

Sindrome Coronarica Acuta



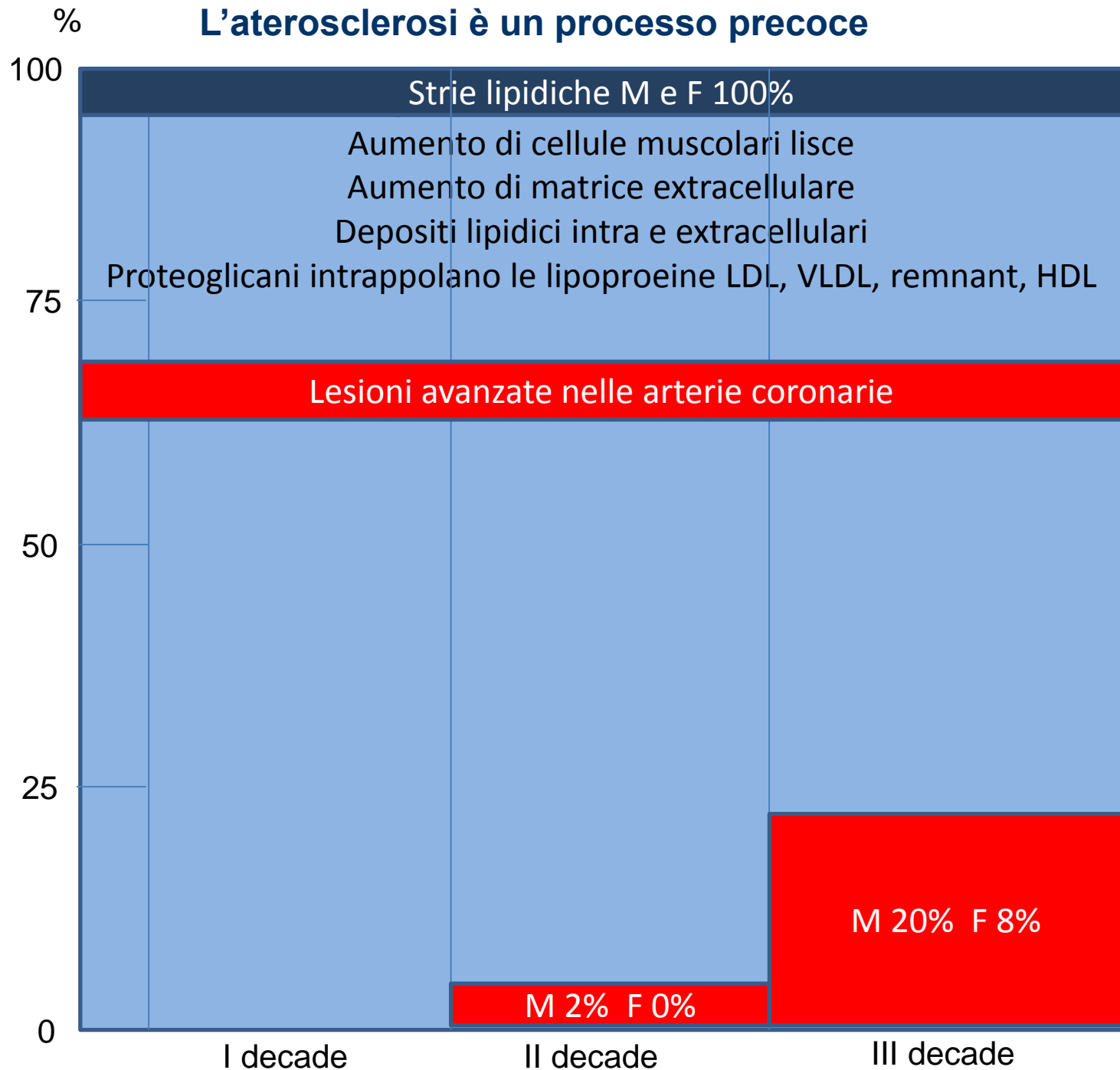
**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon



L'aterosclerosi è un processo precoce



Patogenesi dell'aterosclerosi

Disfunzione endoteliale

Dovuta a perdita di ossido nitrico (NO)

Associata a ipercolesterolemia, diabete, ipertensione, fumo

Viene indotta da LDL ossidate

Migliora correggendo la dislipidemia con

- statine, che migliorano la biodisponibilità di NO
- ACE inibitori
- Antiossidanti (vitamina C, flavonoidi)

Infiammazione

Macrofagi modificati da LDL ossidate rilasciano citochine e fattori di crescita

I markers d'infiammazione si associano al rischio aterosclerotico:

- Proteina C Reattiva (CRP)
- Lp-PLA2 (da misurare in soggetti a rischio medio e alto e non a basso rischio).

Patogenesi dell'aterosclerosi

Infiammazione

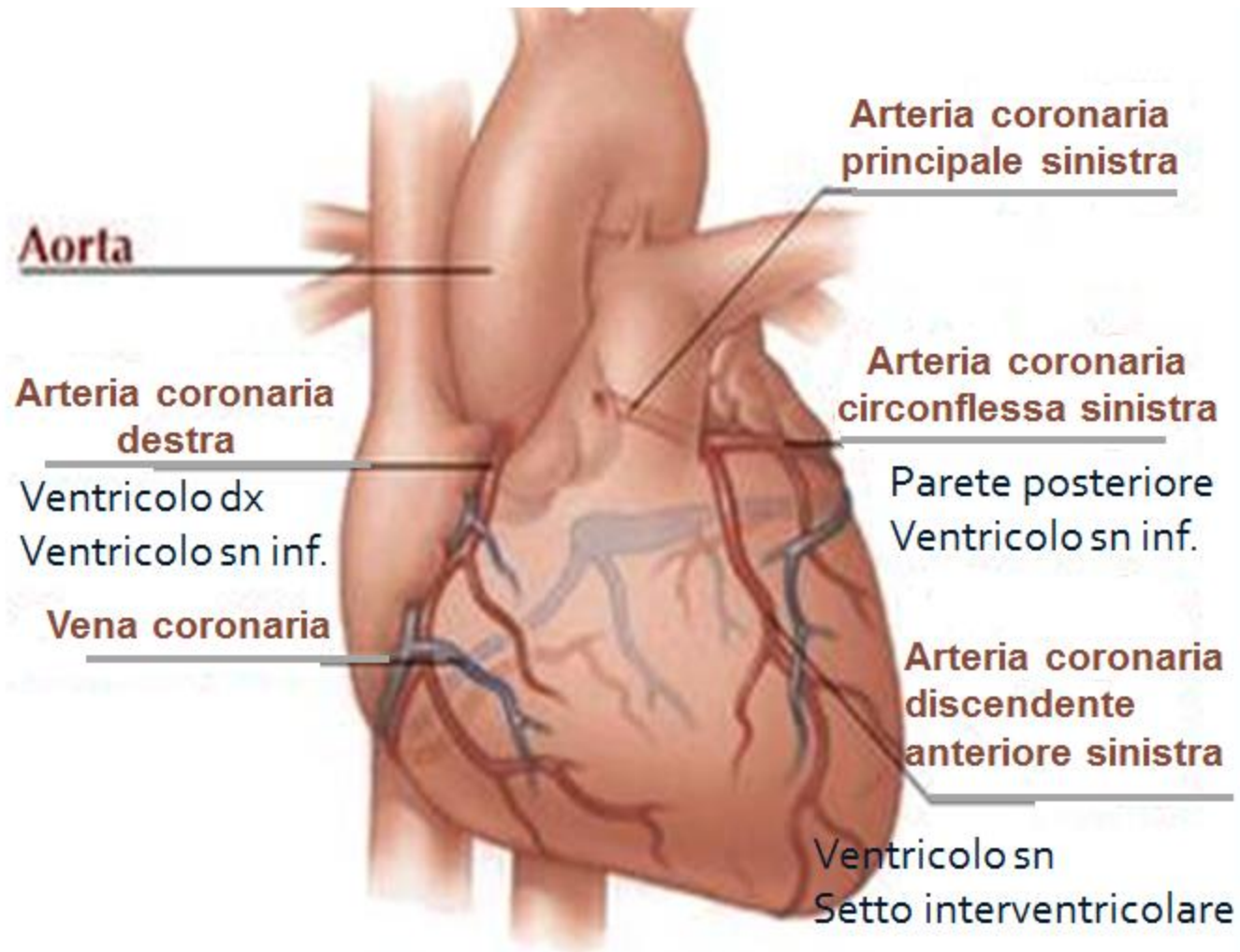
Citochine — Il rilascio è stimolato dalle LDL ossidate, formazione di radicali liberi, stress emodinamico, ipertensione e infezione.

Specialmente la interleuchina-1 (IL-1) e tumor necrosis factor-alpha (TNF α)

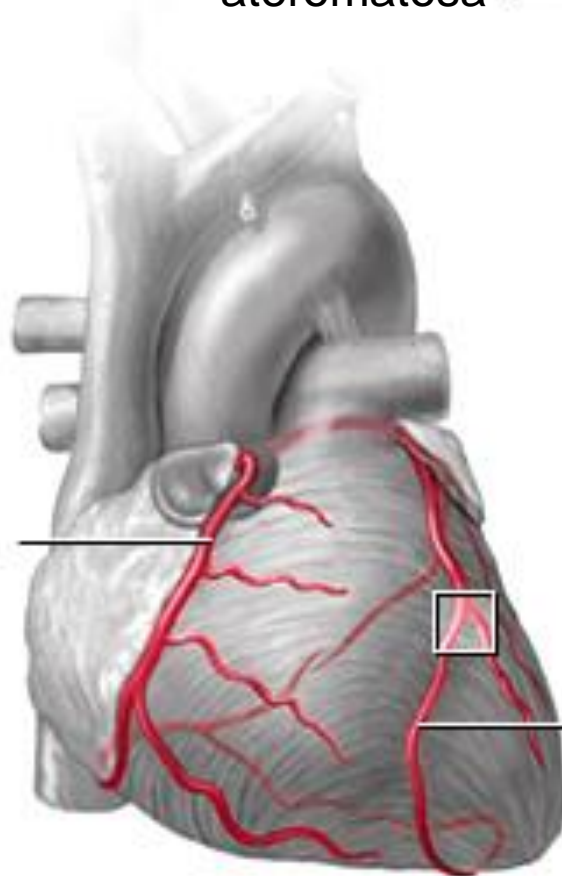
- innalzano l'espressione di molecole di superficie cellulare (ICAM-1, VCAM-1, selettine) su cellule endoteliali, smc e macrofagi
- Inducono la proliferazione cellulare,
- contribuiscono alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, stimolano le metalloproteinasi della matrice
- inducono l'espressione di fattore tissutale (TF).

Attivazione leucocitaria — Leucociti (monociti circolanti e anche linfociti T) vengono precocemente reclutati

ANATOMIA DEL CUORE: ANGIOLOGIA



Arteria
coronaria
destra



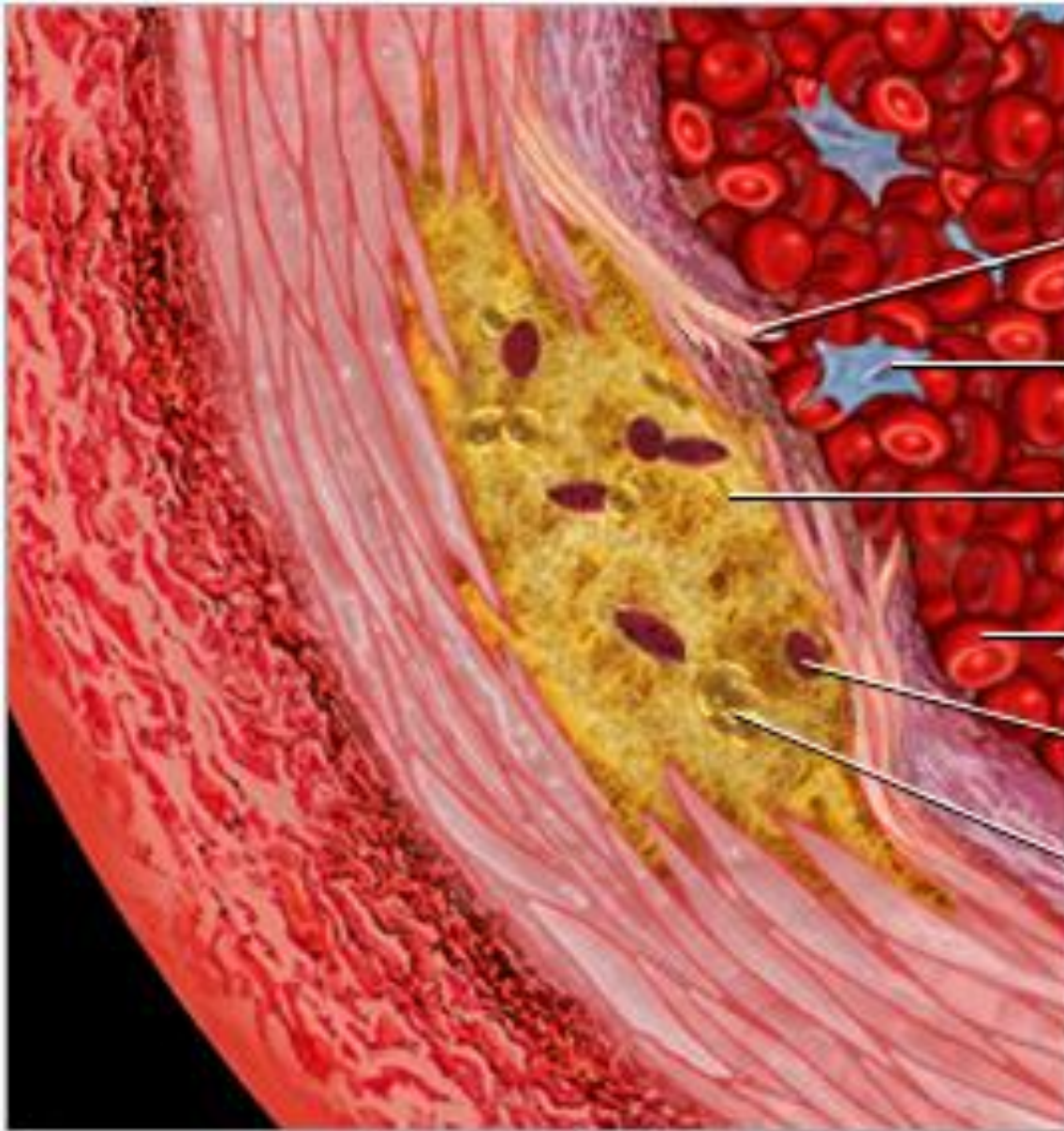
Placca
ateromatosa



Trombo

Arteria
interventricolare
anteriore

SEZIONE TRASVERSALE DI ARTERIA CON ATEROMA



Fissurazione

Monociti/macrofagi

Deposito di
colesterolo

Eritrociti

Cellula schiumosa

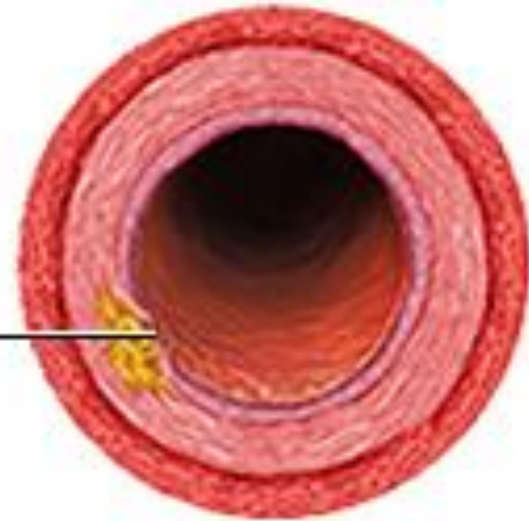
Core necrotico
lipidico

SEZIONE TRASVERSALE DI ARTERIA CORONARIA

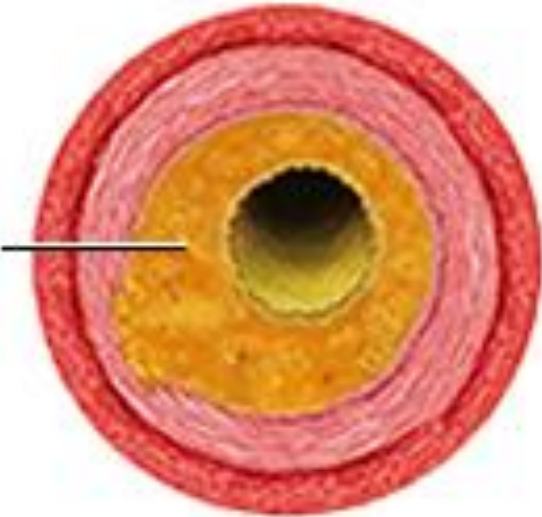
Arteria normale



Rottura di capsula dell'ateroma



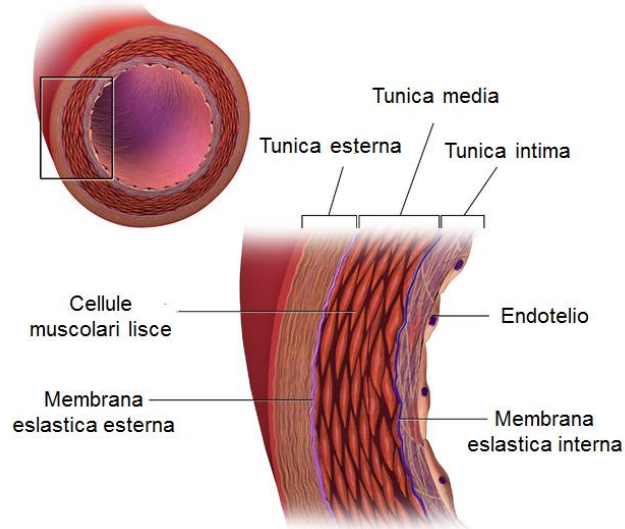
Ateroma ostruente



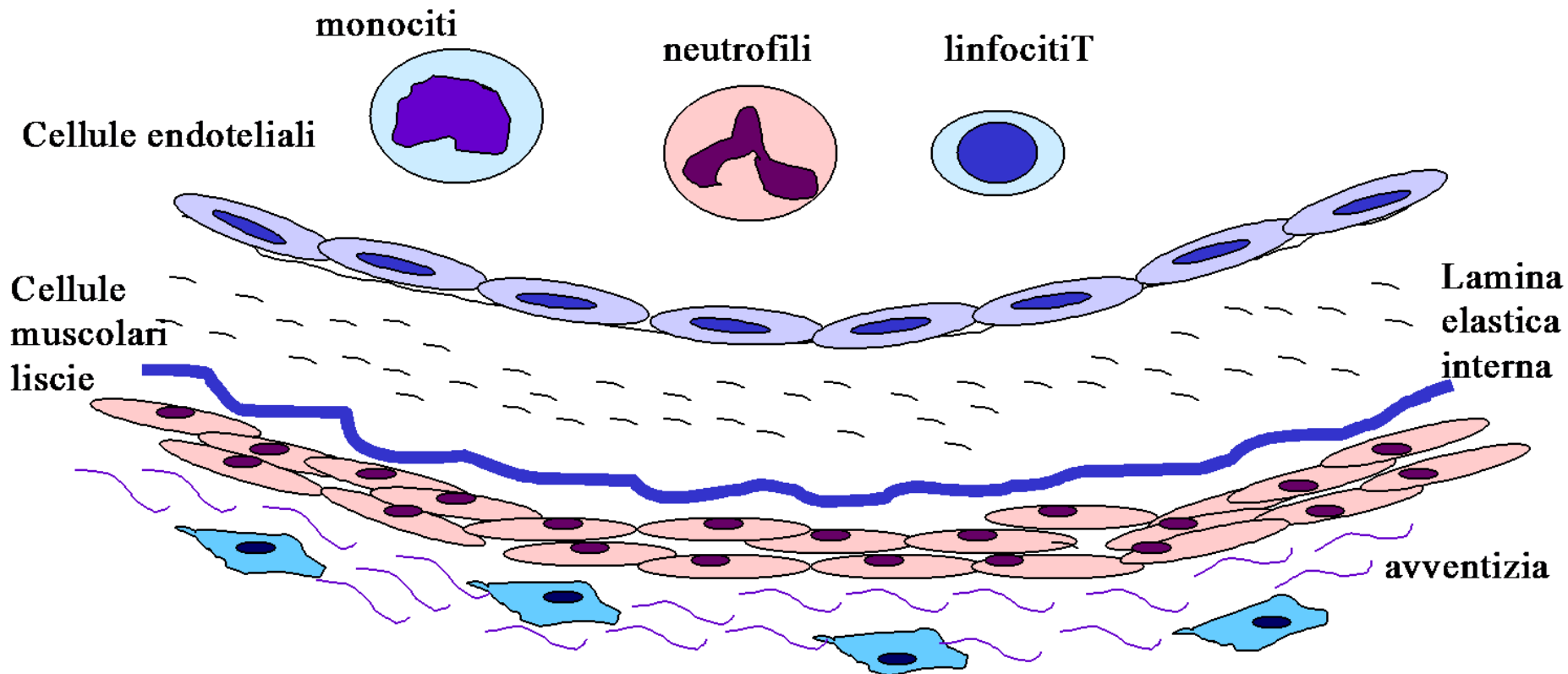
Lesione ateromatosa complicata con trombosi



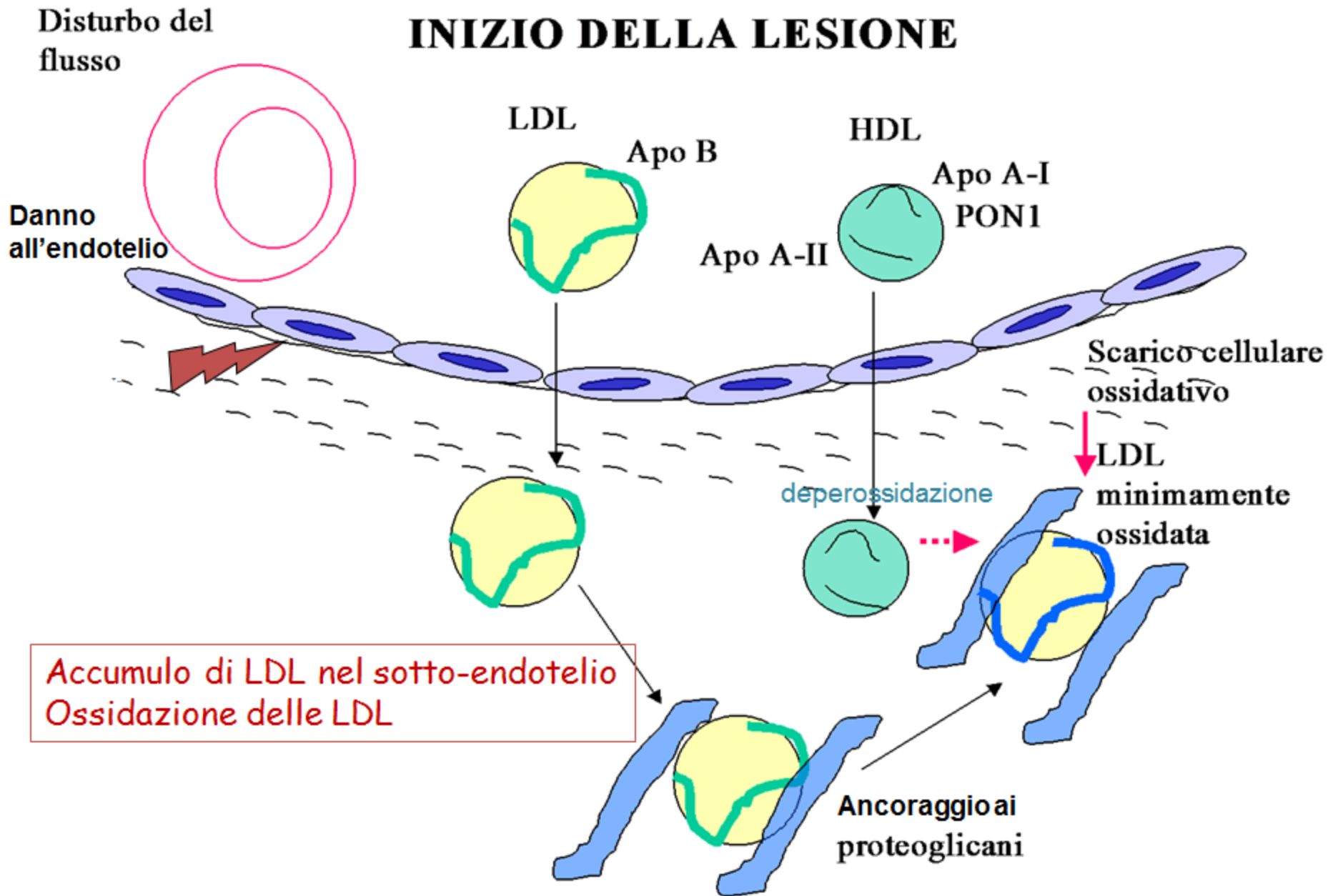
**FORMAZIONE ED EVOLUZIONE DELLA
PLACCA ATEROMATOSA
INFIAMMATORIA O VULNERABILE**

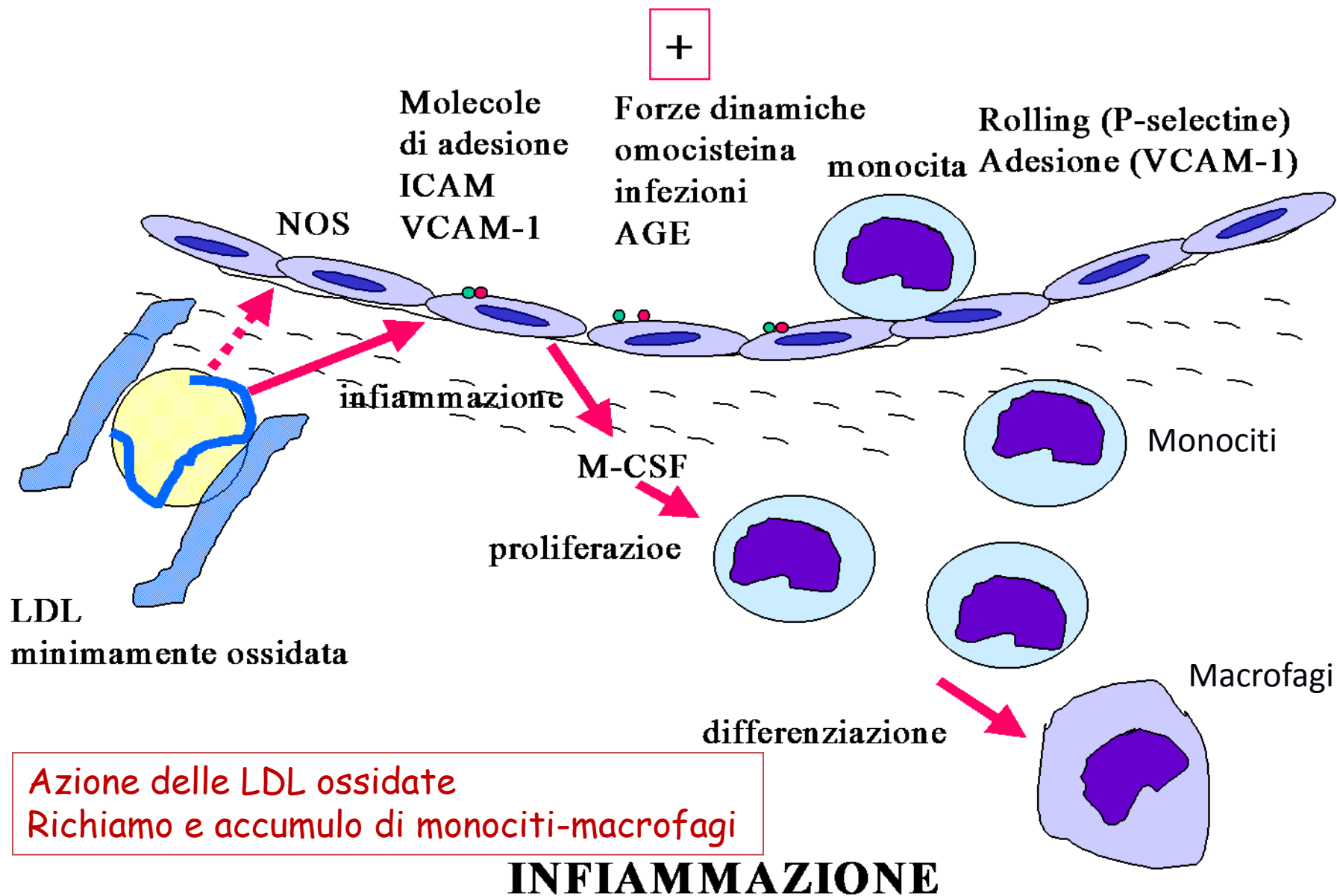


STRUTTURA DI GROSSA ARTERIA NORMALE



INIZIO DELLA LESIONE

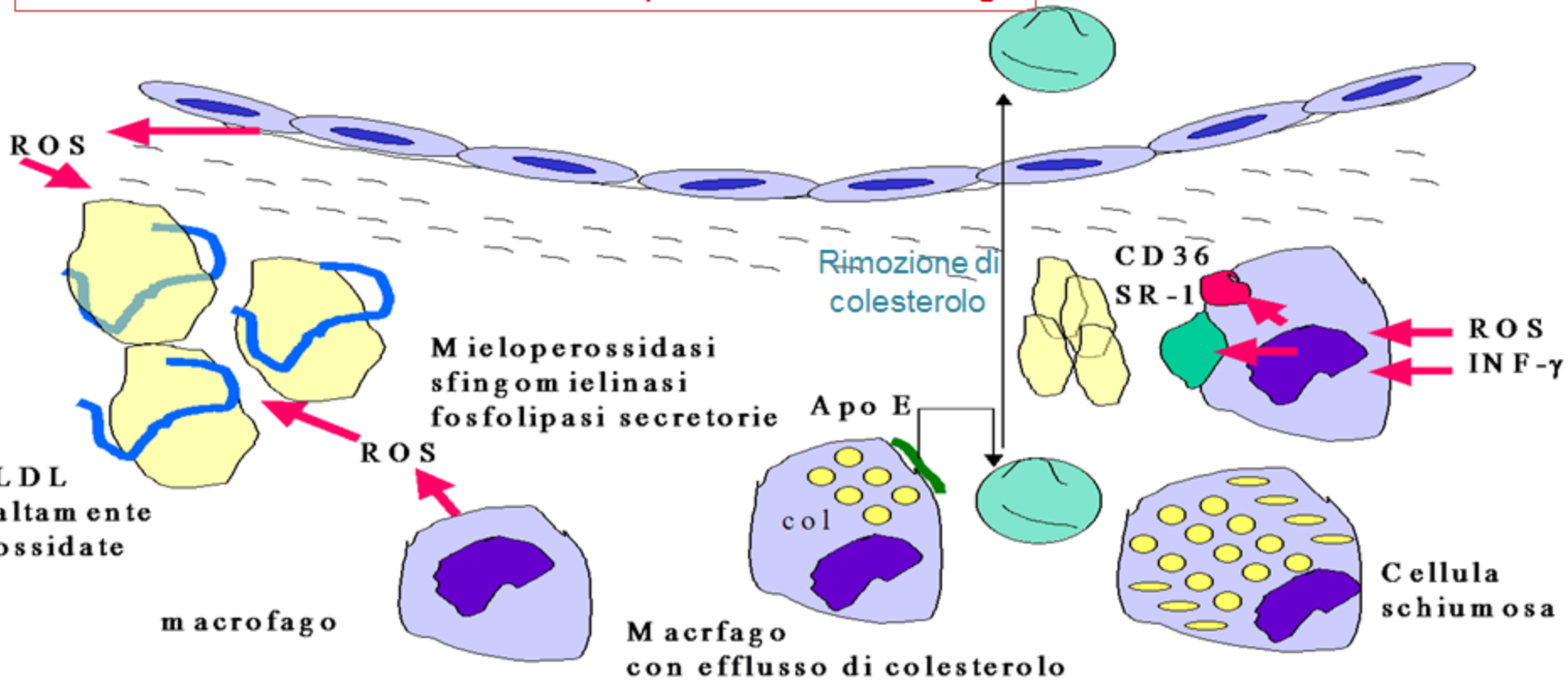




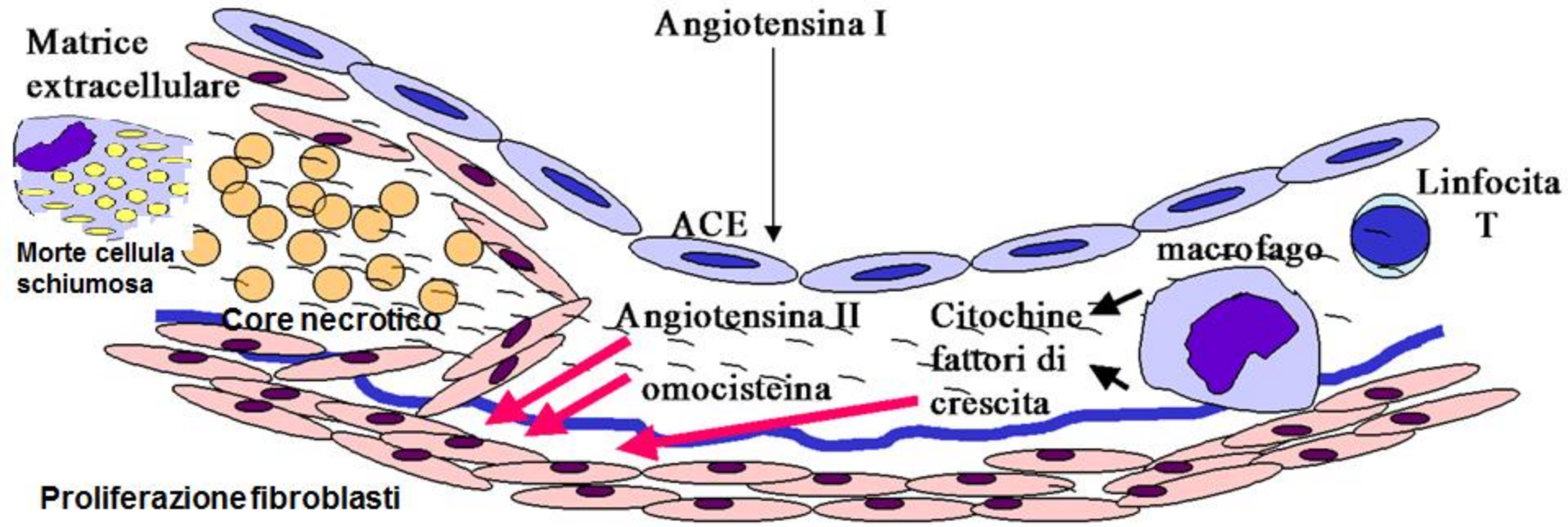
FORMAZIONE DELLA CELLULA SCHIUMOSA

Rimozione delle LDL ossidate da parte dei macrofagi

HDL



CAPSULA FIBROSA

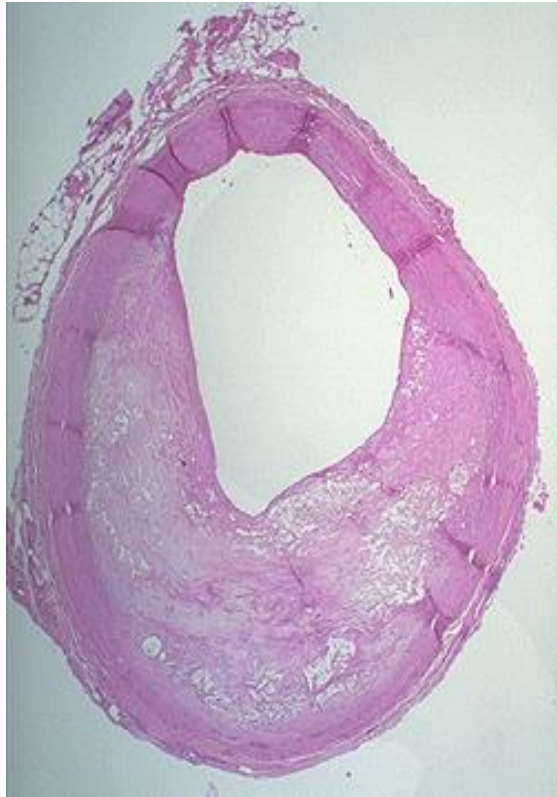


Isolamento del core necrotico

FORMAZIONE DELLA PLACCA FIBROSA

ARTERIE CORONARIE

Ateroma ostruente

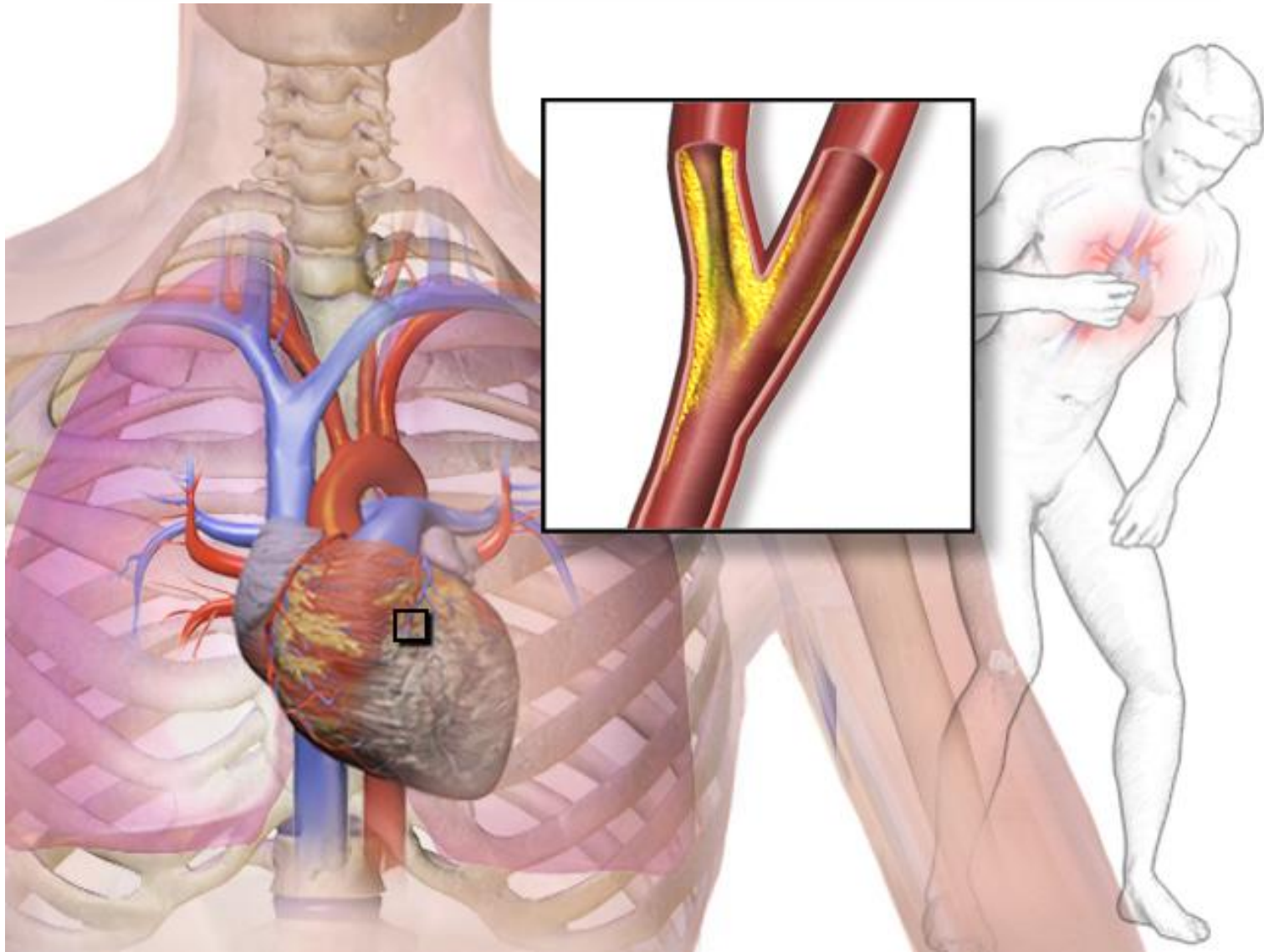


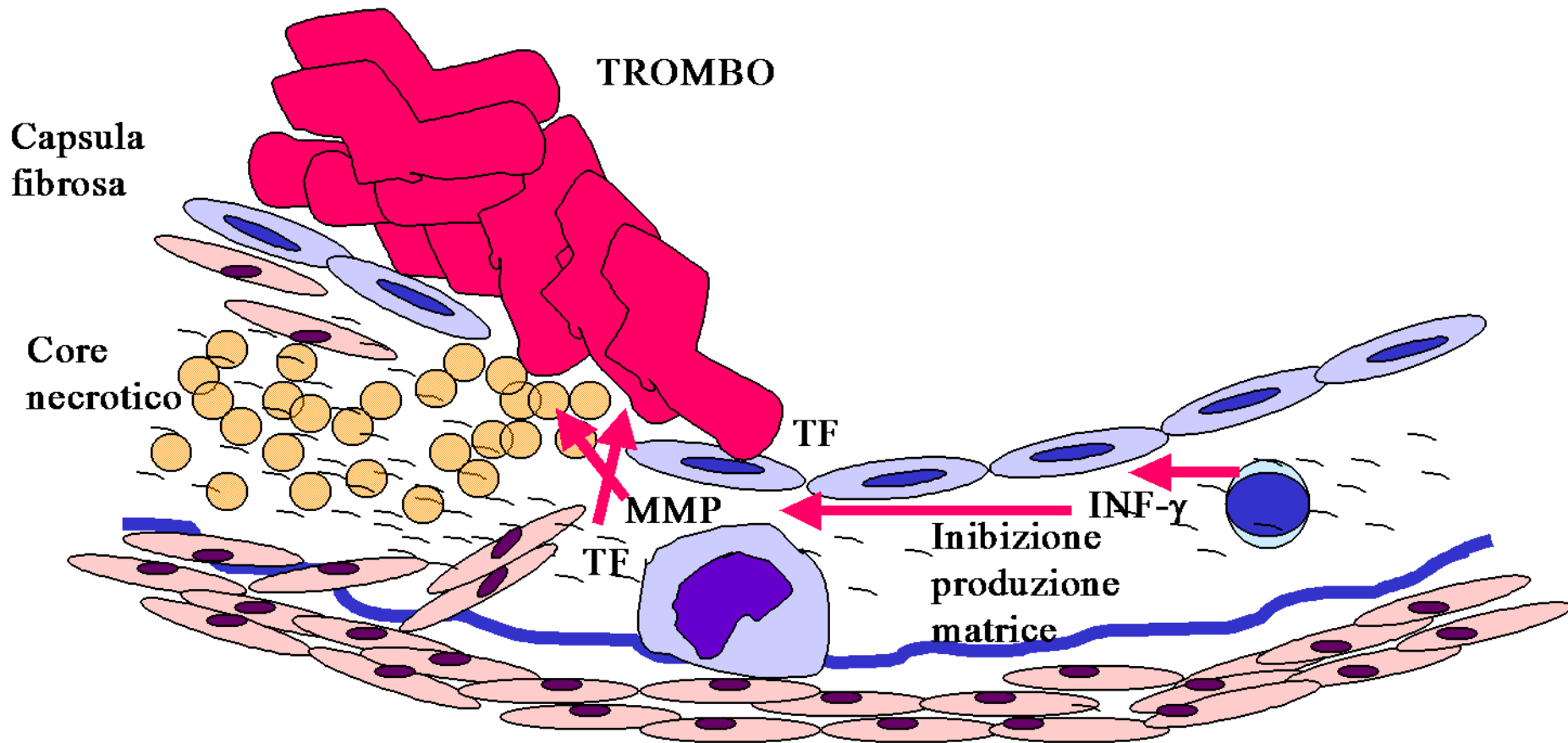
- Progressiva ostruzione del lume del vaso
- Progressiva riduzione del flusso di sangue
- Insufficiente apporto di ossigeno nelle condizioni di aumentate richieste (sforzo fisico)



ANGINA STABILE

ANGINA STABILE, CRONICA, DA SFORZO





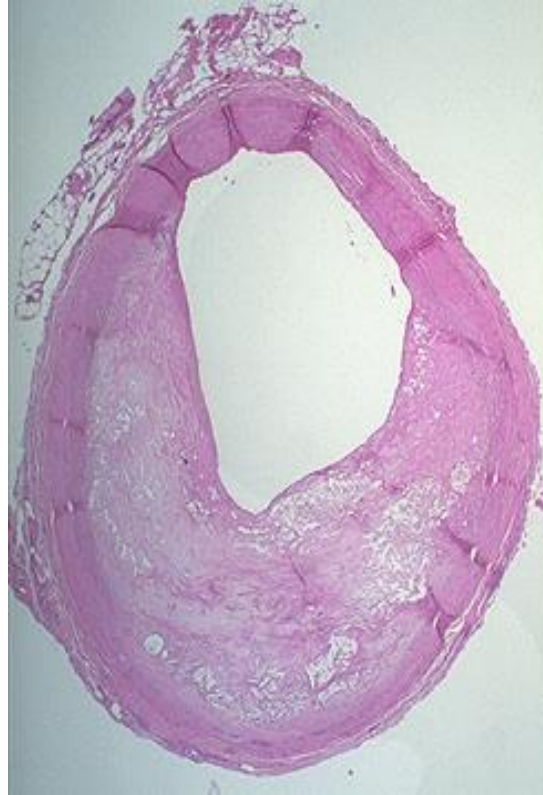
Rottura della capsula
 Attivazione di piastrine e meccanismo della coagulazione
 Formazione del trombo

LESIONE COMPLICATA E TROMBOSI

MMP = metallo-proteasi della matrice; TF = fattore tissutale; INF-γ = interferone γ

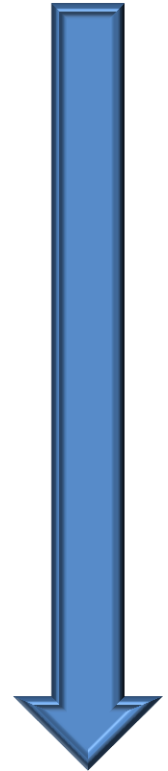
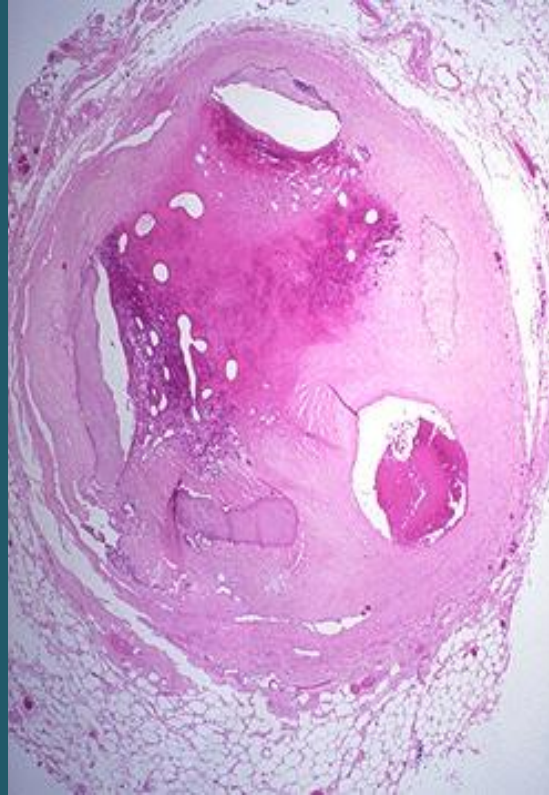
ARTERIE CORONARIE

Ateroma ostruente

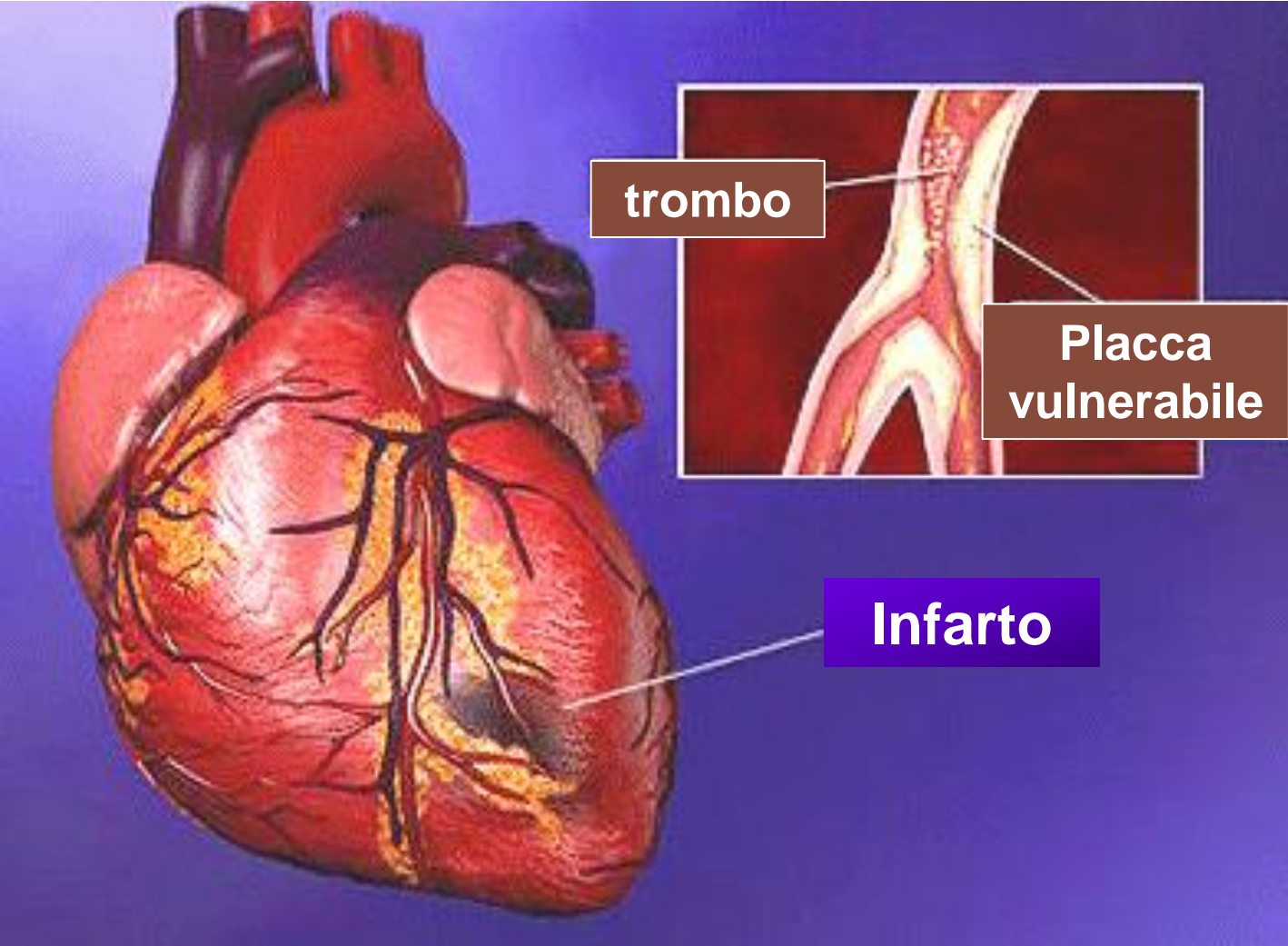


ANGINA STABILE

Rottura di placca vulnerabile



**INFARTO MIOCARDICO E
SINDROME CORONARICA
ACUTA**



APPROFONDIMENTI SULLA ROTTURA/EROSIONE DI PLACCA

Contributo della rottura o erosione di placca allo sviluppo delle sindromi coronariche acute e potenziali strategie per rilevare e trattare le placche vulnerabili.

La sindrome coronarica acuta [Acute Coronary Syndromes (ACS)] rappresentano uno spettro di manifestazioni cliniche della arteriopatia coronarica acuta, che include:

1. angina instabile [Unstable Angina (UA),
2. infarto miocardico acuto [Acute Myocardial Infarction (AMI),
3. arresto cardiaco o morte improvvisa coronarica.

PATOGENESI

1. Nella maggior parte dei casi la trombosi arteriosa coronarica è il meccanismo patogenetico finale, come documentano studi angiografici e anatomopatologici .

Coronarografia

Iniezione di mezzo di contrasto nell'ostio dell'arteria coronaria

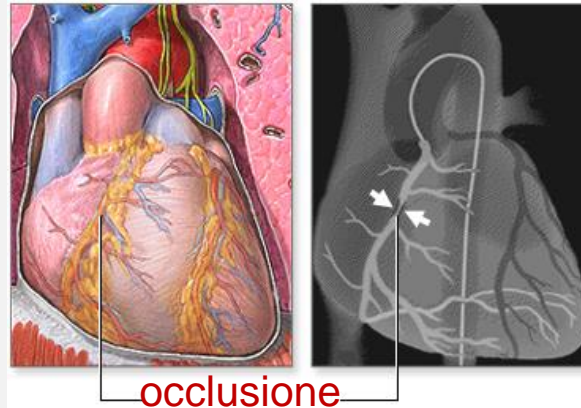


Immagine Rx

2. Si osservano anche casi di trombosi dopo esposizione del sangue a noduli calcifici.
3. Si sono postulati anche altri meccanismi di ACS, come il disaccoppiamento tra flusso e richieste di sangue fornito.

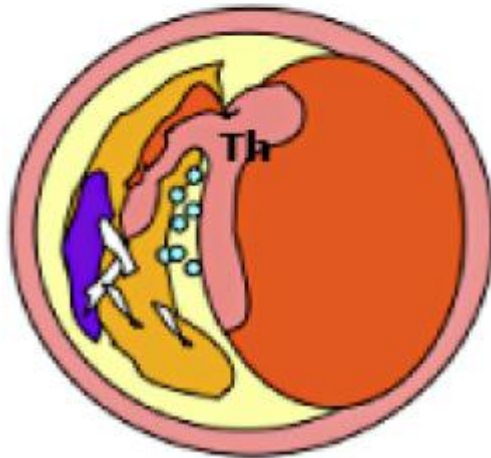
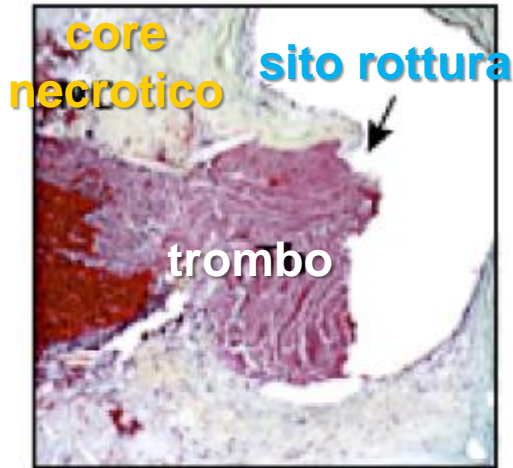
La trombosi arteriosa coronarica

- Trombi coronarici si trovano nel **50-75% dei casi di morte improvvisa.**
- La rottura o erosione di placca avviene spesso in siti dove la **stenosi luminale è angiograficamente modesta.**

Studi autoptici dimostrano che la morte improvvisa coronarica avviene nel 40% dei casi per rottura di placca in siti con stenosi <50% del diametro.

- **Nei casi in cui la rottura o erosione non porta alla occlusione trombotica** del vaso, ciascuno di questi eventi non causa necessariamente sintomi ma **la placca progredisce dopo la guarigione.**

Rottura



Placche con rottura sono ateromi con una capsula fibrosa sottile con trombi luminali (Th). Hanno un grosso core necrotico (NC), che contiene abbondanti cristalli di colesterolo, una capsula sottile ($<65 \mu\text{m}$) ed infiltrazione da cellule schiumose e T linfociti.

La capsula è più sottile nel sito di rottura dove consiste di poche fibre collagene e rare cellule muscolari lisce (SMC).

Il trombo nel lume comunica con il core necrotico.

Rottura di placca

E' la morfologia più frequente associata alla trombosi coronarica acuta.

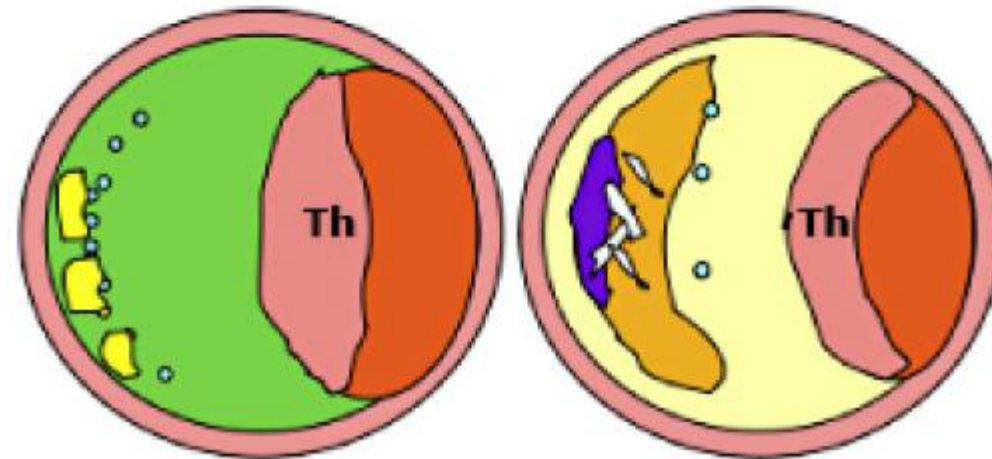
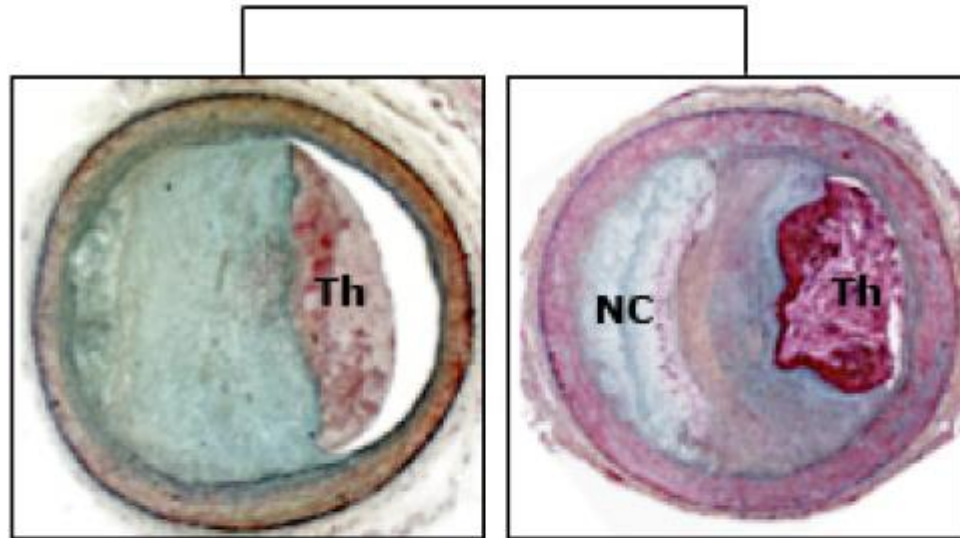
Si riscontra un trombo intraluminale sopra una capsula fibrosa sottile e rotta che ricopre la placca aterosclerotica con un core necrotico relativamente abbondante.

La capsula consiste principalmente di collagene tipo I, macrofagi e linfociti, mentre la componente di SMC è assente o rada. La rottura compare nel punto più debole della capsula, ma può trovarsi anche nella porzione media della capsula.

La breccia nella capsula mette in contatto le cellule e gli elementi noncellulari del sangue con i componenti del core necrotico altamente trombogenici, sviluppandosi così il trombo.

Storicamente, si pensava che la principale fonte di fattore tissutale (TF) fosse il core necrotico, ma ora si sa che **i monociti circolanti, anziché i soli macrofagi, producono TF che inizia e propaga acutamente i trombi nell'angina instabile su base aterosclerotica.**

Erosione



- Le erosioni avvengono sopra lesioni ricche di SMC e proteo-glicani.
- I trombi del lume si sviluppano su aree prive di endotelio.
- L'intima profonda della placca erosa presenta accumuli lipidici extracellulari ma i core necrotici sono meno frequenti e, comunque, non comunicano con il trombo del lume.
- Manca l'infiltrato infiammatorio oppure è poco consistente con pochi macrofagi e linfociti.

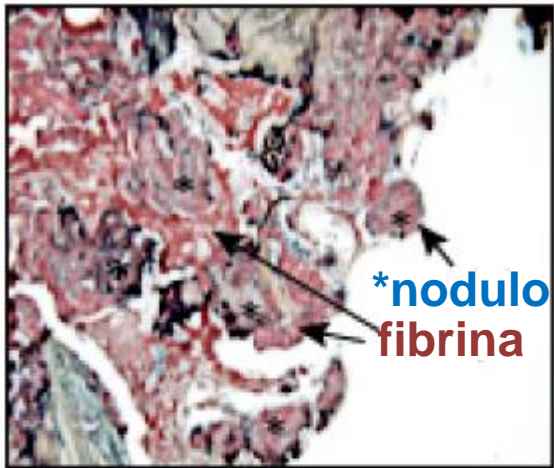
Erosione di placca

E' la seconda morfologia più prevalente delle trombosi coronariche acute. Le caratteristiche dei trombi sovrastanti differiscono da quelle della rottura di placca: **i trombi mostrano stadi tardivi di guarigione** con lisi di cellule infiammatorie, invasione di SMC e/o cellule endoteliali o strati organizzati di SMC e proteoglicani con vari gradi di strati di piastrine/fibrina .

I trombi delle placche erose contengono una maggiore densità di cellule mieloperossidasi positive rispetto a quelli delle placche rotte, perciò i livelli sistemici di **mieloperossidasi** sono elevati nei pz con ACS con erosione di placca rispetto alla rottura di placca. Quindi, aumentati livelli di biomarcatori selettivi di infiammazione riflettono specifici eventi coronarici acuti.

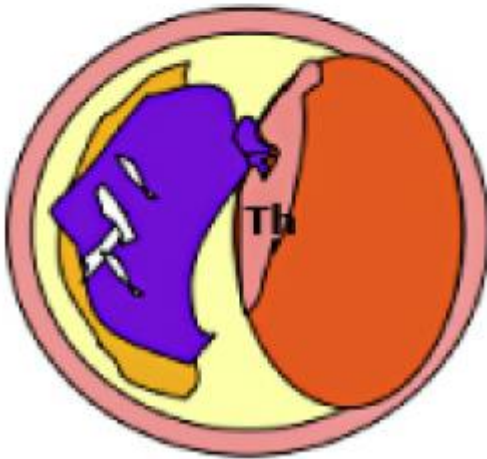
Un grosso accumulo di molecole di matrice extracellulare, **i proteoglicani**, nei siti di erosione differenzia la erosione della rottura di placca; questo accumulo **promuove la de-endotelizzazione e l'aggregazione piastrinica**. Un proteoglicano, **lo ialuronano**, promuove la polimerizzazione della fibrina, che **facilita la migrazione delle SMC e la progressione della placca**.

Nodulo calcifico



I noduli calcifici sono placche con trombi luminali che protrudono nel lume attraverso una capsula fibrosa sottile rotta.

Nel sito del trombo manca l'endotelio e mancano pure le cellule infiammatorie (macrofagi, T linfociti).



Nodulo calcifico

E' la morfologia meno frequente associata alla trombosi coronarica acuta.

Si tratta di placche fibrocalcifiche con poco o niente core necrotico e con rottura della superficie luminale e trombosi, attribuita a noduli calcifici densi eruttivi.

Si ritrovano nelle arterie fortemente calcificate spesso con grosse piastre di matrice calcificata circondate da aree di fibrosi, infiammazione e neovascolarizzazione.

Sono prevalenti negli uomini anziani con arterie coronarie tortuose e insufficienza renale cronica. I noduli calcifici protrudono nel lume, dato l'assottigliamento dello strato di collagene sovrastante e la perdita di endotelio ; il calcio entra in contatto con il flusso sanguigno e si forma il trombo.

MORFOLOGIA DELLA PLACCA NELLE ACS

Prendiamo in considerazione

Morte cardiaca improvvisa

Infarto miocardico acuto

Angina instabile

MORFOLOGIA DELLA PLACCA NELLA ACS

Morte cardiaca improvvisa

Si riscontra trombosi nel 50-75% dei casi con

- **rottura di placca** (55-65%),
- **erosione** (30-40%)
- **noduli calcifici** (2-7%).

MORFOLOGIA DELLA PLACCA NELLA ACS

Infarto miocardico acuto

STEMI (acute ST-segment elevation myocardial infarction)

è dovuto:

- 75% a **rottura di placca**
- 25% a **erosione di placca**

confermato da studi clinici che utilizzano high-resolution (10-15 μm) imaging modality optical coherence tomography (OCT).

NSTACS (non-ST-segment elevation acute coronary syndromes) usando OCT, sono dovute a:

- **rottura di placca** nel 47% dei casi.

Nelle NSTACS, che comprendono NSTEMI (non-ST elevation myocardial infarction) e angina instabile

L'incidenza di rottura di placca è minore rispetto a STEMI.

Angina instabile

L'incidenza di **rottura di placca** è **più bassa rispetto ai casi di morte cardiaca improvvisa e AMI** e, rispetto a questi, nella UA **prevale la proporzione di restringimento severo (>75 %)** delle arterie coronariche dato dalle placche aterosclerotiche.

Ciò non esclude che nella UA la trombosi acuta non sia la causa degli eventi acuti, inclusa la morte.

Oggigiorno la maggior parte dei pz con UA non muore acutamente, ma il decesso avviene per scompenso cardiaco, o per cause extracardiache.



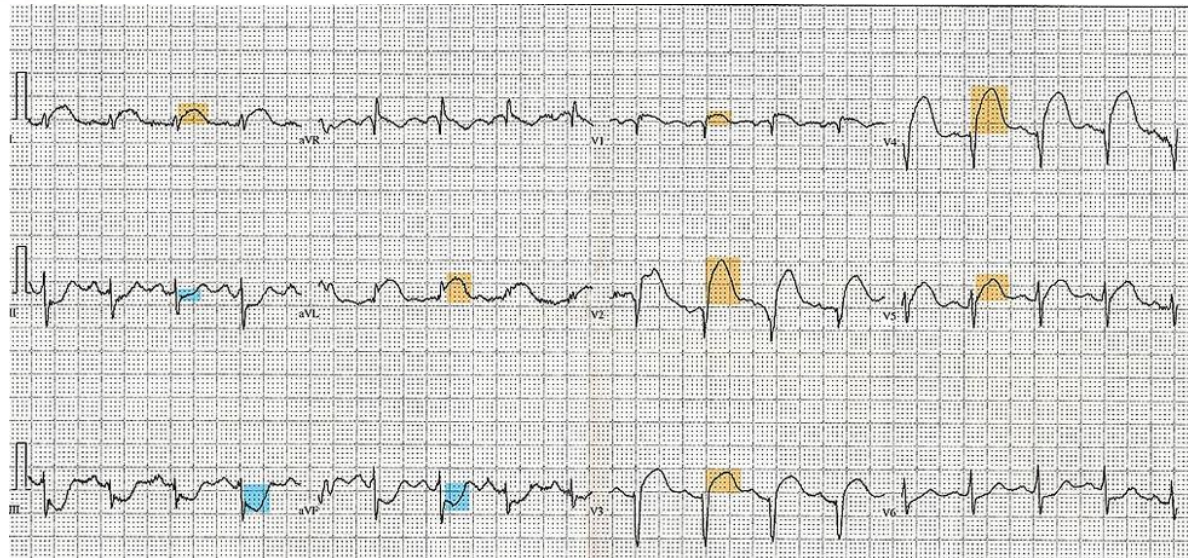
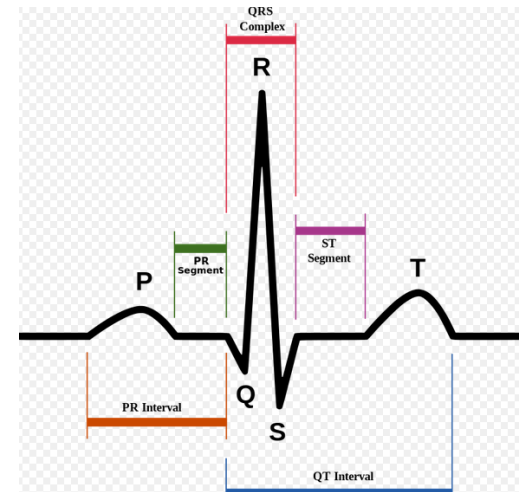
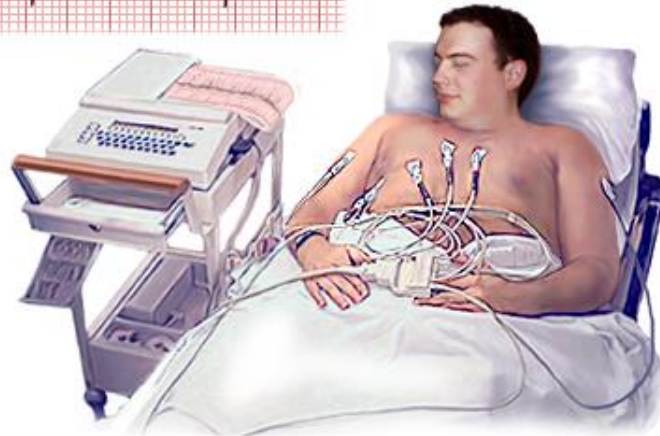
**SINDROME CORONARICA
ACUTA - ACS**

**DIAGNOSI CLINICA E DI
LABORATORIO**

Sindrome coronarica acuta (ACS)

- Costellazione di sintomi causati da ischemia miocardica acuta.
- Elevato rischio di morte cardiaca o di complicanze.
- Deve essere identificata tra tutti i pazienti che si presentano al Pronto Soccorso con sintomi toracici non traumatici.

Sindrome coronarica acuta (ACS)

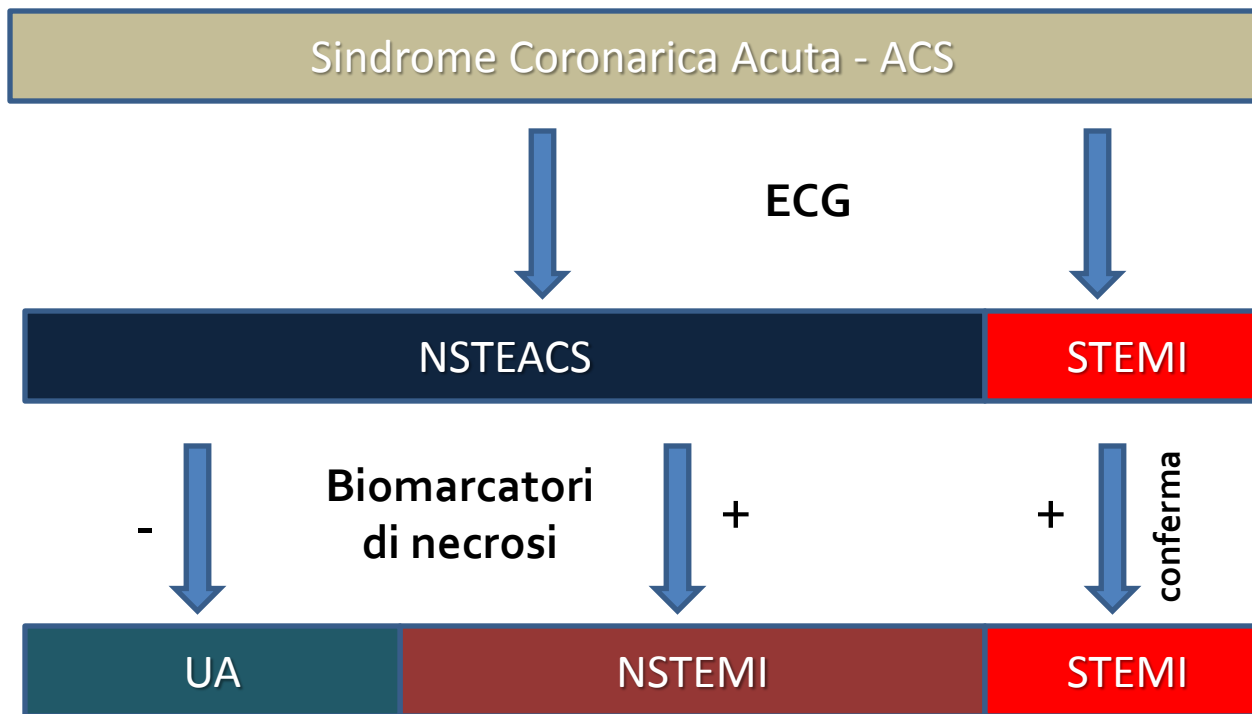


Elettrocardiogramma a 12 derivazioni che evidenzia elevazione del segmento ST (in arancio) in più derivazioni, indicativo di infarto miocardico.

Sindrome coronarica acuta (ACS)

- Esistono 2 principali categorie basate su ECG alla presentazione:
 - elevazione del tratto ST (STE) diagnostico di MI (**STEMI**);
 - sottolivellamento ST o assenza di alterazioni ECG, detto **NSTEACS**, che comprende angina instabile (**UA**) e MI senza STE (**NSTEMI**), che condividono la patogenesi ma differiscono per gravità.
 - In **STEMI** l'ischemia è d'intensità e durata tale da causare netta necrosi miocitaria, documentata dai biomarcatori cardiaci

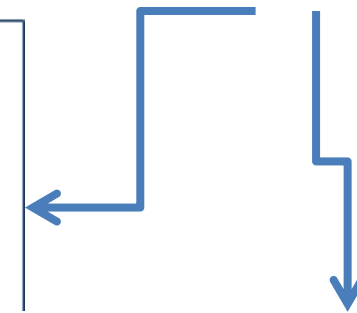
Categorizzazione della Sindrome Coronarica Acuta



Sindrome coronarica acuta (ACS)

la causa più comune è la arteriopatia coronarica con rottura della placca e formazione del trombo intracoronarico.

Il trombo è solo parzialmente ostruttivo o solo transitoriamente occlusivo e si ha ischemia coronarica senza STE persistente (NSTEACS, che comprende UA e NSTEMI).
70% dei casi



il trombo occlude completamente il vaso ed esita in STEMI.
30% dei casi

- Le terapie antitrombotiche e antiplastriniche servono ad arrestare la propagazione o la ricorrenza del trombo coronarico.
- STEMI è candidato alla immediata terapia riperfusiva con fibrinolitici o PCI, mentre la fibrinolisi è dannosa in caso di NSTEACS.

Valutazione del dolore toracico acuto

1. Dispendioso per costi e tempo:

50% dei pazienti non ha sindrome coronarica acuta

50% dei pazienti ha sindrome coronarica acuta (ACS):

- 15% ha infarto miocardico acuto (AMI)
- 35% ha angina instabile (UA)

2. Nel Pronto Soccorso avviene l'identificazione o l'esclusione di ACS in base a:

- **sintomi clinici e ECG indicativi di ischemia più**
- **valori dei bio-marcatori di necrosi miocardica.**

1. criteri ECG hanno

poca specificità diagnostica:

- indicativi solo d'ischemia miocardica
- l' onda Q può esserci per un precedente MI

poco sensibilità diagnostica:

- un ECG normale non esclude ACS

2. biomarcatori cardiaci

indicano la comparsa di necrosi miocardica

Angina Instabile [Unstable angina (UA)]

Nei pazienti con sintomi ischemici suggestivi di ACS senza aumento dei biomarcatori con o senza variazioni ECG indicativi di ischemia si pone diagnosi di angina instabile.



Infarto Miocardico



**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon

DIAGNOSI DI INFARTO MIOCARDICO (MI)

1. **caratteristiche cliniche:**

- ECG
- marcatori biochimici di necrosi miocardica
 - Imaging

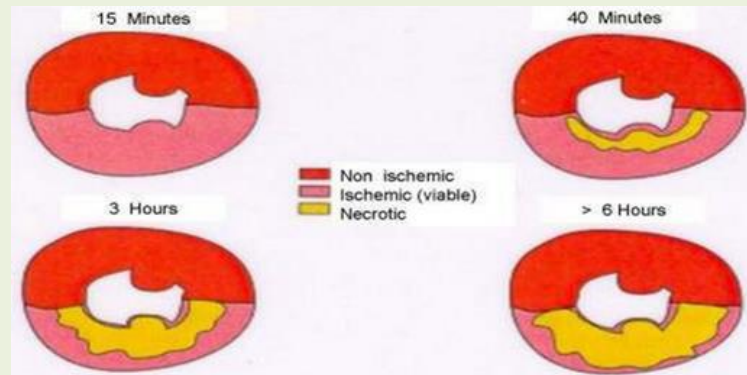
2. **caratteristiche anatomopatologiche**

Caratteristiche anatomopatologiche

MI è dato da morte cellulare miocardica dovuta ad **ischemia** che si prolunga per almeno 20 minuti.

Il tempo per la **necrosi completa**, generalmente 2-4 h, dipende da:

- circolo collaterale
- sensibilità dei miociti alla ischemia
- occlusione persistente o intermittente dell'arteria coronarica.



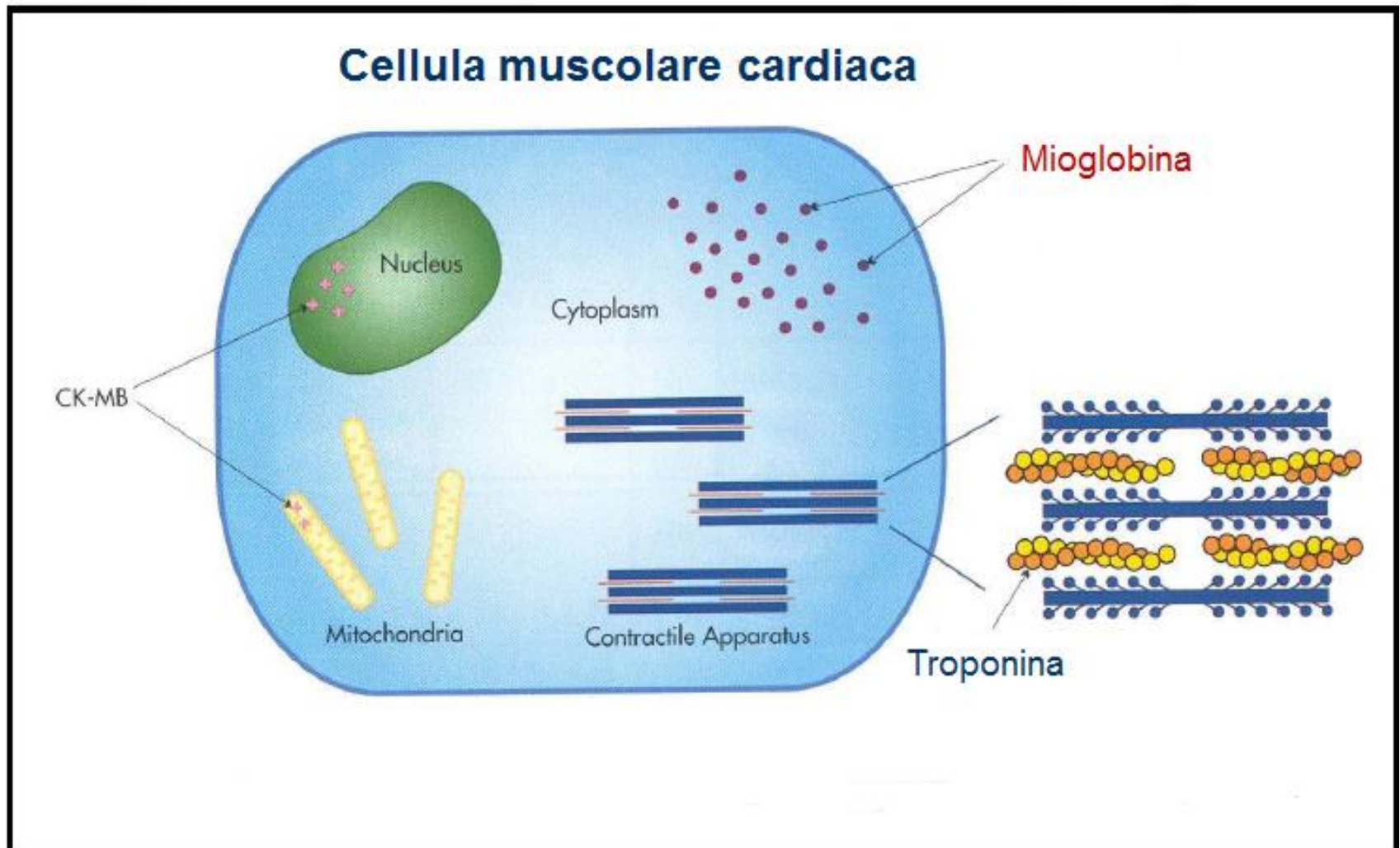
Il successivo processo di **cicatizzazione** dura 5-6 settimane.

Definizione di MI

Biomarcatori sempre più sensibili e specifici per il tessuto miocardico consentono di rilevare piccolissime quantità di tessuto miocardico danneggiato o necrotico.

Nella classificazione del tipo di MI è necessario differenziare le varie condizioni che causano MI “spontaneo” o “connesso a procedure”.

Localizzazione cellulare dei marcatori cardiaci

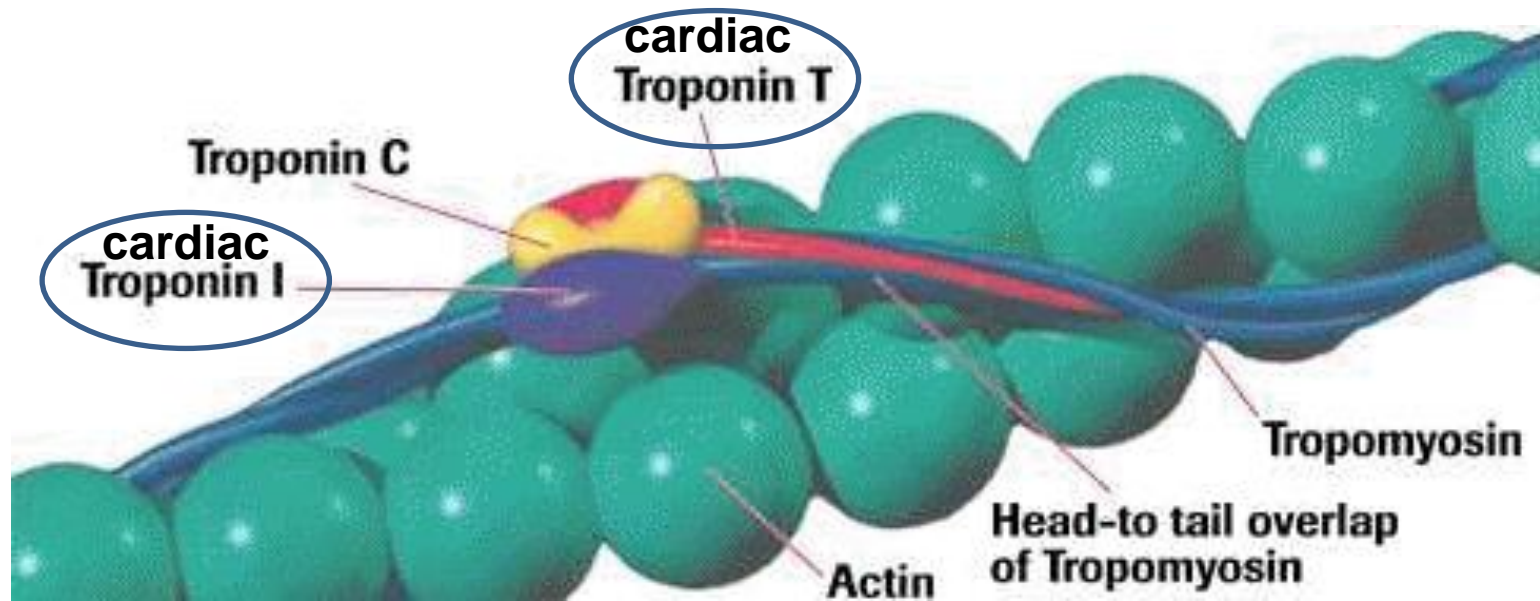


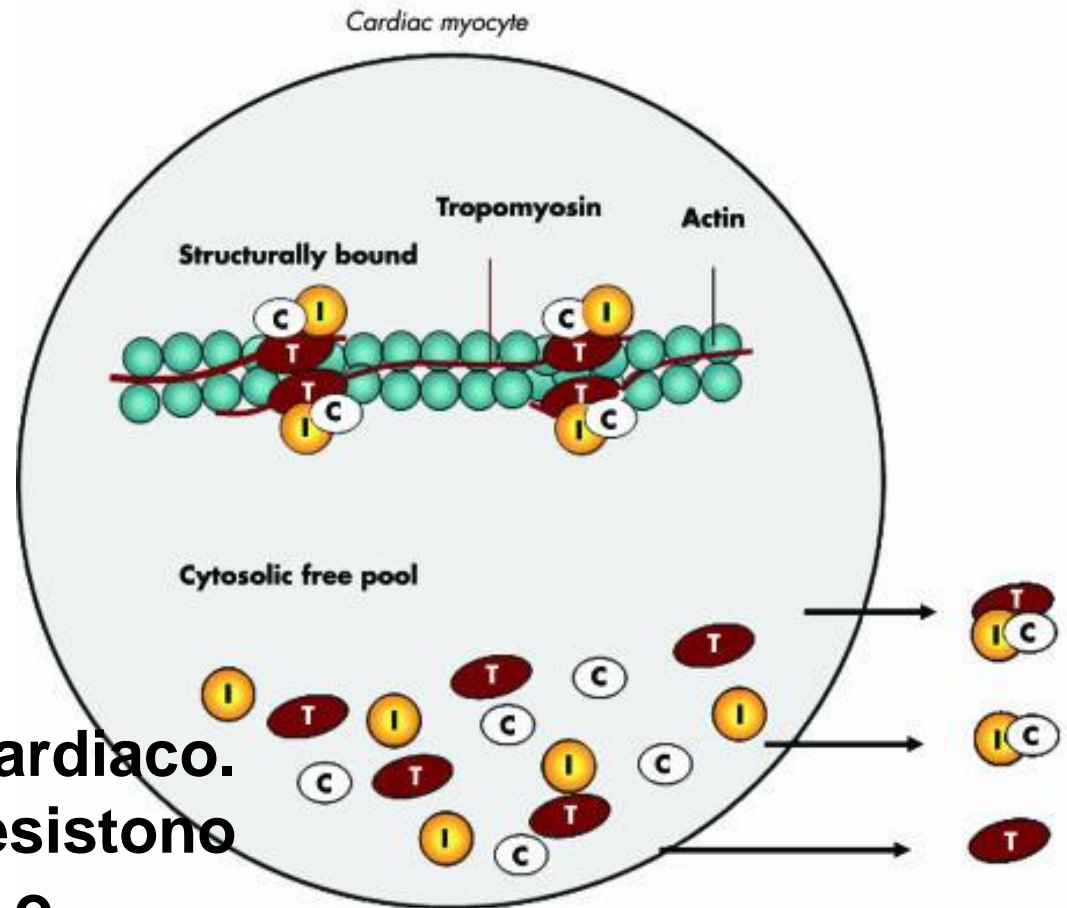
Rilevamento di danno e necrosi miocardica con biomarcatori

Il danno miocardico viene rilevato quando aumentano i livelli ematici di biomarcatori sensibili e specifici.

Le **troponine cardiache I e T** sono componenti dell'apparato contrattile delle cellule miocardiche e sono espresse quasi esclusivamente nel cuore.

Le **Troponine cardiache I e T** sono codificate da geni espressi esclusivamente nelle cellule miocardiche





**Filamento miofibrillare cardiaco.
Le troponine cardiache esistono**

- **strutturalmente legate o**
- **in un pool libero citosolico.**

Le cTn vengono rilasciate dai miociti in

- **forme complessate e**
- **forme libere.**

Il rilascio delle proteine strutturali dei miociti avviene per:

- normale turnover dei miociti,
 - apoptosi,
- rilascio di prodotti di degradazione cellulare,
 - aumento della permeabilità cellulare,
 - necrosi dei miociti.

Indipendentemente dalla biopatologia

La **necrosi miocardica** dovuta ad **ischemia** è designata come **infarto miocardico - MI**.

Tuttavia esistono anche **condizioni cliniche associate a danno miocardico non-ischemico**, qui elencate:

Scompenso cardiaco

Insufficienza renale

Aritmie

Embolia polmonare

Procedure coronariche percutanee o chirurgiche non-complicate

.

INFARTO O DANNO MIOCARDICO

Procedure
cardiache

Procedure non-
cardiache

Danno
miocardico

Infarto
miocardico

Tachi-bradi-
aritmie

Scompenso
cardiaco

Insufficienza
renale

Danno miocardico
con morte cellulare
evidenziata da
aumento di cTn

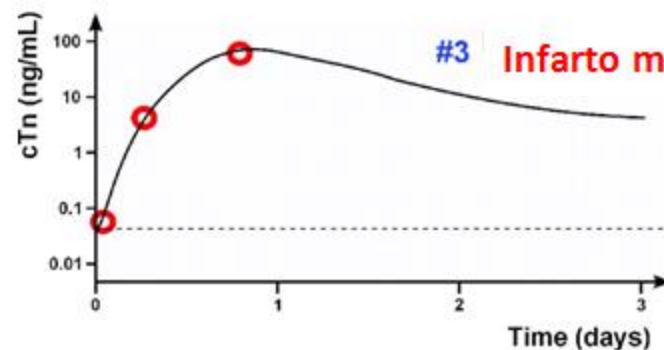
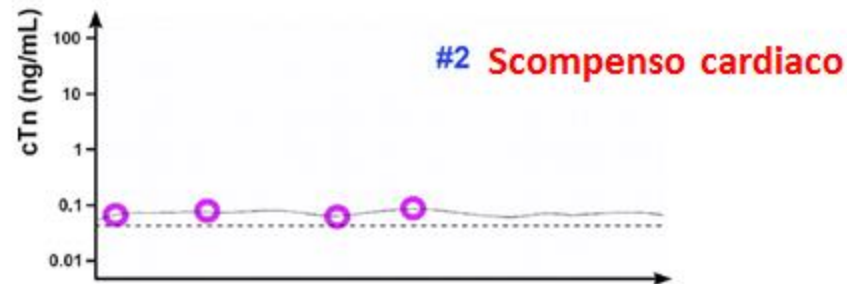
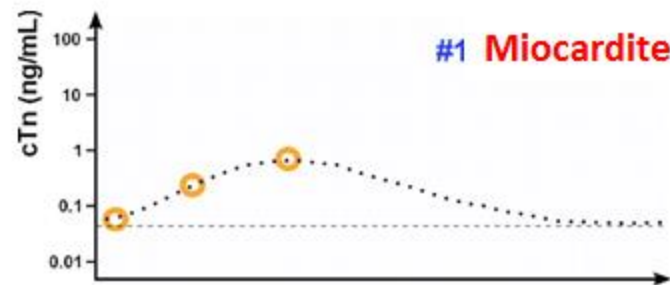
Evidenza clinica di
ischemia
miocardica acuta
con crescita e calo
di cTn

Bisogna distinguere

una causa acuta di **aumento di cTn**, che richiede una **salita e/o calo** dei valori, che caratterizza MI,

da aumenti **cronici, stabili**, dovuti a danno miocardico

Cinetica della cTnI plasmatica in casi paradigmatici



Il cutoff 40 ng/L è indicato dalla linea orizzontale tratteggiata

Vinay S. Mahajan, and Petr Jarolim *Circulation*. 2011;124:2350-2354

La troponina cardiaca I o T (cTnI o cTnT) è il biomarcatore **raccomandato** per la elevata specificità per il tessuto miocardico e per la elevata sensibilità clinica.

Livello decisionale

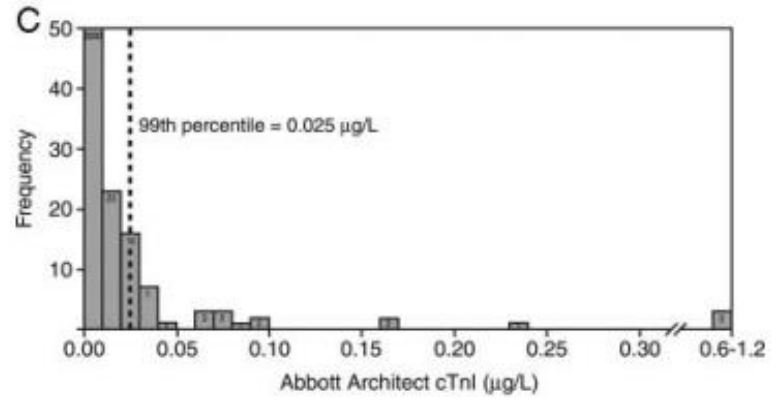
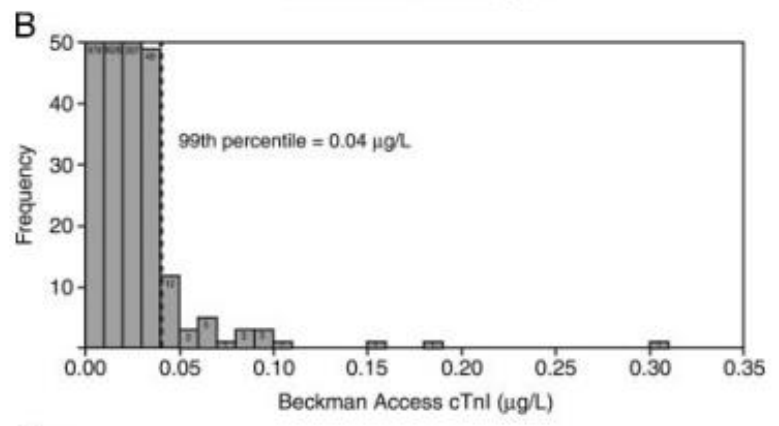
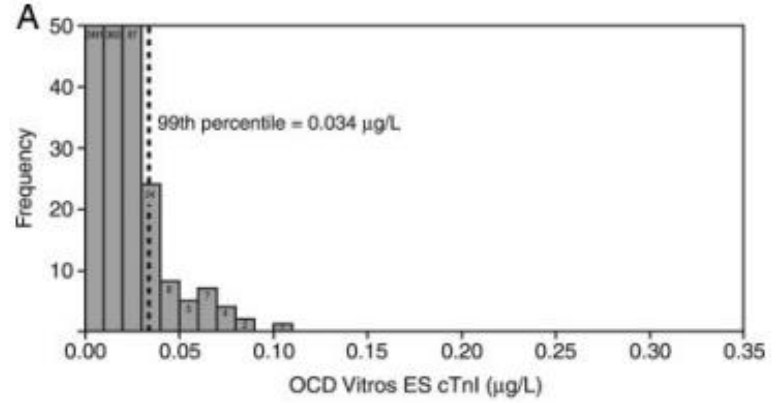
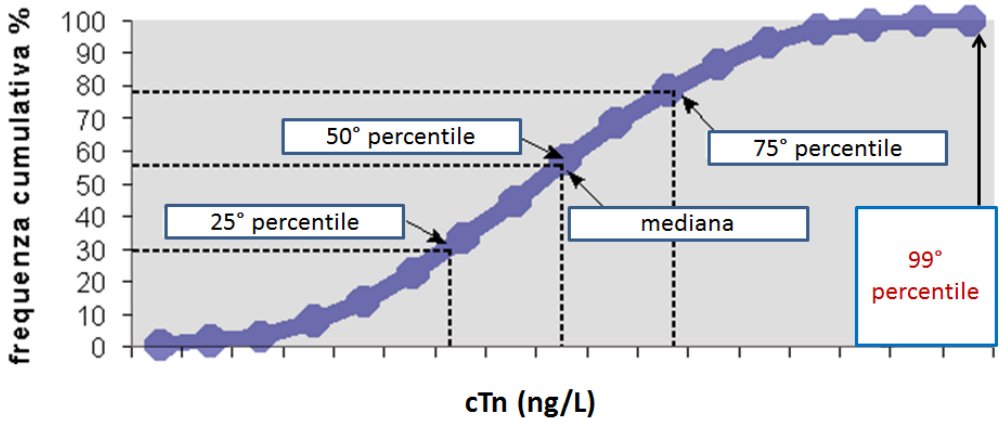
I criteri sono stati definiti dalla *Global Task Force for the Third Universal Definition of Myocardial Infarction*

Valore **>99° percentile** di una popolazione normale di riferimento in buona salute.

Deve essere determinato **per ogni specifico dosaggio in ciascun laboratorio** con metodo sotto controllo.

In alternativa il valore è tratto dai dati della **letteratura** qualificata che hanno impiegato il

medesimo sistema analitico. **Valori ripartiti per**



Distribuzione percentile (a destra) e 99° percentile dell'URV per tre dosaggi di TnI di 2° generazione.

Come fanno gli studi a definire **un individuo "normale" per l'arruolamento in uno studio di riferimento?**

Ad oggi, non esistono linee guida chiare. Ottenere un valore corretto del 99 ° percentile per troponine ad alta sensibilità (hs) è particolarmente importante per

- la classificazione appropriata del MI nella cura del paziente,
 - per gli studi clinici,
- per la valutazione prognostica dei pazienti che si presentano al pronto soccorso con sindrome coronarica acuta ed eventi non ischemici.
- Per la prevenzione primaria, in cui le troponine cardiache potranno essere utili in futuro.

Definizione della normalità

Il documento CLSI per Definire, Stabilire, e Verificare gli intervalli di riferimento nel laboratorio clinico (EP28-A3c) fornisce una guida.

Tuttavia la selezione di soggetti "normali" nei diversi studi è molto variabile, riscontrandosi, in qualità crescente:

- una mancata definizione di come i soggetti normali sono stati selezionati,
- la utilizzazione di questionari sulla salute o alla presa in visione delle caratteristiche cliniche di base,
- l'uso di metodi di screening utilizzando biomarcatori ematici surrogati, cioè:
 - la glicemia a digiuno o HbA1c (diabete),
 - creatinina (funzionalità renale),
 - NT -ProBNP (disfunzione miocardica),
- L'uso di elettrocardiogramma, ecocardiografia e spirometria

La disfunzione miocardica

Nello studio PIVUS (Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors) il 99 ° percentile cTnI nella coorte complessiva era 44 ng/L, ma si riduceva a 28 ng/L nei soggetti sottoposti a screening per anomalie di NT-proBNP (uomini, < 210 ng/L, donne, < 250 ng/L), malattie cardiovascolari, ipertrofia ventricolare sinistra, e anomalie elettrocardiografiche. Tuttavia questo tipo di approccio di screening presenta costi proibitivi.

La funzione renale

Nello studio di Collinson et al., l'inclusione, dopo il questionario iniziale, della velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) > 60 ml/min/1,73m² aveva un maggiore effetto sulla diminuzione del 99 ° percentile per la cTnT, ma non per cTnI. Gli autori conclusero che questo risultato era atteso, perché **la cTnT circolante è più sensibile alle variazioni di eGFR.**

Caratteristiche cliniche comunemente utilizzate tramite questionari per definire un gruppo di riferimento

Cardiopatìa

Malattia coronarica
Scompenso cardiaco
Precedente rivascolarizzazione

Ipertensione

Tumori

Dislipidemia

Patologie della tiroide

Malattia renale

Ospedalizzazione recente

Gravidanza

Alterato BMI >35 o <18

Presenza di raffreddore o infezioni

Malattie sistemiche

Vasculopatie

Precedente stroke

Malattie infiammatorie croniche

Diabete mellito

Abuso di tabacco

Farmaci cardioattivi

Abuso d'alcol

**Caratteristiche cliniche comunemente utilizzate tramite
biomarcatori surrogati
per definire un gruppo di riferimento**

Elettroliti	Hb
Urea	Leucociti
Creatinina con stima della funzione renale (eGFR)	Piastrine
Calcio	Ferro, Transferrina, Ferritina
Colesterolo totale, LDLc, Trigliceridi, HDLc	
Albuminuria	
HbA1c, Glicemia a digiuno	
NT-proBNP	
Fosfati	
Enzimi epatici	

**Caratteristiche cliniche comunemente utilizzate tramite
vari test
per definire un gruppo di riferimento**

Ecocardiografia da stress

Ecocardiogramma

Frazione di eiezione
Massa ventricolare sinistra
Rigurgito valvolare
Stenosi valvolare
Parametri distolici

Elettrocardiogramma

Frequenza cardiaca

Pressione arteriosa

Esame obiettivo

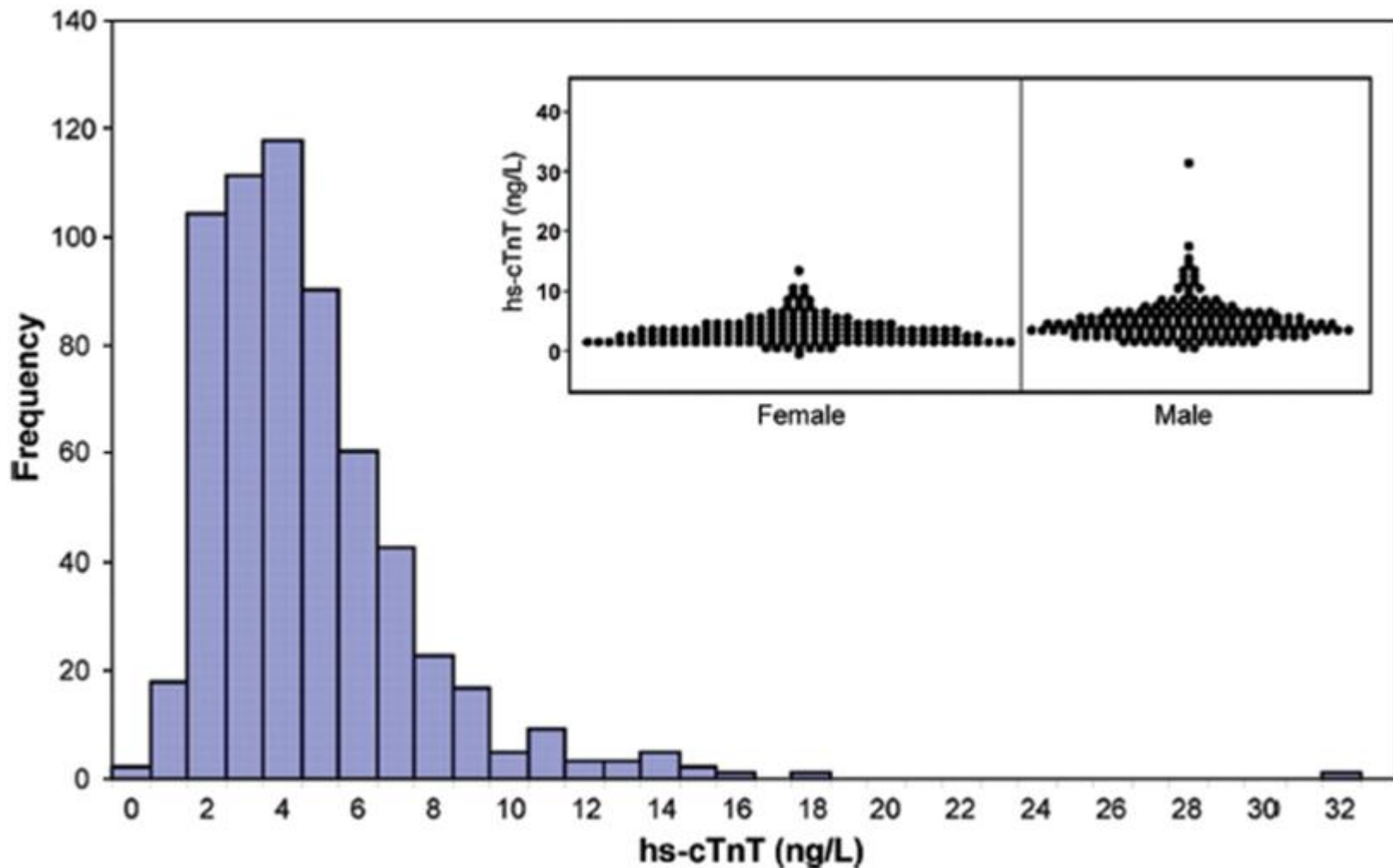
Peso, altezza

Spirometria

Il sesso

Diversi studi hanno dimostrato differenze nel 99° percentile tra gli uomini e le donne, che, se considerate, danno la possibilità di misurare le concentrazioni di hscTn al di sopra del limite di rilevazione (LOD) del test nel 50% dei soggetti normali partecipanti allo studio.

Per i dosaggi di hscTn, **il 99° percentile sesso-specifico** dovrà essere determinato e indicato per l'uso clinico.



Distribuzione di (hs)-cTnT in una popolazione di riferimento.

Il 99° percentile dell'intera popolazione era 13,5 ng/L.

Gli inserti mostrano le distribuzioni separate di uomini e donne, dove il 99° percentile era più elevato negli uomini, rispetto alle donne (14,5 ng/L e 10,0 ng/L, rispettivamente)

L'età

Alcuni studi hanno evidenziato un **aumento progressivo** di cTnI con l'aumentare dell'età sia per gli uomini che per le donne.

Resta da stabilire se saranno necessari 99° percentili età-specifici per decennio. La difficoltà di reclutamento di individui sani in età superiore ai 60 anni rimane una sfida, e il biomarcatore cTn stesso è spesso lo strumento più sensibile per rilevare patologie cardiache silenti comuni in questa fascia di età.

Siero, plasma, o sangue intero

Le linee guida CLSI / IFCC per la determinazione del valore di riferimento forniscono dettagli dal punto di vista di laboratorio su come i campioni devono essere raccolti (sangue intero, plasma o siero), gestiti, e conservati.

Poiché i valori del 99 ° percentile **possono variare in base al tipo di campione**, è importante indicarne il tipo di utilizzato.

Numero di individui di riferimento

Il numero minimo di persone di riferimento necessarie per il 99 ° percentile è **300**, secondo le raccomandazioni **IFCC Task Force**. Nel 2010, la **Società Europea di Cardiologia** indica che un campione di almeno **300 persone per gruppo** è necessario per raggiungere una probabilità (intervallo di confidenza, CI) del 95% che almeno il 99% della popolazione normale sia al di sotto del valore di cTn osservato.

Nel 2012 il IFCC WG-TNI (**Gruppo di lavoro sulla standardizzazione della Troponina I**) concordò per un campione di almeno **300 individui per sesso ed età** per ottenere la probabilità del 95% che almeno il 99% della popolazione sia

Raccomandazioni delle variabili da considerare per definire una popolazione normale di riferimento per determinare il 99° percentile di cTn

Storia clinica per malattie cardiovascolari e uso di farmaci

Marcatori surrogati di diabete

Marcatori surrogati di disfunzione miocardica

Marcatori surrogati di disfunzione renale

Diagnostica per Immagine (se finanziariamente possibile)

Popolazione diversificata di numerosità sufficiente

Minimo 300 uomini e 300 donne
Diversità di razza/etnia con 40% bianchi,
40% africani,
20% asiatici

Diversa distribuzione di età da 18 a 70 anni

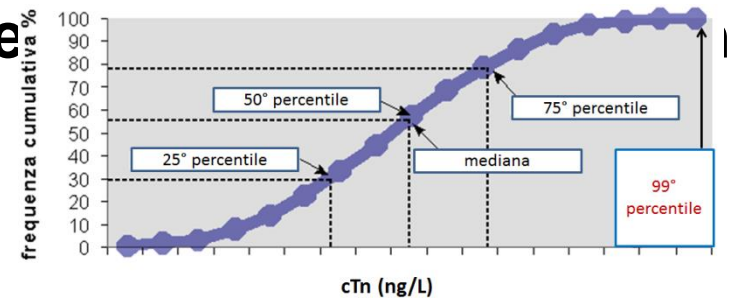
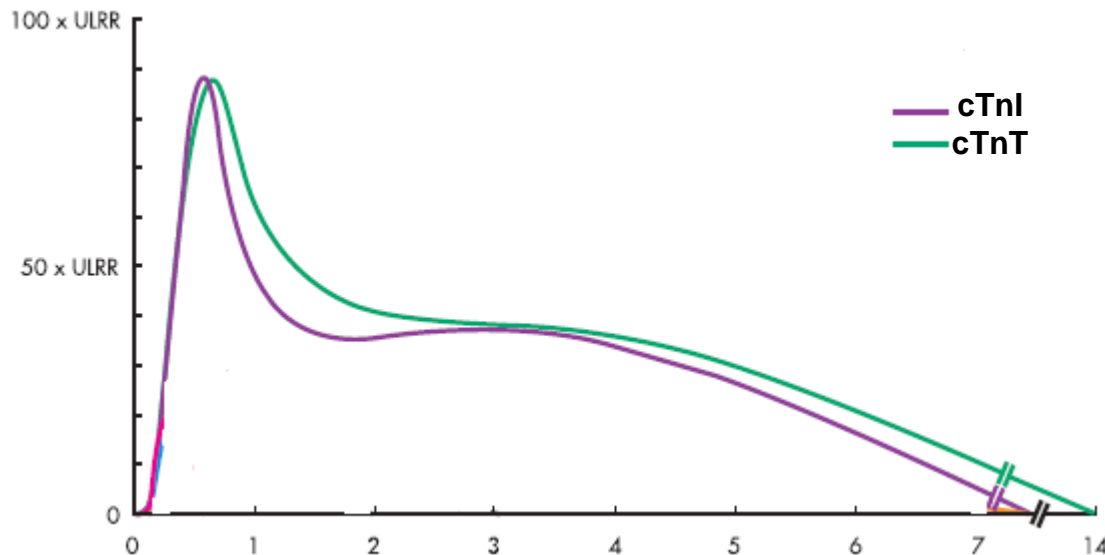
Sangue intero, siero, plasma

Troponina cardiaca I o T (cTnI, cTnT)

- **specificità pressoché assoluta** per il tessuto miocardico
- **elevata sensibilità** diagnostica per dosaggi ad alta sensibilità hscTn

Il valore è **aumentato quando supera** il valore di riferimento di un gruppo di controllo di riferimento.

Diminuisce elevato per 7-10 giorni!



I valori vanno **refertati** in **ng/L** o **pg/mL** a numero intero.

I criteri per la crescita dei valori di cTn sono definiti dal profilo di precisione di ciascun dosaggio.

La **precisione ottimale** come coefficiente di variazione (CV) all' URL del 99° percentile dovrebbe essere $\leq 10\%$.

- Una **migliore precisione** (CV $<10\%$) è appannaggio dei dosaggi più sensibili e facilita l'identificazione della variazione dei valori.
- Con dosaggi senza precisione ottimale è più difficile determinare un cambiamento significativo.
- Non si devono usare dosaggi con CV $>20\%$ all'URL

Panoramica dei biomarcatori cardiaci

Manufacturer	System	Assay	LoD (ng/l)	LoB (ng/l)	99th percentile (ng/l) ^a	CV at 99th percentile ^a	Turnaround time (minutes) ^a	CE marked
Abbott Diagnostics	ARCHITECT	STAT hs-cTnI	1.1 to 1.9	0.7 to 1.3	26.2	4%	16	✓
Beckman Coulter	Access and UniCel Dxl	AccuTnI+3	10	<10	40.0	<10%	13	✓
Roche	Elecsys	cTnT-hs	5	3	14	<10%	18	✓
Roche	Elecsys	cTnT-hs STAT	5	3	14	<10%	9	✓

LoD = limite di rilevamento

LoB = limite del bianco

Informazioni fornite dal produttore al National Institute for Health and Care (NICE)

Timing:

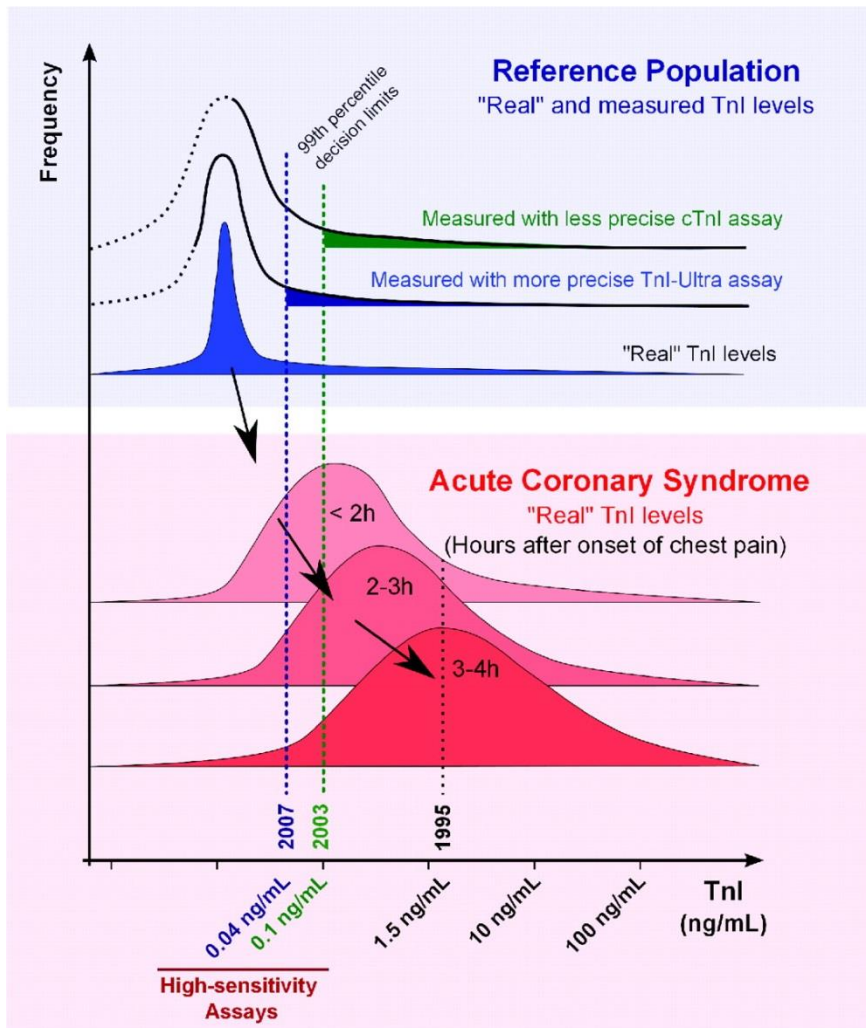
I campioni per cTn vanno raccolti al primo accertamento e ripetuti 3-6 h dopo. Ulteriori campioni sono richiesti se compaiono ulteriori episodi ischemici o quando non è chiaro il momento dell'inizio dei sintomi.

Crescita e/o calo dei valori:

E' richiesto per la diagnosi di MI e con **almeno un valore sopra il livello decisionale**, in associazione a forte predittività pre-test (pre-test likelihood) cioè prevalenza:

$$\text{Probabilità pre-test} = \frac{(\text{veri positivi} + \text{falsi negativi})}{\text{totale}}$$

Valori di cTnI nella popolazione di riferimento e in una popolazione con ACS



Vinay S. Mahajan, and Petr Jarolim *Circulation*.
2011;124:2350-2354

In alto, istogrammi di frequenza di livelli TnI reali (blu pieno) nei controlli di riferimento sani e la distribuzione degli stessi livelli misurata con dosaggio meno preciso cTnI (verde) e più preciso (blu). In pratica, i valori al di sotto della soglia di sensibilità del test (porzioni tratteggiate dell' istogramma) non possono essere distinti l'uno dall'altro. Nota come i limiti decisionali del 99° percentile diminuiscono con l'aumento della precisione del dosaggio.

In basso, istogrammi di frequenza ipotetici delle concentrazioni di cTnI in soggetti con ACS <2, 2-3, o da 3 a 4 ore dopo l'insorgenza dei sintomi. I limiti decisionali (linee verticali tratteggiate) per i moderni test cTnI ad alta sensibilità sono basati sul 99° percentile della popolazione sana di riferimento.

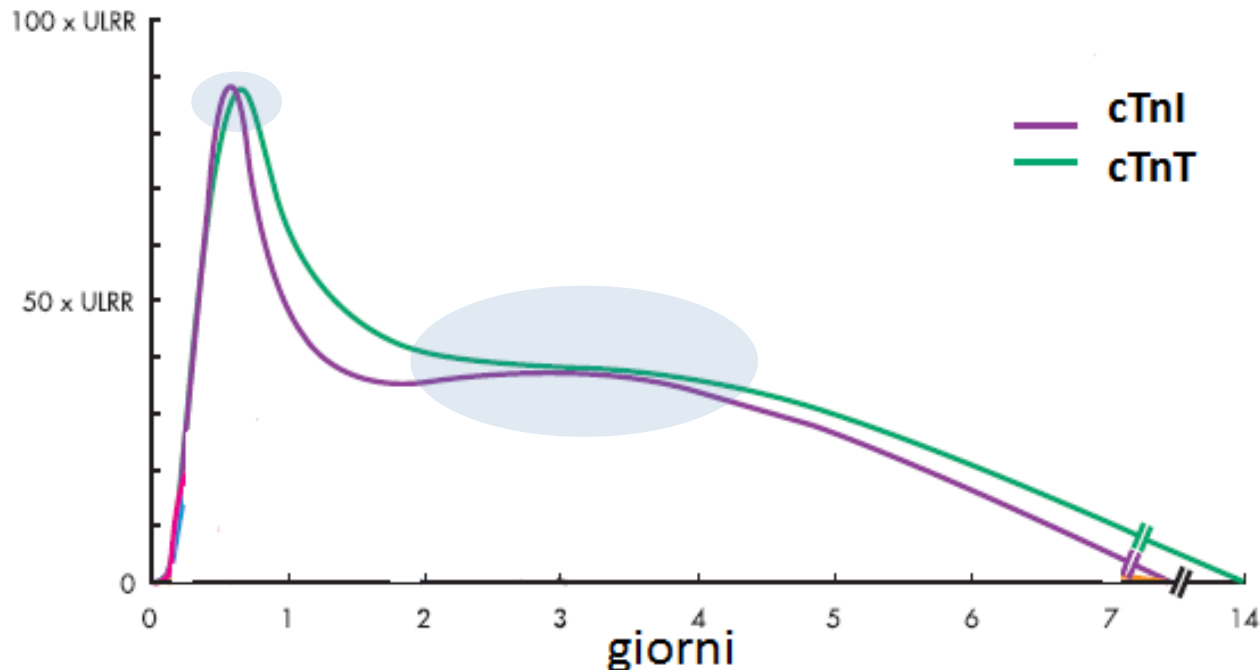
Nota l'impatto della riduzione dei cutoff diagnostici dei recenti test cTnI sulla frazione di infarti miocardici acuti

Il pattern di crescita e/o calo non è necessario per porre diagnosi di MI in caso di **pazienti con elevato rischio pre-test di MI che si presentano tardi dopo la comparsa dei sintomi;**

Ciò quando è problematico rilevare il pattern di crescita e/o calo.

Per esempio (indicati dalle aree azzurre):

- *vicino al picco della curva di concentrazione nel tempo*
- *nella porzione del lento declino. I valori rimangono elevati sino a :*

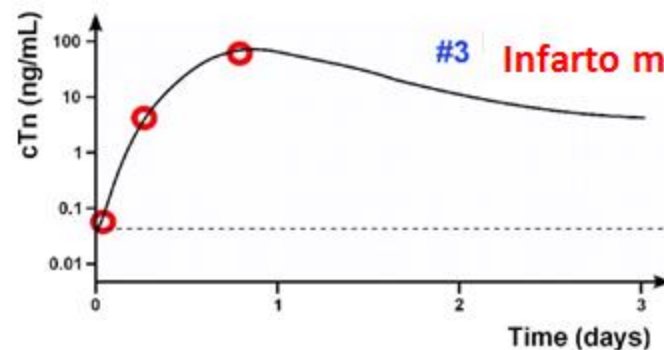
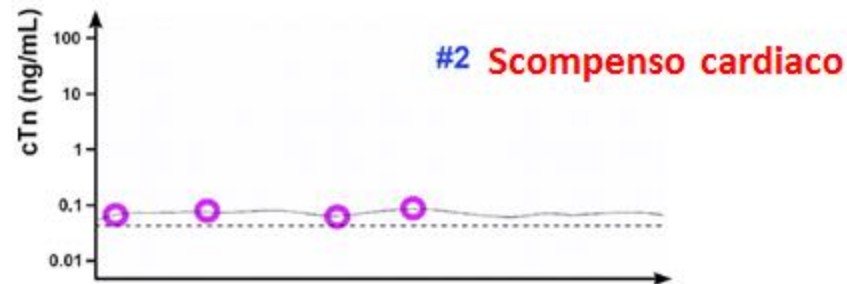
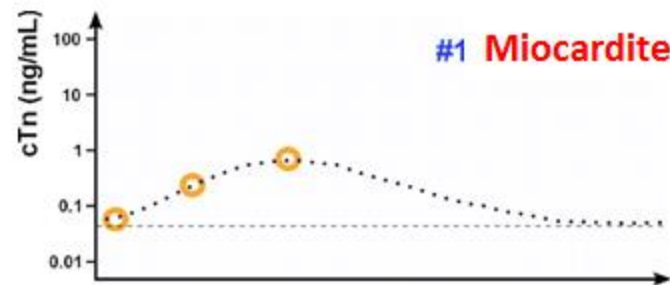


Un valore elevato di cTn (>99° percentile URL) senza evidenza clinica di ischemia

induce a ricercare una delle diagnosi associate a danno miocardico, quali:

- miocardite
 - dissezione aortica
 - embolia polmonare
 - scompenso cardiaco
 - Insufficienza renale

Cinetica della cTnI plasmatica in casi paradigmatici



Il cutoff 40 ng/L è indicato dalla linea orizzontale tratteggiata

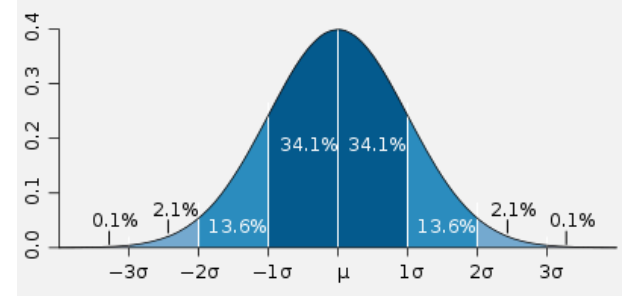
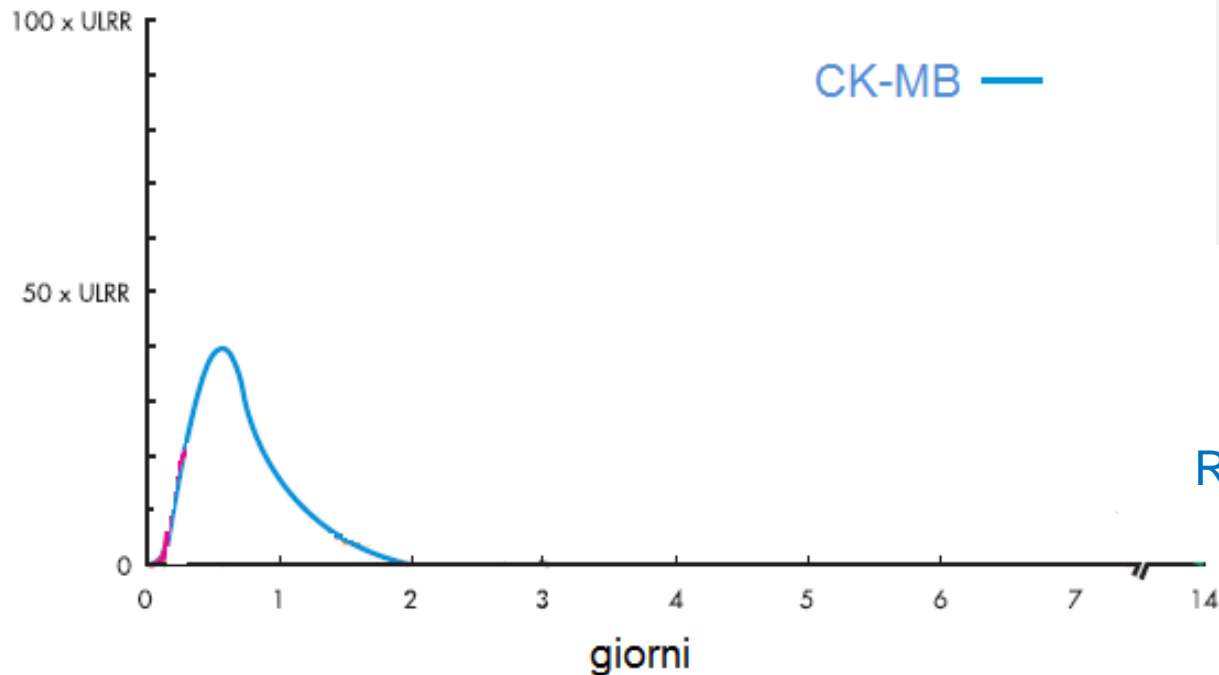
Vinay S. Mahajan, and Petr Jarolim *Circulation*. 2011;124:2350-2354

CKMB massa

Se il laboratorio non dispone del dosaggio della cTn la migliore alternativa era il CKMB massa.

Come per la troponina, un valore aumentato di CKMB era definito da una misura superiore al 99° percentile URL, che rappresentava il livello decisionale per MI.

Bisognava utilizzare valori ripartiti per sesso.



Rimane elevato per 2-4 giorni

Creatine Kinase-MB

The Journey to Obsolescence

Gurmukh Singh, MD, PhD, MBA,^{1,2,3} and Paramdeep S. Baweja, MD²

From the ¹School of Medicine, University of Missouri-Kansas City, Kansas City; ²Truman Medical Center, Kansas City, MO; and ³Heritage Labs International, Olathe, KS.

Am J Clin Pathol 2014;141:415-419

Obiettivi: valutare l'utilità clinica e la richiesta del test creatina chinasi (CK)-MB. **Metodi:** Abbiamo esaminato il numero di test CK-MB dal 2007 al 2013 mentre ne scoraggiavamo l'uso. Dapprima il CK-MB venne rimosso dal pannello della sindrome coronarica (ACS) e poi dal menu principale, e osservammo le richieste del test. Abbiamo anche esaminato le cartelle cliniche dei pazienti per valutare l'appropriatezza del suo utilizzo. **Risultati:** Dopo la rimozione di CK-MB dal pannello di ACS, il volume delle richieste scese da circa 12.000 a circa 150 euro all'anno. Nel rivedere le cartelle cliniche di 171 pazienti che avevano effettuato la determinazione CK-MB lungo un periodo di 28 mesi, scoprimmo che CK-MB aveva contribuito alla diagnosi solo in un paziente, anche se non era essenziale. Dopo la rimozione di CK-MB nel menu di laboratorio, due test CK-MB sono stati ordinati in 4 mesi, senza dare valore aggiunto.

Conclusioni: CK-MB non aggiunge valore alle informazioni già disponibili con la misura della troponina

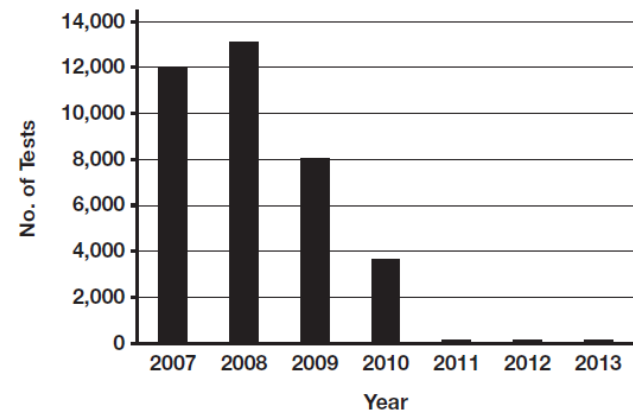


Figure 1 The creatine kinase (CK)-MB test volume from 2007 through 2013. The numbers for 2013 are extrapolated from the first 4 months. CK-MB was not on the acute coronary syndrome (ACS) panel for portions of 2009 and 2010 and not on the ACS panel in 2011 through 2013.

Table 1
Yearly Volumes for Creatine Kinase-MB Tests

	Year						
Volume	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013 ^a
Total	12,057	13,111	8,063	3,849	143	159	36

^a The number for 2013 is for the first 4 months of the year only.

Table 2
Results of the College of American Pathologists Cardiac PT Survey, 2013 CAR-B^a

Assay	No. of Participating Laboratories
Troponin I	1,703
Troponin T	292
Total troponin	1,995
CK-MB	1,528
Gap, (Troponin) - (CK-MB), No. (%)	437 (23.4)

^a Around 23% fewer laboratories participated in the creatine kinase (CK)-MB proficiency testing (PT) than for troponin PT. The ~23% gap in the number of laboratories participating in troponin vs CK-MB may be an overestimate of the number of laboratories that have discontinued CK-MB testing for acute coronary syndrome since some of the PT may be for point-of-care testing sites.

Caratteristiche cliniche dell'ischemia in MI

L'ischemia miocardica

- è la **tappa iniziale** nello sviluppo del MI
- deriva da uno **sbilanciamento tra fornitura e richiesta di ossigeno**
- viene **identificata da:**
 - **storia del paziente**
 - **alterazioni ECG.**

Sintomi d'ischemia

varie combinazioni di dolore al torace, alle estremità superiori, alla mandibola o all'epigastrio (sotto sforzo o a riposo) o equivalenti ischemici come dispnea o affaticamento. Il disturbo **dura generalmente 20 min**, è **diffuso** ed è accompagnato da sudorazione, nausea o sincope.

Classificazione Clinica di MI



In virtù delle strategie terapeutiche immediate (riperfusion), è prassi designare come:

- **MI con elevazione ST** ['ST elevation MI' (**STEMI**)] quello che compare nei pazienti con sintomi d'ischemia che sviluppano all'ECG elevazione ST in almeno due derivazioni contigue.
- **MI senza elevazione ST** ['non-ST elevation MI' (**NSTEMI**)].

Molti pazienti con MI sviluppano onde Q (**MI con onda Q**), ma non tutti.

I pazienti senza valori elevati di biomarcatori vengono diagnosticati come angina instabile [unstable angina (**UA**)].

In aggiunta a queste categorie, MI è classificato in vari tipi, in base a differenze patologiche, cliniche e

TIPO 1: MI spontaneo

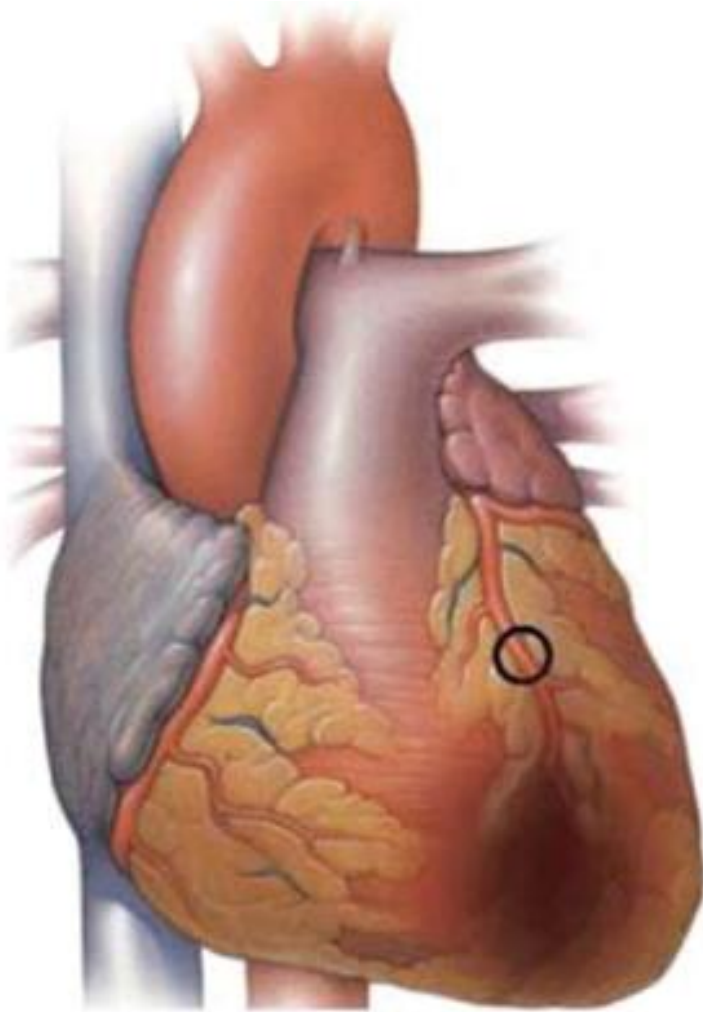
È rottura, ulcerazione, fissurazione, erosione o dissezione della placca aterosclerotica con conseguente **trombo intraluminale** in una o più arterie coronarie che porta a ridotto flusso sanguigno miocardico o emboli piastrinici distali con conseguente necrosi dei miociti.

TIPO 2: MI secondario a sbilanciamento ischemico

Nei casi in cui una condizione diversa da CAD porta allo **sbilanciamento tra apporto e richiesta di ossigeno**: disfunzione dell'endotelio coronarico, spasmo arterioso coronarico, embolia coronarica, tachi/bradi-aritmie, anemia, insufficienza respiratoria, ipotensione e ipertensione con o senza ipertrofia ventricolare sinistra (LVH).

TIPO 3: MI che porta a morte senza che siano disponibili i valori dei biomarcatori

Morte cardiaca con sintomi che suggeriscono ischemia miocardica e presumibili alterazioni ECG o nuovo blocco di branca sinistro (LBB), ma la morte avviene prima che si ottengano i campioni di sangue o prima che il biomarcatore cresca.



**Rottura di placca con
trombo**



MI Tipo 1

**Vasospasmo o
disfunzione endoteliale**



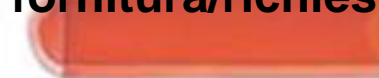
MI Tipo 2

**Aterosclerosi fissa e
sbilanciamento
fornitura/richiesta**



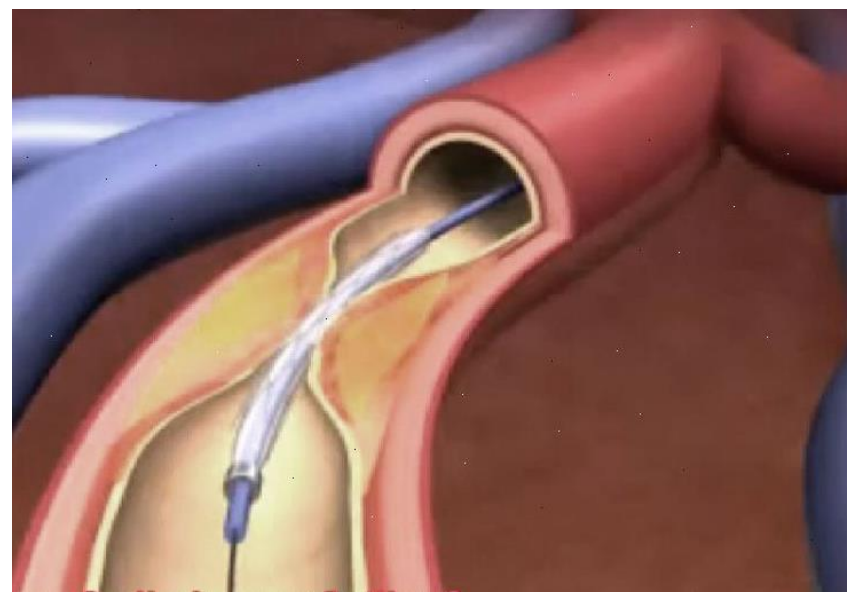
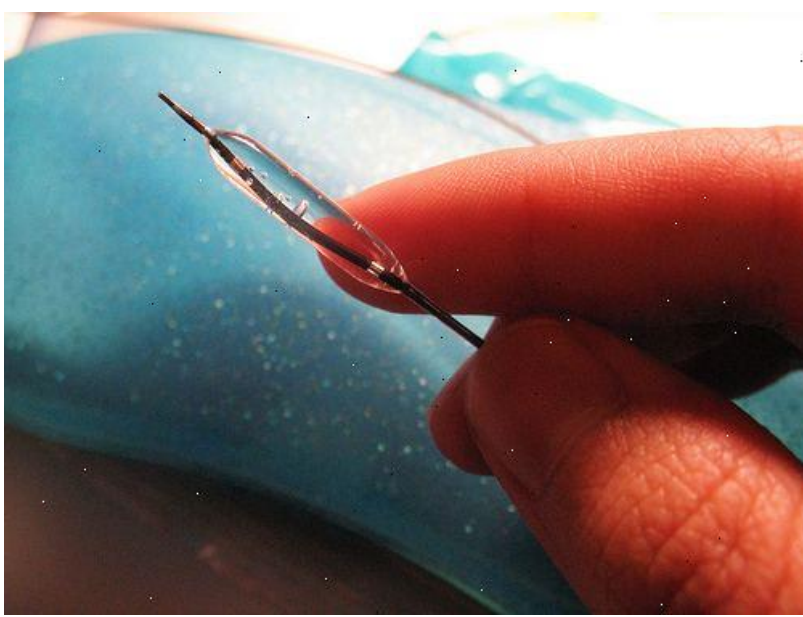
MI Tipo 2

**Solo
sbilanciamento
fornitura/richiesta**

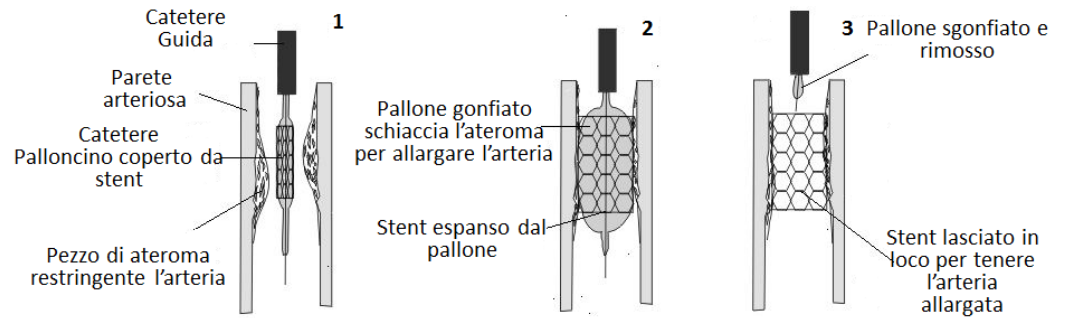
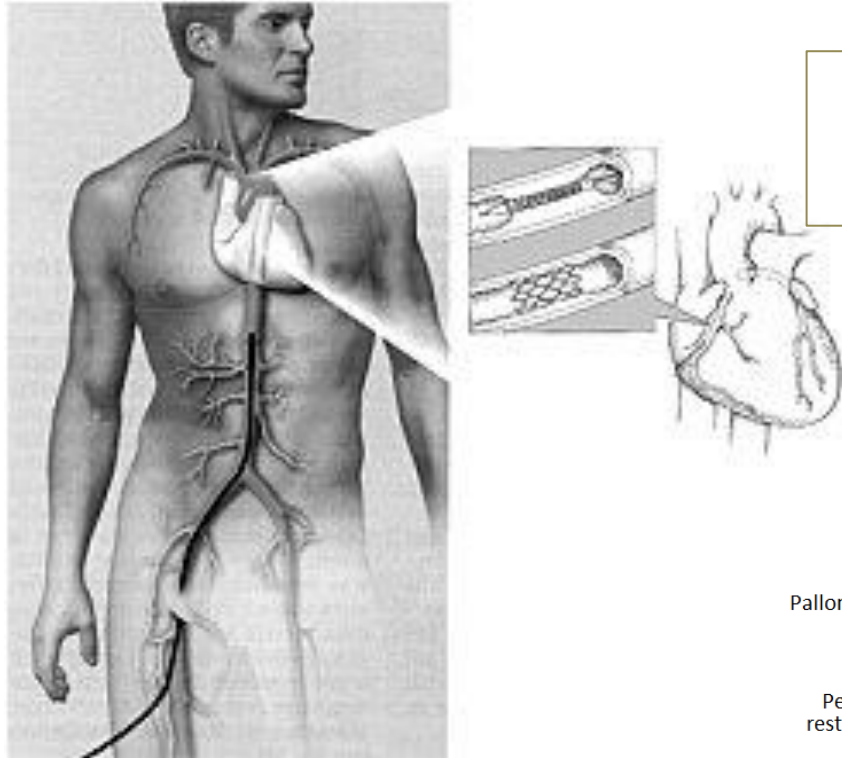


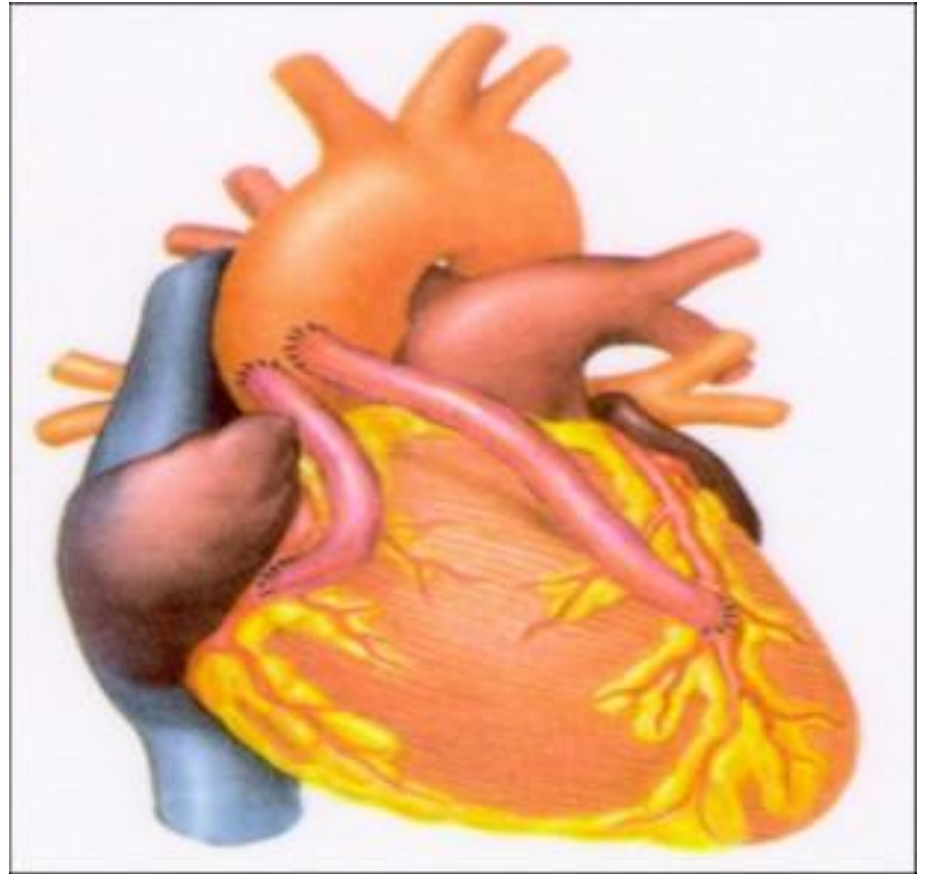
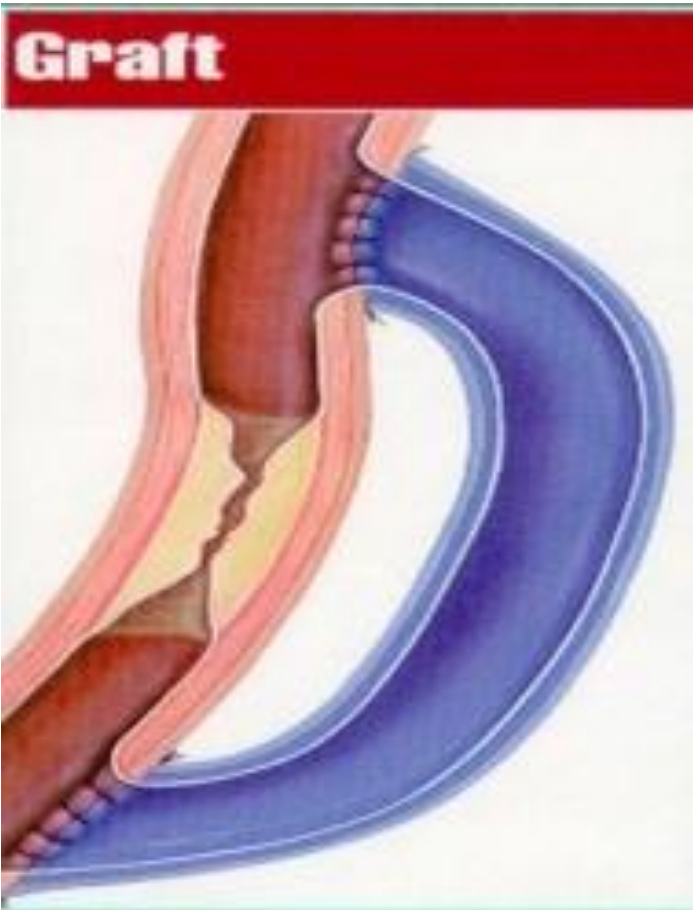
MI Tipo 2

Differenziazione tra infarto miocardico (MI) di tipo 1 e 2 secondo le condizioni delle arterie coronariche.



intervento coronarico percutaneo (PCI)





bypass aortocoronarico [coronary artery bypass grafting (CABG)]

Classificazione universale di MI

TIPO 4a: MI relativo a intervento coronarico percutaneo (PCI)

Aumento (arbitrario) dei valori di cTn $>5 \times 99^{\circ}$ percentile URL in pazienti con valori basali normali ($< 99^{\text{th}}$ percentile URL) o un aumento $> 20\%$ con i valori basali elevati, sia stabili che in calo.

In aggiunta devono esserci o

- 1) **sintomi** d'ischemia miocardica oppure
- 2) nuove alterazioni **ECG** ischemiche o nuovo LBBB oppure
- 3) perdita di pervietà **angiografica** di un'arteria coronarica principale o del circolo collaterale o flusso peristentemente basso o non-flusso o embolizzazione oppure
- 4) **imaging** che evidenzia una nuova perdita di miocardio vitale o una nuova area di alterata motilità della parete.

TIPO 4b: MI relativo a trombosi dello stent

Si rileva con l'**angiografia** coronarica o all'**autopsia** nella condizione d'ischemia miocardica e con **crescita e/o calo** dei valori dei biomarcatori cardiaci **con almeno un valore $> 99^{\circ}$ percentile URL.**

TIPO 5: MI relativo a bypass aortocoronarico [coronary artery bypass grafting (CABG)]

Elevazione (arbitraria) di cTn $>10 \times 99^{\circ}$ percentile URL nei pazienti con valori basali normali ($< 99^{\circ}$ percentile URL). In aggiunta devono esserci o

- 1) all'**ECG** nuove onde Q patologiche o nuovo LBBB oppure
- 2) occlusione documentata **angiograficamente** dell'innesto o occlusione della nuova arteria coronarica oppure
- 3) **imaging** che evidenzia una perdita recente di miocardio vitale o nuova area di alterata motilità della parete.

In alcune tappe richieste durante le procedure di rivascularizzazione meccanica tramite PCI o CABG si possono verificare:

- un danno miocardico o
 - un infarto periprocedurale o
 - un nuovo infarto.
- Valori elevati di cTn si possono riscontrare a seguito di queste procedure per vari insulti che portano a **danno miocardico e necrosi.**
 - Le sottocategorie di **MI-relato a PCI** sono connesse a **trombosi dello stent e ristenoasi** che possono avvenire dopo la

Il rigonfiamento del palloncino nella PCI spesso causa **ischemia transitoria**, a volte con dolore toracico o alterazioni ST.

Un danno miocardico con necrosi può invece derivare da eventi periprocedurali , quali:

- dissezione coronarica,
- occlusione di un'arteria coronarica principale o suo ramo,
- interruzione del circolo collaterale,
- flusso basso o non riperfusione,
- embolizzazione distale,
- ostruzione microvascolare.

La embolizzazione del trombo intracoronarico o di frammenti particolati dell'ateroma non è sempre prevenibile dall'attuale terapia aggiuntiva

PCI

Nei pazienti sottoposti a PCI si esegue misura della cTn prima della procedura e dopo 3–6 h.

- Quando un valore è **<5x 99° percentile URL** dopo PCI e il **valore basale era normale** si tratta di **“danno miocardico”**.
- Quando con valore **basale normale (<99° percentile URL)**, si **riscontra un aumento > 5x 99° percentile URL** si tratta di **“infarto miocardico”**. La soglia di cTn >5x 99° percentile URL è arbitrariamente fissata su giudizio clinico e dalle società scientifiche.
- Se i **valori basali sono elevati, stabili o in discesa**, deve esserci un aumento del **20%** per la diagnosi di **“infarto miocardico”**.

TROMBOSI DELLO STENT

Quando si tratta di **trombosi dello stent**, **“MI tipo 4b”**, si

CABG

Durante CABG, numerosi fattori possono dare danno miocardio periprocedurale con necrosi:

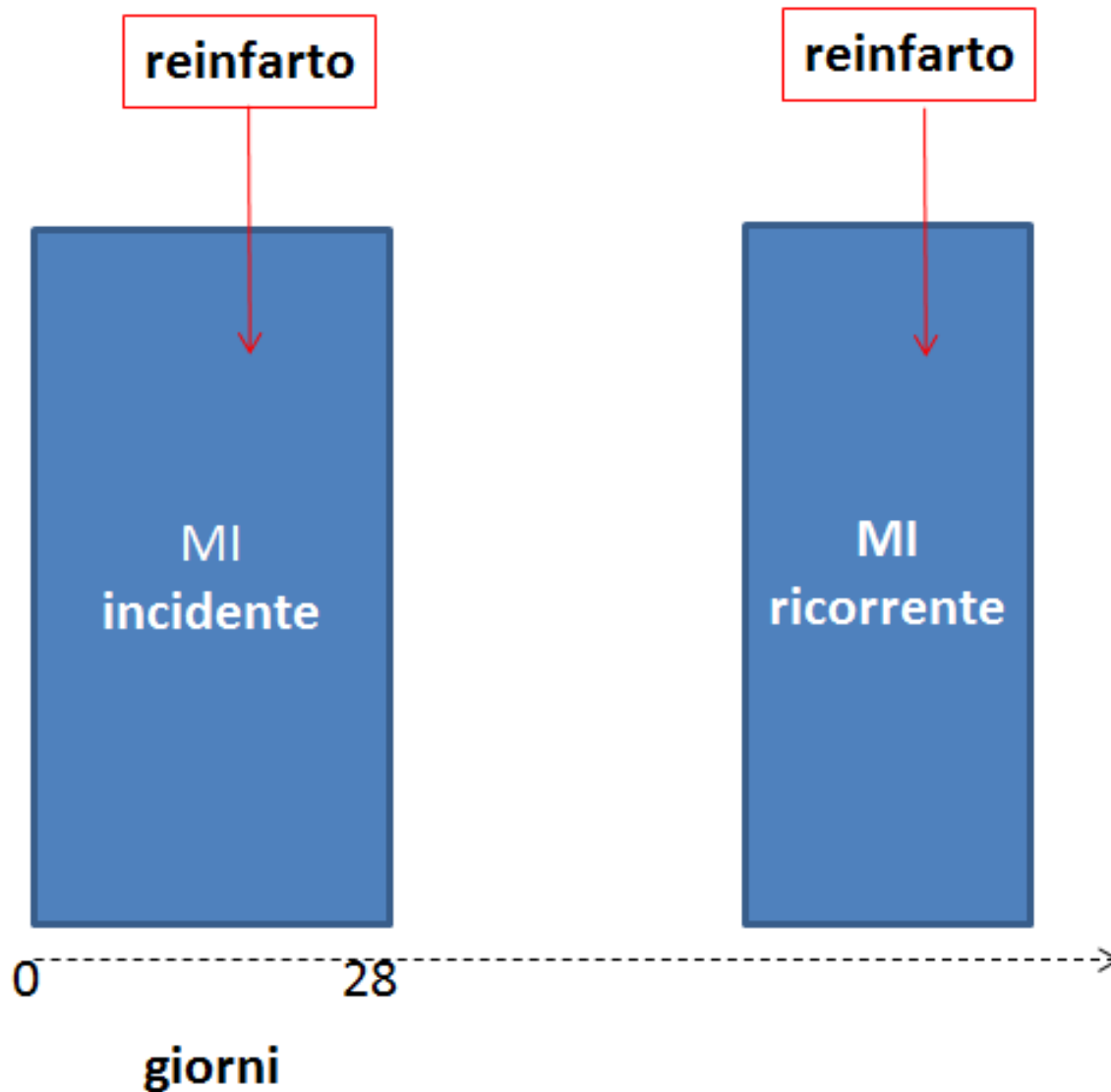
1. apposizione di sutura o manipolazione cardiaca
2. dissezione coronarica
3. ischemia da inadeguata protezione cardiaca intra-operatoria
4. eventi microvascolari da riperfusione
5. generazione di radicali liberi,
6. aree di miocardio non irrorate dai vasi trapiantati.

Nei pazienti con **valori basali normali di cTn**, qualsiasi aumento dopo CABG indica **necrosi miocardica**.

Tuttavia, nel caso di CABG i **biomarkers non supportano da soli la diagnosi di MI.**

Alla luce dell'**impatto avverso sulla sopravvivenza** nei pazienti con aumento significativo di CTn, la Task Force suggerisce, per convenzione arbitraria, valori di **cTn >10x 99° percentile URL durante le prime 48 h post-CABG**, da un **valore basale normale (<99° percentile URL)**, in aggiunta alle alterazioni all'ECG, angiografia e imaging per la diagnosi di **MI tipo 5.**

Infarto miocardico incidente, reinfarto e infarto miocardico ricorrente



Infarto miocardico ricorrente

‘MI incidente’ è definito come il primo MI di un individuo.

Quando le caratteristiche del MI compaiono nei primi 28 giorni dopo MI incidente, questo non viene considerato come nuovo evento.

Ma se le caratteristiche del MI si presentano dopo 28 giorni dal MI incidente, questo viene considerato come **“MI ricorrente”**.

Reinfarto

E' un MI acuto che compare **entro 28 giorni da un infarto incidente o ricorrente.**

Se si sospetta reinfarto dai segni clinici o dai sintomi dopo il MI iniziale, si esegue la **misura immediata di cTn**. Un secondo campione deve essere poi raccolto **dopo 3–6 h**.

- Se al momento del sospetto reinfarto la concentrazione **basale** era **elevata, stabile o in calo**, un **aumento $\geq 20\%$** nel secondo campione conferma il reinfarto.
- Se la concentrazione **basale** era **normale**, per il reinfarto si applicano i criteri di un nuovo MI acuto (**$>99^{\circ}$ percentile URL**).

«Danno o infarto miocardico associato a scompenso cardiaco (HF) ?»

Usando **cTn** ad elevata sensibilità, si trovano concentrazioni di cTn misurabili in tutti i pazienti con HF, che in percentuale significativa **superano il 99° percentile**, indicando la presenza di danno miocardico con necrosi, specie nello scompenso acuto.

Mentre MI tipo 1 è una causa importante di HF acuto e dovrebbe essere sempre considerato in questo contesto, valori elevati di cTn da soli, in un paziente con HF non stabiliscono la diagnosi di MI tipo 1. Ci deve essere **crescita e/o calo significativo** con o **sintomi** d'ischemia, nuove alterazioni ischemiche all'**ECG** o perdita di funzione miocardica all'**imaging**

Per spiegare concentrazioni di cTn da misurabili ad elevate nei pazienti con HF sono stati invocati meccanismi multipli :

- **Presenza di MI tipo 1**
- **Presenza di MI tipo 2** che può derivare da:
 - aumentata pressione transmurale,
 - ostruzione di piccoli vasi coronarici,
 - disfunzione endoteliale,
 - anemia
 - ipotensione.
 - **Altre condizioni:**
 - apoptosi dei cardiomiociti
 - autofagia dovuta a stiramento della parete
 - tossicità cellulare dovuta all'infiammazione
 - neurormoni circolanti.

Se sono presenti **arterie coronarie normali**, si invoca MI tipo 2 o le altre condizioni con un meccanismo non-coronarico di rilascio di cTn.

Quando non si conosce l'anatomia coronarica, un valore di cTn sopra il 99° percentile URL non è sufficiente **nel fare diagnosi di MI acuto.**

Sono necessari studi di perfusione miocardica, angiografia coronarica o MRI.



Rischio Cardiovascolare



PARTE 1

**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon





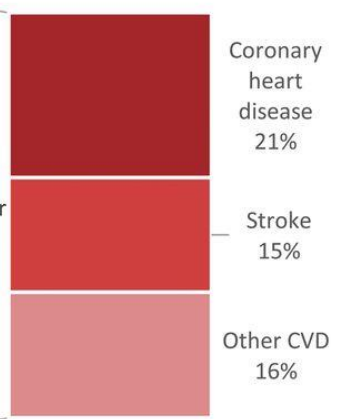
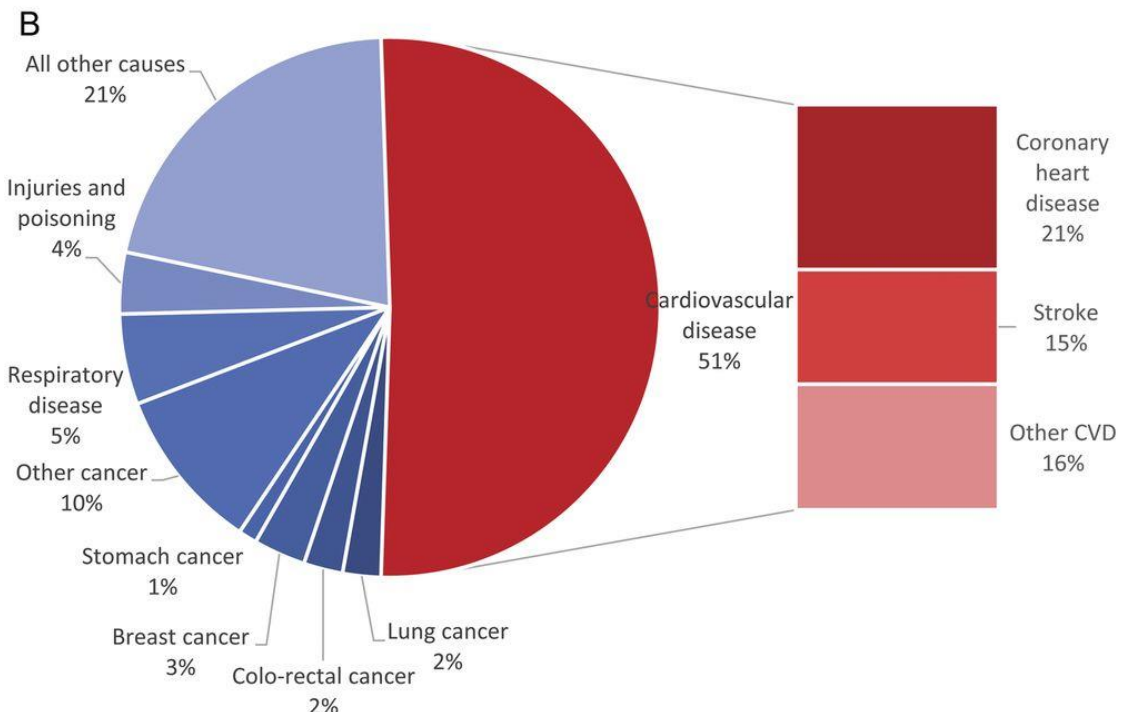
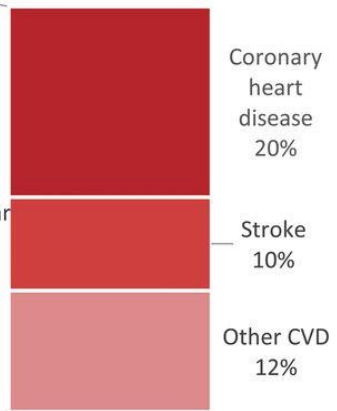
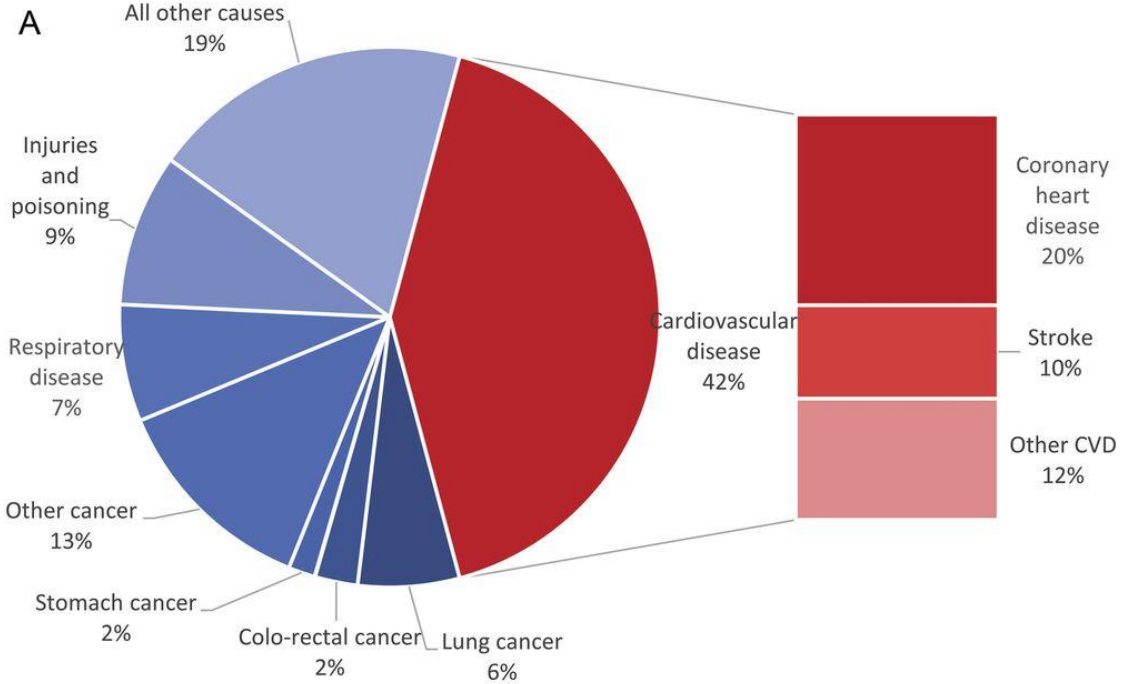
Prevenzione della cardiopatìa coronarica e dello stroke

In Europa le malattie cardiovascolari sono ancora responsabile di **oltre 4 milioni di morti l'anno**, cioè circa la metà di tutti i

- La malattia cardiovascolare causa il **maggiore onere di mortalità tra gli Europei** rispetto ad ogni altra malattia.
- In totale, CVD ha causato il **51% dei decessi tra le donne e il 42% tra gli uomini** dai dati dell'anno **2014**, rispetto al 19% e 23%, rispettivamente, per tutti i tumori.
- La sola malattia coronarica incide per il 20% di tutte le morti in Europa ogni anno.

Morte per Malattia Cardiovascolare in Europa nel 2014: valori in assoluto e in percentuale

	Malattia Cardiovascolare (totale)		Cardiopatia Coronarica		Malattia Cerebrovascolare		Altre malattie cardiovascolari	
	Valore assoluto	Percentuale	Valore assoluto	Percentuale	Valore assoluto	Percentuale	Valore assoluto	Percentuale
Maschi								
Tutte le morti (tutte le età)	1862774	42%	876017	20%	429756	10%	557001	12%
Morti premature <75 anni	939698	36%	473501	18%	201170	8%	264417	10%
Morti premature <65 anni	508132	31%	253432	16%	95249	6%	159451	10%
Femmine								
Tutte le morti (tutte le età)	2219326	51%	903330	21%	627227	14%	688769	16%
Morti premature <75 anni	536712	37%	232683	16%	155702	11%	148327	10%
Morti premature <65 anni	201492	27%	77166	10%	54470	7%	69856	9%
Totale								
Tutte le morti (tutte le età)	4082100	46%	1779347	20%	1056983	12%	1245770	14%
Morti premature <75 anni	1472410	37%	706184	18%	357482	9%	412744	10%
Morti premature <65 anni	709624	30%	330598	14%	149719	6%	229307	10%



Percentuale delle principali cause dei decessi in Europa nel 2014 (WHO):

Uomini (A)

Donne (B)

- **Quindi, le malattie cardiovascolari (CVD) costituiscono la causa principale di morte.**
- Negli ultimi decenni la loro **prevalenza è calata** per merito di una diagnosi precoce, un trattamento più aggressivo e soprattutto cambiamenti favorevoli nei fattori di rischio (rinuncia al fumo di sigaretta e gestione aggressiva della pressione arteriosa e dei lipidi).
- La maggior parte dei **fattori di rischio** per la CVD sono **modificabili** con cambiamenti dello stile di vita e trattamenti farmacologici.

Nello studio INTERHEART nove **fattori potenzialmente modificabili** erano presenti in oltre il 90% della popolazione a rischio di un primo infarto del miocardio. Tra questi:
fumo di sigaretta,
dislipidemia,
ipertensione,
diabete,
obesità addominale.

Inoltre **altri fattori abbassavano il rischio**:
regolare attività fisica,
consumo giornaliero di frutta e verdura,
consumo quotidiano di piccole quantità di

alcol.

La presenza di molteplici fattori di rischio conferisce un ulteriore rischio additivo.

La presenza di cinque fattori di rischio pone a un rischio del 25%-30% a 10 anni di avere un primo evento CHD, paragonabile al rischio assoluto dei pazienti sopravvissuti a un precedente MI o stroke ischemico.

Fumo –

- Il fumo di sigaretta rimane la **principale causa evitabile di morte e disabilità.**
- **La quantità di sigarette** attualmente fumata **aumenta sia la morbilità che la mortalità da CVD**
- **I benefici della cessazione** cominciano ad apparire dopo pochi mesi e raggiungono quella del non fumatore dopo diversi anni.

Dislipidemia –

L'uso delle **statine** ha dimostrato **benefici clinici** per le malattie cardiovascolari.

Diversi orientamenti su chi dovrebbe essere sottoposto a **screening** per dislipidemia.

Tutti i pazienti con dislipidemia, devono fare attività fisica, mantenere una dieta prudente, e perdere peso.

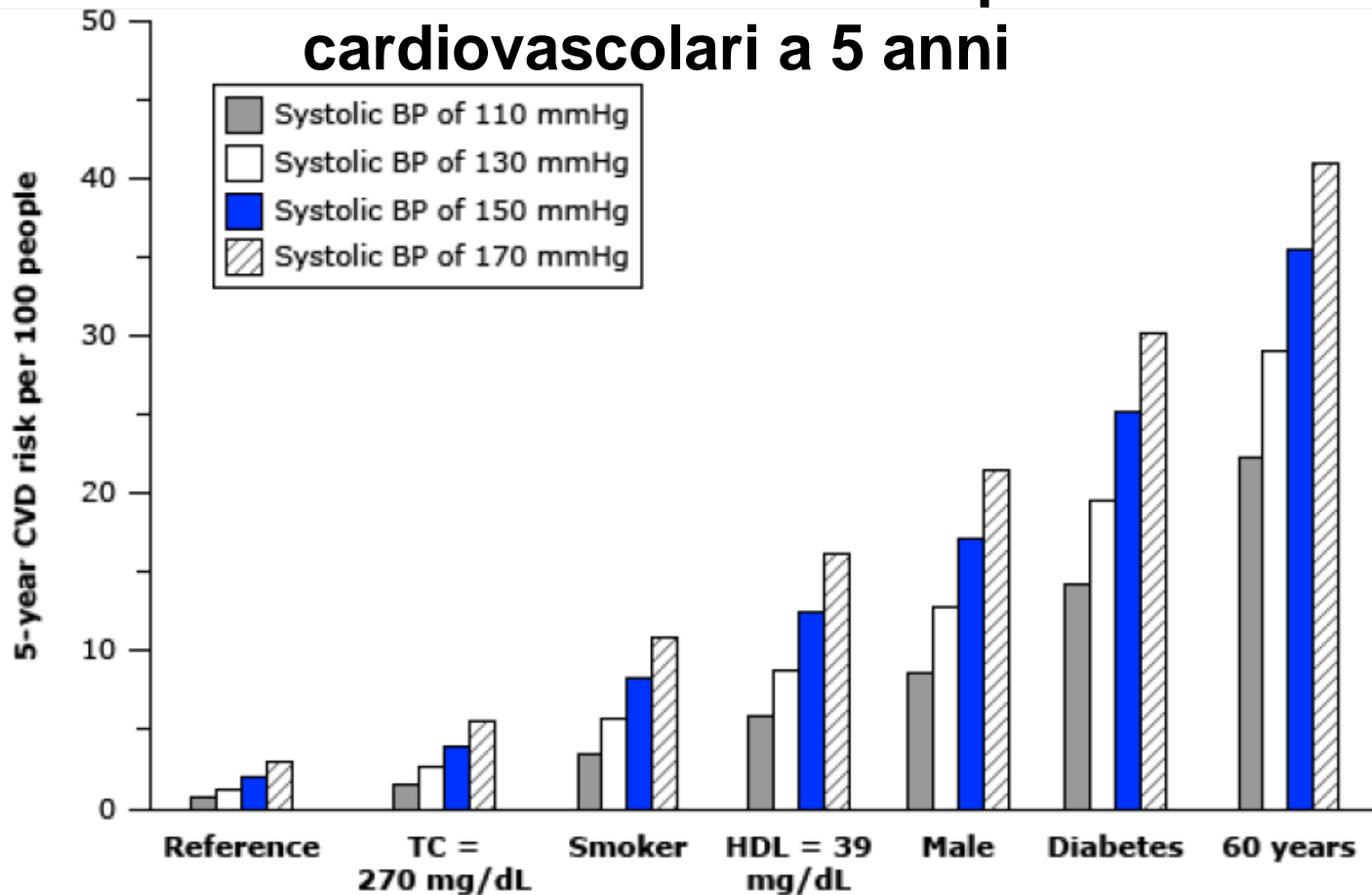
Ipertensione –

E' un fattore di rischio CVD ben noto.

- **Definizione - L'ipertensione** è generalmente definita come una pressione sistolica ≥ 140 mmHg e / o pressione diastolica ≥ 90 mmHg. Tuttavia, i pazienti con sistolica 120-139 mmHg e / o diastolica 80-89 mmHg sono nello stato di "**pre-ipertensione**" e sono pure ad aumentato rischio cardiovascolare.

- **traguardo di pressione arteriosa** – E' di solito < 140 sistolica e < 90 mmHg diastolica, ma per i pazienti ad alto rischio, come quelli con sindrome metabolica, diabete, o malattia renale cronica proteinurica, l'obiettivo è ancora più basso.

Effetti additivi di fattori di rischio per malattie cardiovascolari a 5 anni



I rischi assoluti per CVD dati **per livelli di pressione arteriosa sistolica di 110, 130, 150, e 170 mmHg** in presenza di fattori di rischio aggiuntivi.

Diabete mellito –

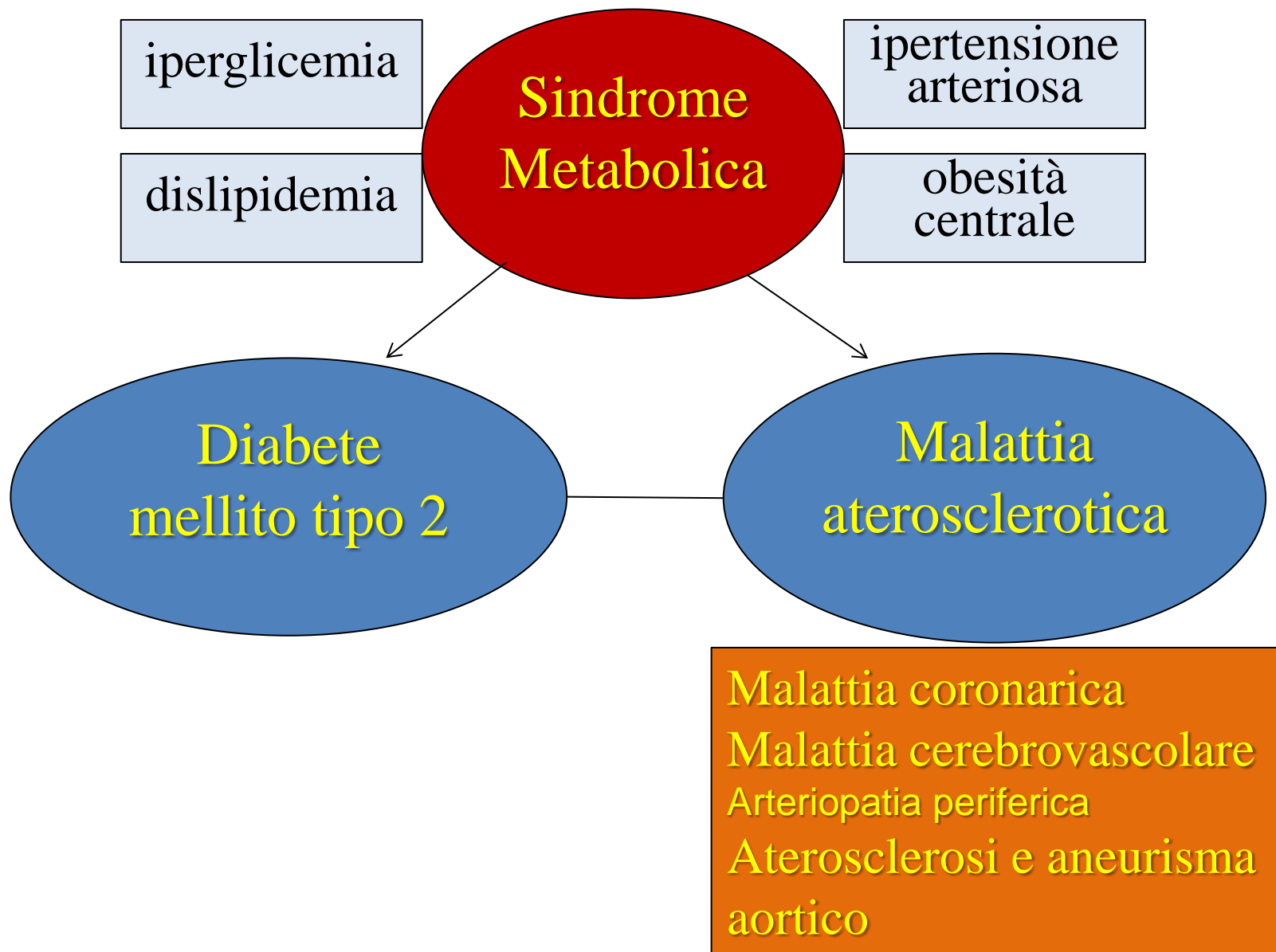
La morbilità e la mortalità da diabete comprende **complicanze sia macrovascolari** (CHD, ictus e arteriopatia periferica) **che microvascolari** (retinopatia, nefropatia e neuropatia).

- Per le complicanze macrovascolari, è fondamentale l'intervento su molteplici fattori di rischio (peso, pressione arteriosa, lipidi), oltre al controllo glicemico.
- Per le complicanze microvascolari, lo stretto controllo glicemico ne riduce l'incidenza sia nel diabete mellito di tipo 1 che di tipo 2.

