

La Biochimica Clinica
Introduzione al Corso

Studio e Valutazione delle
modificazioni dei parametri
biochimici del sangue con
definizione degli scostamenti dalla
media

Studio e Valutazione delle
modificazioni delle componenti
cellulate (numero e caratteristiche
chimico fisiche e biologiche) del
sangue con definizione degli
scostamenti dalla media

- *Determinazione di enzimi (proteine):*
- Attività



- Espressione



- *Determinazione dei livelli di prodotti del catabolismo*
- Delle proteine (azotemia),
- Dell'eme (bilirubina),
- Delle basi puriniche (uricemia).

- *Determinazione dei livelli di sostanze a valore nutrizionale:*
- Lipidi (Colesterolo, trigliceridi),
- Glucidi (glicemia),
- Proteine (Albumina e transferrina, QPE).

- *Determinazione dei livelli di elettroliti (ioni circolanti):*

- Na⁺
- K⁺
- Cl⁻

- Ca⁺⁺
 - Fosfati
 - Mg⁺⁺
- } **Metabolismo osseo**

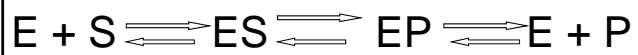
- *Determinazione degli elementi cellulari del sangue (emocromo):*

- Globuli rossi o emazie
- Globuli bianchi o leucociti
- Piastrine

- *Studio del loro numero e delle loro caratteristiche chimico-fisiche e biologiche*

