



Università degli Studi di Ferrara

Biochimica Clinica

Dispense per corso di laurea in Tecniche di
Laboratorio Biomedico

Prof. C. Bergamini

La biochimica clinica comporta l'impiego di tecniche diagnostiche atte a valutare la presenza di alterazioni a livello di metaboliti che possano avere importanza clinico/diagnostica => a questo proposito si analizzano fluidi corporei valutando l'omeostasi dell'organismo.

SCOPI PRINCIPALI DELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

1. **Diagnosi:** a causa di un sospetto il medico si rivolge al laboratorio per ricevere conferma. Alla conferma della diagnosi seguirà necessariamente la determinazione della corretta terapia.
2. **Monitoraggio della terapia:** alla conferma della diagnosi e individuazione della corretta terapia il laboratorio entra in gioco nel monitoraggio della terapia valutando se i metaboliti che hanno determinato il sospetto nel medico si sono normalizzati.
3. **Prognosi:** attraverso la prognosi si può valutare l'entità della malattia e la capacità dell'individuo di guarirne.

Estremamente importanti, ad esempio, a livello della compartimentazione cellulare sono la distribuzione degli elettroliti e delle proteine.

- **Elettroliti:** i più importanti a livello della compartimentazione sono i cationi monovalenti Sodio e Potassio e gli anioni Bicarbonato e Cloruro. Valori Intracellulari si dosano nel plasma in cui i valori, tipici dell'ambiente Intra e Extracellulare (questi ultimi detti natriemia e kaliemia) sono molto diversi fra loro rispettivamente:

$$Na_i = 15 \text{ meq/L} \quad Na_e = 135-145 \text{ meq/L}$$

$$K_i = 130 \text{ meq/L} \quad K_e = 5 \text{ meq/L}$$

Per effetto del trasporto effettuato soprattutto dalla pompa sodio-potassio.

- **Proteine:** differenze marcate si osservano anche per le proteine, che si dividono fra il compartimento plasmatico e compartimento cellulare perciò proteine plasmatiche e proteine cellulari. Ora, alla morte delle cellule la membrana cellulare perde le sue caratteristiche di selettività e viene meno la caratteristica compartimentazione cellulare. In base a questo ciò che era contenuto nella cellula viene disperso pertanto enzimi specifici possono essere rilevati nel torrente circolatorio => questo dovuto al fatto che grazie alla differenziazione cellulare vengono prodotti enzimi tessuto specifici che possono essere riscontrati.

Nel caso del miocardio un marcatore specifico è la "creatina chinasi II" i cui valori aumentano a livello del torrente circolatorio, nel caso di infarto del miocardio, in maniera proporzionale al tipo e alla entità della lesione. Ecco come l'esame laboratoristico può fornire un risultato prognostico definendo l'entità della malattia e la possibilità del paziente di guarirne.

4. **Screening:** determinare all'interno di una popolazione sana quella frazione di popolazione a rischio di contrarre o sviluppare determinata malattia

Per esempio:

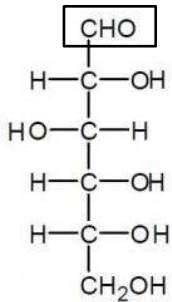
- screening del carcinoma prostatico attraverso il dosaggio del PSA (antigene specifico prostatico) nel torrente circolatorio.
- Screening neonatale per determinare casi di Fenilchetonuria PKU, disordine metabolico del metabolismo della fenilalanina che comporta gravi lesioni a livello

del SNC. (Non è il cretinismo, quello è conseguente ad una insufficienza tiroidea che comporta un insufficiente sviluppo cerebrale).

ACCURATEZZA, PRECISIONE, SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ, APPROPRIATEZZA

Accuratezza: capacità di un metodo di dare risultati simili, ossia un metodo è tanto più accurato quanto i valori ottenuti sono simili dopo diverse misurazioni dello stesso metabolita sullo stesso campione nelle medesime condizioni.

Specificità: capacità del metodo di determinare effettivamente il metabolita d'interesse per cui il metodo è proposto.

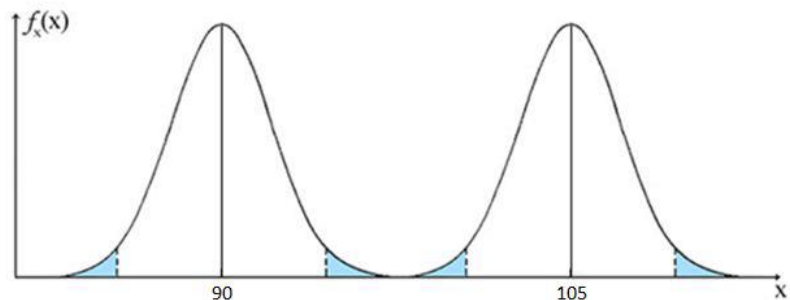


formula di struttura

Per esempio: nel dosaggio del glucosio (aldoso). All'inizio veniva determinato basandosi sui gruppi aldeidici del glucosio, cioè si sfruttava il potere riducente del glucosio, potere a cui però contribuivano anche altri composti riducenti quali bilirubina e vit. C. In definitiva non si andava a dosare solamente il glucosio ma anche altri metaboliti ottenendo come valore normale circa 105. Passando a determinazioni enzimatiche invece è possibile determinare unicamente il glucosio presente a livello del torrente circolatorio; in base a questo a seconda del metodo utilizzato io posso avere valori differenti:

- 105 che si usi la capacità riducente (dosaggio delle aldeidi).
- 90 che si usa la determinazione enzimatica

Diversa pertanto sarà anche la distribuzione della gaussiana rappresentante la popolazione a seconda del metodo impiegato.



Precisione: capacità del metodo di fornire risultati il più possibile vicini al valore vero del metabolita analizzato. L'ampiezza della distribuzione dei valori, quanto si discostano dal valore medio e pertanto la precisione del metodo può essere visualizzata secondo l'ampiezza della gaussiana in cui si distribuiscono i valori della popolazione media. In base a questo un metodo deve risultare sì preciso dando risultati all'interno dell'effettivo range fisiologico, ma deve anche essere in grado di valutare correttamente risultati che effettivamente vi si discostino. Per esempio nel bambino la glicemia è più bassa che nell'adulto pertanto il metodo deve essere in grado di determinare ugualmente quei valori che si discostino sensibilmente dal range normale.

Sensibilità: è il minimo valore di metabolita che il metodo è in grado di rilevare.

Appropriatezza: ossia la richiesta laboratoristica del medico deve essere appropriata alla diagnosi da effettuare.

SITUAZIONI CHE POSSANO DETERMINARE VARIABILITÀ

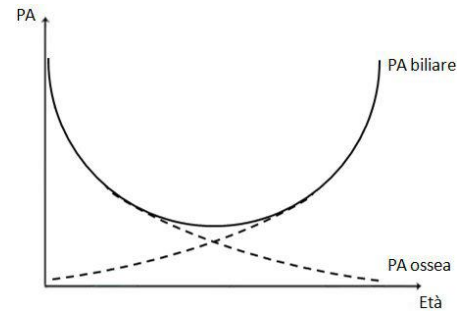
Tipo Biologico

- Stato di salute del soggetto
- Età - Sesso - Costituzione

Per esempio, la fosfatasi alcalina è spesso usata sia come marker della condizione ossea, in quanto favorisce l'ossificazione, sia come marker delle condizioni delle vie biliari.

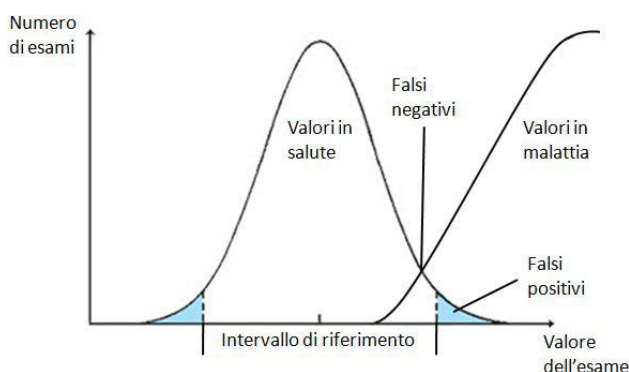
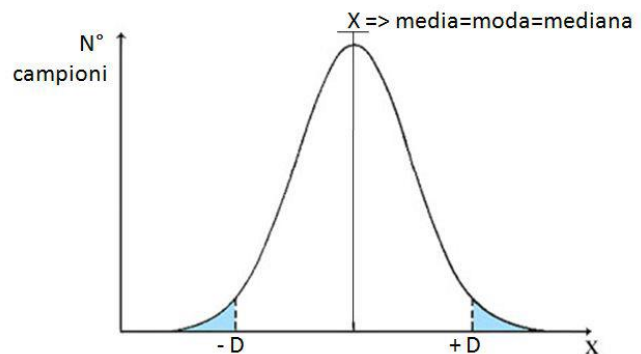
Per il bambino che presenta elevata osteogenesi ed elevata ossificazione, che va a ridursi poi nel giovane adulto e nell'adulto, è evidente come l'andamento della PA sarà variabile in relazione all'età dell'individuo. La PA alcalina con

l'avanzare dell'età cala progressivamente, senza mai azzerarsi perché è sempre presente un certo grado di rimodellamento osseo, fino ad arrivare ad un nuovo aumento con l'avanzare dell'età. Questo aumento è dovuto non ai livelli della PA ossea ma ai livelli della PA di natura biliare perché con l'età il fegato perde progressivamente funzionalità determinando così l'aumento della PA. Il metodo determina però la PA presente senza discernere fra quella di origine ossea o biliare, ed ecco come può essere presente variazione determinata dall'età.



In linea di massima il laboratorista deve determinare la concentrazione di determinati metaboliti in campioni diversi, il più delle volte rappresentati dal sangue, siero e plasma, e di seguito elaborare un referto.

I range di normalità vengono presi da una popolazione sana ed adattati a sesso, età e tipo di popolazione. La popolazione sana presa in esame per stabilire i range risulterà essere distribuita secondo una gaussiana (con media-moda-mediana che coincidono). Il range di normalità viene fissato fra +2 e -2 deviazioni standard; ossia i valori limite sono rappresentati da +2 e -2 deviazioni standard e all'interno di questi due valori, quindi all'interno del range, rientra il 95,6% della popolazione. Il 4% della popolazione dunque risulta per definizione al di fuori del range considerato "normale", ma questo non determina individui malati ma piuttosto casi sospetti che necessitano di ulteriore accertamento. La popolazione malata presenterà una gaussiana in aumento rispetto alla popolazione sana => cioè spostata sulla dx.



Le due popolazioni in realtà possono anche sovrapporsi pertanto la quota della popolazione rappresentata dalla curva malata che entri in quella sana determinerà la quota di falsi positivi.

Quota che può essere minimizzata o massimizzata in base al valore dei limiti di riferimento impostati. Pertanto si può

affermare che eventuali falsi positivi o negativi dipendono da errori d'interpretazione sui limiti di riferimento del range di normalità.

Inoltre, determinato un valore che si discosti dal range di normalità bisogna essere certi che tale variazione sia effettivamente dovuta alla salute del pz. La regola della "**Minima modifica significativa**" consente di valutare se la variazione fra 2 dosaggi dello stesso campione e dello stesso individuo a distanza di alcuni giorni sia una variazione analitica o biologica o una variazione **patologica** e dunque effettivamente legata alla salute del pz.

- *Variazione analitica (Va)*: dipende dal metodo utilizzato e deve essere il meno possibile (si ottiene con la standardizzazione delle procedure)
- *Variazione biologica (Vb)*: valori diversi fra due persone ma entrambi giusti in quanto dovuti ad influenze genetiche, fisiologiche a breve e lungo termine, assunzione di farmaci o sostanze...

Variabilità analitica e biologica determinano la *variabilità globale* $= \sqrt{Vb^2 + Va^2}$ che viene presa in considerazione nel calcolo della *minima modifica significativa* $= 2,8\sqrt{Vb^2 + Va^2}$. Esistono delle tabelle che consentono di valutare la variabilità analitica (Va) e biologica (Vb) del metodo e dunque definire la variabilità totale e la minima modifica significativa. Se il valore della differenza fra i due saggi è $> 2,8\sqrt{Vb^2 + Va^2}$, allora la differenza fra i due risultati è effettivamente dovuta ad una condizione patologica. Per riassumere: la minima modifica significativa prende in esame la variabilità totale e determina se la differenza che si ottiene fra due misurazioni consecutive dello stesso campione e nello stesso paziente è una differenza patologica o meno. Se la differenza fra i due valori ottenuti è $>$ della minima modifica significativa allora la variazione è sì dovuta alle condizioni di salute dell'individuo.

Esempio: nel caso del tumore dell'ovaio viene prodotto a dosi elevate il marcatore CA125 da parte delle cellule tumorali. A seguito della terapia chirurgica il CA125 di contro calerà in relazione alla presenza o meno di tumore residuo. Si potrà dunque valutare la presenza di recidive (dovute al tumore residuo) attraverso dosaggi seriatî in cui si avrà aumento del CA125 nel caso di recidiva. Ecco dunque l'importanza di valutare se la differenza nei dosaggi effettuati è effettivamente una differenza legata allo stato di salute del paziente o legata ad altre variabili.

PRELIEVI LIQUIDI

- Sangue
 - Urine
 - Saliva
 - Liquido amniotico
 - Liquidi intrarticolari
- } I più importanti e utilizzati

Sangue

- **Arterioso:** (arteria femorale) prelevato solo nel caso di emogasanalisi perché, per effetto della elevata pressione arteriosa, il prelievo è difficile e ad elevato rischio di emorragie. L'emogas è un dosaggio che misura il pH e il gas disciolto nel sangue (CO_2 , O_2 , HCO_3):

- Pressione parziale della CO_2 a livello arterioso = 40mmHg
- Pressione parziale della CO_2 a livello venoso = 46mmHg

Questo prelievo deve essere effettuato in siringhe di vetro ad alta tenuta e contenente anticoagulanti, perché nel caso di siringhe di plastica a causa della porosità della stessa la CO_2 tenderà ad uscire per gradiente di concentrazione. Inoltre il campione deve essere mantenuto dentro sacche refrigerate in modo che il metabolismo cellulare sia ridotto al minimo (altrimenti produrrebbe CO_2).

Nel bambino per comodità di prelievo si impiega sangue arteriolizzato che presenta caratteristiche molto simili al sangue arterioso. Viene prelevato da una zona ad alta vascolarizzazione previo riscaldamento dell'area stessa per favorire la dilatazione delle arteriole.

- **Venoso:** (vena brachiale) è costituito da una parte corpuscolata (ematocrito) e da una parte liquida che viene definita :

- **Siero:** si ottiene con la coagulazione del sangue secondo la via intrinseca attivata dal contatto dei fattori della coagulazione con la superficie della provetta e la separazione della parte corpuscolata da quella liquida per centrifugazione. Il completo processo di coagulazione impiega 1h a 37°C . Il siero viene preferito al plasma per l'elettroforesi delle proteine plasmatiche in quanto il fibrinogeno contenuto nel plasma può avere gradi differenti di glicosilazione cambiando le proprietà di migrazione. Per la migrazione si necessita di un pH alcalino in modo che le proteine non si trovino al loro punto isoelettrico, altrimenti non migrano più.
- **Plasma:** differisce dal siero per la presenza del fibrinogeno e dei fattori della coagulazione. Non si deve attendere la coagulazione pertanto i dosaggi su plasma sono molto più rapidi e si evita che il metabolismo cellulare per 1h a 37°C modifichi i parametri. Sul plasma vengono dunque dosati, per esempi, i fattori della coagulazione, il glucosio (in particolar modo il glucosio viene effettuato su plasma perché i globuli bianchi e soprattutto i macrofagi consumano elevatissime quantità di glucosio. Se si dovesse attendere un'ora di coagulazione si osserverebbe alterazione della glicemia pertanto viene immediatamente separata la parte corpuscolata e compiuta l'analisi sul plasma. Necessario dunque evitare la coagulazione attraverso l'impiego di anticoagulanti.

Parlando degli **ANTICOAGULANTI** si ha da distinguere fra:

- *Anticoagulanti in vivo*: come le eparine che vengono utilizzate per prevenire le trombosi nel postoperatorio. Agiscono attivando l'antitrombina III che inattiva la trombina. In vivo si utilizzano anche anticoagulanti per via orale, che inibiscono l'azione della vitamina K
- *Anticoagulanti in vitro*: per il dosaggio degli elettroliti non si possono utilizzare né un chelante né eparine che contengano Na^+ o K^+ in quanto si aggiungerebbero ulteriori elettroliti al campione. Si utilizza dunque eparina di litio o di ammonio. Fra gli anticoagulanti in vitro ricordiamo:
 - **Chelanti del calcio**: non devono essere impiegati per dosare ioni bivalenti come calcio o magnesio => si parla dell'ossalacetato e del **citrato**.
Citrato è un inibitore reversibile della coagulazione utilizzato per la conservazione di cellule da trasfondere e per l'analisi di laboratorio della coagulazione che riprende aggiungendo un eccesso di calcio. Per valutare l'efficacia della coagulazione si misurano i tempi di formazione del coagulo:
PTT => tempo di protrombina che misura l'andamento della via estrinseca (10-15s)
apTT => tempo di tromboplastina parziale attivata che misura l'andamento della via intrinseca (30s)
 - **EDTA**: utilizzato nell'esame dell'ematocrito e dell'emocromo perché inibisce l'interazione fra le cariche delle particelle e non altera le caratteristiche morfologiche delle cellule.

Urine

La minzione è di circa 1.5L al giorno. Nell'esame delle urine diversi sono i parametri che vengono presi in considerazione:

1. **Esame fisico**: in cui vengono presi in considerazione:

- **Colore**: giallo paglierino è il colore normale
- **Densità**: 1,02 - 1,05 g/ml
- **pH**: normalmente è debolmente acido (tra 4,5 e 7) in quanto il nostro è un metabolismo ossidativo che produce acidi dove quelli non volatili vengono eliminati con le urine.
- **Torbidità**: aumenta se sono presenti batteri o muco.

2. **Esame chimico**: esame in cui si vanno a controllare i metaboliti normalmente NON presenti a livello delle urine. Queste analisi vengono effettuate attraverso una scala colorimetrica sfruttando la chimica secca", ossia stick urinari su cui sono fissati indicatori o enzimi i quali virano di colore in base alla concentrazione del metabolita. Fra i metaboliti normalmente non presenti ricordiamo:

- **Elastasi**: enzima tipico dei globuli bianchi in grado di degradare l'elastina. In caso di infezione delle vie urinarie saranno presenti globuli bianchi e conseguentemente le elastasi.
- **Emoglobina**: nel caso di emoglobinuria la striscia reattiva da gialla diventa di un verde più o meno uniforme (emoglobina libera). La presenza di emoglobina indica un processo di emolisi in circolo con rilascio di ferro e conseguenti danni ossidativi.
- **Sangue**: nel caso di ematuria la striscia reattiva assume un aspetto puntiforme conseguente alla diretta presenza di GR nelle urine (GR interi).

- *Glucosio*: Se c'è glucosio significa che la [glucosio] nel sangue è > alla capacità di riassorbimento dei tubuli renali.
 - *Proteine*: Le proteine nelle urine sono presenti fino a 120/150 mg al giorno. Una proteinuria >500 è sempre patologica e si divide in:
 - Proteinuria non selettiva: la lesione è a livello del glomerulo che non filtra bene. Dunque l'origine è glomerulare.
 - Proteinuria selettiva: la membrana è selettiva. Le catene peptidiche >5 KDa non passano il filtro glomerulare e in più è presente una selettività in base alla carica. La presenza nelle di proteine piccole a basso peso molecolare indica una proteinuria selettiva in cui le proteine vengono filtrate ma non adeguatamente riassorbite; origine tubulare.
3. **Esame del sedimento**: 10 ml di urine, vengono centrifugate, si toglie il sopranatante e si risospende il sedimento, ossia la parte corpuscolata in cui si ricercano:
- *Cellule*: normalmente si riscontrano cellule di sfaldamento delle basse vie urinarie fra cui possono essere presenti anche leucociti e globuli rossi. I GR possono essere indizio sia di situazione fisiologica (ciclo mestruale) che patologica (emorragia). Per capire l'origine dell'emorragia si fa la raccolta di urina dei 3 bicchieri: se i GR sono in maggior quantità nel 1° la lesione è a livello dell'uretra; se sono più alti nel 2° la lesione è a livello della vescica; se sono più alti nel 3° la lesione è nelle prime vie urinarie (reni, bacinetto o ureteri).
 - *Cilindri*: piccole formazioni a bastoncino, generalmente di 3 tipi:
 - Cilindri di GR: legati ad un accumulo di gr nelle urine,
 - Cilindri di GB: legati ad infezione delle vie urinarie,
 - Cilindri ialini: formate da proteine precipitate all'interno del tubulo in seguito a proteinuria,
 - Cristalli: si parla di "litiasi" delle vie urinarie in cui viene studiata la forma del cristallo:
 - Aghiformi (cisteina)
 - A bara (fosfato di Ca^{++})
 - A lettera (ossalato di Ca^{++})
 - A losanga (rosei brillanti e semi trasparenti => cristalli di acido urico)
 - *Batteri*: al microscopio ottico si evidenzia lo sciamaggio dei batteri che sembrano formare delle correnti. La presenza di batteri determina la presenza di GB e dunque di elastasi e di urine alcaline in quanto per la maggior parte si tratta di batteri intestinali **ureasi+** che scindono l'urea determinando alcalinità e forte odore di ammoniaca.

Saliva

Presenta alcune componenti proprie come le α -amilasi ed elevate concentrazioni di ioduro di potassio. Per la maggior parte la saliva rispecchia le concentrazioni proteiche riscontrate nel plasma. Variazioni si possono ottenere nel caso di alterazioni nel flusso di saliva ma in forma generale restituisce buoni risultati e oltretutto non è un prelievo invasivo.

PROTEINE PLASMATICHE

Per il dosaggio si preferisce utilizzare il siero per evitare problemi dovuti alla glicosilazione del fibrinogeno contenuto nel plasma. La loro concentrazione si aggira sui 70 g/L e il 55% è rappresentato dall'Albumina.

Funzioni

- *Carrier*: funzione di trasporto di diverse sostanze all'interno del torrente circolatorio
- *Difensivo*: ad opera per esempio dei fattori del complemento e degli anticorpi
- *Proteasica*:
 - Endoproteasi: degradano diversi frammenti idrolizzando i legami peptidici interni, dunque endopeptidasi. Un esempio sono le endoproteasi pancreatiche quali tripsina-chimotripsina ed elastasi. Se queste passano in circolo come nel caso delle pancreatiti acute vanno a determinare lesioni di tutti gli organi con edema polmonare e cerebrale. In circolo pertanto esistono appositi inibitori delle proteasi.
 - Esoproteasi: degradano partendo da amino o carbossiterminale pertanto si tratta di amino e carbossipeptidasi.

È importante ricordare che la presenza di un soluto disciolto in un solvente modifica le proprietà della soluzione rispetto a quelle del solvente puro. Queste proprietà vanno sotto il nome di **proprietà colligative** e sono:

- Pressione osmotica
- Temperatura di congelamento
- Tensione di vapore
- Temperatura di ebollizione

Le proprietà colligative dipendono **esclusivamente dal numero** di particelle di soluto presenti nel solvente e non dalla loro natura chimica e fisica (se due soluzioni danno valori uguali per una delle proprietà colligative, daranno valori uguali anche per le altre).

Fra le proprietà colligative la pressione oncotica (o colloid-osmotica) è quella di maggior interesse a livello del torrente circolatorio.

(ATT: pressione osmotica è riferita ad una soluzione acquosa contenente soluti, pressione oncotica è riferita ad una soluzione colloidale cioè contenente proteine => la pressione oncotica è la pressione osmotica esercitata da soluzioni colloidali)

La pressione colloid-osmotica è il fenomeno per cui una soluzione con concentrazione diseguale ai 2 lati di una membrana semipermeabile tende a diluirsi. Questo fenomeno è evidente a livello del letto capillare della porzione arteriosa secondo la legge di Starling:

$$J_v = K_f [(P_c - P_i) - \sigma(p_{pc} - p_{pi})]$$

Dove:

J_v = movimento del liquido (ml/min)

K_f = conduttanza idraulica o coefficiente di filtrazione (ml/min mmHg)

P_c = pressione idrostatica del capillare (mmHg)

P_i = pressione idrostatica interstiziale (mmHg)

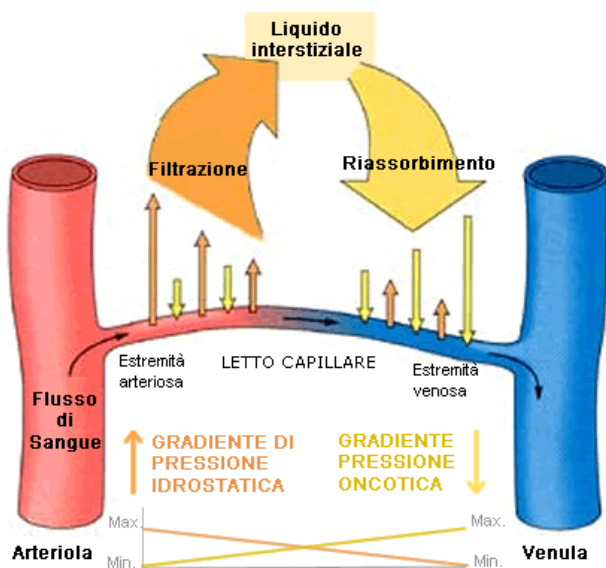
σ = coefficiente di riflessione

p_{pc} = pressione oncotica del capillare (mmHg)

p_{pi} = pressione oncotica interstiziale (mmHg)

Sono due i fattori principali che si articolano nella legge di Starling:

1. la **pressione idrostatica** all'estremità arteriosa del capillare si aggira intorno ai 35 mmHg, mentre quella all'estremità venosa è circa la metà (15 mmHg). Tali valori riflettono la pressione laterale esercitata dal flusso ematico, che tende a spingere fuori il liquido attraverso le pareti del capillare stesso. Al contrario, la pressione idrostatica esercitata dal liquido interstiziale (stimabile in 2 mmHg), favorisce il percorso contrario, premendo contro le pareti del capillare e favorendo l'ingresso dei liquidi al suo interno.
2. la **pressione oncotica**, strettamente dipendente dalla concentrazione di proteine nei due compartimenti rappresenta quella forza che regola il passaggio di acqua per diffusione semplice dal compartimento "proteicamente" meno concentrato a quello più concentrato, attraverso una membrana semipermeabile ad essi interposta (che si lascia attraversare dall'acqua ma non dalle proteine in essa presenti). La pressione oncotica esercitata dalle proteine presenti nel sangue è pari a 25 mmHg, ed ostacola la fuoriuscita dal capillare dei soluti e del solvente. Nel liquido interstiziale essa è pressoché trascurabile.

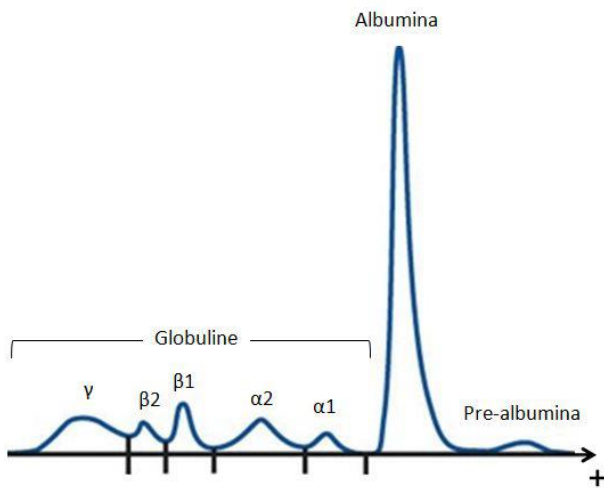


Dunque secondo la legge di Starling all'estremità arteriosa del capillare avremmo una pressione netta di filtrazione pari a: $[(35-(-2))] - (25-0) = 12$ mm Hg tale pressione determina l'uscita dei liquidi e dei metaboliti presenti nel sangue (avviene la filtrazione).