I livelli target di A1C nei pazienti con diabete devono essere individualizzati, pesando i benefici sulla morbilità e mortalità contro il rischio

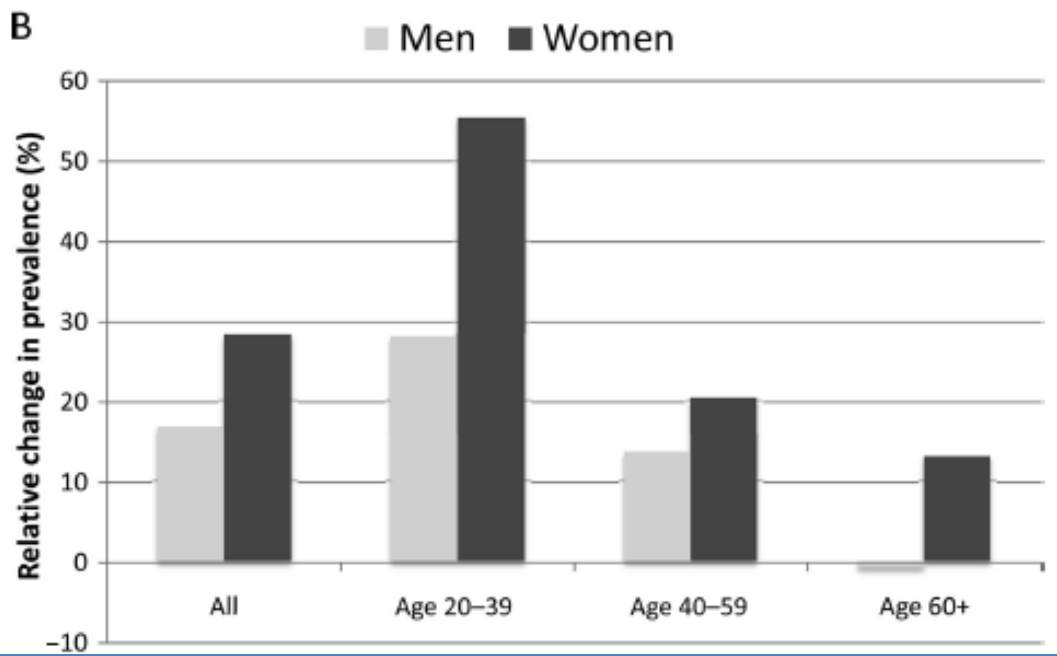
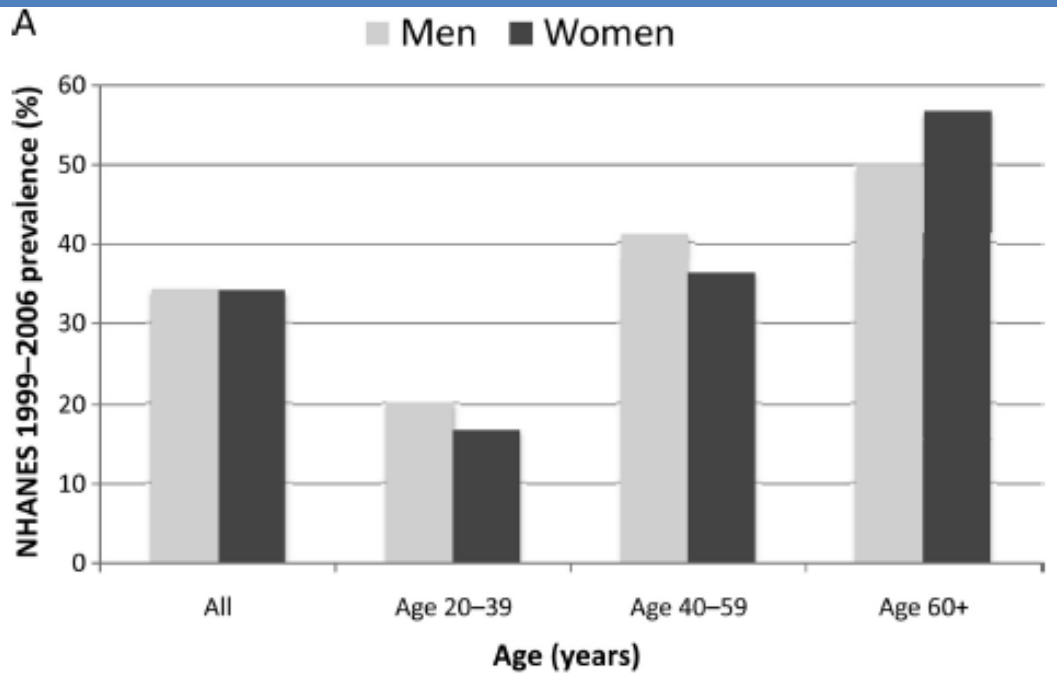
OBESITA' –

- Sta diventando la **principale causa evitabile di morte prematura.**
- **Aumenta alcuni importanti fattori di rischio** per le malattie cardiovascolari (ipertensione, dislipidemia, insulino-resistenza e diabete).
- Esiste un **aumento lineare della morbilità e della mortalità CHD** negli individui con peso corporeo superiore alla norma.
- Circa il 40% degli adulti ha la **sindrome metabolica**, una costellazione di obesità, dislipidemia, ipertensione e resistenza all'insulina, che predispone al diabete. In questi il **rischio** di un primo evento CHD a 10 anni del **16-18%**, paragonabile a quello degli individui che hanno già avuto infarto miocardico o stroke ischemico.



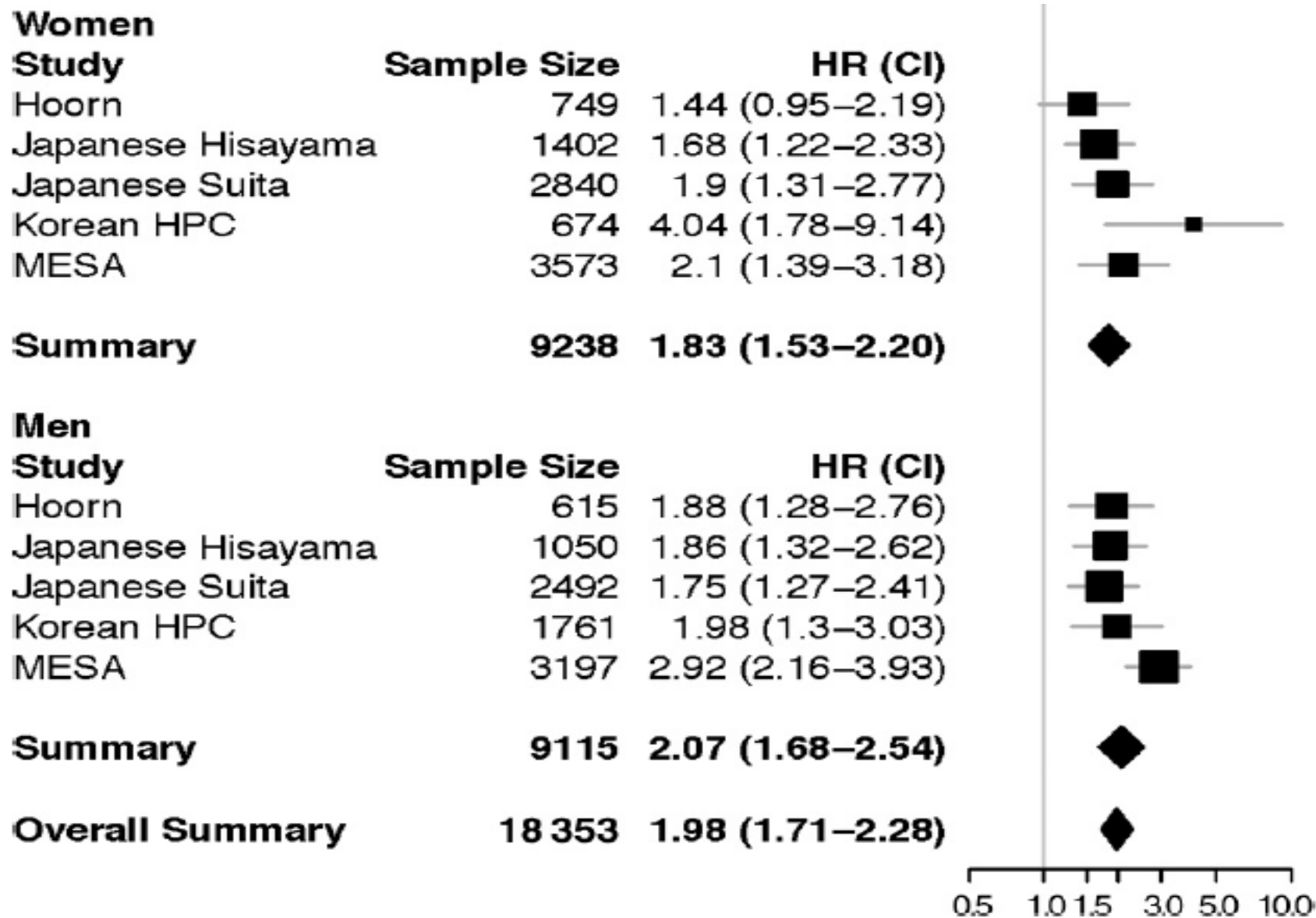
CRITERI DIAGNOSTICI ATTUALI PER LA SINDROME METABOLICA

COMPONENTE	NCEP ATP III 2002	AHA 2005	IDF 2005	DEFINIZIONE ARMONIZZATA. 2009
P-glucosio a digiuno	>110 mg/dL (>6,1 mmol/L)	>100 mg/dL (>5,6 mmol/L) o iperglicemia in trattamento	>100 mg/dL (>5,6 mmol/L) o prec. diagnosi di DMT2	>100 mg/dL (>5,6 mmol/L) o farmaci ipoglicemizzanti
Circonferenza alla vita (WC)	>102 cm per M >88 cm per F	>102 cm per M >88 cm per F	Livelli specifici per etnia	Livelli specifici per popolazione e nazione
Pressione arteriosa	>130/85mmHg	>130/85mmHg o ipertensione in trattamento	>130/85mmHg o ipertensione in trattamento	>130/85mmHg o ipertensione in trattamento
Trigliceridi	>150 mg/dL (>1,7 mmol/L)	>150 mg/dL (>1,7 mmol/L)	>150 mg/dL (>1,7 mmol/L)	>150 mg/dL (>1,7 mmol/L)
HDL colesterolo	<40 mg/dL (<1,0 mmol/L) per M e <50 mg/dL (<1,3 mmol/L) per F	<40 mg/dL (<1,0 mmol/L) per M e <50 mg/dL (<1,3 mmol/L) per F	<40 mg/dL (<1,0 mmol/L) per M e <50 mg/dL (<1,3 mmol/L) per F	<40 mg/dL (<1,0 mmol/L) per M e <50 mg/dL (<1,3 mmol/L) per F
Per la diagnosi	>3 componenti	>3 componenti	Obesità centrale + >2 componenti	>3 componenti



(A), Prevalenza età-specifica della sindrome metabolica tra Adulti statunitensi di età > 20 anni in NHANES 1999-2006.

(B), Variazione percentuale nel tempo della prevalenza età-specifica della sindrome metabolica nei due studi NHANES III (1988-1994) e NHANES 1999-2006.



Associazione tra Sindrome metabolica e eventi cardiovascolari da studi di metaanalisi.
HR (hazard ratio) o rischio relativo aggiustato per età, fumo, colesterolo totale e LDL.

Equivalenti di rischio e fattori di rischio per le malattie cardiovascolari

- Malattia aterosclerotica non coronarica
 - Diabete mellito
- Malattia renale cronica

La malattia cardiovascolare (CVD) comprende quattro aree principali:

- **malattia coronarica (CHD)**, che si manifesta con infarto del miocardio (MI), angina pectoris, scompenso cardiaco e morte coronarica
- **malattia cerebrovascolare**, si manifesta con ictus e attacco ischemico transitorio
- **arteriopatia periferica**, si manifesta con claudicatio intermittens
- **aterosclerosi aortica toracica o addominale, aneurisma aortico**

Malattia aterosclerotica non coronarica –

Arteriopatia aterosclerotica non coronarica comprende:

- **malattia carotidea,**
- **malattia delle arterie periferiche,**
- **aneurisma dell'aorta addominale.**

Questi pazienti hanno un **rischio** di successivi eventi cardiovascolari **equivalente a quello dei pazienti con CHD.**

Cioè hanno un rischio a 10 anni di sviluppare CHD che supera il 20%.

Il diabete mellito –

- **Insulino-resistenza, iperinsulinemia, ed elevata glicemia sono associati a CVD.**
 - Il diabete rappresenta il **10% del rischio attribuibile alla popolazione di un pr**
- $$\frac{(\text{rischio negli esposti} - \text{rischio nei non esposti})}{\text{rischio negli esposti}}$$
- Nel 2002 il diabete viene designato come rischio equivalente di CHD, elevandolo così alla categoria di rischio più elevata.
 - Oltre al diabete di per sé i diabetici hanno un maggior carico di altri fattori di rischio (ipertensione, obesità, aumento di colesterolo totale/HDLc, ipertrigliceridemia).
 - Il rischio di CHD nei diabetici varia notevolmente con l'intensità di questi fattori di rischio.
 - C'è prova convincente del valore della terapia aggressiva del colesterolo sierico e dell'ipertensione nei pazienti con diabete

L'iperglicemia senza diabete mellito conclamato –

Livelli relativamente alti di glucosio nel sangue e di emoglobina glicata si correlano con il rischio cardiovascolare anche nei pazienti senza diabete di base.

Malattia renale cronica -

- L'aumento del rischio CHD in pazienti con malattia renale **in stadio terminale** è ben nota.
- Ora è provato che anche la **disfunzione renale da lieve a moderata** è pure associata ad aumento del rischio di CHD.
- Linee guida della National Kidney Foundation nel 2002 e l'American College of Cardiology /task force American Heart Association nel 2004 **raccomandano che la malattia renale cronica venga considerata un rischio equivalente di CHD**



Fattori di rischio per le malattie cardiovascolari

PREVALENZA DEI FATTORI DI RISCHIO



FATTORI DI RISCHIO	DEFINIZIONE	Framingham Heart Study		NHANES III	
		Uomini	Donne	Uomini	Donne
PRESSIONE ARTERIOSA		%	%	%	%
ELEVATA	Sistolica 20-139mmHg Diastolica 80-89mmHg Terapia antipertensiva	38	33	26	25
LDL COLESTEROLO		%	%	%	%
ELEVATO	>159mg/dL >4,12mmol/L	26	27	26	20
HDL COLESTEROLO		%	%	%	%
BASSO	<40mg/dL <1,04mmol/L	36	10	40	13
DIABETE MELLITO - INTOLLERANZA GLICEMICA		%	%	%	%
	Diabete mellito o glicemia a digiuno: >125mg/dL, >6,94mmol/L glicemia a 2h (OGTT): >199mg/dL, >11,04mmol/L	6	4	8	6
FUMO DI SIGARETTA		%	%	%	%
ELEVATO	Corrente	35	33	28	20

PREVALENZA DEI FATTORI DI RISCHIO



FATTORI DI RISCHIO	DEFINIZIONE	Framingham Heart Study		NHANES III	
		Uomini	Donne	Uomini	Donne
PRESSIONE ARTERIOSA		%	%	%	%
BORDERLINE	Sistolica >140mmHg Diastolica >90 mmHg	43	36	43	27
LDL COLESTEROLO		%	%	%	%
BORDERLINE	100-159mg/dL 2,59-4,12mmol/L	62	57	60	58
HDL COLESTEROLO		%	%	%	%
BORDERLINE	40-59mg/dL 1,04-1,53mmol/L	53	49	50	53
DIABETE MELLITO - INTOLLERANZA GLICEMICA		%	%	%	%
BORDERLINE	glicemia a digiuno: 110-125mg/dL, 6,11-6,94mmol/L glicemia a 2h (OGTT): 140-199mg/dL, 7,77-11,04mmol/L	13	6	10	7
FUMO DI SIGARETTA		%	%	%	%
BORDERLINE	In passato	39	25	42	30

- Oltre il **90% degli eventi** coronarici si verificano nei soggetti con **almeno un fattore di rischio** (situazione presente nel 60% degli uomini e nel 50% delle donne nella popolazione generale).
- Circa **l'8%** si verificano in soggetti che hanno **solo livelli borderline di molteplici fattori di rischio** (situazione presente nel 26% degli uomini e nel 41% delle donne nella popolazione generale).
- **Pochi** eventi si verificano in soggetti **senza fattori di rischio** elevati o borderline (situazione rara, $< 0,4\%$, nella popolazione generale, che comune solo nelle donne in età

- **Quando due o tutti e tre i principali fattori di rischio**

- colesterolo sierico ≥ 200 mg/dL (≥ 5.2 mmol/L),
- elevata pressione sistolica e diastolica,
- fumo di sigaretta

sono presenti, **il rischio relativo aumenta** oltre 5 volte per la malattia coronarica, oltre 4 volte per le malattie cardiovascolari in genere, oltre 3 volte per la mortalità cardiovascolare.

- **i pazienti nelle categorie più alte** sia di colesterolo totale (≥ 240 mg/dL [6.25 mmol/L]) che di pressione sistolica (≥ 160 mmHg) rispetto a quelli nella categoria più bassa hanno un **aumento di rischio relativo** di

FATTORI DI RISCHIO STABILITI PER CVD ATEROSCLEROTICA

L'aterosclerosi è un processo insidioso che inizia con le strie lipidiche che compaiono nella adolescenza, progredisce con le placche in età adulta, che culminano nelle occlusioni trombotiche ed eventi coronarici a mezza età o oltre.

Una varietà di fattori, spesso agendo di concerto, sono associati a un aumentato rischio di placche aterosclerotiche nelle arterie coronarie e in altri distretti arteriosi.

La valutazione del fattore di rischio è utile negli adulti per guidare la terapia per la dislipidemia, l'ipertensione e il diabete, e le **formule multivariate** sono utili per stimare il rischio di eventi coronarici.

National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III

Fattori di rischio

Età: uomo ≥ 45 anni, donna ≥ 55 anni o menopausa prematura senza terapia estrogenica sostitutiva

Storia familiare di CHD prematuro:

MI o morte improvvisa in parenti di primo grado prima dei 55 anni se uomo e 65 anni se donna

Attualmente fumatore

Ipertensione: PA $> 140/90$ mmHg o trattamento antipertensivo

HDL colesterolo < 40 mg/dL (1,03 mmol/L)*

Fattori di rischio negativi

HDL colesterolo ≥ 60 mg/dL (1.55 mmol/L)•

Stato basato sulla presenza di fattori di rischio diversi da LDL colesterolo

* confermato da misure ripetute.

• con HDL colesterolo > 60 mg/dL si sottrae un fattore di rischio

Sesso –

I fattori di rischio CVD agiscono in entrambi i sessi e a tutte le età, ma con diversa importanza relativa.

- **Il diabete e un basso rapporto HDLc/colesterolo totale** hanno più impatto nelle donne.

- **L'incidenza di MI aumenta di sei volte nelle donne e tre volte negli uomini che fumano**

(almeno 20 sigarette al giorno rispetto ai non-fumatori).

Età -

- L'età da sola contribuisce allo sviluppo di CVD.

Prevalenza (%)	Decade di età
2	40-50
3,5	51-60
7,1	61-70
13	71-80
22	81-90
32,5	91-100

- Alcuni fattori di rischio (dislipidemia, alterata tolleranza al glucosio) calano d'impatto con l'avanzare dell'età, ma un rischio relativo inferiore è compensato dal rischio assoluto elevato negli adulti più anziani

Lipidi e lipoproteine -

La prevalenza di dislipidemia (75-85%) è più elevata nei pazienti con malattia coronarica prematura rispetto ai controlli senza CHD (40-48%).

Nello studio INTERHEART, la dislipidemia (definita come aumento del rapporto APOB/APOA-1) dà ragione del 49% del rischio attribuibile alla popolazione di un primo infarto miocardico*

$$\frac{(\text{rischio negli esposti} - \text{rischio nei non esposti})}{\text{rischio negli esposti}}$$

rischio negli esposti

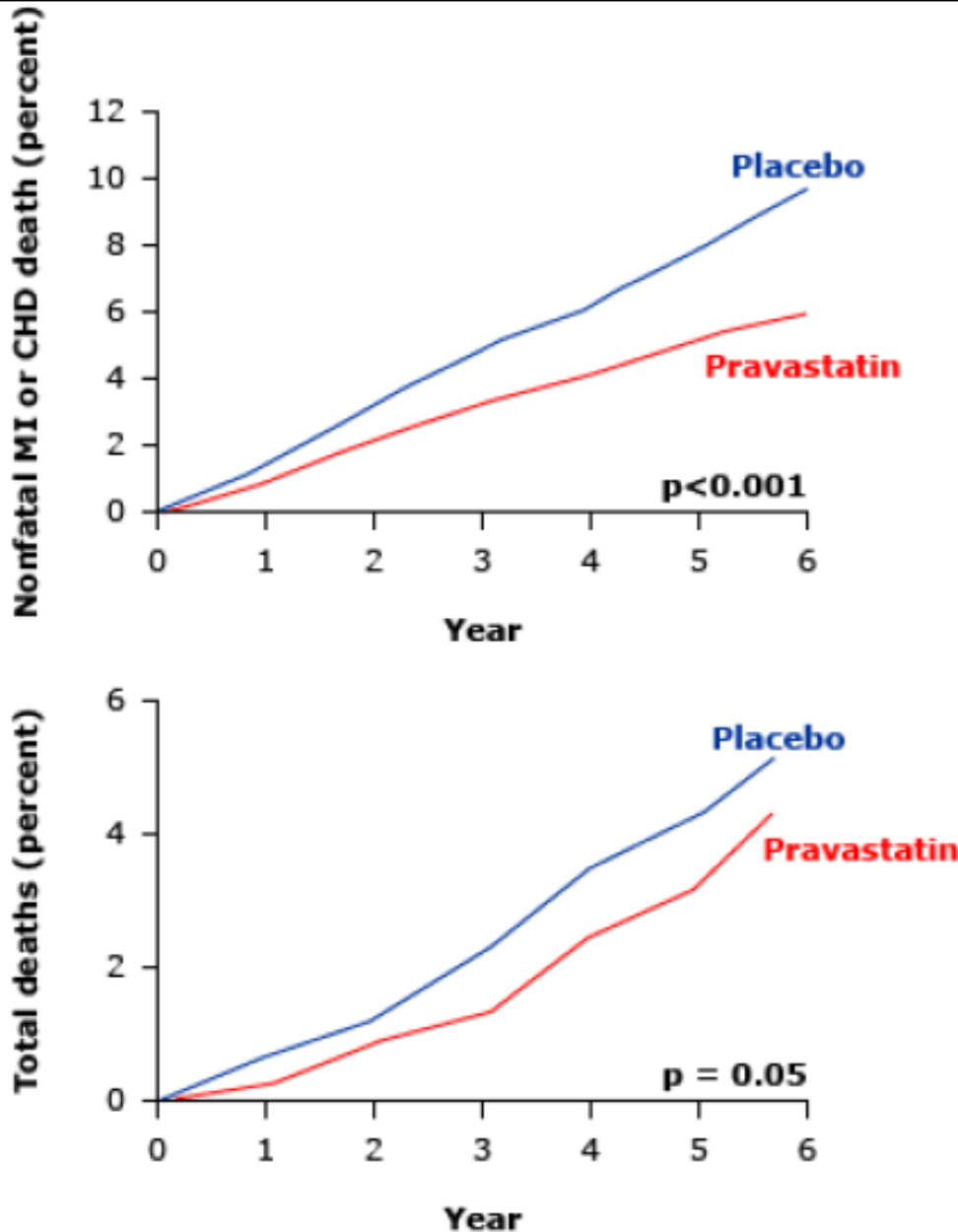
I disturbi del metabolismo delle lipoproteine sono spesso familiari (nel 54% di tutti i pazienti CVD e nel 70% di coloro che hanno un'alterazione lipidica).

I disturbi familiari più comuni sono:

- elevata Lp(a) (da sola o associata ad altre dislipidemie)
- ipertrigliceridemia con ipoalfalipoproteinemia
- iperlipidemia combinata.

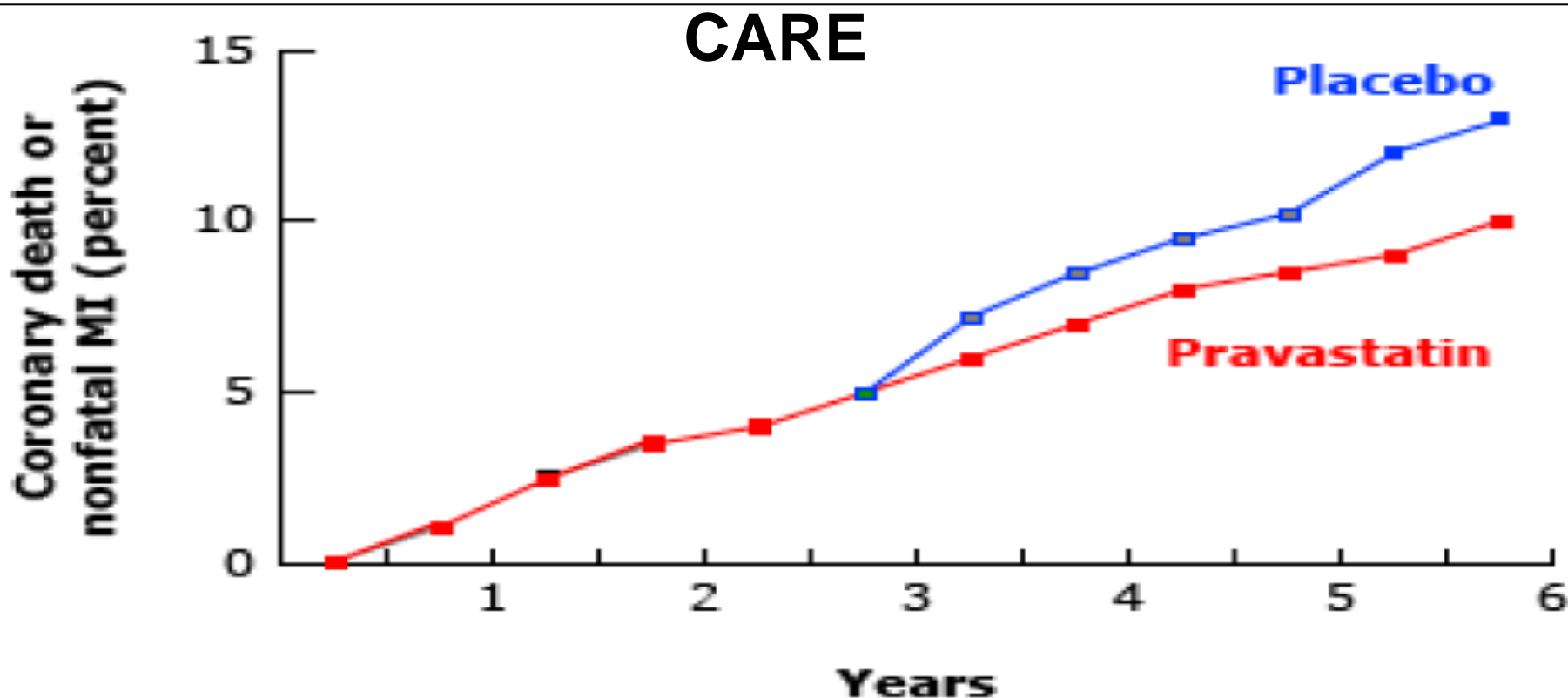
L'importanza patogenetica del colesterolo sierico è provata da studi che dimostrano che **la riduzione dei livelli di colesterolo totale e LDL** (data quasi interamente dalle statine) **riduce gli eventi CVD e la mortalità** sia nella prevenzione primaria che

Pravastatina per la prevenzione primaria di CHD



Analisi di Kaplan-Meier della efficacia della pravastatina rispetto al placebo in uomini di mezza età con ipercolesterolemia (valore medio 272 mg/dl, 7,0 mmol/L). Alla fine dello studio, gli uomini trattati con **pravastatina** (linea rossa) avevano 32% di riduzione di MI non fatale o di morte da malattia coronarica (CHD, pannello superiore) e 22% di riduzione di morte da qualsiasi causa (pannello inferiore)

Beneficio della pravastatina post-MI nello studio



Analisi di Kaplan-Meier della incidenza di morte coronarica o MI in pazienti post-MI con livelli medio-alti di LDLc che erano stati randomizzati alla terapia con pravastatina o al placebo.

L'incidenza era significativamente ridotta dalla terapia con pravastatina ($p = 0,003$). Una simile percentuale di vantaggio compare anche nei pazienti con livelli quasi normali di LDL-colesterolo (125-150 mg/dl [3,2-3,9 mmol/L]).

Le seguenti alterazioni di lipidi e lipoproteine sono associate a un aumento del rischio di CHD:

aumento di colesterolo totale e di colesterolo LDL

basso HDL-colesterolo

ipertrigliceridemia

aumento del colesterolo non-HDL

aumento della Lp (a)

aumento della apolipoproteina C-III

LDL piccole e dense

differenti genotipi di apolipoproteina E (apoE) che influenzano i livelli di colesterolo e trigliceridi, nonché il rischio di CHD

Le anomalie di cui sopra richiedono la misurazione dei lipidi e lipoproteine. *La spettroscopia con risonanza magnetica nucleare (NMR) delle particelle lipoproteiche è stata proposta come metodo alternativo per la previsione del rischio CVD, ma questa tecnica non migliora l'accuratezza predittiva della misura standard di lipidi o apolipoproteine*



MARKERS INFIAMMATORI



Markers infiammatori -

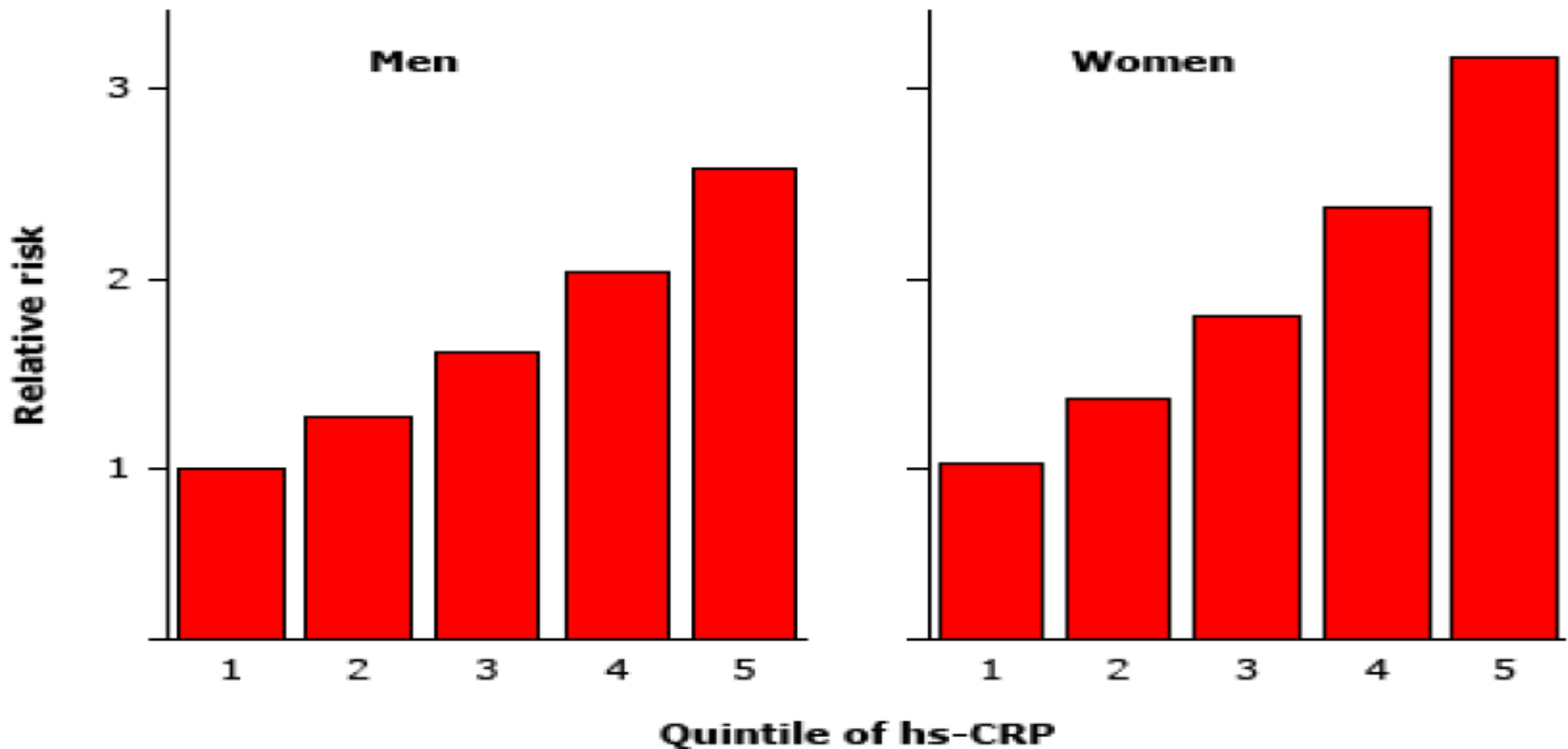
Numerosi i marcatori infiammatori sono associati ad un aumentato rischio CVD.

- **La proteina C-reattiva (CRP)** è il marcatore d'infiammazione più usato nella pratica clinica. Il suo ruolo nella valutazione del rischio cardiovascolare continua ad evolversi, ma il suo ruolo preciso nella CVD è incerto.
- Si suggerisce che sia **l'interleuchina-6 (IL-6)** ad avere un ruolo causale diretto nello sviluppo di CHD.

La proteina C-reattiva -

- La concentrazione di CRP, che **indica il livello di base dell' infiammazione, predice il rischio a lungo termine di un primo infarto miocardico, stroke ischemico, o malattia arteriosa periferica.**
- La misura dei livelli di CRP **migliora la stratificazione del rischio.**
- Le linee guida suggeriscono la misura di CRP ad alta sensibilità (hs-CRP) **nei pazienti a rischio intermedio per CAD,** per migliorare la valutazione del rischio ed indirizzare verso la prevenzione primaria.

L'aumento delle concentrazioni di proteina C-reattiva fa prevedere il rischio di infarto miocardico



Negli uomini (sinistra) e nelle donne (destra) apparentemente sani, il rischio relativo aggiustato di infarto miocardico è associato all'aumento dei quintili di hs-CRP.

Interleuchina-6 –

- **Determina una cascata di risposte proinfiammatorie tramite l'attivazione dei recettori di membrana (IL-6R) sulla superficie cellulare.**
- **IL-6 e IL-6R sembrano avere un ruolo causale diretto nello sviluppo di CHD e possono essere un futuro bersaglio degli interventi terapeutici per prevenire CHD.**
- **La variante allelica del gene che codifica per IL6R Asp358Ala (rs2228145), comporta una riduzione del legame di IL-6 alla membrana, con conseguente diminuzione del segnale e minore infiammazione.**

- **ogni copia dell'allele Asp358Ala è associata a:**
 - **aumento dei livelli di IL-6R solubile**
 - **diminuzione significativa dei livelli di CRP**
 - **diminuzione significativa del rischio di CHD (-3,4%).**
- **due varianti alleliche danno più beneficio di una sola variante allelica, che comunque dà maggiore beneficio di nessuna variante allelica**



Rischio Cardiovascolare



PARTE 2

**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon



MALATTIA CARDIOVASCOLARE AREE

- MALATTIA CORONARICA
 - SINDROME CORONARICA ACUTA (INFARTO MIOCARDICO, ANGINA INSTABILE, MORTE CORONARICA), ANGINA PECTORIS, SCOMPENSO CARDIACO
- MALATTIA CEREBROVASCOLARE
 - STROKE ISCHEMICO, TIA
- MALATTIA ARTERIOSA PERIFERICA
 - CLAUDICATIO INTERMITTENS
- ATEROSCLEROSI AORTICA E ANEURISMA TORACICO O ADDOMINALE

FATTORI DI RISCHIO CLINICI

Sesso maschile

Fumo di sigaretta

Età

Obesità centrale

Ipertensione

Sindrome Metabolica

Diabete

Insufficienza Renale Cronica

Apnea notturna

FATTORI DI RISCHIO DI LABORATORIO

Colesterolo totale

LDL-c

HDL-c

trigliceridi

apo B

apo A-I

Lp(a)

omocisteina

citochine

proteina C-reattiva

fibrinogeno

D-dimero

PAI-1

F VII

vWF

creatinina

cistatina C

microalbuminuria

BNP

cTnI

MPO

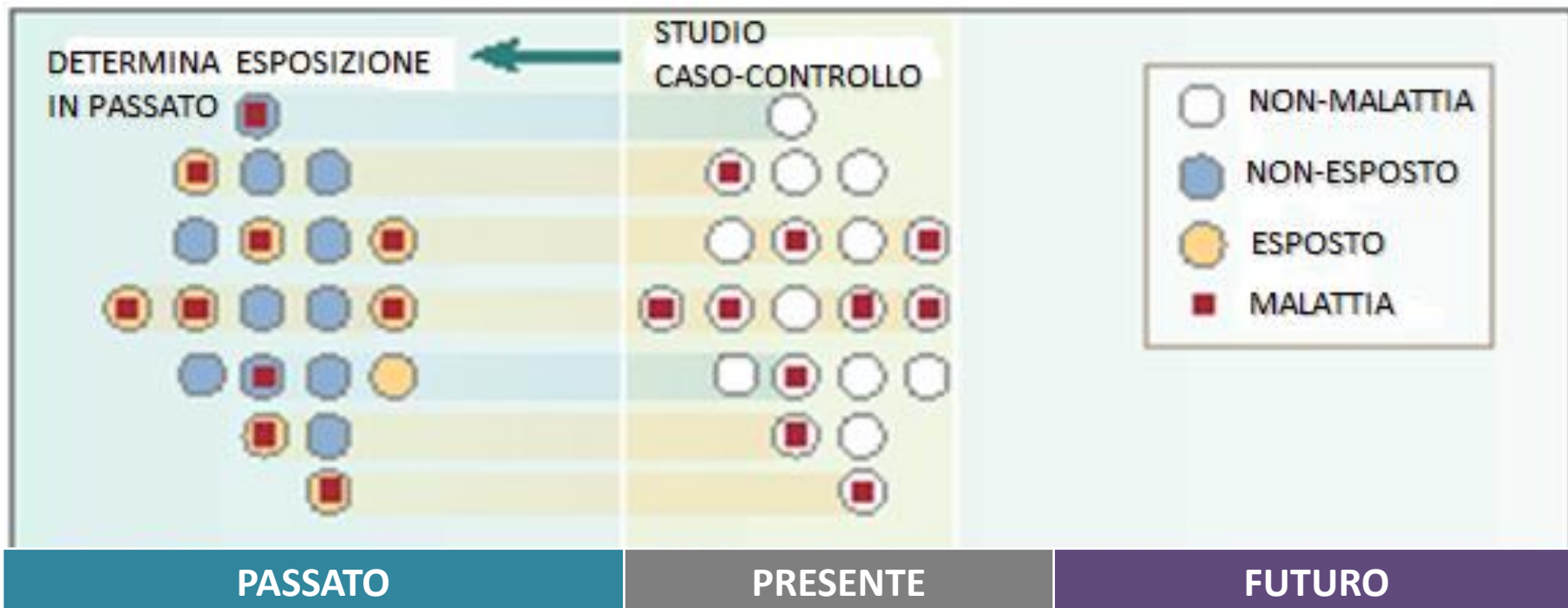
ox-LDL

8-iso-PGF₂ α

tioli liberi

GLI STUDI CLINICI

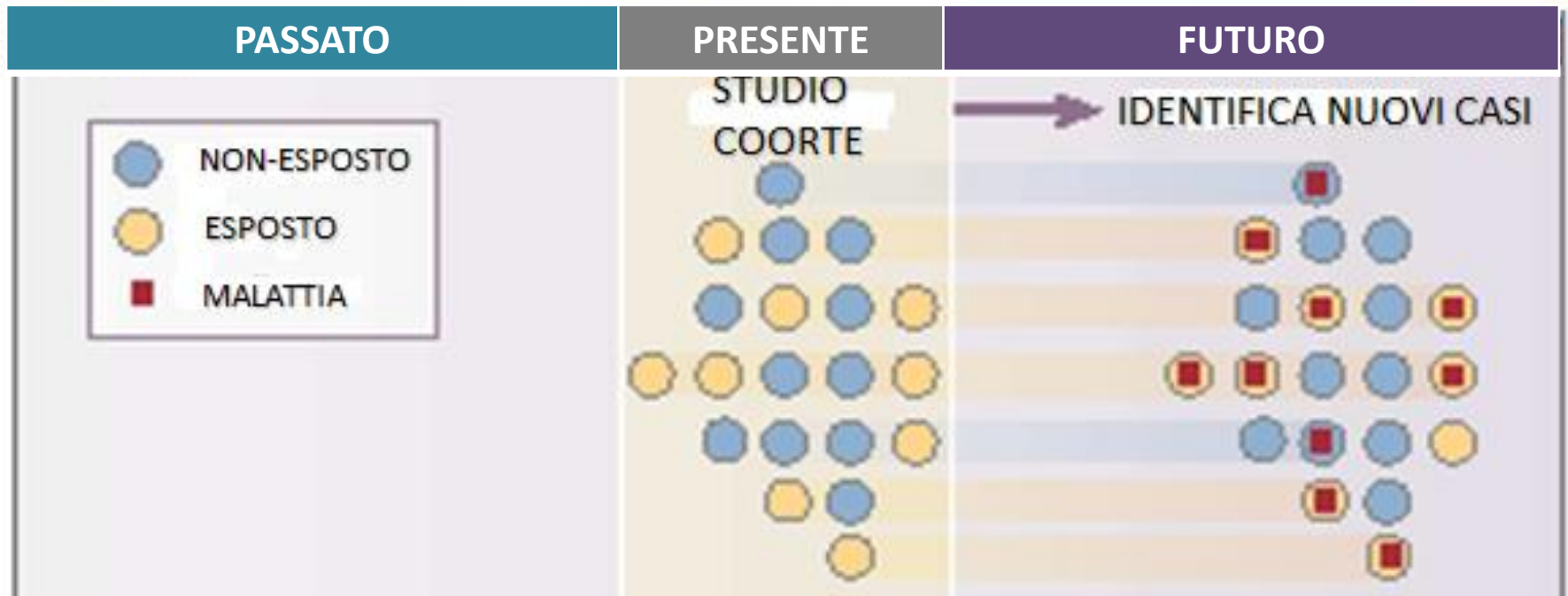
Uno **studio caso-controllo** identifica persone con o senza malattia, determina le differenze tra i due gruppi riguardo una passata esposizione e quindi attribuisce a queste differenze il ruolo di fattori causali.



Nella individuazione di fattori di rischio è un **metodo limitato**.

GLI STUDI CLINICI

Uno **studio prospettico** identifica persone con o senza una data esposizione e le segue nel tempo per determinare quelli in cui la malattia si sviluppa e quindi attribuisce alle differenze nella precedente esposizione il ruolo di fattori causali



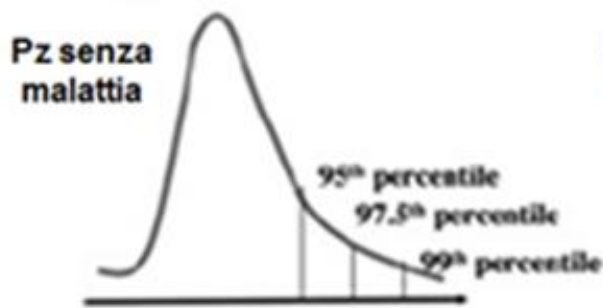
Uno studio prospettico è **notevolmente più valido** di uno studio caso-controllo nell'individuare fattori di rischio .

Modalità per definire valori alterati dei biomarcatori:

FN=falso-negativo, FP=falso positivo, TN=vero negativo, FP=vero positivo Pz=pazienti, f/u=follow-up

I

Limiti di riferimento

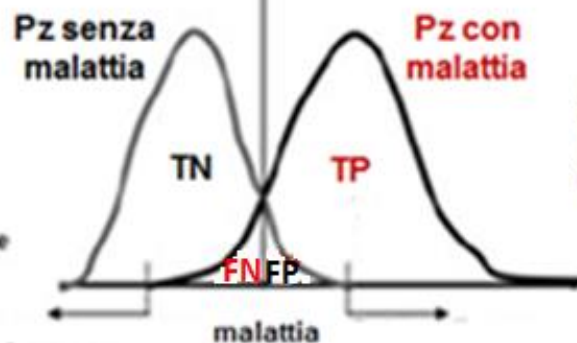


Risultato del biomarker

I limiti di riferimento sono valori definiti statisticamente in base alla distribuzione nel campione di riferimento

II

Limiti di discriminazione



Risultato del biomarker

I limiti di discriminazione separano le distribuzioni dei pazienti con malattia e senza malattia

III

Soglia di definizione del rischio



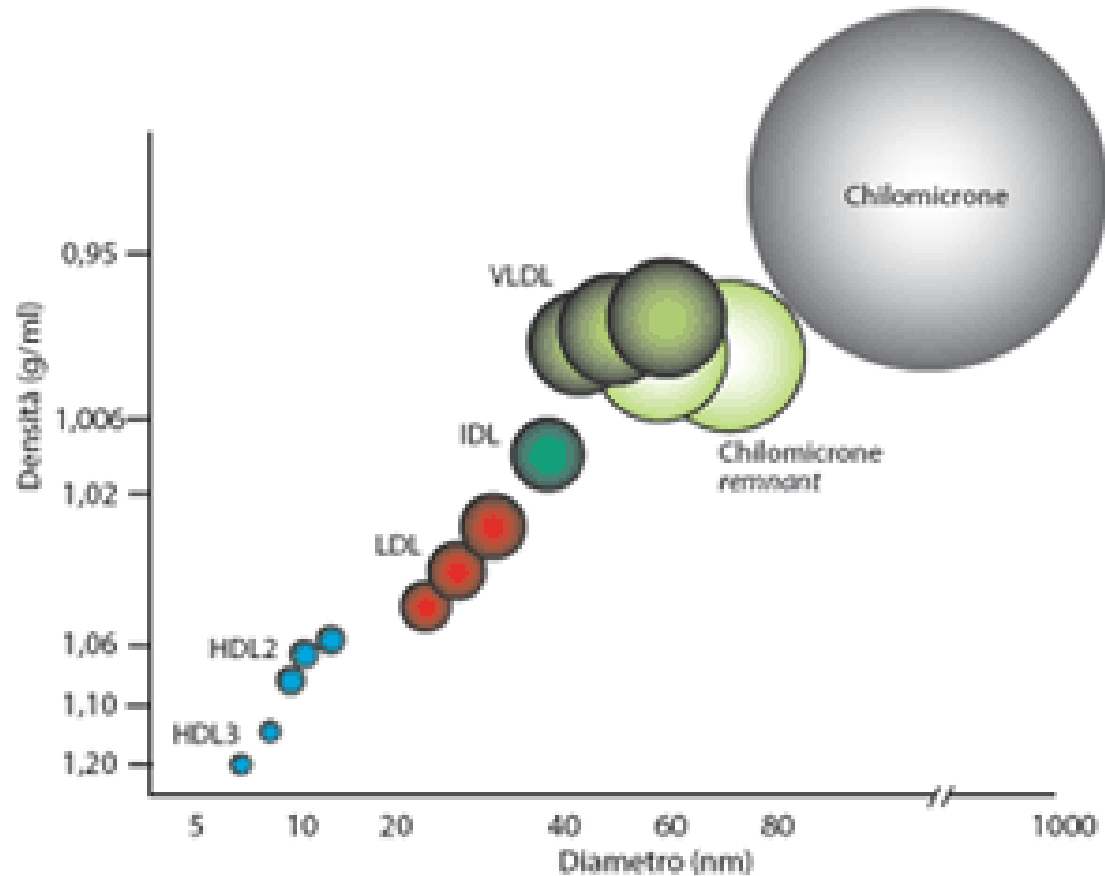
Range di valori di base

La soglia del rischio identifica il livello al quale il rischio di malattia cresce al follow up



Lipidi e Lipoproteine

Classi di lipoproteine in base alla densità

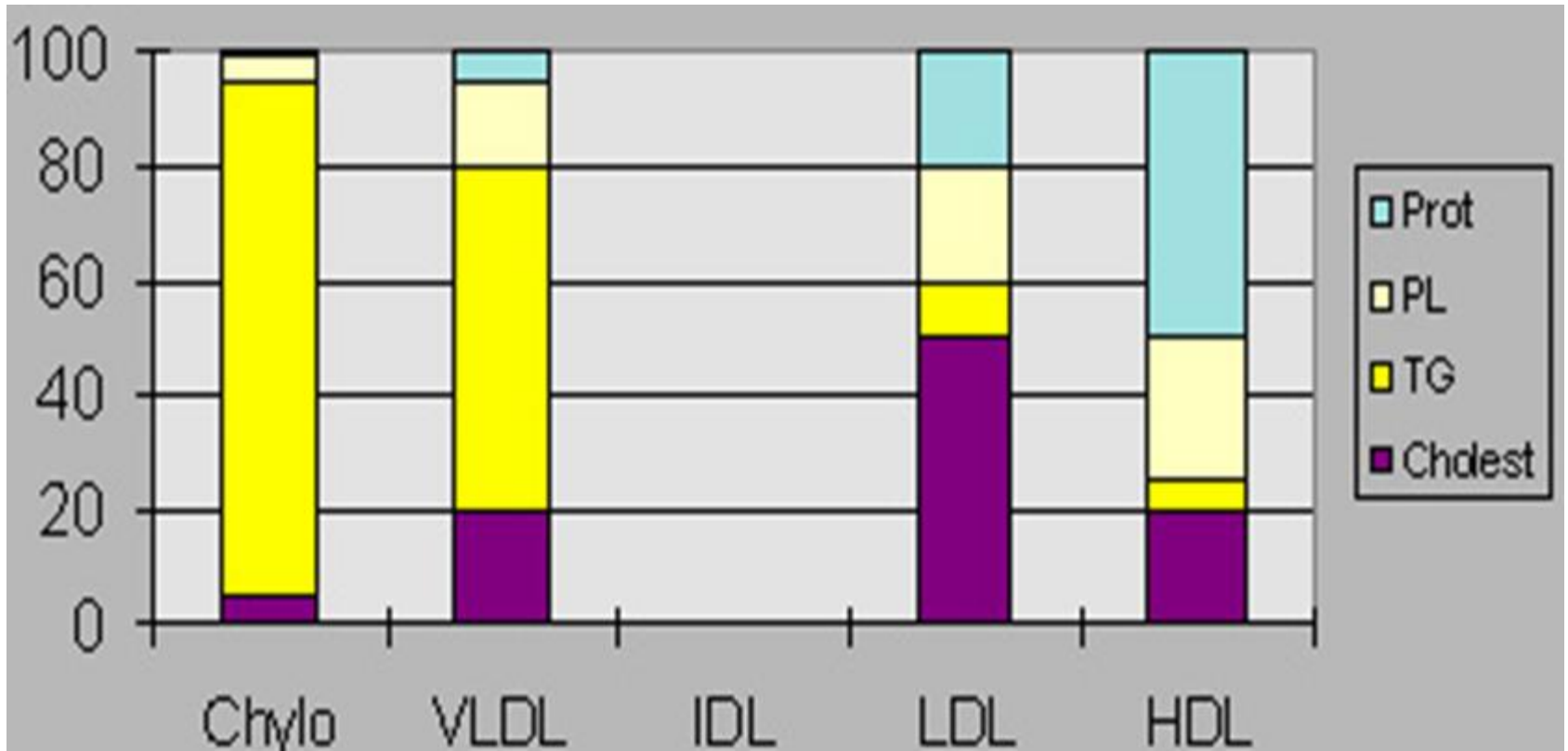


Densità alla ultracentrifugazione:

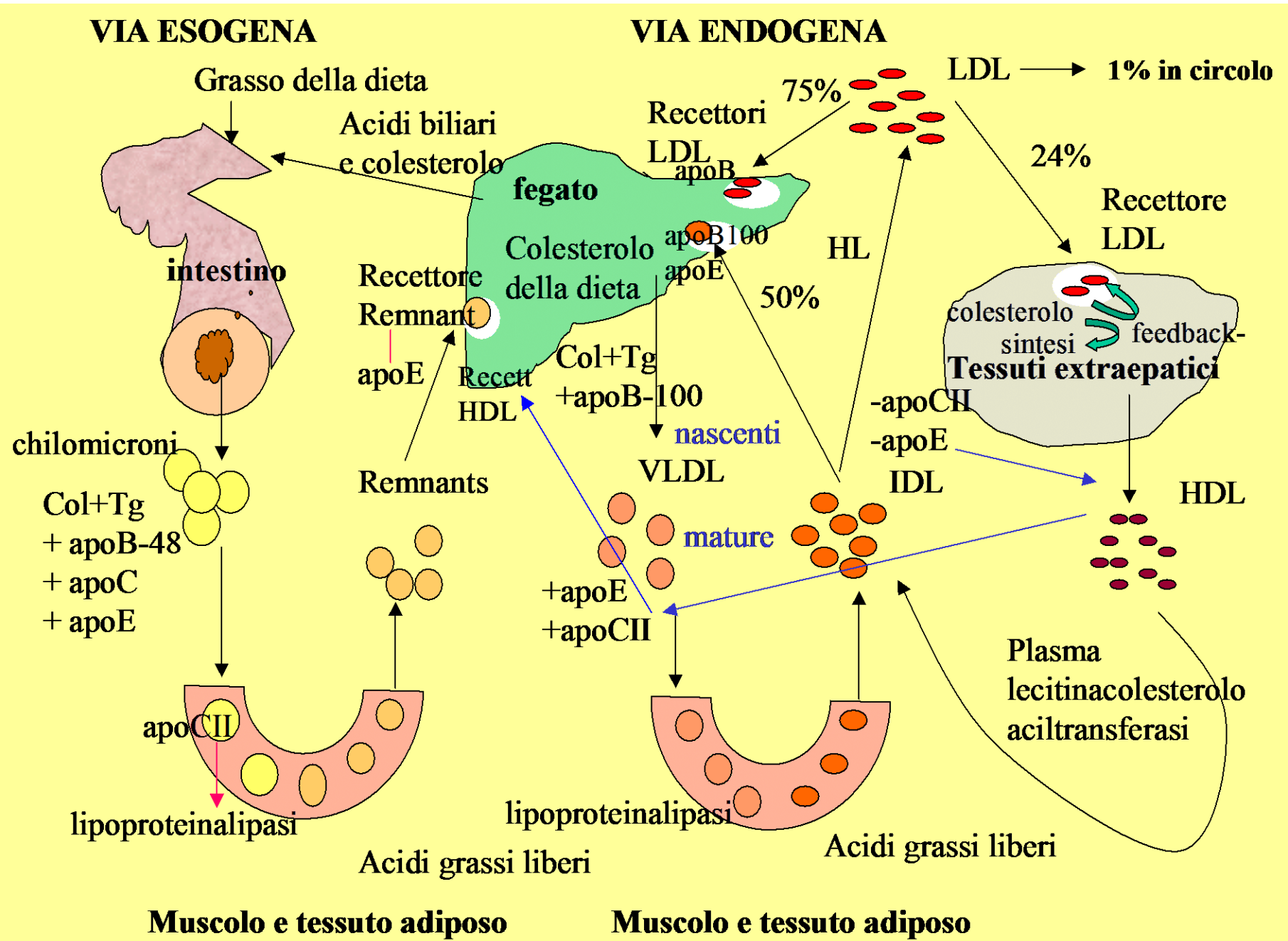
chilomicroni, chilomicroni remnant, VLDL, IDL, LDL, HDL

Alla densità crescente si associa parallelamente la riduzione di dimensione

Composizione lipidica delle lipoproteine



Metabolismo delle lipoproteine



Fattori di rischio lipidici

- a) aumento del colesterolo totale nel plasma
(ipercolesterolemia)
- b) aumento di colesterolo contenuto nelle
LDL (LDLc)
- c) calo del colesterolo contenuto nelle HDL
(HDLc)
- d) aumento dei trigliceridi nel plasma
(ipertrigliceridemia)

COLESTEROLO TOTALE

Nello studio MRFIT

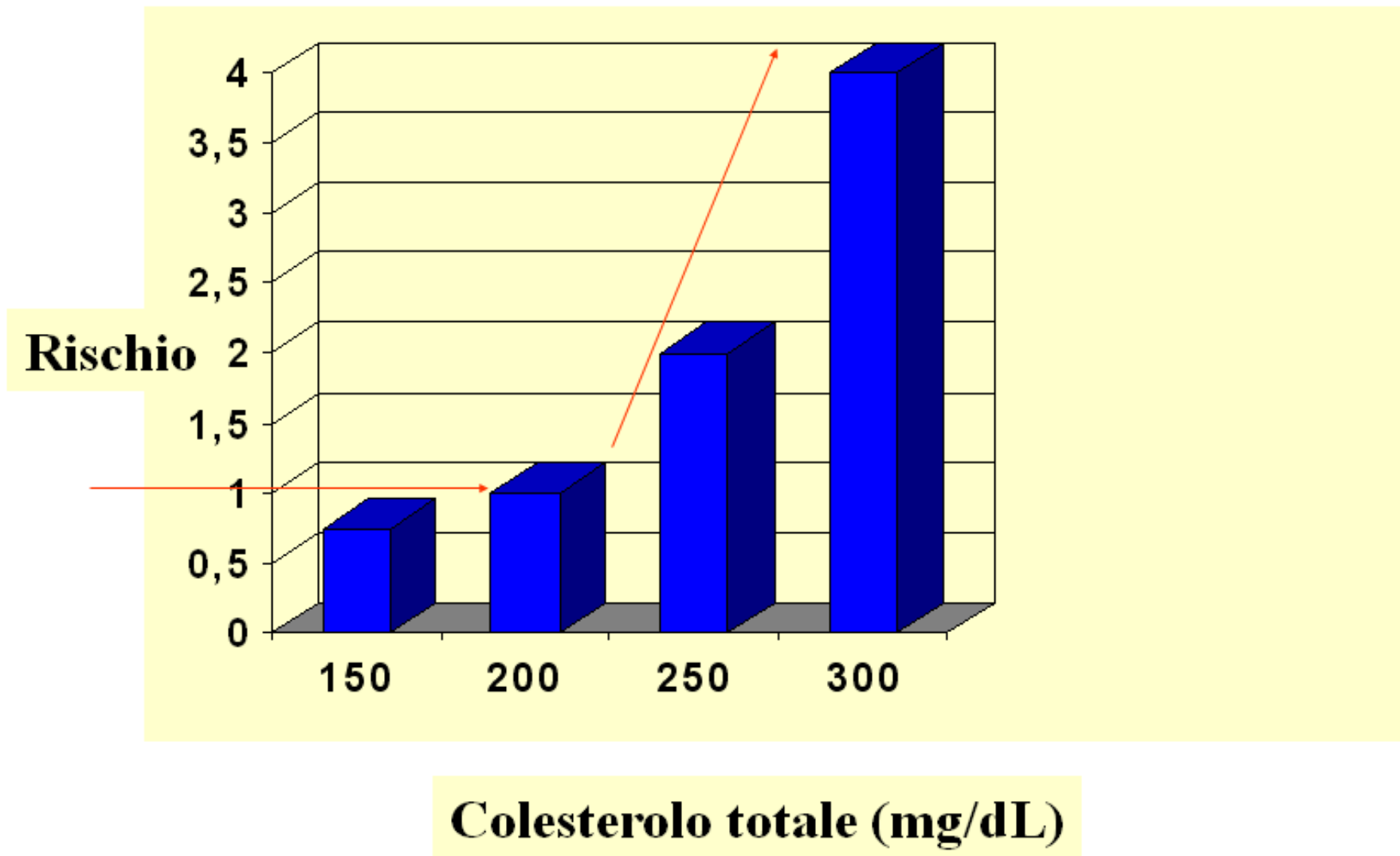
(Multiple Risk Factor Intervention Trial)

nel 1986 eseguito su circa 350,000 uomini di mezza età

si dimostra un aumento progressivo del rischio di CHD all'aumentare dei valori di colesterolo totale (CT) nel siero

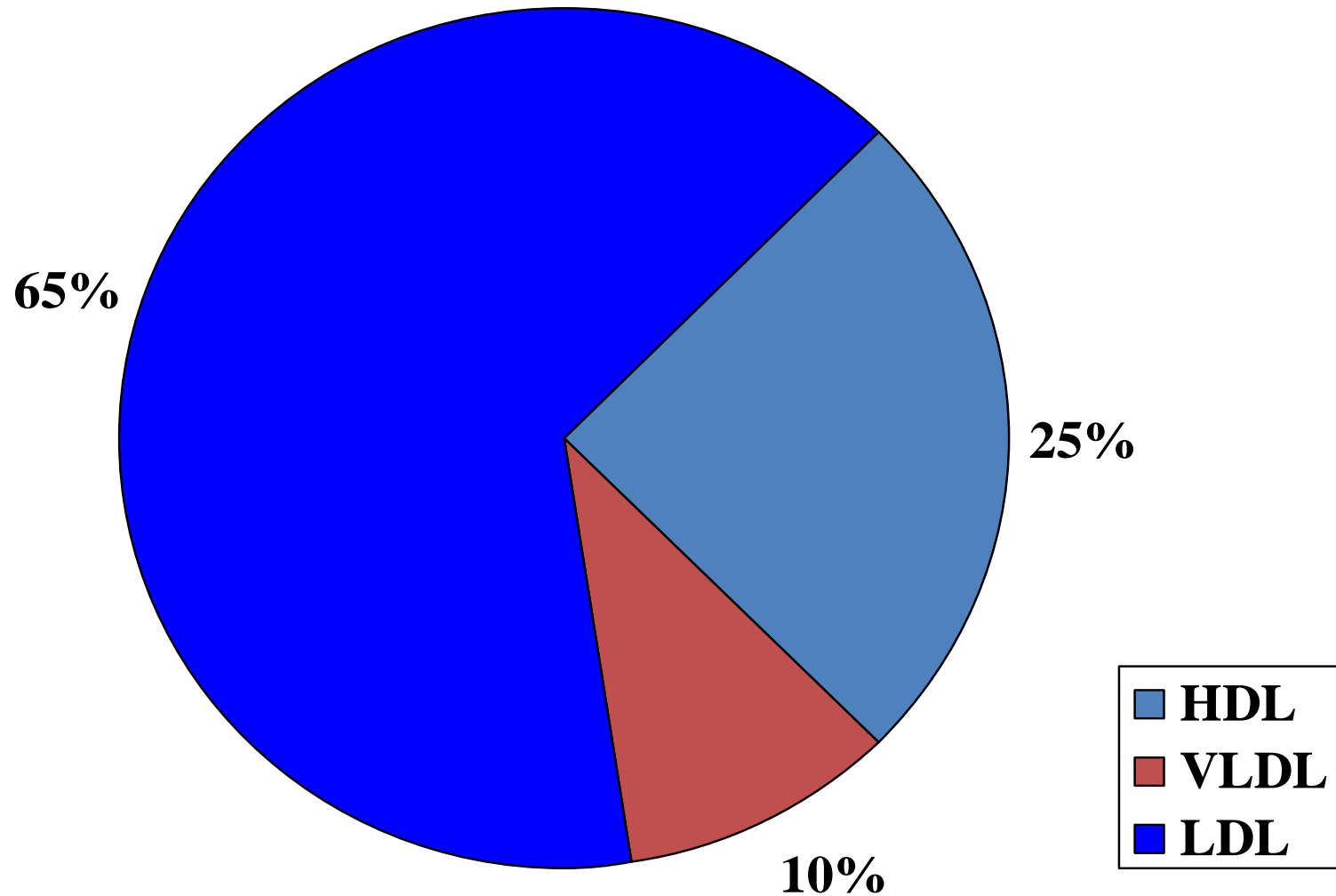
NB: per una valutazione completa del rischio serve misurare, oltre al colesterolo totale (CT), il colesterolo LDL (LDLc), il colesterolo HDL (HDLc) ed i trigliceridi (Tgl).

Rischio di morte CHD per livello di Colesterolo totale



CHD = malattia coronarica

Distribuzione del Colesterolo totale nelle lipoproteine



75-85% prodotto dal fegato e 15-25% proviene dalla dieta

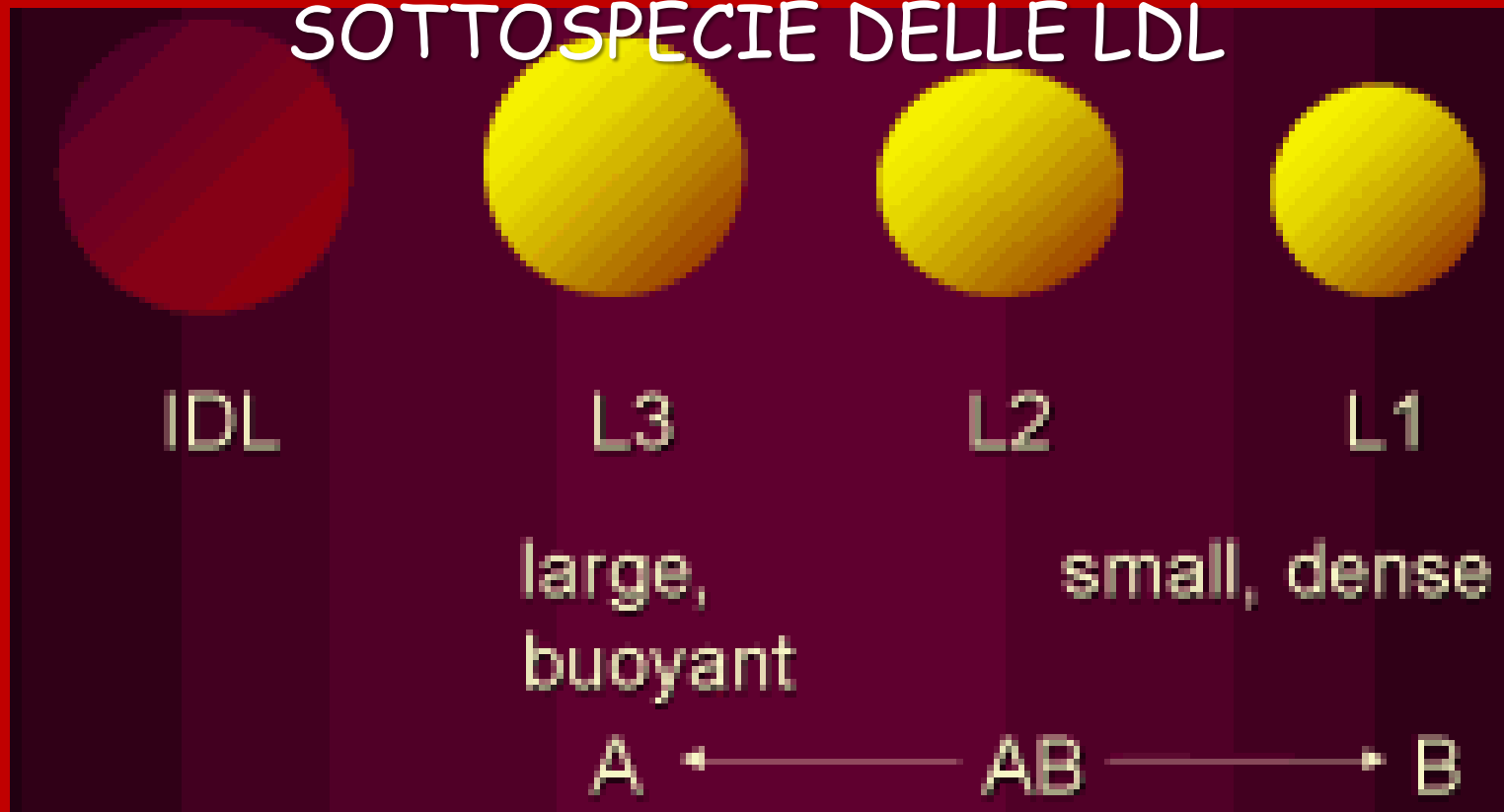
COLESTEROLO LDL (LDLc)

Porta i $\frac{3}{4}$ del colesterolo totale

i suoi livelli si associano al rischio cardiovascolare in numerosi studi (Gotto AM, 1990)

Quando le placche aterosclerotiche si sono formate, la riduzione di LDLc stabilizza le placche, riducendone il rischio di rottura e la morbidità e la mortalità cardiovascolare.

SOTTOSPECIE DELLE LDL



- Fenotipo A: predominano LDL grosse

- Fenotipo B: predominano LDL piccole e dense e determina maggiore rischio

Le LDL "piccole e dense" hanno le seguenti caratteristiche:

1. ridotto legame al recettore (ridotta clearance)
 2. aumentata affinità per i proteoglicani (accumulo in ateromi)
 3. aumentata suscettibilità alla ossidazione (placca infiammatoria)
- per questi motivi sono LDL maggiormente aterogene

SOTTOSPECIE LDL

LDL piccole-dense associate a aumento di Tgl e calo di HDLc costituiscono il quadro di "dislipidemia aterogena"

Le LDL piccole e dense sono misurabili solo in laboratori specialistici (vedi più avanti);

Metodi indiretti per la loro misura sono:

- il dato di un aumento dei Tgl come surrogato alla misura delle LDL piccole e dense*
- Il calcolo dell'indice aterogeno del plasma:*

Indice Aterogeno del Plasma (AIP) = $\text{Log}(\text{Tgl}/\text{HDLc})$

AIP < 0,11 – basso rischio

AIP 0,11-0,21 rischio intermedio

AIP > 0,21 rischio elevato

COLESTEROLO HDL (HDLc)

PROTEZIONE DAL RISCHIO

Le HDL proteggono dal processo di formazione della placca:

1. retrotrasporto del colesterolo

2. attività antiossidante

Di conseguenza HDLc è:

1. inversamente correlato al rischio di CAD

2. per ogni calo di HDLc di 5 mg/dL sotto al valore mediano di uomini e donne, il rischio di infarto miocardico acuto (AMI) aumenta del 25% (Framingham Heart Study)

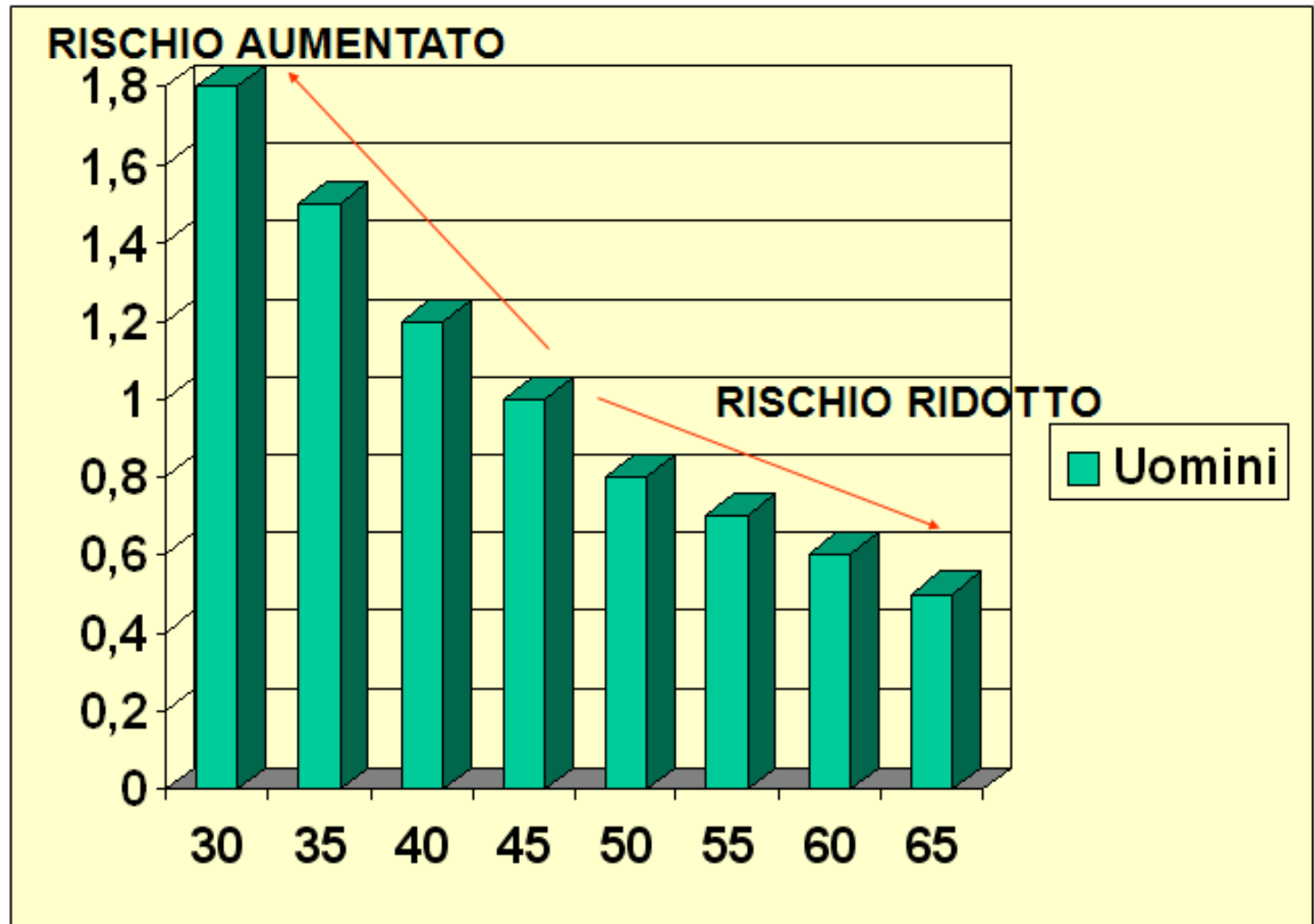
3. protettivo > 60 mg/dL

4. Rischio <40 mg/dL spesso associato a:

- lipoproteine aterogene (LDL piccole e dense)
- altri fattori di rischio (insulino-resistenza, diabete, ipertensione)

Rischio di CAD per livello di HDL-C

Rischio

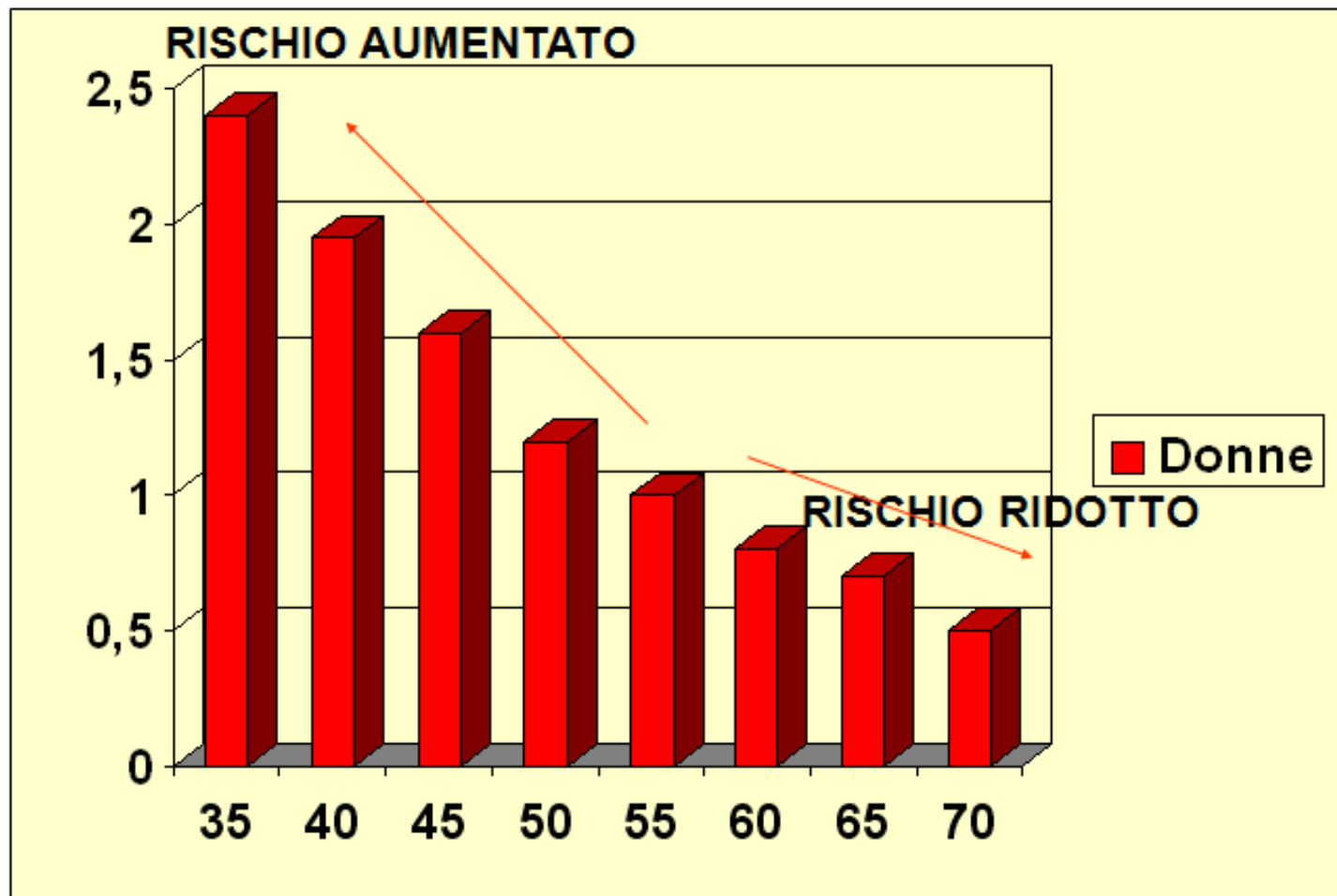


HDL-C (mg/dL)

CAD = malattia coronarica

Rischio di CAD per livello di HDL-C

Rischio



HDL-C (mg/dL)

SOTTOCLASSI HDL

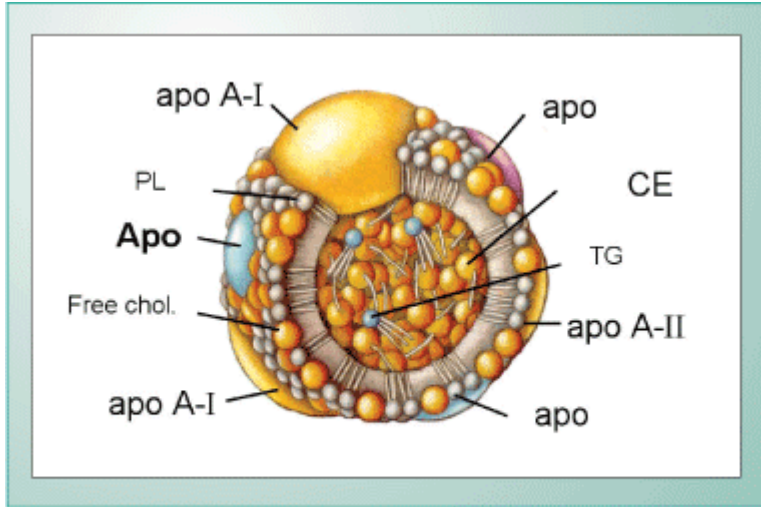
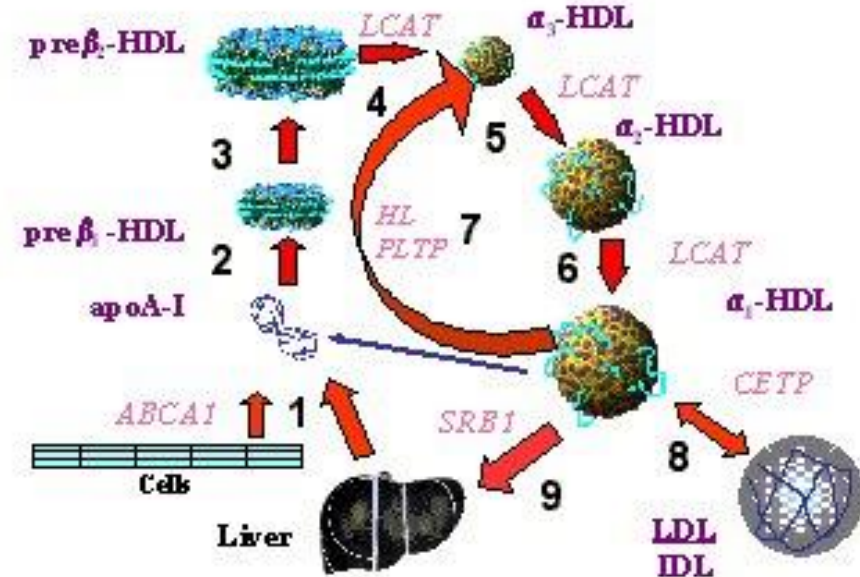


Fig. 1 - Composition of high-density lipoprotein (HDL). Apo = apoprotein; PL= phospholipids; chol. = cholesterol; CE = esterified cholesterol; TG= triglycerides.



In base alle dimensioni e alla densità si identificano due principali sottoclassi:

- HDL2 : grosse, inversamente correlate alla cardiopatia ischemica, opera il retrotrasporto del colesterolo
- HDL3 : piccole, hanno attività antiossidante perché portano l'enzima paraoxonasi (PON1)

Classificazione NCEP ATP III dei valori di colesterolo totale, LDL e HDL (mg/dL) nel rischio CVD primario

LDL colesterolo

<100	ottimale
100-129	subottimale
130-159	borderline elevato
160-189	elevato
>190	molto elevato

Colesterolo totale

<190	ottimale
190-239	borderline elevato
>240	elevato

HDL colesterolo

<40	basso (rischio)
≥60	alto (protezione)

TRIGLICERIDI (Tgl)

Meta-analisi: fattore di rischio indipendente
M, RR 1.32; F, RR 1.76 (Hokanson JE. J Cardiovasc Risk.
1996;3:213) M=maschi, F=femmine, RR = rischio relativo

Caerphilly and Speedwell Cohorts: fattore di rischio indipendente da Colesterolo Totale, LDLc e HDLc (Yarnell JW 2001)

Studi prospettici sui benefici della riduzione selettiva dei Tgl non sono realizzabili

Schemi di scoring del rischio globale

Gli schemi di scoring non includono Tgl, ma NCEP ATIII dà importanza alla misura ed abbassa il cut point a 150 mg/dL (Circulation 2002)

Ipertrigliceridemia

1. iperproduzione di VLDL
2. ridotto catabolismo di VLDL e/o chilomicroni remnant.
Dopo adesione all'endotelio, la successiva idrolisi dei Tgl ad opera della lipoproteinlipasi (LPL) porta a riduzione di volume delle particelle e loro penetrazione nel vaso

L' aumento dei Tgl spesso si associa a variazioni delle sottospecie di LDL e HDL, con calo di HDLc
(dislipidemia aterogena)

Ai fini di screening, diagnosi e trattamento della CHD ci si basa sui risultati del dosaggio dei lipidi sierici, per ottenere un profilo lipidico.

PROFILO LIPIDICO

Comprende la concentrazione di colesterolo totale, colesterolo HDL (HDL-C), e trigliceridi.

Con questi valori, si può stimare la concentrazione di colesterolo LDL (LDL-C).

Colesterolo Totale e HDL-C –

La loro misura nel siero è eseguita con **metodo diretto**, in soggetti **a digiuno o non a digiuno**; ci sono solo piccole differenze clinicamente insignificanti.

- Il **Colesterolo Totale** nello stesso individuo (**variabilità biologica intraindividuale**) può variare dal 4% al 11% a causa di molteplici fattori, tra cui stress, malattia lieve e postura.
- I valori possono variare tra i diversi laboratori (**variabilità analitica interlab**), così che con una singola misura il valore può variare fino al 14%. Quindi, in un individuo con una concentrazione "vera" nel siero di 200 mg/dl (5.2 mmol/L), il range di valori attesi è di 172-228 mg /dl (4,5-5,9 mmol /L). Queste osservazioni suggeriscono che **serve più di una misura di colesterolo per una sua determinazione valida.**
- **HDL-C** può dimostrare ancora **maggiore variabilità.**

Rapporto colesterolo totale su colesterolo HDL –

Il rapporto tra le concentrazioni di colesterolo totale o LDL-C su HDL-C è stato utilizzato in molti studi epidemiologici per categorizzare le popolazioni in sottogruppi ad alto e basso rischio.

Tuttavia, **non è consigliabile il loro uso per il trattamento dei singoli pazienti**, in quanto non c'è evidenza a suo supporto da parte di studi clinici randomizzati.

LDL-colesterolo

Equazione di Friedewald - LDL-C riportato nel profilo lipidico è generalmente calcolato utilizzando questa formula, secondo cui:

$LDL-C = \text{colesterolo totale} - HDL-C - \text{colesterolo VLDL (C-VLDL)}$.

Il colesterolo totale nel plasma o nel siero è la somma del colesterolo presente in ciascuna delle particelle lipoproteiche VLDL, HDL, e LDL.

La formula viene applicata per valori misurati a digiuno, perché nel non digiuno, il contributo dei chilomicroni post-prandiali al pool totale delle lipoproteine rende la formula meno accurata. Colesterolo totale e HDL-C sono misurati direttamente, mentre il valore di colesterolo associato alle VLDL è stimato con approssimazione dividendo per 5 il livello di trigliceridi, secondo la seguente equazione:

$LDL-C = \text{colesterolo totale} - HDL-C - (\text{Trigliceridi}/5)$.

Ci sono, tuttavia, diverse fonti di errore nella stima di LDL-C con la **formula di Friedewald**:

- **La formula è valida solo quando la concentrazione totale dei trigliceridi è inferiore a 400 mg/dl (4,516 mmol/L).** In pazienti con ipertrigliceridemia più pronunciata, i livelli di LDL-C devono essere misurati direttamente (LDLc diretto), tramite tecnica di immunoprecipitazione.
- **La stima è influenzata dall'errore di ciascun metodo di misura dei lipidi** (colesterolo totale, trigliceridi, e HDL colesterolo).
- **Il calcolo di VLDL-C (da trigliceridi) sottovaluta il contenuto di colesterolo delle lipoproteine aterogene a densità intermedia (IDL), e VLDL remnant.**
- **La concentrazione stimata di LDL-C comprende anche il colesterolo contenuto nella Lipoproteina (a).**

Misura diretta - Sono disponibili dosaggi per misurare direttamente la concentrazione di LDL-C e ciò va fatto **nei pazienti con una concentrazione di trigliceridi > 400 mg/dL (4,516 mmol/L).**

E' noto che anche nei pazienti con valori di trigliceridi più bassi, i dosaggi diretti possono dare risultati significativamente diversi rispetto al valore stimato di LDL-C, tuttavia **tutte le linee guida per il trattamento della ipercolesterolemia si basano sul valore stimato.**

L'entità della differenza dei valori di LDL-C con la equazione di Friedewald e la misura diretta è stata valutata in uno studio negli USA su 1.310.440 adulti sottoposti a profilo lipidico tramite ultracentrifugazione verticale su gradiente di densità che avevano trigliceridi <400 mg/dL (4,516 mmol/L).

La conclusione: l' LDL-C calcolato dall' Equazione Friedewald, diviene progressivamente inesatto, dando valori erroneamente inferiori con il crescere dei livelli di trigliceridi;

questo è particolarmente evidente per valori di LDL-C <70 mg/dL (1.81mmol L).

Ad es. tra i pazienti con Friedewald LDL-C <70 mg/dL,

- *il 23% aveva LDL-C diretto >70 mg/dL*
- *Saliva al 39% se i trigliceridi erano 150-199 mg/dL;*
- *Saliva al 59% se i trigliceridi erano 200-399 mg/dL.*

Altri metodi indiretti –

In alcuni pazienti l' LDL-C è più accurato se misurato direttamente anziché stimato con la equazione di Friedewald, ma la misura diretta è più costosa.

Sono stati proposti altri metodi indiretti, diversi da Friedewald, per ricavare LDL-C.

Un metodo relativamente semplice, validato in un campione di oltre 1,3 milioni di profili lipidici, utilizza un **fattore regolabile per il rapporto tra trigliceridi e VLDL-C**. La validità e l'utilità di questo metodo richiede ulteriori prove prima di poterne raccomandare l'uso.

Trigliceridi –

I trigliceridi sono trasportati da chilomicroni e particelle VLDL.

I livelli di trigliceridi sono influenzati da una recente assunzione di cibo e **devono essere misurati a digiuno.**

Cause di risultati inaccurati nel profilo lipidico –

- La presenza di una **proteina monoclonale** circolante può portare a valori falsamente bassi di HDLc e/o LDLc.

DIMENSIONI E NUMERO DI LDL –

Il colesterolo LDL (LDL-C) non quantifica con precisione il numero delle particelle LDL.

Ciò è più evidente quando prevalgono le particelle LDL piccole, che trasportano meno colesterolo rispetto a quelle grandi.

- Per la medesima quantità di LDL-C, il paziente con particelle LDL più piccole può richiedere circa il 70% in più di particelle di LDL rispetto al paziente con particelle LDL più grandi.
- Ci sono forti associazioni tra le particelle di LDL e le malattie cardiovascolari, che forniscono un razionale per **test avanzati per le sottoclassi di LDL e per il numero di particelle LDL** nella valutazione del rischio CVD e per la terapia.

DIMENSIONI E NUMERO DI LDL –

- Nei pazienti con insulino-resistenza (sindrome metabolica, diabete di tipo 2), vi è discordanza tra LDL-c e la concentrazione di particelle LDL o di apolipoproteina B. Ciò deriva da un **rimodellamento delle LDL nell'insulino-resistenza**, che si traduce in particelle piccole, impoverite di colesterolo. La concentrazione di particelle LDL piccole e il numero totale di particelle di LDL aumentano progressivamente con la gravità della insulino-resistenza, mentre i livelli di LDL-c non cambiano.
- In terapia con statine, i 2/3 dei diabetici di tipo 2 che hanno abbassato i livelli di LDLc <100 mg/dL sono a rischio perché hanno un eccesso di particelle LDL.

- Un numero superiore di particelle LDL è associato ad **aumentato rischio CVD**, indipendentemente dai lipidi marcatori (rassegna di 24 studi nel 2009).
- Tuttavia, la misura delle **sottofrazioni o distribuzione** delle dimensioni delle LDL generalmente **non aggiunge miglioramento nella previsione del rischio** rispetto ai fattori di rischio tradizionali;
- ma **nei pazienti ad alto rischio cardiometabolico**, è di **beneficio** nel migliorare la stratificazione del rischio e come guida alla terapia modificante le lipoproteine.

Le dimensioni delle particelle lipoproteiche sono misurate in laboratori specializzati tramite diverse tecniche analitiche:

- risonanza magnetica nucleare (NMR)
 - gel elettroforesi con gradiente
 - ultracentrifugazione analitica
 - mobilità ionica (IM)

Colesterolo non-HDL –

E' definito come la differenza tra il colesterolo totale e HDL-C (**Colesterolo totale – HDLc**).

Comprende tutto il colesterolo presente nelle particelle lipoproteiche aterogene, incluse le lipoproteine a bassa densità (LDL), la lipoproteina(a) (Lpa), lipoproteine a densità intermedia (IDL), e lipoproteine a bassissima densità (VLDL).

Si è suggerito che la frazione non-HDL-C può essere uno strumento migliore di LDL-C per la valutazione del rischio di LDL-C.

INDICAZIONI PER LE MISURE

Profilo lipidico - Un profilo lipidico a digiuno è raccomandato per:

- lo screening di anomalie dei lipidi
 - il rischio cardiovascolare
 - il monitoraggio della terapia.

Si richiede la misura di tutti i componenti del profilo lipidico e si sconsiglia di richiedere solo singoli componenti, anche se una come il LDL-C è di interesse primario.

INDICAZIONI PER LE MISURE

La misura periodica di LDL-C è utile per valutare se un paziente ha centrato l'obiettivo di LDL-C o se ha aderito al trattamento.

Non esistono dati certi sul modo ottimale di monitorare la terapia ipolipemizzante, ma è ragionevole controllare l'LDL-C

- **ogni sei settimane dopo l'inizio del trattamento fino a quando il target è raggiunto e**
- **successivamente, una misura ogni 6-12 mesi.**

Altre misure di LDL –

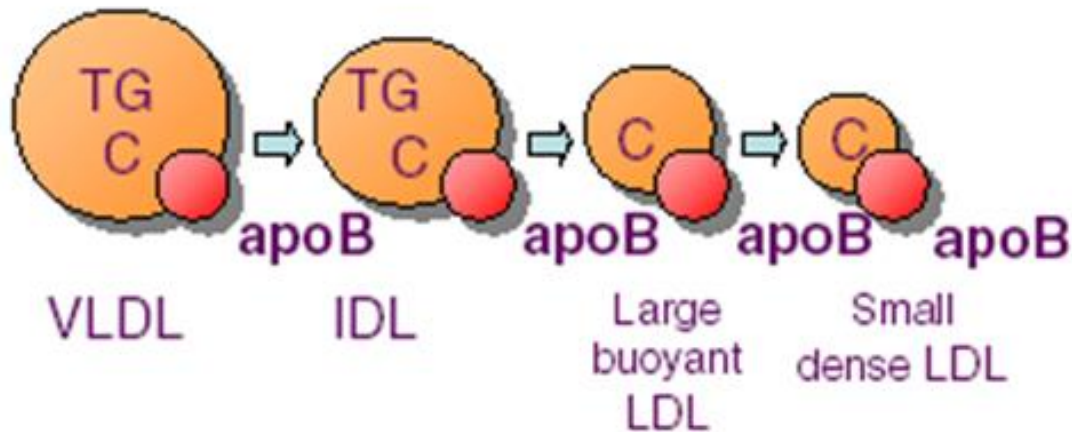
E' indicato misurare la concentrazione delle particelle LDL, o la misura della concentrazione di **apolipoproteina B (ApoB)** come suo surrogato, **nei soggetti con insulino-resistenza che hanno raggiunto il loro obiettivo minimo accettabile di LDLc.**

Queste informazioni consentono indicazioni terapeutiche, come:

- un aumento della dose di statine o
- una terapia combinata con statina più o niacina o fibrati.

Le lipoproteine -

Dal fegato



Aterogene

Indietro al fegato

Retrotrasporto
del colesterolo



Anti-aterogene

APOLIPOPROTEINE

La misura delle apolipoproteine quantifica le particelle aterogene (**apoB**) e quelle antiaterogene (**apo A-I**):

una particella = una molecola di apolipoproteina

Studio INTERHEART:

dislipidemia definita come aumentato rapporto apoB/apoA-I è responsabile del 49% del rischio attribuibile alla popolazione per primo AMI.

$$\frac{(\text{rischio negli esposti} - \text{rischio nei non esposti})}{\text{rischio negli esposti}}$$

APOLIPOPROTEINE

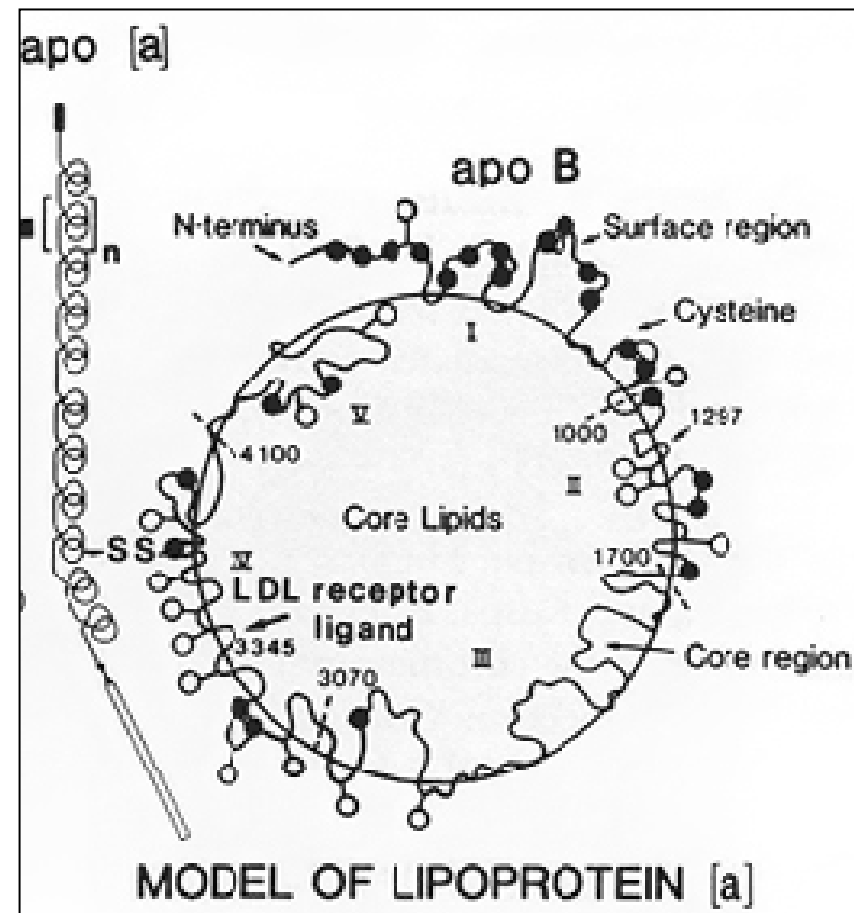
- Alcuni suggeriscono che la misura delle lipoproteine o apolipoproteine può essere **utile in alcuni pazienti**.
- Le linee-guida del 2010 dell'American College of Cardiology Foundation/American Heart Association **non raccomandano** comunque l'uso di questi test per la valutazione del rischio cardiovascolare **negli adulti asintomatici**.

LIPOPROTEINA (a) –

è costituita da una lipoproteina LDL cui è legata la **apolipoproteina(a)**, una glicoproteina simile al **plasminogeno**.

La catena apo (a) contiene cinque domini ricchi di cisteina noti come "kringles". Il quarto Kringle è omologo al dominio di legame del plasminogeno alla fibrina.

A causa di questa somiglianza strutturale con il plasminogeno, la Lp (a) interferisce con la fibrinolisi, competendo con il legame del plasminogeno alle molecole e alle cellule. Ciò **inibisce l'attivazione del plasminogeno, la generazione di plasmina e la fibrinolisi**.



LIPOPROTEINA (a) -

Ruolo nell'aterosclerosi

- **Lp (a) si lega anche ai macrofagi** tramite un recettore ad alta affinità che promuove la formazione delle **cellule schiumose** e la deposizione di colesterolo nelle placche aterosclerotiche.
- Quindi lipoproteina (a) può essere in grado di contribuire ad **aterosclerosi e trombosi insieme.**

LIPOPROTEINA (a) -

I livelli nel plasma di Lp(a) possono variare fino a mille volte tra gli individui sani, essendo determinati da variazioni nel gene LPA che codifica la apo(a).

Il polimorfismo di ripetizione Kringle IV tipo 2 (KIV-2) ricorre da 2 e 40 volte per ogni allele e determina la dimensione della apo(a), che si correla inversamente con i livelli nel plasma di Lp(a).

Secondo il Framingham Heart Study, il 90 ° percentile dei livelli di Lp (a) è **39 mg/dL (1.39 μmol/L) negli uomini** e **39,5 mg/dL (1,41 μmol/L) nelle donne** (unità di massa).

LIPOPROTEINA (a) -

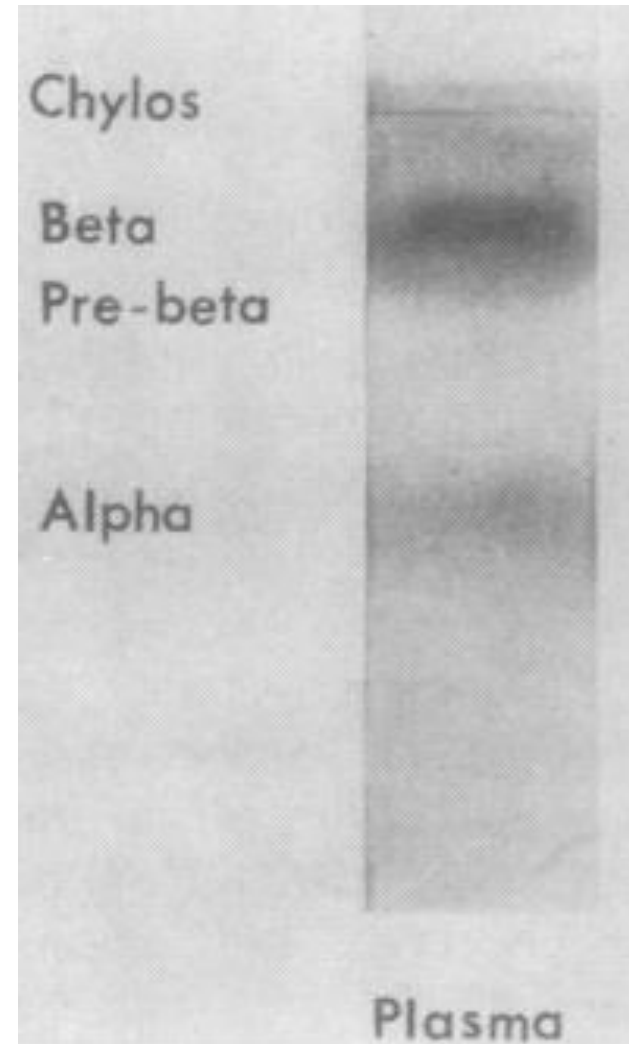
Le **isoforme piccole** sono dannose per altri motivi oltre alla concomitanza di **elevati livelli di Lp(a)**.

Infatti:

- Un numero inferiore di repeat KIV-2 si associa con un **umentato rischio di infarto del miocardio (MI)**.
- I portatori di 2 rari **polimorfismi allelici a singolo nucleotide (SNP) (rs3798220 e rs10455872)** che **etichettano il polimorfismo KIV-2 repeat**, sono ad **umentato rischio di CHD**.

Misura della concentrazione serica di Lp(a) –

Lp(a) è stata inizialmente individuata come un "affondamento" della banda delle lipoproteine pre-beta (sinking pre-beta) rilevato mediante **elettroforesi su gel**.



Misura della concentrazione serica di Lp(a) –

- Il metodo di riferimento per la misura della Lp (a) è la **ultracentrifugazione a densità di gradiente**.
- **Tecniche ELISA** sono oggi ampiamente disponibili, ma molti di questi metodi sono insensibili e incapaci di distinguere tra le isoforme apo(a) e quindi possono provocare sottostime o sovrastime significative dei livelli di Lp(a).
- Un test disponibile in commercio allo stato dell'arte utilizza un **metodo immunoturbidimetrico innalzato con lattice** e misura la concentrazione di Lp(a), indipendentemente dalla dimensione di apo (a) e il numero di ripetizioni Kringle-IV.

Negli individui **i livelli di Lp (a) sono stabili nel tempo.**

LIPOPROTEINA (a) -

RISCHIO CVD –

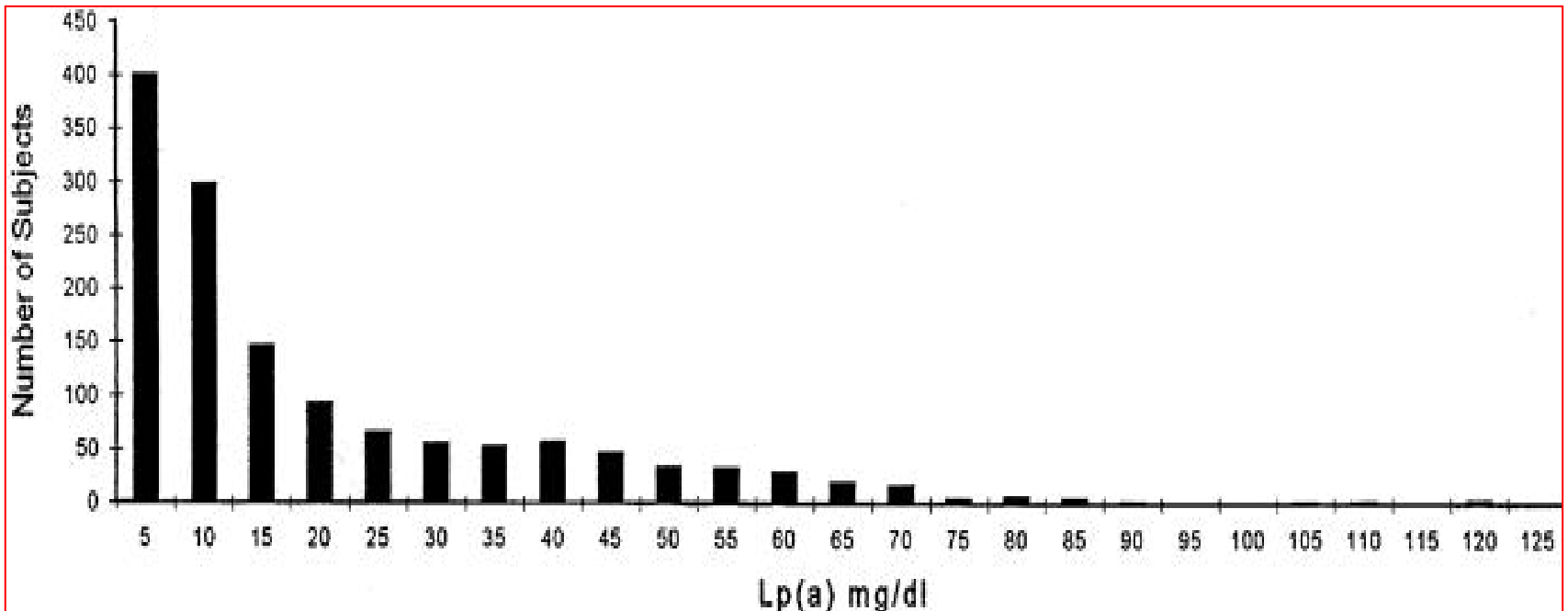
Studi epidemiologici e meta-analisi dimostrano una robusta e specifica **associazione di elevati livelli di Lp(a) con aumentato rischio di CHD.**

- Da una meta-analisi del 2009 (comprendente oltre 120.000 partecipanti in 36 studi prospettici) l'associazione tra Lp(a) e **rischio CHD è continuo e il rapporto di rischio è 1,13**, dopo aggiustamento per i fattori di rischio tradizionali.

Da una revisione sistematica (40 studi con 58.000 partecipanti) il **rischio relativo di CHD è 2.08 per quelli con isoforme apo(a) piccole**, rispetto a quelli con grandi isoforme.

Rischio CVD -

In particolare, sono i livelli estremi di Lp(a) che si associano ad un rischio notevolmente aumentato. Tuttavia, i dati sui **livelli estremi di Lp(a) e/o corrispondenti genotipi LPA a rischio non sono inclusi negli attuali strumenti di previsione del rischio CVD** e pertanto possono rimanere non identificati.



Rischio CVD -

Recentemente, uno studio, che ha combinato i dati di 24 studi prospettici, riporta **solo lievi miglioramenti nella previsione del rischio CHD dopo aggiunta di Lp(a)** ai livelli dei fattori di rischio convenzionali.

Ma ciò vale per la media delle persone con livelli bassi e moderati, perché **la misura della Lp(a) migliora sostanzialmente la previsione del rischio delle persone con livelli estremi**, un approccio medico comunemente seguito.

SCREENING –

Allo stato attuale, lo screening e il trattamento di livelli eccessivi di Lp(a) deve essere considerato solo per:

- **pazienti con malattia coronarica (CHD) senza alcun'altra dislipidemia identificabile**
- **pazienti con una forte storia familiare di malattia coronarica e nessuna altra dislipidemia**
- **pazienti con ipercolesterolemia refrattaria alla terapia con farmaci per abbassare il colesterolo LDL.**
 - Infatti, in alcuni pazienti l'eccesso di Lp(a) risulta come componente significativa del livello di colesterolo LDL calcolato dalla formula di Friedewald, e le terapie standard per abbassare i livelli di LDL-C non abbassano apprezzabilmente i livelli di Lp(a).

COLESTEROLO REMNANT COME FATTORE DI RISCHIO:

Verso il superamento del
prelievo a digiuno?

COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NON-A-DIGIUNO

Il **Colesterolo Remnant** è il contenuto di colesterolo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, composte da

- lipoproteine a bassissima densità (VLDL) e lipoproteine a densità intermedia (IDL) **a digiuno** e
- da queste 2 lipoproteine insieme con i chilomicroni remnant nello stato di **non-digiuno**.

➤ **Elevati trigliceridi** plasmatici nel non-digiuno sono un marker di **elevato colesterolo remnant**, che si associa ad aumentato rischio di malattia cardiovascolare .

Poiché è improbabile che i trigliceridi di per sé causino direttamente malattie cardiovascolari, è più

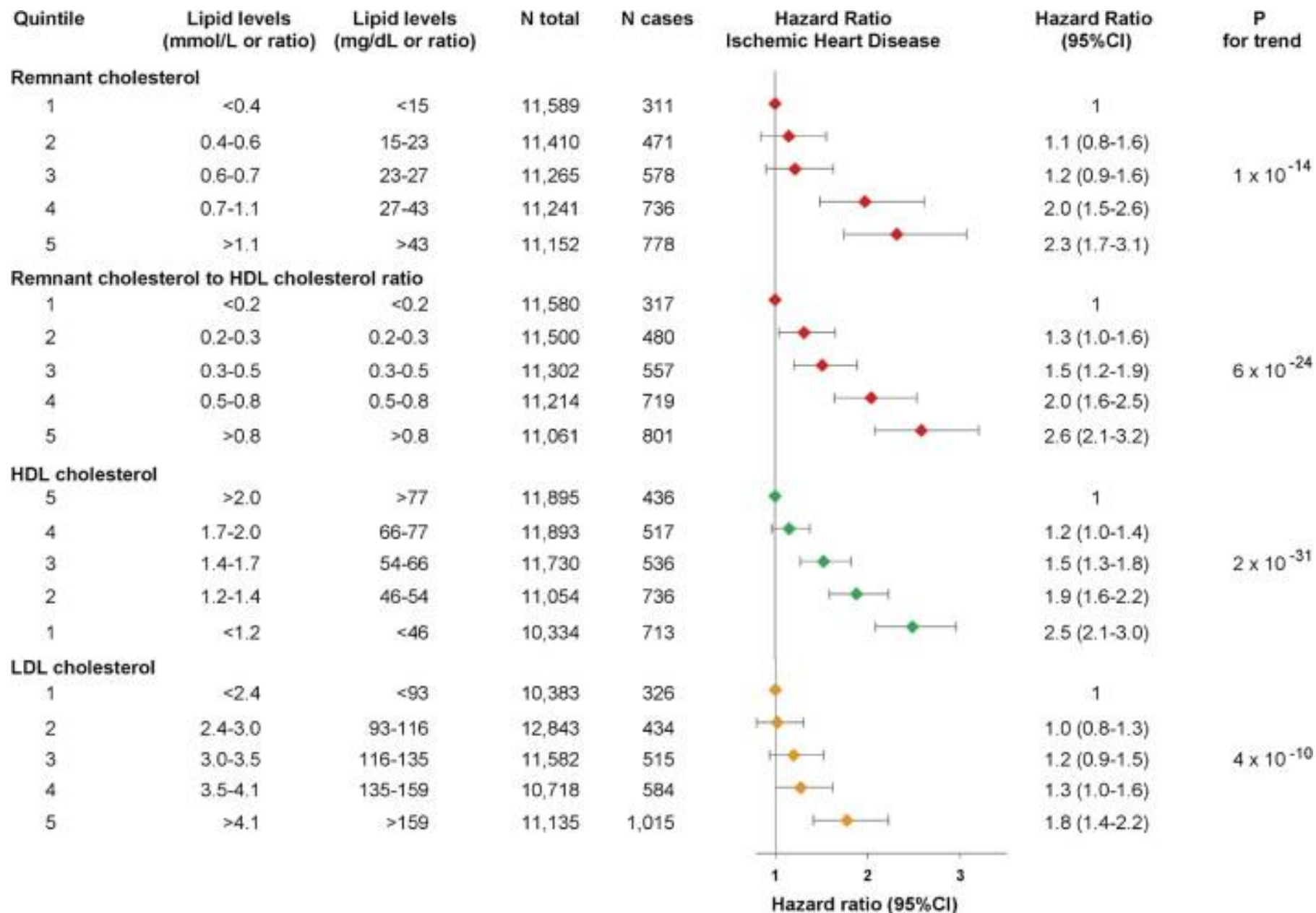
COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NON-A-DIGIUNO

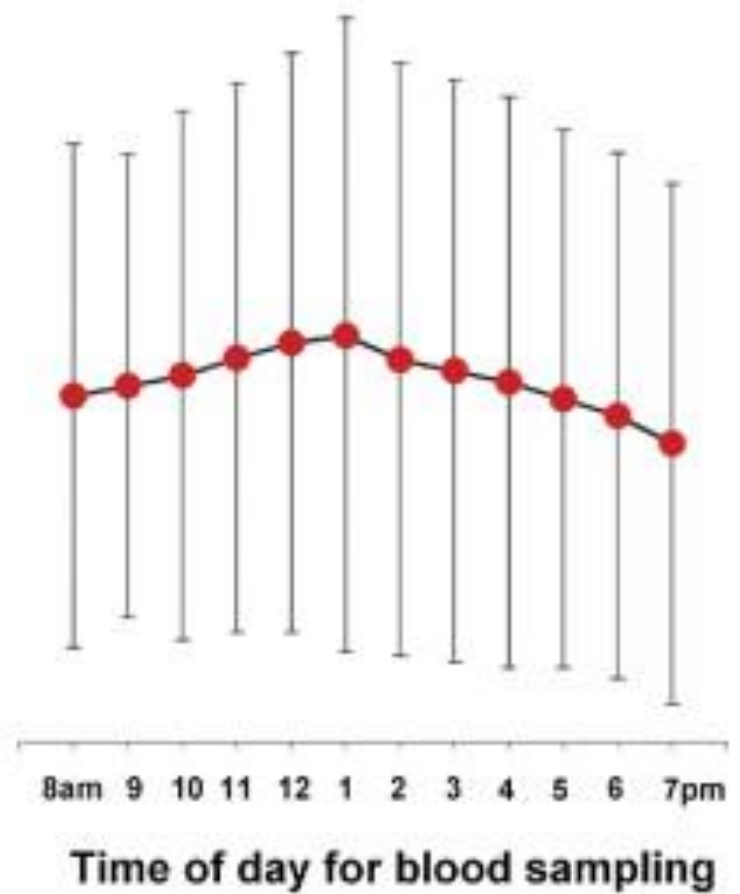
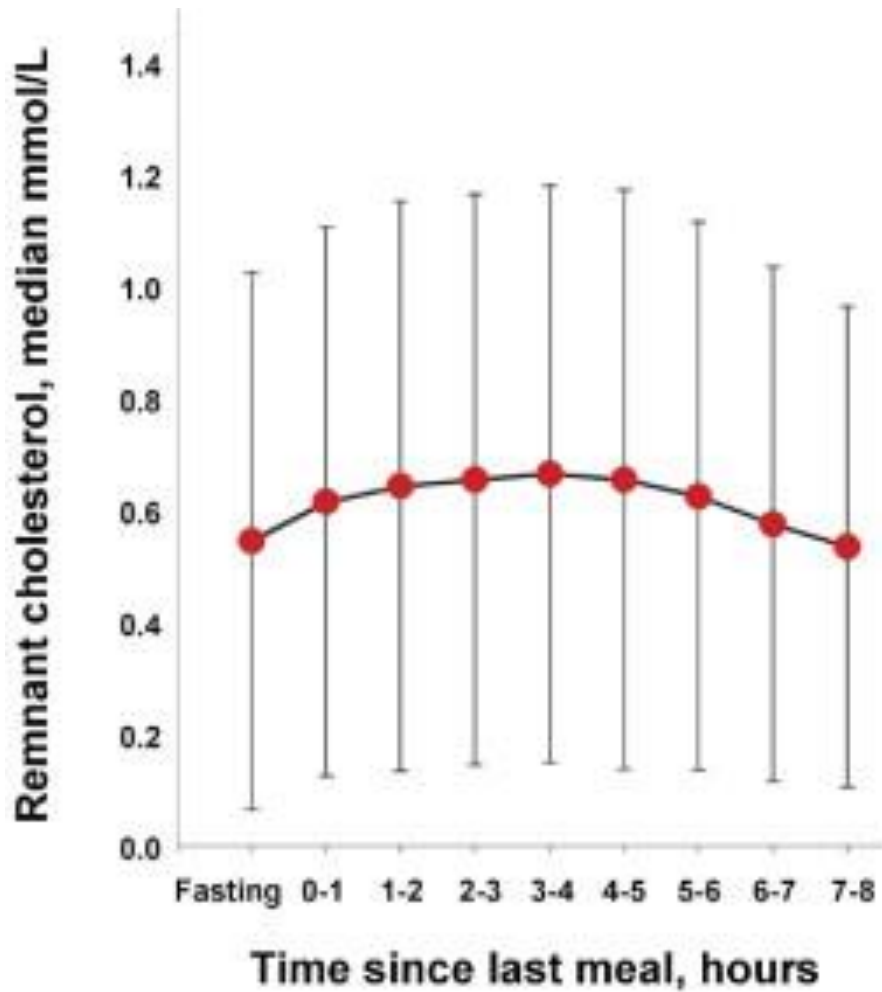
- **L'elevazione del colesterolo remnant si associa anche ad una riduzione delle lipoproteine ad alta densità (HDL).** *Tuttavia, poiché aumenti di colesterolo HDL non riescono a ridurre le malattie cardiovascolari, è più probabile che sia l'elevato colesterolo remnant un fattore causale rispetto al ridotto colesterolo HDL.*

COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NON-A-DIGIUNO

Uno studio condotto in Danimarca su 73513 soggetti di entrambi i generi con età compresa tra 46 e 71 anni (Varbo A et al. J Coll Am Cardiol 2013) ha evidenziato che:

- un **aumento di 1 mmol / l (39 mg / dl) di Colesterolo Remnant nel non-digiuno** è associato ad un **rischio causale 2,8 volte superiore per cardiopatia ischemica, indipendente** da un ridotto Colesterolo HDL.





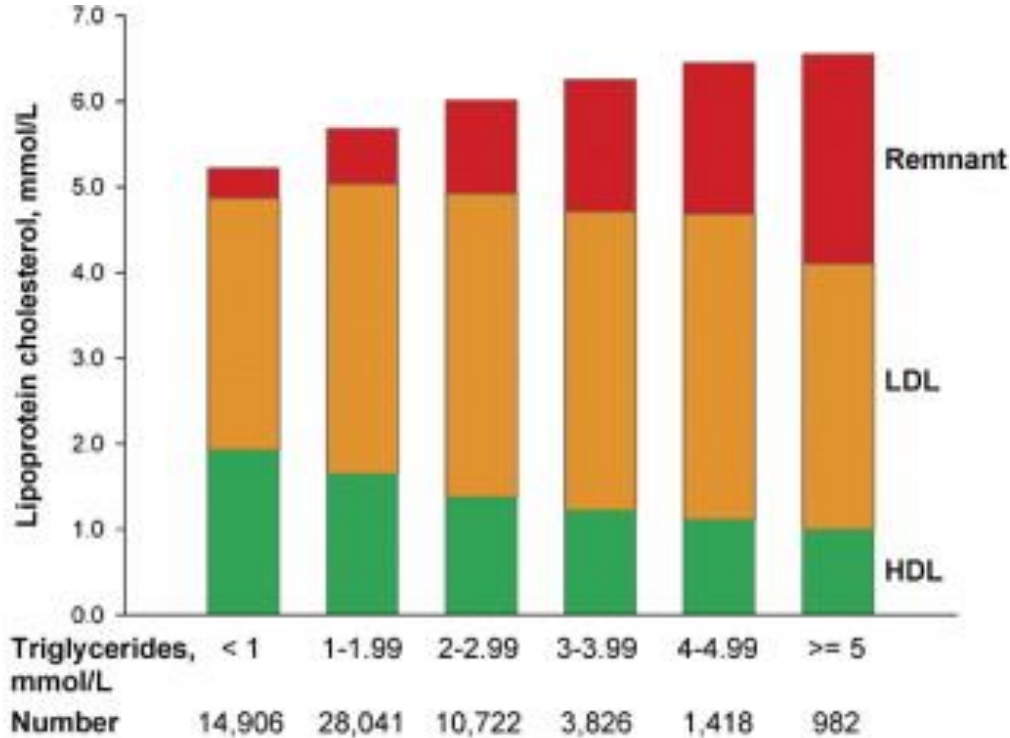
Number

598	8,937	12,272	15,241	11,751	7,058	2,499	745	359
-----	-------	--------	--------	--------	-------	-------	-----	-----

Number

1,194	1,440	1,538	1,512	1,457	1,110	2,884	15,569	13,951	12,809	5,555	284
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	-------	-----

Colesterolo Remnante in funzione del tempo dall'ultimo pasto e dell'orario del prelievo Mediane con range interquartili (barre d'errore).



Associazioni e Correlazioni tra Colesterolo Lipoproteico e Trigliceridi

(Alto) Distribuzione del colesterolo nelle lipoproteine in funzione dell'aumento dei livelli di trigliceridi nel non-digiuno.

	R ²	Remnant cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	Triglycerides
Remnant cholesterol			-0.45	0.12	0.96
HDL cholesterol		p<0.001		-0.12	-0.42
LDL cholesterol		p<0.001	p<0.001		0.12
Triglycerides		p<0.001	p<0.001	p<0.001	

(Basso) Matrice di correlazione di lipidi e lipoproteine.
 HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein.

COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NEL NON-DIGIUNO

Meccanicisticamente, la spiegazione di un effetto causale dell' elevato colesterolo residuo nel non-digiuno potrebbe essere che:

- queste **lipoproteine ricche di trigliceridi entrino e rimangano intrappolate nel intima della parete arteriosa**. *Analoga alla cattura delle LDL nell'intima, questo meccanismo comporterebbe l'accumulo di colesterolo intinale, aterosclerosi e cardiopatia ischemica in ultima analisi.*
- a differenza delle LDL, le lipoproteine remnant e quelle ricche in trigliceridi **non hanno bisogno di essere ossidate per essere inglobate nei macrofagi** per causare la formazione delle cellule schiumose e l'aterosclerosi.

COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NEL NON-DIGIUNO

Il Colesterolo Remnant può essere **calcolato direttamente da un profilo lipidico standard, purché il prelievo venga fatto nel non-digiuno**, come è stato raccomandato in Danimarca dal 2009:

**Colesterolo Remnant nel non-digiuno, =
Colesterolo Totale nel non-digiuno - Colesterolo HDL -
Colesterolo LDL**

COLESTEROLO REMNANT E TRIGLICERIDI NON-A-DIGIUNO

Fatto importante, il **Colesterolo Remnant** è **direttamente correlato ai trigliceridi plasmatici**, perché il colesterolo remnant è il colesterolo contenuto nelle lipoproteine ricche in trigliceridi.

IN FUTURO

Questi risultati possono aiutare gli sforzi futuri diretti a ridurre le malattie cardiovascolari al di là della riduzione ottenuta con statine.

Il focus di futuri studi di intervento dovrebbe essere non solo la riduzione dei livelli di colesterolo LDL, ma anche la **riduzione dei livelli di Colesterolo Remnant** nel non-digiuno e di lipoproteine ricche in trigliceridi o, in alternativa, la riduzione di apolipoproteina B nel non-digiuno o del colesterolo non-HDL, entrambi i quali includono le lipoproteine remnant o ricche in trigliceridi.



Rischio Cardiovascolare



PARTE 3

**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon



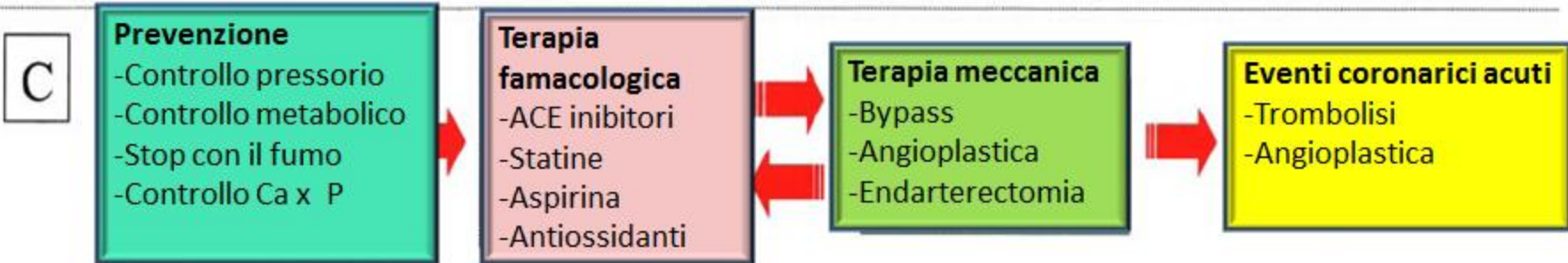
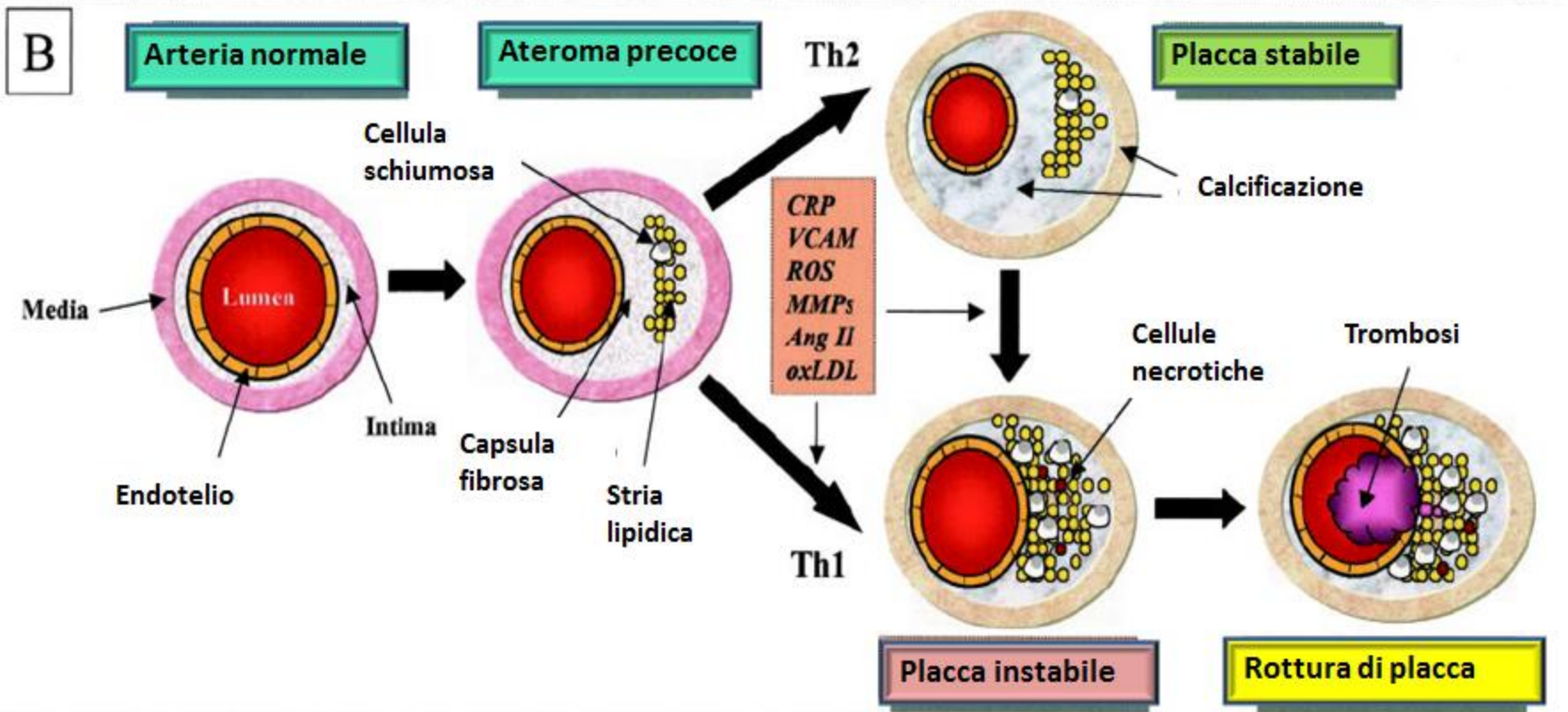
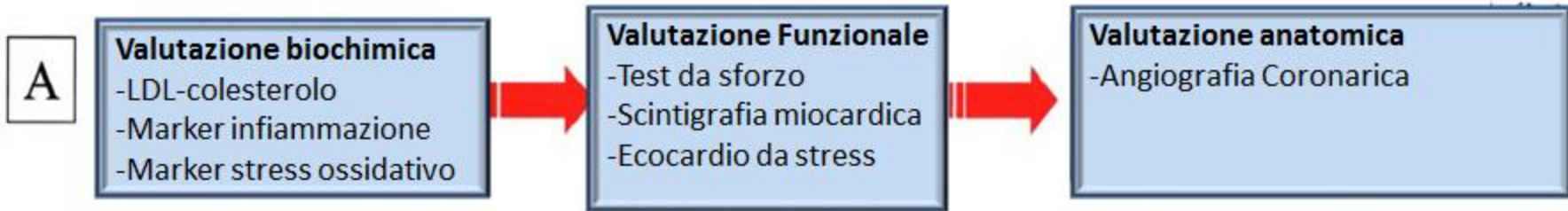


Marcatori d'inflammatione

Marcatori d'inflammatione

I livelli plasmatici dei marcatori di inflammatione sono associati al rischio cardiovascolare:

- la generazione della placca aterosclerotica è di per sé un processo infiammatorio e
- la rottura della capsula è favorita dal processo infiammatorio.



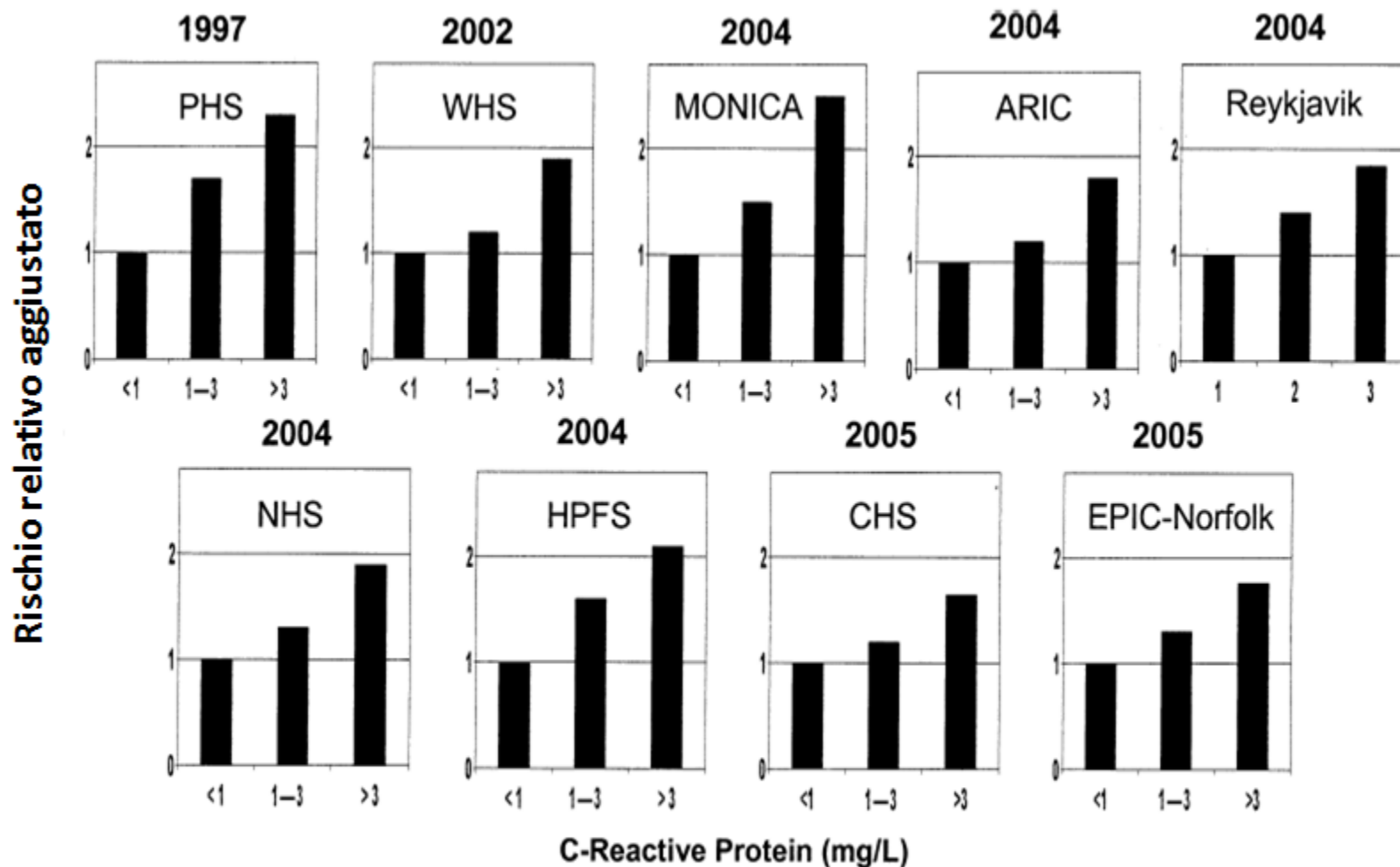
Proteina C-reattiva (CRP)

Misurata con **metodo ultrasensibile (hs-CRP)** la concentrazione di CRP predice eventi vascolari

- **cardiaci,**
- **cerebrali,**
- **arteriosi periferici.**

Dimostrato in oltre 30 studi coorte (MONICA, ARIC, Cardiovascular Heart Study, Framingham Heart Study).

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP in vari studi



I tre livelli di rischio:

Basso <1mg/L

Intermedio 1-3 mg/L

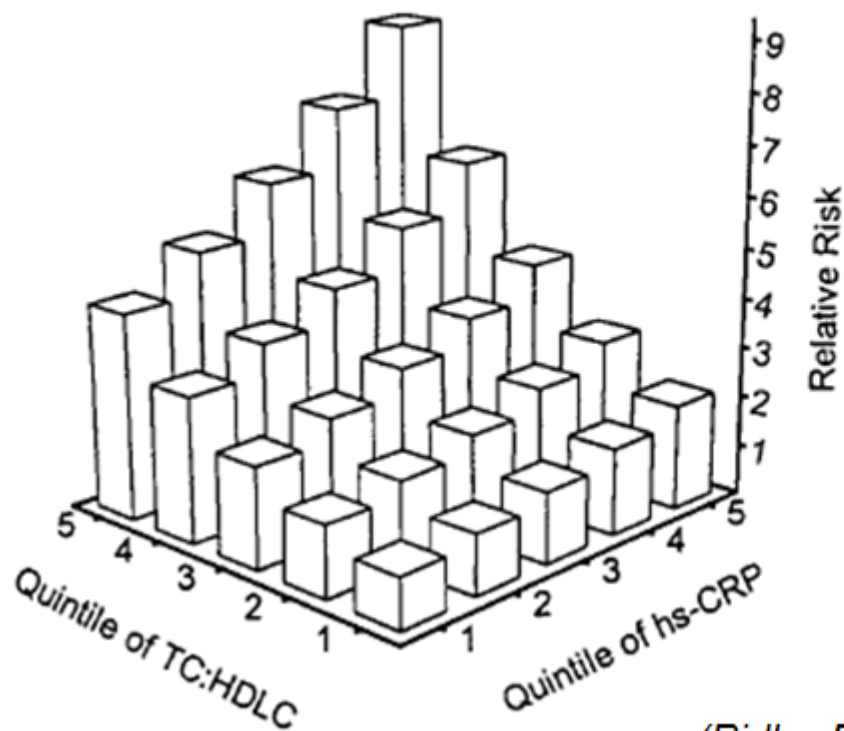
Alto >3 mg/L

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità (hs-CRP)

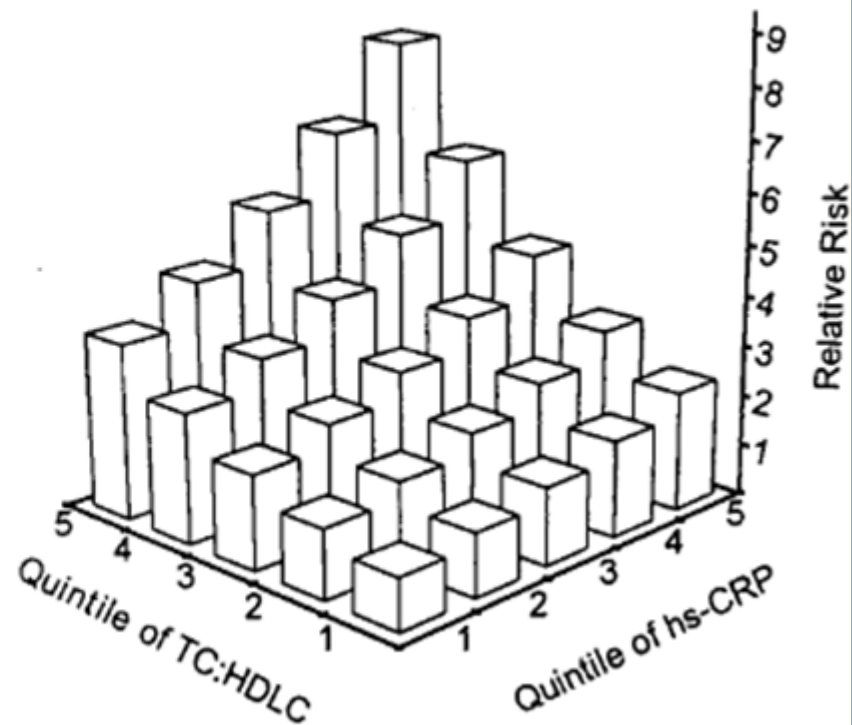
Associando i valori di CRP con quelli lipidici la definizione del rischio migliora.

Physicians' Health Study

Uomini



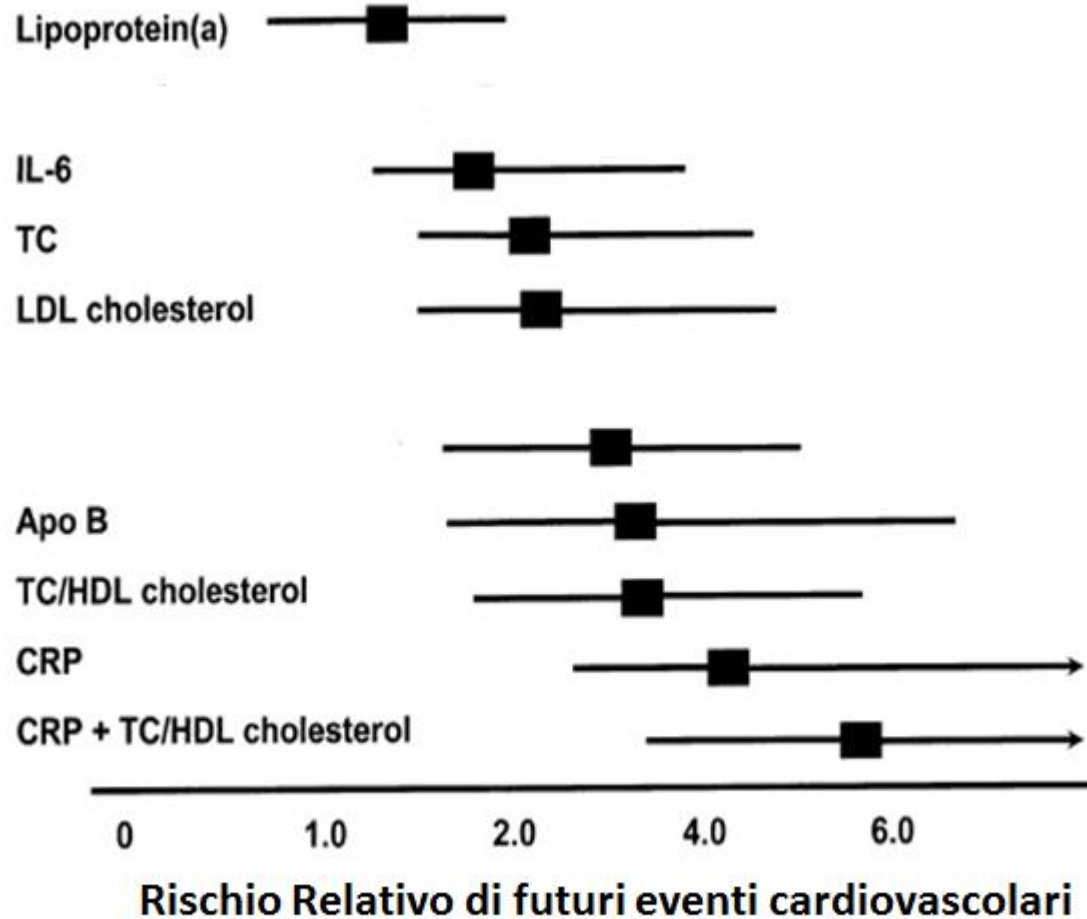
Donne



(Ridker PM JAMA 2005)

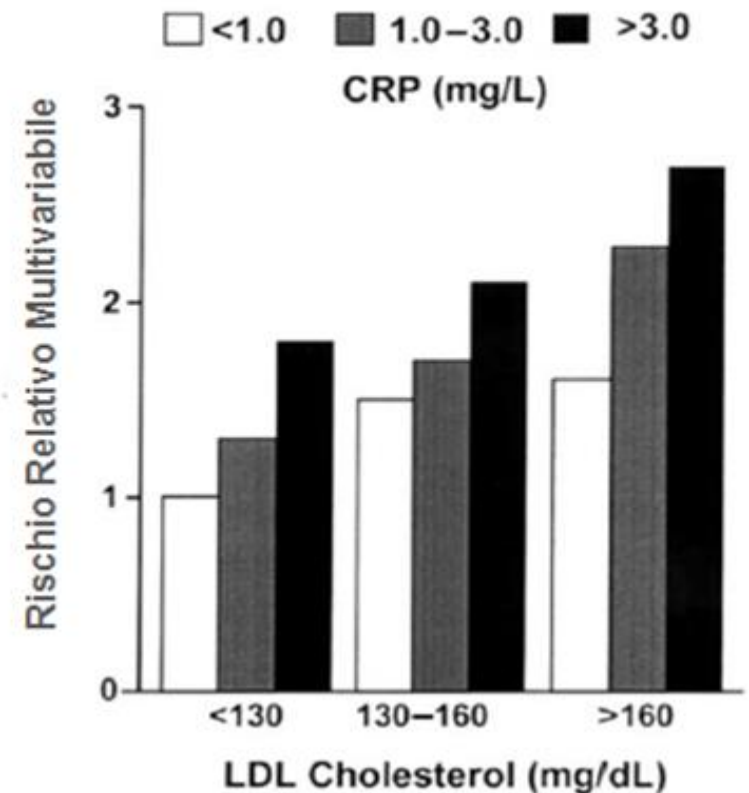
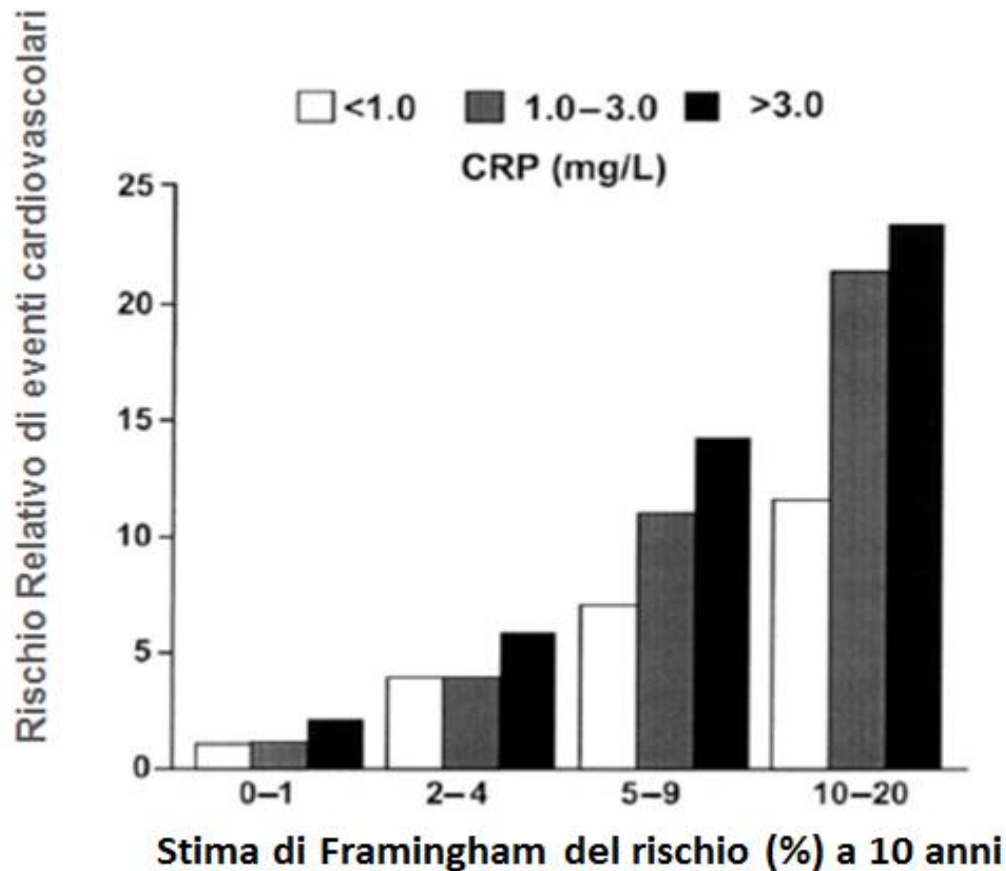
Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP

Confronto tra i fattori di rischio



In donne apparentemente sane (Women's Health Study)

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP



CRP aggiunge informazioni prognostiche indipendenti a tutti i livelli dello score di Framingham del rischio (sinistra) e a tutti i livelli di LDLc (destra)

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP

L'algoritmo noto come «[Reynolds risk score](#)» è stato validato in uomini e donne (*Ridker PM. JAMA 2007 e Ridker PM. Circulation 2008*) e, utilizzando il dato di hs-CRP, riclassifica appropriatamente il 20-30% dei soggetti con rischio intermedio in soggetti ad alto o basso rischio.

L'utilità della hsCRP nella riclassificazione del rischio è stata confermata anche nel [Framingham Heart Study](#) (*Wilson PWF. 2008*)

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP

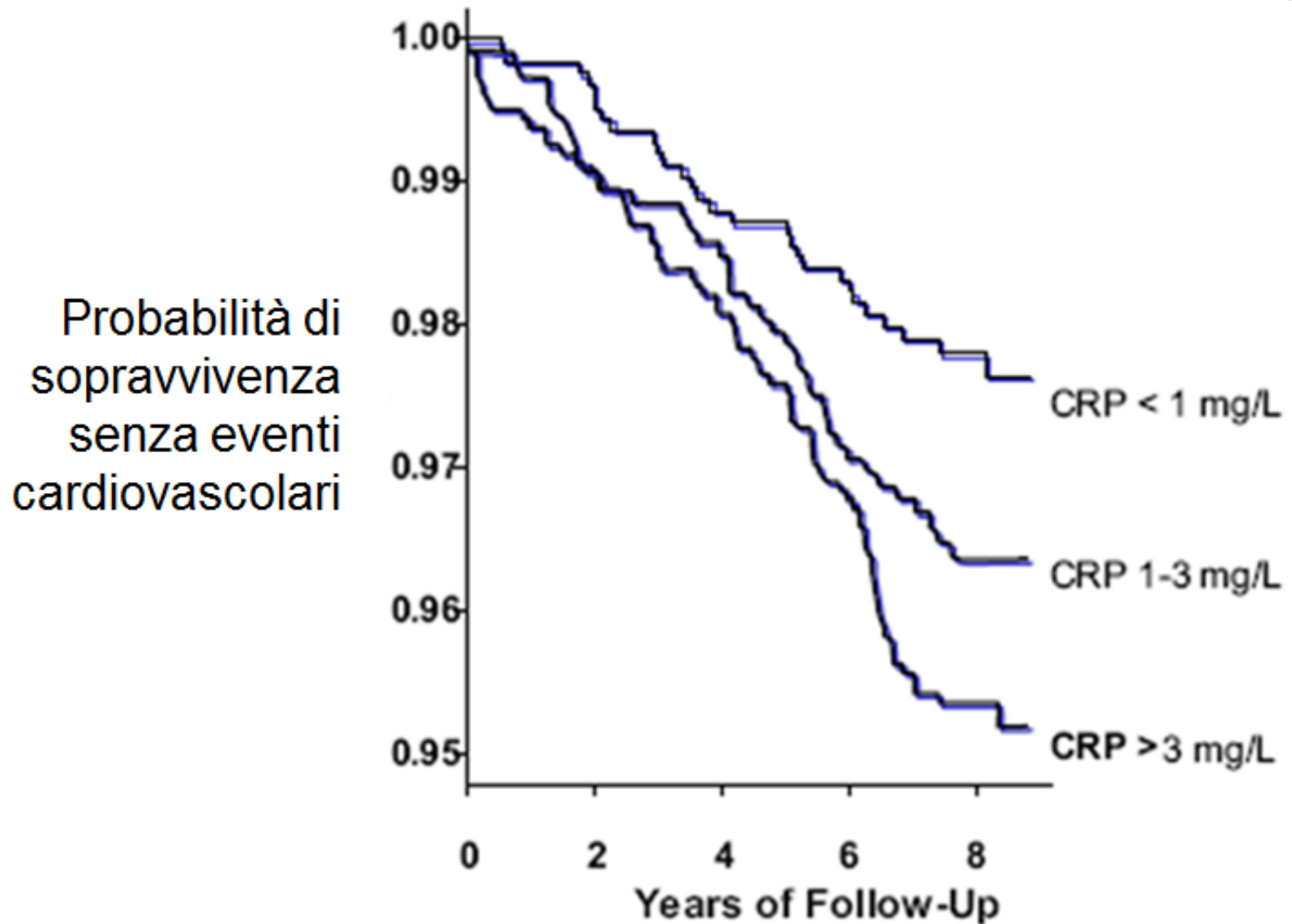
Lineeguida AHA/CDC (*Pearson TA Circulation 2003*)
raccomandano i seguenti cut points:

<1 mg/L basso rischio

1-3 mg/L rischio moderato

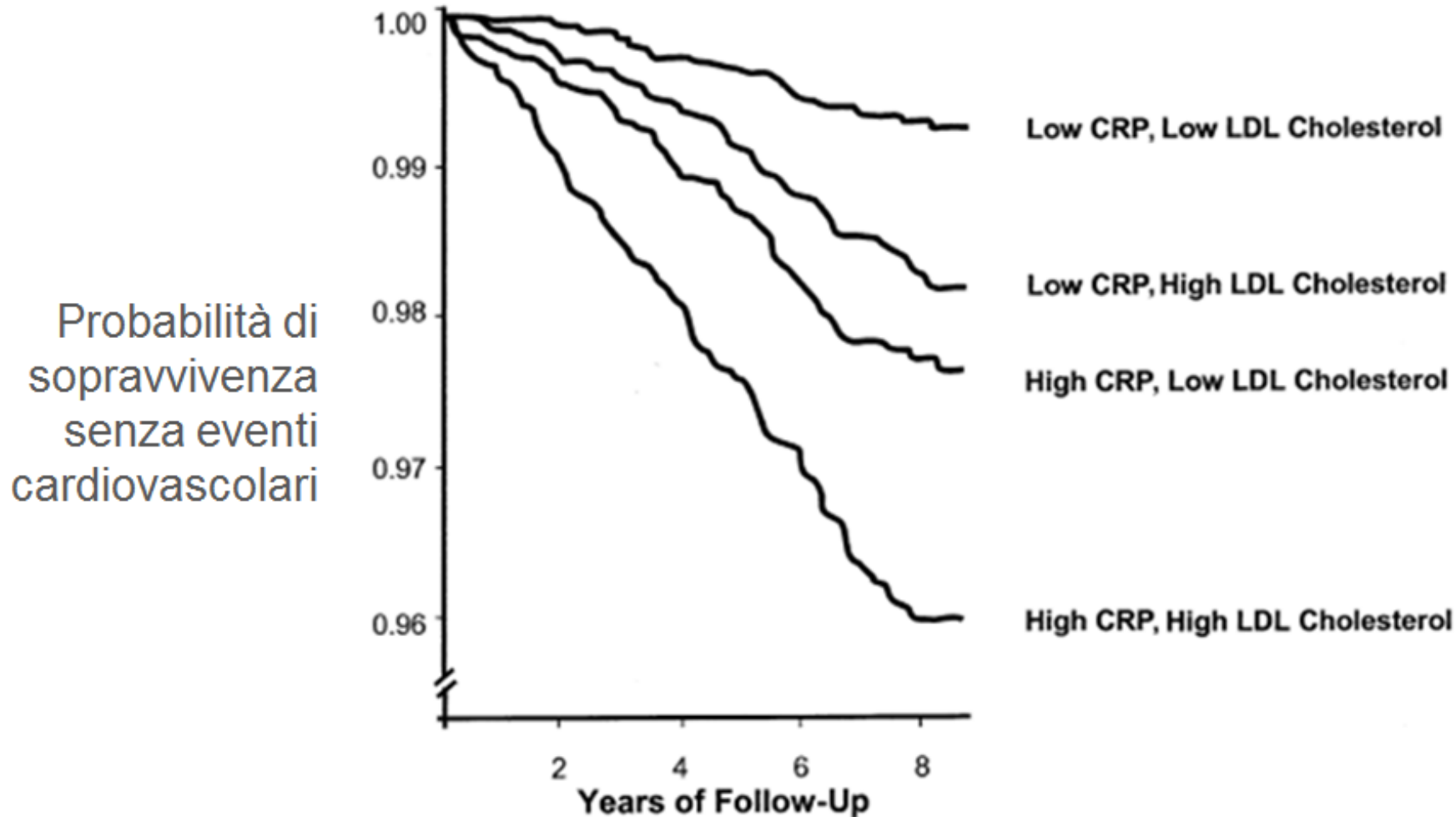
>3 mg/L alto rischio

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP



Valore predittivo clinico di hs-CRP ai tre livelli decisionali in individui con sindrome metabolica (*Circulation* 2004)

Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP



Women Health Study

Curve di Kaplan-Meier in 4 gruppi basati su alti e bassi livelli di CRP e LDLc.

CRP basso = 1,52 mg/L e LDLc basso = 124 mg/dL

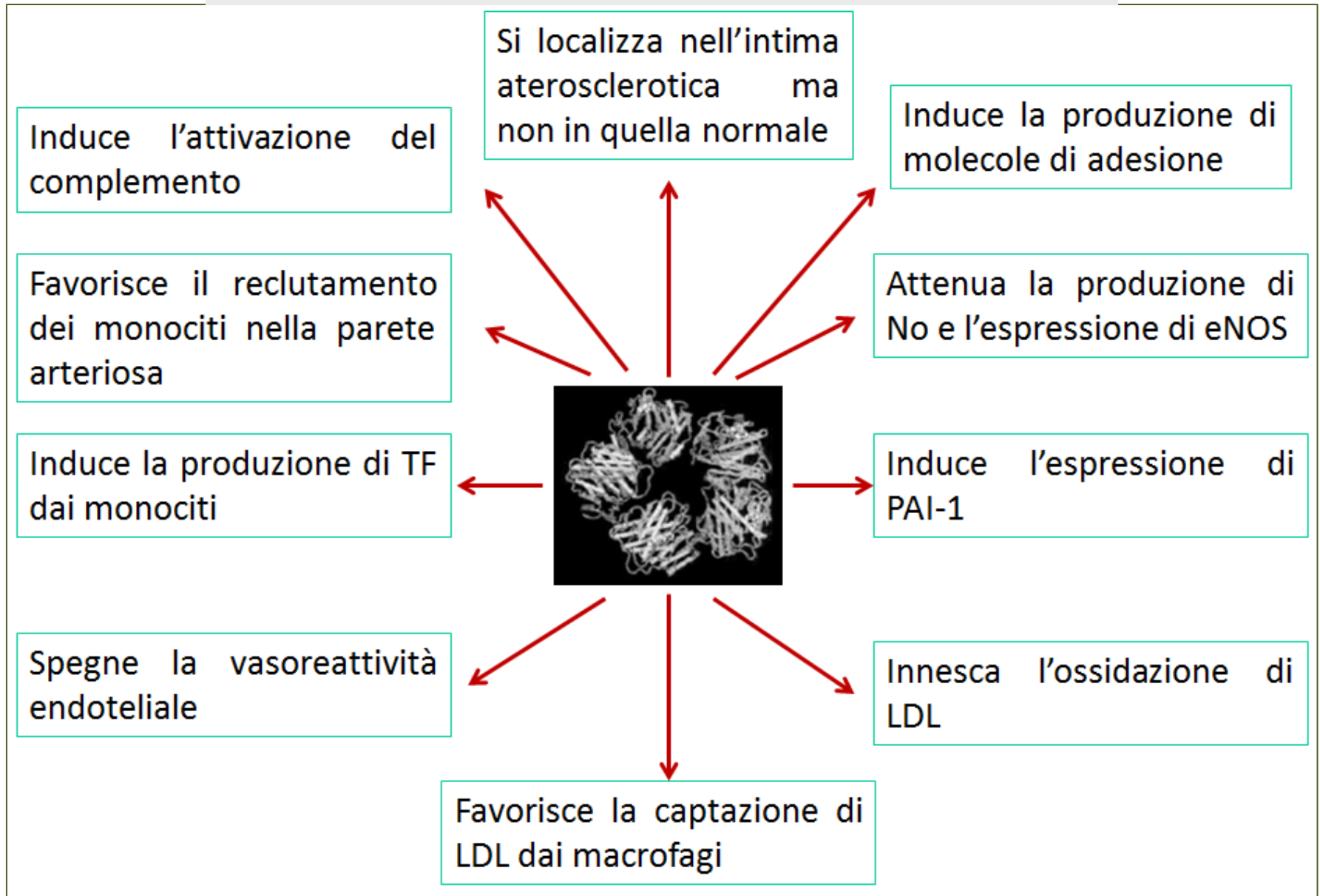
Proteina C-reattiva ad elevata sensibilità hs-CRP

I migliori effetti della terapia con statine si hanno nei soggetti in cui queste non solo riducono LDL-C, ma anche hs-CRP (*PROVE IT-TIMI 22, Ridker PM. NEJM 2005; the A to Z, Morrow DA Circulation 2006*).

Estremi benefici della statina in individui apparentemente sani con bassa concentrazione di LDL-C (<130 mg/dL) ma con elevata concentrazione di hs-CRP (>2 mg/L):

- **Studio JUPITER** (*Ridker PM. NEJM 2008*), 17802 soggetti, follow-up 5 anni, riduzione del 50% circa degli eventi vascolari cardiaci, cerebrali e arteriosi periferici.

Funzioni della Proteina C-reattiva



Tuttavia la funzione patofisiologica della CRP rimane incerta



Parametri di funzione e di danno renale

Parametri di funzione e di danno renale

La concentrazione di **S-creatinina**, tramite il valore della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) con essa stimata, è un **biomarcatore indipendente di rischio di malattia cardiovascolare (CVD)**

- American Heart Association (AHA) raccomanda di considerare ad alto rischio i pazienti con insufficienza renale cronica (IRC).
 - **GFR** stimata <41 mL/min (quartile inferiore) triplica il rischio di morte cardiovascolare entro 3 anni.

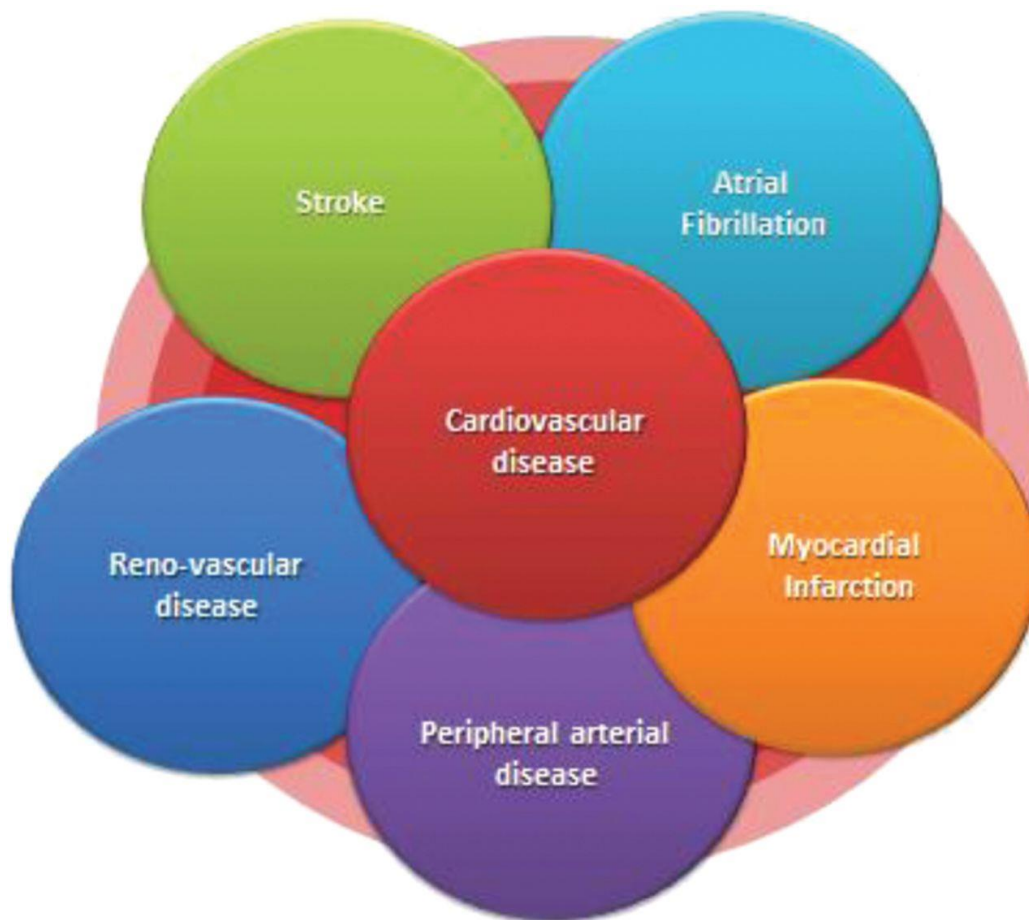
Anche qualsiasi grado di **albuminuria**, importante indicatore di danno renale, è un **fattore di rischio indipendente per CVD**.



Modelli multivariati di rischio cardiovascolare

Quali Eventi Considerare nel Rischio

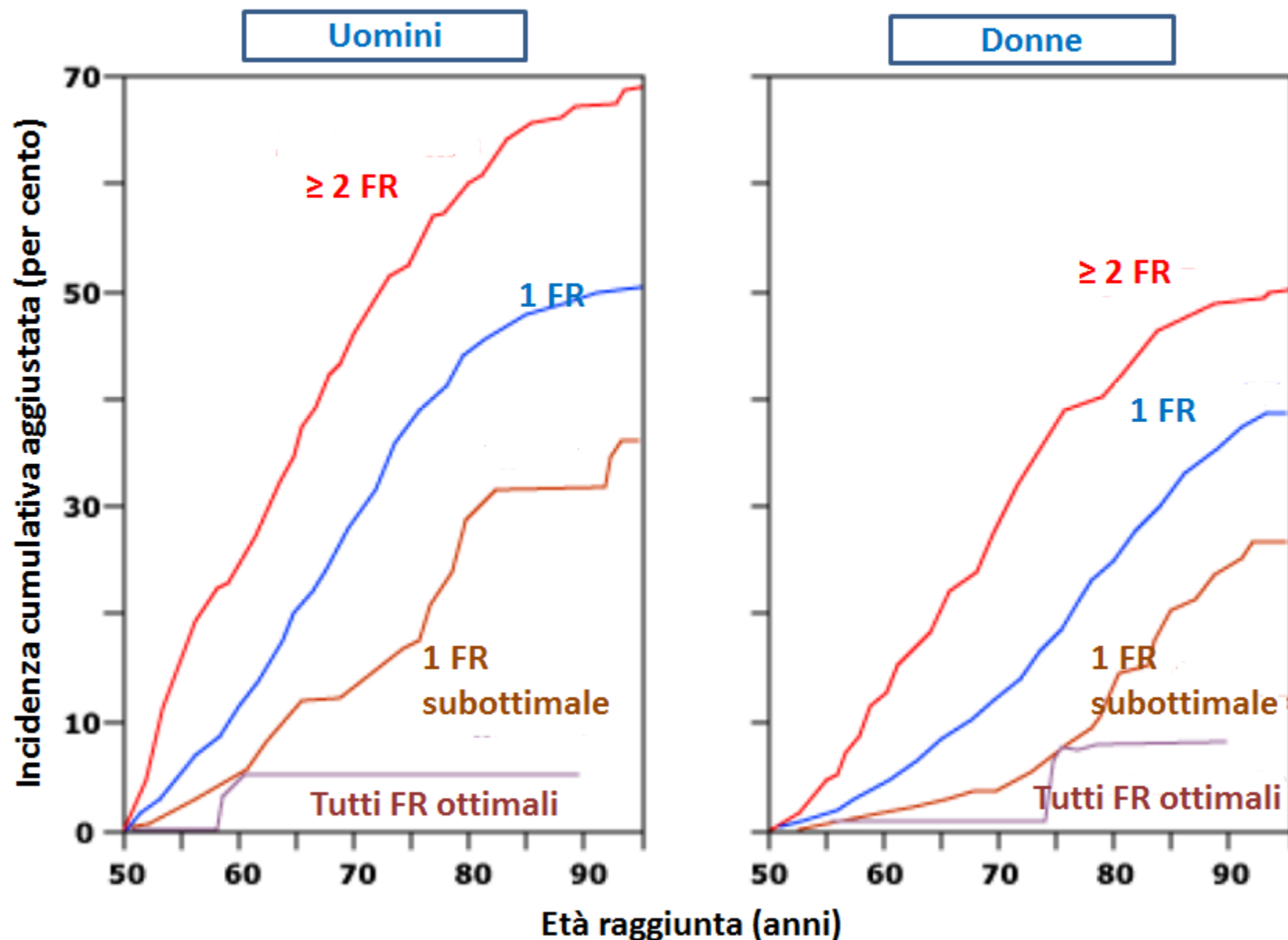
Anche se la cardiopatia coronarica (CHD) è la manifestazione più comune di malattia cardiovascolare (CVD), **la malattia coronarica rappresenta solo circa il 50% del numero totale dei primi eventi cardiovascolari.**



Il Framingham Heart Study dimostra che tra i partecipanti che non avevano inizialmente CHD **il rischio di eventi di CVD nel corso della vita per le persone di 40 anni è del 49% negli uomini e del 32% nelle donne.** Anche coloro che erano apparentemente senza malattia **a 70 anni** avevano un rischio nel corso della vita del **35% e 24% negli uomini e nelle donne,** rispettivamente.

Il rischio di CHD varia soprattutto con il carico aggregato dei fattori di rischio (vedi figura).

Rischio di malattia cardiovascolare nel corso della vita



*FR=fattori di rischio

- Una **valutazione generica del rischio relativo** per CVD si ottiene banalmente contando il numero di fattori di rischio tradizionali presenti in un paziente.
- Una **stima più precisa del rischio assoluto** per un primo evento cardiovascolare diviene auspicabile nel dare le raccomandazioni per il trattamento di un specifico individuo.
 - per stimare il rischio cardiovascolare in un singolo paziente vanno presi in considerazione:
 - il **valore predittivo dei fattori di rischio** e
 - l'utilizzo di **modelli di rischio multivariati**.

A CHI DOVREBBE ESSERE FATTA LA STIMA DEL RISCHIO CVD?

NO

- **non necessitano della stima:**

gli individui con CVD stabilito o equivalenti di rischio CVD sono già ad alto rischio di eventi cardiovascolari ricorrenti e sono trattati con adeguate misure di prevenzione secondaria:

SÌ

- **necessitano della stima:**

I pazienti di età >20 anni senza CVD stabilito devono essere sottoposti a periodica valutazione del rischio cardiovascolare **ogni tre-cinque anni**, per dare una **gestione adeguata dei fattori di rischio specifici** (ad es. modifiche nella dieta per l'ipertensione o dislipidemia, ecc) **e del rischio complessivo** (ad es. mantenimento di una dieta sana, esercizio fisico regolare).

- **Sino a quando:**

la valutazione periodica del rischio va fatta **sino alla età di 79 anni.**

MODELLI MULTIVARIATI DI RISCHIO –

- Sono stati sviluppati in individui inizialmente sani sulla base di più variabili.
- Una componente importante di questi modelli è che molti dei fattori di rischio (ad es. l'età, l'ipertensione, colesterolo LDL) danno un aumento graduale del rischio.
- **Non esiste un modello unico** di rischio appropriato per tutti i pazienti. La scelta deve essere personalizzata in base alle caratteristiche del paziente (ad es. età, sesso, etnia).
- Generalmente questi modelli stimano il rischio di un individuo nel corso dei prossimi 10 anni.

MODELLI MULTIVARIATI DI RISCHIO –

Sono stati sviluppati per le popolazioni nella diverse aree del mondo

- I criteri di **Framingham (USA)** sono più adatti per americani di discendenza caucasica europea e sovrastimano o sottostimano il rischio di eventi in certe popolazioni (uomini giapponesi e ispanici, donne native americane, uomini e donne afro-americani, popolazioni europee e asiatiche, pazienti di età >85 anni).
- I modelli multipli, tra cui **SCORE (UE)** e **QRISK2 (UK)**, sono stati sviluppati nel tentativo di fornire migliore accuratezza predittiva per i pazienti europei.

Punteggio di Framingham (1998)

Deriva da una **popolazione in gran parte caucasica di discendenza europea**, ma studi successivi indicano una buona performance per la previsione di eventi coronarici in donne e uomini, bianchi e neri.

Parametri incorporati nel punteggio di rischio di CHD

- Età
- Genere
- Colesterolo totale e LDL (mg/dL)
- Colesterolo HDL (mg/dL)
- Pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- Diabete mellito (sì o no)
- Fumo corrente (sì o no)

Parametri non utilizzati nel punteggio di rischio CHD

- Trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
- Storia familiare di CVD (sì o no)

Endpoint valutati

- Morte CHD
- IM non fatale
- Angina instabile
- Angina stabile



Punteggio ATP III di rischio CHD forte (2002) E' Il punteggio di rischio

Framingham modificato (2002) dal Third Treatment Panel (ATP III) per includere le loro raccomandazioni per lo screening e il trattamento della dislipidemia.

Le modifiche includono l'eliminazione del diabete dall' algoritmo, in quanto equivalente CHD; ampliamento della fascia di età; l'inclusione del trattamento dell'ipertensione e punti età-specifici per il fumo e il colesterolo totale.

Parametri incorporati

- Età
- Sesso
- Colesterolo totale (mg/dL)
- Colesterolo HDL (mg/dL)
- Pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- Trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
- Fumo corrente (sì o no)



Parametri non utilizzati

- Diabete mellito (sì o no)
- Storia familiare di CVD (sì o no)

Endpoint valutati

- morte CHD
- IM non fatale



National Heart, Lung,
and Blood Institute



[Accessible Search Form](#)

[Advanced Search](#)

NHLBI Entire Site

- Public
- Health Professionals
- Networks
- Funding & Research
- Clinical Trials
- Training & Careers
- Researchers
- Educational Campaigns
- News & Resources
- About NHLBI

Home » Clinical Practice Guidelines » Cholesterol » CVD Risk Calculator

Wednesday, October 15, 2014

Information for Health Professionals

Risk Assessment Tool for Estimating Your 10-year Risk of Having a Heart Attack

[Clinical Practice Guidelines](#)

[Heart & Vascular Information](#)

[Lung Information](#)

[Blood Information](#)

[Sleep Information](#)

[Interactive Tools and Resources](#)

[Education Campaigns](#)

[National Education Programs](#)

[Continuing Education Opportunities](#)

[Health Observances](#)

The risk assessment tool below uses information from the Framingham Heart Study to predict a person's chance of having a heart attack in the next 10 years. This tool is designed for adults aged 20 and older who do not have heart disease or diabetes. To find your risk score, enter your information in the calculator below.

Age:

years

Gender:

Female Male

[Total Cholesterol:](#)

mg/dL

[HDL Cholesterol:](#)

mg/dL

[Smoker:](#)

No Yes

[Systolic Blood Pressure:](#)

mm/Hg

Are you currently on any medication to treat high blood pressure.

No Yes



Punteggio Generale di Framingham (2008) –



Framingham Heart Study

A Project of the National Heart, Lung, and Blood Institute and Boston University

I punteggi di rischio di Framingham del 1998 e quello successivo del 2002 non includono tutte le possibili manifestazioni dell'aterosclerosi, come **stroke, attacco ischemico transitorio, claudicatio intermittens e scompenso cardiaco (HF)**. Questi sono stati inclusi nel punteggio del 2008, sebbene siano state **omesse le manifestazioni di aterosclerosi aortica**.

Il rischio di sviluppare un evento cardiovascolare è con questo punteggio più alto rispetto ai punteggi che prevedono solo gli eventi coronarici.



Punteggio Generale di Framingham (2008) –

Parametri incorporati

-
- G



Framingham Heart Study

A Project of the National Heart, Lung, and Blood Institute and Boston University

- colesterolo totale (mg / dL)
 - colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
 - diabete mellito (sì o no)
 - fumo corrente (sì o no)

Parametri non utilizzati

- Storia familiare di CVD (sì o no)

Endpoint valutati

- morte CHD
- IM non fatale
- insufficienza coronarica o angina
- ictus ischemico o emorragico fatale o non fatale
 - Attacco ischemico transitorio
 - claudicatio intermittente
- scompenso cardiaco (Heart Failure, HF)





Framingham Heart Study

A Project of the National Heart, Lung, and Blood Institute and Boston University

Calculator: 10-year risk of developing cardiovascular disease in men (Patient information)

Input:

Age	<input type="text"/>	yr ▼
Systolic Blood Pressure	<input type="text"/>	mmHg ▼
Total cholesterol	<input type="text"/>	mg/dL ▼
HDL cholesterol	<input type="text"/>	mg/dL ▼
On blood pressure medication	No ▼	
Cigarette smoker	No ▼	
Diabetes present	No ▼	

Results:

Risk % ▼

Reset form



SCORE punteggio di rischio di morte CVD (2003)

Raccomandato nel 2007 dalla **Società Europea di Cardiologia**, deriva dai dati su oltre 200.000 pazienti in **12 paesi europei**. I punteggi di rischio sono **distinti per le aree europee ad alto e basso rischio**. SCORE si differenzia dai precedenti modelli Framingham in due punti importanti: si **stima il rischio a 10 anni di un primo evento aterosclerotico fatale** (per esempio, stroke o rottura di aneurisma addominale) e non solo la morte associata a cardiopatia coronarica (CHD).

Parametri incorporati

- Età
- Genere
- colesterolo totale (mg / dL)
- colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- fumo corrente (sì o no)
- Regione d'Europa (ad alto rischio o di una regione a basso rischio)

SCORE Risk Charts

The European cardiovascular disease risk assessment



Parametri non utilizzati

- il trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
- Il diabete mellito (sì o no)
- Storia familiare di CVD (sì o no)



Endpoint valutati: morte per malattia cardiovascolare (compresi CHD, aritmia, scompenso cardiaco-HF, ictus, aneurisma aortico, malattia vascolare periferica)

SCORE Risk Charts

The European cardiovascular disease risk assessment



Which charts should I use for my country?

Nazioni a basso

rischio

Use the **low risk charts** in Andorra, Austria, Belgium*, Cyprus, Denmark, Finland, France, Germany, Greece*, Iceland, Ireland, Israel, Italy, Luxembourg, Malta, Monaco, The Netherlands*, Norway, Portugal, San Marino, Slovenia, Spain*, Sweden*, Switzerland and the United Kingdom.

Nazioni a alto

rischio

Use the **high risk charts** in other European countries. Some are at very high risk and the charts may underestimate risk in these. These include Armenia, Azerbaijan, Belarus, Bulgaria, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Latvia, Lithuania, Macedonia FYR, Moldova, Russia, Ukraine and Uzbekistan.

*Updated, re-calibrated charts are now available for Belgium, Germany, Greece, The Netherlands, Spain, Sweden and Poland.

For more information please contact your **National Cardiac Society**.



il progetto cuore

Epidemiologia e prevenzione delle malattie cerebro e cardiovascolari



<http://www.cuore.iss.it>

Sesso

Età (espressa in anni)

Abitudine al fumo di sigaretta (si intende chi fuma regolarmente ogni giorno, anche una sola sigaretta, oppure ha smesso da meno di 12 mesi)

Qual è il valore della pressione sistolica? (espressa in mmHg)

Qual è il valore della colesterolemia totale? (espressa in mg/dl)

Qual è il valore della colesterolemia HDL? (espressa in mg/dl)

E' mai stato diagnosticato il diabete? (oppure due determinazioni successive di glicemia a digiuno superiori o uguali a 126 mg/dl)

Presenza di ipertensione arteriosa per cui il medico ha prescritto farmaci anti-ipertensivi (si considera sotto trattamento chi assume regolarmente questi farmaci)

Nota importante:

Si raccomanda di consultare il medico per consigli o per trattamenti.





This calculator is only valid if you do not already have a diagnosis.

QRISK e QRISK2 – Gli algoritmi QRISK (2007) e l'aggiornamento QRISK2 (2014) sono stati sviluppati per predire il rischio CVD nei pazienti di diverse etnie che vivono **in Inghilterra e Galles**.

Il QRISK2 include i predittori di rischio utilizzati nel modello di Framingham/ATPIII modificato, ma aggiunge informazioni su etnia, status socio-economico, storia familiare, e altre variabili mediche come il diabete, malattia renale cronica, fibrillazione atriale, e artrite reumatoide.