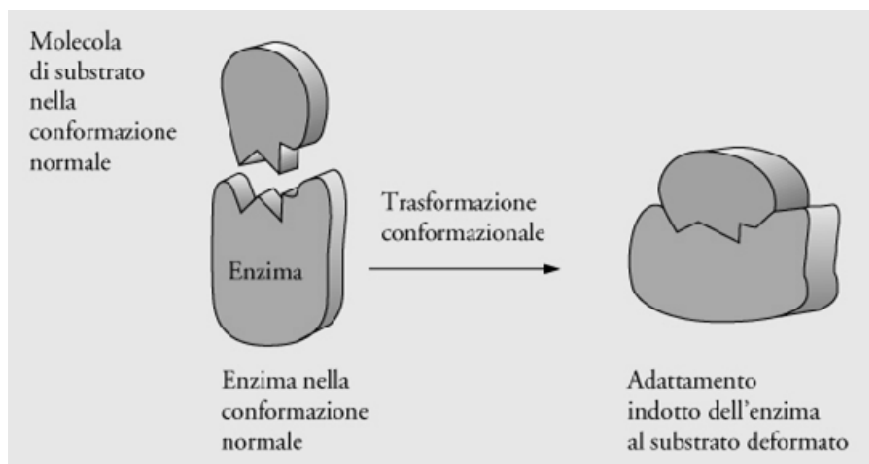
Enzimi in Biochimica Clinica

Cinetica Enzimatica

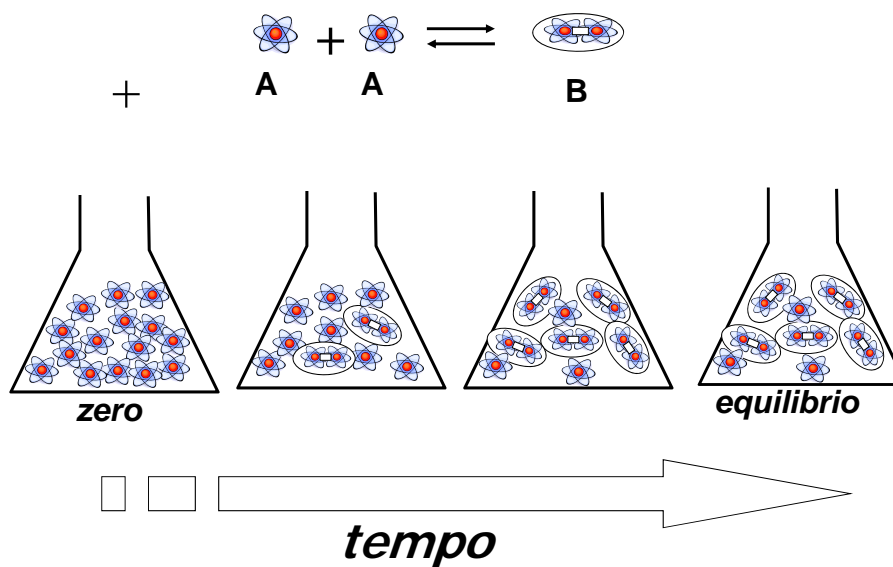


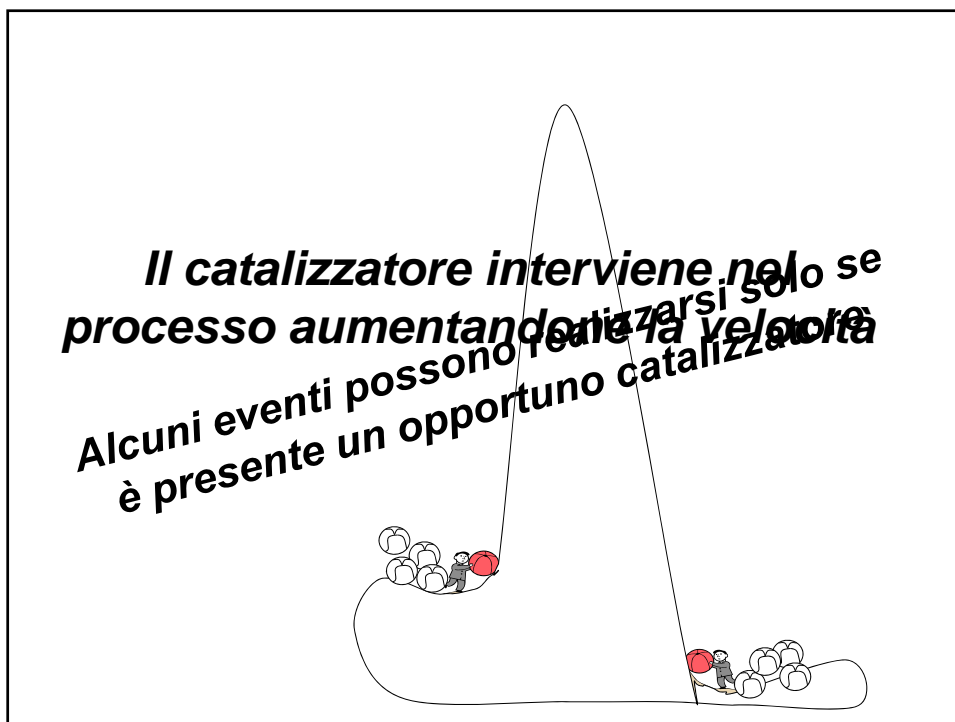
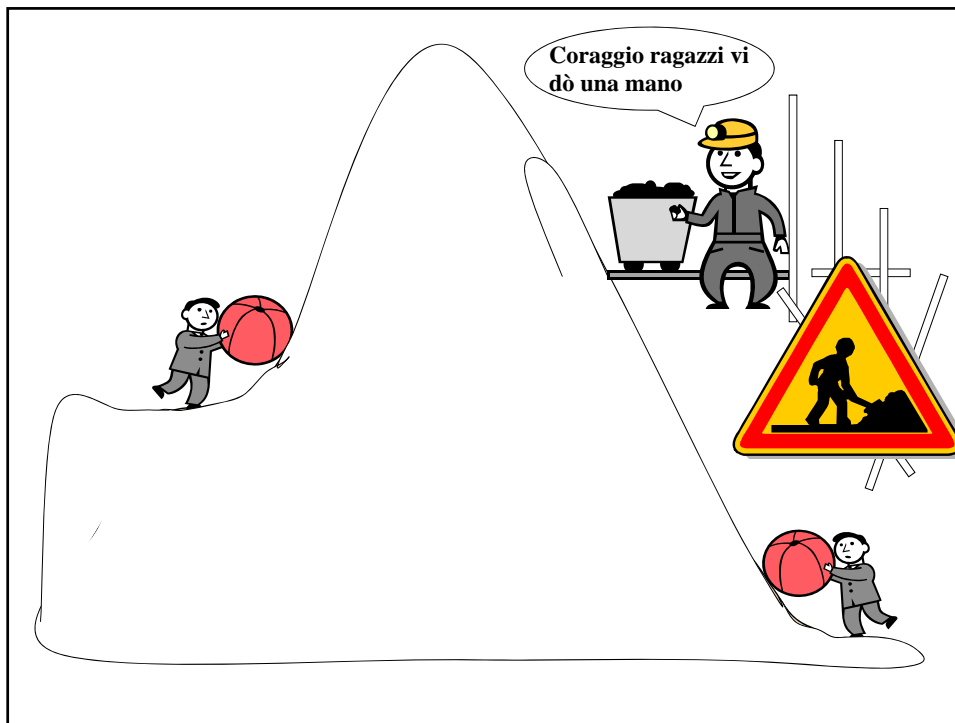
L'enzima accelera la velocità di formazione del complesso ES
Abbassando l'energia di attivazione

Gli enzimi: catalizzatori biologici



Una reazione chimica





Localizzazione Enzimatica

Gli enzimi si possono trovare:

- Liberi nelle cellule di diversi tessuti ed organi
- Confinati in particolari strutture all'interno delle cellule stesse
- In un determinato tessuto od organo specifico.

Quando le strutture cellulari vengono danneggiate gli enzimi cellulari si liberano e si riversano nel circolo sanguigno.

In questo modo, un aumento della loro concentrazione nel campione può rappresentare un indice abbastanza preciso di un danno cellulare e quindi tissutale.

Meccanismi responsabili di un aumento degli enzimi nel plasma:

- 1) necrosi o danno cellulare indotto da fattori tossici o da ischemia, in cui gli enzimi normalmente contenuti nel citoplasma fuoriescono dalle cellule per citolisi
- 2) aumentato turnover cellulare che si realizza normalmente durante l'accrescimento, la rigenerazione cellulare o anche in corso di neoplasie
- 3) induzione enzimatica in cui aumenta la sintesi proteica dell'enzima
- 4) ostruzione dei dotti escretori per cui enzimi normalmente presenti nelle secrezioni esocrine rigurgitano nel plasma.

Diagnostica di laboratorio del danno Epatico: Enzimi di citolisi

Transaminasi

Alanina aminotransferasi ALT (Sinonimo SGPT) (10\25 u\l):

L'enzima è localizzato principalmente nelle cellule **epatiche** (fegato) dalle quali esce in seguito a danni a carico della loro parete.

E' un indicatore abbastanza specifico di un danno epatico senza però chiarirne la causa.

Alcuni farmaci (ad esempio i barbiturici, il fenobarbital, i glucocorticoidi, l'acetaminofene, il tiacetarsamide ed altri) possono determinare un innalzamento dell'ALT.

catalizza la reazione reversibile:

L-alanina + alfa-chetoglutarato -----> L-glutammato + piruvato

Transaminasi

Alanina aminotransferasi ALT (Sinonimo SGPT) (10\25 u\l):

E' dipendente dal coenzima piridossal fosfato. Pertanto in condizioni di malassorbimento che riducono l'apporto di vitamina B6 (precursore del Pir. Fosf.) vi è una riduzione marcata dell'attività dell'ALT.

Nel caso dell'etilismo cronico vi è un malassorbimento di Vitamina B6 che causa una riduzione relativa dell'attività dell'ALT in concomitanza al danno epatico.

Pertanto il rapporto AST/ALT diventa maggiore di 2.

Aspartato aminotransferasi AST (Sinonimo SGOT) (8\20 u\l) :

E' contenuto in diverse cellule ma risulta particolarmente concentrato in particolari distretti delle cellule epatiche (mitocondri) e del tessuto muscolare (anche cardiaco).

Il fatto che siano localizzati all'interno di subunità cellulari fa sì che si abbia , un rilascio **più lento** dell'enzima nel sangue a seguito di danni che coinvolgono il fegato, ma ciò indica anche un **danno più grave** alle cellule del fegato o dei muscoli.

Evenienze che provocano un falso innalzamento della AST sono per esempio la rottura esagerata di globuli rossi (emolisi) e la lipemia alta (elevato tasso di lipidi nel sangue).

catalizza la reazione reversibile:

L-aspartato + alfa-chetoglutarato -----> L-glutammato + ossalacetato

Dosaggio

Per dosare l'AST si usa l'enzima malato deidrogenasi che utilizza come substrato l'ossalacetato prodotto dall'AST.

Quanto più acido malico si forma dall'ossalacetato ad opera della malato deidrogenasi tanto più è presente l'AST.

Quindi la diminuzione di assorbanza a 340nm allo spettrofotometro misura l'attività enzimatica dell'AST.

