

Regolazione acido-base

Abbiamo già definito cos'è un sistema tampone(?) delle proteine è il sistema chimico immediato che interviene istantaneamente; l'altro è quello respiratorio che interviene attraverso l'eliminazione più o meno accentuata della CO₂ e quindi di una sostanza fundamentalmente acida.

Infine avevamo il sistema renale che è quello che interviene più tardivamente ma che è anche capace sia di eliminare gli acidi che di riassorbire delle basi; tutti e due gli elementi fanno sì che –se vi ricordate l'equazione di Handerson/Hasselbach: quel rapporto tra basi e acidi che normalmente è uguale a 20 e che permette così di dar luogo a un pH di 7.4–si mantenga più o meno intorno a questi valori. Quindi sia un eventuale incremento o decremento al denominatore o al numeratore di questa equazione può essere meglio regolata a partire dall'apparato renale. Apparato renale che quindi elimina sia gli H⁺ sia riassorbe bicarbonati.

Ma come fa ad eliminare gli H⁺?

Essi si possono eliminare attraverso una riduzione del pH delle urine (perché normalmente le urine hanno un pH acido anche perché il metabolismo dell'organismo è prevalentemente acido).

La presenza quindi di H⁺ in eccesso nelle urine fa abbassare il pH delle urine e determina l'eliminazione di una quota di H⁺. E' chiaro però che questo pH non può andare al di sotto di certi limiti cioè in genere non può andare al di sotto di 4.5/4 di pH; questo onde evitare alterazioni dell'epitelio di rivestimento del sistema renale. Quindi c'è bisogno di eliminare l'H⁺ attraverso l'emuntorio renale anche con modalità diverse che non determinano una riduzione del pH delle urine e questo viene svolto dal rene attraverso una serie di meccanismi.

Il primo è quello che consente al rene di eliminare una sostanza molto tossica per l'organismo, l'AMMONIACA(NH₃) che si determina per tutti i prodotti azotati, è una molecola idrofobica, volatile, diffusibile ed estremamente tossica in particolare per il sistema nervoso centrale ma anche per altre cellule. Quindi il rene ha la funzione di eliminare l'ammoniaca semplicemente attraverso l'associazione con l'H⁺: cioè eliminando una valenza acida che è data dall'H⁺ e legandola all'ammoniaca abbiamo la formazione dello ione ammonio. quest'ultimo diventa idrosolubile, passa nelle urine e non acquisisce quell'elemento di acidità notevole qual è quello dell'H⁺ libero; quindi diventa quindi un accettore di H⁺ (indeterminato?). Da un lato l'eliminazione di un H⁺, quindi direttamente di una valenza acida, dall'altro formando un prodotto che risulta essere fundamentalmente diciamo una base o cmq con un pH notevolmente meno basso dell'(?). In questo modo quindi il rene elimina l'ammoniaca e anche 1H⁺.

Un altro sistema è quello collegato ai fosfati, tamponi fosfati: il rene tra le sue funzioni ha quella di regolare la concentrazione di molti ioni e di molti elementi più o meno(?) e tra questi abbiamo anche la regolazione del Ca, del Mg, del fosfato...

Per quanto riguarda il fosfato: è di per se stesso un sistema tampone anche piuttosto efficace perché è formato da un acido forte -l'acido fosforico H₃PO₄- ma è formato anche da tre basi di intensità differente: H₃PO₄ può cedere 1, 2, 3 H⁺ in base alla sua forza, al suo grado di dissociazione dando luogo a tre basi: la più debole H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, la più forte PO₄³⁻.

Se leghiamo un H⁺ alla base fosfato PO₄³⁻ in realtà abbiamo da un lato l'eliminazione di un H⁺ e quindi una modifica del pH acido cioè della concentrazione di H⁺, una loro riduzione, e dall'altro abbiamo la formazione non di un acido ma di una base meno forte ma pur sempre una base cioè il

PO₄³⁻ più H⁺=HPO₄²⁻:quindi abbiamo tolto una valenza acida ma abbiamo creato una base meno forte del PO₄³⁻ma pur sempre una base e qsto fa sì che il pH a livello delle urine non scenda ulteriormente e però viene eliminata cmq una valenza acida perché l'H⁺ è legato a qsta base.Anche qsto determina quindi da un lato l'eliminazione di H⁺,dall'altro l'evitare di fare diminuire ulteriormente il pH delle urine che abbiamo detto al di sotto di 4 risulta essere deleterio per qnt riguarda l'epitelio di rivestimento.