In questa popolazione il QRISK2 identifica i soggetti a rischio in modo **più preciso del Framingham/ATP III modificato**.

Parametri incorporati



- Età
- Sesso
- colesterolo totale (mg / dL)
 - colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
 - fumo corrente (sì o no)
- Storia familiare di malattia cardiovascolare in parente di primo grado di età <60 anni (sì o no)
- Regione del Regno Unito (punteggio sulla base dei livelli di disoccupazione, sovraffollamento, auto di proprietà, casa di proprietà)
- Indice di massa corporea (kg/m²)

This calculator is only valid if you do not already have a diagnosis.



QRISK e QRISK2 –

Parametri non utilizzati

- Il diabete mellito (sì o no)

Endpoint valutati

- morte CHD
- IM non fatale
- insufficienza coronarica o angina
 - rivascolarizzazione coronarica
 - ictus fatale o non fatale
 - attacco ischemico transitorio
 - claudicatio intermittente



This calculator is only valid if you do not already have a diagnosis.

About you

Age (25-84):

Sex: Male Female

Ethnicity:

UK postcode: leave blank if unknown

Postcode:

Clinical information

Smoking status:

Diabetes status:

Angina or heart attack in a 1st degree relative < 60?

Chronic kidney disease?

Atrial fibrillation?

On blood pressure treatment?

Rheumatoid arthritis?

Leave blank if unknown

Cholesterol/HDL ratio:

Systolic blood pressure (mmHg):

Body mass index

Height (cm):

Weight (kg):

Welcome to the QRISK[®]2-2014 cardiovascular disease risk calculator

Welcome to the QRISK[®]2-2014 Web Calculator. You can use this calculator to work out your risk of having a heart attack or stroke over the next ten years by answering some simple questions. It is suitable for people who do not already have a diagnosis of heart disease or stroke.

The QRISK[®]2 algorithm has been developed by doctors and academics working in the UK National Health Service and is based on routinely collected data from many thousands of GPs across the country who have freely contributed data for medical research. It is updated annually each April, refitted to the latest data to remain as accurate as possible.

Whilst QRISK2 has been developed for use in the UK, it is being used internationally. For non-UK use, if the postcode field is left blank the score will be calculated using an average value. Users should note, however, that CVD risk is likely to be under-estimated in patients from deprived areas and over-estimated for patients from affluent areas. All medical decisions need to be taken by a patient in consultation with their doctor. The authors and the sponsors accept no responsibility for clinical use or misuse of these score.

The science underpinning the QRISK[®]2 equations has been published here:

- [Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2, BMJ 2008;336:1475-82.](#)

Click [here](#) for more information on QRISK[®]2.

Calculate risk over years.

Punteggio Reynolds di rischio CVD per le donne (2007)

E' stato sviluppato da una coorte prospettica di quasi 25.000 donne americane senza diabete. Le principali differenze tra il punteggio di rischio Reynold e le altre stime di rischio sono l'**inclusione della storia familiare di infarto miocardico, di Hb A1c e di proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP).**

Parametri incorporati

Reynolds Risk Score

Calculating Heart and Stroke Risk for Women and Men

- colesterolo totale (mg / dL)
 - colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- diabete mellito valutato da emoglobina A1c (per cento)
 - fumo corrente (sì o no)
- storia dei genitori con infarto miocardico prima dei 60 anni (sì o no)
 - hs-CRP sierica (mg/L)

Parametri non utilizzati

- il trattamento della pressione arteriosa (sì o no)

Endpoint valutati

- morte cardiovascolare
 - IM non fatale
 - ictus non fatale
- rivascolarizzazione coronarica



Punteggio Reynolds di rischio CVD per gli uomini (2008)

E' stato sviluppato da una coorte prospettica di oltre 10.000 uomini americani senza diabete e **include** come variabili nel calcolatore di rischio **la storia familiare di MI e hs-CRP**. A differenza del punteggio di rischio Reynolds per le donne, **non è stato incluso** il livello di **emoglobina A1c** come variabile nel punteggio di rischio.

Parametri incorporati

Reynolds Risk Score

Calculating Heart and Stroke Risk for Women and Men

- colesterolo totale (mg/dL)
 - colesterolo HDL (mg/dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
 - fumo corrente (sì o no)
- storia dei genitori di infarto miocardico prima dei 60 anni (sì o no)
 - hs-CRP sierica (mg/L)

Parametri non utilizzati

- Il diabete mellito (sì o no)
- il trattamento della pressione arteriosa (sì o no)

Endpoint valutati

- morte cardiovascolare
 - IM non fatale
 - ictus non fatale
- rivascolarizzazione coronarica



Reynolds Risk Score

Calculating Heart and Stroke Risk for Women and Men

Home

Calculator

FAQ

If you are healthy and without diabetes, the Reynolds Risk Score is designed to predict your risk of having a future heart attack, stroke, or other major heart disease in the next 10 years.


In addition to your age, blood pressure, cholesterol levels and whether you currently smoke, the Reynolds Risk Score uses information from two other risk factors, a blood test called hsCRP (a measure of inflammation) and whether or not either of your parents had a heart attack before they reached age 60 (a measure of genetic risk). To calculate your risk, fill in the information below with your most recent values. [Click here](#) for help filling the information.

Gender

Male Female

Age


Years (Maximum age must be 80)

 Do you currently smoke?


Yes No

 Systolic Blood Pressure (SBP)


mm/Hg

 Total Cholesterol


mg/DL (or) mmol/L

 HDL or "Good" Cholesterol

mg/DL (or) mmol/L

 High Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP)

mg/L

 Did your Mother or Father have a heart attack before age 60 ?

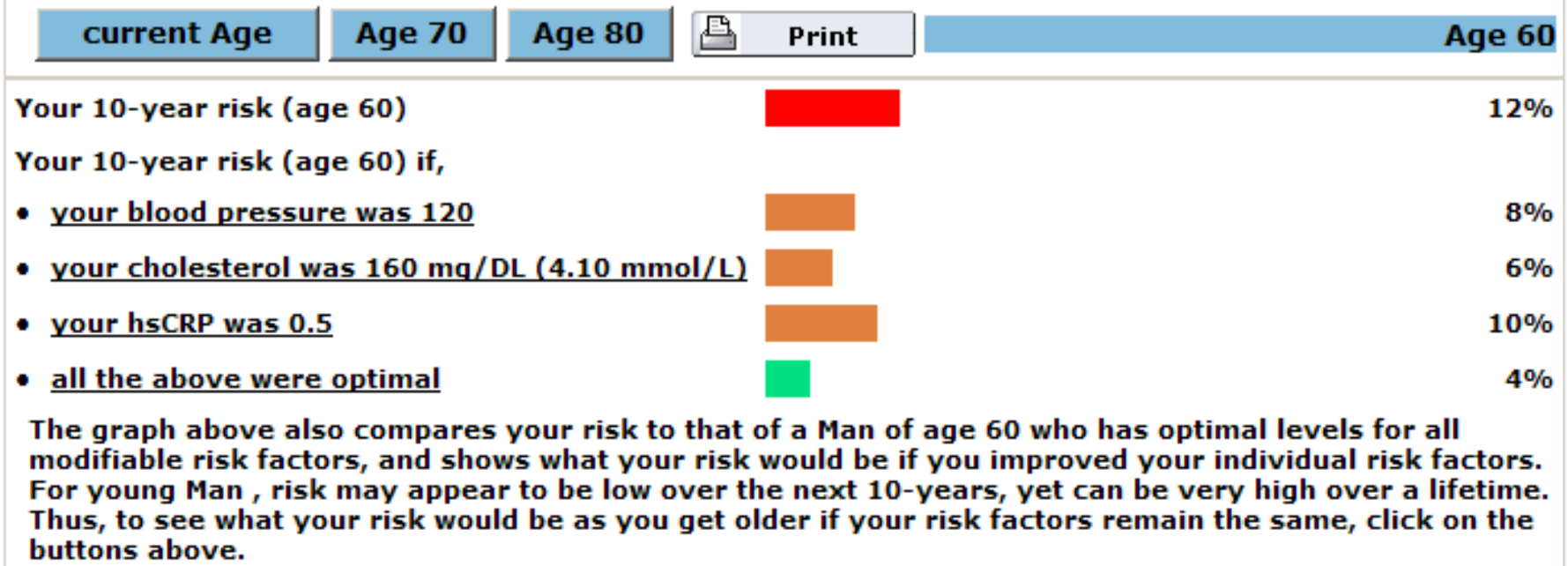
Yes No

Calculate 10 year risk



Reynolds risk score

As shown in the graph below, at Age 60, your chance of having a heart attack, stroke, or other heart disease event at some point in the next 10-years is **12 percent**. This risk is approximately 3 times higher than that of a Man the same age who has optimal levels of all modifiable risk factors.



www.reynoldsriskscore.org



Calcolatore di rischio CVD forte della coorte raggruppata ACC/AHA (2013)



E' il primo modello di rischio che include i dati provenienti da popolazioni ampie di pazienti **caucasici e afro-americani**. Il modello include gli **stessi parametri del modello di Framingham generale del 2008**, ma include **solo endpoint forti (MI fatale e non fatale e stroke)**.

Tuttavia il calcolatore sembra ben calibrato per popolazioni simili a quelle per le quali è stato sviluppato, ma non è tanto preciso in altre popolazioni.

Fino a che questi problemi non saranno risolti, **l'uso esclusivo di questo calcolatore è sconsigliato**.



Parametri incorporati

- età
- genere
- colesterolo totale (mg / dL)
- colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
 - diabete mellito (sì o no)
 - fumo corrente (sì o no)

Parametri non utilizzati

- storia familiare di CVD (sì o no)

Gli endpoint valutati

- morte CHD
- IM non fatale
- ictus fatale
- ictus non fatale

Punteggio del rischio JBS3 (2014) –



La **Joint British Societies (JBS)** ha pubblicato un nuovo calcolatore di rischio nel 2014 che:

- incorpora molte **variabili dei punteggi originali QRISK e QRISK2**
- estende la **valutazione del rischio oltre la finestra dei 10-anni** dei precedenti calcolatori
 - ❑ Consente la valutazione del rischio su intervalli di tempo più lunghi (ad esempio, 50 anni per un paziente di 45 anni di età, 30 anni per un paziente di 65 anni, ecc).
- consente la **stima della "età del cuore"**
- Il calcolatore consente anche la **stima dell'impatto delle modificazioni dello stile di vita sul rischio futuro** (ad esempio, l'impatto della cessazione del fumo sul rischio CVD).
- *Un link a questo calcolatore si trova sul sito JBS3 risk.*

JBS3



Joint British Societies for the prevention of cardiovascular disease

HOME WHO WE ARE LIFETIME RISK JBS3 REPORT RISK CALCULATOR CONTACT US

Welcome to the website for the Joint British Societies recommendations on the prevention of Cardiovascular Disease (JBS3). On this site you can access the JBS3 Risk Calculator and download the JBS3 report, with its recommendations.

The proposals published in the **JBS3 report** are consensus recommendations, and are a collaborative effort from the British cardiovascular societies who deal with cardiovascular disease prevention. The report was written for GPs and practitioners to help guide their work with patients, in preventing CVD.

The **JBS3 risk calculator** is a tool to help communicate the risk of CVD and the benefits of interventions, whether they are lifestyle or pharmacological. Although the JBS3 risk calculator is openly available on this website, it has been designed for use by Doctors and Practitioners with their patients.

NEW – JBS3 Heart Risk app

An app of the JBS3 Risk Calculator was released on Monday 2 June 2014. Available in both iTunes and Google play, the JBS3 Heart Risk app features all of the key parts of the JBS3 Risk Calculator. Using this app or the risk calculator with patients will help healthcare practitioners to better illustrate the risk of cardiovascular disease and the gains that can be made from interventions such as reducing blood pressure, or stopping smoking. Follow the below links to download today. The app will be free to download for a limited period!

iOS: <https://itunes.apple.com/gb/app/jbs3-heart-risk/id878100271?mt=8>

Android phone: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.bc.jbs3heartrisk>

Android Tablet: <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.bc.jbs3heartrisktbl>



Parametri incorporati



JBS3

Joint British Societies for the prevention of cardiovascular disease



- Età
- Genere
- Razza
- colesterolo totale (mg / dL)
- colesterolo HDL (mg / dL)
- pressione arteriosa sistolica (mmHg)
- trattamento della pressione arteriosa (sì o no)
 - diabete mellito (sì o no)
 - fumo corrente (sì o no)
- Storia familiare di malattia cardiovascolare in parente di primo grado di età <60 anni (sì o no)
 - malattia renale cronica
 - fibrillazione atriale
 - artrite reumatoide
 - Regione del Regno Unito (punteggio sulla base dei livelli di disoccupazione, sovraffollamento, auto di proprietà, casa di proprietà)
 - Indice di massa corporea (kg / m²)

Parametri non utilizzati

JBS3

Joint British Societies for the prevention of cardiovascular disease

- Nessuno

Endpoint valutati

- morte CHD
- IM non fatale
- insufficienza coronarica o angina
- rivascolarizzazione coronarica
 - ictus fatale o non fatale
- attacco ischemico transitorio
 - claudicatio intermittente

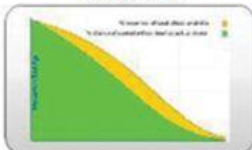


Profile

Heart Age

Healthy Years

Outlook



more

Profile

Date of Birth: Day: 21, Month: 1, Year: 1979

Gender: male female

Ethnic group: White or not stated

Height (m): 1.62 (5' 4" (64.0")) Weight (kg): 68.0 (10st 10 (150 lb)) BMI: 25.9

Townsend quintile (3 if unknown): 3: Average



I have never suffered from Cardiovascular Disease

I have read the

Do you smoke? I smoke 20+/day

Total Cholesterol: 7.0 mmol/L

HDL Cholesterol: 1.4

NonHDL Cholesterol: 5.6

Systolic Blood Pressure: 160 mm Hg

Have you received blood pressure treatment?

Do you suffer from diabetes?

Does a close relative under 60 suffer from CVD?

Do you have a chronic kidney disease?

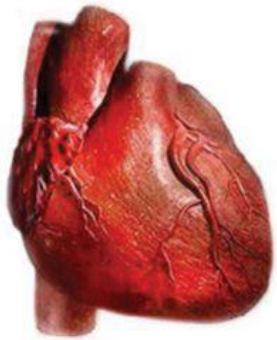
Have you suffered atrial fibrillation?

Do you have rheumatoid arthritis?

Save

Load

Next



Your heart age is about
47

compared to a person of the same age, gender
and ethnicity with optimal risk factors

Interventions

Future smoking category

20+/day ▼

Systolic Blood Pressure

160 → 160 ▲ ▼

Total Cholesterol

7.0 → 7.0 ▲ ▼

HDL Cholesterol

1.4 → 1.4 ▲ ▼

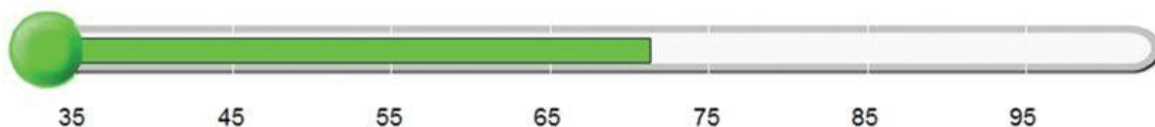
NonHDL Cholesterol: 5.6

BMI: 25.9

Reset



On average, expect
to survive to age 71
without a heart attack or stroke



expected life without a heart attack or stroke

Your risk of a heart attack or stroke
in the next 10 years is

1.9%

assuming you don't die of anything else

Interventions

Future smoking category

20+/day

Systolic Blood Pressure

160 → 160

Total Cholesterol

7.0 → 7.0

HDL Cholesterol

1.4 → 1.4

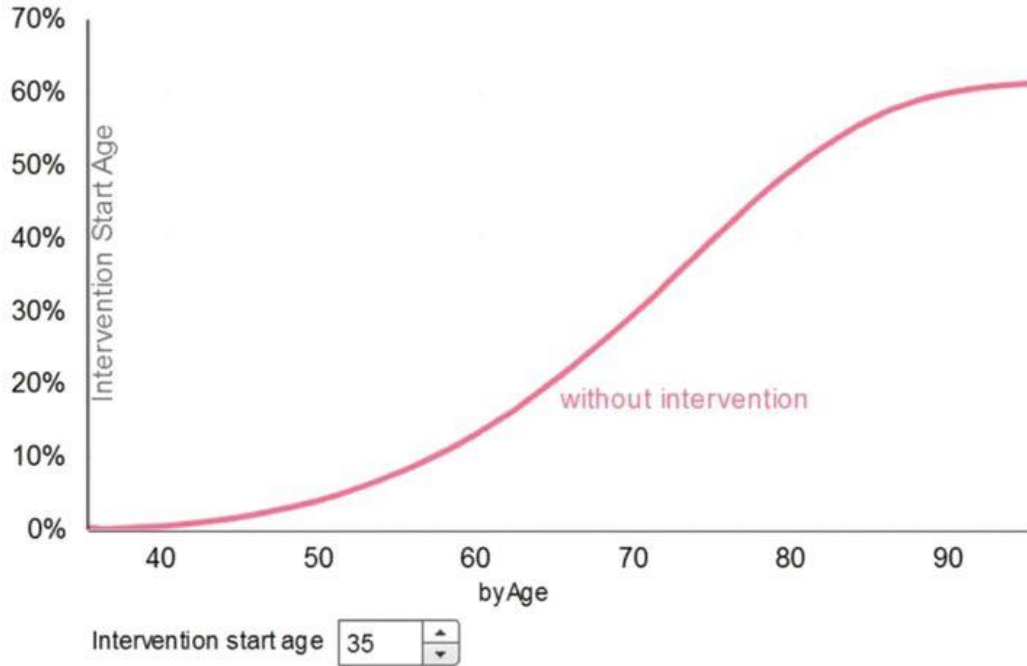
NonHDL Cholesterol: 5.6

BMI: 25.9

Reset

Profile Heart Age Healthy Years Outlook Compare Risk by age Outcomes Balance Years Gained Gain per year

% Chance of having had a Heart Attack or Stroke



Interventions

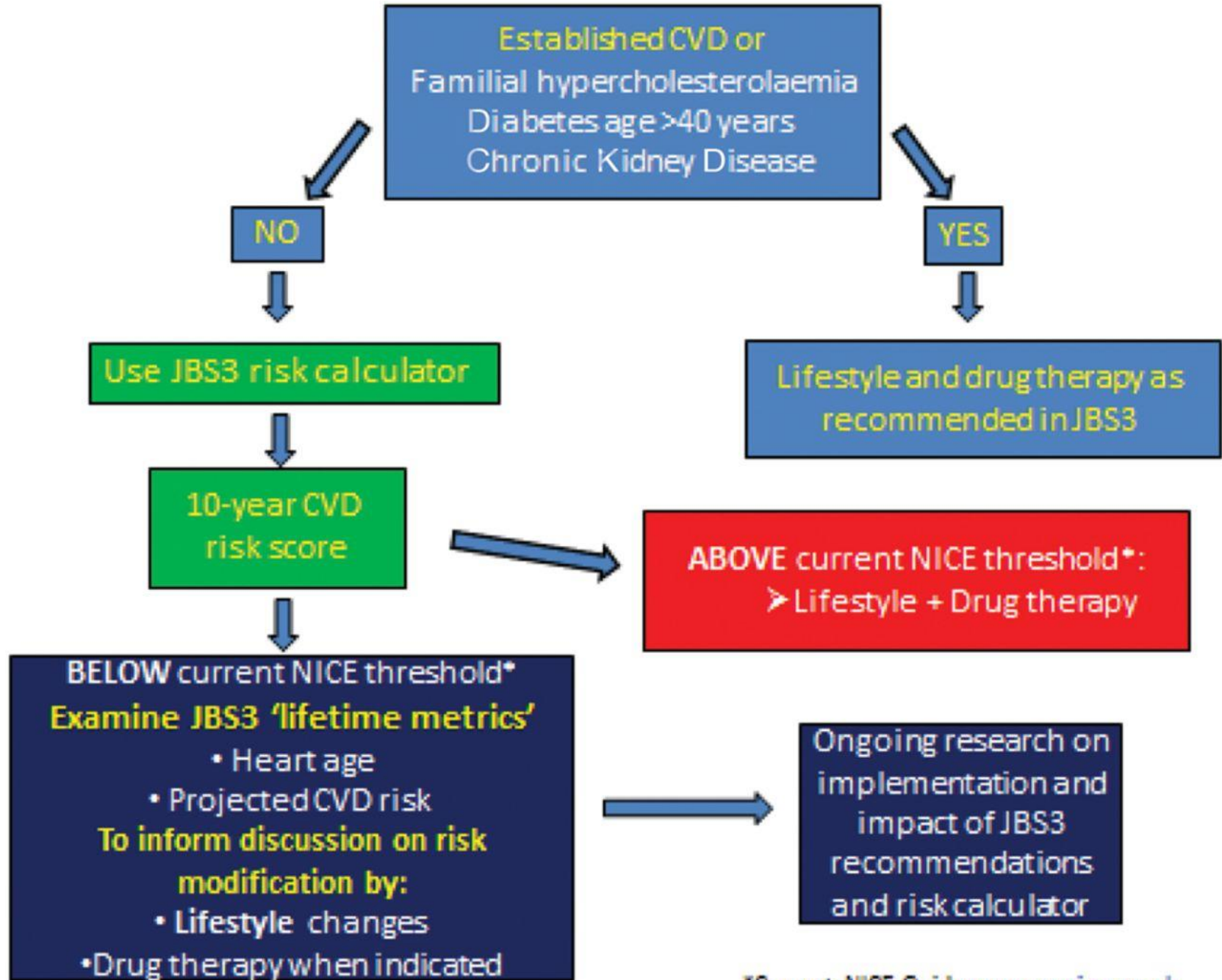
Future smoking category

Systolic Blood Pressure
 →

Total Cholesterol
 →

HDL Cholesterol
 →

NonHDL Cholesterol: 5.6
 BMI: 25.9



*Current NICE Guidance www.nice.org.uk

[NICE= National Institute for Health and Care](http://www.nice.org.uk)

Limitazioni degli attuali modelli di previsione delle malattie vascolari

- Le valutazioni del rischio, che stratificano i pazienti in base al numero di fattori di rischio in grado di identificare le persone ad alto rischio, tendono a rassicurare falsamente le persone considerate a basso rischio che possono però avere anomalie multiple marginali.
- I modelli di rischio che identificano i pazienti che hanno maggiore o minore probabilità di sviluppare la malattia cardiovascolare entro un determinato periodo di tempo (ad esempio, 10 anni) non considerano il rischio nel corso della vita (tranne JBS3), che potrebbe essere sostanzialmente più elevato e suscettibile ad una riduzione aggressiva dei fattori di rischio.
- La gravità e la frequenza del primo evento CVD è diminuita nel corso degli ultimi 40 anni.
- Gli effetti relativi dei fattori di rischio tradizionali variano in base all'esito valutato.
- Alcuni modelli di rischio non includono importanti esiti cardiovascolari (ictus, HF, arteriopatia periferica).

Potenziali miglioramenti per i modelli di rischio –

1. l'aggiunta di **nuovi** test nei modelli, quali **biomarcatori** (es. hs-CRP), esami di **imaging** (es. punteggio di calcio coronarico o spessore della intima-media carotidea), **test da sforzo**, screening per nuovi **genotipi**, ecc.
2. la stima del **rischio nel corso della vita** nei soggetti con un basso rischio a dieci anni (0-10%).



Diabete Mellito



PARTE 1

**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon

DIABETE MELLITO nella Storia

Dimagrimento,
poliuria,
polidipsia



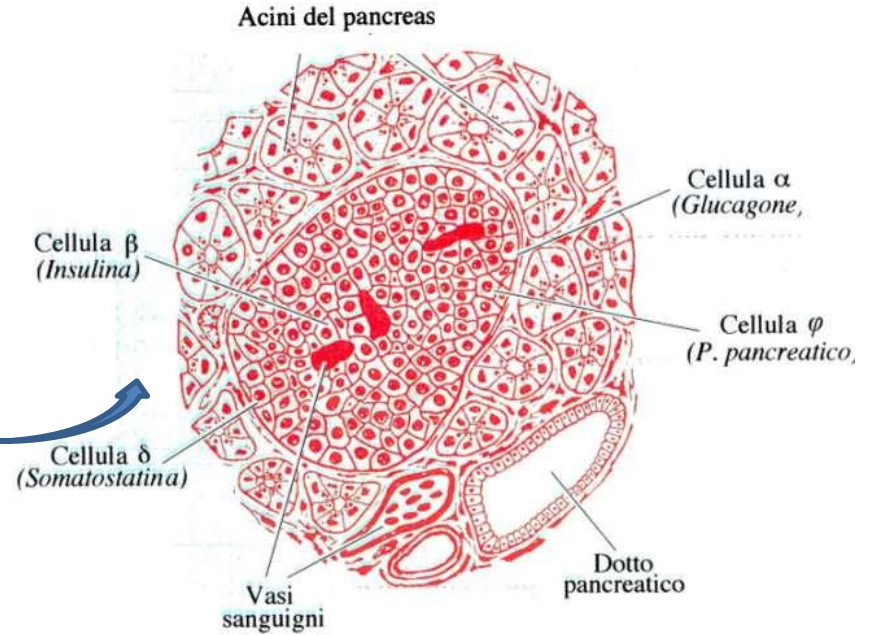
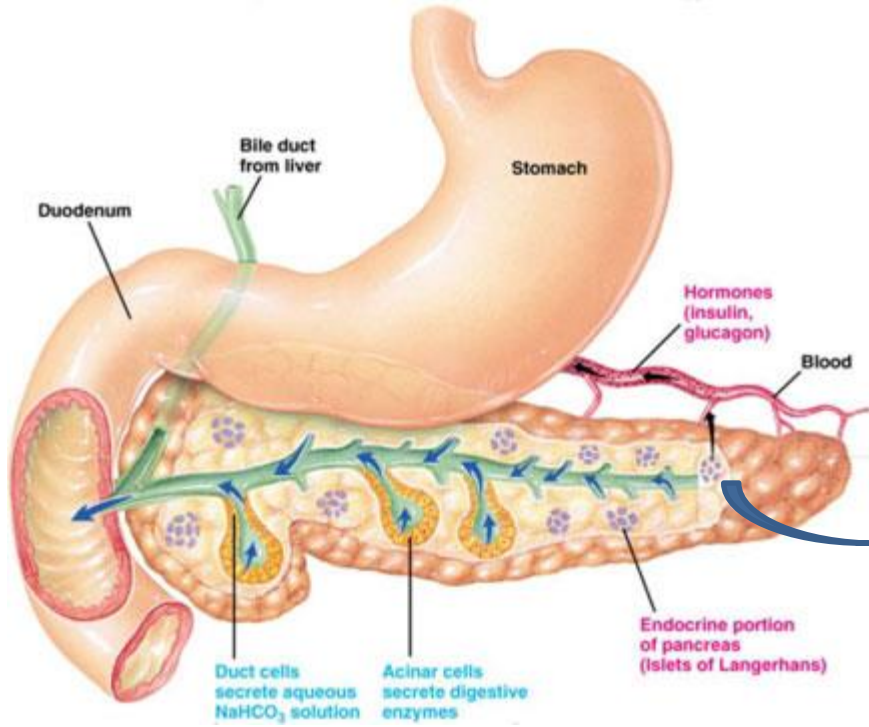
Matthew Dobson

1776 DC

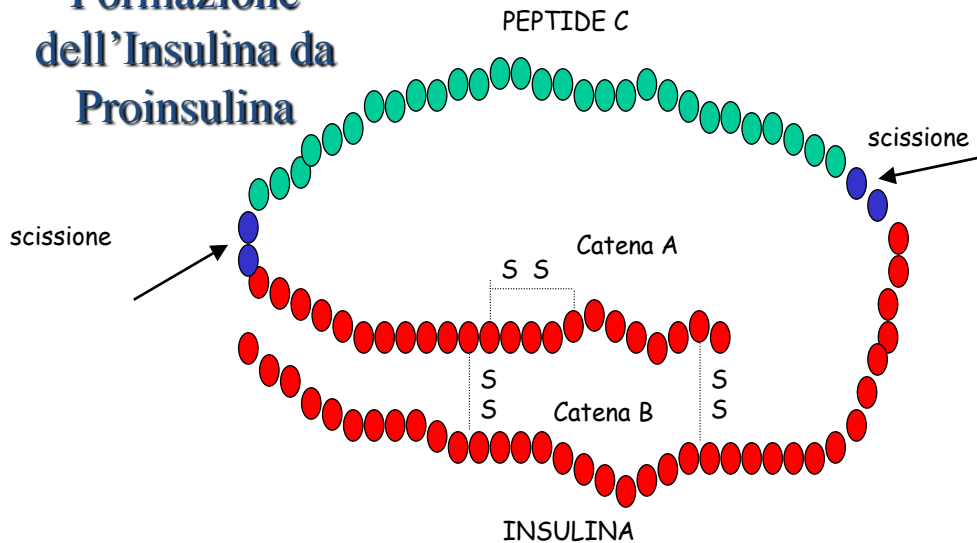
DIABETE MELLITO negli ultimi 200 anni

- Riconosciuto come **entità clinica nel 1812**, la sua prevalenza era ignota come pure i meccanismi della malattia, nessun trattamento era possibile e i pazienti morivano entro pochi mesi dalla diagnosi.
- **1889**: la **rimozione del pancreas** ai cani portava al diabete fatale.
- **1910**: ipotesi che il diabete fosse dovuto a carenza di una **sostanza prodotta dal pancreas**: «insulina» dalle isole pancreatiche.
- **1921**: **estratti pancreatici** guarivano il diabete nei cani pancreatectomizzati.
- **1922**: **l'insulina venne purificata** e da allora usata con successo nella cura dei pazienti diabetici.
- **1959**: l'introduzione del primo metodo di **dosaggio RIA** mirato proprio alla misura dell'insulina.

Beta Insule del Pancreas: Anatomia e Istologia



Formazione dell'Insulina da Proinsulina



P
R
O
I
N
S
U
L
I
N
A

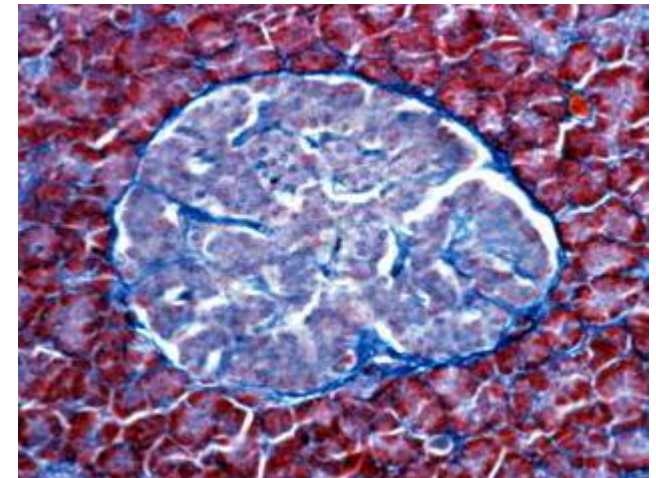
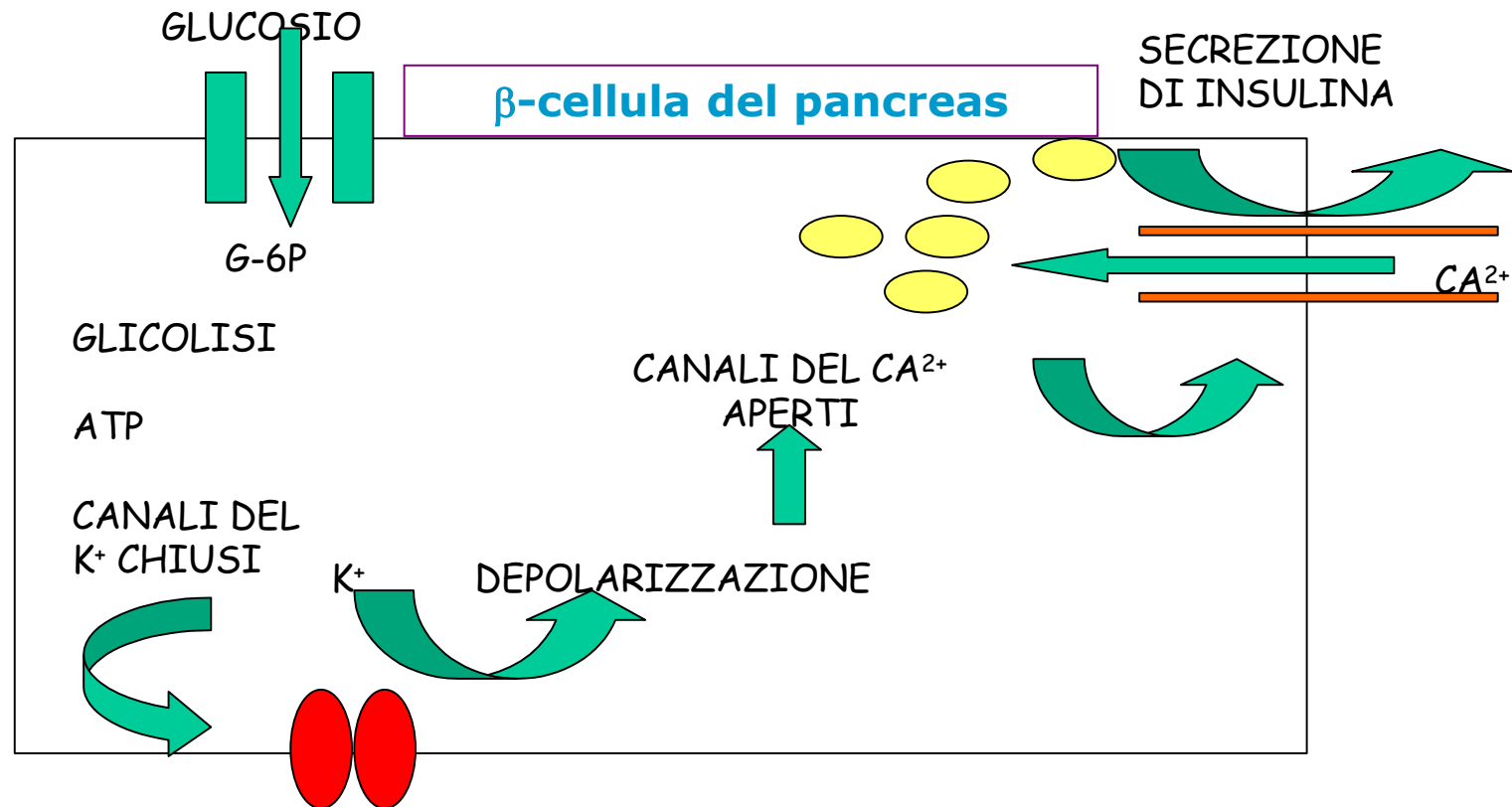


Immagine dell'insula al microscopio

Ruolo fisiologico dell'insulina

- Aumenta il **trasporto di glucosio nelle cellule**
- Attiva la **glicogeno-sintasi**
- Attiva la **glucochinasi** (accumulo di glucosio)
- Aumenta il **catabolismo di carboidrati a glicerolo**
- Stimola la **sintesi lipidica**
 - Attiva: citrato-lipasi, Acetil-CoA carbossilasi, acido grasso sintasi, glicerolo-3-fosfato deidrogenasi
- Stimola il **trasporto attivo di aminoacidi e la sintesi proteica**
- Stimola la **captazione di K dalle cellule**

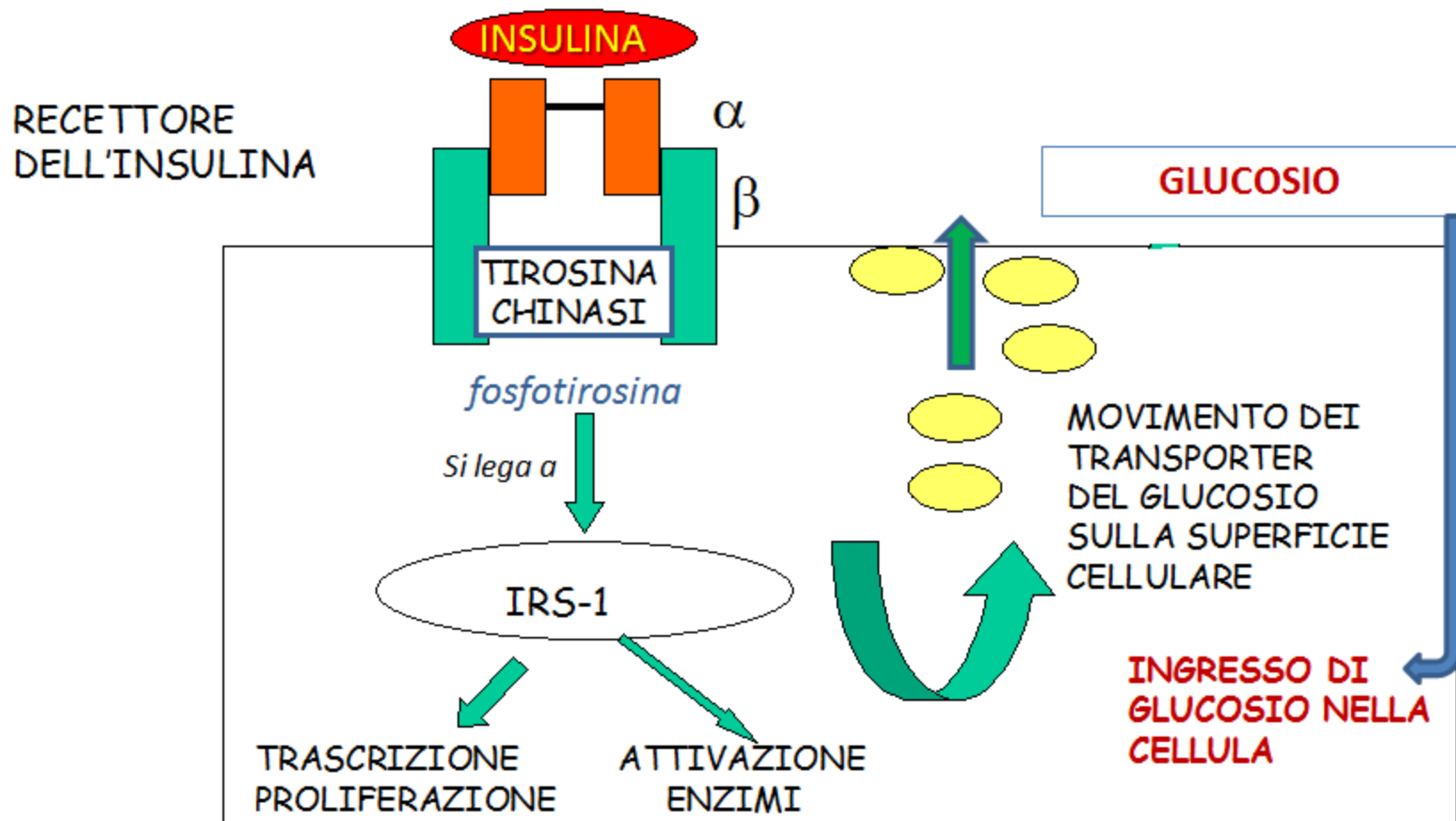
Secrezione dell'Insulina



Solfonilurea (farmaco ipoglicemizzante orale) chiude i canali del K^+depolarizza la cellula e induce secrezione d'insulina

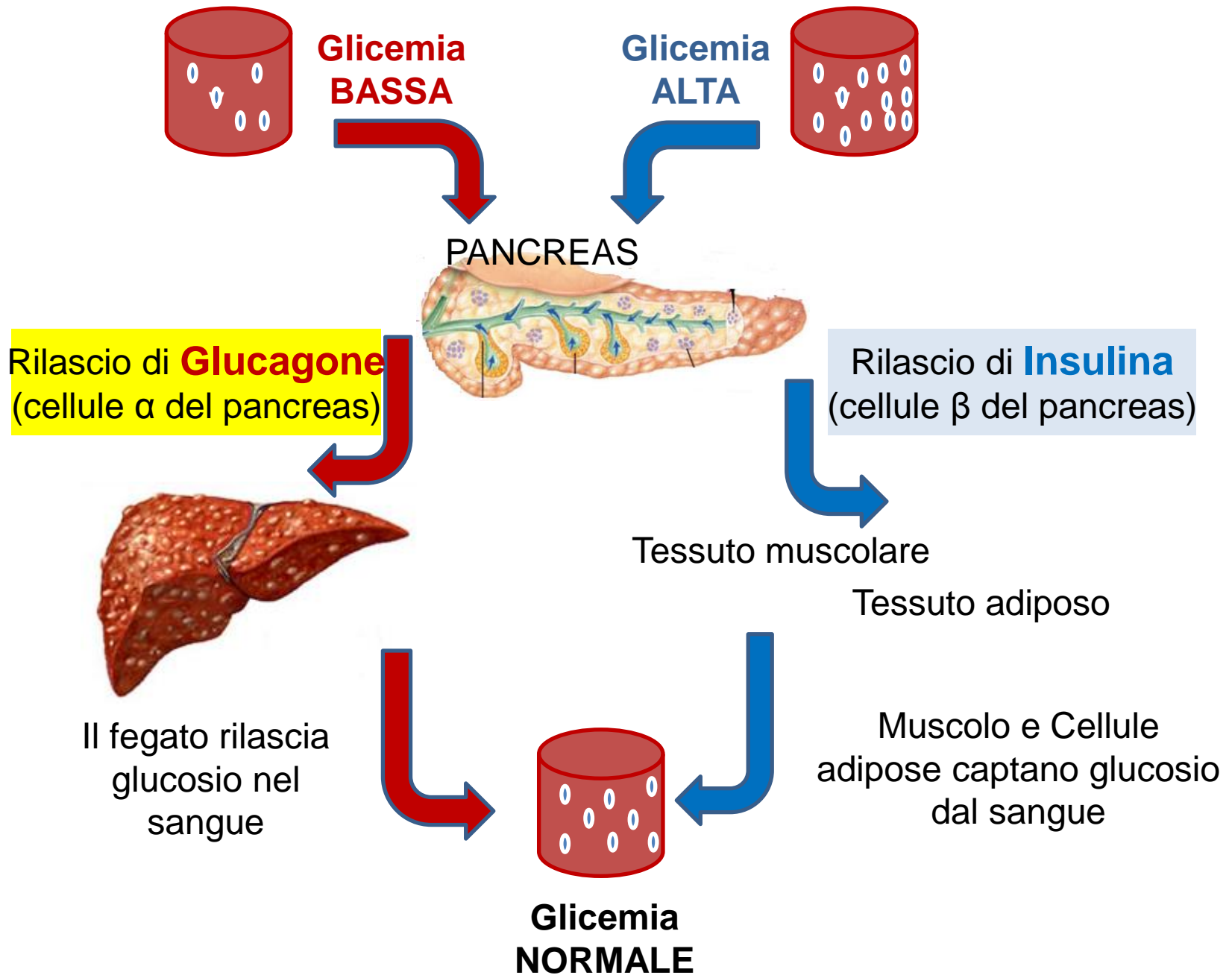
Azione dell'insulina

cellula di tessuti/organi periferici



IRS-1 = Insulin Receptor Substrate 1

Meccanismi di regolazione della glicemia



DIABETE MELLITO negli ultimi decenni

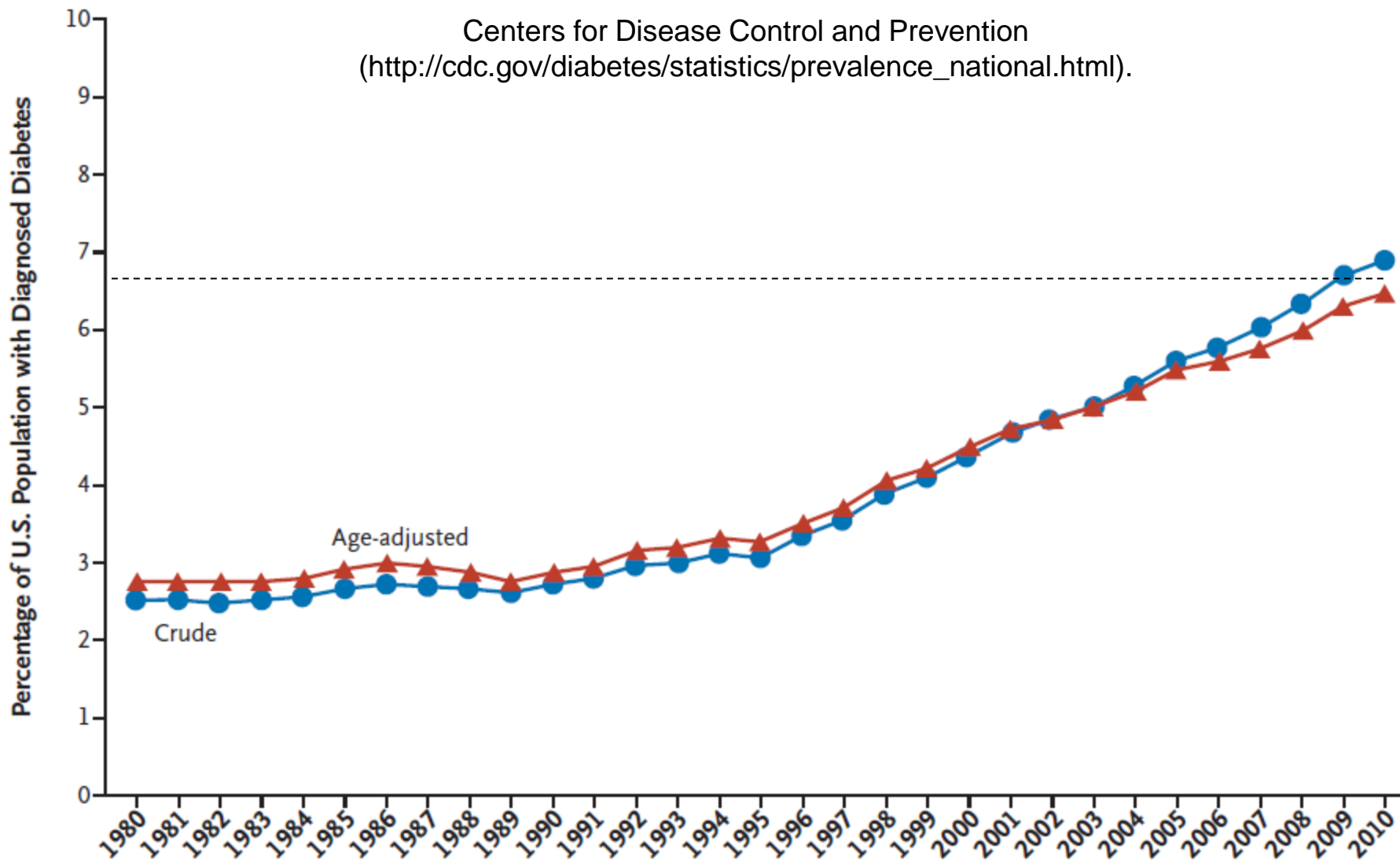
Progressi nella prevenzione del diabete, ma attualmente la sua **condotta terapeutica è poco soddisfacente.**

In passato il diabete era dovuto prevalentemente ad un grave **difetto d'insulina.**

Oggi il difetto d'insulina rappresenta solo il 10% dei casi, mentre il diabete prevale in persone sovrappeso con una **combinazione di resistenza all'insulina e carente secrezione d'insulina.**

La prevalenza di questa forma di diabete è **incrementata drasticamente negli ultimi 30-40 anni** e rappresenta una tra le più comuni e importanti morbidità nel mondo.

DIABETE. Prevalenza negli USA negli ultimi 30 anni



Definizione del Diabete Mellito

- Il Diabete Mellito comprende alcune **sindromi** con alterazione del metabolismo dei carboidrati caratterizzate dalla presenza d'**iperglicemia**.
- E' associato a **difetto** relativo o assoluto della secrezione d'**insulina** e/o a **resistenza** periferica di vario grado all'azione dell'insulina.

Classificazione del diabete mellito

Classificazione eziologica del diabete mellito

Diabete tipo 1

“distruzione beta-cellulare, che provoca generalmente deficit assoluto d’insulina”

A. Immuno-mediato

B. Idiopatico

Diabete tipo 2

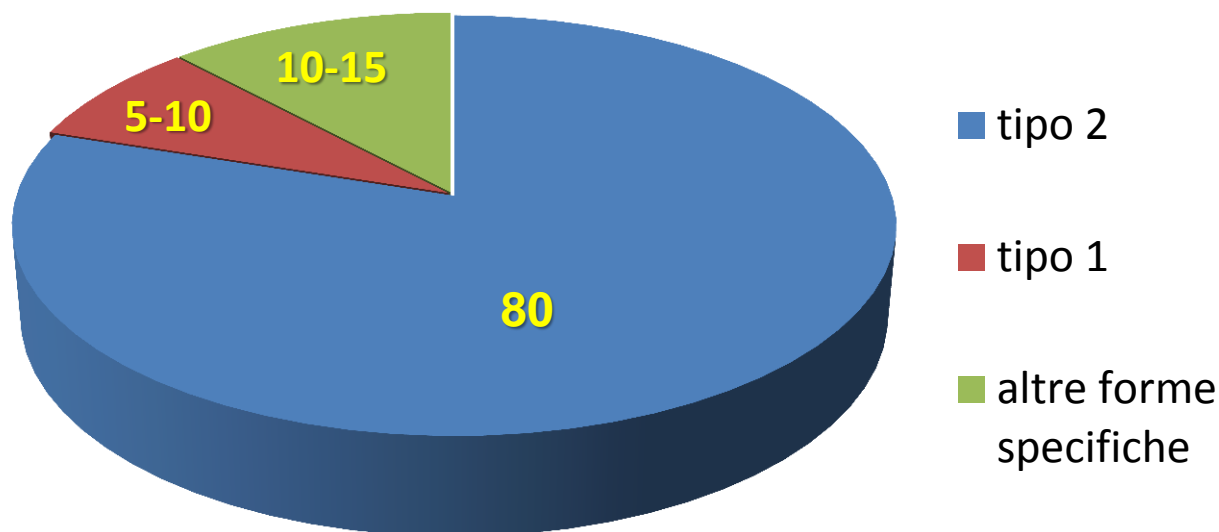
“può variare da prevalente insulino-resistenza con deficit relativo d’insulina a prevalente difetto secretorio con insulino-resistenza”

Altri tipi specifici

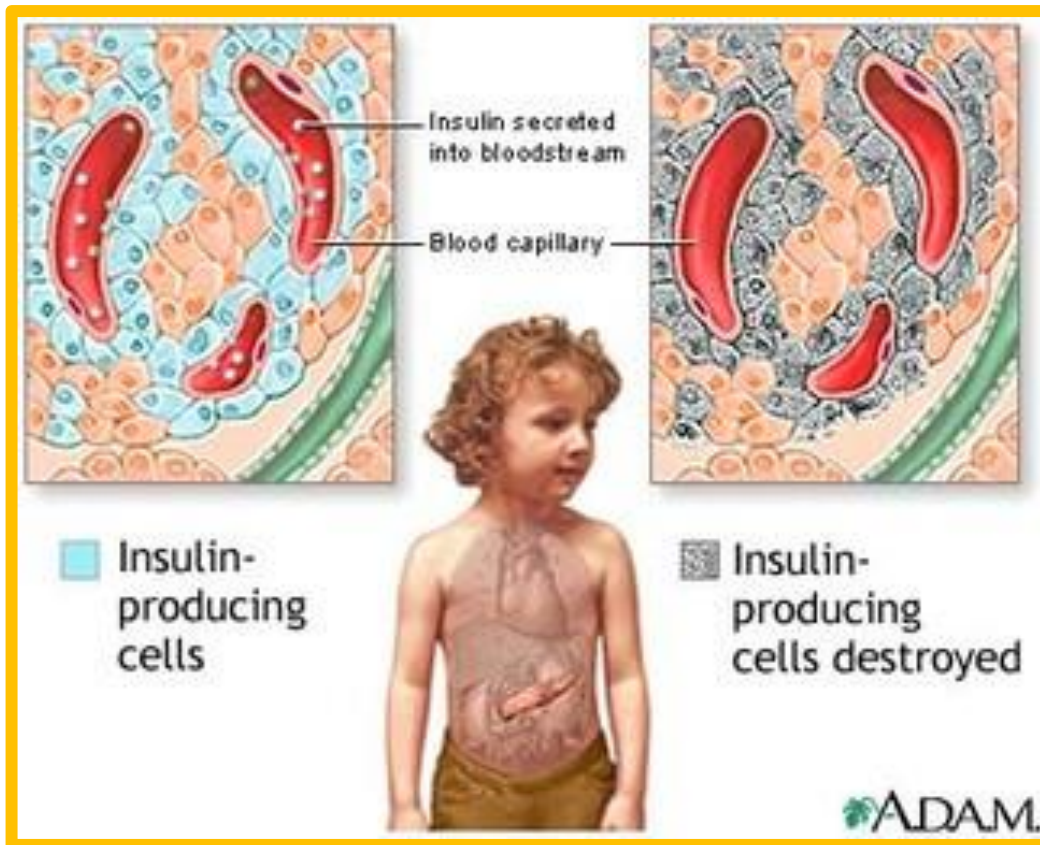
«genetici, pancreopatie, endocrinopatie, farmaci, infezioni, forme autoimmuni rare, malattie rare cromosomiche/genetiche, gestazionale

Prevalenza su base Eziologica del Diabete Mellito in UE

per cento



Il diabete tipo 2 comprende l'80-90% dei casi di diabete negli Stati Uniti, Canada ed Europa; il diabete tipo 1 abbraccia il 5-10%, mentre il rimanente è dato da diabete dovuto ad altre

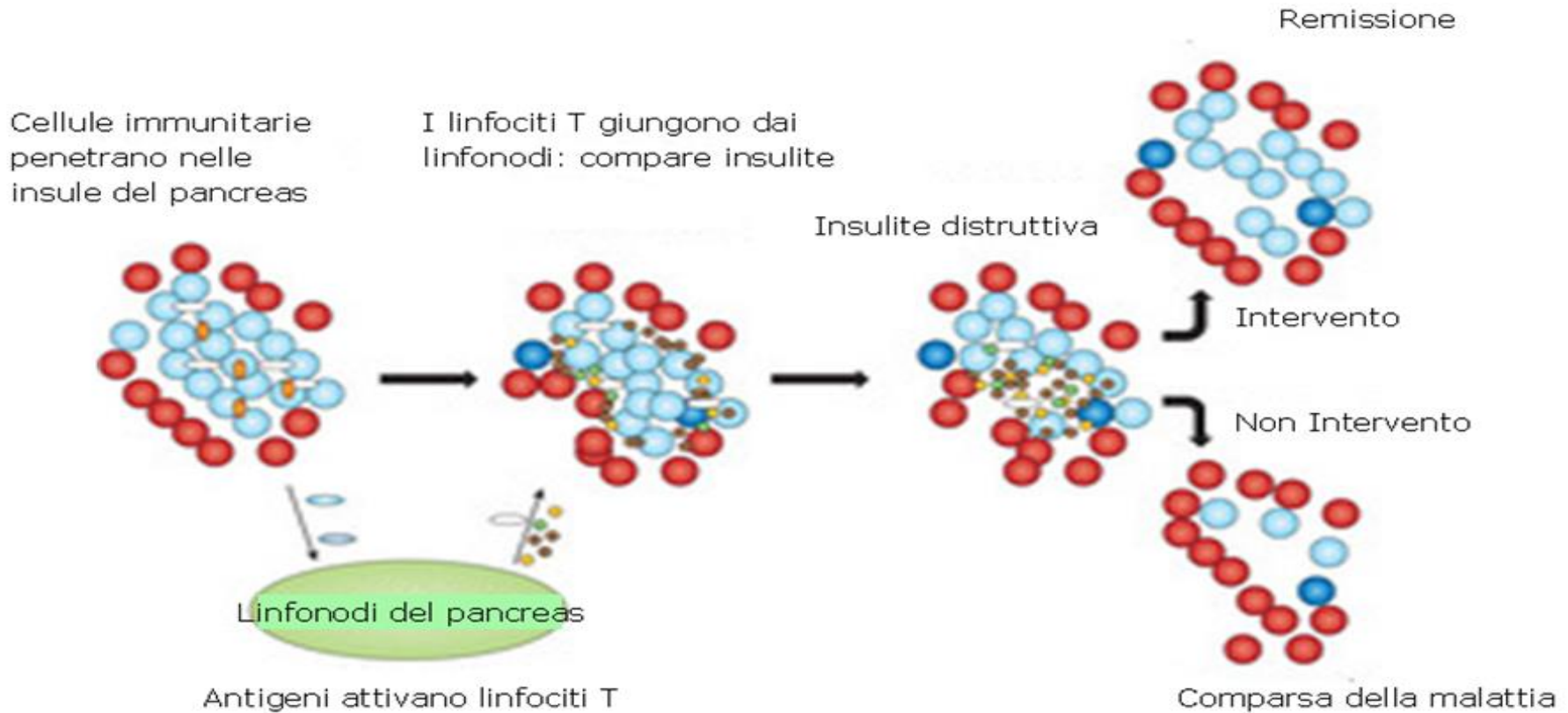


Il diabete mellito tipo 1

DIABETE TIPO 1 – E' caratterizzato dalla distruzione delle cellule beta del pancreas, con conseguente carenza assoluta di insulina.

Questo è di solito causato dalla distruzione autoimmune delle

Meccanismo di distruzione delle beta insule nel diabete tipo 1A



Compare un insulto immunologico non ancora definito in un individuo con predisposizione genetica, che avvia un processo immunologico cronico di basso-grado (priming). Gli eventi iniziali consistono nell'infiltrazione di cellule immunitarie.

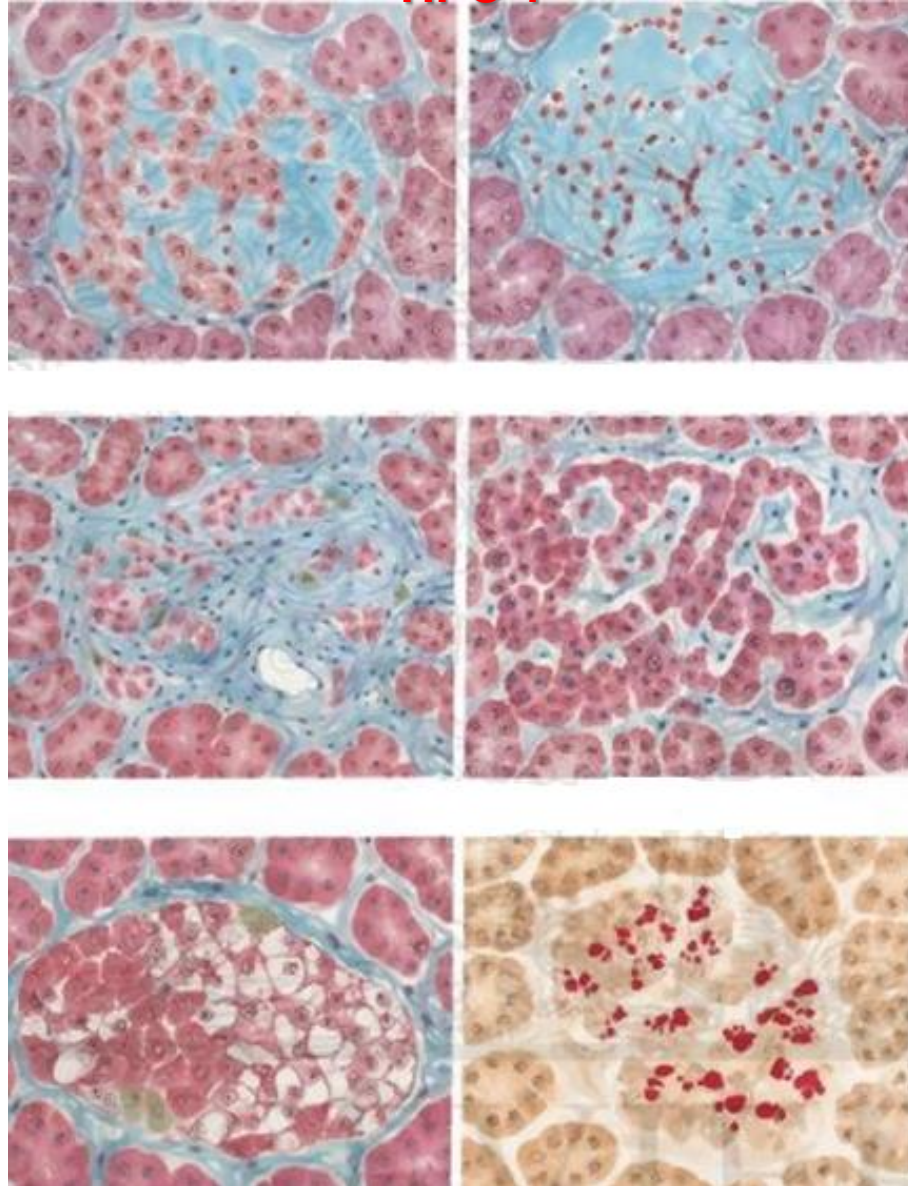
DIABETE TIPO 1 - Possono aiutare a stabilire la diagnosi i test per la ricerca nel siero dei seguenti **autoanticorpi**:

- **anti-cellule insulari (ICA)** o
- altri autoanticorpi insulari:
 - **anti-decarbossilasi dell'acido glutammico [GAD] 65***,
 - **anti-insulina**,

Un risultato positivo è indice di **diabete immuno-mediato o tipo 1A**. Tuttavia, **l'assenza di autoanticorpi pancreatici** non esclude la possibilità di diabete di tipo 1. Alcuni pazienti con carenza assoluta di insulina non hanno alcuna evidenza di autoimmunità e non hanno altra causa nota per la distruzione delle cellule beta. Essi vengono definiti come **diabete tipo 1B o idiopatico**.

* Nei mammiferi, GAD esiste in due isoforme codificate da due geni diversi - GAD1 e GAD2. Queste isoforme sono GAD67 e GAD65 con pesi molecolari di 67 e 65 kDa rispettivamente. GAD1 e GAD2 sono espressi nel cervello dove GABA viene utilizzato come neurotrasmettitore, GAD2 è espresso anche nel pancreas.

QUADRO ISTOLOGICO DEL DIABETE TIPO 1



L'attuale classificazione del diabete mellito della American Diabetes Association (ADA) **non considera:**

1. **l'eterogeneità clinica** dei pazienti con diabete
2. il concetto emergente secondo cui **la disfunzione delle cellule beta** è un difetto primario nella fisiopatologia del diabete, indipendentemente dal «tipo» .

Sono stati allora proposti **altri schemi di classificazione** che considerano:

- l'autoimmunità beta-cellulare,
- la funzione delle cellule beta,
- le caratteristiche cliniche,
- il peso corporeo.

L'alta prevalenza di **sovrappeso/obesità** nella popolazione ha ulteriormente complicato i sistemi di classificazione per l'elemento aggiunto della insulino-resistenza, anche nel diabete di tipo 1.

Si prevede che altri sottotipi di tipo 1 (e di diabete di tipo 2) verranno definiti più chiaramente in futuro.

Diabete autoimmune latente negli adulti (LADA) –

- Studi su popolazioni hanno evidenziato che , laddove era alta la prevalenza di diabete di tipo 1 (Paesi Scandinavi), ben il 7,5-10 % degli adulti con **diabete apparentemente di tipo 2** avevano **auto-anticorpi circolanti** diretti contro antigeni delle cellule beta del pancreas (islet-cell antibodies [ICA] o GAD 65).
- La prevalenza è certamente più bassa nella popolazione più diversificata del resto dell'Europa o degli Stati Uniti.
- Questi adulti **non necessitano di insulina al momento della diagnosi, ma progrediscono verso l'insulino-dipendenza** dopo diversi mesi o anni.
- Questa entità, indicata come "**diabete autoimmune latente negli adulti**" (LADA), rappresenta una **frazione molto piccola di tutti i casi di diabete.**
- Alla analisi di genotipizzazione, LADA condivide caratteristiche genetiche di entrambi i diabeti di tipo 1 e di

Diabete autoimmune latente negli adulti (LADA) – I pazienti affetti da LADA di solito hanno:

- ❑ **BMI più basso,**
- ❑ **minore secrezione di insulina endogena (misurata in termini di concentrazioni sieriche di peptide C dopo stimolazione),**
- ❑ **progressione più rapida verso l'insulino-dipendenza.**

Così, la presenza ed i titoli di anticorpi anti-GAD (o ICA) può aiutare a identificare i pazienti con LADA:

- **ritenuti erroneamente con diabete 2,**
- **che rispondono male alla terapia con farmaci ipoglicemizzanti orali,**
- **che richiedono insulina,**
- **che sono ad aumentato rischio di sviluppare chetoacidosi.**

Sono in corso studi per determinare se il trattamento precoce con insulina o l'uso di immunomodulatori possono prevenire la

Diabete autoimmune latente negli adulti (LADA) –

Esiste uno **strumento di screening** per identificare tra i pazienti adulti con diabete di nuova diagnosi chi indirizzare al **test degli autoanticorpi**.

Queste caratteristiche includono:

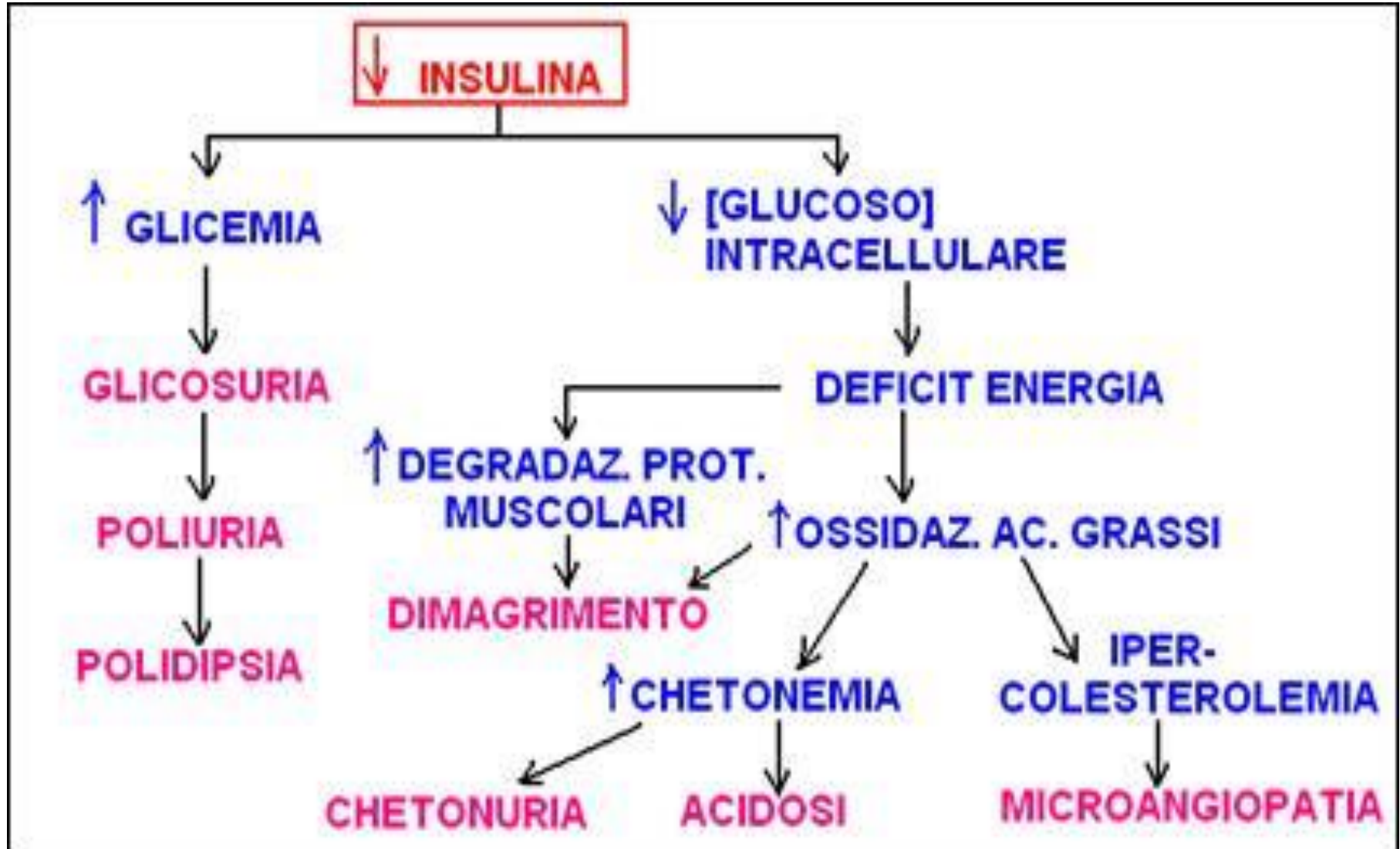
- **età di insorgenza <50 anni,**
- **sintomi acuti,**
- **indice di massa corporea (BMI) <25 kg/m²**
- **storia personale o familiare di malattie autoimmuni.**

La presenza di **due o più criteri** ha una sensibilità del 90% e una specificità del 71% per l'identificazione di pazienti poi positivi per gli anticorpi anti-GAD.

La misura di più di un anticorpo aumenta la probabilità di un valore positivo, ma è anche più costosa.

Anticorpi anti-insulina non devono essere misurati se il paziente ha ricevuto terapia insulinica per ≥2 settimane, perché questo produrrà anticorpi anti-insulina.

Conseguenze del deficit di insulina



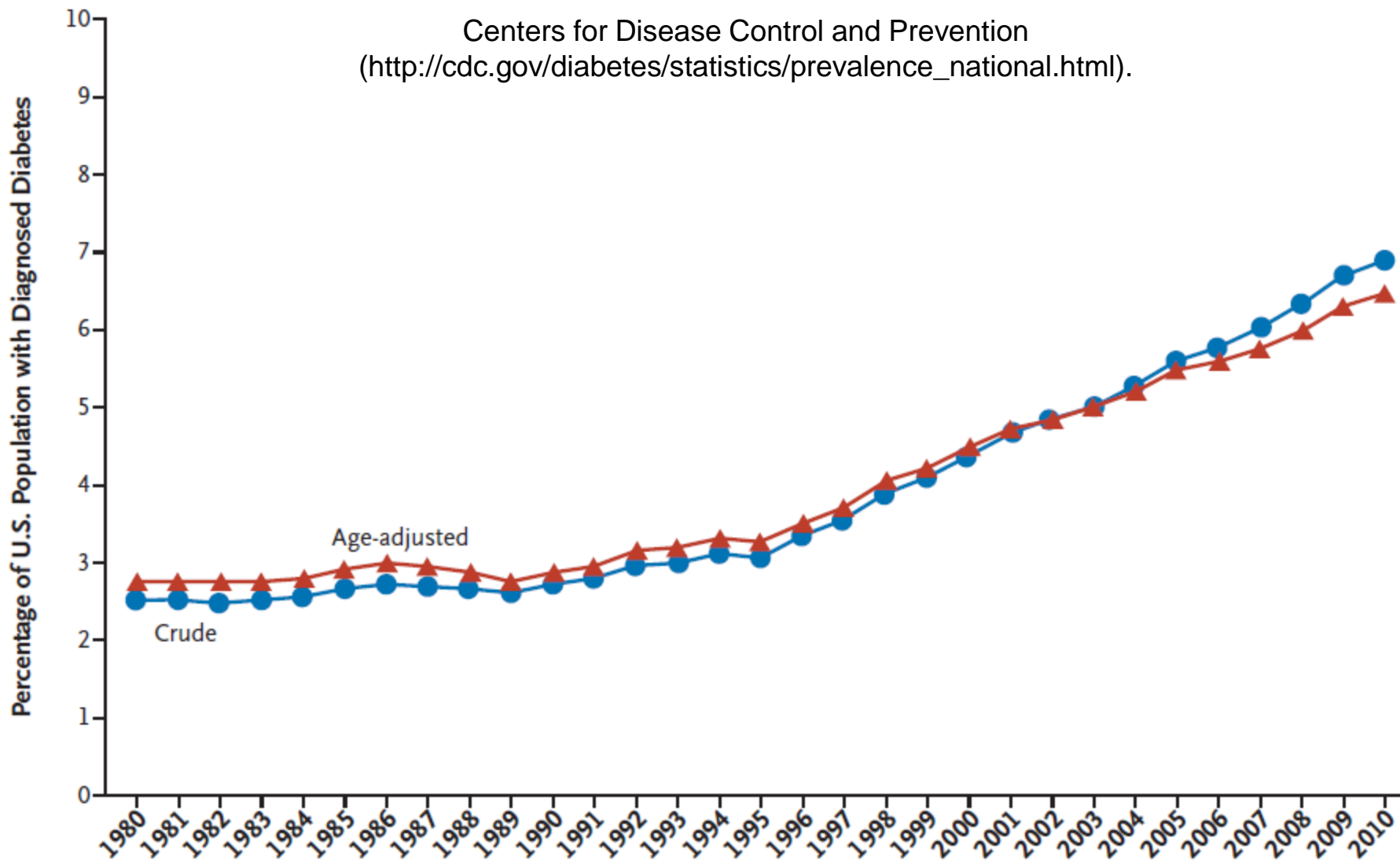


Il diabete mellito tipo 2

DIABETE TIPO 2 –

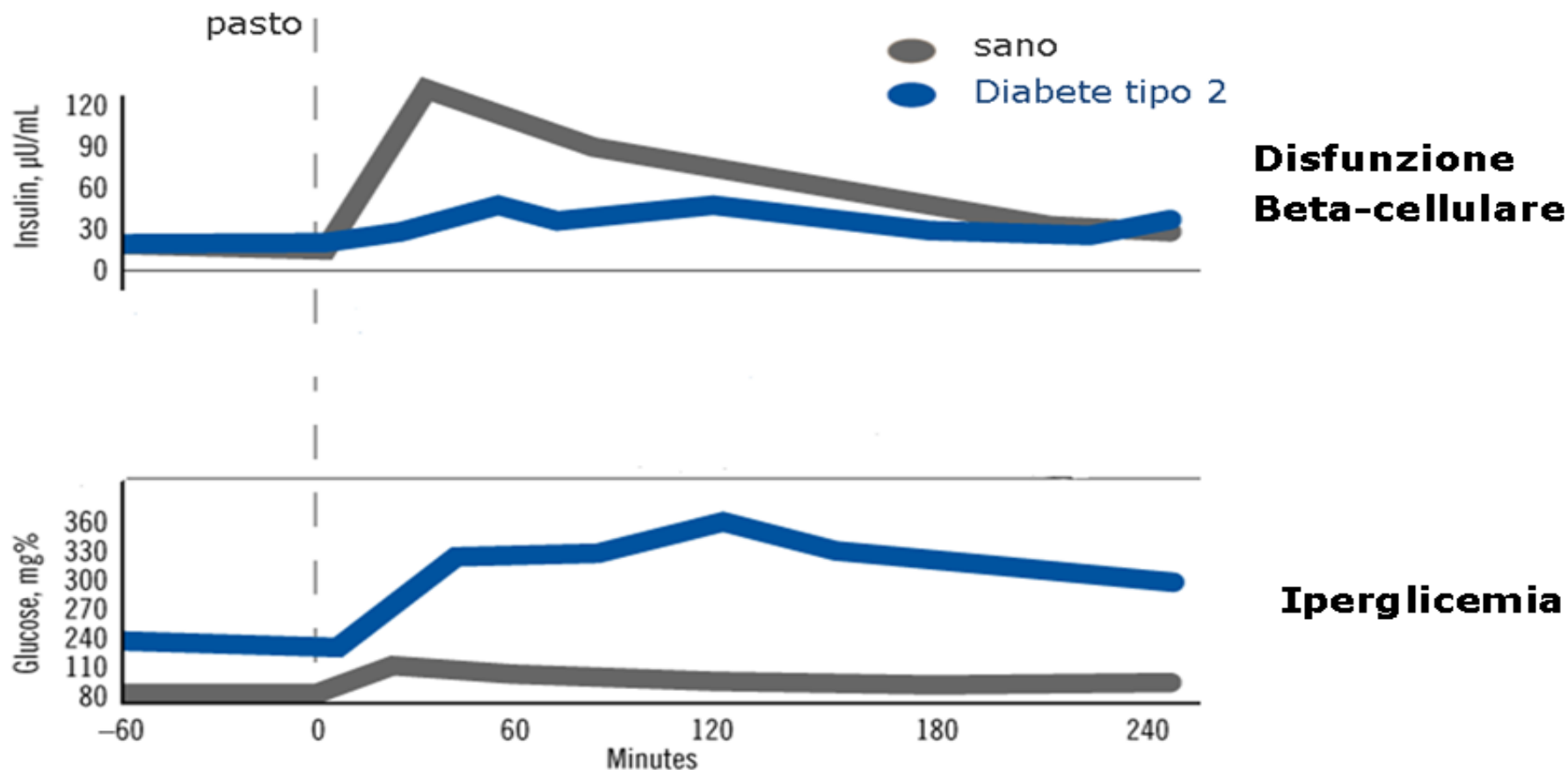
- E' di gran **lunga il tipo più comune** di diabete negli adulti.
- E' **caratterizzato da iperglicemia e vari deficit di insulina o insulino-resistenza.**
- La sua **prevalenza aumenta notevolmente con il grado di obesità.**
- L'insulino-resistenza e il deficit di insulina possono derivare da **influssi genetici o ambientali**, il che rende difficile determinare l'esatta causa in un singolo paziente.
- Inoltre, **l'iperglicemia stessa può compromettere la funzione delle cellule beta del pancreas e aggravare l'insulino-resistenza.**

DIABETE. Prevalenza negli USA negli ultimi 30 anni



DIABETE TIPO 2

- I pazienti presentano **negli stadi precoci iperglicemia post-prandiale, seguita da graduale deterioramento della prima fase di risposta insulinica all'iperglicemia.**
- Non esiste un test specifico per la diagnosi.



DKA (Diabetic Keto-Acidosis) nel diabete di tipo 2 –

- I pazienti con diabete di tipo 2 di solito si presentano con iperglicemia senza chetoacidosi,
- ma **certe volte si può verificare** chetoacidosi per meccanismi simili a quelli del diabete di tipo 1:
 - **Lo stress da infezioni o altre malattie causano un'augmentata secrezione di ormoni controregolatori** che aumentano ulteriormente la resistenza all'insulina.
 - **La secrezione di insulina già compromessa non è in grado di rispondere alla maggiore domanda**, con conseguente iperglicemia, che può compromettere ulteriormente la secrezione di insulina per via della tossicità del glucosio.

CARATTERISTICHE DISTINTIVE TRA DIABETE TIPO 1 E TIPO 2

Caratteristiche cliniche	Diabete tipo 1	Diabete tipo 2
Età alla diagnosi	Prevalentemente < 25 a, ma a qualsiasi età	Tipicamente > 25 a, ma in aumento negli adolescenti con obesità
Peso	Generalmente magri, ma sovrappeso e obesità ora con più frequenza	sovrappeso/obesità in oltre il 90% dei casi
Autoanticorpi	Presenti	Assenti
Dipendenza all'insulina	Sì	No
Sensibilità all'insulina	Normale quando controllato	Ridotta
Storia familiare di diabete	Raro (5-10%)	Frequente (75-90%)
Rischio di chetoacidosi	Alto	Basso

DISTINZIONE TRA DIABETE TIPO 1 DA DIABETE DI TIPO 2 –

E' a volte difficile distinguere tra diabete tipo 1 e diabete tipo 2 con presentazioni atipiche.

- **La necessità di insulina di per sé non fa distinzione.** I pazienti con diabete tipo 1 hanno necessità assoluta di terapia insulinica, ma molti pazienti con diabete di tipo 2 perdono nel tempo la funzione delle cellule beta e richiedono insulina per il controllo del glucosio.
- **La chetoacidosi (DKA) non può fare distinzione.** Sebbene sia facile che si verifichi in presenza di deficit completo di insulina (diabete tipo 1), anche i pazienti con diabete di tipo 2 la sviluppano in determinate circostanze (es. infezioni/malattie gravi).
- **Il sovrappeso e l'insulino-resistenza non fanno distinzione.** In passato, lo scarso controllo metabolico del diabete di tipo 1 ha impedito alla maggior parte di questi pazienti l'aumento di peso. La terapia intensiva oggi comunemente utilizzata per gestire il diabete di tipo 1 ha

Diabete mellito altri tipi
specifici

Classificazione eziologica del diabete mellito

Altri tipi specifici

A. Difetti genetici nella funzione beta cellulare

1. Cromosoma 12, HNF-1-alfa (MODY3)
2. Cromosoma 7, glucokinasi (MODY2)
3. Cromosoma 20, HNF-4-alfa (MODY1)
4. Cromosoma 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)
5. Cromosoma 17, HNF-1-beta (MODY5)
6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6)
7. DNA mitocondriale

B. Difetti genetici nell'azione dell'insulina

1. Insulino-resistenza tipo A
2. Diabete lipoatrofico

Altri tipi specifici

MALATTIE DEL PANCREAS ESOCRINO –

- **Qualsiasi malattia che danneggi il pancreas, o la rimozione di tessuto pancreatico, può causare diabete; la variabilità nella frequenza con cui questo si verifica è determinata dal grado della insufficienza pancreatica (vedi tabella successiva).**
- Di solito si tratta di **diabete insulino-dipendente differente dal diabete tipo 1**, in quanto vengono colpite anche le cellule alfa pancreatiche, che producono glucagone. Di conseguenza, vi è un aumentato rischio di ipoglicemia, sia correlato al trattamento che

MALATTIE DEL PANCREAS ESOCRINO

La fibrosi cistica –

I meccanismi del diabete sono unici, in parte del diabete di tipo 1 e in parte di tipo 2, con associazione di diminuita produzione di insulina e insulino-resistenza.

Emocromatosi ereditaria –

Il diabete è presente al momento della diagnosi nel 50% dei pazienti sintomatici.

Pancreatite cronica –

l'intolleranza al glucosio si verifica con una certa frequenza, ma diabete mellito si manifesta tardivamente nel corso della malattia.

FREQUENZA DI DIABETE MELLITO IN DIVERSI TIPI DI MALATTIA PANCREATICA

MALATTIA	PERCENTUALE
Pancreatectomia totale	100
Pancreatectomia	
Distale	20-40
40-80% di resezione	40
80-90% di resezione	>60
Pancreatite	
Acuta	2-18
Cronica calcificante	60-70
Cronica noncalcificante	15-30
Emocromatosi	
primaria	75
secondaria	16
Carcinoma	40-50
Fibrosi cistica	10

Altri tipi specifici ENDOCRINOPATIE –

- Diversi ormoni, come l'adrenalina, il glucagone, il cortisolo e l'ormone della crescita, antagonizzano l'azione dell'insulina.
- Un aumento fisiologico del rilascio di questi ormoni costituisce la **risposta controregolatoria protettiva all' ipoglicemia**.
- **L'ipersecrezione primaria** (tumori secernenti) di questi ormoni può causare **iperglicemia a digiuno (IFG) o diabete conclamato**.

ENDOCRINOPATIE

A central green box labeled 'ENDOCRINOPATIE' is connected by lines to six surrounding ovals. The ovals contain descriptions of various endocrine disorders: Cushing's syndrome, Acromegaly, Pheochromocytoma, Glucagonoma, Somatostatinoma, and Hyperthyroidism.

Sindrome di Cushing,
ipofisaria o surrenalica o per
somministrazione esogena
di glucocorticoidi.

Acromegalia
eccesso di ormone
somatotropo o GH

Feocromocitoma per
eccesso di catecolamine

Glucagonomi, tumori secernenti
glucagone , associati a caratteristiche
cliniche, tra cui rash cutaneo, perdita
di peso, anemia, ed episodi
tromboembolici.

Ipertiroidismo, l'ormone
tiroideo interferisce con il
metabolismo del glucosio,
anche se un diabete
conclamato è insolito.

Somatostatinomi, tumori secernenti
somatostatina, tipicamente associati
alla triade di diabete mellito,
coleditiasi, e diarrea con steatorrea.

Altri tipi specifici

DIABETE INDOTTO DA FARMACI –

Molti farmaci possono alterare la tolleranza al glucosio.

- diminuendo la secrezione di insulina,**
- aumentando la produzione epatica di glucosio,**
- causando resistenza all'azione dell'insulina**

(vedi tabella).

Classificazione eziologica del diabete mellito

Altri tipi specifici

E. Indotto da farmaci

1. Pentamidina antimicrobico
2. Acido nicotinic ipocolesterolemizzante
3. Glucocorticoidi antinfiammatori
4. Ormone tiroideo terapia dell'ipotiroidismo
5. Diazoxide vasodilatatore, antiipoglicemizzante
6. Agonisti beta-adrenergici broncodilatatori
7. Tiazidi diuretici
8. Dilantin (fenitoina) anticonvulsivante
9. Interferone-alfa immunostimolante

Altri tipi specifici

INFEZIONI VIRALI –

Alcuni virus possono causare il diabete attraverso la distruzione delle cellule beta sia diretta che attraverso un meccanismo autoimmune.

In particolare:

- Rosolia congenita
- Citomegalovirus

Altri tipi specifici

DIABETE MELLITO GESTAZIONALE –

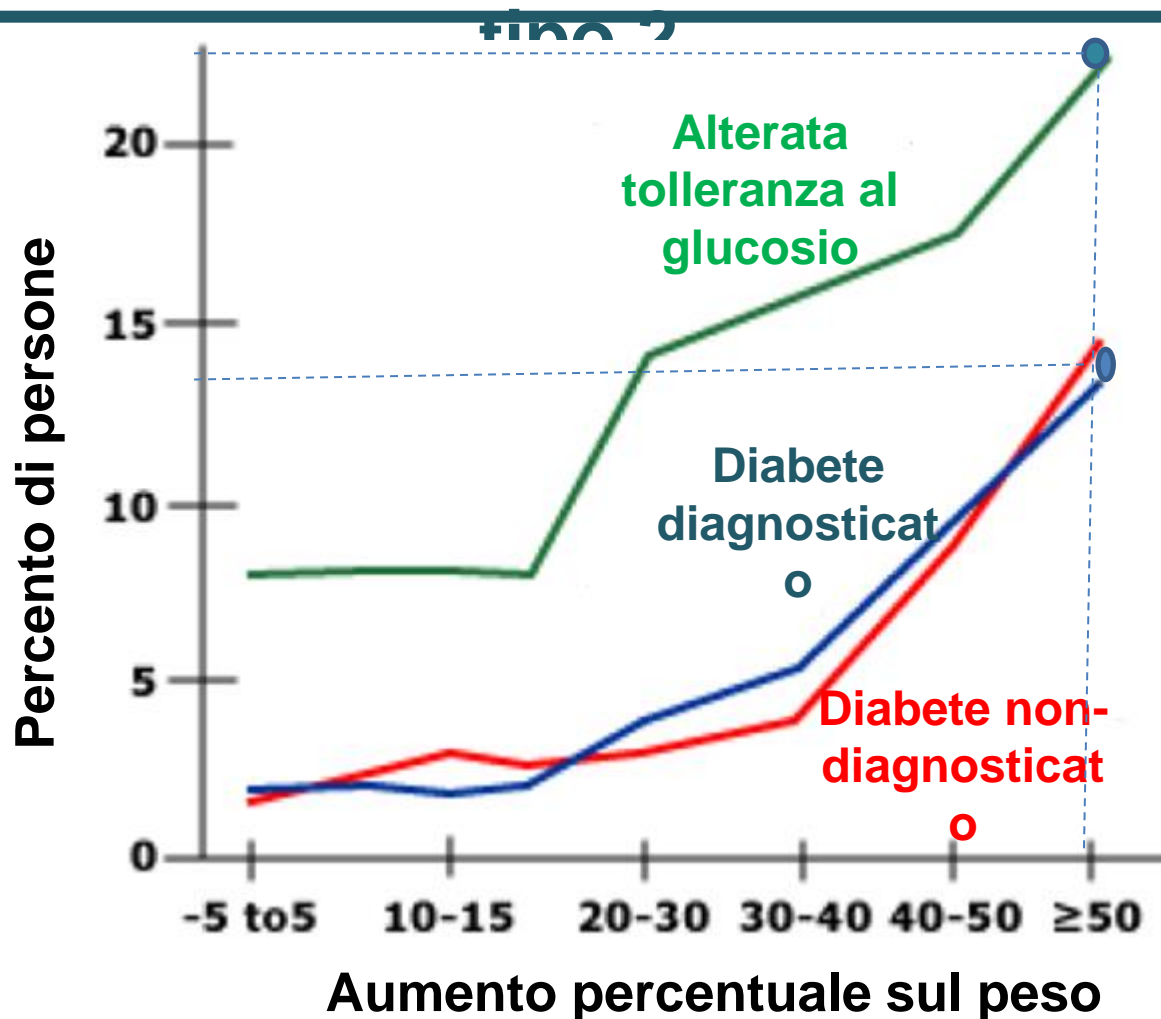
Il diabete gestazionale si verifica quando **la funzione del pancreas della donna non è sufficiente a superare:**

- **la resistenza all'insulina creata da ormoni anti-insulina secreti dalla placenta** (per es. estrogeni, prolattina, somatomammotropina corionica umana, cortisolo e progesterone)
- **il maggiore consumo di «combustibile» necessario per la crescita della madre e del feto.**
- Si stima che negli USA circa il **2% delle donne in gravidanza** sviluppino diabete gestazionale, che si

Patogenesi del diabete mellito tipo 2

- Il diabete mellito tipo 2 è **caratterizzato da:**
 - **iperglicemia,**
 - **insulino-resistenza,**
 - **secrezione di insulina relativamente carente.**
- È una malattia comune la cui prevalenza aumenta marcatamente con i gradi crescenti di **obesità** (*vedi figura successiva*).
- La sua prevalenza è **aumentata in modo allarmante negli ultimi dieci anni**, in gran parte legata alla tendenza all'obesità e allo stile di vita sedentario.

L' aumento di peso aumenta il rischio di diabete



Frequenze di alterata tolleranza al glucosio e di diabete tipo 2 diagnosticato e non-diagnosticato negli USA nella popolazione adulta in base all'aumento percentuale sul peso

FISIOPATOLOGIA –

Comprendere la patogenesi del diabete di tipo 2 è complicato da diversi fattori.

1. I pazienti presentano **una combinazione di vari gradi di insulino-resistenza e insulino-carenza relativa**, ed è probabile che entrambi contribuiscono al diabete.
2. Ciascuna delle caratteristiche cliniche si può manifestare con **influenze genetiche o ambientali**, il che rende difficile determinare l'esatta causa in un singolo paziente.
3. **L'iperglicemia stessa è in grado di alterare la funzione delle cellule beta del pancreas e aggravare la resistenza all'insulina**: ciò porta a un

FISIOPATOLOGIA –

4. E' spesso accompagnato da altre condizioni - ipertensione, elevati livelli sierici di LDLc e bassi livelli di HDLc -, che, come lo stesso diabete di tipo 2, aumentano il rischio cardiovascolare. Questa costellazione di condizioni cliniche è denominata **sindrome metabolica** in cui svolgono un ruolo importante:
- ❑ La **iperinsulinemia** in risposta alla resistenza all'insulina,
 - ❑ L'aumento dei livelli di **acidi grassi liberi** e di **citochine infiammatorie** dal tessuto adiposo e fattori ossidativi.

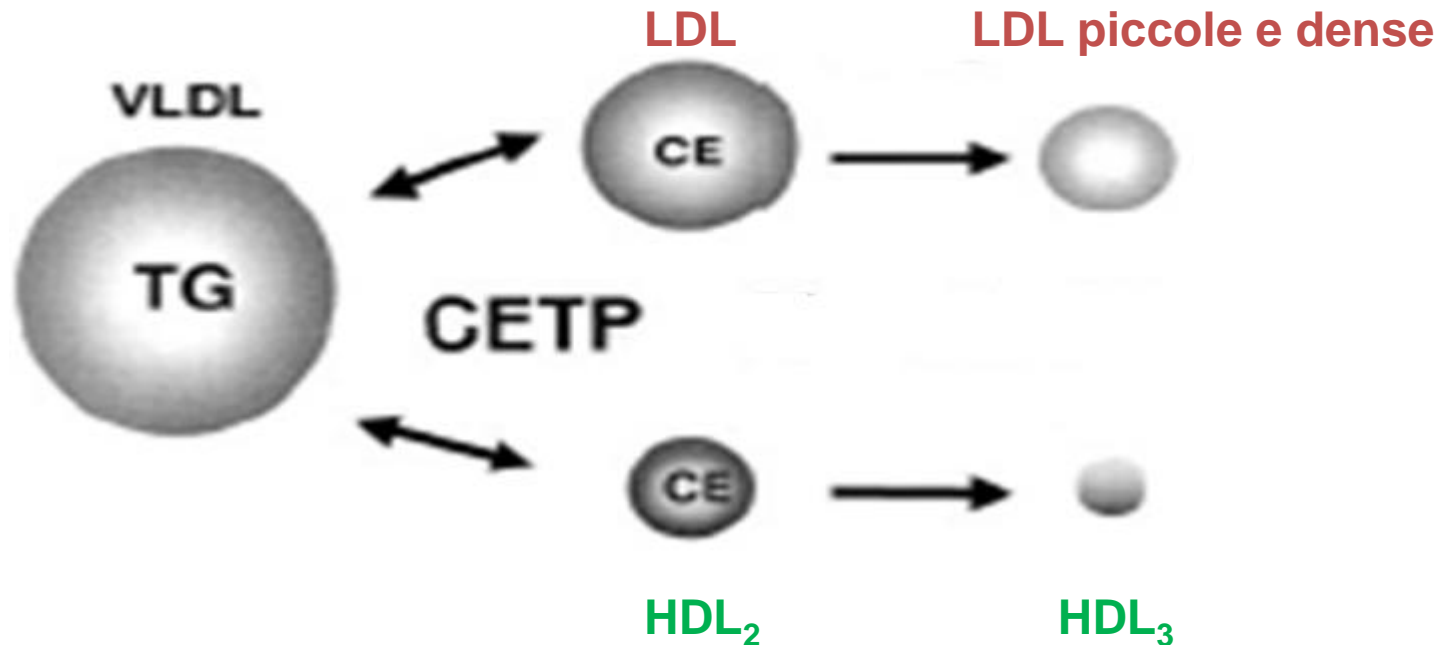
DISLIPIDEMIA NELLA SINDROME METABOLICA:

PRODUZIONE DI LIPOPROTEINE ATEROGENE



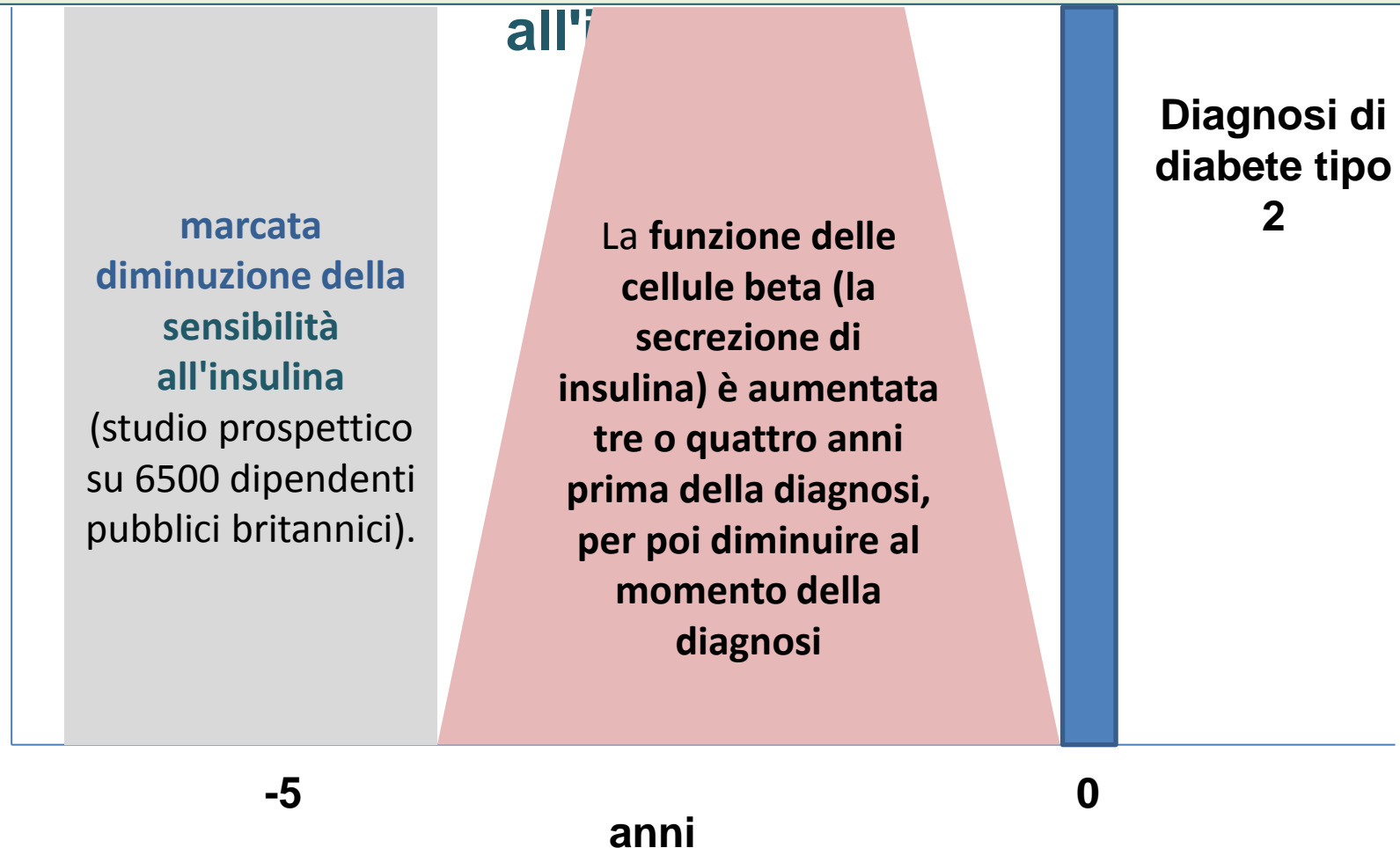
L'insulino-resistenza si associa a elevati acidi grassi liberi (FFA) che portano ad aumentata produzione dal fegato di lipoproteine contenenti apo B, che favoriscono l'aterosclerosi.

DISLIPIDEMIA NELLA SINDROME METABOLICA: RIMODELLAMENTO DELLE LIPOPROTEINE



Lo scambio di lipidi [trigliceridi (TG) con esteri del colesterolo (CE)] tra le lipoproteine (VLDL da una parte e LDL e HDL dall'altra), porta alla formazione di LDL e HDL ricche di trigliceridi, facile substrato della lipasi epatica, che trasforma le LDL in forme piccole e dense (molto aterogene) e riduce le HDL₂ (molto anti-aterogene)

Compromissione della secrezione di insulina e resistenza



insulino-resistenza (5 anni prima dello sviluppo di diabete) e **diminuita secrezione di insulina** sono **fattori di rischio indipendenti** per il diabete tipo 2 (studio prospettico su soggetti inizialmente non diabetici).

Secrezione di insulina –

- **La secrezione di insulina dalle cellule beta richiede il trasporto del glucosio nella cellula, mediata dal trasportatore di glucosio 2 (GLUT-2).**
 - In soggetti normali alimentati con **una dieta ricca di grassi**, compare un'alterazione a carico di GLUT-2 che causa intolleranza al glucosio.
- **L' inattivazione di ABCA1, un trasportatore cellulare di colesterolo, nelle cellule beta determina una secrezione difettosa di insulina, una ridotta tolleranza al glucosio.**

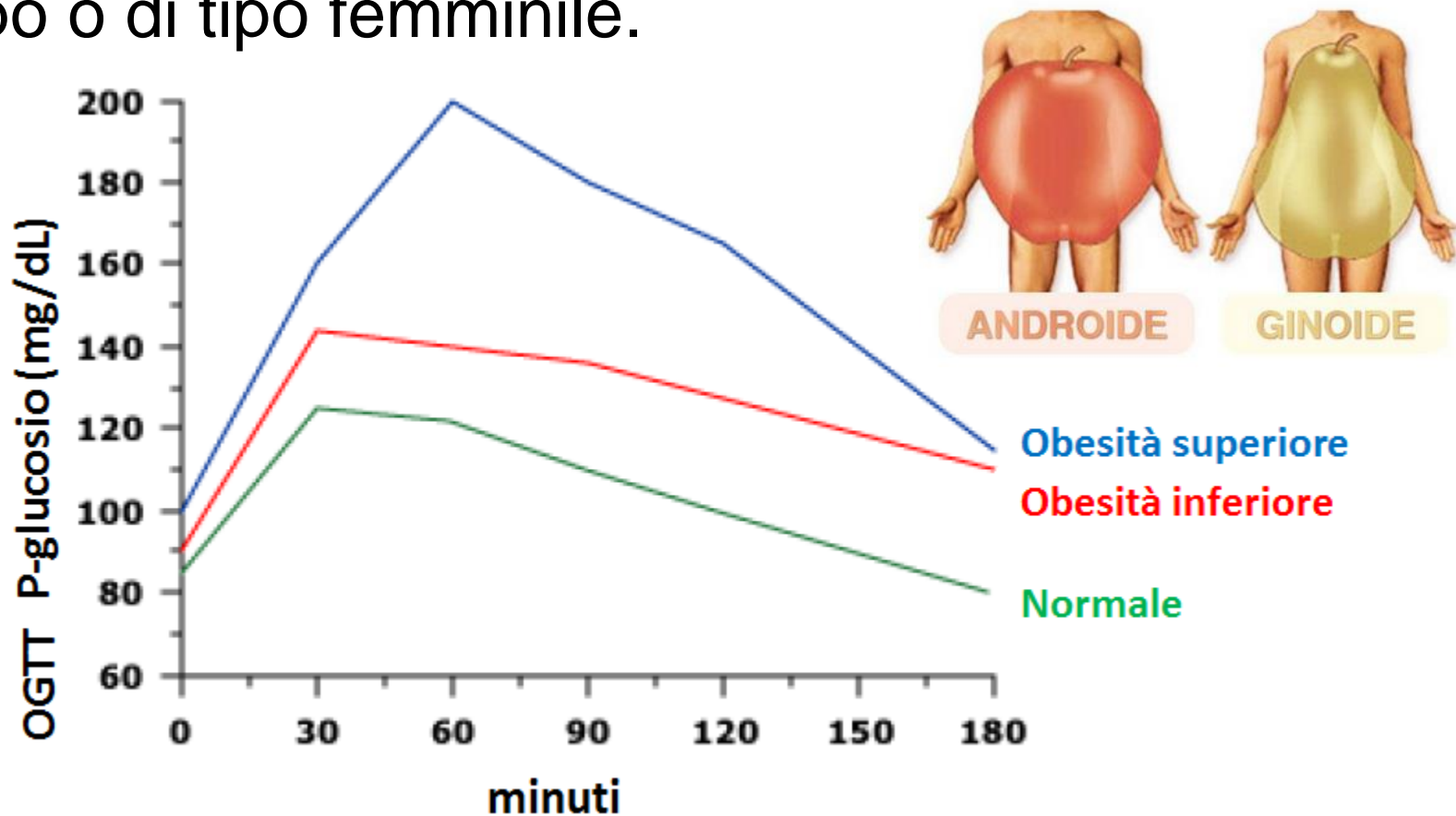
Insulino resistenza –

La resistenza all'insulina può essere **il miglior predittore** di diabete di tipo 2.

- Gran parte dei pazienti sembra avere un **rischio genetico**.
- La resistenza all'insulina **si aggrava con l'aumentare dell'età e del peso** in soggetti suscettibili.
- In soggetti normopeso **l'iperinsulinemia sia a digiuno che post-glucosio** predice il futuro aumento di peso, che a sua volta predispone alla iperglicemia.
- **L'iperglicemia** stessa contribuisce con un **effetto tossico sulla beta cellule, che riduce l'espressione del gene per l'insulina**.

Tipologia di distribuzione del grasso –

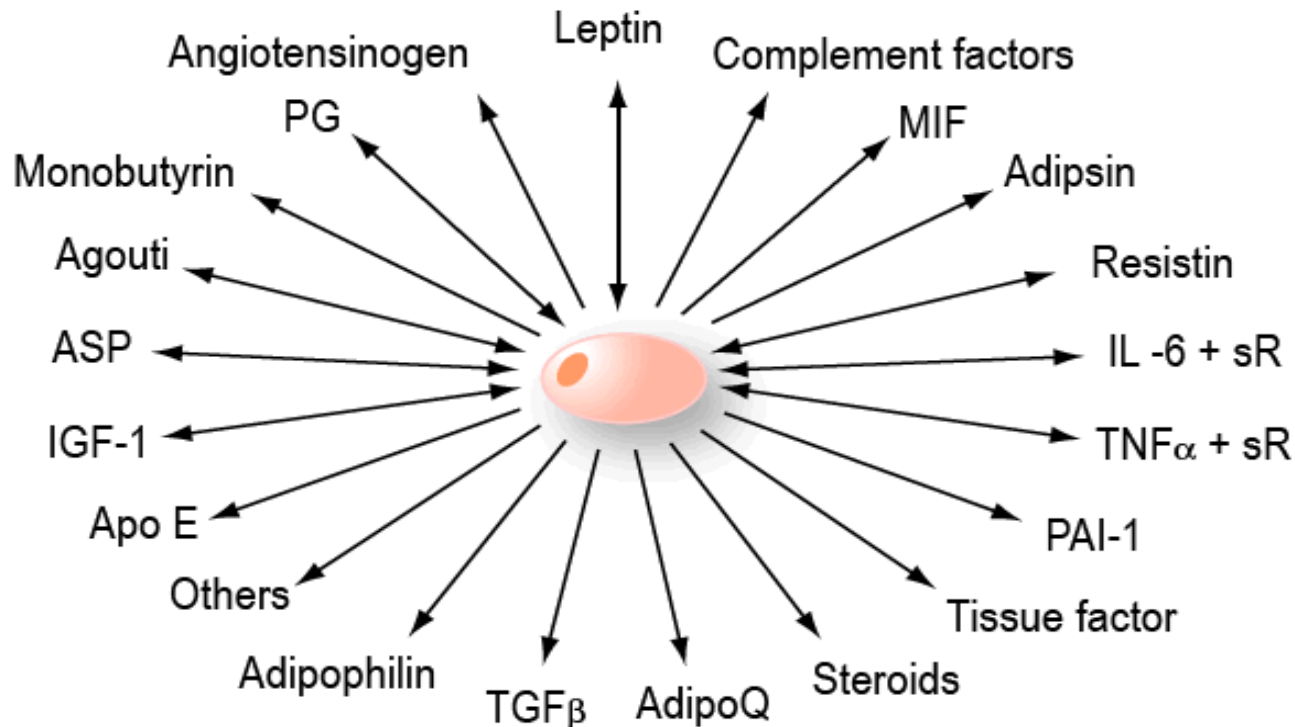
L' **obesità** della parte superiore del corpo o di tipo **maschile** obesità ha una maggiore associazione con la **resistenza all'insulina** e la intolleranza al glucosio rispetto alla obesità della parte inferiore del corpo o di tipo femminile.



Insulino resistenza e obesità -

La resistenza all'insulina è collegata alle sostanze secrete dagli adipociti, le "**adipochine**" tra cui leptina, adiponectina, fattore di necrosi tumorale alfa, e resistina.

Adipociti e adipochine



Meccanismi con cui
l'obesità induce
insulino-resistenza

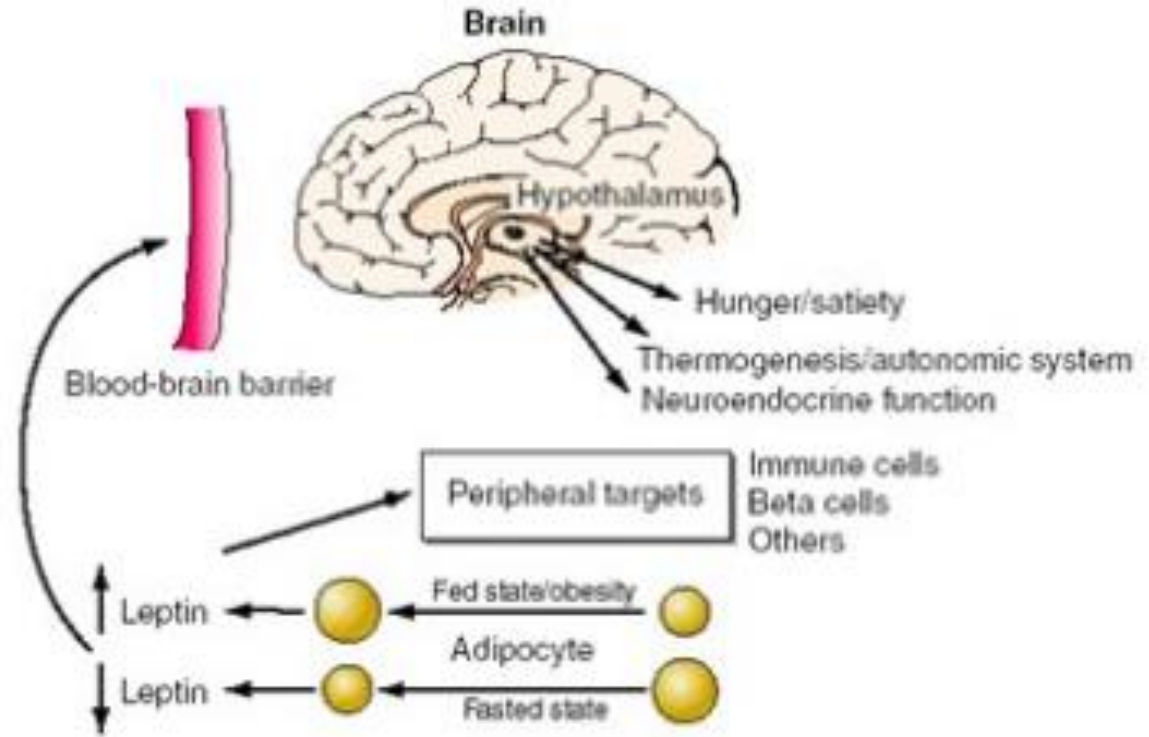
Acidi grassi liberi: aumentano nell'obesità e inibiscono:
- la secrezione d'insulina,
- la captazione di glucosio mediata dall'insulina

Tumor Necrosis Factor-alfa: riduce l'azione dell'insulina

Adiponectina: la cui carenza provoca insulino-resistenza

Leptina: modula il peso regolando l'assunzione di cibo e la spesa energetica.

Fattori rilasciati dal tessuto adiposo



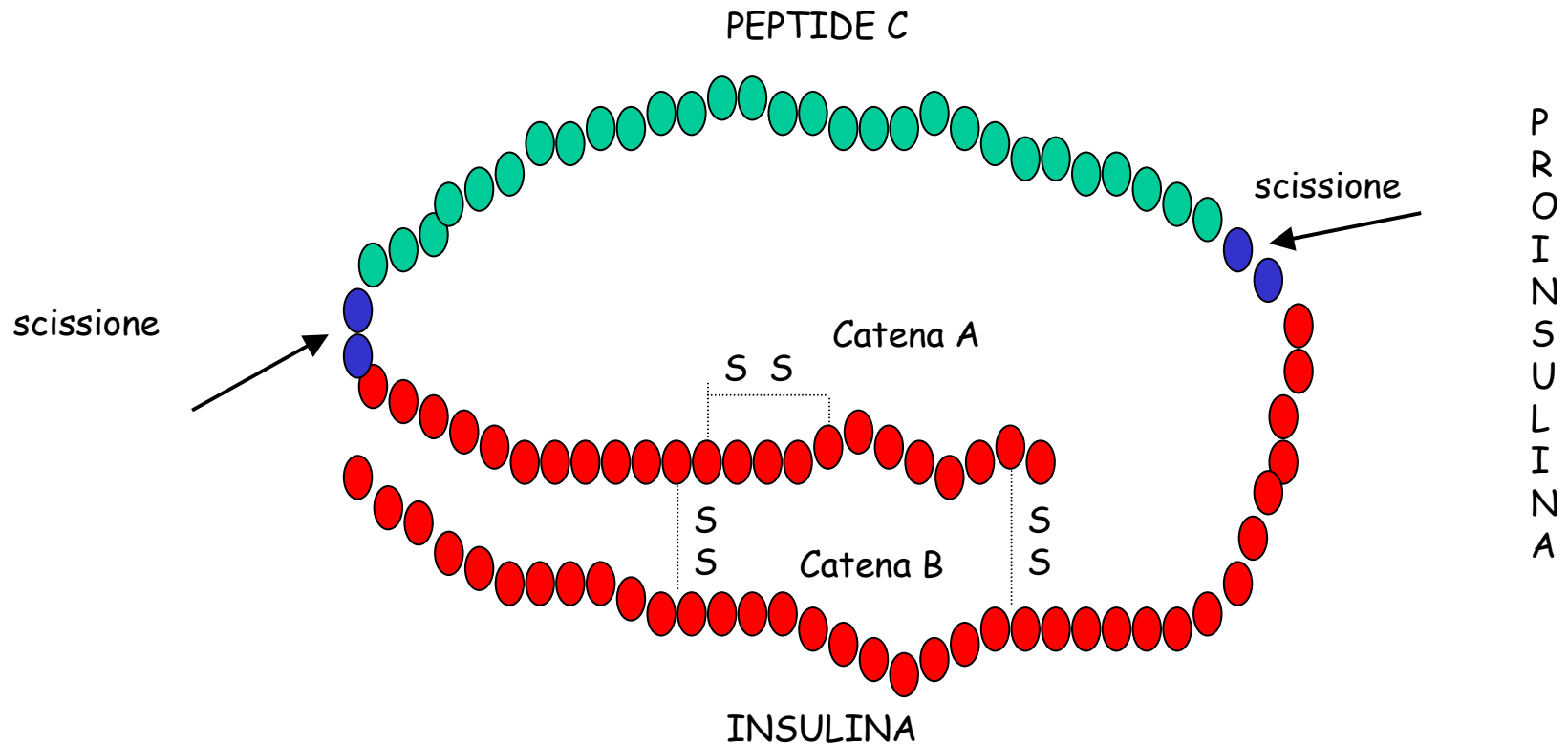
La leptina –

- E' una citochina prodotta dagli adipociti e viene **secreta in proporzione alla massa degli adipociti**.
- Essa **segnala all'ipotalamo la quantità di grasso accumulato** (azione ipotalamica).
- La **carenza di leptina** e la **resistenza alla leptina** sono associati all'**obesità** e all'**insulino-resistenza**.

L'adiponectina –

- **Riduce i livelli ematici di acidi grassi liberi,**
 - **Si associa a migliori profili lipidi,**
 - **Migliora il controllo glicemico.**
- **E' inversamente correlata al rischio di diabete.**
- **E' retroregolata nella obesità.**
- **L' adiponectina e i recettori della adiponectina, possono diventare un obiettivo importante nella gestione del diabete.**
- **Due studi dimostrano che la dieta con fibre di cereali e un ridotto carico glicemico aumentano l'adiponectina nei soggetti diabetici.**

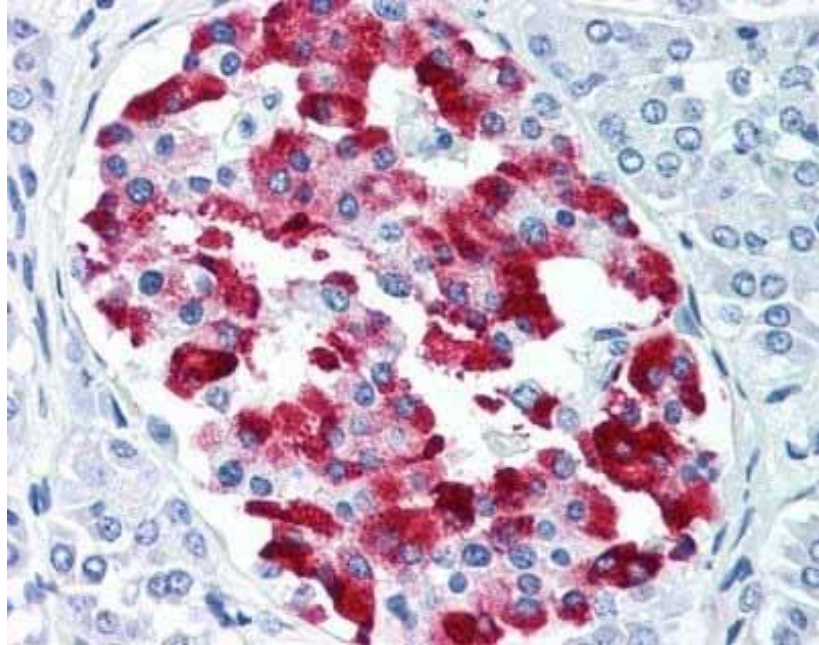
DIFETTO DI PROCESSAZIONE DELL' INSULINA



Difettosa processazione dell'insulina.

- **Normalmente** l'insulina si forma per scissione della proinsulina e solo il **10-15%** dell'insulina è secreta come proinsulina.
- **Nel diabete tipo 2** la quota di proinsulina sale **>40%** nello stato basale e ancor di più sotto stimolo (con arginina o glucagone).

AMILINA



Amilina nelle beta-insule

- E' contenuta nei granuli di **secrezione insieme all'insulina** con cui è co-secreta: normalmente i livelli serici sono circa il 10% di quelli dell'insulina, ma **nel diabete aumentano** di molto.
 - Elevate concentrazioni di amilina nel pancreas riducono la captazione del glucosio da parte delle cellule beta ed **inibiscono la secrezione d'insulina.**
- **Pramlintide** è un analogo sintetico della amilina umana che rallenta lo svuotamento gastrico, riduce il picco glicemico postprandiale e migliora la concentrazioni di HbA1c nei pazienti con diabete di tipo 1

Suscettibilità genetica –

Il diabete di tipo 2 rappresenta una complessa **interazione tra molti geni e fattori ambientali** e il rischio è **poligenico**.

- **La prevalenza** del diabete di tipo 2 **varia notevolmente tra i gruppi etnici** che vivono nello stesso ambiente (*negli USA è da due a 6 volte più frequente negli afro-americani, nativi americani, indiani Pima, e ispanici americani rispetto ai bianchi*).
- Il 39% dei pazienti con diabete di tipo 2 ha **almeno un genitore con la malattia**. Con un parente di primo grado con diabete di tipo 2 il rischio è **5-10 volte superiore** dopo parificazione per età e peso.
- Parenti di primo grado di pazienti con diabete di tipo 2 spesso hanno:
 - **alterato metabolismo non-ossidativo del glucosio** (indicativo di insulino-resistenza) molto prima di sviluppare diabete di tipo 2
 - **disfunzione delle cellule beta** come evidenziato da una

Magnitude of Complications

Leading cause
of blindness
in working age
adults



**Diabetic
Retinopathy**



Stroke

2-fold to 4-fold
increase in
cardiovascular
mortality
and stroke



**Diabetic
Nephropathy**

Leading cause of
end-stage renal disease

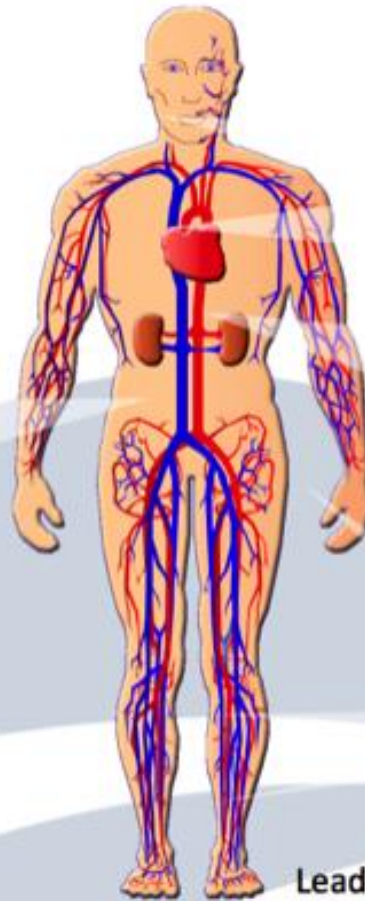


**Cardiovascular
Disease**

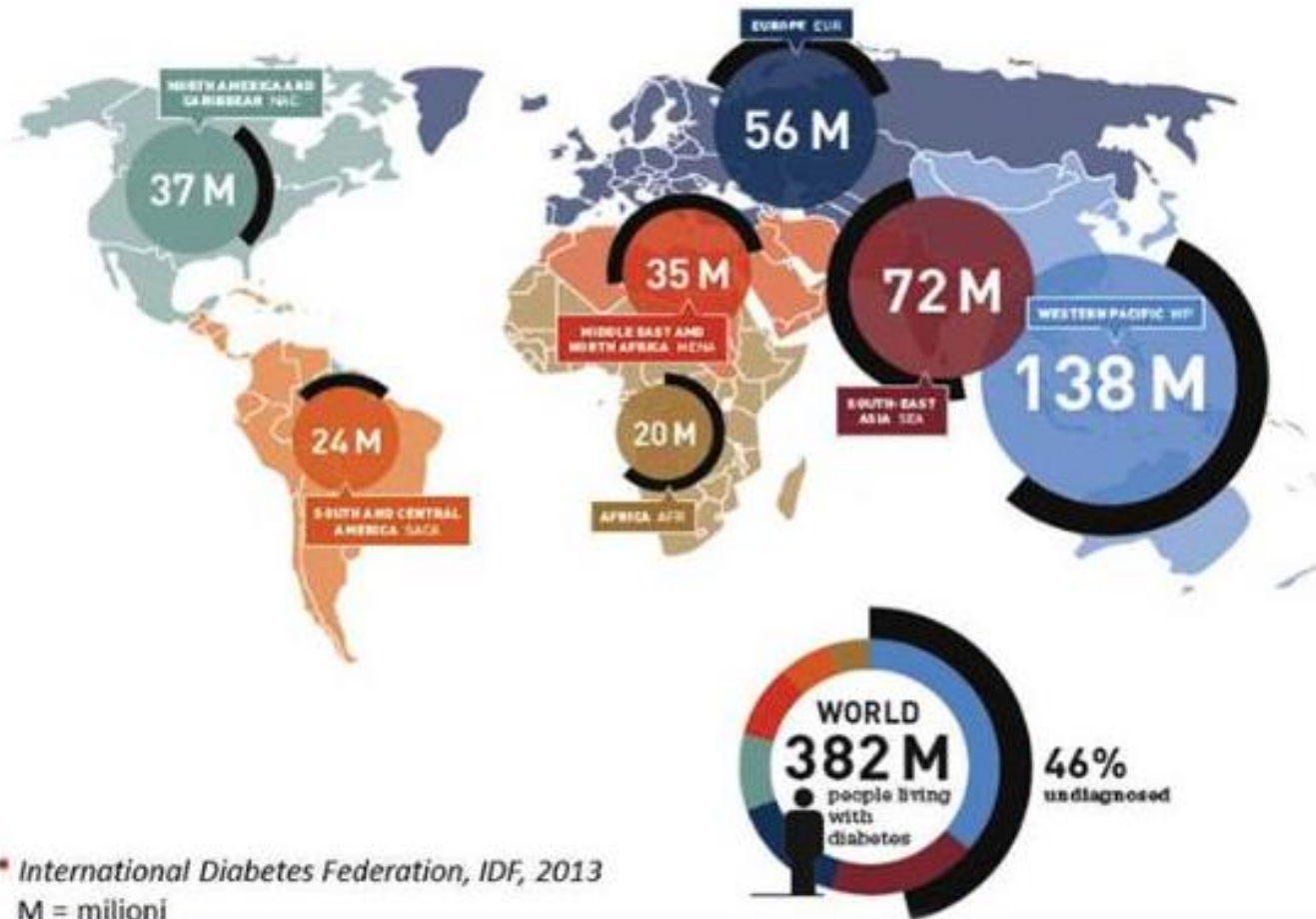


**Diabetic
Neuropathy**

Leading cause of nontraumatic
lower extremity amputations

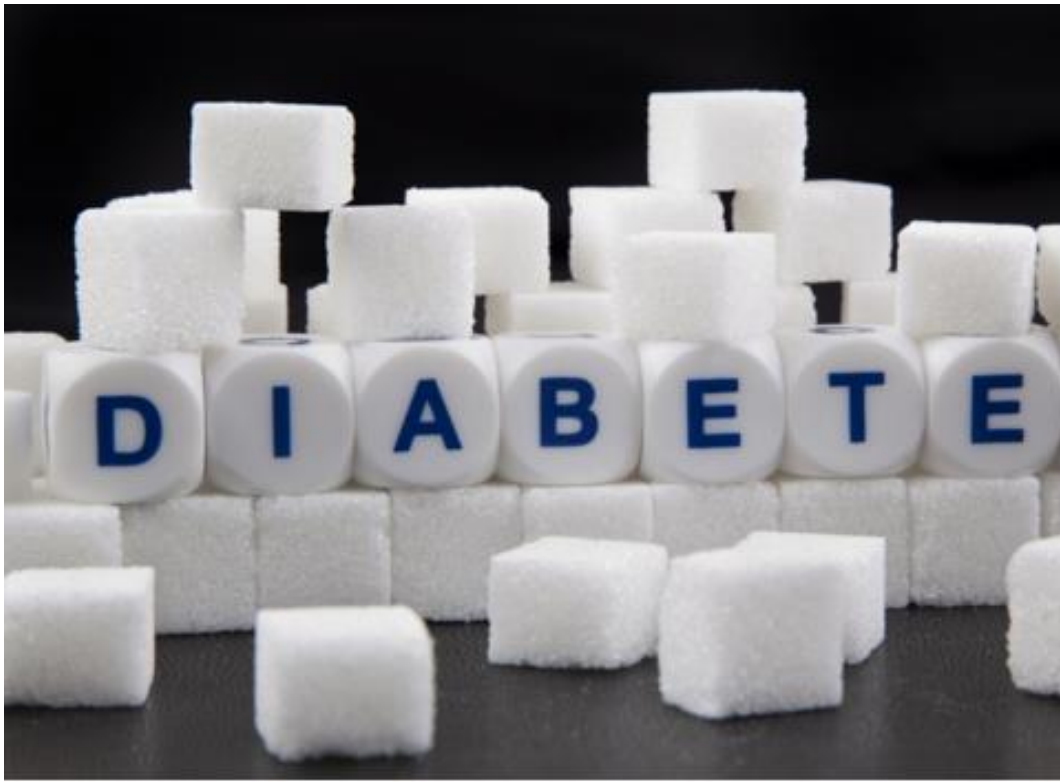


NUMERO DI PERSONE CON DIABETE*



* International Diabetes Federation, IDF, 2013
M = milioni

Diabete Mellito



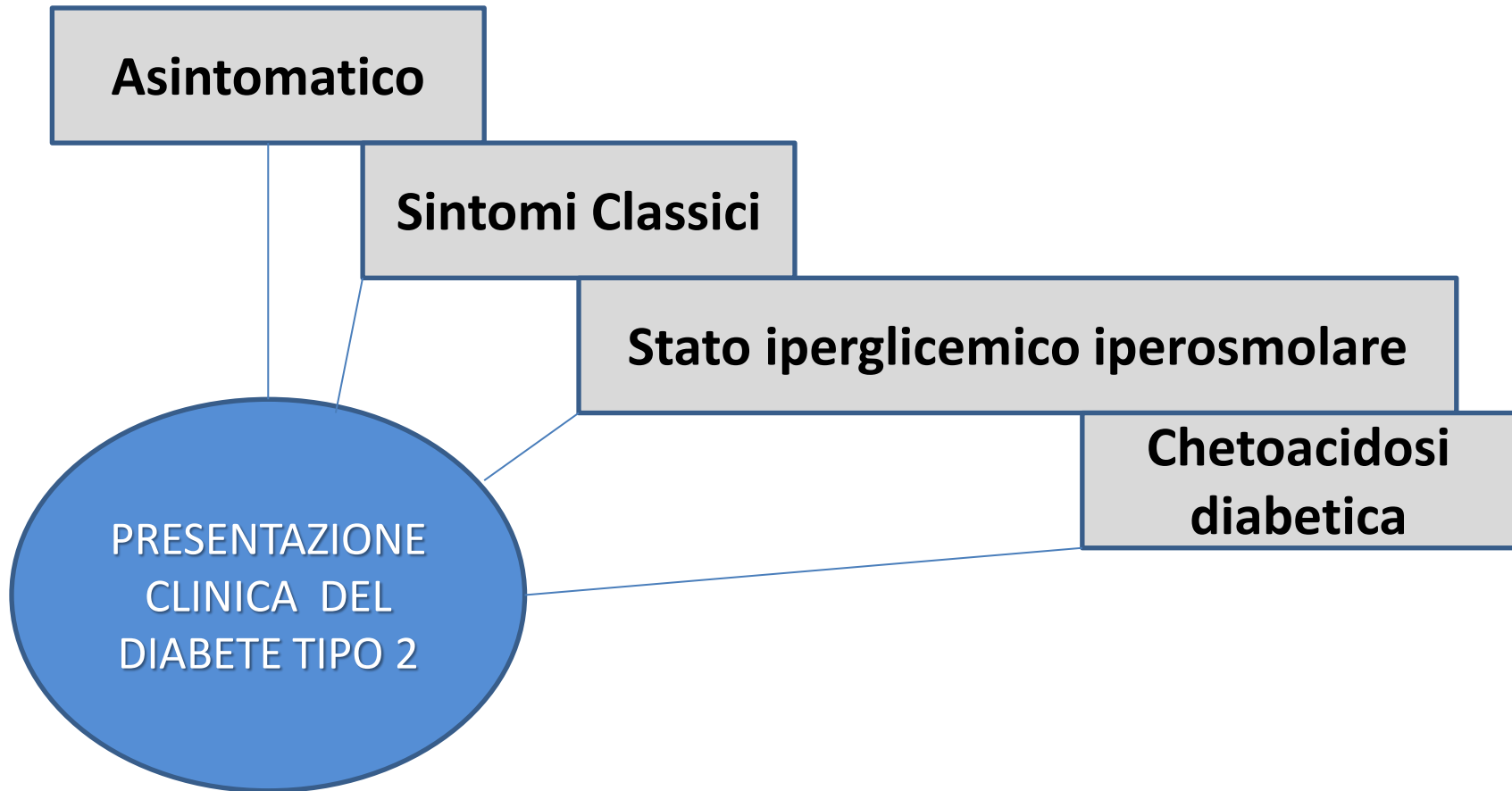
PARTE 2

**ANNO ACCADEMICO
2015-2016**

PATOLOGIA CLINICA

Prof. Renzo Schiavon

Presentazione clinica e diagnosi di diabete mellito negli adulti



Asintomatico

Sintomi Classici

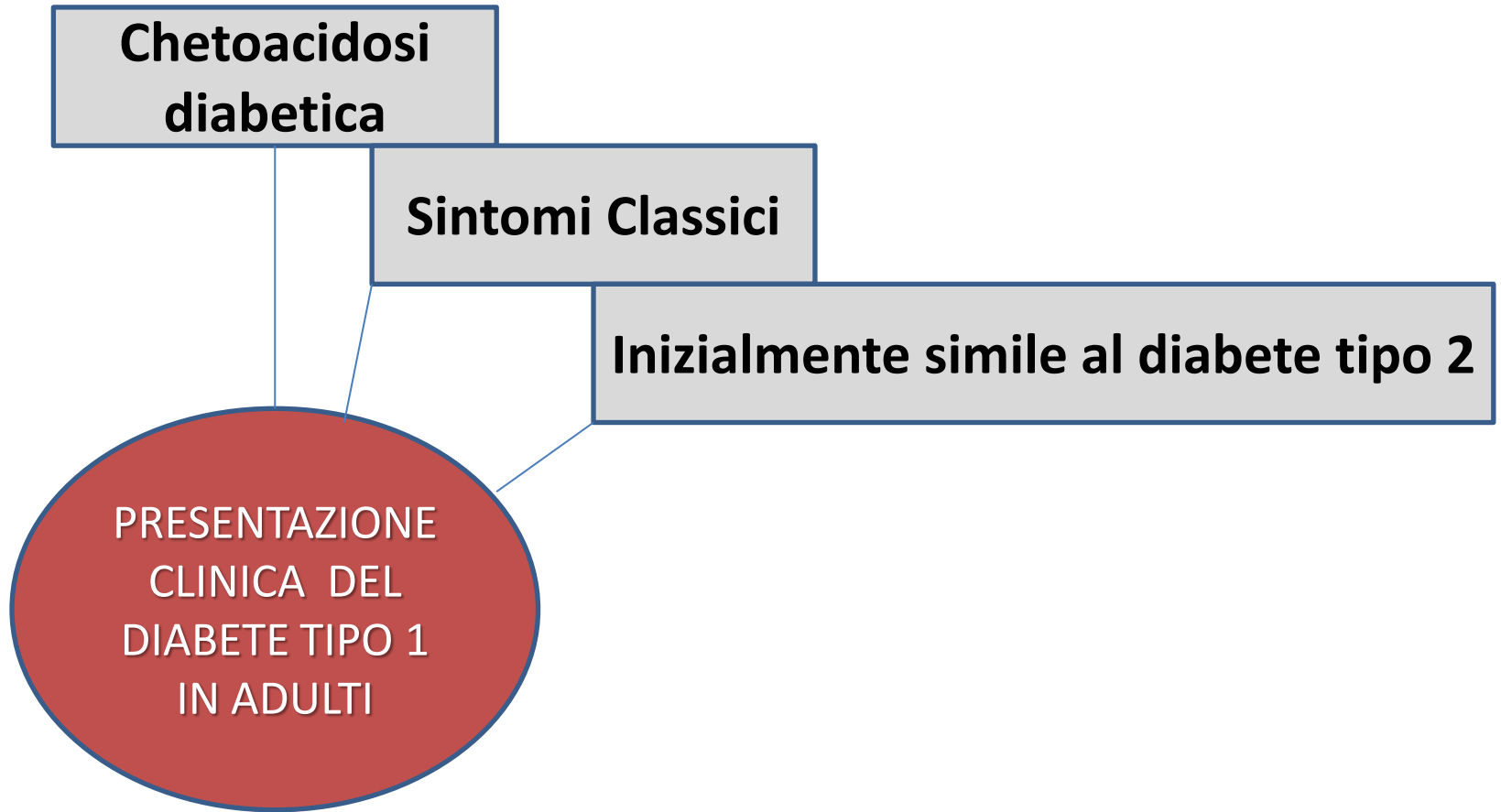
Stato iperglicemico iperosmolare

**Chetoacidosi
diabetica**

**PRESENTAZIONE
CLINICA DEL
DIABETE TIPO 2**

- **Asintomatico.** Nella maggior parte dei pazienti: la iperglicemia è **riscontrata casualmente**, confermata poi da ulteriori test. *Al contrario, la frequenza del diabete sintomatico è diminuita parallelamente alla attivazione dello screening.*
- **Sintomi classici** di iperglicemia includono **poliuria, polidipsia, nicturia, visione offuscata.**
 - La **poliuria** si verifica quando la concentrazione di P-glucosio aumenta oltre 180 mg/dL (10 mmol/L), superando così la soglia renale per il glucosio con conseguente aumento dell'escrezione urinaria di glucosio.
 - La **glicosuria** provoca diuresi osmotica (cioè, poliuria) e ipovolemia che a sua volta porta a

- **Stato iperglicemico iperosmolare.**
Condizione **rara**, caratterizzata da una marcata iperglicemia senza chetoacidosi, grave disidratazione, e ottundimento.
- La **chetoacidosi diabetica (DKA).**
Condizione **rara** che si può verificare in determinate circostanze (di solito **infezione grave o altra malattia**).



PRESENTAZIONE CLINICA del Diabete tipo 1–

- La **chetoacidosi diabetica (DKA)** può essere la presentazione iniziale nel **25% degli adulti** con nuova diagnosi di diabete di tipo 1.
- **Sintomi classici** di iperglicemia (poliuria, polidipsia, affaticamento): gli adulti hanno in genere un **periodo più lungo** , rispetto ai bambini, prima che i sintomi compaiano.
- **Presentazione clinica simile a quella del diabete di tipo 2** (inizialmente non insulino dipendente), con deficit di insulina su base autoimmune che si sviluppa più tardi nel corso della malattia, condizione nota come **LADA** (latent autoimmune diabetes of adults): ciò si verifica nel 2-12% degli adulti diabetici.

LE SOCIETÀ SCIENTIFICHE PER IL DIABETE

rivalutano periodicamente le raccomandazioni per la **classificazione**, la **diagnosi** e lo **screening** del diabete, sulla base delle nuove acquisizioni della ricerca e della pratica clinica.

L'American Diabetes Association (ADA) ha pubblicato i criteri diagnostici per il diabete mellito nel 1997, con follow-up successivi nel 2003, nel 2010 e nel 2014.

La diagnosi si basa su una delle quattro anomalie:

1. aumento della emoglobina glicata (HbA1c),
2. aumento della glicemia a digiuno (FPG),
3. alterato test di tolleranza al glucosio orale (OGTT),
4. elevata glicemia casuale con sintomi (*vedi tabella*).

I pazienti che presentano solo alterata glicemia a digiuno (IFG) e/o ridotta tolleranza al glucosio (IGT) e/o alterata HbA1c sono indicati come avere un **aumentato**

Tabella -Criteri per la diagnosi del diabete

A1C $\geq 6.5\%$. Il test deve essere effettuato in un laboratorio che utilizza un metodo NGSP certificato e standardizzato per il test DCCT. *

OPPURE

FPG ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Il digiuno è definito come non assunzione calorica per almeno 8 ore. *

OPPURE

2-h PG durante OGTT ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Il test deve essere eseguito come descritto dall'OMS, con un carico di glucosio contenente l'equivalente di 75 g di glucosio anidro sciolto in acqua. *

OPPURE

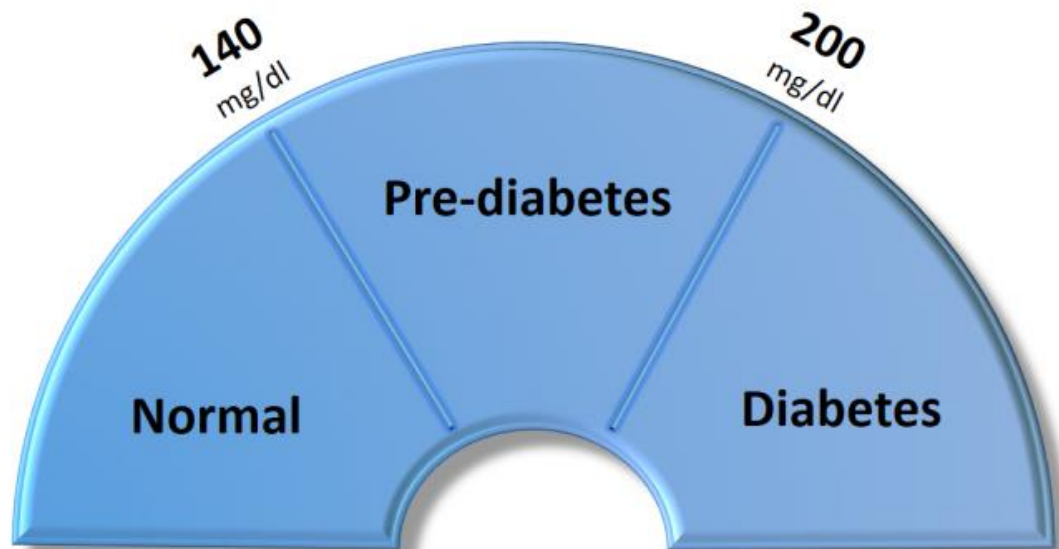
In un paziente con sintomi classici di iperglicemia o di crisi iperglicemica, un **glicemia casuale ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).**

* In assenza di iperglicemia inequivocabile, il risultato deve essere confermato da un test ripetuto.

A1C: Emoglobina glicata; NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program; DCCT: diabetes control and complications trial; FPG (fasting plasma glucose) glucosio plasmatico a digiuno; 2-h PG: Glucosio plasmatico alla 2a ora. OGTT: (oral glucose tolerance test) test da carico orale di glucosio.



2-hour OGT test



CATEGORIE CON AUMENTATO RISCHIO DI DIABETE (PREDIABETE)

FPG 100-125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)

– **ALTERATA GLICEMIA A DIGIUNO**

(Impaired Fasting Glucose –IFG)

o **IPERGLICEMIA NON DIABETICA**

2-h PG in OGTT 140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmol/L)

– **ALTERATA TOLLERANZA AL GLUCOSIO**

(Impaired Glucose Tolerance-IGT)

A1C 5.7-6.4 per cento

- Per tutti e tre i test il rischio è continuo, divenendo estremamente grande per i valori più alti del range.
- La proporzione di soggetti nelle categorie IFG, IGT e diabete aumenta con l'età e con il grado d'obesità.
- **I criteri EDEG** (European Diabetes Epidemiology Group) conservano l'originale valore cut-off di 110 mg/dL (6.1 mmol/L) per

CRITERI DIAGNOSTICI –

1. Se ci sono sintomi di iperglicemia

La diagnosi di diabete mellito è facilmente stabilita: il paziente si presenta con i sintomi classici:

sete, poliuria, perdita di peso, visione offuscata associati a un **valore di glicemia casuale ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)**.

2. In un individuo asintomatico

La diagnosi viene fatta con i criteri diagnostici, sviluppati sulla base della **associazione tra i livelli di glucosio e il rischio di sviluppare retinopatia**.

- **Glicemia a digiuno (FPG) ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L),**
- **2h-PG dopo carico orale di glucosio (OGTT) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L),**

• **valori di emoglobina glicata (A1C) valori $> 6.5\%$**

CRITERI DIAGNOSTICI –

In un individuo asintomatico

- La diagnosi può essere stabilita con **uno qualsiasi dei suddetti criteri di laboratorio.**
- **Un risultato anomalo deve essere confermato mediante ripetizione della misura dalla successiva giornata in poi con lo stesso test.**

Lo stesso test perché le diverse misure di glicemia (glicemia a digiuno, a due ore con OGTT e HbA1c) rappresentano diversi fenomeni fisiologici, ciascuno dei quali identifica diverse porzioni di popolazione con diabete. Infatti:

- *l'utilizzo di A1c in luogo di FPG può diminuire la proporzione di pazienti identificati come diabetici.*
- *2h-PG (test di tolleranza al glucosio orale o OGTT) identifica gruppi diversi rispetto a FPG.*

Osservazioni sulle condizioni glucometaboliche individuate con la misura del glucosio

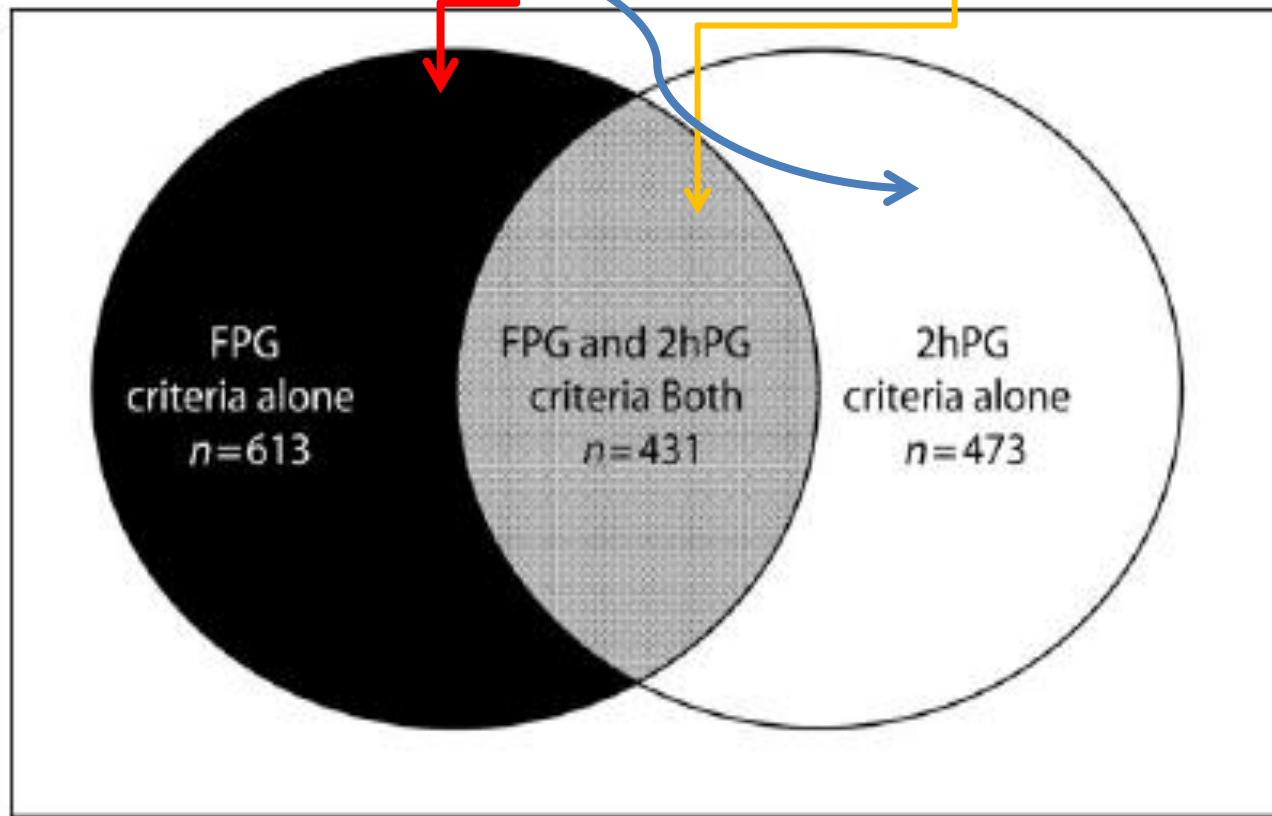
Le determinanti metaboliche e le basi fisiologiche di FPG e 2-h PG differiscono tra loro.

Un individuo nella categoria alterata glicemia a digiuno (IFG), che esegue poi la OGTT, può avere intolleranza al glucosio (IGT) oppure diabete mellito.

Confronto tra FPG e 2-h PG

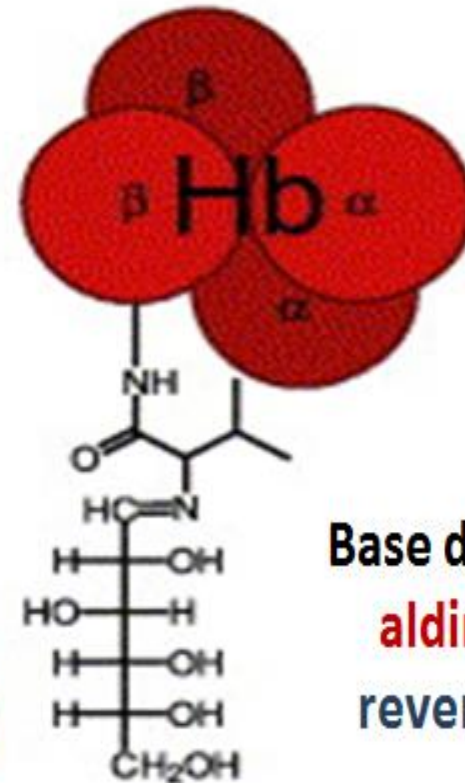
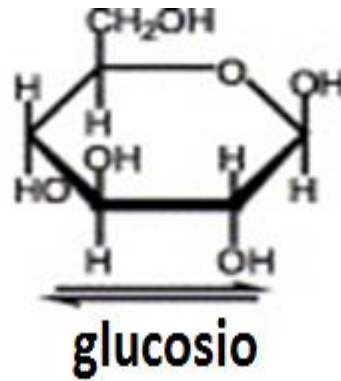
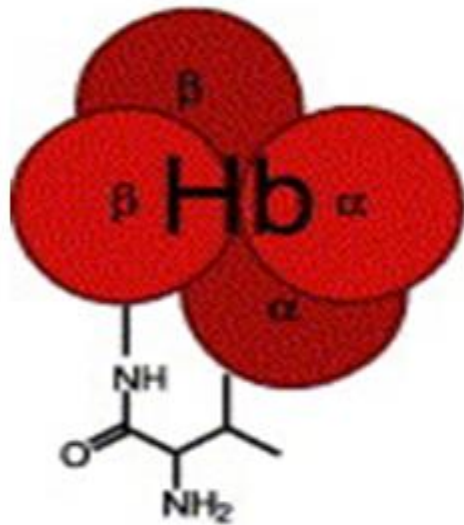
FPG ≥ 126 mg/dL e 2-h PG ≥ 200 mg/dL spesso identificano gli stessi individui, ma non sempre coincidono (Studi DECODE e NHANES III).

- Solo il 28-44% dei diabetici incontrano **entrambi i criteri**,
- il 14-40% incontra **solo FPG**
- il 31-41% **solo 2-h PG**



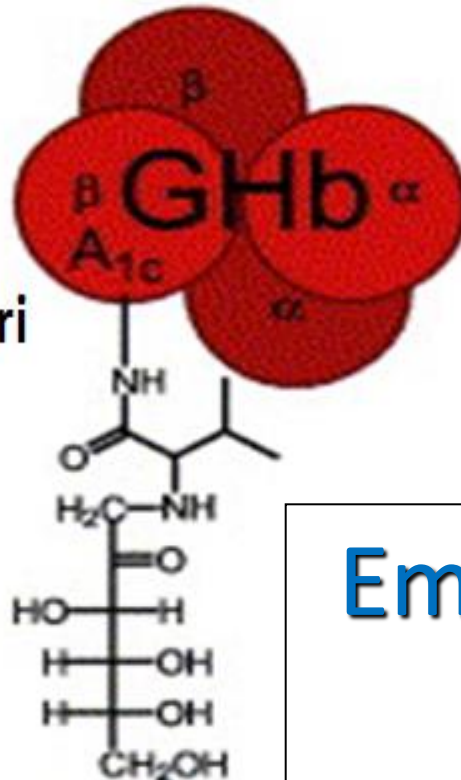
Significato di glicemia a digiuno -FPG e dopo carico orale di glucosio - OGTT

FPG	OGTT
<p>Un normale FPG richiede capacità di mantenere:</p> <ul style="list-style-type: none">• un'adeguata secrezione basale d'insulina e• un'appropriata sensibilità epatica all'insulina per controllare l'output epatico del glucosio	<p>Durante OGTT la normale risposta all'assorbimento del carico di glucosio è</p> <ul style="list-style-type: none">• sia la soppressione dell'output epatico del glucosio• che l'aumento di captazione del glucosio dal fegato e dal muscolo scheletrico. <p>Richiede:</p> <ul style="list-style-type: none">❑ dinamiche appropriate di risposta secretoria delle β-cellule (in quantità e tempo)❑ adeguata sensibilità all'insulina di fegato e



Base di Schiff
aldimina
reversibile

Riarrangiamento di Amadori
chetoamina
irreversibile



Emoglobina glicata
(HbA_{1c})

A1C

Deve essere misurata con un metodo

- **certificato** (National Glycohemoglobin Standardization Program - NGSP) e
- **riconducibile** al dosaggio di riferimento (Diabetes Control and Complications Trial -DCCT).

Il point-of-care (POC) test della A1C può essere un metodo certificato NGSP, ma non è raccomandato.

Esiste una forte **correlazione** tra livelli di A1C e il rischio di retinopatia, che è presente anche con FPG e 2-h PG.

Rispetto a FPG e OGTT la A1C presenta

- **vantaggi:** maggior agio perché il digiuno non è richiesto, maggiore stabilità preanalitica, minori variazioni: nel giorno, tra i giorni e nel caso di stress e malattie

Anemie / Emoglobinopatie

- L'interpretazione dei livelli di A1C è problematica in presenza di certe anemie e emoglobinopatie.
- Per i pazienti con una **emoglobina anomala** ma normale turnover eritrocitario, come il tratto falcemico, bisogna usare un test privo d'interferenze da emoglobine anormale. Una lista aggiornata è disponibile all'indirizzo [www.ngsp.org / interf.asp](http://www.ngsp.org/interf.asp).
- In situazioni di **alterato turnover eritrocitario**, come la gravidanza, una recente emorragia, una trasfusione e alcuni tipi di anemia, per diagnosticare il diabete si usano i criteri basati sulla glicemia.

A1C INTERFERENZE

Method	Interference from HbC	Interference from HbS	Interference from HbE	Interference from HbD	Interference from elevated HbF
Arkray ADAMS A1c HA-8180V (Menarini)	No	No	HbA1c not quantified	HbA1c not quantified	No <30% HbF
Axis-Shield Afinion	No	No	No	No	\$
Beckman AU system	Yes	Yes	No	No	\$
Beckman Synchron System	No	No	No	No	\$
Bio-Rad D-10 (A1c program)	No	No	No	No	No <10% HbF
Bio-Rad Variant II NU	-	-	No	No	No <10% HbF
Bio-Rad Variant II Turbo	No	No	Yes	Yes	No <5% HbF
Bio-Rad Variant II Turbo 2.0	No	No	No/Yes (conflicting reports)	No	No <25% HbF
Bio-Rad in2it	Yes	No	Yes	No	\$
Ortho-Clinical Vitros	No	No	No	No	\$

@ si presume che l'immunodosaggio non presenti interferenze clinicamente significativa da HbE e HbD perché la sostituzione E e la sostituzione D sono distanti dall' 'N-terminale della catena beta dell'emoglobina .

\$ si presume che sia immunodosaggio e metodi di affinità con Boronato mostrino interferenze da livelli di HbF superiori al 10-15%.

A1C INTERFERENZE

Method	Interference from HbC	Interference from HbS	Interference from HbE	Interference from HbD	Interference from elevated HbF
Polymer Tech Systems A1cNOW	Yes	Yes	No	No	\$
Roche Cobas Integra Gen.2	No	No	No	No	\$
Roche/Hitachi (Tina Quant II)	No	No	No	No	\$
Sebia Capillarys 2 Flex Piercing	No	No	No	No	No <15% HbF
Siemens Advia A1c (new version)	No	No	@	@	\$
Siemens DCA 2000/Vantage	No	No	No	No	No <10% HbF
Siemens Dimension	No	No	No	No	\$
Tosoh G7	Yes	No	Yes	No	No ≤30% HbF
Tosoh G8	No	No	Yes	No	No ≤30% HbF
Trinity (Primus) HPLC (affinity)	No	No	No	No	No <15% HbF

@ si presume che l'immunodosaggio non presenti interferenze clinicamente significativa da HbE e HbD perché la sostituzione E e la sostituzione D sono distanti dall' 'N-terminale della catena beta dell'emoglobina .

\$ si presume che sia immunodosaggio e metodi di affinità con Boronato mostrino interferenze da livelli di HbF superiori al 10-15%.

Glicemia a digiuno e a due ore durante curva da carico (OGTT)

- Oltre al test A1C, anche FPG e 2-h PG possono anche essere utilizzati per la diagnosi di diabete.
- La **concordanza tra FPG e 2-h PG è <100%**. Anche la **concordanza tra A1C e entrambi i test** basati sul glucosio è **imperfetta**.
- A1C al cut-point $\geq 6,5\%$ identifica meno casi di diabete rispetto a FPG al cut-point ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES).
- Con questi cut-point, il 2-h OGTT diagnostica più diabete allo screening.

In realtà, una gran parte della popolazione diabetica rimane non diagnosticata.

Come regola, un risultato deve essere ripetuto per escludere errori di laboratorio.

1. E' preferibile che la conferma avvenga ripetendo lo stesso test (ad es. se l'A1C è 7,0% e alla ripetizione è 6,8%, viene confermata la diagnosi di diabete).

2. Se comunque due diversi test (ad es. A1C e FPG) sono entrambi superiori alla soglia diagnostica, questo conferma la diagnosi.

Come regola, un risultato deve essere ripetuto per escludere errori di laboratorio.

3. Se un paziente ha risultati discordanti in due diversi test, si deve ripetere il test con il risultato superiore al cut-point (*ad es. se un paziente soddisfa il criterio di diabete della A1C con due risultati $\geq 6.5\%$, ma non quello del FPG con risultato < 126 mg/dL o $7,0$ mmol/L, o viceversa, si pone diagnosi di diabete*).
4. Poiché per tutti i test vi è variabilità preanalitica e analitica, può capitare che un risultato al di sopra della soglia diagnostica, quando ripetuto, produca un valore al di sotto della soglia, comunque ai margini di questa. Allora bisognerà ripetere il test

TEST PER IL DIABETE IN PAZIENTI ASINTOMATICI

raccomandazioni

- Test per diabete tipo 2 e prediabete in persone asintomatiche dovrebbe essere considerato negli adulti di **qualsiasi età in sovrappeso o obesi** (BMI >25 kg / m²) e che hanno uno o più **fattori di rischio per il diabete**. –GRADO B-
- In quelli **senza questi fattori di rischio**, il test dovrebbe iniziare all'età di **45 anni**. –GRADO B-
- Se i test sono normali, è ragionevole ripeterli almeno ogni 3 anni . –GRADO E-
- I test A1C, glicemia a digiuno, o 2 ore 75 g OGTT sono tutti e tre appropriati. –GRADO B-
- Nei soggetti identificati come prediabete, cercare altri fattori di rischio CVD e, se è il caso, trattarli-

GRADO B-

CATEGORIE AD AUMENTATO RISCHIO DI DIABETE (PREDIABETE)

Individui i cui livelli di glucosio non soddisfano i criteri del diabete, ma sono più alti del normale.

Tali soggetti sono definiti come aventi:

- 1. ALTERATA GLICEMIA A DIGIUNO (IFG)** (livelli di FPG 100-125mg/dL [5,6-6,9 mmol/L]), Va notato che L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e altre organizzazioni definiscono la soglia per IFG a 110 mg/dL (6.1mmol/L).
 - 2. RIDOTTA TOLLERANZA AL GLUCOSIO (IGT)** (2-h OGTT PG con valori di 140-199 mg/dL [7,8-11,0 mmol/L]).
- **"Prediabete"** è il termine usato per le persone con IFG e/o IGT, condizione con rischio relativamente elevato di sviluppare diabete. IFG e IGT non sono entità cliniche a sé stanti, ma piuttosto fattori di rischio per il diabete e

CATEGORIE AD AUMENTATO RISCHIO DI DIABETE (PREDIABETE)

3. A1C al cutoff 5,7% (39 mmol/mol) identifica i casi di alterata glicemia a digiuno (IFG: con glicemia a digiuno [FPG] \geq 100 mg/dL [5,6 mmol/L]) con la massima sensibilità (39%) e specificità (91%).

- Circa il 25% di questi soggetti progredirà verso il diabete di tipo 2 entro 3-5 anni.
- I soggetti con ulteriori fattori di rischio per il diabete, tra cui l'obesità e la storia familiare, hanno maggiori probabilità di sviluppare il diabete.

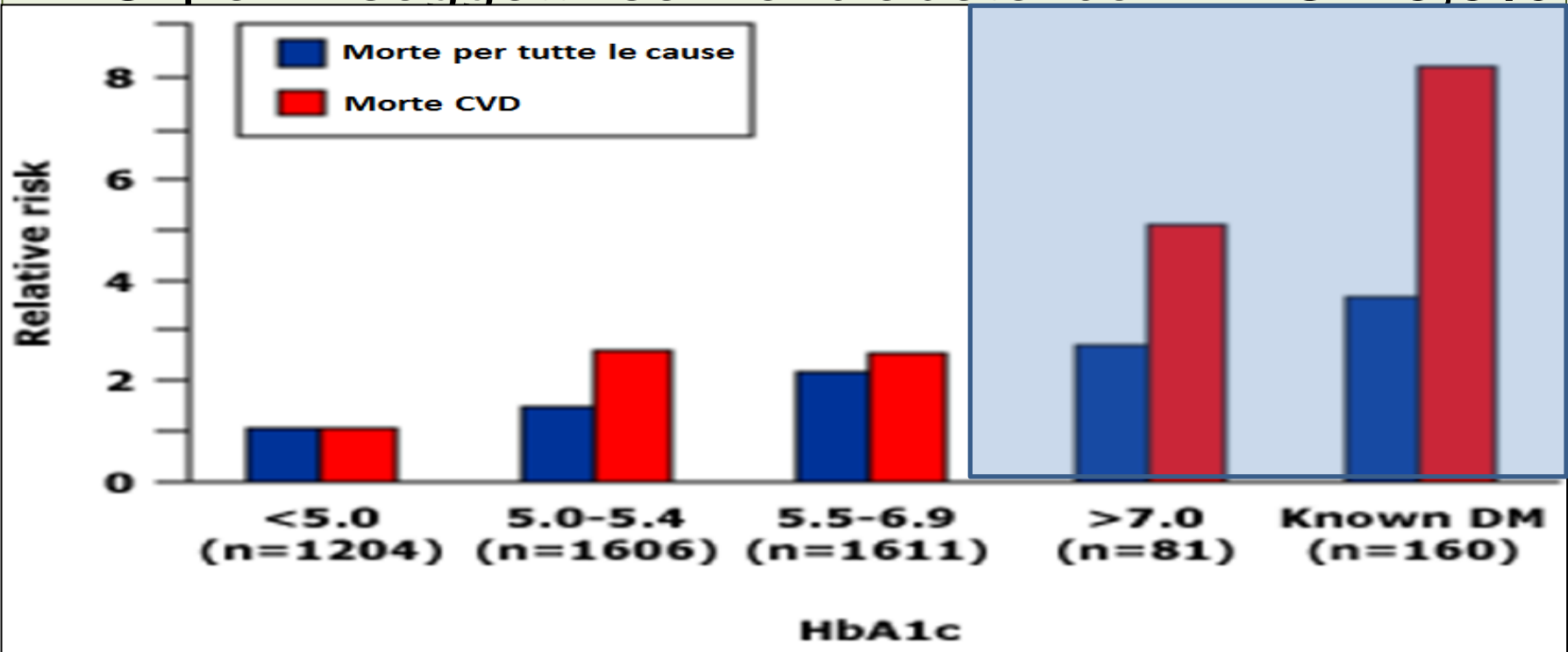
2h-PG (OGTT) è un test più sensibile, ma A1C e glicemia a digiuno sono più agevoli.

Esiste un continuum attraverso l'intero spettro di valori glicemici sub-diabetici, entro cui i valori più alti di glicemia a digiuno o 2hPG-OGTT o di HbA1c conferiscono un rischio più elevato.

AUMENTATO RISCHIO CARDIOVASCOLARE (CVD)

Esiste una correlazione tra A1C e malattia cardiovascolare nei soggetti non diabetici.

Il **rischio relativo** di un evento cardiovascolare è **1,38** per ogni aumento di **punto percentuale** in **A1C** per i soggetti senza diabete con **A1C $\geq 5,5\%$**



AUMENTATO RISCHIO CARDIOVASCOLARE (CVD)

L'aggiunta di A1C ai modelli di rischio
contenenti i convenzionali fattori di rischio
(età, sesso, pressione arteriosa,
colesterolo totale e HDLc, fumatori)

**migliora la predizione del rischio, ma in
un'entità di scarsa rilevanza clinica.**

Stima del controllo glicemico nel diabete mellito

Magnitude of Complications

Leading cause
of blindness
in working age
adults

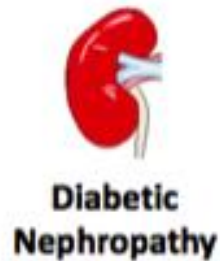


**Diabetic
Retinopathy**

2-fold to 4-fold
increase in
cardiovascular
mortality
and stroke



Stroke



**Diabetic
Nephropathy**

Leading cause of
end-stage renal disease



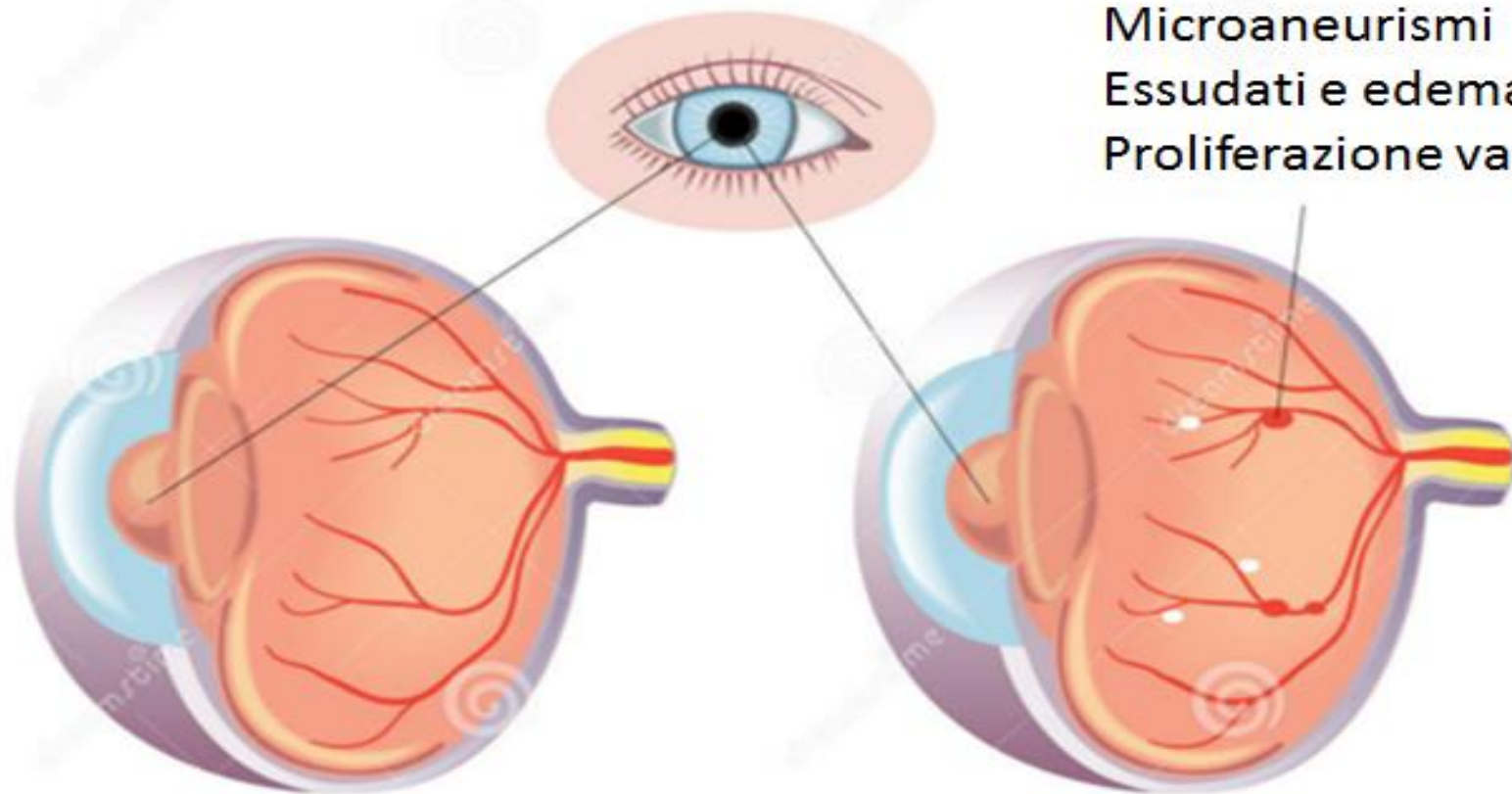
**Cardiovascular
Disease**

**Diabetic
Neuropathy**

Leading cause of nontraumatic
lower extremity amputations

RETINOPATIA DIABETICA

Emorragie retiniche
Microaneurismi
Essudati e edema
Proliferazione vascolare



OCCHIO NORMALE

RETINOPATIA DIABETICA

RETINOPATIA DIABETICA

La retinopatia è la complicanza microvascolare più frequente e porta alla cecità.

- Vanno sempre trattati i **fattori di rischio modificabili**, quali lo scarso controllo glicemico e l'ipertensione.
- Il trattamento oculare antivascolare con anti-fattore di crescita endoteliale ha un notevole costo economico.

RETINOPATIA DIABETICA

FISIOPATOLOGIA

Diverse vie biochimiche collegano l'iperglicemia alle complicanze microvascolari.

Queste includono:

1. l'accumulo di polioli,
2. la formazione di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE),
3. lo stress ossidativo,
4. l'attivazione della proteina chinasi C (PKC).

Questi processi modulano la malattia attraverso effetti su metabolismo cellulare, meccanismi di segnale e fattori di crescita.

POLIOLI

Alte concentrazioni di glucosio attivano l'enzima aldolasi reductasi e aumentano la via dei polioli con **aumento del sorbitolo intracellulare**, che causa danno osmotico alle cellule vascolari.

ATTIVAZIONE DI PKC

La PKC (isoforma PKC- β 2) è attivata dalla iperglicemia.

È una componente integrante il signaling cellulare da parte dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (**VEGF**), mediatori importanti della neovascolarizzazione oculare secondaria all'ischemia retinica e all'edema maculare del diabete

DANNO OSSIDATIVO

La produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (ROS) deriva da **autossidazione del glucosio, glicazione proteica, iperattività della via dei polioli, produzione di prostanoidi**.

Antiossidanti come la vitamina E prevengono in parte la disfunzione vascolare e reversibilizzano significativamente le alterazioni del flusso sanguigno nella retina

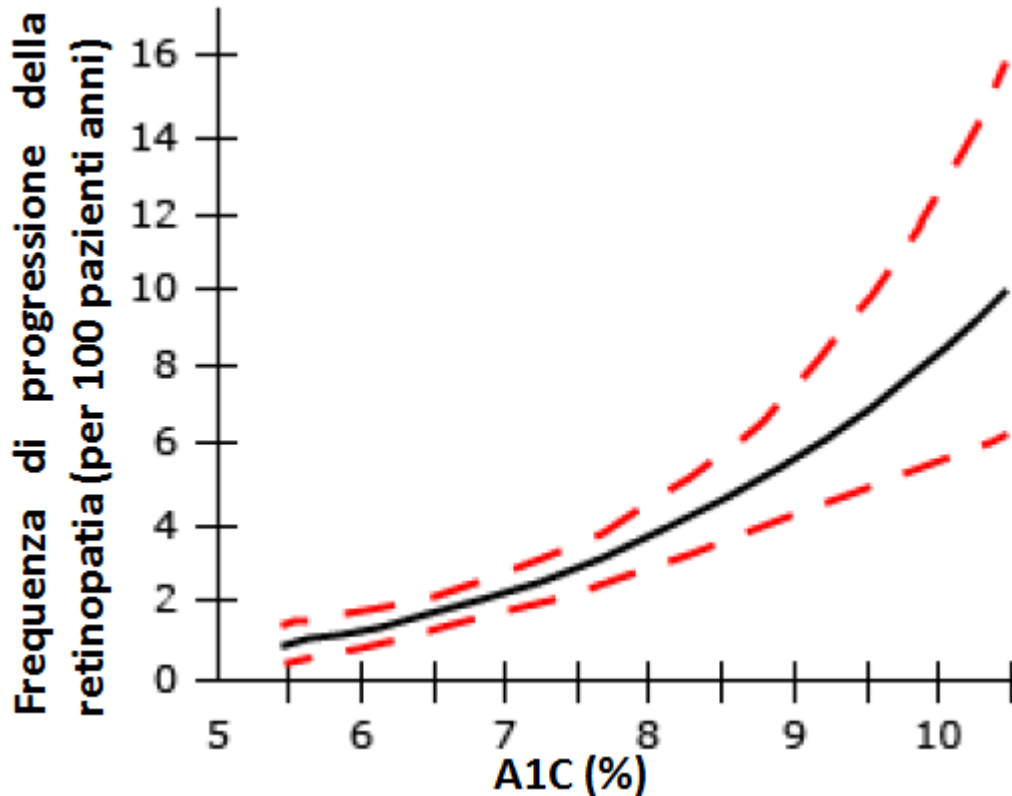
AGE

L'elevazione della glicemia porta al **legame di glucosio alle catene laterali delle proteine** e formazione di prodotti di glicazione avanzata (AGE) che si accumulano nei capillari retinici, danneggiandoli

Lo sviluppo di complicanze microvascolari nei pazienti con diabete di tipo 1 può essere rallentata **trattando l'iperglicemia .**

- Ciò ha portato ad un maggiore uso di **insulina** a **regimi intensivi** per raggiungere uno **stretto controllo glicemico** (figure successive).
- Per stimare il grado di efficacia di questi regimi è **richiesto un metodo preciso**.

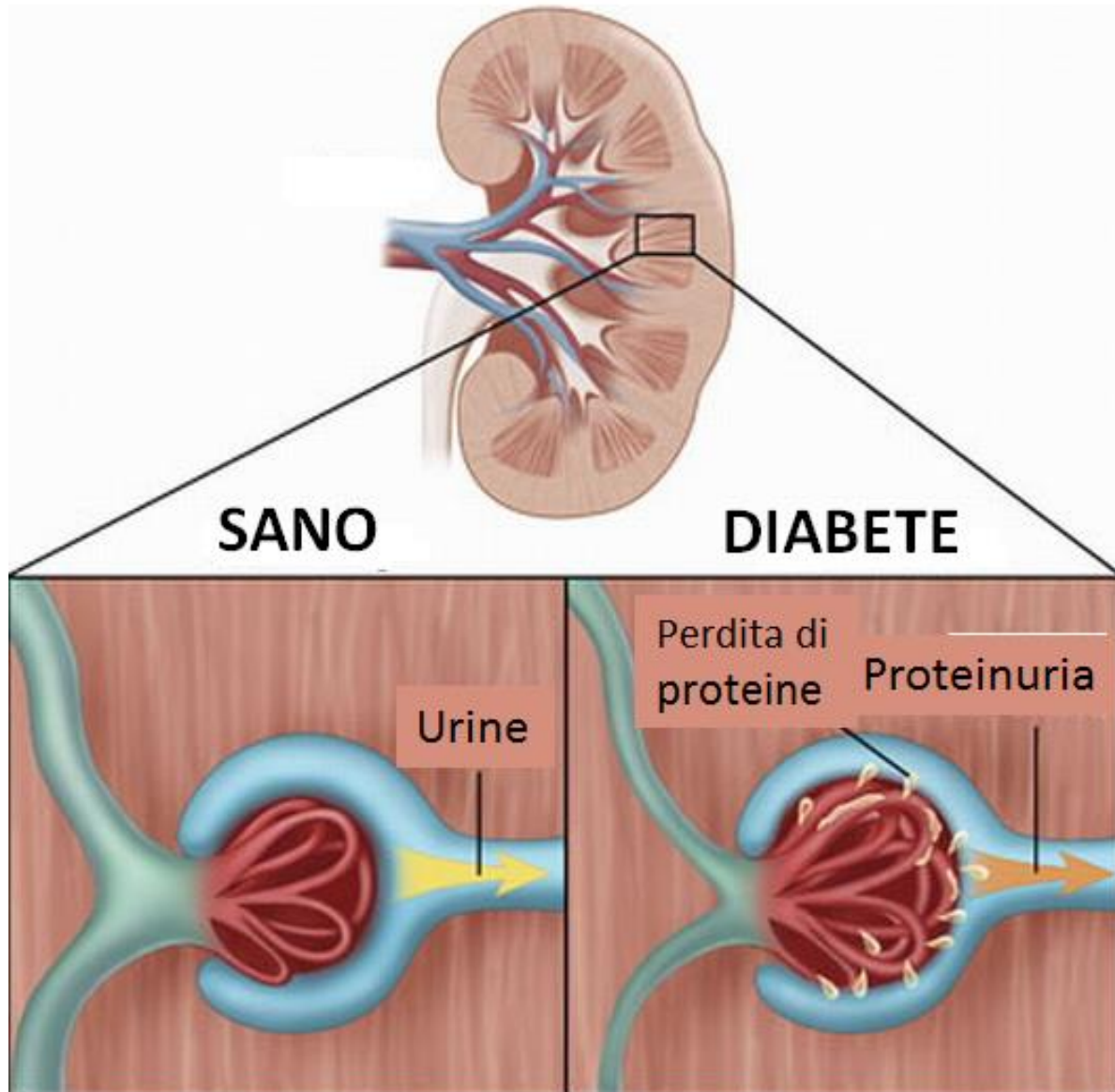
Correlazione tra retinopatia diabetica e controllo glicemico



Il rischio di progressione della retinopatia nei pazienti con diabete di tipo 1 in base ai valori medi di A1C ad intervalli di sei mesi (linea nera).

*Un migliore controllo glicemico si associa ad un tasso minore di retinopatia progressiva. **Le linee rosse tratteggiate rappresentano***

NEFROPATIA DIABETICA



NEFROPATIA DIABETICA

La nefropatia diabetica è la principale causa di malattia renale cronica nei pazienti che iniziano la dialisi e si associa ad aumentato rischio CVD.