Quando il sangue lascia il ventricolo sinistro, l'aorta e le grosse arterie si espandono per accoglierlo. Quando, invece, il ventricolo si rilassa e le valvole semilunari si chiudono, si ha un ritorno elastico delle pareti arteriose che spinge il sangue verso le arterie più piccole e le arteriole. La pressione del sangue è alta nelle arterie e decresce in modo continuo man mano

che il sangue fluisce lungo il sistema circolatorio. La diminuzione della pressione è dovuta alla perdita di energia determinata dalla resistenza dei vasi al flusso. Pertanto se lungo il passaggio nei capillari la velocità e la pressione idrostatica si riducono a causa dell'attrito ma le pressioni oncotiche tendono a rimanere uguali, all'estremità venosa del capillare avremmo una pressione netta di filtrazione pari a: $[(15-(-2))] - (25-0) = -8$ mmHg tale pressione determina l'ingresso dei liquidi e dei metaboliti cellulari nel sangue (avviene il riassorbimento).

In questo senso il sistema circolatorio si comporta come un sistema chiuso in cui si determinano uscite di fluidi a livello della parte arteriosa del letto capillare con un flusso di rientro di identica entità ma in direzione opposta in modo che "il sistema non si svuoti".



In circolo sono presenti 70g/L di proteine, circa il 7% del volume ematico. Le proteine plasmatiche possono essere divise in 2 categorie, originariamente distinte sulla base delle loro proprietà di solubilità, ora sulla mobilità elettroforetica. Si tratta di:

1. *albumina*: del peso di 64kD è l'unica proteina presente in singola copia (ecco perché un singolo picco) e la più abbondante come concentrazione molare. 40-42 g/L rappresenta circa il 55% delle proteine plasmatiche, con emivita di 20gg. A pH 8.8 presenta una carica elevata e un'elevata

motilità. Fra le albumine ricordiamo le pre-albumine come la proteina di legame del retinolo e la transtiretina, proteine con emivita fra 12-48h che si rinnovano pertanto con > velocità rispetto all'albumina.

2. globuline

Il miglior metodo per separare le proteine plasmatiche è l'elettroforesi sulle proteine del siero. Le proteine sottoposte ad un campo elettrico migrano verso il polo di segno opposto con migrazione direttamente proporzionale alla carica e inversamente proporzionale alla massa. Pertanto una proteina che sia al suo punto isoelettrico (cioè carica netta pari a zero) non avrà alcuna mobilità in campo elettrico. La presenza di gruppi carbossilici o gruppi amminici in base al pH influenza la mobilità della proteina:

- Gruppi carbossilici: acido aspartico e acido glutammico hanno gruppi acidi che possono andare incontro a processo di dissociazione dando $\text{COO}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{COOH}$ con costante di dissociazione $\text{pK} = 4$. Perciò a pH inferiori a 4 i gruppi carbossilici esistono nella forma indissociata.
- Gruppi amminici: come arginina e lisina i cui gruppi possono andare in contro a dissociazione dando $\text{R-NH}_3^+ \leftrightarrow \text{NH}_2 + \text{H}^+$ con costante di dissociazione $\text{pK} = 9$. A pH inferiore a 9 il protone è legato e la proteina si trova in forma R-NH_3^+ assumendo carica positiva.

A pH = 2 per esempio COOH è indissociato e il protone legato dando R-NH_3^+ .

La proteina avrà carica netta positiva e dunque migrerà se sottoposta a campo elettrico.

Albumina

Funzioni:

- *Regolazione della pressione colloidale-osmotica* costituendo oltre il 50% delle proteine plasmatiche
- *Regolazione della distribuzione dei liquidi*: un calo di albumina determina una condizione edematosa (formazione di edemi) poiché, come regolatore della pressione colloidale-osmotica, richiama liquidi dagli spazi interstiziali. (Nota: Se cala l'albumina cala la pressione oncologica e dunque cala il riassorbimento venoso => legge di Starling). Cali dell'albumina possono essere riscontrati nel caso di:
 - Mancata sintesi: a causa di denutrizione e dunque per il mancato apporto di aa o in seguito a deficit di funzionalità epatica; ossia deficit del tessuto che normalmente la produce,

- Infiammazione: infatti quando tende a passare nel liquido interstiziale è indice di uno stato infiammatorio conseguente all'aumento della permeabilità vasale,
 - Reazioni di fase acuta,
 - Malattie renali: con elevati livelli di proteinuria,
 - Ustioni gravi: con accumulo di grandi quantità di liquidi contenenti albumina nei tessuti conseguentemente all'abnorme permeabilità vasale.
 - Enteropatie albuminodisperse,
 - Accumulo nei terzi spazi: come a livello della cavità addominale conseguentemente a cirrosi epatica con grande perdita di liquidi contenenti elevate concentrazioni di albumina.
 - *Funzione di trasposto*: l'albumina è una singola molecola con 3 tasche idrofobiche che consente il trasposto di acidi grassi, farmaci, bilirubina, ormoni steroidei (sistemi di trasporto specifici) e ioni (in particolare calcio)
 - *Funzione di riserva di aminoacidi per le cellule*: ulteriore funzione della presenza dell'albumina a livello dei tessuti è quella di essere degradata per fornire aa necessari alla sintesi di nuove proteine.
- Nota - Gli amminoacidi si dividono in:
- Essenziali: devono essere forniti con la dieta. Sono Valina, Leucina, Isoleucina, Metionina, Lisina, Treonina, Fenilalanina e Triptofano. Pertanto le proteine con bassa emivita in assenza di aa essenziali sono quelle i cui livelli calano più velocemente. Queste consentono di monitorare lo stato nutrizionale del pz
 - Non essenziali: non devono essere necessariamente forniti con la dieta.
- *Contribuisce al controllo del pH* (come tutte le proteine): liberano l'elettrone e lo rilasciano. L'aminoacido coinvolto nell'equilibrio acido-base è l'istidina.

Globuline

Le Globuline si dividono in tre gruppi elettroforetici (alfa, beta, gamma) di cui i primi due sono a sintesi epatica e si dividono poi in due sottogruppi alfa1/2 e beta1/2, mentre le gamma globuline sono a sintesi linfocitaria.

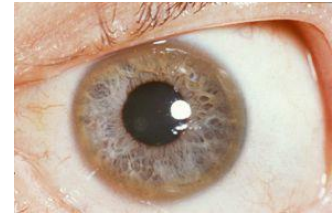
Tra le **alfa 1 globuline** si distinguono:

- *$\alpha 1$ glicoproteina acida*: funzione di legame e trasposto di materiale lipidico. È una proteina di fase acuta positiva,
- *$\alpha 1$ fetoproteina*: proteina sintetizzata durante la vita fetale e regola la pressione colloid-osmotica nell'adulto. Nella donna gravida i livelli di $\alpha 1$ fetoproteina aumentano; nel caso in cui siano presenti gravi difetti dello sviluppo della corda neurale i livelli aumentano fino a 500-1000 mg/dL
- *$\alpha 1$ antitripsina*: viene prodotta da fegato, macrofagi e cellule epiteliali respiratorie e successivamente immessa nel circolo sanguigno. L' $\alpha 1$ antitripsina blocca l'elastasi neutrofila (una proteasi) evitando che venga danneggiato l'epitelio polmonare. Pertanto forme di enfisema polmonare possono essere direttamente correlate a deficit di $\alpha 1$ antitripsina.

Tra le **alfa 2 globuline** si ritrovano:

- *Ceruloplasmina*: proteina di grande PM che trasporta il rame ai tessuti periferici e controlla lo stato di ossidazione del Ferro (controlla la conversione di Fe²⁺ a Fe³⁺)
 - Fe²⁺ => radicali dannosi
 - Fe³⁺ => radicali non tossici

Il Morbo di Wilson è una malattia genetica caratterizzata dalla mancata sintesi di ceruloplasmina a livello del fegato con danni a livello di fegato, cuore, pancreas e iride (segno caratteristico è l'anello di Kayser Fleisch; il deposito di ferro attorno all'iride)



- *Aptoglobina*: lega l'emoglobina che può liberarsi dopo un processo di emolisi e viene successivamente rimossa dai macrofagi.
- *α2 macroglobulina*: inibitore delle proteasi. L'α1 antitripsina cede le proteasi all'α2 macroglobulina che le porta al fegato.

Tra le **beta 1 globuline** si trova la proteina C reattiva: proteina di fase acuta positiva. È un'opsonina, la faccia inferiore della proteina tende a legare il calcio cambiando le caratteristiche di carica dell'altra faccia la quale reagisce con i mucopolissacaridi batterici favorendo l'attacco degli anticorpi. Un soggetto sano presenta proteina C reattiva a bassi livelli (5-10mg/mL). Se il soggetto contrae un'infezione virale la proteina C reattiva aumenta progressivamente (50-100mg/mL) per raggiungere un picco massimo nelle 24h (aumenta anche nei tumori). Se le terapie sono efficaci, i livelli di proteina C reattiva calano pertanto documenta la progressione della malattia.

Tra le **beta 2 globuline** si trova la transferrina: è una proteina plasmatica che trasporta il ferro nel torrente circolatorio. Sintetizzata dal fegato e dal sistema monocitico-macrofagico, la transferrina è in grado di legare in modo molto stabile, ma reversibile, il ferro assorbito a livello intestinale e quello proveniente dalla degradazione dei globuli rossi, veicolandolo alle sedi di utilizzo (in particolare il midollo osseo) e di deposito (in particolare il fegato).

γ Globuline o Immunoglobuline

Mentre le catene leggere possono essere di tipo κ o λ, esistono 5 tipi di catene pesanti: α, ε, γ, δ e μ ciascuna delle quali da origine ad una delle 5 classi di immunoglobuline:

- *IgG*: 10-12 g/L sono i principali anticorpi di difesa. Sono proteine monomeriche costituite da due catene pesanti e due leggere in grado di attraversare la placenta.
- *IgM*: 1,5 g/L costituiscono la risposta primaria. Sono immunoglobuline pentameri che non attraversano la placenta.
- *IgA*: 3,5 g/L sono immunoglobuline di secrezione presenti a livello di mucose e sierose (sono presenti le forme di secrezione tanto quanto le forme dimeriche).
- *IgD*: la loro quantità è infinitesimale. Si ritrovano soltanto sulla superficie dei linfociti B immaturi con unica funzione quella di attivare i linfociti B e di promuovere la loro maturazione verso lo stadio di plasmacellule quando vengono a contatto con l'antigene per il quale sono specifici.
- *IgE*: coinvolte nei processi allergici dunque si riscontrano livelli aumentati solamente nel caso di risposte allergiche.

Iperglobulinemie: aumento conseguente a processi infiammatori infettivi oppure reazioni di tipo autoimmune.

Ippoglobulinemie

L'ippoglobulinemia è fisiologica nel neonato e nei primi mesi di vita



IgG: trattandosi di IgG materne calano subito dopo il parto e successivamente vengono prodotte dal bambino

IgM: aumentano con lo sviluppo del sistema immunitario del bambino

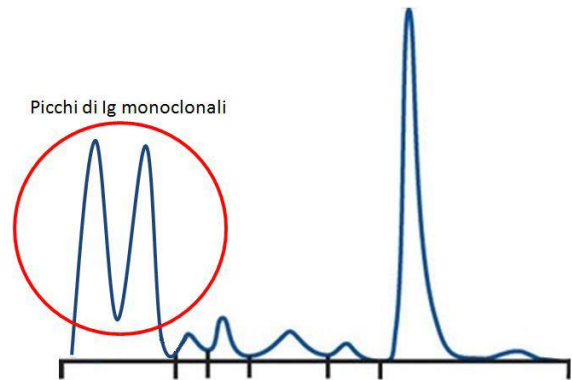
IgA: si sviluppano verso i 10 anni di vita.

L'ippoglobulinemie patologiche sono:

- **Sindrome di Bruton:** caratterizzata da forte riduzione o dall'assenza totale di linfociti B in circolo.
- **Sindrome di Wiskott-Aldrich:** caratterizzata da un difetto di produzione dei linfociti T e da associazione con timoma, acondroplasia e lesioni cerebellari (atassia)

Nell'adulto si possono avere sindromi gravi legate ad alterazioni midollari, leucemie, mielomi, AIDS... che si associano allo sviluppo di paraproteinemie ossia una condizione anomala per cui le Ig sono prodotte da un singolo clone di plasmacellule.

Ciò può accadere in un tumore di origine midollare che determini l'espansione clonale di una singola linea linfocitaria determinando l'aberrante produzione di una sola classe di immunoglobuline e la quasi scomparsa delle altre classi. È il caso per esempio della sindrome di Waldenström caratterizzata dallo sviluppo di un tumore (cellule B) che produce IgM come proteina monoclonale; molto grandi che comportano un terribile aumento della viscosità del sangue. Scomparirà, dunque, il classico profilo delle γ -globuline per lasciar posto a picchi monoclonali.



Proteine Di Fase Acuta Positiva

I livelli di proteine non sono costanti ma alcune aumentano di concentrazione (Fase acuta positive) nel caso in cui il soggetto abbia una qualche patologia. I fenomeni di fase acuta comportano un

	Età (anni)	VES media (mm/h)	Range (mm/h)
Uomini	20-49	5	0-13
	50-69	7	0-19
Donne	20-49	9	0-21
	50-69	12	0-28

aumento dell'adesività della proteine ai globuli rossi i quali tendono ad aderire gli uni agli altri formando agglomerati e determinando l'aumento della VES. La velocità di eritrosedimentazione viene valutata su sangue intero non coagulato in eparina. Solitamente la VES è ridotta ma risulta aumentata in stati patologici come tumori ed infiammazioni. L'aumento della VES fa parte delle così dette "reazioni di fase acuta" conseguenti all'immissione in circolo di peptidi regolatori (Es IL-6) che controllano la produzione da parte del fegato di proteine di fase acuta che tendono ad aumentare. La proteina C reattiva (opsonina) è quella che subisce le variazioni maggiori: in stati infiammatori la pCr aumenta la sua concentrazione fino a 50x 100x fra le 6-8h dall'inizio del processo infiammatorio; resta elevata a lungo ma

cala quando il processo è in via di risoluzione.

Invece α_1 antitripsina, C3 e C4 (complemento) aumentano più lentamente e scompaiono più tardivamente. Ora, se queste proteine di fase acuta aumentano, in generale determineranno l'aumento dell'osmolarità colloidale, pertanto devono esistere delle proteine di fase acuta negativa che calano mantenendo costante l'osmolarità. Queste proteine sono la transferrina, il fibrinogeno e in particolar modo l'albumina che cala in seguito alla vasodilatazione e alla fuoriuscita di liquidi dovuti alla reazione di fase acuta stessa.

MARKER D'ORGANO o MARKER DI DANNO TESSUTALE

La differenziazione cellulare risiede nella diversa attivazione genetica da parte delle cellule; cellule muscolari scheletriche o cardiache presenteranno un accumulo di proteine contrattili rispetto alle cellule epatiche adibite a sintesi. Pertanto nel caso di lesioni di un tessuto che determinino fenomeni di lisi cellulare o aumentata permeabilità della membrana si può avere fuoriuscita dalla cellula di enzimi e proteine caratteristiche della cellula stessa tali da consentire la determinazione dell'origine della lesione. La fuoriuscita delle proteine cellulari tuttavia non sempre segnala un vero processo di morte cellulare, perché si può verificare anche in caso di lesioni potenzialmente reversibili, in relazione a modifiche del metabolismo energetico. A questo proposito va ricordato che il metabolismo giornaliero di un soggetto sano richiede circa 2000 Kcal/giorno. Se si riduce la quantità di moto che si effettua si riduce anche la quantità di energia necessaria; dunque man mano che si riduce il lavoro si dovrebbe ridurre l'apporto energetico. Ma non ridurre allo 0 perché vi sono processi che devono procedere sempre e costantemente, dunque con metabolismo basale s'intende il minimo apporto energetico necessario per mantenere la vita e l'omeostasi dell'organismo. Per lo più si tratta di mantenere la differenza di potenziale di membrana delle cellule, dunque mantenere l'azione delle pompe ATPasiche Na/K. Se cala l'apporto nutrizionale oltre un certo valore, di contro si avrà un calo dell'ATP con squilibri nel gradiente. Il Na tenderà ad aumentare nella cellula e di contro aumenterà il volume di acqua all'interno della stessa (il Na ha la funzione di regolare la concentrazione dell'acqua); le cellule dunque si distendono e le membrane si stirano con tendenza ad alterazioni della permeabilità e fuoriuscita di sostanze proprie della cellula, come enzimi, che vengono riversati nel torrente circolatorio. Essendo presenti enzimi diversi da tessuto a tessuto è possibile ricercare lesioni d'organo misurando le proteine plasmatiche rilasciate dalle cellule stesse implicate nella lesione. La presenza di questi enzimi evidenzia il danno di tessuti periferici (vengono infatti indicati come "markers di danno tissutale"), ma chiaramente ci sono pure enzimi immessi direttamente in circolo per svolgere lì la loro funzione fisiologica ("enzimi residenti"). I più importanti sono:

- *Fattori della coagulazione*
- *Colinesterasi*: è un enzima secreto costitutivamente dal fegato ad alti livelli ma la cui concentrazione cala in caso di danno epatico. L'enzima degrada l'acetilcolina e viene dosato per via del fatto che le colinesterasi sono inibite dagli esteri fosforici => utili nel caso di intossicazioni sul lavoro e perché la loro misura esprime una sensibilità individuale agli anestetici e ai miorilassanti in modo tale che il suo dosaggio è consigliabile in fase preoperatoria.
- *ACE*: che convertono l'angiotensina I in angiotensina II nel sistema renina-angiotensina-aldosterone implicato nel controllo del metabolismo del sodio.

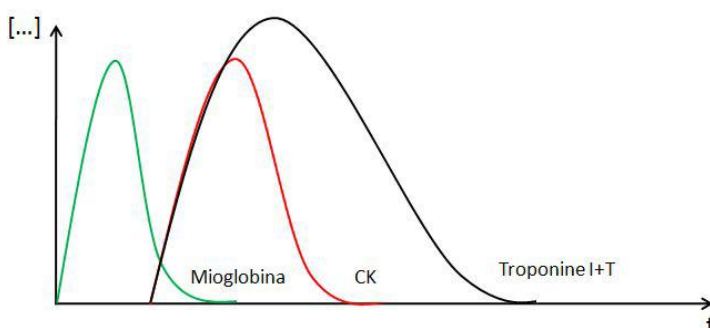
I marker enzimatici di danno tissutale vengono dosati in particolare in caso di patologie ossee, cardiache, epatiche, delle vie biliari, pancreatiche e muscolari.

- *Pancreas*: i markers pancreatici sono rappresentati dagli enzimi digestivi liberati nelle fasi acute d'infiammazione del pancreas. Durante le pancreatiti acute a causa di calcoli gli enzimi pancreatici non raggiungono l'intestino ma ristagnano nel pancreas venendo attivati in sede e digerendo l'organo stesso. Vengono dunque dosati "lipasi e amilasi" anche se il danno principale è causato dalle proteasi difficili però da dosare.

- *Vie biliari*: fosfatasi alcalina e γ -glutamyltranspeptidasi, quest'ultimo implicato nel metabolismo del glutatione e trasporto degli aminoacidi attraverso la membrana cellulare. Aumentano nel caso di occlusioni.
- *Fegato*: transaminasi quali ALT => alanina transaminasi; AST => aspartato transaminasi. Aumentano nel caso di lesioni del parenchima epatico.
- *Prostata*: si dosa una fosfatasi acida tartrato sensibile che aumenta quando la prostata è affetta da tumore che ha sconfinato dalla capsula prostatica invadendo i tessuti circostanti e la PSA, una proteasi coinvolta nel processo di capacitazione dello spermatozoo.
- *Muscolo*: i marker dipendono dal tipo di patologia:
 - Alterazioni dell'innervazione comportano miopatiti neurogene che però non sono evidenziabili con aumento di marker come nelle altre.
 - Infiammazioni degenerative comportano miopatiti infiammatorie. Queste vengono evidenziate con aumento di: adenilato chinasi, creatin chinasi, lattico deidrogenasi, aldolasi che aumentano precisamente in questa sequenza in quanto il loro peso molecolare è in ordine crescente e la loro comparsa correla al procedere della patologia.
- *Cuore*: aumento si riscontra soprattutto nell'infarto del miocardio con morte anossica dei miocardiociti e uscita degli enzimi. Parliamo di:
 - Mioglobina: ATT è un marker d'esclusione perché presente anche in caso di danno al muscolo scheletrico,
 - Troponine: alcune isoforme sono presenti sia nel cuore che nel muscolo:
 - C => sia cuore che muscolo
 - I; T => presentano delle sequenze terminali specifiche solo per le cardiache
 - Creatinchinasi: se ne riscontrano 3 isoforme presenti in concentrazioni diverse in organi diversi:
 - CK-BB: isoforma cerebrale dove è presente al 96%
 - CK-MM: isoforma muscolare presente al 60% nel miocardio
 - CK-MB: isoforma mista presente al 35-40% nel miocardio

Naturalmente la presenza di questi marker dipende pure dalla velocità con cui vengono rimossi:

- Mioglobina: 1-24h
- CK: 6-48h
- Troponine: aumentano con la CK ma restano elevate per giorni.



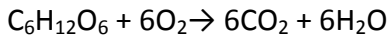
Pertanto le troponine vengono valutate per far diagnosi di infarto del miocardio, le CK avendo bassa emivita si sfruttano per porre diagnosi di reinfarto (questo può accadere per esempio nel caso di un altro pezzo di placca aterosclerotica che entri in circolo determinando ostruzione di una coronaria in una seconda posizione).

EQUILIBRIO ACIDO-BASE

Secondo la teoria acido-base di Brønsted-Lowry

- un acido è una specie chimica capace di donare uno ione H⁺ ad un'altra specie chimica;
- una base è una specie chimica capace di accettare uno ione H⁺ da un'altra specie chimica.

Ora, il metabolismo dei mammiferi e dell'uomo è un metabolismo di tipo ossidativo.

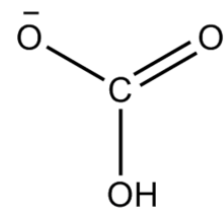


Nel caso del metabolismo ossidativo dei carboidrati, il quoziente respiratorio cioè il rapporto fra il volume di CO₂ emessa e di ossigeno consumato $Q = CO_2/O_2$ (6/6) è uguale ad 1 cioè la proporzione fra CO₂ prodotta e O₂ utilizzato per produrla è di 1:1. Questa situazione si verifica soltanto nel caso che il metabolismo intermedio utilizzi solo i carboidrati.

Nel caso del metabolismo dei lipidi, invece, si richiede un apporto di ossigeno maggiore rispetto a quello che serve per ossidare un carboidrato. $C_6H_{12}O_2 + 8O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$. Di conseguenza il rapporto $Q = CO_2/O_2$ è 6/8, cioè 0.75 (serve più ossigeno).

Per un acido grasso la Q varia a seconda della lunghezza della catena, in quanto il quoziente respiratorio cala ulteriormente se si utilizzano lipidi a catena più lunga. $Q = 0.7 \rightarrow$ coefficiente respiratorio limite per l'ossidazione dei lipidi.

Ad ogni modo, l'ossidazione di una molecola di glucosio o di un lipide che sia, porta alla formazione di un certo numero di molecole di CO₂ le quali vanno incontro ad una reazione spontanea d'idratazione accelerata dall'enzima "carbonico anidraasi", e successivamente dissociazione formando lo ione bicarbonato:



È chiaro quindi che dal metabolismo ossidativo si abbia la formazione di protoni ossia specie estremamente reattive in quanto costituite dal singolo nucleo a carica unitaria, con alta densità di carica. Il protone pertanto viene idratato ad H₃O⁺ (idrogenione) con una produzione giornaliera normale pari a 25 moli. Il protone che deve essere veramente tenuto in considerazione però è quello che deriva dalla reazione di ossidazione di cisteina e metionina, cioè degli aa contenenti zolfo. Questo perché il protone che deriva dall'idratazione della CO₂ è una produzione virtuale per via della presenza di organi specializzati nell'eliminazione del protone determinando lo spostamento verso sinistra dell'equilibrio della reazione di idratazione della CO₂:

- Polmone: elimina la CO₂ determinando lo spostamento dell'equilibrio verso sinistra limitando la produzione del protone per idratazione della CO₂ e favorendo la produzione di CO₂ successivamente eliminata,
- Rene: elimina solfati, fosfati acidi e ione ammonio favorendo il riassorbimento di bicarbonati che determinano lo spostamento dell'equilibrio a destra favorendo l'espulsione della CO₂ e lo smaltimento del protone

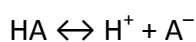
Questi due organi agiscono a livello dello smaltimento del protone influenzando sull'equilibrio della reazione d'idratazione della CO₂. Si tratta di un sistema in rapido equilibrio e quindi l'effettiva produzione di acidi per la fisiopatologia deriva dall'ossidazione di aminoacidi contenenti zolfo: dall'ossidazione di questi aa si producono 80mM di H⁺.

Pertanto un protone prodotto in organi di periferia, per arrivare a rene e polmone ed essere espulso deve viaggiare nel torrente circolatorio però tamponato, per non determinare problemi. Può essere trasportato legato a proteine quali albumina o emoglobina oppure legato ad anioni

(uno ione negativo) di acidi relativamente deboli ma presenti in concentrazioni relativamente elevate in circolo.

Essendo noto il pH del sangue a 7,4 è possibile valutare attraverso l'equazione di Henderson-Hasselbalch quale sia l'anione con miglior effetto tamponante, ossia quale determini la minor variazione del pH sanguigno. (Una soluzione tampone è formata da un acido debole e dal suo sale associato che dissociando garantirà un eccesso dell'anione).

Consideriamo il rilascio di un protone di un acido debole:



La forma salina o base coniugata A^- è la forma ionizzata di un acido debole.

La costante di dissociazione:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

cioè il valore di pH al quale la concentrazione della forma dissociata e indissociata sono uguali.

Quanto più alto è il valore di K_a tanto più l'acido è forte perché si è convertito per la maggior parte in H^+ e A^- .

Riarrangiando l'equazione di Henderson-Hasselbalch si ottiene che:

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Ora, essendo la funzione dei sistemi tampone più efficace quando la pK_a è prossima al pH di interesse, nel definire il miglior tampone fra:

- Fosfati: $pK = 6.8 \approx 2-3 \text{ mM}$
- Bicarbonato: $pK = 6.1 \approx 27 \text{ mM}$

appare chiaro come il bicarbonato risulti avere una pK meno favorevole all'azione tamponante rispetto ai fosfati, ma grazie all'elevata concentrazione e alla possibilità di essere prodotto rapidamente attraverso l'idratazione della CO_2 la cui concentrazione può variare con la respirazione, o alla

Sistema Tampone

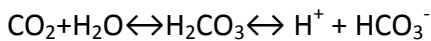
Un sistema tampone mantiene quasi costante il pH di una soluzione perché impedisce che in essa aumenti la concentrazione degli ioni H^+ o OH^- qualora essi vengano aggiunti alla soluzione. Questa azione può essere svolta soltanto se il sistema contiene una quantità sufficiente di una specie capace di sequestrare gli ioni H^+ e di un'altra specie capace di liberarli in modo da neutralizzare gli ioni OH^- aggiunti. Le specie adatte sono un acido debole e la sua base coniugata, oppure una base debole e il suo acido coniugato; la scelta della coppia acido-base coniugata dipende dal valore di pH a cui si vuole operare.