Per dosare l'ALT si utilizza l'enzima lattico deidrogenasi che agisce sul substrato piruvato prodotto dall'ALT. Quanto più acido lattico si forma dal piruvato ad opera della lattico deidrogenasi tanto più è presente l'ALT.

Quindi la diminuzione di assorbanza a 340nm allo spettrofotometro misura l'attività enzimatica dell'ALT.

Lattico deidrogenasi (LDH). (120-240 U/L)

E' un enzima della glicolisi è presente nella maggior parte dei tessuti e in concentrazione più elevata nel cuore, fegato, muscolo scheletrico, rene, eritrociti.

Catalizza la trasformazione dell'acido piruvico in acido lattico.

L'isoenzima M4 (LDH5) è predominante nei muscoli e nel fegato, mentre H4 (LDH1) nel cuore e H3M1 (LDH2) negli eritrociti.

Negli eritrociti è presente ad una concentrazione 150-200 volte più alta rispetto a quella del plasma (emolisi). L'isoenzima cardiaco (LDH1) è facilmente riconoscibile perché è in grado di catalizzare la trasformazione dell' α -idrossibutirrato in α -cheto-butirrato.

Valori elevati di LDH si osservano: 1) infarto del miocardio, 2) anemie emolitiche; 3) anemia perniziosa; 4) leucemia e tumori del testicolo; 5) malattie muscolari (es. distrofia muscolare); 6) malattie epatiche.

Dosaggio dell'LDH

La separazione degli isoenzimi avviene mediante elettroforesi su acetato di cellulosa.

La striscia di carta viene messa a contatto con acido lattico e NAD così che si forma NADH.

Quest'ultimo sviluppa colore sulle bande isoenzimatiche in presenza di appositi reagenti.

L'intensità del colore è proporzionale alla quantità plasmatica di isoenzima.

Diagnostica di laboratorio del danno Epatico: Enzimi di colestasi

La colestasi è dipendente da una ostruzione intrinseca (calcolo) od estrinseca (massa tumorale) dei dotti escretori biliari ed ha come conseguenza un ittero ostruttivo caratterizzato da un incremento della bilirubina coniugata nel sangue.

Fosfatasi alcalina.

Prodotta dal tessuto osseo , fegato e intestino

Bambini 100-600 mU
mUL

Adulti 75\220

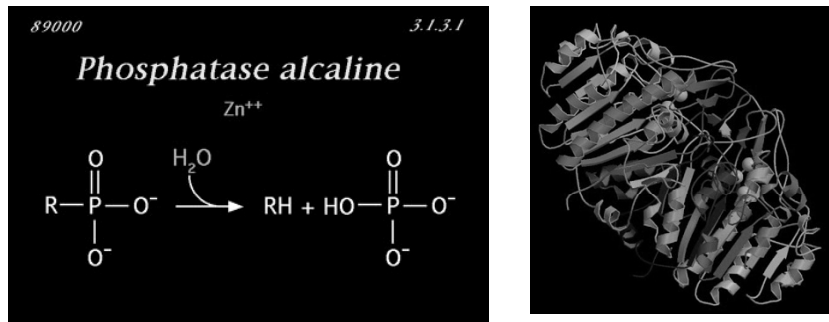
Fosfatasi Acida

Prodotta dalla prostata ,fegato, milza

Uomo 2.5\12 U/L

Donna 0.3\9.5 U/L

ALP- Fosfatasi alcalina EC 3.1.3.1



Isozimi

- Enzima di membrana
- 2 geni: uno detto intestinale, l'altro non specifico
- Vari isozimi: 1) epatico, il più abbondante in circolo; 2) intestinale, 3) placentare, 4) osseo.

Inducibile da corticosteroidi

Usi clinici

- Isozima epatico: ostruzione dotti biliari (specifico per colestasi).
Isozima indotto dai corticosteroidi : è localizzato nei dotti che secernono la bile.
- Isozima osseo: più alto nei giovani denota rapido accrescimento osseo. Si eleva anche in pazienti con metastasi ossee o patologie osteoartritiche.
- Isozima placentare: appare nel siero al termine della gravidanza.

Usi clinici come indicatore di colestasi

- Bassa specificità per la presenza di vari isoziemi, tuttavia il tempo di emivita di ALP in circolo può aiutare: gli isoziemi renali, intestinali e placentari hanno tempi molto ridotti (pochi minuti), mentre ALP epatica ha emivita di diverse ore.
- Alta sensibilità con valori di attività anche molto elevati.

ALP e AcP

- Le fosfatasi sono enzimi addetti all'idrolisi del legame esterico tra alcool e acido fosforico con liberazione di fosforo organico
- Il metodo di ricerca è colorimetrico.
- Le fosfatasi attaccano il substrato p-nitrofenilfosfato che produce p-nitrofenolo di colore giallo.
- L'aumento di assorbanza allo spettrofotometro è misura dell'attività enzimatica. (400nm)

Diagnostica di laboratorio del danno alcoolico

Gamma-glutamil transpeptidasi o gamma- glutamil-transferasi (GGT)

- Prodotta negli epatociti e nelle cellule dell'epitelio biliare.
- Enzima microsomiale (induzione da parte di farmaci che agiscono sul citocromo P450) responsabile del trasferimento di gruppi glutamici tra peptidi.
- Presente anche in altri organi:
 - Cuore, reni, polmoni, pancreas, vescicole seminali
 - Nel plasma la forma predominante è l'isoenzima epatico.

Gamma glutamil transferasi Gamma GT E.C. 2.3.2.2

- Questo enzima, che si trova in alte concentrazione nel fegato, nei dotti biliari e nel rene, entra a far parte del metabolismo degli aminoacidi.
- Un suo aumento è segno di danno e/o di proliferazione della membrana dei canalicoli e/o dei dotti biliari ed è caratterizzato da alta specificità in caso di colestasi.

Aumento di GGT - 1

- Farmaci
 - Induzione - alcol, anti-epilettici etc.
 - Meccanismi diversi
 - antibiotici
 - statine
 - FANS
 - Erbe e altri prodotti omeopatici
 - Methotrexate

Aumento di GGT - 2

- Steatosi (accumulo di grasso)
 - Correlata all'alcol, obesità, diabete mellito, NASH (non-alcoholic steatohepatitis)
- Fibrosi/cirrosi (accumulo di matrice extracellulare e collagene)
 - Cirrosi alcolica, PBC, PSC, emocromatosi, deficit di alfa-1-antitripsina, malattia di Wilson (accumulo di rame) etc.
- Lesioni occupanti spazio
 - Tumori (carcinoma epatocellulare o metastasi)
 - Malattie granulomatose (sarcoidosi, tubercolosi)

Cause di aumento di GGT

>10x ULN

Colestasi, malattia epatica alcolica

5-10x ULN

Epatiti, Cirrosi, pancreatiti

<5x ULN

alcol, farmaci induttori

Cosa c'è di nuovo tra i marcatori
biochimici di funzionalità
epatica?