Altro sistema attraverso cui il rene elimina sempre H⁺ è dato dalla pompa sodio -potassio:i tubuli renali hanno la capacità di scambiare il Na con il K,questo determina da un lato il riassorbimento del K e dall'altro l'eliminazione del Na e con qsto anche l'eliminazione di H₂O.Quindi da un lato svolge la funzione normale di eliminazione di liquidi e di Na e dall'altro tende a recuperare anche il K che nel siero tende ad essere abbastanza basso come concentrazione perché normalmente va da 3.2 a 5.2/5.5 a seconda del tipo di determinazione come mEq(?).Quando c'è una situazione di acidosi avremo un aumento nella preurina nell'escrezione di H⁺ i quali daranno luogo a una competizione con il K per lo scambio con il Na.Essendo cioè l'H⁺ molto simile allo ione K e poiché qsti viene scambiato con il Na,abbiamo una competizione tra l'H⁺ e il K per essere scambiato con il Na e qsto fa sì che venga riassorbito l'H⁺,eliminando il Na e il K,in qsto caso;non viene recuperato e quindi viene perso:l'incremento della perdita di K e quindi ipercaluria.

Domanda:però l'H⁺ viene riassorbito?

Risposta:l'H⁺ viene riassorbito perché se è in eccesso non si può acidificare troppo l'urina ,si è tolto già l'ammoniaca ,si è modificato il fosfato e considerato che perdita del fosfato significa perdita di uno ione estremamente importante che viene regolato dal punto di vista ormonale ,attraverso tutto un sistema che coinvolge le ossa ...quindi non è una regolazione 'semplice'in cui un eccesso di una cosa viene eliminato con un'altra e c'è il bilancio,è un bilancio che cmq viene regolato entro dei limiti oltre i quali non si può andare perché non si può andare troppo a perdere k,ad eliminare H⁺ altrimenti si acidificano troppo le urine.In qsto caso l'altro meccanismo di scambio viene cmq alterato,c'è competizione col K e il k non viene più riassorbito e abbiamo ipokaliemia e possiamo avere un 'ipercaluria e qsto determina uno scambio con gli H⁺

Se qsti fondamentalmente sono i meccanismi attraverso i quali il rene elimina le valenze acide ,quindi gli H⁺,abbiamo però anche un altro sistema che consente una migliore regolazione che consente di trattenere delle basi ,sarebbe il riassorbimento dei bicarbonati: (avviene a vari livelli che adesso vediamo:adesso vediamo prima quello a livello renale e poi quell'altro quantitativamente più importante)rappresentato dal fatto che se schematizzate tra sangue ,cellule tubulari e lume del tubulo renale vedete che se c'è una condizione di acidosi significa che c'è CO₂ in aumento(perché CO₂ è una molecola acida e quindi Incremento di Co₂ significa aumento del denominatore di quella frazione e quindi un pH basso)fa sì che qsta passi ,per gradiente oltre che per diffusione perché la Co₂ è un gas diffusibile , e allora passa all'interno della cellula del tubulo renale dove si coniuga con l'H₂O e attraverso l'azione di un enzima _è una reazione anche spontanea però l'enzima accelera qsto processo.dà luogo alla formazione di H⁺ e bicarbonato:H⁺ viene scambiato a livello del tubulo renale ,tra cellula e lume tubulare,normalmente con il Na,eventualmente si lega ai bicarbonati,forma lo stesso ammoniaca e H₂O e si ripete il ciclo.Ma la cosa più importante è il bicarbonato:



l'H⁺ può passare in scambio col Na per un effetto di concentrazione o per un effetto di carica perché se si accumula l'H⁺ all'interno delle cellule avremo un incremento della concentrazione di H⁺ e qsto competerà col Na all'esterno perché abbiamo messo una carica positiva in più all'interno

della cellula e abbiamo aumentato la sua concentrazione ;a livello del lume tubulare avremo un eccesso di Na e una discrepanza di H+rispetto a quello che c'è all'interno della cellula. ecco allora che l'H+ va nel lume,il Na va all'interno della cellula e abbiamo fundamentalmente eliminato un H+.Ma il bicarbonato che pure è un elemento carico,pure è uno ione negativo,viene riassorbito attraverso uno scambio con il Cl-.

Normalmente qnd c'è un aumento di una carica positiva all'interno delle cellule ,per mantenere il gradiente elettrico occorre che un'altra carica positiva debba uscire;lo stesso dicasi per le cariche negative:se entra o esce deve uscire o entrare un'altra carica negativa:qsto avviene normalmente con il Cl- per qnt riguarda il bicarbonato,vedremo invece che per l'H+ che in qsto caso il Na con l'emoglobina sarà il k.