- Classicamente è definita dalla presenza di proteinuria $>0,5$ g/24h ,cioè **nefropatia conclamata** con albuminuria gravemente aumentata.
- Escrezioni minori di albuminuria, albuminuria moderatamente aumentata o **nefropatia incipiente**, sono predittive per lo sviluppo futuro di proteinuria.

La proteinuria si trova nel 15-40% dei pazienti con

diabete tipo 1 e nel 15-20% dei pazienti con diabete

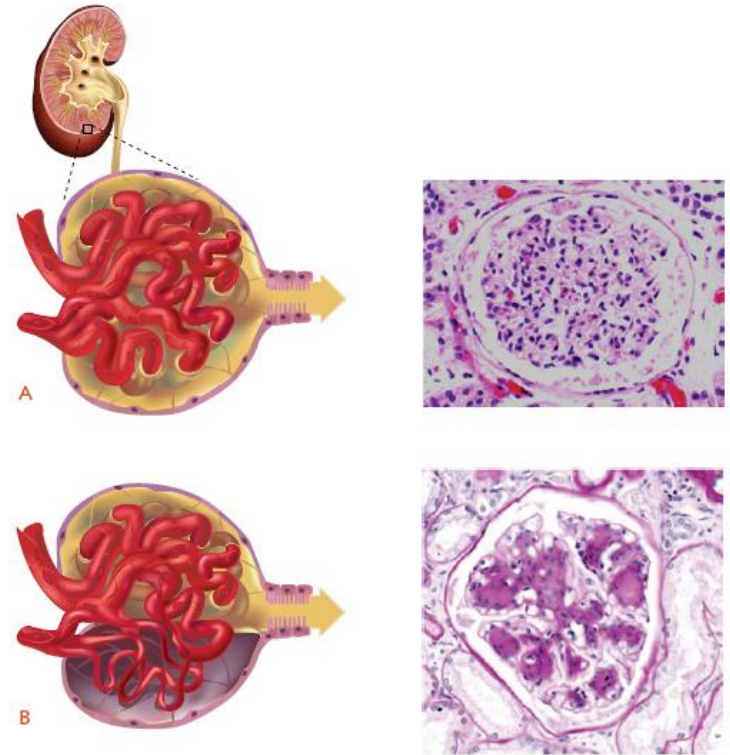
NEFROPATIA DIABETICA

Fattori di rischio e patogenesi

- La nefropatia diabetica si sviluppa soprattutto quando **livelli elevati di glicemia** sono mantenuti per lungo tempo.
- Inoltre una **suscettibilità genetica** contribuisce allo sviluppo della nefropatia diabetica.
- I principali fattori di inizio e progressione della malattia , modificabili, sono **l'iperglicemia** e **l'ipertensione**.
 - ❑ Altri fattori sono la **iperfiltrazione glomerulare**, il **fumo**, la **dislipidemia**, i livelli di **proteinuria**, la **dieta** ricca di proteine e di grassi.

NEFROPATIA D

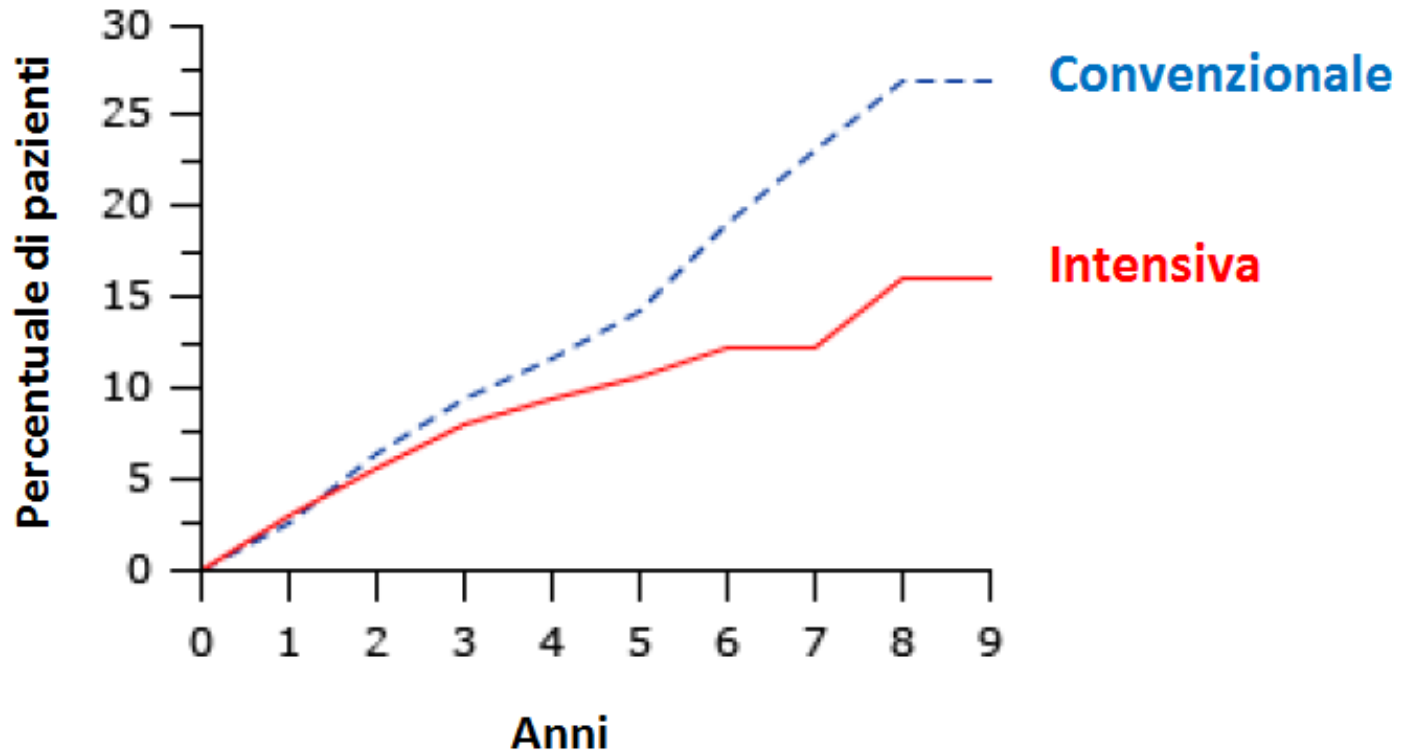
Istopatol



Il diabete causa alterazioni tipiche nella struttura del rene:

- La classica glomerulosclerosi, ma anche
 - alterazioni tubulari e interstiziali e
 - aree di espansione del mesangio.

Un rigido controllo glicemico previene albuminuria moderatamente aumentata nei pazienti con diabete tipo 1.



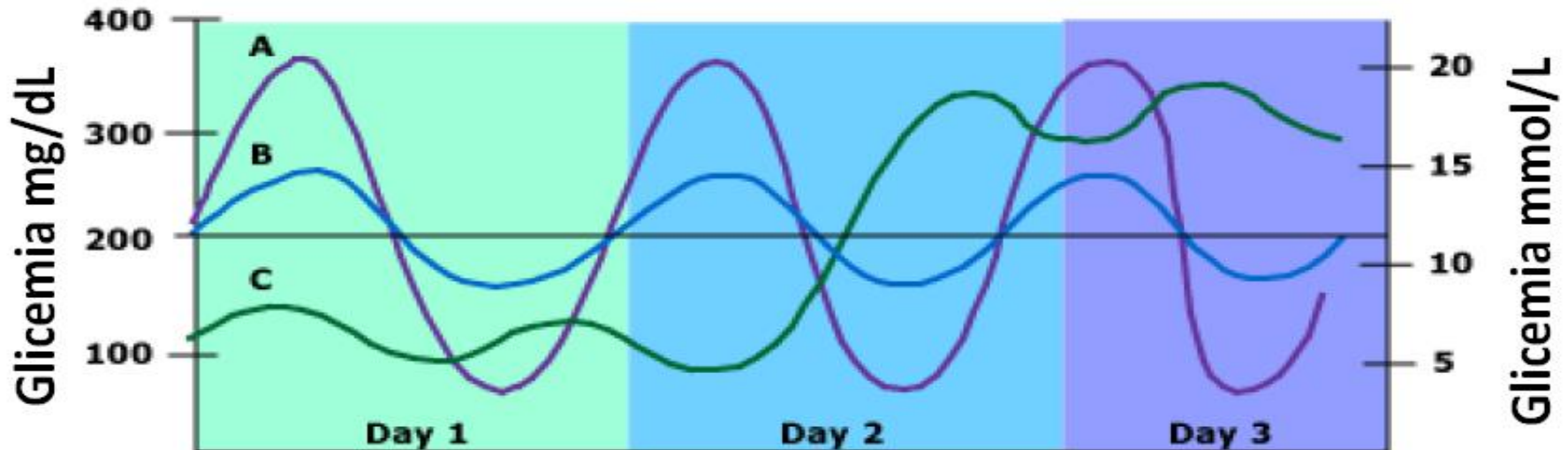
Incidenza cumulativa di albuminuria moderatamente aumentata in pazienti trattati con terapia insulinica convenzionale o ad alta intensità valutata in nove anni.

C'è un beneficio crescente nel tempo con la terapia intensiva ($p < 0.01$)

I dati utili per la definizione del controllo glicemico sono:

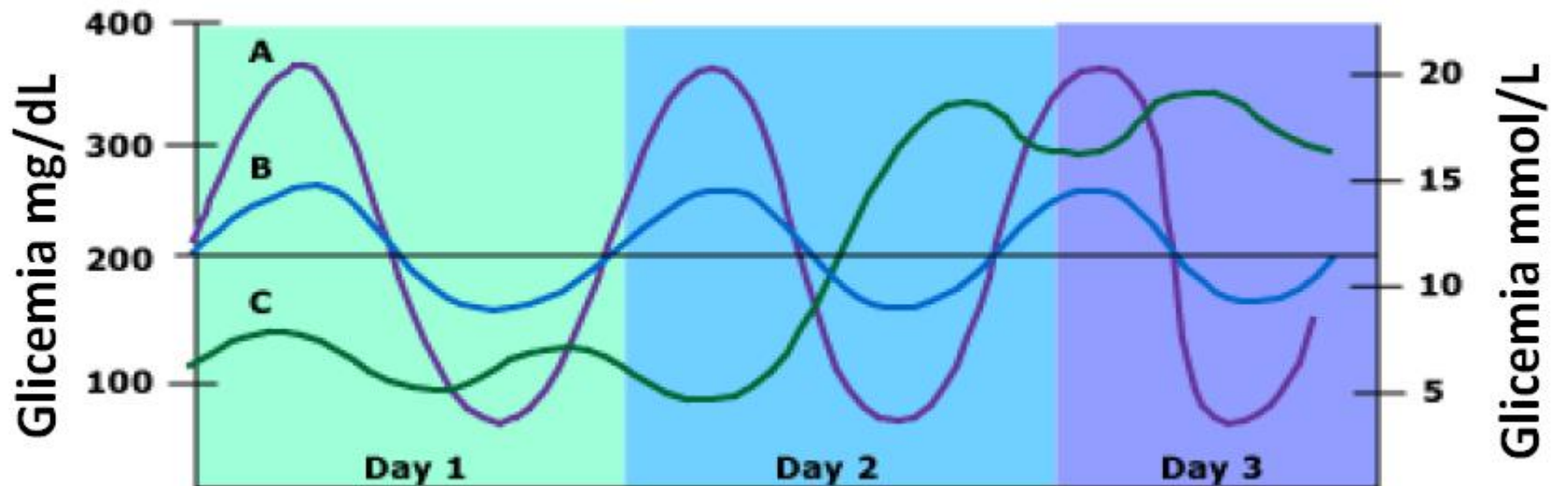
1. La concentrazione media di glucosio nel sangue. E' la media dei valori ottenuti ogni giorno a) prima della colazione, b) a metà mattina, c) prima di pranzo, d) a metà pomeriggio, e) prima di cena, e f) prima di dormire.

- *Questo approccio può essere sostituito o integrato misurando la A1C.*
- *In alcuni casi, tuttavia, vi è disparità tra i valori di*



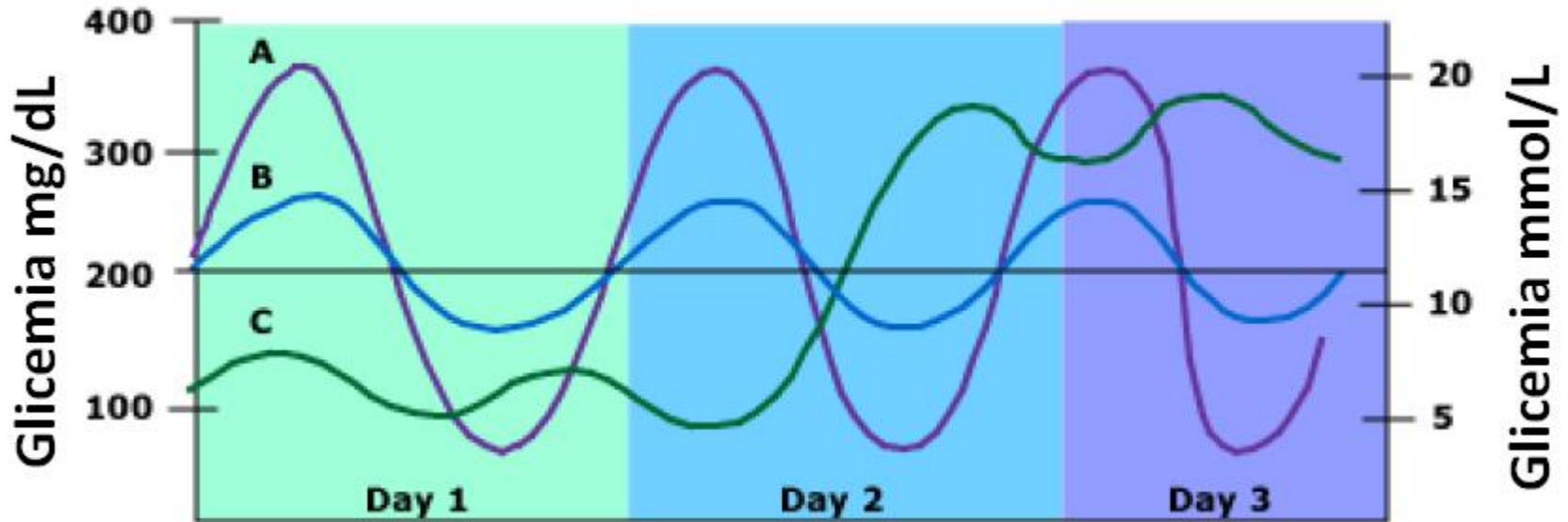
I dati utili per la definizione del controllo glicemico sono:

2. Il grado in cui le concentrazioni di glucosio nel sangue fluttuano nello stesso giorno. E' misurato dall'ampiezza media delle escursioni glicemiche.
3. Il grado in cui le concentrazioni di glucosio nel



- La glicemia media ha ricevuto la massima attenzione.
- Tuttavia, un dato valore di glicemia media può essere associato a varie escursioni glicemiche giornaliere e varie differenze delle medie giornaliere (figura).
- L'approccio per migliorare il controllo della glicemia è diverso a seconda se una elevata glicemia media è associata o meno a grandi fluttuazioni.

Aspetti di controllo glicemico



Escursioni della glicemia in tre pazienti ipotetici che hanno la stessa glicemia media di circa 200 mg/dL (11,1 mmol/L), equivalente ad un valore di emoglobina A1c di circa 8,2%, ma che hanno complessivamente un controllo diverso della glicemia.

***Paziente B** ha variazioni relativamente piccole durante il giorno e nei diversi giorni ; questo paziente ha poche difficoltà nell'abbassare giornalmente la glicemia media senza indurre ipoglicemia. In confronto, il **paziente A** ha marcate variazioni di glicemia nello stesso giorno e il **paziente C** ha marcate variazioni di glicemia nei diversi giorni.*

Questi aspetti di controllo glicemico devono essere migliorati prima che la concentrazione media di glucosio possa essere abbassata in sicurezza.

ùAumentando l'intensità della terapia insulinica si rischia di precipitare ipoglicemia nei pazienti A e C, dato che molti dei loro valori di glicemia sono già nel range

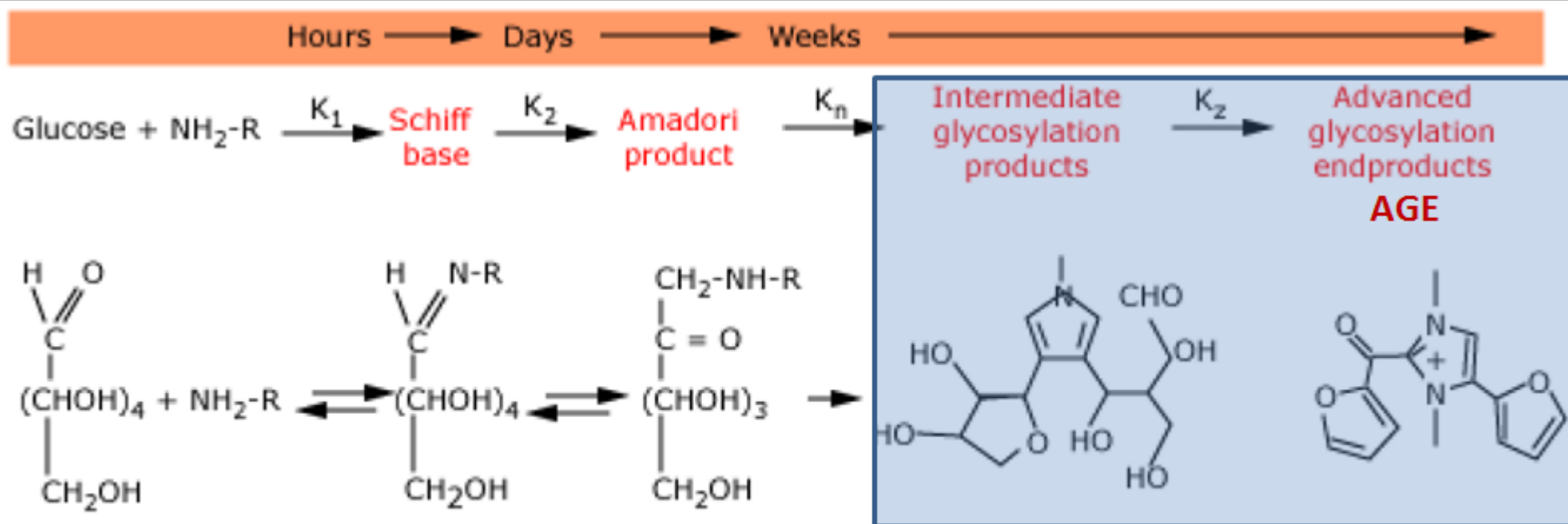
STIMA DELLA GLICEMIA MEDIA-

Un **innalzamento transitorio** della concentrazione di glucosio nel sangue può portare alla formazione di una grande quantità di **aldimine**. Questa reazione si inverte se la concentrazione di glucosio ritorna alla norma.

Invece, la formazione del **chetoamina** è irreversibile perché il glucosio rimane attaccato in modo permanente alla proteina fino a quando questa non è metabolizzata.

La maggior parte dei test disponibili in commercio per la emoglobina glicata misurano solo la chetoamina stabile e non misurano la frazione labile (aldimina) e pertanto rispecchiano **la glicemia media di lunga durata** (da due a tre mesi), non

Il Processo di Glicosilazione



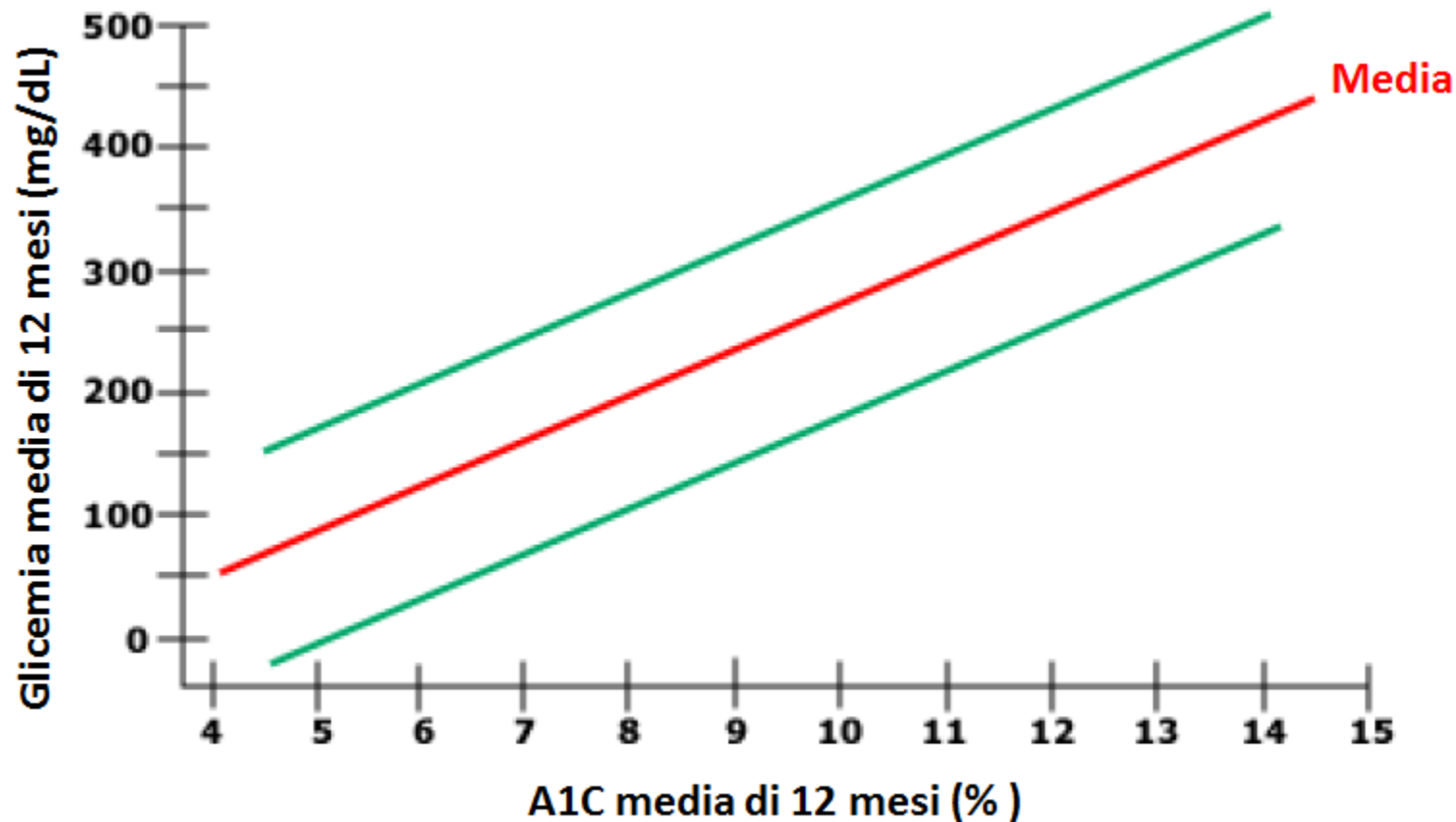
Rappresentazione schematica della formazione dei prodotti di glicosilazione in presenza d'iperglicemia persistente.

STIMA DELLA GLICEMIA MEDIA

Emoglobina glicata –

- E' il test clinico più diffuso, chiamato anche **A1C**, **emoglobina A1c** o **HbA1c**.
- L'emoglobina formatasi nei nuovi globuli rossi entra in circolo con un minimo di glucosio attaccato. Tuttavia, i globuli rossi sono liberamente permeabili al glucosio. Come risultato, **il glucosio viene irreversibilmente attaccato all'emoglobina ad una velocità che dipende dalla concentrazione di glucosio nel sangue.**
- Circa l'1% degli eritrociti, quelli senescenti, viene distrutto ogni giorno, mentre se ne rigenera un numero uguale di nuovi. In questo modo, la quantità media di A1C cambia in modo dinamico e indica la concentrazione media di glicemia nell'arco della vita del globulo rosso.
- Sebbene la A1C rifletta la glicemia media su tutti i 120 giorni di vita del globulo rosso, essa si **correla meglio con la glicemia media delle ultime 8 o 12 settimane.**

Correlazione tra glicemia media e valori medi di A1C



Il confronto delle concentrazioni medie trimestrali di glicemia con i valori trimestrali di HbA1c. Le linee tratteggiate rappresentano il 95% dell'intervallo di confidenza.

STIMA DELLA GLICEMIA MEDIA

- **National Glycohemoglobin Standardization Program** (NGSP) ha standardizzato oltre il 99% dei dosaggi utilizzati riconducendoli allo standard DCCT.
- Il **programma di controllo di qualità rigoroso** ha migliorato la precisione e l'accuratezza dei test.
- Con il **nuovo metodo di riferimento i risultati di A1C sono riportati globalmente in unità SI** (Sistema Internazionale) (mmol/mol) e **unità NGSP derivate** (gli stessi valori riportati attualmente come percentuale dell'emoglobina totale) utilizzando un'equazione master.

I **valori di glicemia media stimata (eAG)**, calcolati dal risultato di A1c e sulla base dei risultati dello studio ADAG sono ora **inclusi**

STIMA DELLA GLICEMIA MEDIA

La eAG (mg/dL o mmol/L) è un termine più rilevante per i pazienti rispetto alla glicemia da automonitoraggio.

Se ci sono differenze nella eAG derivata dal risultato A1C e la glicemia media calcolata dai risultati del glucometro, è necessario approfondire.

Esempi:

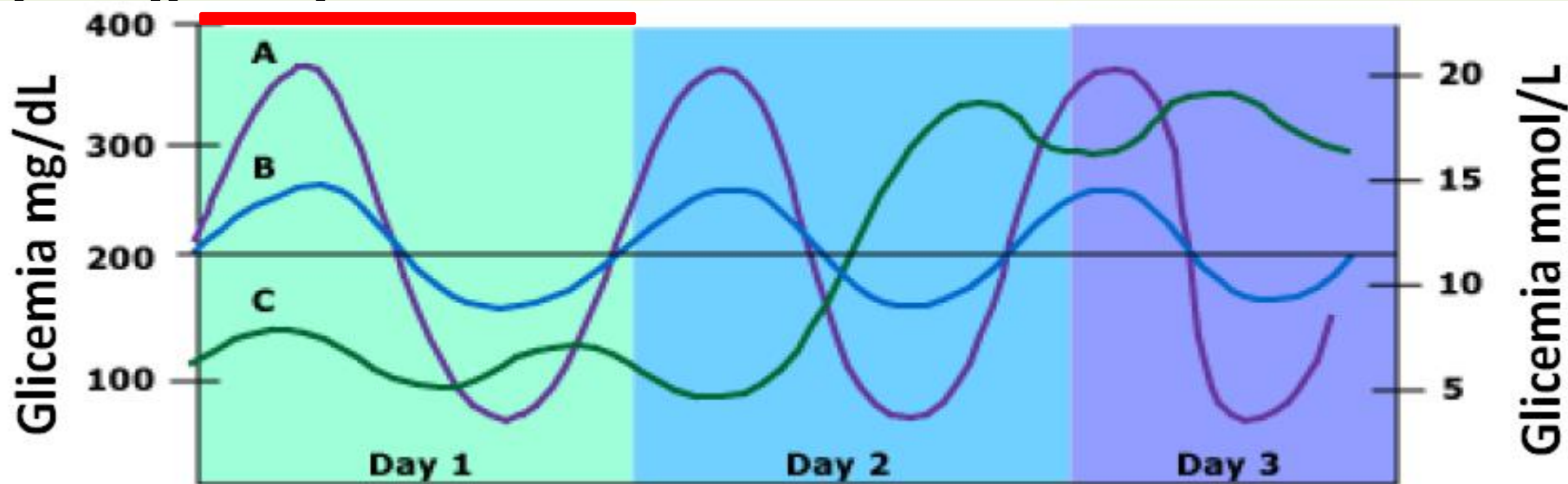
- *Se la eAG è superiore alla glicemia media calcolata dal glucometro, è probabile che il test non venga eseguito nei momenti in cui la glicemia è più alta, cioè dopo i pasti.*
- *Se la eAG è inferiore a quella calcolata dal glucometro, il paziente può avere periodi non rilevati di basso livello di glucosio nel sangue, il più delle volte una ipoglicemia notturna. In tal caso bisogna regolare i tempi in cui si*

VARIAZIONI DEL GLUCOSIO ENTRO IL GIORNO –

Il **range** entro cui la glicemia varia all'interno di un **giorno** definisce un tipo di "**diabete instabile**".
(*situazione A*)

Una buona approssimazione di queste fluttuazioni è possibile nei pazienti che fanno automonitoraggio, ottenendo per diversi giorni le misure della glicemia prima e 90 minuti dopo i pasti.

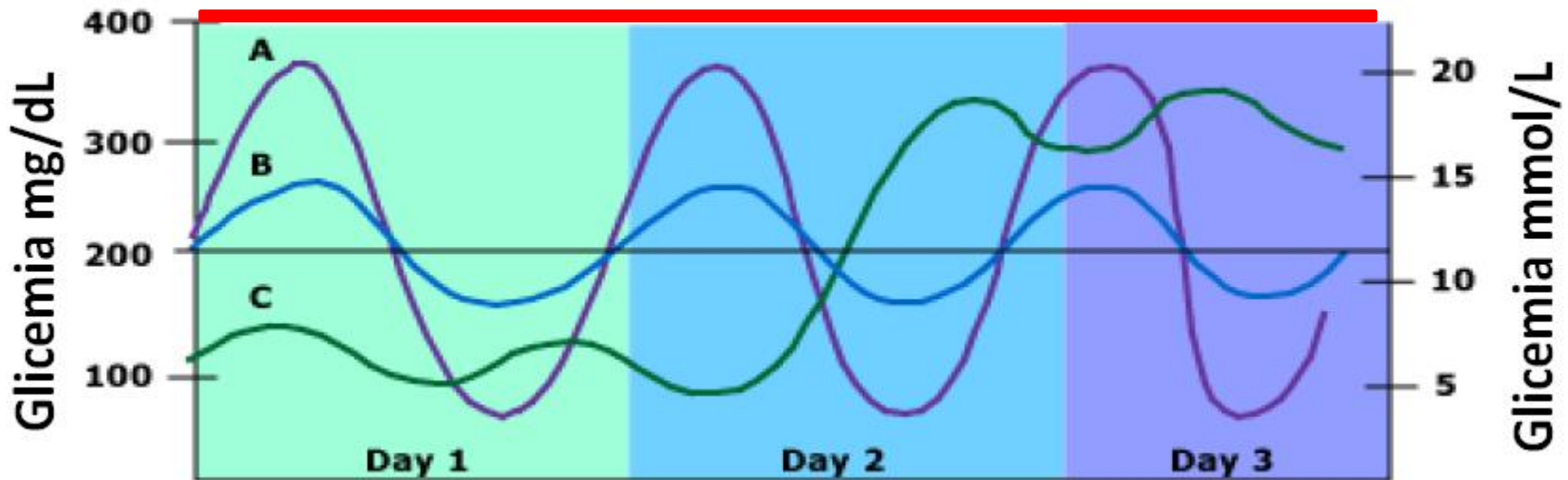
La situazione instabile può aumentare il **rischio di**



VARIAZIONI DI GLUCOSIO TRA I GIORNI –

L' **entità in cui la glicemia varia alla stessa ora nei giorni** (*situazione C*) è un'altra misura utile per il controllo glicemico globale.

La spiegazione di **grosse fluttuazioni nei giorni** è uno stile di vita irregolare per dieta e/o esercizio fisico. Questi problemi devono essere corretti prima di decidere di aumentare la dose di insulina.



RACCOMANDAZIONI PER IL DIABETE TIPO 2 –

- Rispetto al diabete tipo 1 nel diabete tipo 2 vi è **minore variabilità della glicemia e la glicemia a digiuno si correla bene con il valore della A1C, che viene sempre utilizzata per il controllo glicemico.**
- **L'autocontrollo glicemico** ha valore nell'indurre i pazienti ad essere più motivati nel **modificare il loro comportamento** al fine di **migliorare il controllo glicemico (A1c).**
- Migliorare il controllo glicemico è spesso difficile nei pazienti con diabete di tipo 2 a causa di obesità e insulino-resistenza.

Livello ottimale di controllo glicemico per prevenire le complicanze microvascolari nel diabete di tipo 2

Lo studio UKPDS indica che la **terapia intensiva (valore medio di A1C del 7,5%)**, con farmaci ipoglicemizzanti orali o insulina porta ad una **diminuzione del rischio di complicanze microvascolari** rispetto alla terapia convenzionale con la dieta (valore medio A1C del 7,9 %).

Esiste un effetto soglia di A1C; una riduzione dell'1% di A1C si associa alla riduzione del 35% degli endpoint microvascolari

Livello ottimale di controllo glicemico per prevenire le complicanze macrovascolari nel diabete di tipo 2

- C'è anche **beneficio della terapia intensiva rispetto alla terapia convenzionale**, con livelli di A1C di 7% contro 7,9%.
- Con il raggiungimento di livelli di A1C di 6,5% non si registra alcun effetto migliorativo sulla malattia cardiovascolare o sulla mortalità generale e cardiovascolare, mentre si riducono gli esiti microvascolari.

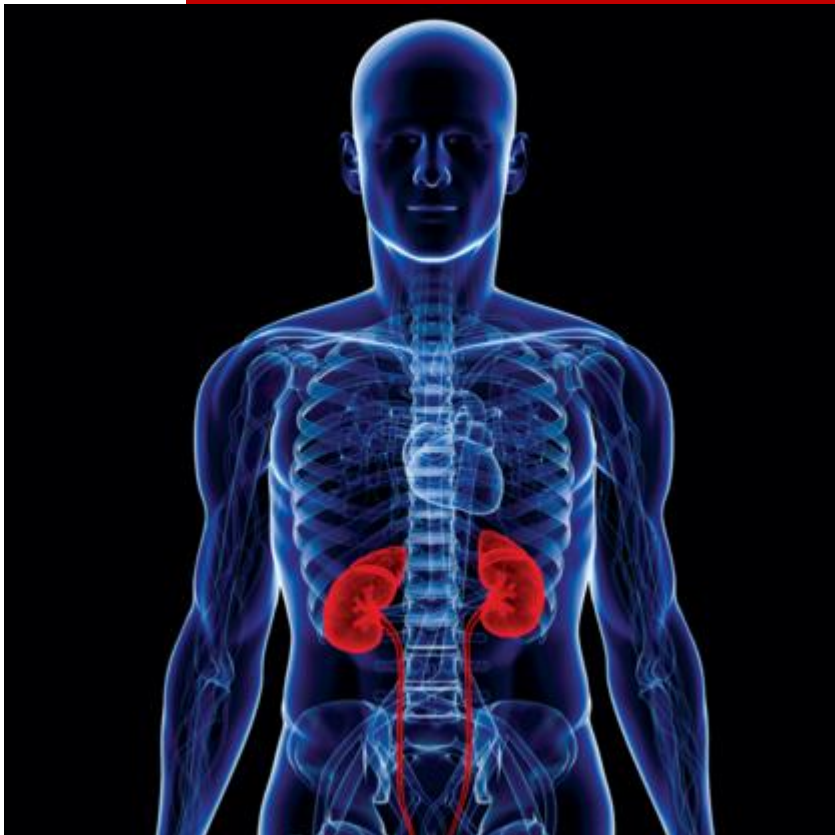
Fatti i debiti conti

l'obiettivo dovrebbe essere di A1C al 7% per la maggior parte dei pazienti.

MALATTIA RENALE CRONICA

CKD

PARTE 1



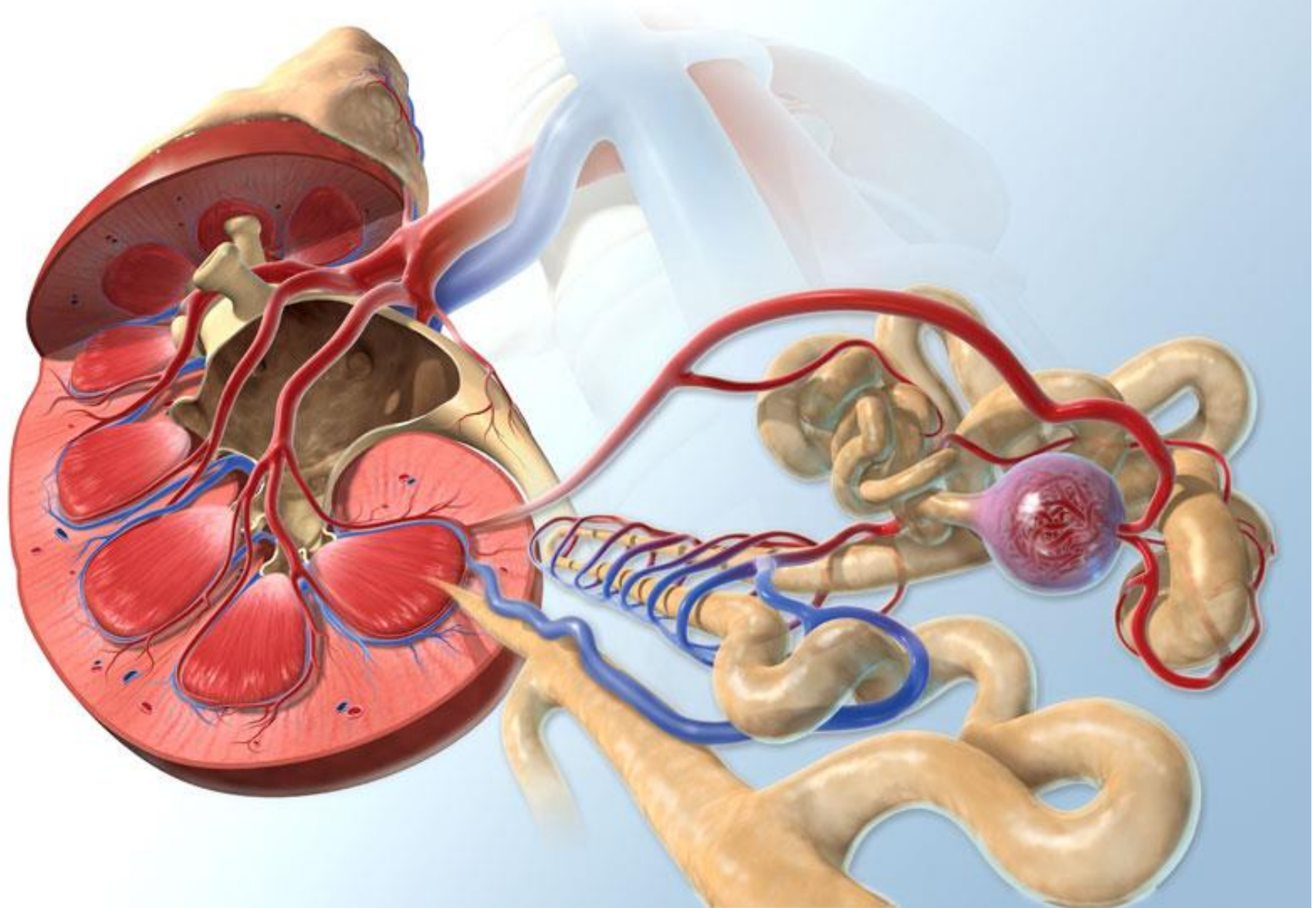
Lezioni di Patologia Clinica

Prof. Renzo Schiavon

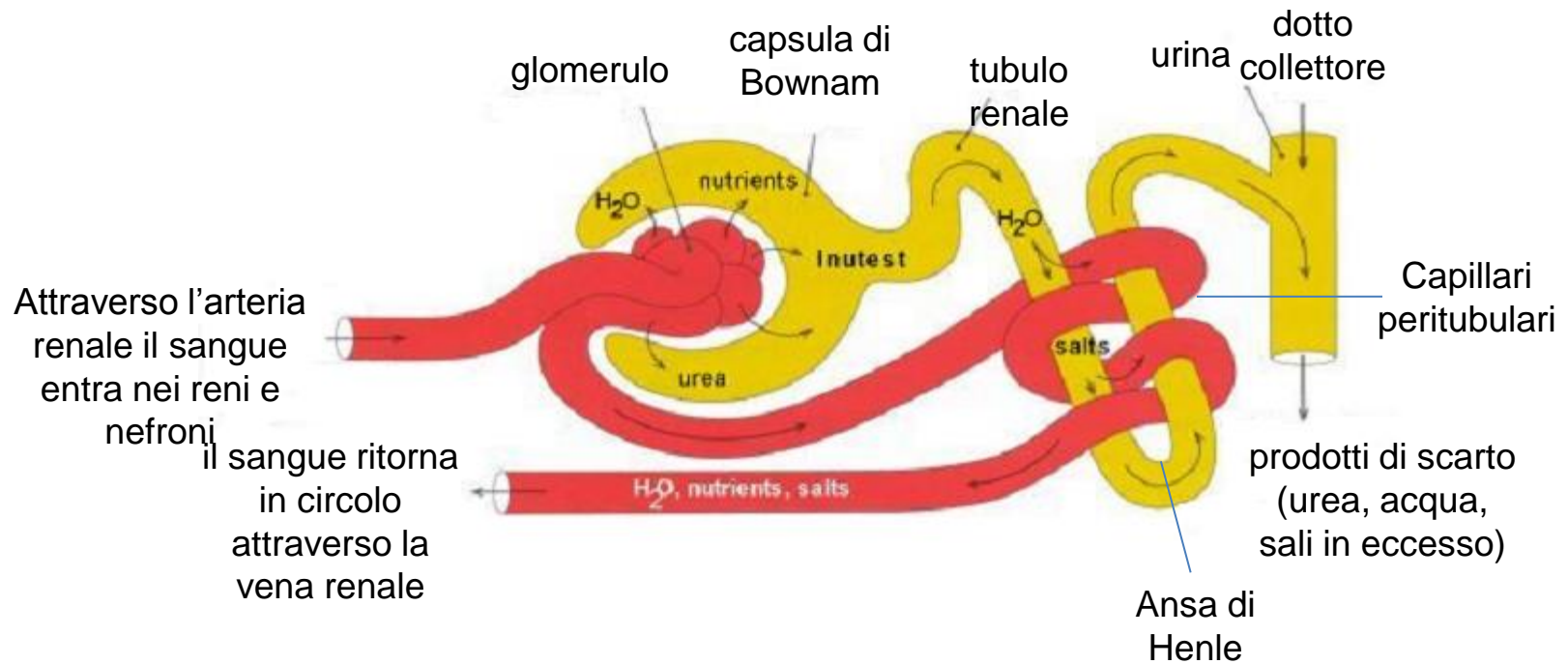
AA 2015-2016

FUNZIONE RENALE

Struttura del rene



Struttura del nefrone



FUNZIONE RENALE

1. Il rene mantiene un ambiente extracellulare costante necessario per un adeguato funzionamento delle cellule e l'ottiene:

- con l'escrezione di alcuni dei **prodotti di scarto** del metabolismo (come l'urea, la creatinina e l'acido urico)
- aggiustando l'escrezione urinaria di **acqua ed elettroliti** in base all'apporto netto e alla produzione endogena. Il rene regola individualmente l'escrezione di acqua e di soluti come sodio, potassio, idrogeno, variandone il riassorbimento tubulare o la secrezione.

FUNZIONE RENALE

2. Il rene **secerne ormoni** che partecipano:

- alla regolazione della **emodinamica** sistemica e renale (renina, prostaglandine, e bradichinina),
- alla produzione di **globuli rossi** (eritropoietina),
- al **metabolismo osteo-fosfo-calcico** (1,25-diidrossivitamina D3 o calcitriolo).

FUNZIONE RENALE

3. Nel paziente con **malattia renale**, alcune o tutte queste funzioni possono diminuire o essere del tutto assenti.

4. Nello **stadio terminale** della malattia renale tutte le funzioni renali sono compromesse nei pazienti, e allora compaiono :
 - **ritenzione di tossine uremiche,**
 - **alterazioni dei liquidi e dell'equilibrio elettrolitico,**
 - **anemia,**
 - **malattia ossea.**

La funzione renale viene valutata dalla Velocità di Filtrazione Glomerulare (GFR)

VELOCITA' DI FILTRAZIONE GLOMERULARE (GFR) Normale

1. La GFR è la **somma delle velocità di filtrazione di tutti i nefroni funzionanti**, quindi fornisce una misura approssimativa del numero di nefroni funzionanti. Le unità filtranti dei reni, i glomeruli, filtrano circa 180 litri di plasma al giorno (125 mL/min).
2. Il valore normale di GFR **dipende da età, sesso, e dimensioni del corpo**, ed è di circa 130 e 120 mL/min/1.73 m² per uomini e donne

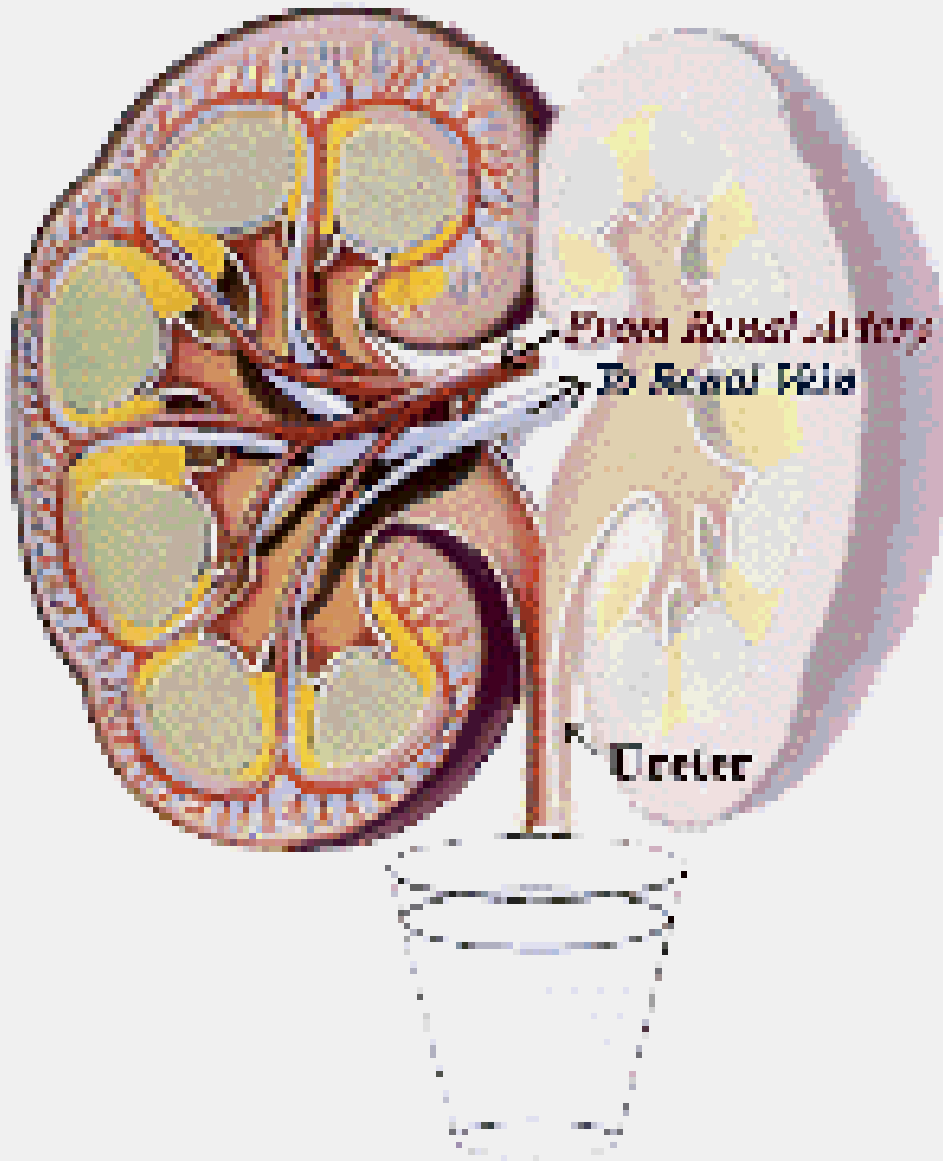
Variazione GFR con l'invecchiamento –

L'associazione tra l'età e la diminuzione della GFR è stato suggerito da diversi studi:

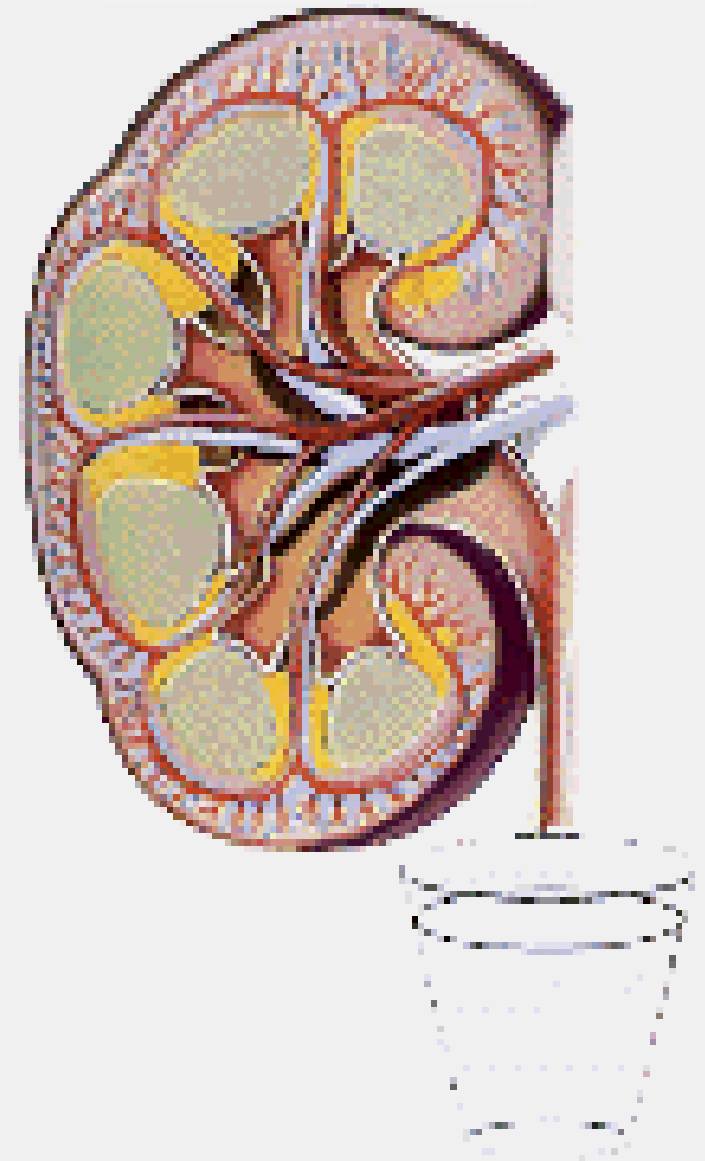
- 1) Nello studio **«*Baltimore Longitudinal Study*»** il tasso medio di **diminuzione della GFR** (misurata come clearance della creatinina) è di **0,75 mL / min/1,73 m² per ogni anno di età**, ed è maggiore nei pazienti con ipertensione. Tuttavia, in 1/3 delle persone non è stata osservata una caduta di GFR .
- 2) Utilizzando la GFR stimata (secondo MDRD), lo studio **«*NHANES III*»** dimostra che il **38% dei soggetti con 70 anni o più**, senza ipertensione o diabete, aveva **GFR inferiore a 60 mL / min/1,73 m²**. In confronto, tali valori bassi sono stati osservati solo nel 0,7% di tali partecipanti di età compresa tra 20 ei 39 anni.

LA GFR SI RIDUCE CON L'AVANZARE DELLA ETA'

RENE GIOVANE



RENE VECCHIO



Significato del declino della GFR –

1. Nei pazienti con **malattia renale**, una riduzione di GFR implica:
 - **progressione** della malattia di base
 - comparsa di un **problema acuto** sovrapposto e spesso reversibile, come ad esempio la diminuita perfusione renale dovuta a deplezione di volume (disidratazione, shock).
2. Tuttavia, **non vi è una correlazione esatta** tra la perdita di massa renale (cioè, perdita di nefroni) e la perdita di GFR. Il rene si adatta alla perdita di alcuni nefroni con una iperfiltrazione di compenso e/o aumentando il riassorbimento di soluti e acqua nei rimanenti nefroni normali. Così, in un individuo che ha perso la metà della massa totale del rene la GFR cala meno della metà.

Significato del declino della GFR –

Questi concetti hanno conseguenze importanti:

3. Una **GFR stabile** non implica necessariamente malattia stabile. Vanno ricercati altri segni di progressione della malattia diversi dal cambiamento della GFR, tra cui un aumento dell'escrezione di proteine, una maggiore attività del sedimento urinario, o un aumento della pressione sanguigna.
4. Analogamente, un **aumento della GFR** può indicare miglioramento della malattia renale ma può anche indicare un aumento controproducente della filtrazione (iperfiltrazione) dovuta a fattori emodinamici, che con il tempo contribuiscono alla glomerulosclerosi .
5. Alcuni pazienti che hanno malattia renale **possono non essere identificati** perché hanno una normale

VALUTAZIONE DELLA GFR

La GFR può essere misurata oppure stimata.

La misura della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) è complessa, richiede tempo, ed è di **difficile attuazione** nella pratica clinica.

Inoltre, la conoscenza esatta della GFR **non è necessaria** per la maggior parte delle situazioni cliniche (*sapere che la GFR è 40 piuttosto che 30 o 50 mL/min per 1,73 m² di solito fornisce un'informazione poco utile*).

Ciò che è importante sapere è se la GFR (e quindi gravità della malattia) sta cambiando oppure è stabile.

Quindi, di solito GFR è **stimata** da marcatori sierici.

Questa viene determinata nei pazienti con massa corporea e dieta relativamente costanti, **misurando la creatinina sierica e usando un calcolo**. Così si monitorano facilmente le variazioni della GFR.

VALUTAZIONE DELLA GFR

Tuttavia, talvolta è importante avere una **conoscenza più precisa** della GFR:

- nell'aggiustamento della **dose dei farmaci** (farmaci tossici con ridotto indice terapeutico, come la chemioterapia)
- prima della **donazione di rene**,
- prima di determinare la necessità di **trapianto**.

In tali circostanze, è ragionevole ricorrere alla misura GFR, anziché alla stima.

VALUTAZIONE DELLA GFR

MISURA

TA

STIMATA

MARCATORE DI FILTRAZIONE IDEALE CORRELAZIONE TRA GFR E S-CREATININA

marcatori di filtrazione esogeni

Inulina
Iotalamato, ioexolo, DTPA o
EDTA

Insight nella misura della creatinina

Formula di Cockcroft-Gault (1973)
Equazione dello studio MDRD (2005)
Equazione CKD-EPI con creatinina
(2012)

marcatori di filtrazione endogeni

Clearance della creatinina

Equazione CKD-EPI con creatinina-cistatina C (2011)
Equazione CKD-EPI con cistatina C (2012)

Insight nella misura della cistatina C

Misura della GFR – MARCATORE DI FILTRAZIONE IDEALE

Il metodo migliore per determinare GFR è la misurazione della clearance urinaria di un marcatore di filtrazione ideale. Utilizzando un marcatore di filtrazione (m), l'equazione per calcolare la clearance di m (C_m) è:

Equazione 1: $C_m = (U_m \times V) / P_m$

dove

P_m è la concentrazione plasmatica del marcatore m ,

U_m è la concentrazione urinaria del marcatore m ,

V è la velocità di flusso di urina.

Misurazione della GFR –

MARCATORE DI FILTRAZIONE IDEALE

Un marcatore di filtrazione ideale è definito come un soluto che è **liberamente filtrato** a livello del glomerulo, **non è tossico**, **non è né secreto né riassorbito** dai tubuli renali, e **non viene modificato** durante la sua escrezione attraverso i reni.

Se questi criteri sono soddisfatti, **il carico filtrato è uguale alla velocità di escrezione urinaria:**

Equazione 2: $GFR = (U_m \times V) / P_m \rightarrow GFR \times P_m = (U_m \times V)$

Dove $GFR \times P_m$ è il carico filtrato, e $U_m \times V$ è la velocità di escrezione urinaria.

Per sostituzione nell' **Equazione 1** $C_m = \frac{GFR}{P_m} \times P_m = GFR$

Quindi: Equazione 3: $GFR = C_m$

Misura della GFR con marcatori di filtrazione esogeni -

1) Il gold standard dei marcatori esogeni di filtrazione è la **inulina**:

- fisiologicamente inerte
- liberamente filtrata a livello del glomerulo
- non è secreta, riassorbita, sintetizzata e metabolizzata per via renale

Così, la quantità di inulina filtrata a livello glomerulare è uguale alla quantità escreta nelle urine, che può essere misurata.

Tuttavia l'inulina **non è facile da ottenere**, è **costosa** ed è **difficile da dosare**. Inoltre, il protocollo classico per misurare la clearance dell'inulina richiede una **infusione endovenosa continua**, **campioni di sangue multipli** e **cateterismo vescicale**.

Misura della GFR con marcatori di filtrazione esogeni -

2) Sono disponibili vari **metodi meno difficoltosi** per la misura della clearance tramite:

- marcatori di filtrazione alternativi (come **iotalamato** radioattivo o non radioattivo, **ioexolo**, **DTPA** o **EDTA**),
- somministrazione in bolo (per via sottocutanea o endovenosa),
- svuotamento spontaneo della vescica,
- clearance plasmatica.
-

Tuttavia questi metodi **hanno svantaggi** che ne limitano l'applicazione nella pratica.

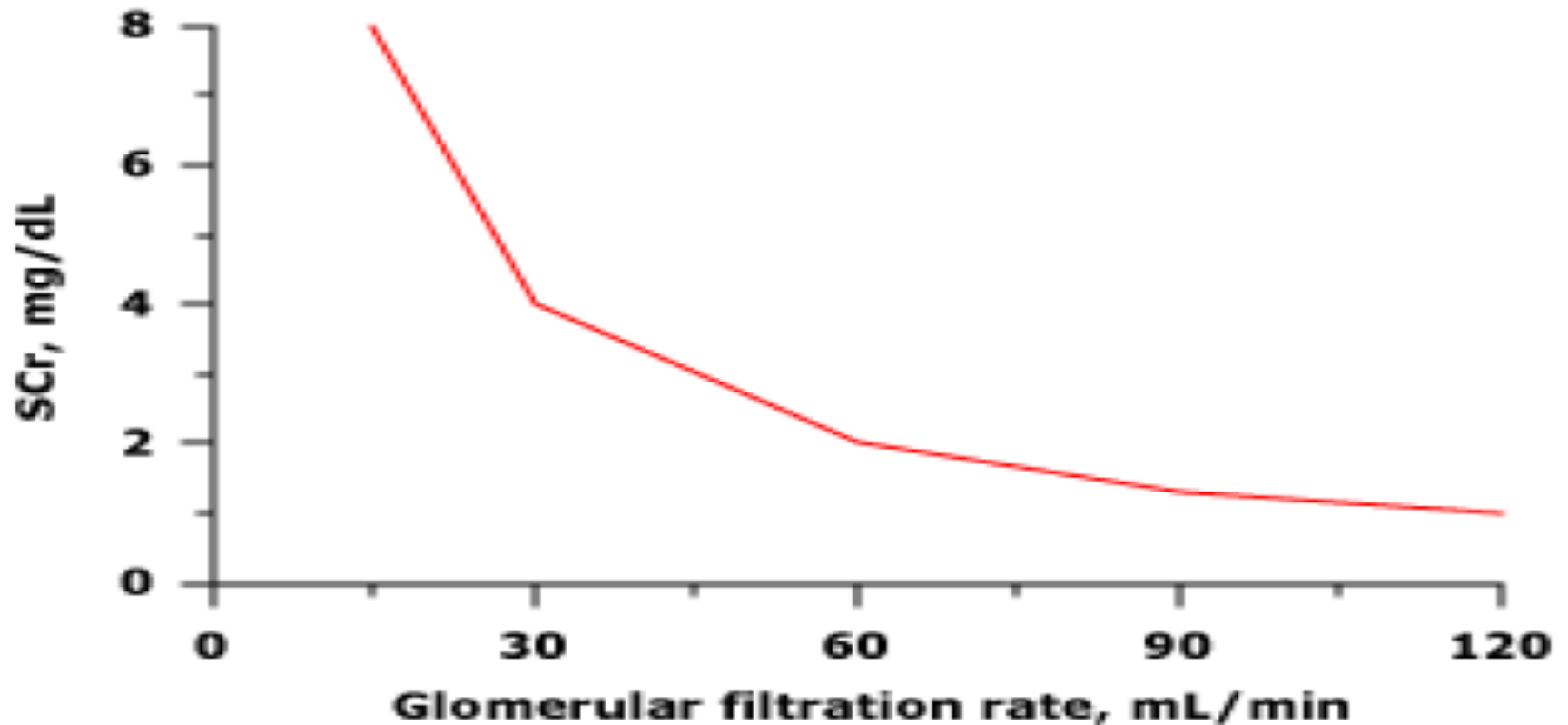
Misura della GFR con marcatori di filtrazione endogeni -

- **Clearance della creatinina** è misurata da raccolta temporizzata delle urine e da sangue prelevato durante il periodo di raccolta:
 - La **raccolta temporizzata** delle urine è difficoltosa e suscettibile di errore e non viene più raccomandata per la routine.
 - **I livelli serici sono influenzati** da altri fattori oltre la GFR, quali: secrezione o riassorbimento tubulare, entità della generazione del marcatore, sua eliminazione extra-renale.
 - In condizioni di **steady state** i livelli serici di marcatore endogeno si correlano al reciproco dei livelli di GFR.

GFR stimata (eGFR)

- La si ottiene tramite equazioni che includono, oltre alla S-Crea, **variabili** come età, sesso, razza, corporatura, come surrogati della massa muscolare e superano i limiti della semplice S-Crea.
- Le equazioni sono **derivate dal confronto** con GFR misurate su popolazioni.
- Le popolazioni consistono principalmente di pz con CRF.

GFR stimata (eGFR)

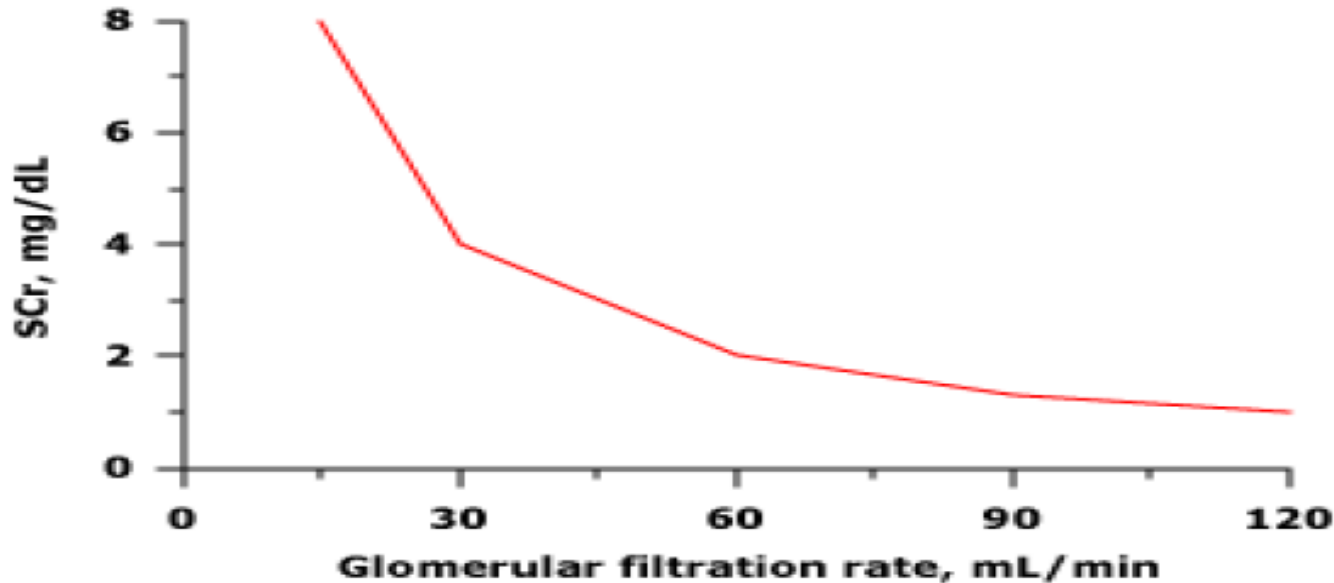


Relazione tra la concentrazione di creatinina sierica (SCr) e la GFR

in uno stato stazionario (steady state) ideale.

Al calare della GFR diminuisce la filtrazione della creatinina e di conseguenza cresce proporzionalmente la sua concentrazione

GFR stimata (eGFR)



- Questa curva raffigura un rapporto ipotetico tra GFR e creatinina sierica.
- In realtà, alla riduzione della GFR si contrappone un aumento della secrezione tubulare della creatinina che smorza l'aumento della creatinina nel siero.
- Pertanto, una riduzione del 50% della GFR non produce un raddoppio della creatinina sierica, ma un aumento inferiore.

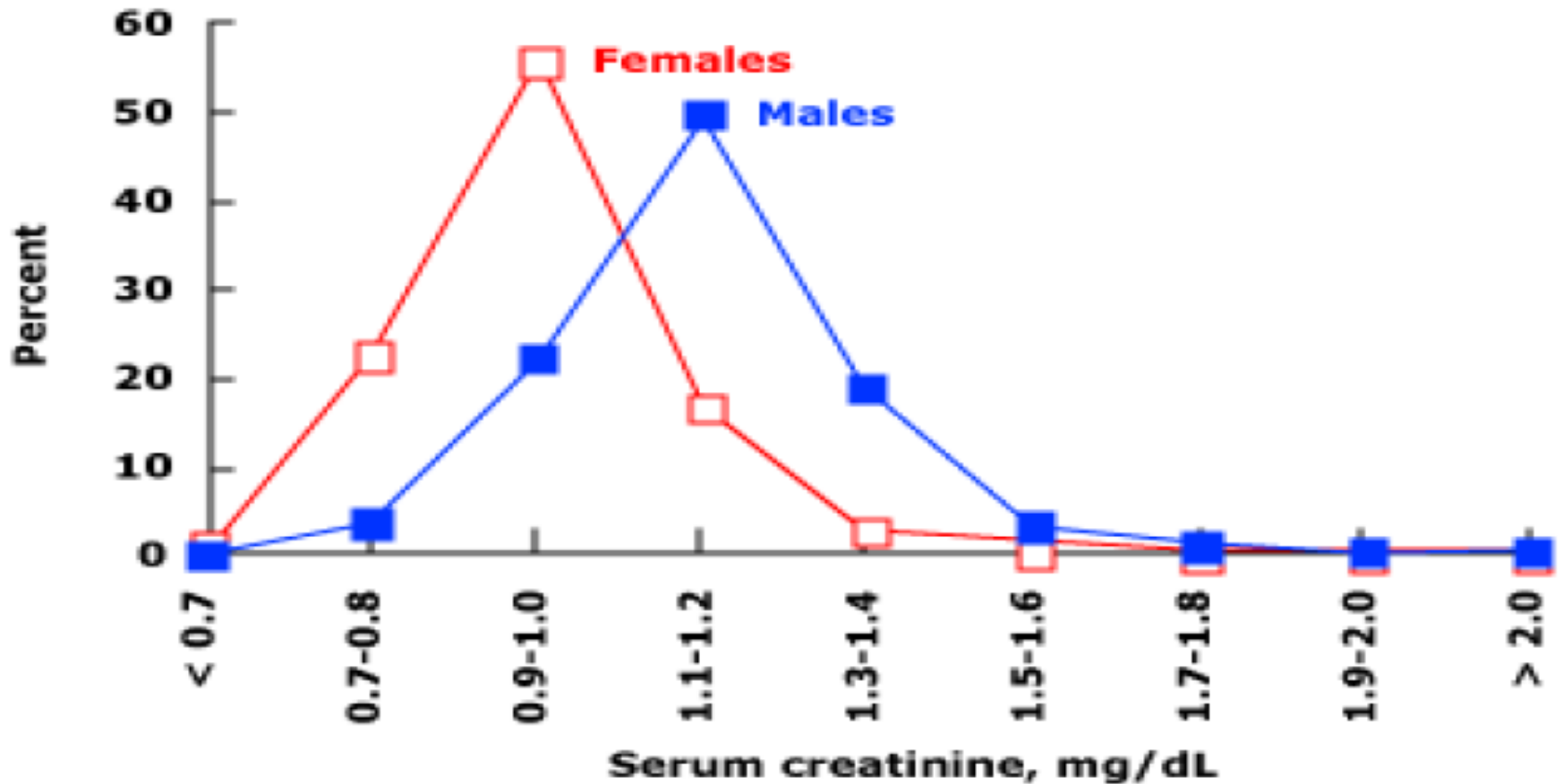
GFR stimata (eGFR)

Creatinina (Crea)

1. Crea è un **derivato aminoacidico**, filtrato liberamente dal glomerulo.
2. La **generazione** di creatinina è determinata dalla massa muscolare e dalla dieta:
 - ciò spiega le differenze per età, razza, etnia.
 - I valori sierici di creatinina sono più bassi nelle donne perché hanno meno massa muscolare, e di conseguenza una minore velocità di produzione della creatinina.
 - I valori più elevati per i neri e valori più bassi per gli ispanici si presume riflettano la massa muscolare.

GFR stimata (eGFR)

Distribuzione di S-creatinina tra uomini e donne USA



FATTORE	EFFETTO SU S-CREATININA
Età	calo
Sesso femminile	calo
Razza o etnia	
nera	aumento
ispanica	calo
asiatica	calo
Struttura corporea	
muscolarità	aumento
amputazione	calo
obesità	invariato
Malattia cronica	
Malnutrizione, infiammazione, devastazione (cancro, grave CVD, ospedalizzazione)	calo
Malattia neuromuscolare	calo
Dieta	
vegeteriana	calo
carne cotta	aumento

GFR stimata (eGFR)

Creatinina - Problemi di misura –

La creatinina sierica è spesso misurata con il **metodo del picrato alcalino**.

1. Alcune sostanze possono interferire con il dosaggio, aumentando artificialmente la concentrazione della creatinina sierica. Questo dosaggio colorimetrico può riconoscere altri composti come cromogeni, in particolare l'acetoacetato nella chetoacidosi diabetica. Alcuni farmaci producono un effetto simile.
2. Le differenze di metodo e apparecchiatura hanno comportato variazioni nella misura della creatinina sierica. Il Bias dovuto allo strumento era superiore a quello dovuto al metodo.
3. In uno studio di valutazione dove oltre 5000 laboratori utilizzavano 20 diversi strumenti per misurare la creatinina sierica e tre metodi diversi (**con picrato alcalino ed enzimatico**), la concentrazione media di creatinina sierica su un campione standardizzato variava tra 0,84-1,21 mg/dL



Creatinina -Problemi di misura –

L'entità della variazione è stata sostanzialmente ridotta dal programma nazionale istituito dalla **National Kidney Disease Education Program (NKDEP)** che ha portato alla **standardizzare del test** in modo che i valori ottenuti dalla misura della creatinina fossero riconducibili ai materiali di riferimento.

GFR stimata (eGFR)

Le Equazioni per la GFR stimata con S-Cr –

1. Migliorano il valore della misura della creatinina sierica, incorporando le **variabili demografiche e cliniche** come surrogati di fattori fisiologici non misurabili che influenzano la concentrazione di creatinina sierica, in base alla sua generazione e alla sua secrezione tubulare.
2. Sono **sufficientemente accurate** per seguire i cambiamenti della GFR nel tempo.
3. **Non forniscono stime accurate in caso di variazioni rapide della GFR** (ad es. nella insufficienza renale acuta).
4. Quelle più comunemente utilizzate sono: le equazioni di **Cockcroft-Gault** , quella dello studio **MDRD** e quella **CKD-EPI**.
5. L'equazione della Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) è la più accurata.
6. Le equazioni MDRD e CKD-EPI sono normalizzate alla

Formula di Cockcroft-Gault

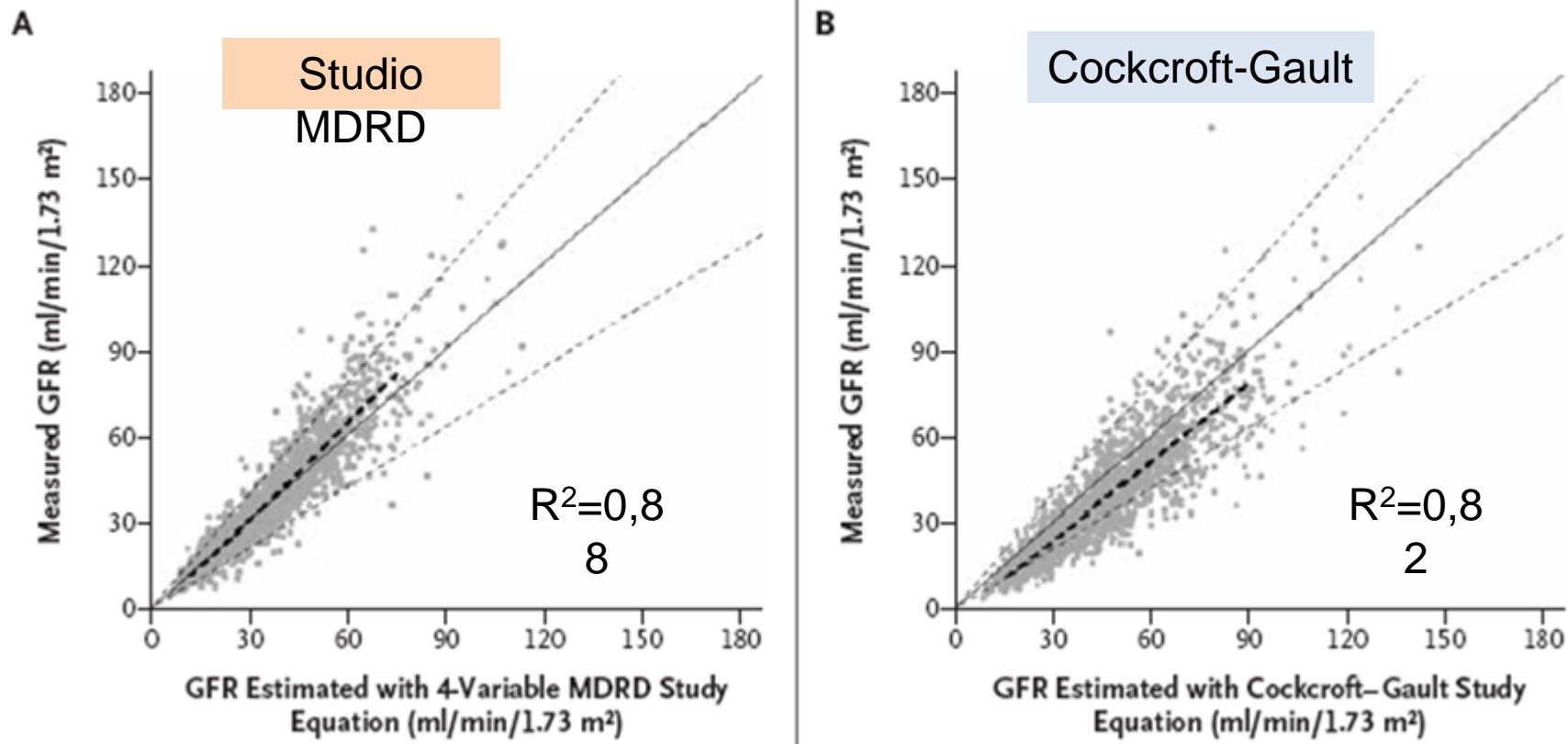
- Nel **1973**, ricavata da 249 uomini con CreaCl 30-130 mL/min
 - $CCr = [(140 - \text{età}) \times \text{peso}] / (72 \times \text{Scr}) \times 0.85$ (se donna)
- Valori espressi in mL/min
- I valori **non sono aggiustati per superficie corporea**
- **Sovrastima** sistematicamente GFR, data la secrezione tubulare della creatinina
- Per convertire i valori in unità SI si rimpiazza il denominatore 72 con 0.84

GFR stimata (eGFR)

Equazione dello Studio MDRD

1. Nel **1999**, determinata da 1628 pz con CRF, poi nuovamente espressa nel **2005** con dosaggio standardizzato della creatinina
2. $GFR = 175 \times (Scr)^{-1.154} \times (età)^{-0.203} \times 0.742$ (se il soggetto è donna) $\times 1.212$ (se di razza nera)
3. GFR è **espressa in mL/min/1.73 m²**
4. Il 91% delle GFR stimate erano entro il 30% dei valori misurati
5. Questo approccio è più **accurato** dell'equazione di Cockcroft-Gault e della clearance della creatinina misurata
6. Per convertire i valori in unità SI rimpiazza 175 con 30.849 nella MDRD del 2005

GFR stimata (eGFR)



Relazione tra eGFR e GFR misurata nei Partecipanti allo Studio Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)

La GFR fu misurata con (125 I) iotalamato

La eGFR fu calcolata con le equazioni dello Studio MDRD (a sinistra) $R^2=0,88$ e la formula di Cockcroft-Gault (a destra) $R^2=0,82$.

Retta di correlazione (in grassetto) e intervallo di confidenza al 95% (linee tratteggiate)

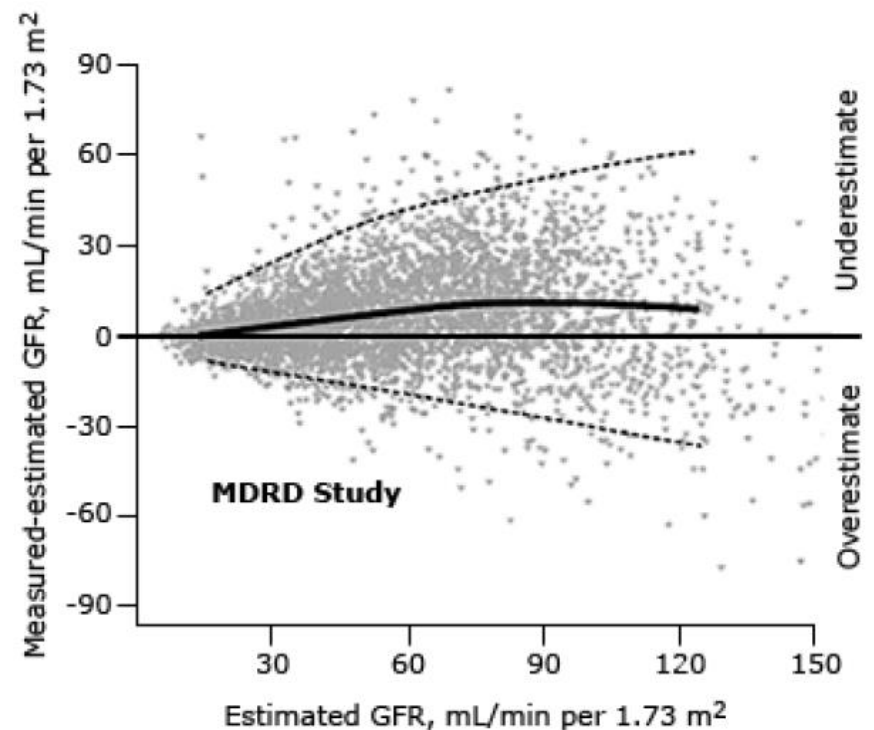
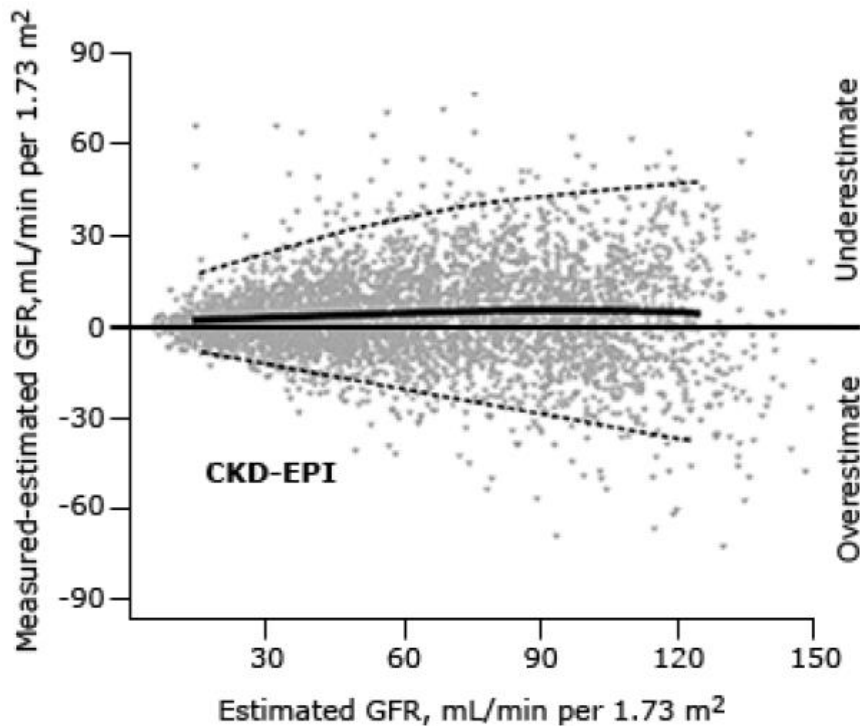
GFR stimata (eGFR)

Equazione CKD-EPI con creatinina (CKD-EPI_{2009Scr})

1. CKD-EPI **(nel 2009)** è superiore quando la GFR è normale o lievemente ridotta (vale a dire, >60 mL/min/1,73 m²).
2. Questa equazione è stata sviluppata dai dati raccolti da 10 studi, validata da 16 studi supplementari, in cui il gold standard era la misura diretta di GFR con marcatori di filtrazione esterni (ad es. iotalamato).
3. La popolazione dello studio comprendeva persone con e senza malattie renali, entro un vasto range di GFR.
4. Un calcolatore per la stima del GFR con l'equazione CKD-EPI equazione si trova al seguente sito web:
https://www.kidney.org/professionals/KDOQI/gfr_calculator

Performance delle equazioni CKD-EPI e MDRD nella stima della GFR misurata

Analisi degli errori di Bland-Altman



Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604.



[Home](#) »

GFR CALCULATOR

Glomerular filtration rate (GFR) is the best overall index of kidney function. Normal GFR varies according to age, sex, and body size, and declines with age. The National Kidney Foundation recommends using the CKD-EPI Creatinine Equation (2009) to estimate GFR.

Serum Creatinine:

mg/dL $\mu\text{mol/L}$

Serum Cystatin C:

mg/L

Age:

Years

Gender:

Male Female

Race:

Black Other

Standardized Assays:

Yes No Not Sure

Remove body surface adjustment:

Yes No Not Sure

CALCULATE

Results

CKD-EPI creatinine equation (2009)	<input type="text"/>	mL/min
CKD-EPI creatinine-cystatin equation (2012)	<input type="text"/>	mL/min
CKD-EPI cystatin C equation (2012)	<input type="text"/>	mL/min
MDRD study equation	<input type="text"/>	mL/min

For persons under 19 years of age, use the [pediatric GFR calculator](#).

IS IT CKD?

Either of the following must be present for ≥ 3 months to be CKD:

- GFR less than 60 ≥ 3 months
- ACR ≥ 30 mg/g or other markers of kidney damage

Click to learn [more](#).

Equation used to estimate GFR?

- CKD-EPI Creatinine (2009)
- CKD-EPI Creatinine-Cystatin C (2012)
- CKD-EPI Cystatin C (2012)
- MDRD Study Equation

What is the patient's ACR?†

- <30 mg/g
- 30-300 mg/g
- >300 mg/g
- <3 mg/mmol
- 3-30 mg/mmol
- >30 mg/mmol

Based on the information supplied:

GFR category is:‡

ACR category is:**

CKD classification is:

Risk of progression is:

Frequency of monitoring should be:

Referral to a nephrologist is:

† Neither the category of GFR nor the category of albuminuria alone can fully capture prognosis of CKD. Persistent and increased albuminuria has been shown to be an independent risk factor for CKD progression.

‡In the absence of evidence of kidney damage, neither GFR category G1 nor G2 fulfill the criteria for CKD.

**ACR 30-300 mg/g for > 3 months indicates CKD.

GFR stimata (eGFR)

Cistatina C –

- E' un marcatore alternativo di filtrazione endogeno con dei **vantaggi** rispetto alla creatinina per stimare la eGFR, dato che:
 - le sue determinanti non-GFR sono meno influenzate da razza, massa muscolare,
 - è più predittivo di CVD e mortalità.
- L'uso combinato di cistatina C e creatinina consente eGFR più accurate ed una predizione dei rischi più accurata.

GFR stimata (eGFR)

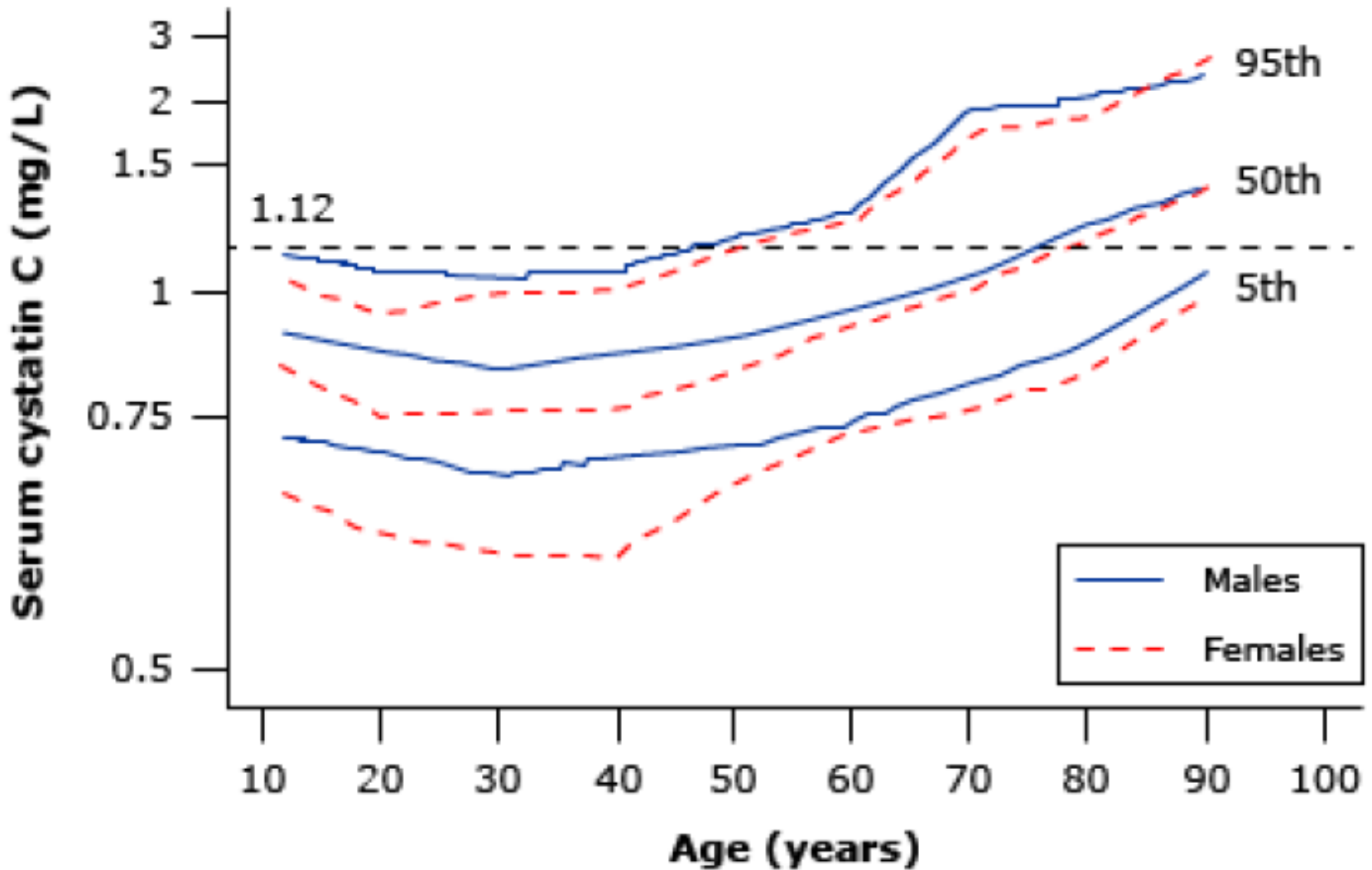
Cistatina C sierica-

1. È una proteina a basso peso molecolare, membro della superfamiglia di **inibitori della cisteina proteasi**.
2. La cistatina C è **filtrata** a livello glomerulare e **non riassorbita**. Tuttavia, è **metabolizzata** nei tubuli, il che ne impedisce l'uso per misurare direttamente la clearance.
3. Si crede sia **prodotta da tutte le cellule** nucleate con tasso di produzione relativamente costante.
4. La sua generazione **varia meno tra gli individui**, ma i suoi livelli sono influenzati da uso di corticosteroidi e sono correlati con età, sesso, peso, altezza, stato di fumatore, livelli di CRP.
5. **Aumenta rapidamente con l'età** (NHANES III: oltre il 50% degli individui di età ≥ 80 ha un elevato livello di cistatina C).

Variazioni della cistatina C in base a sesso ed età

età

A



Cistatina C sierica-

6. E' alterata nell'**ipotiroidismo**, ed è **correlata con i marcatori di infiammazione** (proteina C-reattiva), dimensioni del corpo (in particolare della **massa grassa**), e **diabete**.
7. Insieme, questi dati suggeriscono che i livelli di cistatina C sono anch'essi influenzati da vari fattori.

GFR stimata (eGFR)

Cistatina C sierica-

8. **Esiste una sostanziale variabilità analitica**, anche quando si utilizza lo stesso sistema analitico.
9. Come soluzione questo problema, sono stati generati **materiali di riferimento** certificati dalla Federazione Internazionale per la Chimica Clinica - Gruppo di lavoro per la standardizzazione della cistatina C nel siero e dall'Istituto dei materiali e misure di riferimento (**IRMM**).
10. Questo materiale, ERM-DA471/IFCC, è stato messo a disposizione i laboratori nel 2010. L'uso di questo materiale da parte dei produttori e dei laboratori permette di ottenere **oggi giorno valori consistenti di cistatina**.
11. Rispetto alla creatinina, la sua concentrazione sierica si correla più strettamente con la GFR.
12. Sono state recentemente formulate equazioni di stima basate sui valori di cistatina C da soli e in combinazione con quelli della creatinina.

Equazione CKD-EPI con cistatina C

Equazione CKD-EPI con creatinina-cistatina C

- Sviluppate nel 2012 dalla Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) in collaborazione con il National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). Inker L.A. et al. N Engl J Med 2012;367:20-9.
- Dai dati di 13 studi con più di 5000 partecipanti, in riferimento alla GFR misurata tramite clearance dello iotalamato.
- Con l'obiettivo di sviluppare 2 equazioni per la eGFR: una usando la S-cistatina C e l'altra usando insieme creatinina e cistatina C.

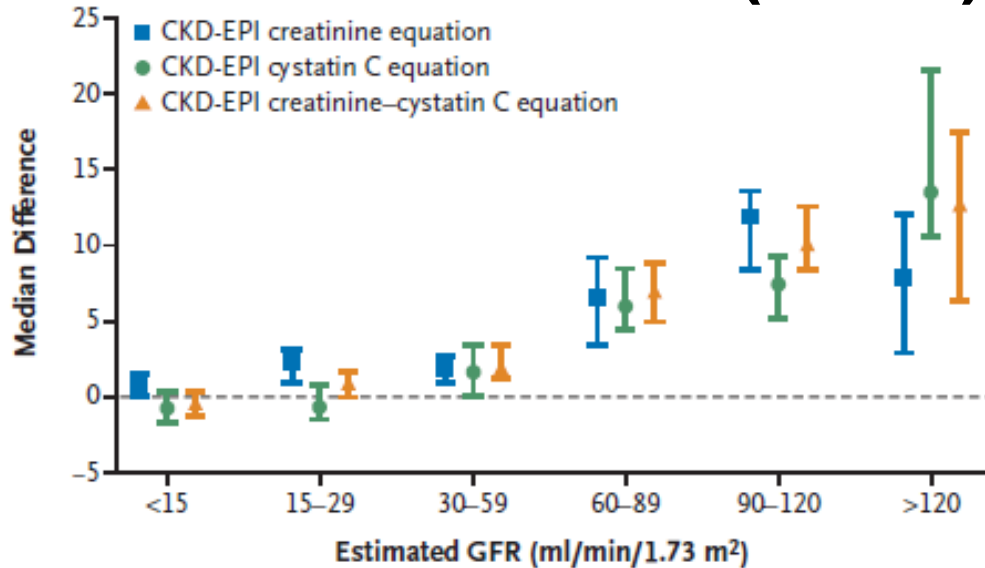
Equazione CKD-EPI con cistatina C

Equazione CKD-EPI con creatinina-cistatina C

- La nuova equazione combinata con creatinina–cistatina C aveva mediamente un **bias simile** a quello della nuova equazione con cistatina C e dell'equazione con creatinina ,
- ma rispetto a queste ultime era **più precisa e più accurata con migliore classificazione delle GFR <60 mL/min/per 1.73 m²** — la soglia per la diagnosi di malattia renale cronica (CKD).

Performance di tre equazioni per stimare la GFR

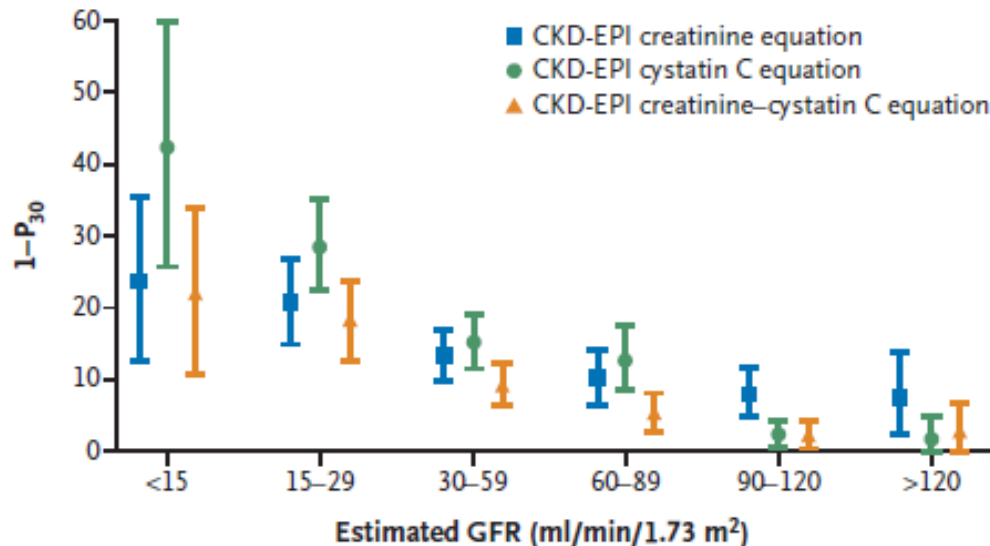
A Bias (eGFR)



A. Differenza tra GFR misurata e GFR stimata.

Il bias è simile per tutte e tre le equazioni.

B Accuracy



B. Accuratezza delle tre equazioni rispetto alla percentuale delle stime superiori al 30% della GFR misurata (1 - P₃₀).

Le barre indicano il 95% dell'intervallo di confidenza.

GFR stimata (eGFR)

Equazione CKD-EPI con cistatina C

Equazione CKD-EPI con creatinina-cistatina C

- L'equazione combinata con creatinina e cistatina C è la più precisa ed accurata per tutto il range di GFR e in sottogruppi definiti demograficamente e clinicamente, inclusi i soggetti con BMI <20 — nei quali la eGFR basata sulla creatinina è notoriamente meno accurata.
 - La precisione è migliore perchè gli errori dati dalle determinanti non-GFR della creatinina e della cistatina C sono inferiori in una equazione che comprende entrambi i markers anzichè uno solo.
- La cistatina C non rimpiazza nella pratica clinica la creatinina, ma combinando entrambe si ottiene una migliore stima della GFR, utile soprattutto per confermare o escludere la diagnosi di malattia renale cronica nei pazienti senza albuminuria con eGFR bassa (60 to 74 mL/min per 1.73 m²) ottenute con la creatinina.

GFR stimata (eGFR)

Generalit à

1. Come per tutti i test diagnostici, l'interpretazione della eGFR viene influenzata dalla **probabilità a priori** della malattia. *Un calo di eGFR in individui peraltro sani rappresenta spesso un falso positivo rispetto ad individui con altri marcatori di danno renale o con fattori di rischio per malattia renale.*
2. Si raccomanda la **conferma** di un calo di eGFR con la misura di GFR (clearance della creatinina) quando è necessario conoscere accuratamente la GFR, *per es. nel determinare l'eleggibilità per la donazione di rene o per aggiustare la dose di farmaci tossici, che sono escreti dal rene.*

GFR stimata (eGFR)

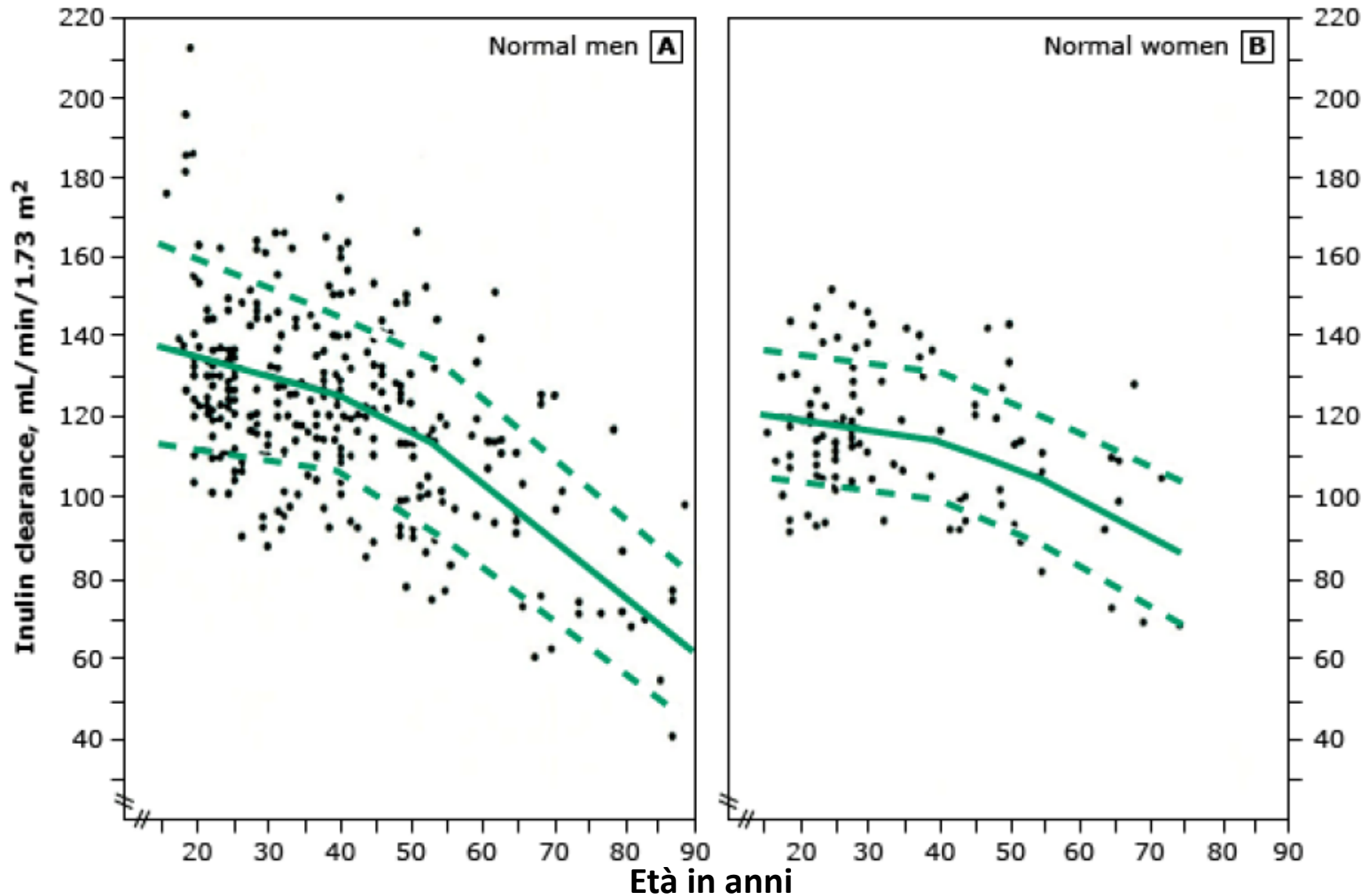
Generalit

3. Generalmente la misura diretta di GFR non è necessaria e la eGFR è appropriata **nella malattia renale cronica (CKD)** per:



RIDOTTA FUNZIONE RENALE

Valori normali della GFR negli uomini e nelle donne



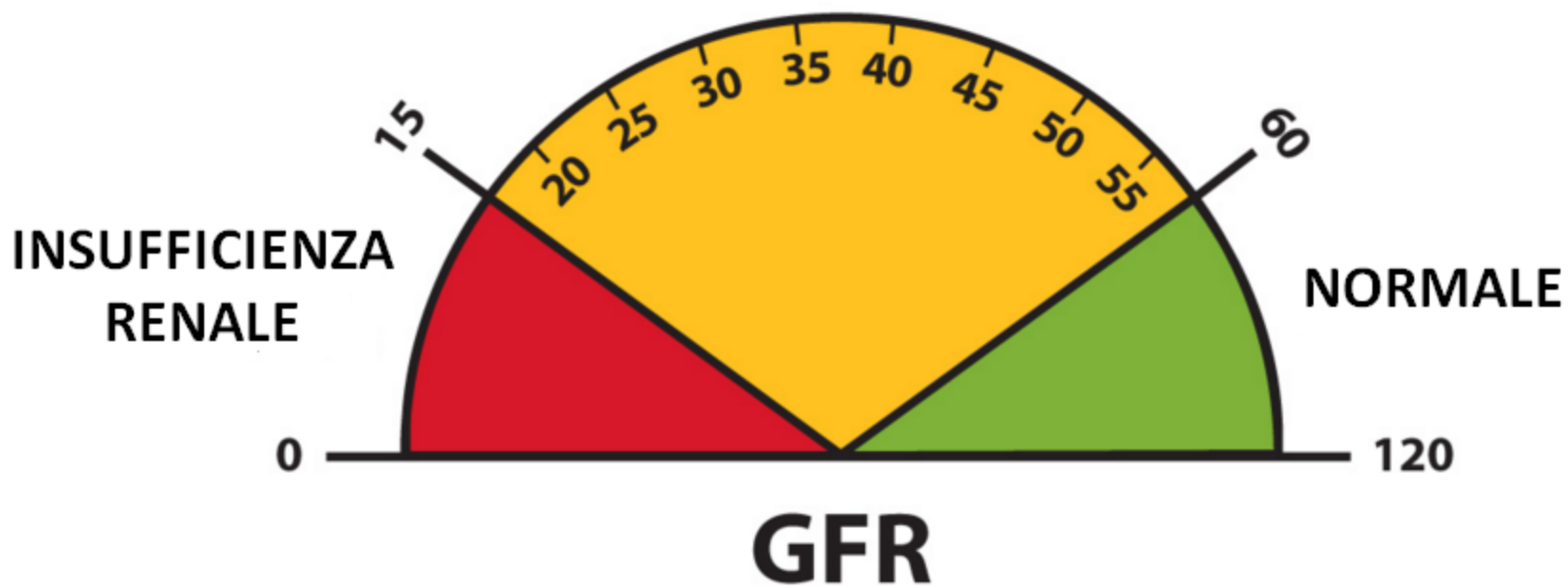
Valori normali per la clearance dell'inulina per uomini (pannello A) e donne (pannello B) di varie età.

Valori medi per decade di età (linea continua) e 1 SD per decade di età (linea

Ridotta GFR —

1. La GFR **misurata** varia nei soggetti normali in base a **età, sesso, assunzione di proteine nella dieta, e forse razza-etnia**.
2. Basandosi sulle misure di clearance nella popolazione sana e nella popolazione con nefropatia, la **soglia** più accettata per definire una ridotta GFR è **< 60 mL/min per 1.73 m²**;
3. La **insufficienza renale** è definita da una GFR **<15 mL/min per 1.73 m²** o dalla necessità di **terapia dialitica**.

MALATTIA RENALE



GFR stimata (eGFR)

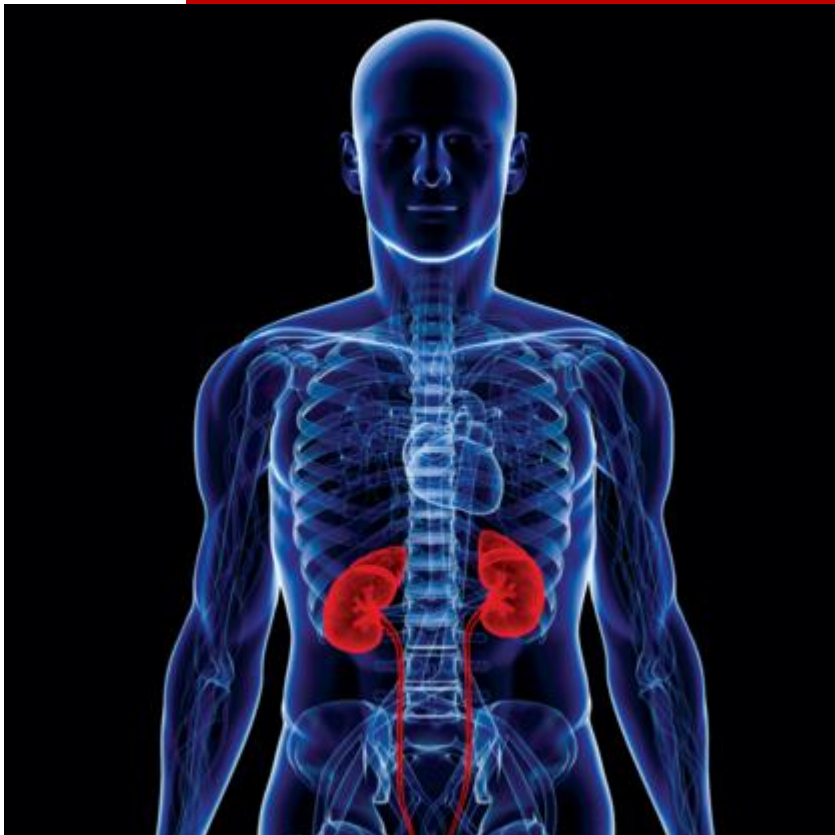
Ridotta GFR —

4. Quando si misura la S-creatinina, la quasi totalità dei laboratori ora riportano **di routine** la eGFR .
5. La S-creatinina è analita richiesto **frequentemente** e riportare la eGFR ha **migliorato la individuazione di soggetti con malattia renale cronica (CKD)**.
6. Gli individui che hanno valori di eGFR sotto la **soglia** di <60 mL/min per 1.73 m² per 3 mesi o oltre hanno malattia renale cronica (CKD).
7. Soglie simili per gli **anziani** — Le associazioni tra eGFR ed eventi avversi non variano sostanzialmente con l'età.

MALATTIA RENALE CRONICA

CKD

PARTE 2



Lezioni di Patologia Clinica

Prof. Renzo Schiavon

AA 2015-2016

DANNO RENALE

Il danno renale è **identificato** dalla presenza di uno dei seguenti marcatori clinici:

1. ALBUMINURIA
2. ALTERAZIONI DEL SEDIMENTO URINARIO
3. ALTERAZIONI ALL'IMAGING
4. ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE
5. TRAPIANTO RENALE

1 - ALBUMINURIA –

- A. Nella pratica clinica, l'albuminuria è il marcatore di danno renale **più frequentemente usato**.
- B. L'albuminuria riflette un aumento della **permeabilità glomerulare** alle macromolecole.

1 - ALBUMINURIA – **proteinuria**

A. L'albuminuria può indicare:

- una **malattia primitiva** del rene o
- il coinvolgimento del rene in una **malattia sistemica**.
 - ✓ In particolare una **disfunzione endoteliale diffusa**, come nel caso di ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, fumo, obesità, e altre malattie.

B. Esistono più metodi **definire l'albuminuria**, quello più vantaggioso è il

**rapporto albumina/creatinina
(albumin-to-creatinine ratio - ACR)
su urina spot, non temporizzata.**

1 - ALBUMINURIA – proteinuria

- E. La **soglia** generalmente accettata, sopra la quale un ACR elevato è 30 mg/g (3.4 mg/mol).
- F. Gli individui con **U-ACR >30 mg/g** (o equivalente) , rispetto a quelli con valori più bassi, anche in presenza di eGFR normale, hanno un **rischio significativamente aumentato** per :
- a) **mortalità** cardiovascolare o per tutte le cause,
 - b) malattia renale in stadio terminale -**ESRD**,
 - c) insufficienza renale acuta –**AKI**,
 - d) **progressione** della CKD.

*Per es. Individui con ACR tra 30 e 299 mg/g (3.4 - 34 mg/mmol) e eGFR tra 90 e 105 mL/min per 1.73 m² hanno un rischio relativo per ESRD 11-
volte superiore a quelli con eGFR simile, ma con ACR <30 mg/g.*

Categorie di albuminuria e proteinuria

- *Le urine normali contengono piccole quantità di albumina, di siero proteine di basso peso molecolare, e di proteine derivate dai tubuli renali e dal tratto urinario inferiore.*
- *Albuminuria e proteinuria **si misurano** tramite:*
 - A. velocità di escrezione** in urine con raccolta temporizzata,
 - B. rapporto** delle loro concentrazioni sulla concentrazione di creatinina in campioni di urine spot,
 - C. stick** semiquantitativo in campioni di urine spot.

A. Velocità di escrezione di **proteinuria** albuminuria e proteinuria

- Le velocità di escrezione normali di albumina (Albumin Excretion Rate-**AER**) e proteine (Protein Excretion Rate-**PER**) sono **<10 mg/24h** e **<50 mg/24h**, rispettivamente.
- Nella maggior parte delle malattie renali, **l'albumina è la proteina urinaria predominante**, che comprendente circa il 60-90% di tutte le proteine urinarie.
- Una **AER** di **30-300 mg/24h** corrisponde a albuminuria **moderatamente aumentata** e **>300 mg/24h** corrisponde a albuminuria **fortemente aumentata**
- Una velocità di escrezione urinaria di **AER e PER >2200 mg/24h e >3500 mg/24h**, rispettivamente, caratterizza la **sindrome nefrosica** (ipoalbuminemia, edema, e ipercolesterolemia)

proteinuria

B. Rapporto tra escrezione di albuminuria e proteinuria e concentrazione di creatinina urinaria (ACR e PCR)

- Albuminuria e proteinuria possono essere accertate con **ACR** (Albumin-Creatinine Ratio) e **PCR** (Protein-Creatinine Ratio). Le misure devono essere determinate **ripetutamente** su campioni di urine da minzione spot del mattino.
- Generalmente, per una decisione clinica, ACR ed PCR sono sufficienti, ma si possono usare per **conferma** le velocità di escrezione AER e PER .
- La **corrispondenza** dei valori di AER con ACR e di PER con PCR deriva dal fatto che la escrezione media di creatinina è 1 g/24h.
 - ❖ Tuttavia, l'escrezione di creatinina varia con età, sesso,

B. Rapporto tra escrezione di albuminuria e proteinuria e concentrazione di creatinina urinaria (ACR e PCR)

- **ACR <10 mg/g** (<1.1 mg/mmol) è **normale**
- **ACR 10-29 mg/g** (1.1-3.3 mg/mmol) è **lievemente aumentata**
- **ACR 30-300 mg/g** (3,4-33,9 mg/mmol) è **moderatamente aumentata**
- **ACR >300 mg/g** (33,9 mg/mmol) è **fortemente aumentata**
- La proteinuria può essere riscontrata da **stick urinari** semiquantitativi. Un risultato **"traccia"** corrisponde alla categoria "normale-lievemente aumentata" o al range inferiore della categoria "moderatamente aumentata". Essendo questi valori approssimativi, i risultati positivi **vanno sempre confermati** con ACR, PCR, AER, o PER.
- Per la conversione di ACR e PCR da mg/g creatinina a mg/mmol di creatinina, bisogna moltiplicare per 0,113

Categorie di albuminuria e proteinuria

	Normale- lievemente aumentato	Moderatamente aumentato	Fortemente aumentato
AER (mg/24h)	<30	30 - 300	>300
PER (mg/24h)	<150	150 - 500	>500
ACR (mg/g)	<30	30 - 300	>300
PCR (mg/g)	<150	150 - 500	>500
Stick per Proteine	Negativo- tracce	Da tracce a 1+	>1+

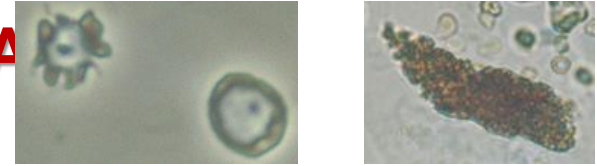
AER: albumin excretion rate; PER: protein excretion rate; ACR: albumin/creatinine ratio; PCR: protein/creatinine ratio.

KDIGO. Summary of recommendation statements. Kidney Int 2013; 3(Suppl):5.

2- ALTERAZIONI DEL SEDIMENTO URINARIO

Eritrociti dismorfici (acantociti),

Cilindri eritrocitari o leucocitari indicano la presenza di danno glomerulare o di infiammazione tubulare.



3- ALTERAZIONI ALL'IMAGING -

Il danno renale viene rilevato dal riscontro di **reni policistici**, **idronefrosi**, e **reni piccoli ecogeni**.

4- ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE -

La **biopsia renale** evidenzia malattie glomerulari, vascolari o tubulointerstiziali.

5- TRAPIANTO RENALE -

I pazienti trapiantati sono considerati come affetti da danno renale, ci siano o meno alterazioni documentate da biopsia o markers di danno.

**CONFERMA DELLA
CRONICITA' DEL DANNO**

Conferma della cronicità del danno o della ridotta funzione



1. Secondo le linee-guida della KDIGO il danno o la ridotta funzione devono persistere per **almeno tre mesi** per porre diagnosi di CKD.

2. Per fare ciò si ricorre al seguente metodo:
 - a) Rassegna delle precedenti **eGFR**,
 - b) Rassegna delle precedenti misure di **albuminuria**,
 - c) Rassegna delle precedenti **analisi del sedimento**,
 - d) Evidenza all'**imaging** di riduzione del volume renale con riduzione dello spessore della corticale o presenza di cisti multiple.

Conferma della cronicità del danno o della ridotta funzione

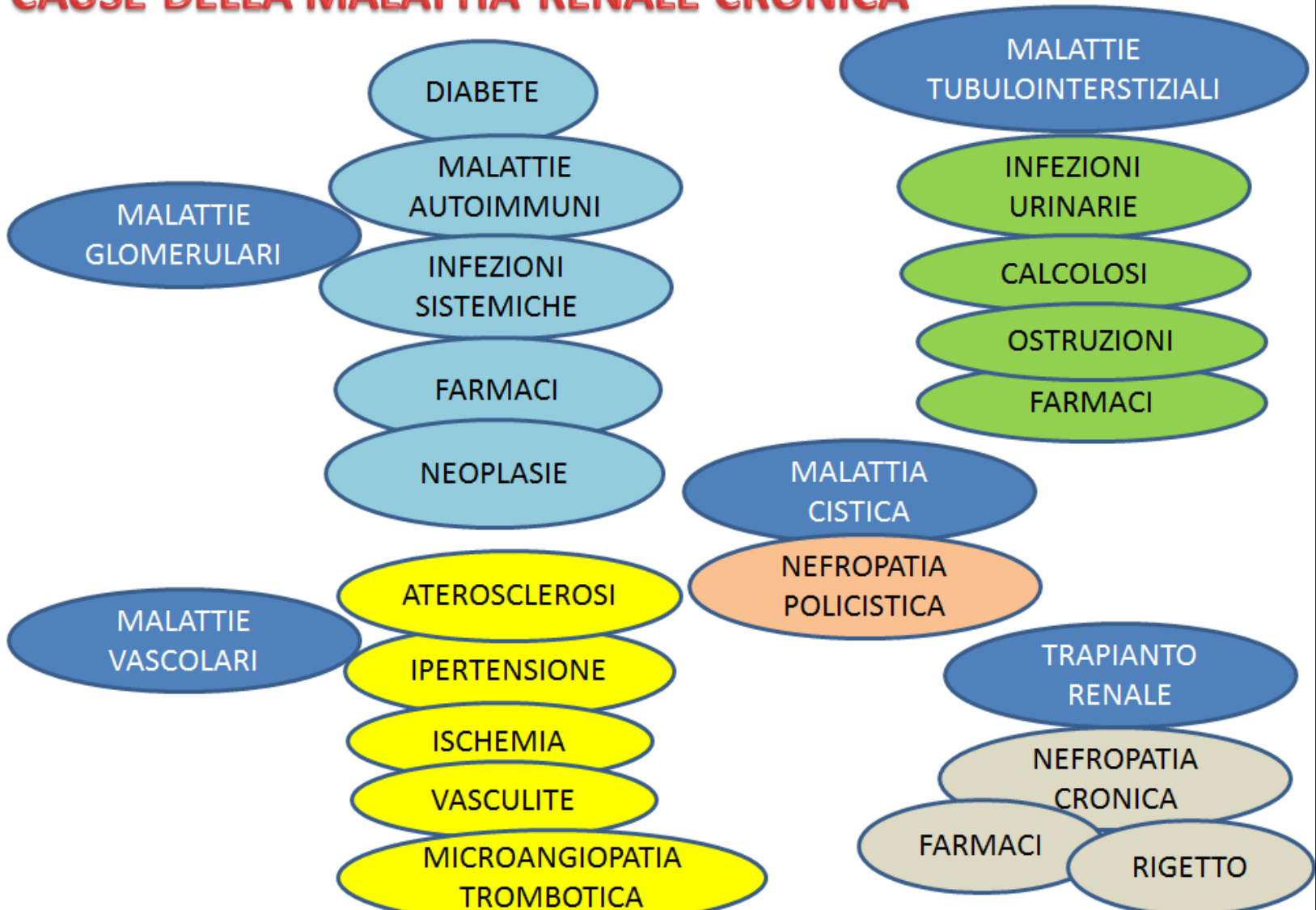


3. Ottenere misure ripetute **entro e poi oltre i tre mesi** prefissati.
4. Inoltre, la ripetizione dei test è necessaria nei pazienti con eGFR o ACR **prossimi ai valori soglia** per la definizione di CKD (eGFR appena <60 mL/min per 1.73 m² o ACR appena >30 mg/g [3.4 mg/mmol]) a causa delle **variabilità biologiche e analitiche** dei test.

PATOGENESI DELLA CKD

PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

CAUSE DELLA MALATTIA RENALE CRONICA



PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

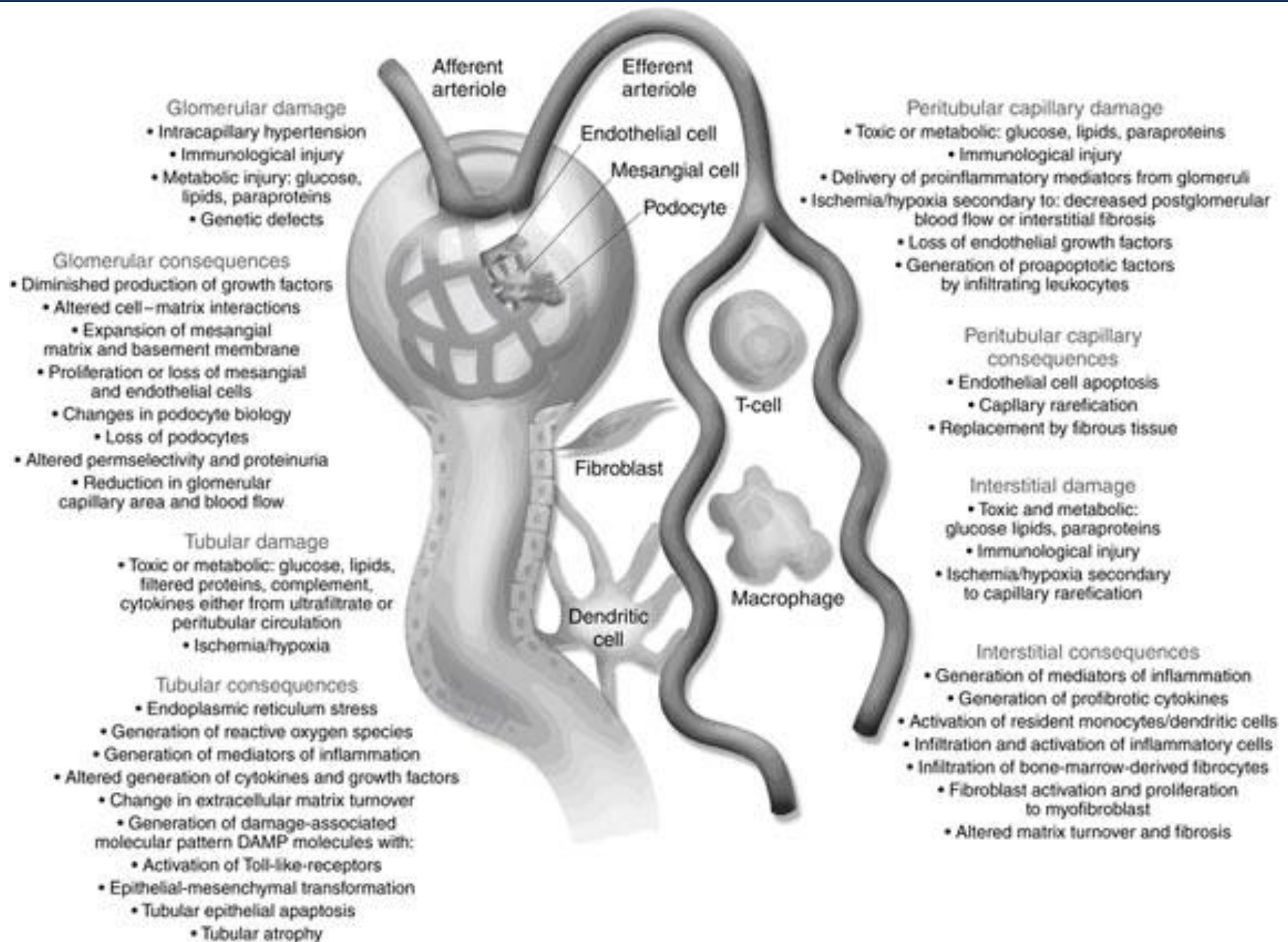
Qualsiasi sia il danno iniziale, subentrano poi meccanismi secondari che conducono ad un percorso comune, caratterizzato da **fibrosi interstiziale**, **progressiva perdita capillare peritubulare con conseguente ipossia tubolare e distruzione dei nefroni funzionanti**.

- ❑ In CKD sono presenti nell'interstizio renale sia linfociti che **macrofagi**, che rilasciano TGF- β e altri fattori che **giocano un ruolo importante nella fibrosi renale**.
- ❑ Alcune **proteine urinarie** hanno la capacità di attivare le vie infiammatorie dipendenti dal fattore nucleare κB (NF κB) e di stimolare la produzione di chemochine da parte delle cellule epiteliali del tubulo renale: ciò spiega il **ruolo della proteinuria nella promozione del danno renale**.
- ❑ La **cascata del complemento** che, se attivata, provoca danno tubulare e infiammazione interstiziale.

PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

- I **tubuli renali** contribuiscono alla **fibrosi renale** rilasciando mediatori proinfiammatori, specie reattive dell'ossigeno, proteine della matrice, proteasi e altre molecole profibrotiche.
- La fibrosi interstiziale ha poco impatto sulla **velocità di filtrazione glomerulare** finché le unità dei nefroni rimangono funzionalmente intatte.
- Con il progredire della malattia i tubuli renali vanno in **atrofia per apoptosi** e la GFR si riduce.

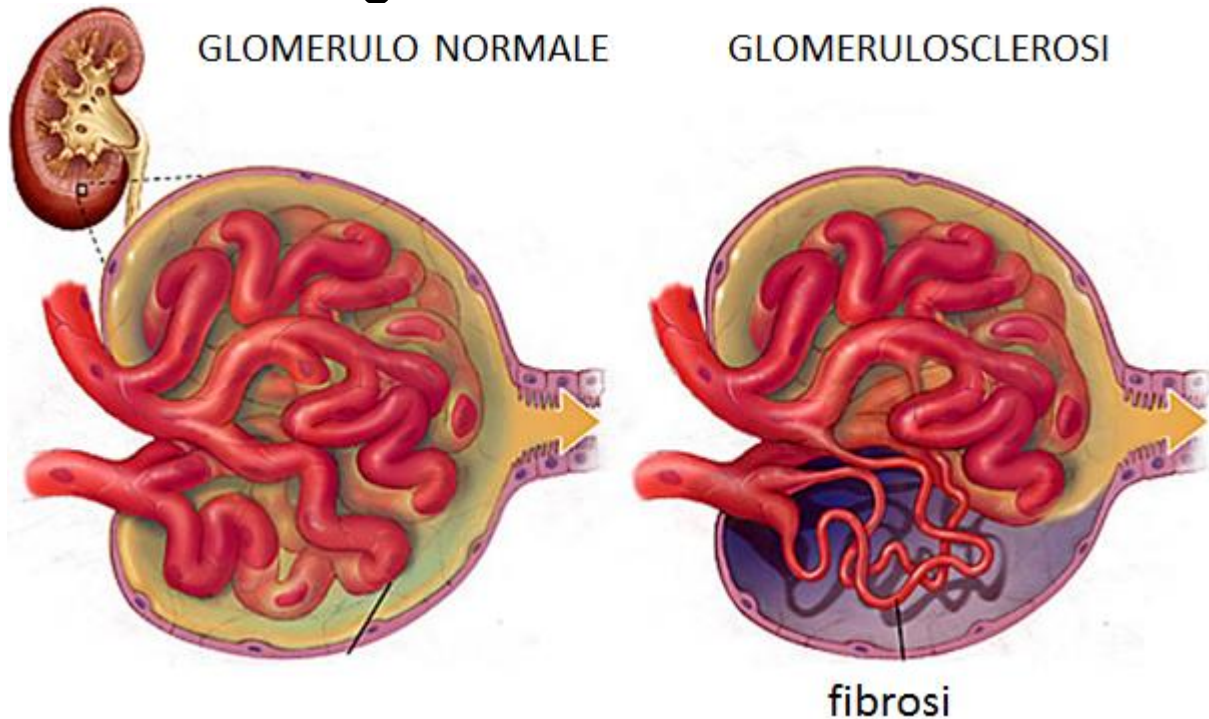
PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)



PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

La malattia renale cronica si sviluppa secondariamente a vari stati patologici primari.

Per un certo periodo di tempo i reni sono in grado di compensare attraverso la iperfiltrazione mantenendo la GFR, ma poi l'aumento della pressione glomerulare porta alla glomerulosclerosi.



PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

A livello sistemico compaiono tre meccanismi dovuti al danno renale che causano ulteriore danno renale:

1. la diminuita escrezione di elettroliti e acqua, che porta a **ritenzione di acqua e sodio** e a **livelli anormalmente elevati di potassio e fosfato**. Si verifica anche **acidosi metabolica** per perdita di bicarbonati, aumentata produzione di acidi non volatili, ridotta escrezione di acidi e l'equilibrio acido-base non è più mantenuto.
2. la ridotta escrezione di soluti organici come creatinina e urea comporta accumulo nel plasma di tossine relate a questi soluti (**tossine uremiche**) che danneggiano tutti i tessuti, inclusi quelli del rene.
3. Il rene danneggiato riduce il rilascio di eritropoietina e di calcitriolo (la forma attivata di vitamina D) con conseguente sviluppo di **anemia e malattia ossea**.

PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Ci sono poi **altri meccanismi sistemici che contribuiscono al danno renale** nella CKD.

1. L' **attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS)**
 - **aumenta la pressione arteriosa sistemica** ma anche quella **glomerulare** con conseguente attivazione della fibrosi.
 - La **vasocostrizione** determina ipossia all'interno dei nefroni che induce aumentata produzione di radicali liberi e apoptosi dell'epitelio tubolare.
2. L' **alterato metabolismo minerale** contribuisce alla **calcificazione vascolare** e al rischio cardiovascolare connesso alla CKD.

PATOGENESI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Rene normale



- Funzione normale
- Dimensione normale
- Bassa escrezione di proteine



Malattia renale



Uretere

- Superficie granulata
- Funzione ridotta
- Dimensione piccola
- Proteinuria

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Sintomatologia



SINTOMATICI

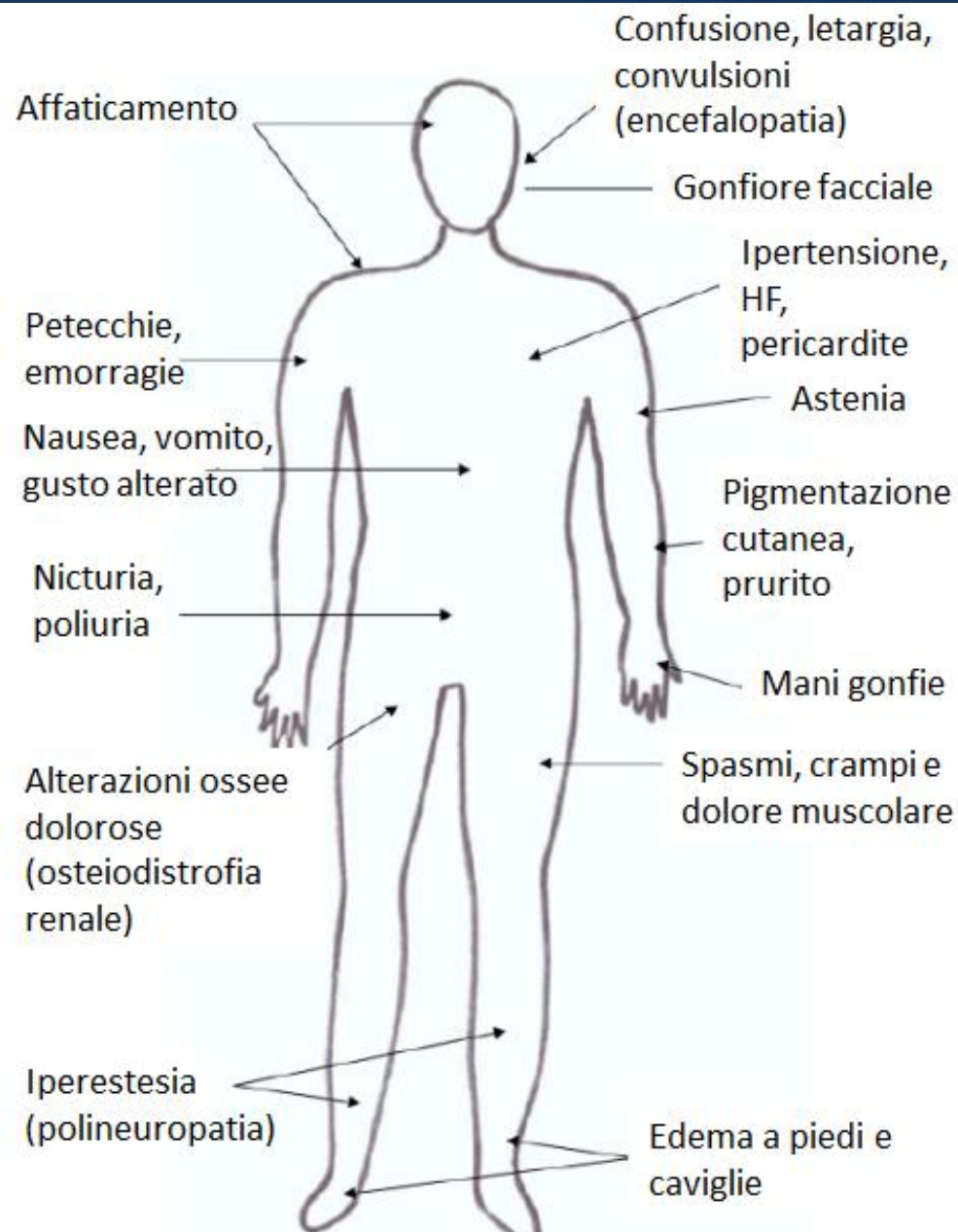
sintomi direttamente riconducibili al **rene** (ematuria macroscopica, dolore al fianco)

sintomi **extrarenali** (edema, ipertensione, segni di uremia).

ASINTOMATICI

riscontrati all'esame di **routine** con ridotta eGFR o alterata urinanalisi.

SEGNI E SINTOMI EXTRARENALI DELLA MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)



Elettroliti: Edema, iponatremia, iperkaliemia, acidosi metabolica, iperuricemia, iperfosfatemia, ipercalcemia

Gastrointestinali: Anoressia, nausea, vomito, malnutrizione

Cardiovascolari: accelerata aterosclerosi, ipertensione sistemica, pericardite

Ematologici: anemia, disfunzioni immunitarie, disfunzione piastrinica

Muscolo-scheletrici: osteodistrofia renale, debolezza muscolare, ritardo della crescita nei bambini, artropatia amiloide causata da deposizione di beta2-microglobulina

Neurologici: Encefalopatia, convulsioni, neuropatia periferica

Endocrinio-metabolici: iperlipidemia, intolleranza al glucosio da insulino-resistenza, amenorrea e infertilità nelle

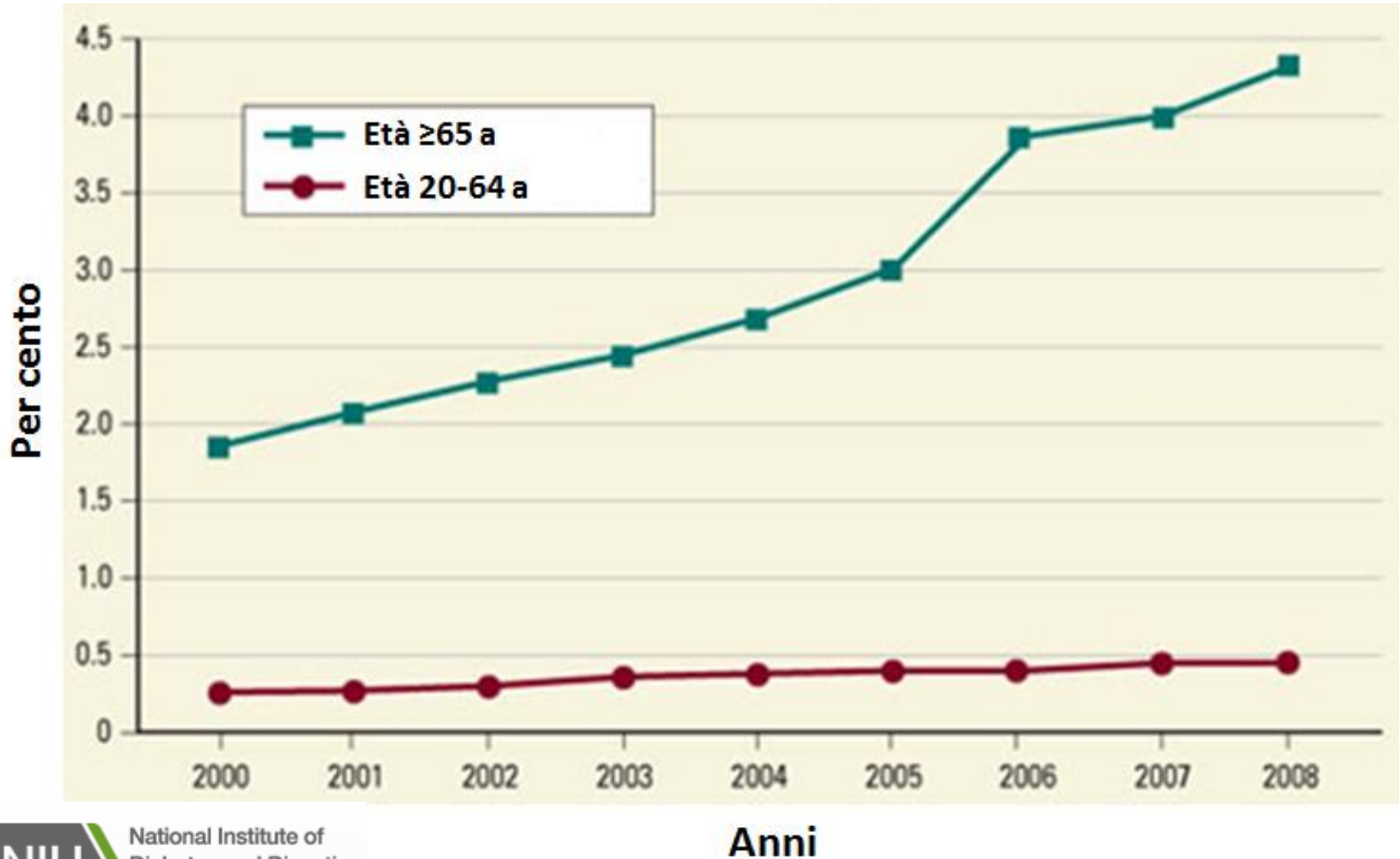
MALATTIA RENALE CRONICA **EPIDEMIOLOGIA**

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

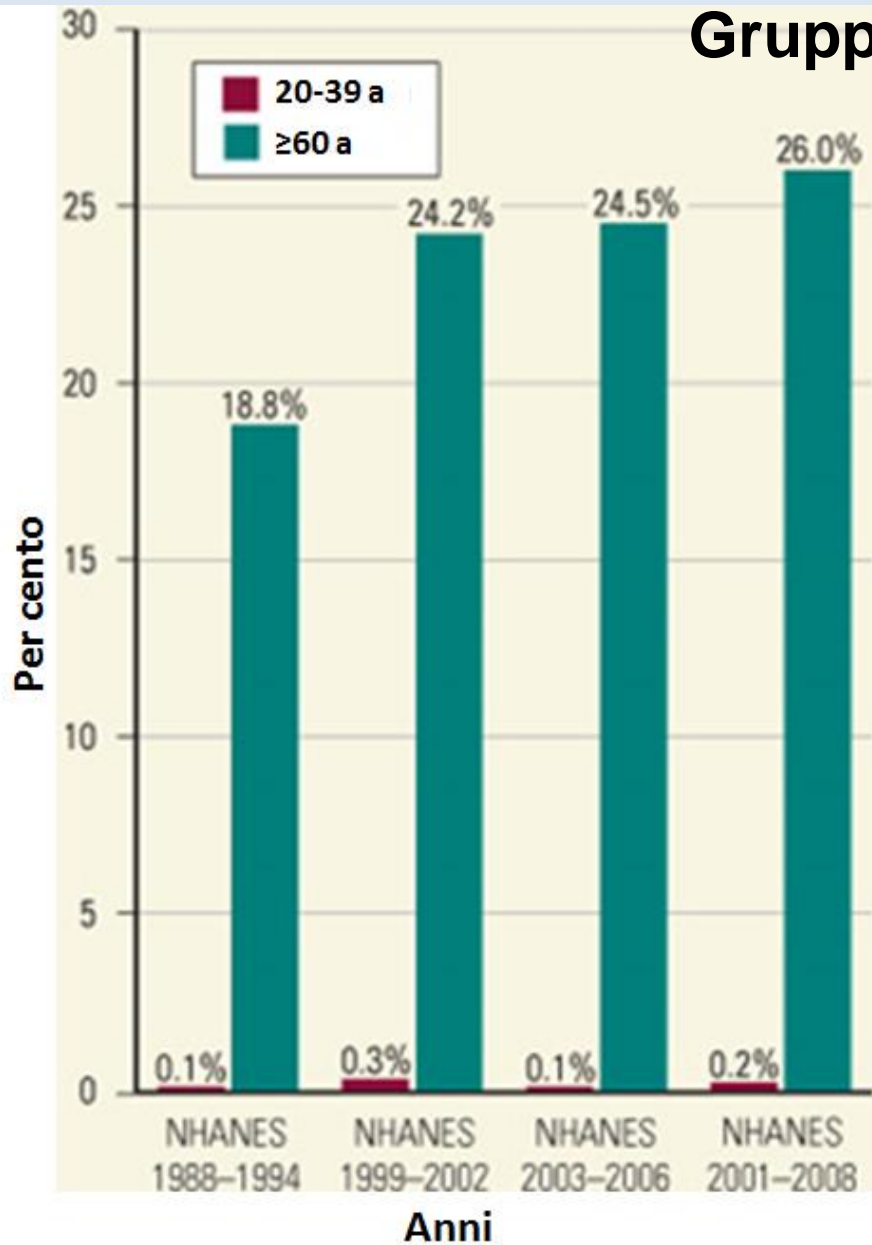
Epidemiologia

Nonostante l'entità delle risorse impiegate per il trattamento della malattia renale terminale ed il sostanziale miglioramento della qualità della terapia dialitica, questi pazienti continuano a soffrire di significativa mortalità e morbilità, e di una ridotta qualità della vita.

Percentuale della Popolazione con Casi Nuovi di CKD, per Gruppo di Età



Percentuale della Popolazione con CKD in Stadio 3, per Gruppo di Età



Prevalenza della Malattia Renale Cronica - CKD

La prevalenza di CKD sta crescendo più rapidamente nelle persone con età >60 anni e nell'arco di 10-15 anni è salita dal 18,8% (Studio NHANES del 1988-1994) al 24,5% (Studio NHANES 2003-2006). Nello stesso periodo, la prevalenza di CKD in persone di età compresa tra 20 e 39 anni è rimasta costantemente al di sotto dello 0,5%.

Un americano adulto su 10 ha CKD di un certo livello, in totale più di 20 milioni.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention

Prevalenza negli anni di CKD

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Una volta che la malattia renale è stata rilevata, vengono **valutati** :

- **grado di disfunzione renale,**
- rapidità della sua **progressione,**
- identificazione della **malattia sottostante.**

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

1. La National Kidney Foundation (NKF) Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (**KDOQI**) nel **2002** introdusse le linee guida per la definizione e la classificazione della malattia renale cronica (chronic kidney disease -CKD), adottate in seguito dal gruppo internazionale del Kidney Disease Improving Global Outcomes (**KDIGO**) nel **2004**.



2. Queste linee guida spostarono il **concetto** della CKD da *condizione clinica pericolosa ma poco frequente e di pertinenza del nefrologo* a **condizione frequente** con uno spettro di gravità che merita l'attenzione del medico di medicina generale e che richiede alcune strategie per la prevenzione, la diagnosi precoce e il trattamento.

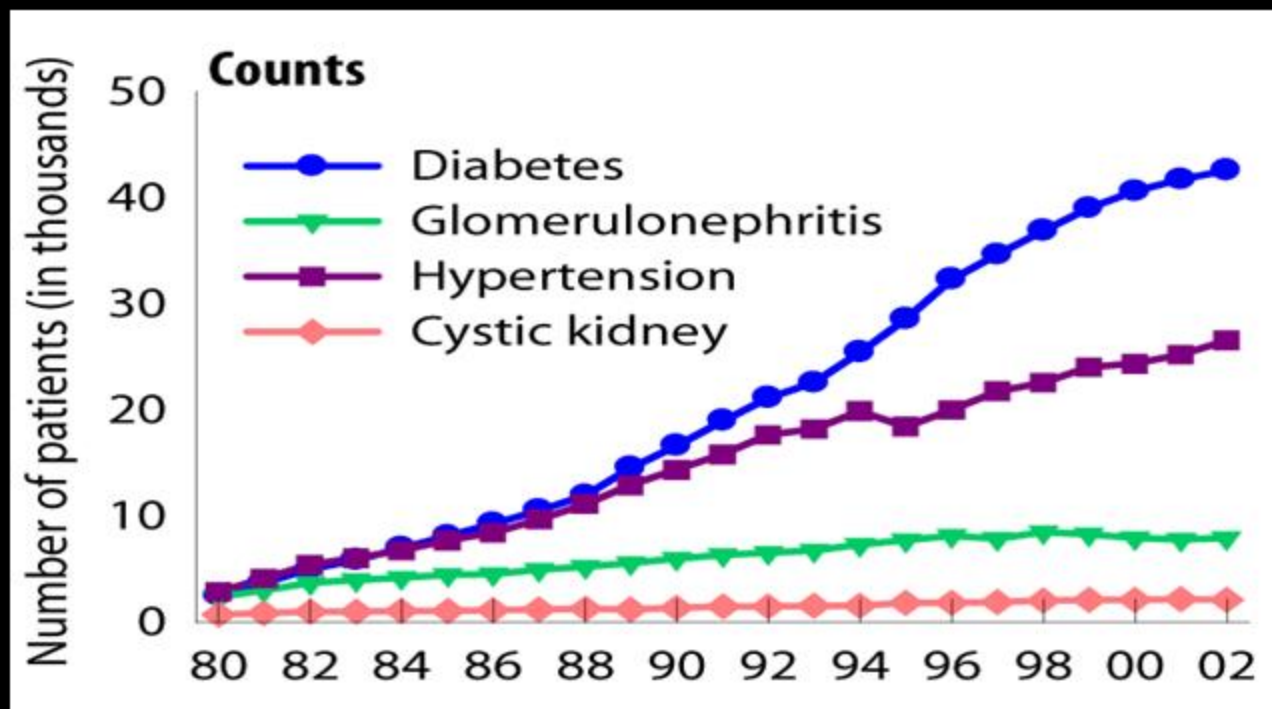
MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Causa della malattia

Fattori di rischio per la CKD:

- Predisposizione **genetica** o sociodemografica
- Presenza di **malattia sottostante** che può iniziare o peggiorare la malattia renale

Incidenza di Insufficienza Renale Cronica (IRC) in base alla Diagnosi Primaria



La IRC dovuta a malattie specifiche del rene è solo la minoranza

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Causa della malattia

1. Identificare la causa della CKD (cioè, diabete, ipertensione, tossicità da farmaci, malattie auto-immuni, ostruzione del tratto urinario, trapianto di rene, ecc.) **consente d'instaurare una terapia specifica.**
2. Inoltre la causa della nefropatia ha implicazioni nella velocità di **progressione** e nel rischio delle **complicazioni.**
3. L'accertamento della causa della CKD può essere **difficile.**

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Progressione della malattia

La **Insufficienza Renale** è lo stadio finale della CKD ed è definita da grave riduzione della funzione renale o dalla necessità di trattamento con dialisi.

Il termine “**Malattia Renale in Fase Terminale**” (end-stage renal disease -ESRD) si riferisce alla insufficienza renale cronica trattata con dialisi o trapianto.

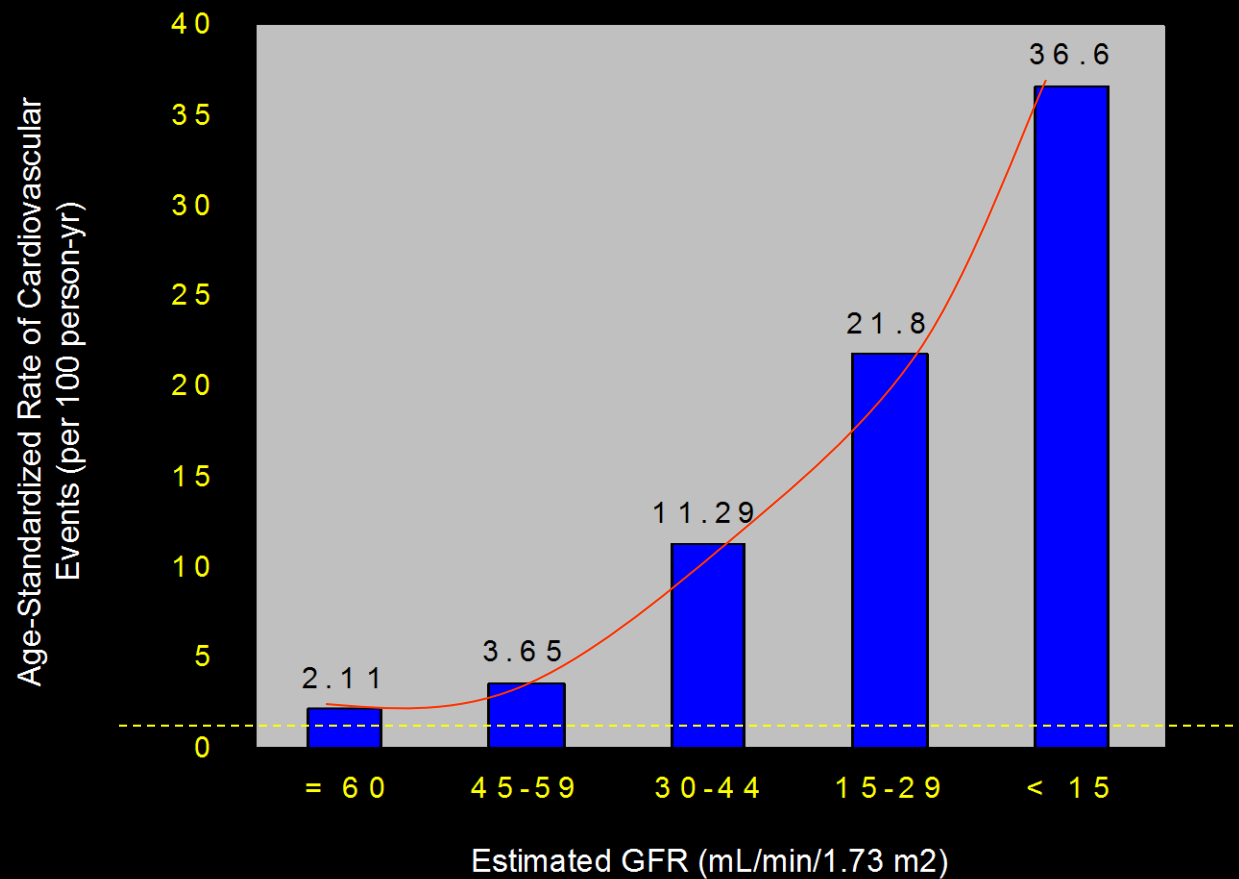
Il **Danno Renale Acuto** (Acute Kidney Injury - AKI) può complicare la CKD e accelerarne la

MALATTIA RENALE CRONICA (CKD)

Complicanze

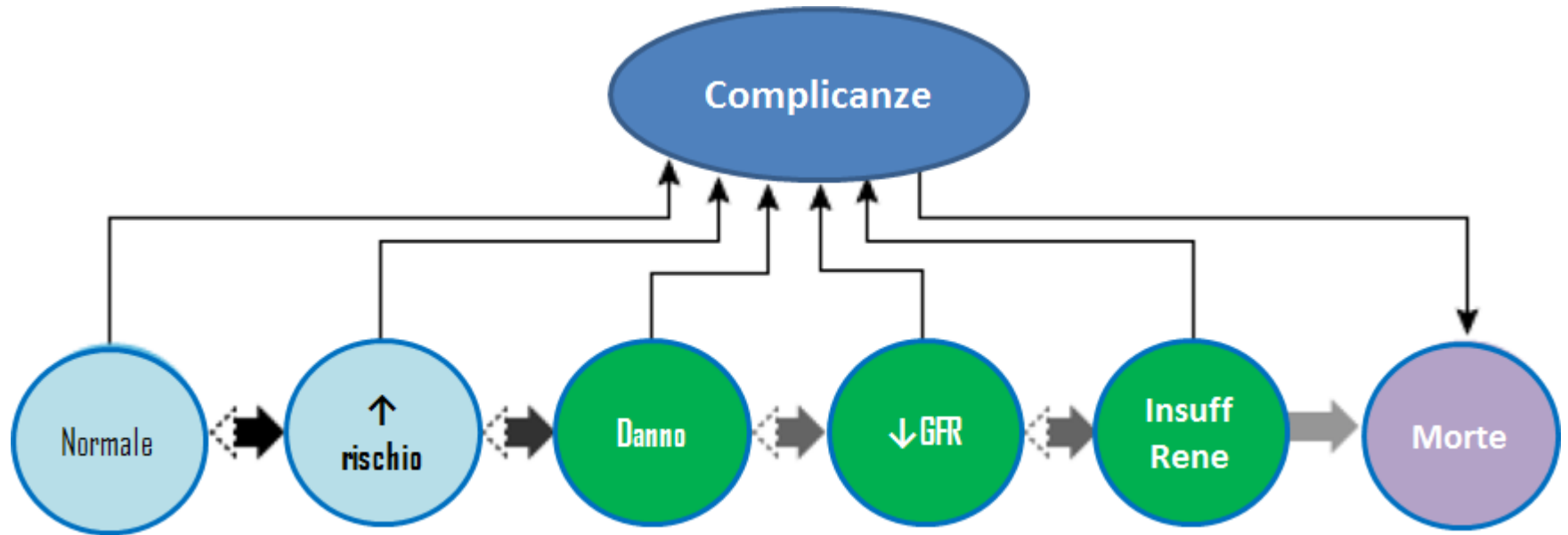
- Oltre alle **complicanze** ormonali e metaboliche ben note, come l'**anemia** e l'**iperparatiroidismo**, le altre complicanze includono l'aumentato **rischio di tossicità da farmaci**, **malattia cardiovascolare**, **infezioni**, **deficit cognitivo** e **ridotta performance fisica**.
- Le complicanze tendono a verificarsi **negli stadi tardivi** e possono portare alla morte prima che la CKD progredisca a insufficienza renale.
- Le complicanze possono anche derivare dagli **effetti avversi degli interventi** usati per prevenire o trattare la malattia.

La Malattia Renale Cronica (CKD) Predice la Malattia Cardiovascolare (CVD)



E' considerato già elevato un rischio di 10% in 10 anni, cioè 1%/anno

MODELLO CONCETTUALE DELLA CKD E LE SUE COMPLICANZE



Cerchi verdi: stadi della CKD; azzurri: potenziali antecedenti della CKD;

viola: conseguenze della CKD;

le frecce spesse tra i cerchi rappresentano lo sviluppo, la progressione e la remissione della CKD.

Le frecce orizzontali da sn a dx enfatizzano la progressione della CKD rispetto alle frecce tratteggiate verso sn che indicano la remissione, che è meno frequente.

"Complicanze" sono la riduzione della GFR, albuminuria e malattia cardiovascolare.

MALATTIA RENALE CRONICA LINEE GUIDA

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012

RACCOMANDAZIONI RELATIVE ALLA DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLA CKD

1.1.1. CKD è definita come anomalie della struttura o funzione renale, presente per 3 mesi, con implicazioni per la salute.

Criteri per la CKD sono riportati nella tabella 1.

Le soglie diagnostiche per

- velocità di filtrazione glomerulare (GFR) < 60 mL/min/1,73 m²
- rapporto Albumina/Creatinina (ACR) ≥ 30 mg/g.

Derivano da studi che hanno esaminato il rischio di mortalità CVD e per tutte le cause, di AKI, di progressione della CKD, di insufficienza renale.

Tabella 1: Criteri per Malattia Renale Cronica - CKD

Marcatori di danno renale (≥ 1 per >3 mesi)

Albuminuria (ACR ≥ 30 mg/g)

Alterato sedimento urinario

Alterazioni elettrolitiche ed altre alterazioni dovute alla tubulopatia

Alterazioni istologiche alla biopsia

Alterazioni strutturali all'imaging

Storia di trapianto renale

Ridotta GFR (per >3 mesi)

GFR < 60 mL/min/1,73m² (GFR nelle categorie G3a-G5)

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012*

1.4.3.5. Si consiglia di misurare la cistatina C negli adulti con eGFR_{creat} [eGFR basata sulla creatinina] di 45-59 ml/min / 1,73 m² e che non hanno altri marcatori di danno renale per potere confermare la CKD. (2C)‡

- ❑ Questo gruppo rappresenta il 3,6% della popolazione negli USA e il 41% delle persone considerate avere CKD sulla base di eGFR_{creat} e ACR da sole.
- ❑ Poiché la diagnosi di CKD in questi individui è in una zona critica, l'uso di un indicatore di conferma è importante. L'utilizzo di eGFR_{cys} fa sì che 2/3 delle persone con eGFR_{creat} <60 mL/min/1,73 m² abbiano diagnosi di CKD confermata da eGFR_{cys} <60 mL/min/1,73 m²

*Stevens PE et al. (KDIGO). *Ann Intern Med.* 2013;158:825-830.

‡ Grado di raccomandazione

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012

1.4.4.2. Consigliamo ai laboratori clinici di riportare il rapporto albumina/creatinina (ACR) o il rapporto proteine/creatinina (PCR) su campioni di urina spot in aggiunta alle sole concentrazioni di albuminuria o proteinuria. (1B)

La misura di ACR è raccomandata per la valutazione della proteinuria di preferenza alle proteine totali urinarie per molte ragioni:

1. L'albumina è la proteina più importante persa nelle urine nella maggior parte dei casi di CKD.
2. ACR predice accuratamente il rischio cardiovascolare e quello renale.
3. La riduzione ACR tramite antipertensivi o il blocco renina-angiotensina dimostra benefici nella progressione della CKD.
4. ACR è più sensibile nel rilevare albuminuria di basso grado clinicamente importante ed è più preciso a concentrazioni basse diagnosticamente importanti.
5. Nel diabete ACR (da 30 a 300 mg/g) è già da decenni in

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012

RACCOMANDAZIONI RELATIVE ALLA DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLA CKD

Si consiglia di classificare la CKD in base alla causa, alla categoria di GFR e alla categoria di albuminuria (CGA). (1B)

Le ragioni:

- ❑ Una **GFR <60 mL/min/1,73 m²** , che è meno della metà del valore normale in giovani adulti maschi e femmine, **si associa a un maggior rischio di complicanze associate alla CKD**. I meccanismi alla base di queste associazioni non sono noti, ma esiste un effetto clinicamente significativo sulla tossicità di farmaci, complicanze endocrino-metaboliche, e rischio CVD.
- ❑ Un **ACR di 30 mg/g** , che è 3 volte superiore al valore normale di giovani adulti maschi e femmine (che è di circa 10

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012

RACCOMANDAZIONI RELATIVE ALLA DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DELLA CKD

La gravità della CKD è espressa dal livello di GFR e di albuminuria (Tabella 2). La gravità è legata ai rischi di esiti avversi, tra cui morte e eventi renali.

- Le **categorie di GFR** sono definite in 5 stadi (G1, G2, G3, G4, G5) con ulteriore suddivisione della categoria G3 (30 -59 mL/min/1,73 m²) in G3a (45 -59) e G3b (30 a 44). **Molte complicazioni sono associate** alle categorie di decremento di GFR, tra cui infezioni e alterata funzione cognitiva e fisica.
- Tre **categorie di albuminuria** servono **per semplificare la valutazione iniziale e la prognosi**. L'ulteriore classificazione in range superiori e nefrosici (ACR >2220 mg/g) è appropriata solo per circostanze specifiche.

Tabella 2: Categorie di GFR e di Albuminuria

Categoria	GFR mL/min/1,73m ²	ACR mg/g	AER mg/24h	Descrizione
GFR				
G1	≥90			Normale o alta
G2	60-89			Lievemente ridotta*†
G3a	45-59			Lievemente -moderatamente ridotta
G3b	30-44			Moderatamente ridotta
G4	15-29			Fortemente ridotta
G5	<15			Insufficienza renale
Albuminuria				
A1		<30	<30	Normale-moderatamente aumentata
A2		30-300	30-300	Moderatamente aumentata*
A3		>300	>300	Fortemente aumentata‡

*relativamente ai livelli del giovane adulto

†senza danno renale evidente G1 e G2 non soddisfano i criteri di CKD

‡ include la sindrome nefrosica (ACR >2200 o AER >2200)

LINEE GUIDA

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) 2012

RACCOMANDAZIONI PER IL MONITORAGGIO DELLA CKD

Le persone con CKD vanno **valutate almeno una volta all'anno**.

- La **frequenza esatta** del monitoraggio di GFR e ACR dipenderà dalla gravità della CKD (*figura*) e il rischio di progressione.
- Piccole fluttuazioni nella velocità di filtrazione glomerulare sono frequenti e non indicano necessariamente progressione.
- La **percentuale minima di variazione significativa di eGFR per definire la progressione è 25%**.
- Non ci sono dati per dare raccomandazioni su come definire la progressione della albuminuria, ma **livelli crescenti di albuminuria suggeriscono progressione** e aumentato

Figura 1: Stadiazione dei pazienti che soddisfano la definizione di CKD con Guida alla frequenza del monitoraggio in base alle categorie di GFR e di

Albuminuria

				Categorie di albuminuria persistente		
				descrizione e range		
				A1	A2	A3
				Normale-lieve aumento	Aumento moderato	Forte aumento
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
Categorie di GFR (mL/min/1.73m ²) descrizione e range	G1	Normale o alto	≥90	1 se CKD	1	2
	G2	Calo lieve	60-89	1 se CKD	1	2
	G3a	Calo lieve-moderato	45-59	1	2	3
	G3b	Calo moderato-forte	30-44	2	3	3
	G4	Forte calo	15-29	3	3	4+
	G5	Insufficienza renale	<15	4+	4+	4+

Griglie di GFR e albuminuria per indicare il rischio di progressione per intensità di colore (verde, giallo, arancione, rosso, rosso intenso). I numeri nelle caselle sono di guida per la frequenza del monitoraggio (1,2,3,4 volte all'anno).



Lezioni di Patologia Clinica

AA 2015-2016

Prof. Renzo Schiavon



IPONATREMIA

IPONATREMIA

La definizione può variare tra i diversi laboratori, ma generalmente è data da una **concentrazione serica di sodio ≤ 135 mEq/L**

E' dovuta a ritenzione di acqua per incapacità di fare corrispondere la sua escrezione alla sua ingestione.

Il calo di sodio nel plasma/siero è da diluizione e quindi si associa ad **un calo proporzionale della osmolalità plasmatica < 275 mOsm/Kg_{H₂O}** , tranne alcune eccezioni.

fattori determinanti la natremia

I fluidi extracellulari e intracellulari sono in equilibrio osmotico, perché l'acqua si muove liberamente attraverso le membrane cellulari.

Quindi

La tonicità plasmatica (o osmolalità plasmatica effettiva) *che è data dall'attività osmotica dei soluti che non attraversano liberamente le membrane cellulari*

è uguale all'osmolalità intracellulare effettiva e alla osmolalità effettiva dell'acqua totale corporea (TBW-Total Body Water)

Cioè

$$\text{TONICITÀ PLASMATICA} = \frac{(\text{SOLUTI EXTRACELLULARI} + \text{SOLUTI INTRACELLULARI})}{\text{TBW}}$$

fattori determinanti la natremia

SODIO- Il sodio scambiabile (N_{ae}) con i suoi anioni di accompagnamento ($2 \times N_{ae}$) sono i principali soluti effettivi extracellulari.

POTASSIO- Il potassio scambiabile (K_e) e i suoi anioni di accompagnamento ($2 \times K_e$) sono i principali soluti intracellulari
questi soluti sono i principali determinanti della osmolalità plasmatica effettiva.

$$\text{TONICITÀ PLASMATICA} = \frac{(\text{SOLUTI EXTRACELLULARI} + \text{SOLUTI INTRACELLULARI})}{\text{TBW}}$$

$$\text{TONICITÀ PLASMATICA EFFETTIVA} = \frac{(2 \times N_{ae} + 2 \times K_e)}{\text{TBW}}$$

$$2 \times P\text{-Na} = \frac{(2 \times N_{ae} + 2 \times K_e)}{\text{TBW}}$$

$$P\text{-Na} = \frac{(N_{ae} + K_e)}{\text{TBW}}$$

fattori determinanti la natremia

L'effetto del potassio sul P-Na

- Nei pz con iponatemia da diuretici tiazidici la concentrazione di Na + K nelle urine supera quella del plasma → si abbassa la P-Na indipendentemente dalla introduzione di liquidi.

$$P\text{-Na} = \frac{(N_{ae} + K_e)}{TBW}$$

- Nei pz con grave iponatremia e grave ipokalemia* (terapia diuretica o vomito) il trattamento con potassio in aggiunta al sodio (soluzione fisiologica) porta ad una correzione molto rapida dell'iponatremia con possibile danno cerebrale (sindrome da demielinizzazione)

*ipokalemia=ipopotassemia

fattori determinanti la natremia

FRAZIONE NON SCAMBIABILE – Il 30% del sodio corporeo e una minore frazione del potassio corporeo sono legati all'osso e quindi non scambiabili e osmoticamente non attivi.

GLUCOSIO- Il glucosio è il principale soluto extracellulare ma normalmente è presente in concentrazioni molto più basse del sodio (*90 mg/dL, cioè 5mmol/L verso 140 mmol/L*).

UREA – L'urea è una **osmole inefficace** perché attraversa liberamente le membrane cellulari. Quando la sua concentrazione plasmatica varia, il soluto si sposta rapidamente dentro o fuori la cellula per equilibrare le concentrazioni, senza movimento d'acqua, diversamente da quanto accade per il S-Na.

regolazione dell'acqua

ADIURETINA (ADH)

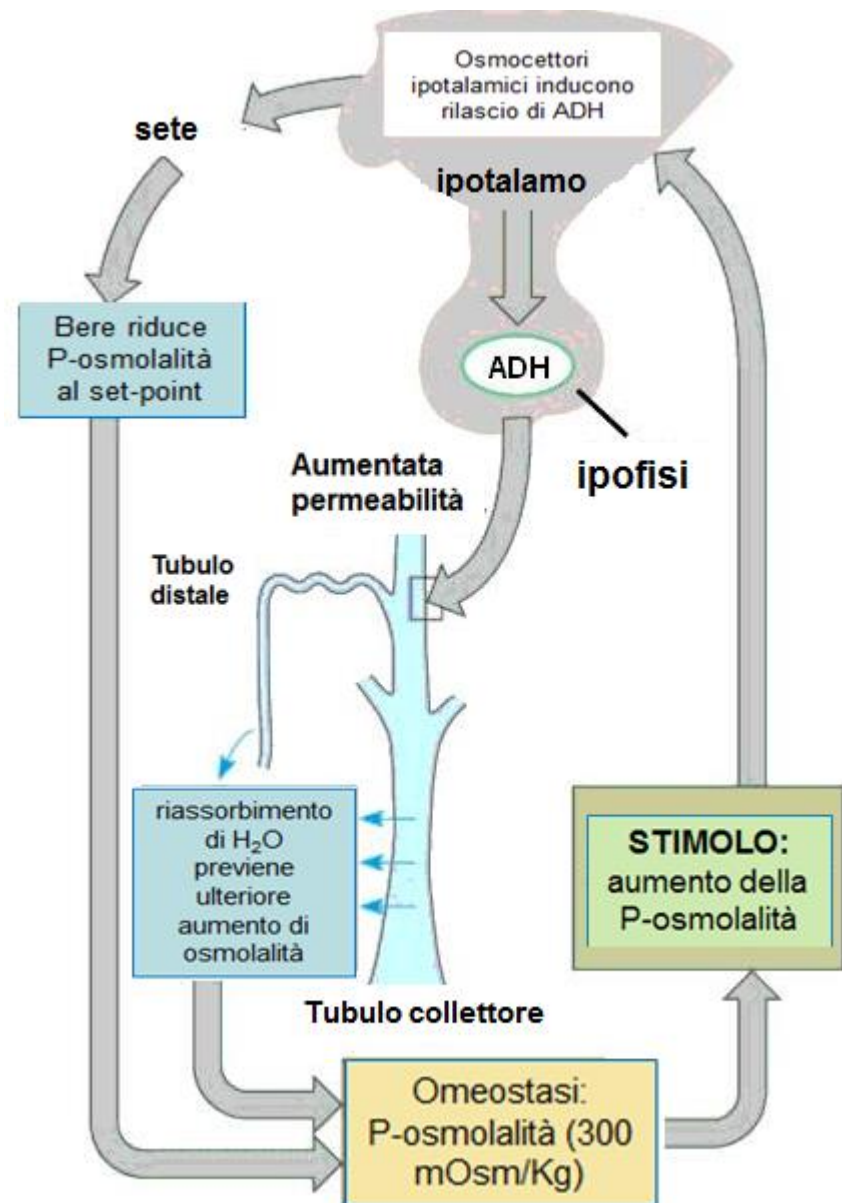
È l'ormone chiave nella regolazione dell'acqua nel nostro organismo

Meccanismo di azione

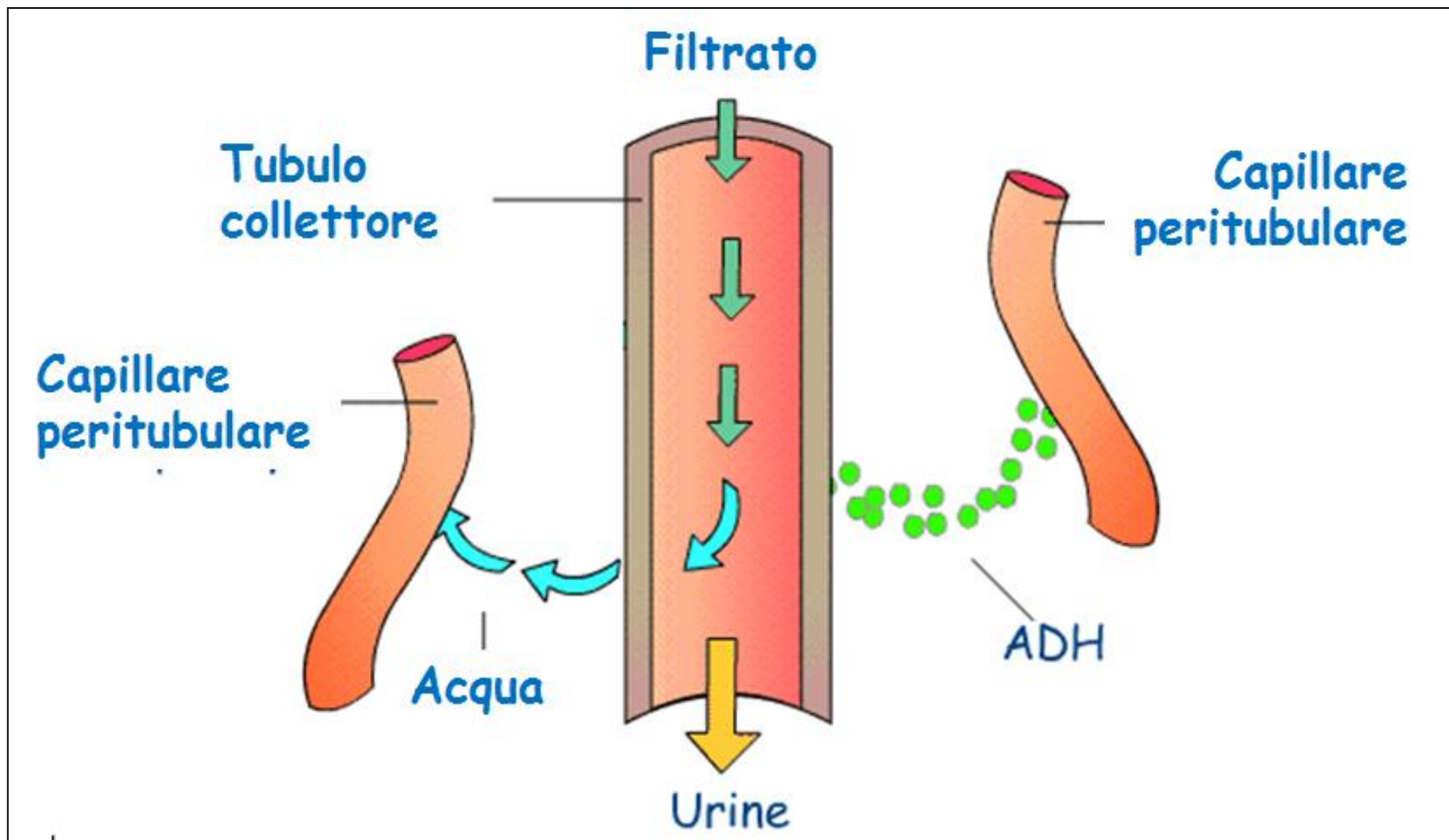
Aumenta la permeabilità all'acqua dei tubuli collettori del rene, favorendone il riassorbimento in circolo e riducendone l'escrezione nell'urina, che così diviene concentrata.

meccanismo di azione della adiuretina (ADH)

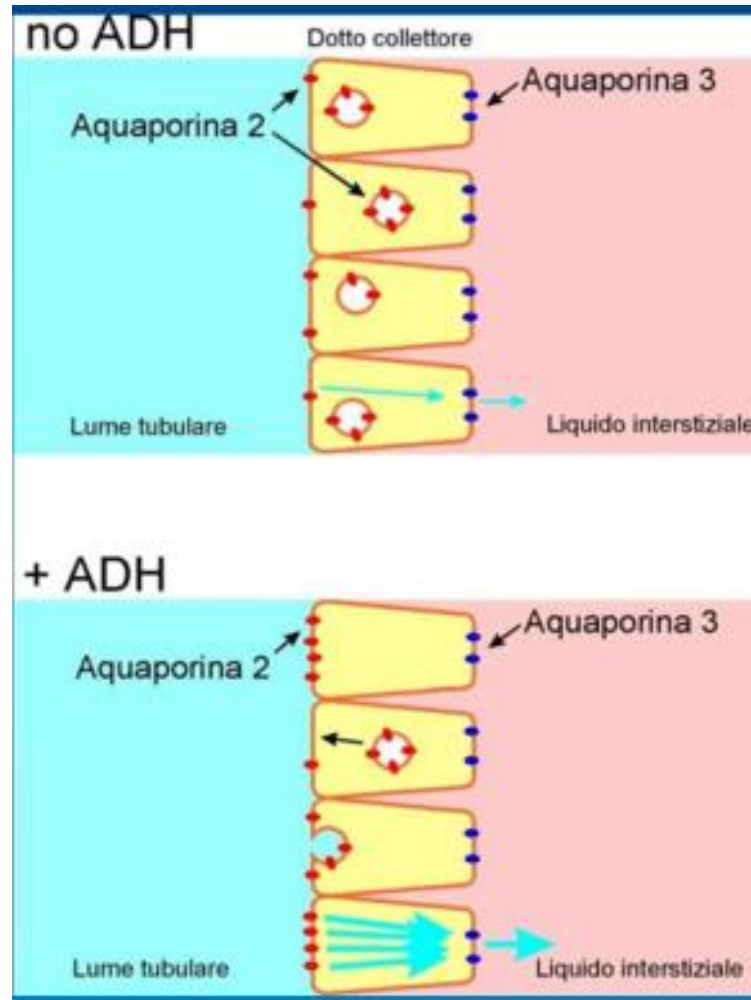
ADH rilasciato dall'ipofisi viaggia nel sangue e giunge ai capillari peritubulari del nefrone. ADH si lega ai recettori sui tubuli distali e collettori dei nefroni dove fa aprire i canali d'acqua delle pareti del tubulo. Ciò consente all'acqua di diffondere attraverso le pareti del tubulo nel fluido interstiziale dove viene raccolta dai capillari peritubulari. In caso di disidratazione viene riassorbita la maggior parte dell'acqua del filtrato, ma si noti che anche in caso di estrema mancanza di acqua, i reni continuano a produrre circa 500 ml di urina ogni giorno per poter svolgere la loro funzione escretoria.



meccanismo di azione della adiuretina (ADH)

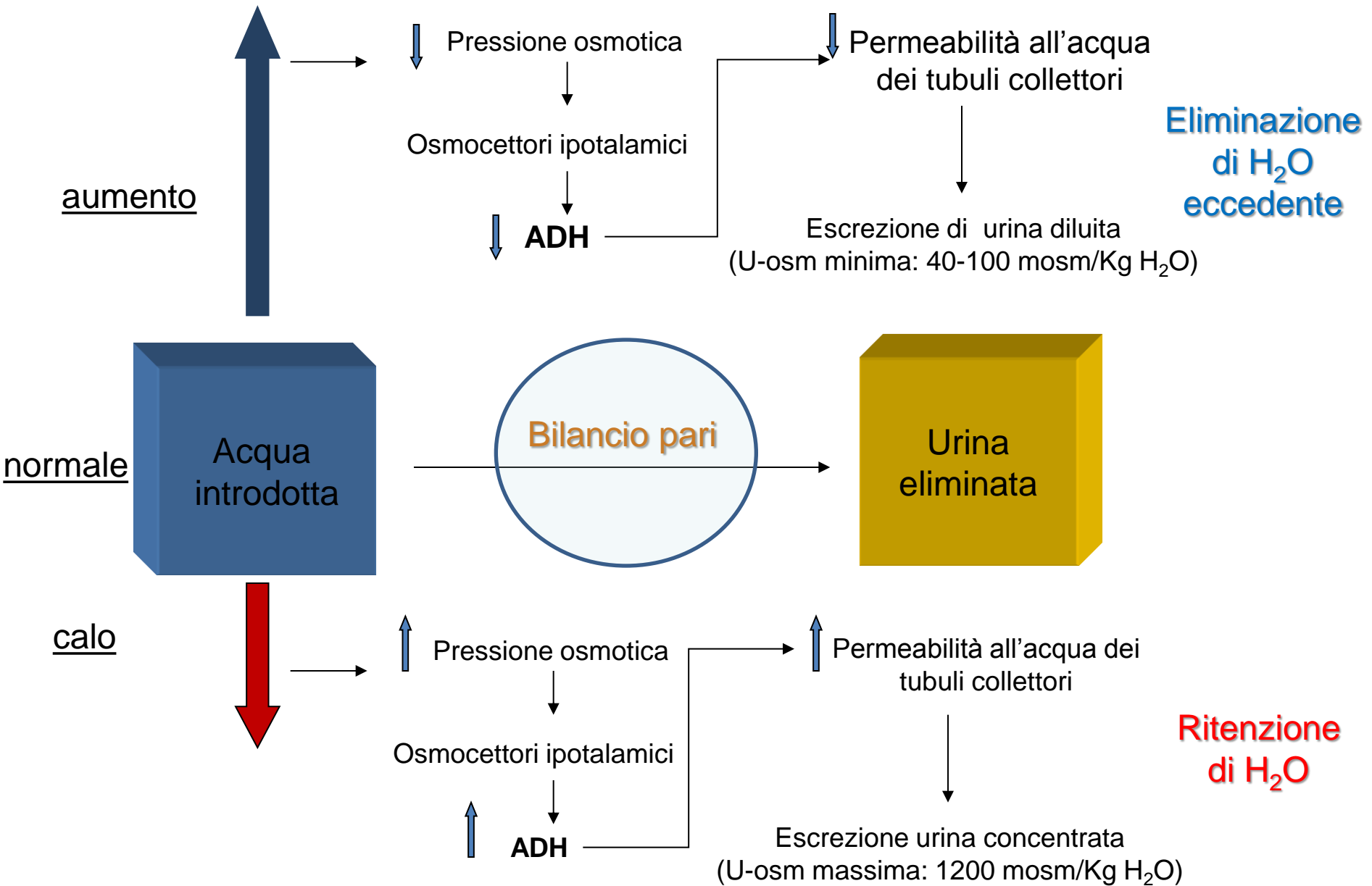


meccanismo di azione della adiuretina (ADH)



L'attivazione dei recettori per l'ADH induce l'inserzione di aquaporine nella membrana citoplasmatica delle cellule del dotto collettore, che forma canali permeabili all'acqua.