Nuove aree di interesse

- Biologia molecolare
 - Malattie ereditarie o genetiche (deficit di alfa-1-antitripsina, malattia di Wilson)
- Test per valutare l'assunzione di alcol
 - Carbohydrate deficient transferrin (CDT)
- Biomarcatori di fibrosi
 - PIIINP

Carbohydrate deficient transferrin

- Transferrina : glicoproteina con p.m. 80,000
- Singola catena polipeptidica di 679 aminoacidi.
- Due siti di legame per il Ferro, emivita 6-12 giorni.
- Due unità di catene laterali oligosaccaridiche con 3-4 residui di acido sialico (funzione di stabilizzazione della molecola e di regolazione dell'affinità per il recettore).
- Eliminazione per via epatica (degradazione lisosomiale).
- L'alcol interferisce direttamente con l'enzima che aggiunge o rimuove i residui di acido sialico e provoca un aumento delle forme asialo, mono- e di-sialo.

Senbilità e specificità di nuovi marcatori di danno epatico da alcol

Test	Sensibilità	Specificità	Cut-off
CDT	65-95	90-100	6 %
mAST	79	93	5 U/L
GST*	60-90	55-100	55 IU/L
AST/ALT	20-50	10-30	50 IU/L

*Glutatione-S-transferasi

Confronto tra GammaGT e CDT

	CDT	GGT	CDT+GGT
Sensibilità			
Mediana	68.5%	61%	92%
Range	20-91	17-100	35-98
Specificità			
Mediana	95.5%	77.5%	83%
Range	71-100	9-100	17-93

Litten et al Alcohol Clin Exp Res 1995

Biomarcatori di fibrosi epatica - 1

Collagene/procollagene

<i>Tipo</i>	<i>% nel fegato normale</i>	<i>% nel cirrotico</i>
I	40 – 50	60 – 70
III	40 – 50	20 – 30
IV	1	1 – 2
V	2.5	5 – 10
VI	0.1	0.2

Biomarcatori di fibrosi epatica - 2

Componenti della matrice extracellulare

Fibronectina (molecola di adesione)

Vitronectina (molecola di adesione)

Laminina (componente principale delle
membrane basali cellulari)

Acido ialuronico

Collagene di tipo I e III

- Collageni a struttura fibrillare con tripla elica (300 nm).
- Sintetizzati sotto forma di propeptidi ad entrambe le estremità delle fibrille (larghezza di 40-50 nm).
- La rimozione dei propeptidi promuove la crescita delle fibrille.
- I propeptidi possono essere trattiene nella matrice extracellulare (tipo I) o rilasciati in circolo (III).
- Sono disponibili immunodosaggi di PICP (propeptide C-terminale di tipo I), PINP (N-terminale), PIIINP (N-terminale di tipo III).
- PIIINP appare il migliore nell'individuazione della fibrogenesi epatica.

PIIINP

- **Concentrazioni circolanti aumentate si riscontrano in numerose malattie epatiche:**

– Cirrosi alcolica, carcinoma epatocellulare, cirrosi biliare primitiva, epatite virale cronica da HCV

Possono aumentare anche in malattie non epatiche con alterazioni del metabolismo del collagene:

– Mielofibrosi, sclerosi sistemica, metastasi ossee da carcinoma mammario, ipertiroidismo

Diagnostica di laboratorio del danno pancreatico

AMILASI (100\300 u\l): indicatore delle affezioni pancreatiche un suo aumento, depone a favore di una pancreatite. Aumenti più modesti si possono avere in corso di enteriti, epatiti e parotite.

LIPASI: enzima prodotto dal pancreas, che viene normalmente attivato nell'intestino durante la digestione. In alcuni stati patologici però, l'enzima può attivarsi nel contesto della ghiandola pancreatica, prima di arrivare nell'intestino causando quindi danni al pancreas. In questi casi, si possono apprezzare tassi elevati dell'enzima nel siero che rimangono alti per molti giorni dopo l'inizio della patologia.

Anche l'insufficienza renale può causare un innalzamento della Lipasi e dell'Amilasi nel sangue, per una diminuita escrezione renale.

Dosaggio

Lipasi

La lipasi è un enzima che in presenza di ioni calcio catalizza l'idrolisi dei trigliceridi con formazione di un monogliceride e due molecole di acidi grassi.

Metodo titrimetrico.

Una emulsione d'olio d'oliva viene incubata per tempi variabili con una aliquota di plasma, quindi i trigliceridi vengono idrolizzati a monogliceridi ed acidi grassi.

Questi ultimi possono poi essere titolati con una soluzione di idrossido di sodio 0,05M utilizzando la timolftaleina come indicatore.

La quantità di idrossido di sodio usata per giungere al punto di viraggio dell'indicatore è proporzionale all'attività lipasica.

Amilasi

Le amilasi sono enzimi implicati nella scissione di zuccheri complessi (polisaccaridi). Si dosano le α -amilasi.

Esistono due forme isoenzimatiche di cui una prodotta dalle ghiandole salivari (ptialina nella saliva) e l'altra dal pancreas.

Il metodo di ricerca è colorimetrico e va effettuato sul siero oppure in presenza di eparina, un anticoagulante che non inibisce l'attività degli ioni calcio.

Le due forme isoenzimatiche possono essere distinte mediante separazione elettroforetica in quanto dotate di diversa carica netta, cioè diverse proprietà elettriche

Diagnostica di laboratorio del danno miocardico

CPK (creatin Fosfochinasi) (50\100 mU/ml)

Enzima dimerico deputato al metabolismo muscolare è presente nel cuore e nei muscoli.

Esistono tre isoforme a seconda del dimero che si forma dalle subunità M=muscle e B= brain:

- 1) M/M. Isoforma presente nel muscolo scheletrico e solo in piccola percentuale nel cuore. Un suo innalzamento è tipico nelle distrofie muscolari e nell'ipertermia maligna conseguente ad una ipersensibilità agli anestetici centrali (caratterizzata da tremori muscolari e conseguente innalzamento della temperatura corporea).
- 2) B/B. Localizzata nel cervello e non di particolare interesse diagnostico.
- 3) M/B. Localizzata nel miocardio e attualmente impiegata nella diagnosi del danno ischemico miocardico. Si innalza dopo 12 ore dal danno miocardico e si normalizza dopo pochi giorni.