Qsto che cosa ha comportato:

_nel sangue :riduzione della CO₂,che è entrata nelle cellule,la fuoriuscita dalle cellule di un bicarbonato. Quindi qsto ha comportato praticamente l'eliminazione di una valenza acida e il riassorbimento di una base e qsto tende a ridurre la discrepanza tra basi e acidi,

_A livello della cellula ,all'interno della cellula avevamo avuto l'assunzione di una molecola acida e di una basica cioè l'H+ e l'HCO₃⁻ ma l'H+ si è scambiato col Na e quindi ha equiparato il livello di acidità e ha equiparato il livello di elettroliti o di ioni positivi scambiandosi col Na e quindi non c'è squilibrio di pH né di cariche ioniche positive all'interno della cellula.

Il bicarbonato che appunto era la carica negativa è stato riportato nel sangue e si eliminata anche la carica negativa.

Quindi il bilancio finale è :nel sangue abbiamo ridotto una molecola acida,abbiamo assunto una molecola basica ,nella cellula fundamentalmente non è cambiato né il pH né la concentrazione di ioni positivi e negativi.;nelle urine ci sarà stata la eliminazione di un H+ anziché di Na e quindi un pH più acido.

In tutto qsto l'AC è l'enzima chiave :esistono anche diuretici che funzionano da inibitori dell'anidrasi carbonica che vanno usati solo in ceret condizioni altrimenti possono dare squilibri idro-elettrolitici e soprattutto squilibri del pH,dell'equilibrio acido-base ;quindi bisogna fare molta attenzione quando e come si usano. E qsta AC ,nella cellula tubulare renale ,è ancheuna molecola che si trova nei globuli rossi dove andiamo a vedere come si effettua la regolazione sia a livello del sangue e quindi dell'Hb, sia a livello dell'apparato respiratorio.

La regolazione come sistema tampone e come sistema respiratorio.

Cominciamo a vedere la prima .

Tra i tamponi più importanti abbiamo le proteine che poiché possono essere sottoforma di cariche positive e negative avremo che sono sostanze che possono accettare e cedere degli H+ o delle cariche.L'Hb rappresenta la proteina più abbondante , quella che riveste un ruolo preminente per qnt riguarda i sistemi tampone.cosa succede nel GR?L'Hb sta nel GR :quindi lo scambio e la regolazione avviene a livello del GR.Se abbiamo una condizione di acidosi che vuol dire eccesso di CO₂:la CO₂ passa dal plasma al GR→legame all'H₂O→azione dell'anidrasi carbonica e formazione di H+ e bicarbonato.Quindi sempre lo stesso identico proceso.Con la differenza che l'Hb come qualsiasi altra proteina del nostro organismo viaggia in genere legata a degli ioni e in particolare si trova sottoforma di sale potassico cioè è legata allo ione K.In qsto caso un incremento dell'H+ che si ottiene per la correzione della CO₂ in H+ e HCO₃⁻ fa sì che aumenti la concentrazione di H+ che spiazza il K dall'Hb e la rende acida:quindi l'Hb perde il suo K e lega invece l'H+.In qsto modo abbiamo due effetti:da un lato abbiamo annullato l'H+ all'interno della cellula e quindi non abbiamo modificato il pH all'interno del GR,dall'altro abbiamo staccato il K e legato l'H+ all'Hb e

qsto determina: il k è una carica positiva in più che adesso si trova all'interno della cellula e deve essere eliminato e viene escluso dalla cellula. Quindi il risultato finale è che abbiamo scambiato H^+ con il k , H^+ è entrato nella cellula e si è legato all' Hb , Hb stacca il k che fuoriesce dalla cellula.

Il bilancio netto è che: non si è modificato il pH o meglio la concentrazione degli H^+ , non si è modificato il gradiente elettrolitico perché una carica positiva è entrata e un'altra carica positiva è uscita.

Rimane però che Hb è acida cioè è legata all' H^+ ma, qsto è un vantaggio perché ricordando Hb e l'effetto Bohr: l'effetto Bohr che ha modificato l'associazione dell' Hb con O_2 e quindi il grado di saturabilità dell' Hb da parte dell' O_2 fa sì che Hb abbia una maggiore affinità per O_2 e rende più rapida la cessione dell' O_2 , condizione che si deve attuare e in condizioni di acidosi significa che il metabolismo è ricco di scorie ma povero di O_2 . Quindi i tessuti hanno bisogno di una maggiore quantità di O_2 , Hb acida cede maggiormente e più rapidamente O_2 e quindi a una pO_2 inferiore riesce a cedere una maggiore quantità di O_2 e quindi abbiamo un ulteriore vantaggio: Hb ha funzionato come tampone, ha legato H^+ , ha evitato la modificazione del pH e inoltre contribuisce anche a cedere maggiormente O_2 ai tessuti che sono in uno stato di carenza di O_2 .