RUOLO FISIOLÓGICO DELL'ORMONE ANTIDIURETICO (ADH)



regolazione dell'acqua

SENSORI DELL'ACQUA E DELLA VOLEMIA

1. OSMOCETTORI IPOTALAMICI

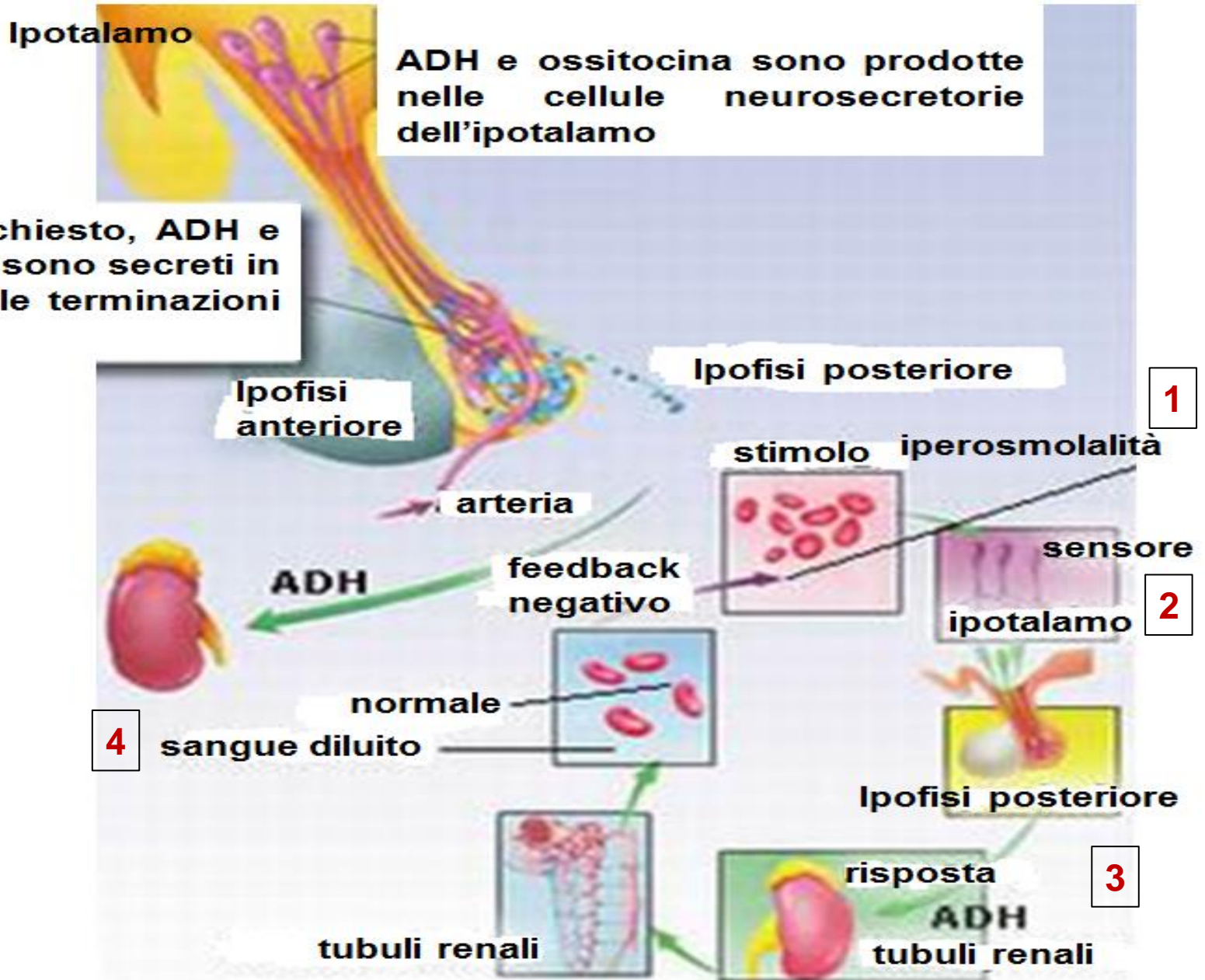
2. BAROCETTORI CAROTIDEI

OSMOCETTORI IPOTALAMICI

Sono i sensori della pressione osmotica nel plasma, cioè del rapporto tra acqua e soluti.

Quando la pressione osmotica **sale troppo**, o quando **scende troppo**, **essi intervengono facendo secernere ADH o inibendo la secrezione di ADH, rispettivamente, al fine di riportare la pressione osmotica ai valori normali.**

meccanismo d'azione degli osmocettori ipotalamici

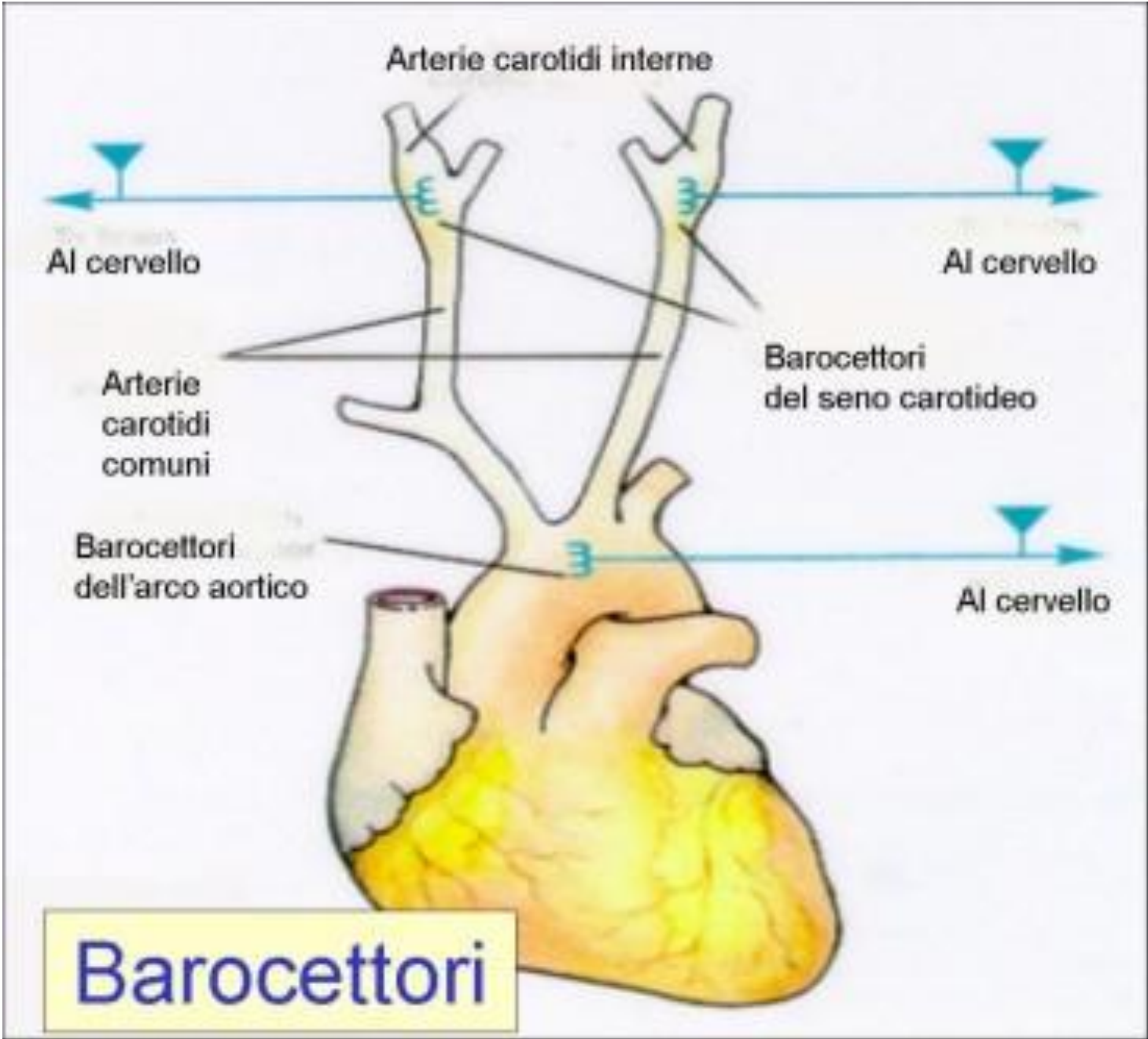


BAROCETTORI CAROTIDEI

Sono i sensori della pressione arteriosa che a sua volta dipende dal volume di sangue e quindi di fluido (volemia) e dalla forza di contrazione del cuore (gittata cardiaca).

Quando la pressione arteriosa **scende troppo**, o quando **sale troppo**, essi intervengono mandando un messaggio al cervello che attiva una serie di **reazioni atte a normalizzare** il valore della pressione arteriosa (rispettivamente secrezione o inibizione di ADH e norepinefrina).

I barocettori sono situati alla partenza del flusso di sangue dal ventricolo sinistro, e cioè nell'arco aortico e nei seni carotidei.



Cause di IPONATREMIA

IPONATREMIA

E' dovuta a ritenzione di acqua per incapacità di fare corrispondere la sua escrezione alla sua ingestione.

Cause di IPONATREMIA

1

Malattie in cui
ADH è elevato

- Effettiva riduzione del volume circolante
(scompenso cardiaco cronico, cirrosi epatica, diuretici)
- SIADH (sindrome da inappropriata secrezione di ADH)
- Alterazioni ormonali
(ipotiroidismo, insufficienza surrenalica)

2

Malattie in cui
ADH può
essere
adeguatamente
soppresso

- Insufficienza renale avanzata
- Polidipsia primaria
(incluso ecstasy)
- Basso introito di soluti
(malnutrizione, potomania
dei bevitori di birra)

3

Iponatremia
con osmolalità
plasmatica
normale o
elevata

- Iperglicemia, mannitolo
- Fluidi isosmotici non contenenti sodio
(fluidi di lavaggio)
- Psuedoiponatremia (iperlipidemia, iperprotidemia)
- Insufficienza renale (iperazotemia)

1

IPONATREMIA

Malattie in cui ADH è
elevato

A

**Effettiva riduzione del volume circolante
(scompenso cardiaco cronico, cirrosi epatica,
diuretici)**

SIADH (sindrome da inappropriata secrezione
di ADH)

Alterazioni ormonali
(ipotiroidismo, insufficienza surrenalica)

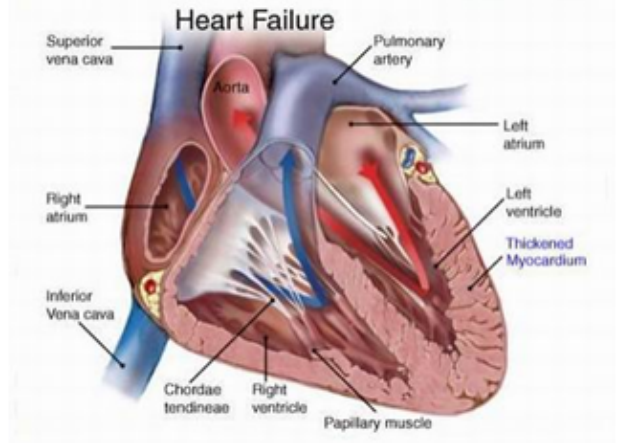
A. Effettiva riduzione del volume circolante

↓ **perfusione tissutale** → barocettori carotidei (↓ pressione o stiramento) inducono stimolo per il rilascio di ADH che supera l'effetto inibitorio degli osmocettori sulla secrezione di ADH per la iponatriemia → **↑ rilascio ADH**

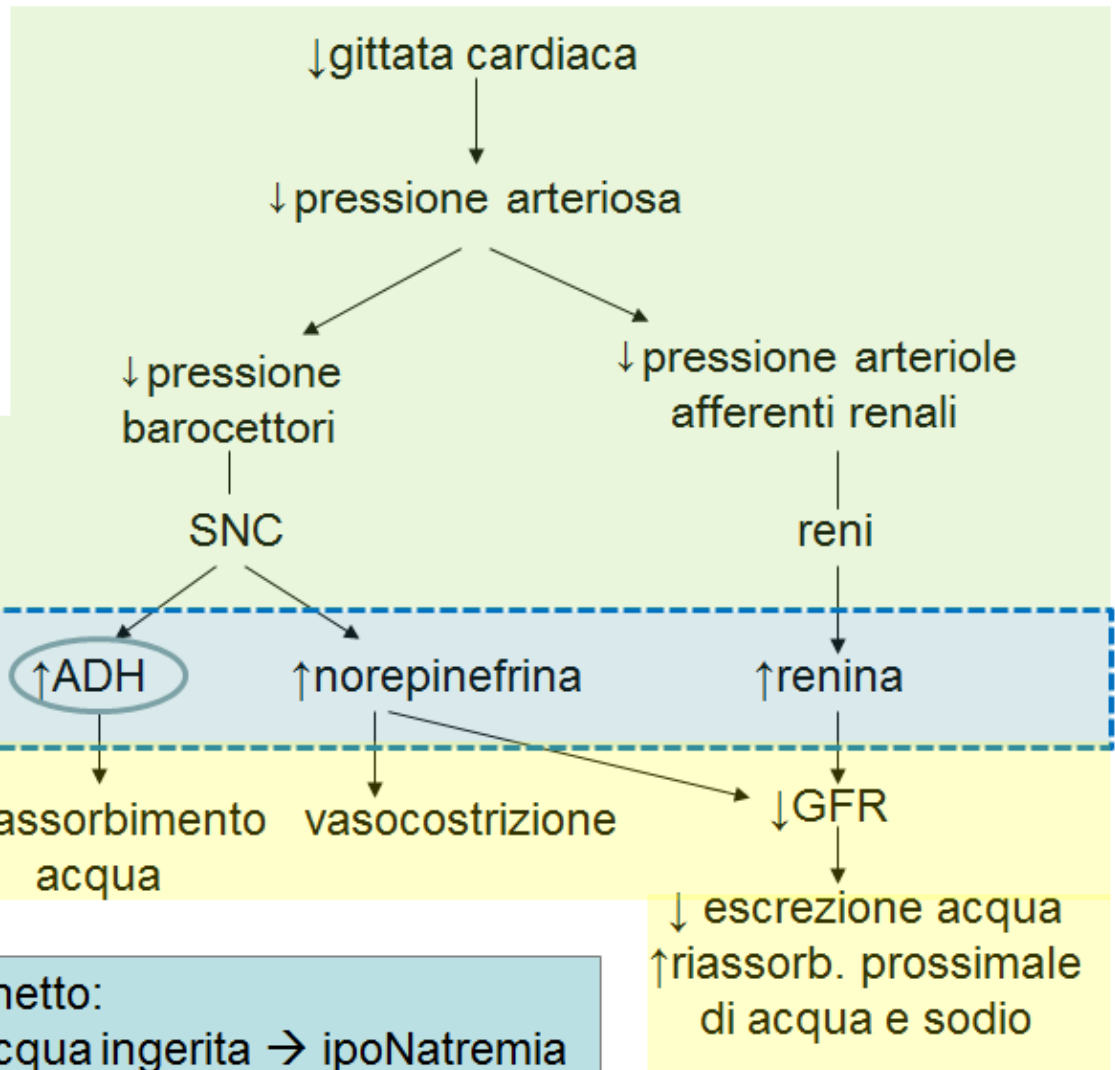
Scompenso cardiaco e cirrosi: la volemia può essere ↑↑, ma la pressione avvertita dai barocettori è ↓ per ↓ gittata cardiaca (scompenso cardiaco) o per vasodilatazione periferica (cirrosi) → ↑rilascio ADH → iponatriemia (segno prognostico).

Iповolemia reale: perdita gastrointestinale, urinaria o da emorragia → barocettori carotidei (↓ pressione o stiramento) → ↑rilascio ADH, che, in condizioni di normale assunzione di acqua, → iponatriemia (anche ipokalemia per perdita di K, oltre ad iperazotemia per ↓perfusione renale).

IPONATREMIA – SCOMPENSO CARDIACO (HF)



deplezione volume effettivo
(anche se \uparrow plasma e volume
extra-cellulare, edemi)



Ormoni "ipovolemici"

↑ ADH

↑ norepinefrina

↑ renina

Tentativo di ripristino della
pressione di perfusione

↑ riassorbimento
acqua

vasocostrizione

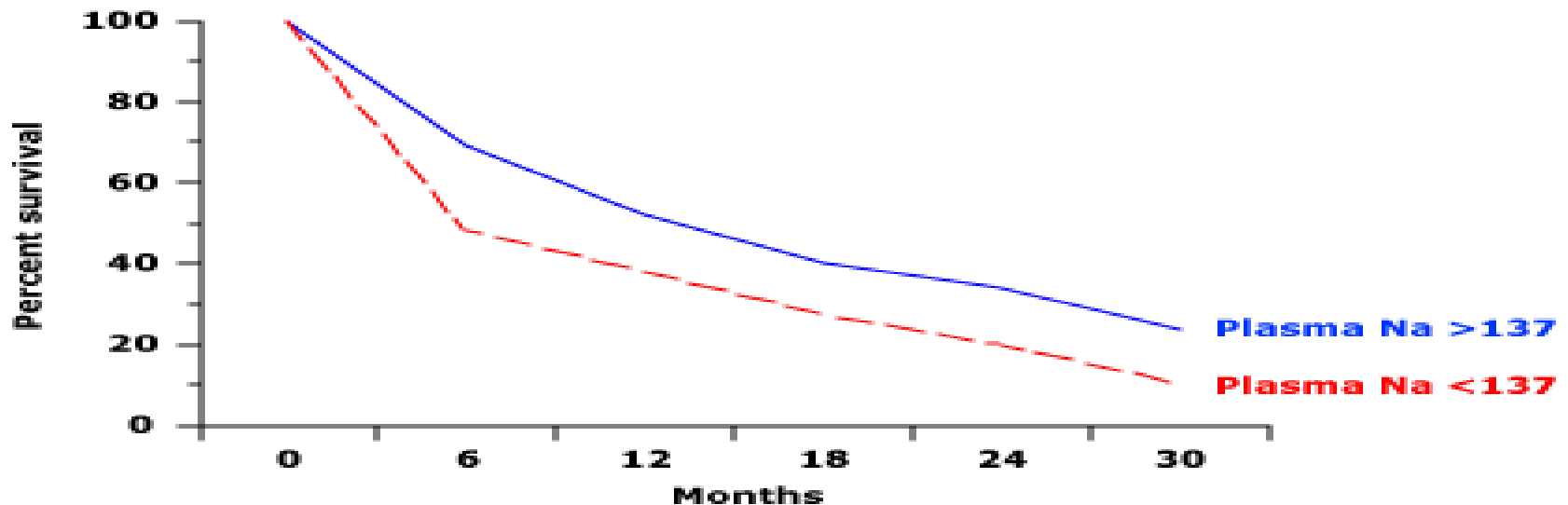
↓ GFR

↓ escrezione acqua
↑ riassorb. prossimale
di acqua e sodio

Effetto netto:
incapacità di escrezione dell'acqua ingerita → iponatriemia

IPONATREMIA – SCOMPENSO CARDIACO CRONICO (CHF)

Iponatremia si associa a ridotta sopravvivenza in CHF

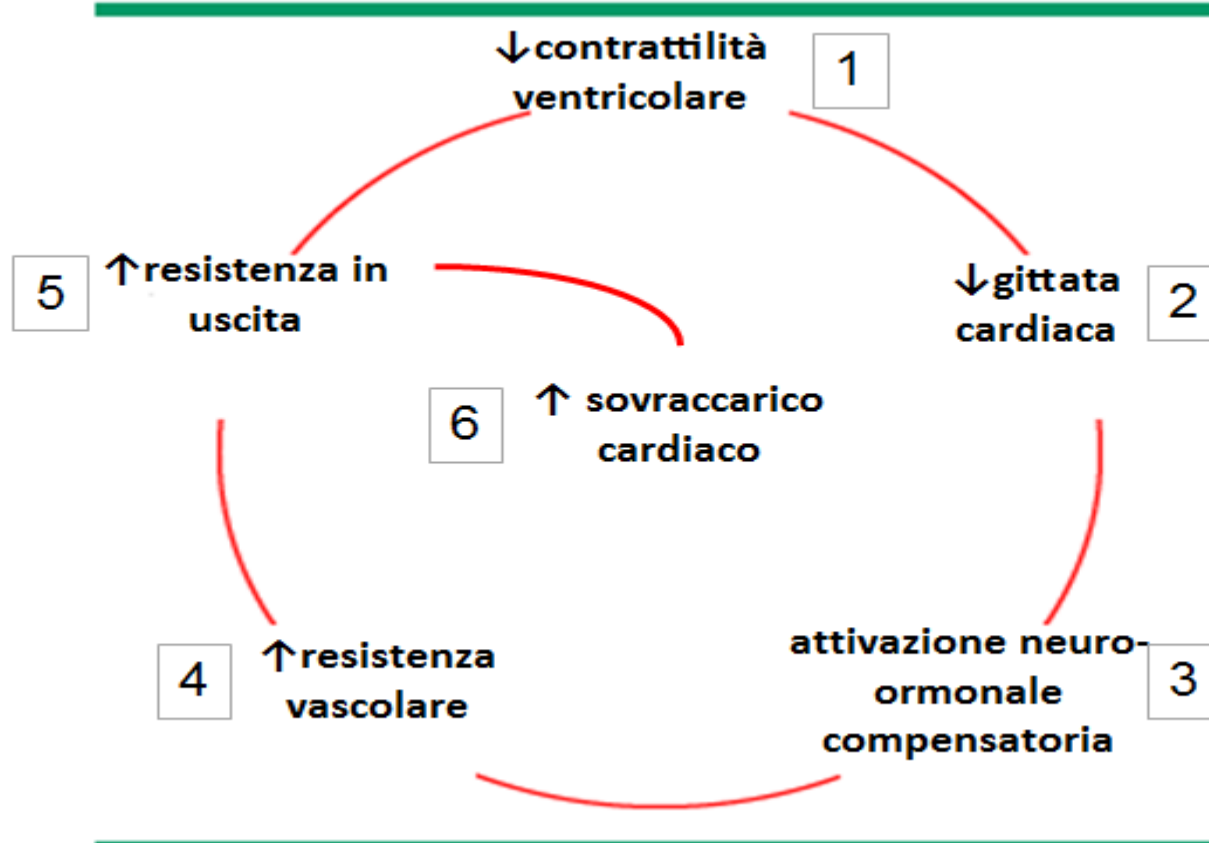


Sopravvivenza dei pazienti con grave scompenso cardiaco cronico (CHF) e **normonatremia (linea intera)** o **iponatremia (linea tratteggiata)**: cutoff 137 mEq/L. Sopravvivenza significativamente ridotta nei pazienti con iponatremia. *Lee, WH, Packer, M, Circulation 1986; 73:257.*

Pazienti con S-sodio <125 mEq/L sono in stadio finale e spesso è presente iperKalemia, per deficit di escrezione.

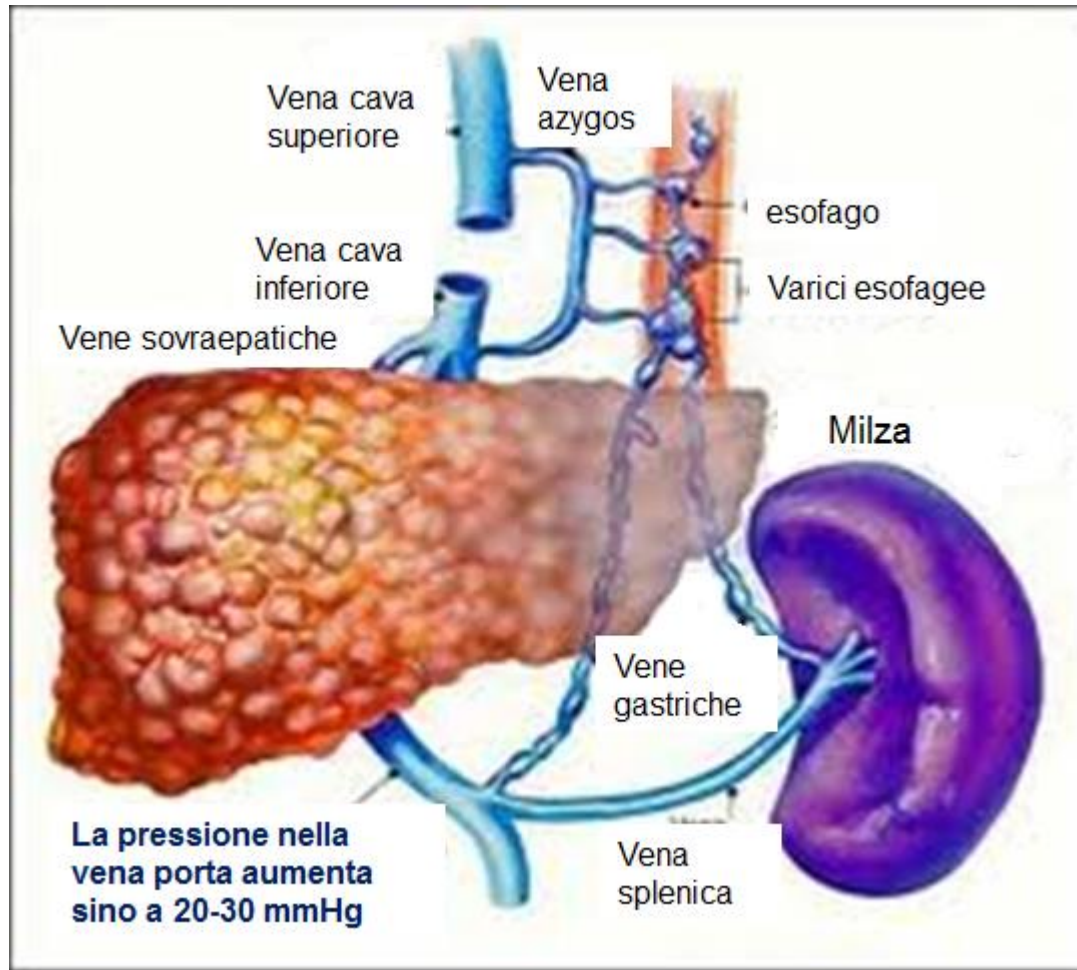
IPONATREMIA – SCOMPENSO CARDIACO (HF)

Attivazione neuro-ormonale in CHF

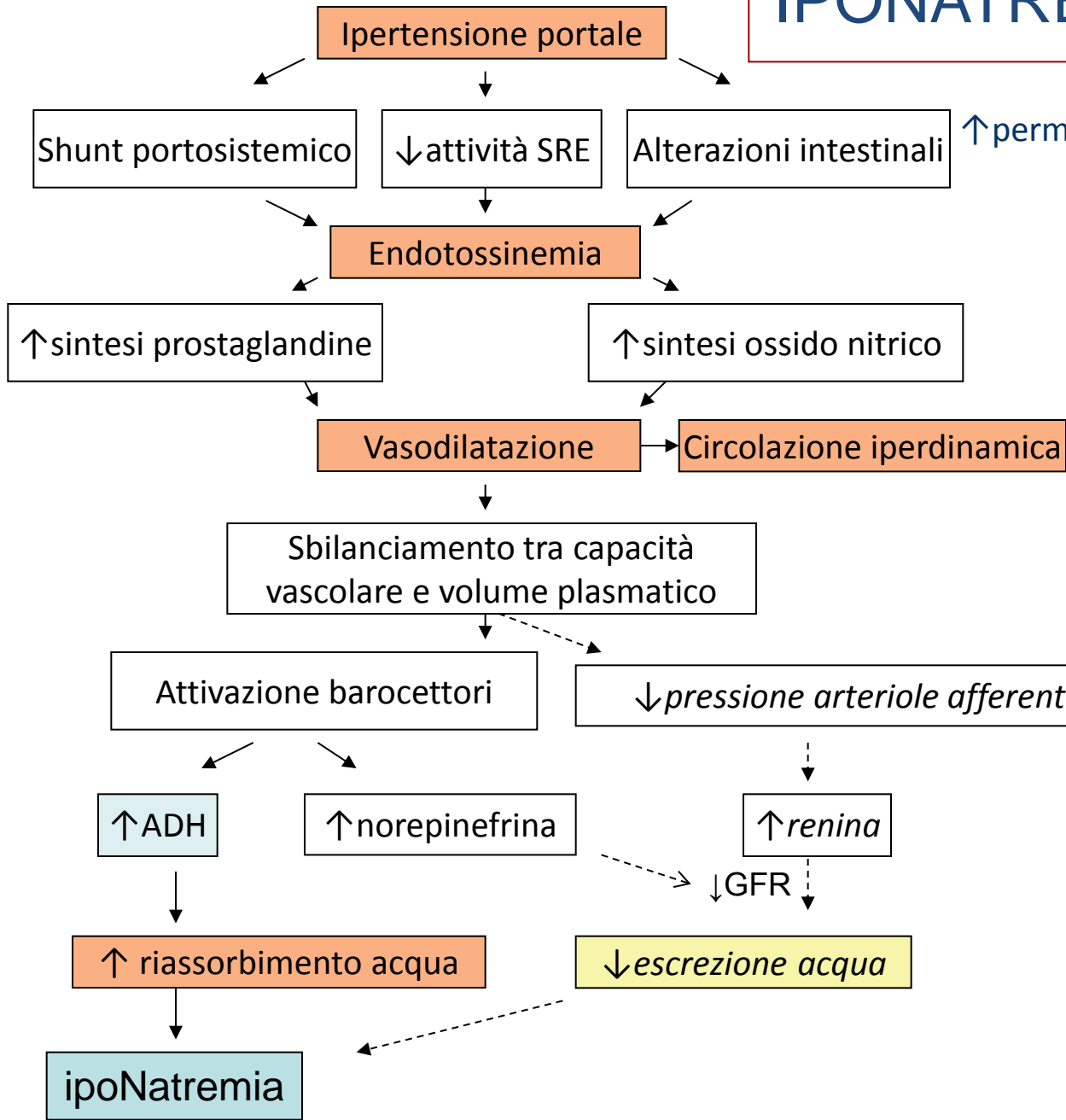


Il meccanismo adattativo per mantenere la pressione arteriosa e la perfusione tissutale, porta a sovraccarico e accelera il deterioramento miocardico e la performance ventricolare innescando un circolo vizioso con aumento di norepinefrina, angiotensina II e ADH, che tutte e tre aumentano il sovraccarico.

CIRROSI EPATICA ED IPERTENSIONE PORTALE

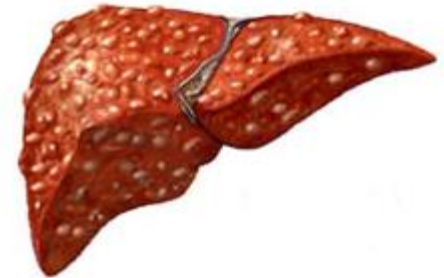


IPONATREMIA – CIRROSI



↑permeabilità → traslocazione batterica
↑crescita batterica

↓resistenze vascolari sistemiche
↓pressione arteriosa
↑gittata cardiaca

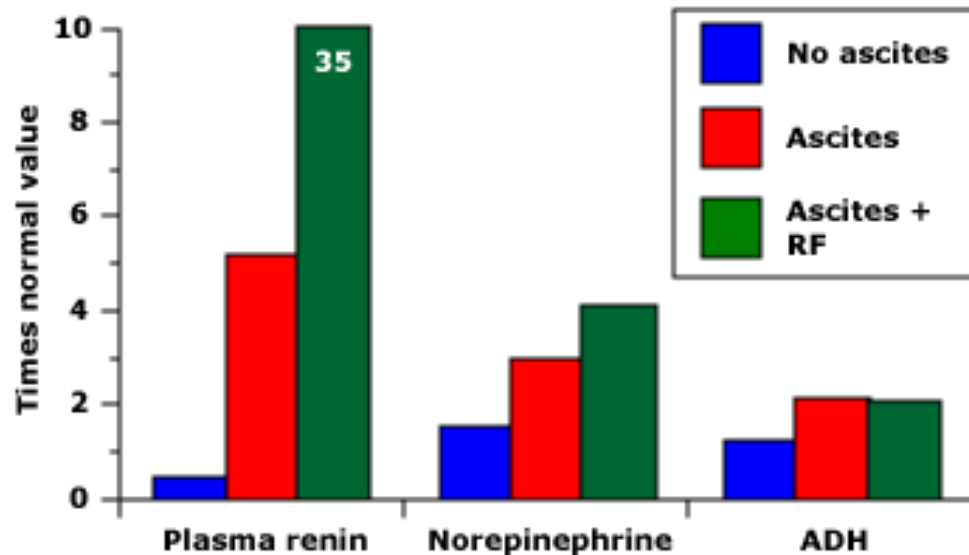


Malattie in cui ADH è elevato

IPONATREMIA – CIRROSI

Malattie in cui ADH è elevato

Risposta ormonale alla cirrosi



Cirrosi di gravità progressiva - no ascite, ascite, e ascite più insufficienza renale (RF) da sindrome epatorenale – si associa ad incremento progressivo di renina, norepinefrina e ADH nel plasma. Questo incremento progressivo degli ormoni ipovolemici si correla con il calo della pressione arteriosa media associato alla vasodilatazione (da 89 a 75 mmHg) e con il calo della concentrazione plasmatica di sodio (da 138 a 128 meq/L).

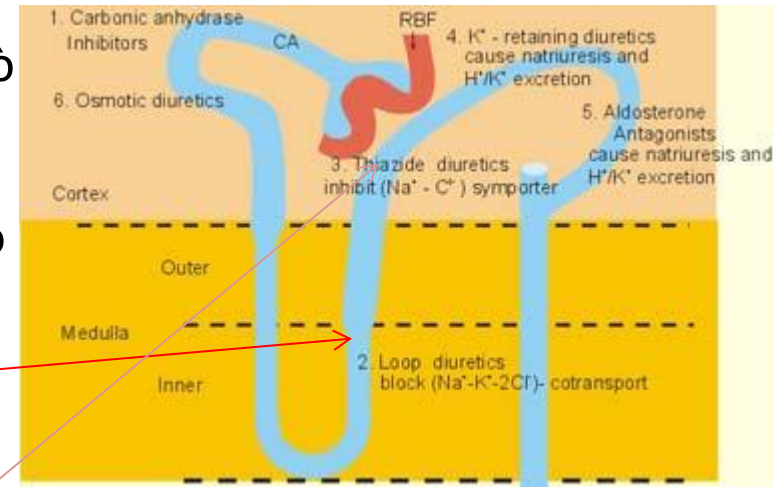
Data from Asbert, M, Gines, A, Gines, P, et al. Gastroenterology 1993; 104:1485.

A. Effettiva riduzione del volume circolante

4. Diuretici tiazidici (non diuretici dell'ansa):
iponatremia acuta, spesso grave.

Iponatremia indotta da diuretici

- Il riassorbimento renale del sodio avviene nella branca ascendente dell'ansa di Henle; ciò genera il gradiente osmotico nell'interstizio midollare: in presenza di ADH l'acqua è riassorbita dal tubulo collettore nell'interstizio midollare.
- I **diuretici dell'ansa** inibiscono questo riassorbimento del Na e, quindi, inficiano l'azione dell'ADH
- I **diuretici tiazidici** agiscono invece sul tubulo distale nella corticale renale, dove aumentano l'escrezione di sodio e potassio e mantengono il riassorbimento dell'acqua da ADH.
 - **In alcuni casi, dopo 1-2 settimane di terapia si sviluppa ipoNatremia.**



1

IPONATREMIA

Malattie in cui ADH è
elevato

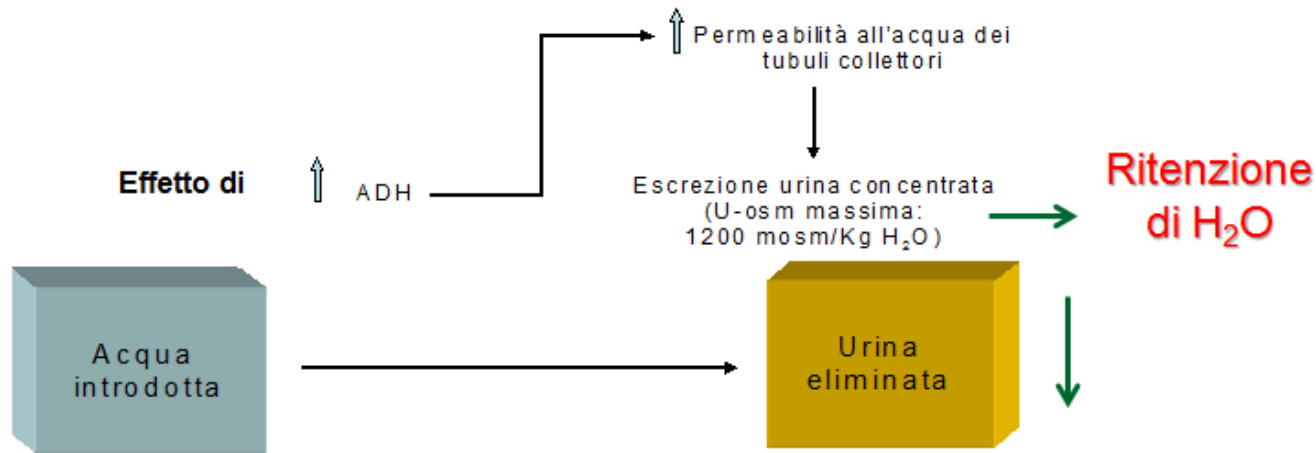
B

Effettiva riduzione del volume circolante
(scompenso cardiaco cronico, cirrosi epatica,
diuretici)

**SIADH (sindrome da inappropriata
secrezione di ADH)**

Alterazioni ormonali
(ipotiroidismo, insufficienza surrenalica)

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)



SIADH

ADH fisso

U-osmolalità non riducibile sotto ~750 mosm/Kg H₂O

L'escrezione di acqua dipende dai soluti

Usuale escrezione di soluti (Na, K, urea) ~750 mosm

Diuresi ~ 1 L

(H₂O persa ~ 1 L)
Il resto è ritenuta

Per aumentare la escrezione di acqua e ridurre lo stato di iponatremia

Dieta ricca di proteine e di sale

Soluti sino a 1200 mosm

Diuresi ~ 1.6 L

(H₂O persa ~ 1.6 L)

Ritenzione di acqua *eccedente quella necessaria ad eliminare i soluti*

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

Va sospettata nei pz con:

- **iponatremia,**
- **iposomolalità plasmatica,**
- **osmolalità urinaria >100 mosmol/kg (cioè non bassa),**
 - **sodio urinario* generalmente > 40 mEq/L,**
 - **bilancio acido-base e potassico normali‡,**
- **spesso, bassa concentrazione plasmatica di acido urico e urea (o BUN).**

* U-Na distingue tra iponatremia da deplezione effettiva del volume circolante (scompenso cardiaco, cirrosi e ipovolemia vera) e iponatremia da SIADH: <25 mmol/L nell'ipovolemia e >40 mmol/L nella SIADH.

‡ questa condizione esclude iponatremia da: diuretici, vomito, diarrea, lassativi o insufficienza surrenalica.

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

RESET DELL'OSMOSTAT — E' una forma particolare, che comprende 1/3 dei casi di SIADH, in cui, sebbene la secrezione di ADH rimanga inappropriatamente aumentata, si verifica un reset verso il basso dell'osmostat (centri regolatori dell'osmolalità) : **la concentrazione di sodio nel plasma è regolata normalmente (quindi stabile) ma ad un livello più basso, tipicamente 125-135 meq/L .**

E' importante stabilire la presenza di questa condizione perché qui la correzione dell'iponatremia è dannosa (alzare la sodiemia e l'osmolalità stimolerebbe il rilascio di ADH e la sete, peggiorando l'iponatremia).

Quindi:

- iponatremia stabile (125-135 mEq/L)
- normale risposta a restrizione o aumento di acqua
- non rischio di iponatremia progressiva
 - non necessita di trattamento

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

Cause di SIADH:

1. Malattie del SNC
 2. Tumori
 3. Farmaci
4. Interventi chirurgici
5. Malattie polmonari
6. Somministrazione di vasopressina, desmopressina, ossitocina
 7. Infezione da HIV
 8. SIADH ereditaria
 9. SIADH idiopatica

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

malattia

Malattie del SNC

stroke
emorragia
infezione
trauma
psicosi

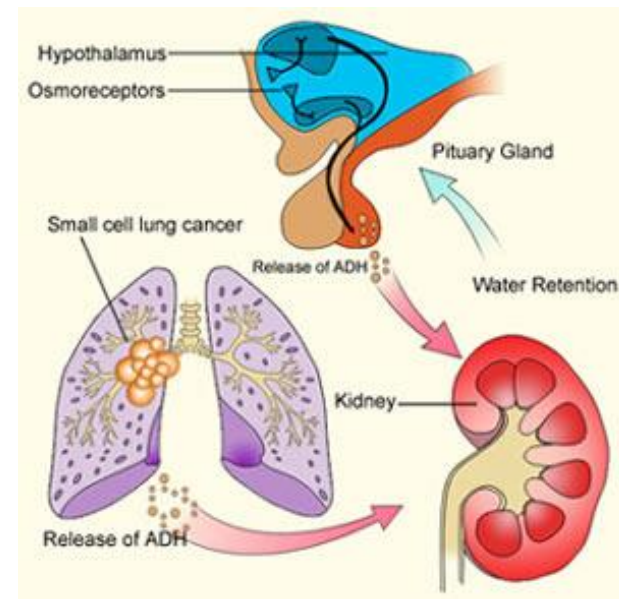
meccanismo

possono aumentare il rilascio di ADH.

Tumori

carcinoma polmonare a piccole cellule,
altri tumori polmonari e, meno spesso ,
tumori del duodeno-pancreas,
tumori testa-collo,
neuroblastoma olfattivo

produzione ectopica di ADH



SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

malattia

Farmaci

Carbamazepina, Valproato
Bromocriptina
Ciclofosfamide
Vincristina, Vinblastina, Cisplatino, Metotrexate
Inibitori del rilascio di serotonina (fluoxetina, sertralina)
Oppiacei
FANS
Interferone alfa e gamma
Lorcanide
Amiodarone
Ciprofloxacina
Imatinib ad alte dosi
Ecstasy (metilenediossimetamfetamina), che si associa anche ad eccessiva assunzione di liquidi
Vasopressina (somministrazione esogena di ADH i.v. per controllare l'emorragia gastrointestinale)

meccanismo

aumentano il rilascio o l'effetto dell' ADH

Grossa chirurgia

Addominale
Toracica

ipersecrezione di ADH, mediata dalle vie afferenti del dolore

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

malattia

Pneumopatie

Polmoniti:
-Virali
-Batteriche
-Tubercolari

**Somministrazione
ormonale**

Vasopressina
(per controllare emorragie GI).
Desmopressina
(m. von Willebrand, emofilia o
disfunzione piastrinica, diabete
insipido centrale, nocturia)
Ossitocina
(per indurre il parto)

Infezione da HIV

la SIADH è associata a:
polmoniti da *Pneumocystis carinii* o altri agenti,
infezioni del SNC e tumori maligni.
Alla base dell'iponatremia sono anche in gioco
deplezione di volume (perdite GI) ed
insufficienza surrenalica.

meccanismo

meccanismo non chiaro

agiscono per
aumento di attività
del recettore
vasopressinico
(antidiuretico)V2
nel rene

SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH (SIADH)

malattia

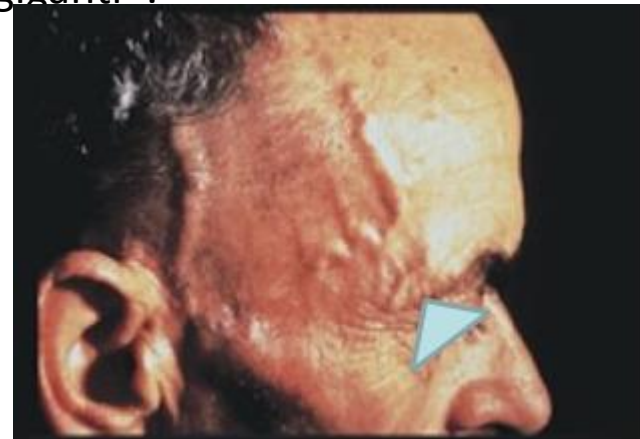
SIADH ereditaria

Due alterazioni:

- 1- del gene per il recettore renale della vasopressina-2 (V2) (sindrome nefrogena da antidiuresi inappropriata, con attivazione persistente del recettore);
- 2- del sensore osmolale dell'ipotalamo (una forma di reset dell'osmostat).

Idiopatica

La causa più verosimile è un tumore occulto o, negli anziani, arterite temporale a cellule giganti*.



*

1

IPONATREMIA

Malattie in cui ADH è
elevato

C

Effettiva riduzione del volume circolante
(scompenso cardiaco cronico, cirrosi epatica,
diuretici)

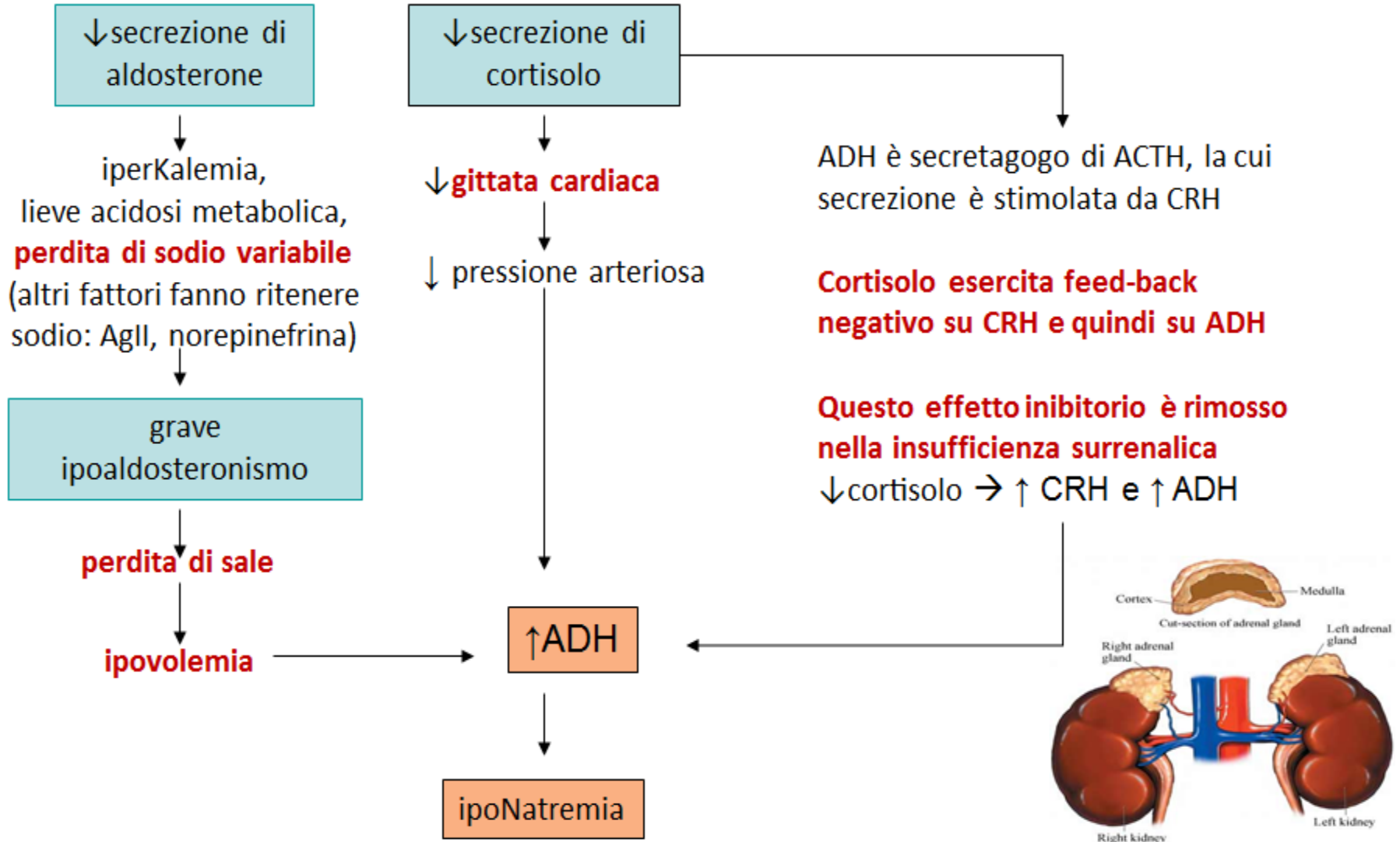
SIADH (sindrome da inappropriata secrezione
di ADH)

**Alterazioni ormonali
(ipotiroidismo, insufficienza surrenalica)**

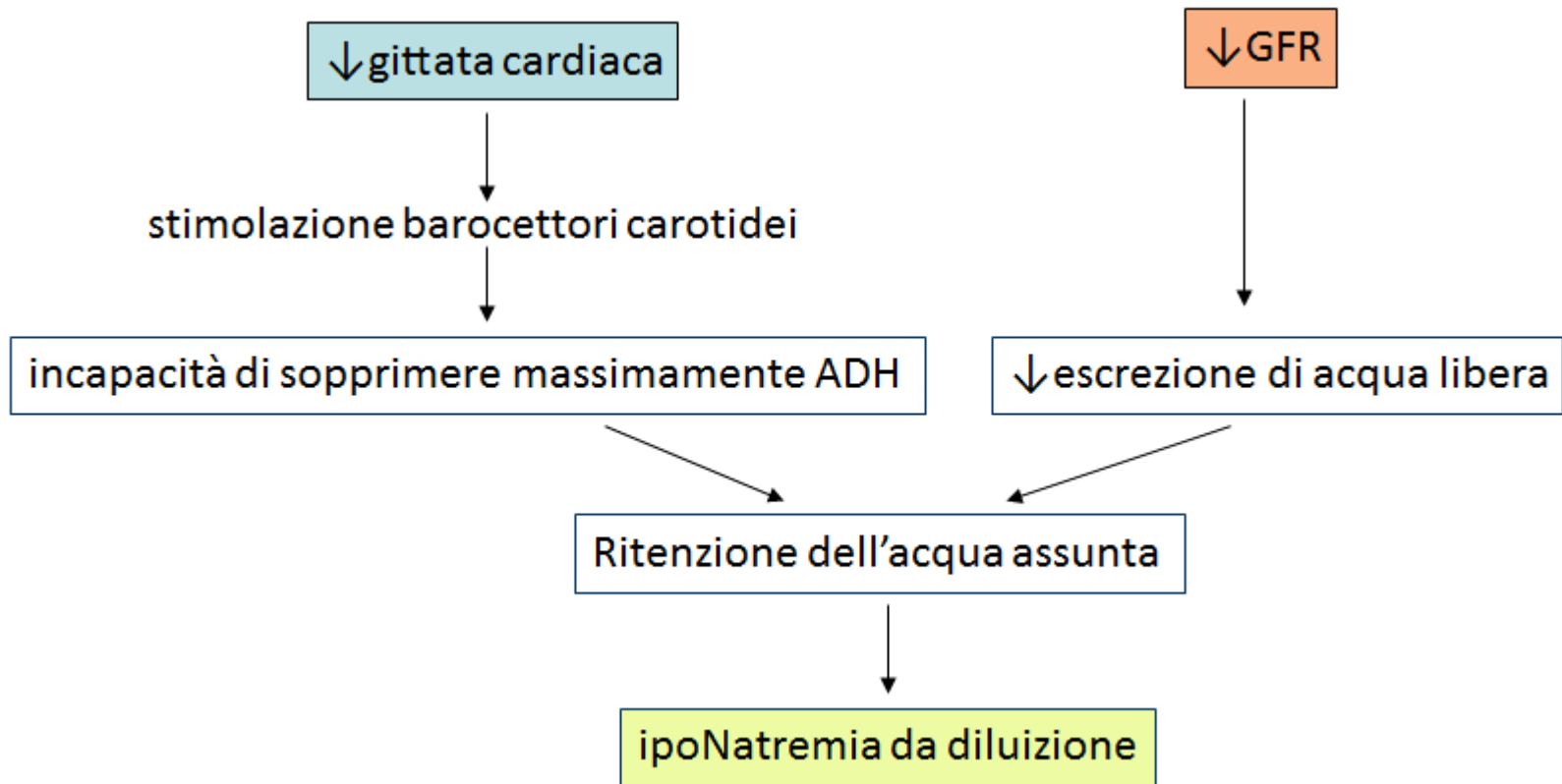
ALTERAZIONI ORMONALI

- Insufficienza surrenalica
 - Ipotiroidismo
- hCG in gravidanza (lieve reset in basso di osmostat → calo sodiemia di ~ 5 mEq/L)

IPONATREMIA – INSUFFICIENZA SURRENALICA



IPONATREMIA – IPOTIROIDISMO



A

Insufficienza renale avanzata

B

Polidipsia primaria
(incluso ecstasy)

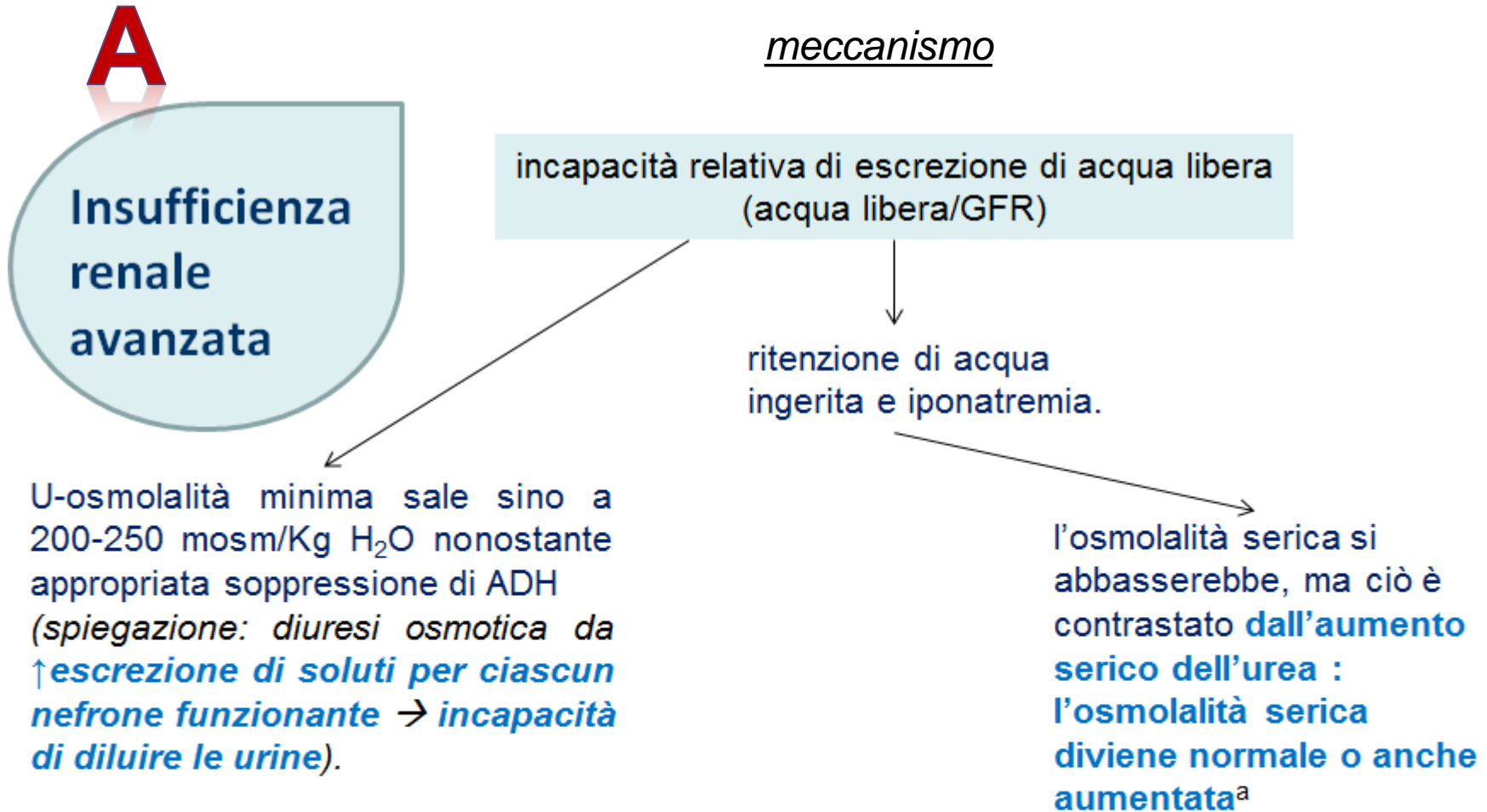
C

Basso introito di soluti
(malnutrizione, potomania dei
bevitori di birra)

IPONATREMIA

Malattie in cui
ADH può essere
adeguatamente
soppresso

malattie in cui ADH può essere adeguatamente soppresso



$$\begin{aligned} {}^a \text{ S-Osmolalità} &= 2 \times \text{S-[Na]} + [\text{glucosio}_{\text{mg/dL}}]/18 + [\text{BUN}_{\text{mg/dL}}]/2.8 \\ &= 1.86 \times [\text{S-sodio}] + [\text{S-glucosio}/18] + [\text{S-Urea}/1.4] + 9 \end{aligned}$$

Malattie in cui ADH può essere adeguatamente soppresso

B

**Polidipsia
primaria**

m. psichiatriche

(antipsicotici che danno secchezza delle fauci)

lesioni ipotalamiche con coinvolgimento del centro della sete (sarcoïdosi)

Ecstasy, specie in donne

meccanismo

- ↓ S-Na solo lieve perché l'acqua è prontamente escreta
- Asintomatici, salvo la polidipsia e la poliuria

- inappropriata secrezione di ADH e marcato introito di liquidi
- ipoNatremia grave e potenzialmente fatale

Malattie in cui ADH può essere adeguatamente soppresso

C

meccanismo

Basso
introito di
soluti

Pazienti malnutriti
Bevitori di birra

Dieta bassa in proteine e sali, ma alta in liquidi



Diminuzione marcata di escrezione di acqua

- l'escrezione di soluti in soggetti con dieta normale = 600-900 mosm/die
quando U-osmolalità è 60 mosm/Kg H₂O, la diuresi massima è (900/60=15) 15 L
MA
- con basso introito di soluti → l'escrezione di soluti scende a 250 mosm/die, con riduzione della diuresi massima (250/60) a meno di 4 L: un introito di acqua superiore → ipoNatremia

3

A

Iperglicemia, mannitolo

B

Fluidi isosmotici non contenenti sodio
(fluidi di lavaggio)

C

Psuedoiponatremia (iperlipidemia,
iperprotidemia)

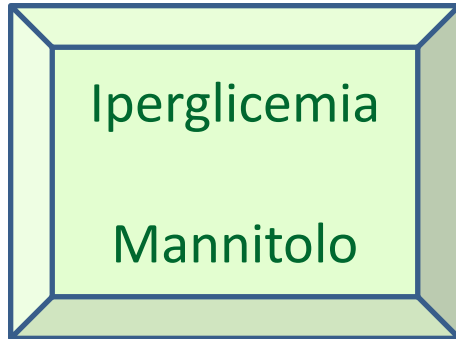
D

Insufficienza renale (iperazotemia)

Iponatremia con
osmolalità
plasmatica normale
o elevata

iponatremia con osmolalità plasmatica alta o normale

A



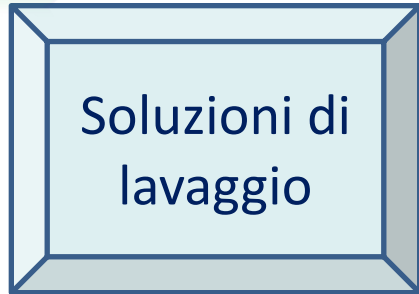
meccanismo

→ ↑P-osmolalità → fuoriuscita di acqua dalle cellule → emodiluizione con iponatremia

La **relazione tra variazioni seriche di glucosio e sodio** non è lineare e va considerata per la correzione della glicemia: **bisogna stimare l'aumento di S-Na quando la glicemia sarà corretta**, perchè l'insulina porta glucosio ed acqua all'interno delle cellule

iponatremia con osmolalità plasmatica alta o normale

B



meccanismo

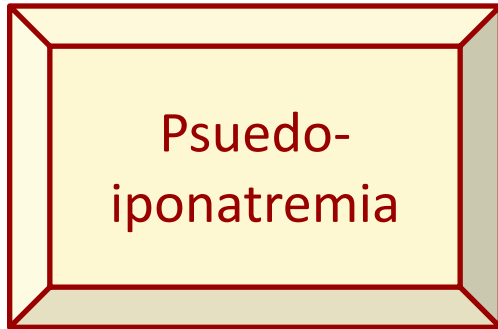
Aggiunta allo spazio extracellulare di fluidi isosmotici non-contenenti Na:

- **soluzioni di lavaggio** di glicina o sorbitolo durante resezioni transuretrali di prostata o vescica → Sindrome da resezione transuretrale
- **irrigazioni** durante isteroscopia o chirurgia laparoscopica.

le soluzioni sono assorbite → ↓↓ S-Na a <110 mEq/L e compaiono sintomi neurologici.

iponatremia con osmolalità plasmatica alta o normale

C



meccanismo

↑↑ lipidi (siero lattescente) o
↑↑ proteine (mieloma multiplo)
→ riduzione della frazione di acqua del
plasma → ↓ misura S-Na (solo con
potenziometria indiretta)

- acqua plasmatica normale = 93% con 7% di grassi e proteine →
S-Na 142 mEq/L di plasma, in realtà 154 mEq/L di acqua
($142/0.93= 154$)
- acqua plasmatica in dislipidemia marcata o mieloma multiplo =
80%
il risultato va aggiustato al valore normale di acqua plasmatica
(93%).
- $\text{Plasma-H}_2\text{O} = 99.1 - (0.1 \times \text{lipidi totali}_{\text{g/L}}) - (0.07 \times \text{proteine totali}_{\text{g/L}})^*$

iponatremia con osmolalità plasmatica alta o normale

D

meccanismo

Iponatremia vera
in insufficienza
renale

iponatremia con P-osmolalità normale o aumentata per l' iperazotemia (l'urea è osmole inattiva)

utile P-osmolalità corretta o effettiva = $P\text{-osm} - (\text{BUN}/2.8)$

IPONATREMIA

PERCORSO DIAGNOSTICO

- **Anamnesi, esame obiettivo, test di laboratorio**

- **Anamnesi e Esame Obiettivo**

- Perdita di liquidi (vomito, diarrea, terapia diuretica) con segni di deplezione di volume extracellulare (ridotto turgore cutaneo, bassa pressione venosa giugulare)
 - Segni di edema periferico e/o ascite dovuti a scompenso cardiaco, cirrosi, insufficienza renale
 - Una delle cause di SIADH
 - Segni/Sintomi di insufficienza surrenalica o di ipotiroidismo
 - La deplezione di volume di piccola entità o edema di piccola entità è difficile da cogliere → servono **test di laboratorio**

- **Test di laboratorio:**

- **P-OSMOLALITÀ:**

- normalmente 275-290 mosm/KgH₂O.

- **iponatremia con ↓ P-osmolalità:**

- nella maggior parte delle iponatremie

in rari casi è normale o ↑ per gap osmolale (osmolalità calcolata^a < misurata di 10 unità)^b

- **iponatremia con P-osmolalità normale:**

- pseudoiponatremia, assorbimento di soluzioni di lavaggio.

- **iponatremia con ↑ P-osmolalità:**

- iperglicemia, somministrazione di mannitolo ipertonico → fuoriuscita di acqua dalle cellule → emodiluizione → iponatremia; effetto in parte contrastato da diuresi osmotica → perdita di acqua in eccesso al Na e K → S-[Na] che si normalizza o ↑ (chetoacidosi diabetica, stato iperglicemico iperosmolare)

- **Iponatremia in insufficienza renale:**

- P-osmolalità ↑, ma ↓ quella effettiva (P-osm – BUN/2.8)

^a Osmolalità = 2*S-[Na] + [glucosio_{mg/dL}]/18 + [BUN_{mg/dL}]/2.8 + [etanolo_{mg/dL}]/4.6

^b intossicazione metanolo, PEG, chetoacidosi diabetica o alcolica, acidosi lattica, IRC

- **Test di laboratorio:**

- **U-OSMOLALITÀ:**

- in pz con iponatriemia e \downarrow P-osmolalità la U-osmolalità **distingue tra ridotta escrezione di acqua (quasi sempre) e polidipsia primaria (assunzione d'acqua che supera le capacità escretorie).**

- **Risposta normale** al carico idrico (polidipsia primaria):

iponatriemia \rightarrow \downarrow \downarrow ADH \rightarrow urine massimamente diluite con U-osmolalità <100 mosm/Kg H₂O e gravità specifica ≤ 1.003 .

- U- osmolalità sopra questo valore indica **incapacità di normale escrezione di acqua libera per continua secrezione di ADH** (nella maggior parte dei pz U-osm ≥ 300 mosm/Kg H₂O).

- Altre condizioni con iponatriemia con U-osmolalità <100 mosm/Kg H₂O:

- **Malnutrizione:** \downarrow soluti nella dieta \rightarrow \downarrow escrezione di acqua per bassi soluti (diluizione urinaria intatta)

- **Reset dell'osmostat:** dopo che un carico idrico sopprime appropriatamente ADH, S-[Na] moderatamente ridotto (125-135 mEq/L) e stabilmente (misure multiple).

- **Test di laboratorio:**

- **U-[Na]:**

- in pz con iponatriemia e \downarrow P-osmolalità, **distingue tra iponatriemia da riduzione effettiva del volume arterioso e iponatriemia con volemia normale:**

- U-[Na] < 25 mEq/L = **Ipovolemia** (*escludi perdite renali di sale per diuretici tiazidici o insufficienza surrenalica*)

- U-[Na] > 40 mEq/L = **normovolemici**; pz con SIADH in cui l'escrezione di Na è determinata dalla sua assunzione.

- **Test di laboratorio:**
- **S-ACIDO URICO E S-UREA:**

- in pz con SIADH, l'iniziale **ritenzione di acqua ed espansione del volume si associa a ipouricemia (<4 mg/dL o 238 μ mol/L) ed ipoazotemia (BUN <5 mg/dL o 1,8 mmol/L) per \uparrow escrezione urinaria di urato e urea.**
- \uparrow volume \rightarrow \downarrow riassorbimento prossimale di Na \rightarrow \downarrow riassorbimento di acido urico
- \uparrow volume (+stimolazione recettore V1) \rightarrow \uparrow clearance dell'urea \rightarrow BUN < 5 mg/dL (non in anziani per ridotta escrezione frazionale dell'urea dovuta all'età)

- **Test di laboratorio:**
- **ESCREZIONE FRAZIONALE DEL SODIO (FENa):**

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} * P_{Cr}}{P_{Na} * U_{Cr}} \times 100$$

- **in pz insufficienza renale acuta la FENa accerta lo stato volemico** meglio di U-[Na]: FENa <1% = effettiva deplezione di volume.

- **BILANCIO ACIDO-BASE E POTASSICO:**

- In pz con ipoNatremia di eziologia non chiarita
 - **alcalosi metabolica e ipoKalemia** = uso di diuretici, vomito
 - **acidosi metabolica e ipoKalemia** = diarrea, uso di lassativi
 - **acidosi metabolica e iperKalemia** = insufficienza surrenalica
 - **In SIADH S-bicarbonato e S-potassio sono normali** (non ridotti come Na e Cl) perché normalizzati dai fattori che regolano il bilancio acido-base e quello potassico.

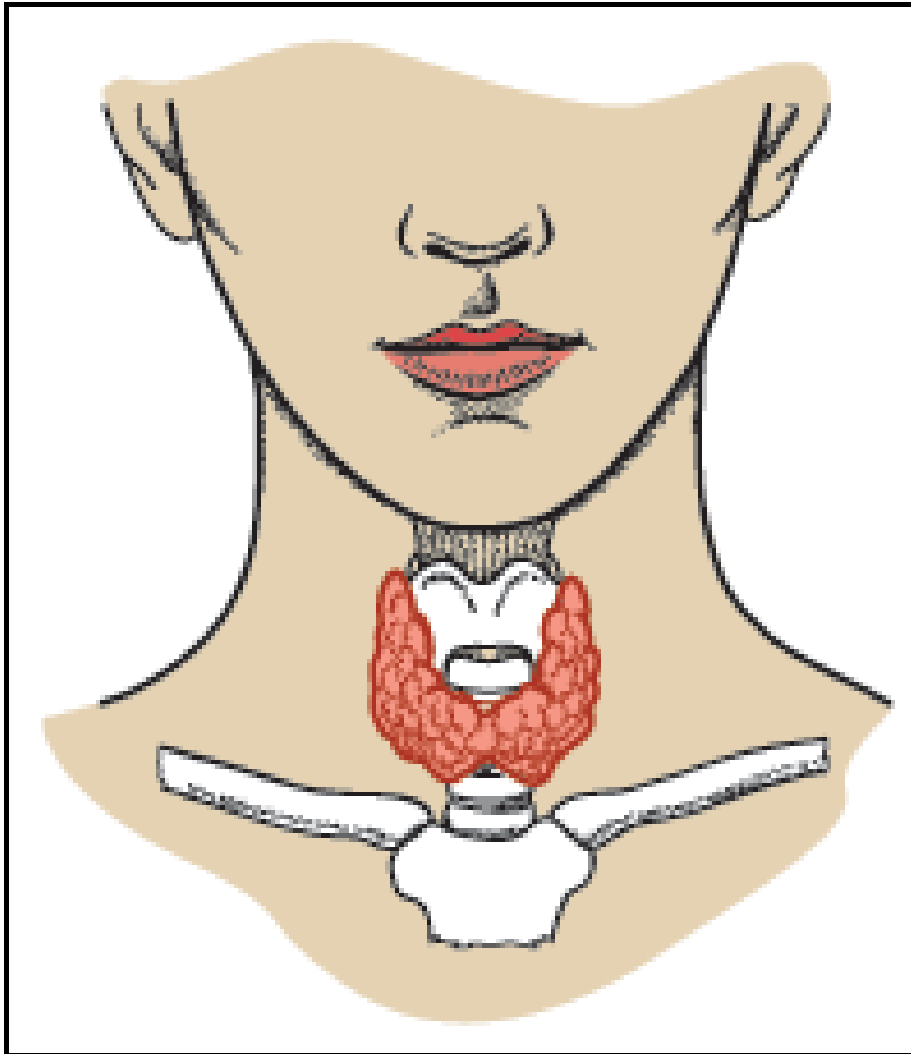
- **Caratteristiche di Laboratorio della SIADH:**
 - P-osmolalità ↓
 - U-osmolalità inappropriatamente ↑ (100-300 mosm/KgH₂O)
 - U-[Na] > 40 mEq/L
 - S-urea ↓
 - S-urato ↓
 - S-creatinina =
 - Bilancio acido-base =
 - S-potassio =
 - Funzione surrenalica =
 - Funzione tiroidea =
 - Se il pz con SIADH è anche ipovolemico U-[Na] ↓ e dopo carico salino U-[Na] aumenta e U-osmolalità rimane alta.

Lezioni di Patologia Clinica
AA 2015-2016



PATOLOGIA DELLA TIROIDE

Anatomia



Posta davanti alla cartilagine tiroidea

Composta da due lobi uniti da un istmo

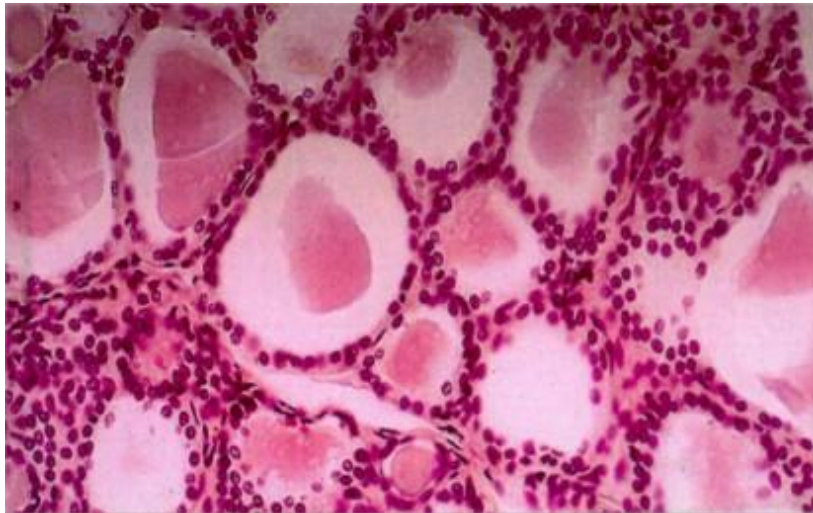
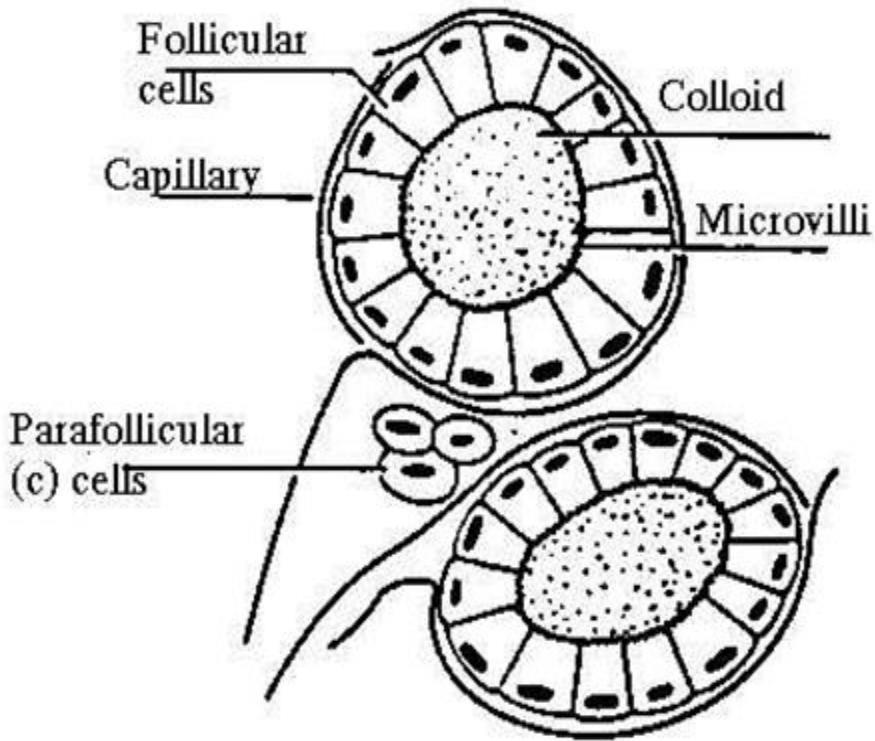
Pesa 20 g

Irrorata da 2 arterie tiroidee, le superiori originano dalla carotide esterna, le inferiori dalla succlavia

Ricco drenaggio linfatico

Innervazione adrenergica e colinergica

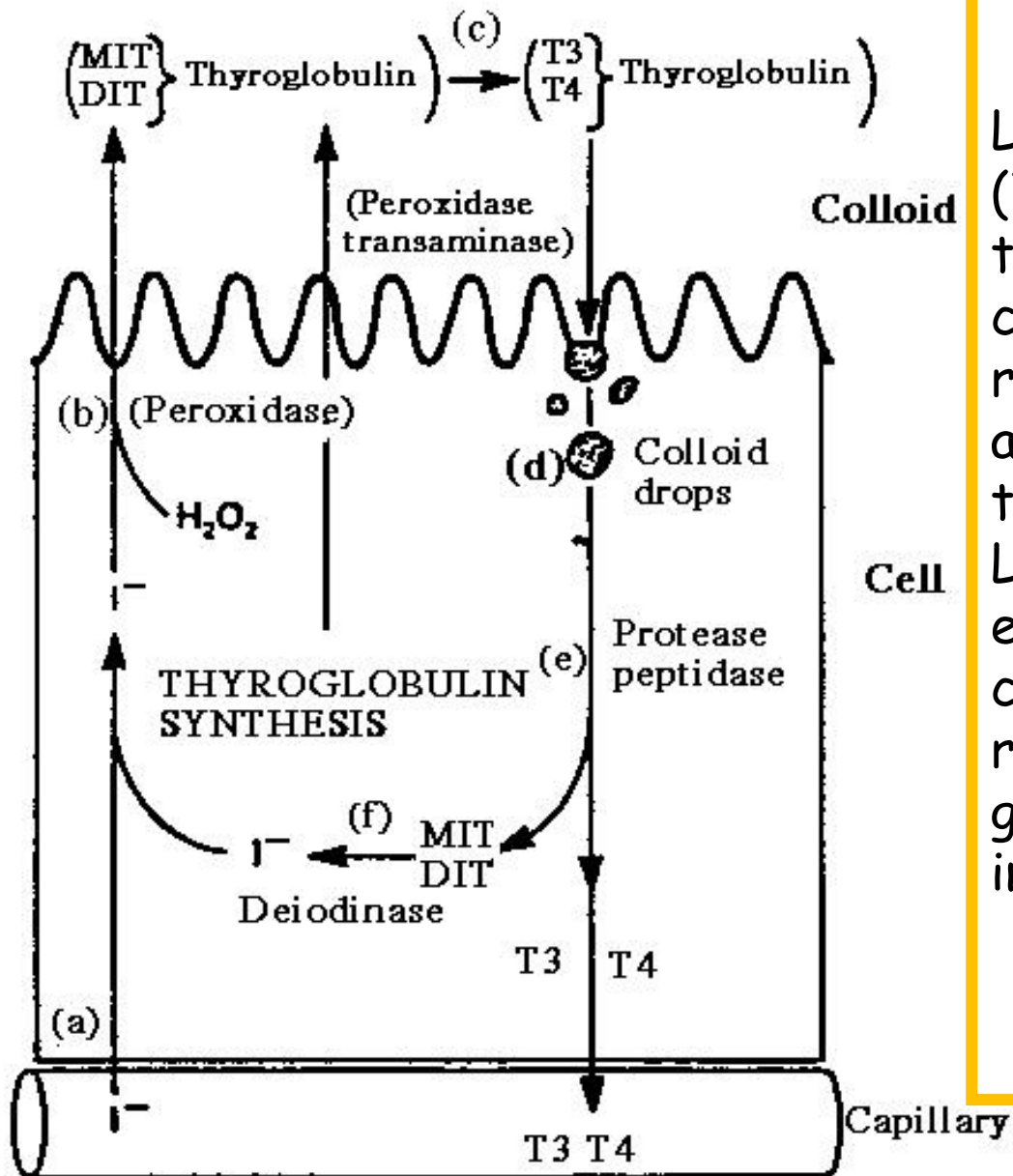
Istologia



La tiroide è composta da **follicoli** rivestiti da epitelio monostratificato, che contengono all'interno la colloide. Quando stimolate, le cellule diventano colonnari e il lume si impoverisce di colloide, quando sopresse, le cellule si appiattiscono e nel lume si accumula colloide.

20-40 follicoli compongono un **lobulo**, ognuno servito da un sistema vascolare, cosicché la ghiandola è altamente vascolarizzata.

La ghiandola contiene anche **cellule parafollicolari** o cellule C, in prossimità dei follicoli, ma non a contatto con la colloide, secernono calcitonina (ormone ipocalcemizzante)



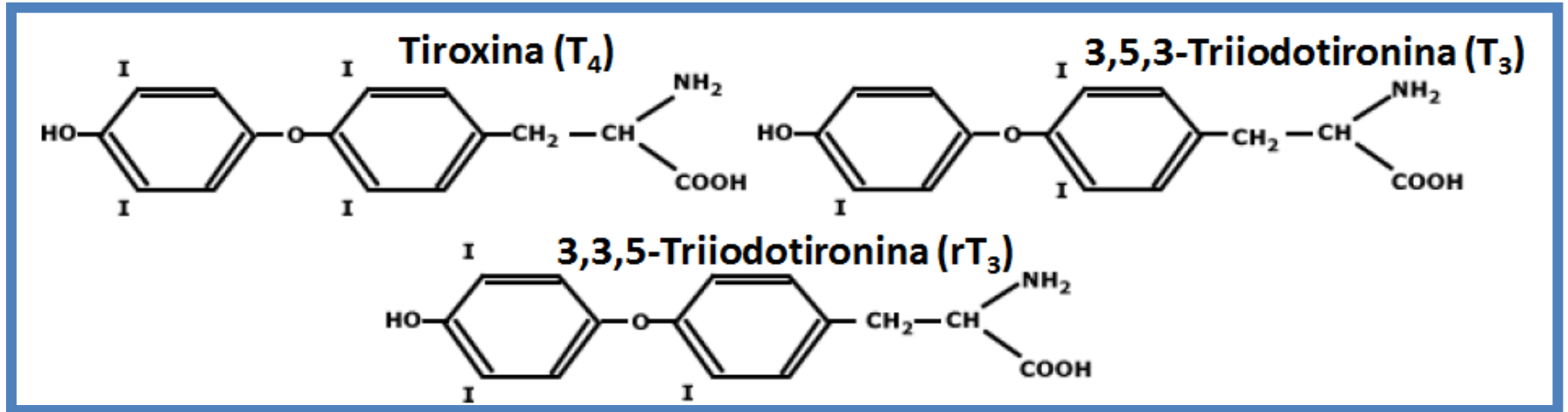
La glicoproteina **tireoglobulina** (TG), ricca di residui di tiroxina, è il maggiore costituente della colloide e rappresenta la forma di accumulo di iodio e di ormoni tiroidei.

Le cellule epiteliali sintetizzano e secernono TG all'interno della colloide, e, al bisogno, la riassorbono e da essa scindono gli ormoni tiroidei per immetterli in circolo.

Sintesi e fisiologia dell'ormone tiroideo

(T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3) sono costituiti da un anello fenilico legato ad una molecola di tirosina. Entrambi hanno due atomi di iodio sul loro anello tirosinico (interno), ma sull'anello fenilico (esterno) T4 ha due atomi di iodio mentre T3 ne ha uno solo.

Se l'atomo viene rimosso dall'anello interno del T4 si forma T3 inverso (rT3), biologicamente inattivo.



T4 è prodotto solo dalla tiroide, mentre T3 è prodotto dalla tiroide e da molti altri tessuti, a seguito di deionizzazione del T4.

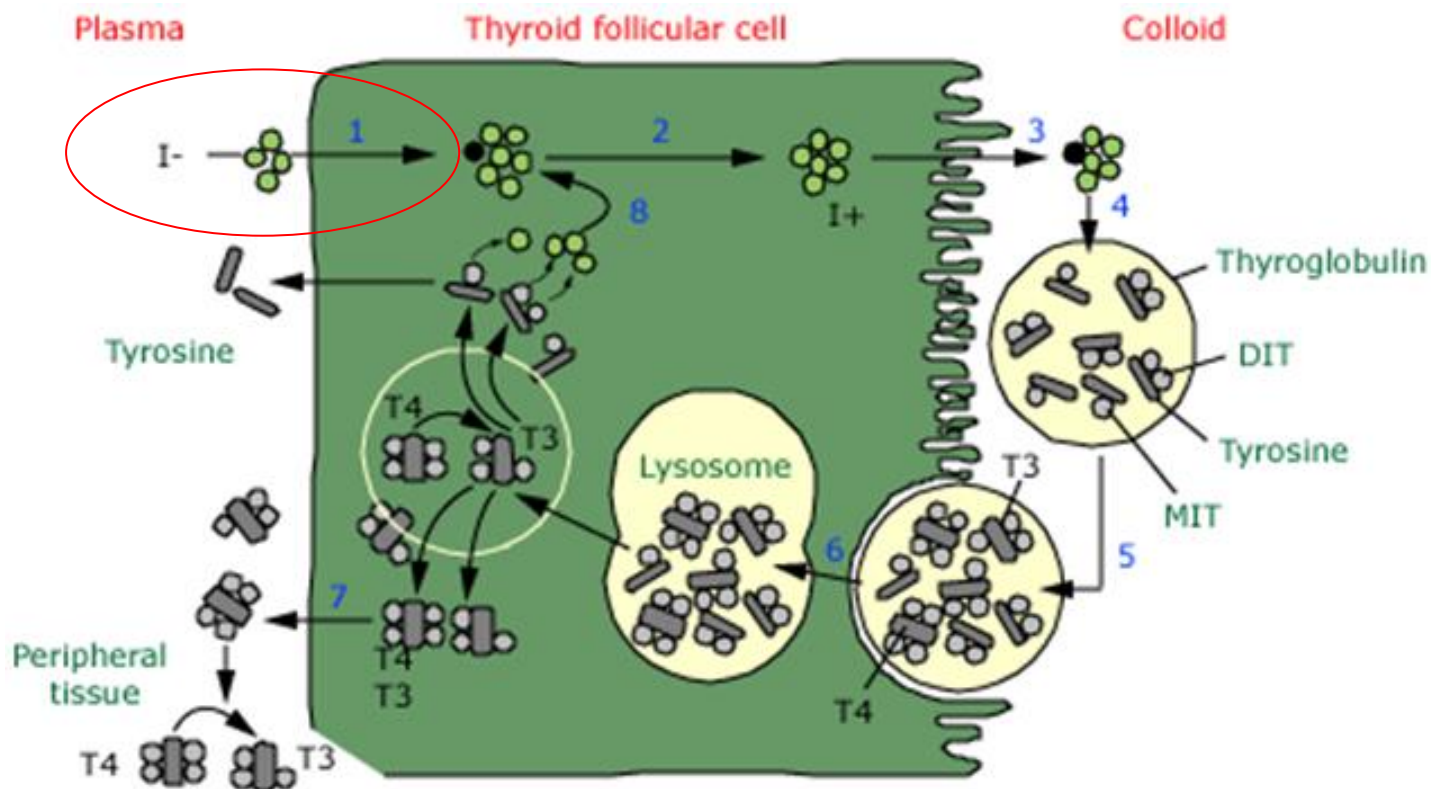
La tiroide contiene grandi quantità di T4 e T3 incorporati nella tireoglobulina, la proteina entro cui gli ormoni sono sia sintetizzati che immagazzinati.

Economia dello Iodio

- Lo iodio è essenziale per la normale funzione tiroidea
- Si ottiene da gli alimenti che lo contengono o al quale viene aggiunto.
- Lo iodio alimentare viene assorbito come ioduro e rapidamente distribuito nel liquido extracellulare, che contiene anche lo ioduro rilasciato dalla tiroide e dalla deiodinazione extratiroidea delle iodotironine. Da questo pool lo ioduro è trasportato nella tiroide oppure escreto con e urine.
- L'assunzione di iodio giornaliera raccomandata è 120 μg negli adulti e adolescenti.
- La carenza di iodio è definita dalla sua escrezione urinaria.

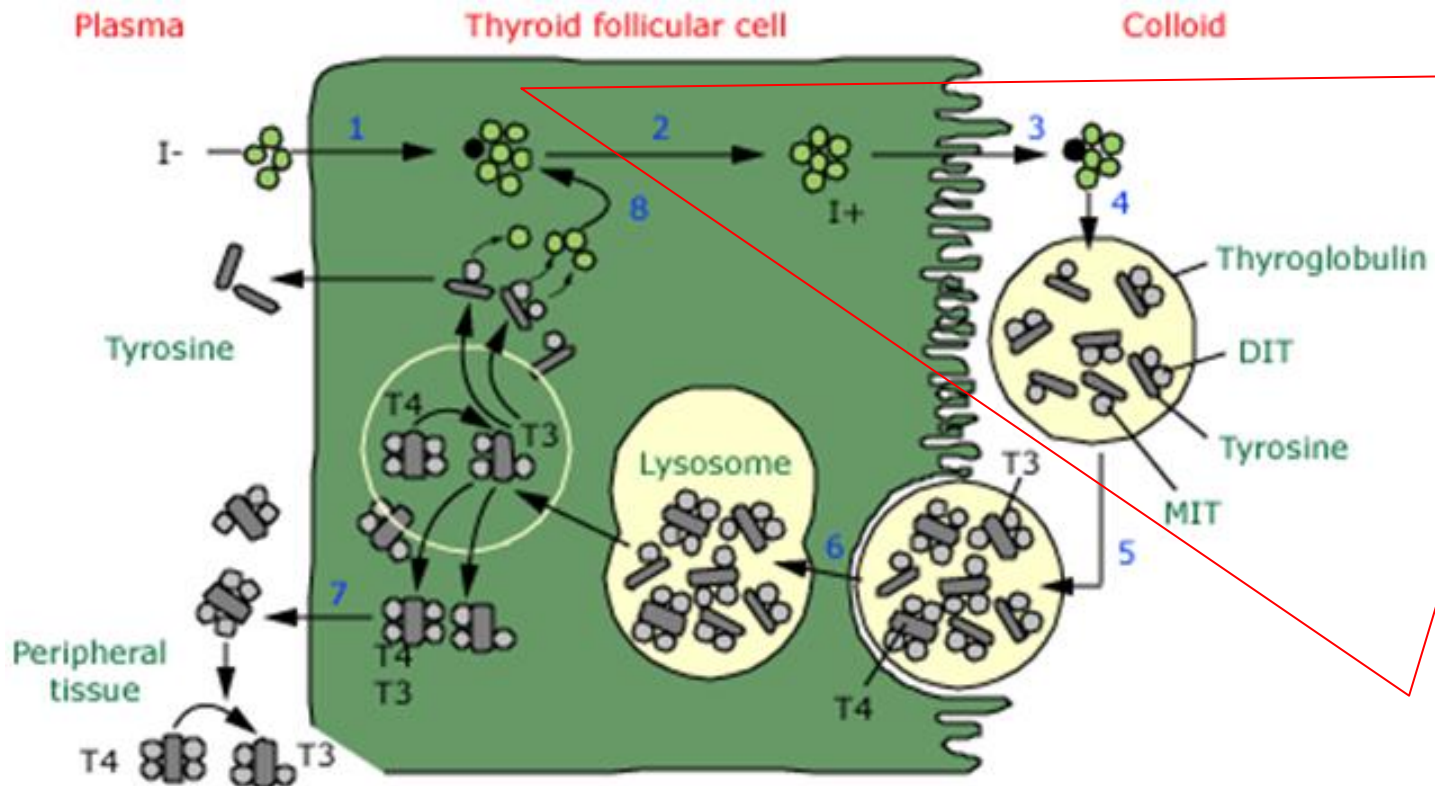
1. Trasporto dello ioduro nella tiroide —

Si tratta di un trasporto attivo, energia-dipendente e saturabile, che richiede metabolismo ossidativo. Il trasportatore è una proteina transmembrana. Altri ioni come perclorato e pertecnetato competono per il meccanismo di trasporto dello ioduro.



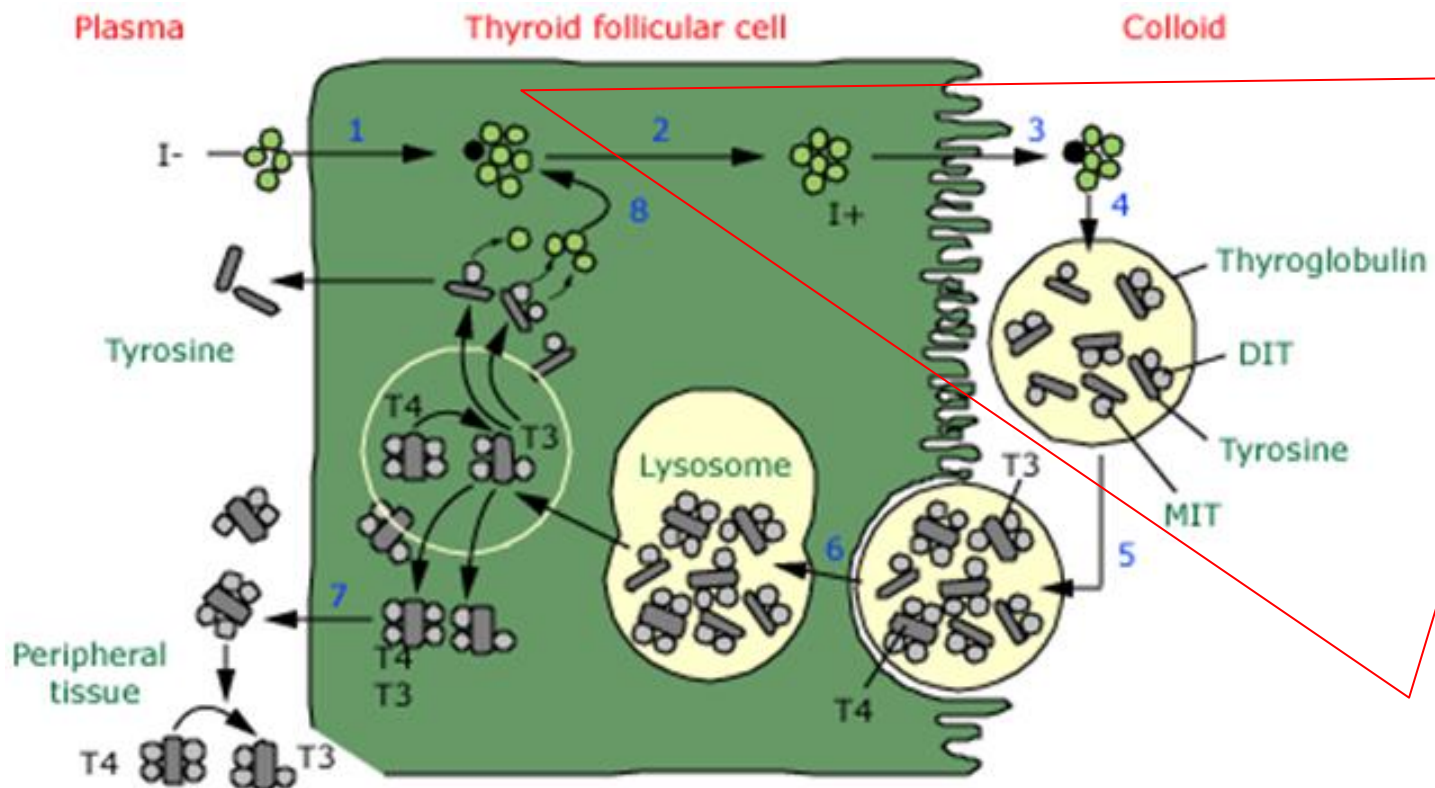
2,3,4. Iodinazione della tirosina—

Lo ioduro viene trasportato dalla Pendrina (un trasportatore di membrana) alle vescicole esocitotiche fuse con la membrana cellulare apicale. Poi lo ioduro viene ossidato dall'enzima **tireoperossidasi** in presenza di H_2O_2 e organificato ad una parte (10%) dei residui tirosinici della tireoglobulina.



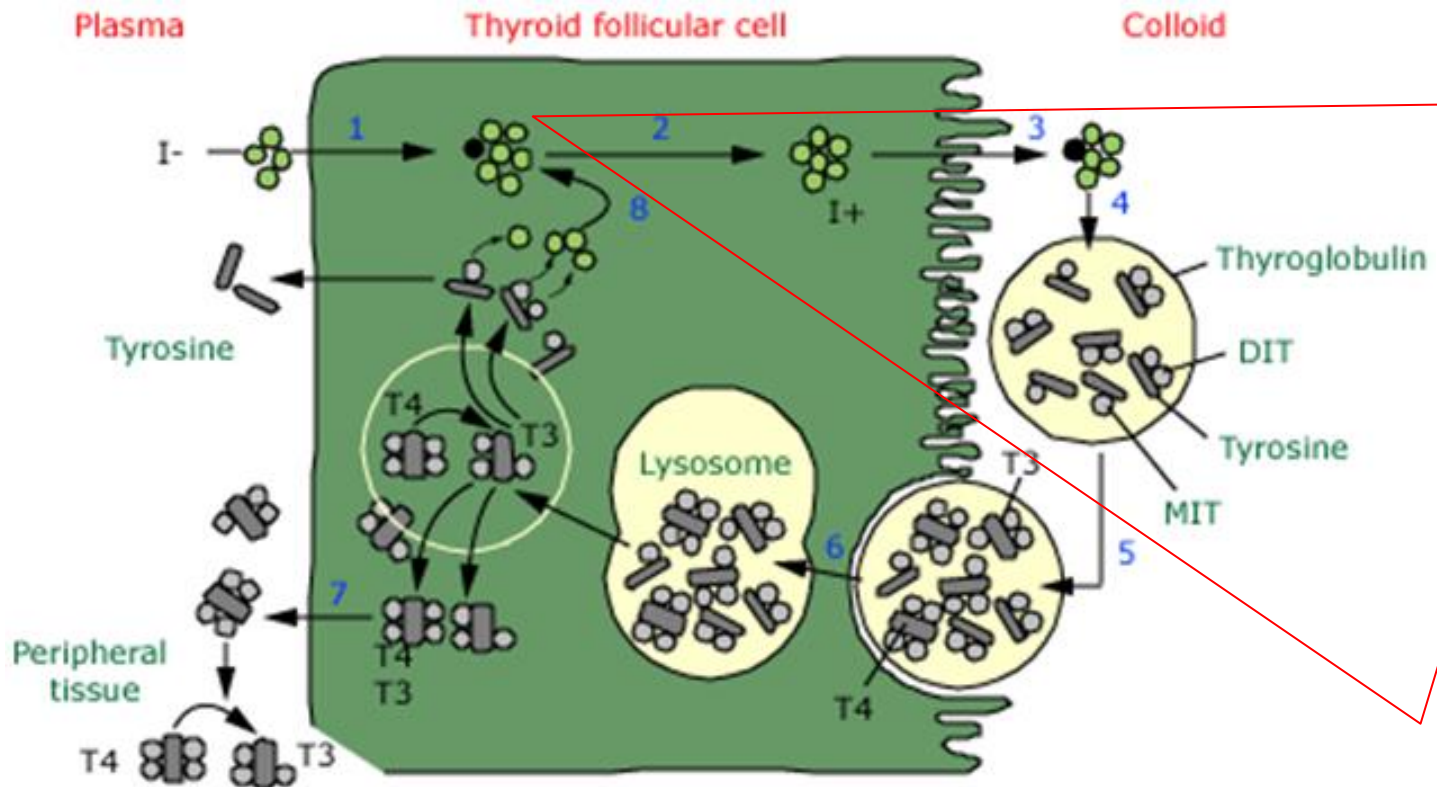
4. Accoppiamento dei residui iodotirosinici della tireoglobulina –

All'interno di una molecola di tireoglobulina il T4 si forma per l'accoppiamento di due residui di diiodotirosina e il T3 dall'accoppiamento di una monoiodotirosina e una diiodotirosina. Queste reazioni sono catalizzate dalla **tireoperossidasi**.



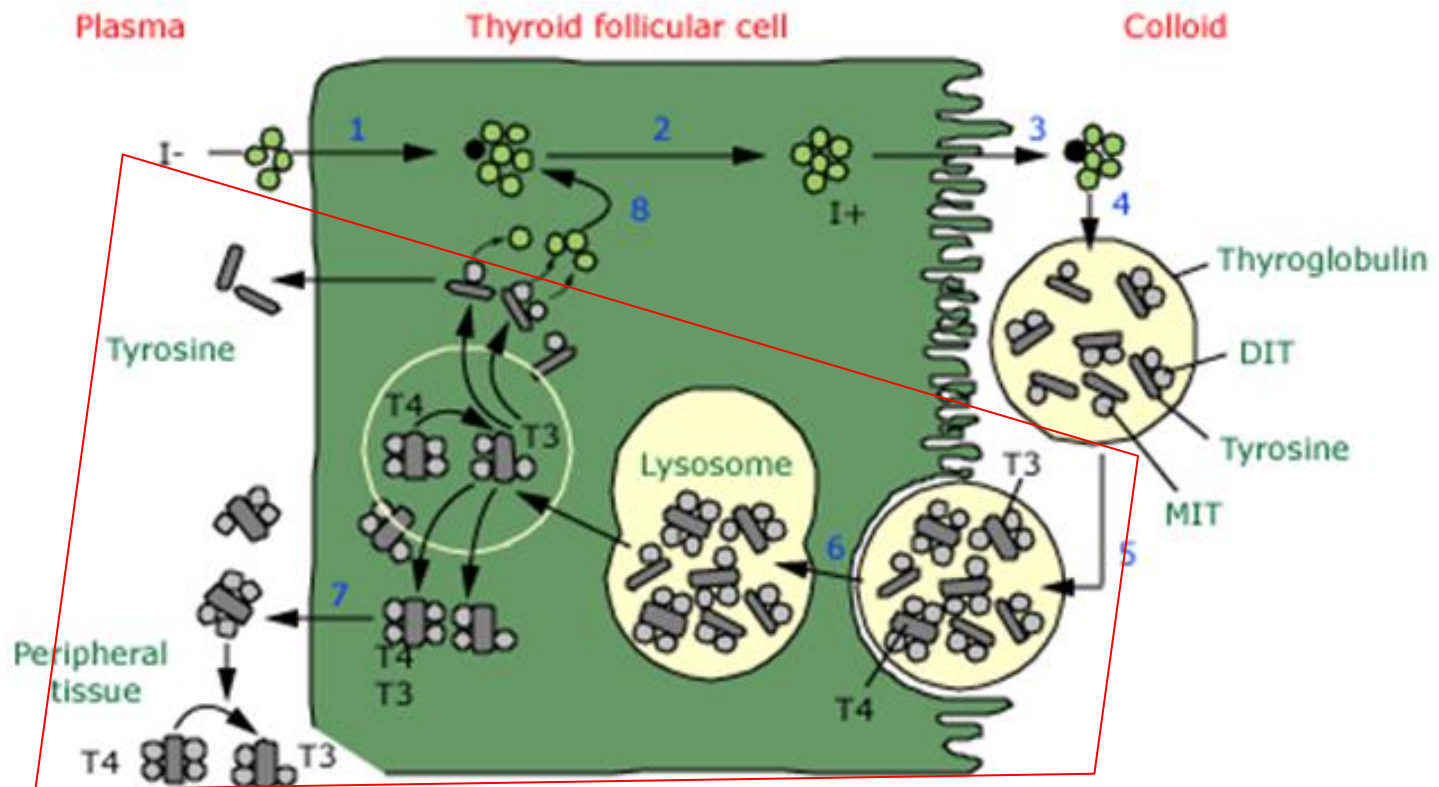
4. Sintesi della tireoglobulina –

La tireoglobulina è una glicoproteina che si trova nel lume dei follicoli tiroidei. E' sintetizzata e glicosilata nel reticolo endoplasmatico rugoso, e poi incorporata nelle vescicole esocitotiche che si fondono con la membrana cellulare apicale. Solo allora i residui di tirosina vengono iodinati ed accoppiati.



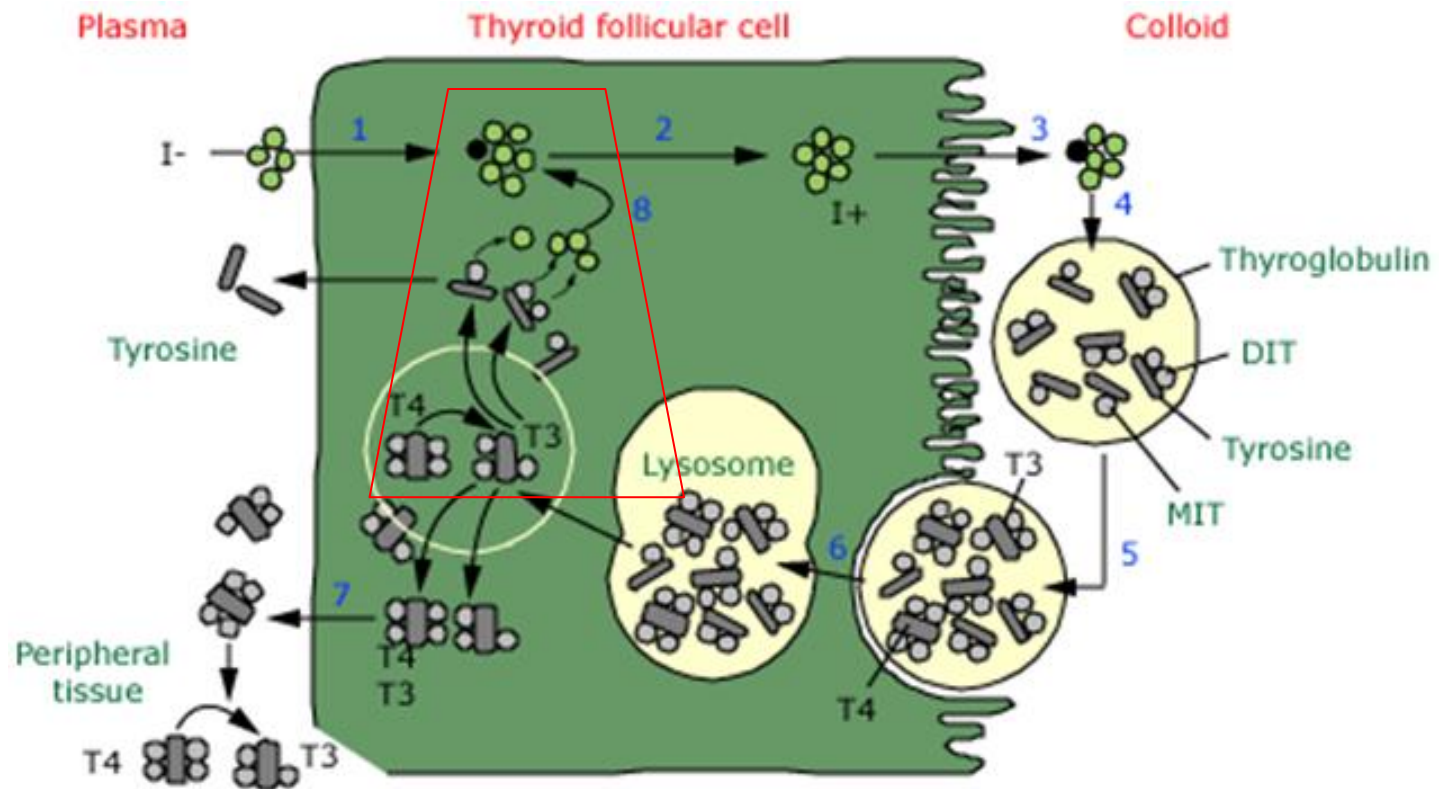
Endocitosi della colloide e rilascio ormonale –

La tireoglobulina viene riassorbita nelle cellule follicolari in forma di goccioline di colloide. Le goccioline si fondono con i lisosomi per formare fagolisosomi, dove la tireoglobulina viene idrolizzata a T4, T3, amminoacidi costituenti, e parte del T4 viene convertito a T3. Gli ormoni vengono secreti nel liquido extracellulare ed entrano in circolo.



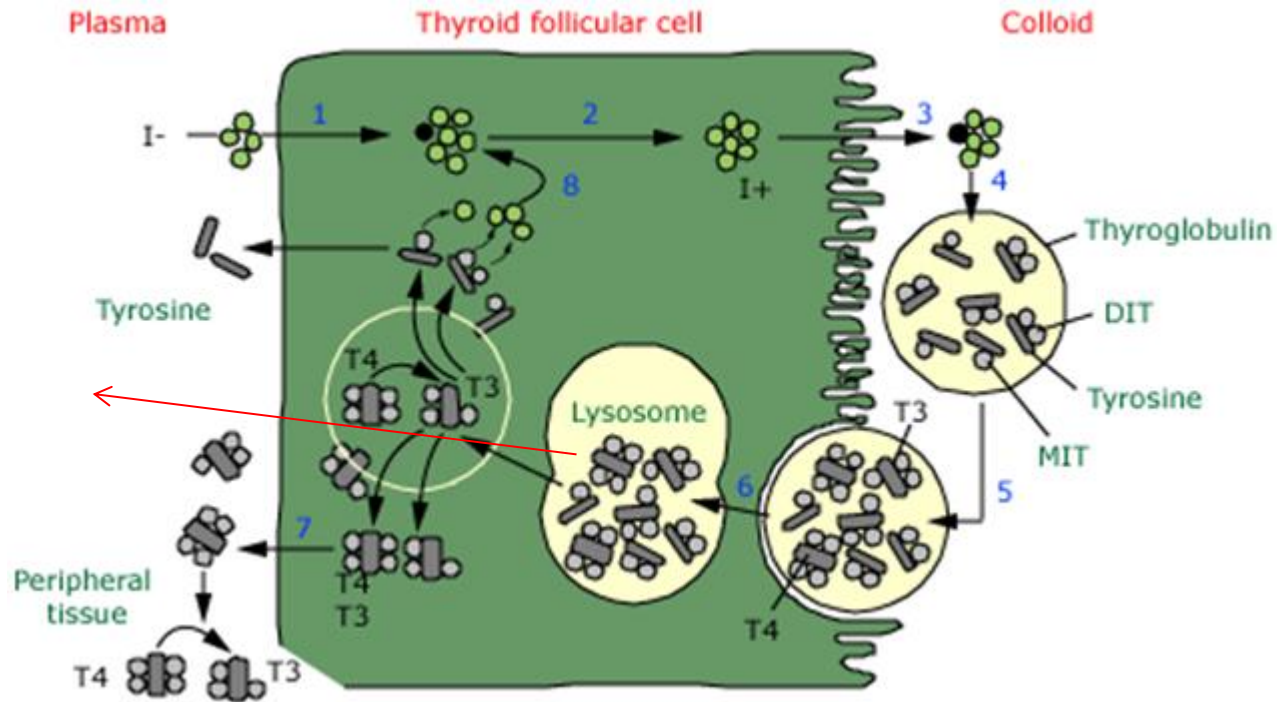
Riciclaggio dello ioduro –

Le iodotirosine liberate dalla tireoglobulina vengono deiodinate dalla iodotirosina-deiodinasi. La maggior parte dello ioduro viene riciclato per la neosintesi di ormone tiroideo.



Secrezione della tireoglobulina –

Ogni giorno sono rilasciati dalla tiroide 100 µg di tireoglobulina: una piccola frazione dei 25 mg di tireoglobulina che deve essere idrolizzata per produrre i 100 µg di T4 secreti ogni giorno.



Produzione extratiroidea di T3-

80% del T3 circolante è prodotto dalla 5'-deiodinazione (nell'anello esterno) del T4 nei tessuti extratiroidei.

Fegato e reni sono le principali fonti di T3 nel siero, ma T3 è prodotto dalla quasi tutti i tessuti.

Esistono tre tipi di T4-5'-deiodinasi:

1. la **deiodinasi tipo I** è predominante in fegato, rene, e tiroide. *Produce normalmente il 35% del T3 sierico*
2. la **deiodinasi tipo II** predomina in muscoli, cervello, adenoipofisi, cute e placenta. *Produce normalmente il 65% del T3 sierico. La sua attività aumenta nell'ipotiroidismo e cala nell'ipertiroidismo.*
3. Nei siti extratiroidei rT3 è prodotto dalla **deiodinasi tipo III**.

METABOLISMO DELL'ORMONE TIROIDEO-

Tiroxina (T4) –

Il pool extratiroideo di T4 è per la maggior parte extracellulare.

T4 è degradata alla velocità del 10% al giorno.

- *l'80% è deiodinata, un 40% per formare T3 e l'altro 40% per formare rT3.*
- *Il restante 20% è coniugato con glucuronide e solfato, deaminato e decarbossilato.*

La deiodinazione di T4 a T3 porta ad una maggiore attività biologica, mentre gli altri metaboliti del T4 sono biologicamente inattivi.

La conversione di T4 a T3 nei tessuti extratiroidei è regolata indipendentemente dalla regolazione dell'asse ipofisi-tiroide.

METABOLISMO DELL'ORMONE TIROIDEO-

Triiodotironina (T3) –

La maggior parte del T3 (80%) è prodotto dalla deiodinazione extratiroidea di T4 e il rimanente 20% proviene dalla tiroide.

Il pool extratiroideo di T3 è per maggior parte intracellulare.

Il T3 è degradato, per lo più da deiodinazione, molto più rapidamente del T4 (circa il 75% al giorno).

Triiodotironina inversa (rT3) –

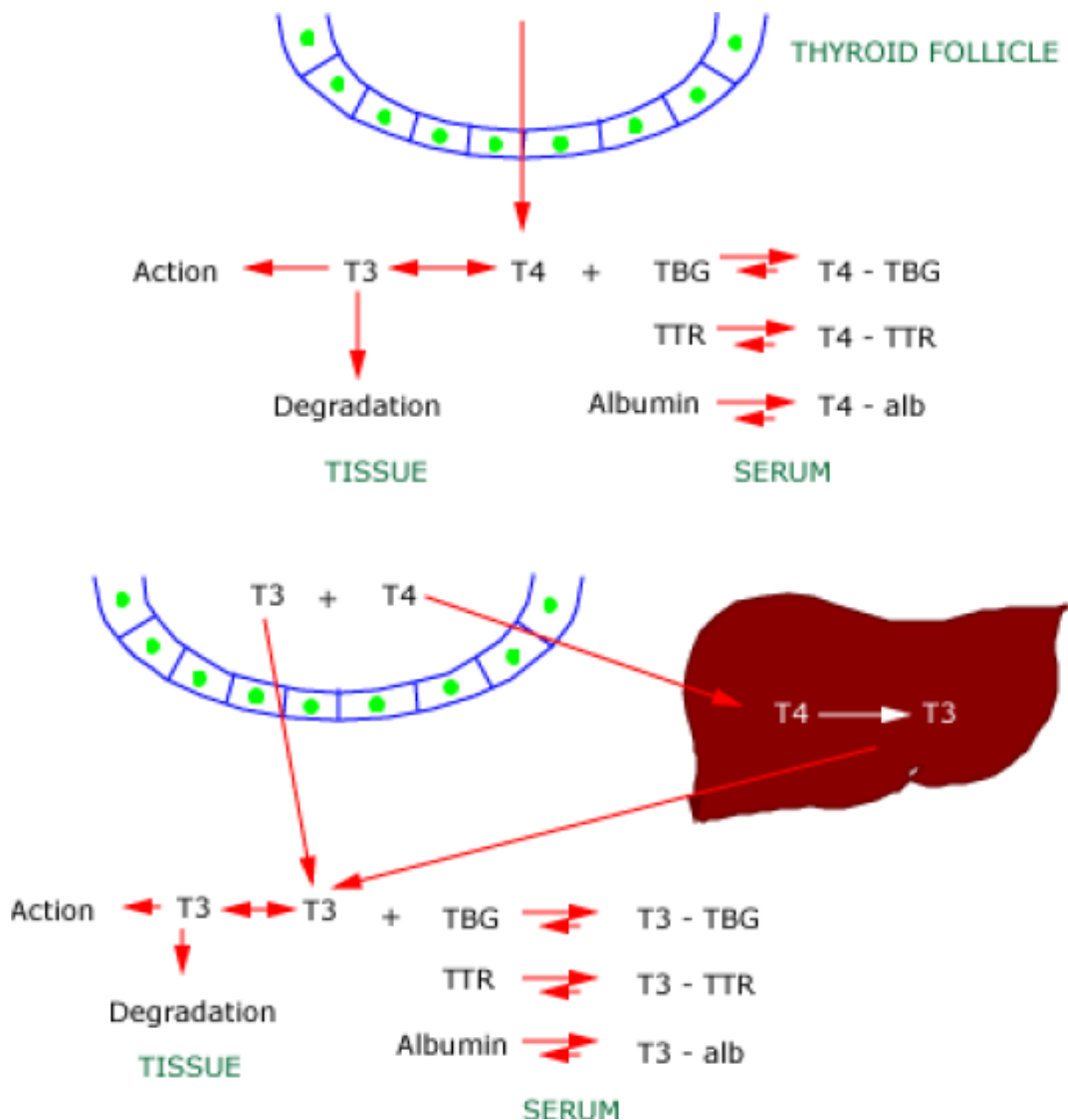
La produzione di rT3 deriva quasi tutta dalla deiodinazione extratiroidea del T4. rT3 viene degradato ancora più rapidamente del T3.

SIERO PROTEINE DI LEGAME –

Oltre il 99,95% del T4 e il 99,5% del T3 nel siero si trovano legati alle seguenti proteine:

- globulina legante la tiroxina (TBG),
 - transtiretina (TTR), precedentemente detta prealbumina (TBPA),
 - albumina,
 - lipoproteine (soprattutto apo-AI delle HDL).
-
- **Per T4**, il 75% è legato a TBG, il 10% a TTR, il 12% a albumina, il 3% a lipoproteine. Circa lo 0,02% o 2 ng/dL (25 pmol/L) è libero.
 - **Per T3**, l'80% è legato a TBG, il 5% a TTR, il 15% a albumina e lipoproteine. Circa lo 0,5%, o 0,4 ng/dL (6 pmol/L) è libero.

Trasporto e metabolismo dell'ormone tiroideo



SIERO PROTEINE DI LEGAME –

Poiché quasi tutto il T4 e il T3 nel siero è legato, cambiamenti nelle concentrazioni sieriche delle proteine di legame, soprattutto TBG, influenzano fortemente le concentrazioni sieriche di T4 totale e T3 e il metabolismo frazionale di T4 e T3.

Invece, le concentrazioni di ormone libero (T4 libero-fT4, T3 libero-fT3) non subiscono variazioni come pure il metabolismo frazionale di fT4 e fT3.

Funzioni generali –

La attività biologica della tiroide è determinata dalle concentrazioni sieriche di fT4 e di fT3.

Le proteine leganti servono a mantenere le concentrazioni sieriche di fT4 e fT3 entro limiti ristretti e a garantire che T4 e T3 siano immediatamente e continuamente disponibili per i tessuti. Queste proteine, quindi, hanno sia le funzioni di buffer che di stoccaggio.

A più lungo termine, se la secrezione della tiroide cessa, il T4 immagazzinato nel siero serve a ritardare l'insorgenza di ipotiroidismo.

Inoltre, le proteine di legame proteggono i tessuti da improvvisi aumenti della secrezione della tiroide o di produzione extratiroidea di T3.

INGRESSO CELLULARE E LEGAME DELL'ORMONE-

fT4 e fT3 sono immediatamente disponibili per l'assorbimento cellulare e T4 e T3 si dissociano rapidamente dalle proteine.

Il trasporto nelle cellule è mediato da un carrier o avviene per diffusione. Il T3 è anche prodotto nelle cellule per deionizzazione di T4.

Parte del T3 prodotto localmente deve lasciare le cellule, come dimostra il fatto che le concentrazioni di T3 sono normali nei pazienti ipotiroidei che assumono T4 alle dosi che normalizzano le concentrazioni di T4 nel siero.

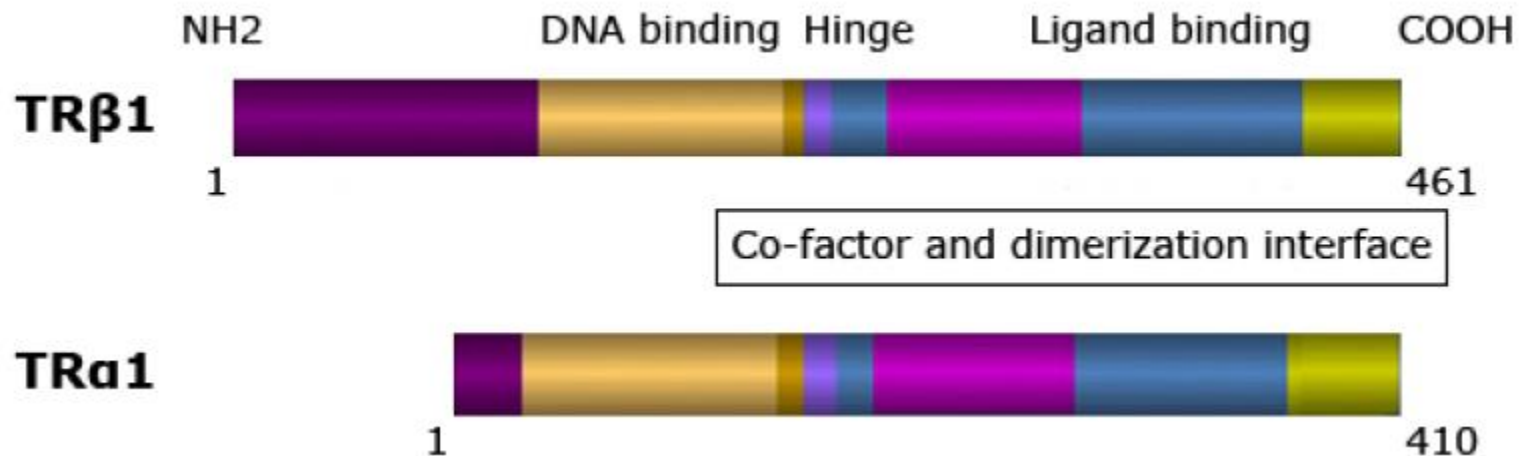
Nelle cellule il T3 si lega ai [recettori nucleari del T3](#).

Recettori nucleari del T3 –

Mediano le azioni fisiologiche dell'ormone tiroideo.

Il T3 diffonde o viene trasportato nel nucleo e si lega al suo recettore localizzato sulla cromatina.

Tipi di recettori – sono due, T3-alfa e beta ed entrambi sono proteine lineari. Gli mRNA per ciascun recettore hanno diversi splice in modo che vi siano almeno tre forme di recettori alfa e due forme di recettori beta. I recettori differiscono nella struttura delle loro regioni amino e carbossi-terminale, ma le regioni di binding del DNA e del T3 vincolanti sono altamente conservate.



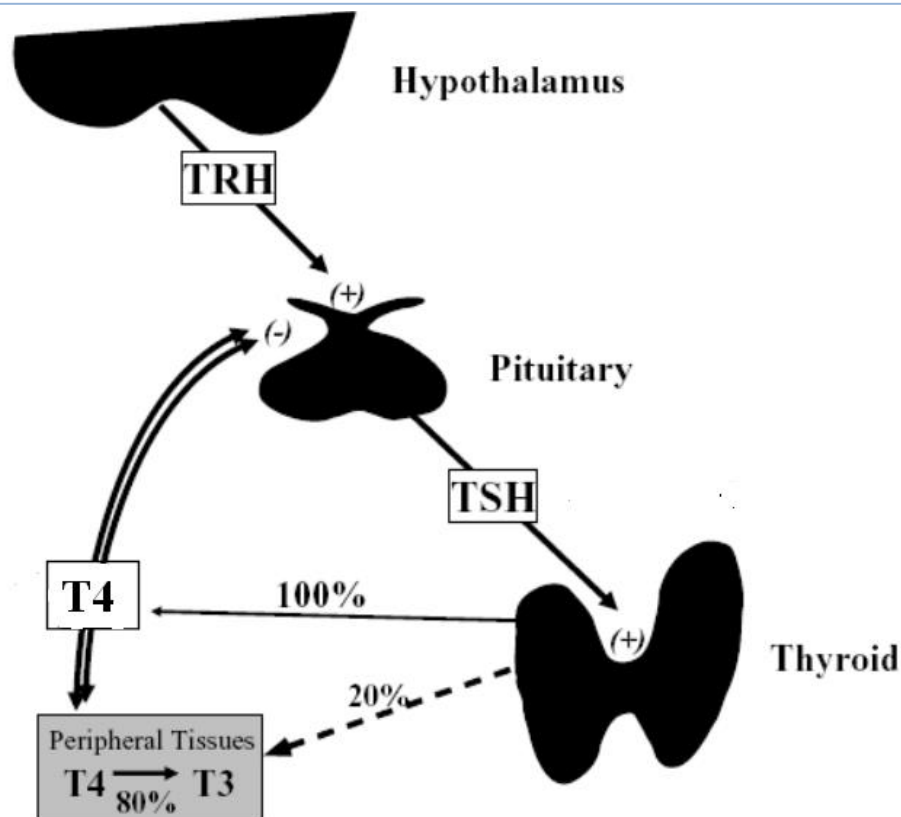
REGOLAZIONE DELLA PRODUZIONE DELL'ORMONE TIROIDEO –

La produzione di ormone tiroideo è regolata in due modi:

1. **Regolazione della biosintesi tiroidea e secrezione di T4 e T3** da parte della tireotropina (TSH).
 - La secrezione di TSH è inibita da T4 e T3 ed è stimolata da ormone di rilascio della tireotropina (TRH).
2. **Regolazione della conversione extratiroidea di T4 a T3** da parte di fattori nutrizionali, ormonali e associati alla malattia. L'effetto di questi fattori si differenzia nei diversi tessuti.

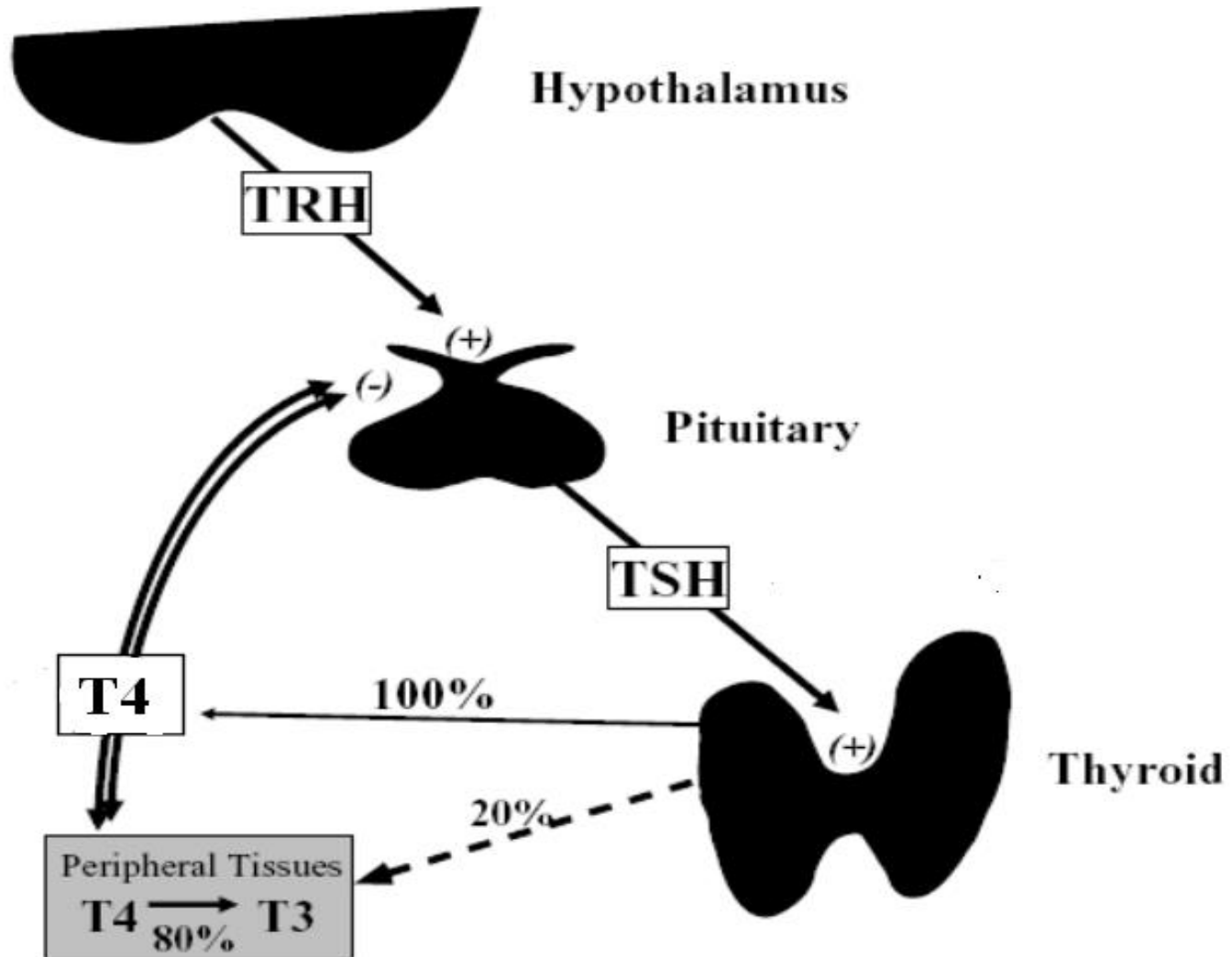
Il primo meccanismo è di difesa alle alterazioni della secrezione tiroidea, e il secondo varia la disponibilità di ormone tiroideo nei tessuti in risposta a malattie non tiroidee.

L'Attività della Tiroide è Controllata dall'Asse Ipotalamo-Ipofisario



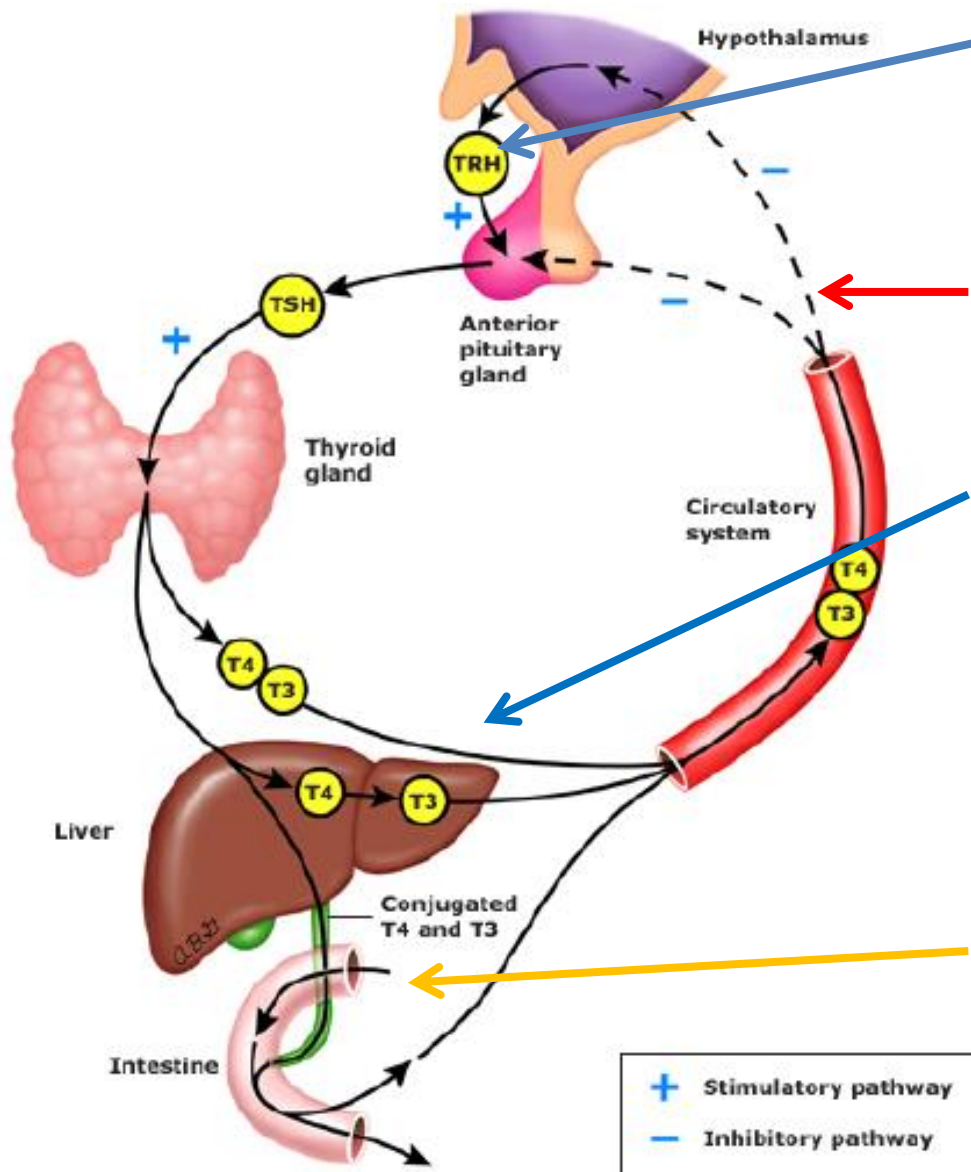
Il **TRH** (ormone rilasciante tireotropina) dell'**ipotalamo** stimola l'**ipofisi** a secernere **TSH** (tireotropina), il principale ormone trofico che controlla la biosintesi e il rilascio di T4 e T3. Tutto il **T4** in circolo deriva dalla tiroide, mentre solo il 20% del **T3** è il prodotto diretto della tiroide. La maggior parte del T3 circolante deriva dalla deiodinazione del T4 nei tessuti periferici.

L'Attività della Tiroide è Controllata dall'Asse Ipotalamo-Ipofisario



Il **T₄** è il principale ormone tiroideo responsabile del feedback negativo sulla secrezione del TSH dall'ipofisi, completando il circolo omeostatico.

Regolazione della produzione dell'ormone tiroideo



L'ormone rilasciante la tireotropina (TRH) aumenta la secrezione di tireotropina (TSH), che stimola la tiroide a sintetizzare T4 e T3.

T3 e T4 inibiscono la secrezione di TSH, sia direttamente che indirettamente sopprimendo il rilascio di TRH.

T4 viene convertito a T3 nel fegato e in molti altri tessuti per azione della T4-5'-deiodinasi.

Una parte di T4 e di T3 viene coniugata nel fegato con glucuronide e solfato, escreta poi nella bile, e parzialmente idrolizzata nell'intestino.

Una parte di T4 e di T3 viene riassorbita nell'intestino.

Interazioni farmacologiche possono avvenire in qualsiasi di questi siti.

Tireotropina (TSH) –

TSH è una glicoproteina sintetizzata e secreta dai tireotrofi dell'ipofisi anteriore, composta da una subunità alfa, uguale a quella dell'ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH) e gonadotropina corionica (hHCG). Al contrario, la subunità beta è specifica per l'attività biologica del TSH.

La secrezione del TSH è pulsatile, e le concentrazioni sieriche sono 50-100% più alte in tarda serata che durante il giorno.

Meccanismo d'azione del TSH –

- ❑ Stimola ogni passo della sintesi degli ormoni tiroidei e la loro secrezione.
- ❑ Stimola il metabolismo intermedio e l'espressione di molti geni e provoca ipertrofia e iperplasia tiroidea.

Le azioni del TSH sono avviate dal legame a specifici recettori della membrana plasmatica, che attiva l'adenilato-ciclastasi, aumentando la formazione AMP ciclico, che poi attiva diverse proteina chinasi.

Regolazione della produzione extratiroidea di T3 –

- L'attività della **T4-5'-deiodinasi tipo I**, l'enzima che predomina nel fegato e rene
 - è diminuita in caso di digiuno, ipotiroidismo, diabete, uremia, malattie non tiroidee
 - è aumentata in caso di ipertiroidismo, glucosio più insulina, e elevato apporto calorico.
- L'attività della **T4-5'-deiodinasi tipo II**, che predomina nel cervello, adenoipofisi e muscolo
 - aumenta in caso di ipotiroidismo: serve a ridurre l'impatto su questi tessuti del deficit tiroideo, aumentando la disponibilità di T3 per mantenere la crescita e la funzione dei neuroni e dell'adenoipofisi.
 - diminuisce in caso di ipertiroidismo.

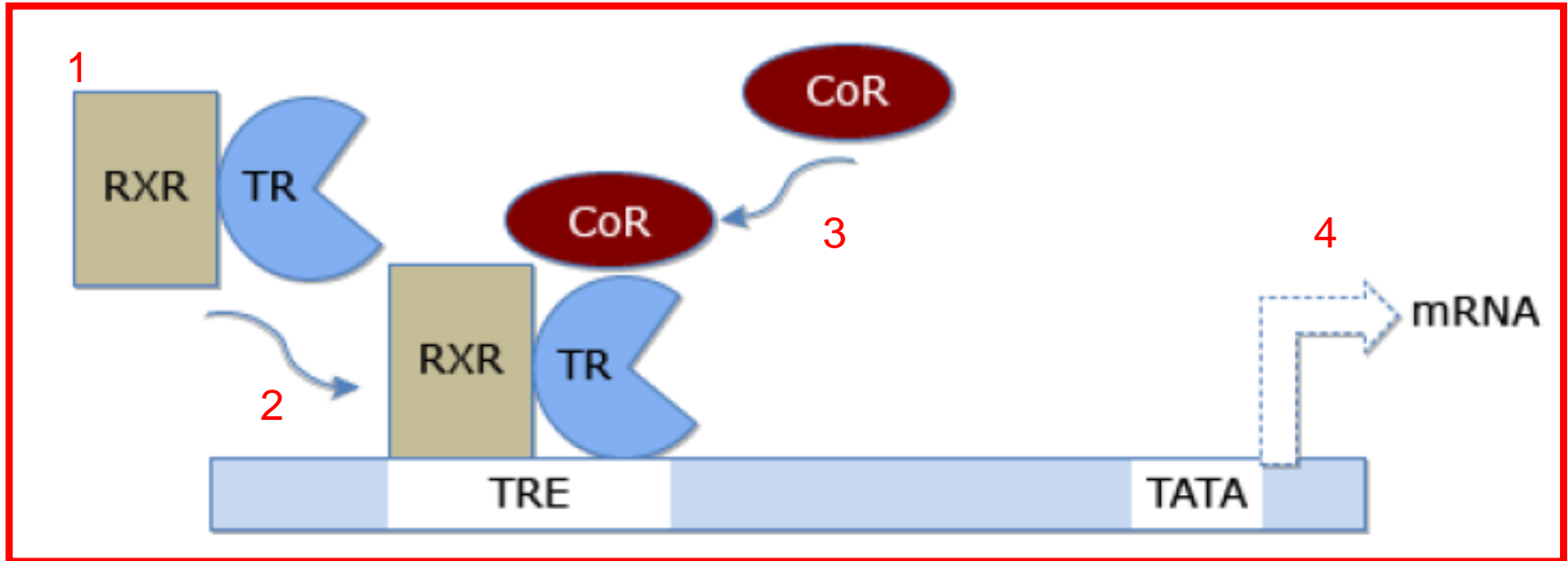
Azione dell'ormone tiroideo

Gli ormoni tiroidei sono essenziali per lo sviluppo cerebrale e somatico dei bambini e per le attività metaboliche degli adulti; influenzano la funzione di quasi tutti gli organi.

La loro disponibilità è mantenuta da:

- Grosse riserve di ormone in circolo e nella tiroide.
- Biosintesi e secrezione tenute entro limiti stretti da un meccanismo di regolazione che è molto sensibile a piccole variazioni di ormone circolante.

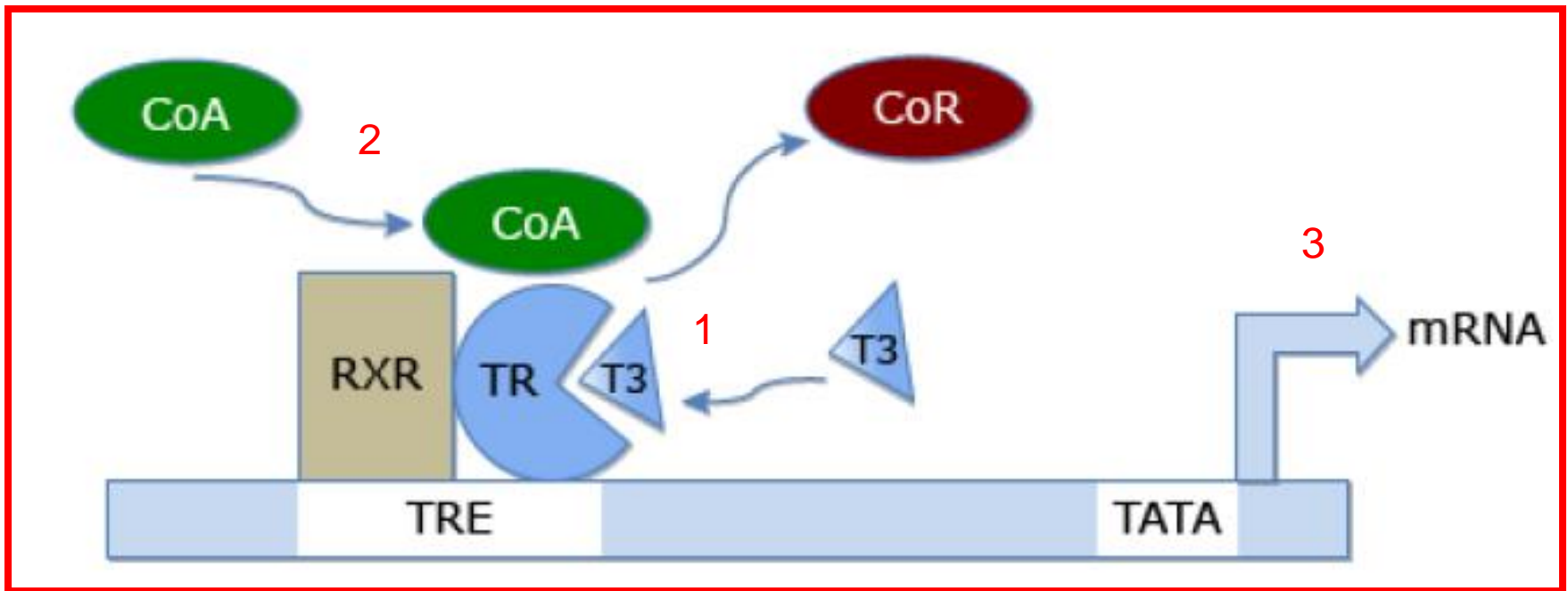
Mediazione dell'azione dell'ormone tiroideo



In assenza di T3, il recettore dell'ormone tiroideo (TR)

1. Eterodimerizza con il recettore X dei retinoidi (RXR),
2. L'eterodimero si lega a un elemento di risposta dell'ormone tiroideo (TRE)
3. Recluta il co-repressore (CdR), con conseguente silenziamento genico (4).

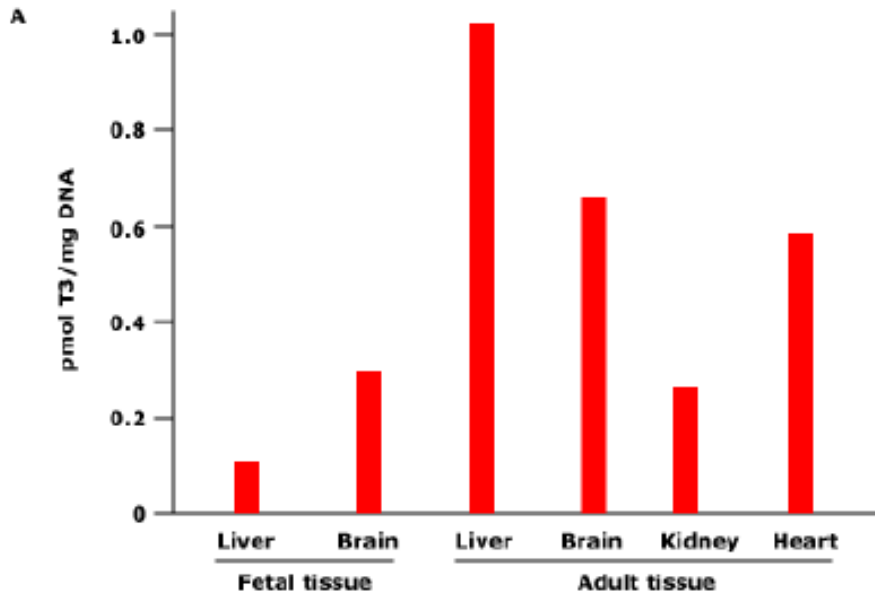
Mediazione dell'azione dell'ormone tiroideo



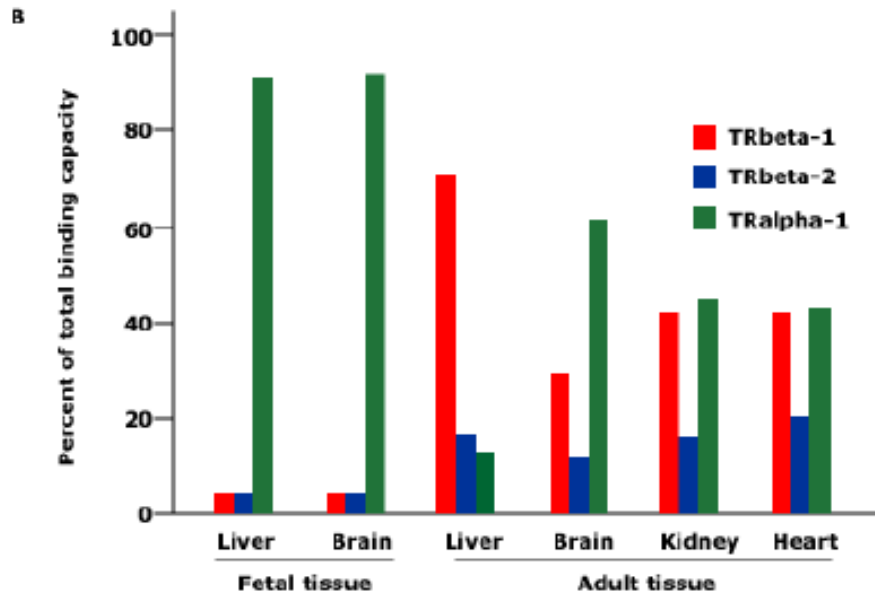
In presenza di T3

1. Il legame con T3 rompe il legame del co-repressore (CoR) all' eterodimero [recettore dell'ormone tiroideo (TR) - recettore del retinoide X (RXR)]
2. promuove il legame del coattivatore (CoA), e aumenta l'espressione di mRNA (3).

Distribuzione dei recettori degli ormoni tiroidei in diversi tessuti



A.
Capacità di legame della triiodotironina totale (T3) nei nuclei di diversi tessuti.



B.
Distribuzione di diverse isoforme di TR, determinate da dosaggi con anticorpi isoforma-specifici.

AZIONE DELL'ORMONE TIROIDEO SU OSSO, CUORE E REGOLAZIONE DEL METABOLISMO –

Ossa e sviluppo osseo –

- Nei neonati affetti da ipotiroidismo congenito non trattato lo sviluppo delle epifisi è ritardato.
- Nell'osso sono espresse tutte le isoforme di TR, che interagiscono con altri recettori nucleari, compresi quelli per la vitamina D e i retinoidi.
- Le concentrazioni sieriche di osteocalcina sono correlate positivamente con lo stato della tiroide, e nell'osso i livelli di mRNA dell'osteocalcina sono stimolati da T3 con pattern regione-specifico, in parallelo a quelle aree che sono più suscettibili all'osteoporosi nei pazienti con ipertiroidismo.
- La perdita ossea mediata dall'ormone tiroideo è il risultato dello innalzamento dell'azione delle catecolamine da parte del TR-alfa .

Espressione genica nel cuore –

Il cuore è un target importante per l'azione degli ormoni tiroidei.

Regolazione del metabolismo –

L'ormone tiroideo regola la velocità del metabolismo ed è associato a modeste variazioni del peso corporeo.

Il TR-alfa è importante per il rafforzamento dell'azione adrenergica mediata dall'ormone tiroideo.

Esiste un collegamento diretto tra lo stato tiroideo e la risposta alla stimolazione adrenergica nel grasso sottocutaneo.

Il difetto del metabolismo ossidativo mitocondriale, che si riscontra nel diabete di tipo 2 e nella sindrome metabolica, sembra collegato alla ridotta azione degli ormoni tiroidei.

L'ormone tiroideo regola anche il metabolismo interagendo con altri recettori nucleari metabolici.

Patologia della Tiroide

1. Alterazioni dello sviluppo (agenesia, ipoplasia)
2. Errori biosintetici congeniti (alterata produzione ormonale)
3. **Danni tossici o nutrizionali** 200 milioni di persone al mondo
 1. Gozzo endemico: $\geq 10\%$ bambini affetti nella popolazione mondiale
 2. Carenza di iodio nella dieta
 3. Ingestione di sostanze gozzigene (manioca)
4. **Malattie autoimmuni**
 1. M. di Graves,
 2. Tiroidite di Hashimoto

Concorso di fattori genetici, ambientali e ormonali

Autoanticorpi verso: recettore del TSH (TSHR), tireoperossidasi (TPO) e tireoglobulina (TG),

TSHR-Ab \rightarrow stimolanti

\rightarrow soppressori

Effetti distruttivi

* immunità cellulo-mediata

* anticorpi citotossici

5. Tumori benigni e maligni

A. Tumori Epiteliali Primari

- Tumori delle cellule follicolari
 - Benigni: adenoma follicolare
 - Maligni:
 - ✓ Carcinoma differenziato
 - ✓ Carcinoma indifferenziato
- Tumori delle cellule C-parafollicolari
 - Carcinoma midollare tiroideo
- Tumori delle cellule follicolari e parafollicolari
 - Carcinoma misto follicolare-midollare

B. Tumori Non-epiteliali Primari

- Linfomi tiroidei
- Sarcomi tiroidei

C. Tumori tiroidei Secondari (metastasi)

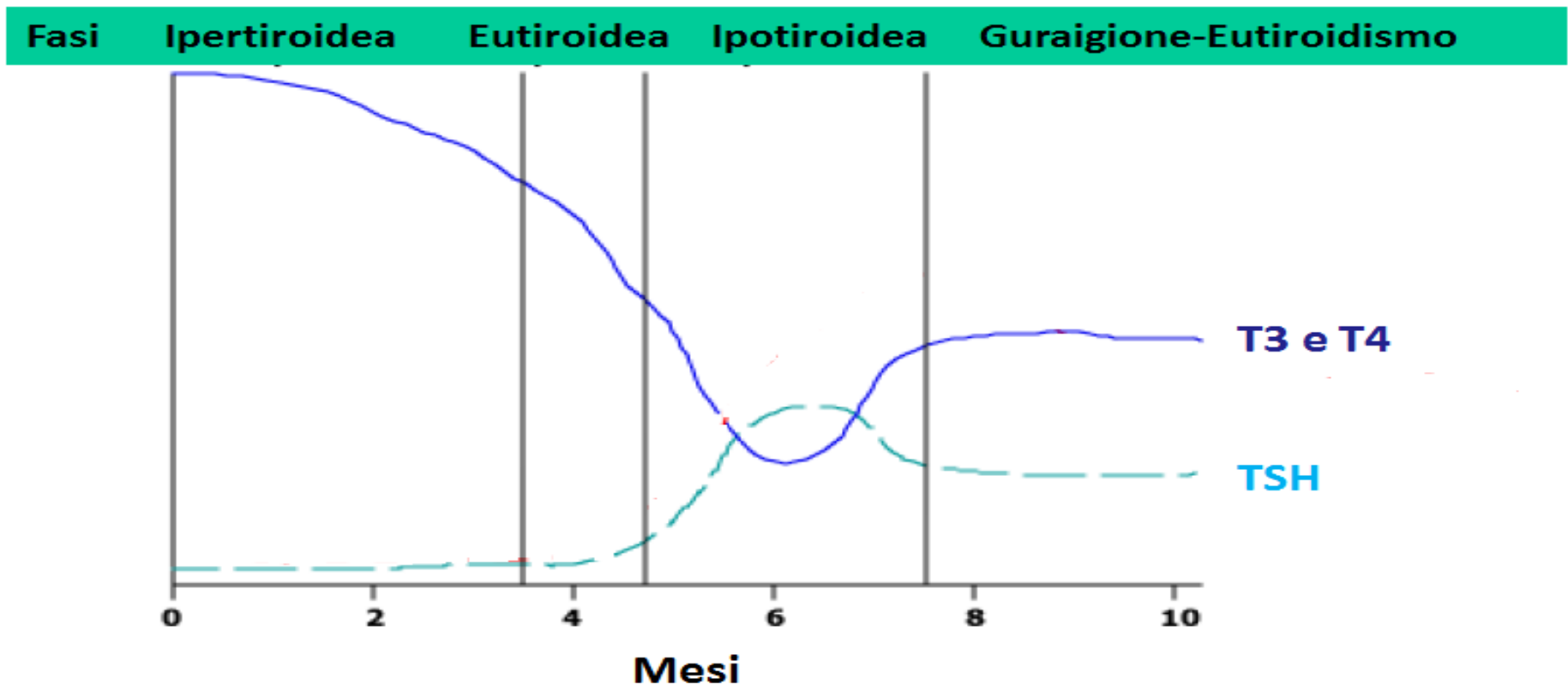
Cause di tiroidite in base alla presenza o assenza di dolore

malattia	sintomi	causa
Con dolore tiroideo		
Tiroidite subacuta	Tiroidite subacuta granulomatosa	Infezione virale o infiammazione post-virale
	Tiroidite subacuta non-suppurativa	
	Tiroidite di de Quervin	
Tiroidite infettiva	Tiroidite acuta o cronica	microrganismi G+ e G-
Tiroidite da radiazione		M.Graves trattato con radioiodio
Tiroidite da trauma		
Senza dolore tiroideo		
Tiroidite indolore	Tiroidite silente	Autoimmune (variante di tiroidite di Hashimoto)
	Tiroidite linfocitaria con ipertiroidismo a risoluzione spontanea	
	Tiroidite linfocitaria subacuta	
Post-partum	Tiroidite post-partum	Entro 1 anno dal parto (anti-TPO Ab e anti-TG Ab)
Tiroidite da trauma		Infiammatoria

Cause di tiroidite base alla presenza o assenza di dolore

malattia	sintomi	causa
Senza dolore tiroideo		
Associata a farmaci	Interferone alfa	Esacerbazione di tiroidite autoimmune sottostante
	Interleuchina 2	In pz con cr. metastatico o leucemia
	amiodarone	↑ sintesi ormonale o eccessivo rilascio per danno tiroideo ↓ sintesi ormonale per azione antitiroidea dello iodio
	Litio	ipertiroidismo
Tiroidite linfocitaria cronica	Tiroidite di Hashimoto	Autoimmune e cronica
Tiroidite fibrosa	Tiroidite di Riedel	Anticorpi anti-tiroide
	Tiroidite invasiva	

Decorso caratteristico della tiroidite (indolore, post-partum, subacuta)

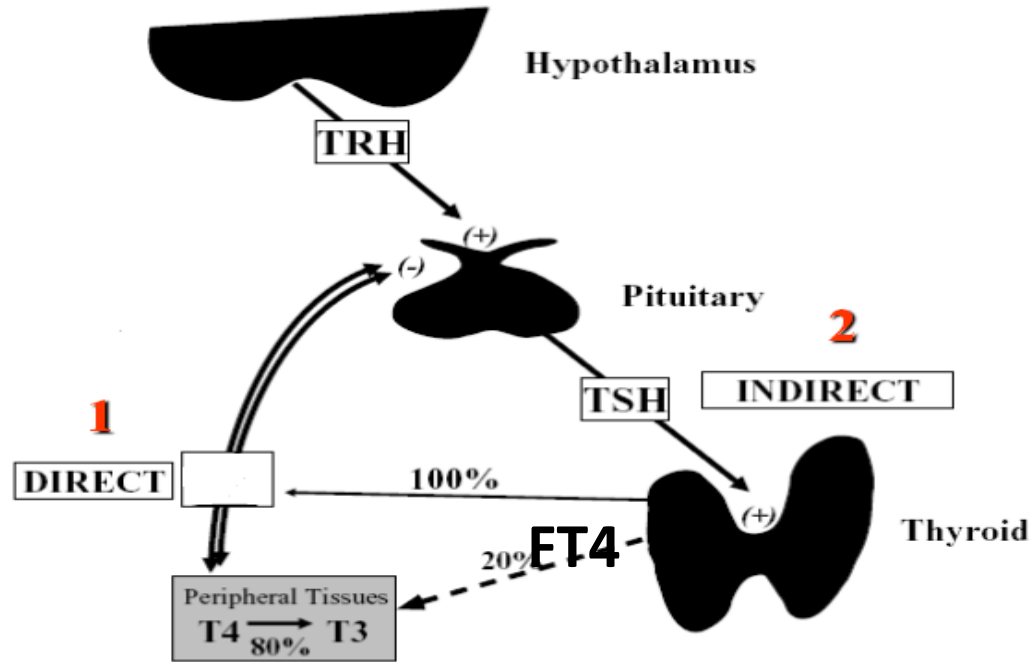


Inizialmente l'infiammazione danneggia i follicoli e attiva proteolisi della tireoglobulina all'interno dei follicoli con rilascio in circolo sregolato di grosse quantità di T4 e T3 e quindi **ipertiroidismo**. Questo stato dura solo fino all'esaurimento dei depositi di tireoglobulina, perché la neosintesi dell'ormone cessa. Al ridursi dell'infiammazione, i follicoli tiroidei si rigenerano e riprendono a sintetizzare ormone. Ci può essere un **periodo transitorio di ipotiroidismo** con aumentata secrezione di TSH prima che **la secrezione tiroidea si normalizzi**.

Tuttavia, **alcuni pazienti hanno solo ipertiroidismo o ipotiroidismo**.

La valutazione di laboratorio della funzione tiroidea

Il TSH è l'Approccio più Sensibile per Individuare Distiroidismi



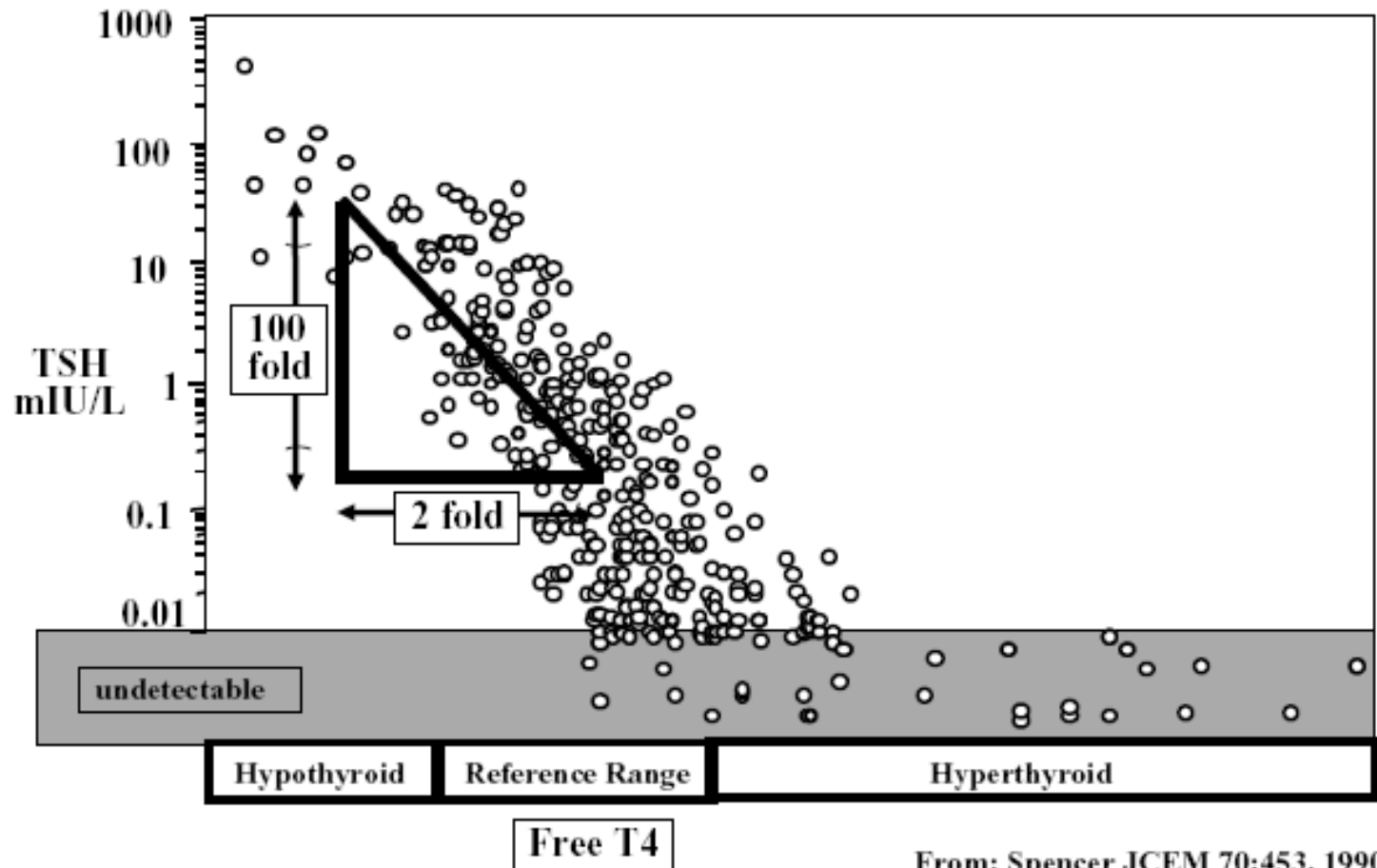
Esistono due modi per valutare la funzione tiroidea:

- 1 - l'approccio diretto**, che consiste nella misura dell'ormone tiroideo dominante, T4, misurato come ormone libero (FT_4) per superare l'effetto dei legami proteici;
- 2 - l'approccio indiretto**, **TSH**, che riflette inversamente lo stato ormonale tiroideo a livello dei tessuti (e dell' ipofisi). E' ora molto chiaro che la fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisario indica che **la misura del TSH è l'approccio più sensibile per individuare le disfunzioni tiroidee.**

Il Potere Diagnostico del TSH è dato dalla Relazione TSH/FT₄

La **relazione Log-Lineare** indica che le alterazioni di FT₄ sono amplificate nel TSH

Per esempio una variazione di 2 volte del FT₄ produce una variazione di 100 volte del TSH



La funzione della tiroide è accertata meglio dalla misura del TSH serico, a patto che sussistano seguenti condizioni:

- steady state (malattia stabilizzata)
- assenza di malattia ipotalamo-ipofisaria (secondaria a patologia ipotalamica).

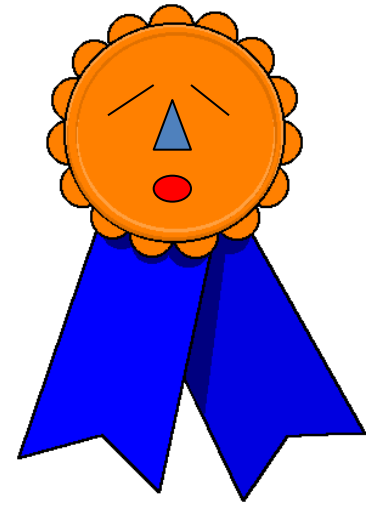
Tuttavia, la misura diretta degli ormoni tiroidei nel siero rimane importante in molti pazienti, perchè in alcuni casi è difficile essere certi dello stato della funzione ipotalamo-ipofisaria.

Quindi:

I TEST DI LABORATORIO USATI PER ACCERTARE LA FUNZIONE TIROIDEA SONO —

Concentrazione nel siero di **TSH**

Concentrazione nel siero di T4 (o T3) liberi (**FT4, FT3**)

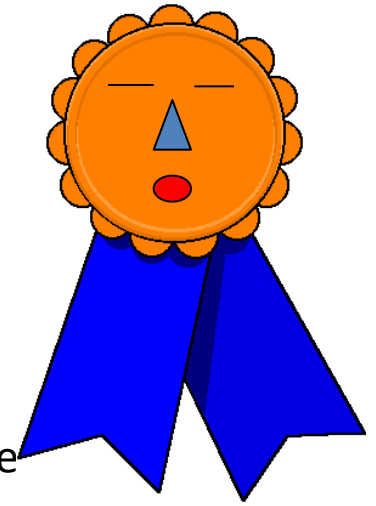


S-TSH — 1^a Generazione

RIA di prima generazione aveva un limite di rilevamento (Detection Limit-DL) insoddisfacente, circa 1 mU/L.

Dato che il range normale è circa 0.4-5.0 mU/L, questi dosaggi erano utili per la diagnosi di ipotiroidismo primario (in cui S-TSH è molto elevato), ma non avevano sufficiente sensibilità nel distinguere livelli normali da livelli bassi, tipicamente presenti nella maggior parte dei pazienti con ipertiroidismo.

S-TSH — 2^a Generazione

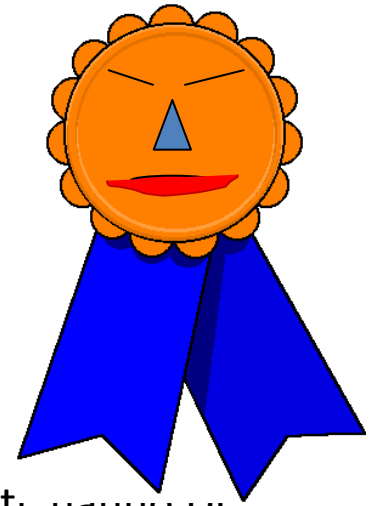


Dosaggi immunometrici di seconda generazione avevano DL dieci volte circa 0.1 mU/L.

Siccome questo limite era un po' sotto il range di normalità del TSH (circa 0.4-5.0 mU/L), questi test potevano essere usati nello screening per distinguere ipertiroidismo da eutiroidismo oltre che ipotiroidismo.

Tuttavia, dato che il range sotto la norma è molto limitato, valori prossimi al DL non distinguono il grado di ipertiroidismo e, inoltre, certe carenze del controllo di qualità in alcuni laboratori potevano dare valori decisamente erranei.

S-TSH — 3^a Generazione



Dosaggi chemiluminometrici di terza generazione, attualmente usati, hanno un limite di sensibilità intorno allo 0.01 mU/L.

Quindi evidenziano anche lievi ipertiroidismi, anche in condizioni di controllo di qualità poco soddisfacente.

Per rilevare valori nel range dell'ipertiroidismo servono queste misure di terza generazione con sensibilità funzionale di almeno ≤ 0.05 mU/L.

S-TSH —

Attualmente il limite superiore di normalità è controverso.

- La maggior parte dei laboratori riporta valori di circa 4.5-5.0 mU/L.
- **National Academy of Clinical Biochemistry** sostiene che questo sia ridotto a 2.5 mU/L perchè il 95% di volontari eutiroidei accertati presentano valori tra 0.4 e 2.5 mU/L.
 - **National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)** dimostra l'importanza di range di normalità in base all'età. Lo studio comprende oltre 16mila individui e dimostra uno spostamento verso valori più alti negli anziani, anche dopo avere escluso quelli anti-TPO-positivi. (97.5 centile per TSH in soggetti tra 20-29 anni era 3.56 mU/L, mentre sopra gli 80 anni era 7.49 mU/L).

S-T4 libero (FT4) e S-T3 libero (FT3) —

Il razionale degli ormoni liberi è che l'ormone libero, cioè non legato, è quello che viene captato dalle cellule per poi interagire con i recettori nucleari.

Poiché vari farmaci e varie malattie alterano le concentrazioni delle proteine leganti o le loro interazioni con T4 e T3, le concentrazioni di ormone libero e totale possono essere discordanti. Un esempio è l'eccesso di TBG indotto dagli estrogeni in cui le concentrazioni di T4 totale sono elevate per l'aumento di ormone legato a TBG, ma le concentrazioni di T4 libero, fisiologicamente importanti, sono normali.

E' quindi necessario misurare le concentrazioni di ormone libero.

Diversi test sono disponibili per la misura del T4 libero (FT4) —

1. **Dialisi di equilibrio** (solo nei laboratori di riferimento)
2. **Misura “diretta”** dell’ormone libero (nei laboratori clinici)

Siccome questi metodi non misurano direttamente FT4, le linee guida suggerirebbero di chiamarli “**test di stima del T4 libero**” .

FT4 “diretto” —

E' la misura più frequente, esistono vari metodi commerciali, ma nessuno misura proprio il T4 non legato, ma ben di più, perchè l'ormone libero rappresenta solo lo 0.03% del T4 totale.

Il vantaggio percepito è che la confusione riguardo le alterazioni con le proteine leganti risulta comunque mitigata.

Lo svantaggio è che nessuno dei kit commerciali fornisce valori corretti di F-T4 per tutte le alterazioni di legame che sono state descritte.

La misura “diretta” di FT4 durante la gravidanza può essere infatti inattendibile.
Gli intervalli di riferimento variano a seconda dei metodi usati.

FT3 “diretto” —

Sono disponibili ed usualmente utilizzati dai nostri laboratori. Valgono gli stessi concetti espressi riguardo il FT4.

USO CLINICO DEI TEST DI FUNZIONE TIROIDEA

I test di funzione tiroidea sono usati per:

1. Screening della funzione tiroidea
2. Accertamento dell'adeguatezza della terapia dell'ipotiroidismo con levotiroxina
3. Monitoraggio del trattamento dell'ipertiroidismo.

USO CLINICO DEI TEST DI FUNZIONE TIROIDEA

S-TSH

S-FT4

S-FT3

Condizione clinica

Normale funzione ipotalamo-ipofisaria

Normale	Normale	Normale	Eutiroidismo
Normale	Normale o alto	Normale o alto	Ipertiroxinemia eutiroidica
Normale	Normale o basso	Normale o basso	Ipotiroxinemia eutiroidica
Normale	Basso	Normale o alto	Eutiroidismo: terapia con triiodotironina
Normale	Basso-normale o basso	Normale o alto	Eutiroidismo: terapia con estratto tiroideo
Alto	Basso	Normale o basso	Ipotiroidismo primario
Alto	Normale	Normale	Ipotiroidismo subclinico
Basso	Alto o normale	Alto	Ipertiroidismo
Basso	Normale	Normale	Ipertiroidismo subclinico

Alterata funzione ipotalamo-ipofisaria

Normale o alto	Alto	Alto	Ipertiroidismo mediato daTSH
Normale o basso	Basso o normale-basso	Basso o normale	Ipotiroidismo centrale

1. Screening per la disfunzione tiroidea

Screening dei pazienti ambulatoriali —

Va fatto nei pazienti a rischio.

E' dibattuto il suo costo-efficacia nella popolazione generale.

Per i pazienti ambulatoriali, qualora si debba impiegare un unico test, i dosaggi del **TSH** di terza generazione sono più sensibili e specifici di quelli del FT4.

Tuttavia, alcuni esperti raccomandano la misura di **entrambi TSH e FT4**, data la possibilità di commettere errori quando si misuri solo il TSH in pazienti con ipotiroidismo secondario (patologia ipofisaria) o centrale (patologia ipotalamica) o ipertiroidismo mediato da TSH.

Dato che questo approccio risulta più costoso è stata proposta la **seguinte strategia**: → →

Screening dei pazienti ambulatoriali —

Strategia

Regola:

- **S-TSH normale** (0,3-3,0 mU/L) — non servono altri test.
- **S-TSH alto** (>3,0 mU/L) — misura FT4 per determinare il grado di ipotiroidismo.
- **S-TSH basso** (<0,3 mU/L) — misura FT4 e FT3 per determinare il grado di ipertiroidismo.

Tuttavia:

- *misura sia TSH che FT4 se si sospetta malattia ipotalamica (es. donna giovane con amenorrea ed astenia).*
- *misura FT4 se il paziente ha sintomi convincenti di iper- o ipotiroidismo nonostante il TSH sia risultato normale.*

Screening dei pazienti ricoverati —

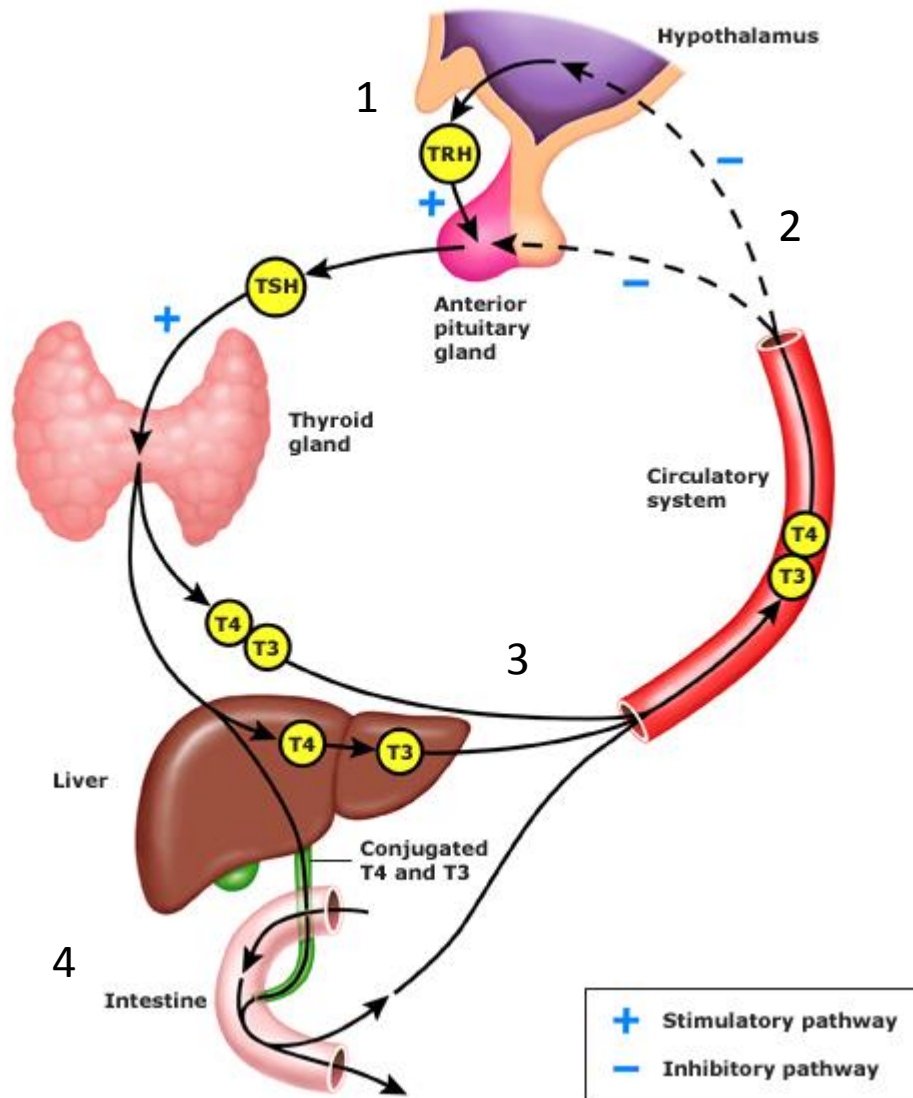
è più problematico e non è raccomandato, salvo che non si sospetti una malattia tiroidea, perchè nelle malattie gravi non-tiroidee compaiono alterazioni degli ormoni tiroidei e TSH, quali:

1. Alte concentrazioni di acidi grassi liberi, che spiazzano gli ormoni tiroidei dalle proteine di legame, innalzando FT4 e FT3;
2. Ipotiroidismo centrale acquisito;
3. Eventuale presenza di farmaci che alterano la funzione tiroidea.