Markers Biochimici di Danno al Miocardio

* Indicatori Precoci *

■ **Creatin chinasi (CK) (CPK): isoenzima che catalizza la fosforilazione di creatina**

- CPK MM ⇒ muscolare (97%) cardiaca (≅ 75%)
- CPK MB ⇒ muscolare (1-3%) cardiaca (25% di T)
- CPK BB ⇒ cervello – tratto gastrointestinale - vescica
- CPK mitocondriale ⇒ ubiquitaria

Nel corso di IMA aumenta la CPK MB a partire da 2/6 ore dall'insorgere dell'evento con un picco tra 18/22 ore ed un ripristino dei valori normali dopo 48/72 ore

Soggetto sano

CPK MB / CPK Tot < 2,5

Isoforme: MM3 MM2 MM1

MB 2 MB1

Dosaggio

CPK

Si tratta di un enzima addetto alla produzione di energia (ATP) a partire dalla fosfocreatina

La CPK (isoenzima MB) aumenta dopo 5 - 6 ore dall'attacco fino a raggiungere 600 - 700 U / litro dopo 24 ore.

In assenza di ulteriori crisi cardiache la sua concentrazione ritorna a livelli normali dopo circa 72 - 96 ore.

- **IL DOSAGGIO DELL'ISOENZIMA CREATINA KINASI (CK)-MB È IL PIÙ USATO MARKER PER LA DIAGNOSI DI IMA.**
- **Il test ha una finestra diagnostica limitata** (tempo in ore di positività dopo l'infarto)
- **e specificità clinica bassa** (abilità del test di differenziare tra malattia cardiaca ed altre condizioni).
- altri markers più efficienti sono **le troponine**, T (cTnT) e I (cTnI).
- Insieme alla troponina C, queste proteine formano un complesso che regola la contrazione muscolare.
- Anche se la forma maggiore della troponina è localizzata all'interno dell'apparato contrattile, **una piccola frazione di cTnT e cTnI si trova libera nel citoplasma.**
- **La Specificità** è la chiave del successo del test : le troponine T ed I non si trovano in nessun altro tessuto diverso dal cuore.
- **Quindi l'individuazione di qualsiasi aumento della troponina nel sangue è indicativo di danno cardiaco.**

Cause di livelli di CK-MB falsi positivi

- Pericarditi
- Cardioversione, defibrillazione (>400 J)
tachicardia ventricolare prolungata
- Traumi scheletrici,
- Miositi, distrofie muscolari
- Sindrome di Reye
- Ipotiroidismo
- Alcolismo
- Periodo peripartum
- Colecistite acuta
- Carcinoma (prostata, mammella)
- Farmaci (aspirina, tranquillanti)
- Ustioni termiche od Elettriche
- Malattie vascolari del Collagene, specie LES
- Massiva mioglobinuria o rabdomiolisi
- Ipertermia, ipotermia

Markers Biochimici di Danno al Miocardio

* Indicatori Precoci *

- **Mioglobina:** proteina trasportatrice di O₂ dalle membrane cellulari ai mitocondri. Essa rappresenta il I markers di danno miocellulare liberato nel torrente circolatorio. Nel corso di IMA aumenta dopo la 1^a ora dall'insorgere dell'evento con un picco tra 16/18 ore ed un ripristino dei valori normali dopo 24/36 ore. Purtroppo la mioglobina scheletrica prodotta in caso di intensa attività fisica non è distinguibile da quella cardiaca. La diagnosi differenziale viene eseguita mediante il dosaggio dell'anidrasi carbonica III che è presente soltanto nel muscolo scheletrico.



Linee guida per il dosaggio rapido di Mioglobina, Troponina, CK-MB e CPK

- La **Mioglobina** ha la caratteristica di essere la più precoce a comparire in circolo: 2 ore dall'insulto ischemico.
- Essa è dotata di alta sensibilità ma di bassa specificità: il suo incremento quindi non associato a quello della Troponina non è diagnostico.
- L'incremento dei suoi valori nel sangue dura circa 24 ore

Markers Biochimici di Danno al Miocardio

* Indicatori Precoci *

- **Troponina:** il complesso delle troponine (T, C, I) partecipa insieme alle molecole di actina e tropomiosina alla formazione del filamento sottile del muscolo striato. Le forme cardiache delle troponine T ed I sono distinguibili da quelle presenti nella muscolatura cardiaca grazie all'utilizzo di specifici anticorpi monoclonali. Nel corso di IMA la troponina I aumenta entro le 3/6 ore con un picco tra le 15/25 ore ed un ripristino dei valori normali dopo circa 7 giorni, associando quindi l'elevata specificità a un'ampia finestra diagnostica.
 - Troponina I: specificità più elevata, dosaggio in 10'
 - Troponina T: specificità meno elevata, dosaggio in 2 h

Linee guida per il dosaggio rapido di Mioglobina, Troponina, CK-MB e CPK



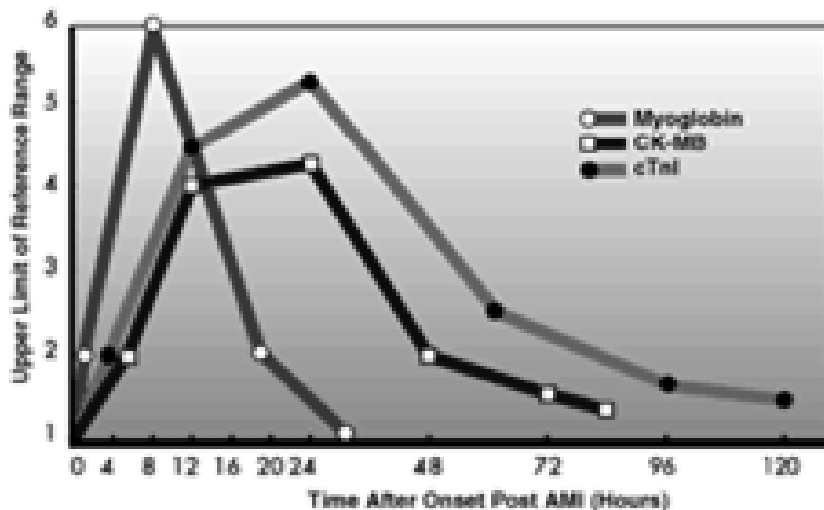
- La Troponina I o T è dotata di alta sensibilità e specificità. Il suo livello nel sangue in caso di necrosi miocardica aumenta dopo 3-6 ore dall'insulto ischemico.
- Essa è dotata anche di un valore prognostico e di guida alla terapia: i pazienti con IMA ed alti valori di troponina e quelli con angina instabile e troponina positiva presentano una prognosi peggiore e quindi devono essere sottoposti ad una terapia più aggressiva



Linee guida per il dosaggio rapido di Mioglobina, Troponina, CK-MB e CPK

Alcune cause non ischemiche di aumento della TPN

- Miocardite/Pericardite;
- Cardiomiopatia dilatativa;
- Scompenso cardiaco;
- Cardioversione elettrica;
- Cuore polmonare acuto;
- Contusione miocardica/trauma chirurgico;
- Tossicità da chemioterapici;
- Sepsi;
- IRC.