Si è formato però anche il bicarbonato che è una carica negativa nelle cellule che può essere scambiata col Cl^- .

Risultato finale:

→ è entrata una molecola acida che è la CO_2 ;

→ è stato tamponato H^+ ;

→ è stato eliminato il bicarbonato.

Quindi nel plasma avremo una molecola acida in meno, la CO_2 ; una molecola basica in più, il bicarbonato. All'interno della cellula vi è equilibrio, non c'è modifica del pH, non del gradiente elettrico, né degli ioni positivi né di quelli negativi perché da un lato è uscito il k e dall'altro è entrato il Cl^- .

Chiaramente sistema del tutto analogo con le altre proteine soltanto che non in tutti i casi vi è l'anidrasi carbonica, quindi non in tutte le condizioni ci sarà una notevole relativa importanza di un certo tipo di sistema: in qsto caso Hb , il sangue quindi condizioni di anemia o cmq di carenza di Hb in senso generale della funzione dell' Hb incidono anche sulla capacità dell'organismo di equilibrare il pH.

Da cui vi rendete conto del perché con l'emogasanalisi, che rappresenta l'esame da cui otteniamo tutti qsti dati, si effettua anche il dosaggio dell' Hb e dell'ossi Hb quindi della pO_2 , dalla quantità di O_2 trasportata dall' Hb stessa.

Se qsto avviene a livello del sangue quindi ci spiega il meccanismo delle proteine e in particolare dell' Hb , dell' O_2 , dello scambio... a livello dell'apparato respiratorio abbiamo il Gr, lo stesso che stava in circolo, che andava nei tessuti ma a qsto punto si trova a livello anche del sacco aereo quindi della membrana respiratoria, membrana sensibile agli scambi gassosi.

Anche qui abbiamo lo stesso identico processo ma con un fine diverso. Perché nel Gr O_2 dall'aria viene normalmente legato all' Hb e qsto poi lo vedremo... non lo vedremo perché penso che la maggior parte di voi l'effetto Bohr se lo ricordi... è quello fondamentalmente soltanto di uno spostamento a sinistra della curva di associazione cioè una ridotta pressione(?) per aumentare(?) dall'altro anche la scissione di O_2 . Ma consideriamo la CO_2 : se abbiamo una condizione di acidosi avremo la tendenza dell' Hb che lega O_2 di riportarsi allo stato di partenza, cioè di normale regolazione cioè sottoforma di una proteina potassica cedendo H^+ e allora Hb si lega all' O_2 , può o meno in qste condizioni eliminare H^+ che viene portato all'interno della cellula e scambiato col k : quindi abbiamo l'effetto opposto: entra il k che sostituisce H^+ dell' Hb , H^+ a qsto

punto risulta essere libero nella cellula ma l'H⁺ ha determinato un incremento delle cariche positive, un abbassamento del pH, e allora viene scambiato il bicarbonato con il Cl⁻.

A questo punto H⁺ e bicarbonato mediante l'azione dell'anidrasi carbonica danno l'H₂O e CO₂ che è diffusibile apssa nel plasma e da qsto nel sacco aereo e può essere eliminata attraverso la normale ventilazione .

Ripetiamo: il procedimento è sostanzialmente uguale a quello che avviene nel GR in circolo con la differenza che in qsto caso il processo è inverso perché in realtà è l'Hb che legando l'O₂ a livello del sacco aereo può determinare il distacco dell'H⁺ e l'assimilazione del k, quindi ritorna di nuovo nella forma nativa come proteina potassica; l'H⁺ che a qsto punto ha ceduto determina un pH acido nella cellula perché incrementa la concentrazione di H⁺ ma ci sono dei bicarbonati all'esterno che possono essere scambiati e a qsto punto ,partendo da quest'altro lato, l'H⁺, che ha ceduto l'Hb, + bicarbonato, che sono entrati dall'esterno, attraverso l'azione dell'anidrasi carbonica formano H₂O e CO₂.

La CO₂ poiché trova ,essendo una molecola diffusibile e poiché qui c'è il sacco aereo, quindi capace di determinare una modifica delle concentrazioni, tra quella che è la quantità di CO₂ nell'aria e quella che è la quantità di CO₂ che in qsto caso risulta essere aumentata nel plasma da uno scambio, una diffusione e quindi la CO₂ può essere eliminata attraverso la via aerea.