Nel caso che si esegua comunque lo screening, si raccomanda l'uso dei due test TSH e FT4.

- farmaci che alterano la funzione tiroidea -

L'interazione può avvenire in ognuna delle vie del metabolismo dell'ormone tiroideo.



- 1- Thyrotropin-releasing hormone (TRH) aumenta la secrezione di tirotropina (TSH), che stimola la sintesi e la secrezione di T4 e T3 da parte della tiroide.
- 2- T3 e T4 inibiscono la secrezione di TSH sia direttamente che indirettamente, sopprimendo il rilascio di TRH.
- 3- T4 è convertito a T3 nel fegato e in molti altri tessuti per azione di T4 monodeiodinasi.
- 4- Parte di T4 e T3 viene coniugata con glucuronide e solfato nel fegato, escreto nella bile e in parte idrolizzato nell'intestino, dove può essere riassorbito

Farmaci che causano ipotiroidismo – Azioni

Inibizione di sintesi e/o rilascio di ormoni tiroidei

Ridotto assorbimento intestinale di T4

Immunodisregolazione - interferone-alfa, interleukina-2

Soppressione di TSH - dopamina

Possibile tiroidite distruttiva - sunitinib (inibitore della tirosina chinasi)

Aumentata clearance di T4 e soppressione di TSH - bexarotene

Farmaci che causano ipertiroidismo – Azioni

Stimolazione di sintesi e/o rilascio di ormoni tiroidei - iodio, amiodarone

Immunodisregolazione - interferone-alfa, interleukin-2

Farmaci che causano alterazione dei test di funzione tiroidea senza disfunzione reale della tiroide

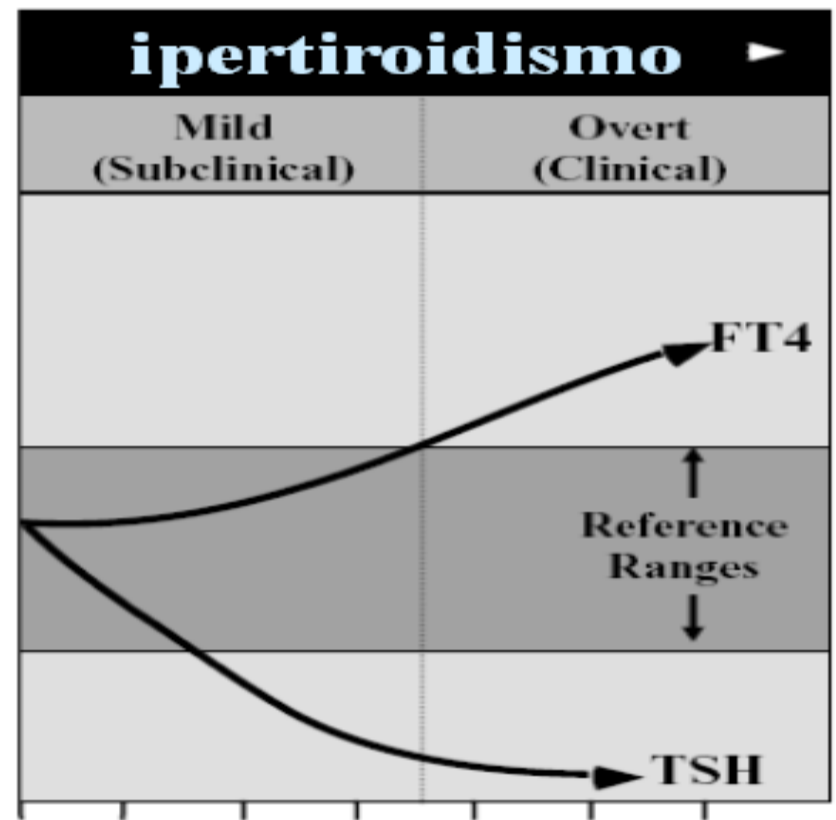
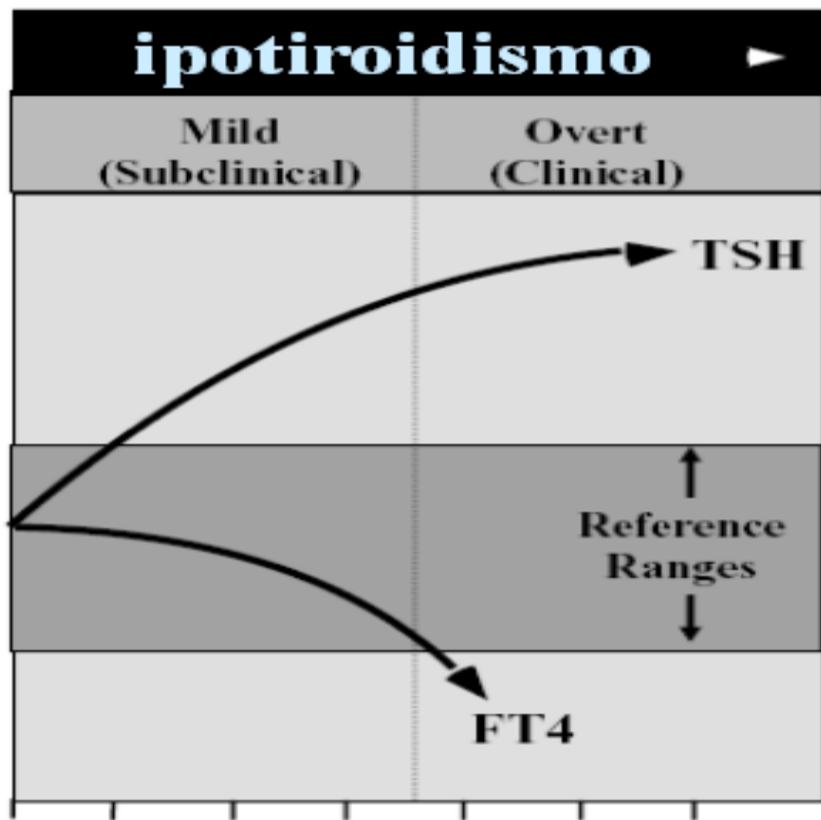
Ridotto legame di T4 a TBG - salicilati, furosemide, eparina (tramite acidi grassi liberi), certi FANS

Aumentata clearance del T4 – fenitoina, carbamazepina, rifampicina, fenobarbitale

Soppressione della secrezione di TSH - dobutamina, glucocorticoidi, octreotide

Alterata conversione di T4 a T3 - amiodarone, glucocorticoidi, agenti di contrasto (acido iopanoico), propiltiuracile, propranololo, nadololo.

I DISTIROIDISMI

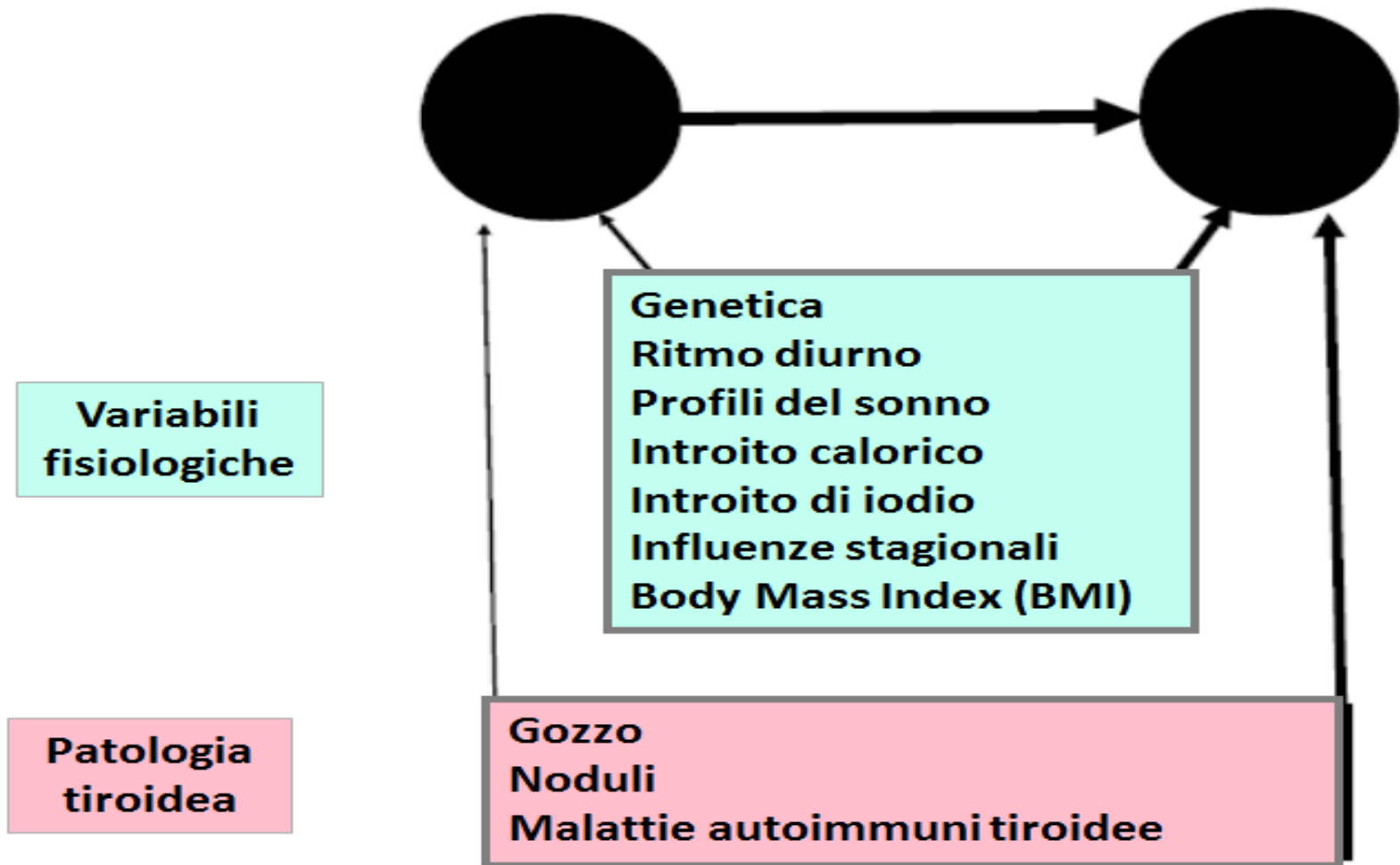


Months / Years

Durante lo sviluppo di **distiroidismo (ipotiroidismo o ipertiroidismo)**, la prima alterazione compare a carico del TSH non appena l'ipofisi avverte che si è spostato il valore usuale (setpoint) del T_4 .

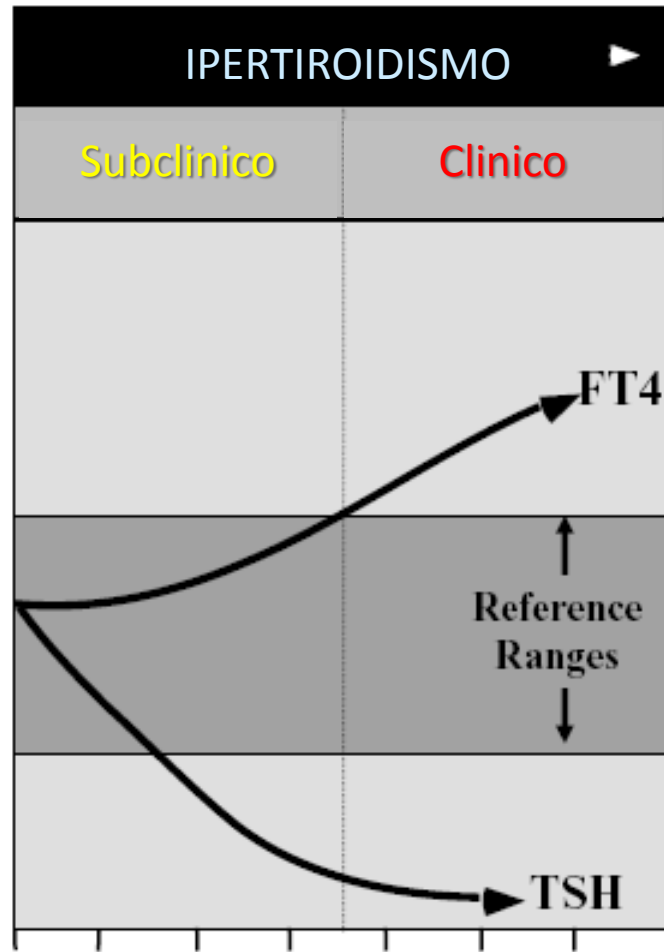
La malattia lieve, distiroidismo **subclinico**, è svelata dalla sola alterazione del **TSH**, mentre la malattia conclamata, distiroidismo **clinico**, è presente quando **sia TSH che FT_4** sono fuori dal loro intervallo di riferimento.

Fattori che contribuiscono alla variabilità interindividuale del TSH



Gli individui hanno differenti fattori patofisiologici che influenzano il TSH. La variabile più importante è la presenza di patologie della tiroide: gozzo, noduli e malattie autoimmuni della tiroide.

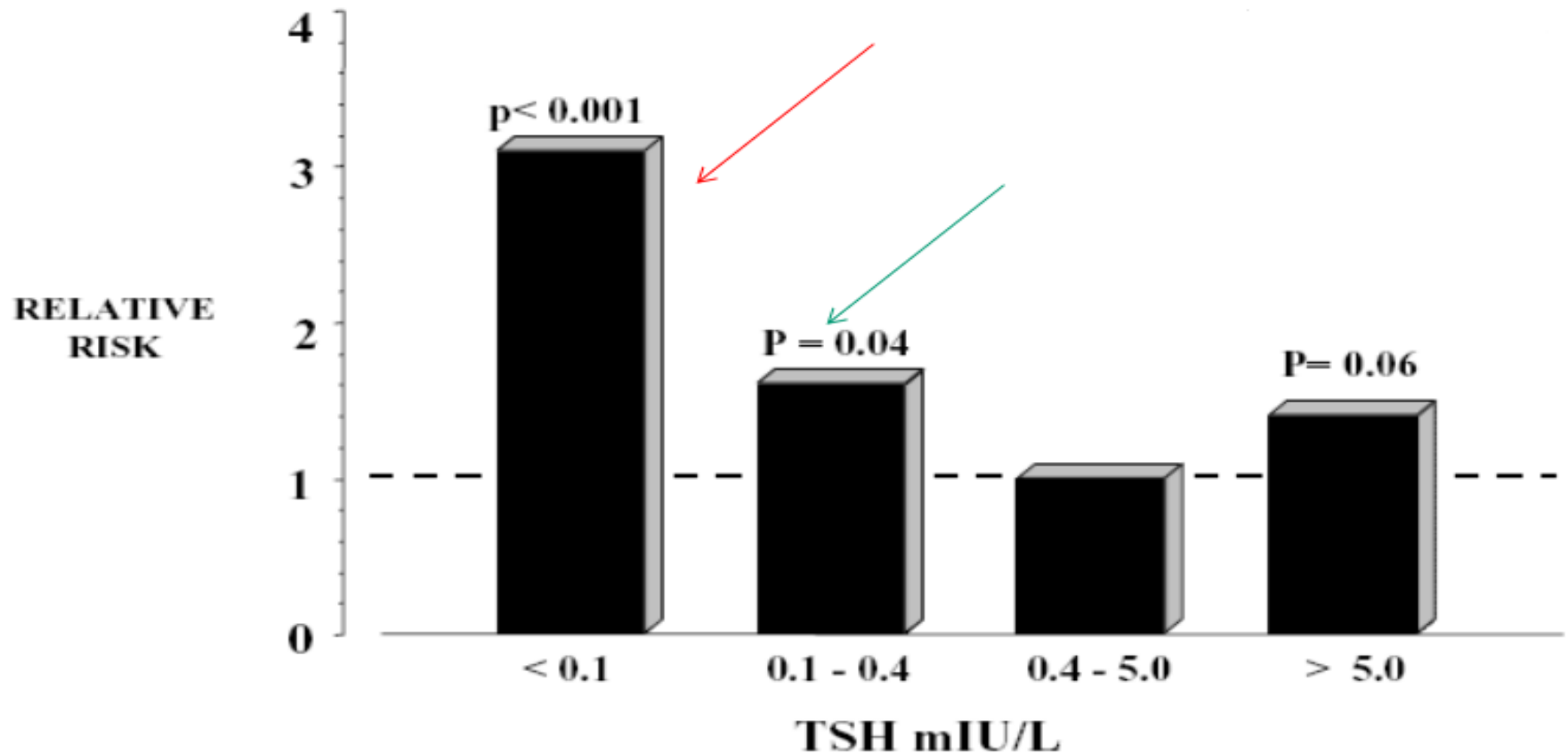
L'ipertiroidismo è caratterizzato dalle seguenti alterazioni



L'ipertiroidismo è un importante fattore di rischio per le seguenti patologie:

- fibrillazione atriale
- fratture osteoporotiche

Studio Framingham – Rischio Relativo di Sviluppo di Fibrillazione Atriale negli individui >60 anni con ipertiroidismo



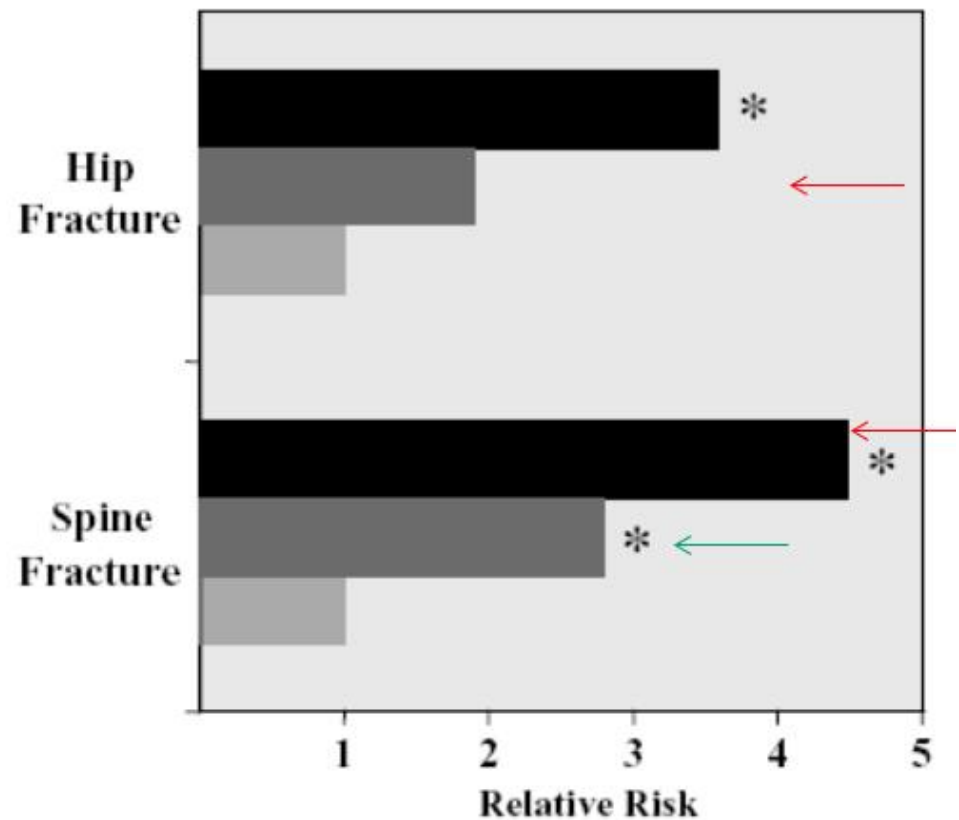
I soggetti >60 anni con TSH <0.1 mIU/L hanno un aumento di 3-volte del rischio di sviluppo di fibrillazione atriale (→).

Anche una soppressione del TSH di grado inferiore, cioè nel range 0.1-0.4 mIU/L (**ipertitoidismo subclinico**) comporta un aumentato rischio di fibrillazione atriale (→).

Iperitiroidismo – Lo Studio delle Fratture Osteoporotiche

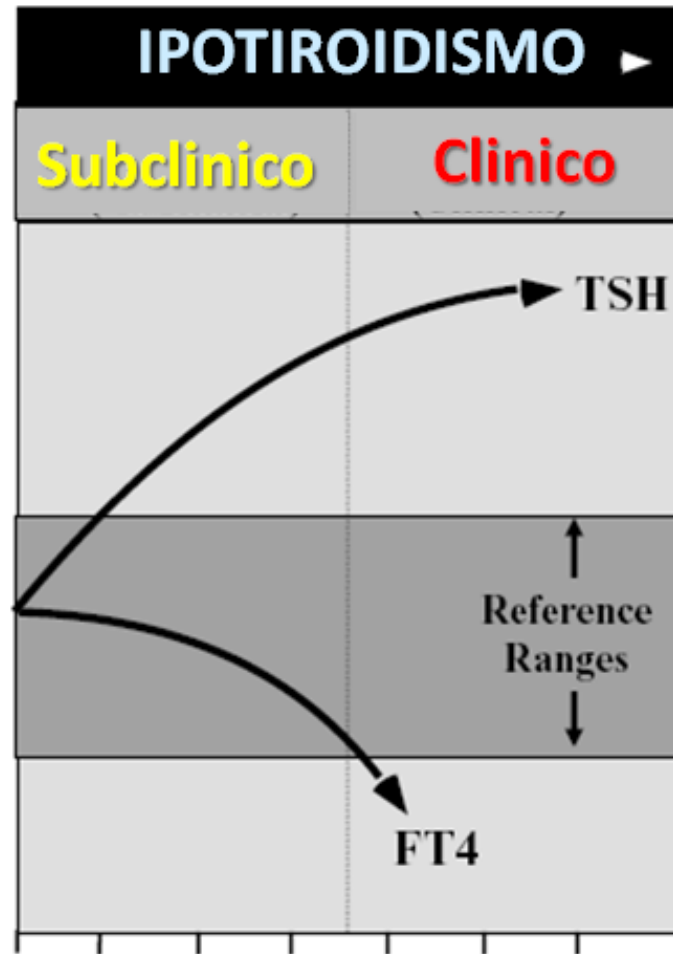
- Prospective Cohort Study
- 686 from Cohort of 9704 women
- Age >65 yrs
- Data Adjusted by Multifactorial Analysis

1. Previous Hyperthyroidism
2. Age
3. Self-Rated Health
4. Estrogen Use
5. Thyroid Hormone Use



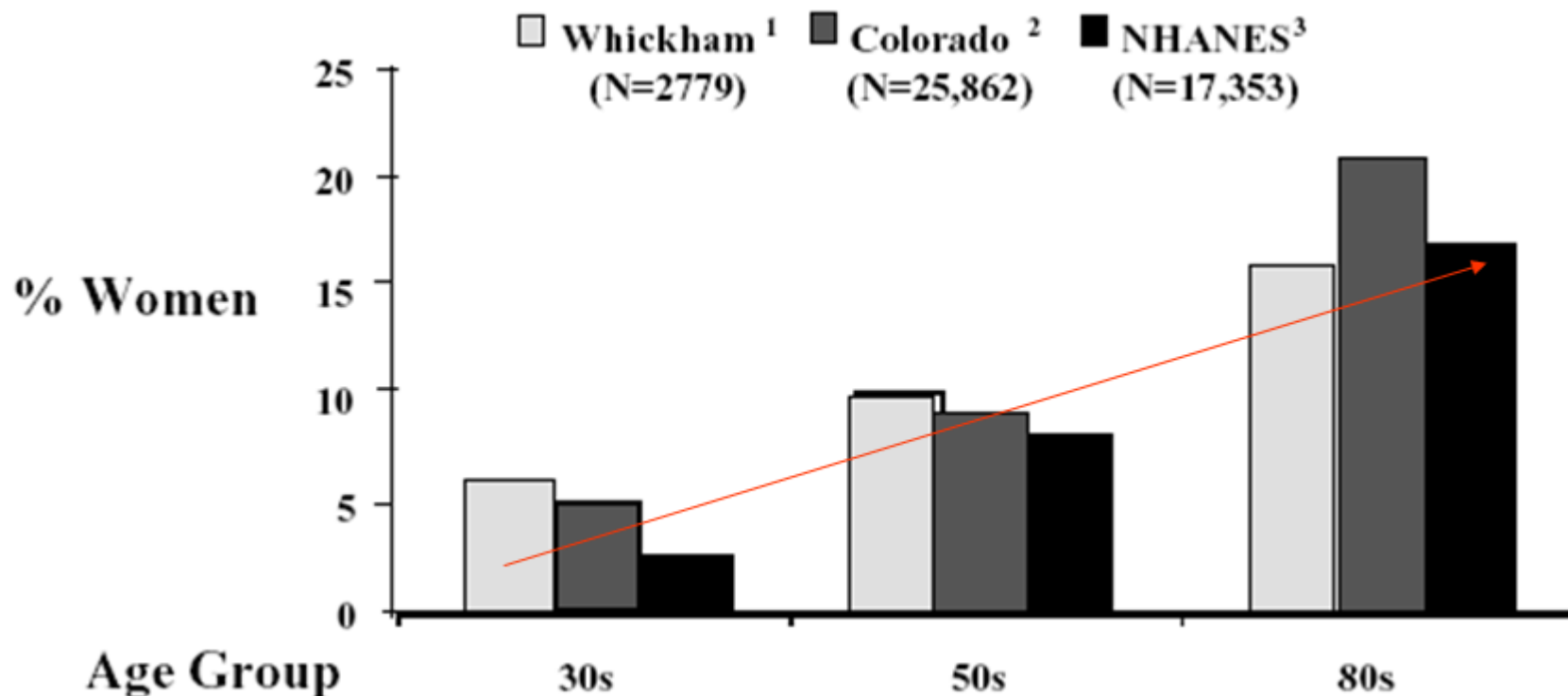
Il rischio aumenta nelle donne in età avanzata con basso TSH e lo si ritrova, specialmente per la colonna vertebrale (→), anche nei casi di TSH marginalmente soppresso (ipertiroidismo subclinico) (0.1-0.5 mIU/L) (→)

L'ipotiroidismo è caratterizzato dalle seguenti alterazioni



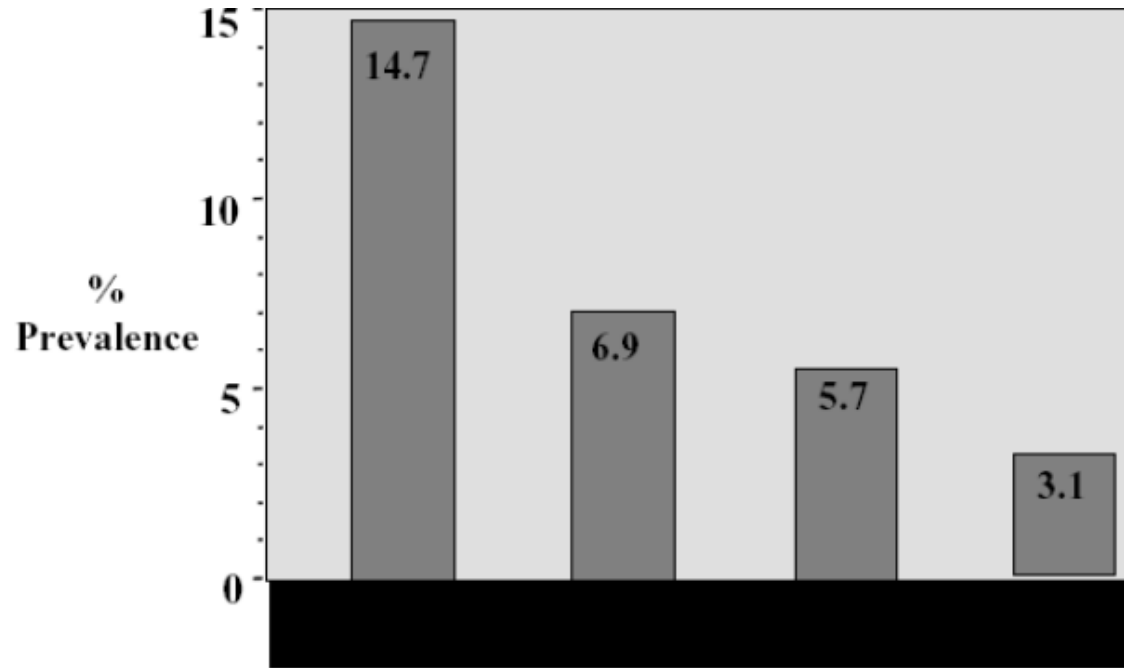
L'ipotiroidismo è prevalente nelle donne di età avanzata con eziologia autoimmune

Prevalenza di Ipotiroidismo Subclinico in Donne di Diversi Gruppi di Età



Le **tiroiditi autoimmuni**, soprattutto quella di Hashimoto, che portano ad ipotiroidismo sono molto comuni. La prevalenza di ipotiroidismo subclinico è elevato nelle donne ed aumenta con l'età, come dimostrato da tre grossi studi.

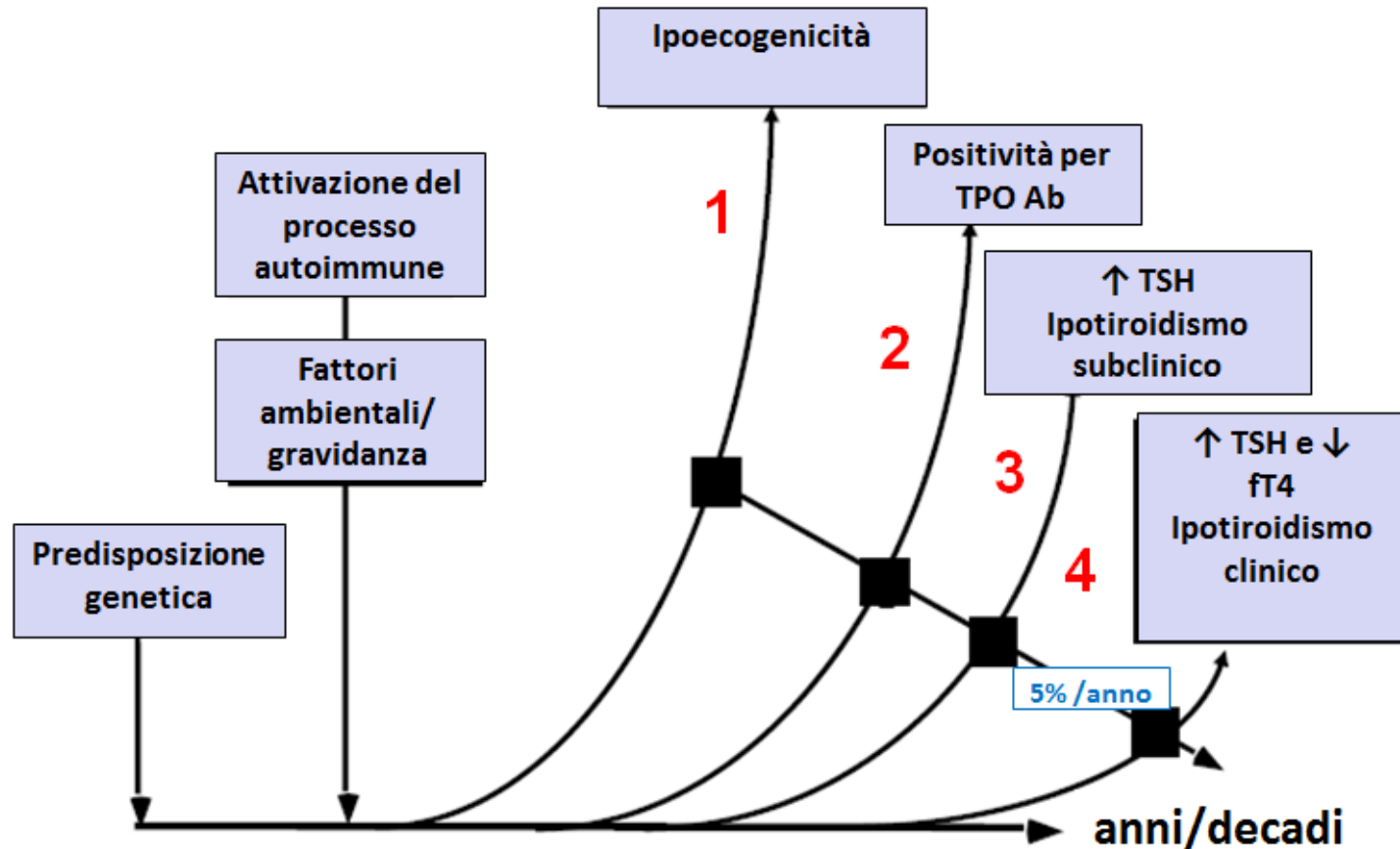
NHANES - Prevalenza di Anticorpi anti-Tiroide



→ Odds Ratio for Overt Hypothyroidism	23.5	6.9	1.1
→ Odds Ratio for Subclinical Hypothyroidism	11.7	4.0	1.5

Gli autoanticorpi anti-tiroide sono un marker di tiroidite autoimmune e sono molto prevalenti nella popolazione. Gli anticorpi anti-perossidasi tiroidea (TPOAb), sono il tipo di anticorpi dominante, e spesso sono associati a anticorpi anti-Tireoglobulina (TgAb). Il rischio (OR) di ipotiroidismo manifesto (→) o subclinico (→) è strettamente correlato alla presenza di TPOAb, specialmente quando si associano TgAb, ma non per TgAb da soli: per la diagnosi di tiroidite autoimmune TPOAb è l'unico test necessario.

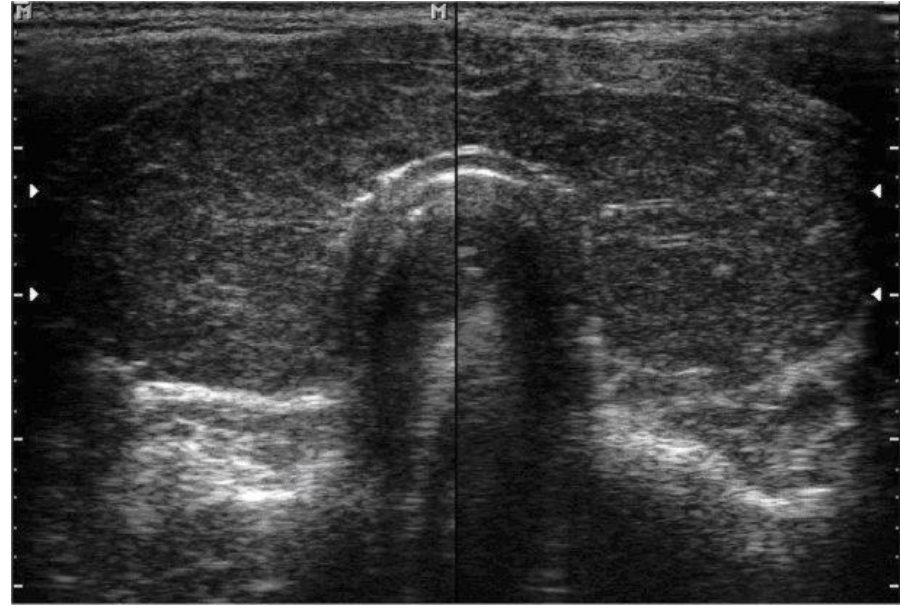
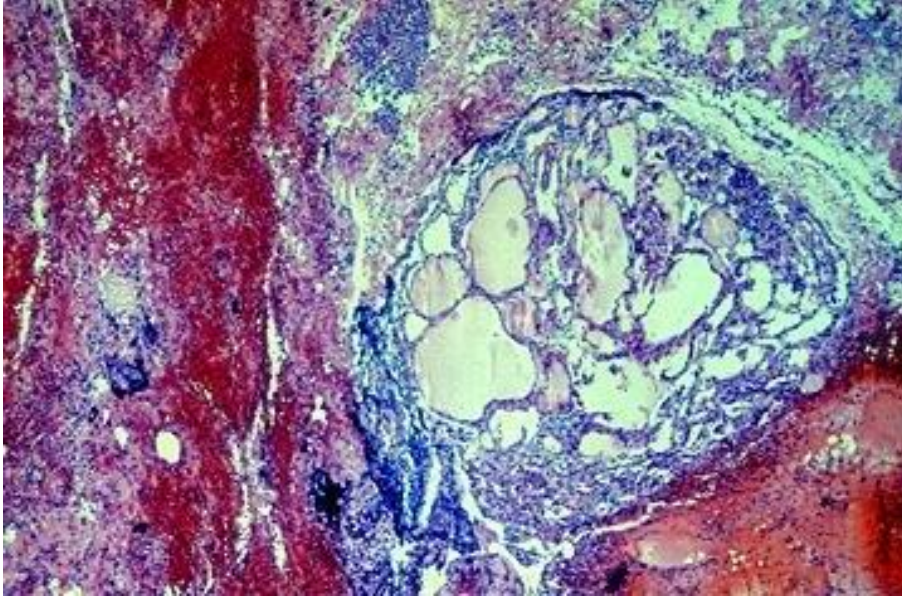
Sviluppo della Disfunzione Tiroidea Autoimmune



Nella progressione della tiroidite di Hashimoto la ipoecogenicità **(1)** precede la presenza di anticorpi anti-TPO **(2)**.

Nel procedere della malattia, l'ipotiroidismo lieve (subclinico, solo aumento di TSH) **(3)** progredisce ad ipotiroidismo conclamato (alto TSH/basso FT₄) **(4)** con una velocità del 5%/anno circa.

TIROIDITE DI HASHIMOTO



L'istologia tiroidea è sovvertita da:
infiltrazione linfocitaria, atrofia
parenchimale e fibrosi.

Spesso la tiroide aumenta di volume,
raramente si riduce.

La tiroide riduce progressivamente la
sintesi degli ormoni tiroidei sino alla
comparsa di ipotiroidismo subclinico,
prima, e clinicamente manifesto, dopo.

L'ecografia tiroidea svela una
disomogeneità diffusa su uno
sfondo ipoecogeno.

ANTICORPI ANTITIROIDE —

Diversi anticorpi verso antigeni tiroidei sono stati descritti nelle tiroiditi croniche autoimmuni. Gli antigeni includono:

-Tiroglobulina (→TgAb o anti-Tg)

-Tiroperossidasi (→TPOAb o anti-TPO)

-Recettore del TSH (→TRAb o TSHR-Ab o anti-TSHR)

Quasi tutti i pazienti con tiroidite di Hashimoto presentano anticorpi anti-TPO (specifici) e anti-Tg (meno specifici).

ANTICORPI ANTITIROIDE —

Gli anticorpi anti-recettore del TSH (TRAb) sono classificati

come:

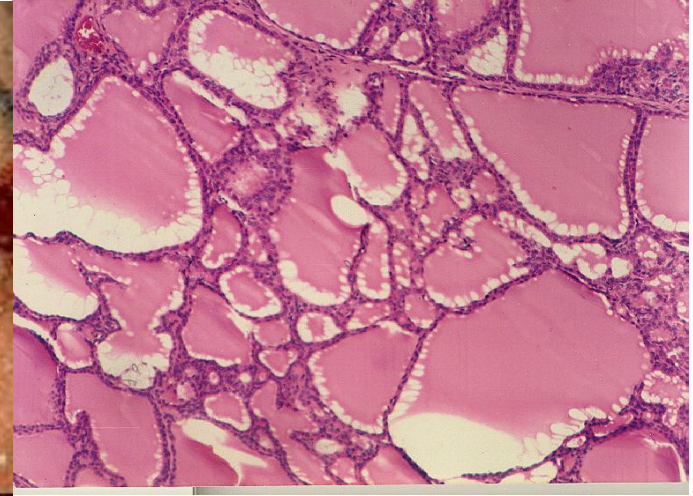
- A. stimolanti
- B. bloccanti
- C. neutri.

-Quelli stimolanti causano la malattia di Graves. Tuttavia in questa malattia compaiono sia anticorpi stimolanti che bloccanti.

-Anticorpi bloccanti si trovano anche nella variante atrofica della tiroidite di Hashimoto.

-La misura di TRAb è utile per accertare la remissione dopo un ciclo di terapia antitiroidea nei pazienti con m. di Graves.

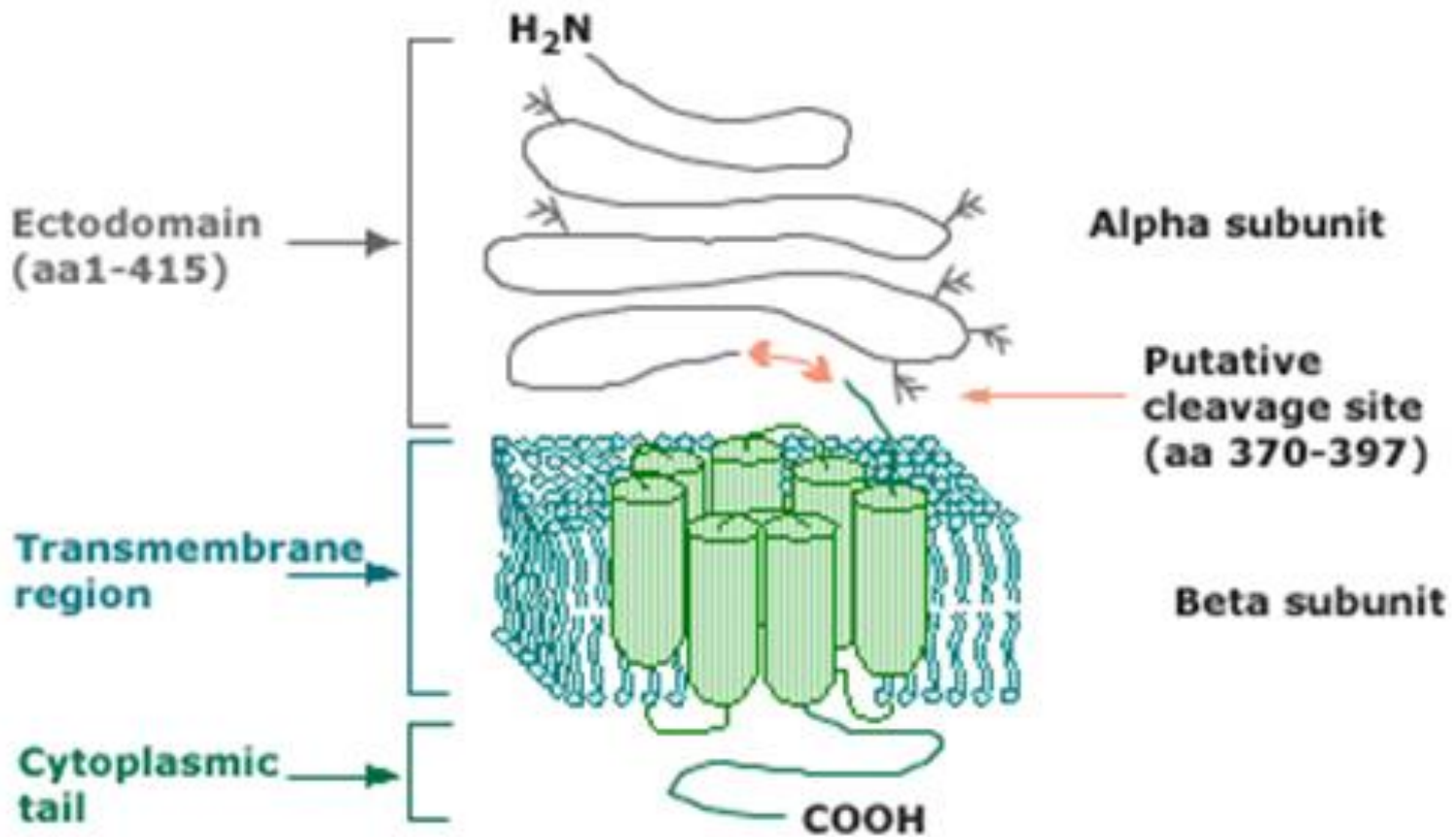
MALATTIA DI GRAVES



E' una sindrome caratterizzata da:

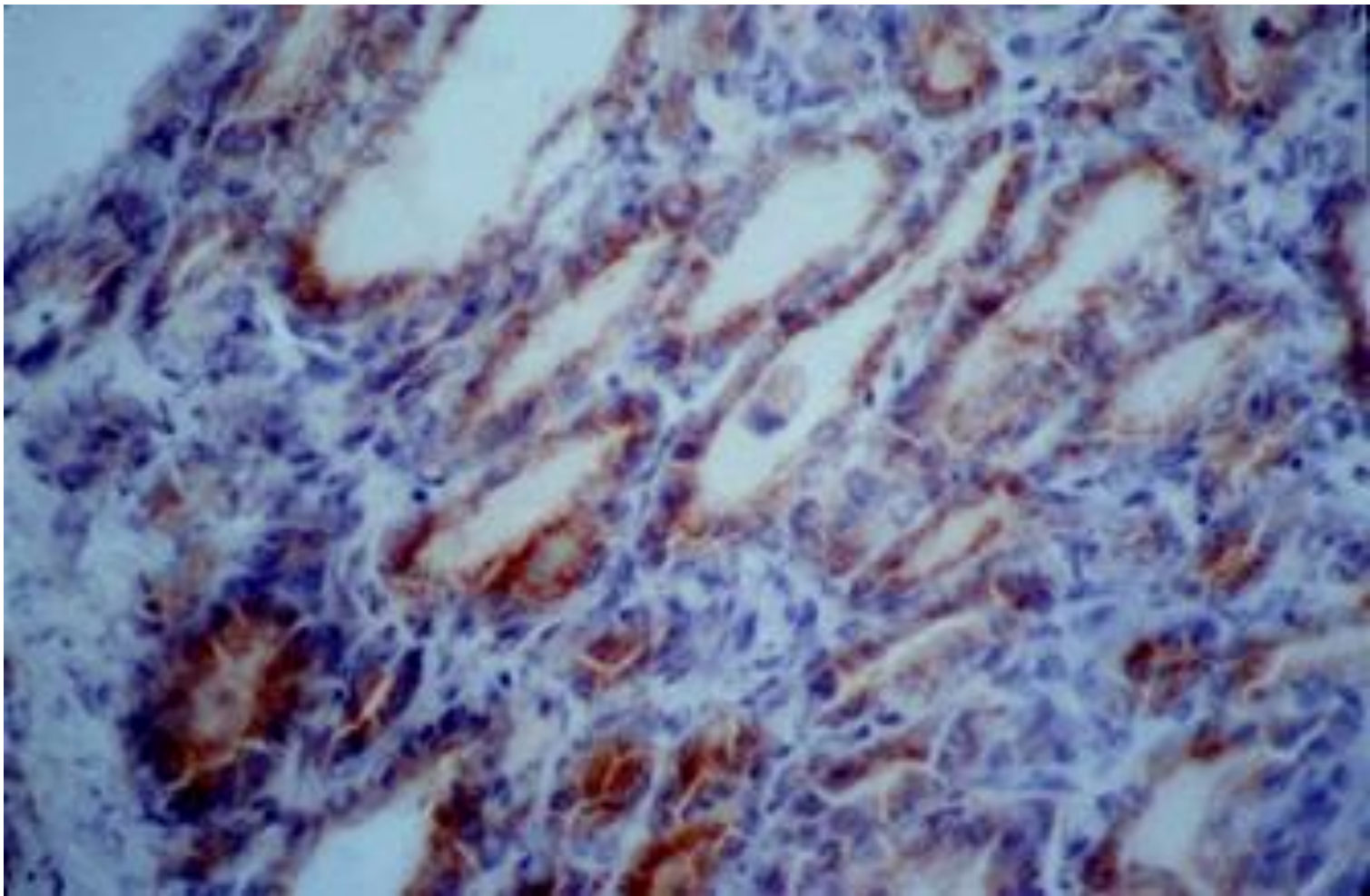
- ipertiroidismo
- gozzo
- orbitopatia (esoftalmo)
- talora, dermopatia (mixedema pretibiale o localizzato).

L'ipertiroidismo è causato da autoanticorpi verso il recettore della tirotropina (TSHR-Ab), che attivano il recettore, stimolando così la sintesi e la secrezione di ormone tiroideo e la crescita della tiroide (gozzo diffuso).



Struttura ipotetica del recettore del TSH.

Anticorpi anti recettore del TSH stimolanti (m. Graves) e inibenti (tiroidite di Hashimoto) legano differenti porzioni del recettore.



Nella malattia di Graves la tiroide presenta iperplasia follicolare e infiltrati linfocitari.

Il titolo auto-anticorpale nel siero (TSHR-Ab) declina dopo trattamento con farmaci antitiroidei, tiroidectomia o iodio radioattivo

NODULI TIROIDEI

PREVALENZA: i noduli tiroidei **sono molto frequenti**.

In un ampio studio (Framingham, MA), noduli clinicamente manifesti sono presenti nel 6.4% delle donne e 1.5% degli uomini.

La maggior parte dei noduli sono benigni.

FREQUENZA DI CARCINOMA —

sebbene i noduli tiroidei, singoli o multipli, causino una certa ostruzione o siano antiestetici, la loro massa non causa problemi.

La preoccupazione principale è:

(a) se si tratta o meno di cancro e se sia letale.

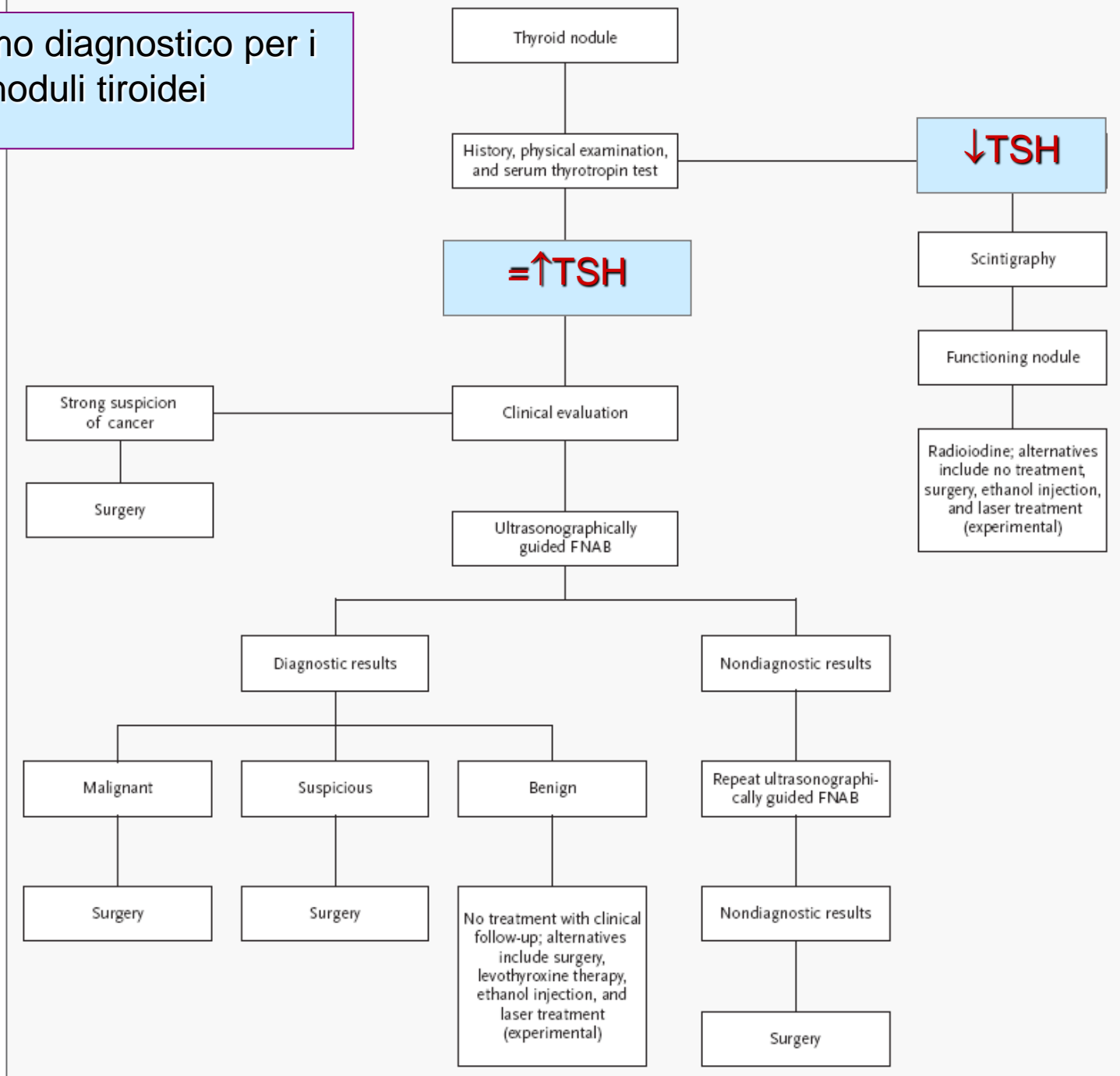
(b) se causano o meno disfunzione della tiroide.

La frequenza di carcinoma **è bassa** (circa 5% di tutti i noduli).

CAUSE DI NODULI TIROIDEI

Benigni	Maligni
Gozzo Multinodulare (sporadico) («adenoma colloidale»)	Carcinoma Papillare
Tiroidite di Hashimoto (cronica linfocitaria)	Carcinoma Follicolare
Cisti: colloide, semplice, emorragica	<ul style="list-style-type: none">• Minimamente o Fortemente Invasivo
Adenomi Follicolari	<ul style="list-style-type: none">• Tipo Ossifilico (cellule di Hurthle)
<ul style="list-style-type: none">• Adenomi Macrofollicolari	Carcinoma Midollare
<ul style="list-style-type: none">• Adenomi Microfollicolari (cellulari)	Carcinoma Anaplastico
Adenomi a cellule di Hurthle (cellule ossifiliche)	Linfoma primitivo della tiroide
<ul style="list-style-type: none">• Aspetto macro- o microfollicolare	Carcinoma Metastatico (mammella, cellule renali, altro)

Algoritmo diagnostico per i noduli tiroidei



2. Monitoraggio della terapia con levotiroxina

MONITORAGGIO DELLA TERAPIA CON LEVOTIROXINA

I pazienti con ipotiroidismo primario che assumono levotiroxina sono monitorati con la misura di **S-TSH**.

- ❑ Se S-TSH è alto, la dose va aumentata
- ❑ Se S-TSH è basso, la dose va ridotta (per evitare il rischio di fibrillazione atriale).
 - Tuttavia, per sopprimere la ricorrenza di cr tiroideo o ricrescita di gozzo il goal per i pazienti che assumono levotiroxina è S-TSH di terza generazione non-misurabile o subnormale.

Al contrario, S-FT4 è insensibile nell'accertare l'appropriatezza della dose di levotiroxina.

3. Monitoraggio del trattamento dell'ipertiroidismo

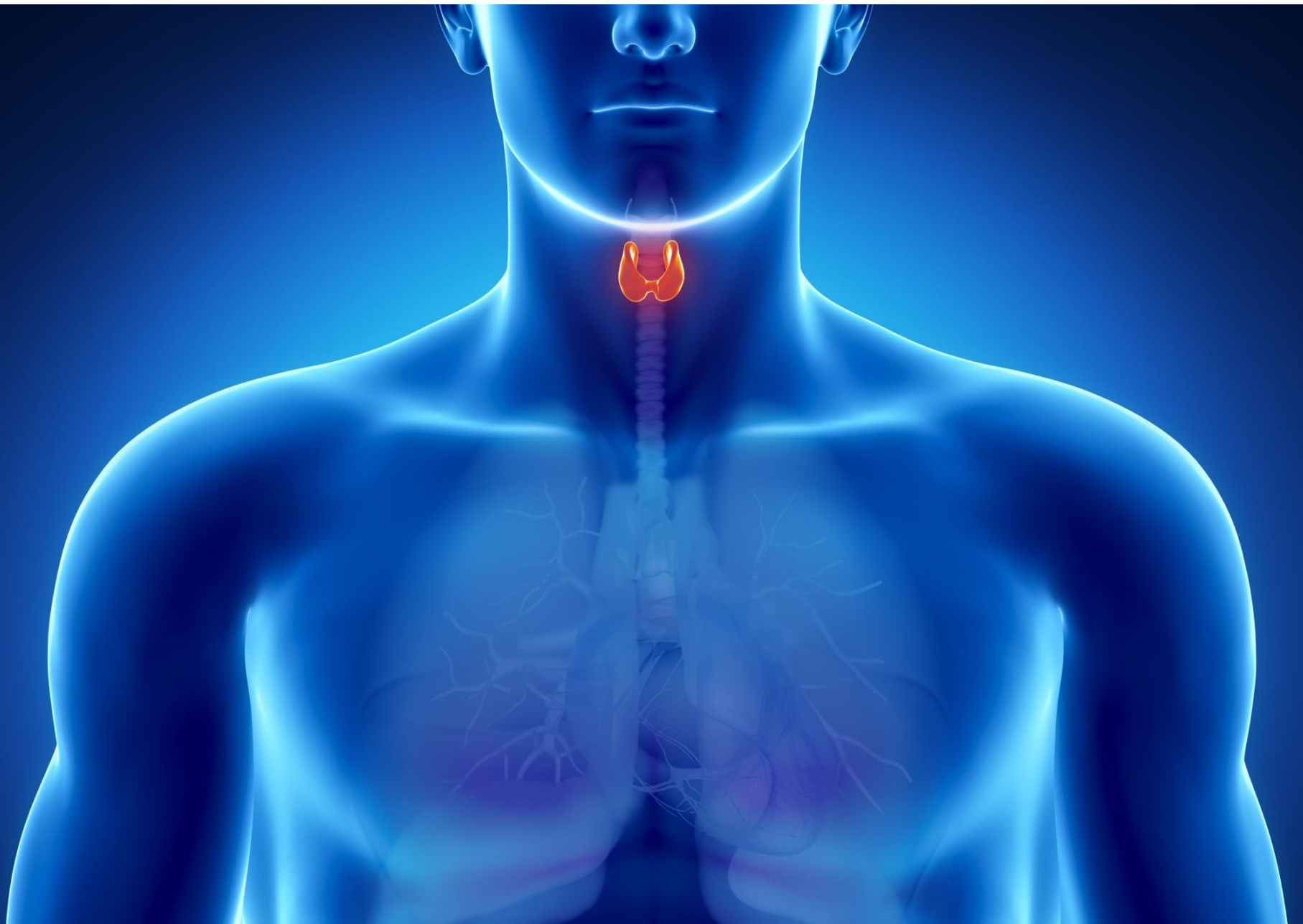
Monitoraggio del trattamento dell'ipertiroidismo

I livelli di S-TSH sono utili per la diagnosi, ma non sono in grado di distinguere il grado d'ipertiroidismo, dato che la soppressione avviene negli stadi precoci della malattia.

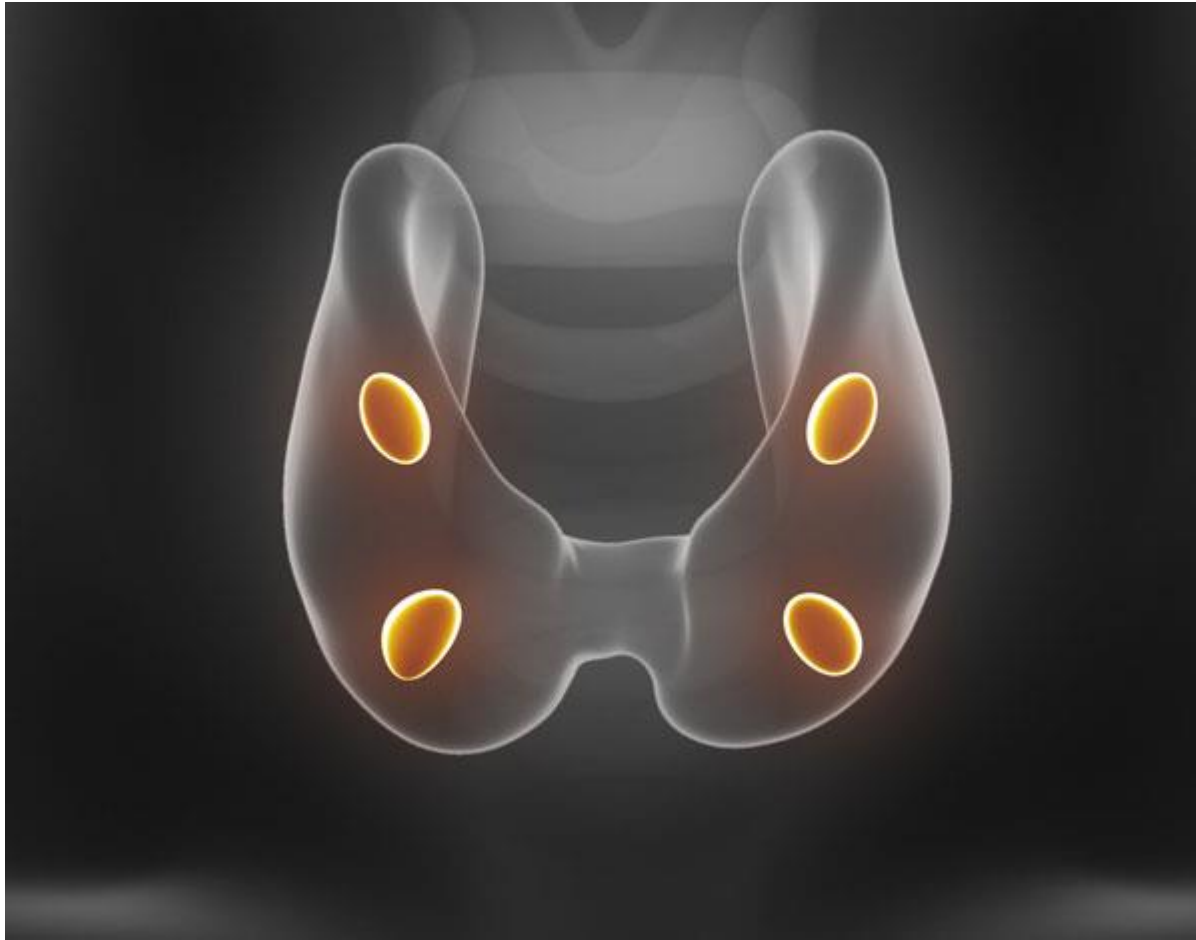
Nelle fasi iniziali del trattamento bisogna ricorrere alla misura di **FT3 e FT4** per valutare l'efficacia di farmaci antitiroidei, radioiodio, chirurgia, perchè il S-TSH rimane subnormale per alcune settimane.

Appena raggiunte le condizioni di steady-state la misura di **S-TSH** è richiesta per accertare l'efficacia della terapia.

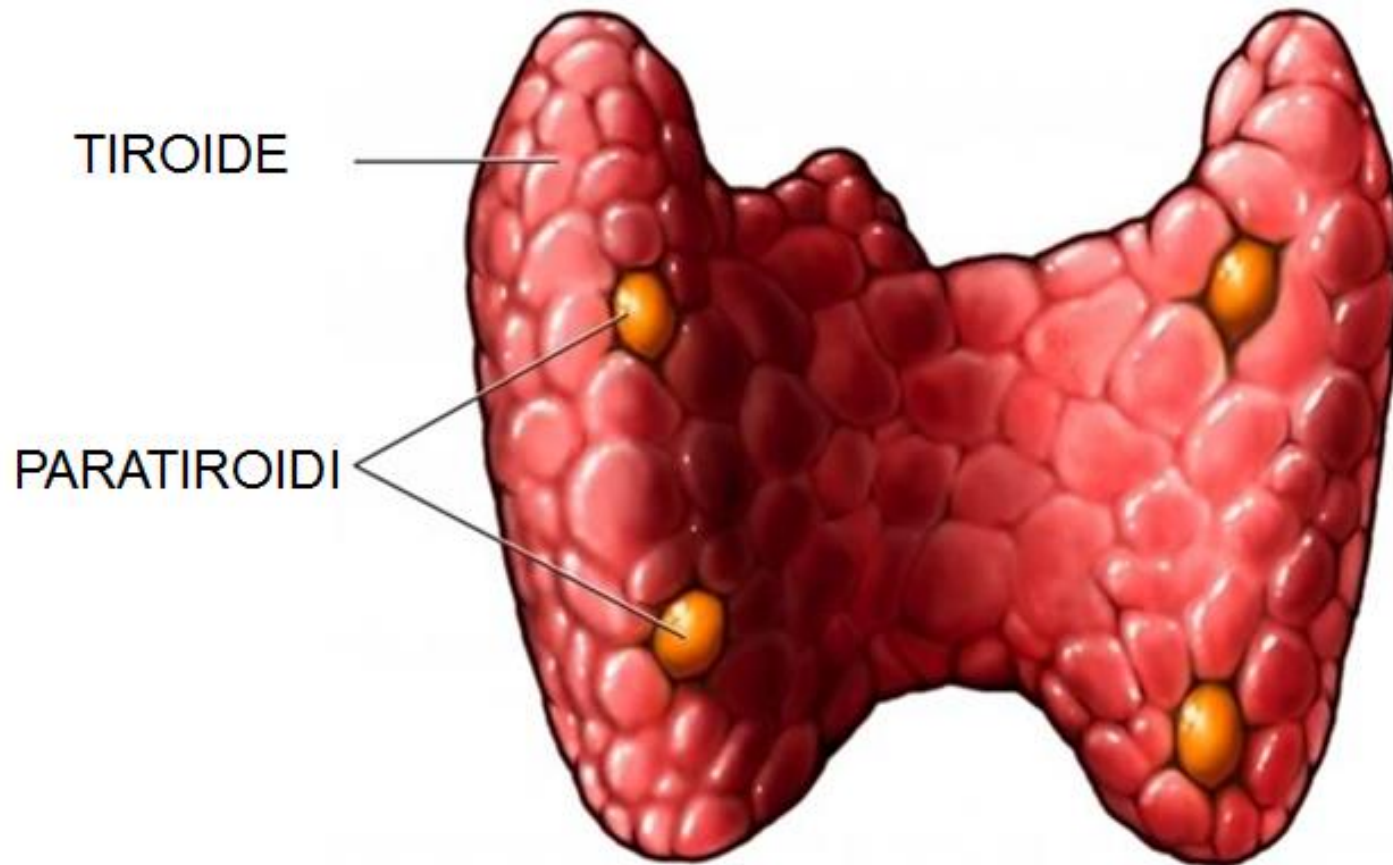
In molti tipi di ipertiroidismo i livelli di **S-FT3** sono sproporzionatamente più alti di quelli di S-FT4 e sono quindi più validi nello seguire i pazienti.



IPERPARATIROIDISMI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO



Prof. Renzo
Schiavon
AA 2015-2016



Le ghiandole paratiroidi sono poste nella faccia posteriore della tiroide, ma da questa sono funzionalmente indipendenti.

Generalmente (84% dei casi) sono 4, due superiori e due inferiori , disposte simmetricamente

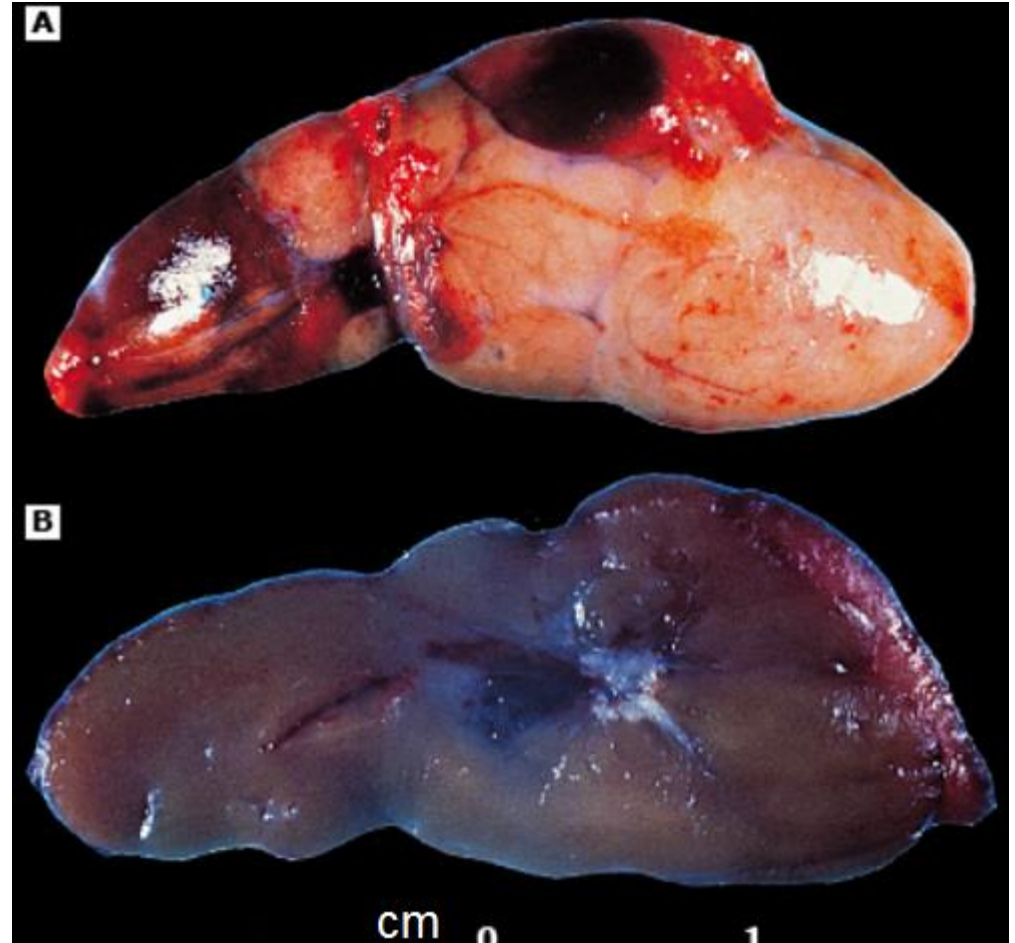
Le paratiroidi producono il paratormone (PTH) che è uno dei due principali ormoni che modulano l'omeostasi calcio-fosforo; l'altro è il calcitriolo (1,25 diidrossivitamina D)

Le ghiandole paratiroidi

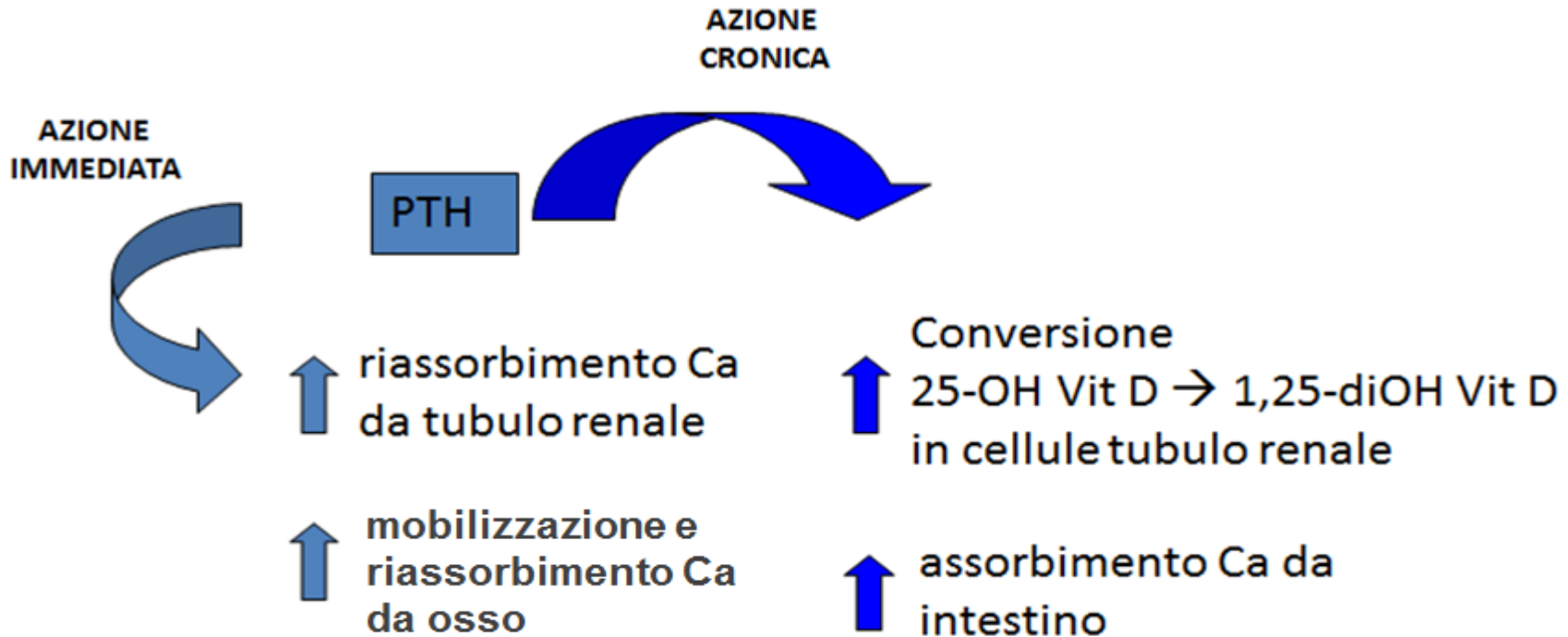
Ingrossata (**adenoma**) raggiunge il peso di 50 mg-20 gr, tipicamente 1 g e la dimensione di 1 cm.



La dimensione **normale** è di un chicco di riso (4x2 mm, 35-50 mg).



AZIONE DEL PARATORMONE (PTH)

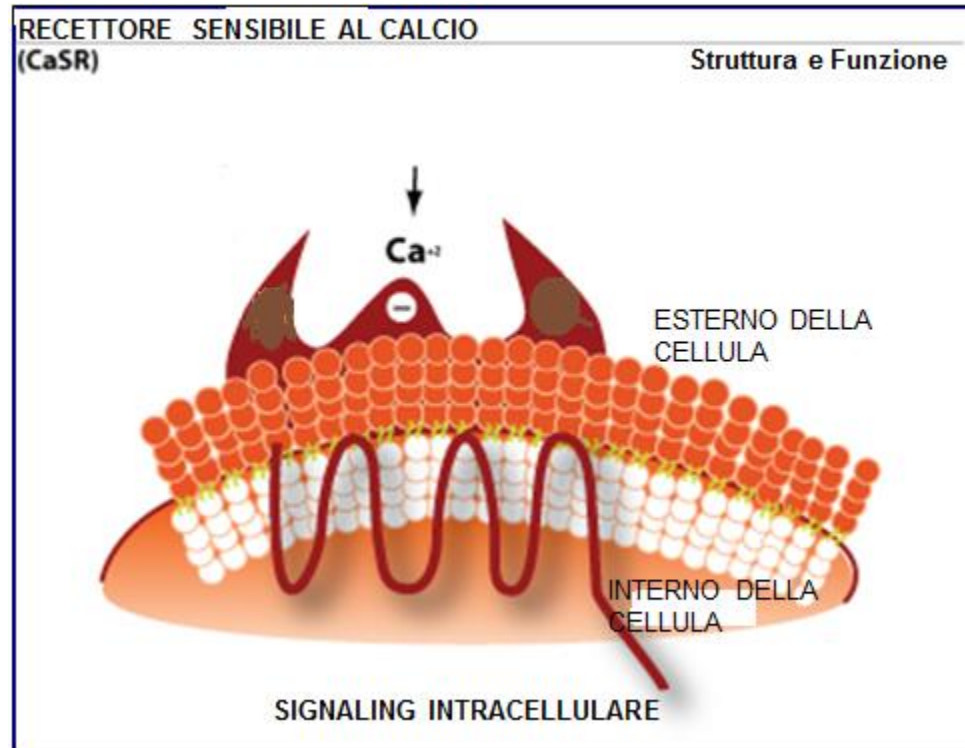


Il PTH opera l' **aumento dei livelli di calcio nel plasma** tramite un'azione immediata ed un'azione cronica.

L'azione immediata comprende 1) un aumentato riassorbimento del calcio (Ca) nel nefrone distale del rene e 2) una mobilizzazione del calcio dai depositi scheletrici, prontamente disponibili ed in equilibrio con il fluido extracellulare. A questa segue il rilascio di calcio per il riassorbimento osseo, operato dalle cellule ossee (osteoclasti attivati da osteoblasti a loro volta attivati dal PTH)

L'azione cronica si realizza nel rene con la conversione di 25-OH Vit D in 1,25 diOH Vit D, forma attiva e conseguente aumento dell'assorbimento intestinale del Ca.

SECREZIONE DEL PARATORMONE (PTH)

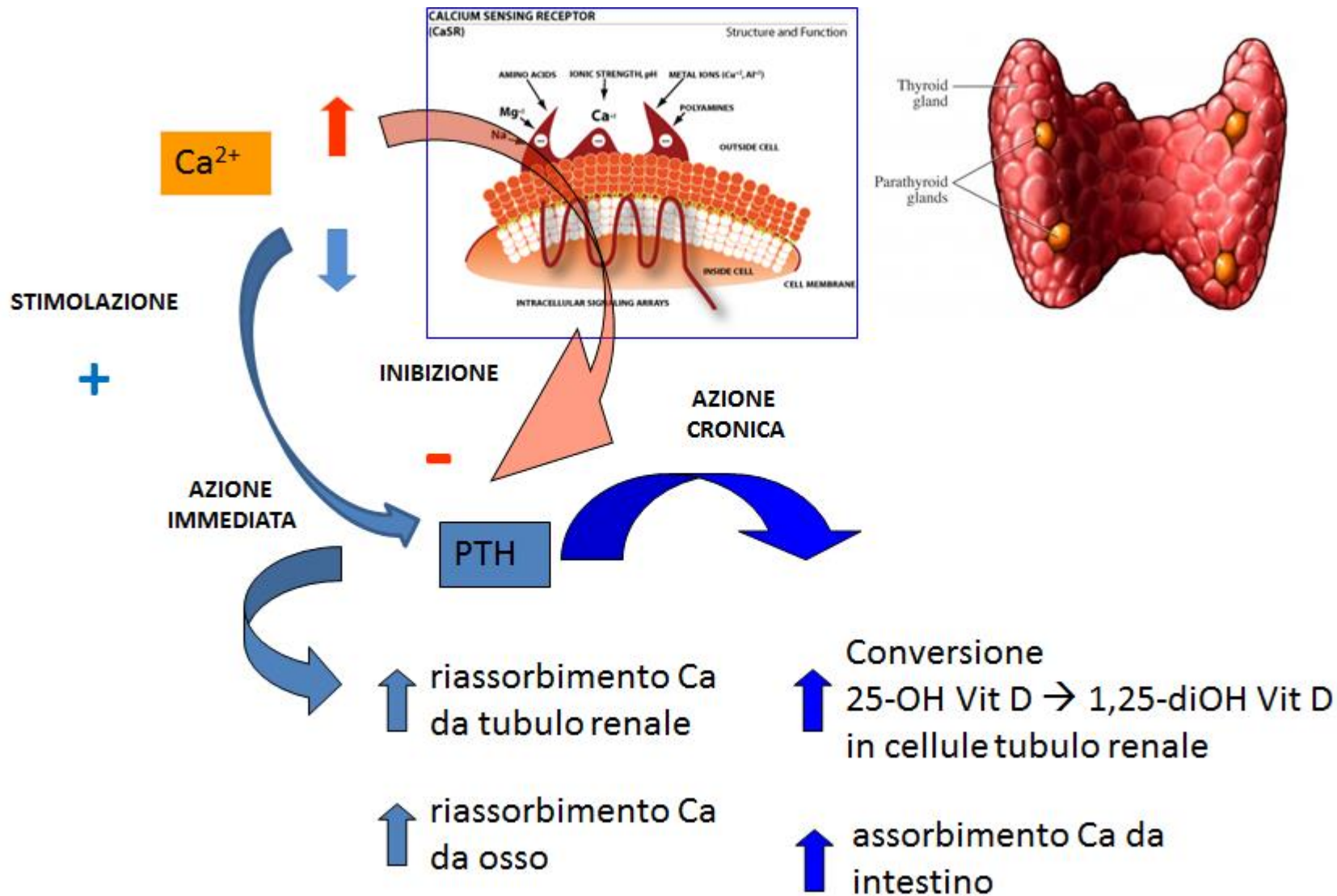


La secrezione di PTH è regolata dal **calcio ionizzato** nel plasma, che agisce tramite un recettore estremamente sensibile al calcio (**CaSR**) posto sulla superficie delle cellule paratiroidee.

Con un **piccolo aumento del calcio ionizzato plasmatico**, il complesso calcio-recettore agisce tramite una o più *guanina-nucleotide binding (G) protein* attraverso secondi messaggeri (calcio intracellulare, inositolo-fosfati) per **inibire la secrezione di PTH**.

Al contrario, un **piccolo calo del calcio ionizzato plasmatico** porta alla deattivazione del recettore, che costituisce lo **stimolo alla secrezione di PTH**.

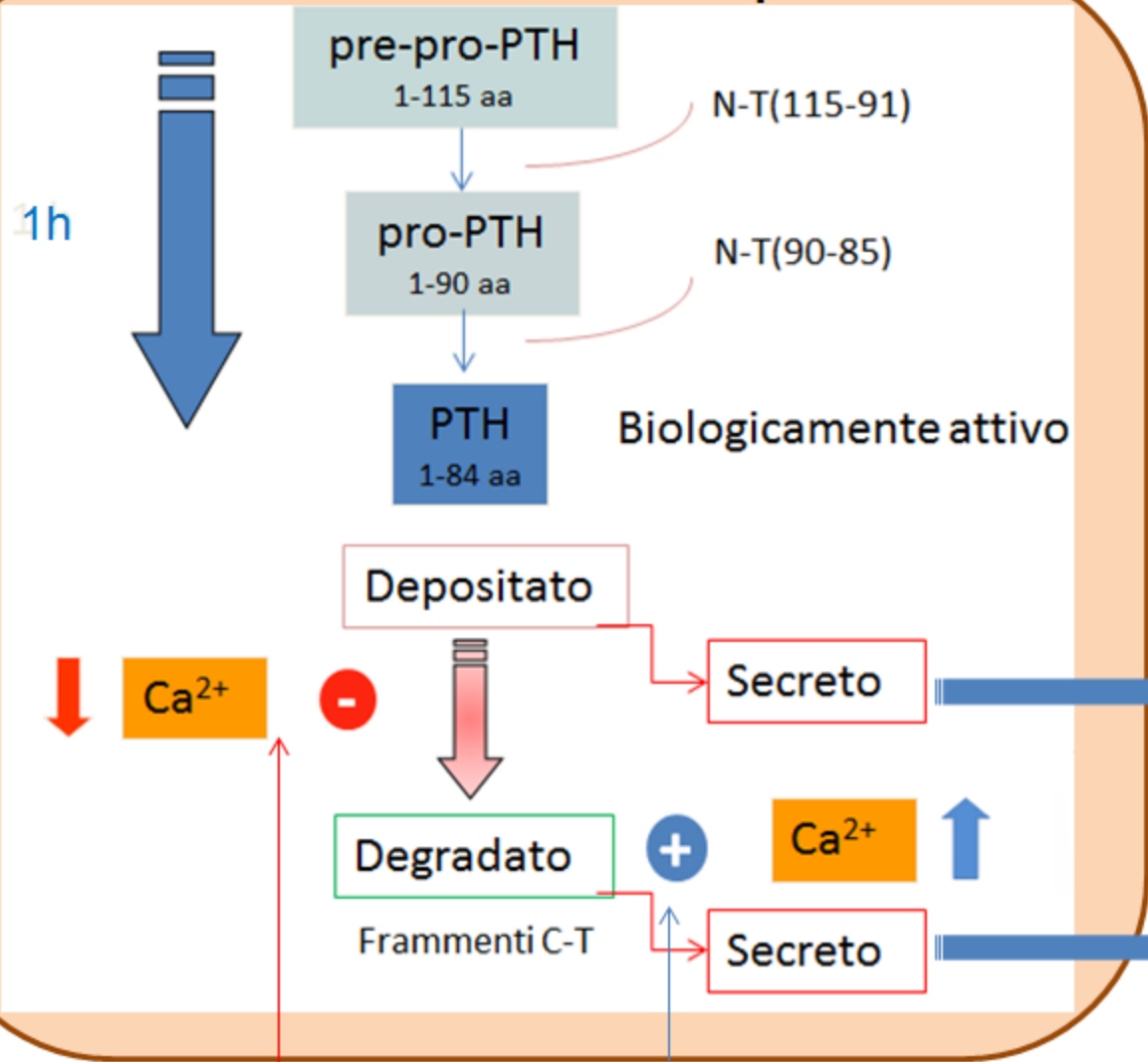
Schema riassuntivo della risposta delle parotidi in base ai livelli plasmatici di calcio ionizzato



Il calo di calcio stimola nelle cellule parotidiche la secrezione di PTH la cui azione incrementa i livelli plasmatici di calcio. L'aumento di calcio inibisce la secrezione di PTH per ridurre i livelli plasmatici di calcio

SINTESI DEL PARATORMONE (PTH)

Cellula paratiroidea



Azione

Clearance

Emivita
2-4 min

Emivita
10-40 min

Frammenti C-T

In caso di ipocalcemia

la degradazione intracellulare cala e viene prevalentemente secreto PTH 1-84 (attivo)

In caso di ipercalcemia

la degradazione intracellulare aumenta e vengono prevalentemente secreti frammenti C-terminali del PTH

Sintesi e degradazione del PTH-

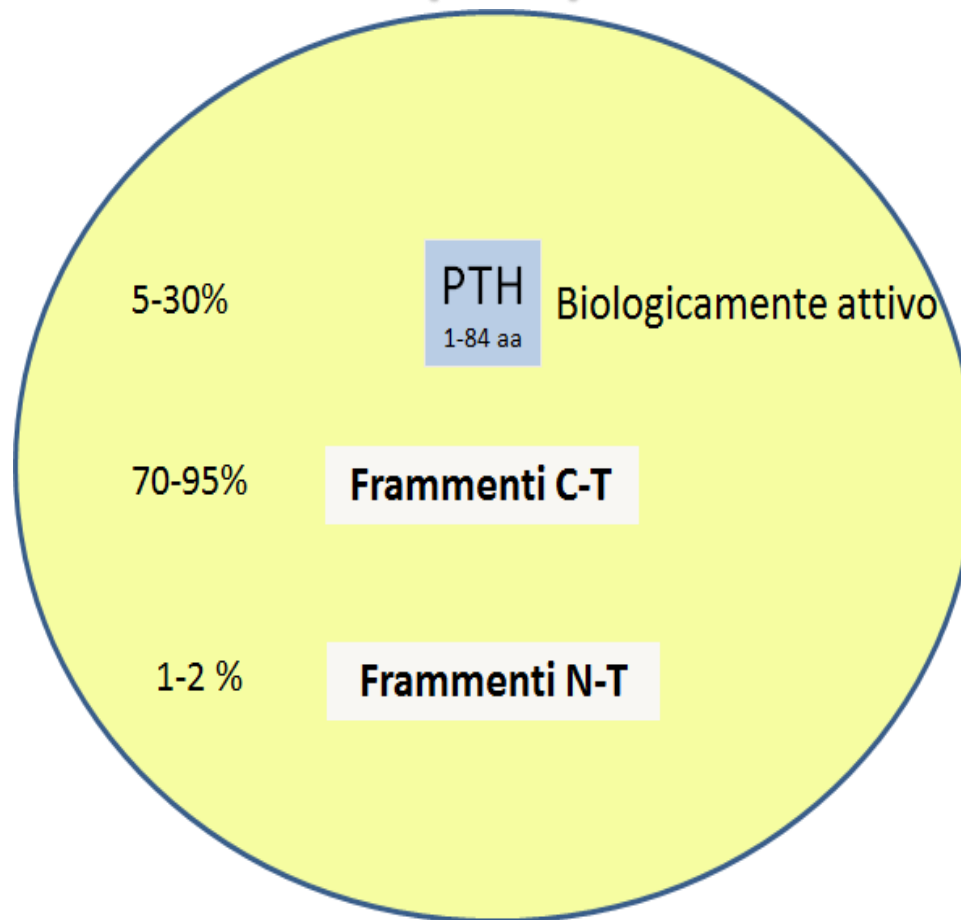
Il PTH è sintetizzato nelle cellule paratiroidee come un polipeptide di 115-aminoacidi, chiamato **pre-pro-PTH**, che viene scisso in corrispondenza della porzione N-terminale prima a **pro-PTH** (90 aminoacidi) e poi a **PTH** (84 aminoacidi). Quest'ultimo è la forma principale di deposito, di secrezione e di ormone biologicamente attivo. Il processo biosintetico impiega meno di un'ora.

Il PTH 1-84 è secreto per esocitosi in pochi secondi dopo comparsa di ipocalcemia. Il **calcio** non solo **regola** il **rilascio**, ma anche la **sintesi** e la **degradazione** del PTH, in tutte le sue forme molecolari. Infatti, oltre al PTH intatto, nelle paratiroidi sono presenti alcuni frammenti carbossi-terminali inattivi e piccole quantità di frammenti amino-terminali attivi del PTH. In caso di ipocalcemia, la degradazione intracellulare di PTH diminuisce, ed è secreto prevalentemente PTH 1-84; in caso di ipercalcemia sono secreti soprattutto frammenti carbossi-terminali di PTH biologicamente inattivi. Questi frammenti carbossi-terminali includono specie lunghe di scissione aminoterminali, come il PTH 7-84, riconosciuto dal recettore C-PTHr, che possiede una certa attività biologica.

Clearance del PTH–

Una volta secreto, il PTH è **rapidamente allontanato dal plasma tramite captazione principalmente epatica e renale**, dove il PTH 1-84 è scisso in frammenti amino e carbossi-terminali che vengono poi eliminati dal rene. Il **PTH intatto** ha una **emivita** plasmatica di **2-4 minuti**. I **frammenti C-terminali**, che sono eliminati principalmente dal rene, hanno emivita 5-10 volte maggiore (**10-40 min**).

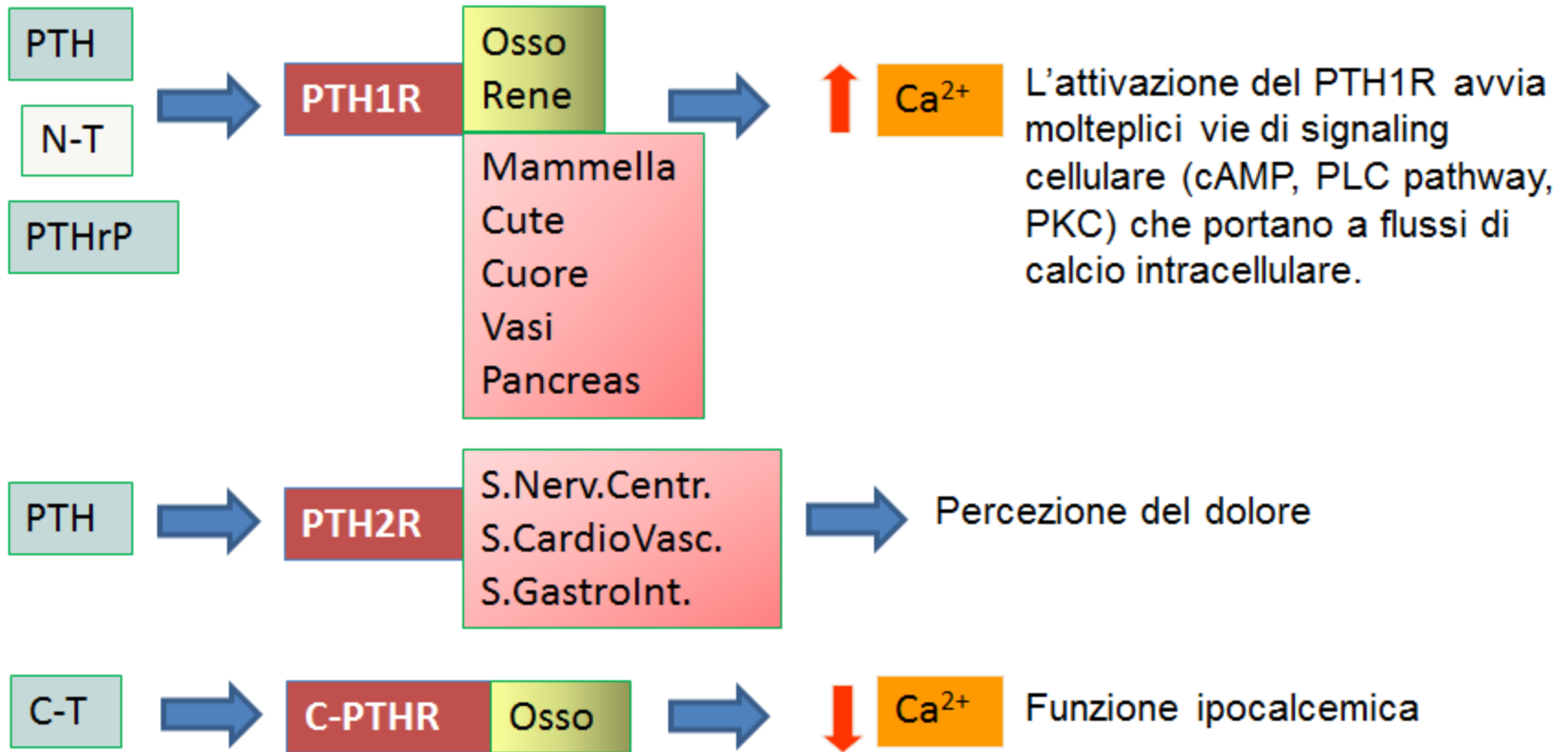
PARATORMONE (PTH) CIRCOLANTE



In presenza di valori normali di calcemia, PTH 1-84 costituisce il 20% del totale delle molecole di PTH circolante. Questa proporzione aumenta al 33% in condizioni di ipocalcemia, e scende al 4% in presenza di ipercalcemia.

Nei soggetti normali il PTH immunoreattivo circolante comprende: paratormone intatto (5-30%), frammenti C-terminali (70-95%) e frammenti N-terminali (1-2%).

RECETTORI DEL PARATORMONE (PTHR)



N-T: Frammenti N-T

PTHrP: proteine relate al PTH

C-T: Frammenti C-T

Recettori del PTH –

Il PTH, nelle sue varie forme molecolari, agisce legandosi e attivando uno dei diversi tipi di recettori.

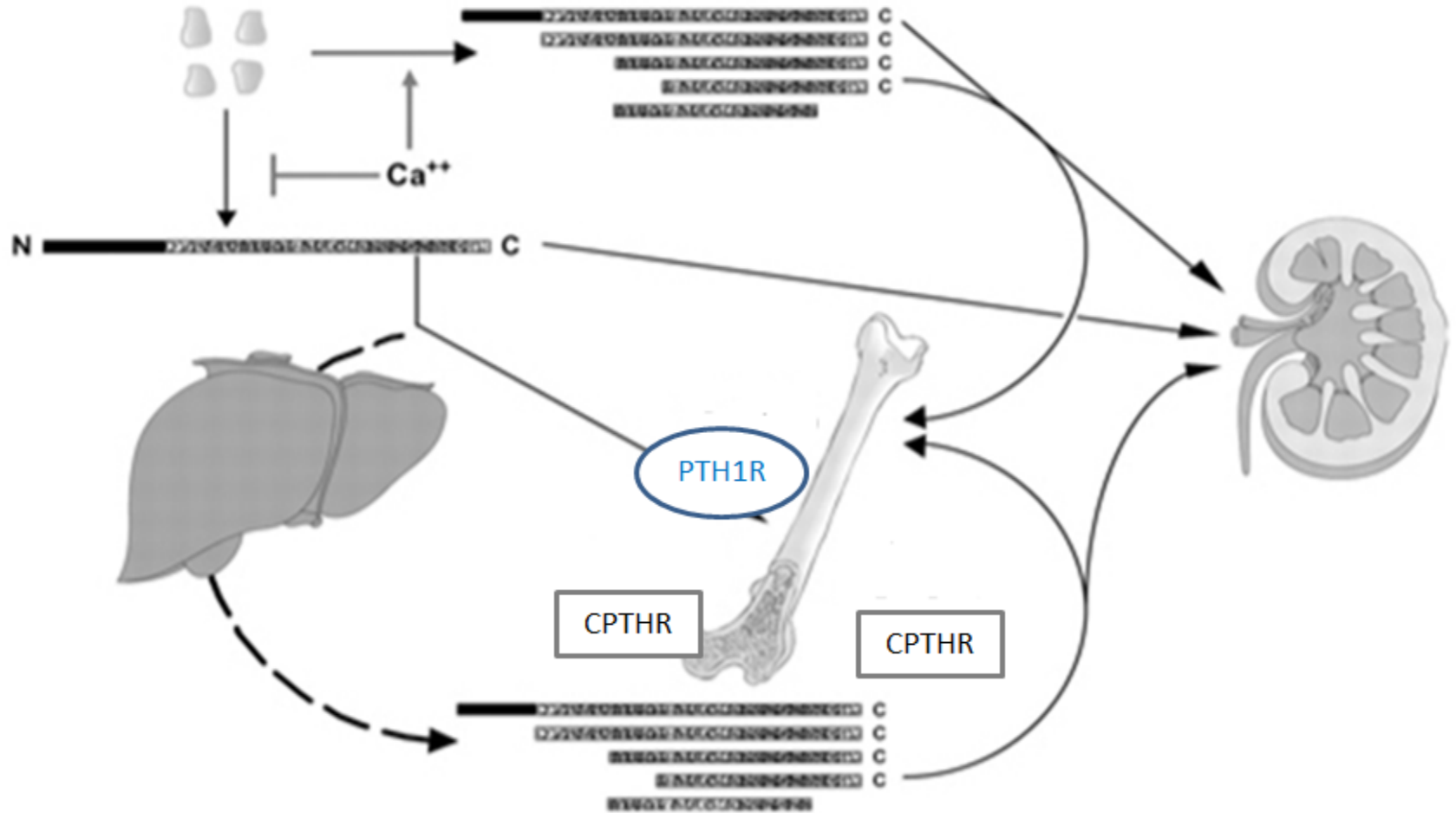
Il recettore classico PTH/PTHrP, altrimenti noto come **PTH1R**, è fortemente espresso nelle **ossa** e nei **reni**, ed è anche presente in altri tessuti come mammella, cute, cuore, vasi sanguigni, pancreas che non sono considerati come classici tessuti target del PTH. Il PTH1R **lega PTH intatto e i frammenti N-terminali di PTH biologicamente attivi**, come il PTH 1-34. Il PTH1R riconosce sia PTH che le **proteine relate al PTH (PTHrP)**, secrete da certi tumori, a causa della omologia nelle porzioni N-terminali di queste due frazioni. L'attivazione del PTH1R **induce molteplici vie di segnalazione cellulare**, tra cui quelle dello AMP ciclico (cAMP), della fosfolipasi C (PLC), della proteina chinasi C (PKC), e il rilascio di depositi intracellulari di calcio. I dettagli di come questi segnali stimolino il riassorbimento osseo, il riassorbimento tubulare renale di calcio, o la idrossilazione del calcidiolo restano inspiegati.

Recettori del PTH –

Il recettore PTH2 (**PTH2R**), che lega selettivamente PTH ma non PTHrP, è fortemente espresso nel **sistema nervoso centrale, cardiovascolare e gastrointestinale**, così come polmone e testicoli, e sembra coinvolto nella **percezione del dolore** senza avere nulla a che fare con il metabolismo del calcio.

Si sono recentemente scoperti nuovi recettori del PTH (**C-PTHr**) con specificità per la regione **carbossi-terminale del PTH**, una porzione di ormone che si pensava essere biologicamente inerte, ma che ora si sa possedere **attività ipocalcemizzante**. I C-PTHr sono presenti in vari tessuti, ma sono prevalentemente espressi nell'**osso**.

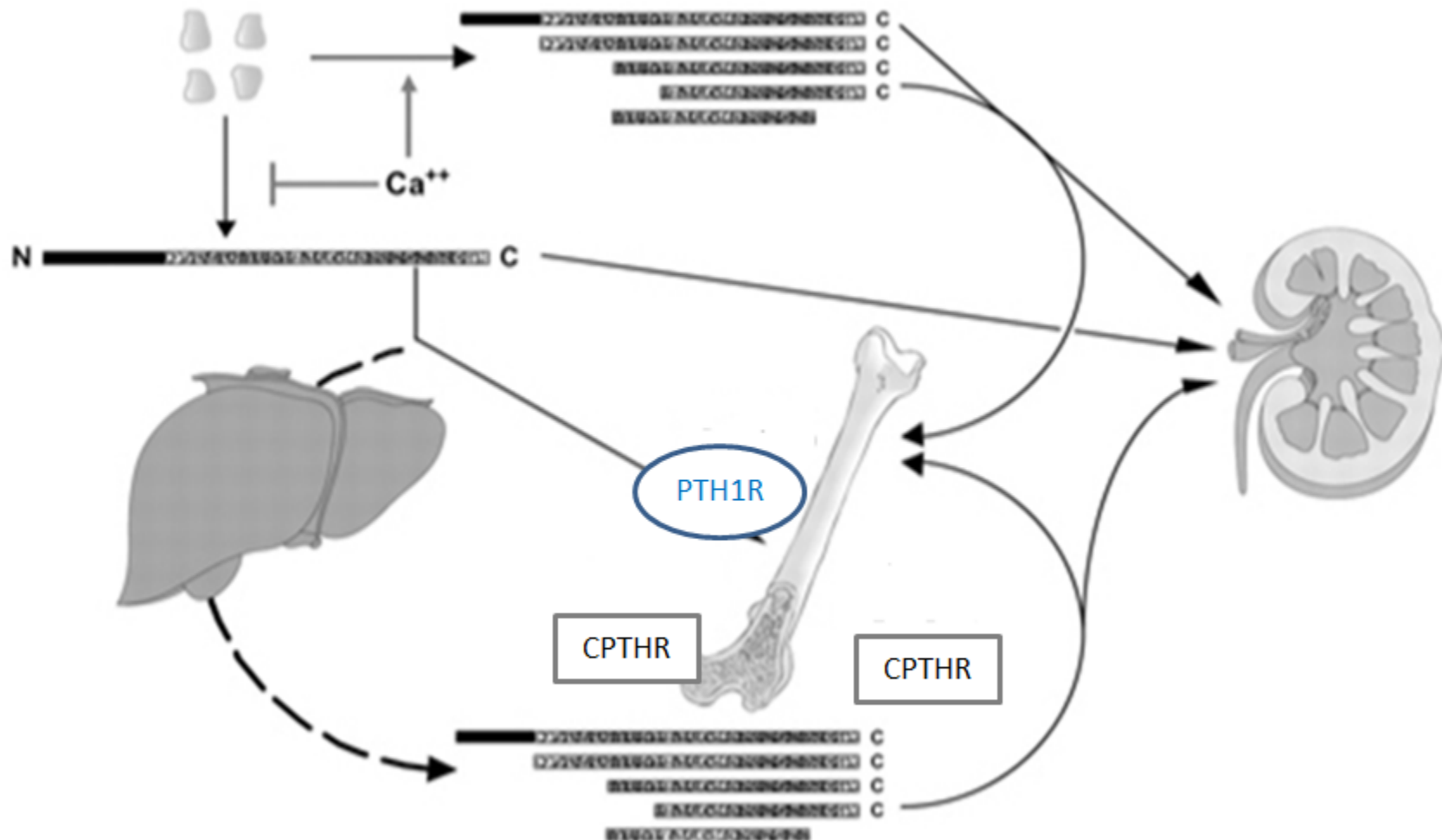
Secrezione e metabolismo del PTH



La **secrezione** del **PTH intatto** dalle paratiroidi si accompagna a quella di una famiglia di **frammenti di C-T del PTH** (ombreggiatura in grigio) la cui quantità, relativamente al PTH, cresce alle più alte concentrazioni di calcio nel siero.

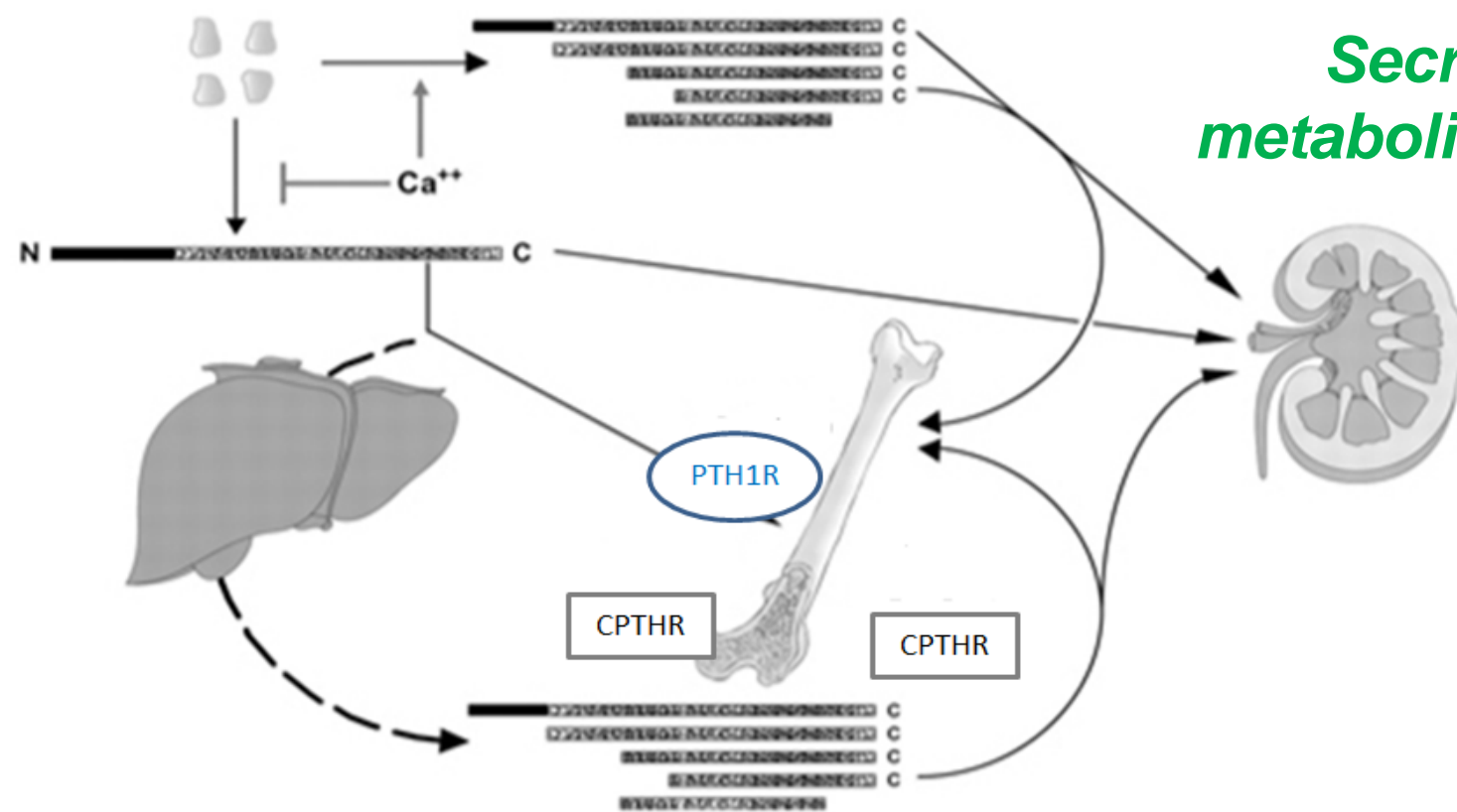
Il **PTH intatto** agisce direttamente sui PTH1R tramite la propria sequenza N-terminale (ombreggiatura in nero) nei tessuti target (osso) o subisce direttamente la clearance epatica o renale.

Secrezione e metabolismo del PTH



La clearance epatica del PTH comprende una proteolisi rapida da parte delle cellule del Kupffer a **frammenti N-terminali** (degradazione in situ) e a **serie di frammenti C-terminali**, alcuni dei quali compaiono in circolo.

Secrezione e metabolismo del PTH



I **frammenti C-T del PTH (CPTH)** prodotti dalle paratiroidi e dalla clearance epatica sono chimicamente simili e comprendono frammenti minimamente troncati, forme lunghe ed alcuni frammenti della regione intermedia troncati ad entrambe le estremità.

I frammenti CPTH hanno effetto diretto sulle cellule dell'osso tramite una diversa classe di recettori dei CPTH (C-PTHr) ed operano **effetto ipocalcemizzante**.

I frammenti CPTH circolano normalmente a concentrazioni 5 volte superiori rispetto quelle del PTH intatto, subiscono **clearance** principalmente dai **reni** e in circolo si **accumulano** sproporzionatamente **nella insufficienza renale**.

Interazioni tra PTH e

1. Calcio
2. Calcitriolo
3. Iperfosfatemia

1. Interazioni tra PTH e Calcio

INTERAZIONI CALCIO-PARATORMONE

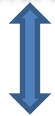
FUNZIONI DEL CALCIO EXTRACELLULARE

Ca²⁺

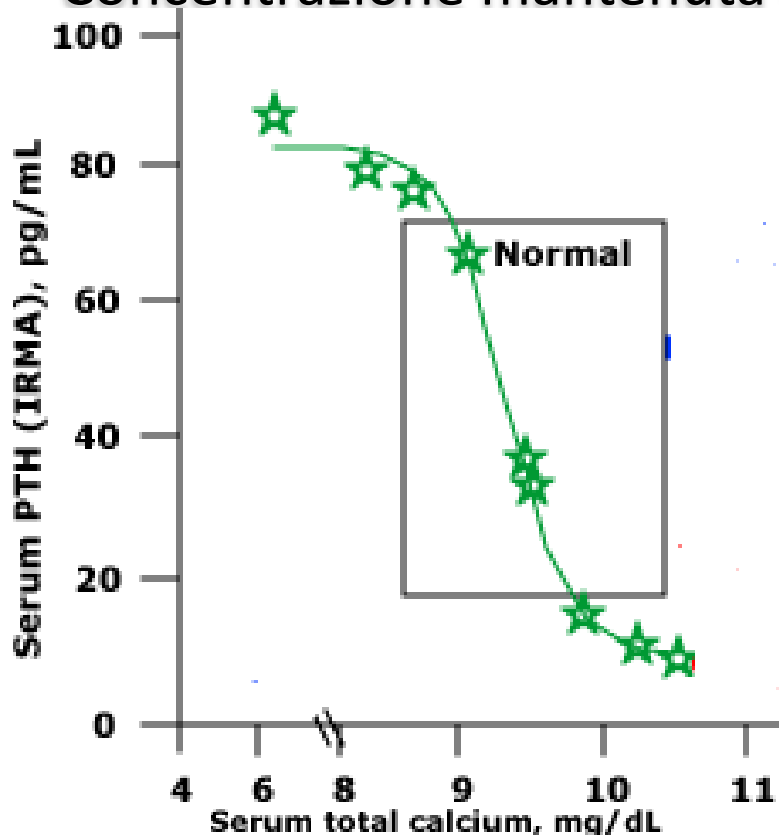


- Signaling cellulare per secrezione ormoni
- Contrazione muscolare
- Coagulazione

Extracellulare



Concentrazione mantenuta entro un range strettissimo



un calo di 0.1 mg/dL di Ca²⁺ sierico → forte aumento di PTH in pochi minuti e viceversa.

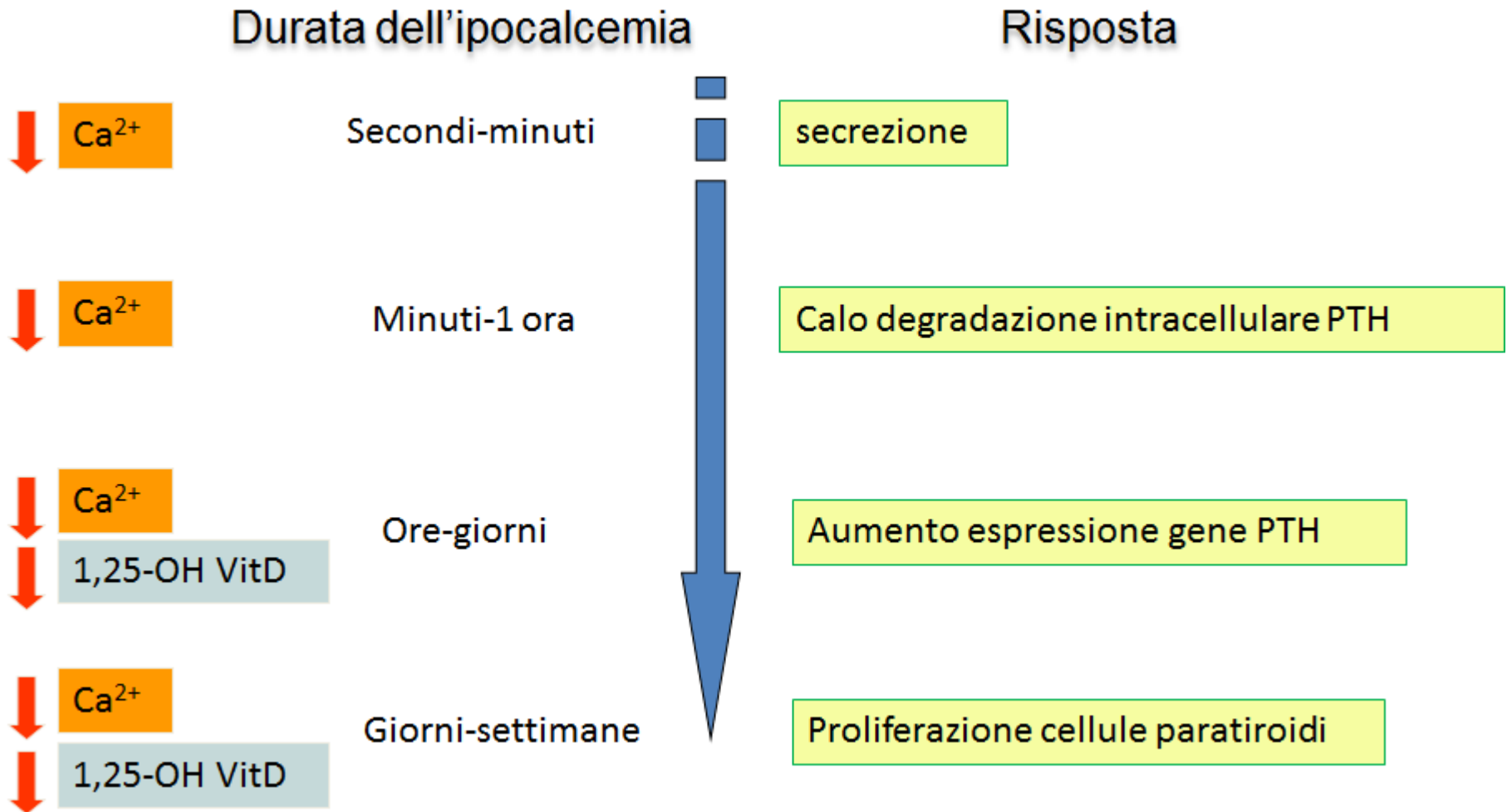
Interazioni di calcio-PTH –

Gli ioni calcio extracellulari (Ca^{2+}) regolano numerosi processi biologici, tra cui la segnalazione intracellulare per la secrezione di molti ormoni, la contrazione muscolare, e la cascata della coagulazione.

E' quindi importante che le concentrazioni plasmatiche di Ca^{2+} siano mantenute entro un intervallo molto stretto, operato dalla **interrelazione stretta tra Ca^{2+} plasmatico e secrezione di PTH.**

Questa relazione è descritta da una **curva sigmoidale rovesciata**, ricavata da studi in vivo e in vitro. Il punto medio o «**set-point**» della curva di calcio-PTH è il fattore determinante la concentrazione di calcio ionizzato in vivo, e la pendenza della curva assicura che questa concentrazione vari poco. In soggetti normali, una diminuzione di appena 0,1 mg/dL (0,025 mmol/L) dei valori plasmatici di Ca^{2+} comporta un forte aumento della concentrazione di PTH entro pochi minuti; al contrario, un altrettanto piccolo incremento di Ca^{2+} nel plasma abbassa rapidamente la concentrazione di PTH nel siero.

RISPOSTA DEL PTH ALLA IPOCALCEMIA O AL CALO DI 1,25-OH Vitamina D (CALCITRIOLO)



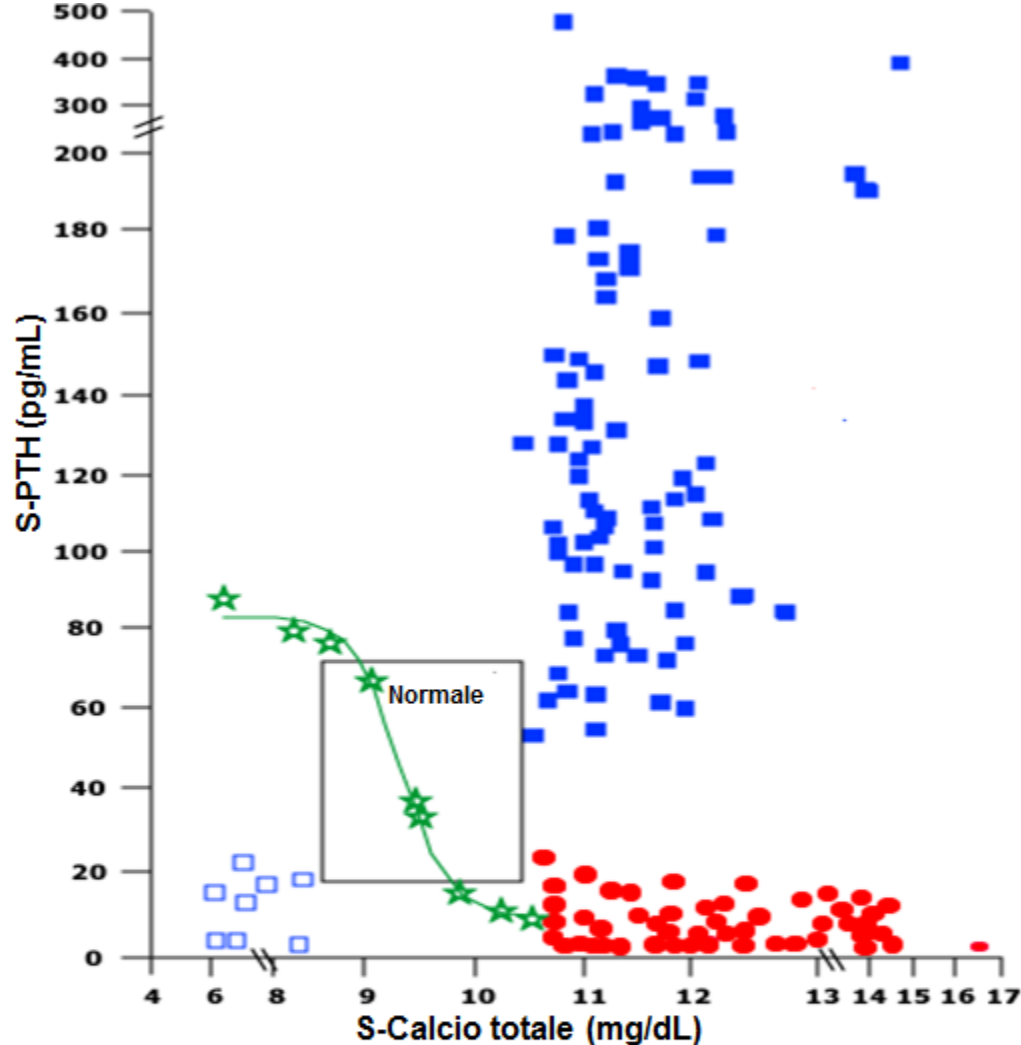
↓ Indica calo

La risposta del PTH alla ipocalcemia –

Ha il seguente profilo temporale:

- **Da secondi a minuti** - esocitosi di PTH dalle vescicole secretorie nel fluido extracellulare.
- **Da minuti a un'ora** - riduzione della degradazione intracellulare di PTH.
- **Da ore a giorni** - aumento dell'espressione genica del PTH come risultato di stabilizzazione dell' mRNA del PTH (che è stimolato anche da basse concentrazioni di calcitriolo sierico, che causano una maggiore trascrizione del gene PTH).
- **Da giorni a settimane** - proliferazione delle cellule paratiroidee (stimolate anche da basse concentrazioni di calcitriolo sierico).

Concentrazioni di PTH nel siero nelle iper- e ipo-calcemie



Le concentrazioni sieriche di PTH in funzione della concentrazione di calcio totale del siero in diversi stati patologici. Il **range normale** è indicato nella casella bianca. La curva sigmoideale (verde) è derivata da un protocollo di infusione di calcio citrato somministrato a 38 soggetti normali. I valori serici di PTH e di calcio sono bassi in **ipoparatiroidismo** (□) ed alti nell' **iperparatiroidismo primario** (■). La concentrazione di calcio sierico è elevata e quella di PTH sierico è appropriatamente bassa nei pazienti con **ipercalcemia non-PTH-indotta delle neoplasie maligne** (●).

Iperparatiroidismo primario –

Nei pazienti con iperparatiroidismo primario, che è causato da adenoma o iperplasia delle paratiroidi, la secrezione di PTH è eccessivamente elevata rispetto alla concentrazione di calcio nel siero (spostamento a destra della curva calcio-PTH).

La base cellulare dello spostamento è dovuto alla diminuita sensibilità delle cellule paratiroidi al calcio, forse a causa di una diminuzione del numero di recettori sensibili al calcio (CaSR) funzionanti, o all'aumento della massa delle cellule paratiroidi, o a entrambi. La base molecolare dello iperparatiroidismo primario è attualmente poco nota.

Iperparatiroidismo secondario –

Nei pazienti con **insufficienza renale** che hanno iperparatiroidismo incontrollato, l'aumento della secrezione di PTH è legato non solo alla iperplasia della ghiandola, ma anche alla ridotta espressione dei recettori sensibili al calcio. Questo si traduce in una ridotta risposta ai livelli di calcio, con continua secrezione di PTH, nonostante livelli di calcio normali o alti e, in definitiva, in qualche caso, in autonomia paratiroidea.

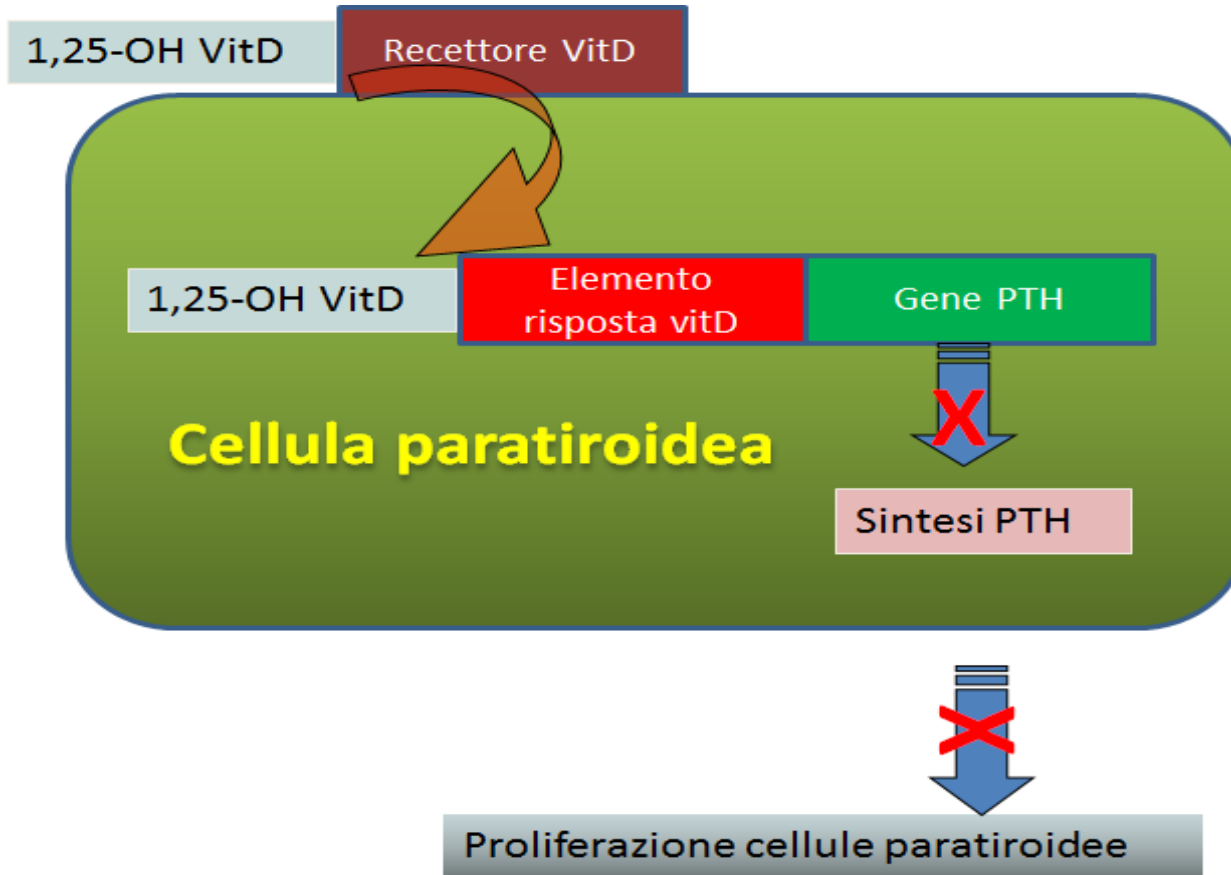
Nei pazienti con iperparatiroidismo secondario a **grave carenza di vitamina D**, la iperplasia delle quattro ghiandole paratiroidee spiega tutta la fisiopatologia e tale iperplasia può richiedere mesi o oltre un anno per tornare alla normalità.

Ipercalcemia non PTH-indotta delle neoplasie maligne –

Si tratta di pazienti con ipercalcemia dovuta alla sovrapproduzione di proteine relate al PTH (PTHrP) da parte di certi tumori, riconosciute dal recettore PTH1R.

2. Interazioni tra PTH e Calcitriolo

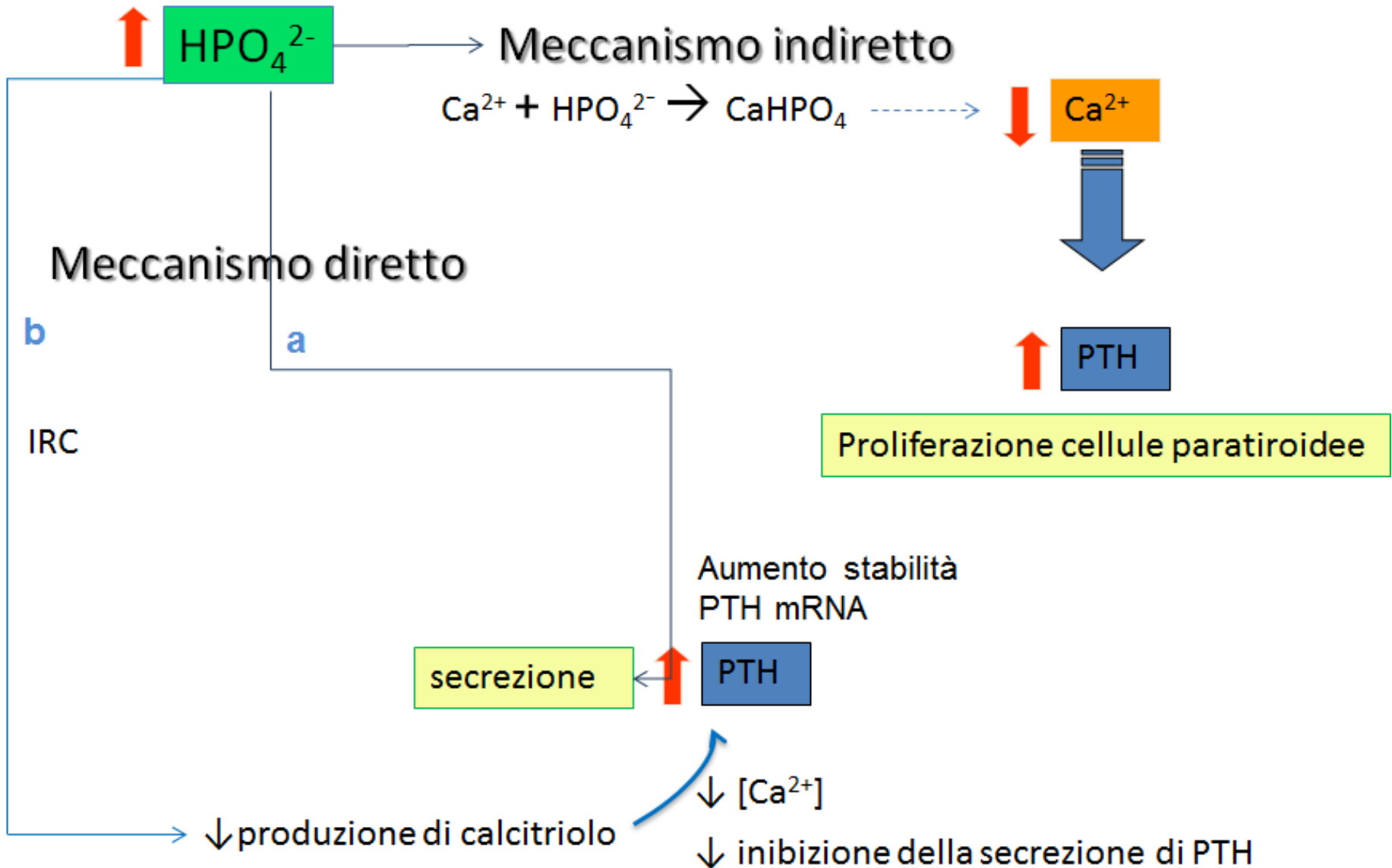
1,25 OH Vit D (Calcitriolo) e PTH



Le cellule paratiroidee contengono **recettori per la vitamina D**, e il gene del PTH contiene un **elemento di risposta alla vitamina D**. Il calcitriolo, legandosi all'elemento di risposta alla vitamina D, **inibisce l'espressione genica del PTH e quindi la sintesi del PTH**. Il calcitriolo **inibisce anche la proliferazione delle cellule paratiroidee**.

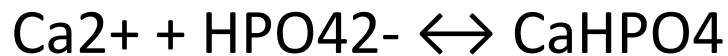
3. Interazioni tra PTH e Iperfosfatemia

IPERFOSFATEMIA E PTH



Iperfosfatemia e PTH –

L'iperfosfatemia stimola la secrezione di PTH, almeno in parte, con **meccanismo diretto, aumentando la stabilità dell' mRNA del PTH e la crescita delle cellule paratiroidee**. Queste risposte sono mediate, in parte, dal **meccanismo indiretto** della induzione di **ipocalcemia nello spostamento a destra della seguente reazione:**



Ci sono prove crescenti che la iperfosfatemia (indipendentemente dalle concentrazioni sieriche di calcio e di calcitriolo) stimoli direttamente la sintesi e secrezione del PTH , nonché la proliferazione cellulare paratiroidea, nei pazienti con insufficienza renale avanzata, che costituisce la causa più comune di iperfosfatemia.

Azioni del PTH su

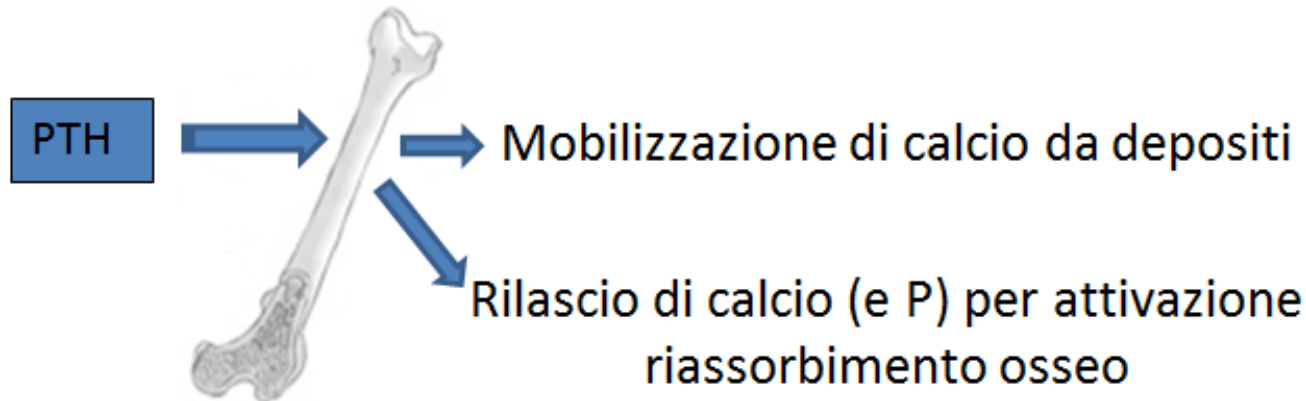
1. Osso

2. Rene

1. Azioni del PTH sull' Osso

AZIONI DEL PTH SULL' OSSO

PTH aumenta indirettamente l'attività e il numero di osteoclasti, tramite gli effetti su RANKL (receptor activator of nuclear factor kappaB ligand) e osteoprotegerina



**IPERPARATIROIDISMO
CRONICO**



Osteopenia → osteite fibrosi cistica

*Il volume dell'osso trabecolare
tende ad essere preservato a
spese dell'osso corticale*



Azione del PTH sullo scheletro –

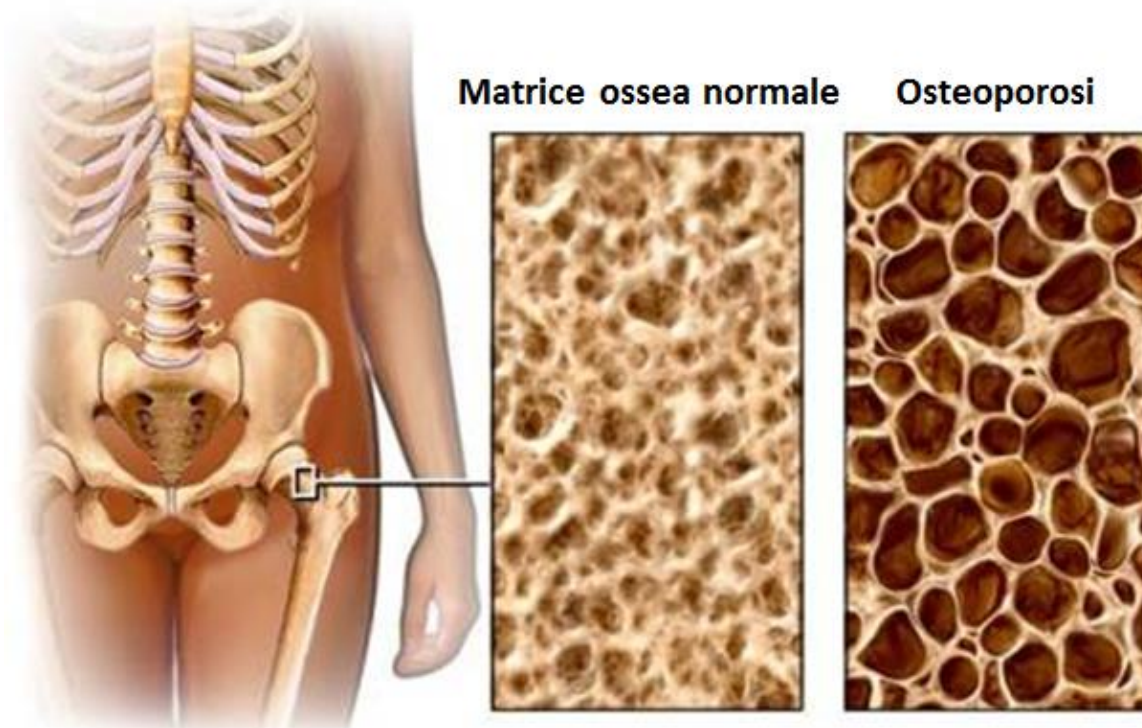
Il PTH agisce sulle ossa, il principale serbatoio di calcio, per rilasciare il calcio.

- Con effetto immediato **mobilizza il calcio dai depositi scheletrici**, prontamente disponibili ed in equilibrio con il fluido extracellulare.
- Successivamente, il PTH **induce il rilascio di calcio (e anche fosfato) mediante attivazione del riassorbimento osseo**. Gli **osteoblasti possiedono recettori del PTH** e indirettamente tramite interazione intercellulare e tramite gli effetti su RANKL (receptor activator of nuclear factor kappaB ligand) e osteoprotegerina, **aumentano l'attività e il numero degli osteoclasti**, che operano il riassorbimento osseo. L'effetto netto del PTH sull'osso varia, a seconda della gravità e della cronicità dell'eccesso di PTH, dalla **osteopenia alla osteite fibrosa cistica**.

Mentre la condizione di iperparatiroidismo cronico porta al riassorbimento osseo, la **somministrazione intermittente di PTH stimola la formazione di osso, anzichè il riassorbimento.**

La somministrazione sottocutanea di PTH una volta al giorno determina un sostanziale incremento della densità minerale dell'osso e riduce il rischio di fratture vertebrali e altre nei pazienti con osteoporosi.

Elementi specifici della molecola PTH sembrano essenziali per l'anabolismo osseo. Come esempio, il troncamento N-terminale dei primi due amminoacidi di PTH elimina la maggior parte della segnalazione cAMP, creando una condizione importante per l'anabolismo osseo



2. Azioni del PTH sul Rene

Sintesi di **calcitriolo**

PTH incrementa la sintesi di calcitriolo

PTH → ↑ sintesi 1- α idrossilasi

PTH → ↓ attività 24-idrossilasi

Calcitriolo → ↑ *assorbimento intestinale di calcio e fosforo*

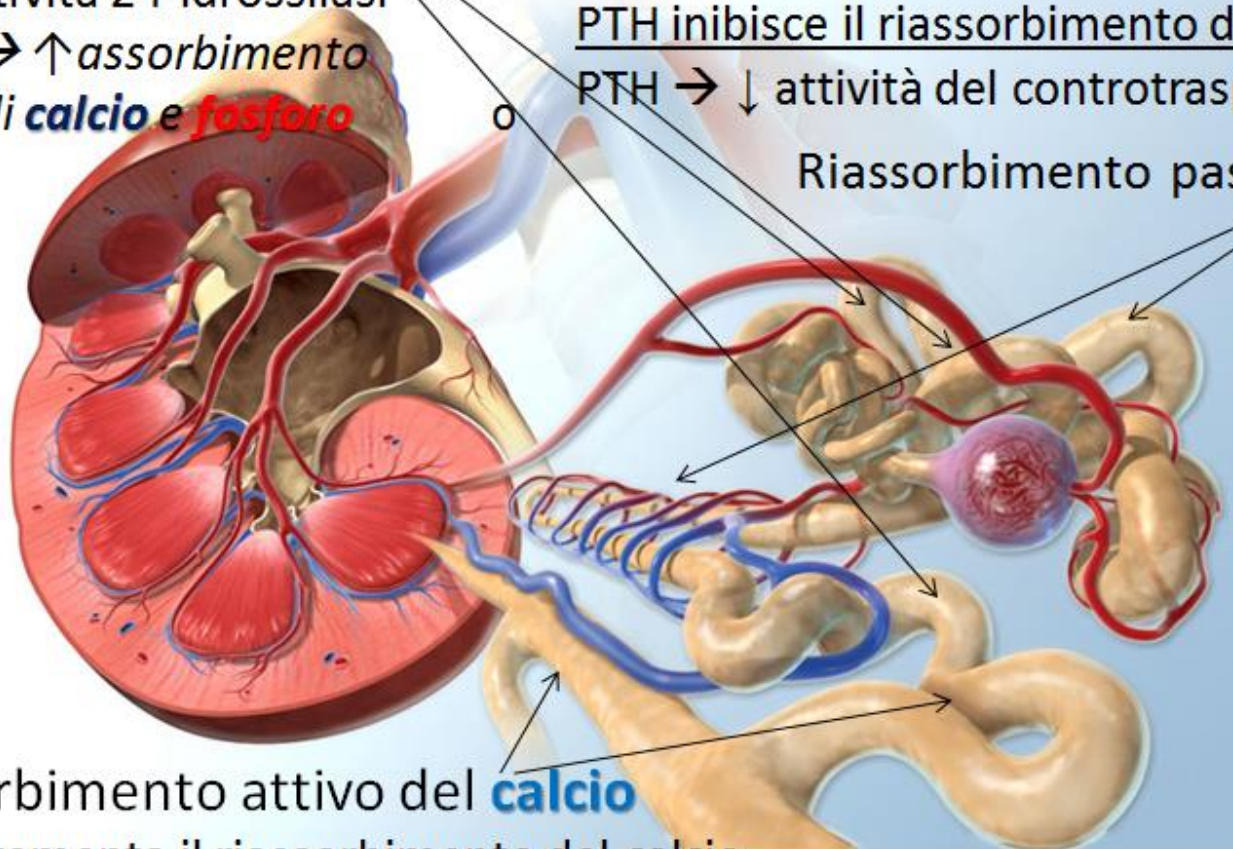
AZIONI DEL PTH NEL RENE

Riassorbimento del **fosforo**

PTH inibisce il riassorbimento del fosforo

PTH → ↓ attività del controtrasporto

Riassorbimento passivo del **calcio**



Riassorbimento attivo del **calcio**

PTH incrementa il riassorbimento del calcio

PTH → proteine trasporto transmembrana del calcio

Es. ↑ Ca^{2+} → ↓ PTH → ↓ *riassorbimento* Ca^{2+} → *normo* Ca^{2+}

AZIONI DEL PTH NEL RENE

1. Sintesi di calcitriolo –

Il PTH **stimola la sintesi della 1-alfa idrossilasi** nei **tubuli prossimali** e quindi la conversione di calcidiolo a calcitriolo.

Circa il 50% dei pazienti con iperparatiroidismo primario presentano elevate concentrazioni sieriche di calcitriolo, come risultato di questa azione del PTH.

Il PTH **riduce** anche **l'attività della 24-alfa-idrossilasi** che inattiva calcitriolo. Questa è una azione particolarmente importante del PTH nel mantenimento dell'omeostasi del calcio in stati di carenza di vitamina D.

AZIONI DEL PTH NEL RENE

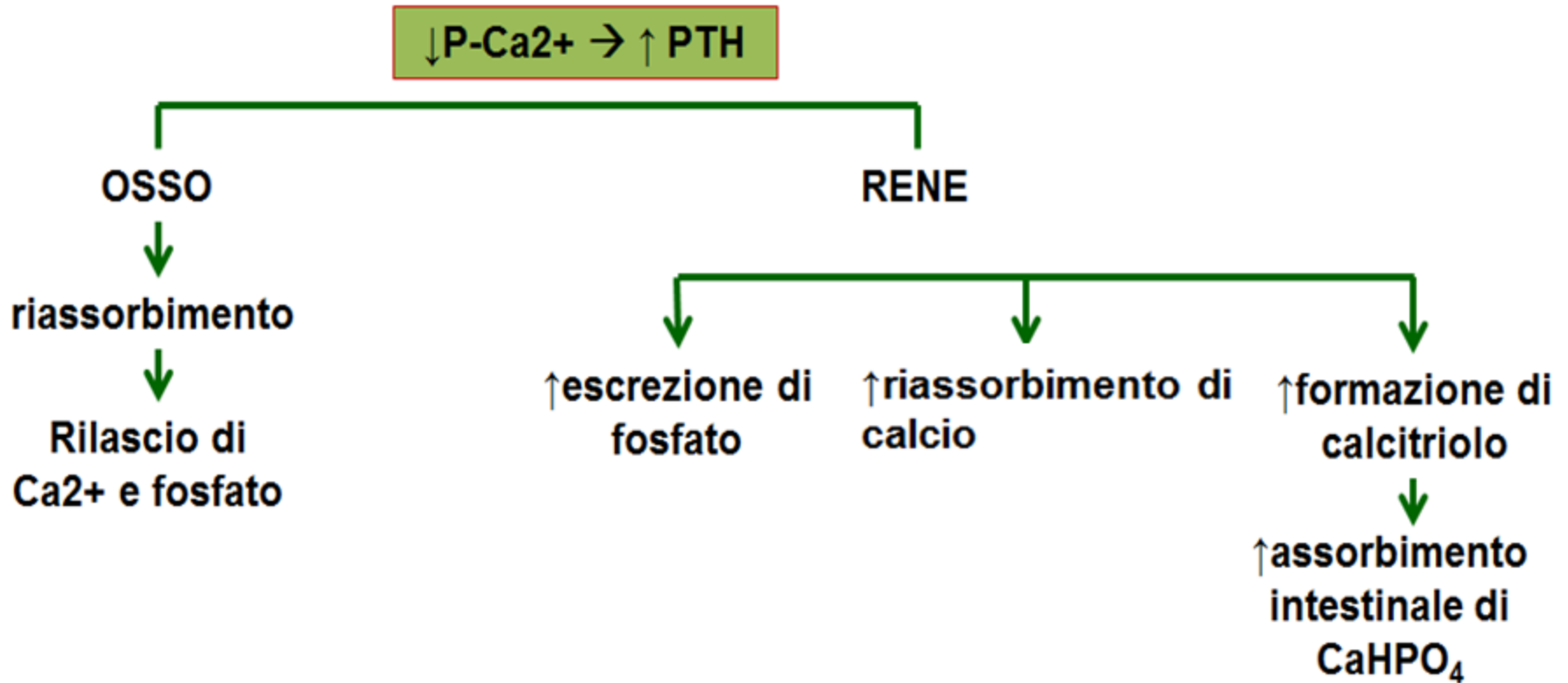
2. Riassorbimento renale del calcio –

Il **calcio filtrato** viene riassorbito lungo gran parte del nefrone. Nel **tubulo prossimale** viene **riassorbito passivamente** per il gradiente elettrochimico creato dal riassorbimento di sodio e acqua. Invece, nel **tubulo distale** il **trasporto** del calcio è **attivamente regolato** secondo le esigenze dell'organismo **per azione del PTH**.

3. Riassorbimento di fosfato –

Il PTH è la **principale determinante ormonale delle concentrazioni di fosfato nel siero**. Inibisce il riassorbimento tubulare di fosforo principalmente nel tubulo prossimale ma anche nel tubulo distale. Questo effetto è mediato principalmente da **ridotta attività, internalizzazione e degradazione del co-trasportatore di sodio-fosfato** nella membrana luminale dei **tubuli prossimali**.

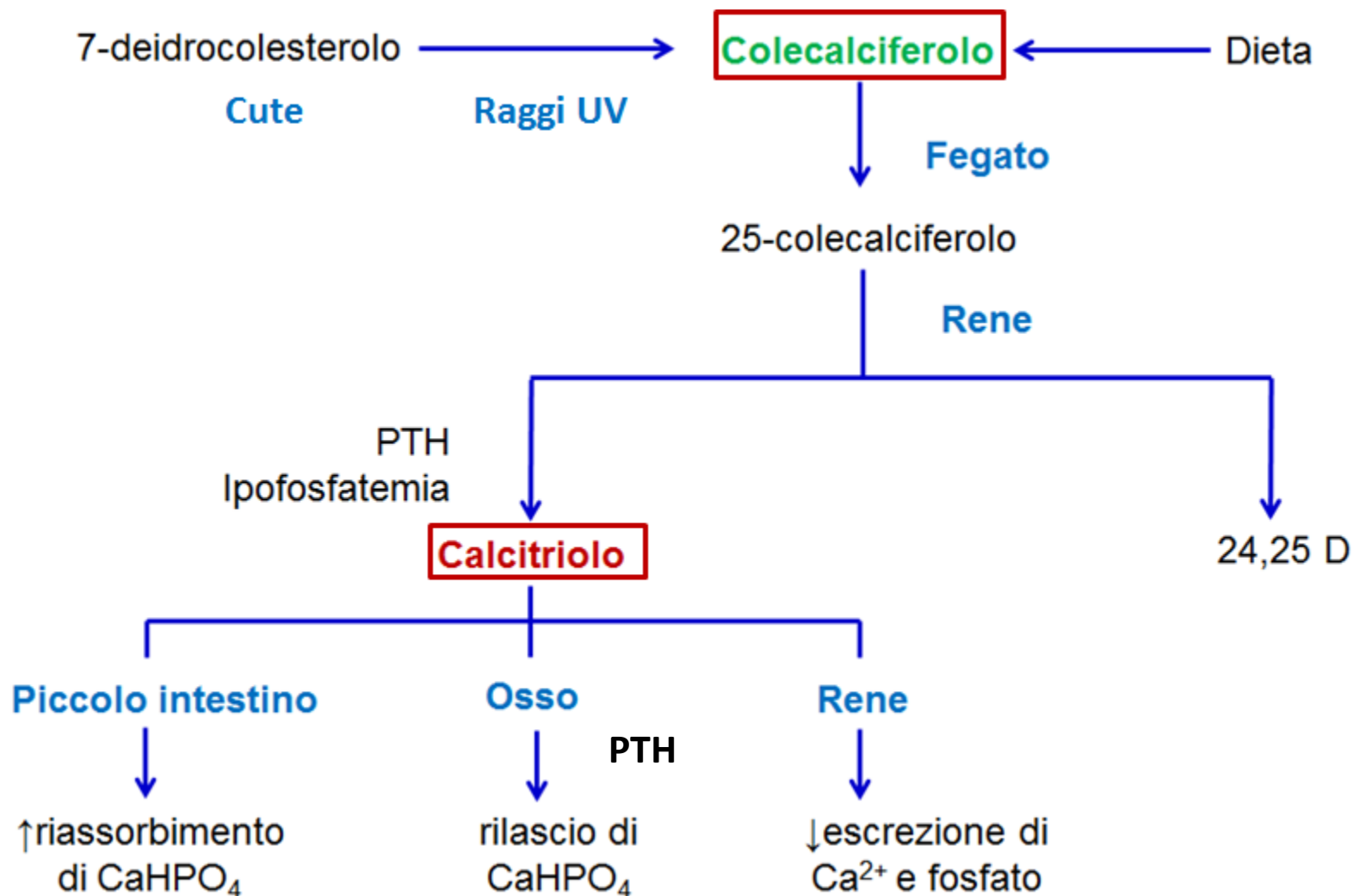
Omeostasi del paratormone



Effetto del PTH sul metabolismo calcio-fosforo.

L'effetto netto è un **aumento della concentrazione plasmatica del calcio senza variazione oppure con calo di quella del fosforo.**

Metabolismo della vitamina D



L'attivazione metabolica della vitamina D a calcitriolo e suoi effetti sulla omeostasi calcio-fosforo. Il risultato è un **aumento delle concentrazioni sieriche di calcio e fosforo**

VITAMINA D –

La vitamina D3 (colecalfiferolo) è uno steroide liposolubile, che è presente nella **dieta** e che può anche essere sintetizzata nella **pelle** da 7-deidrocolesterolo in presenza di **luce ultravioletta**. L'enzima **epatico** 25-idrossilasi aggiunge al colecalfiferolo un gruppo ossidrilico in posizione 25 e forma la **25-OH-Vitamina D o calcidiolo**. Il calcidiolo prodotto dal fegato entra in circolo e raggiunge il rene, legato alla **proteina legante la vitamina D**. Nel **rene**, le cellule tubulari contengono due enzimi (1-alfa-idrossilasi e 24-alfa-idrossilasi) che idrossilano ulteriormente il calcidiolo, producendo **1,25 diidrossivitamina D (calcitriolo)**, la forma **attiva** della vitamina D o **24,25 diidrossivitamina D**, che è un metabolita **inattivo**.

Da notare che il calcitriolo può anche essere sintetizzato nei macrofagi attivati e linfociti timo derivati. Questo assume importanza nelle malattie granulomatose, come la sarcoidosi polmonare attiva, la tubercolosi, e linfomi, in cui la sovrapproduzione di calcitriolo può portare ad una maggiore assorbimento intestinale del calcio ed ipercalcemia.

IUPERPARATIROIDISMI

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

E' causato da **Adenoma o iperplasia delle paratiroidi**

Induce

secrezione di PTH inappropriatamente alta rispetto alla calcemia

(shift dx della curva calcio-PTH)

- per ridotta sensibilità al calcio delle cellule paratiroidi (calo del numero di CaSR funzionanti)
- per aumento della massa di cellule paratiroidi
 - per entrambi

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

La diagnosi di iperparatiroidismo primario viene sospettata in presenza di una **elevata concentrazione di calcio serico, confermata** con un successivo dosaggio.

Il dosaggio usato è quello del **calcio totale**, alcuni consigliano la misura di calcio ionizzato, ma questo aggiunge poco vantaggio nei pazienti con concentrazioni normali di albumina sierica e senza alterazioni del bilancio acido-base.

Bisogna quindi prendere in considerazione tutte le cause di ipercalcemia (vedi Tabella successiva).

CAUSE DI IPERCALCEMIA

PTH-mediata

Iperparatiroidismo primario sporadico

Ipercalcemia Familiare

MEN-I e IIa (neoplasia endocrina multipla), FHH (ipercalcemia familiare ipocalciurica), Iperparatiroidismo familiare isolato

PTH-indipendente

Ipercalcemia da neoplasia

PTHrp, Attivazione extrarenale di 1α -idrossilasi, Metastasi ossee osteolitiche e citochine locali

Intossicazione da vitamina D

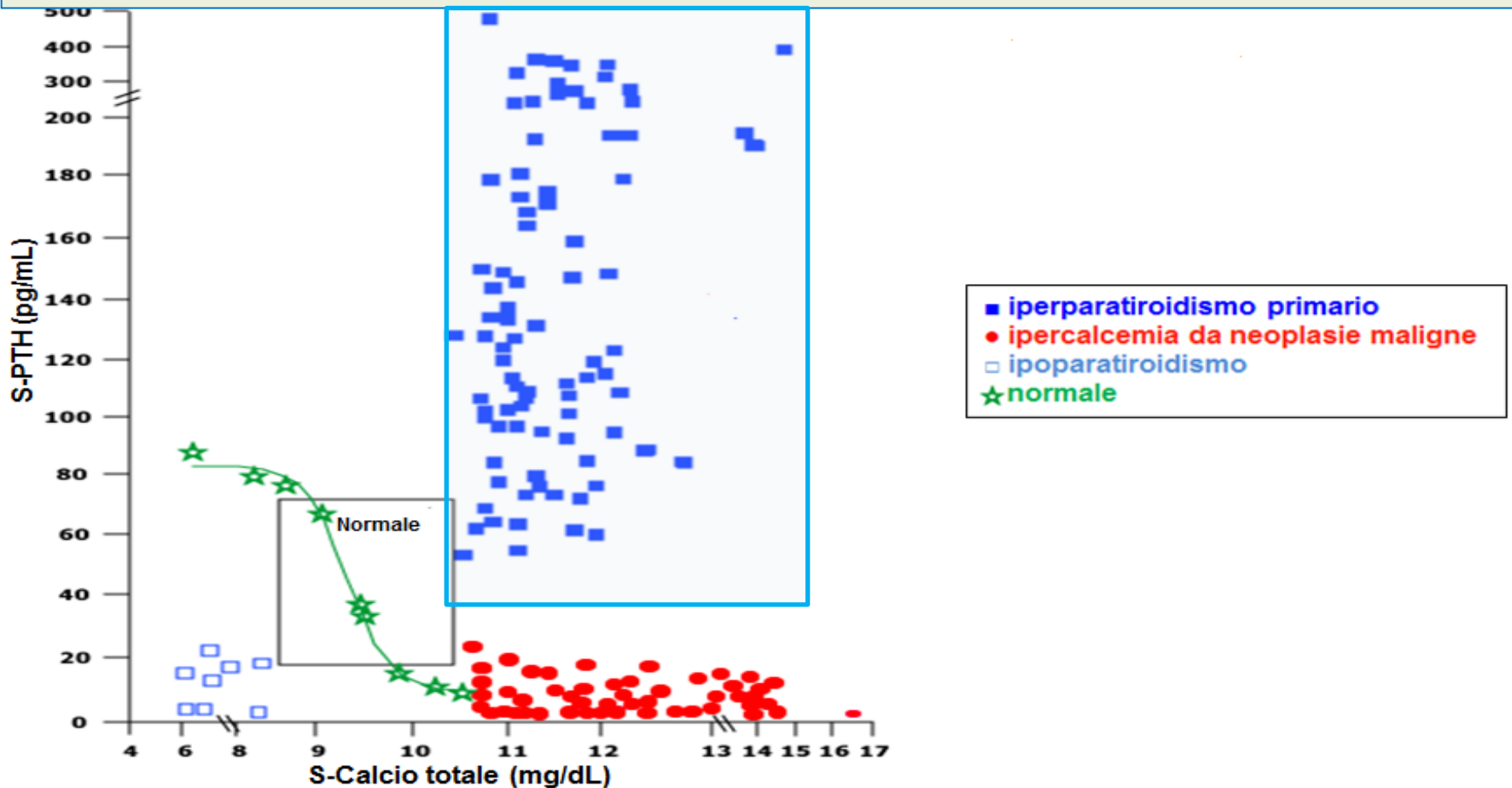
Malattie granulomatose croniche

Attivazione extrarenale di 1α -idrossilasi

IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

Si misura quindi la concentrazione di **PTH** .

La diagnosi di iperparatiroidismo primario viene posta sulla base di un valore **PTH francamente elevato**, oppure **entro l'intervallo di riferimento normale, ma inappropriatamente elevato rispetto all'ipercalcemia**.



IPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

L' 80-90% dei pazienti con iperparatiroidismo primario ha elevate concentrazioni di PTH intatto (IR normale = 10-60 ng/L).

In uno studio, le **concentrazioni medie di calcio e PTH serici nei pazienti con iperparatiroidismo asintomatico** erano:

S-Calcio Totale = 11 mg/dL (2.8 mmol/L)

S-PTH = 120 ng/L

DIAGNOSI DIFFERENZIALE DEGLI IPERPARATIROIDISMI PRIMARI

	iPTH (PTH intatto)	S-Calcio totale	U-Calcio (mg/24h)	25OHD
HPT primario (PHPT)	Normale alto → Elevato	Elevato	Normale o Elevato	Normale o normale basso
Neoplasia	Basso (<20pg/mL)	Elevato	Elevato	Dipende dal tumore
HPT secondario a carenza vit D	Elevato	Normale o Basso	Basso	Basso (20 ng/mL)

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

1) IRC con aumentata secrezione di PTH
per ipertrofia ghiandolare e
per ridotta espressione di sensori del calcio

Ridotta risposta ai livelli di calcio con continua secrezione
di PTH nonostante livelli normali o alti di calcio



2) Carenza grave di vitamina D
per iperplasia delle 4 ghiandole paratiroidee

L'iperparatiroidismo secondario (SHPT)

Compare nelle condizioni di **appropriata risposta delle paratiroidi in presenza di bassi livelli di calcio**. Le concentrazioni di PTH salgono, il calcio viene mobilizzato da aumentato riassorbimento osseo e per aumentato assorbimento intestinale (da calcitriolo).

Quindi biochimicamente è caratterizzato da:
elevato PTH e Calcio basso o normale.

L'iperparatiroidismo secondario può comparire in:

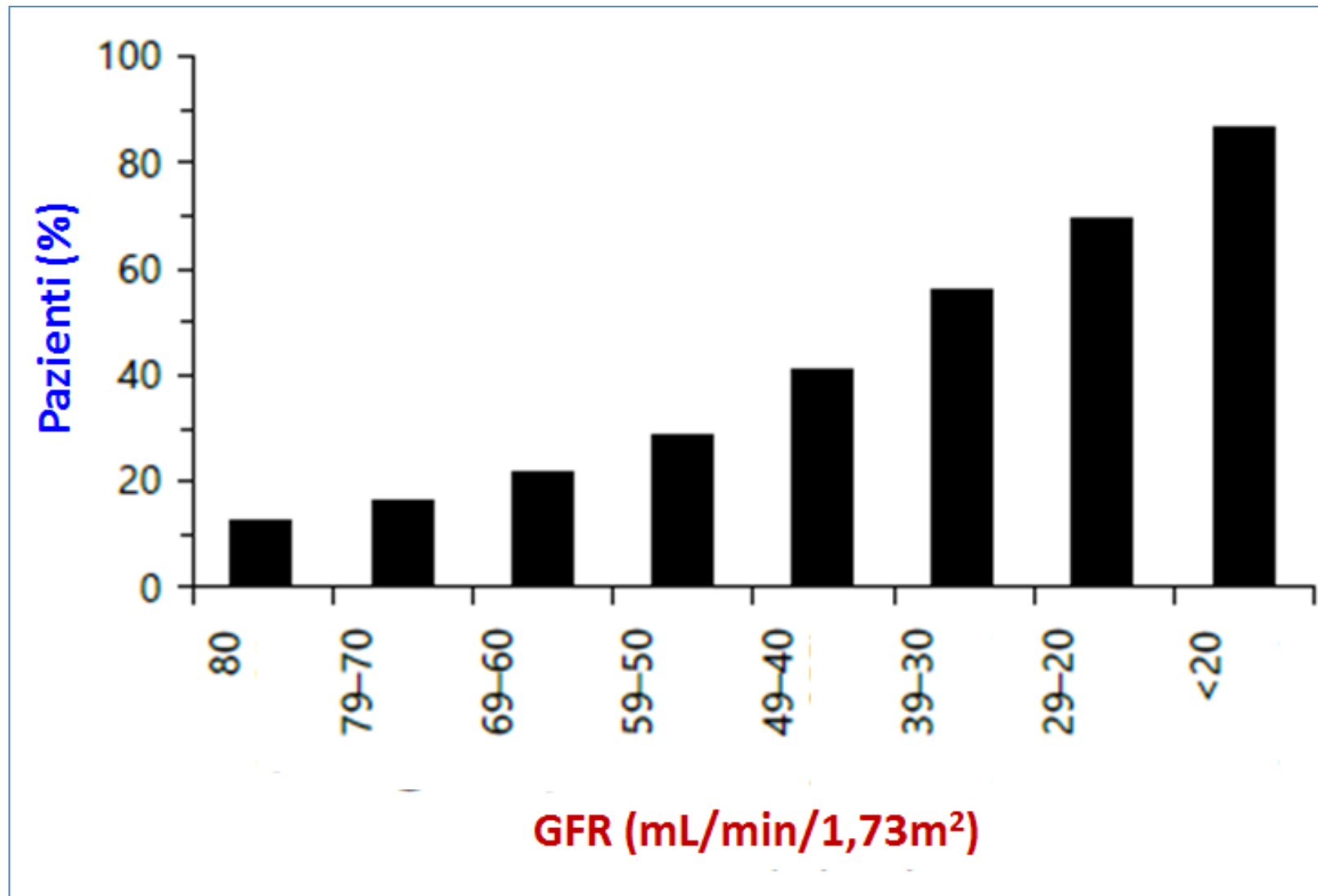
- **pazienti con insufficienza renale** e carente produzione di calcitriolo (1,25diidrossivitamina D)
- **individui con inadeguata assunzione o assorbimento di calcio** (carenza di vitamina D o malassorbimento).

Per **differenziare l'iperparatiroidismo secondario da quello primario normocalcémico** bisogna accertare la funzione renale (S-creatinina), lo stato della vitamina D (25OHD), e la calcio sufficienza (U-Calcio).

L'iperparatiroidismo secondario (SHPT)

Si manifesta con un aumento della produzione di ormone paratiroideo (PTH) associato a iperplasia paratiroidea ed è una **conseguenza frequente e grave del declino della funzione renale.**

Da uno studio per la valutazione della malattia renale precoce (SEEK) è emerso che la **prevalenza di SHPT** (definito da PTH intatto >65 ng/L) **comincia ad aumentare nello stadio 3b** di funzione renale, quando il GFR scende <45 mL/min/1,73m², e aumenta lungo tutto lo spettro della riduzione del GFR sino a includere quasi tutti i pazienti con GFR <20 mL/min/1,73m².



La prevalenza di SHPT (definito da PTH intatto >65 ng/L) nei pazienti con malattia renale cronica (CKD) **aumenta con il declino della GFR.**

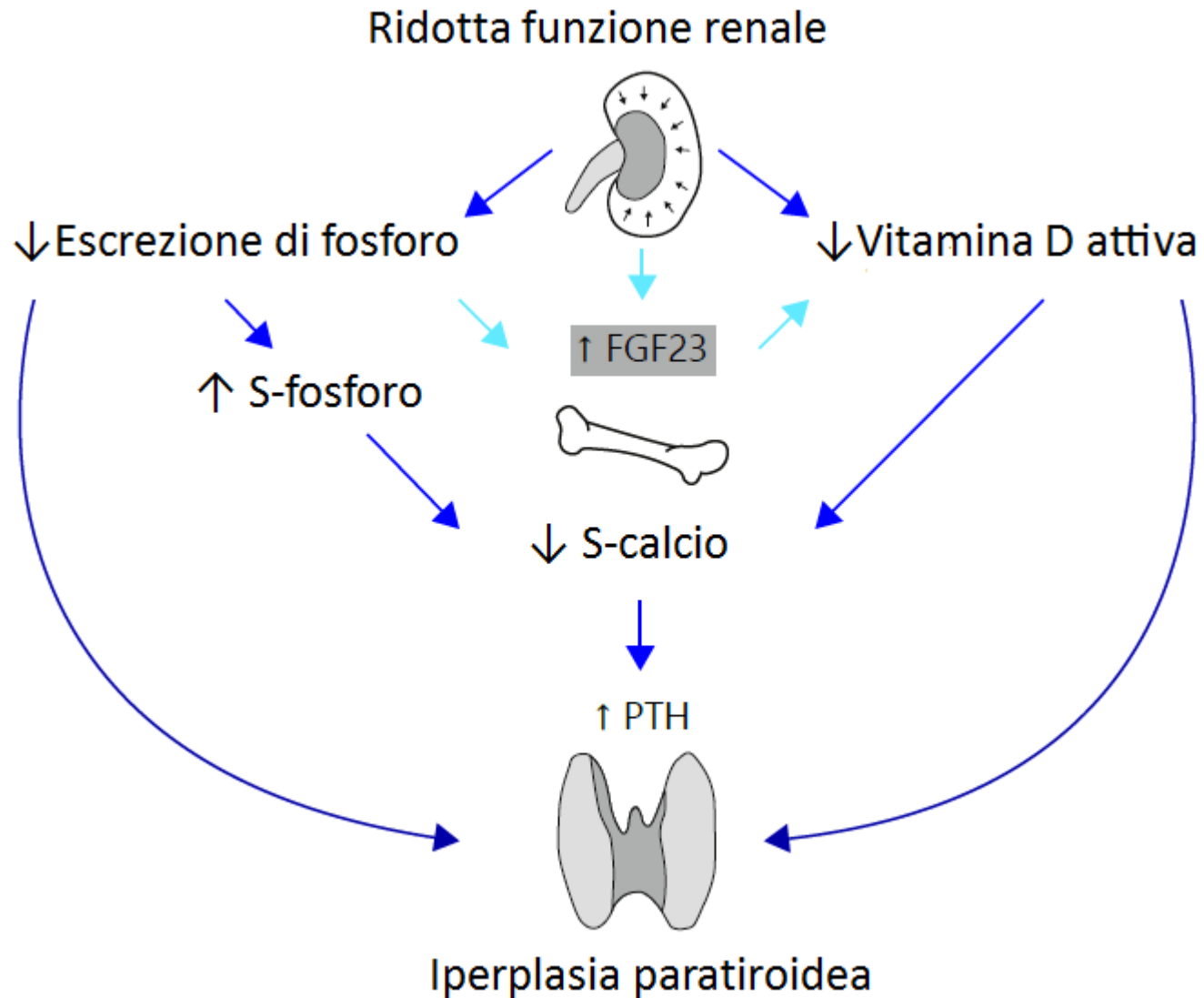
L'iperparatiroidismo secondario (SHPT)

SHPT è il risultato di una **complessa serie multifattoriale di disturbi del metabolismo minerale e osseo**, sistemi che si trovano normalmente in un equilibrio finemente modulato.

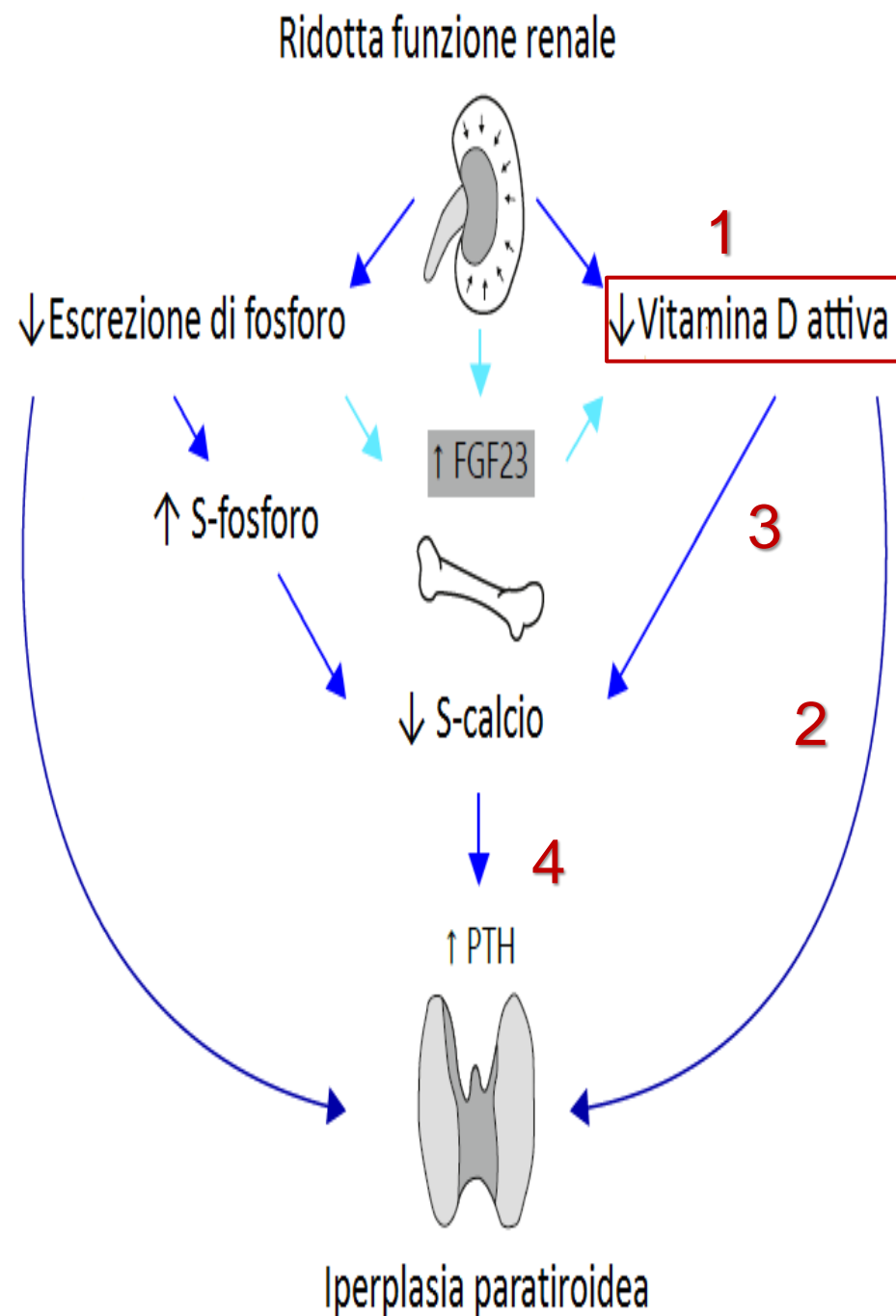
Le **implicazioni cliniche** dello sconvolgimento di questo equilibrio comprendono:

- osteodistrofia renale (perdita ossea, fratture da fragilità, deformità ossea),
- calcificazione vascolare,
- malattia cardiovascolare,
- aumentata morbidity e mortalità.

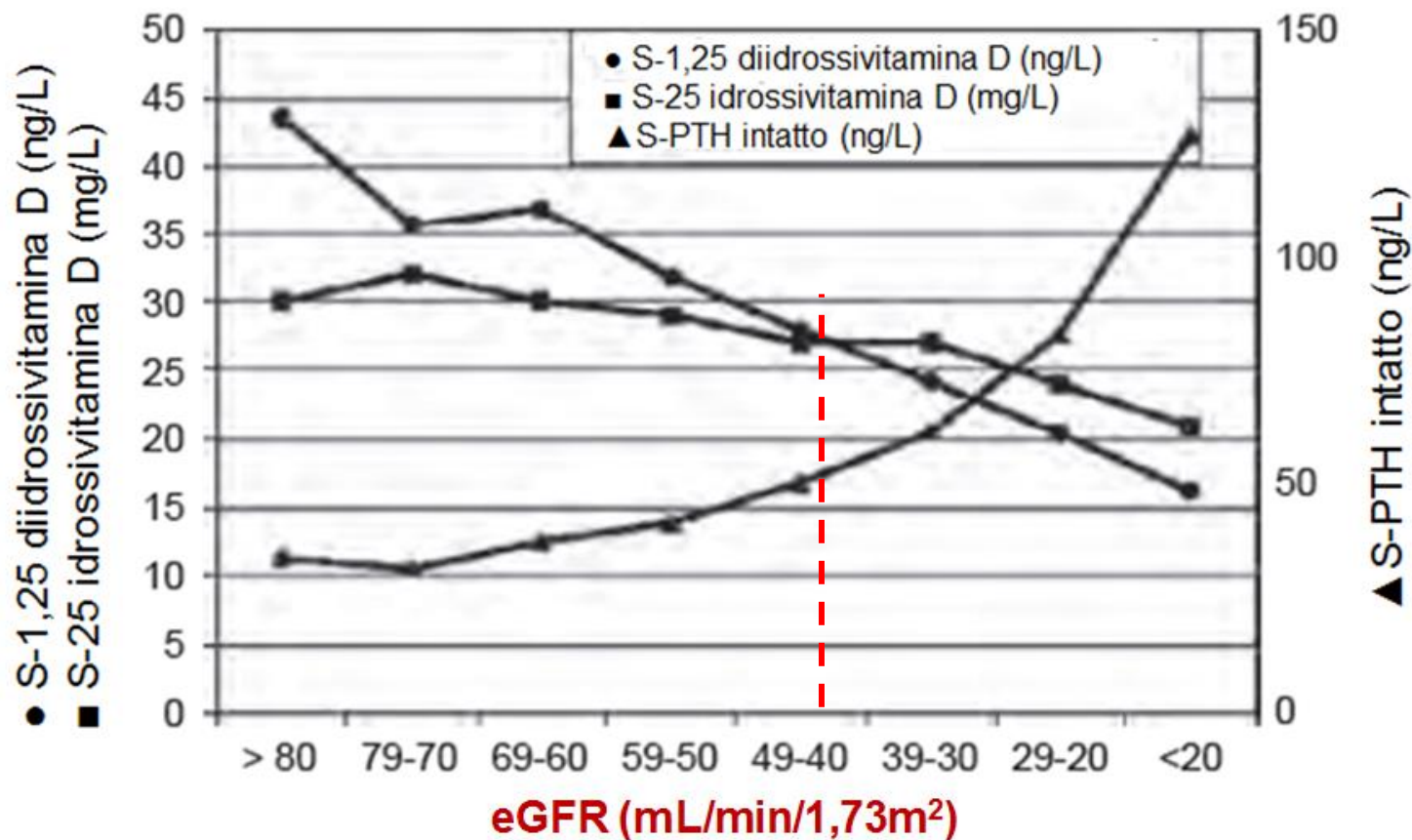
Patogenesi di SHPT nella malattia renale cronica



- Con il declino della funzione renale, i livelli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ calano a causa della ridotta disponibilità di 1α -idrossilasi. (1)
- In condizioni di omeostasi, un ruolo chiave della forma attiva della vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, è la soppressione dei livelli sierici di PTH e della iperplasia paratiroidea tramite i recettori paratiroidi della vitamina D, che nella malattia renale cronica si riduce. (2)
- Un altro ruolo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ che è rilevante per lo sviluppo di SHPT è la stimolazione dell'assorbimento del calcio nell'intestino: con livelli bassi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ l'assorbimento di calcio diminuisce, contribuendo così allo stato ipocalcémico (3), che stimola la secrezione di PTH. (4)

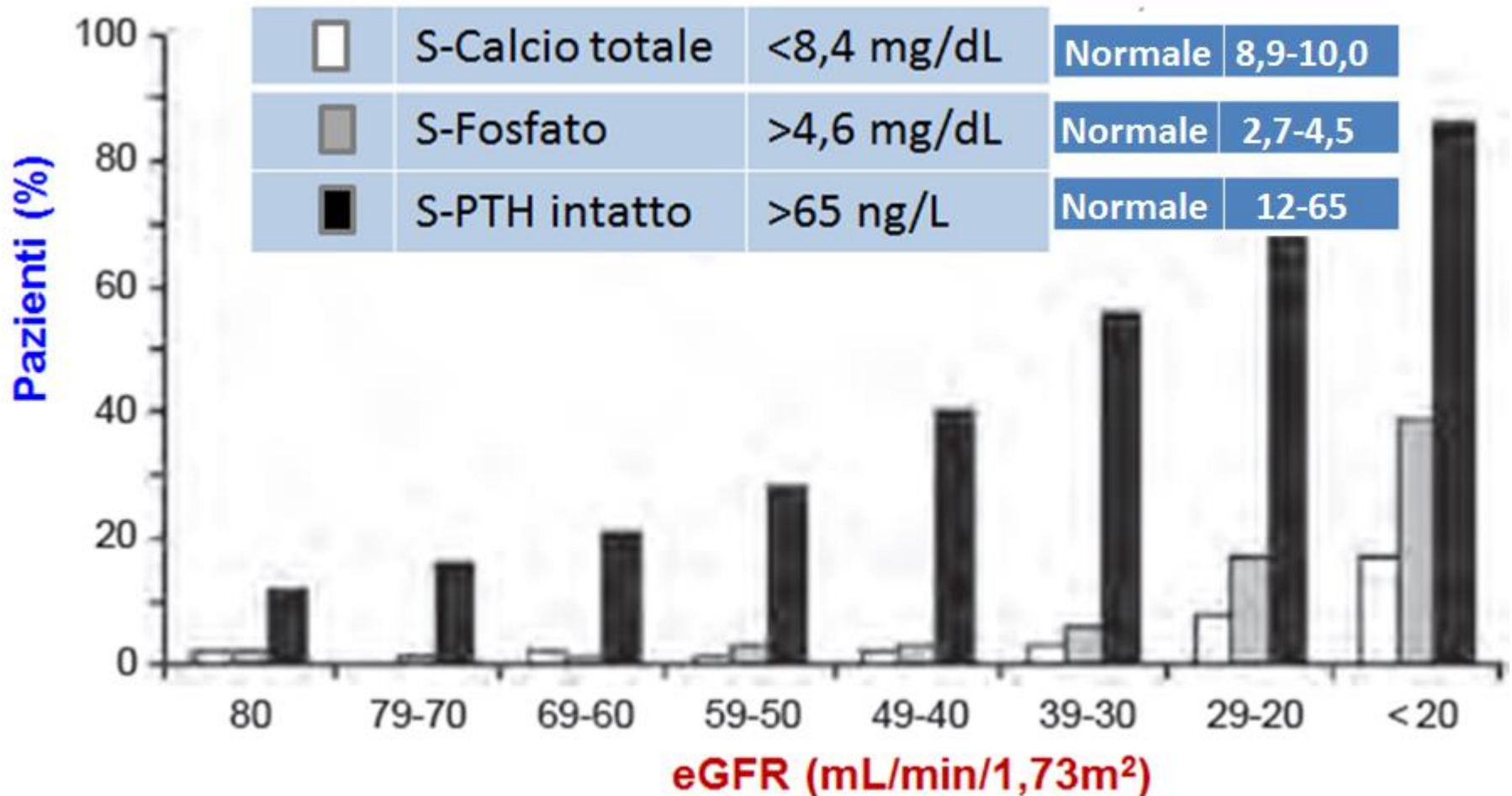


Valori mediani nel siero di 1,25 diidrossivitamina D, 25 idrossivitamina D e PTH intatto in base ai livelli di GFR



I livelli di vitamina D declinano precocemente nella malattia renale cronica (CKD), suggerendo che questo evento è importante per lo sviluppo di SHPT. Nello studio SEEK, i livelli di 1,25(OH)₂D₃ si correlano con la GFR ed diventano carenti (<22 pg/mL) quando la GFR è circa 45 mL/min/1,73 m²; cioè allo stesso livello in cui aumenta la prevalenza di SHPT.