Markers Biochimici di Danno al Miocardio

* Indicatori Tardivi *

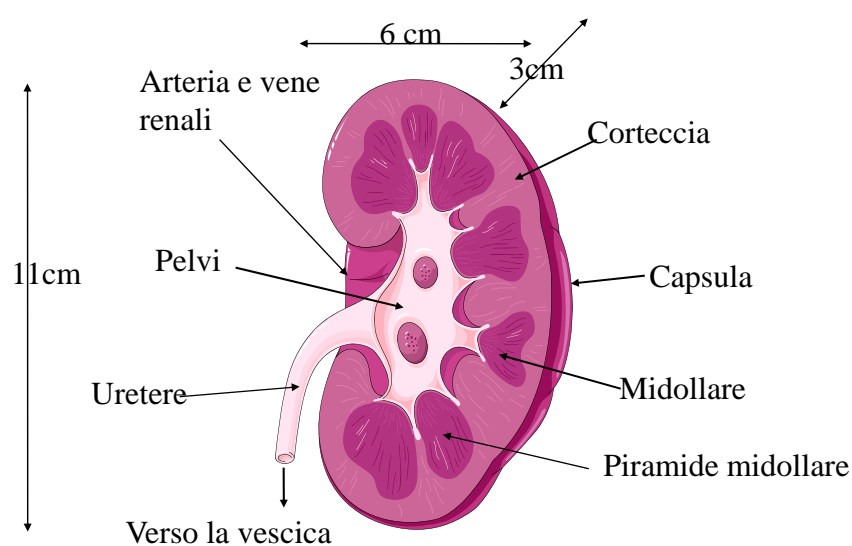
● **Miosina:** rappresenta una delle maggiori componenti strutturali del tessuto muscolare, composta da:

✘ **MHC:** catene pesanti isoforme α e β nel miocardio (solo β m. scheletrico)

non presentano pool citoplasmatico, aumentano in circolo soltanto dopo 48 h dall'insulto miocardico, raggiungono il picco dopo 5/6 giorni e tornano a valori normali dopo più di 10 giorni

✘ **MCL1 e MCL2:** catene leggere legate alla regione N terminale delle MHC. Presentano un piccolo pool citoplasmatico, sono riversati nel sangue entro 6 ore dall'insulto e persistono per circa 14 giorni

Anatomia renale



Quali sono le funzioni dei reni?

- Regolazione del volume e dell'osmolarità dei liquidi corporei
- Regolazione del bilancio elettrolitico
- Regolazione dell'equilibrio acido-base
- Escrezione di prodotti del metabolismo (urea, creatinina) e di sostanze esogene (farmaci)
- Sintesi ed escrezione di ormoni
- Gluconeogenesi

Cosa passa nel filtrato glomerulare?

- | • Liberamente filtrati | • Meno facilmente filtrati* | • Di solito non filtrati* |
|--|---|----------------------------------|
| – H ₂ O | !! β ₂ -microglobulina# | – Immunoglobuline |
| – Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Ca ⁺⁺ , Mg ⁺ , PO ₄ , etc. | – RBP (retinol-binding protein) | – Ferritina |
| – Glucosio | !! α ₁ -microglobulin | – Cellule |
| – Urea | – Albumina | |
| – Creatinina | *proteine di basso PM | |
| – Insulina | # talora usato come indicatore di funzionalità renale | |
| | | *dimensioni più grandi |

RIASSORBIMENTO DAL FILTRATO GLOMERULARE

	<u>% riassorbimento</u>
Acqua	99.2
Sodio	99.6
Potassio	92.9
Cloruri	99.5
Bicarbonato	99.9
Glucosio	100
Albumina	95-99
Urea	50-60
Creatinina	0 (o negativo)

Riassorbimento tubulare e secrezione di sostanze

- **Attivo organiche**
 - Glucosio
 - Aminoacidi
 - Proteine (pinocitosi)
 - **3 sistemi secretori finora identificati:**
 - per acidi organici (per es. Penicilline)
 - per basi organiche forti
 - (per EDTA)

Riassorbimento tubulare e secrezione di sostanze

- Passivo organiche
 - Urea: segue l'acqua e, perciò, segue Na^+ & Cl^-
 - lenta diffusione attraverso la membrana, per cui vi è una escrezione netta.
 - Flusso più rapido causa una maggiore escrezione.
 - Acidi e basi deboli:
 - Diffusione non-ionica attraverso i lipidi della membrana.

Perchè valutare la funzionalità renale?

- Per identificare una disfunzione renale.
- Per diagnosticare una malattia renale.
- Per monitorare la progressione della malattia.
- Per monitorare la risposta al trattamento.
- Per valutare alterazioni della funzionalità che possono influenzare alcune terapie (per es., digossina, chemioterapia).