Come esempio, possiamo considerare la coppia acido acetico/ione acetato, cioè CH_3COOH/CH_3COO^- ; l'acido e la base coniugata sono legati dal seguente equilibrio: $CH_3COOH = H^+ + CH_3COO^-$

Nel caso si aggiungano ioni H^+ alla soluzione, per il principio di Le Chatelier l'equilibrio di ionizzazione dell'acido acetico regredisce e ciò comporta che la maggior parte degli ioni H^+ aggiunti vengano sequestrati dagli ioni acetato per dare acido acetico non ionizzato. Nel caso, invece, vengano aggiunti alla soluzione ioni OH^- , essi reagiscono con gli H^+ presenti per dare acqua; la scomparsa degli ioni H^+ provoca però lo spostamento a destra dell'equilibrio di ionizzazione dell'acido, così che si liberano nuovi ioni H^+ . Il risultato finale è che le concentrazioni di ioni H^+ e OH^- rimangono quasi inalterate.

Un tampone come questo non può però essere costituito soltanto da acido acetico perché gli ioni acetato che esso genera sono troppo pochi; in un litro di soluzione di acido acetico 1 M, infatti, c'è quasi una mole di acido acetico non ionizzato e poco più di 10^{-3} moli di ioni acetato. Per incrementarne la quantità, si può procedere in modi diversi; il più comune è quello di aggiungere un sale che lo contenga, per esempio l'acetato di sodio, $CH_3COO-Na^+$, che, in quanto sale, è un elettrolita forte e libera in acqua tutti i suoi ioni.

possibilità di essere riassorbito per via renale, l'azione tamponante del bicarbonato risulta essere quella biologicamente maggiore. Applicando l'equazione di Handerson-Hasselbach alle anidridi si ottiene che:



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2][\text{H}_2\text{O}]} \quad (\text{H}_2\text{O} \text{ costante. Si incorpora nella } K_a)$$

$$\frac{1}{k} = \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]} \rightarrow [\text{H}^+] = \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} \times K \rightarrow \text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}^+]}$$

Sostituendo i dati all'equazione si ottiene: $\text{pH} = 6,1 + \log_{10} \frac{27 \text{ mM}}{1,2 \text{ mM}} = 6,1 + \log_{10} 22,5 = 7,4$ ossia l'impiego del bicarbonato come sistema tampone restituisce esattamente il valore del pH fisiologico, cosa che non si ottiene con i fosfati.

Alterazioni di questo equilibrio con variazione del pH fisiologico vanno sotto il nome di:

- Acidosi: per riduzione del pH $\Rightarrow \log_{10} < 1,3$
- Alcalosi: per incremento del pH $\Rightarrow \log_{10} > 1,3$

Essendo la pKa evidentemente una costante relativa al tampone considerato, è chiaro come situazioni di acidosi o alcalosi dipendano da variazioni nelle concentrazioni dell'anione bicarbonato e della CO_2 .

Le lesioni primitive che determinano:

Situazioni di acidosi

- Per riduzione del bicarbonato (acidosi metabolica)
- Per aumento della CO_2 (acidosi respiratoria)

Situazioni di alcalosi

- Per aumento di bicarbonati (alcalosi metabolica)
- Per diminuzione della CO_2 (alcalosi respiratoria)

In una situazione di acidosi metabolica per esempio la reazione più logica di compensazione sarà quella di far ridurre la $\text{CO}_2 \Rightarrow$ il compenso dunque sarà la stimolazione di un'alcalosi respiratoria.

Acidosi

Si ha una riduzione del rapporto tra HCO_3^- e $\text{CO}_2 (< 22)$ in quanto il $\log_{10} \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} < 1,3$

La riduzione del rapporto si ha per:

- *Riduzione dei bicarbonati* (acidosi metabolica non di tipo respiratorio): conseguente a riduzione dei bicarbonati dovuto a perdita; il rene non li recupera, non vengono assorbiti a livello intestinale oppure vengono consumati.
- *Incremento della CO_2* : specificatamente maneggiata dall'apparato respiratorio (acidosi di tipo respiratorio)

L' H^+ è piccolo ed estremamente reattivo, perciò deve essere eliminato tramite respirazione.

Respirazione

$H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2O + CO_2$ (la CO_2 viene eliminata con l'atto respiratorio).

Effetto Bohr dell' H^+ a livello della respirazione polmonare => l'aumento o la diminuzione del valore di pH sanguigno determinano il rilascio della molecola di O_2 in quanto l'affinità per la stessa da parte dell'emoglobina rispettivamente aumenta e diminuisce. Nelle condizioni di pH relativamente basso e di elevata concentrazione di CO_2 presenti nei tessuti periferici, l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno diminuisce (forma tesa) man mano che si legano H^+ e CO_2 . Questa modifica di affinità favorisce il rilascio di ossigeno nei tessuti e il legame dell'emoglobina con la CO_2 e H^+ . Nei capillari dei polmoni, all'aumentare della pressione parziale di ossigeno la CO_2 viene eliminata e il pH del sangue tende ad aumentare; l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno aumenta e la proteina può legare più ossigeno da trasportare ai tessuti periferici. Viene liberata la CO_2 e lo ione H^+ che reagendo con HCO_3^- può restituire CO_2 che verrà espulsa. In forma generale più si respira più si elimina CO_2 e protone. Dunque un eventuale aumento della CO_2 e del pH agisce sui centri che regolano la respirazione aumentandola.

Acidosi Respiratoria => conseguente ad un aumento della pressione parziale della CO_2 che correla direttamente all'aumento del protone con conseguente calo del pH. Questo dovuto ad ipoventilazione conseguente per esempio a:

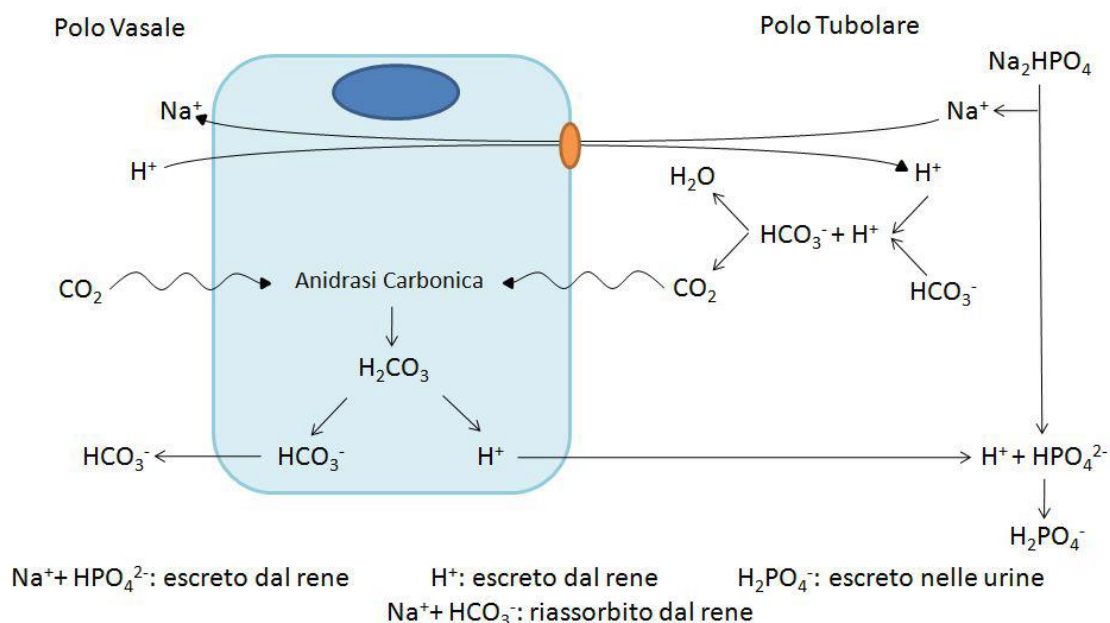
- Disturbi centrali
- Lesioni a livello dei nervi periferici che innervano i muscoli respiratori (SLA)
- Deformità della gabbia toracica
- Fibrosi polmonari che limitano la diffusione del gas

Alcalosi Respiratoria => conseguente ad un calo della pressione parziale della CO_2 che correla direttamente ad un calo del protone con conseguente aumento del pH. Questo dovuto ad iperventilazione conseguente per esempio a:

- Iperattività dei centri respiratori (es: meningiti)
- Sindromi isteriche

Rene

Elimina il protone attraverso tre vie:

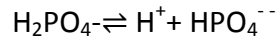


Riassorbimento del Bicarbonato

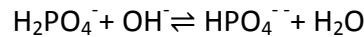
A livello del tubulo prossimale le cellule presentano funzione di riassorbimento; buona parte del sodio filtrato dal glomerulo come Na_2HPO_4 viene riassorbito con il cotrasporto di cloruro o bicarbonato oppure con l'antiporto dell'idrogenione (H^+). Il protone che passa al tubulo complessa con l' HCO_3^- filtrato dal rene, dissociando in H_2O e CO_2 . La CO_2 presente a livello tubulare come la CO_2 presente a livello del torrente circolatorio è libera di diffondere all'interno della cellula dove l'anidraasi carbonica idrata la CO_2 formando H_2CO_3 che scinde spontaneamente in $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. L' HCO_3^- viene riassorbito mentre H^+ espulso a livello tubulare.

Meccanismo Dei Fosfati

A livello del filtrato glomerulare sono presenti dei fosfati derivati dai fosfati di sodio. Mano a mano che il filtrato glomerulare scende nel tubulo, le cellule riassorbono il sodio ed eliminano H^+ . Per ogni H^+ viene espulso un HPO_4^{2-} sotto forma di H_2PO_4^- che costituisce il tampone fosfato, ossia il principale tampone delle urine. Questo tampone è costituito da H_2PO_4^- che funge da donatore di ioni H^+ (acido di Bronsted-Lowry) e dallo ione idrogeno fosfato HPO_4^{2-} che funge da accettore di ioni H^+ (base di Bronsted-Lowry). Tra tali ioni si stabilisce l'equilibrio:

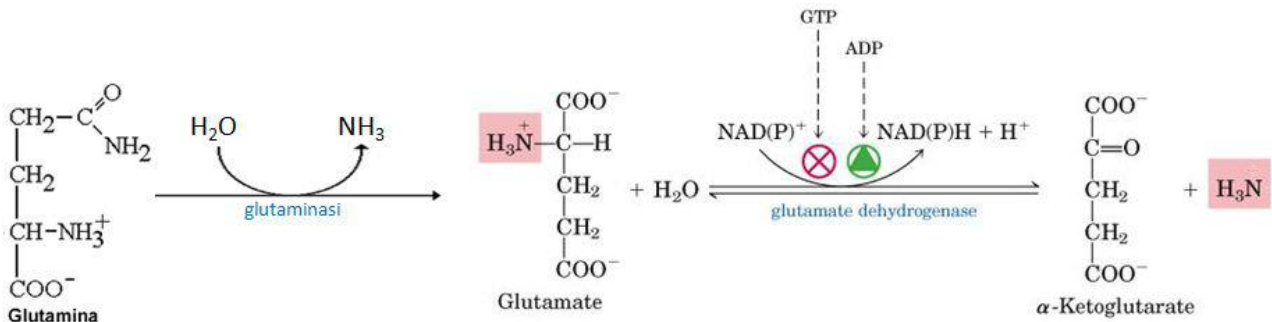


Se a tale sistema si aggiungono ioni H^+ essi reagiscono con lo ione HPO_4^{2-} e l'equilibrio si sposta verso sinistra generando H_2PO_4^- ; mentre l'aggiunta di OH^- fa spostare l'equilibrio a destra in quanto la generazione di acqua determina la formazione di idrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) secondo la reazione:



Trappola dell'ammonio

La corticale del rene, come il fegato, è organo gluconeogenico che impiega lo scheletro carbonioso dell'acido glutammico producendo α -chetoglutarato attraverso l'azione di due enzimi: glutaminasi + glutammato deidrogenasi che catalizzano in sequenza le 2 reazioni:



L'ammoniaca viene prodotta nelle cellule tubulari ed è libera di diffondere nel lume dove, trattandosi di una base, lega il protone dando lo ione ammonio NH_4^+ che essendo specie carica non può passare le membrane biologiche. Resta dunque intrappolato nel lume e viene espulso con l'urina e con esso il protone. La trappola dell'ammonio è un ulteriore metodo per eliminare il protone.

Test di laboratorio

L'esame di laboratorio per elezione è l'*emogasanalisi* che consente di valutare contemporaneamente:

- pH
- $[CO_2]$ e conseguentemente di $[HCO_3^-]$
- stato di ossigenazione (concentrazione di ossigeno legato all'emoglobina)

Dalla concentrazione della CO_2 essendo noti il pH e la pKa (costante a temperatura costante), si può facilmente risalire alla concentrazione di HCO_3^- attraverso l'equazione di Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

Gap Anionico

Quando avviene un aumento della concentrazione dello ione H^+ nel plasma, questo viene tamponato anche dalle proteine a livello dell'aa istidina, soprattutto a carico delle proteine albumina ed emoglobina. Nel caso di aumento dunque il protone dovrà entrare nei GR per venir legato all'emoglobina, ma l'entrata di una carica determina necessariamente l'uscita di un'altra per mantenere costante la differenza di potenziale della cellula. Lo scambio avviene a scapito del potassio K^+ che viene espulso, dunque è chiaro come l'equilibrio acido-base sia influenzato e di contro influenzi l'equilibrio idroelettrolitico.

In condizioni normali la somma dei cationi plasmatici principali è data da:

Na^+ (140) + K^+ (5) = 145mEq/L, i quali devono essere equilibrati dagli anioni dove la somma delle specie principali è Cl^- (105) + HCO_3^- (25-27) = 130-132mEq/L. Poiché la somma dei cationi non corrisponde alla somma degli anioni plasmatici, è chiaro come debbano essere presenti altre cariche negative, come quelle dei gruppi fosfato o degli anioni sulle proteine (p.e. i carbossili dissociati), che normalmente non misuriamo ma che ugualmente concorrono all'equilibrio. Questa differenza non misurabile ma colmata in gran parte dalle cariche negative sulle superfici delle proteine prende il nome di GAP ANIONICO ed è pari a 12 ± 4 mEq/L.

Acidosi Metabolica

In base a quanto detto sul gap anionico distinguiamo due forme di acidosi metabolica:

Con aumento del gap anionico

Se diminuisce l' HCO_3^- e non aumenta il Cl^- si ha un aumento del gap anionico. Questa condizione può essere riscontrata a causa di aumentata produzione di acidi non volatili: si tratta degli acidi non eliminabili con la respirazione come la CO_2 , solitamente sono l'acido lattico oppure i chetoacidi che oltre ad essere difficilmente eliminabili consumano i bicarbonati che agiscono cercando di contrastare l'acidosi.

MUD PILES (pugnetto di fango) è l'acronimo utilizzato per elencare un insieme di condizioni e sostanze che determinano acidosi metabolica con aumento del gap anionico

M. Metanolo: ossidato ad acido formico

U. Uremia: insuff. renale in cui il soggetto non è in grado di eliminare acidi

D. Diabete: accumulo di corpi chetonici

P. Paraformaldeide: disinfettante vescicale che se viene riassorbito porta alla formazione di acidi

I. Ischemia: mancato trasporto di ossigeno con diminuzione del Ferro e tendenza all'acidosi lattica

L. Acido lattico: prodotto in seguito a lavoro muscolare => L sta per Lattoacidemia

E. Etilen-Glicole: l'etilenglicole (utilizzato come aromatizzante nella produzione di vino) produce acido glicolico e acido ossalico

S. Salicilato: dosi elevate di aspirina.

Senza aumento del gap anionico

Se la diminuzione del HCO_3 viene compensata sotto il profilo dell'equilibrio delle cariche da un aumento del Cl^- (115), non si ha variazione del gap anionico. Spesso si riscontra in seguito ad alterazioni gastrointestinali dove il meccanismo di insorgenza dell'acidosi è legato alla secrezione fisiologica di HCO_3 nel lume intestinale e/o ai meccanismi di escrezione dei protoni da parte del rene. Nel lume intestinale vengono riversate elevate quantità di HCO_3 con i secreti pancreatici in parallelo alla produzione contemporanea di protoni a livello gastrico per la secrezione dell'acido cloridrico. Normalmente questi processi sono fra loro in equilibrio, ma un mancato riassorbimento dei bicarbonati (diarrea profuse, sindromi dell'intestino breve per fistole o per resezioni chirurgiche, uso anomalo di lassativi) può provocare uno squilibrio con perdita dei bicarbonati e di conseguenza eccesso di acidi, mentre l'equilibrio delle cariche viene mantenuto da una maggiore disponibilità di cloruri. In aggiunta alla perdita di bicarbonati per via enterica, stati di acidosi metabolica senza aumento del gap anionico possono insorgere in seguito alla compromissione dei meccanismi di regolazione renale con mancata eliminazione del protone renale, (Acidosi tubulari renali distali, di tipo 1 e 4) oppure mancato riassorbimento dei bicarbonati (Acidosi tubulare renale prossimale, di tipo 2).

Alcalosi Metabolica

- *Causa Gastrica*: perdita di acidi in seguito a vomito prolungato con eliminazione di succhi gastrici
- *Cause di terzo spazio*: raccolta di liquidi con conseguente calo della volemia. Si ha pertanto la tendenza all'aumento del riassorbimento del sodio (assieme al contro trasporto di ioni H^+) per aumentare la ritenzione idrica e dunque ristabilire la volemia. La perdita prolungata comporta necessariamente un prolungato riassorbimento del sodio con perdita di elevate quantità di protone e conseguente riassorbimento di bicarbonati per il processo illustrato in precedenza di riequilibrio delle cariche elettriche.
- *Stato di iper-riassorbimento di sodio*: provocato da alterazioni a livello del rene e squilibri endocrini (eccesso di aldosterone e conseguente riassorbimento di HCO_3^-)

METABOLISMO DEGLI ELETTROLITI

Con elettroliti si intendono le specie ioniche presenti in circolo e, in particolare, Na^+ , K^+ , Cl^- (poco misurato) e HCO_3^- (l'anione che rappresenta la componente basica del sistema tampone).

Sodio

Presenta un fabbisogno giornaliero pari a 200-300 mg, necessari per il ripristino delle quote di perdita obbligate, mentre l'assunzione giornaliera è pari a 4-5 g; l'eccesso viene eliminato per via renale.

La quantità totale di sodio nel corpo umano è circa 4 moli (80g) di cui:

- 135-145 mEq/L nell'ambiente extracellulare
- 10-12 mEq/L nell'ambiente intracellulare (si ricordi che per ioni monovalenti: 1mEq=1mmole)
- Il rimanente 70% circa fissato nell'osso

Il sodio viene filtrato nel rene e riassorbito per il 75% nel tubulo prossimale secondo un meccanismo di cotrasporto dove il gradiente del sodio viene sfruttato come sorgente di energia necessaria al riassorbimento di altre sostanze quali: cotrasportatore (simporto) Na^+ /glucosio e il Na^+ /amminoacidi. Il sodio che non viene riassorbito con i cotrasportatori viene assorbito da scambiatori (antiporto) Na^+ / H^+ e da simporti Na^+ / HCO_3^- . Il regolatore finale del riassorbimento del Na^+ nel tubulo prossimale è l'azione della pompa Na^+ / K^+ ATPasi: questa pompa ionica secerne ioni Na^+ nel liquido interstiziale e porta ioni K^+ all'interno delle cellule tubulari, in questo modo la concentrazione di Na^+ all'interno della cellula rimane bassa e il trasporto del Na^+ dal lume tubulare al citoplasma delle cellule è favorito dal gradiente di concentrazione.

Il restante è riassorbito per il 20% nell'ansa ascendente di Henle accoppiato all'assorbimento dell'urea per il mantenimento del gradiente osmotico extratubolare, mentre il restante 5% circa del carico filtrato viene riassorbito a livello del tubulo contorto distale dopo attivazione da parte dell'apparato iuxtaglomerulare della produzione di aldosterone, a sua volta dipendente dal sistema renina-angiotensina. In ultima analisi l'aldosterone promuove un antiporto di riassorbimento del sodio nel tubulo distale, con eliminazione di protone o di potassio. Nell'equilibrio finale è nuovamente implicata la pompa Na^+ / K^+ ATPasi. Quella appena descritta è la quota regolativa del sodio. L'effettiva escrezione risulta comunque determinata dalle azioni dei peptide natriuretici atriale (A), Cerebrale (B da Brain, presente in quantità elevate anche nei ventricoli cardiaci) e Endoteliale, tipo C).

Il sodio a livello plasmatico (presente a concentrazioni di circa 140-145 mEq/L con una corrispondente osmolarità plasmatica di 285-295 mOsm/kg) regola la volemia, la pressione sanguigna e l'accumulo di acqua. Disturbi nel metabolismo del sodio sono conseguenti a stati di controllo della pressione sanguigna (cioè alterazioni nella concentrazione del sodio si evidenziano durante fenomeni di regolazione della pressione). Pochissime sono le determinazioni del sodio di valenza clinica e diagnostica => un caso esempio è quello degli stati infusionali di pz disidratati dove devono essere introdotti sia liquidi che soluti.

Un adulto è composto per il 60% da acqua, pertanto un individuo di 70Kg è composto da 42 L di cui 2/3 sono intracellulari (28 L) e la quota extracellulare (14 L) è suddivisa in 2 compartimenti: vasale (come fase liquida) 3,5 L ed interstiziale 10,5 L.

- **Aumento** nelle concentrazioni di sodio si può avere nel caso di sovraccarico alimentare o problemi di escrezione

- **Diminuzione** si può avere nel caso di perdite di H₂O essendo il sodio in soluzione e dunque bugualmente perso (iponatremia deplezionale) e per ritenzione di acqua (iponatremia diluzionale). Differenze si hanno poi in relazione al tipo di perdita: ipotonica, isotonica o ipertonica. La perdita è sempre a carico di soluzioni extracellulari (mai intra).
 - *Ipotonica*: la perdita è praticamente di acqua pura. Si riscontra un aumento del soluto e una condizione di ipernatremia che, rendendo iperosmolare la soluzione residua, ha come risultato di richiamare solvente dall'ambiente intracellulare all'ambiente extracellulare per mantenere costante la volemia. La perdita dunque si distribuisce fra tutte le diverse compartimentazioni con un meccanismo di compenso della volemia che porta alla disidratazione delle cellule. Non si arriva mai però a un equilibrio completo, l'ambiente extracellulare resta leggermente ipertonico. L'ipertonica viene quindi colta dagli osmocettori che stimolano la secrezione di ADH (che favorisce il riassorbimento renale dell'acqua) e che generano lo stimolo della sete (risposta compensatoria).
 - *Isotonica*: perdite di questo tipo riguarderanno la componente plasmatica con riduzione del plasma circolante e stato di ipovolemia. Trattandosi di una perdita isotonica non si avrà aumento nella concentrazione del sodio dunque non si avrà gradiente osmotico e la perdita di sodio e di acqua resterà confinata a carico del solo compartimento extracellulare.
 - *Ipotonica*: In questo caso la perdita di sodio sarà legata a eliminazione di soluzioni ad alto contenuto di sodio e l'iponatremia sarà quindi essenzialmente di tipo deplezionale.

Ipernatremia

Condizione di aumento delle concentrazioni del sodio:

- Da sovraccarico di sodio (cibi salati)
- Da ridotta eliminazione (↑↑ H₂O in corpo è la più frequente:
 - nel caso di insufficienza renale
 - per eccessivo riassorbimento tubulare
 - PRIMITIVI
 - Morbo di Conn: iperplasia della surrenale con aumentata secrezione di mineralcorticoidi => eccesso di aldosterone
 - Sindrome di Cushing => produzione di glucocorticoidi che hanno, seppur blande, azioni come mineralcorticoidi.
 - SECONDARI
 - Per riduzione dell'efficacia circolatoria a livello del rene (diminuita GFR).

La concentrazione di acqua viene avvertita nell'organismo dai Barocettori carotidei e dagli osmocettori ipotalamici. L'ADH viene secreta in risposta ad una aumentata osmolarità >282mOsm/Kg, e viene ulteriormente stimolato in seguito ad una riduzione della pressione arteriosa. osmoli => numero di moli di soluto che contribuiscono alla pressione osmotica di una soluzione. Glucosio e Urea sono specie a rapida diffusione.

Una situazione di ipernatremia è sempre accompagnata da un aumento dell'osmolarità plasmatica calcolata come:

$$\text{OSMOLARITÀ PLASMATICA} = 2[\text{Na}^+] + [\text{Glucosio}] + [\text{Urea}]$$

$$= 140 \text{ mM/L} + 5 \text{ mM/L} + 5-10 \text{ mM/L}$$

L'osmolarità globale oscilla fra i 282-295 mOsm.

I livelli di natremia arrivano fino a 145mM/L dunque nello stato d'ipernatremia si hanno concentrazioni >145 e di contro l'osmolarità plasmatica risulterà sempre aumentata.

La volemia, invece, risulterà:

- Euvolemia: si ha un aumento relativo del sodio rispetto all'acqua provocato da una perdita di acqua o per via renale legata all'ADH o per diabete insipido o per via respiratoria o cutanea.
- Ipervolemia: eccessivo riassorbimento tubulare, ipersurrenalismo con sindrome di Cushing, iperaldosteronismo.
- Ipovolemia: provocate da uno stato di disidratazione in seguito alla perdita di acqua per via renale per altre vie.

Iponatremia

Condizione di riduzione della concentrazione del sodio:

- Da ridotto apporto
- Da aumentata perdita
 - A livello renale (insufficienza renale acuta, deficit di mineralcorticoidi; è la più frequente),
 - A livello dell'apparato digerente (vomito, diarrea, fistole, ostruzione intestinale)
Fistole: due parti cave che si fondono e si mettono in comunicazione, accelerazione flusso dei liquidi che non vengono riassorbiti.
Ostruzione intestinale: accumulo di liquidi contenenti Na⁺
 - A livello della cute (↑ sudorazione, ustioni).
 - Sindromi da aumentata perdita di sale di tipo celebrale. Il cervello secerne eccessive quantità di peptidi natriuretici (in particolare C).
- Diuresi terapeutica

Un calo nella concentrazione del sodio si riflette a livello dell'osmolarità plasmatica che potrà risultare:

- Normale: è ridotta la quantità di acqua nel plasma (la quantità di sodio è normale). Quadro di *pseudoipernatremia* dovuto all'aumentata presenza di sostanze lipofile nel sangue o ad un aumento delle proteine (anticorpi monoclonali delle paraproteinemie). Si risconterà riduzione dell'acqua circolante a causa del volume occupato dall'eccesso di sostanze lipofile e proteine. In queste condizioni il rilievo dell'iponatremia è un errore laboratoristico risultante dall'utilizzo come modalità analitica di tecniche di spettrometria di fiamma o di assorbimento atomico (che fanno riferimento alle concentrazioni del sodio circolante) invece che delle corrette tecniche con gli elettrodi specifici che misurano l'attività degli ioni sodio).
- Elevata: dovuta all'aumentata presenza di altre sostanze endogene (Glucosio e urea, nel diabete e nella insufficienza renale) o esogene (mannitolo per infusione terapeutica) che influenzano la osmolarità.
- Ridotta: da diluizione, da deplezione o entrambe.

Necessario pertanto verificare la volemia che potrà risultare:

- Ipervolemia: si ha un eccesso di acqua che non viene eliminata da parte del rene mentre il sodio può essere normale o ridotto (diluizione).
- Ipovolemia: perdita di grandi quantità di acqua e di sodio (dovuta a problemi renali o non renali, quindi viene controllata la concentrazione di Na⁺ nelle urine: se è alto, il rene non funziona; se è basso il rene funziona quindi il problema è altrove, ad es. perdite intestinali).
- Euvolemia: c'è solo deficit di Na⁺ (meccanismo legato all'eccessiva secrezione di ADH nel diabete insipido).

L'iponatremia ha importanza clinica se si sviluppa in fretta (sintomatologia in relazione ai tempi di comparsa).

Livelli di Na⁺ inferiori a 120 mEq/L sono gravi se si sviluppano velocemente.