Prevalenza dell'alterazione del metabolismo minerale nella malattia renale cronica.



Prevalenza di iperparatiroidismo, ipocalcemia e iperfosfatemia in base ai livelli di eGFR a intervalli di 10 mL/min/1,73m².

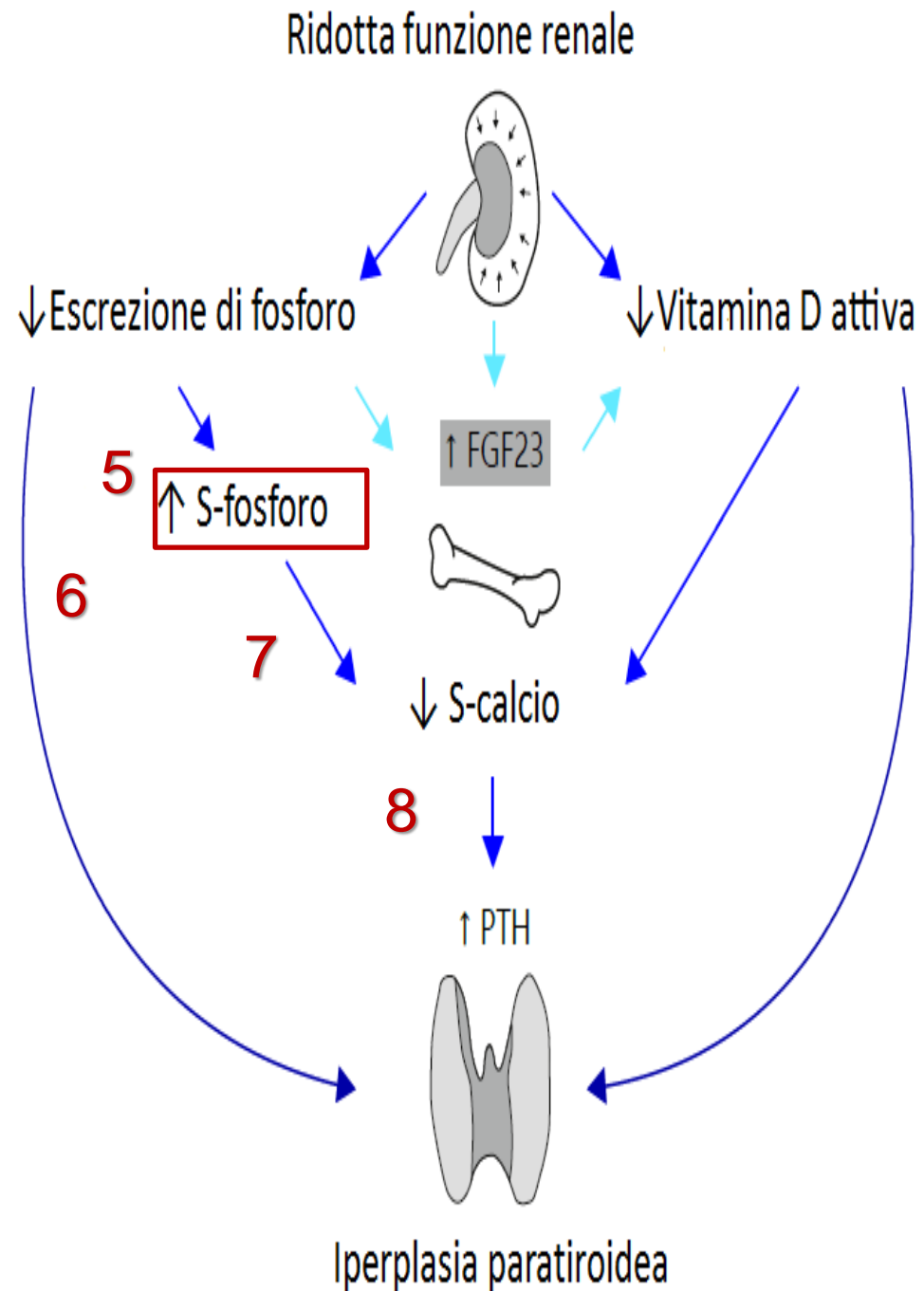
- **Il declino progressivo della funzione renale** comporta anche elevati livelli plasmatici di fosforo.

L'iperfosfemia: (5)

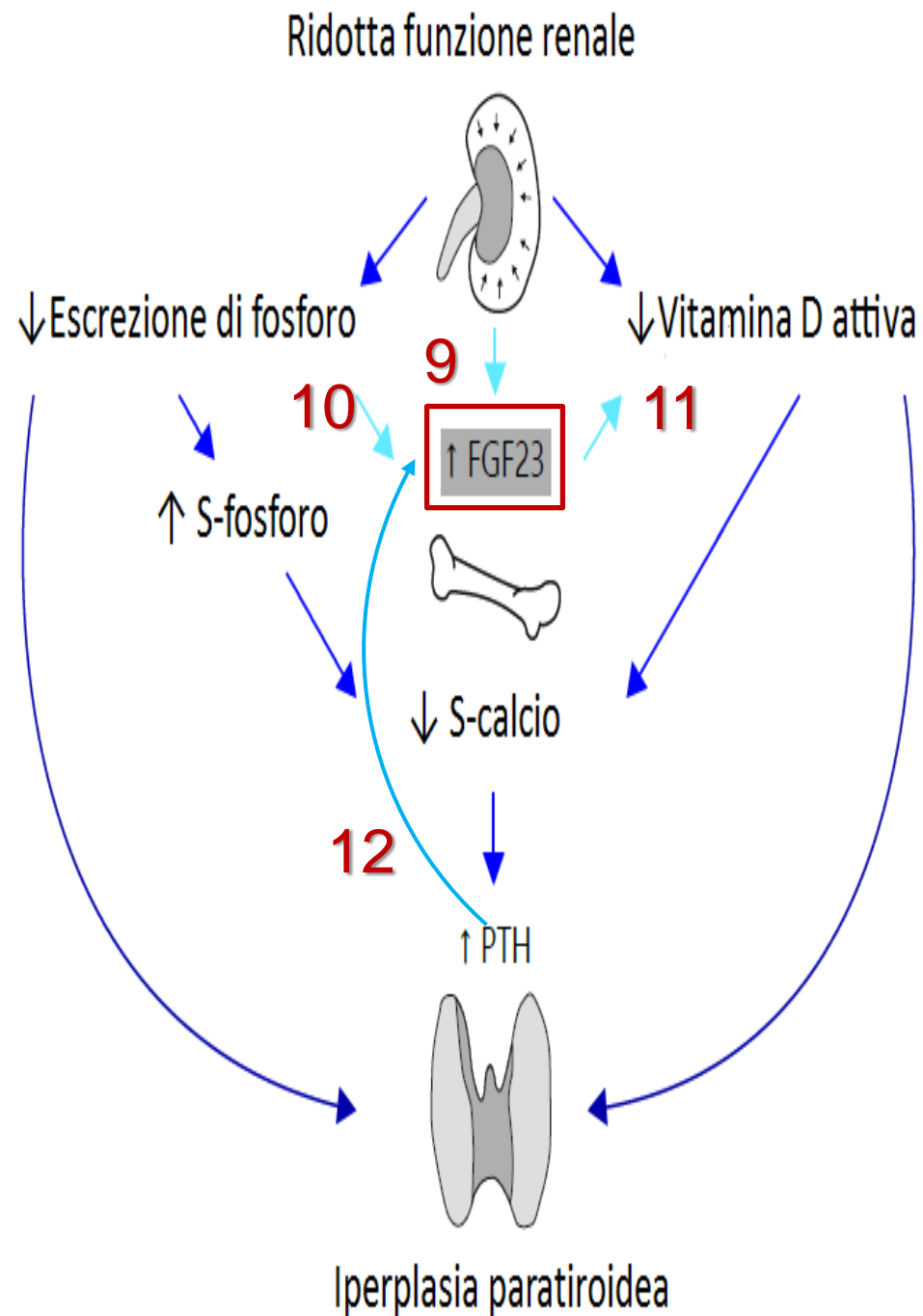
- **promuove direttamente la produzione di PTH (6)** e

- insieme con la diminuzione dello assorbimento del calcio mediato dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, **provoca ipocalcemia. (7)**

- **L'ipocalcemia, a sua volta, stimola la produzione e la secrezione di PTH. (8)**



- Il **fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF23)**, un peptide prodotto dagli osteociti, contribuisce ulteriormente alla fisiopatologia della SHPT. I livelli di FGF23 **aumentano con il declino della funzione renale (9)**
- Sembra che l'aumento dei livelli di FGF23 sia la **risposta omeostatica della ridotta escrezione di fosfato, (10)** che si verifica con la riduzione della massa renale.
- FGF23 **inibisce la 1 α -idrossilasi**, sopprimendo in tal modo la formazione di 1,25(OH)₂D₃. **(11)**
- Inoltre, il PTH stesso sembra stimolare ulteriormente la produzione FGF23. **(12)**



Fisiopatologia di SHPT

Va notato che **la conoscenza di questo complesso processo multifattoriale è ancora in evoluzione.**

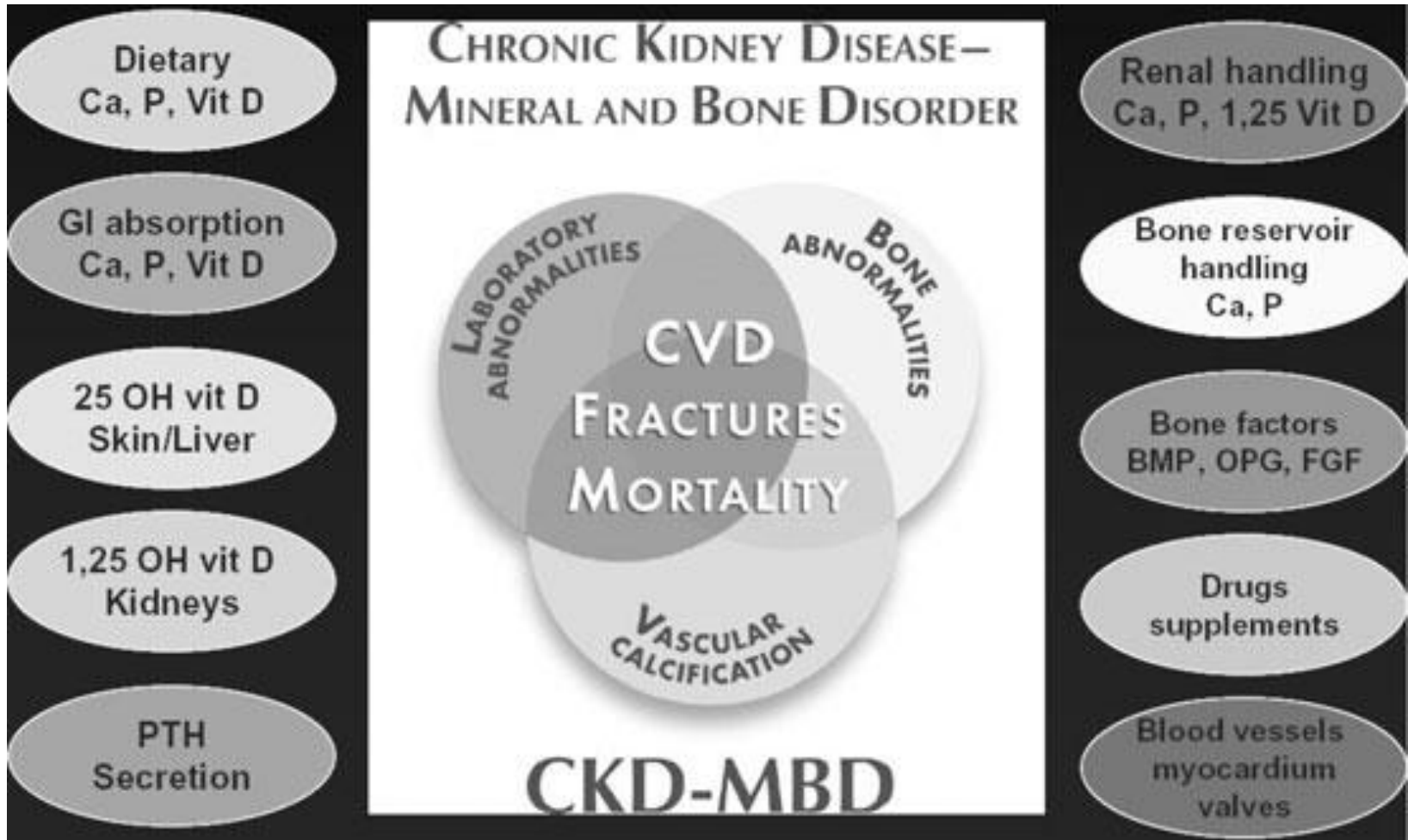
- ❑ Diminuita espressione di recettore della vitamina D e dei recettori sensori del calcio (CaSR), nonché
- ❑ FGFR-Klotho (proteina transmembrana codificata dal gene soppressore dell'invecchiamento «Klotho» che si lega in un complesso con il recettore di FGF23 e con il FGF23, che induce un segnale di fosforilazione) sono associati all'iperplasia paratiroidea;
- ❑ è probabile che altri mediatori (ad es sclerostina) svolgono anche un ruolo nel deterioramento osseo e vascolare nei pazienti con insufficienza renale cronica.

Fisiopatologia di SHPT

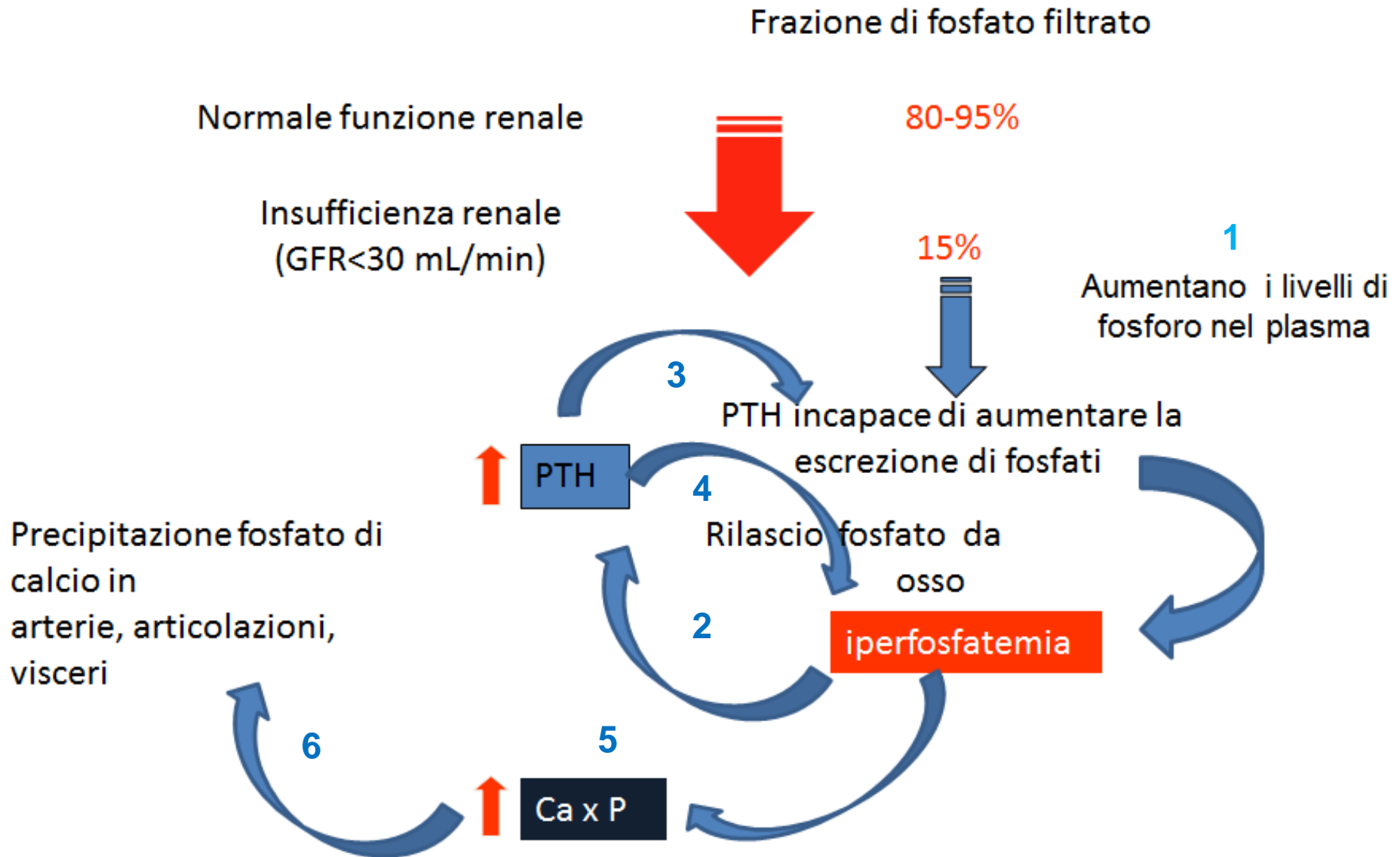
In definitiva, il quadro del declino della GFR, è una cascata di cambiamenti adattativi all'interno di un sistema strettamente regolato che porta ad un metabolismo minerale altamente disordinato, che ha come caratteristiche salienti:

- ❑ calo dei livelli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,
- ❑ iperfosfatemia,
- ❑ ipocalcemia,
- ❑ aumento di FGF23,
- ❑ SHPT, con associata malattia ossea, calcificazione vascolare, malattia cardiovascolare, e aumento della morbilità e della mortalità.

RISCHIO DI CALCIFICAZIONE DELLE ARTERIE CORONARIE NELLA INSUFFICIENZA RENALE CRONICA



EFFETTI MALADATTATIVI DELL'IPERPARATIROIDISMO



EFFETTI MALADATTATIVI DELL'IPERPARATIROIDISMO

KDOQI

Forte associazione tra mortalità cardiaca e fosforo serico o prodotto Ca x P

Rischio relativo di morte, aggiustato, è maggiore:

per fosforo serico > 6.5 mg/dL----->	Normale	2,7-4,5
per prodotto Ca x P > 72 mg ² /dL ² ----->	Normale	32-40

Linee Guida KDOQI raccomandano:

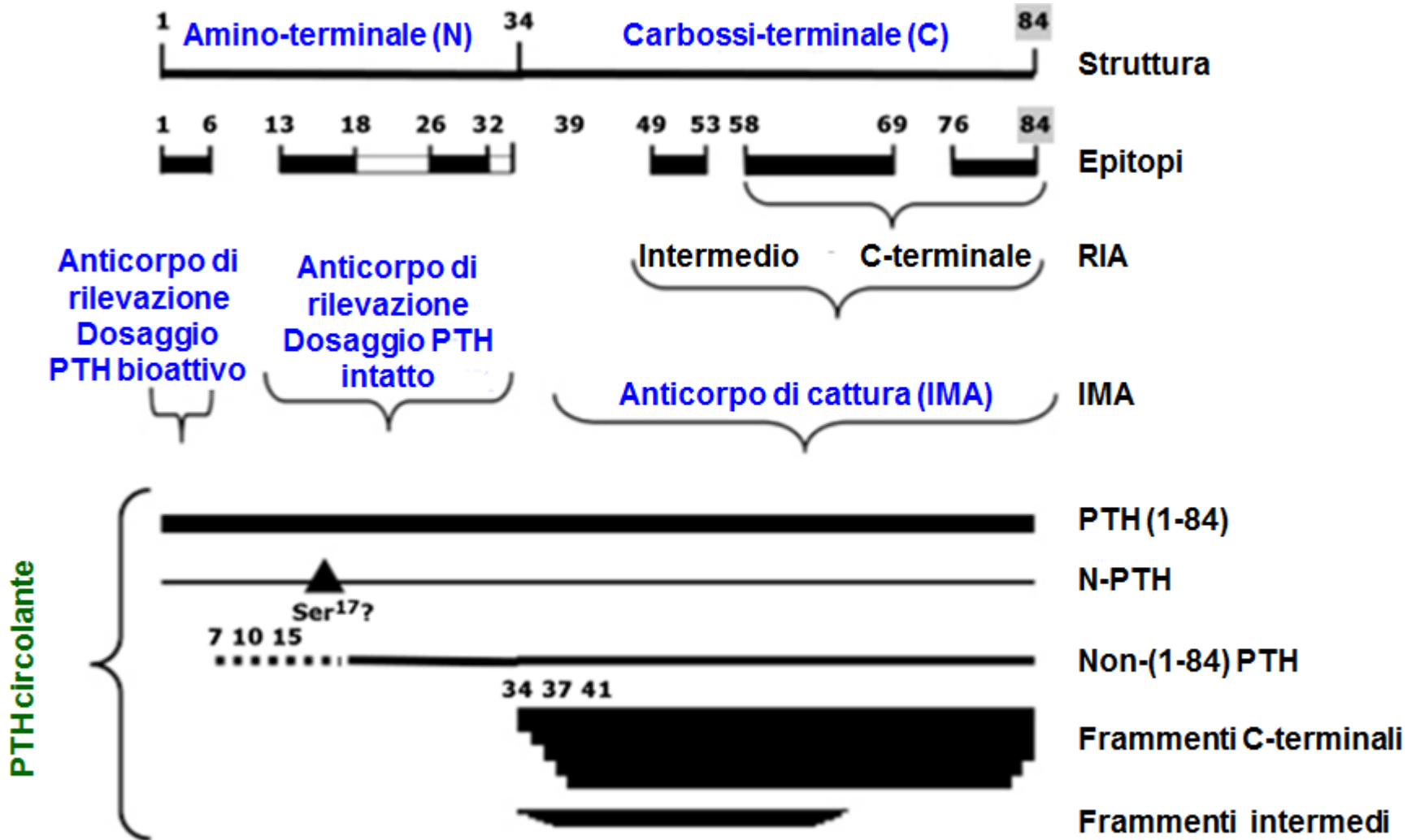
Predialisi Calcio serico 8.4-9.6 mg/dL (2.1-2.4 mmol/L)	Normale	8,9-10,0
Predialisi Fosforo serico 3.4-5.5 mg/dL (1.1-1.78 mmol/L)	Normale	2,7-4,5
Predialisi PTH Intatto 150-300 ng/L	Normale	12-65

Raggiungere i target di calcio e fosforo ha impatto simile per outcome a quello per iPTH



Dosaggio del Paratormone

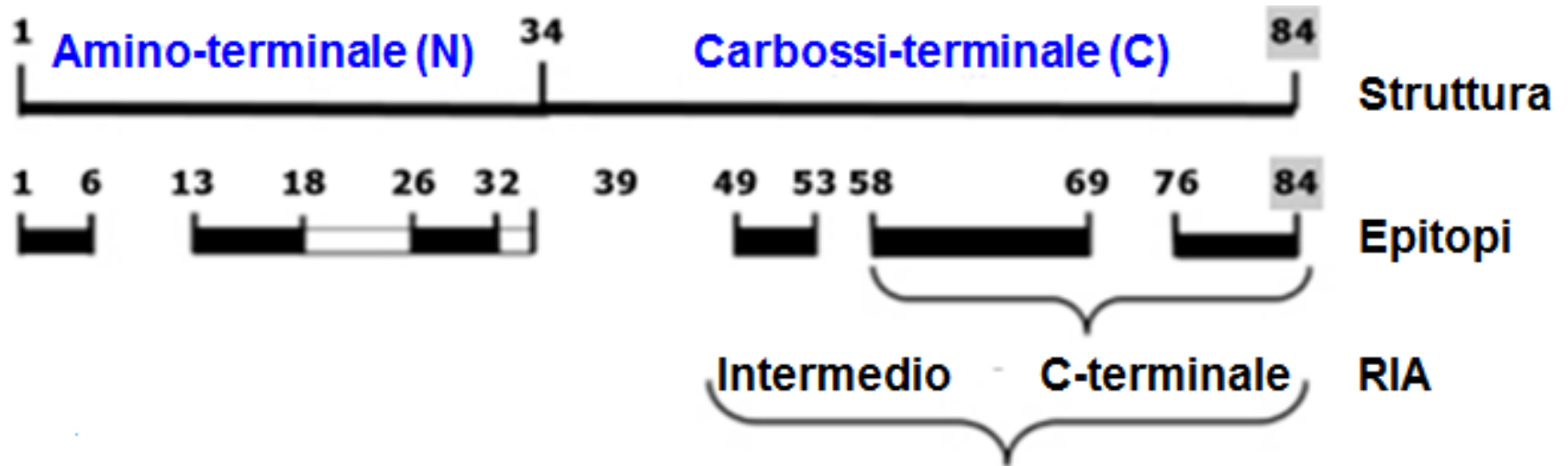
DOSAGGIO DEL PARATORMONE



Presentazione schematica del PTH(1-84) e le regioni peptidiche riconosciute dagli anticorpi usati negli immunodosaggi a due siti.

DOSAGGIO DEL PARATORMONE

RIA



Dosaggio RIA con diversi anticorpi policlonali verso porzione intermedia o C-terminale.

Rileva frammenti privi di porzione N-terminale, perciò inattivi.

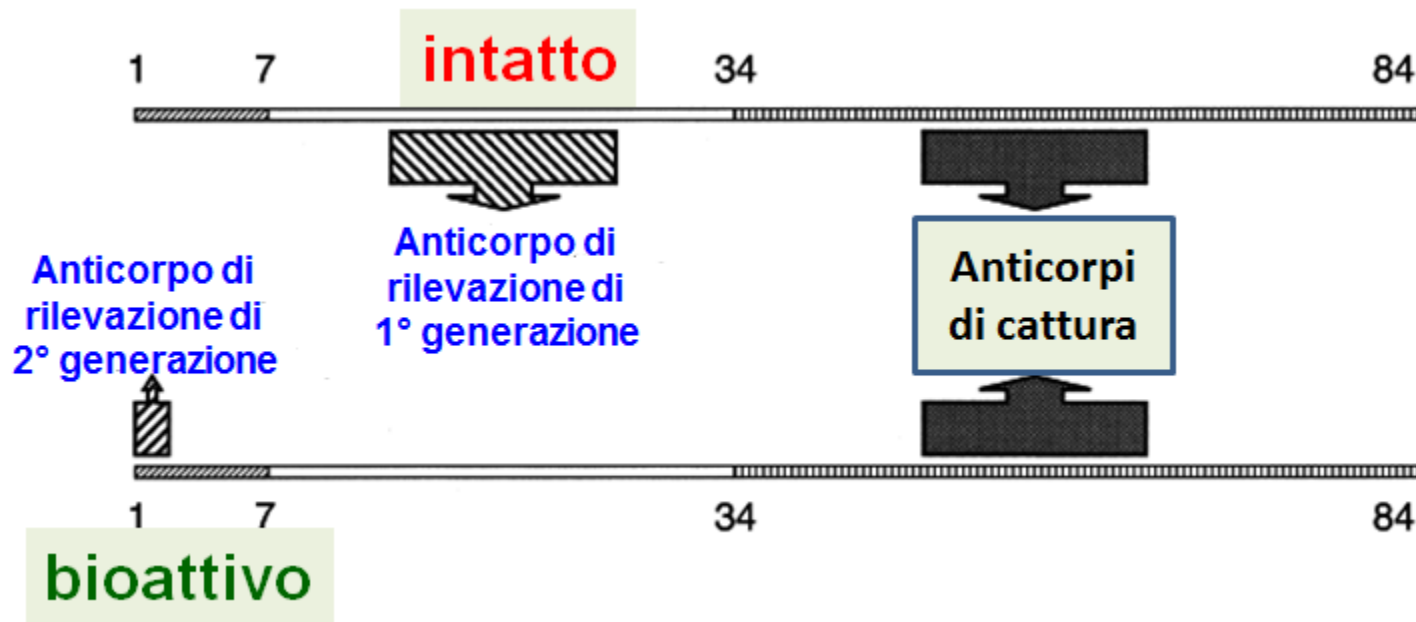
Cross-reattività con vari frammenti ormonali e insufficiente sensibilità

Dosaggio abbandonato.

DOSAGGIO DEL PARATORMONE

1° generazione – Intatto

2° generazione – Bioattivo



Dosaggio Two-site sandwich assay:

Anticorpo-cattura verso parte C-terminale

Anticorpo di detezione verso porzione N-terminale

Epitopi detezione:

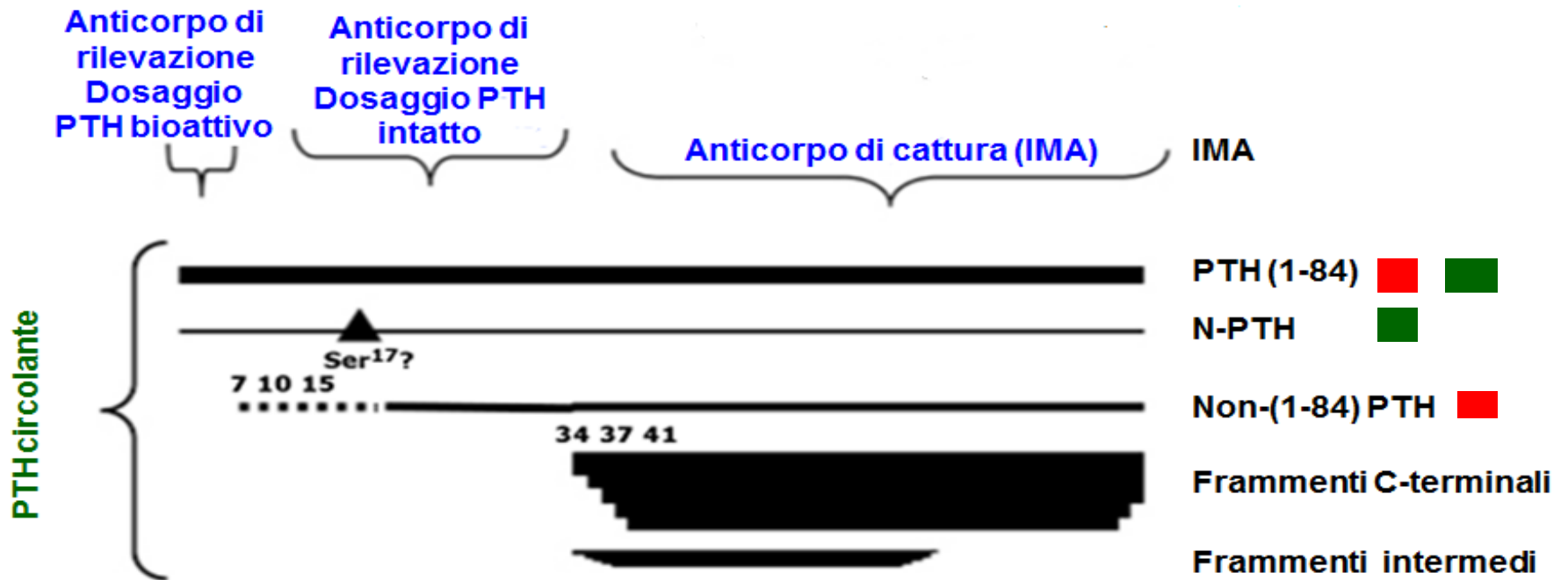
13-34, **PTH Intatto**, 1° generazione

1-4, **PTH Bioattivo**, 2° generazione

Epitopi di cattura:

39-84

DOSAGGIO DEL PARATORMONE



PTH Intatto: riconosce PTH 1-84 e non-PTH 1-84

PTH Bioattivo: riconosce esclusivamente PTH 1-84, ma anche il frammento N-terminale N-PTH

Frammenti C-terminali :

sono i più abbondanti, nei sani 80% del PTH circolante, nei pz con IRC 95%.

Il grosso frammento **non-PTH 1-84**, serie di frammenti C-T privi di una piccola porzione N-T, secreto negli iperparatiroidismi primari e secondari, è una forma dominante (C-PTHR).

Frammenti N-terminali:

N-PTH, nei sani 4-8% del PTH Bioattivo e nei pz con IRC 15%, azione sconosciuta.

USO CLINICO DEL DOSAGGIO DEL PARATORMONE

USO DEL DOSAGGIO DEL PARATORMONE: PTH Intatto e PTH Bioattivo

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

In Insufficienza Renale Cronica (IRC) per diagnosi e monitoraggio della malattia ossea.

Correlazione eccellente tra PTH Intatto e Bioattivo ($r=0.977$),
Ma in pazienti- HD (in emodialisi) il PTH con metodo Bioattivo è **in media la metà rispetto a quello Intatto**, a causa di gran numero di frammenti C-T rilevati dal metodo Intatto.

La riduzione di GFR entro lo spettro della IRC si associa di preferenza ad aumento di non-PTH 1-84, anziché di PTH 1-84 e al corrispondente calo del rapporto :

PTH 1-84 (valore con metodo Bioattivo)

non-PTH 1-84 (valore con metodo Intatto-valore con metodo Bioattivo)

USO DEL DOSAGGIO DEL PARATORMONE: PTH Intatto e PTH Bioattivo

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

Linee guida della National Kidney Foundation Dialysis Outcome Quality (K/DOQI)

Per il trattamento ottimale dell'iperparatiroidismo secondario e delle alterazioni del metabolismo minerale .

La maggior parte dei dati clinici , inclusi quelli relativi alla osteodistrofia renale, si basano sul dosaggio del PTH Intatto.

In assenza di dati che attribuiscano benefici alla misura delle isoforme di PTH in IRC, il PTH Intatto dovrebbe essere usato per la diagnosi e monitoraggio della malattia ossea renale.

USO DEL DOSAGGIO DEL PARATORMONE: PTH Intatto

IPERPARATIROIDISMO SECONDARIO

Linee guida della National Kidney Foundation Dialysis Outcome Quality (K/DOQI)

Valori target di PTH intatto

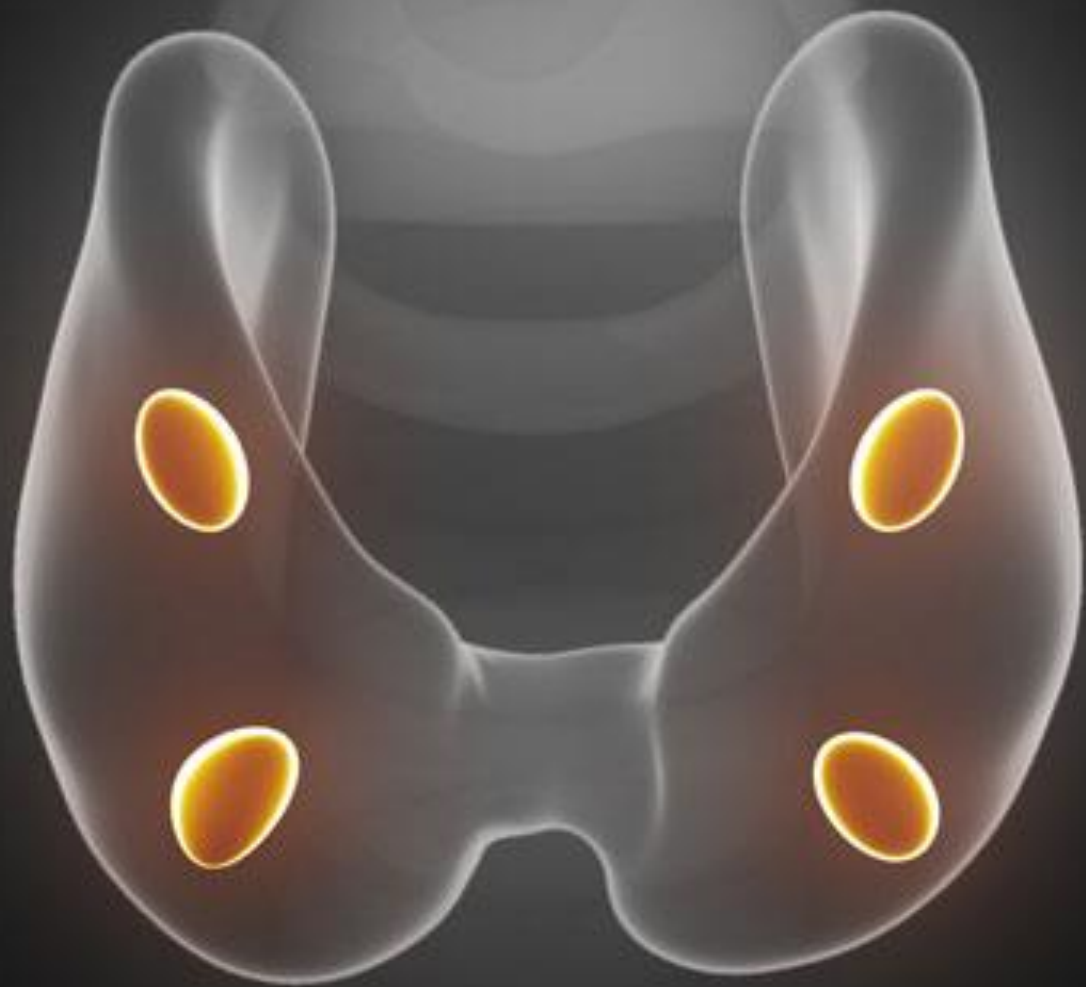
35-70 pg/mL per IRC stadio 3a e 3b (GFR 30-59 mL/min per 1.73 m²)

70-110 pg/mL per IRC stadio 4 (GFR 15-29 mL/min per 1.73 m²)

150-300 pg/mL per IRC stadio 5 (GFR <15 mL/min per 1.73 m²)

Raccomandazioni Linee Guida KDOQI: Proposta.

	% pazienti HD entro target	% di tempo entro target per singolo paziente
Predialisi Calcio serico 8.4-9.6 mg/dL		
Predialisi fosforo serico 3.4-5.5 mg/dL		
Predialisi PTH Intatto 150-300 pg/mL		





Corso di Patologia Clinica I
Tecnici di Laboratorio Biomedico II anno
(2014-2015)

Principi e Tecniche Diagnostiche di Chimica Analitica Clinica

Docente: Dott.A.Cariani

Biologo Dirigente Patologia Clinica
Laboratorio Unico Provinciale
Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche
Azienda Ospedaliero Universitaria S.Anna
Cona/Ferrara

PATOLOGIA CLINICA

DEFINIZIONE

La **patologia clinica**, altrimenti chiamata **Medicina di Laboratorio** o **analisi clinica** o **Biologia Clinico-Medica** è la branca della patologia generale che si occupa di analizzare i campioni biologici di tessuto, sangue o altri liquidi e secrezioni con lo scopo di valutare i parametri fisiopatologici ed effettuare una diagnosi.

Medicina di Laboratorio

Funzione

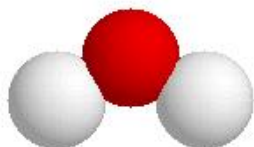
Estendere i sensi del clinico al fine di migliorare l'intervento terapeutico e quindi lo stato psicofisico dell'individuo "malato"

Efficacia

Il clinico deve eseguire test appropriati al momento giusto e valutarne la significatività in termini di probabilità di malattia

Benvenuto nel...

Sito della Medicina di Laboratorio



Il linguaggio delle misure

LAB TESTS ON-LINE 

*“Dove è la sapienza
che abbiamo smarrita nella conoscenza
dove è la conoscenza
che abbiamo smarrita nell'informazione
dove è l'informazione
che abbiamo smarrita nei dati.”
(Marc Porat)*

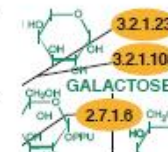


Manuale Merck di diagnosi e terapia

Estendere i sensi del medico. Questo è il significato della diagnostica di laboratorio: un significato che condivide con l'altra grande estensione dei sensi del medico, la diagnostica per immagini.

Inspirata dai "Choruses from the rock" di T. S. Eliot, la frase di Porat rappresenta lo spunto per riflettere sul passaggio

dati → informazione → conoscenza



Errori congeniti del metabolismo

new

discutendo della complessità dei processi che consentono di trasformare i dati di laboratorio in

Cosa percepiamo?????

- Noi non percepiamo la “realtà” ma ciò che i vari sistemi di trasduzione ci trasmettono
- Noi non immagazziniamo la realtà ma ciò che dopo la trasduzione abbiamo elaborato

Quindi

Dobbiamo cercare di identificare/controllare bene il segnale di partenza, tenere sotto controllo i sistemi di trasduzione ed elaborare i “dati” in maniera corretta per evitare di avere una visione “realistica” ma non “reale” dei fenomeni/eventi/stati che analizziamo

Matrici biologiche:

1. **Sangue** (venoso, arterioso, capillare)
2. **Urine** (chimico fisico, colturale, citologico..)
3. **Feci** (RSO, chimico fisico, ...)
4. **Liquido Cefalo Rachidiano** (chimico fisico, colturale, citologico..)
5. **Liquidi da cavità sierose** (pleurica, peritoneale, pericardica per chi-fis-colt)
6. **Liquido amniotico** (fisico, chimico, citologico)
7. **Liquido sinoviale** (fis-chi-citol)
8. **Espettorato** (citol)
9. **Lavaggio bronchiale** (BAL per citologico)
10. **Tamponi, essudati, liquidi drenaggi, tessuti, materiali** (chi-fis-cito-colt)

Variabilità analitica

- **Variabilità preanalitica**
- **Variabilità analitica**
- **Variabilità post analitica** (software di gestione dati, manipolazione dati da parte dell'operatore, ...)

Variabilità preanalitica

- *Variabilità biologica (intra-interindividuale)*
- Prelievo campione
- *Conservazione campione*
- Trattamento preanalitico campione



La fase pre-analitica

Sieratura e centrifugazione

- 30' in contenitori di vetro (> plastica)
- 15' con attivatori della coagulazione (vetro/ caolino)
- 5' con idonee quantità di trombina
- Tempi più lunghi a 4°C

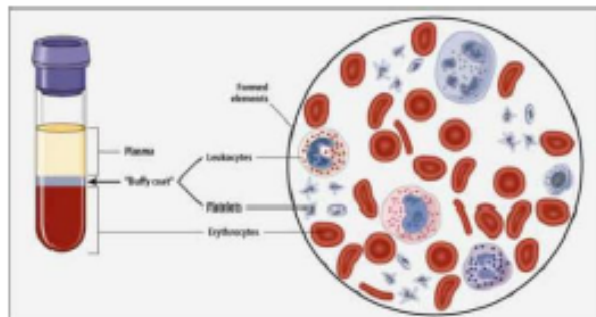
Entro 1h dal prelievo



Centrifugazione



Separazione siero/plasma dalla parte corpuscolata





La fase pre-analitica

Conservazione dei campioni

Temperatura di conservazione del materiale biologico

0°C (Acqua e ghiaccio): Ormoni-Metaboliti a vita breve (NH_4^+ Acido lattico)

-20°C/-70°C/-142°C

Nota: A temperatura ambiente non avvengono cambiamenti per 4h a carico di enzimi, metaboliti, elettroliti e minerali

Conservazione al buio (Bilirubina, Porfirine, Vitamine)

→ Liofilizzazione

→ Modificazione del pH

pH 2 per Ca, P e ossalati nelle urine (HCl diluito)

pH 7-8 per Acido urico (Carbonato di sodio)

→ Aggiunta di sostanze chimiche con funzioni particolari



Alcuni analiti sono stabili, ad es bilirubina, colesterolo, trigliceridi, azoto urico, ALP, non subiscono alterazioni nei sieri conservati a contatto col coagulo per almeno 48 h a temperature comprese tra 4°C e 30°C.

Variabilità biologica (intra-inter)

- La **variabilità biologica** è la fluttuazione naturale che ciascun analita ha attorno al proprio **punto omeostatico** all'interno di un fluido biologico, fluttuazione dovuta a fattori caratterizzati da particolare incisività come :

Variabilità biologica (intra-inter)

- Specie
- Razza (caucasici, africani, orientali,...)
- Età
- Sesso
- Abitudini (alimentari, voluttuarie,..)
- Ambiente (radiazioni, inquinanti, cronobiologia,...)
- Stato psico-fisico (salute, malattia, riposo, attività, stress,..)
- Xenobiotici (farmaci, tossici,...)
- Ritmi circadiani
-

“Controllare” le condizioni del soggetto

- **Dieta e digiuno** (glucosio, potassio, fosforo, trigliceridi, azoto ureico,..)
- **Farmaci** (interferenza metabolica, fisica, chimica)
- **Postura,attività,“stato”** (clino-ortostatismo; persone “esterne”, ambulatoriali o ricoverate)
- **Ritmo cronobiologici** (ultradiano, circadiano, infradiano)

[VES, ACTH, cortisolo, gonadotropine, sideremia, cloruremia, 5-idrossitriptamina, catecolammine urinarie, sodio, potassio, fosfati,...],

Variabilità biologica

- I **ritmi circadiani** assumono una posizione particolare. Prendiamo ad esempio alcuni ormoni e in questo contesto si può notare una certa variabilità ciclica o ritmica di tipo circadiano sui loro valori di concentrazione :
- **1.** Il cortisolo presenta un picco alle ore 4 – 6 del mattino per poi abbassarsi per tutto l'arco della giornata; alle ore 20 ha un valore pari al 50% rispetto alle ore 8. Tende ad aumentare con lo stress.
- **2.** Il TSH o tireotropina ha invece un picco alle ore 2 – 4 del mattino per poi abbassarsi per tutto l'arco della giornata mentre raggiunge il minimo intorno alle 17 – 18 del pomeriggio.
- **3.** La prolattina ha invece un picco nelle prime ore del mattino in relazione alla fase REM e presenta notevoli variazioni in gravidanza e in corso di stress.

Variabilità biologica

- Nell'organismo, infatti, le concentrazioni dei vari metaboliti presentano delle variazioni casuali attorno ad un punto omeostatico, che sono caratteristiche di ciascun individuo, e rappresentano la cosiddetta **variabilità biologica intraindividuale (CV_i)**. In modo analogo, la differenza nei risultati dello stesso costituente ottenuti in individui diversi, tutti nelle stesse condizioni fisiologiche, dovuta alla diversità dei punti omeostatici tra questi individui, costituisce la **variabilità biologica interindividuale (CV_g)**, che può essere associata ai tradizionali valori di riferimento.

Valore di riferimento (normale?)

- Per **valore normale** si intende il valore più frequentemente riscontrato negli individui sani della specie umana
 - Il concetto di **soggetto sano** è un archetipo, cioè non è facilmente identificabile con un modello reale ma si può dire che sano è un “soggetto senza malattia”
 - Fattori di variabilità del concetto di normalità sono: età , sesso, razza, estrazione sociale, abitudini di vita, ecc
- Da qui il postulato di **R. Grasbeck** che ha sostituito il concetto di **valore normale** con quello di **valore di riferimento**, calcolato su una popolazione ristretta con almeno **caratteristiche genetiche ed ambientali molto “omogenee” e confrontabili con quelle del soggetto a cui il risultato di laboratorio si riferisce. Il dato analitico ha pertanto valore solo se confrontato con i valori di riferimento.**

Valori di riferimento

- I **principali fattori che influenzano** i valori di riferimento sono principalmente :
 - **genetico** (gruppi sanguigni, antigeni di istocompatibilità);
 - **fisiologico** (età, sesso, eccesso di peso, fattori ambientali, stato nutrizionale, gravidanza, ora e giorno del prelievo, modalità di prelievo, postura);
 - **esogeno** (alimentazione, attività fisica, attività professionale, fattori psichici, abitudini di vita in genere, fumo, alcool, stress, ansia, dolore, assunzione di contraccettivi, assunzione di farmaci, altitudine, clima);
 - **variabilità intra ed interindividuale** (variabilità biologica della specie);
 - **variabilità biologica ritmica** (oscillazioni dei valori di alcuni analiti nel corso della giornata, della settimana, del mese).

Valori di riferimento

- **Se la distribuzione è statisticamente normale**, i **valori di riferimento** vengono arbitrariamente fissati come pari alla **media +/- 2 E.S.**; vi si include così circa il 95% della popolazione sana.
- **Se la distribuzione non è statisticamente normale** (cioè non è descrivibile con una gaussiana) e non si può rendere normale con procedimenti matematici, si usa prendere un limite inferiore il **percentile 2.5%** e come **limite superiore quello 97.5%** degli individui affetti dalla patologia. Ciò vuol dire che per il 5% dei casi si avranno valori troppo bassi o troppo alti senza che vi sia una patologia presente (falsi positivi).

L'intervallo dei valori di riferimento per un determinato analita è quindi l'insieme dei valori ottenuti con un determinato metodo su una popolazione sana e omogenea rispetto al fattore di variabilità legata al paziente che può influenzare quel parametro.

Sangue (intero, plasma, siero)

Cause di variabilità preanalitica-analitica

Emolisi

- Osmotica o chimica
 - Meccanica
 - Fisica
 - Cause biologiche
- +++potassio, ++LDH, +/-AST, +emoglobina, +azoto, +bicarbonati,.....

Sangue (intero, plasma, siero)

Cause di variabilità preanalitica-analitica

Coaguli

- Tralci di Fibrina
- Coagulo bianco
- Coagulo rosso

---piastrine, -WBC, -RBC, +PT, +APTT, -fibrinogeno, ..

Sangue (intero, plasma, siero)

Cause di variabilità preanalitica-analitica

Anticoagulanti e preservanti

- Eparina
- Ossalato
- EDTA
- Citrato
- Fluoruro
- Iodoacetato

---calcio, ---magnesio, +++K,

Alterazioni del campione

1. Fisica (liquido-solido; liquido-vapore)

- **Evaporazione** (concentrazione dei soluti o perdita dei composti volatili quali etanolo, O₂, CO₂,...)
- **Solubilizzazione** (Sali di fosfato/ossalato di calcio che precipitano nelle urine al variare della temp e del pH,..)
- **Adsorbimento** (oligominerali per es cationi sulle pareti del vetro non del polipropilene o teflon,..)
- **Desorbimento** (cessione metalli o inquinanti da parte dei sistemi di prelievo o di analisi,..)
- **Diffusione** (fuoriuscita di potassio o LDH dagli eritrociti, gradiente di conc in campione scongelato e non mescolato)

Alterazioni campione

2. Chimico-fisica (alterazione molecolare strutturale/sterica in funzione del tipo di stimolo, durata, pH, sostanze ossidanti o riducenti, temperatura,..) :

- **Fotolisi** (vitamine del gruppo B, vit A, porfirine, bilirubine,VMA,...)
- **Denaturazione** (proteine in immunoenzimatica,...)
- **Polimerizzazione/aggregazione** (legami deboli in proteine in immunoenzimatica ed elettroforesi,...)

Alterazioni campione

3. Biochimica o biometabolica (in vitro vi è la mancanza di segnali/molecole di regolazione omeostatica, il collasso dei sistemi energetici ed alterazione delle compartimentalizzazioni)

- **alterazioni dei sistemi energetici** (riduzione glucosio/ATP; aumento acido lattico, ADP, NH_4^+ ,...)
- formazione di gradienti di concentrazione
- variazione della permeabilità cellulare
- variazione nella concentrazione di diversi metaboliti-cataboliti,..

Conservazione del campione

- Contenitori adatti, tappati
- Conservazione a temp ambiente (22-25 °C) non oltre le 4 ore
- Conservazione a 4°C non oltre le 24 ore
- Evitare ripetute variazioni di temperatura (congelamento-scongelamento)
- Conservare il campione per siero a temperatura ambiente per almeno 30 minuti prima del processing
- Centrifugazione/separazione; sierare a 2000g per 5 min

Controllare la matrice biologica

Conservazione del campione

- **Raffreddamento a +4°C (max 24 ore)**
- **Raffreddamento a 0 °C** (max poche ore; gastrina, insulina, renina, ammoniaca, acido lattico)
- **Raffreddamento a -20°C; -80°C; -140°C** (mesi,anni) -195°C (tempo indefinito)
- **Conservazione al buio** (porfirine,....)
- **Liofilizzazione**
- **Modificazione del pH** : mantenimento della solubilità, stabilità chimica, attività biologica (pH acido-ossalato/fosfato di calcio, VMA-Catecolamine; pH alcalino-porfirine)
- **Additivi** (glicostatici-fluoruro e monoiodoacetato, anticoagulanti-EDTA, batteriostatici-streptomina,..)
- **Deproteinizzazione**
- **Sistemi complessi/sinergici** (glicostatici e raffreddamento, alcalinizzazione e buio,....)

Controllare la matrice biologica

Conservazione del campione

Sistemi complessi/sinergici

- Deproteinizzazione e raffreddamento (acido lattico e piruvico)
- Glicostatici e raffreddamento (glucosio)
- Alcalinizzazione,raffreddamento,buio (porfirine,..)
- Acidificazione,raffreddamento,buio (catecolamine,VMA,..)

Il dato in Chimica Clinica

In Chimica Analitica Clinica la “realtà” è costituita dalla **composizione della matrice** da analizzare e nello specifico dalle quantità dei diversi analiti in essa contenuti

Le quantità vere delle diverse sostanze sono di solito ignote ed il compito delle analisi Cliniche di laboratorio è quello di dare una **“stima”, quanto più possibile vicina alla “realtà”,** di tali quantità **esprimendole con dei dati** (non numeri).

Valore misurato (risultato analitico)

- Il valore vero (la “realtà”) è una “astrazione”
- Il **valore assoluto non ha “senso scientifico”**

La misura di una qualsiasi grandezza richiede un metodo di misura (operatore, reagenti, hardware, software,..) che inevitabilmente viene influenzato almeno dalla **casualità (errori)**, dando sui replicati una serie di **risultati che si distribuiscono attorno al valore vero (curva gaussiana)**

Deviazione standard

Da Wikipedia, l'enciclopedia libera.

La **deviazione standard** (in inglese: *standard deviation*) o **scarto tipo**^[1] o **scarto quadratico medio** è un **indice di dispersione** (vale a dire una misura di variabilità di una popolazione o di una **variabile casuale**) derivato direttamente dalla **varianza**, ha la stessa unità di misura dei valori osservati (mentre la varianza ha come unità di misura il quadrato dell'unità di misura dei valori di riferimento). La deviazione standard misura la dispersione dei dati intorno al valore atteso.

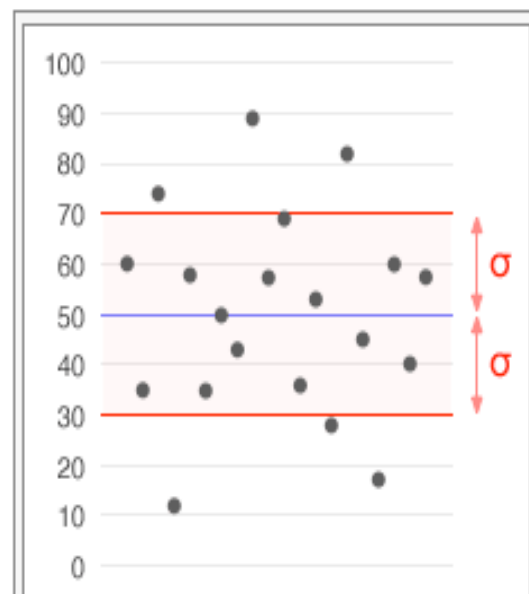
Il termine "*standard deviation*" è stato introdotto in **statistica** da **Pearson**^[2] assieme alla lettera greca σ che lo rappresenta. Il termine italiano "deviazione standard" ne è la traduzione più utilizzata nel linguaggio comune; il termine dell'**Ente Nazionale Italiano di Unificazione** è tuttavia "scarto" tipo, definito come la radice quadrata positiva della varianza per lo meno fin dal 1984^[3]

Se non indicato diversamente, è semplicemente la radice quadrata della **varianza**, la quale viene coerentemente rappresentata con il quadrato di sigma (σ^2).

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

dove $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ è la **media aritmetica**.

Formalmente lo scarto tipo di una variabile casuale può essere calcolato a partire dalla **funzione generatrice dei momenti** (radice quadrata della differenza tra il momento secondo ed il momento primo elevato al quadrato).



Un data set con una media di 50 (in blu) e una deviazione standard (σ) di 20.

Il risultato analitico è influenzato/determinato dal “metodo analitico”

- Ogni metodo analitico/analisi è soggetta ad **errori**
- Il valore analitico è **più o meno attendibile** (Reliability) in relazione al tipo di metodo ed alla influenza degli errori
- Ogni metodo analitico possiede delle **caratteristiche specifiche**, **non tutte** (contemporaneamente) ottimali

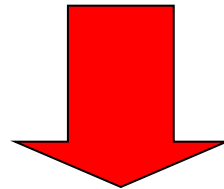
Caratteristiche che influenzano la Attendibilità del risultato

- **Precisione** (risente della esecuzione analitica)
- **Esattezza/Accuratezza** (risente del metodo ed esecuzione analitica)
- **Specificità** (risente del metodo)
- **Sensibilità** (risente del metodo)

Stato del paziente, modalità di prelievo e di conservazione

Precisione

Concordanza fra risultati di una serie di distinte misure (repliche) ottenute con lo stesso metodo su porzioni di uno stesso campione ritenuto omogeneo e stabile



Imprecisione : dispersione dei risultati dovuta ad errori casuali

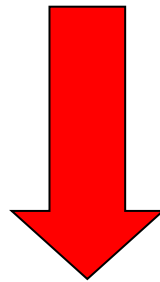
Ripetibilità (deviazione dal valore medio dei replicati ottenuti in una stessa seduta giornaliera; precisione intraserie)

Riproducibilità (deviazione dal valore medio dei replicati ottenuti in diverse sedute in diversi giorni; precisione interserie)

Accuratezza

- **Grado di concordanza fra il valore medio ed il valore vero** (o più probabile conosciuto ottenuto con metodi definitivi o di elezione) in una serie di distinte repliche di una stessa analisi sul medesimo campione

Inaccuratezza : scostamento dei risultati dovuto ad errori sistematici (strumenti, reagenti, calibrazioni, taratura,..) ed anche casuali



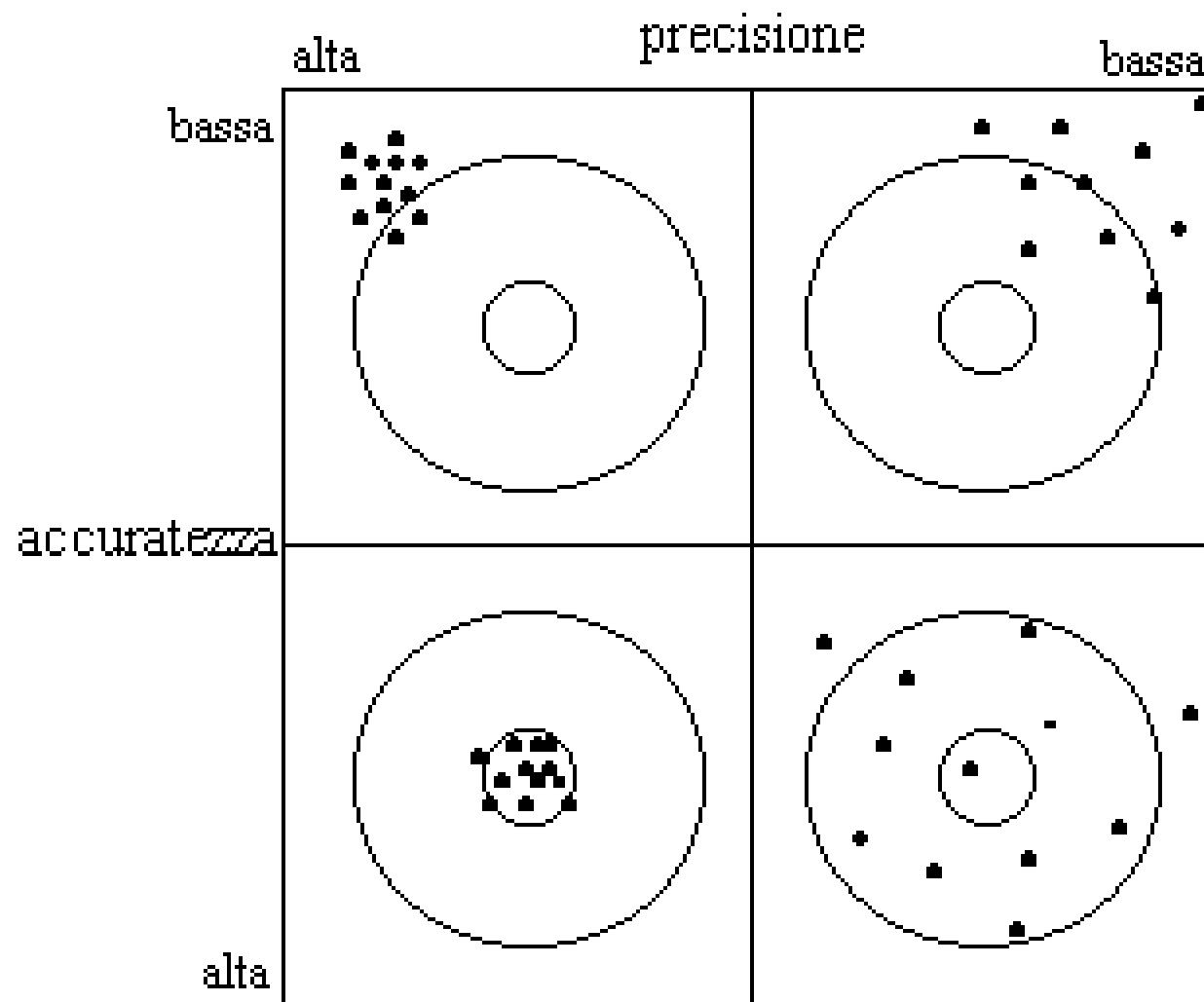
Specificità

Specificità

- Proprietà del metodo di individuare **solo e soltanto la sostanza in oggetto** senza subire interferenze (**robustezza**) positive o negative da parte di altre sostanze presenti nella matrice

Varia in funzione di:

- Separazione/ purificazione preliminare
- Selettività di particolari reazioni
- Selettività di lettura del segnale (l. onda, tempo,..)
- Impiego di metodi diretti altamente specifici (enzimatici, immunologici,..)
- Tecniche separative accoppiate (gas-spettrometria di massa,..)



Sensibilità

- **Limite di rilevabilità:**

La **più piccola quantità di sostanza** che il metodo riesce a misurare, cioè a distinguere dal bianco con un certo limite fiduciario (95%)

- Rapporto tra segnale analitico e rumore di fondo (noise)
- In genere corrisponde al doppio della deviazione standard del bianco

Metodo analitico

altri parametri

- **Range analitico:** intervallo di concentrazioni esplorato/esplorabile nel corso delle misurazioni (calibrazioni, misura campioni, test funzionali,..)
- **Range dinamico (Intervallo di lavoro):** intervallo di concentrazioni nel quale il segnale y varia con la concentrazione di x (tra il limite di rilevabilità e il limite di linearità o saturazione)

Pertanto, tutti i metodi analitici non commerciali devono essere validati prima della loro introduzione in routine (inclusi alcuni dosaggi di analiti critici in kit e le variazioni a kit commerciali)
con le seguenti definizioni:

Linearità: dedotta dalla retta di calibrazione in base alla regressione polinomiale.

Limite di rilevazione: definito come la più bassa concentrazione di un analita che può essere distinta dal background (zero analitico o biologico) con il 99% di confidenza (+3 DS sopra la media dello zero analitico o biologico).

(Im)precisione, ottenuta dalla misura dei coefficienti di variazione nel giorno e fra giorni a tre differenti livelli di concentrazione. **Se si** utilizza nuova strumentazione, l'imprecisione analitica misurata deve essere conforme alle specifiche tecniche del costruttore, che ne hanno dettato la scelta.

Accuratezza, ottenuta dalla misura della deviazione percentuale (Bias) rispetto a materiali di riferimento.

Misura analitica

Errore

Qualsiasi misura analitica è affetta da errore

- Per errore si intende la differenza tra il valore misurato e quello “reale”
- Tale errore viene definito come ***“errore totale”***
- L'errore totale è costituito dalla somma di diversi tipi di errore che possiamo in generale identificare come :

1. Sistemático

2. Casuale

3. Grossolano

Errore Totale

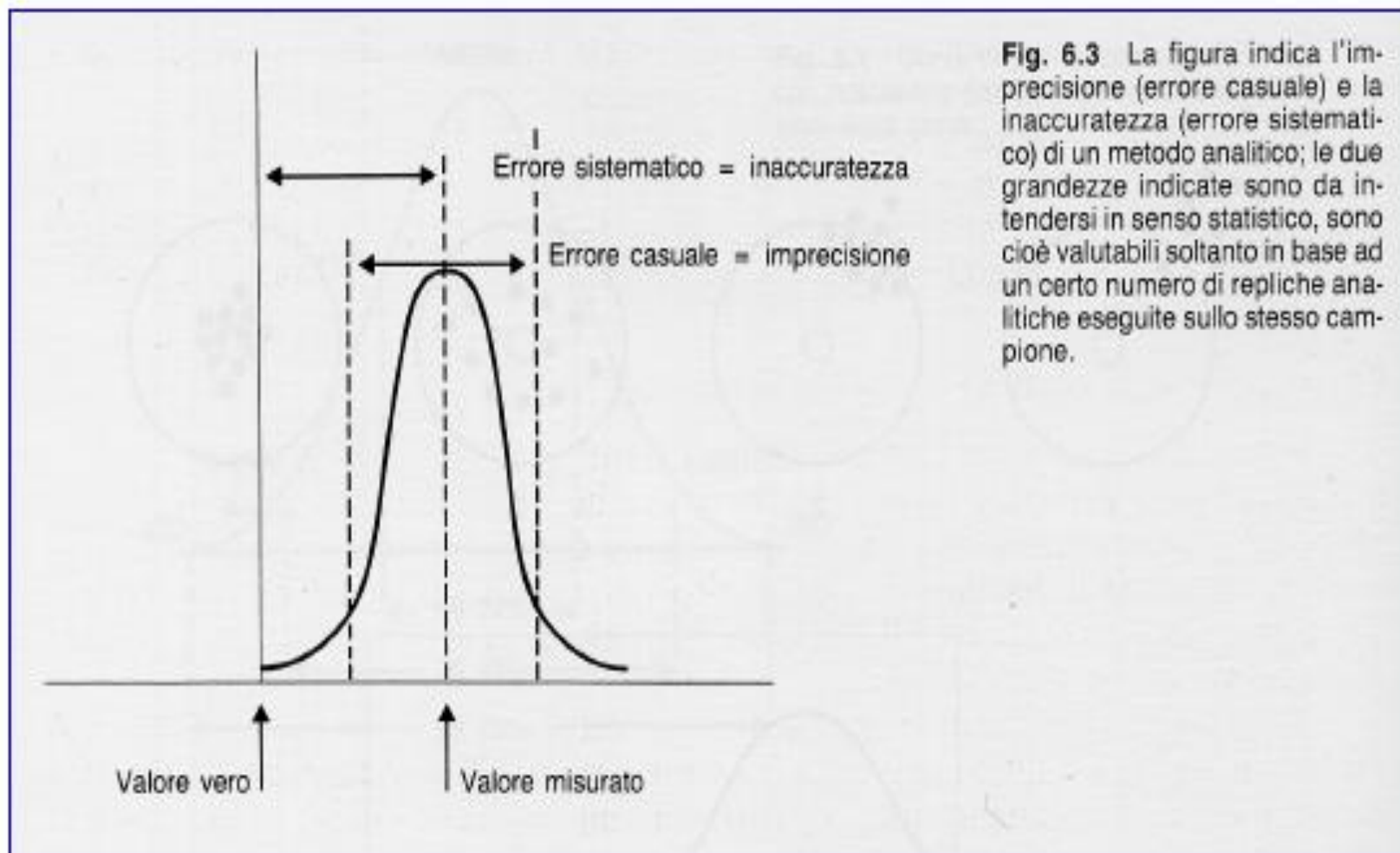
Definizione “quantitativa”

ERRORE CASUALE (E_c) = differenza tra il risultato di una misurazione (x) e la media (M) che risulterebbe da un infinito numero di misurazioni del medesimo misurando effettuate in condizioni di ripetibilità : **$E_c=x-M$**

ERRORE SISTEMATICO (E_s) = differenza tra la media che risulterebbe (M) da un numero infinito di misurazioni dello stesso misurando , effettuate in condizioni di ripetibilità e il valore vero (V) del misurando : **$E_s=V-M$**

ERRORE (E) : differenza tra il risultato di una misurazione (x) e il valore vero del misurando (V)

$$E_t = V - x = E_c + E_s$$



Errore sistematico *(sovra-sottostima)*

- Altera il risultato in maniera sistematica
- Si ripete tutte le volte che si esegue una misura con un determinato metodo
- **In genere la causa è nota o identificabile (a priori o meno)**
- In genere imputabile alla scarsa sensibilità o specificità di un metodo
- **In genere sono eliminabili**

Possibili cause di errori sistemati (inaccuratezza):

- cambio di lotto reagente / calibratore,
 - errati valori di calibratori,
 - reagenti preparati impropriamente,
- deterioramento reagenti / deterioramento calibratori,
 - conservazione inadeguata di reagenti / calibratori,
 - cambio di volume campione o reagente a causa di disallineamento o staratura pipettatore,
 - cambio temperatura incubatori o blocchi reazione,
 - deterioramento fotometro o fotomoltiplicatore,
 - cambio di procedura da un'operatore all'altro.
- **Regole più sensibili (maggior potenza):**
 - 2_{2s}
 - 4_{1s}

Errore casuale

- **Si presenta sempre** anche se si opera con modalità “apparentemente” corrette!!!
- Altera il risultato in minima misura
- Si presenta sporadicamente
- **In genere la causa non è nota o identificabile**
- In genere imputabile all’operatore o alle condizioni operative
- **In genere non sono eliminabili**
- La loro presenza si evidenzia nella distribuzione gaussiana dei replicati

- **L’errore grossolano** è casuale ma individuabile (dovuto all’operatore)

Possibili cause di errori casuali (imprecisione):

- Bolle d'aria o particelle nei reagenti e nelle linee di dispensazione dei reagenti,
- reagenti ricostituiti/miscelati non adeguatamente,
 - temperatura e incubazione instabile,
 - linea di fornitura elettrica instabile,
- variazioni individuali dell'operatore nel pipettamento, controllo dei tempi, ecc.

● Regole più sensibili (maggiore potenza):

- 1_{3s} R_{4s}

ACCETTABILITA' ERRORE TOTALE ANALITICO

(ETa)= imprecisione+inaccuratezza

- Imprecisione massima accettabile:

$$CV_a < 0.5 CV_{intra}$$

- Inaccuratezza massima accettabile:

$$Bias < 0.25(CV^2_{intra} + CV^2_{inter})^{1/2}$$

Traguardi analitici

Prestazione ottimale : $ETa < 1.65 (0.25 CVi) + 0.125 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

$$Ba < 0.125 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$$

$$CVa < 0.25 CVi$$

Prestazione desiderabile: $ETa < 1.65 (0.50 CVi) + 0.25 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

$$Ba < 0.250 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$$

$$CVa < 0.50 CVi$$

Prestazione Minima : $ETa < 1.65 (0.75 CVi) + 0.375 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

$$Ba < 0.375 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$$

$$CVa < 0.75 CVi$$

Indici di variabilità relativa

Coefficiente di Variazione (*CV Deviazione Standard relativa*)

- Gli **indici di variabilità relativa** come il **CV**, servono a confrontare le intensità dello **scostamento** dalla **media** (espressi dagli indici di variabilità assoluta i più **comuni** **varianza e deviazione standard**), che si registrano in due **rilevazioni statistiche** differenti espresse a loro volta in **unità di misura** diverse.
- Il **coefficiente di variazione** è quindi utile *per confrontare direttamente la precisione di risultati ottenuti da campi di variazione (medie) diversi* ed inoltre, essendo un valore puro non tiene conto dell'unità di misura e quindi della diversa natura dei dati (dispersione del peso delle mele di una cassetta confrontato con le glicemie di un gruppo di esseri umani).

$$CV = (DS / X_{medio}) \times 100$$

Quando posso aver fiducia di un dato analitico?

Quando esprime una confidenza pari almeno al 95%

LIMITI FIDUCIARI di un dato analitico:

Per un dato isolato x , ottenuto con un metodo del quale abbiamo calcolato la deviazione standard su almeno 25 sedute (controlli), i valori corrispondenti a $x \pm 2DS$ sono i limiti fiduciarî o di confidenza pari al 95,5%

In altre parole è l'intervallo di valori entro il quale con una probabilità del 95.5% cade il valore vero

Come faccio a valutare l'errore di un metodo?

- Si utilizzano dei **“controlli”**, cioè dei campioni “noti” (a concentrazione fisiologica e patologica) che devono essere introdotti casualmente all'interno di una serie analitica.
- **Dai risultati ottenuti si ricava la media, la DS, il CV.**

Controllo di qualità interno (CQI)

- **Scopo analitico/clinico**

Evidenziare gli **errori** di una misura analitica che si collochino **al di fuori dei limiti di accettabilità di precisione (ed accuratezza....)** per poter dare ai clinici una elevata affidabilità (fiducia) del dato stesso.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Considerazioni

- **Nessun metodo di controllo di qualità è infallibile** e adeguato in assoluto
- La scelta del tipo di metodo da adottare dipende da molti fattori (tipo di analisi, controlli esterni,..)
- Per poter garantire costantemente la **attendibilità** ed il **contenimento degli errori** è necessario istituire delle **procedure formali** di controllo

Controllo interno di qualità

(art 124 del DPCM del 10/02/1984)

Strumenti

- **Uso di standard per la calibrazione degli strumenti (periodico)**
- **Uso di materiale a titolo noto (controlli giornalieri)**
- **Allestimento delle carte di controllo**
- **Calcolo e verifica del CV (automatico)**

Carte di controllo Shewhart-Levey-Jannings

- La carta di controllo è uno **strumento grafico/statistico per tenere “sotto controllo” un metodo analitico** ed un analita in particolare
- Si costruisce utilizzando i dati ottenuti da dei **controlli inseriti ogni giorno in una serie analitica per almeno 20-30 giorni consecutivi**
- Da tali dati si ottiene la media e la deviazione standard che verranno riportate graficamente evidenziando orizzontalmente la **media (senza gli outliers), la prima, la seconda (limite di allarme) e la terza deviazione standard (limite di intervento)**

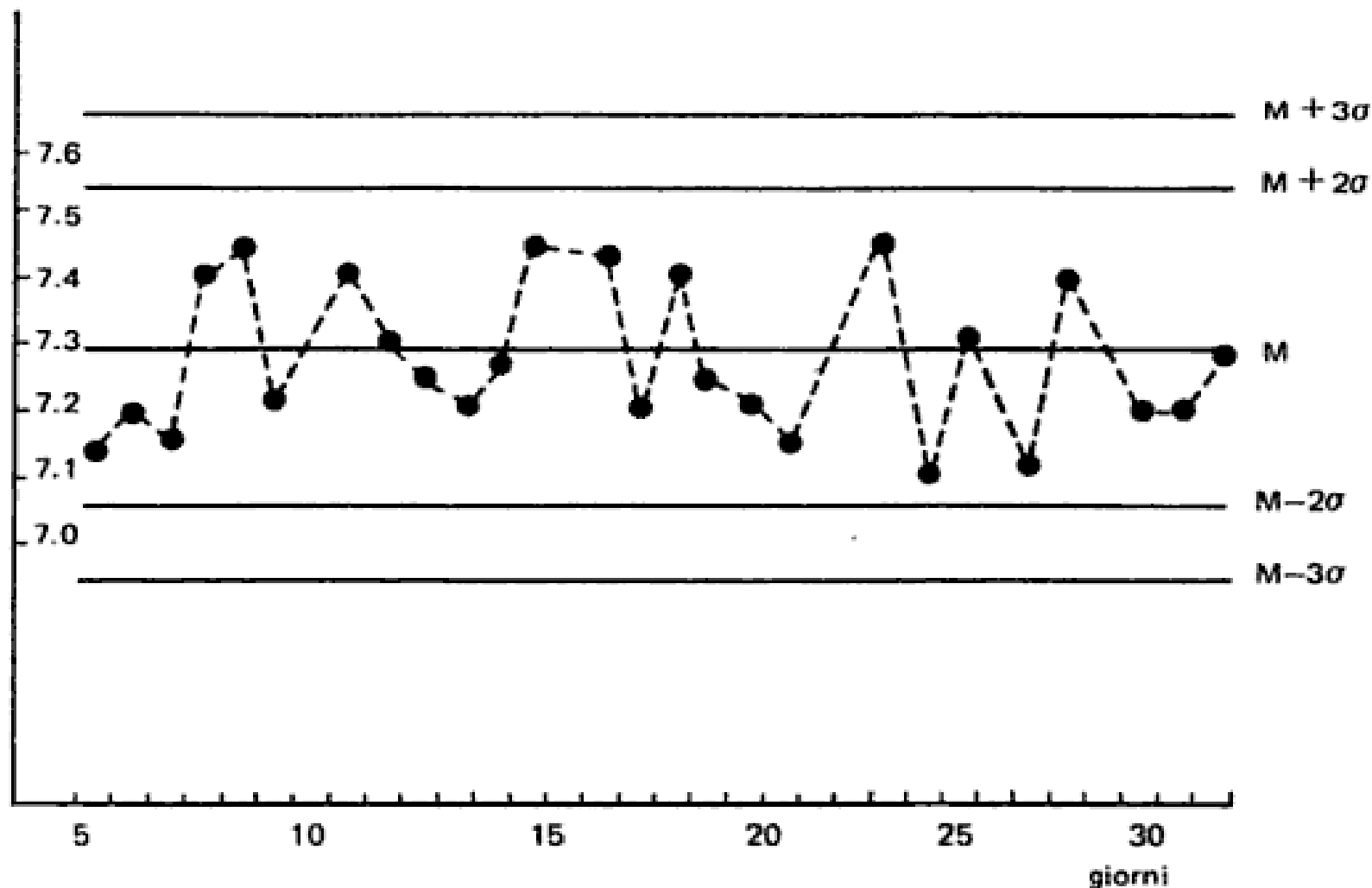


Fig. 4-5 - Esempio di carta di controllo di qualità secondo Shewhart, basata sull'uso dei limiti di allarme e di intervento. M valore medio; $M \pm 2DS$ limiti di allarme; $M \pm 3DS$ limiti di intervento.

Nota I valori riportati nella figura indicano che il metodo nel periodo di tempo considerato, è "sotto controllo".

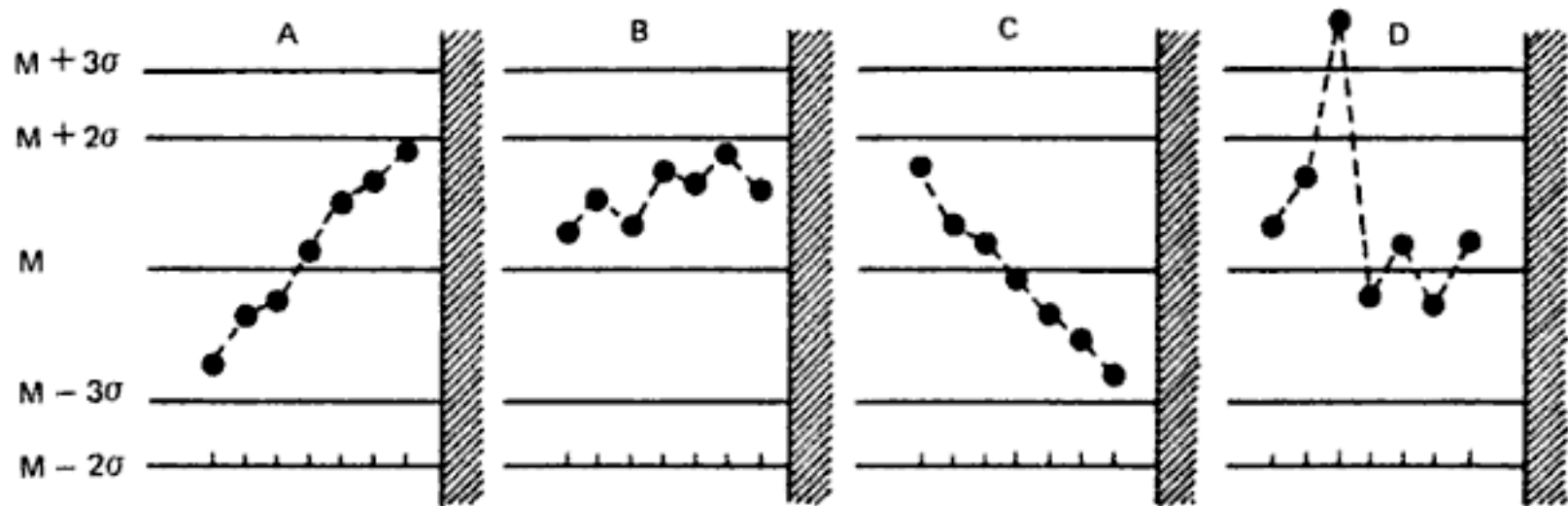
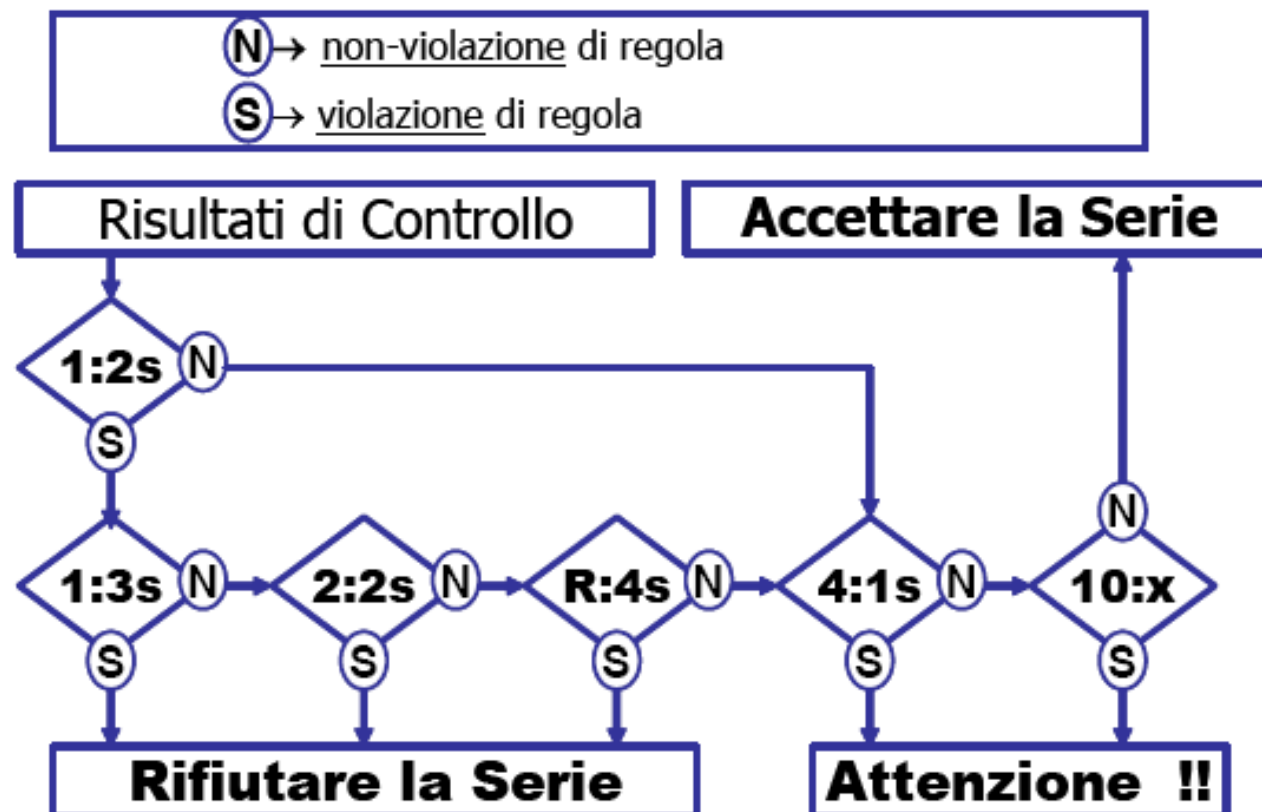


Fig. 4-6 - Esempi di metodo "fuori controllo". A: sette valori consecutivi progressivamente crescenti; B: sette valori consecutivi superiori (o inferiori) al valore medio; C: sette valori consecutivi progressivamente decrescenti; D: un valore riconfermato al di fuori del limite di intervento.

Sistema di controllo a regole multiple proposto da Westgard (12).

Lo schema seguente esemplifica l'algoritmo.



ERRORI CASUALI: QUALI REGOLE?

Gli errori casuali, che provocano un aumento della imprecisione, possono essere causati da:

- *Miscelazione incompleta.*
- *Bolle o particelle solide nei reagenti*
- *Variazioni nella erogazione campioni e reagenti.*
- *Instabilità ottica.*
- *Imprecisione dei tempi di lettura (metodi manuali)*

Le regole più sensibili (= con maggiore potenza) per la rilevazione dell'errore casuale sono:

$1_{2.5s}$

1_{3s}

R_{4s}

ERRORI SISTEMATICI: QUALI REGOLE?

Gli errori sistematici, oltre al "bias" del metodo, possono essere causati da:

- *taratura inadeguata*
- *Sottrazione del bianco non corretta.*
- *Reagenti preparati male o scaduti.*
- *Deriva del rivelatore.*
- *Malfunzionamento costante di altri componenti strumentali.*
- *Termostatazione non corretta.*

Le regole più sensibili (= con maggiore potenza) per la rilevazione dell'errore sistematico sono:

$$1_{2s}$$

$$3_{1s}$$

$$4_{1s}$$

$$N_x (N > 6)$$

Controllo di qualità esterno

- Accanto al controllo intralaboratorio gli **standard per l'accreditamento impongono anche la partecipazione a programmi di controllo esterno (VEQ-Valutazione Esterna Qualità).**
- Nel controllo esterno i campioni “di controllo” vengono inviati al laboratorio partecipante da altri laboratori di riferimento oppure da qualificati/accreditati organismi regionali o nazionali (Az.Osp.Careggi Firenze; S.Orsola Bologna; CRB Padova,..)

Obiettivi della VEQ

- Integrare il programma di CQI
- Fornire una misura della qualità dell'analisi nei singoli laboratori (autovalutazione delle prestazioni, Monitoraggio nel tempo della qualità)
- Agire come stimolo educativo per il miglioramento della qualità dell'intero processo analitico
- Indagare sui fattori che possono influenzare la validità dei risultati
- Fornire una misura dello stato dell'arte
- Fornire una fotografia delle performance a livello internazionale

Controllo di qualità esterno

- Di norma si seguono **2 procedure alternative**:
 1. Fare analizzare i campioni prima da un **numero sufficientemente elevato di laboratori di riferimento** e su questi calcolare media e deviazione rispetto alle quali verificare la performance degli altri laboratori
 2. Usare i **valori di consenso**, cioè i valori medi ottenuti da tutti i partecipanti al programma di controllo di qualità interlaboratorio

“Dove è la sapienza che abbiamo smarrita nella conoscenza, dove è la conoscenza che abbiamo smarrita nell’informazione, dove è l’informazione che abbiamo smarrita nei dati.”

“dove sono i dati, che abbiamo smarrito nel web?”.

(Marc Porat)

Chairman & Founder at [Perfect Commerce Inc](#)

**incisa nell’ala Comunicazione
del museo Scientifico per Bambini a Washington**



Cromatografia

DEFINIZIONE

*Tecniche che permettono la separazione delle diverse sostanze (molecole) di una miscela complessa in base alla loro diversa distribuzione/affinità tra una **fase stazionaria** (solida, liquida) ed una **fase mobile** (liquida, gassosa).*

CROMATOGRAFIA

Fase stazionaria (GRANULI)

- Saccarosio
- Amido
- talco
- carbonato di calcio
- fosfato di calcio
- fosfato di magnesio,
idrossido di calcio
- **ossido di silicio**
- **ossido di alluminio**
- carboni attivi
- DIMENSIONE
- FORMA
- SUPERFICE
- POROSITA' (100-120mesh
fino 200-400 mesh)
- Stabilità meccanica
- Gruppi funzionali
- capacità

FASE MOBILE

es: soluzioni acquose di
metanolo ed etanolo

eluizione in condizioni
isocratiche o in
gradiente

Polarità equivalente
all'analita più polare
della miscela da
analizzare

Solvente	Polarità
Perfluoroalcani	6,0
Iso-ottano	7,0
Diisopropil etere	7,0
N-pentano	7,1
N-esano	7,3
N-eptano	7,4
Diethyl etere	7,4
Trietilamina	7,5
Ciclopentano	8,1
Cicloesano	8,2
Propilcloruro	8,3
Tetracloruro di carbonio	8,6
Acetato di etile	8,6
m-xilolo	8,8
toluolo	8,9
Cloroformio	9,1
Tetraidrofurano	9,1
Acetato di metile	9,2
Benzolo	9,2
Percloroetilene	9,3
Acetone	9,4
Diclorometano	9,6
Clorobenzolo	9,6
Dicloroetano	9,7
Diossano	9,8
Metil-etil-chetone	9,8
Disolfuro di carbonio	10,0
Alcool propilico	10,2
Piridina Nitrometano	10,4
Nitrobenzene	11,0
Alcool etilico	11,1
Dimetilformamide	11,2
Acetonitrile	11,5
Acido acetico	11,8
Dimetil solfossido	12,4
Alcool metilico	12,8
Etilamina	12,9
Glicoletilenico	13,5
Formamide	14,7
Acqua	17,9
	21,0

Cromatografia Definizioni

- **Kd= coefficiente di distribuzione** (affinità relativa dell'analita tra fase stazionaria e mobile)
 - **Tempo di ritenzione t_r** : il tempo impiegato dall'analita per emergere dalla colonna (specifico per ogni analita)
 - **Volume di eluizione o ritenzione V_r** : volume di fase mobile necessario per eluire l'analita
 - **Velocità di flusso F_c** **$V_r = t_r F_c$**
- (Dimensioni della colonna, caratteristiche fisiche delle particelle, viscosità della fase mobile)
- **Volume della fase stazionaria V_s**
 - **Volume/spazio morto V_m** (volume intorno alle particelle)

$$\underline{V_r = V_m + K_d V_s}$$

Cromatografia

Caratteristiche operative principali

- **Grado di risoluzione**: correlato alla capacità, al rapporto di ritenzione ed al numero di piatti
- **Selettività**: capacità di distinguere 2 sostanze simili (C di affinità e chirale)
- **Efficienza** : picchi a base stretta senza spalle (fenomeni di diffusione)
- **Capacità** : quantità di materiale risolvibile (C a scambio ionico)

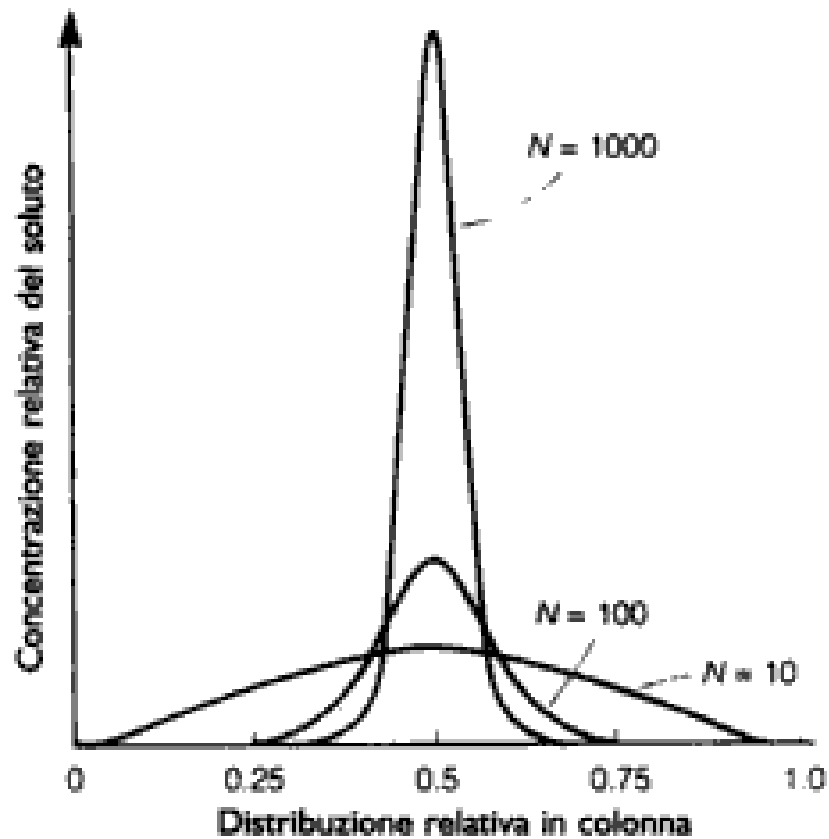


Figura 2.2 – Diagramma dell'effetto del numero di piatti teorici (N) sull'aspetto della distribuzione del soluto.

1 Cromatografia di adsorbimento

- Fase stazionaria granulare (adsorbente), attivata (acqua libera o costituzionale) posta in colonna
- Fase mobile costituita dal solvente adatto, spinto o aspirato
- Forze di Van der Waals
- Isotherma di adsorbimento rettilinea

Varianti analitiche:

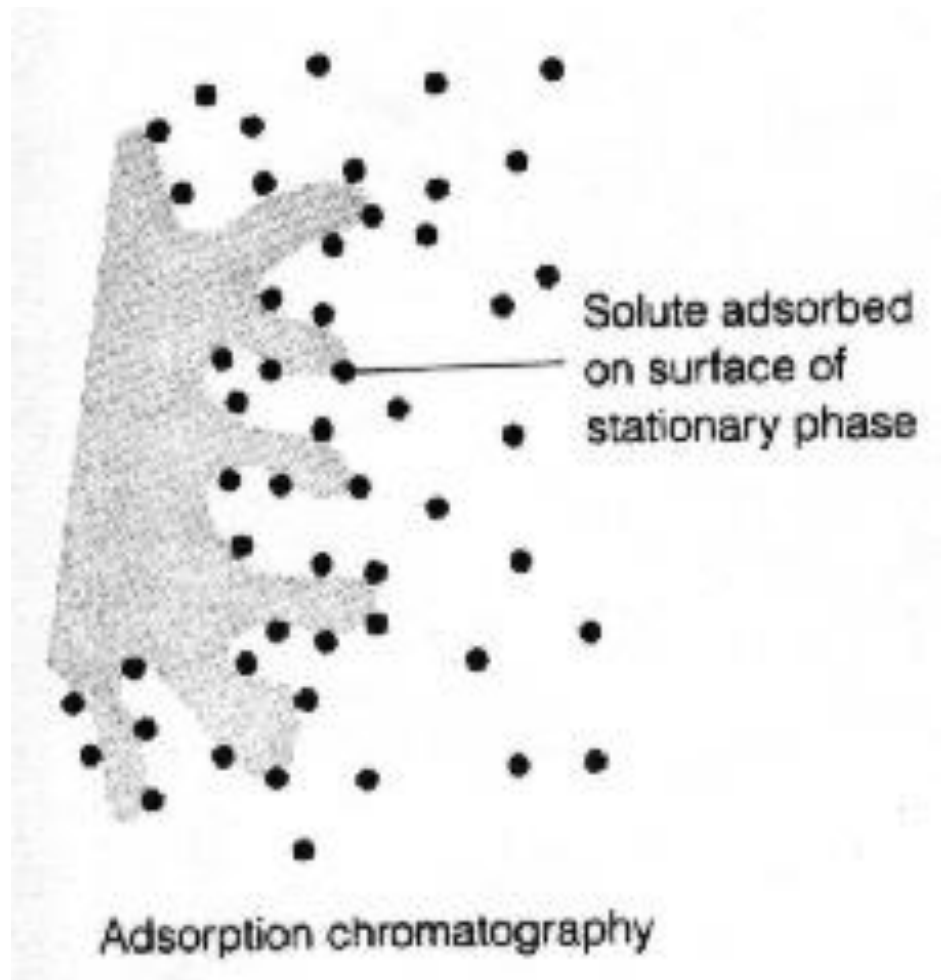
Secondo Tsweet (estrusione colonna)

Per eluizione (percolare con eluente)

Frontale (solvente che serve anche da eluente)

per spostamento (eluente con affinità per l'adsorbente maggiore rispetto alla molecola/e/analita/i)

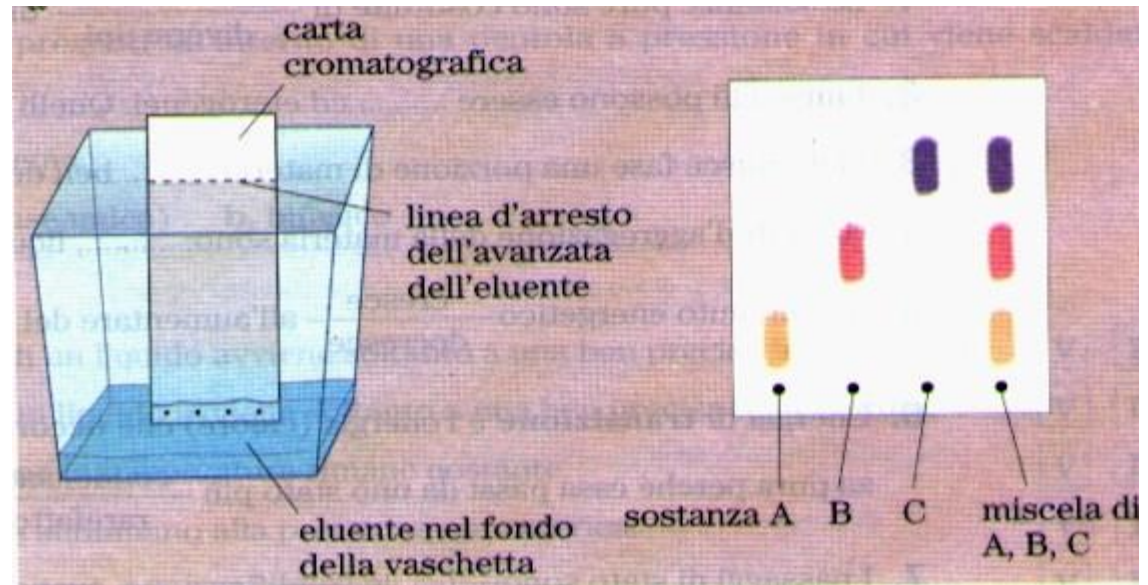
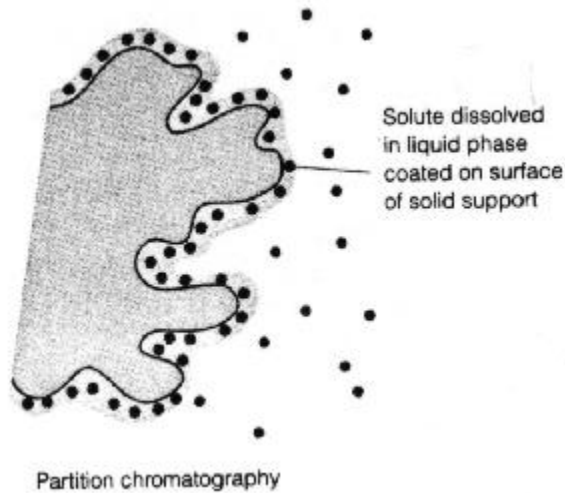
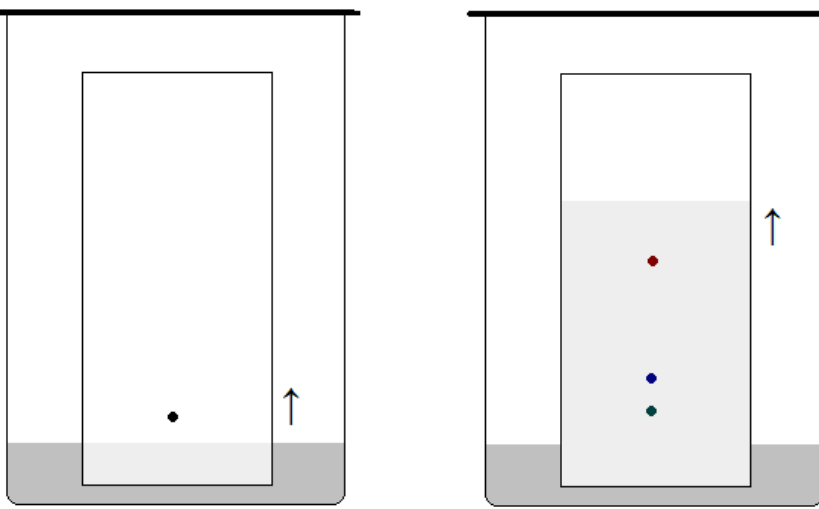
- A. Adsorbenti deboli (saccarosio, carbonato di calcio, amido, talco,..)
- B. Adsorbenti medi (fosfato di calcio, fosfato di magnesio, idrossido di calcio,..)
- C. Adsorbenti forti (ossido di silicio, ossido di alluminio,..)



2 Cromatografia di ripartizione

- Ripartizione continua tra 2 fasi fra loro immiscibili (mobile-fissa)
- Fase stazionaria liquida trattenuta da striscie o fogli di carta (**cromatografia su carta**, asbesto,..)
- Fase mobile solvente organico idratato
- Ascendente, discendente, orizzontale circolare, radiale (direzione del flusso del solvente che impregna la carta-“sviluppo”)
- Mono-bidimensionale
- Evidenza analiti con reazioni o fasi fissate sulla striscia (colore, adsorb UV; fluorescenza, autoradiografia,..)
 - **Separazione AA o idrolizzati proteici**

Cromatografia di ripartizione (sviluppo per capillarità)



Cromatografia liquida

- **Cromatografia liquida in fase normale:**

fase stazionaria polare e fase mobile poco polare (alchilammina legata a silice; esano, eptano,.. Eluito prima il meno polare)

- **Cromatografia liquida in fase inversa:**

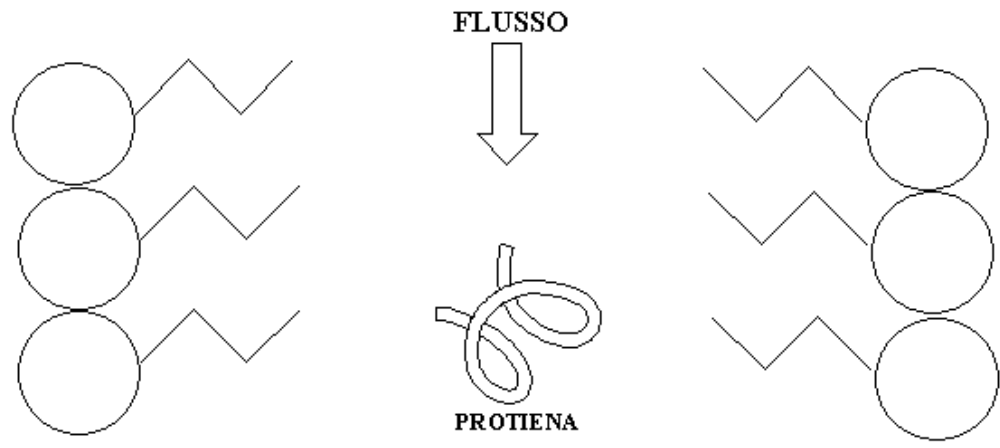
fase stazionaria apolare (gruppi alchilsialinici su silice: butile-C4, ottile-C8, ottadecile-C18) e quella mobile relativamente polare (tamponi acquosi, metanolo, acetonitrile,..)

La fase stazionaria è inerte (interazioni apolari, idrofobiche) e la separazione avviene in funzione delle caratteristiche della fase mobile (eluito prima il polare).

- **Cromatografia liquida in fase inversa** per accoppiamento ionico (soppressione ionica estremizzando il pH o accoppiamento ionico con il controione)

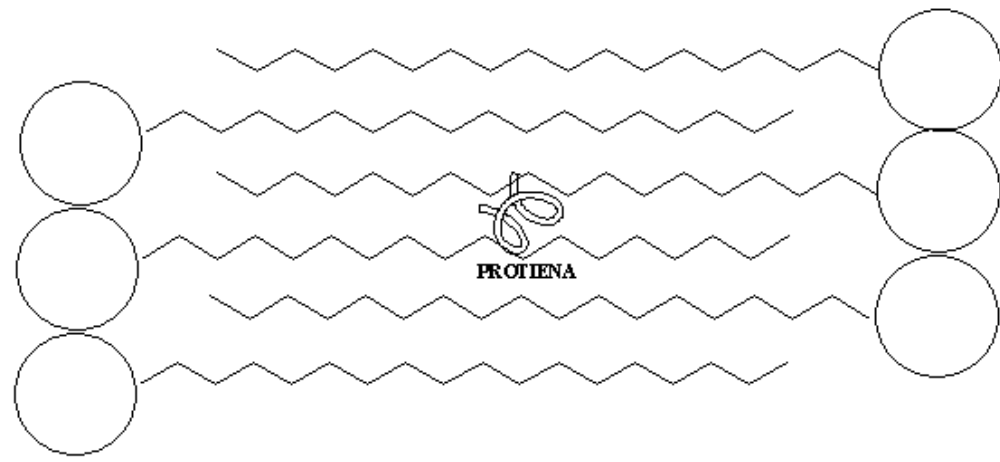
- **Cromatografia chirale** (da enantiomeri derivatizzazione a diastereoisomeri)

- **Cromatografia controcorrente** (liquido-liquido)



PROTEINA

COLONNA C4



PROTEINA

COLONNA C18

3 Cromatografia a scambio ionico

- **Fase solida:** scambiatore di ioni costituito da **resine sintetiche** (polistirene,...) o **cellulosa modificata** (carbrossimetilcellulosa,.), supporti in silicato di alluminio-zeoliti, ionizzati con gruppi polielettrolitici

Gruppi funzionali polimeri sintetici o naturali:

Solfonico,carbossile,fosforico,trimetilamina,etilsolfonico,carbrossimetile, trietilamina,..

- **Fase liquida:** tamponi acidi o basici o a gradiente di pH

- **Reazione chimica di scambio ionico**

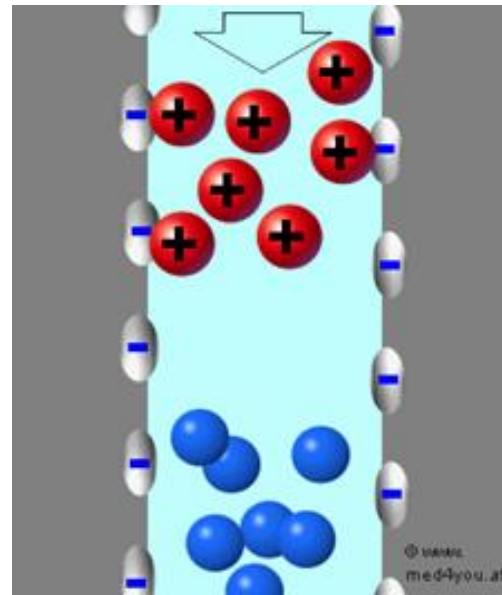
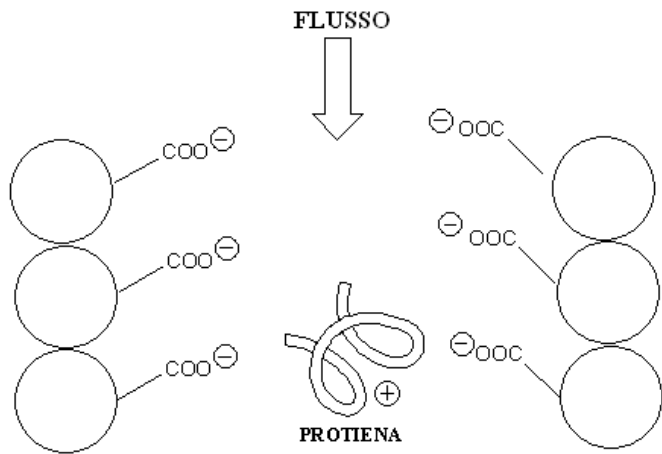
(la velocità di scambio varia in funzione delle ramificazioni, dei granuli e delle velocità di eluizione)

- Rilevazione mediante ninidrina (AA,..)

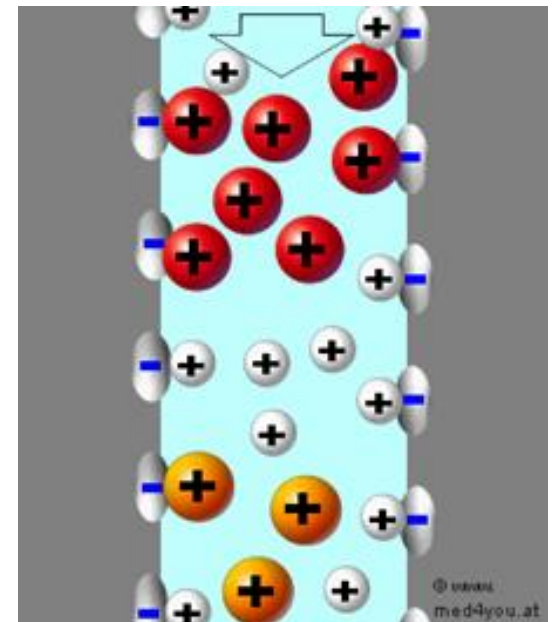
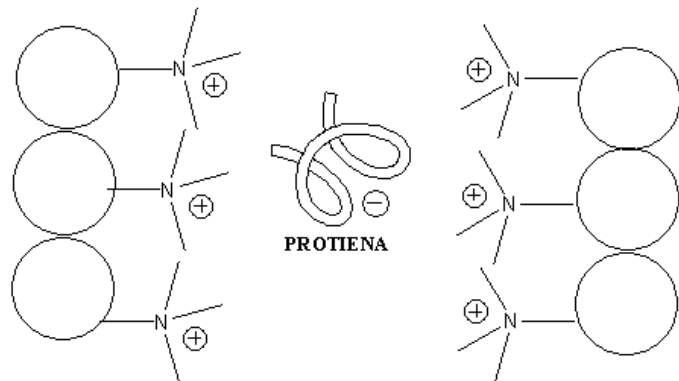
Separazione di sostanze ionizzate al alto peso molecolare come

:

- **aminoacidi, acidi nucleici, nucleoproteine,..**



SCAMBIO CATIONICO

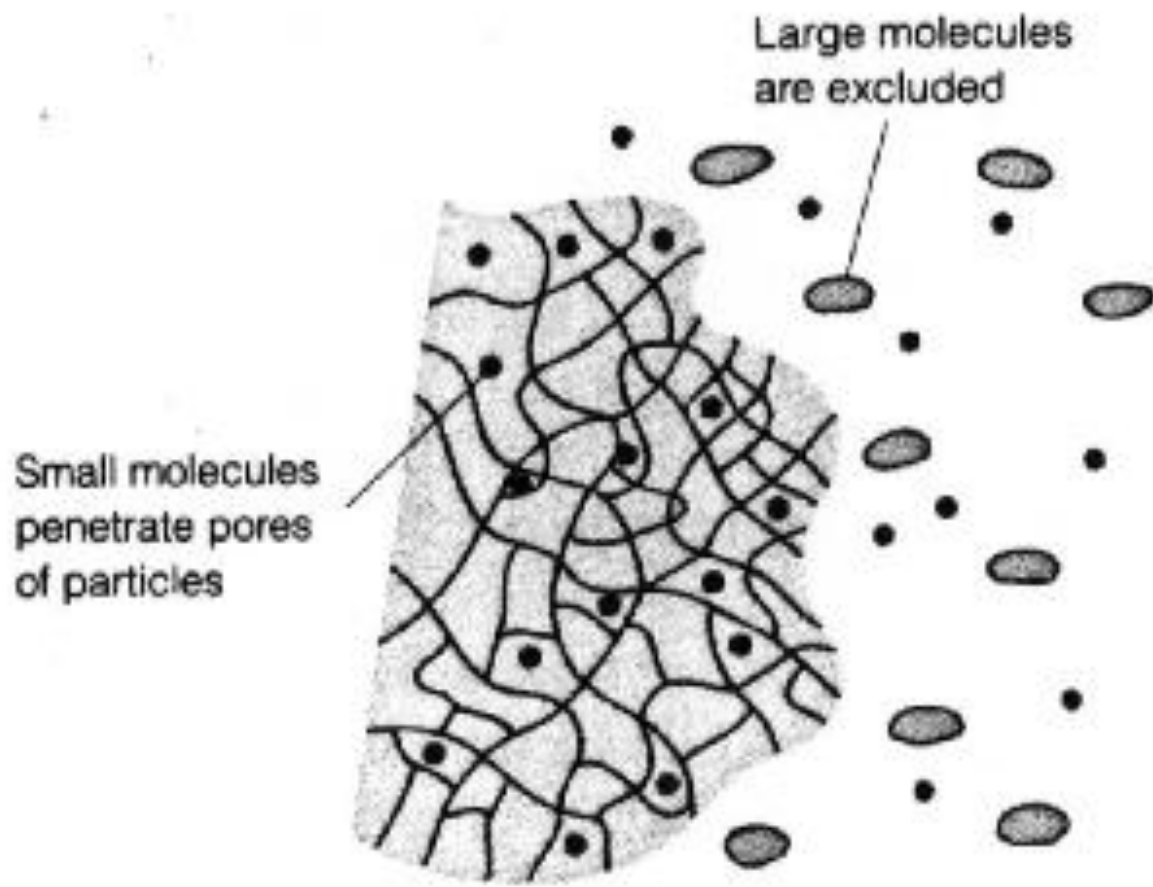


4 Gel cromatografia (ad esclusione spaziale)

- **Fase stazionaria**: resine granulari ottenute dalla polimerizzazione dello stirene (gel) poi funzionalizzato con gruppi acidi (solfonici, carbossilici) o basici (gruppi amminici,..)
- **Fase mobile**: tamponi acquosi a forza ionica a pH variabile
- **Setaccio dimensionale** (separazione in base alla dimensione molecolare)+**adsorbimento+scambio ionico**

“La si può pensare come una Cromatografia liquido liquido su colonna”

- ***Separazione conservativa di proteine o acidi nucleici***



Molecular exclusion chromatography

5 Cromatografia di affinità

- **Fase fissa:** supporto con gruppi funzionali attivi biologicamente legati covalentemente (enzimi, recettori, antigeni, anticorpi,..)
- **Fase mobile:** tamponi a diversa forza ionica
- **Legami specifici (non covalenti,...)**
- **Su colonna o per immersione (metodo batch)**
- *Separazione di fattori, proteine, ormoni, vitamine, recettori, farmaci, ormoni,..*

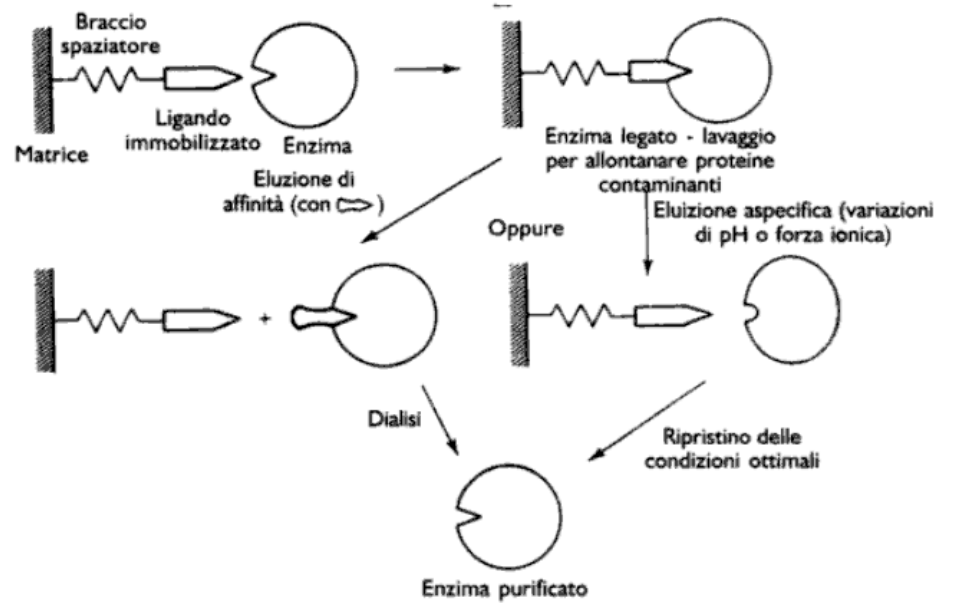
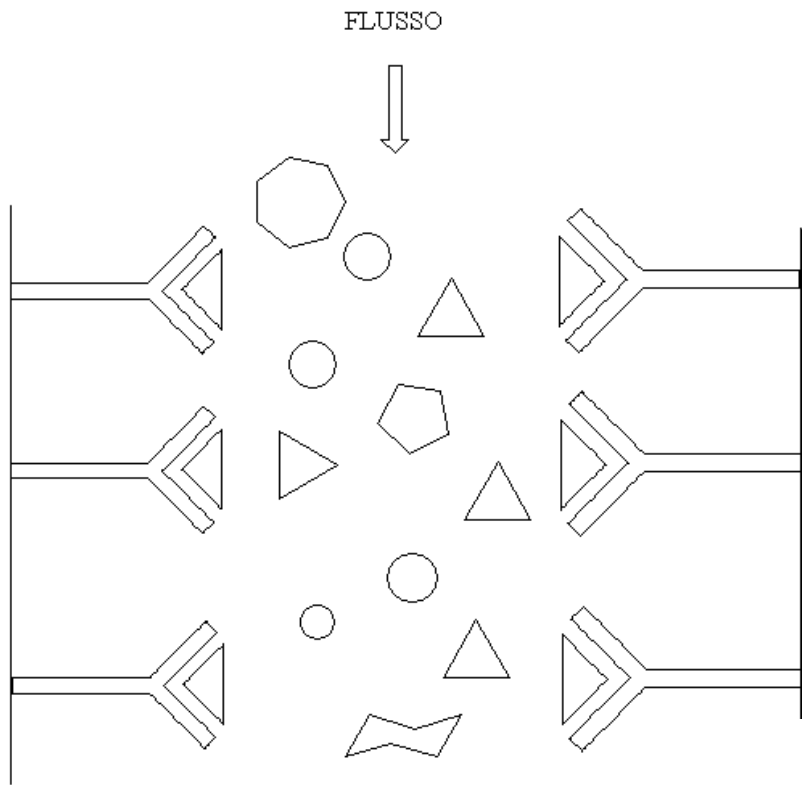


Figura 2.8 – Schema della purificazione di un enzima mediante **cromatografia d'affinità**.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

- **Fasi stazionarie:**

granulari di diversa natura in colonna
(silice, allumina, alchilammina, ottosilano, ottadecilsilano..)

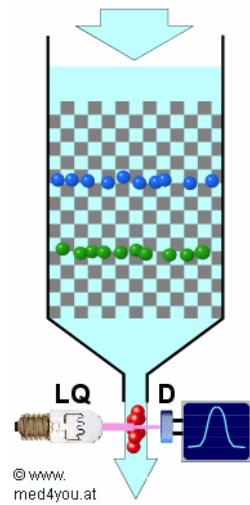
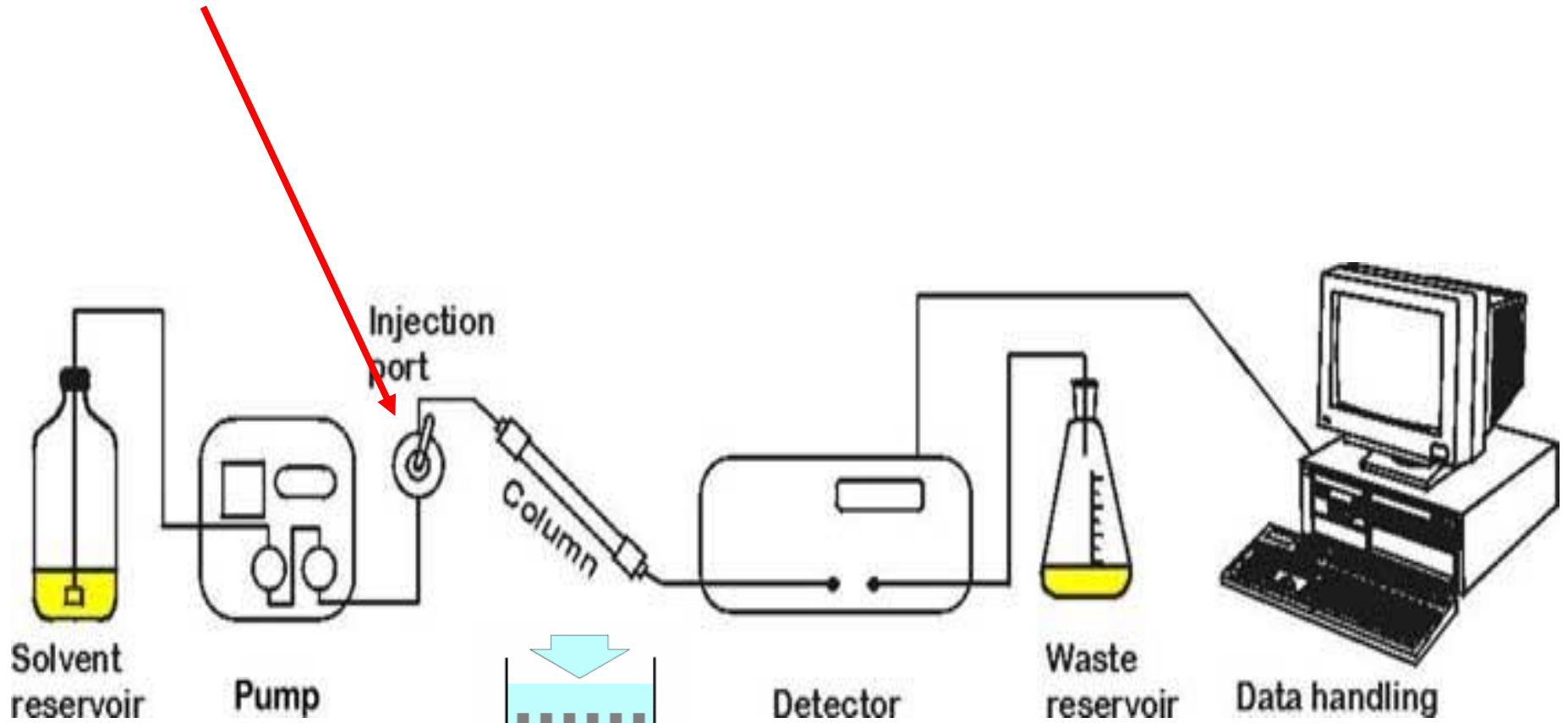
- **Fasi mobili:**

tamponi acquosi a diversa forza ionica, solventi a diversa polarità (polare per composti idrofili; in fase inversa per quelli lipofili)

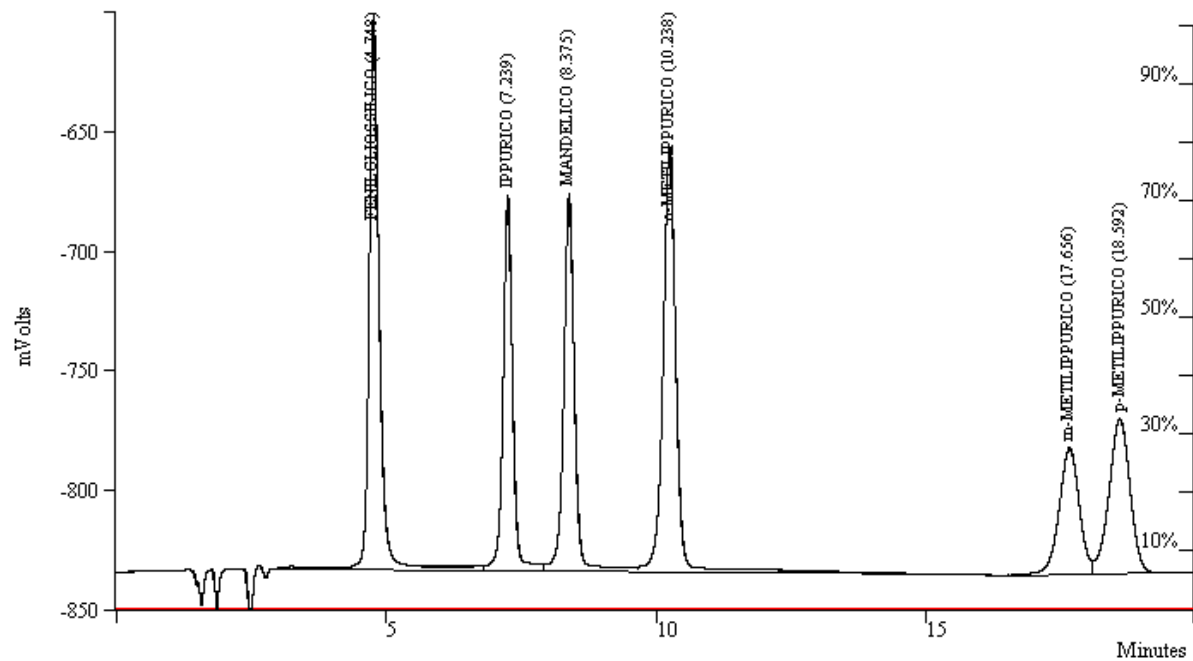
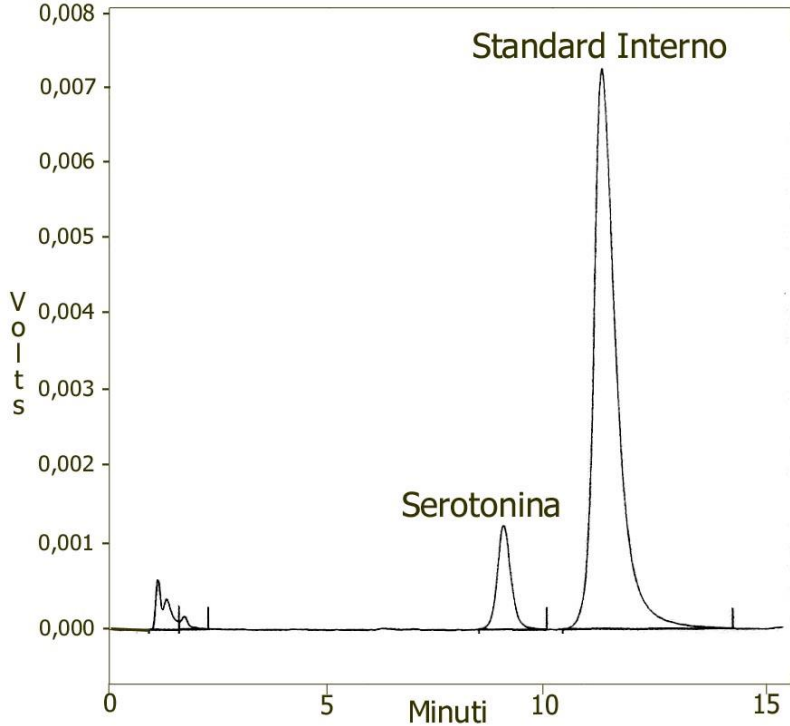
La cromatografia liquida ad alta efficienza (pressione) **sfrutta 4 dei 5 principi fondamentali della cromatografia (ripartizione, adsorbimento, scambio ionico, esclusione spaziale) divenendo di fatto una delle più efficienti e versatili metodiche cromatografiche**

- Estremamente veloce, selettiva, **sensibile (10^{-9} g)** e a ridotta manualità
- **Fondamentale la Programmazione del solvente e riduzione spazi morti**

- ***Virtualmente tutte le molecole biologiche possono essere separate o misurate attraverso tale tecnica (campione solubile in solventi acquosi o organici)***



HPLC cromatogrammi



Quantificazione picchi

uso dello standard

- L'area sottesa dal picco è proporzionale alla quantità di analita (integrazione)
- Utilizzo di uno standard/calibratore per correlare i tempi e le aree dei picchi dei campioni
(Utilizzazione di più standard/calibratori per costruire una retta di calibrazione)
- Utilizzo di uno standard interno per ogni campione (calibratore-controlli) per “compensare” variazioni delle condizioni operative nelle singole iniezioni

Preparazione del campione

- **Nel caso di cromatografie analitiche quantitative la purificazione del campione è fondamentale (plasma, urina, omogenato cellulare)**
- Il sistema di estrazione con solventi (dietiletere, diclorometano,..) non si usa più (in lab analisi chimico cliniche)
- **Il sistema di estrazione in fase solida (colonnine) permette di concentrare o isolare componenti selezionati da matrici complesse**
- Le colonne preparative sono “simili” a quelle analitiche e quindi “trattengono selettivamente gli analiti specifici diluiti in acido tricloroacetico o perclorico, acetonitrile; verranno poi eluiti/recuperati con agenti quali metanolo e acetonitrile
- Preparazione con tecnica del **column switching**
- Preparazione con estrazione in **fluidi supercritici** (biossido di carbonio a 31°C e 7.38 MPa)

Derivatizzazione del campione

Siccome in molti casi il rivelatore ha una sensibilità relativamente bassa verso vari soluti, ne risulta che essi possono venire individuati solo quando la loro concentrazione è alta. **IL LIMITE DI RIVELABILITÀ DI ALCUNI SOLUTI PUÒ ESSERE MIGLIORATO**, modificandone la struttura con una reazione di derivatizzazione.

**LA DERIVATIZZAZIONE VIENE FATTA
IN VISTA DELL'IMPIEGO DI UNO
SPECIFICO RIVELATORE**

(che generalmente è lo spettrofotometro o il fluorimetro).

Cromatografia

Applicazioni cliniche

HPLC (TLC-GC)

per la analisi ed identificazione di:

- AA (cistina, fenilalanina, tirosina, arginina,...)
- Emoglobine patologiche (Hb glicata, A2, Hb fetale, Hb S, Hb C,..)
- Isoenzimi
- Proteine semplici o coniugate
- Acidi nucleici
- Ormoni steroidei,..
- Farmaci e loro metaboliti
- Droghe e loro metaboliti/cataboliti (urine, sangue)
- Polisaccaridi
- Lipidi e fosfolipidi
- Porfirine,....
- Catecolammine (urine)

Tabella 2.5 Elenco di alcune applicazioni delle tecniche cromatografiche per la separazione e l'analisi di sostanze di interesse chimico-clinico.

Sostanza	Tecnica cromatografica di elezione				
	PC	TLC	GC	HPLC	CC
Aminoacidi	0	0		0	0
Peptidi	0	0		0	0
Proteine				0	0
Acidi nucleici				0	0
Nucleosidi				0	0
Steroidi		0	0		
Lipidi		0	0		
Fosfolipidi		0	0		
Alcoli			0		
Barbiturici		0		0	
Amfetamine		0		0	
Opiacei		0		0	
Antiistaminici		0		0	
Fenotiazine		0	0	0	
Analgesici		0		0	
Glucosidi cardiaci		0		0	
Catecolamine		0		0	
LSD		0		0	
Porfirine	0				
Metaboliti porfirine				0	0
Acidi biliari		0		0	
Ormoni tiroidei					0

Legenda: PC: cromatografia su carta;

Potenziale Zeta

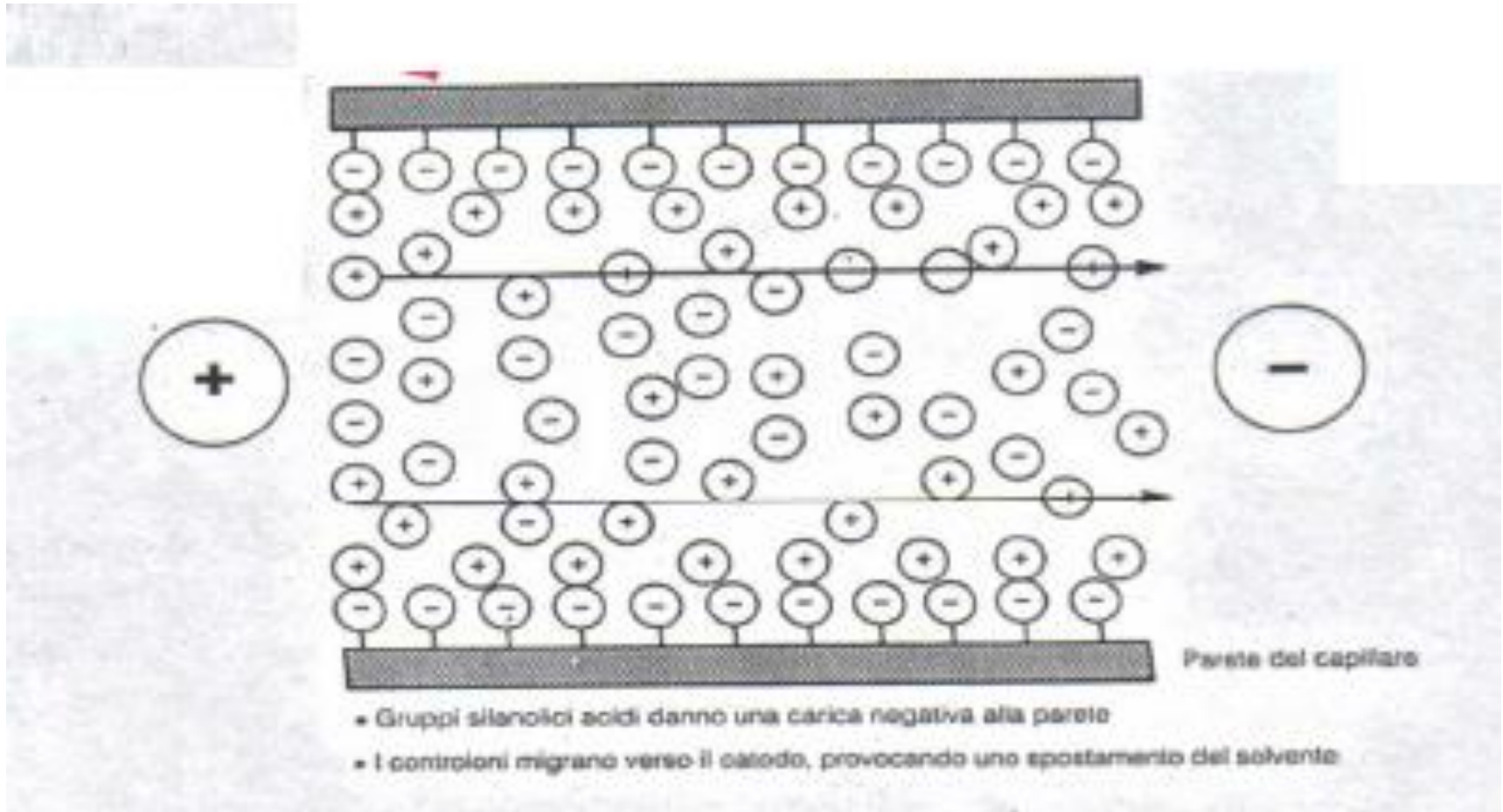
- Helmholtz-Stern

Il potenziale zeta si esplica a livello **dell'interfaccia solido-liquido** a seguito della “non uniforme” distribuzione dei cationi del solvente

Il potenziale zeta (-0,05+0.05 V) è responsabile di quattro fenomeni elettrocinetici:

1. **Elettroendosmosi**
2. **Potenziale di flusso** (liquido-diaframma poroso-ddp)
3. **Effetto Dorn** (sedim part colloidali-ddp)
4. **Elettroforesi**

Flusso elettroosmotico



Elettroforesi

Definizione

- **Migrazione** attraverso un mezzo fluido e sotto l'influenza di un campo elettrico di particelle comunque **dotate di cariche** elettriche siano esse ioni o polielettroliti macromolecolari (**proteine,..**)
- Questo si realizza in base alla **diversa densità di cariche** superficiali delle sostanze da separare

Diversa densità cariche (diverse dimensioni)



Diversa mobilità

Elettroforesi proteica

generalità

- **le proteine**, che sono dei **poliettoliti anfoteri (anfolti)** possono facilmente essere separate se sciolte in fase acquosa
- L'influenza del campo elettrico sulle proteine dipende dalla loro carica relativa, che a sua volta **dipende dal pH e dal punto isoelettrico** della proteina stessa (pH <PI migrazione catodica; pH >PI migrazione anodica)
- **Gli ioni idrogeno, ossidrile e gli elettroliti** della soluzione si distribuiscono attorno alla molecola proteica contribuendo alla sua carica totale e quindi influenzando la sua mobilità elettroforetica
- **Importanti applicazioni in biochimica e biochimica clinica per indagini qualitative e quantitative**

Elettroforesi

Tipologie

- **Elettroforesi in fase libera o con gradiente mobile**

Elettroforesi capillare

- **Elettroforesi zonale**

SDS-Page-Western Blot

Immunolettroforesi

Elettrosineresi

Elettroimmunodosaggio,..

Elettroforesi capillare

Evoluzione elettroforesi in fase libera

- Genomica (DNA,..)
- Proteomica (AA,peptidi,..)
- Metabolomica
- **Chimica clinica (sieroproteine,.....farmaci,ioni metallici)**

- Separazione molecole ionizzate e non (EC micellare)
- Efficienza elevata
- Rapidità
- Automazione
- Costi contenuti

Elettroforesi capillare

- Si conduce all'interno di un tubo molto sottile (capillare) tipicamente di **50 micron** (da 20 a 100) di diametro interno e 300 di diametro esterno
- Il capillare permette di ridurre i moti convettivi e permette una buona dispersione del calore
- Più è breve il capillare e più è veloce la migrazione (entro certi limiti)
- **Fondamentale e controproducente è lo sviluppo di calore**
- **10-50 kV**
- **20-100 cm**
- Iniezione del campione ad alto voltaggio; ad alta pressione

Elettroforesi capillare (CE)

- La migrazione netta degli analiti avviene con velocità diverse ma **sempre verso il catodo** a seguito del flusso elettroosmotico

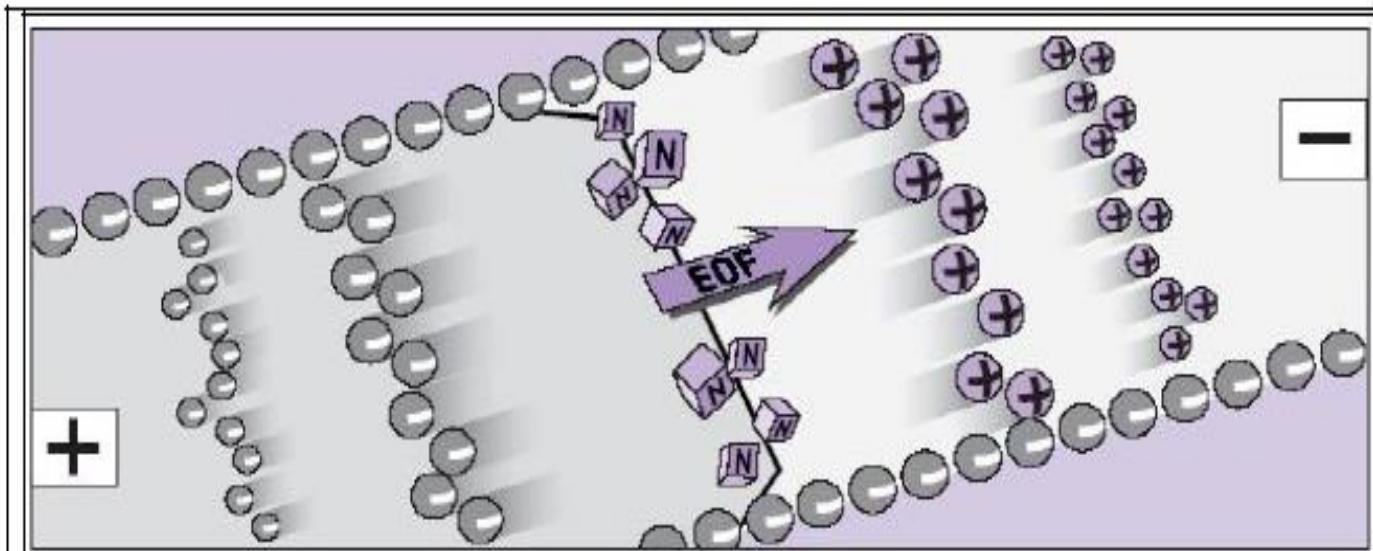


Figura 4: La figura quattro mostra le differenti velocità di migrazione dei soluti, aventi cariche elettriche diverse, dovute alla presenza del flusso elettroosmotico nell'elettroforesi capillare (7).

3.1 ELETTROFORESI CAPILLARE

Il sistema Capillarys™ 2 comprende 8 capillari in parallelo (con un diametro interno inferiore a 100 µm), così da permettere 8 analisi simultaneamente. Utilizzando rack di 13x8 il Capillarys™ 2 riesce ad eseguire 90 elettroforesi per ora.

Il pipettaggio dei campioni avviene direttamente dalla provetta primaria (da 13 a 16 mm di diametro e da 75 a 100 mm di altezza) o in microprovette da 1,5 mL posizionate su provette primarie, sempre senza tappo. Lo strumento capillare esegue sempre 8 elettroforesi contemporaneamente, dunque se si deve analizzare un numero inferiore a 8 campioni su un rack, il resto delle posizioni deve essere occupato da delle provette contenenti acqua bidistillata. L'iniezione dei campioni (diluiti 1/10 con tampone) nei capillari avviene tramite il sistema idrodinamico, applicato per 4 secondi (campione iniettato circa 1 nL); lo strumento necessita di un volume morto di campione di circa 200 µL.

La separazione avviene applicando una differenza di potenziale costante di 9 kV alle estremità di ogni capillare, per una durata di 4 minuti. La temperatura dei capillari è tenuta sotto controllo a 35°C per effetto Peltier durante tutta la migrazione. La misurazione delle proteine viene effettuata all'estremità anodica del capillare per spettrometria di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 200 nm. Alla fine della misurazione i capillari vengono risciacquati utilizzando una soluzione di lavaggio e poi nuovamente riempiti con la soluzione tampone.

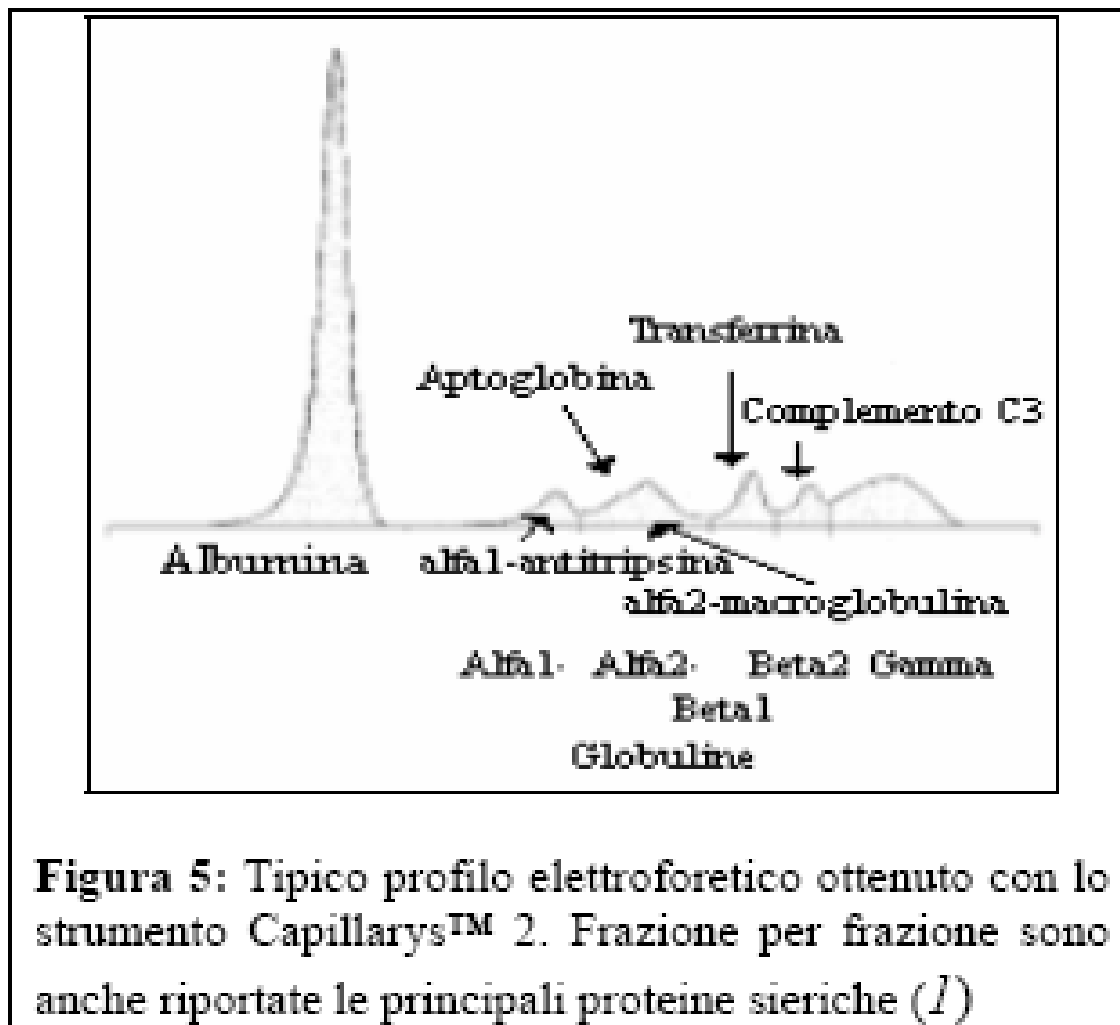


Figura 5: Tipico profilo elettroforetico ottenuto con lo strumento Capillarys™ 2. Frazione per frazione sono anche riportate le principali proteine sieriche (1)

Elettroforesi zonale

Caratteristiche generali

- La migrazione e la separazione avvengono fra i pori di un **supporto solido** ottenendo alla fine delle **bande**
- Le molecole non si separano solo in funzione della loro **carica** ma anche in funzione della loro **massa e forma**

Elettroforesi zonale

Caratteristiche generali

materiali impiegati

In relazione al tipo di interazione tra il tampone ed il supporto si distinguono

- **Mezzi stabilizzanti polifasici:**

Carta, acetato di cellulosa, polvere di cellulosa, amido granulare,..

- **Mezzi stabilizzanti monofasici:**

Gel di agar, gel di amido, gel di poliacrilamide

Elettroforesi zonale

Vantaggi

- Apparecchiature estremamente semplici (vaschetta, **alimentatore**,...)
- Indagine sia qualitativa che quantitativa
- Volumi di campione richiesti molto piccoli (2-50 mcL)
- Separazione in bande ben distinte e stabili
- Al termine della separazione è possibile operare (colorare,..) sulle bande e/o associare altre tecniche (immunodiffusione,..)

Elettroforesi zonale

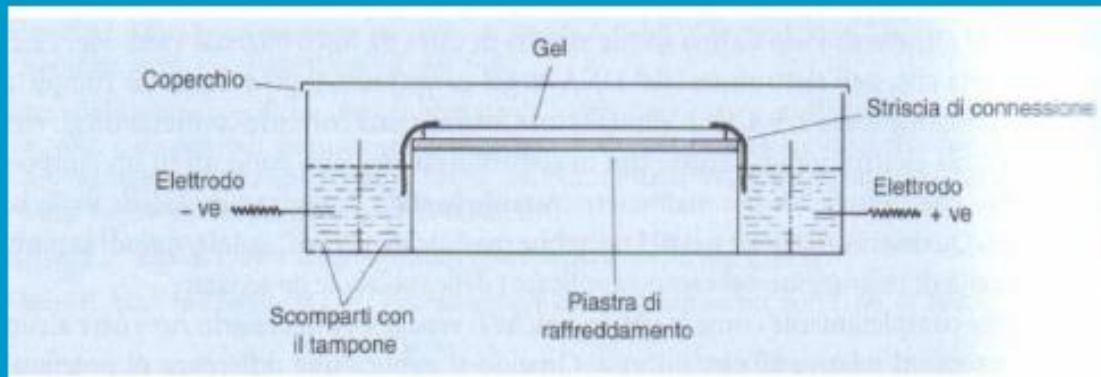


Figura 12.2 Tipico apparato orizzontale per elettroforesi su gel, come quello utilizzato per l'immuno-elettroforesi, l'isoelettrofocalizzazione e l'elettroforesi del DNA e dell'RNA su gel di agarosio.

Piastra di vetro o di plastica e posta su piastra refrigerante per dissipare il calore prodotto.

La connessione tra gel e tampone avviene attraverso l'uso di una sottile striscia di carta da filtro bagnata

Elettroforesi zonale

Supporti polifasici

Il tampone è legato per capillarità e si distingue nettamente

- **Carta da filtro (cellulosa): praticamente abbandonata (Whatman)**
Effetto cromatografico per adsorbimento, effetto diffusione e trascinamento
- **Acetato di cellulosa (resina termoplastica, ancora in uso)**
 1. Scarso adsorbimento con alto potere risolutivo
 2. Elevata porosità e bande ristrette
 3. Tempi di separazione relativamente rapidi (decine di minuti)
 4. Procedure di identificazione delle bande (colorazione,..) relativamente rapidi
 5. Diafanizzazione (metanolo) più agevole
 6. Movimento netto dovuto alla elettromigrazione e alla elettroendoosmosi dell'acqua

Elettroforesi zonale

Supporti monofasici

- **Gel di amido:**

tecnica: SGE

effetto setaccio molecolare, oltre 20 frazioni proteiche plasmatiche; difficoltà interpretative dei risultati; è stato **usato per emoglobine ed aptoglobine**

- **Gel di agar o agarosio** (polisaccaride solfonato estratto dalle alghe):

Tecnica : AGE (agarose gel electrophoresis)

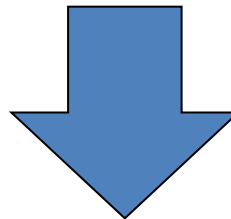
no effetto setaccio (solo massa/carica)

scarsa elettroendoosmosi, separazione rapida (20-30 min)

bande nette, accoppiamento per immunodiffusione; **usato per proteine ed acidi nucleici.**

- **Gel di poliacrilamide** (acrilammide+bis-acrilammide: cross-linking)

Tecnica PAGE



Elettroforesi zonale

variabili tecniche

- **Natura e pH del tampone** (pH stabile, carica superficiale stabile, conducibilità elettrica,.. Tris fosfato pH 8.6; tris glicina pH 8.6, Michaelis al Veronal pH 8.6;...) per ridurre EEO e la diffusione
- **Forza ionica** (Lewis-Randall;intensità del campo elettrico dovuto agli ioni in soluzione; dipende da conc ionica tot e valenze; $\mu=0,01-0,1$)

Maggiore è la conc. dei soluti minore è la corrente trasportata dagli analiti e la loro separazione; migliora però la compattezza delle bande e si riducono i fenomeni endosmotici

- **Tensione** costante a 100-300 V ($R=V / I$)
- **Corrente** tende ad aumentare per la concentrazione del tampone a seguito dell'evaporazione per effetto Joule

- **Tempo** (mediamente 5-20 min)

- **Temperatura**

- **Calore :**

Effetto Joule= $W=RI^2$

- Aumento della velocità di diffusione con bande meno definite
- Comparsa di correnti convettive
- Denaturazione
- Diminuzione della viscosità del tampone e della resistenza del mezzo

Procedimento generale elettroforesi zonale

- Applicazione del supporto alla camera
 - Applicazione del campione (semina 2-50 mcl)
 - Migrazione a tensione o corrente costante
 - Identificazione delle componenti
1. **Fissazione bande** per bollitura o etanolo o ATCA
 2. **Identificazione bande mediante:** fluorocromi, assorbanza UV, autoradiografia, coloranti come amido schwarz, Comassie Brillan Blue, amiso Black, nero Sudan, AP Schiff,..; immunochimica-immunoenzimatica
 3. **Quantificazione mediante scansione densitometrica** (fluorocromi stabili/laser) dopo diafanizzazione con metanolo e riscaldamento

Proteine plasmatiche (razza umana)

186

3. - ELETTROFORESI

Tabella 3.2. Valori normali delle frazioni proteiche del siero di individui normali adulti, ottenuti mediante elettroforesi zonale.

Frazione	% del totale	Valori medi (g/dl)	± 2 S.D. (g/dl)
Albumina	45-70	4,2	3,2-5,2
a ₁ -globulina	2-5	0,2	0,1-0,3
a ₂ -globulina	8-14	0,8	0,6-1,0
b-globulina	10-15	0,9	0,7-1,1
g-globulina	11-22	1,2	0,8-1,6
Proteine totali		7,3	6,3-8,3

Elettroforesi proteica

Performance generale

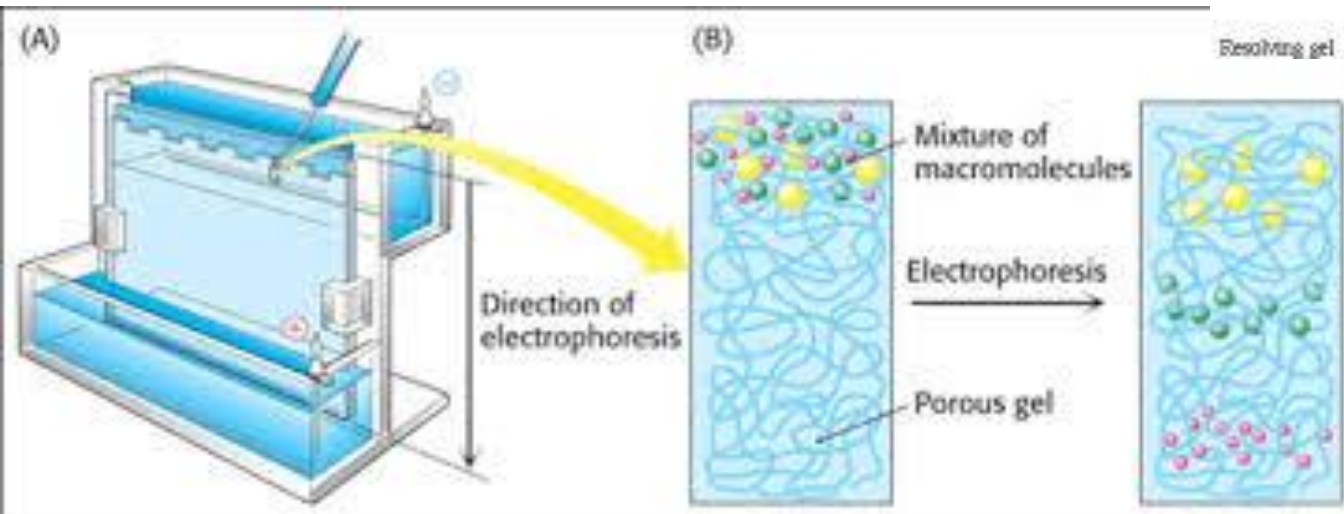
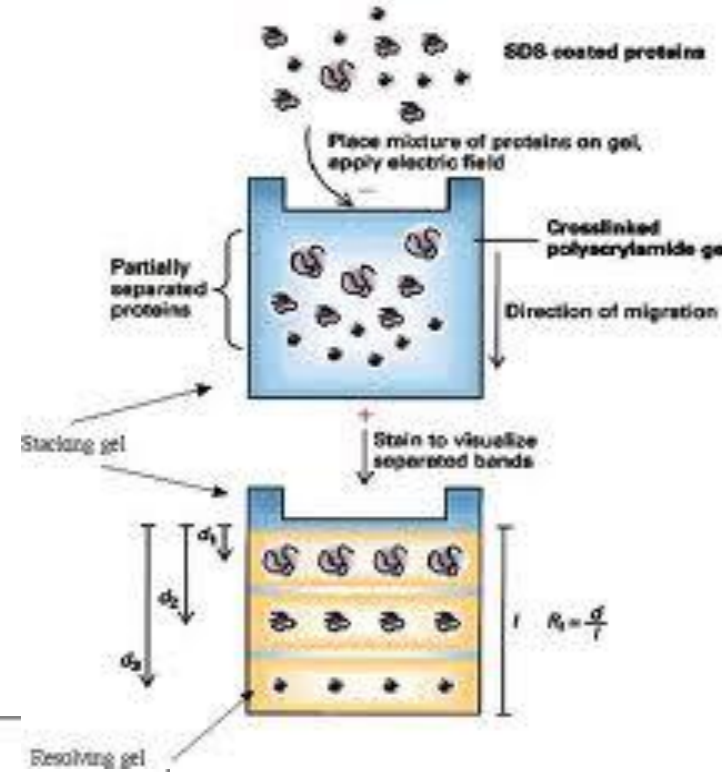
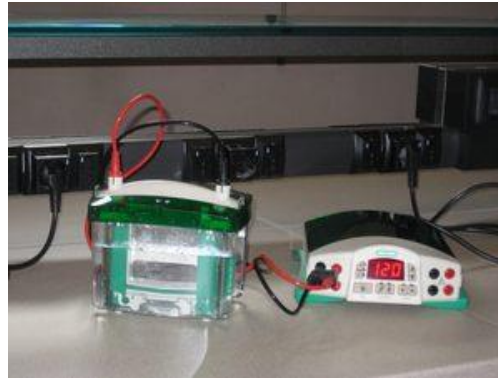
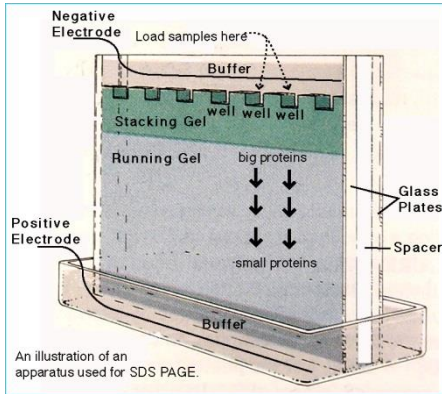
- **Sensibilità** : ordine dei microgrammi per E. zonale; per lipoglicoproteine ordine 2-3 volte superiore
- **Precisione**: CV totale 5-10%(dipende dalla resa delle diverse fasi : trasferimento, colorazione, decolorazione, lettura densitometrica,..)
- **Accuratezza** : sia per la zonale che per la fase libera non sempre sufficiente per indagini cliniche (gradiente di rifrazione non omogeneo, assorbimento o sviluppo colore non omogeneo,...necessità di fattori di correzioni sperimentali non ottimali)

Elettroforesi zonale

SDS-PAGE

- **Maggiormente diffusa**
- **Analisi qualitativa di miscele di proteine (Semiquantitativa!!!!)**
- **Può essere utilizzato per calcolare la massa molecolare relativa** (retta di calibrazione con proteine standard ; distanza migrazione contro log massa molecolare standard.)
- Il campione va bollito 5 min con **SDS sodiododecilsolfato** (detergente anionico) e betamercaptoetanololo (rompe i ponti disolfuro)
- **Poliacrilamide 10-15% o in gradiente** (stacking 4% pH 6,8; running dal 5 al 25% sul fondo, pH 8,8)
- **Effetto setaccio molecolare** (separa in base alle dimensioni e risolve proteine con M simile; in gradiente)
- **Determina con sufficiente precisione la massa molecolare**
- **Separazione da 2 a 200 Kd (in gradiente)**

SDS PAGE (camera verticale)



Nei sistemi Tris-acetato gli ioni principalmente coinvolti nella migrazione sono:

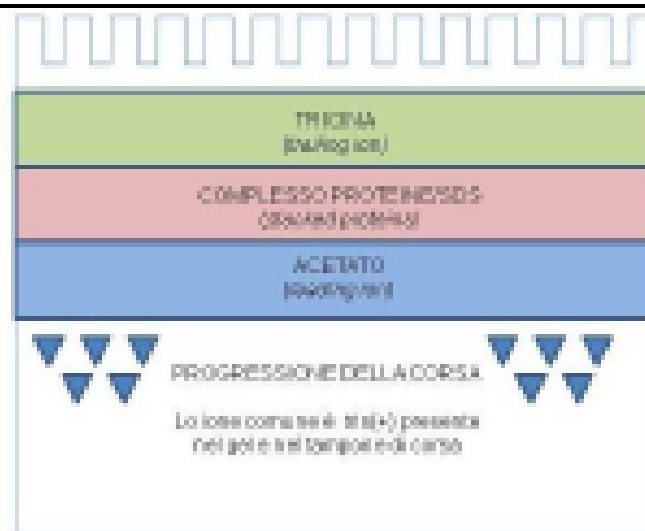
- Acetato(-) fornito da tampone del gel che funge da *leading ion*
- Tricina (-) fornito dal tampone di corsa che funge da *trailing ion*
- Tris (+) è lo ione comune presente sia nel tampone del gel sia nel tampone di corsa

La combinazione di un pH del gel intorno a 7.0 e del pH del tampone pari a 8.3 anche in questo caso comporta un pH operativo più basso (8.1) rispetto ai sistemi Tris-Glicina durante l'elettroforesi.

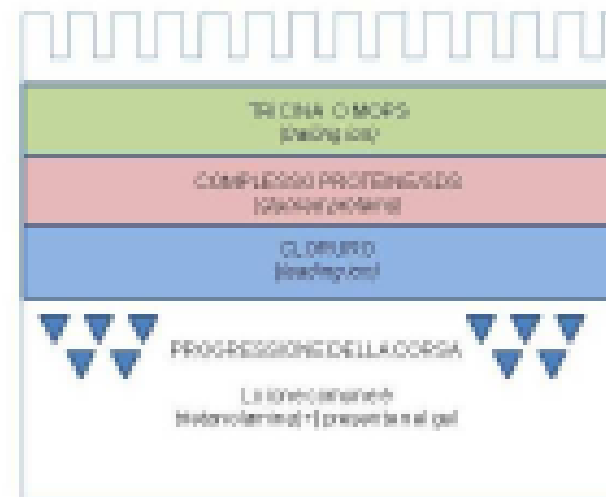
Nei sistemi Trietanolamina gli ioni principalmente coinvolti sono:

- Cloruro(-) fornito dal tampone del gel che funge da *leading ion*
- Tricina o MDPS (-) (a seconda del tampone di corsa utilizzato) che fungono da *trailing ions*
- Trietanolamina (+) agisce come ione comune presente nel gel mentre Tris (+) è fornito dal tampone di corsa

La combinazione del pH del gel intorno a 7.6 e del pH del tampone (8.2) crea un pH operativo inferiore (7.9) rispetto ai sistemi Tris-Glicina durante l'elettroforesi



- Ioni positivi nel tampone del gel Tris, acetato - pH 7.0
- Ioni presenti nel tampone di corsa Tris+, Tricina- e SDS (pH 8.3)
- pH operativo 8.1



- Ioni presenti nel tampone del gel Trietanolamina+, Cloruro - pH 7.6
- Ioni presenti nel tampone di corsa Tris+, Tricina- o MDPS- e SDS (pH 8.2)
- pH operativo 7.9

Nei **sistemi Tris-Glicina** tre diversi ioni sono coinvolti nella migrazione:

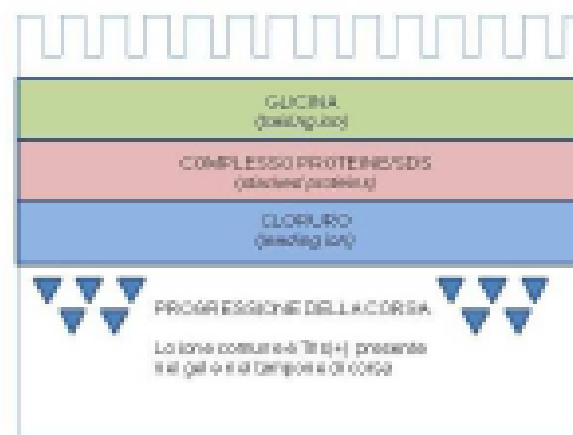
- Cloruro(-) presente nel tampone del gel , funge da *leading ion* poiché esso ha l'attrazione maggiore verso l'anodo rispetto agli altri ioni presenti nel sistema
- Glicina (-) l'anione primario presente nel running buffer , funge da *trailing ion* poiché esso è solo parzialmente carico negativamente e rimane dietro lo ione cloruro con una maggiore carica negativa
- Tris base (+) è lo ione comune presente sia nel gel sia nel tampone di corsa.

Durante l'elettroforesi , la combinazione del pH del gel (8.5) e del tampone di corsa (pH 8.3), formano un pH operativo pari a 9.5 nella regione di separazione del gel.

Nei **sistemi Bis-Tris** tre ioni sono principalmente coinvolti nella migrazione:

- Cloruro(-) presente nel tampone del gel , funge da *leading ion* poiché esso ha l'attrazione maggiore verso l'anodo rispetto agli altri ioni presenti nel sistema
- MES o MOPS (-) (a seconda del tampone di corsa utilizzato) fungono da *trailing ions*
- Bis-Tris(+)² agisce come ione comune presente nel gel mentre Tris (+) è fornito dal tampone di corsa

La combinazione di un pH del gel più basso (6.4) e del pH del tampone (7.3-7.7) comporta un pH operativo significativamente più basso (7.0) rispetto ai sistemi Tris-Glicina durante l'elettroforesi.



- Ioni presenti nel tampone del gel Tris+ Cl- (pH 8.5)
- Ioni presenti nel tampone di corsa Tris+ Glicina e SDS (pH 8.3)
- pH operativo 9.5



- Ioni presenti nel tampone del gel Bis-Tris+ Cl- (pH 6.4)
- Ioni presenti nel tampone di corsa Tris+ MES- o MOPS- e SDS (pH 7.5)
- pH operativo 7.0

Elettroforesi zonale....

Metodica quantitativa?!?!

Misura quantitativa

Densitometria a scansione

Misura la luce trasmessa quando un raggio laser attraversa un gel

Si costruisce un grafico che relaziona l'assorbanza e la distanza di migrazione

L'area dei picchi di assorbanza determina la quantità di proteina nella banda

Limiti

In un intervallo di concentrazione ristretto è valida la relazione lineare tra assorbanza e concentrazione

Non sempre quantità uguali di proteine diverse si colorano nello stesso modo con un dato colorante

Rivelazione e stima delle proteine da gel

Colorante :

Comassie Brilliant Blue

0.1 % in metanolo: acqua: acido acetico glaciale
(45:45:10)

La miscela Metanolo:acido acetico glaciale denatura e fissa le proteine nel gel

Rivela fino a 0.1 μg di proteine

Silver staining

$\text{Ag}^+ \longrightarrow \text{Ag}$ sulla proteina

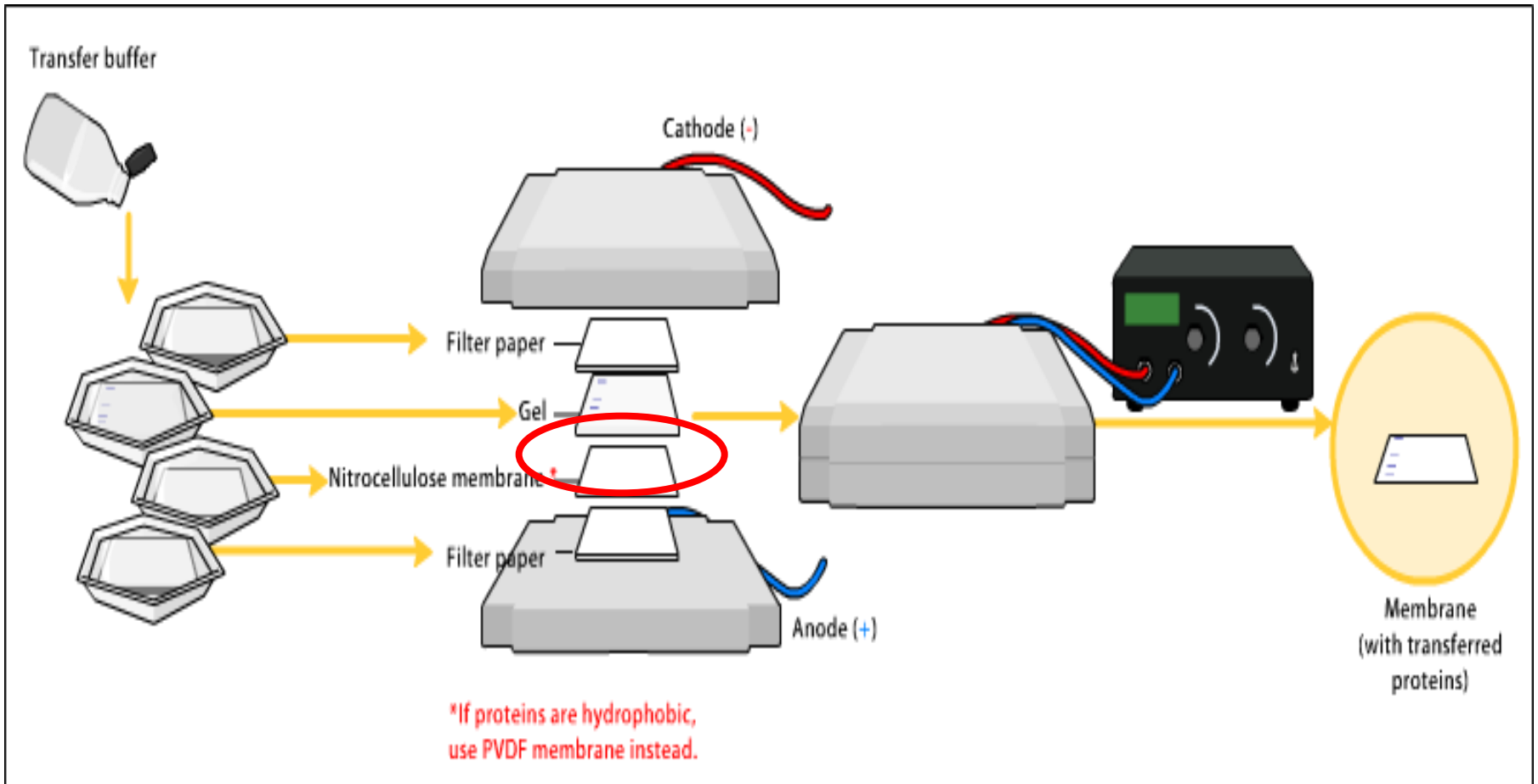
Rivela fino a 0.1 ng

Rivelazione con lectine per glicoproteine

Applicazioni SDS-PAGE

- ❑ **Analisi qualitativa di miscele di proteine**
- ❑ **Valutazione della purezza dei campioni (in particolare dopo ogni passaggio di purificazione)**
- ❑ **Separazione di proteine multimeriche in diverse bande**
- ❑ **Determinazione della massa molecolare relativa (M_r)**
Confronto della mobilità del campione con quella di una serie di proteine con M_r nota che vengono separate sullo stesso gel
Si riporta in grafico la distanza di migrazione in funzione del $\log M_r$

Western Blot



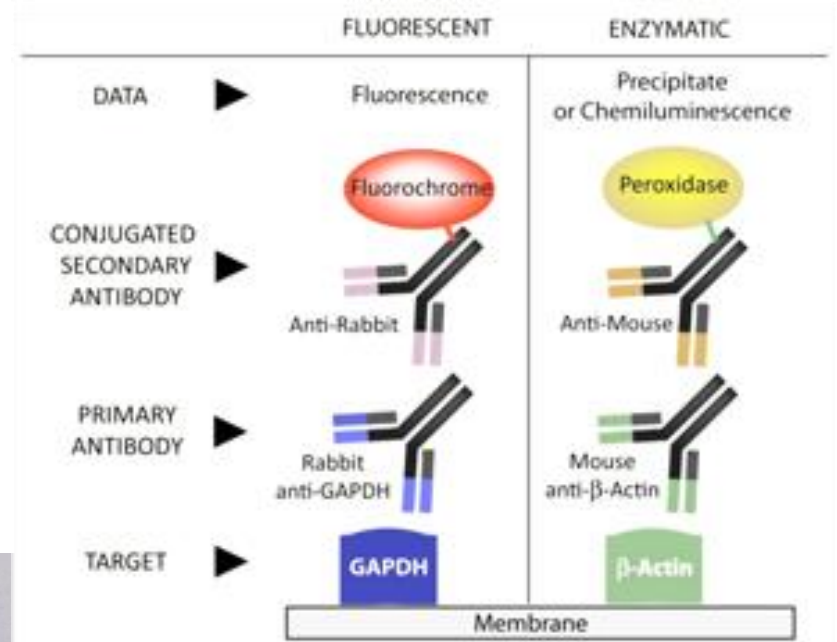
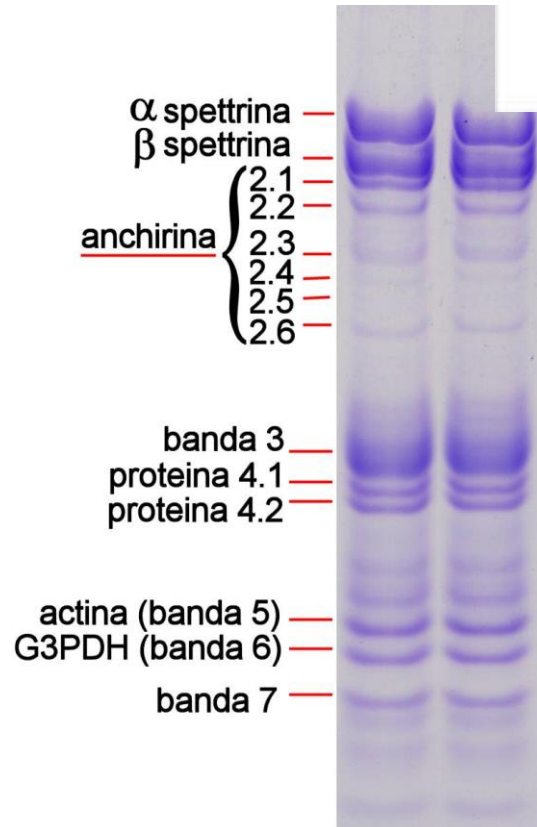
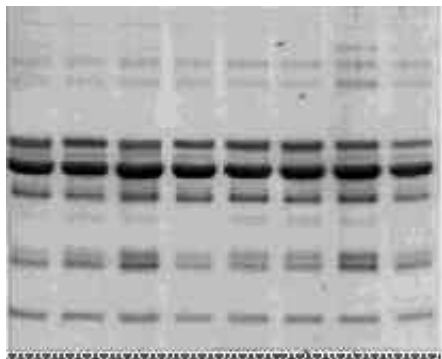
Passaggio delle bande sotto corrente continua (eletroblotting) ed interazioni idrofobiche con la nitrocellulosa; il blot viene saturato con proteine del latte e le bande individuate con anticorpi primari e secondari coniugati ad enzimi

WB colorazione

RILEVAZIONE BANDE

con:

- PEROSSIDASI
- FOSFATASI alcalina
- BRILLANT BLUE
- LUMINOLO
- SILVER STAIN



Fotometria

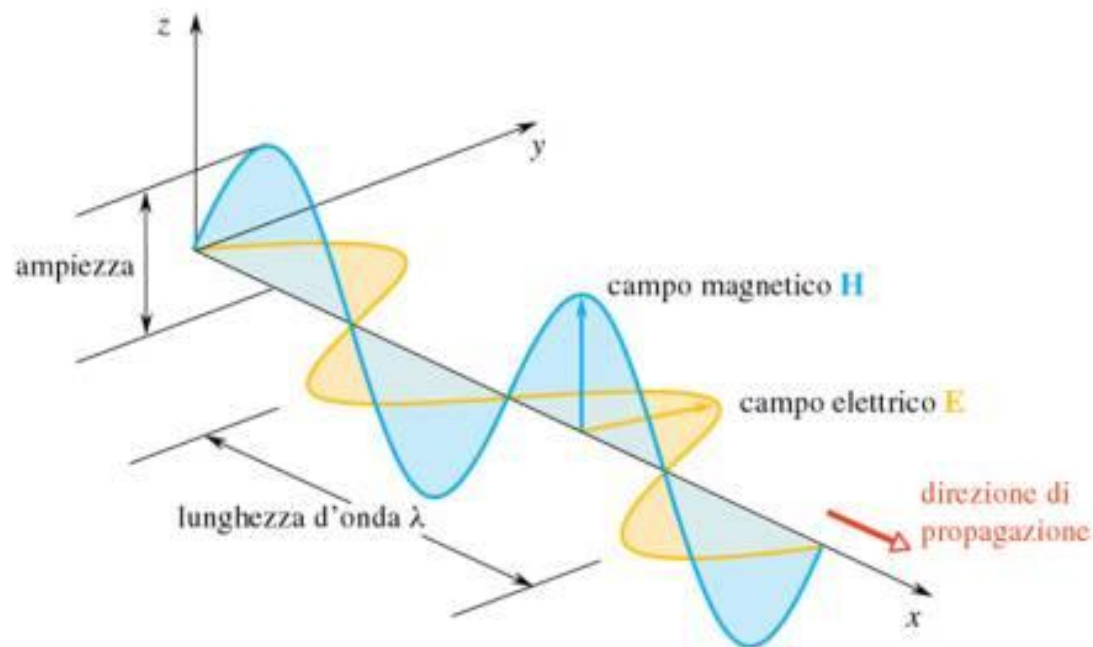
Misura la energia radiante dopo la sua interazione con la materia

1. Fotometria di emissione
2. Spettrofotometria di assorbimento atomico
3. **Spettrometria di assorbimento molecolare/spettroscopia, nel visibile e nell'UV**

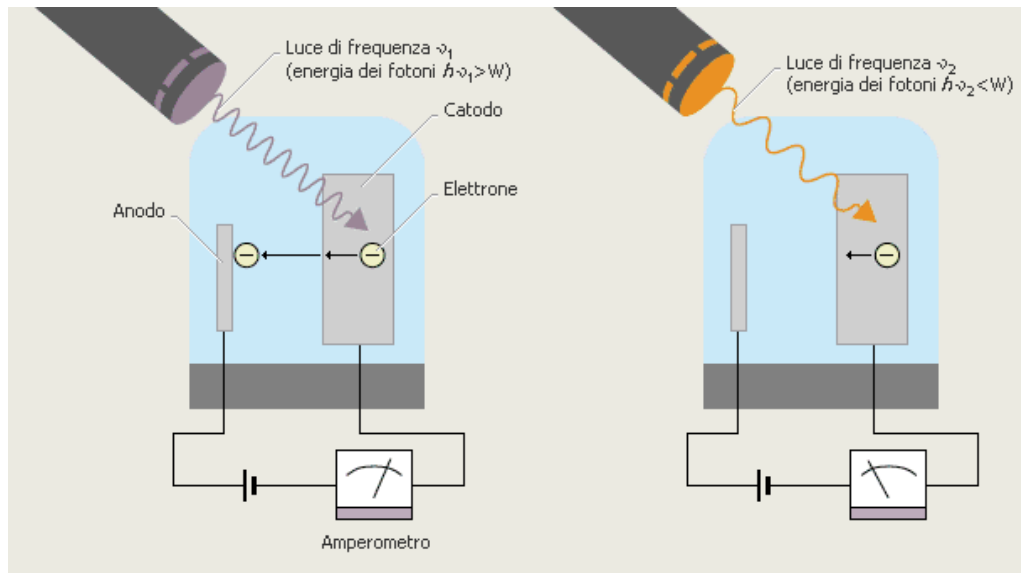
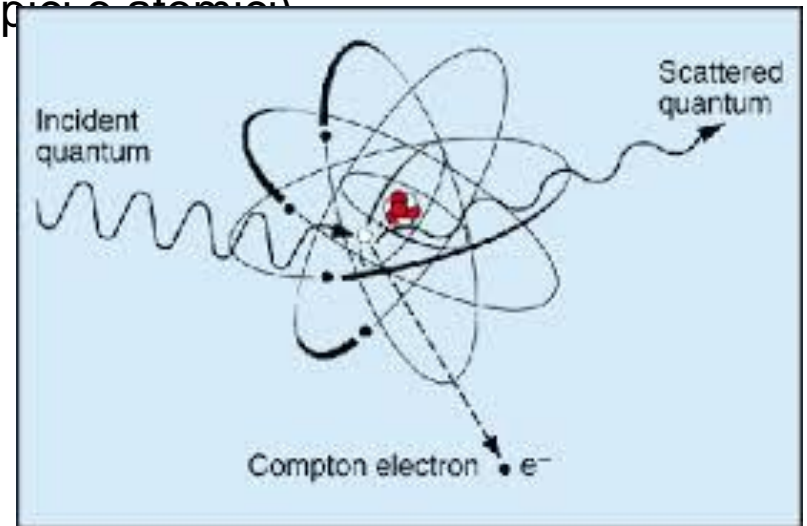
Spettrometria di assorbimento

- La S.A: è una delle diverse tecniche fotometriche che sfruttano la interazione delle radiazioni elettromagnetiche/luminose con la materia.
- Come indicato dalla denominazione la S.A. mette in relazione la concentrazione della sostanza da analizzare con la energia che la stessa sostanza (o suoi derivati) assorbe
- La differenza tra la energia (luminosa) incidente e quella trasmessa costituisce un misura della quantità dell'analita.