Segni e sintomi di insufficienza renale

- Sintomi dell'uremia (accumulo di prodotti tossici) (*nausea, vomito, letargia*)
- Disordini della minzione (*frequenza, nocturia, ritenzione, disuria*)
- Disordini del volume di urine (*poliuria, oliguria, anuria*)
- Alterazioni della composizione delle urine (*ematuria, proteinuria, bacteriuria, leucocituria, calcoli*)
- Dolore
- Edema (*ipoalbuminemia, ritenzione di*

Indagini biochimiche di funzionalità renale

- Esame delle urine
 - Aspetto e colore (sangue, torbidità)
 - Osmolalità e peso specifico
 - pH (di solito acido)
 - Glucosio / Corpi chetonici
 - Proteine
 - Analisi del sedimento (cellule, batteri, cristalli, cilindri*)
 - *particelle che si formano come "stampo" mucoproteico dei tubuli del nefrone
- Misurazione del filtrato glomerulare (GFR glomerular filtration rate): capacità del rene di rimuovere prodotti del catabolismo dal sangue
 - Test di clearance
 - Creatinina (insieme con urea e altri nitro-composti costituisce l'azotemia)
- Test di funzionalità tubulare

Analisi delle urine

- Glucosio
 - Aumento del glucosio plasmatico
 - Bassa soglia renale o altri disordini dei tubuli
- Proteinuria
 - Normale < 200 mg/24h. Sticks positività = >300mg/L
 - Cause: -
 - *Iperafflusso (aumento di proteine a basso PM nel plasma)*
 - *Perdita glomerulare*
 - *Ridotto riassorbimento tubulare*
 - *Proteine di origine renale*

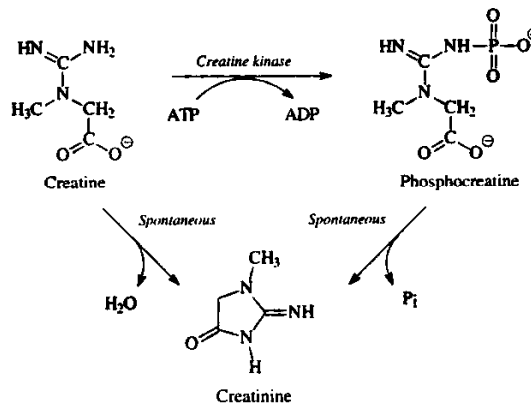
Determinazione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR)

- Analisi più frequentemente utilizzata per valutare la funzionalità renale.
- La misurazione è basata sul concetto di clearance:
“determinazione del volume di plasma dal quale una sostanza viene rimossa attraverso la filtrazione glomerulare”

Determinazione della Clearance

- Clearance = $(U \times V)/P$
 ove U è la concentrazione urinaria della sostanza x
 V è la velocità di formazione delle urine (mL/min)
 P è la concentrazione plasmatica della sostanza x
- Unità di misura = volume/unità di tempo (mL/min)
- Clearance = GFR, allora la sostanza x deve possedere le seguenti proprietà: -
 - viene filtrata liberamente dal glomerulo
 - il glomerulo rappresenta l'unica via di escrezione dal corpo (no secrezione o riassorbimento tubulare)
 - non è tossica ed è facilmente misurabile

Clearance della creatinina



- 1-2% della creatina muscolare viene convertita a creatinina ogni giorno
- La quantità prodotta è correlata alla massa muscolare
- Viene liberamente filtrata a livello glomerulare
- Lieve escrezione tubulare

Clearance della creatinina

- Raccolta temporizzata delle urine per la determinazione della creatininuria (di solito 24h)
- Un campione di sangue prelevato entro il periodo di raccolta delle urine

Problemi: -

- problemi pratici di un'accurata raccolta delle urine
- Variabilità intra-soggetto = 11%, Differenza critica = 33%
- Interferenze sulla misurazione della creatinina (reazione di Jaffè: bilirubina, Hb, sostanze ossido-riducenti)

Concentrazione plasmatica della Creatinina

Difficoltà:

- La concentrazione dipende dal bilancio tra entrate ed uscite.
- La produzione è determinata dalla massa muscolare, correlata a età, sesso e peso corporeo.
- Elevata variabilità inter-individuale nella popolazione a fronte di una minore variabilità intra-soggetto.
- La concentrazione è inversamente proporzionale al GFR.
 - Piccole variazioni della creatinina portano a grandi variazioni del GFR.

Cistatina-C

Newman et al Kidney Int 1995;47:312-318

- Inibitore della cisteina-proteinasi C (PM 13000)
- Liberamente filtrato dal glomerulo
- Produzione costante da parte di tutte le cellule nucleate
- Non note vie di escrezione extra-renali
- Non influenzata dalla massa muscolare, dalla dieta o dal sesso
- La concentrazione sierica ha una forte correlazione negativa con il GFR

Il marcatore endogeno ideale di GFR

- ⌘ Tasso di produzione costante (creatinina dipende da massa muscolare, sesso, dieta, esercizio fisico,...)
- ⌘ Rimosso dal circolo solo per filtrazione glomerulare (la creatinina viene eliminata anche per via intestinale e cutanea)
- ⌘ Liberamente filtrato a livello glomerulare (è l'unico criterio soddisfatto dalla creatinina)
- ⌘ Non riassorbito nè secreto dai tubuli renali (la creatinina ha un certo grado di riassorbimento e secrezione tubulare)

La cistatina C soddisfa tutti i 4 criteri, richiede solo un prelievo di sangue, ma è un test più costoso ed ancora poco conosciuto ...

Test di funzionalità tubulare (poco usati)

- N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)
- Tubulo prossimale
 - Riassorbimento di fosfati
 - Aminoaciduria
 - Glicosuria
 - Escrezionale frazionale di HCO_3^-
- Tubulo distale
 - Acidificazione (carico con cloruro d'ammonio)
 - Concentrazione

• **Microalbuminuria**

- rapporto albumina:creatinina (ACR)
 $\geq 2.5 \text{ mg/mmol}$ (uomo) o $\geq 3.5 \text{ mg/mmol}$
(donna) o albumina $\geq 20 \text{ mg/l}$

• **Proteinuria**

- rapporto albumina:creatinina ≥ 30
 mg/mmol o
- albumina $\geq 200 \text{ mg/l}$

Gli esami ematochimici di routine :**Glicemia****Azotemia (BUN)****Creatinina****Elettroliti Sierici:****Na⁺ Ca⁺⁺****K⁺ P****Cl⁻****Transaminasi: GOT/GPT (AST/ALT)****Fosfatasi alcalina ALP****Bilirubina T/F****Proteine Totali****Glicemia** (Valori ematici normali: 70 - 110 mg / dl)

La glicemia va misurata subito dopo il prelievo oppure è necessario impedire alterazioni dei valori con l'aggiunta di anticoagulanti glicostatici tipo fluoruro di sodio.

Il metodo di ricerca più utilizzato per la glicemia prevede l'ossidazione del glucosio con glucosio ossidasi .

L'acqua ossigenata che si forma reagisce con un accettore di elettroni in presenza di perossidasi per dare acqua ed un cromogeno bruno la cui assorbanza a 450 - 500 nm ci fa risalire alla concentrazione ematica di glucosio.