Inferiori a 105mEq/L compaiono sintomi importanti (confusione, convulsioni).

Inferiori a 90mEq/L compaiono alterazioni a livello dei riflessi profondi e dei riflessi bulbari.

In generale un deficit di sodio provoca una riduzione del volume plasmatico e una riduzione del liquido interstiziale con conseguente sforzo circolatorio, tachicardia, ipotensione, oliguria e ridotto volume oculare.

Metabolismo dell'acqua

Disidratazione

- Per mancata deglutizione
- Per mancato accesso all'acqua
- Da ridotto apporto associato a incapacità di trattenimento.

La quantità di acqua necessaria per eliminare le scorie è di 400-500 mL (vie urinarie). Altre perdite obbligate di acqua avvengono attraverso la via gastroenterica, respiratoria e cutanea (sudorazione e mantenimento idratazione cutanea). La perdita globale di H₂O è di 1- 1.1 L dunque questo è il fabbisogno minimo, da dividersi in acqua esterna + acqua prodotta dal metabolismo.

- Diabete insipido (per mancata secrezione di ADH)
- Carico osmotico (nel caso del diabete → poliuria)

In caso di diminuzione dell'osmolarità plasmatica si ha una aumentata escrezione ed un ridotto riassorbimento di acqua (aumenta l'escrezione di Na⁺ e Glucosio). I segni sono: sete, scarsa salivazione, sintomi di tipo neurologico (confusione), calo pressione venosa centrale.....

La carenza di acqua è però compensata dal comparto intracellulare, soprattutto a livello celebrale, in quanto il cervello è particolarmente sensibile allo stato di disidratazione. Il principale contributo per la fornitura di sangue al cervello deriva dall'arteria carotide interna (derivante dalla carotide comune) che insieme all'arteria basilare forma il poligono del Willis alla base del cervello. Ulteriore contributo si ha grazie ai vasi meningei che dalla teca interna attraverso l'aracnoide irrorano la superficie della materia grigia. Quello che si ottiene nel caso di disidratazione è una coartazione del cervello che tende ad allontanarsi dalla teca interna allungando questi vasi che possono rompersi dando emorragia subaracnoidea. Il meccanismo di difesa contro questa situazione è la sintesi di molecole osmoticamente attive da parte dei neuroni, che richiameranno acqua all'interno della cellula e operano un meccanismo osmoprotettore opponendosi alla cessione di acqua e limitando la coartazione. Ecco che reidratando soggetti disidratati si deve procedere molto lentamente per non causare situazione opposta con edema cerebrale a causa della presenza proprio di questi osmoliti neuronali, che attirerebbero grandi quantità di acqua all'interno delle cellule.

Aumento del contenuto idrico

Per esempio in situazioni di errata escrezione, o aumento nella secrezione di ADH o assunzione di elevate quantità di acqua => tutte situazioni che in definitiva portano a ritenzione e aumento se il volume è maggiore alle potenzialità di escrezione del rene. Con queste alterazioni del metabolismo si hanno sintomatologie a livello neurologico a causa dell'aumento di acqua nel SNC con aumento della pressione e compressione dei neuroni all'interno della scatola cranica.

- Bevitori compulsivi
- Irrigazione di H₂O per lavaggio (Es: da irrorazione della vescica nel trattamento di papilloma virus o da cistoscopia)
- Aumentata assunzione di acqua per via parenterale
- Ridotta escrezione di acqua (per insufficienza renale o alterazione dei meccanismi regolatori)
- Per eccessiva produzione di ADH (produzione ectopica di ADH, specialmente a livello polmonare, tipica delle sindromi paraneoplastiche)
- Per assunzione di farmaci che potenziano l'azione dell'ADH

I sintomi sono: confusione, mal di testa, convulsioni, coma... inoltre l'accumulo di acqua nella scatola cranica può provocare edema e/o erniazione del cervelletto.

Potassio

Il Potassio nel corpo umano è circa 3 M (120g) distribuito fra:

- Ambiente intracellulare 115-125mEq/L (tranne che nel globulo rosso in cui la concentrazione è di 105 mEq/L)
- Ambiente extracellulare 3.5-6.5 mEq/L

Il potassio viene totalmente riassorbito a livello del tubulo contorto prossimale e viene successivamente eliminato a livello del tubulo contorto distale per dar luogo al riassorbimento del sodio attraverso la pompa Na/K ATPasi. Questo ione è implicato nella regolazione dell'eccitabilità delle membrane nei tessuti eccitabili pertanto controlla le funzioni neuronali, muscolari e la funzionalità cardiaca. Chiaro dunque come le concentrazioni di questo ione, presente in ambiente extracellulare per il 2% vengano misurate con estrema attenzione poiché degli squilibri possono essere molto pericolosi.

Ipokaliemia (rara)

- Da redistribuzione tra ambiente intra- ed extracellulare
 - Alcalosi: in carenza di idrogenione H⁺ per riassorbire Na⁺ si deve eliminare K⁺ attraverso le pompe ATPasiche.
 - In seguito ad un'aumentata sintesi del glicogeno e delle proteine perché aumenta l'ingresso di K⁺ nelle cellule
- Vero deficit: da aumentata escrezione a livello renale per eccesso di mineralcorticoidi e Na⁺ o extrarenale per via gastroenterica.

Per discriminare tra ipokaliemia vera o da redistribuzione si controlla la concentrazione di K⁺ urinario. Nel caso di potassio alto si tratterà di forme renali (vero deficit) quali:

- Acidosi metabolica: in cui non c'è eliminazione di H⁺ e viene eliminato K⁺
- Alcalosi metabolica: se manca H⁺, per riassorbire Na⁺ si deve eliminare K⁺

Una situazione di ipokaliemia si accompagna a riduzione del tono e contrattilità muscolare fino agli stati di paralisi ipokaliemica con alterazioni a livello di ECG dunque alterazione nella contrattilità del miocardio.

Iperkaliemia

- Legata a cause spurie (es.emolisi dopo il prelievo o sofferenza cellulare).
- Legata ad un eccesso di assunzione di K⁺ con la dieta, o per cause iatrogene (trasfusioni o infusioni parenterali).

- Legata al movimento transcellulare. In seguito a mancato riassorbimento di sodio non si verifica l'escrezione del potassio, causata da insufficienza renale con conseguente insufficienza di aldosterone (morbo di Addison).
- Legata ad alterazioni nell'equilibrio acido base: fuoriuscita del potassio intracellulare per riequilibrare le cariche ai lati della membrana. Per esempio quando il protone viene legato e tamponato dall'emoglobina.

Una situazione di ipercaliemia si accompagna aumentata eccitabilità, crampi, fibrillazione, arresto cardiaco (se supera i 7mEq/L).

Calcio

Il corpo umano contiene circa 1Kg di calcio e la maggior parte è contenuta a livello dell'osso: 99%, pari a 990 g, contenuto a livello di ossa e denti sotto forma di cristalli di idrossiapatite, 1% distribuito quasi totalmente nei liquidi extracellulari e liquidi interstiziali. Nel plasma la calcemia è 2,5mM. All'interno della cellula, il calcio è contratto nel reticolo endoplasmatico e nel mitocondrio le concentrazioni presenti nel citosol molto basse (10^{-6} M) pertanto è presente un marcato gradiente fra compartimento intra ed extracellulare pari a 1:4000.

Per quanto riguarda le **funzioni** distinguiamo fra:

Funzioni intracellulari

- Importante messaggero per ormoni e fattori di crescita,
- Regola trascrizione, metabolismo, attivazione neuronale e contrazione muscolare.

Funzioni extracellulari

- Stabilizzazione dei tessuti in particolar modo attraverso la mineralizzazione ossea
- Processo della coagulazione che è calciodipendente.

Normalmente si misura il calcio plasmatico che oscilla fra 2,4-2,5 mM ed è diviso in 3 quote distinte:

- Metà si trova legato alle proteine plasmatiche, in particolar modo al residuo carbossilico (acido) dell'albumina,
- Dell'altra metà:
 - 7% forma complessi stabili con anioni quali citrato e fosfato,
 - 43% è calcio ionico implicato nelle funzioni fisiologiche 1-2-4.

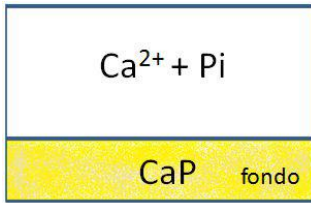
Metabolismo

È quindi importante mantenere adeguato il patrimonio di calcio mediante l'assunzione di 1g/die (poiché si perde per via renale) e mantenere l'equilibrio costante tra ambiente intra- ed extracellulare. La quota assorbita con la dieta va a distribuirsi nei fluidi circolanti che la trasportano in tutto l'organismo rendendola disponibile per tutte le sue funzioni. La quota assorbita bilancia la quota persa a livello renale, ma nell'eventuale caso di una riduzione della calcemia, il meccanismo compensatorio porta all'aumento del riassorbimento del calcio ed eventualmente alla mobilitazione dello stesso dall'osso al circolo. Perciò la sua deposizione sotto forma di idrossiapatite è un meccanismo reversibile.

Le situazioni che determinano variazioni della calcemia dal punto di vista chimico ricalcano il comportamento delle soluzioni sature in cui il calcio e il fosforo si associano formando fosfato di calcio (poco solubile) e precipitando nel corpo di fondo. Si forma pertanto un equilibrio

dinamico fra le componenti in soluzione e il corpo di fondo, che segue le leggi del prodotto di solubilità:

$\text{CaP} \leftrightarrow \text{Ca}^{++} + \text{Pi}$ da cui la costante di equilibrio è pari a $K_{eq} = \frac{[\text{Ca}^{++}][\text{Pi}]}{[\text{CaP}]}$ all'attività del solido

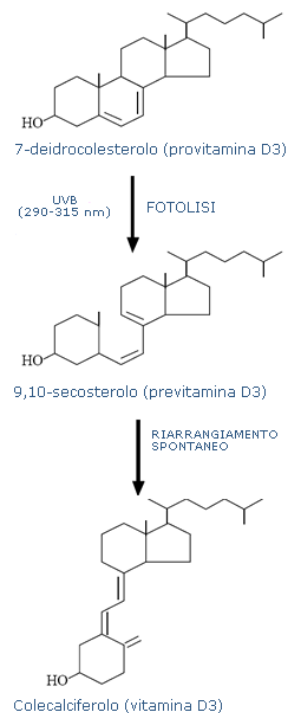


([CaP]) viene attribuito il valore in quanto la soluzione è satura e che dalla massa dei reagenti, la concentrazione resta costante perché la soluzione è satura. In questo modo si ricava la costante di dissociazione $K_{ps} = [\text{Ca}^{++}][\text{Pi}]$ che descrive l'equilibrio nelle soluzioni sature. Le specie risultano essere inversamente proporzionali pertanto un incremento di una comporta un calo dell'altra. In condizioni d'ipocalcemia sarà quindi necessario ridurre la concentrazione dei fosfati per ottenere un aumento della calcemia. Il soggetto ipocalcémico è caratterizzato da iperfosfatemia.

Regolazione

Il meccanismo di regolazione della calcemia è un meccanismo endocrino affidato a 3 ormoni:

- **Calcitonina:** ormone ipocalcemizzante che inibisce la mobilitazione dell'osso inibendo gli osteoclasti, ma con effetto molto modesto nell'uomo. È prodotto dalle cellule parafollicolari della tiroide che percependo l'ipercalcemia secernono l'ormone. Per un tumore midollare della tiroide che tipicamente secreta calcitonina, i livelli dell'ormone possono essere utilizzati come marker.
- **PTH:** porta alla formazione dell'osso a partire dalla cartilagine. È un ormone prodotto dalle ghiandole paratiroidi (da 4 a 8) poste sulla superficie posteriore o inserite all'interno della tiroide. Il PTH è un ormone ipercalcemizzante che agisce a livello di tutti e 3 gli organi implicati nel metabolismo del calcio:
 - Intestino: assorbimento di Ca^{2+}
 - Osso: a bassi livelli stimola l'attività degli osteoblasti con deposizione della matrice ossea, ad alti livelli stimola l'attività degli osteoclasti con mobilitazione del calcio e attività ipercalcemizzante.
 - Rene: azione ipercalcemizzante legata al controllo del PTH nell'escrezione dei fosfati. Dunque se il PTH favorisce l'azione di escrezione e calano i fosfati, per l'equilibrio descritto dalla K_{ps} aumenterà la concentrazione del calcio. Inoltre a livello del rene controlla l'attivazione della vitamina D a 1,25 di idrossicolecalciferolo con idrossilazione alla posizione 1. La forma attiva aumenta il riassorbimento intestinale del calcio e agisce sulle paratiroidi stimolando la secrezione di PTH => azione sinergica.
- **Vitamina D:** si forma a partire dal 7-deidrocolesterolo per irraggiamento UV, che rompendo l'anello β forma colecalciferolo il quale viene idrossilato sul C25 nel fegato e nel rene sul C1. La forma attiva (1-25 colecalciferolo) è il calcitriolo, le cui azioni principali sono:
 - Aumentare il riassorbimento del calcio intestinale,
 - Favorire la deposizione ossea attraverso mineralizzazione della cartilagine.
 - Controllare negli osteoblasti la sintesi dell'Osteocalcina, che dopo carbossilazione da parte della vitamina K lega il Ca^{2+} fungendo da nucleo di calcificazione della matrice ossea.



Ipocalcemia

- *Insufficienza delle paratiroidi*: provocato da insufficienza vascolare, stato di infiammazione, chirurgia, tiroidectomia in quanto spesso le paratiroidi sono inserite nel parenchima tiroideo
- *Deficit di vitamina D*: se non è presente un buon apporto o sintesi di vitamina D il soggetto tenderà ad andare incontro a ipocalcemia poiché non assimila bene in calcio dietetico.
- *Insufficienza renale*: con alterazione nell'eliminazione dei fosfati: aumenta il fosfato, diminuisce il calcio. Il rene infatti possiede diverse funzioni:
 - Funzione omeostatica
 - Funzione escrettrice
 - Funzione endocrina (Attivazione della vitamina D, sintesi dell'EPO, controllo del metabolismo minerale tramite il sistema renina-angiotensina-aldosterone)

La sintomatologia delle ipocalcemie deriva da aumento della contrattilità muscolare perciò stati di tetania con morte per asfissia nel caso in cui non sia rapidamente trattata. Può presentarsi anche in forma latente, valutata con manovre cliniche che la rendono evidente quali:

- Segno di Chvostek: percussione con un dito sul nervo facciale ottenendo contrazione ipsilaterale del volto
- Segno di Trousseau: l'interruzione temporanea della circolazione sanguigna dell'avambraccio provoca un crampo tetanico della mano che assume un atteggiamento particolare: "mano da ostetrico"

Ipercalcemia

Due forme principali dovute a:

- Iperparatiroidismo o iperparatiroidismo secondario che si manifesta in corso di insufficienza renale.
- Legato a neoplasie: gli effetti possono dipendere o dalla localizzazione ossea del tumore con degradazione della matrice ossea, o da sindrome paraneoplastica cioè secrezione di sostanze con attività biologica simile a quella del PTH: la porzione attiva del PTH è rappresentata dall'N-terminale che lega il recettore attraverso i primi 2 aa; perciò peptidi liberati da tumori con la sequenza N-terminale del PTH, noti come PTHrp, mimano l'azione del PTH.

Sintomi: ipocratismo digitale => dita a bacchetta di tamburo o unghie a vetrino di orologio.

Omeostasi ossea

L'osso è un tessuto connettivo formato da "idrossiapatite + fibre collagene" che va incontro a continuo rimodellamento ad opera di:

- Osteoclasti: formano lacune di riassorbimento in cui scavano l'osso
- Osteoblasti: derivano da cellule staminali mesenchimali; la loro funzione è quella di riempire con matrice ossea le lacune consentendo il rimodellamento in base al carico.

La proteina che interviene nella mineralizzazione dell'osso e secreta dagli osteoblasti è l'osteocalcina. Questa proteina viene carbossilata a livello dell'aa "acido- γ carbossiglutammino" formando dei gruppi chelanti che legano il calcio e su cui successivamente depositano i fosfati costituendo la matrice ossea. Le molecole di collagene invece sono sintetizzate dall'osteoblasto come procollagene in forma solubile, che presenta agli estremi ammino- e carbossi-terminale delle strutture globulari. Una volta secreto all'esterno della cellula sono presenti delle proteasi che eliminano le porzioni globulari facendo precipitare il collagene il quale si stabilizza legandosi in gruppi da 3 molecole parzialmente sovrapposte e stabilizzate da legami crociati.

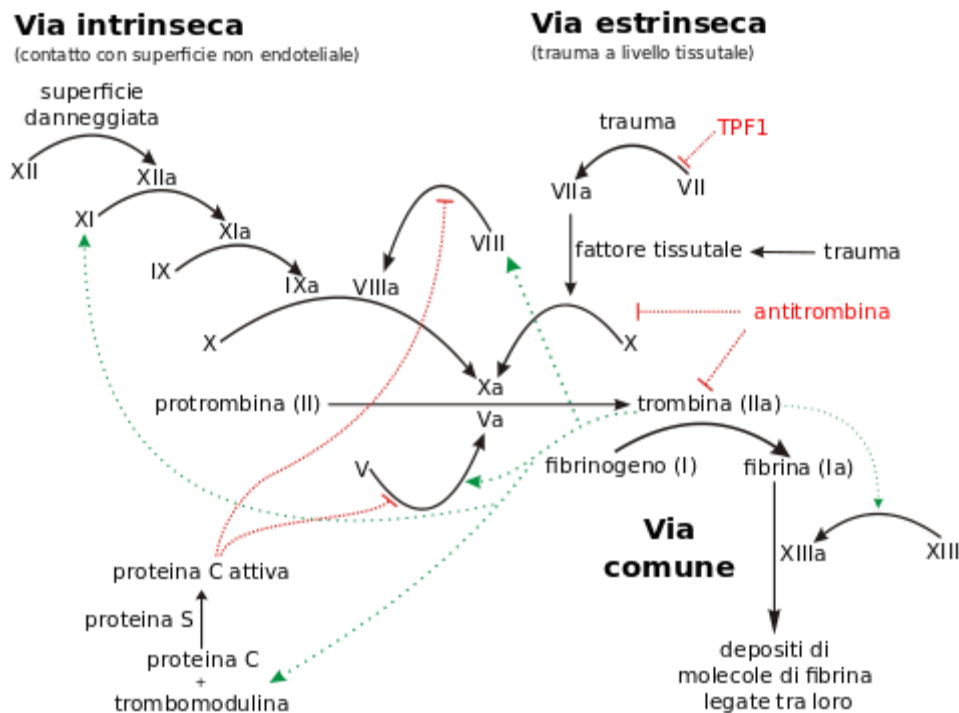
Marker di turnover: attraverso l'analisi dei prodotti specifici di osteoclasti e osteoblasti è possibile determinare la fase del metabolismo osseo ed eventuali alterazioni: se, per esempio, aumentano i prodotti dei blasti allora è una fase in cui prevale l'accrescimento. Questi marker sono:

- Le parti globulari del protocollagene => telo peptidi
- La fosfatasi acida tartrato resistente che determina la liberazione locale di fosfati.

Esistono in oltre dei meccanismi inibitori o attivatori della sintesi e attività di blasti e clasti che possono descrivere la fase del rimodellamento osseo: per esempio RANKL è il principale regolatore della differenziazione osteoclastica, una proteina di membrana e solubile che si lega al suo recettore (RANK). Il RANKL è prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule T attivate. La formazione di osteoclasti invece è limitata dall'osteoprotegerina (OPG) un recettore solubile che si lega al RANKL e che è prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule stromali.

COAGULAZIONE

La coagulazione è promossa dalle due vie coagulative intrinseca ed estrinseca. Quest'ultima è quella di maggior rilievo fisiologico:



Sono presenti due fattori, il fattore VIII e il fattore V, che non hanno attività protesica andando ad attivare ulteriori fattori lungo la cascata, ma fungono da coenzimi facilitando l'attivazione di alcuni fattori.

La funzione coagulativa può essere verificata valutando il tempo di conversione del fibrinogeno in Fibrina, tramite due test che attivano la via intrinseca e quella estrinseca. Questo tempo può calare nel caso in cui in vivo si abbia un consumo del fibrinogeno causato da un processo di coagulazione intravasale disseminato.

- Valutazione delle vie coagulative: le due vie coagulative vengono valutate aggiungendo al plasma gli attivatori specifici per le differenti vie e monitorando il tempo impiegato per coagulare.
- Valutazione via estrinseca: indagata attraverso il "tempo di protrombina" o "tempo di Quick". Al campione viene aggiunto un eccesso di calcio annullando gli effetti anticoagulanti e consentendo al sangue di tornare a coagulare; e tromboplastina, estratto tissutale che mima il fattore tissutale liberato normalmente dalle cellule traumatizzate che attiva la via estrinseca. Questo esame consente di valutare l'andamento di tutti i fattori che compongono via estrinseca e comune inoltre consente di valutare l'efficacia degli anticoagulanti orali.
- Valutazione via intrinseca: indagata attraverso il "tempo di tromboplastina parziale attivata". Al campione viene aggiunto un eccesso di calcio annullando gli effetti anticoagulanti e consentendo al sangue di tornare a coagulare; e un attivatore della fase di contatto come fosfolipidi anionici, silice... Il termine "parziale" sta a indicare che tra i reagenti non vi è la tromboplastina. Questo esame consente di valutare l'andamento di tutti i fattori che compongono via intrinseca e comune. Inoltre consente di valutare l'efficacia della terapia anticoagulante con eparina sul paziente.

Il sistema di controllo invece deputato alla regolazione della coagulazione è un sistema di tipo inibente affidato a sostanze anticoagulanti fra cui le principali sono:

- Antitrombina III: l'antitrombina rappresenta il più importante inibitore della trombina (IIa) e di molti altri fattori della coagulazione, soprattutto Xa. L'azione di questa proteina è notevolmente potenziata dall'eparina.
- Plasmina: deriva dall'attivazione del plasminogeno operata da attivatori tissutali del plasminogeno, trombina, fibrina... la reazione catalizzata dall'enzima attivo è la trasformazione della fibrina insolubile, propria del coagulo, in prodotti di degradazione della fibrina.
- Trombomodulina: è attivata dall'interazione con due proteine circolanti: proteina C + proteina S.
- Una volta attivata la trombomodulina lega la trombina variandone la specificità, la quale degrada il fattore V e fattore VIII che sono fattori acceleranti fino a 400 mila volte la coagulazione. Chiaro che se vengono inibiti questi fattori inibita sarà la coagulazione stessa.

Aggregazione piastrinica

Per valutare le vie di coagulazione e l'eventuale tendenza a trombosi si valuta la presenza di:

- Fattore V e VIII
- Proteine C + S
- Tromboplastina

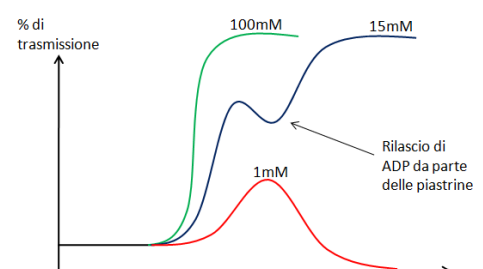
In fine si procede con la conta piastrinica e la valutazione dell'aggregazione. L'aggregazione piastrinica è un fenomeno ADP-dipendente, per il quale è possibile distinguere un'aggregazione primaria e secondaria.

- L'aggregazione primaria (prima onda di aggregazione) si verifica quando lo stimolo che ha condotto al rilascio di ADP è quantitativamente insufficiente e/o limitato nel tempo.
- L'aggregazione secondaria (seconda onda di aggregazione) è dovuta al rilascio di ADP da parte delle piastrine, attivate con piccole quantità di agonisti.

L'aggregazione piastrinica viene valutata attraverso l'*aggregometro a trasmissione luminosa di Born*. Tale metodo misura l'aggregazione su plasma ricco di piastrine (PRP). Il PRP viene posizionato all'interno di una cuvetta cilindrica in plastica e mantenuta in agitazione da una ancorotta magnetica che, mantenendo in sospensione le piastrine, fa apparire torbido il plasma. A questo punto si aggiunge un aggregante, tipicamente ADP, al cui contatto le piastrine da discoidali assumono forma sferica dando luogo a processi superficiali, come formazione di pseudopodi, che portano al legame fra piastrine. Queste aggregandosi determinano il cambiamento dell'aspetto della sospensione che si presenta con grossi aggregati in liquido trasparente. Ciò che viene misurato è la luce trasmessa attraverso il PRP con un fotometro. All'aggregazione il plasma appare visivamente limpido, dunque dopo l'aggiunta di ADP, avvenuta l'aggregazione, si verifica un notevole aumento della trasmissione della luce => lo strumento permette di fornire una misurazione dell'ampiezza e della velocità di tale aumento.

Se le concentrazioni finali utilizzate di ADP sono:

- 50-100 mM: il processo è reversibile
- 200-300 mM: si ottiene una curva mista
- 1 mM: si ottiene una curva fusa



Queste variazioni a seconda della concentrazione dipendono dal fatto che le piastrine per passare dall'aggregazione primaria alla secondaria liberano elevate concentrazioni di ADP => ed ecco perché abbiamo una forma mista. Se le concentrazioni utilizzate di ADP sono inferiori a $100 \mu\text{M}$ esse sono troppo basse perché le piastrine rispondano all'aggregazione liberando ADP. In queste condizioni particolari quindi il processo di stimolazione si limita ad una modifica reversibile della forma delle piastrine.

METABOLISMO DEL FERRO

Il fabbisogno giornaliero alimentare di ferro è pari a 20 mg/die, di cui ne viene assorbita solo una quota (dell'ordine di 1-1,5 mg) corrispondente alle perdite fisiologiche che vengono così reintegrate. Nel corpo sono presenti circa 4 g di ferro distribuiti:

- 2-2,5g nell'emoglobina + 0,5 in un po' tutte le altre proteine contenenti ferro quali i citocromi (65% del totale)
- 130 mg nella mioglobina => 3,5%
- 1g in ferritina ed emosiderina come riserva tissutale + 10mg in quota circolante legata alla transferrina => 27%

In condizioni normali la quantità di ferro di origine alimentare assorbita è pari al 10%, in relazione alla quantità di ferro presente nel corpo, all'attività emopoietica dell'individuo e alle perdite.

Il ferro è un elemento di transizione facilmente ossidabile; i due stati di ossidazione che si possono riscontrare nell'organismo sono:

- Fe^{2+} è il ferro più biodisponibile. In gran parte esso è legato all'eme (Ferro eminico).
- Fe^{3+} non è assimilabile, a meno che non venga convertito in Fe^{2+} dall'assunzione di acido ascorbico, (vitamina C), che essendo un antiossidante lo riduce a Fe^{2+} rendendolo assimilabile.

Assorbimento

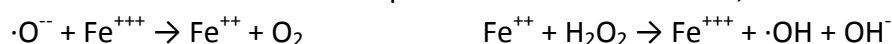
I succhi gastrici facilitano la dissociazione degli ioni ferro dal resto del cibo; con l'aiuto della vitamina C questi ioni vengono ridotti a Fe^{2+} per essere assorbiti. L'assorbimento è influenzato dalle concentrazioni di ferro presenti nell'organismo ed avviene per lo più a livello della mucosa del duodeno dove l'ambiente più acido favorisce l'assorbimento. Gli enterociti sono in grado di assorbire il ferro Fe^{2+} direttamente se in complesso con l'eme in quanto l'intera molecola può attraversare la membrana dell'enterocita. Nel citoplasma in Fe^{2+} viene ossidato a Fe^{3+} per essere immagazzinato nell'apoferritina che accumulando Fe^{3+} diventa ferritina (deposito di ferro).