Qsto è il meccanismo di regolazione che sempre usa il sangue o meglio i GR, sempre usa l'Hb, sempre usa l'AC ma consente al polmone di scambiare, eliminare una molecola acida attraverso l'eliminazione diretta della CO₂.

Quindi tre meccanismi fondamentali, attraverso cui si ha la modifica delle basi e degli acidi, consentono in generale di regolare il pH del plasma ,dei tessuti.

Condizioni che determinano, modificano il pH dell'organismo: esistono fondamentalmente due tipi di alterazioni: acidosi e alcalosi che possono essere di origine metabolica e respiratoria e ognuna di qste può essere acuta o cronica.

Il sistema che abbiamo visto consente di classificare :

1- il tipo di squilibrio acido-base, cioè se è alcalosi o acidosi

2- attraverso la pCO₂ si può determinare se è di tipo metabolico o respiratorio.

Abbiamo detto che qnd è di tipo respiratorio in genere è un 'acidosi perché si accumula la CO₂, quindi in qsto versante ci sono le acidosi respiratorie .IN qst'altro versante ci sono le alcalosi oppure quelle metaboliche .

Livello di pH: qste linee indicano il pH e al di sotto della linea centrale che corrisponde a pH 7.4 ci sono tutte le condizioni di acidosi. Quindi le acidosi si trovano tutte sul vostro lato destro e in basso. Acidosi che possono essere respiratorie man mano che incrementa la pCO₂, sono acute se non incrementano anche i bicarbonati, sono croniche man mano che aumenta il livello di bicarbonati al di sopra di 24-25 mEq.

Allora qsto significa che potete tranquillamente distinguere le cause dell'acidosi, e dell'alcalosi, stabilire se sono più o meno compensate , se è intervenuto il sistema respiratorio senza quello renale o se è intervenuto anche quello renale, e questo mi permette di fare anche la diagnosi di acuto e cronico. Qnd si fa l'emogasanalisi essa mi consente di valutare bicarbonati, pCO₂, pH che è quello che ci serve per qsto scopo ma consente di valutare anche :
1 stabilire la quantità di Hb → stabilire la capacità dell'individuo di compenso dell'equilibrio acido /base;

2 la pCO₂ che corrisponde al grado di ossigenazione , di funzionalità dell'Hb ma soprattutto del metabolismo periferico a livello tissutale ;

3 l'entità della mancanza o meno di ioni e quindi di basi e quindi di acidi e qsto permette di regolare cioè dal punto di vista anche matematico, quindi quantitativamente, la quantità di farmaci eventualmente da somministrare, cioè la quantità di bicarbonati, la quantità di lattato, di K⁺, cioè sono tutte sostanze che vengono utilizzate esclusivamente qnd ci sono delle condizioni di alterato pH il che significa tutte le condizioni respiratorie legate ad un alterato scambio gassoso, quindi enfisema polmonare, bronchiti, polmoniti, fibrosi polmonare, restrittive o meno, e anche una delle maggiori cause di scompenso dell'equilibrio acido/base è il cuore polmonare cronico che non è altro che un elemento di destabilizzazione anche della circolazione e quindi anche del circolo cardiaco, in funzione di alterazioni primitive e /o primarie a livello dell'apparato respiratorio.

Dall'altro lato abbiamo acidosi metaboliche che è qnd invece non è alterata direttamente la quantità di CO₂ ma è incrementata la quantità di acidi poiché si sono formati degli acidi fissi che tra i più importanti sono:

-ac lattico → shock, sforzo fisico, estrema attività fisica, scarsa ossigenazione, tutte condizioni anaerobiosi diretta o indiretta;

-ac urico → funzionalità renale e quindi insufficienza renale;

-corpi chetonici → tutti gli squilibri che comportano o un'eccessiva utilizzazione di substrati energetici come gli acidi grassi o una carenza dell'utilizzazione, un'alterazione dell'utilizzazione degli zuccheri per qnt riguarda l'attività cellulare e quindi per qnt riguarda il normale approvvigionamento energetico e quindi di ATP da parte delle cellule

ALCALOSI

Al contrario o vi è una perdita di H⁺. basti pensare alle condizioni di vomito profuso, ricorrente che non fa altro che eliminare gran parte di quell'acido cloridrico che viene prodotto al livello gastrico e se considerate che ne viene prodotto circa 1.5/1.8 litri al giorno vi revedete conto di qnte valenze acide possono essere eliminate.

Chiaramente condizioni di squilibrio si hanno anche per disturbi di assorbimento gastroenterico, diarrea, vomito biliare, nelle condizioni di pancreatite (immagite i bicarbonati che vengono prodotti dal pancreas), intossicazioni da parte di molti farmaci o di alcool, etanolo, metanolo... sono tutte sostanze che danno luogo a condizioni di squilibrio sia delle basi sia degli acidi e quindi le varie condizioni di alcalosi e acidosi.