Colesterolo

Valori ematici normali Colesterolo: 130 - 250 mg / dl
HDL: 35 - 85 mg / dl LDL: 110 - 180 mg / dl

Un suo aumento nel sangue insieme ai trigliceridi potrebbe rappresentare un fattore di rischio di malattie aterosclerotiche e malattie coronariche. Il fattore di rischio è tanto più elevato quanto più aumenta il rapporto colesterolo totale / colesterolo-HDL

Gli esteri del colesterolo sono trasformati in colesterolo dalla colesterolo esterasi

Utilizzando la colesterolo ossidasi si produce 4-colestenone e acqua ossigenata.

Quest'ultima può essere dosata con la perossidasi che forma un cromoforo bruno rilevabile allo spettrofotometro.

Aggiungendo al siero polianioni (eparina o solfarandestrano) e cationi bivalenti (calcio o magnesio) si possono separare per centrifugazione le diverse frazioni di lipoproteine in base alla loro densità. La separazione può essere effettuata anche per elettroforesi

AZOTEMIA (UREA) Valori ematici normali: 10 - 45 mg / dl

La degradazione dei prodotti azotati produce ammoniaca, una sostanza tossica che deve essere ulteriormente trasformata in una meno pericolosa e più facilmente eliminabile.

Questo processo di trasformazione avviene nel fegato dove l'ammoniaca derivata dalla deaminazione degli aminoacidi diventa urea attraverso una complessa serie di reazioni (ciclo dell'urea).

La concentrazione ematica di urea (azotemia) aumenta in conseguenza ad inefficiente escrezione renale o per un aumentato catabolismo proteico. La sua diminuzione nel sangue, invece, è caratteristica negli stati di gravidanza e nei disordini epatici.

Il metodo di ricerca consiste nell'impiego di ureasi che scinde l'urea in ammoniaca ed anidride carbonica.

Attraverso il reattivo di Berthelot (soluzione di fenolo-ipoclorito in presenza di nitroprussiato) l'ammoniaca formatasi reagisce dando origine all'indofenolo di colore blu la cui concentrazione è rilevabile allo spettrofotometro a 580nm.

ELETTROLITI

Valori ematici normali

Sodio: 135 - 148 mEq / litro

Potassio: 3.5 - 5.5 mEq / litro

Calcio: 9.0 - 11.0 mg / dl

Fosforo: 2.5 - 4.8 mg / dl

Gli elettroliti rappresentano importanti composti inorganici presenti nei fluidi biologici. Tra questi i più importanti sono il sodio (Na⁺), potassio (K⁺), calcio (Ca²⁺), cloro (Cl⁻), carbonati (HCO₃⁻) e fosfati (HPO₄²⁻). All'interno delle cellule sono maggiormente presenti il potassio e i fosfati, mentre all'esterno predominano il sodio e i cloruri. La concentrazione di questi sali deve rimanere costante per il mantenimento della pressione osmotica, il bilancio idrico, per la corretta funzione di alcuni enzimi in quanto cofattori e per la regolazione dell'eccitabilità neuro-muscolare

Perchè si esegue l'analisi?

Gli squilibri elettrolitici riguardano svariate patologie del sistema nervoso, cardiocircolatorio, escretorio, endocrino, problemi di alimentazione, ecc.

Come si effettua il dosaggio?

Gli elettroliti vengono dosati mediante potenziometria con elettrodi selettivi (ISE).

CREATININA

Valori ematici normali nell'uomo: 0.60 - 1.50 mg / dl

Valori ematici normali nella donna: 0.50 - 1.20 mg / dl

La creatinina deriva dalla creatina per perdita di una molecola d'acqua. Questa trasformazione avviene spontaneamente sia in vitro che in vivo nei muscoli. La creatina (acido N-metil guanidin acetico) è una molecola che, fosforilandosi, immagazina energia chimica a livello muscolare permettendo la sintesi di ATP.

Perchè si esegue l'analisi?

La concentrazione di creatina nel plasma è bassa e nelle urine dovrebbe essere assente. Può aumentare nelle miopatie o dopo digiuno prolungato a causa di un aumentato catabolismo muscolare.

La creatinina, che rappresenta il prodotto di scarto della creatina è idrosolubile e viene eliminata con le urine. L'accumulo di creatinina nel sangue è quindi indice di problemi renali per la sua mancata escrezione. La creatininemia aumenta in tutte le nefropatie.

Come si effettua il dosaggio?

La creatinina è determinata con il reattivo di Jaffè contenente picrato alcalino. Il prodotto della reazione è un complesso giallo-rosso che può essere misurato allo spettrofotometro.

BILIRUBINEMIA**Valori ematici normali****Bilirubina totale: 0.3 - 1.0 mg / dl****Bilirubina diretta: 0.0 - 0.4 mg / dl****Bilirubina indiretta: 0.3 - 1.0 mg / dl**

Alcune proteine come l'emoglobina nei globuli rossi e la mioglobina nelle cellule muscolari addette al trasporto dell'ossigeno rispettivamente nel sangue e nei muscoli hanno una particolare struttura molecolare interna detta EME.

Tale porzione non proteica detta gruppo prostetico subisce un fisiologico processo di degradazione.

Uno dei prodotti di degradazione dell'EME è la bilirubina (di colore giallo), sostanza poco solubile in acqua e tossica per le cellule. Il destino fisiologico della bilirubina è quello di esser legata dalla proteina albumina che la trasporta fino al fegato.

Qui la bilirubina viene coniugata con l'acido glucuronico per divenire maggiormente solubile e passare poi nella cistifellea ed essere riversata, con la bile, nell'intestino dove per opera di alcuni batteri viene ridotta ad urobilinogeno e stercobilinogeno.

Questi ultimi due prodotti possono essere eliminati con le feci.

Perchè si esegue l'analisi?

La presenza di bilirubina nel circolo sanguigno e la sua conseguente diffusione nei tessuti è la causa di un classico sintomo dei danni epatici e degli eritrociti: l'ittero. Le cause possono essere un'elevata distruzione dei globuli rossi (ittero emolitico), disturbi del fegato (ittero epatocellulare) o un diminuito deflusso della bile (ittero da ostruzione dovuto a calcoli biliari). L'aumento della bilirubina diretta, cioè coniugata all'acido glucuronico, indica la presenza di un danno epatico. Mentre un aumento della bilirubina totale, cioè sia glucuronata che legata all'albumina, indica la presenza di danni extraepatici.

Come si effettua il dosaggio?

Per la bilirubina diretta si fa reagire il siero con il reattivo di Ehrlich mentre per quella totale, oltre al reattivo di Ehrlich, si utilizza il dimetilsolfossido che scinde il complesso bilirubina-albumina.