Dunque l'ione entra nell'enterocita come ione ferroso Fe^{2+} ma diventa ione ferrico Fe^{3+} a livello della proteina. Il suo trasporto nel sangue invece è affidato alla transferrina che lega e trasporta nel plasma l'ione Fe^{3+} sia proveniente dalla dieta, sia proveniente dal metabolismo di emoglobina e mioglobina, fino alle destinazioni finali:

- Midollo osseo: per l'emopoiesi e sintesi Hb
- Fegato: per il deposito
- Muscolo: per la sintesi di mioglobina

Sebbene il ferro associato alla transferrina sia meno dello 0,1% del ferro corporeo totale, questa percentuale rappresenta la frazione dinamicamente più importante, caratterizzata da un'alta velocità di turnover (25 mg/24 h). La transferrina può legare a sé due atomi di ferro Fe^{3+} a livello di due diversi siti. In condizioni normali, la transferrina plasmatica è saturata con per circa il 30%; nel plasma possiamo quindi distinguere diverse forme: quella senza ferro (apotransferrina), quella completamente satura (transferrina diferrica) e quella che contiene ferro solo in un sito (transferrina monomeric).

È estremamente importante che il ferro sia sempre legato a strutture protettive in quanto libero il Fe^{++} è estremamente tossico poiché forma radicali liberi, nel corso della reazione di Fenton



Se gli ioni ferroso e/o ferrico si trovano in soluzione non complessati si ha formazione del radicale ossidrilico ($\cdot\text{OH}$) partendo dal radicale superossido. Il radicale $\cdot\text{OH}$ è specie estremamente reattiva e in grado di decomporre qualsiasi tipo di sostanza con cui venga in contatto.

Normalmente il ferro è presente in tutte le cellule in quando si trova nel 50% degli enzimi del ciclo di Krebs, dunque presente a livello dei mitocondri. La quota maggiore deriva dai globuli rossi i quali vengono smaltiti a livello della milza dove avviene l'emocateresi e il ferro viene immagazzinato e rilasciato dai macrofagi splenici. Sebbene venga costantemente riciclato, una perdita fisiologica di ferro è sempre presente, di circa 1mg/die. Perdite fisiologiche si hanno a causa della desquamazione dei tessuti; per esempio gli enterociti che si squamano a livello intestinale con perdita del ferro in essi contenuti o a causa delle mestruazioni. In base ai livelli di perdita, l'intestino stesso regola l'assorbimento che, in casi particolari, può risultare:

Ridotto assorbimento

- Dieta povera
- Alterazione del pH gastrico con calo dell'acidità
- Presenza di agenti chelanti di ioni bivalenti (EDTA)
- Calo della superficie intestinale assorbente e alterazione degli enterociti.

Tutte queste condizioni possono determinare carenza di ferro tissutale (immagazzinato nella ferritina) determinando:

- deplezione di ferro: la saturazione plasmatica della transferrina arriva ad essere <16%
- anemie sideropeniche: in caso di emorragia cronica o sindrome celiaca che interessa il duodeno dove si ha assorbimento del ferro.
- calo dell'eritropoiesi.

I sistemi di compenso alla carenza di ferro portano ad una ridotta sintesi di apoferritina e dunque ad un calo della ferritina (riserva di ferro) e ad un contrapposto aumento della transferrina (trasporto plasmatico) in modo tale che se c'è poco ferro, poco ne resti depositato nei tessuti aumentando la quota plasmatica.

Aumentato assorbimento

- aumento della motilità intestinale
- emocromatosi (ereditaria)
- aumento del turnover del ferro
- disordini metabolici

Tutte queste condizioni possono determinare accumulo di ferro con sistemi di compenso che portano ad un'aumentata sintesi di apoferritina e dunque di ferritina aumentando così il deposito tissutale e ad un opposto calo della transferrina per ridurre il ferro plasmatico in quanto la saturazione della transferrina arriva ad oltre il 60%. Una condizione cronica di aumentato assorbimento determina un sovraccarico che si traduce in Emocromatosi:

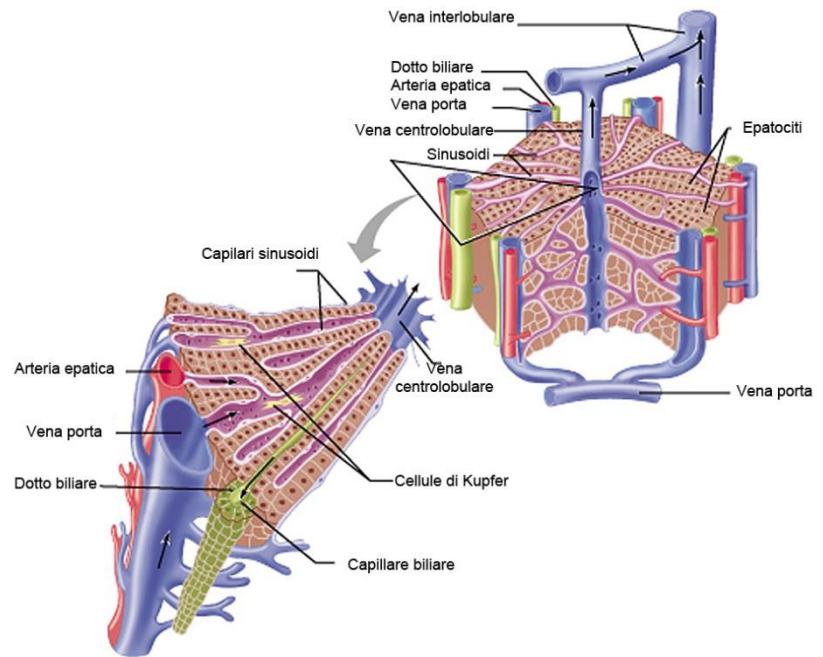
- *Emocromatosi primaria*: è causata da un'anomalia dei geni che controllano la quantità di ferro assorbita con l'alimentazione. Si assiste ad un aumento anche di 2 volte dell'assorbimento del ferro che si accumula e si deposita nei tessuti
- *Emocromatosi secondaria*: di norma è provocata da un'altra patologia o da un altro disturbo che causa il sovraccarico di ferro: ricordiamo le frequenti trasfusioni che determinano un notevole apporto di GR e ferro con conseguente aumentato turnover.

L'emocromatosi può colpire molti organi e causare segni e sintomi diversi; molti dei quali però di solito non si verificano fino all'età adulta. I sintomi variano a seconda della gravità della malattia, tra quelli più frequenti ricordiamo:

- dolore articolare,
- stanchezza,
- debolezza,
- dimagrimento,
- mal di stomaco.

FEGATO

È l'organo più grande (1,5kg) del corpo umano. L'unità morfofunzionale è il LOBULO EPATICO con gli angoli occupati da uno spazio portale che contiene un ramo dell'arteria epatica, uno della vena porta e un canalicolo biliare. I prodotti di digestione assorbiti nell'intestino entrano nella vena porta epatica. A livello dei lobuli il sangue venoso (80%) entra nei sinusoidi dove si mescola a quello arterioso proveniente dall'arteria epatica (20%) i sinusoidi convergono poi nelle centrolobulari, nelle vene sovraepatiche e infine arrivano alla vena cava inferiore che porta il sangue venoso da fegato e arti inferiori al cuore.



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Essendo a cavallo tra circolo portale e circolo generale il fegato smista le sostanze nutritive che gli pervengono dall'assorbimento intestinale e, oltre ad esse, molecole più elaborate che il fegato sintetizza ad uso generale: lipoproteine, albumina, enzimi, colesterolo, fosfolipidi ecc.. È chiaro dunque come quest'organo assuma molteplici funzioni metaboliche inerenti a:

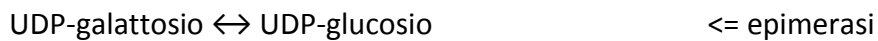
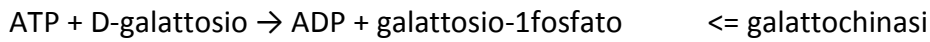
- Metabolismo dei carboidrati,
- Metabolismo dei lipidi,
- Metabolismo delle proteine,
- Metabolismo dei farmaci
- Meccanismo di detossificazione => ittero

Metabolismo dei carboidrati

Il fegato assume una funzione di regolazione nell'ambito del metabolismo dei carboidrati e favorisce il controllo della glicemia con accumulo di glicogeno in fase post-prandiale e rilasciando il glucosio in fase di digiuno dalle riserve glucidiche o intervenendo con la gluconeogenesi. A livello del metabolismo dei carboidrati le vie metaboliche proprie del fegato sono:

- *Glicogenosintesi*: Il fegato riesce a mantenere costante la glicemia: funzione glucostatica del fegato; catturando i monosaccaridi provenienti dall'assorbimento intestinale che trasforma in glicogeno per poi ridistribuirli in forma di glucosio ai vari tessuti su richiesta. L'elevata capacità di sintesi del glicogeno è dovuta alla presenza della glucochinasi, enzima capace di fosforilare il glucosio in glucosio-6-P, anche quando la concentrazione elevata di questo non lo consentirebbe. Va ricordato che, a differenza della esochinasi, la glucochinasi non è inibita da un eccesso di glucosio-6-P. La capacità di rilasciare glucosio in circolo invece, propria del fegato, è dovuta alla presenza della glucosio-6-fosfatasi, che idrolizza il glucosio-6-P in glucosio e fosfato inorganico (Pi).

- *Gluconeogenesi*: è con questo processo di trasformazione di materiale non glucidico in glucosio che il fegato mantiene la glicemia nei limiti normali ed assicura, anche in carenza di glucidi, un adeguato rifornimento di glucosio.
- *Via del galattosio*: il galattosio è un epimero del glucosio perché differisce solo per l'organizzazione spaziale dei costituenti. Il galattosio viene fosforilato dalla galattochinasi in galattosio-1-fosfato. Successivamente l'uridil-transferasi catalizza la formazione di uridildifosfogalattosio (UDP-Galattosio, o UDP-Gal) che viene convertito in UDP-Glucosio ad opera di una epimerasi che determina semplicemente una variazione nell'organizzazione spaziale dei sostituenti al carbonio 4.



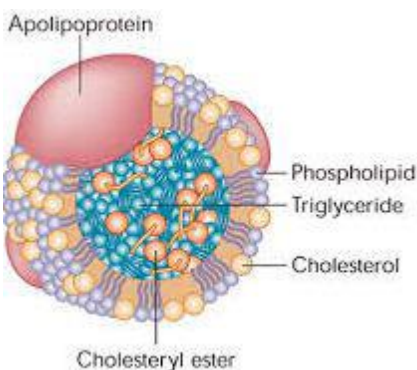
UDP-glucosio viene utilizzato per esempio come substrato nella sintesi del glicogeno. Mancanza di uridil-transferasi determina sindrome di intolleranza al galattosio con problemi epatici ed intestinali,

- Il fruttosio viene in parte trasformato in fruttosio-6-P dalle esochinasi e, in parte prevalente, in fruttosio-1-P dalla fruttochinasi, che nel fegato è molto attiva. Il fruttosio-1-fosfato viene scisso solamente in presenza di *aldolasi* epatica dando diidrossiacetonfosfato e gliceraldeide. Diidrossiacetonfosfato entra nella via della glicolisi come gliceraldeide-3-fosfato grazie all'azione della triosofosfatoisomerasi. È per questo che nel fegato e solo nel fegato, il fruttosio è utilizzato nel processo glicolitico. Nel caso di mancanza dell'*aldolasi* epatica si ha intolleranza al fruttosio. Nel fegato si accumula fruttosio-1-fosfato con elevato sequestro di fosfati da parte del fruttosio, pertanto le cellule epatiche non riescono a sintetizzare ATP con squilibrio energetico generalizzato.

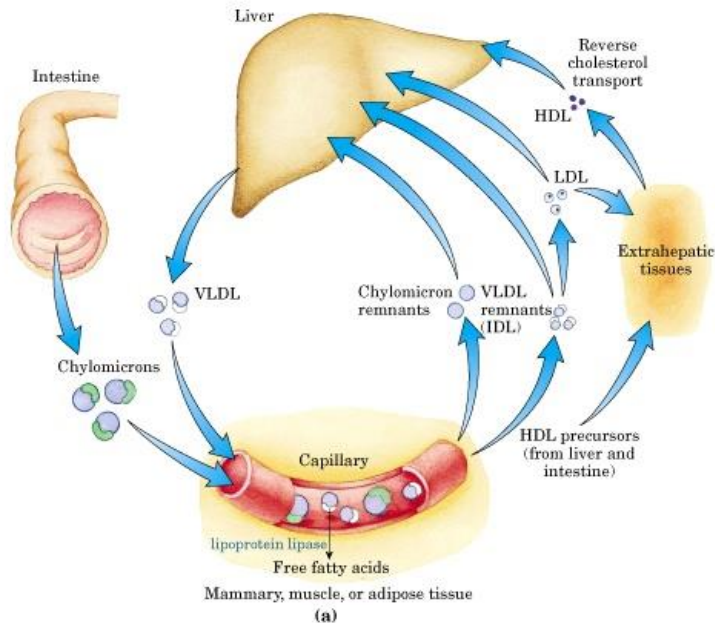
Metabolismo dei lipidi

I lipidi provenienti dalla dieta non possono passare come tali attraverso la parete intestinale dunque prima di essere assorbiti devono essere convertiti da particelle di grasso macroscopico a micelle microscopiche. Questo avviene grazie all'azione dei sali biliari che emulsionano i grassi in micelle finemente disperse e dunque più accessibili all'azione delle lipasi intestinali che degradano il triacilglicerolo in glicerolo e acidi grassi. Questi vengono assorbiti dalle cellule enteriche e al loro interno ricostituiscono i triacilgliceroli per venir incorporati nei chilomicroni assieme a colesterolo e apolipoproteina C-II e B48. I chilomicroni sono i trasportatori dei trigliceridi alimentari che attraverso il sistema linfatico e il torrente circolatorio arrivano ai tessuti dove una lipoprotein lipasi attivata nei capillari dall'apolipoproteina C-II, rilascia acidi grassi e glicerolo che possono così diffondere al citoplasma di miociti, adipociti e qualsiasi altra cellula in cui siano impiegati.

Per quanto riguarda i lipidi immagazzinati negli adipociti questi vengono mobilitati quando il glucagone legando l'adipocita attiva l'adenilatociclastasi che producendo AMPc determina la fosforilazione e l'attivazione della lipasi ormone sensibile e della perilipina. La perilipina è una proteina presente sulla superficie delle gocce lipidiche all'interno degli adipociti che funge da

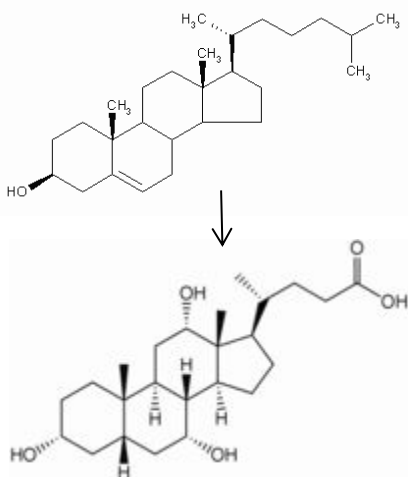


protezione all'azione della lipasi ormone sensibile. Una volta fosforilata subisce una modificazione conformazionale esponendo i trigliceridi all'azione delle lipasi ormone sensibile che idrolizza i triacilgliceroli in acidi grassi liberi che escono dagli adipociti, si legano all'albumina e vengono veicolati nel sangue a dove richiesto entrando nelle cellule attraverso specifico trasportatore.



I lipidi non possono essere trasformati in carboidrati ma i carboidrati possono essere trasformati e immagazzinati sotto forma di lipidi. Il tessuto adiposo e il fegato sono due organi lipogenetici. Il fegato non li può mantenere tutti al suo interno altrimenti si andrebbe incontro a steatosi epatica. Vengono quindi prodotte le VLDL (proteine a bassissima densità) che li trasportano poi in circolo. Le **VLDL** sono i trasportatori di trigliceridi di sintesi endogena (dal fegato alla periferia) formati per oltre il 60% da trigliceridi.

La lipoproteinlipasi si lega all'apolipoproteina C-II e provoca la degradazione dei trigliceridi contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL in glicerolo + acidi grassi. Quando i trigliceridi sono rimossi dai chilomicroni o dalle VLDL, restano in circolo dei residui; le **IDL** (lipoproteine a densità intermedia) che vengono a trasformate in circolo nelle **LDL**. LDL sono trasportatori del colesterolo, contenuto per oltre il 50%, verso la periferia dove viene utilizzato dalle cellule per la sintesi di ormoni, per produrre la bile e soprattutto per mantenere la fluidità delle membrane cellulari. ApoB100 e ApoE presenti sulla superficie delle LDL interagiscono con il recettore di membrana per le LDL, la membrana si introflette ed il colesterolo entra per un processo di pinocitosi. In fine il colesterolo presente in eccesso sulle membrane cellulari e sui tessuti viene tolto grazie all'azione delle **HDL**, lipoproteine ad alta densità ricche in apolipoproteine A. Le apolipoproteine assumono il colesterolo dalle membrane che incontrano. Il colesterolo captato inizialmente è in forma solubile, ma successivamente viene esterificato al gruppo OH precipitando all'interno delle lipoproteine che lo portano al fegato. Giunto al fegato il colesterolo non viene degradato ma eliminato o come è o dopo una parziale modificazione in sali biliari (immagine: da colesterolo ad acido chenodesossicolico).



Durante le *fasi di digiuno* invece i trigliceridi possono essere mobilitati per la produzione di energia, si assisterà dunque ad un flusso di acidi grassi dal tessuto adiposo al fegato in quanto i mitocondri epatici sono la sede esclusiva della sintesi dei corpi chetonici. Se nel fegato il catabolismo degli acidi grassi nel processo della β -ossidazione produce acetil-CoA ad un ritmo superiore di quello del suo smaltimento nel ciclo di Krebs, la quota eccedente di acetil-CoA che viene incorporata nei corpi chetonici utilizzati come substrato energetico dai muscoli e soprattutto dal cuore.

Metabolismo delle proteine

Ad eccezione degli anticorpi tutte le proteine plasmatiche sono di origine epatica => fondamentale la produzione delle proteine della cascata della coagulazione. La sintesi globale delle proteine come la sintesi dei fattori della coagulazione può essere indice di funzionalità epatica. Per esempio: l'albumina ha una emivita molto lunga, pertanto una condizione di ipoalbuminemia è indice di malattia epatica a lungo termine. Ulteriore indice di funzionalità epatica può essere il tempo di Quick o tempo di protrombina: un elevato tempo di Quick è conseguente alla mancata produzione di fattore VII da parte del fegato, produzione che è vit.K dipendente. Dunque i casi che possono verificarsi in pazienti con riduzione di fattore VII e conseguente allungamento del tempo di Quick sono 2:

- Danno epatico con ridotta produzione del fattore VII
- Deficit di vit.K; la K è sintetizzata in larga misura dai batteri intestinali e l'unico caso di deficit si ha nella sindrome da malassorbimento dei lipidi in quanto la K è liposolubile.

Dunque, se la somministrazione di vitamina K per via endovenosa a pazienti con alterazione del tempo di Quick, il tempo di Quick stesso si normalizza allora è di certo sindrome da malassorbimento, caso contrario è sicuramente danno epatico.

Il fegato riceve gli aminoacidi provenienti dall'assorbimento intestinale e quelli prodotti dall'idrolisi proteica nei tessuti extraepatici, specialmente muscoli. Gli aminoacidi sono utilizzati per la sintesi delle proteine intraepatiche e di buona parte di quelle plasmatiche o per la gluconeogenesi o per la produzione di energia mediante il ciclo di Krebs. Non potendo essere immagazzinati vanno incontro a degradazione ossidativa in 3 casi:

- Durante il turnover proteico in cui gli aa non necessari per la sintesi di nuove proteine vengono degradati,
- Quando la dieta è troppo ricca di proteine e il surplus viene degradato,
- Durante digiuno o diabete non curato quando i carboidrati non sono disponibili

La degradazione delle proteine ingerite con la dieta avviene nel tratto gastrointestinale. A livello dello stomaco le proteine vengono denaturate dall'HCl e degradate parzialmente in peptidi dalla pepsina. La degradazione completa a peptidi avviene nell'intestino con l'intervento delle endoproteasi pancreatiche tripsina e chimotripsina. La digestione delle proteine prosegue fino alla formazione di dipeptidi e di aminoacidi liberi per intervento delle amino- e carbossi-peptidasi e delle dipeptidasi. Gli aminoacidi liberi e i dipeptidi sono poi assorbiti dalla mucosa intestinale. Giunti al fegato o ai muscoli la prima tappa fondamentale della degradazione degli aminoacidi per il loro utilizzo metabolico è l'allontanamento del gruppo amminico dall'aa ad opera di specifici enzimi, le transaminasi, che trasferiscono il gruppo amminico (transaminazione) all' α -chetoglutarato generando glutammato. Le transaminasi differiscono tra loro per l'aa su cui agiscono ma sono tutte specifiche per l' α -chetoglutarato come accettore => questo consente di convogliare i gruppi NH_2 provenienti da tutti gli aa su un singolo α -chetoacido, mentre gli scheletri carboniosi residui che costituiscono l' α -chetoacido corrispondente dell'aa deaminato, vengono avviati alla demolizione ossidativa lungo il ciclo di Krebs. Sempre a livello degli epatociti dal glutammato così formato viene liberato ione ammonio grazie alla glutammato deidrogenasi che libera NH_3 rigenerando l' α -chetoglutarato che può essere riutilizzato nel processo di deaminazione. Si ha in questo modo la deaminazione completa degli aa che si conclude con lo smaltimento dell' NH_3 che è tossico, attraverso il ciclo dell'urea o dell'O.C.A (ornitina/citrullina/arginina) in cui viene sintetizzata urea dal fegato e smaltita con le urine.

Farmaci

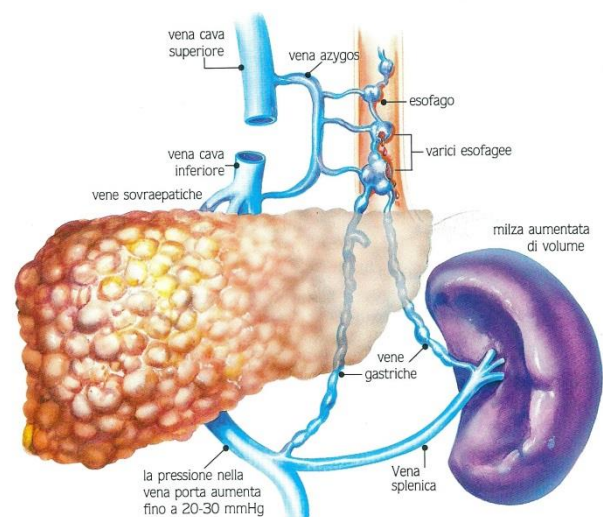
Il fegato ha un ruolo chiave nella biotrasformazione ed eliminazione dei farmaci (soprattutto quelli da via orale assorbiti dall'intestino). Il metabolismo dei farmaci consta di due fasi:

1. *Biotrasformazione* in metaboliti solubili tramite reazione di ossidazione e idrolisi. Avviene nel reticolo endoplasmatico ad opera di ossidasi miste, ma non è propriamente il processo di detossificazione in quanto il metabolita potrebbe risultare anche più tossico del composto originale. La detossificazione vera e propria avviene nella fase 2 di coniugazione
2. *Coniugazione* con acido glucuronico, glutatione, acido acetico... il metabolita solubilizzato durante la prima fase viene coniugato ad un composto endogeno non tossico che ne consente la filtrazione ed espulsione per via renale.

Diversi sono i meccanismi tossici che possono derivare dall'assunzione di farmaci:

- *Reazione tossica diretta* => si ha quando la velocità della fase1 è > della fase2. È dovuta alla sovrapproduzione di metaboliti reattivi che non vengono immediatamente coniugati dunque alterano gli epatociti,
- *Reazione idiosincrasica* => quando metaboliti reattivi legano proteine epatiche si può avere la formazione di neo-antigeni che stimolano reazioni di ipersensibilità.
- Drenaggio errato del sangue dal fegato con passaggio diretto del sangue portale nella circolazione venosa generale (ipertensione portale, che può derivare da iperafflusso ematico o da ostacolo al deflusso dal fegato). Si distinguono tre situazioni di ipertensione portale:
 - tipo pre-epatici in cui il flusso ematico in arrivo è troppo elevato
 - tipo epatico (per danni diretti al fegato, p.e. Cirrosi)
 - tipo post-epatico (p.e. Trombosi delle vene cave inferiori con blocco dell'efflusso e del ritorno venoso)

In tutti questi casi sono necessarie altre vie per far defluire il sangue, che bypassino il fegato compromesso => shunt portosistemici. Non passando più il sangue dal fegato però tutti i processi di detossificazione non vengono compiuti e tutte le tossine e prodotti metabolici come ammoniaca possono arrivare al cervello che ne è molto sensibile determinando encefalopatie d'origine epatica. Inoltre, le vene dello shunt vengono enormemente dilatate con rischio di rottura delle *varici esofagee* ed elevato sanguinamento che può portare a morte. Il sangue dalle varici entra nello stomaco e nell'intestino dove viene digerito (feci nere) e degradato dai batteri intestinali con elevata produzione di ammine che non venendo detossificate possono determinare encefalopatie. In fine in queste situazioni è facile l'istaurarsi di una condizione di ascite => 3-4L che si raccolgono nella cavità addominale e andranno ad alterare e compromettere la meccanica



respiratoria, a dare problemi di terzo spazio e su base osmotica perché verrà stimolato il riassorbimento di soluti e di acqua che andrà ad accumularsi ulteriormente nell'ascite.

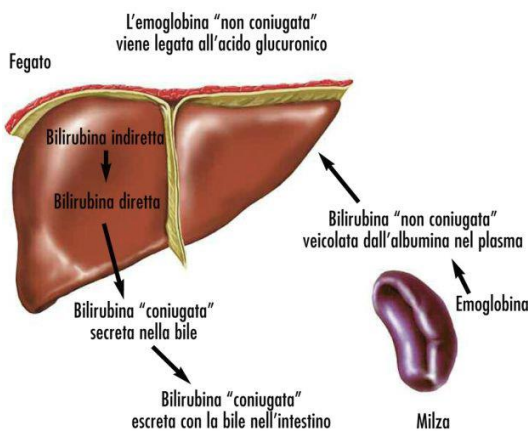
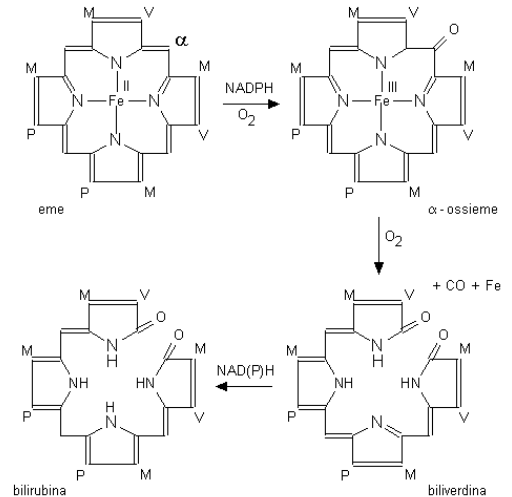
Meccanismo di detossificazione => Ittero

L'ittero è la manifestazione clinica di quasi tutte patologie epatiche in cui si ha l'accumulo della bilirubina nel sangue che determina il caratteristico colorito giallastro di epidermide e sclera.

La bilirubina totale è pari a 1,2-1,5 mg/dl => oltre gli 1,8 inizia depositare nei tessuti dando situazioni di preittero apprezzabili a livello della cornea, sclera, mucosa sub-linguale. Per concentrazioni >3 si ha ittero conclamato.

La bilirubina si forma dal catabolismo della parte eminica dell'emoglobina, della mioglobina e dei citocromi, mentre la parte proteica e il ferro vengono riciclati. Con la rimozione del ferro, l'eme si trasforma nella protoporfirina 9 in cui l'emossigenasi scinde il legame fra l'anello A e B liberando CO. Il monossido di carbonio in concentrazioni ridotte non è tossico, anzi assieme all'ossido nitrico (NO) sono controllori della vasodilatazione.