Tutte condizioni che sono piuttosto gravi perché danno luogo ad alterazioni della permeabilità e scambi delle membrane cellulari.

DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE GENETICHE ED EREDITARIE

Negli ultimi anni e fondamentalmente nell'ultimo decennio, quinquennio risultano essere aumentate di molto le attività di diagnostica, soprattutto di biologia molecolare o tecniche analoghe, che permettono di analizzare direttamente le modificazioni dei geni. Se prima venivano utilizzate fondamentalmente a scopo di ricerca, esistono adesso moltissime applicazioni dirette a malattie di ordine genetico che vanno da quelle congenite o ereditarie, strettamente intese, a modifiche di alcuni fattori per modifiche fenotipiche o soprattutto per quanto riguarda l'oncologia per andare a valutare le modifiche del materiale genetico in determinati tipi di tumori. Ma dal punto di vista pratico qste applicazioni pur essendo diventate piuttosto comuni ed essendo aumentate di numero non sempre hanno e d'anno la sicurezza qnd non effettuate in condizioni standard cioè qnd non effettuate secondo controlli a livello internazionale: tutti i laboratori

possono,devono avere una cosiddetta certificazione tipo ISO9200 etc...cioè sono delle procedure da attuare in tutte le fasi di lavorazione di un determinato campione e quindi di un certo tipo di dato o risposta di un determinato teste qste procedure più sono collaudate ,più sono standardizzate tanto maggiore è la loro sicurezza e le possibilità di usare uno stesso dato da un Paese a un altro o da un laboratorio a un altro..E quindi rendono universale il dato di laboratorio .Nonostante tutte qste procedure ormai consolidate per qnt riguarda la diagnostica normale,nei laboratori per qnt riguarda le malattie genetiche e la biologia molecolare purtroppo non tutte sono completamente stabilizzate e quindi non completamente standardizzate. Qsto da un punto di vista pratico comporta che esiste un difetto professionale e una mancanza dovuta a una ridotta affidabilità della risposta per gran parte delle malattie genetiche. Sono pochissime le malattie genetiche che vengono tuttora determinate,molte ancora alla fase sperimentale di ricerca molte altre invece (?) gruppi specializzati per settori di malattie o per tipologia di malattie . Qsto perché le modificazioni genetiche alla base delle varie malattie possono essere di natura estremamente variabile:abbiamo quelle relative alle alterazioni dei cromosomi,o di porzioni di qsti(pensate al cromosoma Philadelphia o a molte delle emopatie o leucemie che si hanno per alterazioni cromosomiche ancora basti pensare alle modalità con cui si ottengono delle mutazioni al livello del DNA che possono essere puntiformi,significative cioè legate ad alterazioni funzionali o ininfluenti dal punto di vista funzionale ed ecco allora che distinguiamo vari tipi di fenotipi con una gravità eventuale di malattia diversa a seconda del tipo di mutazione che si è avuta(immaginate le coronaropatie o il fattore V di (?) oppure tutti gli altri fenomeni che hanno diversi tipi di modificazioni avari punti non tutte significative o con la stessa gravità fenomenologica della malattia a cui si riferisce).

MALATTIE DA ESPANSIONE DI SEQUENZE RIPETUTE

SINDROME X FRAGILE

In questo caso la malattia dell' X FRAGILE è una malattia ereditaria, quindi è trasmissibile da madre a figlio (prevalentemente maschio), è costituita da un anomalo aumento di un certo numero di triplette, tutte del tipo CGGA. L'aumento del n° delle triplette porta che ci può essere un soggetto portatore, uno sano e uno malato, dipende dal numero di ripetizioni di queste triplette: da 5 a 50 può essere considerato SANO, il soggetto non ha alcuna sintomatologia e non è neanche portatore (c'è da valutare se può essere o meno un fattore predisponente ad un'ulteriore amplificazione del n° di triplette); quando invece il numero va da 50 a 200 si parla di PRE-MUTAZIONE, il soggetto è clinicamente sano, nel senso che non ha alterazioni sintomatologiche, però ha una particolare predisposizione nel far ulteriormente amplificare le triplette, portando nella progenie a soggetti con un n° di triplette superiore a 200; con 200 si ha la MALATTIA che può essere più o meno grave a seconda del n° di ripetizione delle triplette.

Che cosa fanno in realtà questa RIPETIZIONE ed AMPLIFICAZIONE di triplette?!

Fanno in modo che i 2 filamenti di DNA creino una sovrapposizione ad un livello diverso dell'inizio e o a metà della sequenza di triplette ripetute, qsto crea uno SHIFT, invece di aver un combaciamento diretto delle triplette tra di loro, essendo tutte uguali, si crea una zona di sovrapposizione che è sfalsata rispetto alla normale prosecuzione della sintesi del DNA. Qsto comporta che ci saranno dei tratti o letti male, o avvolto, o deleti, oppure saltati, ciò implica una mutazione e/o un'ulteriore amplificazione delle triplette con successive possibilità di danno.

Del resto X fragile è una condizione che si crea perché queste sequenze rendono il cromosoma più fragile, quindi più suscettibile ad eventuali rotture.

Dal punto di vista della SINTOMATOLOGIA (anche se ciò che c'interessa è prevalentemente la diagnosi), qsta sindrome si manifesta con MACROCEFALIA e con DISMORFISMI FACCIALI (porta all'allargamento delle "fontanelle" nei bambini); neii pazienti che invece hanno un'età più avanzata e negli adulti, questa sintomatologia si accompagna ad alterazioni del QUOZIENTE INTELLETTIVO, della STATURA (in genere + alta della norma), a (??) MACROORCHIDISMO ed alterazioni nelle relazioni sociali.

La DIAGNOSI viene fatta attraverso 2 tipi di tecniche:

il **PCR** e **SOUTHERN BLOT**.

Sapete che moltissime delle malattie genetiche si servono dell'analisi attraverso queste tecniche.

Mentre la PCR può essere utilizzata nelle PRE-MUTAZIONI (o cmq quando il numero di triplette non è eccessivamente espanso); per quanto riguarda la diagnosi di un malato che abbia un n° di triplette ripetute estremamente ampio, conviene utilizzare un southern blot.

Qual è la motivazione di questo?!

Per la PCR occorre che ci sia un distacco dei 2 filamenti che consenta alla ?polimerasi di completare la porzione di gene che viene ad essere amplificata. L'eccessivo aumento delle triplette ripetute aumenta il grado di possibile shift, crea lo stesso problema che dà luogo alla formazione delle triplette, quindi può essere utilizzata solo quando il n° delle triplette risulta relativamente basso. Il SOUTHERN BLOT consente di andare a valutare un N° estremamente ampio di triplette ripetute.

Entrambe le tecniche consentono di valutare sia i soggetti SANI; sia PORTATORI che MALATI.

Importante una diagnosi CERTA perché questo tipo di malattie implica valutazioni sia economiche, sociali che psicologiche relative al paziente ed alla famiglia.

Per quanto riguarda la **DISTROFIA MUSCOLARE** sia di DUCHENNE che di BECKER, sono dovute a delle macromutazioni legate soprattutto al gene della *distrofina*, proteina che fa parte del citoscheletro e che consente l'integrità tra le strutture contrattili e la membrana della cellula.

Dal punto di vista pratico sono malattie ereditarie relativamente frequenti: la d.di DUCHENNE è presente in 1:3500 maschi nati; quella di BECKER è molto meno rappresentata 3:100.000 maschi nati e ha una sintomatologia notevolmente ridotta.

Per quanto riguarda la SINTOMATOLOGIA:

inizia sia con DEBOLEZZA MUSCOLARE che con RITARDO MENTALE, almeno fino ai 2-3 anni, durante i quali avviene la comparsa delle manifestazioni. Successivamente l'alterazione e rottura delle strutture muscolari, soprattutto delle fibre contrattili, la sostituzione con tessuto connettivale e adiposo, fanno in modo che qsti muscoli perdano progressivamente la loro forza contrattile e danno una forma di *pseudoipertrofia*, aumentano il loro volume non per aumento della massa muscolare, ma per l'adipe ed il tessuto connettivale che ad esso si sostituisce.

Per quanto concerne il tipo di alterazione, anche qui dipende dall'alterazione della trascrizione di un gene legato al cromosoma X, ecco perché le donne sono portatrici ed i maschi sono quelli esposti clinicamente a questo tipo di patologia. Si ha l'alterazione di una proteina piuttosto grossa, circa 500 aa, utile sia per l'attacco con l'*actina*, uno dei due filamenti dell'unità contrattile del muscolo, ma anche con le proteine glicosilate.

Che cos'è in realtà questa proteina?!

È una proteina che si trova a ponte, come collegamento, tra la struttura contrattile e quella della matrice cellulare; il fatto che questo ponte non sia stabile, provoca il distacco delle unità contrattili rispetto alla matrice, l'alterazione delle fibrocellule muscolari e la sostituzione con connettivo ed adipe.