La protoporfirina 9 così aperta prende il nome di biliverdina che viene trasformata a bilirubina eliminando il doppio legame fra l'anello C e D ed ottenendo un legame attorno a cui la molecola può ruotare liberamente assumendo isomeria cis/trans per la presenza dei doppi legami residui.



Esistono 2 frazioni di bilirubina:

- **Bilirubina indiretta:** la bilirubina una volta libera di ruotare su sé stessa può chiudersi diventando una molecola completamente idrofobica e insolubile. In quanto insolubile e prodotta per la maggior parte dalla milza nel turnover dei GR, deve essere veicolata al fegato legata all'albumina a causa della sua insolubilità. I definisce questa bilirubina indiretta perché non reagisce con il reagente di Ehrlich se non dopo che si siano scissi i legami con la albumina per effetto dell'aggiunta di solventi..
- **Bilirubina diretta:** giunta al fegato la bilirubina viene coniugata con acido glucuronico diventando solubile, per essere in seguito escreta con la bile di cui è il principale pigmento. Diretta = solubile coniugata all'acido glucuronico, e "direttamente" reattiva col reagente di Ehrlich.

Per riassumere: i termini di bilirubina diretta e indiretta quindi fanno riferimento alla reazione di Van Der Bergh in cui la bilirubina, esposta all'acido diazosulfanilico, si scinde in due pigmenti identificabili fotometricamente.

- La frazione diretta reagisce con l'acido diazosulfanilico direttamente per fornire una stima della bilirubina sierica coniugata.
- La bilirubina sierica totale è la quota che reagisce dopo aggiunta di alcool.

- La bilirubina indiretta si ottiene sottraendo dalla bilirubina totale la quota di bilirubina diretta e fornisce una stima della bilirubina non coniugata.

Chiaro dunque come la bilirubina possa fungere da marker di funzionalità epatica. In base ai 3 step del metabolismo della bilirubina (bilirubina indiretta, diretta, bile) si distinguono 3 tipi di ittero:

- *Ittero emolitico o pre-epatico*: quando a causa di emolisi in atto il turnover dei GR è estremamente aumentato e questo comporta un aumento della bilirubina indiretta a livelli troppo elevati per essere captata dal fegato, pertanto ne aumentano le concentrazioni circolanti. Si riscontra in seguito ad anemie, aumento dell'eritropoiesi e comparsa di reticolo citi in circolo. Le feci risultano molto colorate per via dell'elevata quantità di bilirubina (che è pigmento della bile) e al tempo stesso si hanno urine scure perché la bilirubina è complessata all'albumina e non supera la barriera glomerulare.
- *Ittero epatico*: a causa di malattia epatica, spesso epatite di tipo virale (o da altre cause, p.e. sostanze tossiche e farmaci), dove gli epatociti hanno membrana cellulare molto permeabile tale che la bilirubina può passare al circolo. In questo caso aumentano i livelli di bilirubina coniugata (diretta), che normalmente è presente a basse concentrazioni (0.1-0.3 mg/dL). Le urine sono scure (color marsala) ed anche le feci hanno il loro colore abituale.
ATT => raramente cirrosi epatica è causa di ittero
- *Ittero post-epatico*: dovuto ad occlusione delle vie biliari intraepatiche o postepatiche dovuto per esempio a calcolosi biliare. Ciò che aumenta è la bilirubina diretta perché già stata coniugata dal fegato. La bilirubina essendo in questo caso idrosolubile può passare il filtro glomerulare pertanto le urine appariranno molto scure. Al contrario le feci, non arrivando la bile all'intestino e non potendo formarsi stercobilina, saranno molto chiare.

Altri tipi di ittero

- *Ittero di Gilbert*: ittero a bilirubina indiretta dovuto ad un difetto generico di captazione a livello epatico. È una forma benigna tipica dei soggetti con colorito olivastro.
- *Ittero neonatale*: deficit di glucoroniltransferasi che attacca gli acidi glucuronici alla bilirubina. Si tratta di un ittero a bilirubina indiretta che nel neonato tenderebbe a passare e depositarsi al cervello con danni neurologici, non essendo la barriera emato-encefalica ancora formata.

I vari tipi di ittero vengono distinti sulla base del tipo di bilirubina che aumenta e si deposita nei tessuti e sulla base del comportamento dell'urobilinogeno e degli enzimi marker del fegato.

RENE

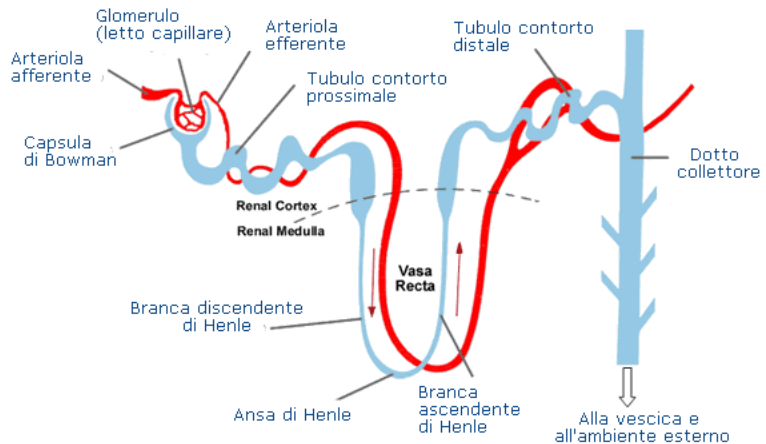
Situati nella cavità addominale i due reni (ognuno 150 g) ricevono grandi quantità di sangue dalle arterie renali (rami dell'aorta) e, dopo averlo filtrato, lo riversano nelle vene renali che confluiscono nella vena cava. I reni svolgono funzioni importantissime:

- Escretrice
- Regolatrice dell'equilibrio acido-base e acqua-elettroliti
- Endocrina a controllare il metabolismo dell'aldosterone (tramite la secrezione della renina), della vitamina D e dell'eritropoietina.

Cenni di Anatomia e fisiologia

Il nefrone è considerato l'unità funzionale del rene e può essere diviso in:

- **Corpuscolo renale:** è formato dal glomerulo renale e dalla capsula del Bowman che avvolge il glomerulo per raccogliere il filtrato (ultrafiltrato).
- **Elementi tubulari:** il filtrato raccolto viene incanalato in una serie di canalicoli, dove viene privato di sostanze utili per l'organismo. Il sistema di canalicoli viene suddiviso in tre sezioni – tubulo prossimale, ansa di Henle, tubulo distale – ognuna delle quali è specializzata nel riassorbimento e/o nella secrezione di particolari componenti.

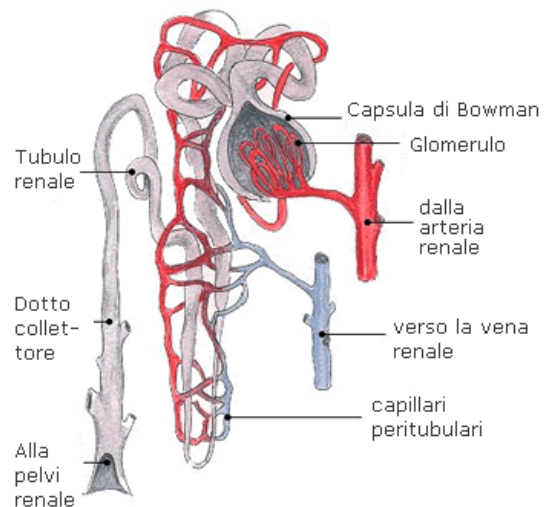


L'arteriola afferente trasporta il sangue da filtrare; l'arteriola efferente veicola il sangue parzialmente filtrato in una rete di capillari distribuita attorno agli elementi tubulari dove le componenti ematiche possono essere riassorbite dai tubuli e secrete le sostanze che devono essere escrete.

Il glomerulo renale funziona da filtro nei confronti del sangue che lo attraversa, trattenendo le cellule e le proteine plasmatiche. Il sangue viene spinto dalla pressione idrostatica contro le pareti capillari, favorendo il passaggio di molte sue componenti nella capsula di Bowman, dove si raccolgono formando l'ultrafiltrato (o pre-urina)

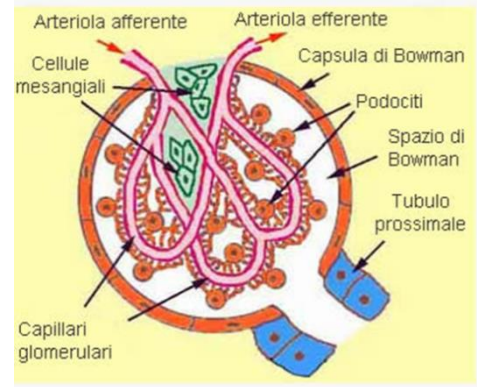
I capillari glomerulari sono fenestrati, con grandi pori che permettono alla maggior parte delle componenti ematiche di filtrare attraverso l'endotelio. Il diametro di questi pori permette il passaggio di molte sostanze,

risultando troppo piccolo soltanto per le proteine plasmatiche di elevato peso molecolare e per le cellule sanguigne (nel complesso definite elementi corpuscolati). La molecola dell'albumina relativamente piccola fa da spartitraffico fra quelle filtrabili e non filtrabili. In condizioni normali



non può attraversare l'endotelio capillare anche perché bloccata da proteine cariche negativamente che la respingono.

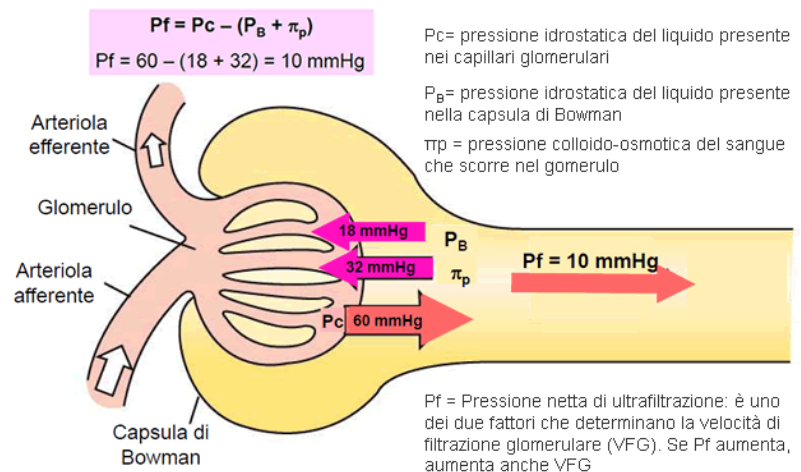
L'epitelio della capsula di Bowman contiene cellule specializzate chiamate podociti; ogni podocita è caratterizzato da estensioni citoplasmatiche, dette pedicelli, che avvolgono i capillari glomerulari. Si vengono così a formare delle fessure di filtrazione (pori a fessura). I podociti presentano anche fibre contrattili, la cui contrattilità è influenzata dall'azione endocrina di alcuni ormoni che regolano la pressione arteriosa e l'equilibrio dei liquidi nell'organismo.



Nei processi di filtrazione entrano in gioco forze molto importanti:

- La pressione idrostatica del sangue che scorre nei capillari glomerulari favorisce la filtrazione: questa pressione dipende dalla pressione arteriosa e dalla pervietà vasale, per cui tanto maggiore è la pressione arteriosa, tanto maggiore risulta la spinta del sangue sulle pareti capillari, quindi la pressione idrostatica capillare (P_c) è di circa 60 mm Hg.
- La pressione colloidale-osmotica è legata alla presenza delle proteine plasmatiche nel sangue; questa forza si oppone alla precedente, richiamando il liquido verso l'interno dei capillari. La pressione colloidale-osmotica del sangue che scorre nei capillari glomerulari (π_p) è di circa 32 mm Hg

Anche la pressione idrostatica del filtrato accumulato nella capsula di Bowman si oppone alla filtrazione. La pressione idrostatica (P_b) esercitata dal liquido accumulato nella capsula di Bowman è di circa 18 mm Hg. Sommando le forze appena descritte emerge che la filtrazione è favorita da una pressione netta di ultrafiltrazione (P_f) pari a 10 mm Hg.



Il volume di liquido filtrato nell'unità di tempo prende il nome di velocità di filtrazione glomerulare (VFG). Il valore medio della VFG è di 120-125 ml/min, pari a circa 180 litri al giorno mentre solo 1,5 L di urina viene espulsa quotidianamente. Questo implica un elevatissimo riassorbimento. La VFG può essere determinata valutando la clearance plasmatica renale di una sostanza che sia filtrata al glomerulo ma né riassorbita né secreta al tubulo; sicché il volume di plasma da cui essa deriva corrisponde a tutto quello filtrato in un minuto e quindi alla velocità di filtrazione glomerulare => ad esempio l'inulina. (ATT => nella pratica clinica la stima della VFG si ottiene dalla clearance della creatinina).

Il flusso ematico renale invece (FER) ammonta a circa 1600 ml/min (30% circa della gittata cardiaca). Questa misura può essere ottenuta attraverso la clearance dell'acido para-aminoippurico che viene sia filtrato dal glomerulo sia secreto dal tubulo prossimale dunque se tanto plasma è stato depurato del PAI, altrettanto deve essere passato attraverso i reni nello stesso periodo di tempo.

Processo di riassorbimento

Lungo il tubulo renale avvengono i processi di riassorbimento e di secrezione.

- **Riassorbimento:** impedisce l'eccessiva escrezione urinaria di acqua, elettroliti e sostanze organiche che hanno passato la barriera del glomerulo.
- **Secrezione:** favorisce il passaggio di sostanze da eliminare dai capillari peritubulari al lume dei tubuli.

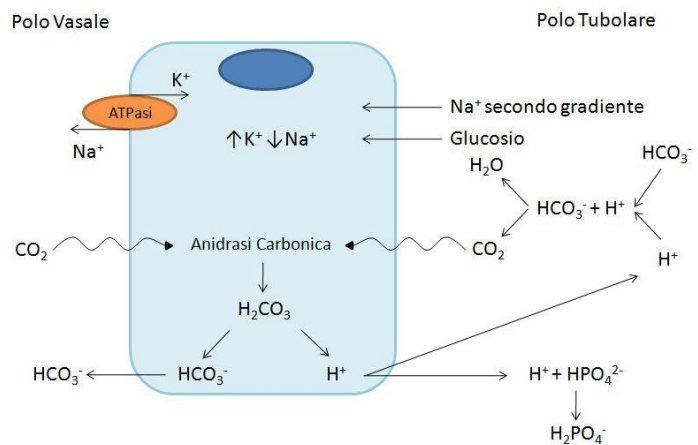
Nel tubolo prossimale:

- Si riassorbe circa il 90% dell'acqua e del cloruro di sodio filtrato.
- Si riassorbono al 100% le sostanze nobili: glucosio, aminoacidi, proteine.

Riassorbimento del sodio

Rappresenta il 65% del filtrato glomerulare. Viene riassorbito ad opera di una pompa Na^+/K^+ ATPasica che secerne Na^+ dal citoplasma al lume capillare. La concentrazione citoplasmatica di sodio cala dunque e il sodio viene riassorbito secondo gradiente dal lume tubulare al citoplasma delle cellule tubulari. Questa quota viene definita riassorbimento obbligatorio e non è sottoposta a controllo ormonale.

Circa il 75% del sodio viene riassorbito nel tubulo contorto prossimale mentre un 25% viene riassorbito nell'ansa di Henle per creare il gradiente di concentrazione della midollare necessario al riassorbimento dell'acqua. I peptidi natriuretici atriali sono gli effettivi regolatori del riassorbimento del sodio. Quote minori ma regolatrici vengono riassorbite nel tubulo distale sotto controllo da aldosterone e dai peptidi natriuretici.



Riassorbimento dei cloruri

Avviene accoppiandosi al trasporto del sodio e in minima parte al potassio. Questo riassorbimento interviene nel mantenimento della neutralità elettrica. Il massiccio riassorbimento di sodio determinerebbe sbilancio nella carica positiva totale; questo bilancio è ristabilito dall'antiporto con il protone H^+ (entra sodio esce protone) o con il cotrasporto di una carica negativa, ossia Cl^- .

Riassorbimento del bicarbonato

Avviene diversamente nei vari tratti del tubulo. L'azione della carbonico anidrasi che permette di recuperare bicarbonato a scapito del protone consente anche di stabilire l'equilibrio elettrico che si modifica con il riassorbimento del sodio

Riassorbimento del glucosio

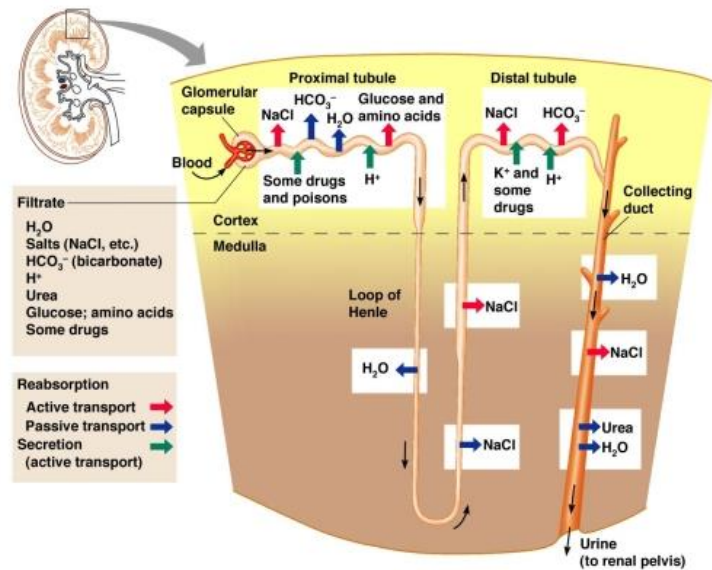
Avviene diversamente a seconda del segmento anatomico coinvolto: il riassorbimento è totale nell'ultimo tratto del TCP finché non vengono saturati i trasportatori. Il riassorbimento del glucosio può anche essere energizzato dal riassorbimento del sodio, come avviene nell'intestino tenue.

Riassorbimento del potassio

Avviene contro gradiente di concentrazione e lungo il gradiente elettrico. Nella porzione iniziale del tubulo è un trasporto attivo, poi diventa passivo.

Riassorbimento dell'acqua

Nel liquido interstiziale intorno all'ansa di Henle e al tubulo collettore sono presenti delle soluzioni con un'osmolarità molto elevata per l'accumulo di soluti (sodio e urea). Inoltre, le pareti dei vari tratti del tubulo renale hanno diversa permeabilità all'acqua e ai sali. La branca discendente dell'ansa di Henle è permeabile all'acqua, che viene quindi riassorbita grazie al gradiente di concentrazione della midollare che varia da 50 a 1200 milliosmoli, ma non ai soluti. Nella branca ascendente dell'ansa di Henle la parete è impermeabile all'acqua, e possiede delle pompe in grado di espellere sali che consentono di mantenere il gradiente osmotico. La branca ascendente termina a livello dell'apparato iuxtaglomerulare dove le



cellule iuxtaglomerulari percepiscono la pressione dell'arteriola afferente in risposta alla quale (se cala) secernono la renina (per aumentare il riassorbimento del sodio a scapito del potassio e il riassorbimento di acqua per alzare la volemia e la pressione arteriosa); le cellule della macula densa percepiscono la concentrazione di cloruro di sodio nel liquido tubulare. Una riduzione viene percepita come una riduzione della pressione arteriosa sistemica stimolando il rilascio di renina dalle cellule iuxtaglomerulari.

Nell'ultimo tratto del tubulo distale e nel dotto collettore, agiscono aldosterone e ormone antidiuretico, per regolare: composizione elettrolitica e volume.

Dal tubulo distale in poi la permeabilità della parete tubulare è regolata attivamente, dall'ormone antidiuretico o vasopressina: questo peptide è infatti in grado di rendere permeabili all'acqua le pareti del tubulo distale e collettore grazie all'azione delle acquaporine, riducendo i volumi escreti e aumentando quelli riassorbiti.

Malattie Renali

Innanzitutto bisogna capire se colpiscono il tubulo o il glomerulo e questo può essere fatto con le prove di funzionalità tubulare e glomerulare.

Funzionalità glomerulare

- *Clearance della creatina*: la quantità di creatina che deve essere eliminata ogni giorno è circa l'1% del totale e se viene correttamente eliminata le concentrazioni ematiche restano inferiori a 1,2-1,3mg/dl. L'escrezione della creatina dipende dal sesso e dal peso, come preso in considerazione nella formula di Cockcroft-Gault. L'escrezione della creatina dipende anche dalla massa muscolare, per esempio un livello di creatinina nel plasma di 1,6 mg/dL può essere normale per un atleta robusto; resta comunque il fatto che la sua clearance è un parametro fondamentale ma non sensibile

$$\text{Creatinine clearance (mL/min)} = \frac{(140 - \text{age [years]}) \times \text{weight [kg]}}{\text{serum creatinine } [\mu\text{mol/L}]} \quad (\text{Females})$$
$$\frac{(140 - \text{age [years]}) \times \text{weight [kg]} \times 1.2}{\text{serum creatinine } [\mu\text{mol/L}]} \quad (\text{Males})$$

per le modifiche minime iniziali perché la creatininemia può restare invariata anche con perdita del 60-70% della funzionalità glomerulare.

- *Proteinuria*: il glomerulo non dovrebbe filtrare proteine superiori a 60kDa. Quelle poche che vengono filtrate sono riassorbite a livello del tubulo prossimale dove le cellule le endocitano e le degradano; il recupero è degli aa e non delle intere proteine.

Funzionalità tubulare

Sono parametri anche meno significativi di quelli glomerulari. Si valuta la glicosuria, ossia il mancato riassorbimento del glucosio, che si può però avere nel caso di superamento della soglia massima in pz diabetici. Teoricamente se la glicemia è normale (e il pz non è diabetico) ma si evidenzia glicosuria allora si ha un problema a livello del tubulo.

- Prove di acidificazione urinaria: viene somministrato un sale quale cloruro di ammonio NH₄Cl, derivante da un acido forte e da una base debole, che determina una reazione salina acida => cioè si somministra un eccesso di protone che sarà escreto dal tubulo se questo funziona correttamente determinando un'acidificazione delle urine che passano da 6,5 a pH 4.
- Prova di concentrazione: al soggetto a digiuno si fa vuotare la vescica e si somministra un pasto asciutto, vietando assolutamente l'assunzione di ogni bevanda. Ogni 3 ore si raccolgono le urine, di cui si misura la quantità ed il peso specifico. In condizioni normali la diuresi si concentra nettamente (15-20 ml per campione) e la densità dell'urine si eleva oltre 1030 e talora oltre i 1040. In condizioni patologiche: la densità non sale oltre 1015-1026 (ipostenuria) mentre la quantità delle urine tende spesso a farsi relativamente alta per poliuria compensatoria.

Insufficienza Renale Acuta

Se ne distinguono 3 tipi:

- *Pre-renale*: sono provocate da disturbi circolatori generali con calo della pressione a livello dell'arteriola afferente ed errata filtrazione glomerulare => non si forma ultrafiltrato. Questo può essere dovuto a shock, emorragia, formazione di terzi spazi ed edema; con conseguente alterazione della volemia e pressione.
- *Renale*: di solito è una patologia di tipo glomerulare come glomerulonefriti e nefriti interstiziali => in generale malattie del parenchima.
- *Post-renale*: caratterizzata dall'incapacità di eliminare l'urina per blocco delle vie escretrici, dovuto per esempio ad ipertrofia prostatica, fibrosi retro peritoneale, ptosi renale (il rene si abbassa e l'uretere si piega e si chiude), litiasi con colica renale.

Nel secondo tipo, una volta risolto il blocco segue una fase di poliuria con aumento fino a 6-7 L al giorno fino al riequilibrio. Le analisi di laboratorio sul sangue mostrano tendenza alla mancata eliminazione del protone con acidosi di tipo metabolico, calo in concentrazione dei bicarbonati e conseguente aumento della kaliemia perché parte del protone viene tamponato entrando nelle cellule e K⁺ viene espulso per mantenere la differenza di potenziale. Aumentano anche le concentrazioni di creatinina, urea (azotemia) e acido urico.

Insufficienza Renale Cronica

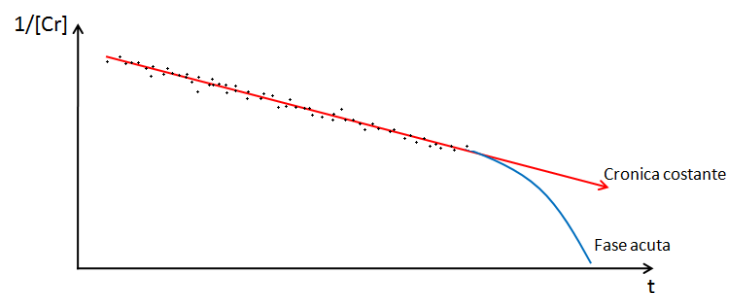
Non si riscontra una variazione marcata dei volumi di urina ma piuttosto la situazione è caratterizzata da squilibri metabolici con ritenzione di sostanze tossiche. Il pz presenta dunque una condizione di uremia con aumento nella concentrazione di urea, creatina, guanidina e deposizione nel tessuto. Inoltre il rene non produce più eritropoietina e il pz presenta anemia. Si verificano

lesioni ossee (osteodistrofia renale), iperfosfatemia e ipocalcemia. Soggetto uremico e anemico assumerà un colorito brunastro con tossine non più eliminate che si accumulano nei tessuti dove cristallizzano determinando uno stato di infiammazione diffusa (in più puzza). Complicazioni di elevata entità derivano proprio dal deposito di queste sostanze tossiche a livello delle sierose determinando sierositi => in particolar modo complicanze gravi si hanno dalla pericardite uremica. Inoltre in tutte le forme di insufficienza renale, il rene non favorisce più l'eliminazione dei fosfati. L'aumento dei fosfati a livello plasmatico determina un calo in concentrazione del calcio (questo per via della $K_{ps} = [Ca^{2+}][Pi]$, rapporto che deve restare costante) con ipocalcemia. Il sistema di compensazione risponde con la secrezione del PTH e stimolazione cronica delle paratiroidi con ipertrofia e iperplasia. In più si ha mobilitazione del calcio dalle ossa con demineralizzazione e distruzione. La rimozione delle paratiroidi è l'unica soluzione per evitare la completa demolizione delle ossa.

Monitoraggio malattia renale

Si eseguono dosaggi seriatî della creatininemia riportando in grafico il reciproco delle concentrazioni a distanza di tempo. Se l'interpolazione dei risultati crea delle rette allora vuol dire che si ha una progressione costante della malattia renale. Se si ha una brusca accelerazione allora alla cronica si è aggiunta una fase acuta.

Raggiunta una creatininemia di 4mg/dl si deve pensare al trapianto o dialisi. Se il trapianto funziona allora la creatininemia deve calare, se non è così ma cresce ancora si tratta di rigetto.



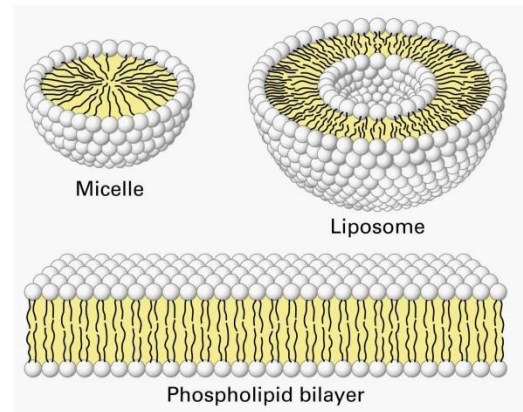
LIPIDI

I lipidi sono sostanze eterogenei caratterizzati fondamentalmente dalla loro idrofobicità. Dal punto di vista funzionale si distinguono in:

- Lipidi di tipo strutturale => colesterolo, fosfolipidi, glicolipidi
- Lipidi con funzione energetica

Alcuni sono molecole anfipatiche, idrofobiche e solubili soltanto in sostanze apolari il cui aspetto strutturale dipende dall'organizzazione che assumono in un liquido polare:

- Quando le concentrazioni sono ridotte si dispongono a monostrato,
- Quando le concentrazioni sono elevate e superano la concentrazione micellare critica, formano strutture micellari.