Come si fanno a valutare i vari tipi di mutazioni geniche!?

Anche qui con **SOUTHERN BLOT** e la **MULTIPLEX PCR**.

In realtà si vanno a vedere le lesioni e delezioni che avvengono a livello di questo gene ma, essendo questo molto lungo, essendo le delezioni numerose, è necessario avere più sonde, ecco perché il southern blot utilizza, in questo caso, 8 sonde differenti contemporaneamente.

Rappresenta l'analogo della multiplex pcr perché l'amplificazione(?) avviene per più geni contemporaneamente, perché in questo caso non basta andare ad individuare un solo tipo di alterazione del gene, ma occorre che ci sia l'individuazione contemporanea di più delezioni o alterazioni dello stesso. Solo quando avviene la contemporanea determinazione di un numero adeguato di mutazioni si può stabilire:

1. l'eredità ed il tipo di alterazione
2. il tipo di malattia

(ecco perché contemporaneamente devono essere esaminati più esoni per poter effettuare una diagnosi precisa).

Richiesta di delucidazioni circa la tecnica SOUTHERN BLOT:

il SOUTHERN BLOT non è altro che una tecnica che consente di analizzare la sequenza delle basi di un certo filamento, oppure di un certo materiale genetico.

Come?!

Devono essere prese delle cell che abbiano il materiale genetico che si vuole analizzare (qualunque sia la provenienza delle cell occorre andare ad estrarre il DNA e valutare la sequenza delle basi).

La sequenza delle basi, del materiale genetico estratto, potrà essere esaminata per valutare eventuali variazioni rispetto alla normale sequenza delle basi ed esprimere se quel tipo di sequenza è associato o meno ad un certo trascritto, quindi ad un'eventuale alterazione.

Non potendo, però, esaminare tutto il materiale in quanto tale, occorre fare una serie di procedimenti attraverso i quali il DNA viene ad essere frammentato in porzioni, ottenute con enzimi che permettono di separare e distinguere i vari pezzi di DNA che, poi, vengono ad essere analizzati.

Come vengono analizzati?!

Attraverso una SEPARAZIONE ELETTROFORETICA, che consente di dar luogo ad una distinzione in funzione del numero di basi e di enzimi utilizzati per la digestione(?); la diversa migrazione delle varie porzioni del DNA, viene *blottata*, ossia trasferita su una membrana, che può essere di varia natura: viene effettuato un trasferimento del materiale presente su gel, dopo che si è ottenuta la separazione elettroforetica, al foglietto che rappresenta una specie di carta fotocopiatrice, in senso orizzontale, dei 2 foglietti uno sull'altro. Successivamente questo materiale viene ??? sul gel, per ottenere la mappatura: abbiamo la possibilità di distinguere le varie porzioni di DNA in base alla diversa migrazione.

(ulteriore chiarimento attraverso l'illustrazione di slides)

Si utilizza nei test di paternità, nei procedimenti di ordine legale per l'individuazione genica di materiale biologico che si trova su vittime o sui sospettati per i rispettivi confronti...

...Man mano che aumenta il numero di frammenti utilizzati, è possibile riconoscere un parallelismo tra l'analisi dei frammenti di DNA del sospettato rispetto alla vittima, permette di stabilire se il campione corrisponde a quello della vittima o del sospettato, la sovrapposizione delle varie bande ottenute consente d'identificare il soggetto portatore di quella determinata sequenza (quindi se

un soggetto sospettato non ha la stessa sequenza rispetto a quelle individuate nel materiale biologico della vittima, può essere scagionato!)

Quesito: “il sospettato è il portatore, oppure è colui che deve essere indagato per vedere se ha un gene mutato ???” ... ????????????

I controlli servono per stabilire semplicemente un materiale base sul quale andare ad individuare una popolazione media, la vittima è quella che ha un materiale genetico che può confondere le indagini su un eventuale sospettato, perché se il sospettato ha materiale genetico della vittima, si dovrebbe avere “quel” tipo di sovrapposizione, tra il materiale della vittima e quello del sospettato; dipende dal tipo di indagine, se il materiale biologico è sulla vittima ma apparteneva al sospettato, oppure è della vittima e si trova sul sospettato, in questo modo si può fare l’abbinamento tra il materiale che è proprio della vittima, il materiale che è proprio del sospettato, il materiale che è stato trovato in un caso o nell’altro e, quindi, andare ad individuare l’incrocio di questi elementi; quando combaciano la sicurezza è matematica, perché il materiale genetico è diverso anche tra fratelli o familiari di primo grado, quindi permette d’individuare specificamente la persona.