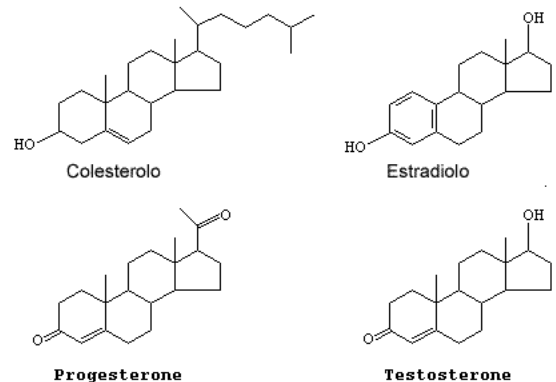


Colesterolo

Ha 27 atomi di carbonio, è una molecola anfipatica che tende a dare strutture micellari. L'ossidrilico viene esposto verso la parte acquosa, che sia interna o esterna, mentre la parte idrofobica del ciclo-pentano-peridrofenantrene è nascosta all'interno del doppio strato della membrana.

Diverse sono le sue funzioni:

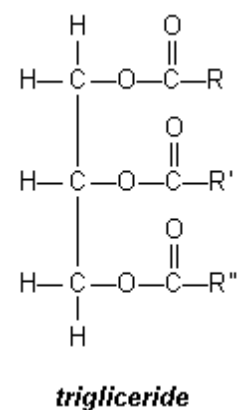
- È il precursore degli ormoni steroidei:
 - 18C → Estrogeni (estradiolo)
 - 19C → Testosterone
 - 21C → Progesterone
- Altri derivati del colesterolo sono: i Glucocorticoidi (non aromatici), i derivati Mineralcorticoidi (aldosterone) ed i derivati Androgenici (testosterone).
- Agisce come fluidificante delle membrane.



Il nostro organismo è in grado di sintetizzare colesterolo ma non degradarlo. Dunque può essere eliminato come tale nella bile o dopo conversione a Sali biliari. Acido colico o deossicolico sono Sali biliari derivati dal colesterolo che possono essere ulteriormente modificati al carbossile della catena laterale aggiungendo un glicina o taurina.

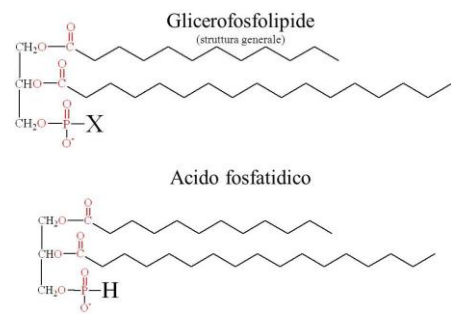
Trigliceridi (funzione di riserva)

Glicerolo più 3 molecole di acidi grassi costituiscono un'ottima riserva energetica altamente conservata ed immagazzinata. Derivato ed intermedio dei trigliceridi è l'acido fosfatidico dove il terzo carbonio viene esterificato con acido fosforico generando il precursore dei glicerofosfolipidi. (legame estere = legame dove è presente un ossigeno fra le due specie => RCO-O-R'). Deriva dalla condensazione di un alcool – in questo caso il glicerolo- e di un acido)



Glicerofosfolipidi (funzione strutturale)

Sono derivati dei diacilgliceroli in cui sul C3 è presente un raggruppamento fosfato. Sempre attraverso un legame estere il gruppo fosfato può essere a sua volta esterificato con una "serina" (aa) ottenendo una fosfatidilserina. La fosfatidilserina viene decarbossilata con formazione di fosfatidiletanolamina la quale può essere metilata a dare fosfatidilcolina. Tutti questi sono lipidi che danno luogo alla formazione di micelle.



Sfingolipidi (funzione strutturale)

Sono formati dalla fosforilazione del residuo alcolico della ceramide con formazione di sfingofosfolipidi come sfingosina e sfingomieline. Dalla ceramide si possono anche formare i glicolipidi; aggiungendo un galattosio si ottengono i cerebrosidi da cui derivano gli altri derivati glicolipidici.

Al laboratorista interessano i meccanismi di trasporto ematico dei lipidi per cui si distinguono 2 vie di trasporto dei trigliceridi esogeni ed endogeni, una via di trasporto del colesterolo alla periferia ed una via di recupero del colesterolo al fegato, come già accennato.

I carboidrati possono essere trasformati in acidi grassi a livello del fegato (steatosi epatica se non vengono rimossi dopo la sintesi) o del tessuto adiposo. Nel mitocondrio viene prodotto acido citrico che esce nel citoplasma dove avviene la sintesi degli acidi grassi. Il citrato è il trasportatore dell'Acetyl-CoA all'esterno del mitocondrio per l'utilizzo come substrato fondamentale per la sintesi degli acidi grassi. Una volta prodotti dovranno essere trasportati in circolo per essere utilizzati dai tessuti periferici o immagazzinati

In circolo dunque si trovano:

- Chilomicroni => sintesi intestinale => trasporto esogeno
- VLDL => sintesi epatica => trasporto endogeno
- LDL => si formano nel plasma per trasformazione dalle VLDL
- HDL => sintetizzate nel fegato sono secrete come dei dischi di ApoA che vanno in circolo, entrano in contatto con le membrane cellulari in periferia caricandosi del surplus di colesterolo e riportandolo al fegato per riutilizzarlo o smaltirlo.

Dislipidemie

Gli errori metabolici che riguardano il trasporto dei lipidi vengono definiti dislipidemie (alterazione dei lipidi circolanti):

- *Primitive* (familiari o di natura genetica) date da:
 - Errori metabolici: mancata attivazione della lipoproteina lipasi o da deficit di lipoproteina CII. Ne conseguono livelli di trigliceridi alti con infarto mesenterico e pancreatite.
 - Alterazioni legate al metabolismo delle LDL: sono situazioni caratterizzate da ipercolesterolemia in seguito a:
 - ridotta rimozione delle LDL (per assenza del recettore delle LDL, per mutazioni delle ApoE)

- Aumentata produzione delle LDL anche conseguente ad un'aumentata sintesi delle VLDL. Questi poi possono depositarsi a livello dei tessuti (formando xantomi), a livello di articolazioni ed endoteli determinando reazioni infiammatorie croniche. Endoteli sono pari a 400 m² pari a 1kg; le cellule sulla superficie hanno le NOX (NADH-ossidasi implicate nella regolazione della vasodilatazione) che liberano radicali sotto forma di anione superossido O₂⁻. Questo è un elemento ossidante a cui le LDL sono particolarmente sensibili da cui si genera OX-LDL che depositano nei tessuti richiamando macrofagi per l'eliminazione e determinando così l'infiammazione che viene valutata attraverso dosaggi ad alta sensibilità della proteina C reattiva (a bassa concentrazione nelle infiammazioni diffuse).
- Alterazioni a livello del fegato nella sintesi di ApoA e ApoB
 - Una maggior sintesi di ApoB si ripercuote sui livelli delle LDL con un forte aumento.
 - Assenza di ApoA fa sì che l'organismo non sia più in grado di veicolare il colesterolo al fegato per eliminarlo.
- Da riduzione delle HDL. L'assenza di HDL può essere data da una ridotta sintesi.
- Secondarie (più frequenti) date da
 - Stile di vita (obesità, sedentarietà, alcool..)
 - Quadri patologici ben definiti: sindrome nefrosica (caratterizzata dalla perdita di proteine quali l'albumina per filtrazione renale e la sintesi compensatoria di proteine ad alto peso molecolare – aptoglobina, beta2 macroglobulina, Apolipoproteina B - da parte del fegato per mantenere adeguata pressione oncotica), diabete, ipotiroidismo, infarto.

Fattori Di Rischio

Si valutano i Rischi relativi di contrarre l'aterosclerosi. Lo studio Framingham definisce come fattori di rischio:

- Colesterolo totale > 220 mg/dL (ottimale a 200 mg/dL dato dalla somma di VLDL, HDL, LDL)
- Colesterolo LDL > 135 mg/dL
- Colesterolo HDL < 45 mg/dL
- Trigliceridi (rappresentano un fattore di rischio indipendente dal colesterolo) >200 mg/dL

Il colesterolo legato alle LDL è nello stato di maggiore ossidazione; un aumento dell'ossidazione comporta un aumento della solubilità e deposito nei tessuti.

Dosaggi

Tipicamente su soggetti a digiuno per evitare la presenza di trigliceridi esogeni (nei chilomicroni).

- *Trigliceridi*: il plasma viene trattato con una lipasi che scinde i trigliceridi in glicerolo + 3 acidi grassi. Il glicerolo viene trattato con la glicerocinasi che trasforma in β-glicerofosfato. Questo ad opera della β-glicerofosfato deidrogenasi produce diidrossiacetonfosfato liberando NADH che sarà ciò che andrà dosato.
- *Colesterolo*: utilizzando la colesterolo ossidasi si produce 4-colestenone e acqua ossigenata; quest'ultima sarà ciò che andrà dosato.
- *HDL*: plasma trattato con metallo bivalente (Mn²⁺) e destransolfato. Si ottiene un precipitato che contiene HDL. Si centrifuga e risospende il pellet in un egual volume di acqua ottenendo una frazione con le sole HDL. Si procede trattando con la colesterolo ossidasi + colesterolo idrolasi perché nelle HDL la maggior parte del colesterolo è esterificato. Questo determina la

liberazione di H_2O_2 che può essere dosata. H_2O_2 + metanolo si formano acqua e formaldeide la quale reagisce con il reattivo acetilacetone-ammoniaca formando un composto rilevabile allo spettrofotometro. La sua concentrazione è direttamente proporzionale a quella iniziale di colesterolo.

- *LDL*: sono ottenute attraverso la formula: $LDL = \text{Colesterolo tot.} - HDL - (\text{Trigliceridi} / 5)$.
I "trigliceridi/5" rappresentano le VLDL.

Tecnica di flottazione => centrifugando il plasma una lipoproteina viene a galla, la VLDL perché ha una densità inferiore alle altre e galleggia come l'olio, mentre le altre sono in soluzione nel plasma. Aumentando la densità verranno a galleggiare le LDL mentre il colesterolo in soluzione sono le HDL.

ISOTOPI

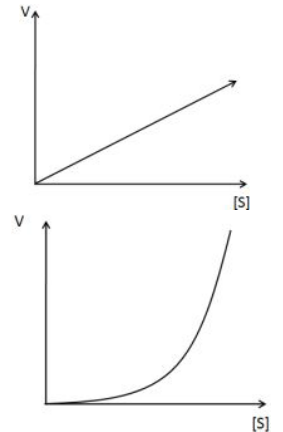
I diversi isotopi presentano la stessa reattività della specie chimica più abbondante. Per esempio consideriamo gli isotopi dell'idrogeno:

- Prozio ^1H : costituisce il 99,9% dell'idrogeno totale => costituito da 1 protone + 1 elettrone
- Deuterio ^2H : secondo isotopo stabile costituito da 1 protone + 1 neutrone + 1 elettrone
- Trizio ^3H : isotopo radioattivo costituito da 1 protone + 2 neutroni + 1 elettrone.

Le differenze che questi 3 isotopi presentano risiedono nella reattività nucleare, cioè nella stabilità del nucleo, ma relativamente alla reattività chimica della specie quella risulta essere la stessa visto che dipende dal numero degli elettroni nella nube periferica. => come abbiamo H_2O così possiamo avere D_2O , cioè acqua pesante con 2 atomi di deuterio anziché il normale prozio.

Per quanto riguarda il trizio invece, l'instabilità dell'isotopo invece può essere valutata in base al rapporto fra numero di neutroni e protoni (N/P). Esiste un valore limite di stabilità pari a 1,54 per cui, oltre a questo valore, l'isotopo viene considerato instabile e il nucleo va incontro a modifiche che lo rendono stabile. Dunque internamente si sviluppano delle forze che determinano il decadimento dell'isotopo secondo una cinetica di primo ordine. Cioè, la termocinetica di una reazione definisce la velocità $V = k[S]^x$ => in termini enzimatici definiamo reazione di ordine:

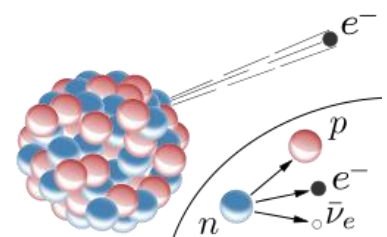
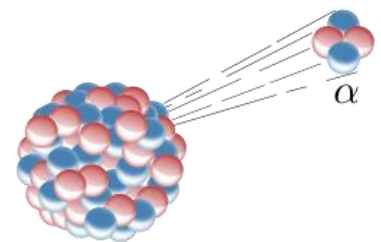
- Zero => reazioni in cui la velocità non dipende dalla concentrazione del substrato
- Primo => reazioni in cui la velocità dipende dal substrato con andamento lineare
- Secondo => reazioni in cui la velocità dipende dal substrato con andamento parabolico



Con decadimento di primo ordine non si descrive chiaramente l'interazione fra due specie ma una decomposizione interna dell'isotopo che si verifica con liberazione di energia sotto forma di radiazioni.

Radiazioni emesse

- α => composte da nuclei di He ($2p + 2n$) dunque di massa decisamente apprezzabile. Possono essere emessi solamente nei fenomeni di fissione in cui si ha lo "split" del nucleo di un elemento a numero atomico elevato in 2 nuclei distinti. ATT: difetto di massa = quando si passa da un elemento all'altro a seguito della fissione la massa fra i prodotti non è la stessa dei reagenti ma si ha una perdita sotto forma di energia
- β => Sono radiazioni emesse da elementi di basso numero atomico. Un neutrone viene convertito in un protone + elettrone, con emissione di quest'ultimo, perciò la massa non si modifica sensibilmente. Si tratta quindi di un elettrone di origine nucleare e quindi ad alta energia cinetica. Quello che varierà sarà il numero atomico che aumenterà di una unità e l'elemento radioattivo si trasforma nell'elemento che lo segue nella tavola periodica. Nuovamente è una radiazione ad alta energia con sensibile penetranza.



- γ => pure radiazioni elettromagnetiche ad elevata energia ed elevata penetranza
- X => energia elettromagnetica che si propaga sotto forma di onde generate da fenomeni di decadimento atomico che interessano transizioni elettroniche tra orbitali. (ossia l'energia che viene liberata da un elettrone quando passa da un orbitale ad alta energia ad uno a più bassa energia)

Dosaggio di un enzima in una biopsia tissutale

In una biopsia il dosaggio deve essere estremamente sensibile perché ridotta è la porzione di tessuto e, poiché di solito si cercano carenze dell'enzima, ancora più ridotta è la concentrazione dell'enzima. Gli isotopi che possono essere impiegati sono il trizio, C^{14} (β -emittente), P^{32} ($\beta+\gamma$ -emittente), I^{125} (per valutare la captazione di iodio da parte della tiroide) e I^{131} => si usano radioisotopi e non isotopi stabili con cui si potrebbe verificare solamente la differenza di massa attraverso spettrometria di massa.

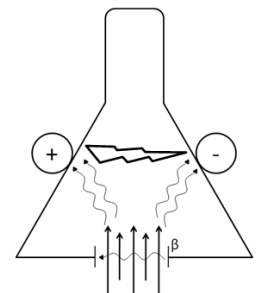
Per esempio marcando un glucosio-1-fosfato con un isotopo radioattivo è possibile valutare l'attività enzimatica della glicogeno fosforilasi. Questo enzima catalizza la reazione reversibile che impiegando un fosfato inorganico da una molecola di glicogeno libera un glucosio 1-fosfato.

$(Glic)_n + Pi \leftrightarrow (Glic)_{n-1} + Glucosio\ 1-P$ si marca dunque il Glucosio 1-P con C^{14} e si fa incubare glicogeno + glucosio-1-P marcato in presenza della glicogeno fosforilasi proveniente dal tessuto omogenizzato (omogenizzato con cavitazione del tessuto congelato in azoto o sonicazione). La glicogeno fosforilasi dell'omogenizzato lavorerà secondo cinetica che dipende dalla [enzima] => il glucosio marcato verrà aggiunto alla catena di glicogeno (la reazione di biosintesi del glicogene in vivo è catalizzata dalla glicogene sintetasi); in vitro la fosforilasi può funzionare in modo reversibile e la reazione inversa è favorita ad alte concentrazioni di glucosio 1-fosfato. Il glicogeno marcato viene poi fatto precipitare in alcol, lavato dal glucosio marcato non utilizzato e dosato. La radioattività legata al glicogene è quindi una misura della quantità di glucosio legato, che è proporzionale alla sua concentrazione.

Valutazione dell'emissione da parte delle specie marcate

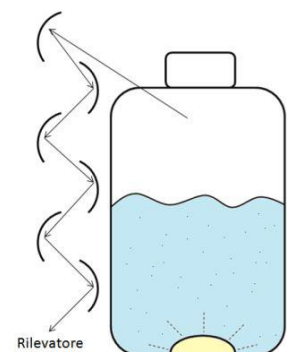
Camera di ionizzazione

Effetto coppia: si ottiene quando l'energia della particella β è così elevata da spaccare una molecola di gas generando una carica + e una -. Le particelle β ionizzeranno le molecole di gas che verranno attratte dai 2 poli generando una scarica elettrica proporzionale all'interazione del gas con le radiazioni β dunque proporzionale alla quantità di radiazione emessa.



Scintillazione (fiala da scintillazione)

Il campione marcato con isotopo radioattivo viene posto all'interno della fiala riempita con materiali organici chiamati "scintillanti" a base di complessi aromatici o ammonio quaternario che hanno la caratteristica di presentare orbitali delocalizzati. Se entrano in contatto con le particelle β gli elettroni degli "scintillanti" passeranno da uno stato fondamentale ad uno stato eccitato ("promozione elettronica"), per poi ritornare allo stato fondamentale con emissione di energia sotto forma di lampo luminoso. La fiala viene posta in un contatore di scintillazione che capta i lampi luminosi e



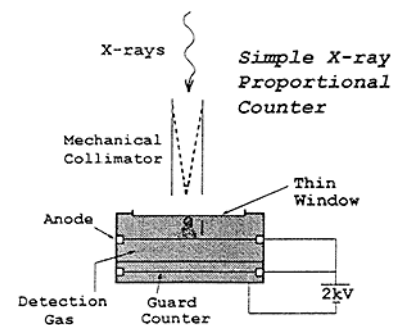
li amplifica. Per effetto fotoelettrico viene misurata l'intensità di corrente di queste emissioni luminose e quindi rapportate al grado di radiazioni emesse.

Effetto Čerenkov

Permette di determinare emissioni β senza l'impiego di scintillatori. Il principio utilizza un materiale che emette radiazioni elettromagnetiche quando una particella passa attraverso questo materiale polarizzandone le molecole (cioè facendo sì che assumano carica + o carica-). Le radiazioni emesse saranno proporzionali al numero di particelle da cui è attraversato dunque dal grado di emissioni β . Questo consente di bypassare l'impiego di sostanze scintillanti che venendo in contattato con emissioni β devono essere adeguatamente smaltite.

Determinazione emissioni X

Rilevate con X counter: scintillatori particolari. Non ci sono fototubi ma semiconduttori che quando attivati da una radiazione X danno luogo direttamente ad una scarica elettrica. L'entità della scarica (misurata con un amperometro) dipenderà dal grado di emissione. (non si devono smaltire sostanze organiche inquinate da radiazioni quindi molto più semplice)



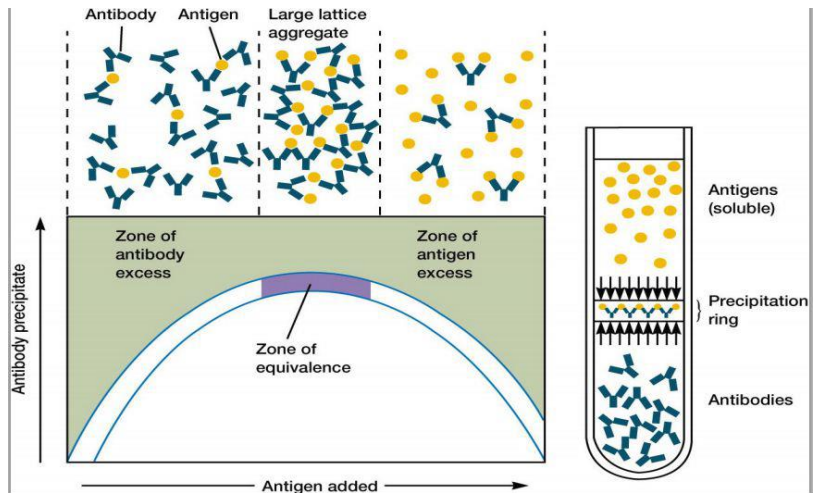
Tempi di decadimento

Valutando i tempi di decadimento (o dimezzamento, cioè lasso di tempo in cui i livelli di emissione vengono dimezzati) delle sorgenti radioattive si può calcolare l'attività residua del campione decidendo quando smaltire senza più rischi per persone o ambiente.

$P^{32} \Rightarrow 14\text{gg}$ $H^3 \Rightarrow 10\text{anni}$ $C^{14} \Rightarrow 5\text{mila anni}$ $Na^{23} \Rightarrow 23\text{ore}$ $P^{33} \Rightarrow 4\text{ore}$

TECNICHE IMMUNOMETRICHE

La reazione antigene-anticorpo può dar luogo in vari casi alla formazione di un polimero di elevatissimo peso molecolare che diventa insolubile nelle soluzioni acquose. Gli immunoprecipitati si formano quando antigeni e anticorpo sono presenti in determinati rapporti stechiometrici. Fisiologicamente possono essere molto importanti, in quanto questi immunocomplessi precipitano nei tessuti e possono essere la causa di numerose patologie. Valutando a quali concentrazioni si ottiene il precipitato è possibile



generare la curva in figura determinando la zona di equivalenza. La formazione dell'immunoprecipitato è una condizione sfruttata in diverse metodiche

In fase solida

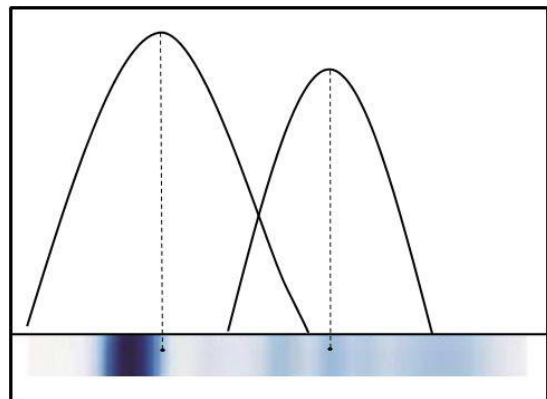
Immunodiffusione radiale

In una capsula di Petri si scioglie l'agar, lo si mescola con l'Ab e si lascia polimerizzare. Si scavano poi pozzetti nell'agar in cui si pongono gli antigeni. Man mano che l'antigene diffonde nell'agar si forma un precipitato ad anello che si muove verso la periferia, divenendo stazionario nella zona di equivalenza (cioè raggiunta la zona di equivalenza si ferma). Ponendo in un grafico il diametro dell'anello di precipitazione che si ottiene a varie concentrazioni note di antigene al punto di equivalenza contro la concentrazione di antigeni, si ottiene una retta di taratura che consente di determinare la concentrazione dell'antigene in un campione ignoto.



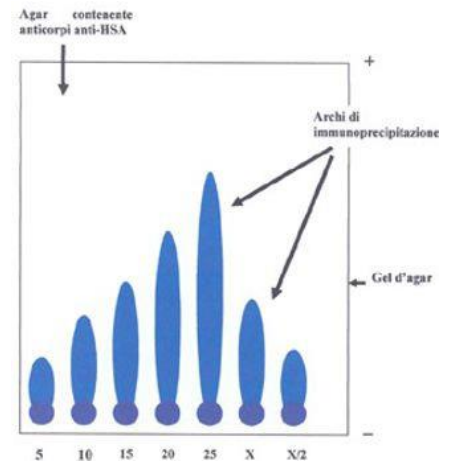
Immunolettroforesi crociata

Dopo aver separato siero con corsa elettroforetica questo viene fatto correre in agar polimerizzato con gli anticorpi diretti contro le proteine di interesse. Applicando una differenza di potenziale le proteine correranno e legheranno gli Ab formando un picco che diventerà stazionario nella zona di equivalenza e la cui altezza descriverà la concentrazione della proteina in esame.



Immunolettroforesi Rocket

È una tecnica che si avvale di un gel d'agar in cui sia presente un determinato anticorpo. In questa matrice vengono scavati dei pozzetti nei quali vengono posti degli antigeni. Applicando una corrente continua gli antigeni migrano verso l'anodo e incontrano gli anticorpi che si muovono invece verso il catodo; quando antigene e anticorpo avranno raggiunto l'equivalenza stechiometrica si formeranno gli immunoprecipitati insolubili che daranno archi di precipitazione. Più l'antigene è concentrato nel pozzetto, più alto sarà il suo arco di precipitazione. Ponendo in grafico l'altezza degli archi contro la concentrazione si otterrà una curva di taratura che servirà per determinare la concentrazione di un antigene in un campione ignoto.



In fase liquida

La turbidimetria viene applicata quando la dimensione delle particelle che provocano torbidità è dell'ordine o superiore al micrometro, condizione nella quale l'assorbimento prevale sulla diffusione (cioè si ha una differenza fra l'intensità di radiazione incidente alla particella e la radiazione riemessa dalla particella). Nel caso si abbia a che fare con particelle di più piccole dimensioni, dell'ordine di decine o centinaia di nanometri, prevale l'effetto diffusivo e viene pertanto utilizzata la nefelometria. (cioè non si ha sostanziale differenza fra la radiazione incidente e emessa).

Turbidimetria

Una raggio luminoso che attraversa un fluido subisce degli effetti dovuti all'interazione tra il raggio stesso e le sostanze disciolte. La torbidità, ossia la presenza di particelle sospese, produce due effetti:

- assorbimento di energia luminosa,
- diffusione di energia luminosa.

L'intensità luminosa di un raggio che attraversa un fluido torbido (senza deviare dalla sua direzione) subisce un progressivo indebolimento. Ponendo in grafico l'intensità luminosa contro la concentrazione si otterrà una curva di taratura che servirà per determinare la concentrazione di un antigene in un campione ignoto.

Nefelometria

La nefelometria è una metodica ottica di analisi che permette di ricavare la quantità di sostanza misurando la radiazione diffusa. Viene applicata per fasi disperse estremamente fini, di diametro dell'ordine di decine o centinaia di nanometri. Quando un raggio incidente attraversa una sospensione colloidale molto diluita produce una radiazione diffusa perfettamente misurabile e l'intensità della luce risulta, entro certi limiti, proporzionale alla concentrazione della fase dispersa.

DOSAGGIO DEGLI ELETTROLITI

Metodiche Electrochimiche

Le procedure elettrochimiche si basano sullo studio delle interazioni fra corrente elettrica e sostanze conduttrici (metalli o ioni) e consentono l'analisi di specie chimiche che possano modificare il loro stato di ossidazione-riduzione (redox) in seguito a reazioni di trasferimento di elettroni. Tali tecniche trovano ampie applicazioni in chimica clinica per la determinazione del pH e degli elettroliti nel sangue, dei gas nell'emograsia, e rappresentano inoltre la base per la produzione di biosensori utilizzati per la determinazione semplice di analiti (elettrodi specifici) o di prodotti di reazioni chimiche.

Per la loro descrizione si fa abitualmente riferimento alle celle galvaniche, costituite da due semi-celle elettrochimiche in ognuna delle quali avviene una reazione redox fra un elettrodo e sostanze disciolte nella soluzione in cui l'elettrodo è immerso. Le caratteristiche elettrochimiche di una delle due celle sono note (semi-cella di confronto o meglio di riferimento) mentre quelle dell'altra (cella di lavoro o di misura) sono variabili dipendendo dallo stato ossidoriduttivo del campione biologico. Le celle elettrochimiche possono essere utilizzate in due prospettive:

- 1) valutare le differenze di potenziale o le intensità di corrente che si sviluppano quando si mettono a contatto fra loro la semi-cella di riferimento con quella ignota,
- 2) far avvenire delle reazioni chimiche redox non favorite somministrando al sistema delle correnti elettriche esterne forzando quindi le reazioni coinvolte.

Nella prima prospettiva le celle elettrochimiche servono quindi fondamentalmente per misurare concentrazioni (o meglio attività, intendendosi con questo termine la concentrazione dello ione libero in soluzione, indipendentemente da quello complessato con altre sostanze) di ioni (perché le forze elettromotrici e le correnti che si stabiliscono sono proporzionali alla concentrazione delle specie presenti) l'altra per produrre sostanze pure o per trasformarle, commutando in pratica energia elettrica in materiale reattivo agli elettrodi.

I processi elettrochimici sono controllati dalla legge di Nernst che correla la differenza di potenziale (più propriamente la forza elettromotrice E) generata in una semi-cella elettrochimica alla intrinseca capacità degli ioni di subire reazioni redox (misurata dalla forza elettromotrice standard, E^0), alla concentrazione delle specie ionizzate presenti in soluzione, al numero degli elettroni trasferiti nel singolo processo redox ed alla temperatura assoluta a cui si opera. La forza elettromotrice globale della cella elettrochimica è poi data dalla somma delle forze generate nelle singole semi-celle. In formula l'equazione di Nernst per il potenziale globale della cella è scritta

$$E_{\text{cell}} = E_{\text{cell}}^{\ominus} - \frac{RT}{zF} \ln Q_r$$

Oppure se si preferisce – come si fa di solito – passare ai logaritmi decadici essa diventa

$$E = E^0 + \frac{0.05916}{z} \log_{10} \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}}$$

In cui Z rappresenta il numero di elettroni trasferiti nel singolo evento redox, R è la costante dei gas, T è la temperatura assoluta, F è la costante di Faraday.

Ne consegue che, una volta che siano note le caratteristiche elettrochimiche della semi-cella di riferimento è possibile determinare la forza elettromotrice sviluppata dalla seconda semi-cella e quindi calcolare il rapporto fra la attività delle specie ossidata e ridotta della seconda semi-cella, quella di misura. Queste misure (potenziometria) vanno effettuate in condizioni di equilibrio, quindi a circuito aperto (senza sviluppo di corrente) e consentono, in particolare nel caso delle specie ioniche (elettroliti), di determinare la loro attività del plasma. Va notato che le attività e le concentrazioni delle specie ioniche tendono a uniformarsi in soluzioni altamente diluite ma possono differirne considerevolmente in soluzioni più concentrate come nel caso degli ioni nel plasma, da una parte per delle interazioni ione-ione che ne schermano gli effetti e la reattività, dall'altra per l'interazione con proteine di legame che riducono la frazione di ioni liberi. Per la specie ionica in questione, si risale dalle misure elettrochimiche di attività alla molalità e poi alla molarità (l'unità in cui i valori sono abitualmente riferiti) sulla base della relazione

$$aX^+ = \gamma X^+ \cdot mX^+$$

per l'ipotetico catione X^+ , in cui a è l'attività termodinamica dello ione, γ è il coefficiente di attività e m è la molalità. I coefficienti di attività variano da ione a ione e dipendono dalla forza ionica ed eventualmente dalle caratteristiche del campione, per esempio dal grado di associazione degli ioni alle proteine plasmatiche (albumina), per cui misure eseguite su campioni concentrati o diluiti con soluzioni standard possono variare come già detto. I dati in molarità del referto (cioè concentrazione c) si ottengono correggendo i valori della molalità degli ioni per la massa dell'acqua nel campione (ρ_{H_2O}) perché gli ioni sono presenti solo nella fase acquosa del campione. Nel nostro esempio per gli ioni presenti nel plasma o nel siero si ottiene

$$cX^+ = mX^+ \cdot \rho_{H_2O}.$$

ρ_{H_2O} assume abitualmente un valore di 0.93 perché nel plasma e nel siero la massa dell'acqua è rappresentata dal 93 % del volume totale perché il 7% del volume è rappresentato dalle proteine plasmatiche che escludono dal loro interno l'acqua e di conseguenza gli ioni. I valori di ρ_{H_2O} possono ridursi significativamente nel caso di sieri iperlipemici o con aumentata concentrazione di proteine (paraproteinemie).

Le tecniche più affidabili per ottenere le concentrazioni degli ioni sono quindi quelle derivate dalla misura dell'attività per via potenziometrica (p.e. con l'uso di elettrodi selettivi) che misura l'attività cioè l'effettiva concentrazione nella fase acquosa, ma esistono anche procedure spettroscopiche (emissione di fiamma e di assorbimento atomico) e anche tecniche di attivazione enzimatica (per gli ioni K^+ e Na^+ , e per la CO_2) o di modifiche spettroscopiche indotte dall'interazione fra lo ione e un "recettore" specifico. Esse verranno descritte in seguito.

Elettrodi Specifici (ISE)

Fra i numerosi esempi di elettrodi selettivi vanno ricordati quelli per la misura del pH, della pCO_2 , della pO_2 , dei cloruri e degli ioni sodio e potassio (oltre a "costruzioni" più complesse note sotto il nome di biosensori).

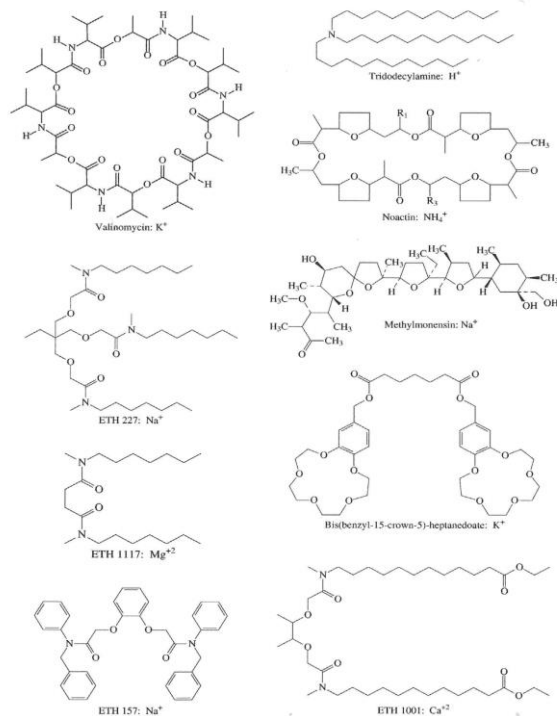
Gli elettrodi specifici sono abitualmente costituiti da elettrodi in vetro o da membrane che presentano permeabilità selettiva agli ioni. Negli elettrodi di vetro si osserva un flusso selettivo, attraverso il loro spessore, dello ione in oggetto e si mettono così in contatto fra loro due compartimenti in cui in uno è presente una soluzione dello ione a concentrazione nota e costante, e nell'altro la soluzione ad attività/concentrazione ignota. In entrambi i compartimenti sono presenti elettrodi di misura. In alternativa la struttura separatrice fra i due compartimenti può essere rappresentata da membrane in cui siano inseriti canali che consentano la permeabilità specifica per gli ioni di interesse. Nel caso degli elettrodi di vetro, si tratta abitualmente di vetri Corning di composizione diversa per ogni ione. P.e. nel caso degli elettrodi selettivi per l' H^+ il vetro è composto di miscele di SiO_2 , Li_2O e CaO in rapporto molare 68 : 25 : 7 con una permeabilità selettiva $H^+ \gg Na^+ > K^+$, mentre nel caso degli elettrodi per il sodio il vetro è costituito da SiO_2 , Na_2O e AlO in rapporto molare 71 : 11 : 18, con la selettività $H^+ > Na^+ > K^+$, che rende quest'ultimo un sensore specifico per il sodio in virtù della costanza del pH plasmatico in condizioni fisiologiche. Va tenuto presente che nella maggior parte dei casi, invece di un vero e proprio flusso di ioni da una superficie all'altra del vetro o della membrana, si tratta di un adsorbimento differenziale dello ione sulle due superfici in funzione della differenza di attività dello ione nei due compartimenti in modo tale che si stabilisca una differenza di potenziale (potenziale di membrana) che segue la legge di Nernst in una forma semplificata

$$E = E' + \frac{N}{z} \cdot \log a$$

visto che in uno dei due compartimenti l'attività dello ione è costante. L'equazione, quindi, indica che la differenza di potenziale che si instaura è direttamente proporzionale al logaritmo della attività dello ione nel compartimento di misura visto che tanto E' che N/z (che sono rispettivamente il fattore di Nernst $[RT/F]$ e la carica dello ione) sono costanti. Il criterio di specificità della selezione (permeabilità o adsorbimento dello ione) è quindi cruciale per l'utilizzo degli utilissimi ISE (ion-selective-electrodes). Esempi tipici di ISE in vetro sono quelli per:

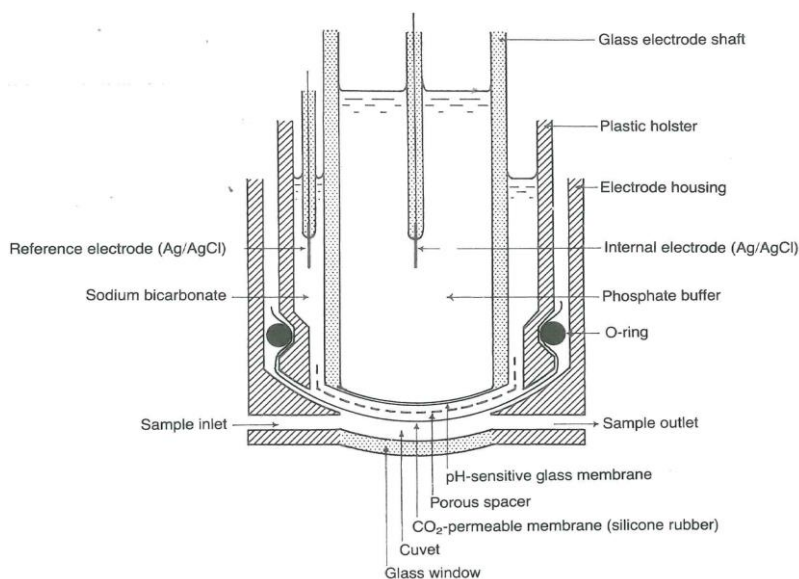
- l'idrogeno: il classico pH-metro in cui la fase costante è abitualmente rappresentata da un elettrodo di platino coperto di platino altamente poroso su cui viene fatto gorgogliare H_2 gassoso che si ionizza secondo la reazione $H^+ + e^- = 1/2H_2$
- il Cloruro che determina l'attività dell'anione secondo la reazione $AgCl$ (solido) + $e^- = Ag$ (solido) + Cl^- perché i valori di attività di $AgCl$ e di Ag sono entrambi 1 perché sostanze pure allo stato solido.

Più versatili sono gli ISE a membrana di cui sono stati descritti modelli per misure di pH, Na^+ , K^+ , Rb^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NH_3 e CO_2 . Le membrane sono costituite da materiali plastici, PVC (polivinil-cloruro) e ionofori specifici per lo ione in quantità approssimative di 65%, 30% e 1-3% assieme ad altri additivi. Essi danno in genere risposte lineari in un ampio range di concentrazioni dell'analita come nel caso del K^+ in cui le concentrazioni che possono essere misurate senza diluizione del campione vanno da 0.1 a 50 100 mM. La selettività degli elettrodi a membrana dipende tanto dalla natura del "plasticizzante" che dallo ionoforo, di cui alcuni sono particolarmente interessanti come la valinomicina per il K^+ . Questi elettrodi, poi, si distinguono in tre categorie (scambiatori ionici carichi se dissociati/scambiatori ionici carichi se complessati/ionofori veri e propri senza carica elettrica) sulla base della modalità di interazione con l'analita. La struttura di alcuni di questi ionofori è riportata nella figura qui sotto.

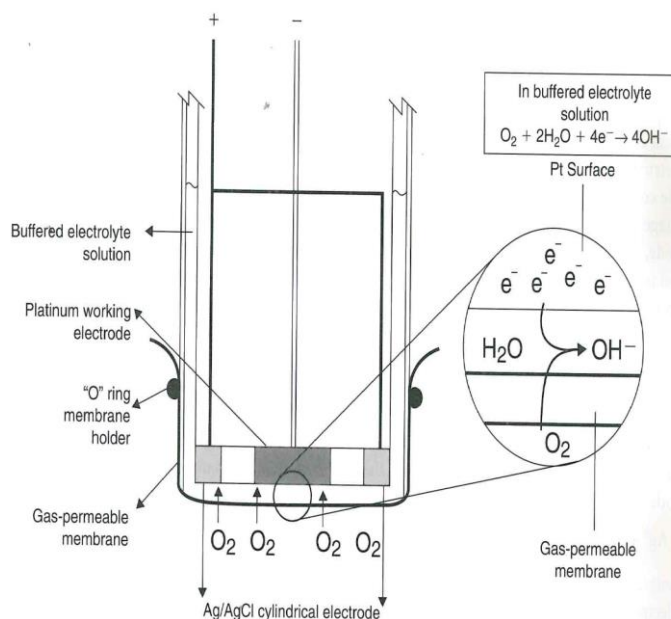


A seguire poi gli schemi di funzione di alcuni elettrodi a membrana di ampio utilizzo, in particolare quelli per la CO_2 e per l'ossigeno (elettrodo di Clark).

L'elettrodo per la misura della CO_2 classico ed ancora in uso è rappresentato fondamentalmente da una cella a flusso in cui scorrono in sequenza il sangue, soluzioni di lavaggio e soluzioni di calibratura a contatto con una membrana sottile di gomma siliconica (o di Teflon) permeabile alla CO_2 . Sull'altro versante è presente un tampone, di sodio bicarbonato (circa 5 mM) diluito, contenente anche dei cloruri. Questa soluzione è poi posta in equilibrio con un tampone fosfato tramite una membrana di vetro sensibile al pH. In entrambi i tamponi, bicarbonato e fosfato, sono immersi due elettrodi $Ag/AgCl$ che agiscono come elettrodi di riferimento e di misura di tipo potenziometrico delle variazioni di pH. La diffusione della CO_2 del sangue modifica il pH del compartimento con tampone (che è a bassa concentrazione) in seguito alla sua idratazione e alla dissociazione del protone, secondo la stessa reazione della carbonico anidraasi già considerata nella equazione di Henderson-Hasselbach. La modifica di pH che si osserva all'elettrodo di misura è funzione logaritmica della variazione della concentrazione di CO_2 .



A differenza degli elettrodi potenziometrici descritti finora l'**elettrodo di Clark** per la misura dell'ossigeno disciolto è una **cella di tipo amperometrico**, che misura cioè l'intensità di una corrente invece che una differenza di potenziale. Anch'esso è organizzato come una cella a flusso da cui l'ossigeno diffonde attraverso una membrana di polipropilene in una soluzione di tampone fosfato in cui pescano due elettrodi uno (anodo) di Ag/AgCl, l'altro (catodo) rappresentato da un filo di platino mantenuto ad un voltaggio di -0.65 Volts, rispetto all'anodo. In assenza di ossigeno il sistema è stabile all'equilibrio, se invece nel liquido di flusso è presente ossigeno esso diffonde all'interno della cella e viene ridotto dal filo di platino polarizzato. In seguito alla riduzione per ristabilire l'equilibrio iniziale si innesca una corrente la cui intensità è funzione della tensione di ossigeno che ha attraversato la cella a flusso.



Per quanto riguarda i dosaggi degli elettroliti nei campioni biologici le tecniche basate sugli ISE sono sicuramente le più diffuse al giorno d'oggi, con due metodiche distinte, quella indiretta e quella diretta. La **metodica ISE indiretta** utilizza elettrodi di considerevoli dimensioni, che richiedono volumi relativamente grandi di liquido per l'immersione adeguata dell'elettrodo. In pratica il campione biologico (di solito il plasma) viene diluito con volumi consistenti di un diluente col vantaggio di ridurre nel campione la concentrazione delle proteine che col tempo possono adsorbirsi sulla superficie della membrana ed alterarne la permeabilità. Al contrario nella **metodica ISE diretta** l'elettrodo viene posto a contatto con il campione non diluito. Questa procedura richiede l'adozione di elettrodi miniaturizzati e sta riscontrando sempre più il favore dei laboratoristi, nonostante il costo degli elettrodi sia decisamente superiore a quello degli elettrodi utilizzati nelle procedure indirette.

Va ricordato che le tecniche ISE sono potenzialmente soggette ad errori per mancata specificità (interferenza da altri ioni), blocco delle membrane da ripetuto contatto con proteine che aderiscano alla superficie e dagli "effetti di esclusione elettrolitica" con cui si intendono l'alterazione del volume della fase acquosa del campione in caso di iperlipidemia o di iperproteinemia, come già indicato, anche se in questo caso le discrepanze sono normalmente del tutto trascurabili.

Tecniche spettroscopiche di spettrofotometria di fiamma e di assorbimento atomico

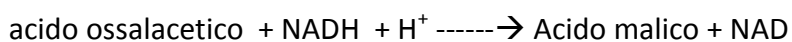
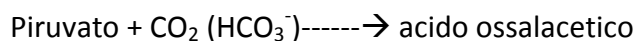
Come si sa gli atomi esistono abitualmente in uno stato fondamentale da cui possono essere “promossi” allo stato eccitato in relazione ai livelli energetici della nube elettronica, in seguito all’assorbimento di energia esterna. Dallo stato eccitato gli atomi tendono poi a “ricadere” allo stato fondamentale con emissione di energia (frequentemente luce) all’ambiente. Su questi concetti si basano due delle metodiche classiche per la determinazione delle concentrazioni (attenzione, concentrazioni) degli elettroliti. Si tratta delle tecniche di **spettrofotometria di emissione di fiamma** e di spettrofotometria di assorbimento atomico. Nella prima, una quota di siero diluito viene aspirato in un sistema a vuoto con gas di trasporto per nebulizzare il campione. Il campione viene poi evaporato a circa 2000° con un fiamma ossiacetilenica (o analoga) sicchè gli elettroni vengono eccitati in un modo relativamente aspecifico per poi ritornare allo stato fondamentale liberando energia di lunghezza d’onda (e quindi colore) caratteristica del tipo di elettrolita. Il litio emette luce nel rosso, il sodio nel giallo (λ_{\max} a 589 nm), il potassio nel viola.... L’intensità della luce emessa è direttamente proporzionale alla concentrazione dell’elettrolita presente nel campione.

Nella **spettrofotometria di assorbimento atomico**, che rappresenta una procedura per molti aspetti inversa rispetto alla fotometria, si determina la capacità degli atomi presenti nel campione di assorbire energia (luce) specifica dell’elettrolita facendo passare i campioni nebulizzati attraverso un fascio di luce emessa da una lampada il cui catodo è costituito dall’elemento in studio. In questo caso, il riscaldamento e la nebulizzazione del campione non hanno lo scopo di eccitare ma solo di dissociare gli elettroliti dai legami chimici che hanno contratto nel campione e quindi liberare atomi allo stato neutro, che assorbono con facilità la luce emessa dalla lampada alle λ specifiche dell’elemento. In questo caso quindi si determina la riduzione dell’intensità del raggio di luce incidente.

Tecniche basate su attivazione enzimatica o formazione di complessi

Esistono enzimi la cui attività è dipendente dalla presenza di ioni (abitualmente cationi) che li attivano con cinetiche di saturazione che seguono, fundamentalmente, curve di saturazione analoghe alle curve michaeliane di saturazione per il substrato. Il grado di attivazione è, quindi, una funzione della quantità di cationi che vengono aggiunte alla miscela di dosaggio. Il metodo, quindi, si presta come procedura per la quantificazione dei cationi in campioni biologici. La procedura è stata ampiamente utilizzata per i cationi potassio e sodio, con risultati che sono sovrapponibili a quelli ottenuti con le tecniche più avanzate (spettrofotometria di assorbimento atomico) per la determinazione delle concentrazioni di elettroliti. Per il *sodio* l’enzima cui si ricorre è la beta-galattosidasi batterica, che si utilizza, di preferenza, in forma immobilizzata e il nitrofenil-beta-galattoside come substrato, misurando il rilascio di nitrofenolo a 420 nm. Per la misura del *potassio* si utilizzano altri enzimi, in particolare la triptofanasi oppure anche la piruvico chinasi.

Nell’ambito delle tecniche enzimatiche per la misura di piccoli analiti vanno ricordate anche le tecniche per la misura della CO₂, che ricorrono alle reazioni accoppiate della piruvico carbossilasi e della malico deidrogenasi secondo lo schema:



Se la reazione della piruvico carbossilasi viene fatta avvenire a pH alcalino, la CO₂ presente nel plasma viene rapidamente idratata a bicarbonato che è l'effettivo substrato della carbossilasi, in modo tale che le due reazioni accoppiate risultano procedura idonea per la misura della CO₂ presente nel sangue, con la diminuzione dei valori di assorbimento a 340 nm in seguito alla ossidazione del NAD ridotto.

Accanto a queste reazioni su base enzimatica, per la determinazione di elettroliti si utilizzano anche tecniche spettrofotometriche basate sulla formazione di complessi colorati. Le procedure più note sono quelle per la *determinazione della calcemia* totale e della sideremia (ferro circolante legato alla transferrina). Nella prima, il plasma raccolto con eparina viene deproteinizzato per trattamento con acidi, nuovamente tamponato e mescolato con molecole organiche che formano complessi rossi (Cresolftaleina-complessolone) o violetti (arsenazo III), la cui estinzione viene misurata a 560 o a 650 nm rispettivamente. Le concentrazioni di calcio libero possono essere misurate con l'uso di ISE oppure calcolate con correzione per i livelli dell'albuminemia.

Per la *determinazione del ferro*, il pH del siero viene abbassato per il rilascio dalla transferrina del ferro che viene poi ridotto dalla forma Fe³⁺ a Fe²⁺ e poi trattato con una specie chelante tramite gruppi -N=C-C=N- per formare un complesso colorato con alto coefficiente di estinzione molare. Si usano in particolare due cromogeni, la Batofenantrolina e la Ferrozina. Metodiche che includano una tappa di deproteinizzazione sono raccomandate soprattutto per i soggetti con una iposideremia perché il metodo senza deproteinizzazione tende a sottostimare la sideremia. Il controllo del ferro circolante di solito include anche il dosaggio della saturazione della transferrina. In questo caso accanto alla sideremia come descritto si tratta una frazione di siero con Fe³⁺ per saturare la transferrina, si rimuove l'eccesso di ferro libero con precipitazione con MgCO₃ e si ripete il dosaggio

I biosensori (o sensori biologici)

Una definizione diffusa descrive i Biosensori come: dispositivi chimici in cui un meccanismo di riconoscimento specifico legato al riconoscimento di un analita, tramite interazione con una molecola biologica, genera un segnale convertito in risposta elettrica, tramite un trasduttore. L'elemento biologico di riconoscimento può essere un enzima, un anticorpo o un acido nucleico. A seconda del loro utilizzo i biosensori vengono variamente identificati come immunosensori, sensori ottici (o optodi), biochips, glucometri, ecc.....

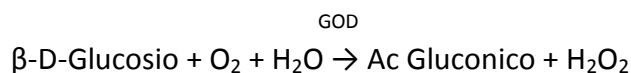
Gli **optometri** sono molto interessanti. Sono costituiti, fondamentalmente, da un supporto su cui è immobilizzato un colorante o un fluoroforo che subisce delle modifiche spettrali, con riduzione dell'intensità della luce emessa, in seguito alla interazione con il ligando per cui mostra specifica affinità. Il tutto viene ricoperto con un materiale che consenta il passaggio dell'analita ma eviti il contatto diretto della cellule del sangue con la superficie dell'optode. Un esempio tipico è rappresentato dai sensori per l'O₂ in cui la fluorescenza del pirene o del fenantrene viene

quenchiata dall'esposizione a concentrazioni crescenti di O₂. In pratica, questi optodi seguono la legge di Stern-Volmer per il quench chimico:

$$I_0/I = 1 + K_{sv} pO_2$$

Gli optodi danno risposte affidabili nella regione di linearità del quench.

Il primo esempio importante di BIOSENSORE ENZIMATICO fu sviluppato da Clark per il dosaggio del glucosio, immobilizzando con una membrana da dialisi della glucosio-ossidasi (GOD) in contiguità all'elettrodo di Clark per l'ossigeno e dimostrando che l'attività dell'enzima era modificata in relazione alla tensione dell'ossigeno. La GOD reagisce con glucosio producendo acido gluconico, due elettroni e due protoni ed inibendo l'enzima che viene riattivato allorché intervenga l'ossigeno che forma H₂O₂ reagendo con i protoni e gli elettroni. In questo modo l'enzima si riattiva e può essere nuovamente utilizzato nella catalisi. La dimostrazione del rilascio di H₂O₂ o del consumo di ossigeno sono quindi la dimostrazione quantitativa dell'ossidazione del glucosio. Il rilascio di H₂O₂ è un fenomeno frequente nelle ossidazioni biologiche e trova ampie applicazioni nella pratica di laboratorio. Per esempio nel dosaggio del glicerolo, del colesterolo, dell'acido urico, dell'etanolo, della creatinina ecc. Oltre che con l'elettrodo di Clark, l' H₂O₂ può essere determinata tramite l'utilizzo dell'enzima perossidasi secondo lo schema seguente, applicato al dosaggio del glucosio in cui la GOD catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico e la formazione di H₂O₂ a sua volta decomposta dalla perossidasi (POD) in presenza di un accettore cromogenico di ossigeno, il fenolaminofenazone (OD):



Si sviluppa un colore bruno la cui intensità è proporzionale alla concentrazione del glucosio presente nel campione. La procedura della POD sviluppata originariamente per le determinazioni manuali è ora disponibile anche in versione automatizzata.

Altri esempi sono rappresentati dai BIOSENSORI DI AFFINITÀ in cui spesso il sensore immobilizzato è rappresentato da acidi nucleici o in alternativa da anticorpi. In ogni caso deve trattarsi di interazioni ad alta affinità per mantenere i necessari criteri di specificità ed evitare interazioni aspecifiche con altri ligandi. Questa necessità fa sì che il legame sia pressoché irreversibile e che di conseguenza i biosensori di affinità siano, fondamentalmente, dei dispositivi monouso, che "lavorano" per contatto diretto (il legame) con un segnale elettrico generato dalla semplice interazione o per via indiretta cioè attraverso dei rivelatori ulteriori, perché le capacità di trasdurre un semplice evento di legame in una risposta elettrica sono molto limitate. I biosensori di affinità basati su nucleotidi sono particolarmente utili per la identificazione di mutazioni. In questo caso il sistema di cattura è una sequenza di deossiribonucleotidi (complementare a quella della sospetta mutazione) che presenti inosina al posto della guanina. Se essa viene fatta reagire con prodotti di PCR del gene mutato, le sequenze generate potranno interagire con quella di cattura ed il complesso che ne risulta sarà un doppio di DNA polinucleotide contenente basi guaniliche che possono essere ossidate generando l'evento elettrico. Un esempio di detezione indiretta è quello di trattare il sensore di affinità saturato con la seconda sequenza con agenti intercalanti che

contengano probes metallici ossidabili (osmio, rutenio....) in modo tale che l'intensità della corrente elettrica che si genera sia una funzione del numero delle sequenze ibridate che si sono formate.