- Alcuni fenomeni come la **rifrazione**, la **diffrazione**, la **interferenza**, la **polarizzazione** possono essere spiegati ipotizzando che la radiazione luminosa sia una radiazione elettromagnetica (fenomeni macroscopici)



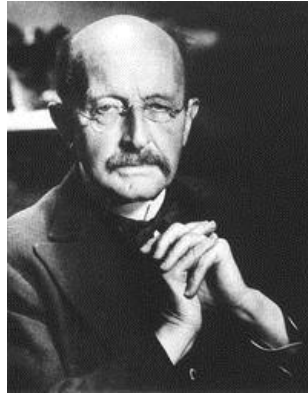
Altri fenomeni quali l'effetto fotoelettrico e l'effetto Compton possono essere spiegati soltanto se si ipotizza una forma "corpuscolata" (quantica-fotonica) della luce (fenomeni microscopici e atomici)



Luceradiazione o fotone?

M.Planck

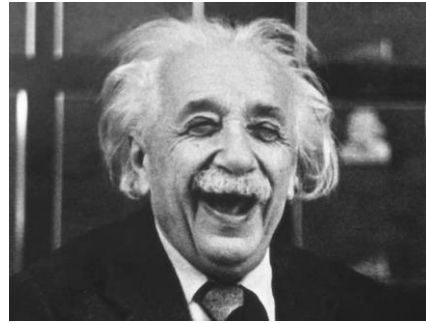
(irraggiamento
corpo nero; 1900)



L'energia di un corpo non può
variare con continuità ma solo
di un numero definito di
“quanti”
(assorbimento, emissione)

A.Einstein

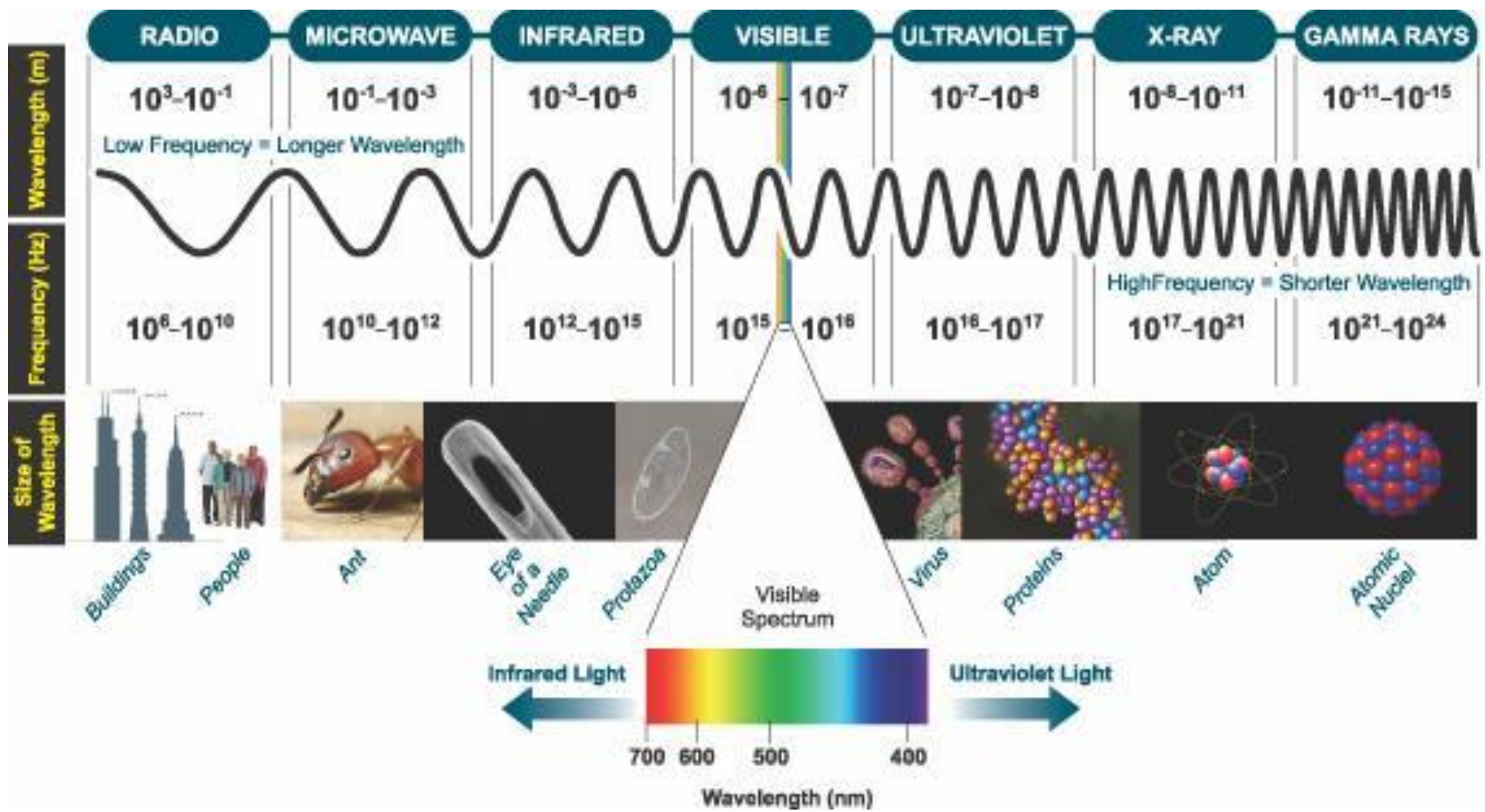
(emissione
fotoelettrica; 1905)



La radiazione si propaga alla
velocità della luce sotto forma
di fotoni

$$E = h\nu \quad (\text{energia quantica})$$

$$c = \lambda\nu \quad (\text{energia fotonica})$$

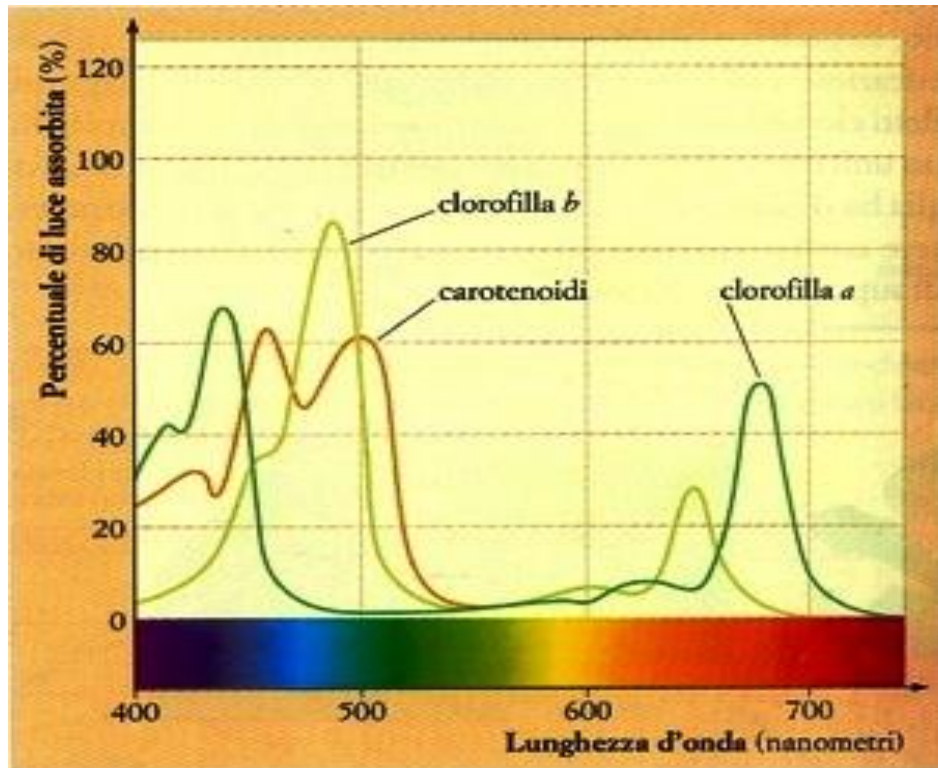


Spettri

- Spettro di riflessione (diffusione)
- Spettro di assorbimento/trasmissione

CONTINUO/DISCONTINUO

SPETTRO ASSORBIMENTO esempio



9.4 È possibile misurare la percentuale di luce di ciascuna lunghezza d'onda che viene assorbita da un pigmento e predisporre un grafico con i risultati ottenuti. Alle tre curve corrispondono i modelli di assorbimento dei principali pigmenti che si trovano nei cloroplasti: la clorofilla *a*, la clorofilla *b* e i carotenoidi.

Tabella 7.1. Interazioni delle radiazioni elettromagnetiche e delle "strutture" della materia

Fenomeno	Regione dello spettro	Lunghezza d'onda
Nucleare	Gamma	0.1 nm
Elettroni interni	Raggi X	0.1-1.0 nm
Ionizzazione	Ultravioletto	10-200 nm
Elettroni di valenza	Ultravioletto vicino e visibile	200-800 nm
Vibrazioni molecolari	Infrarosso vicino ed infrarosso	0.8-25 μm
Rotazione ed orientazione di spin elettronico in campi magnetici	Microonde	400 μm -30 cm
Orientazione di spin nucleare in campi magnetici	Onde radio	100 cm o oltre

Assorbimento delle radiazioni visibili ed ultraviolette

- L'assorbimento nel visibile e nell'ultravioletto dipende fundamentalmente dalle transizioni degli elettroni più esterni (di legame)
- Le molecole organiche possiedono principalmente legami covalenti
- Vi sono 2 tipi di legami covalenti: singoli e doppi (tripli)
- Tali legami, in funzione della distribuzione elettronica vengono definiti σ e π
- **Per gli elettroni σ (assiali) occorre più energia rispetto ai π che sono delocalizzati, hanno più livelli energetici a disposizione e quindi sono più facilmente eccitabili**
- All'aumentare del numero di doppi legami aumenta la lunghezza d'onda della luce assorbita

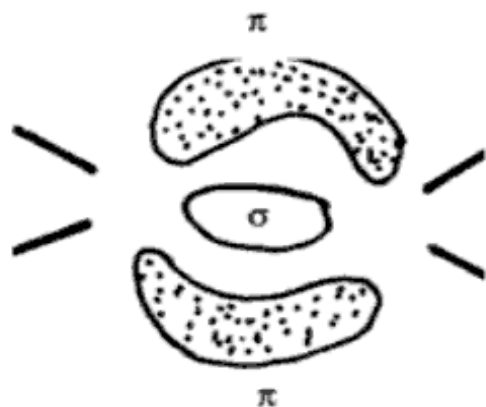
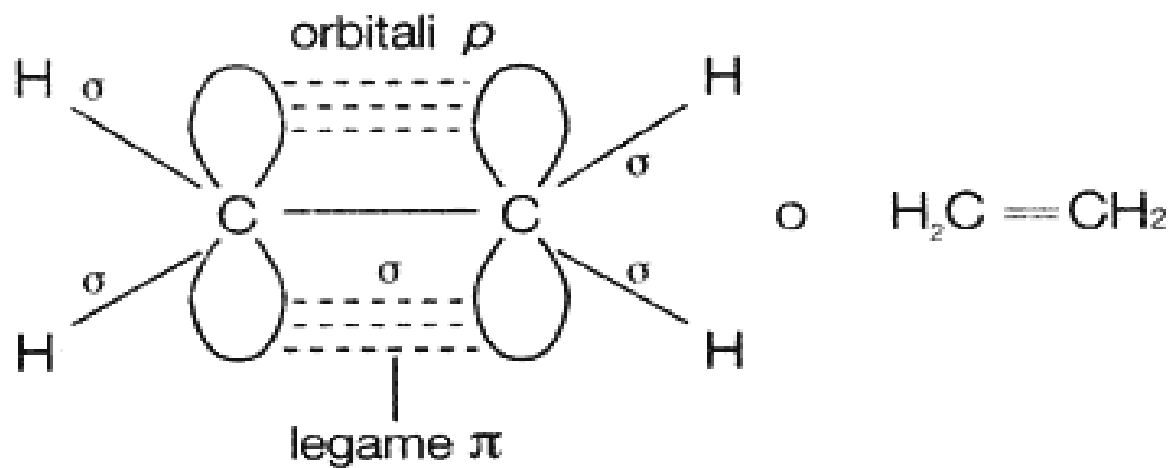


Figura 7.3. - Rappresentazione della molecola dell'etilene con indicazione del legame σ e π .



Assorbimento delle radiazioni visibili ed ultraviolette

- Se la frequenza della radiazione incidente corrisponde ad una delle “frequenze naturali” della molecola il fenomeno di assorbimento è intenso e specifico
- Ogni molecola ha una specifica disposizione dei legami e degli elettroni (delocalizzazione) e quindi possiede uno specifico spettro di assorbimento/emissione

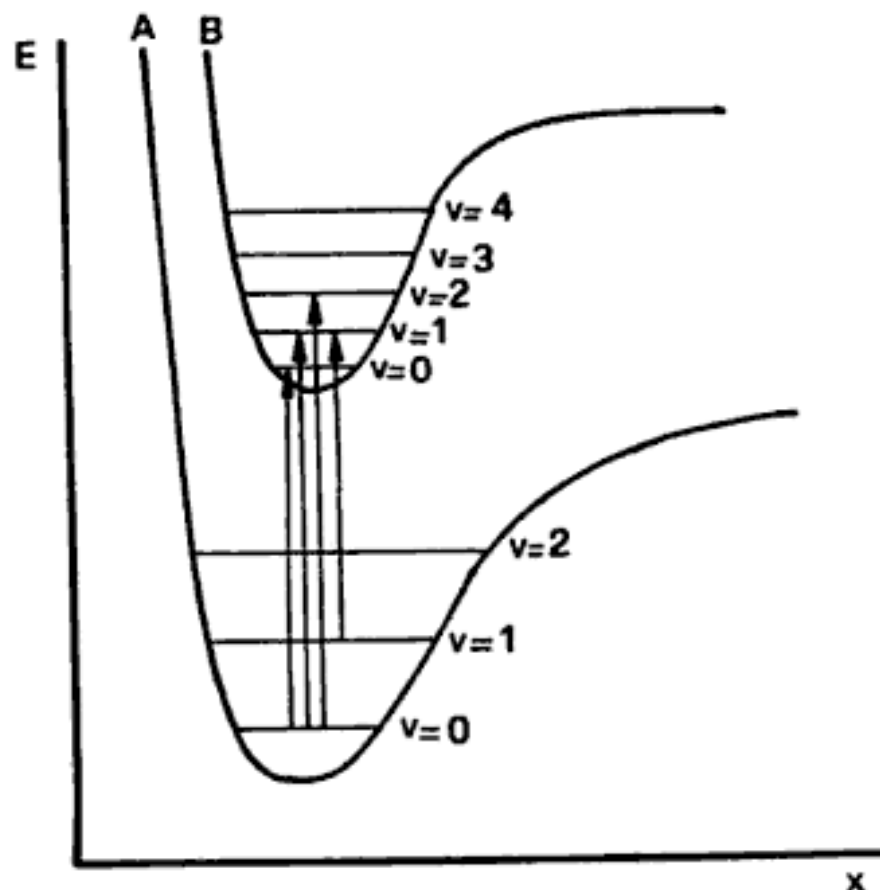
Assorbimento delle radiazioni visibili ed ultraviolette

- In particolare vi è una interazione tra dipolo elettrico indotto nella molecola e campo elettrico della radiazione (teoria di Frank-Condon)
- In tale evenienza la molecola, per tornare al suo stato fondamentale riemetterà energia sotto diverse forme: termica ,fotochimica, radiante

Energia radiante

1. Diffusione $I_0 = I$
2. Fluorescenza, fosforescenza $I_0 < I$

Figura 7.4. - Stato elettronico fondamentale (A) ed eccitato (B) di una molecola biatomica; nei due stati sono indicati i vari livelli vibrazionali ($v = 0$; $v = 1$; $v = 2$; ecc.). Le frecce indicano il fenomeno di assorbimento di **energia** con passaggio elettronico dallo stato fondamentale a quello eccitato.



- **Il cromoforo**

Molecola (composto insaturo) con diversi legami π ed elettroni delocalizzati

- **Raggruppamento chimico insaturo che risulta responsabile di un assorbimento caratteristico fra i 180 e 1000 nm**

Gruppi:

Etilene

Acetilene

Carbonile

Carbossile

Azoico

Nitrico

Nitroso

Solfossido

- **Sostanze/gruppi auxocromiche/iper-cromiche (sostituenti vicino al cromoforo):**

SR

NR₂

Br

OR

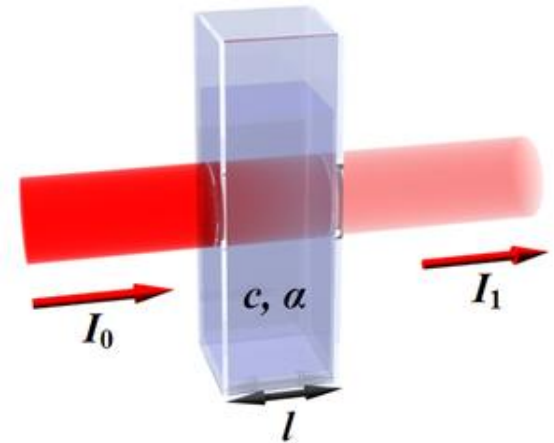
- **Effetto batocromico (red shift), ipsocromico (blue shift), iper-ipocromico**

Relazione tra luce assorbita e concentrazione dell'analita

- **Legge di Lambert-Beer-Bouguer** (fascio parallelo di luce monocromatica; sol diluite)

$$\frac{I_1}{I_0} = 10^{-k\lambda l}$$

$$A = \epsilon_{\lambda} l C;$$



dove ϵ_{λ} è detto coefficiente di assorbimento molare, C è la concentrazione molare della soluzione e l è il cammino ottico. Il valore di ϵ_{λ} è considerato costante per una data sostanza ad una data lunghezza d'onda, benché possa subire lievi variazioni con la temperatura. Inoltre, la sua costanza è garantita solo all'interno di un dato intervallo di concentrazioni, al di sopra delle quali la linearità tra assorbanza e concentrazione può essere inficiata da fenomeni chimico-fisici (ad esempio la precipitazione della specie chimica colorata).

Deviazioni dalla legge di LBB

- ✓ Modifiche nella struttura molecolare della sostanza assorbente (complessi, polimerizzazione,..)
- ✓ Cambiamento dell'indice di rifrazione della soluzione con la concentrazione
- ✓ Modifiche della struttura della sostanza assorbente con il pH
- ✓ Assorbimento della luce da parte di altre sostanze della soluzione
- ✓ Misura a valori troppo elevati di concentrazione per quella sostanza
- ✓ Trasmissione di luce per altri meccanismi
- ✓ **Radiazioni utilizzate non monocromatiche**
- ✓ Presenza di sostanze fluorescenti in soluzione
- ✓ **Solvente con assorbimento troppo elevato**

Schema generale fotometro

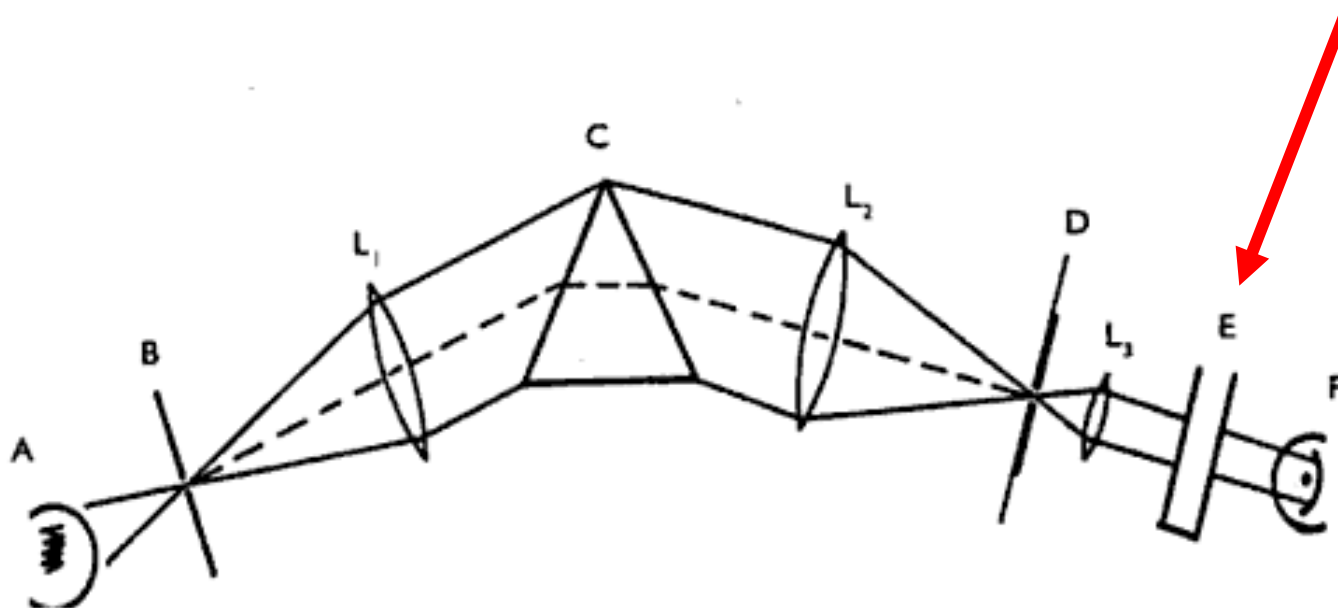
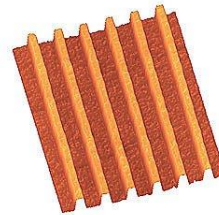


Figura 7.6. - Schema di un fotometro. A = sorgente luminosa; B = fessura di ingresso; C = monocromatore; D = fessura di uscita; E = cella di lettura; F = fotorivelatore con amplificatore; L₁, L₂ e L₃ = lenti.

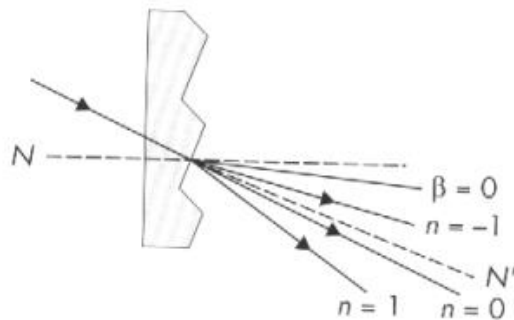
Monocromatore a Reticolo

- Serie di righe, molto numerose, parallele ed ugualmente distanziate, incise su una lastra di vetro o superficie metallica (fotolitografia, fotoriproduzione,..)

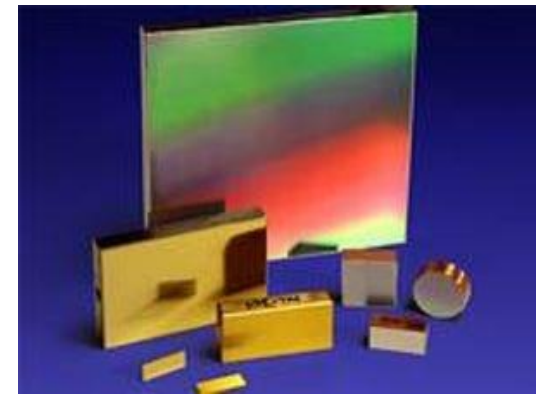
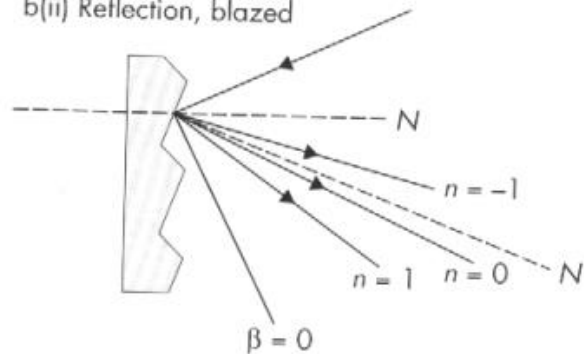


- Reticoli piani o concavi
- Reticoli in trasmissione o in riflessione (per l'ultravioletto <120 nm)

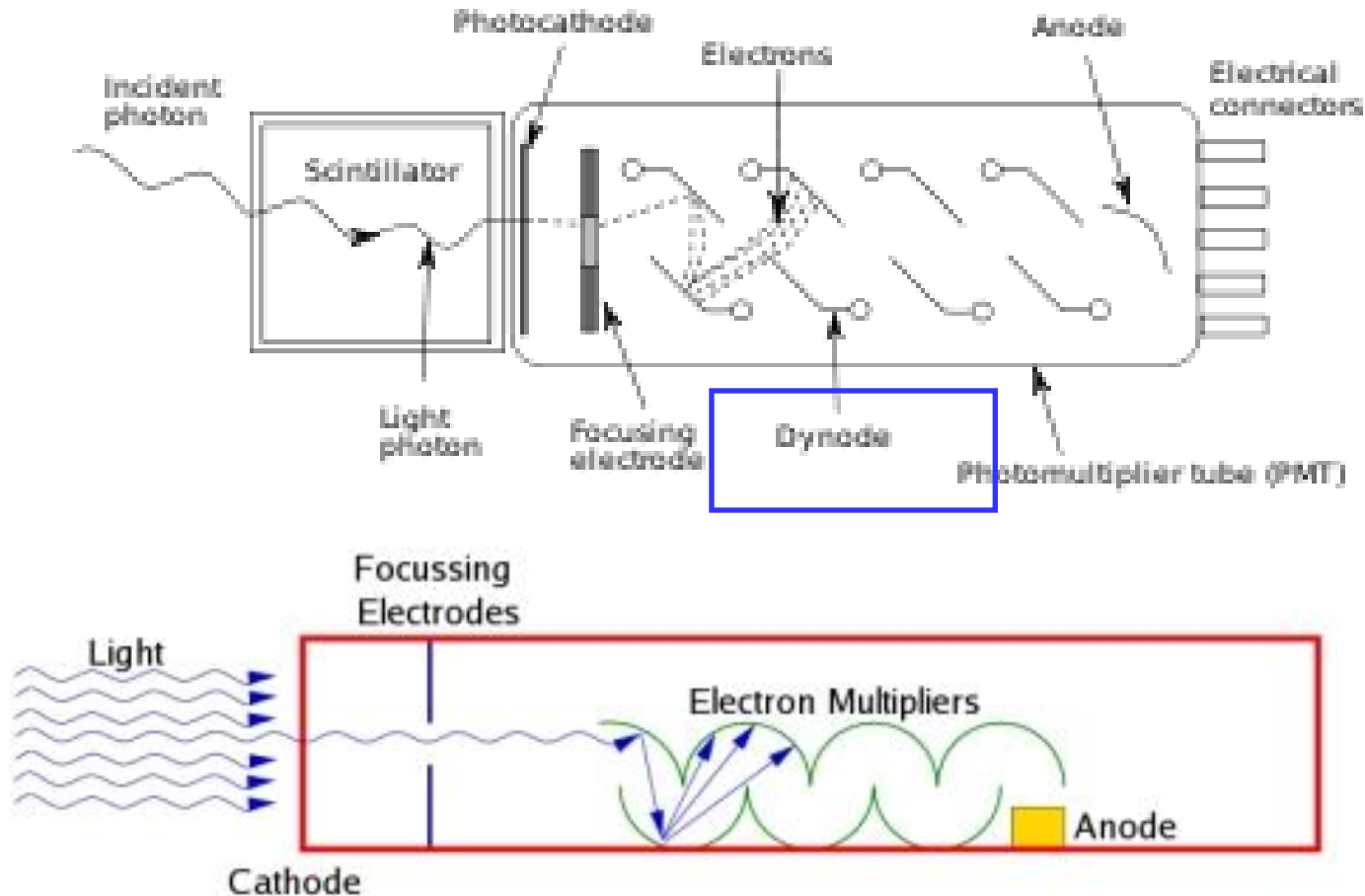
b(i) Transmission, blazed



b(ii) Reflection, blazed



Fotomoltiplicatore (effetto fotoelettrico)



CC 1500 V; risposta rapida; no fatica; Gain 10 E5-6; debole dark current

Analisi con sviluppo o scomparsa di assorbimento

Pretrattamento chimico per formare un composto con spettro di assorbimento adatto

SPECIFICITA'

- **Reazioni di condensazione** (schiff-glucosio,..)
- **Reazioni di idrolisi** (p-nitrofenolo-enzimi,..)
- **Reazioni di ossidoriduzione** (NADP-NADPH-enzimi,..)
- **Reazioni di "gruppo"** (fenilidrazoni-17 idrossicorticosteroidi,..)
- **Reazioni di copulazione** (sale di diazonio-bilirubina,..)
- **Reazioni di complessazione** (ninidrina con aminoacidi,..)
- **Reazioni con degradazione** e rimaneggiamento (reatt Lieberman-colesterolo,..) molecolare
- **Reazioni con spostamento**

Spettroscopia in chimica clinica

1. Analisi diretta (poco usata)

Emoglobina, carbossemoglobina, bromosulfonftaleina,.....

2. Analisi con sviluppo o scomparsa di assorbimento in end-point

3. Misure cinetiche

Misure cinetiche

Per abbreviare i tempi di reazione si ricorre a misure di assorbanza in corso di reazione (non all'equilibrio o END POINT)

- **Lettura singola o continua nel tempo**
- **Occorre un prodotto finale comune che assorba nell'UV (NADH-NADPH) o nel visibile**
- **Si deve utilizzare contemporaneamente uno standard**
- **Si riducono le influenze delle sostanze interferenti**
- **Utilizzate per misure enzimatiche in test ottici semplici o accoppiati (AST,ALT, CPK,..)**

Caratteristiche analitiche dei metodi fotometrici

Sensibilità :

- Variabile in funzione del coefficiente di estinzione molare dell'analita
- È strettamente in funzione dal sistema di reazione
- Si va da **10^{-4} a 10^{-8} moli/L**
- ***Linearità (Lambert-Beer) fino a 2000 OD***

Caratteristiche analitiche dei metodi fotometrici

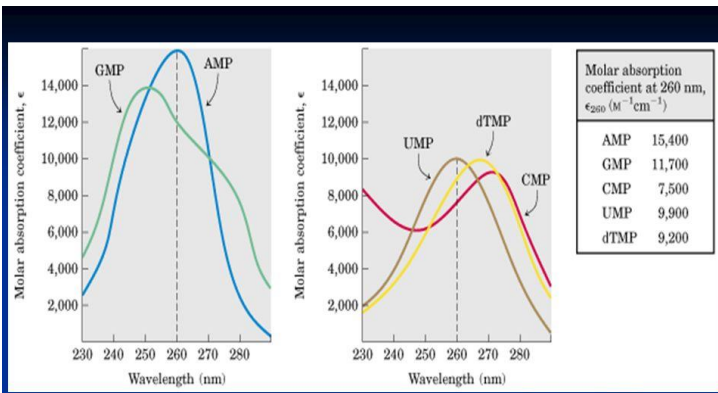
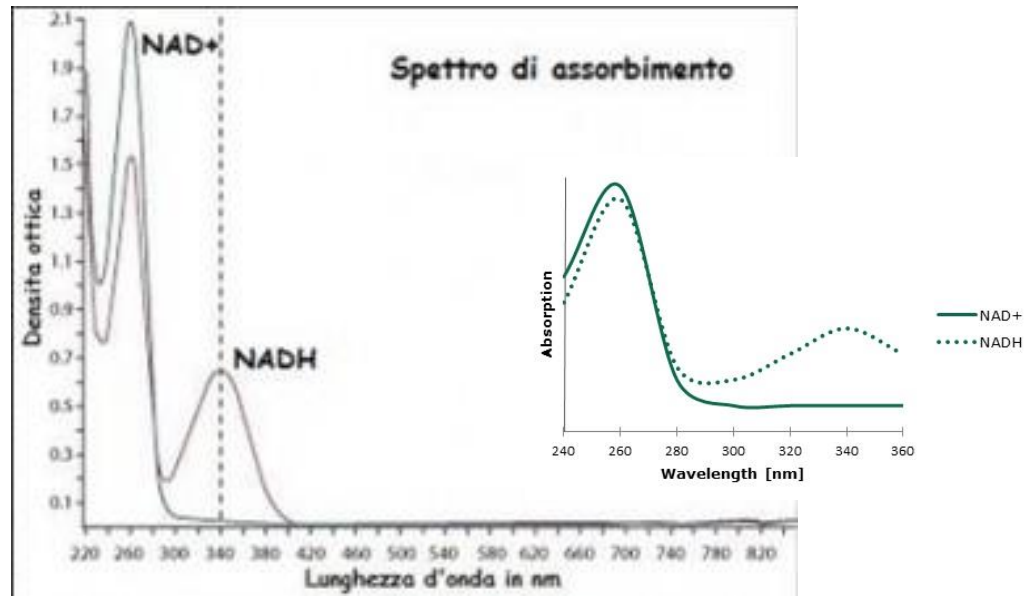
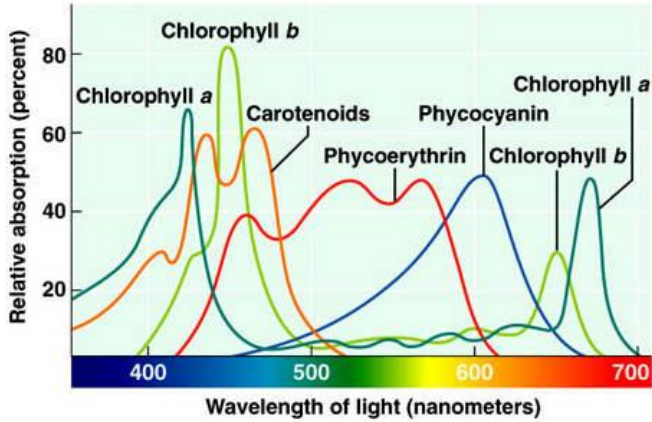
Precisione

- ✓ In genere si lavora con lunghezze d'onda che diano una trasmittanza T attorno al 30-40 % (**0.43 Assorbanza**)
- ✓ Con i moderni spettrofotometri dipende fundamentalmente da fattori metodologici (reagenti, pH, temp, contenitori, sost interferenti, stabilità del colore,..)
- ✓ **CV= 1-3%**
- ✓ Uno dei principali fattori di riduzione della precisione è **la torbidità** (particelle colloidali, micelle,..)

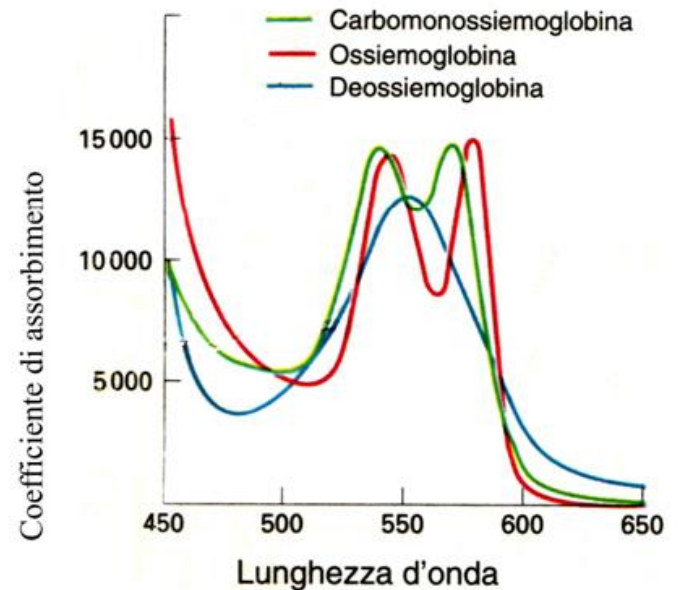
Caratteristiche analitiche dei metodi fotometrici

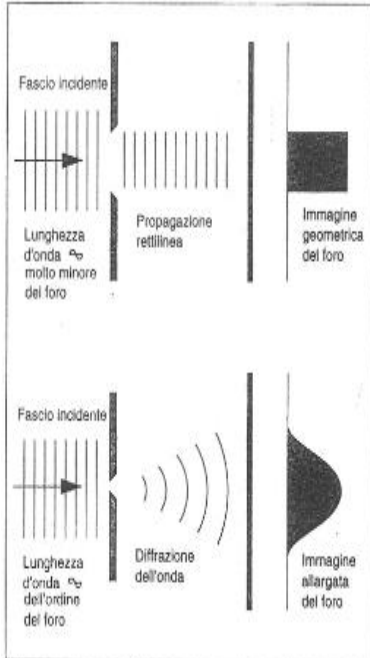
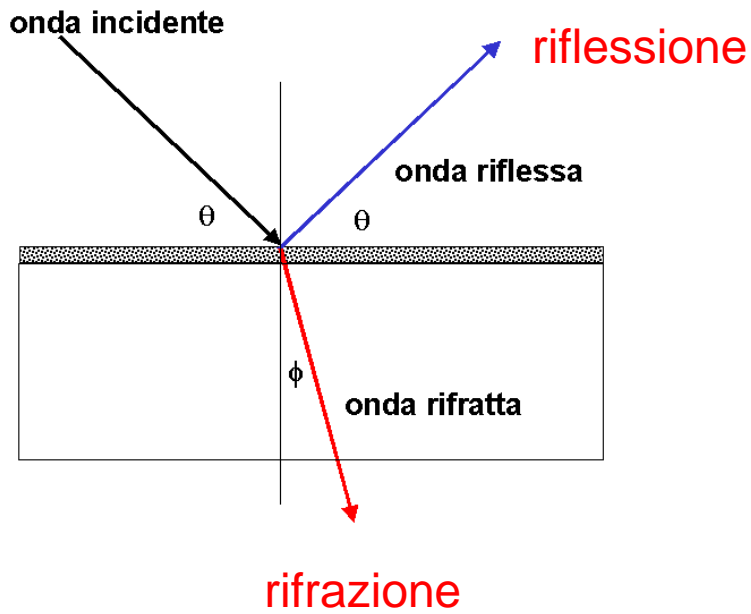
Accuratezza :

- Dipende fondamentalmente dalla specificità del metodo/della reazione
- **Viene influenzata dai sieri lipemici, itterici o emolizzati, farmaci**
- **Si utilizzano lunghezze d'onda specifiche dell'analita o suoi prodotti oppure doppie lunghezze d'onda**
- Si utilizzano standard chimici di controllo
- Va verificata rispetto ad un metodo di riferimento

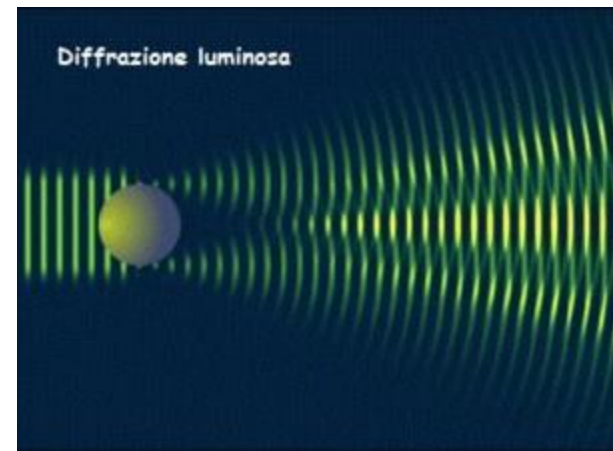
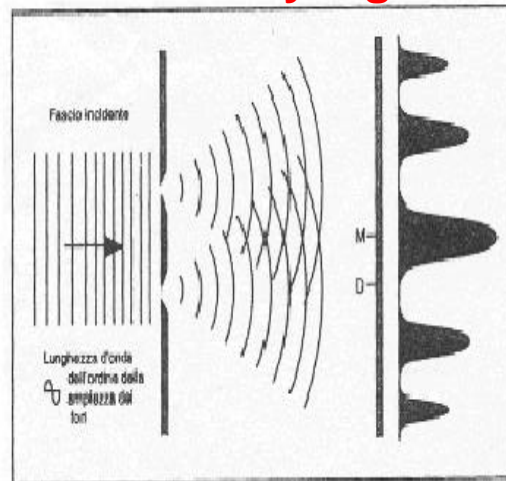


Spettri di di assorbimento della luce da parte dei comuni nucleotidi, gli spettri sono quasi identici, per effettuare misure di assorbimento viene usata la luce a 260 nm





Diffrazione di Rayleigh



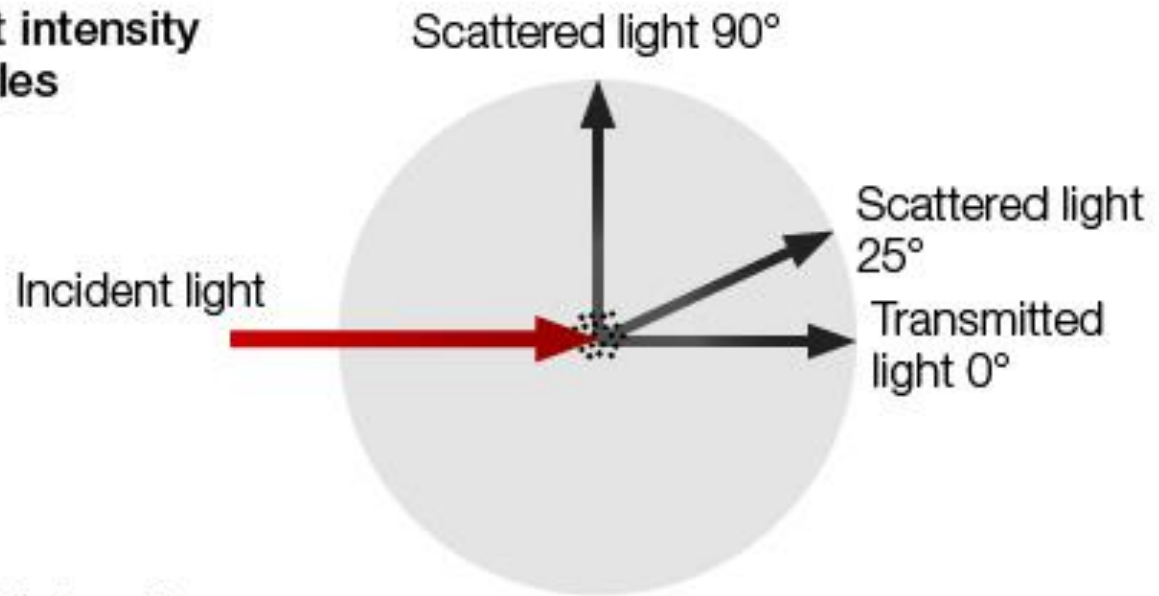
Turbidimetria e nefelometria

- Si basano sulla misura della luce assorbita o diffusa da un sistema eterogeneo quale: una soluzione colloidale, precipitato finemente disperso, complesso antigene-anticorpo,..)
- Il fenomeno dell'assorbimento è sempre accompagnato da quello di diffusione (riflessione, rifrazione, diffrazione)
- La importanza relativa di questi fenomeni dipende dalle dimensioni delle particelle e in particolare dal rapporto dimensione particella/lunghezza d'onda della luce incidente
- Con particelle grandi prevale l'assorbimento e quindi ci si deve orientare verso la turbidimetria
- Con particelle piccole prevalgono i fenomeni di diffusione (effetto Tyndall) e ci si deve orientare verso letture nefelometriche

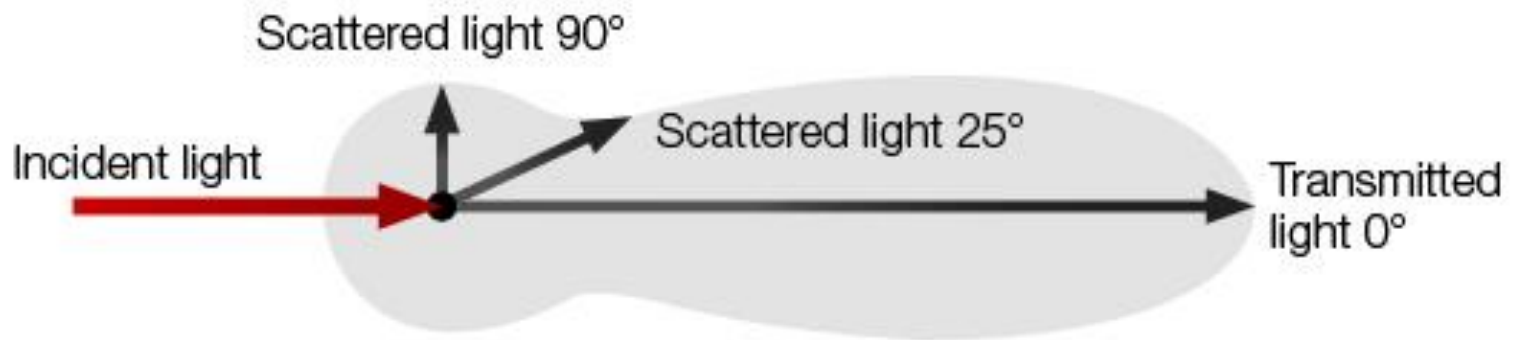
Turbidimetria

- Non è una metodica fotometrica in senso stretto
- Spettro di assorbimento aspecifico
- La relazione tra luce assorbita e concentrazione dell'analita segue la legge di Lambert Beer per soluzioni diluite
- La misura può essere effettuata con qualsiasi fotometro
- Massima sensibilità a lunghezza d'onda corta (blu) in quanto è massima la rifrazione (sul siero si lavora attorno ai 500 nm per evitare bilirubina ed emoglobina)
- Tecnica molto rapida e relativamente poco costosa

**Scattered light intensity
of small particles**



**Scattered light intensity
of large particles**



Turbidimetria

Caratteristiche/Applicazioni

- Criticità sulla stabilità delle sospensioni (uso di colloidali protettori)
- **Riproducibilità non sempre ottimale (modalità/tempi di aggiunta reattivi, mescolamento, lettura,..)**
- Accuratezza non sempre ottimale
- Precisione non sempre ottimale
- **Vasta applicazione in ematologia-coagulazione per la misura del fibrinogeno, PT/APTT (sempre meno per la misura di proteine sieriche ed urinarie, amilasi, lipasi, lisozima),..**

Nefelometria

- Se la sostanza disperdente è molto “fine” (dimensione dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d’onda incidente) e a concentrazione $< 10^{-4}$ mol/L, la relazione tra luce diffusa e concentrazione dell’analita segue la **legge di Rayleigh** (in condizioni controllate di lunghezza d’onda, intensità luce incidente, dimensione particelle,...)

$$I=KN$$

- La misura necessita di apparecchi dedicati (nefelometri o fluorimetri)

Legge di Ryleigh

$$I = K \frac{NV^2}{r^2 \lambda^4} I_0$$

dove:

I = intensità della luce diffusa;

I_0 = intensità della luce incidente;

λ = lunghezza d'onda della luce;

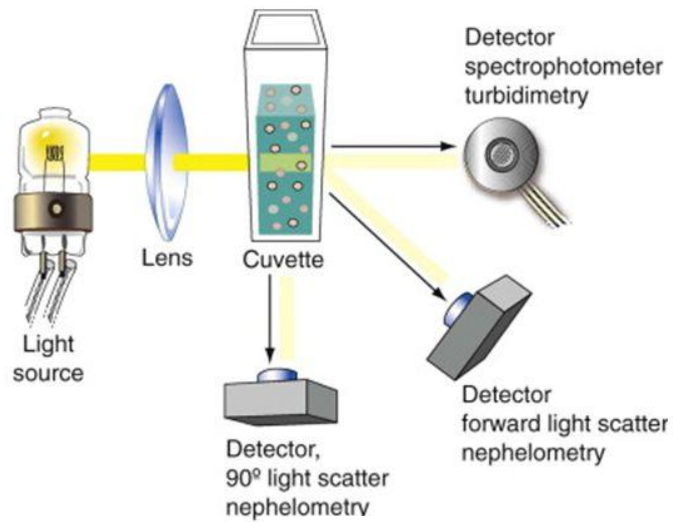
N = numero di particelle disperdenti per unità di volume;

V = volume delle particelle;

r = distanza del fotomoltiplicatore dalla cuvetta;

K = costante.

Nefelometría



Nefelometria

Caratteristiche-Applicazioni

- Criticità sulla stabilità delle sospensioni (uso di colloidio protettori)
- Estremamente sensibile
- Precisione buona (CV 2-3%) se si controllano bene le condizioni della misura (dimensione delle particelle, pH e forza ionica delle componenti saline, polimeri, sostanze interferenti,...)
- Veloce, automatizzabile con scarsi fenomeni di trascinamento
- **Misura delle proteine urinarie e plasmaproteine (tecnologia dei latici con Ab specifici adsorbiti; immunonefelometria)**

Spettrometria a Fluorescenza

Principio

- Nella regione visibile e UV le radiazioni elettromagnetiche possiedono una quantità di **energia sufficiente** a produrre transizioni elettroniche negli elettroni di valenza (10-100 Kcal per mole)
- Nella regione del visibile e dell'UV gli **spettri sono allargati e quantificabili** (salto elettronico da diversi livelli rotazionali e vibrazionali indotto da diverse frequenze)
- Dopo aver assorbito degli specifici quanti di energia e aver dissipato parte dell'energia in calore ed urti, gli **elettroni eccitati ritornano nello stato fondamentale** emettendo radiante con una lunghezza d'onda superiore a quella incidente

Spettrometria a Fluorescenza

Principio

- Contrariamente alla spettrometria in assorbanza la fluorescenza è un metodo che **misura direttamente la luce emessa** (assorbita)
- Per soluzioni molto diluite vale la legge di LBB (intensità della fluorescenza proporzionale alla conc della sostanza)
 - **$F = I_0 a c d \phi$ (RFU)**
- **Vale la legge di LBeer per soluzioni** con assorbanza inferiore a 0.02 e trasmissione >95% (basso effetto di filtro interno)

Fluorescenza

Fasi del fenomeno

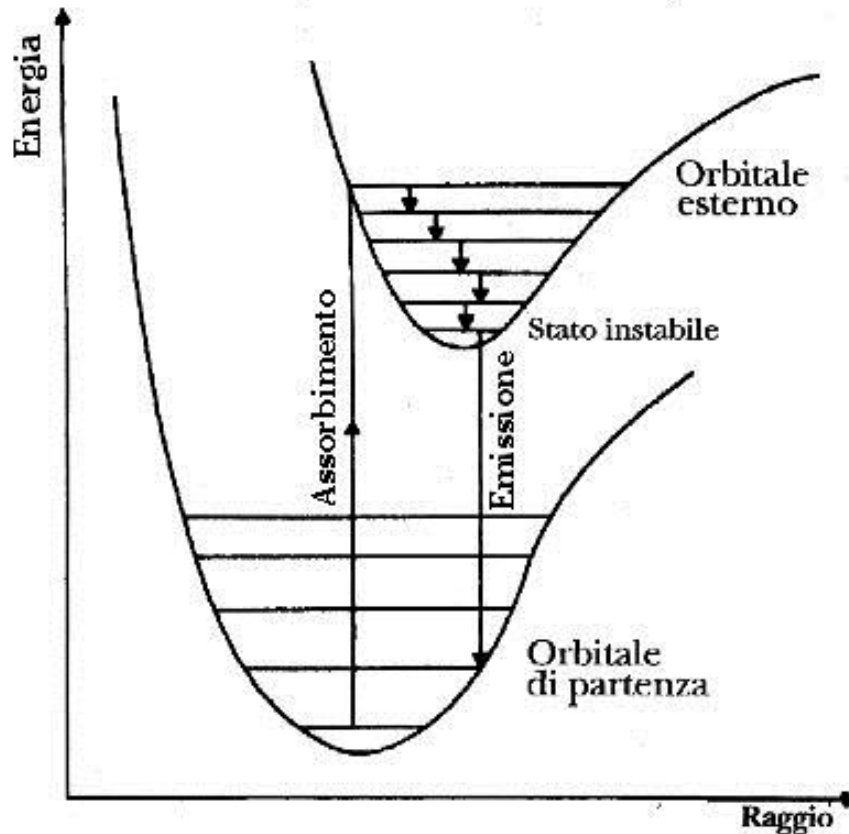
Semiperiodo 10^{-9} 10^{-7} s (fosforescenza 10^{-3} s; minuti)

1. Assorbimento fotone (elettrone singoletto salta allo stato eccitato; 10^{-15} s)
2. Rilassamento vibrazionale (elettrone collide e riduce il livello di eccitazione; 10^{-13} , 10^{-11})
3. Emissione fotone di energia inferiore e lunghezza d'onda maggiore (Stokes shift dovuto alla perdita in energia vibrazionale e quindi collisioni) con ritorno dell'elettrone allo stato fondamentale (10^{-9} , 10^{-7})
4. Rilassamento vibrazionale (elettrone disattivato al più basso livello energetico fondamentale)

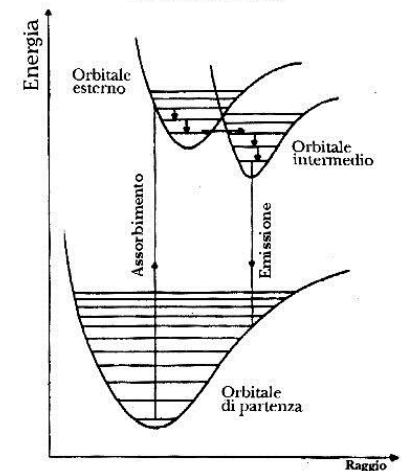
Fluorescenza

Diverse energie;diversi orbitali;diversi salti,diversi spettri;...

Fluorescenza



Fosforescenza



Spettri di eccitazione e di emissione

Una sostanza fluorescente è caratterizzata da 2 spettri

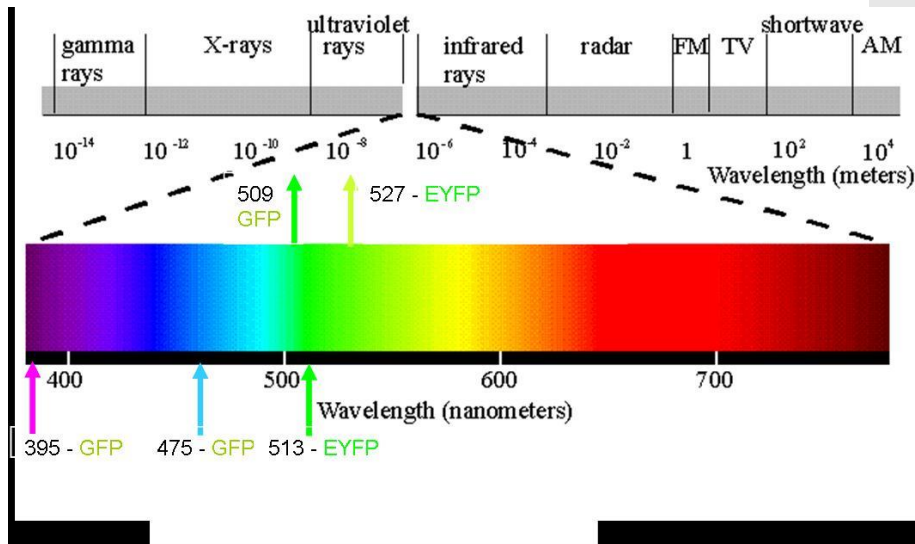
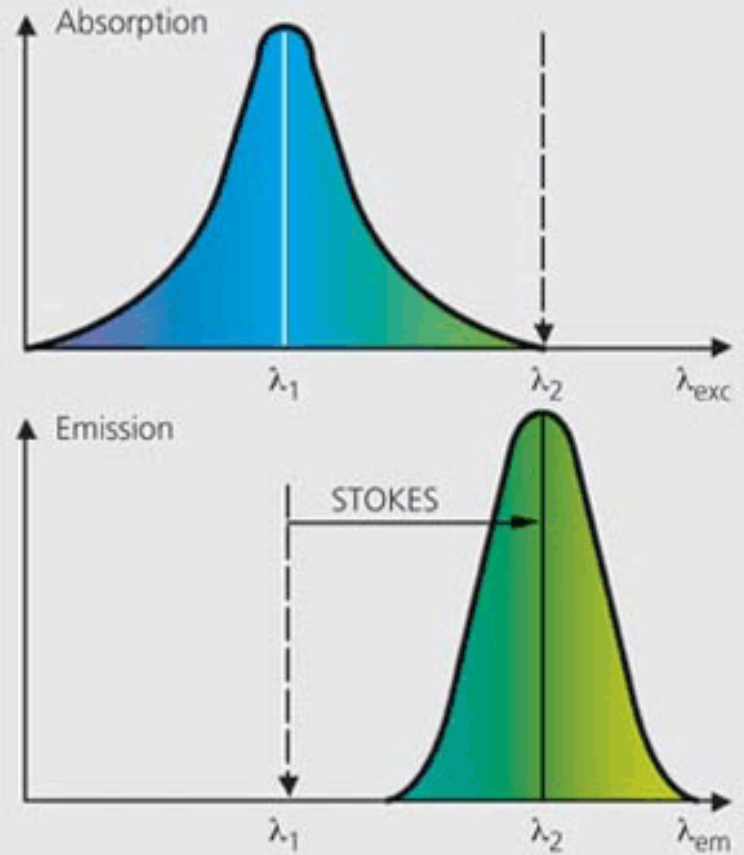
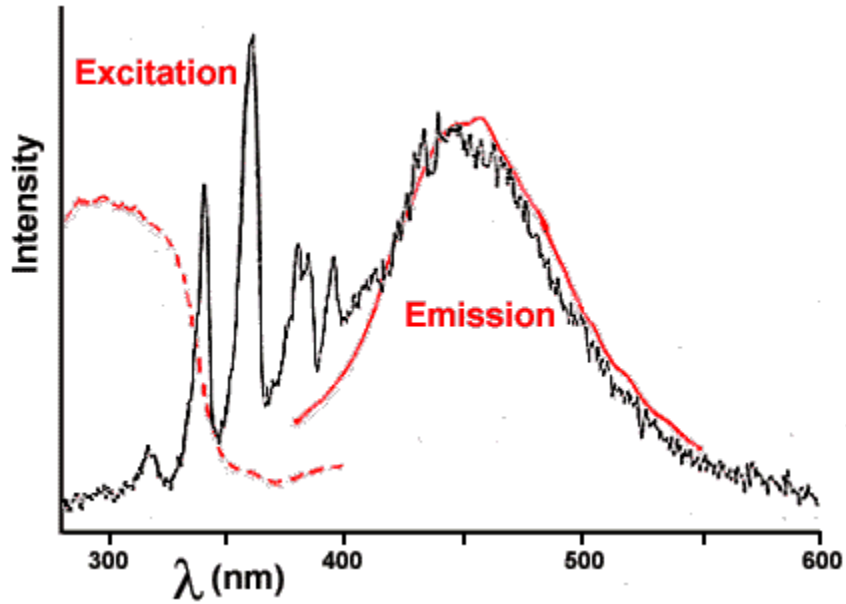
1. **Spettro di eccitazione** teoricamente sovrapponibile a quello di assorbanza
2. **Spettro di emissione**: evidenzia le diverse λ di fluorescenza con λ di eccitazione costante

Altresì:

Lo spettro di emissione non dipende dalla lunghezza d'onda incidente che influenzerà unicamente la intensità di fluorescenza

Per una λ fissa di emissione al variare della lunghezza d'onda di eccitazione varia solo la intensità della prima

Effetto Stokes



Fluorimetro

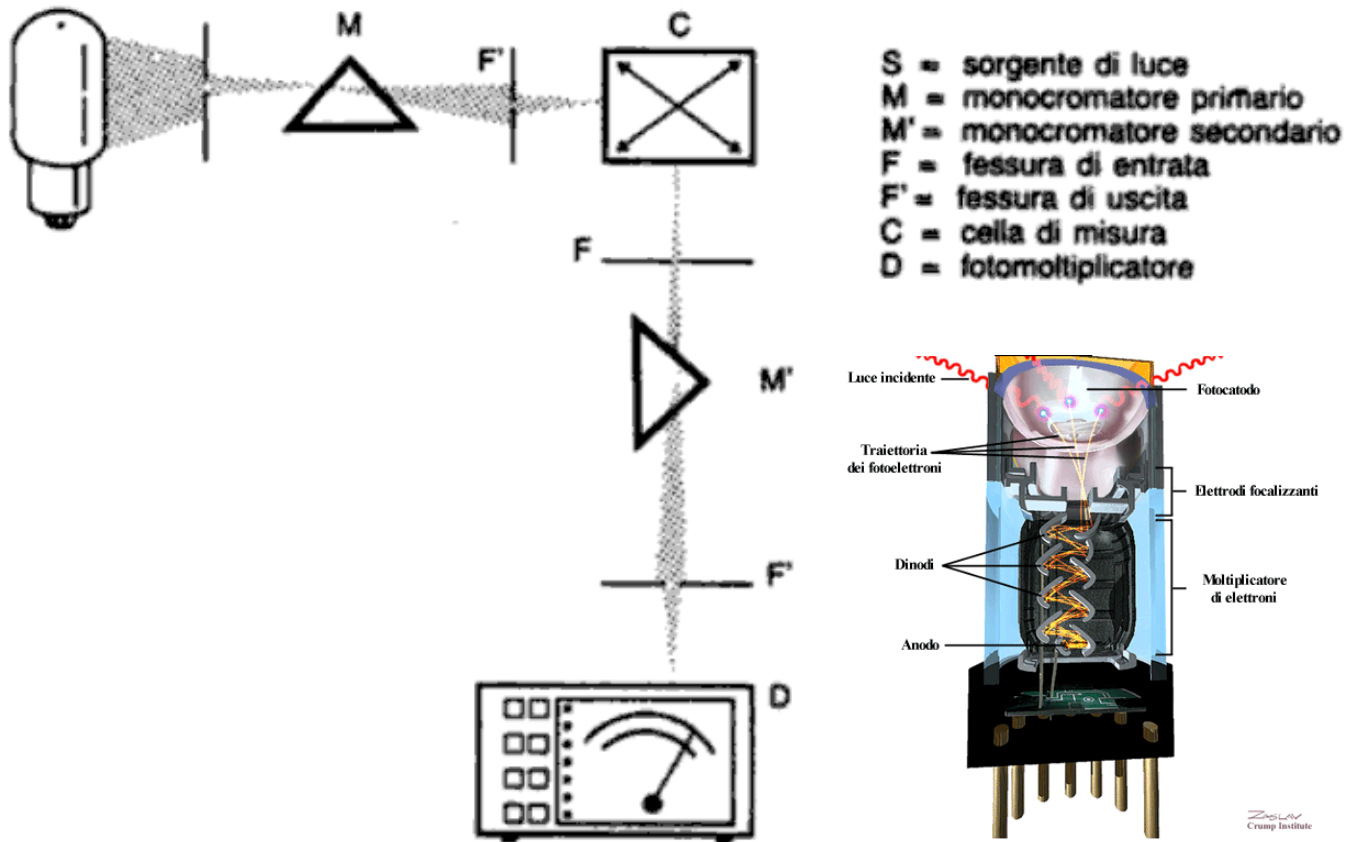


Figura I 4.4. - Rappresentazione schematica di uno spettrofluorimetro.

Fluorescenza

Caratteristiche analitiche

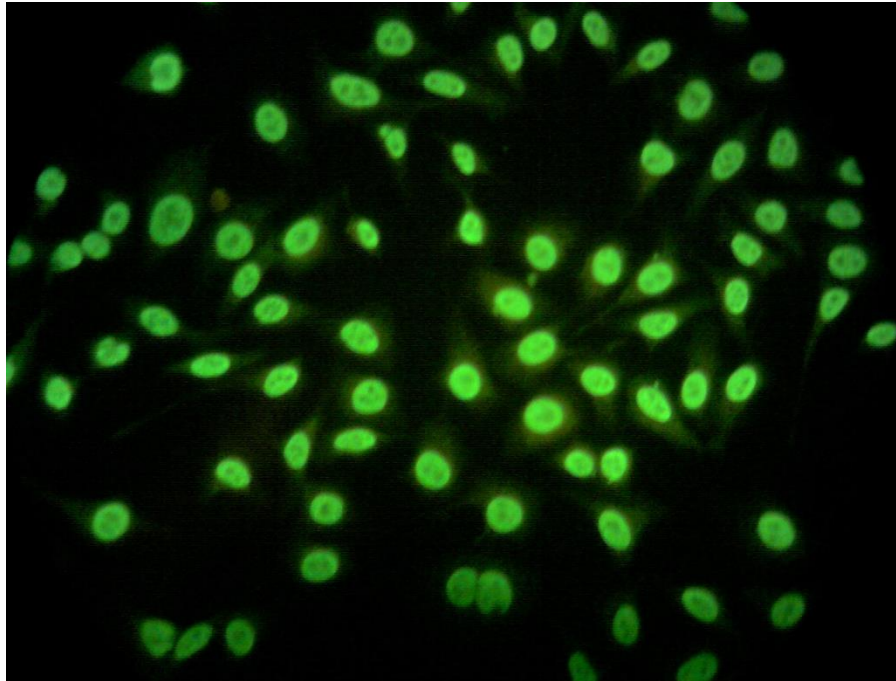
- **Sensibilità** : essendo una misura diretta.. 1000-10.000 volte più sensibili della spettrometria in assorbanza,fondamentale per soluzioni diluite ,fondamentale per valori di assorbanza<0.02 OD
- **Specificità** : molto elevata anche in relazione alla possibilità di variare le 2 lunghezze d'onda (incidente e di emissione)
- **Accuratezza** : molto elevata, verificata con standard chimici e specifica per quel particolare sistema ottico/strumento
- **Linearità** : valida per ordini di 10^3 (campioni diluiti)

Procedimento analitico

- **Fluorescenza diretta** (fluorescenza naturale/intrinseca; porfirine, barbiturici, chinidina,..)
- **Fluorescenza indiretta (IFI)** (fluorescenza indotta con specifici reagenti o gruppi funzionali; Ab-fluorescinati,...; cortisolo, catecolammine, calcio..)
- **Fluorescenza di inibizione** (l'analita riduce la fluorescenza del fluoroforo)

Esempio IFI

Anticorpi antinucleo su cellule Hep-2



Luminescenza-caratteristiche

(Bioluminescenza-Chemiluminescenza)

- Il segnale luminoso presenta una **cinetica variabile in funzione di parametri operativi** quali: natura del sistema, concentrazione dei reagenti, pH della soluzione, temperatura, ..
- Il processo di emissione è **indipendente dal tipo di energia radiante** e quindi non sono necessari dei monocromatori
- Il segnale in uscita spesso va amplificato
- **Fattore critico è la temperatura** (soprattutto per le reazioni enzimatiche)

Luminescenza

esigenze fondamentali

- Opportuna energia di eccitazione
- Idonea sostanza luminescente (efficienza quantica)
- Sufficiente produzione di luce
- Sistema di registrazione/integrazione sincronizzato alla emissione

Luminescenza cinetica del segnale

- **L. tipo “glow”**

1. Cellulare (luminolo in fagociti stimolati)



2. Potenziata (enhanced) del luminolo (HRP+Enha+Lum)

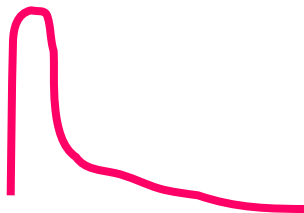
3. Bioluminescenza (luciferina+luciferasi di lucciola)



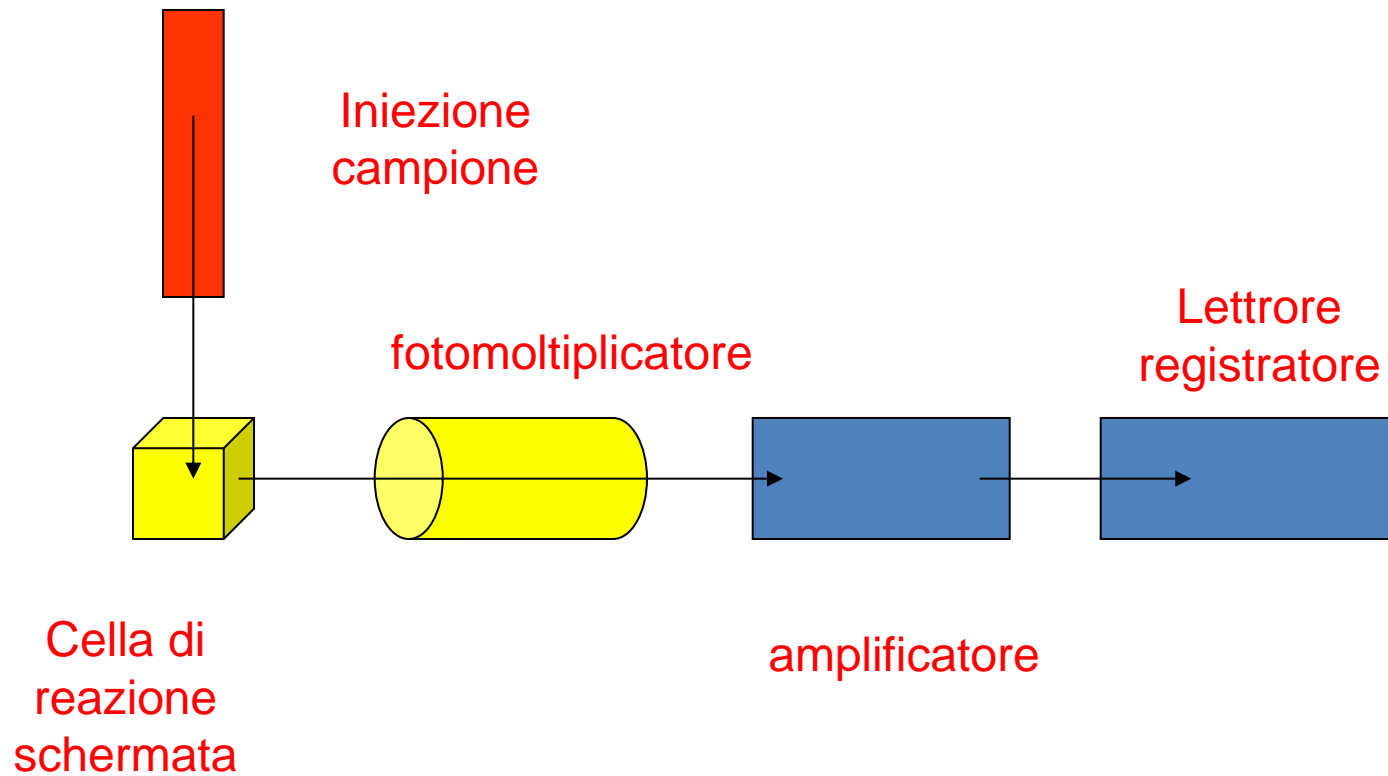
4. 1,2 diossietani (ALP+AMPPD)

- **L. tipo “flash”**

Esteri di acridinio



Luminometro componenti principali



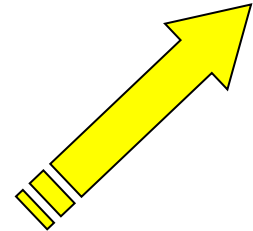
Chemiluminescenza

Composto CL ridotto + H_2O_2

catalizzatori



Composto CL ossidato + **fotone**



- Qualunque sostanza che possa venir coinvolta in reazioni enzimatiche che producono **perossido di idrogeno** può venir misurata con reazioni di chemiluminescenza (enzimi, acido urico,...)

CL= Luminolo, lucigenina

- L'ampio intervallo di misura e la notevole sensibilità del metodo (**$10 E^{-9}$ moli/L per H_2O_2**) la rendono una metodica estremamente efficace e versatile in chimica clinica .

BIOLUMINESCENZA

La bioluminescenza è un fenomeno molto diffuso nel mondo animale e vegetale. L'emissione di luce avviene nella maggior parte dei casi per intervento di un enzima, luciferasi, che catalizza l'ossidazione di un substrato da parte dell' O_2 o dell' H_2O_2 . Il più noto organismo bioluminescente è la lucciola (*Photinus Pyralis*) benchè la maggior parte degli esempi di tale fenomeno si trovi in forme di vita marine quali batteri, plankton e varie specie di pesci.

Sensibilità 10 E-14 moli/campione

Linearità 10 E+3

Bioluminescenza

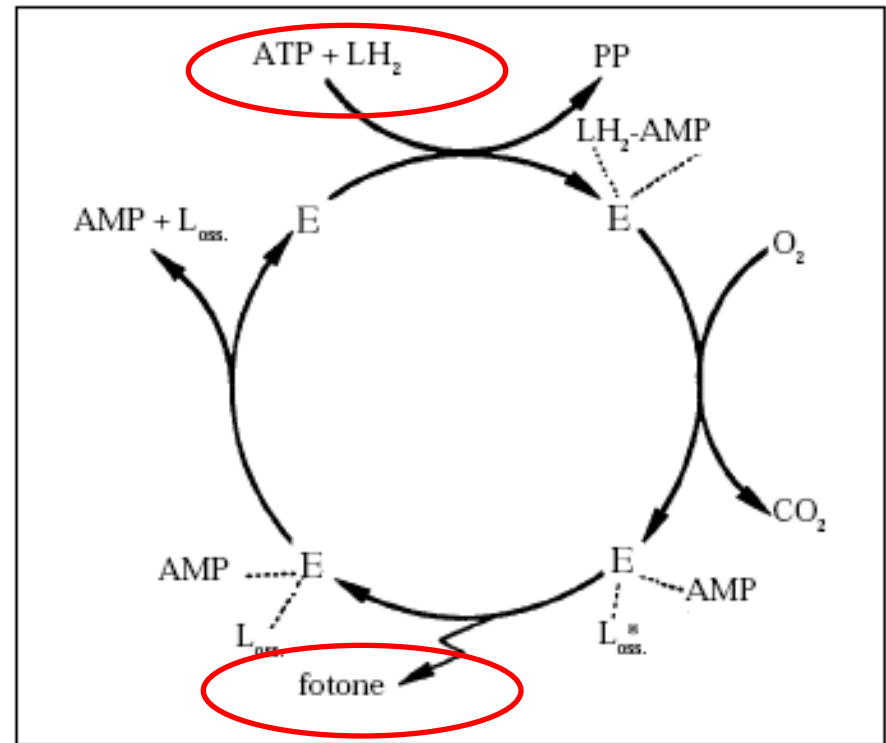
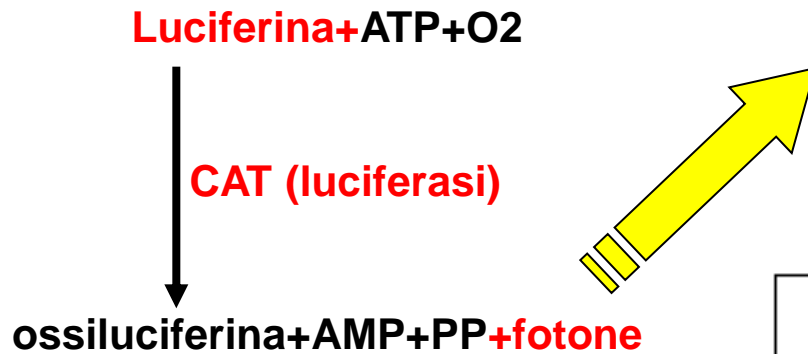
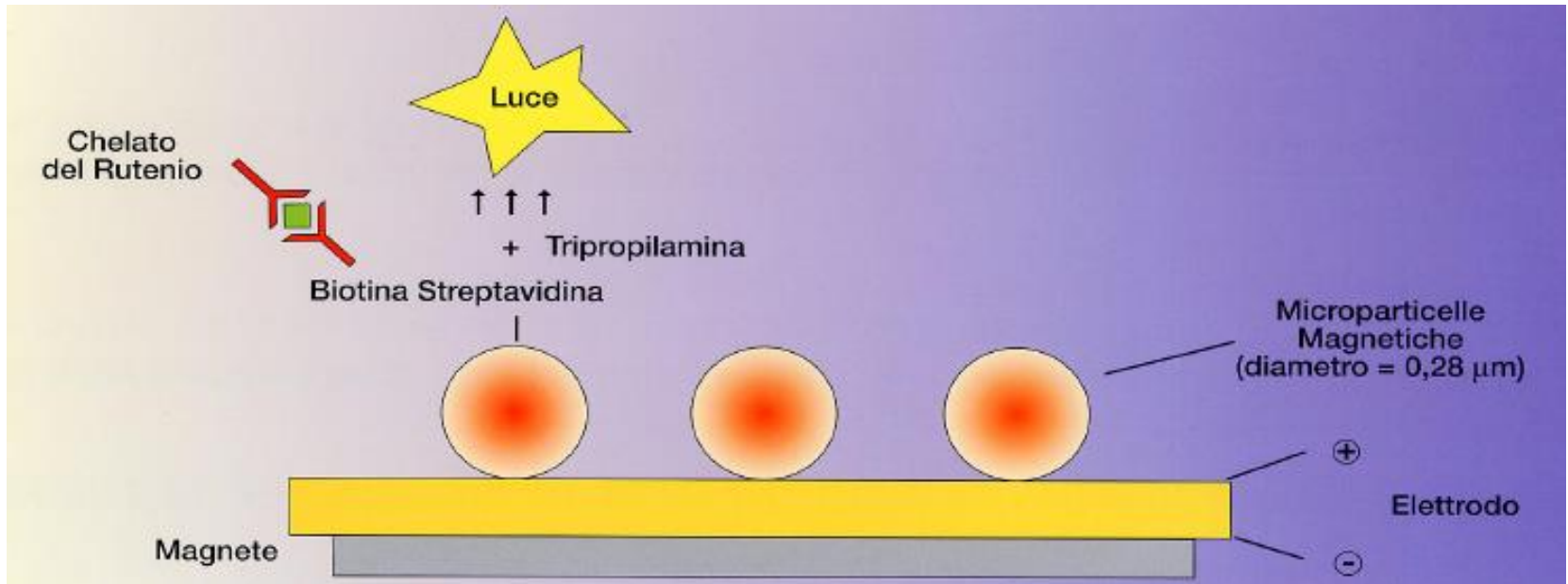


Figura 22. Schema della reazione bioluminescente catalizzata dalla luciferasi della lucciola. E: luciferasi; L_{oss}^{*}: ossiluciferina; LH₂: luciferasi ridotta; PP: pirofosfato.

ECL elettrochemiluminescenza

- Chemiluniscenza **in soluzione**, risultante da reazioni di **trasferimento di elettroni ad alta energia** da una molecola ad un'altra. Il verificarsi di tale fenomeno nel corso **dell'annichilazione radicalica** o all'interno di complessi a trasferimento di carica (eccimeri-molecole uguali, eccipletti-molecole chimicamente diverse) costituisce il meccanismo attraverso cui si genera uno stato elettronico eccitato o si ha trasferimento energetico **da un atomo o da una molecola ad un altro (TMPD tetrametilfenilendiammina, rubrene, acridinio, rutenio..)**
- **Gli ioni radicali sono generati in sequenza ad un elettrodo oppure simultaneamente a due elettrodi separati**

ECL Principio



Applicazioni Cliniche Chemiluminescenza (ECLIA)

MISURE IMMUNOMETRICHE:

- mar
- Ag/Ab \
- Ag/Ab HIV
- Ag/Ab Toxo, Rosolia, CMV
-

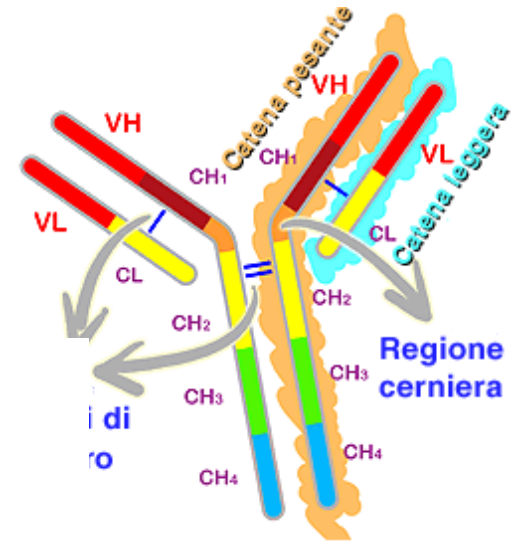
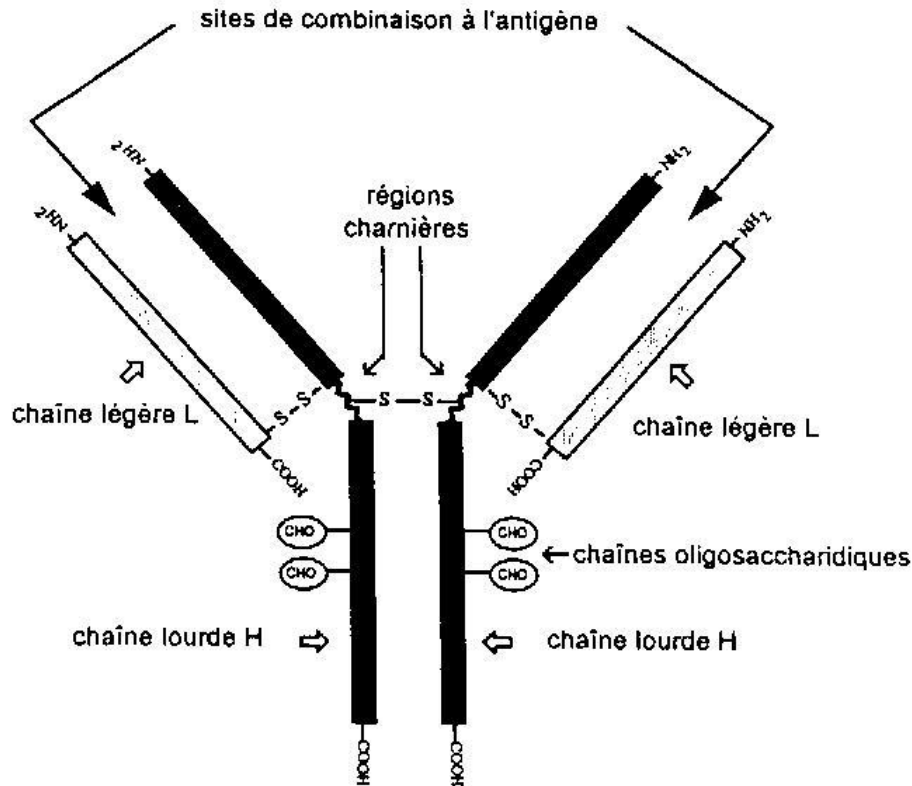
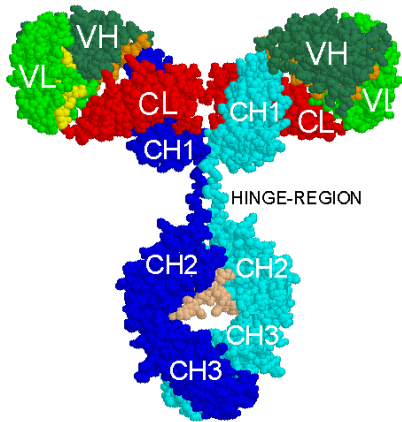


ECL

vantaggi

- Sensibilità elevata (10 E-12 moli/L)
- Marcatori stabili e versatili (segnale stabile)
- Strumentazione semplice
- Range dinamico elevato
- Tempi di incubazione brevi

Immunoglobuline



Frammento Fab

Frammento Fc

Le immunoglobuline umane sono suddivise in 5 classi principali elencate in ordine decrescente di concentrazione sierica: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Le catene leggere (κ e λ) sono comuni alle cinque classi di immunoglobuline, che invece differiscono per le catene pesanti: γ per le IgG, α per le IgA, μ per le IgM, δ per le IgD e ϵ per le IgE.

IgG, sono la classe di anticorpi maggiormente presenti nel siero rappresentando circa il 75% delle immunoglobuline circolanti. Sono monomeri e hanno un peso molecolare di 150.000. Attraversano la barriera placentare. Si possono distinguere 4 sottoclassi IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Le sottoclassi 1 e 3 stimolano la reazione del complemento..

IgA, costituiscono circa il 20 % delle immunoglobuline circolanti e sono presenti nelle secrezioni esterne, quali saliva, colostro, lacrime, muco delle vie respiratorie e del tubo digerente. Nel siero sono monomeri mentre nelle secrezioni sono dimeri e polimeri.

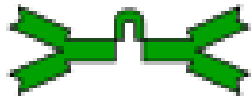
IgM, costituiscono circa il 5-10% delle Ig totali. Sono dei pentameri. È la classe di anticorpi che per prima viene sintetizzata al primo contatto con un nuovo antigene, costituiscono cioè la risposta immunitaria primaria. Stimolano la reazione del complemento e non passano la barriera placentare.

IgD, rappresentano lo 0,2% delle immunoglobuline circolanti. Sono presenti sulla membrana cellulare dei linfociti B, dove, legato l'antigene per cui sono specifiche, inducono l'attivazione della cellula.

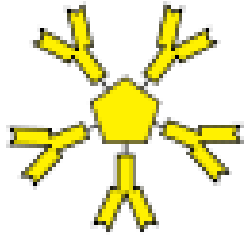
IgE, sono presenti nel siero in concentrazione bassissima, sono monomeri. Sono responsabili della risposta a parassiti. Il frammento Fc delle IgE si lega ai recettori di membrana dei mastociti e dei granulociti basofili.



Monómero
IgD, IgE, IgG



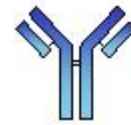
Dímero
IgA



Pentámero
IgM

https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.001

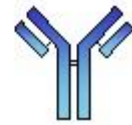
IgG



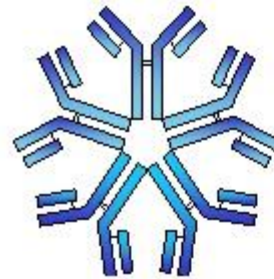
IgE



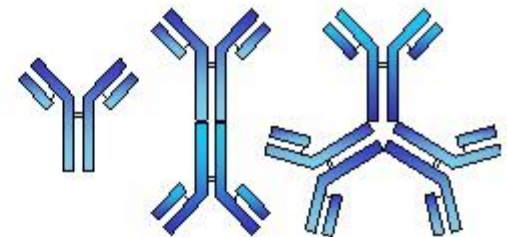
IgD

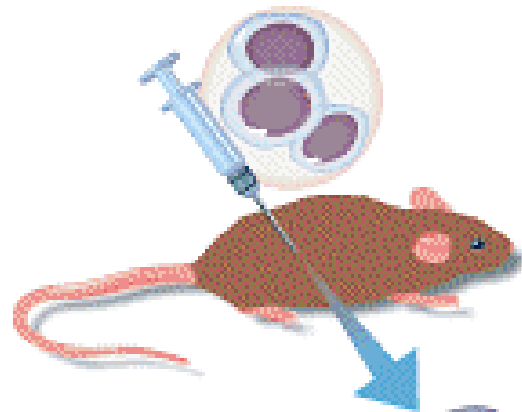


IgM



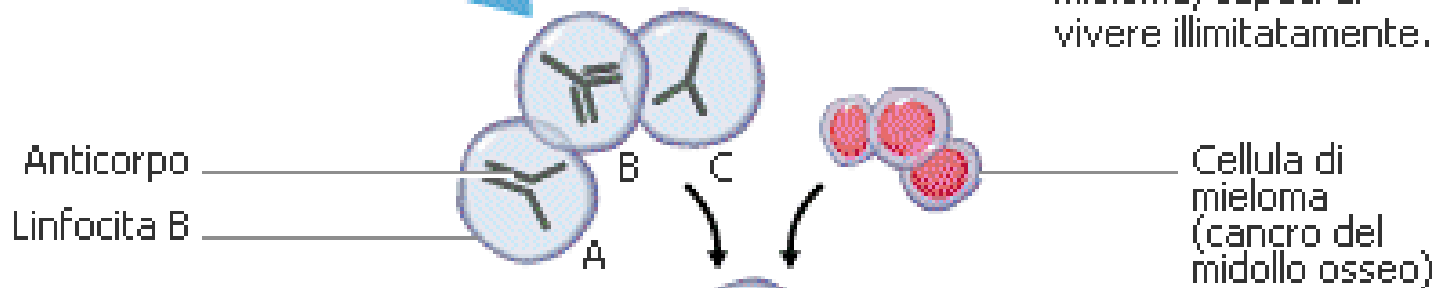
IgA





1. Cellule tumorali vengono inoculate in un topo da laboratorio; ciò ha l'effetto di stimolare la sintesi di linfociti B, che producono vari tipi di anticorpi antitumorali.

2. Vengono impiegate cellule cancerose di mieloma, capaci di vivere illimitatamente.



4. La cellula ibrida capace di produrre l'anticorpo desiderato viene isolata e clonata. In tal modo è possibile ottenere quantità illimitate dell'anticorpo.

3. I linfociti B vengono fusi con le cellule tumorali. Ne derivano cellule ibride capaci di riprodursi continuamente, che secernono l'anticorpo richiesto.

**TRANSFETTATE
CON GENI IG**

IMMUNOCHEMICA

IMMUNOLOGIA-DEFINIZIONI

- **Antigene (Ag):** sostanza (proteine,..) che in adatte condizioni è in grado di indurre, in un animale responsivo, la formazione di uno o più anticorpi e reagire specificatamente con esso.
- **Determinante antigenico:** parte dell'antigene che ne determina la specificità (pochi AA)

Immunogenicità (not self; PM > 10.000, complessità, dose, via di somministrazione, frequenza, adiuvanti,..)

Reazione specifica con anticorpo (determinanti antigenici/epitopi spesso multipli per uno stesso antigene)

- **Aptene (Apt):** sostanza non immunogenica, che è in grado di reagire con un anticorpo specifico

Immunogenicità indotta: legame covalente di radicali o gruppi chimici noti (benzenarsonato, dinitrobenzene, 2,4 dinitrofenile,..) a molecole non spiccatamente immunogeniche (apteni) come i carboidrati, piccoli peptidi, purine, steroidi, farmaci,...

Reazione antigene anticorpo

caratteristiche generali

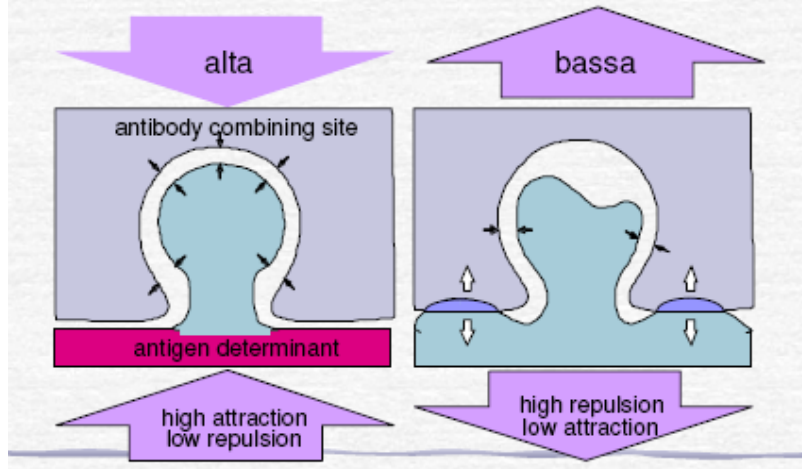
(costante di associazione/dissociazione)

- **Evidenza macroscopica:** precipitazione (cross linked mass), flocculazione, deviazione o consumo del complemento,..
- **Velocità di reazione:** determinata dalla collisione delle componenti; estremamente veloce
- **Temperatura pH e forza ionica:** optimum con forza ionica non eccessiva e pH neutro; in alcuni casi l'aumento di temp riduce la costante di associazione in altre rimane inalterata
- **Specificità ed affinità (avidità):** quanto maggiore risulta la differenza di affinità tra 2 antigeni simili e tanto maggiore è la specificità dell'anticorpo (costante di associazione/dissociazione)
- **Forze di legame:** deboli quali le Forze di Coulomb, forze di Van der Waals, ponti a idrogeno (reazione reversibile)

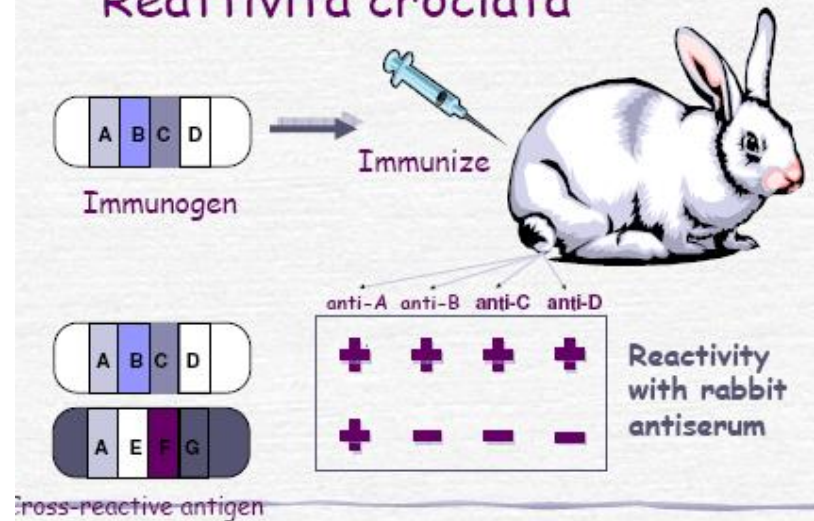
Reazione antigene-anticorpo caratteristiche del legame

- Forza del legame, legami non covalenti, deboli
 - Affinità
 - Avidità
- Reattività crociata

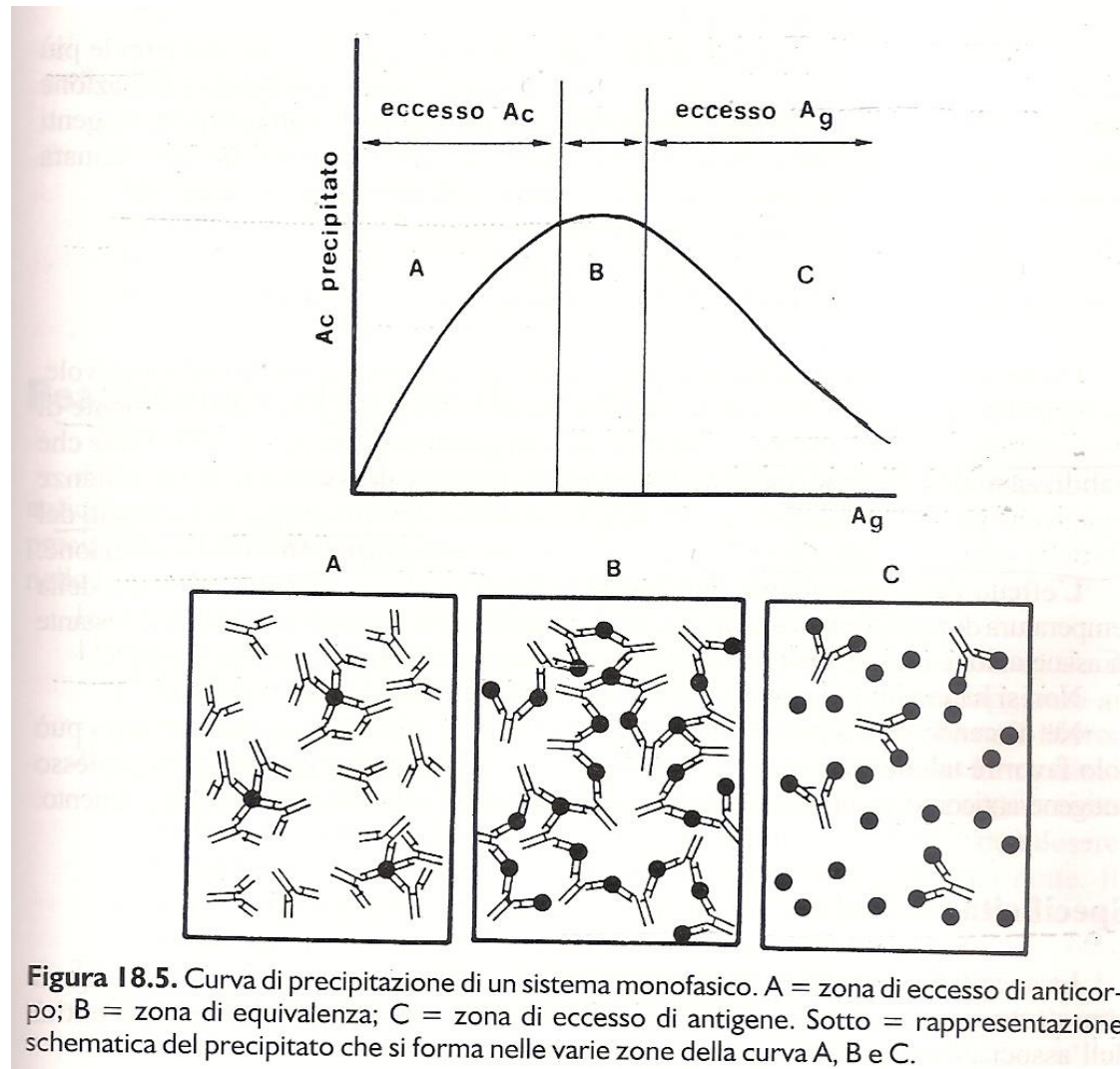
Affinità dell'anticorpo



Reattività crociata



Reazione di precipitazione Ag-Ab



RIA (Radio Immuno Assay)

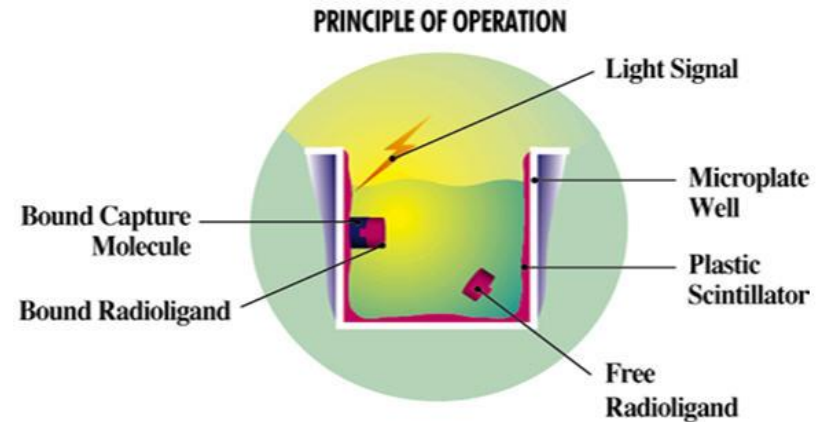
- **Vantaggi:**

- Mi può evidenziare qualsiasi composto immuno{ radiomarcabile
- Elevata sensibilità (pg/ml)
- Elevata specificità
- Elevata precisione
- Automatizzabile

- **Svantaggi :**

- Costo elevato di apparecchiature e reagenti
- Decadimento precoce degli antisieri
- Durata indagine lunga e complessa
- Rischio radiologico (I125,I 131)

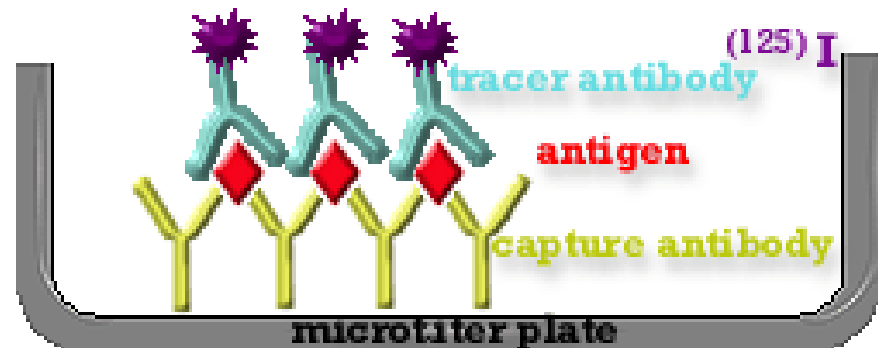
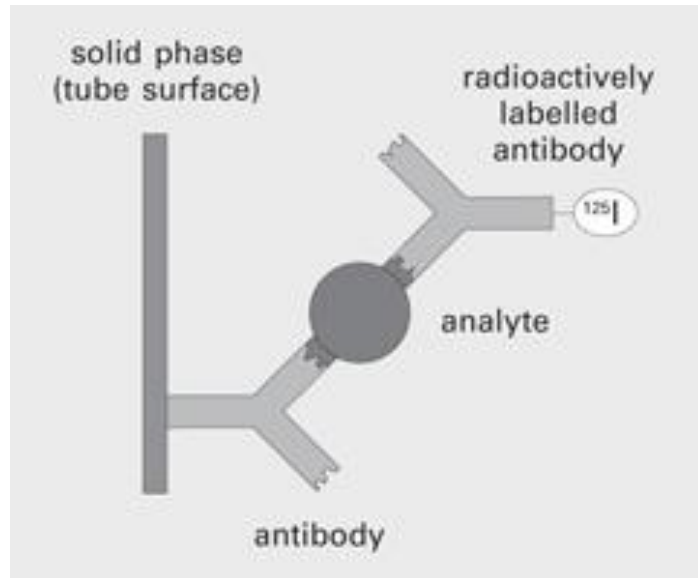
EVOLUZIONE FlashPlate® Technology



Applicazioni

Ormoni (gastrina, , testosterone free, ADH, GH,IGF1,..)

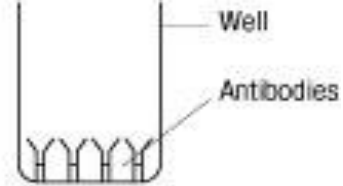
IRMA (ImmunoRadioMetricAssay)



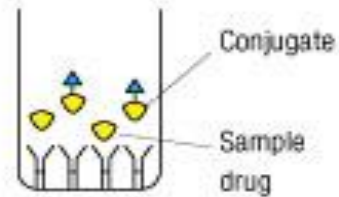
Più sensibile del RIA!!!!
(pg/ml)

ELISA competitivo

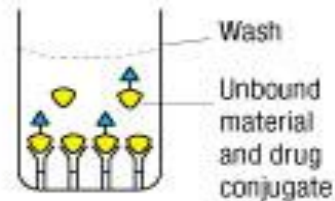
Plates are precoated with the antibody. The plate is ready for use. DO NOT WASH.



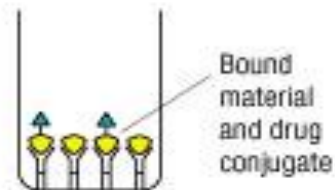
A sample or control is added to each well. Next the drug-enzyme conjugate is added and the mixture is incubated at room temperature.



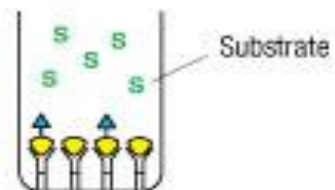
Wash the plate to remove all unbound materials.



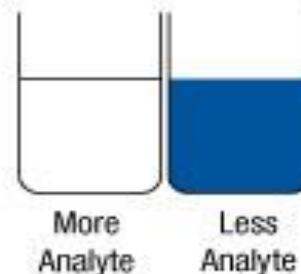
The bound materials now remain in the microplate.



Add TMB substrate to each well and allow the color to develop.

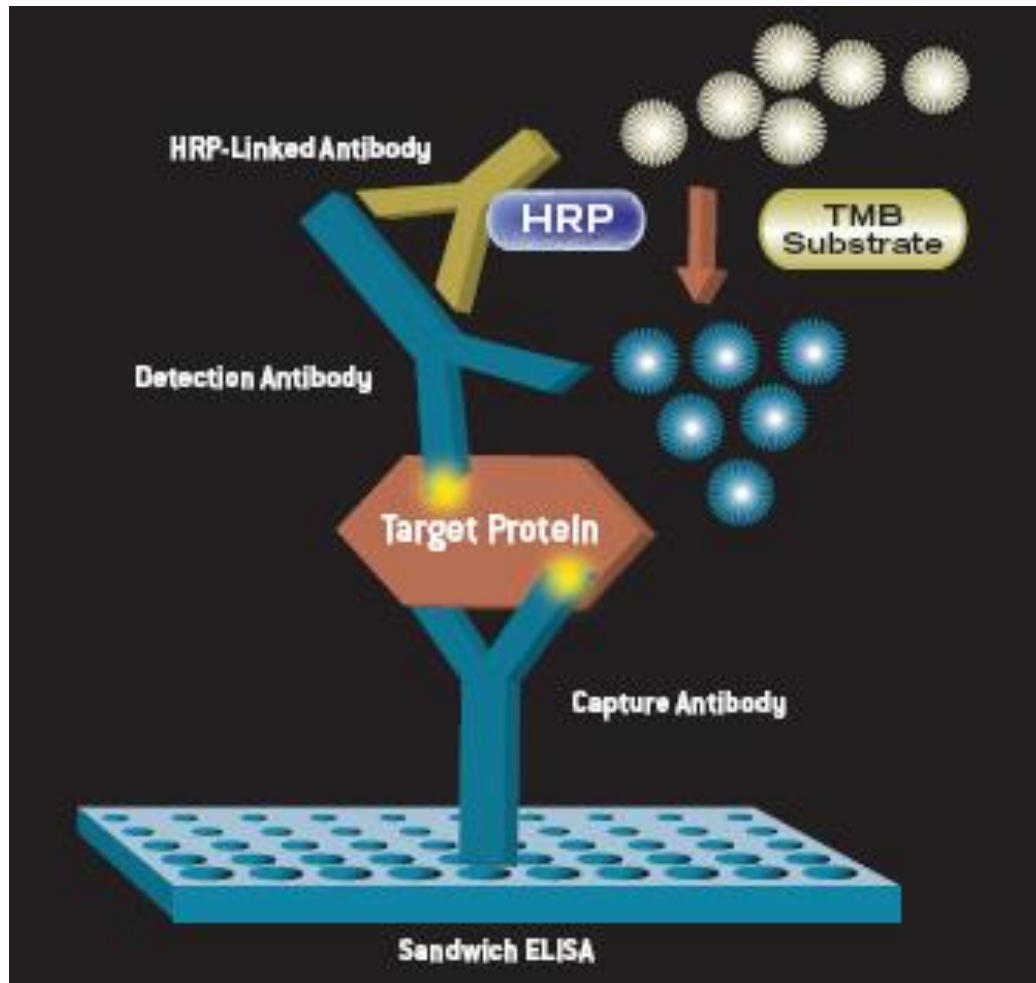


Qualitative results are obtained by measuring the absorbance reading at 650 nm or 450 nm if acid stop is used.

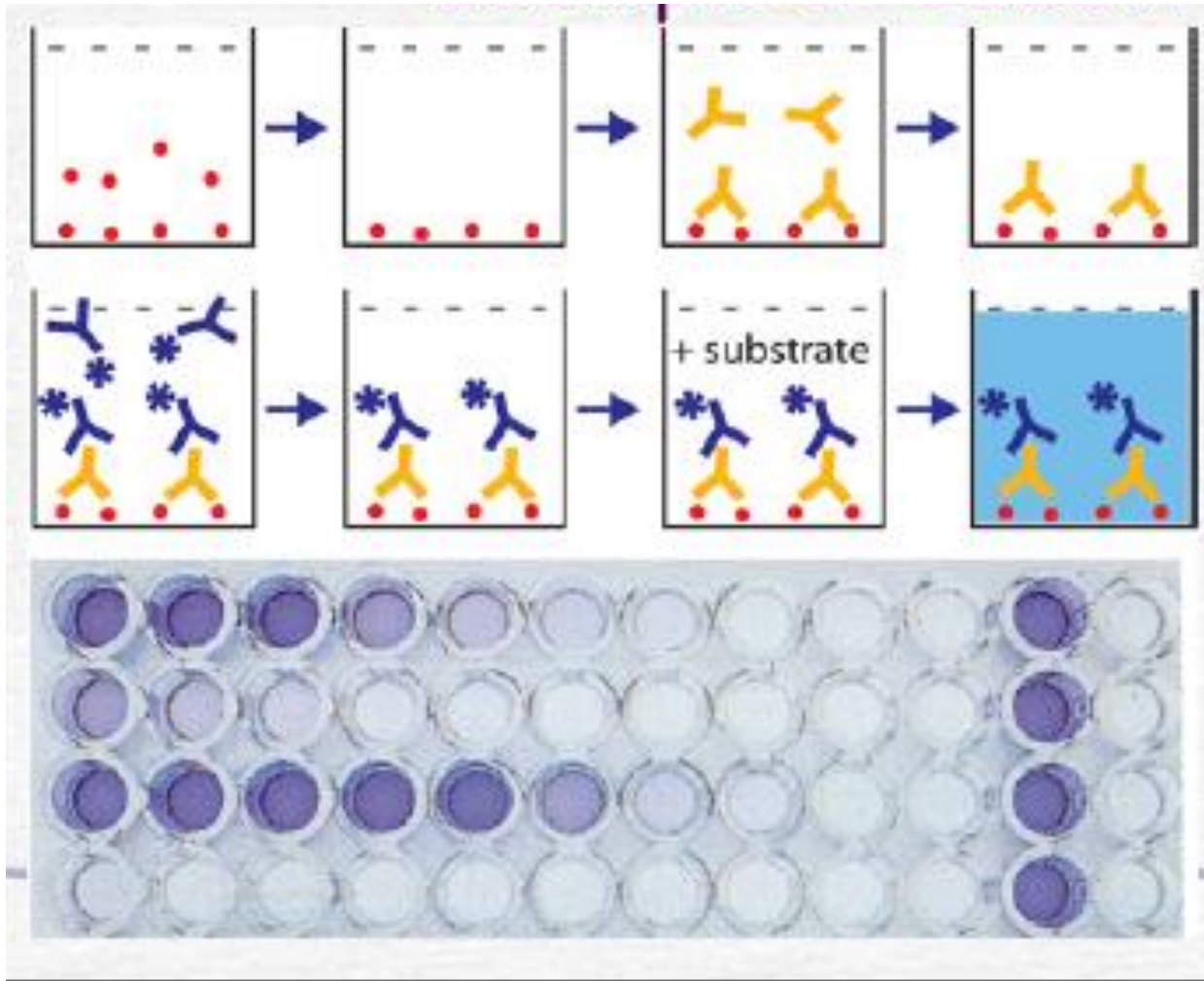


ELISA

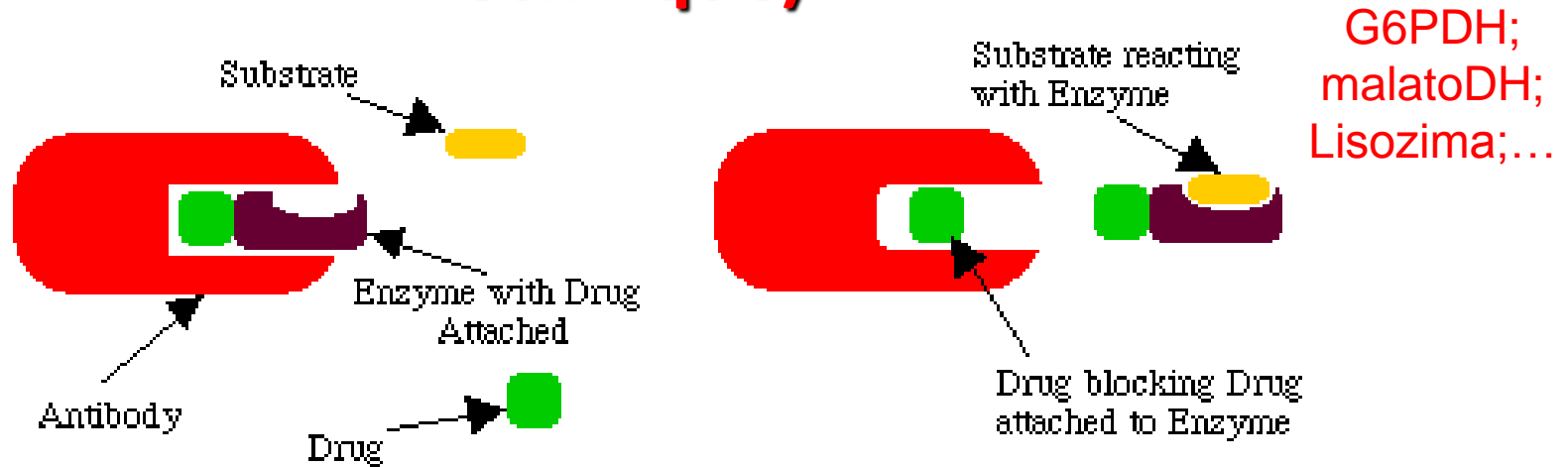
doppio anticorpo(sandwich)



ELISA indiretto



EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)



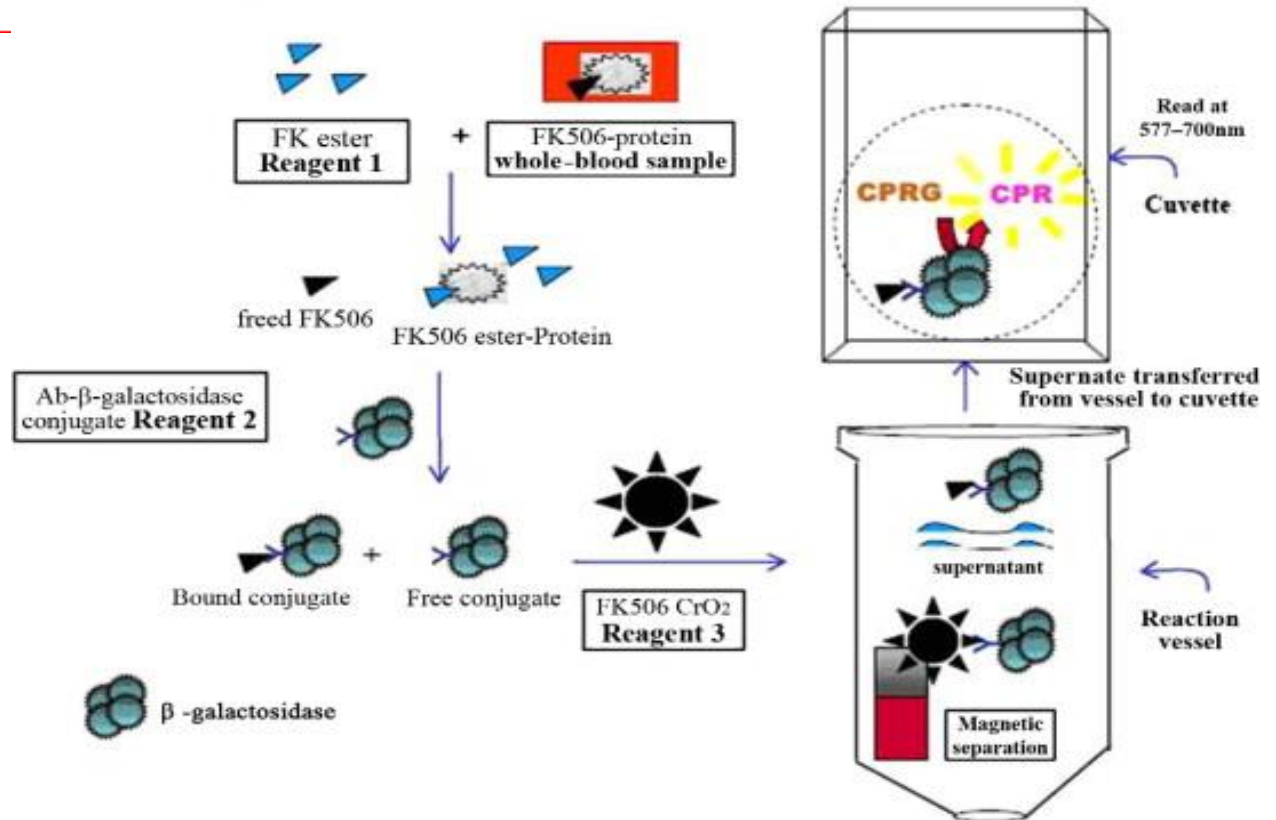
- Metodo immunoenzimatico in fase omogenea competitivo
 - Il marcato è stabile per mesi/anni
 - La misura necessita di un semplice fotometro
 - Si può eliminare la fase di separazione

Viene utilizzato per la misura dei farmaci o droghe nell'urina e nel plasma (amfetamine, cocaina, barbiturici, oppiacei, metadone, digossina,...)

system, which mixes and lyses the whole-blood sample. The lysed sample was then mixed with the antibody conjugate reagent. The tacrolimus present in the sample is bound by the tacrolimus antibody conjugate reagent. Magnetic particles coated with tacrolimus were added to bind free antibody–enzyme conjugate, and the reaction mixture was separated magnetically. Following separation, the supernate containing the tacrolimus–antibody–enzyme complex was transferred to another cuvette and mixed with the substrate. β -galactosidase catalyzes the hydrolysis of chlorophenol red β -D-galactopyranoside to produce chlorophenol red (CPR), which absorbs light maximally at 577 nm. The change in absorbance at 577 nm due to the formation of CPR, which is directly proportional to the amount of tacrolimus in the patient's sample, was measured using a bichromatic (577 and (Fig 1).

ACMIA (Affinity Column Mediated Immunoassay)

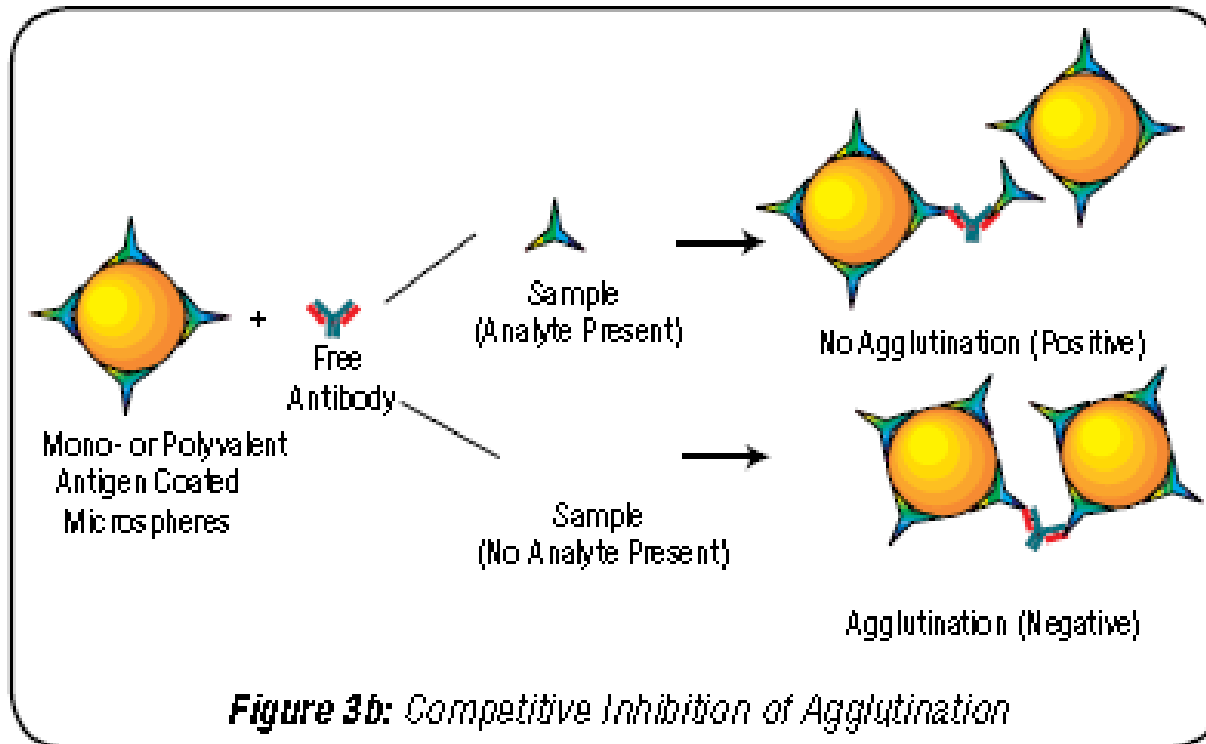
Dimension TACR Schematic—ACMIA



Utilizzato per farmaci immunosoppressori (ciclosporina, Tacrolimus, Everolimus,..)

PETINIA

(Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay)



**340-700
nm**

FARMA CI (Dade Behring):

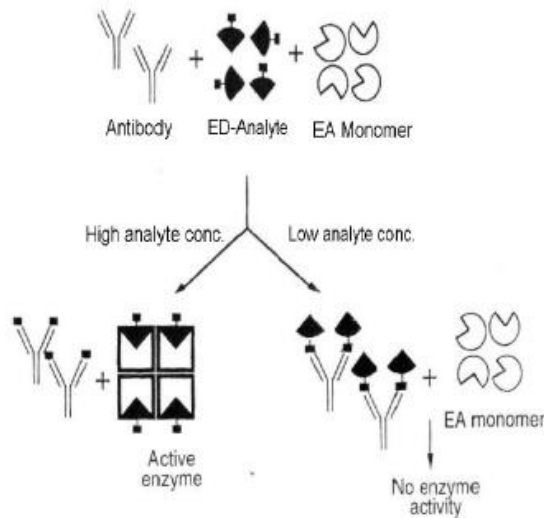
**Carbamazapina, dintoina, teofillina, acodp valproico,
vancomicina, ...**

CEDIA

Cloned Enzyme Donor Immunoassay

Saggi Immuno Enzimatici (2)

SAGGI CEDIA



Frammenti di enzima dell'enzima galattosidasi-B realizzati in laboratorio si riuniscono spontaneamente in soluzione per formare un enzima attivo

Il farmaco del campione compete per siti peptidilici di anticorpi

La concentrazione del farmaco è direttamente proporzionale all'attività dell'enzima

Marcatori immunochimica

1. Enzimi:

ALP

Galattosidasi

GO

G6PDH

Lisozima

MDH

HRP

2. Fluorofori:

Chelati di europio

Fluorescina

ficoeritrina

3. Molecole chemiluminescenti:

Esteri di acridinio

Isoluminolo

Rutenio

Europio

Acridinio

Dioxetano

4. Particelle :

Batteriofagi

Eritrociti

Lattice

liposomi

Immunochimica

Applicazioni

Per diverse matrici:

- **Ormoni**
- **Immunoglobuline**
- **Isoenzimi nel siero e nelle urine**
- **Farmaci nel siero e nelle urine**
- **Droghe di abuso in diverse matrici**
- **Marcatori ossei (osteocalcina, ALP, protocollagene, cross laps,..)**
- **Test anticorpali per epatiti, salmonelle brucelle,..**
- **Interleuchine-citochine**
-

Livelli di sensibilità (g/ml)

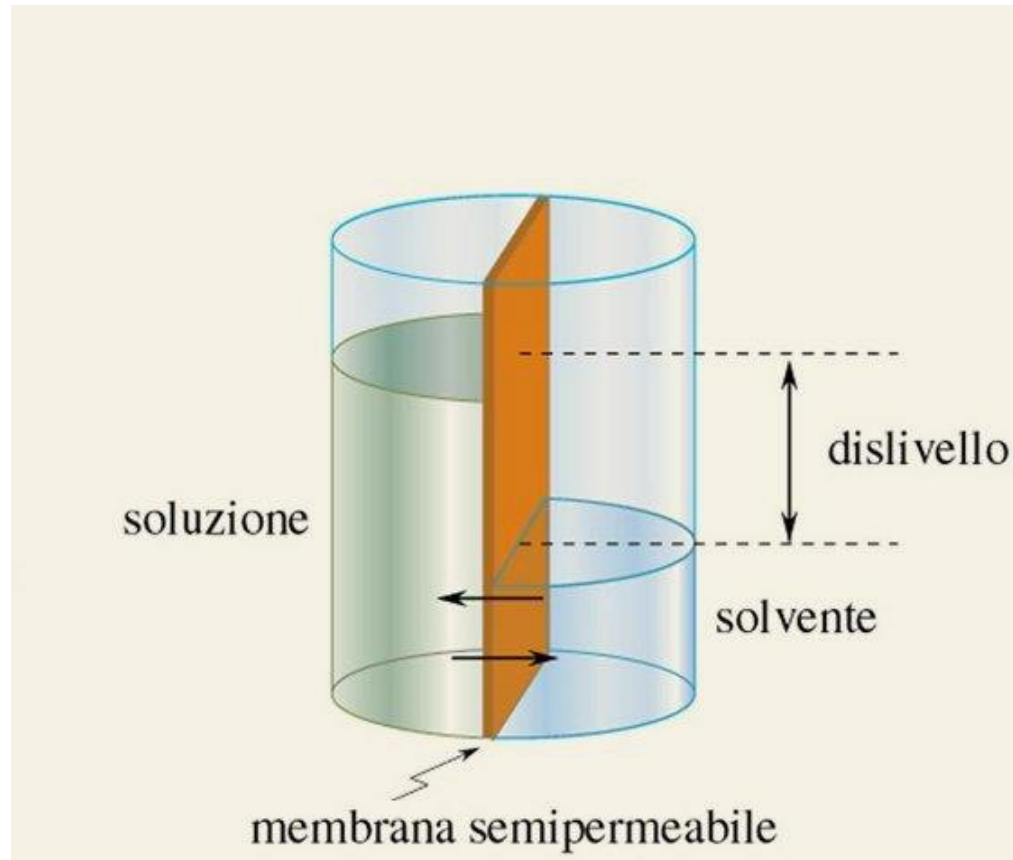
- **Colorimetria : 10^{-3} ... 10^{-5}**
- **Spettrofotometria-turbidimetria: 10^{-4} ... 10^{-7}**
- **Fluorimetria-nefelometria: 10^{-5} ... 10^{-8}**
- **Cromatografia (HPLC; GC) : 10^{-6} ... 10^{-9}**
- **Immunochimica : 10^{-7} ... 10^{-13}**

PRESSIONE OSMOTICA E OSMOLARITA'

- **Proprietà colligative delle soluzioni:**

Proprietà che dipendono unicamente dal numero delle molecole o particelle e non dalla loro natura chimica

1. Pressione osmotica
 2. Abbassamento della tensione di vapore
 3. Innalzamento del punto di ebollizione
 4. Abbassamento del punto di congelamento
- Correlate matematicamente alla pressione osmotica
 - Per soluzioni diluite sono in funzione della concentrazione del soluto



Osmosi e pressione osmotica/oncotica

- **Osmosi** : spontaneo flusso di solvente (acqua) attraverso una membrana semipermeabile (van't Hoff; Traube-ferricianuro di rame) che va dalla soluzione più diluita a quella più concentrata.
- **Pressione osmotica**: pressione che bisogna esercitare su una soluzione affinché non passi il solvente attraverso la membrana semipermeabile
- **Pressione oncotica**: dovuta alla presenza di molecole ad elevato peso molecolare quali le proteine e delle membrane cellulari a semipermeabilità selettiva

Pressione osmotica/oncologica

Teorie

- Filtrazione
- Adsorbimento del solvente attraverso i pori della membrana
- Bombardamento del solvente-soluto sulla membrana
- Riduzione della tensione di vapore del solvente da parte delle molecole di soluto
 - Riduzione energia libera
 - Spostamento del solvente dal sito a potenziale chimico maggiore a quello minore fino all'equilibrio

Pressione osmotica definizione

- La temperatura e la pressione idrostatica aumentano il potenziale chimico
- *Pressione idrostatica che bisogna applicare alla soluzione affinché il potenziale chimico del solvente della stessa aumenti fino a raggiungere quello del solvente puro alla stessa temperatura*

$$\pi V = RT$$

In una soluzione complessa, ciascun soluto produrrà una pressione osmotica uguale a quella che determinerebbe, in base alla sua concentrazione molare, se da solo occupasse tutto lo spazio disponibile



- **Jacobus Henricus van 't Hoff** ([Rotterdam, 30 agosto 1852 – Berlino, 1º marzo 1911](#)) [chimico olandese, premio Nobel per la chimica 1901.](#)

- L'**equazione di van 't Hoff** (anche nota come **relazione di van 't Hoff**) misura quantitativamente la pressione osmotica, intesa come la pressione che si deve applicare per impedire la diluizione del soluto, apponendo una correzione alla formula utilizzata per soluzioni di non-elettroliti:

$$\pi = i M R T$$

- dove:
- R è la costante universale dei gas perfetti (pari a 8,314 J/mol K)
- T è la temperatura assoluta (in K)
- M è la concentrazione molare del soluto (in mol/m³)
- i è un fattore adimensionale di correzione tenente conto del numero di particelle n (molecole e ioni) in soluzione (derivanti dalla eventuale dissociazione del soluto) detto coefficiente di van 't Hoff; per elettroliti deboli deve esser calcolato tenendo conto del grado di dissociazione alfa

$$i = 1 + \alpha (n - 1)$$

Osmolarità in biologia

Osmolalità

- Molarità di una sostanza ideale disciolta in acqua in quantità sufficiente a creare una pressione osmotica (punto di congelamento) identica a quella del liquido biologico
- Questa sostanza ideale non deve né dissociarsi, né associarsi né interagire con l'acqua
- È il numero di moli per Kg di acqua (peso soluto/peso solvente)
- Facilita il confronto tra grandezze da cui dipendono direttamente la tensione di vapore, innalzamento ebullioscopico ed abbassamento crioscopico

Osmolalità

- Valore di pressione osmotica posseduto dal plasma, legato nella quasi totalità all'attività osmotica del sodio sotto forma di cloruro e bicarbonato. I valori normali dell'osmolalità plasmatica sono pari a circa 300 mOsm/kg di acqua. Sono dette rispettivamente isotoniche, ipotoniche e ipertoniche soluzioni che posseggono pressione osmotica uguale, inferiore e superiore a quella del plasma

Misura della pressione osmotica

- Osmometri a membrana

- **Osmometri crioscopici**

Più diffuso, semplice, preciso, comodo

- Osmometri a tensione di vapore

Punto di congelamento

- Temperatura alla quale una quantità infinitesima di fase solida del solvente esiste in equilibrio dinamico con la fase liquida in condizioni di pressione standard
- Esiste un equilibrio dinamico tra le molecole di solvente in fase solida e quelle in fase liquida
- **Il soluto genera una perturbazione che riduce la tensione di vapore del solvente e che può essere compensata solo riducendo la temperatura**
- **La depressione che si realizza nel punto di congelamento rispetto al solvente puro (abbassamento crioscopico) è proporzionale alla concentrazione osmotica del soluto, cioè al numero totale di particelle disciolte**

$$\Delta t_{cr} = i \times K_{cr} \times m$$

dove Δt_{cr} è l'abbassamento crioscopico, uguale alla temperatura di congelamento della soluzione meno quella del solvente puro e K_{cr} è la costante crioscopica. K_{cr} varia da solvente a solvente e per l'acqua vale $1,86 \text{ (}^\circ\text{C} \cdot \text{Kg) / mol}$. M è la molalità della soluzione

i è il coefficiente di van't Hoff

Osmometro crioscopico parametri

- Taratura della scala amperometrica/galvanometrica (zero gradi-zero corrente; soluzioni di NaCl ad osmolalità nota400-900)
- Standardizzazione della velocità di raffreddamento
- Std del tempo di sottoraffreddamento
- Std del tempo e modalità di vibrazione
- Std del tempo di misura finale della temperatura
- Campione siero o urine “limpido”

- **Accuratezza = 1%**
- **Precisione = 0,5%**

Osmolalità siero

275 – 295 mOs/Kg H2O

- Per osmolalità si intende la concentrazione di tutte le particelle (ioniche e non) presenti in una soluzione; a differenza del peso specifico, che dipende sia dalla natura che dal numero delle particelle, l'osmolalità dipende solo dal numero delle particelle, che nel siero sono:

Sodio, Cloruri, Bicarbonati, Potassio, Calcio, Magnesio, Fosfati, Glucosio, Urea e Proteine.

La determinazione dell'osmolalità nel siero è importante nello studio di tutte quelle situazioni nelle quali si possono avere alterazioni dell'equilibrio idro-salino, quali:

gli stati di shock, le malattie renali, le malattie metaboliche, gli stati tossici e gli stati di coma.

- L'osmolarità plasmatica può essere anche calcolata mediante la formula seguente (ve ne sono altre):

$$= [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + (\text{glicemia} / 18) + (\text{azotemia} / 28)$$

Osmolalità urine

300 – 800 mOs/Kg H₂O

- L'osmolalità del siero misura principalmente sodio e l'osmolalità delle urine misura i prodotti di rifiuto urea e [creatinina](#). Il sodio è l'elettrolita più abbondante nel sangue, urine, e feci. Lavora con il potassio (che si trova principalmente nelle cellule), cloro, e CO₂ (nella forma di [bicarbonato](#)) per mantenere una neutralità elettrica nel corpo e un equilibrio acido-base. Il sodio entra nel corpo con la dieta e normalmente è conservato o eliminato dai reni nelle urine per mantenere la sua concentrazione nel sangue entro un range ristretto. Urea e creatinina sono prodotti e rimossi dal corpo a una velocità relativamente costante.



Misura dell'osmolarità tramite determinazione del punto di congelamento

Gamma da 0 a 2500 mOsm/kg, riproducibilità $\pm 0,5 \%$

Volume campione 100 μ l (mini.50 μ L)

Taratura automatica 2 o 3 punti, 0, 300 e 900 mOsm/kg.

Variazioni Osmolalità significato clinico

Cause di ipoosmolalità sierica:

- Iponatriemia
- Polidipsia primaria

Cause di iperosmolalità sierica:

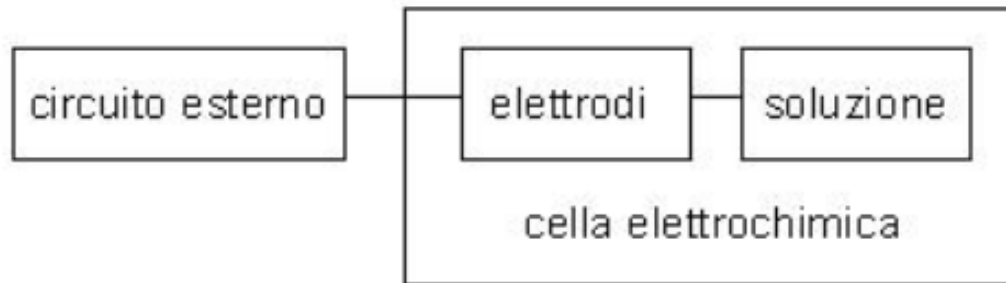
- Ipernatriemia (particolarmente frequente la presenza di disidratazione)
- Iperazotemia
- Iperglicemia
- Intossicazione da glicole etilenico, etanolo, metanolo, isopropanolo, etc.

Cause di aumento del gap osmolale:

- Pseudoiponatriemia (dovuta a iperlipemia o a iperprotidemia), in cui si ha la diminuzione del sodio in concomitanza con valori normali di osmolalità
- Intossicazione acuta da glicole etilenico, etanolo, metanolo, isopropanolo, etc.

Metodi elettrochimici

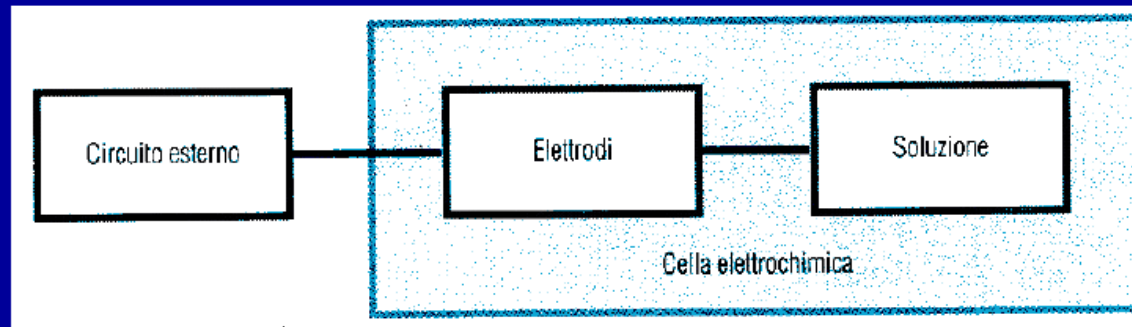
Si basano sulle **proprietà elettriche della materia**, che derivano dalla capacità degli atomi di acquistare o cedere elettroni in particolari condizioni. In tutti i metodi elettrochimici viene stabilito un contatto elettrico tra la materia costituente il campione (generalmente una soluzione) ed un apposito circuito elettrico di misura: misurando alcune proprietà elettriche del circuito, dipendenti dal contatto sopraddetto (come tensione, corrente, resistenza, carica elettrica, ecc.), si ricavano informazioni qualitative e quantitative sul campione esaminato.



Il circuito esterno (formato da tutti conduttori di prima specie), trasmette impulsi elettrici alla soluzione in esame e/o riceve e misura i segnali da essa prodotta; gli elettrodi sono elementi sensibili (generalmente conduttori di prima specie), immersi nella soluzione in esame e fanno da tramite tra soluzione e circuito esterno; la soluzione contiene l'analita che si vuole analizzare. L'insieme degli elettrodi e della soluzione costituisce la cella elettrochimica. Tutti i

TECNICHE ELETTROANALITICHE

I metodi elettrochimici si basano sulla misura della risposta elettrica ottenuta dal campione quando viene inserito in una cella elettrochimica (costituita da conduttori di I e di II specie).



Nei conduttori di I specie (metalli, semiconduttori), il passaggio di corrente avviene mediante flusso di elettroni. La legge fondamentale è la I legge di Ohm:

$$V = i R$$

V = ddp applicata

R = resistenza elettrica

i = intensità di corrente

Nei conduttori di II specie (sali fusi, soluzioni elettrolitiche e alcuni solidi ionici), il passaggio di corrente avviene per spostamento di ioni

In elettrochimica, i parametri che possono essere misurati sono:

- **E**, cioè la differenza di potenziale (ddp) che si stabilisce tra due elettrodi immersi nella soluzione di misura, in potenziometria.
- **Q**, la quantità di carica elettrica che si ottiene applicando una ddp a due elettrodi, in coulombometria o in elettrogravimetria.
- **i**, l'intensità di corrente che passa tra gli elettrodi immersi nella soluzione al variare del potenziale applicato ad uno di essi, in voltammetria.
- **R o Λ** , resistenza o conducibilità in conduttimetria

Elettrochimica

Tecniche Analitiche

- **Potenziometriche:** utilizzano le celle galvaniche, misurano il potenziale all'elettrodo in assenza di corrente, richiedono la presenza di un **elettrodo di riferimento** e seguono la equazione di **Nernst (pH, ioni selettivi,..)**
- **Voltammetriche:** utilizzano le celle elettrolitiche sfruttando la variazione del potenziale all'equilibrio; misurano la corrente che passa attraverso un elettrodo mantenuto dall'esterno a potenziale costante

Sistemi elettrochimici

CELLE

- **Celle galvaniche:** cella elettrochimica (pila) in cui le reazioni avvengono spontaneamente agli elettrodi nel momento in cui questi sono collegati tra di loro da un conduttore esterno **(batteria auto,..)**

Trasformazione della energia chimica in energia elettrica

- **Celle elettrolitiche:** la reazione nella cella avviene per applicazione di un potenziale esterno superiore a quello della cella **(elettrodeposizione metalli, ricarica batterie,..)**

Trasformazione della energia elettrica in energia chimica

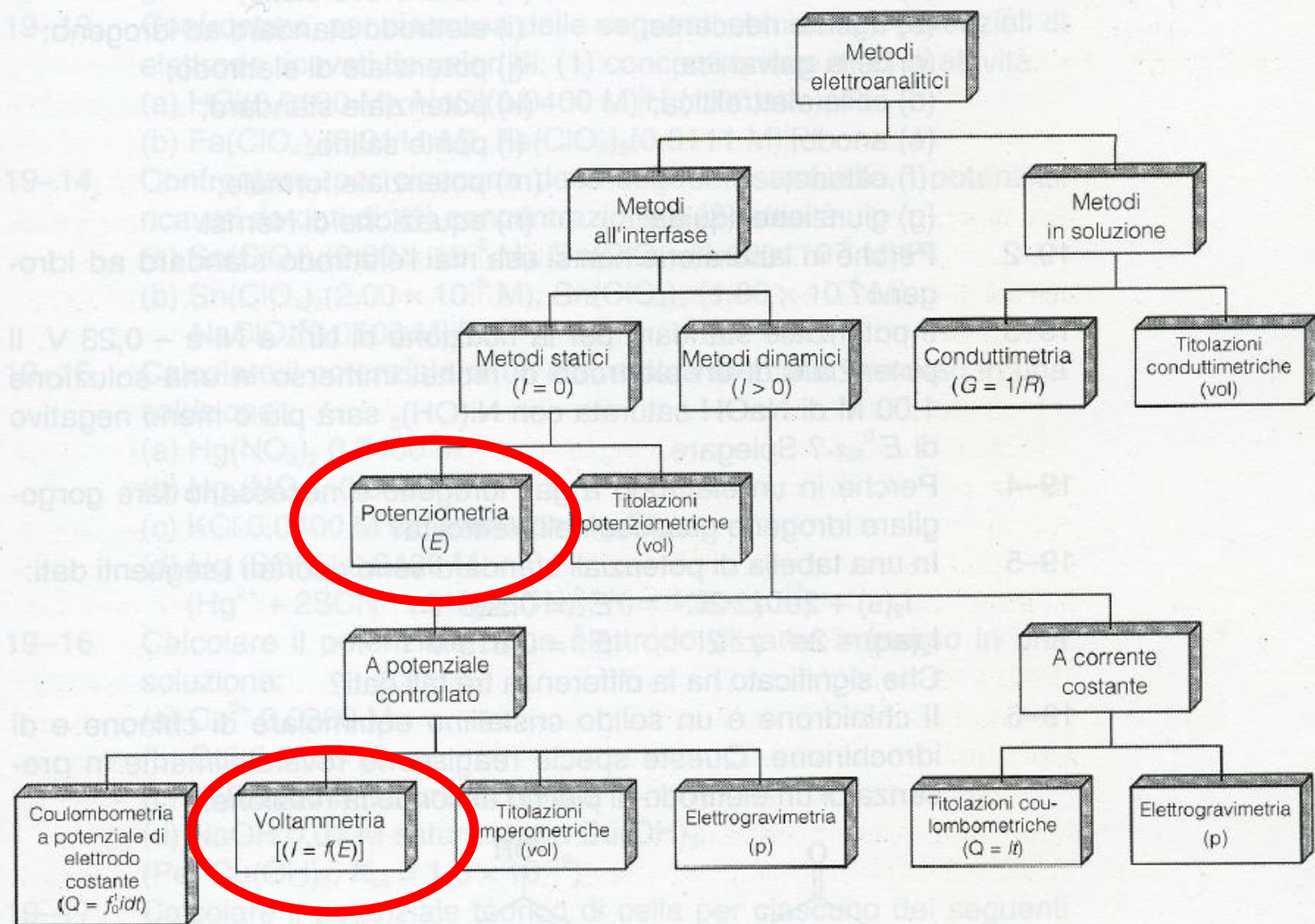
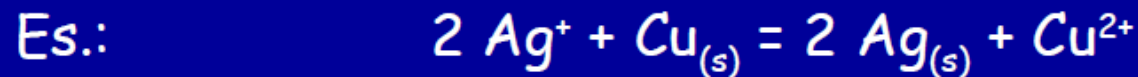


FIGURA 19-10 Quadro riassuntivo dei metodi elettroanalitici più comuni. Tra parentesi è riportata la grandezza misurata in ciascun caso. (I = corrente, E = potenziale, R = resistenza, G = conduttanza, Q = quantità di carica, t = tempo, vol = volume di una soluzione standard, p = peso di una specie elettrodepositata).

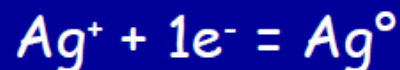
POTENZIOMETRIA

I metodi potenziometrici sono metodi di analisi basati sulla misura della forza elettromotrice (f.e.m.) di una cella galvanica.

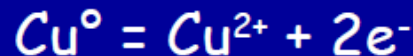
La cella galvanica è un dispositivo atto a convertire l'energia chimica di una reazione di ossido-riduzione in energia elettrica.



riduzione:



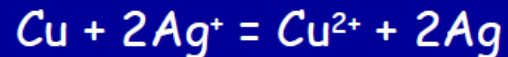
ossidazione:



Una reazione di ossido-riduzione può essere realizzata:

a) per via chimica

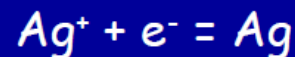
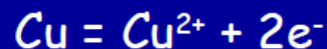
i due reagenti vengono messi in contatto diretto \Rightarrow si ha trasferimento diretto di elettroni da una specie chimica ad un'altra



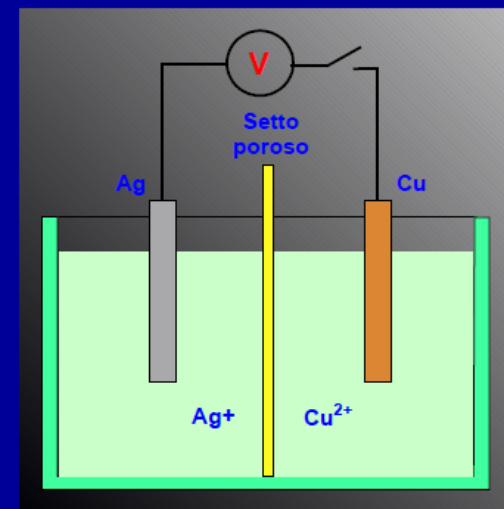
Il rame passa in soluzione come Cu^{2+} , mentre gli ioni Ag^+ si depositano sul rame come argento metallico.

b) per via elettrochimica

i due reagenti non vengono messi a contatto diretto; le due reazioni



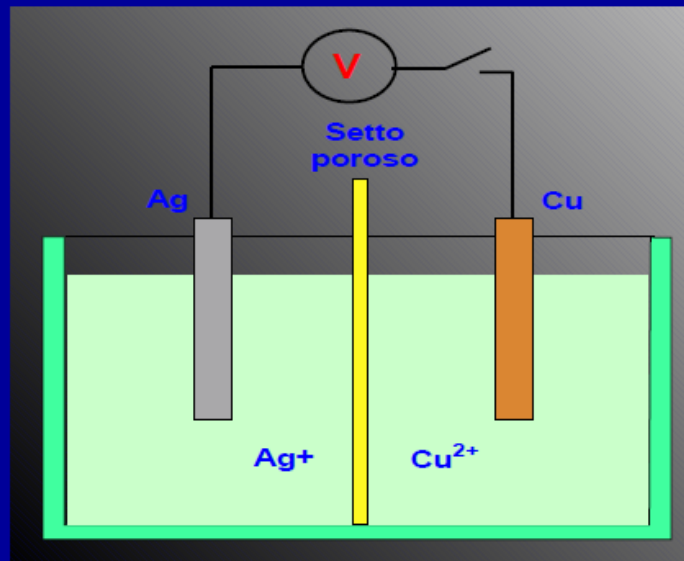
vengono fatte avvenire in una **cella elettrochimica**, cioè in un sistema che non consente il contatto diretto tra i reagenti.



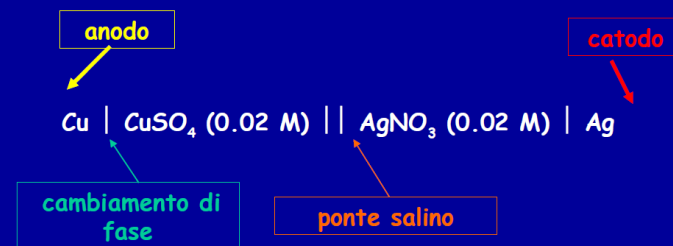
Le celle elettrochimiche possono essere:

- **galvaniche** (o voltaiche), ovvero spontanee
- **elettrolitiche**, ovvero non spontanee

La **differenza di potenziale** ai capi dei due elettrodi, misurata mediante un voltmetro inserito nel circuito esterno, è la manifestazione della tendenza della reazione netta di cella a raggiungere l'equilibrio.



Rappresentazione schematica della cella:



anodo: elettrodo dove avviene l'ossidazione

catodo: elettrodo dove avviene la riduzione

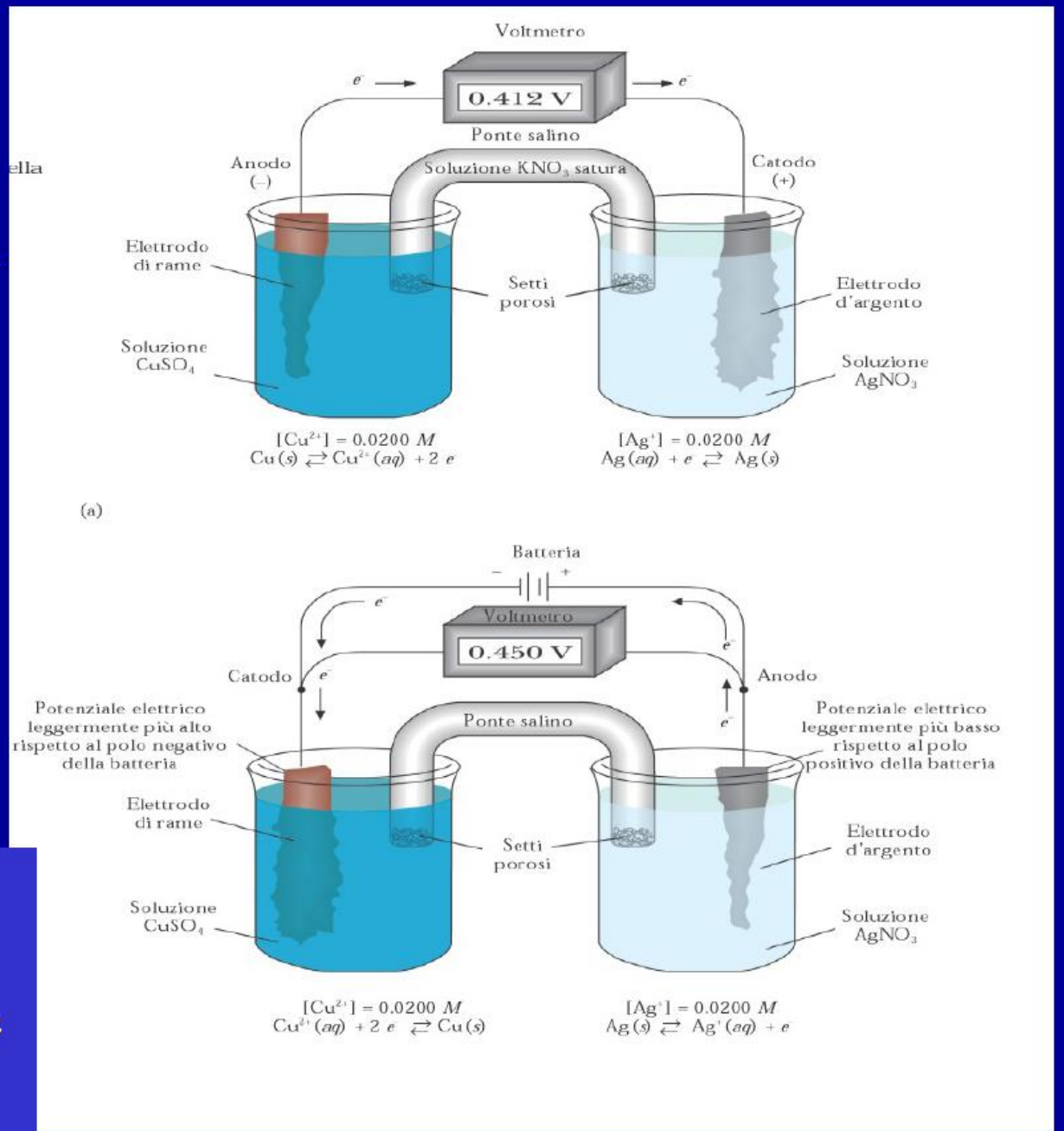
Cella galvanica



Cella elettrolitica



Cella reversibile:
invertendo la direzione
della corrente, la
direzione della reazione
chimica è anche
invertita



Potenziale di una cella galvanica

$$E_{\text{cella}} = E_{\text{catodo}} - E_{\text{anodo}} + E_{\text{giunzione}}$$

Il potenziale di ogni semicella può essere calcolato tramite l'equazione di Nernst

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{rid}}}$$

R = costante generale dei gas (R = 8.314 J/ mol K)

T = temperatura espressa in °K

n = numero di elettroni scambiati nelle reazione redox

F = faraday (96500 Coulomb)

a = attività della specie

E° = potenziale nelle condizioni standard (nelle condizioni cioè in cui l'attività è unitaria)

Riunendo i termini noti (a T = 25°C):

$$E = E^{\circ} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{rid}}}$$

Per convenzione il potenziale elettrodico è un potenziale di riduzione: si riferisce cioè al processo scritto come riduzione

Equazione di Nernst $E = E^\circ + R T/n F \ln [Oss]/[Rid]$

Questa equazione si riferisce ad un qualsiasi dispositivo che generi un potenziale, ad esempio gli elettrodi a vetro per il pH e gli elettrodi iono-selettivi; gli elettrodi redox fondamentalmente. Essa descrive il comportamento degli elettrodi e può essere espressa nella forma semplificata:

$$E = E_{\text{cost}} + 2.303 \frac{RT}{nF} \log_{10} A$$

oppure:

$$E = E_{\text{cost}} + \frac{S}{n} \log_{10} C$$

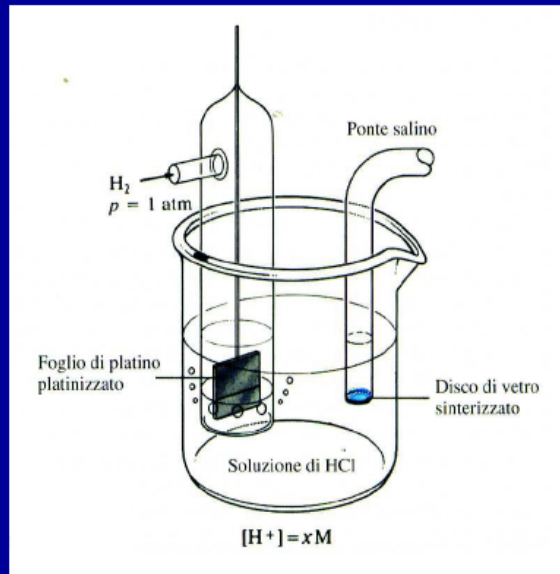


dove E è il potenziale totale (mV) generato tra l'elettrodo di misura e l'elettrodo di riferimento, E_{cost} è il potenziale costante che dipende principalmente dall'elettrodo di riferimento, $2.303 \times RT/F (= S)$ è il *fattore di Nernst* (R è la costante molare dei gas e T è la temperatura assoluta), n è il numero di cariche possedute dallo ione, A è l'attività dello ione e C è la sua concentrazione.

Il potenziale elettrodo standard

Il potenziale elettrodo standard (E°) di una semi-reazione e' definito come il potenziale della semicella quando le attivita' di tutti i reagenti e di tutti i prodotti sono unitarie.

Poiche' E° non può essere determinato in valore assoluto, sperimentalmente E° può essere definito come la forza elettromotrice di una cella ottenuta accoppiando l'elettrodo in esame nelle condizioni standard con l'**elettrodo standard ad idrogeno (SHE)**, al quale per convenzione e' stato assegnato un valore di potenziale pari a 0.000 V.



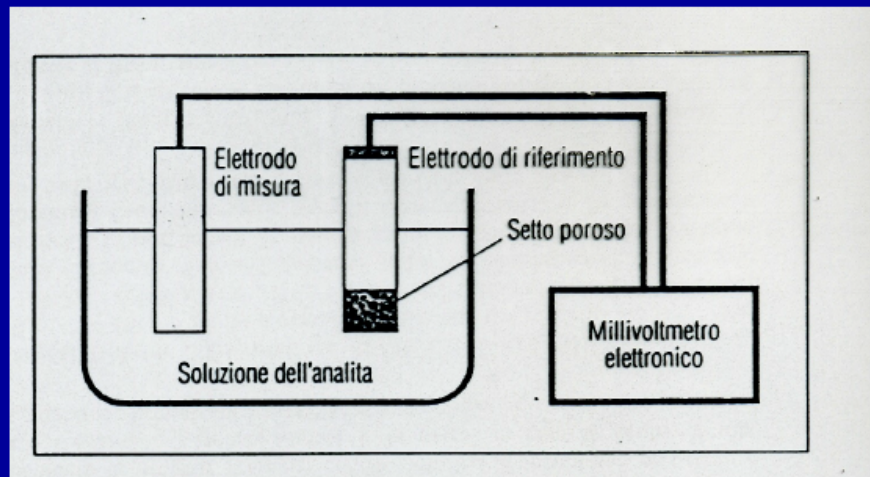
reazione elettrodica: $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- = \text{H}_2 (\text{g})$

per convenzione: $E^\circ_{\text{H}^+/\text{H}_2} = 0.000 \text{ V}$

E' un elettrodo reversibile: può agire sia da catodo che da anodo

MISURE POTENZIOMETRICHE

Si basano sulla misura della forza elettromotrice di una cella ottenuta accoppiando un elettrodo a potenziale noto, costante ed indipendente dalla composizione della soluzione da analizzare (*elettrodo di riferimento*), con un elettrodo il cui potenziale è funzione della specie che vogliamo determinare (*elettrodo indicatore*).



$$E_{\text{cella}} = E_{\text{ind.}} - E_{\text{rif.}} + E_j$$

La misurazione della differenza di potenziale di una cella deve essere effettuata *senza far passare corrente* attraverso di essa, in caso contrario durante la misurazione avverrebbero reazioni elettrodiche che porterebbero alla variazione delle attività degli analiti, e quindi alla variazione del potenziale di cella stesso.

Tabella 21.1. Principali metodi elettrochimici di analisi.

Grandezza misurata	Denominazione del metodo
Potenziale in rapporto alla concentrazione della specie chimica in esame	1) A corrente zero: a) misura di attività o di concentrazioni ioniche (es. pH o misure con elettrodi a ioni selettivi) b) titolazioni potenziometriche 2) A piccola corrente costante: a) potenziometria a corrente costante
Forza elettromotrice contro il tempo (a corrente costante)	Cronopotenziometria
Resistenza (o conducibilità)	1) Titolazioni conduttimetriche
Corrente contro tensione	Polarografia e tecniche voltammetriche
Corrente contro concentrazione dei componente in esame	Titolazioni amperometriche
Coulomb (corrente per tempo)	1) Coulometria a potenziale elettrodico costante 2) Titolazioni coulometriche
Peso della sostanza separata all'elettrodo	Elettrogravimetria

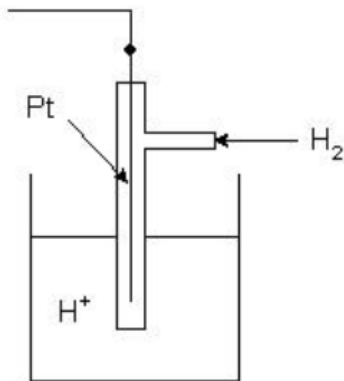
4.2.4 - Elettrodi a potenziale costante (di riferimento)

La misura assoluta del potenziale di elettrodo è impossibile, in quanto l'introduzione di una nuova superficie metallica (l'elemento sensibile di misura) comporterebbe la formazione di nuove interfacce e quindi di nuovi potenziali. La misura del E di un elettrodo viene fatta indirettamente, costruendo una pila o cella elettrochimica in cui uno degli elettrodi ha potenziale costante, mentre l'altro ha un potenziale che dipende dalla specie chimica che si vuole studiare. In questo caso la pila non ha lo scopo di produrre corrente elettrica ma solo quello di permettere la misura del potenziale di elettrodo. E' noto che:

$$E_{\text{cella}} = E_{\text{catodo}} - E_{\text{anodo}}$$

Se uno dei due potenziali è costante, è evidente che l'E cella misurato dipende solo dalla variazione del potenziale dell'altro elettrodo. Vi sono vari tipi di elettrodi a potenziale costante, detti elettrodi di riferimento.

4.2.4.1 - Elettrodo a idrogeno: è l'elettrodo di riferimento per eccellenza, quello utilizzato per costruire la serie elettrochimica degli elementi, dove viene abbinato agli elementi di cui si vuole misurare il potenziale normale E^0 . E' anche indicato con la sigla **SHE** (Standard Hydrogen Electrode). E' schematizzato dalla seguente catena elettrodica (successione di conduttori a contatto): $H^+|H_2||Pt$



E' formato da un filo di Pt immerso in una soluzione acida con attività unitaria degli ioni H^+ , cioè in pratica una concentrazione 1 M in cui gorgoglia H_2 gassoso alla pressione di 1 atm; la redox è la seguente:



Poiché $[H^+] = 1 \text{ M}$ allora $E = E^0$ a cui viene attribuito, in queste condizioni e convenzionalmente, un potenziale uguale a zero. Si ricorda che nella serie elettrochimica, gli elementi con potenziale (+) saranno ossidanti rispetto all'H, cioè tendono più di lui a ridursi e quindi ad acquistare elettroni; al contrario quelli con potenziali (-) saranno riducenti cioè tenderanno ad ossidarsi e quindi più dell'H tenderanno a cedere elettroni

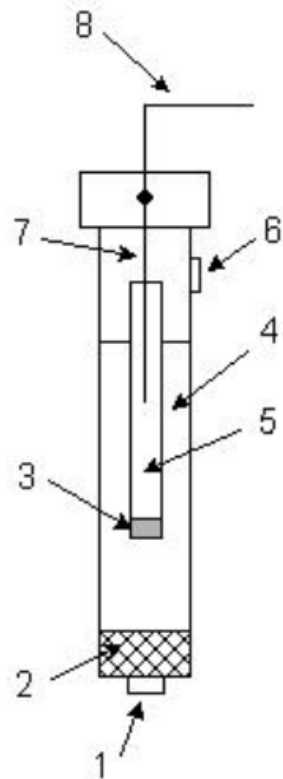
POTENZIALI STANDARD DI ALCUNE SEMIREAZIONI DI RIDUZIONE

(stato standard: T = 298,15 K, C = 1 mol dm⁻³, P = 1 atm)

(le semireazioni di riduzione sono ordinate in base al valore crescente di E°)

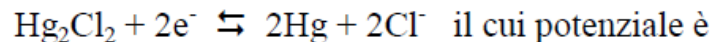
SEMIREAZIONE DI RIDUZIONE	E° (volt)	SEMIREAZIONE DI RIDUZIONE	E° (volt)
Li ⁺ + e ⁻ → Li	-3,0401	I ₂ + 2e ⁻ → 2I ⁻	0,5355
K ⁺ + e ⁻ → K	-2,931	MnO ₄ ⁻ + e ⁻ → MnO ₄ ²⁻	0,558
Ca ²⁺ + 2e ⁻ → Ca	-2,868	MnO ₄ ⁻ + 2H ₂ O + 3e ⁻ → MnO ₂ + 4OH ⁻	0,595
Na ⁺ + e ⁻ → Na	-2,71	BrO ₃ ⁻ + 3H ₂ O + 6e ⁻ → Br ⁻ + 6OH ⁻	0,61
Mg ²⁺ + 2e ⁻ → Mg	-2,372	ClO ₃ ⁻ + 3H ₂ O + 6e ⁻ → Cl ⁻ + 6OH ⁻	0,62
Al ³⁺ + 3e ⁻ → Al	-1,662	O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂ O ₂	0,695
Mn ²⁺ + 2e ⁻ → Mn	-1,185	Fe ³⁺ + e ⁻ → Fe ²⁺	0,771
SO ₄ ²⁻ + H ₂ O + 2e ⁻ → SO ₃ ²⁻ + 2OH ⁻	-0,93	Hg ₂ ²⁺ + 2e ⁻ → 2Hg	0,7973
2H ₂ O + 2e ⁻ → H ₂ + 2OH ⁻	-0,8277	Ag ⁺ + e ⁻ → Ag	0,7996
Zn ²⁺ + 2e ⁻ → Zn	-0,7618	Hg ²⁺ + e ⁻ → Hg	0,851
AsO ₄ ³⁻ + 2H ₂ O + 2e ⁻ → AsO ₂ ⁻ + 4OH ⁻	-0,71	NO ₃ ⁻ + 4H ⁺ + 3e ⁻ → NO + 2H ₂ O	0,957
Fe(OH) ₃ + e ⁻ → Fe(OH) ₂ + OH ⁻	-0,56	IO ₃ ⁻ + 6H ⁺ + 6e ⁻ → I ⁻ + 3H ₂ O	1,085
H ₃ PO ₃ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₃ PO ₂ + H ₂ O	-0,499	Br ₂ + 2e ⁻ → 2Br ⁻	1,0873
Fe ²⁺ + 2e ⁻ → Fe	-0,447	MnO ₂ + 4H ⁺ + 2e ⁻ → Mn ²⁺ + 2H ₂ O	1,224
Cd ²⁺ + 2e ⁻ → Cd	-0,4030	O ₂ + 4H ⁺ + 4e ⁻ → 2H ₂ O	1,229
Co ²⁺ + 2e ⁻ → Co	-0,28	Cr ₂ O ₇ ²⁻ + 14H ⁺ + 6e ⁻ → 2Cr ³⁺ + 7H ₂ O	1,232
H ₃ PO ₄ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₃ PO ₃ + H ₂ O	-0,276	Cl ₂ + 2e ⁻ → 2Cl ⁻	1,35827
Ni ²⁺ + 2e ⁻ → Ni	-0,257	ClO ₄ ⁻ + 8H ⁺ + 8e ⁻ → Cl ⁻ + 4H ₂ O	1,386
Sn ²⁺ + 2e ⁻ → Sn	-0,1375	BrO ₃ ⁻ + 6H ⁺ + 6e ⁻ → Br ⁻ + 3H ₂ O	1,423
Pb ²⁺ + 2e ⁻ → Pb	-0,1262	ClO ₃ ⁻ + 6H ⁺ + 6e ⁻ → Cl ⁻ + 3H ₂ O	1,451
2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂	0,00000	PbO ₂ + 4H ⁺ + 2e ⁻ → Pb ²⁺ + 2H ₂ O	1,455
Sn ⁴⁺ + 2e ⁻ → Sn ²⁺	0,151	Au ³⁺ + 3e ⁻ → Au	1,498
SO ₄ ²⁻ + 4H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂ SO ₃ + H ₂ O	0,172	MnO ₄ ⁻ + 8H ⁺ + 5e ⁻ → Mn ²⁺ + 4H ₂ O	1,507
IO ₃ ⁻ + 3H ₂ O + 6e ⁻ → I ⁻ + 6OH ⁻	0,26	H ₂ O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 2H ₂ O	1,776
Cu ²⁺ + 2e ⁻ → Cu	0,3419	S ₂ O ₈ ²⁻ + 2e ⁻ → 2SO ₄ ²⁻	2,010
O ₂ + 2H ₂ O + 4e ⁻ → 4OH ⁻	0,401	O ₃ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → O ₂ + H ₂ O	2,076
Cu ⁺ + e ⁻ → Cu	0,521	F ₂ + 2e ⁻ → 2F ⁻	2,866

4.2.4.2 - *Elettrodo a calomelano*: è costituito da mercurio, cloruro mercurioso poco solubile (calomelano) e cloruro di potassio ed è quindi schematizzabile mediante la seguente catena galvanica: $\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{Hg}|\text{KCl}$. Il tipo più usato è quello a calomelano saturo **SCE** (Saturated Calomel Electrode)



- | | |
|----------------------|--|
| 1 = setto poroso | 5 = pasta di Hg e Hg_2Cl_2 |
| 2 = cristalli di KCl | 6 = bocchetta di rabbocco |
| 3 = sostegno poroso | 7 = filo di platino |
| 4 = soluzione di KCl | 8 = cavo schermato |

In questo elettrodo l'interfaccia è costituita da una pasta di Hg e Hg_2Cl_2 a contatto con una soluzione saturata di KCl, in presenza di corpo di fondo; un filo di Pt garantisce il contatto elettrico con l'esterno; un setto poroso mette l'ambiente dell'elettrodo in contatto con la soluzione in cui sarà immerso. La reazione all'interfaccia è:

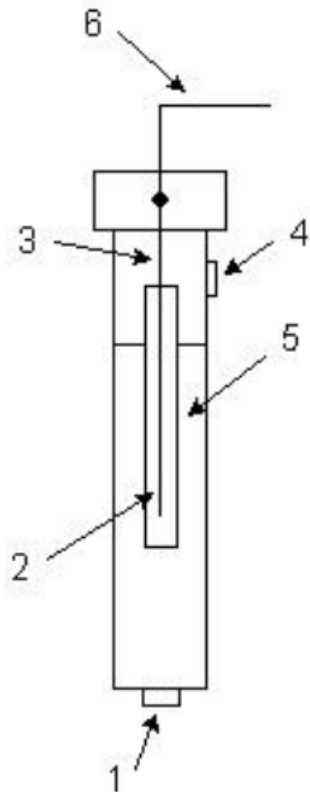


$$E = E^0 + \frac{S^*}{2} \cdot \log \frac{1}{[\text{Cl}^-]^2}$$

dato che il calomelano ed il mercurio sono rispettivamente solidi e liquido insolubili e quindi hanno attività unitaria ovvero concentrazione costante. Il potenziale dell'elettrodo dipende pertanto solo dalla concentrazione degli ioni Cl^- che, essendo in soluzione saturata, si può ritenere costante, come l'E totale, che risulta essere: $E = 0,246 \text{ V}$.

4.2.4.3 - Elettrodo a cloruro d'argento: è costituito da un filo di Ag rivestito da un deposito insolubile di AgCl, il tutto immerso in una soluzione di KCl saturo oppure 1 N. Nella sua versione con la soluzione saturo di KCl viene indicato con la sigla SSC (Saturated Silver-Silver Chloride Electrode).

Questo elettrodo è descritto dalla seguente catena galvanica: AgCl|Ag|KCl.



- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1 = setto poroso | 4 = bocchetta di raccordo |
| 2 = rivestimento di AgCl | 5 = soluzione di KCl 1 N |
| 3 = filo di Ag | 6 = cavo schermato |

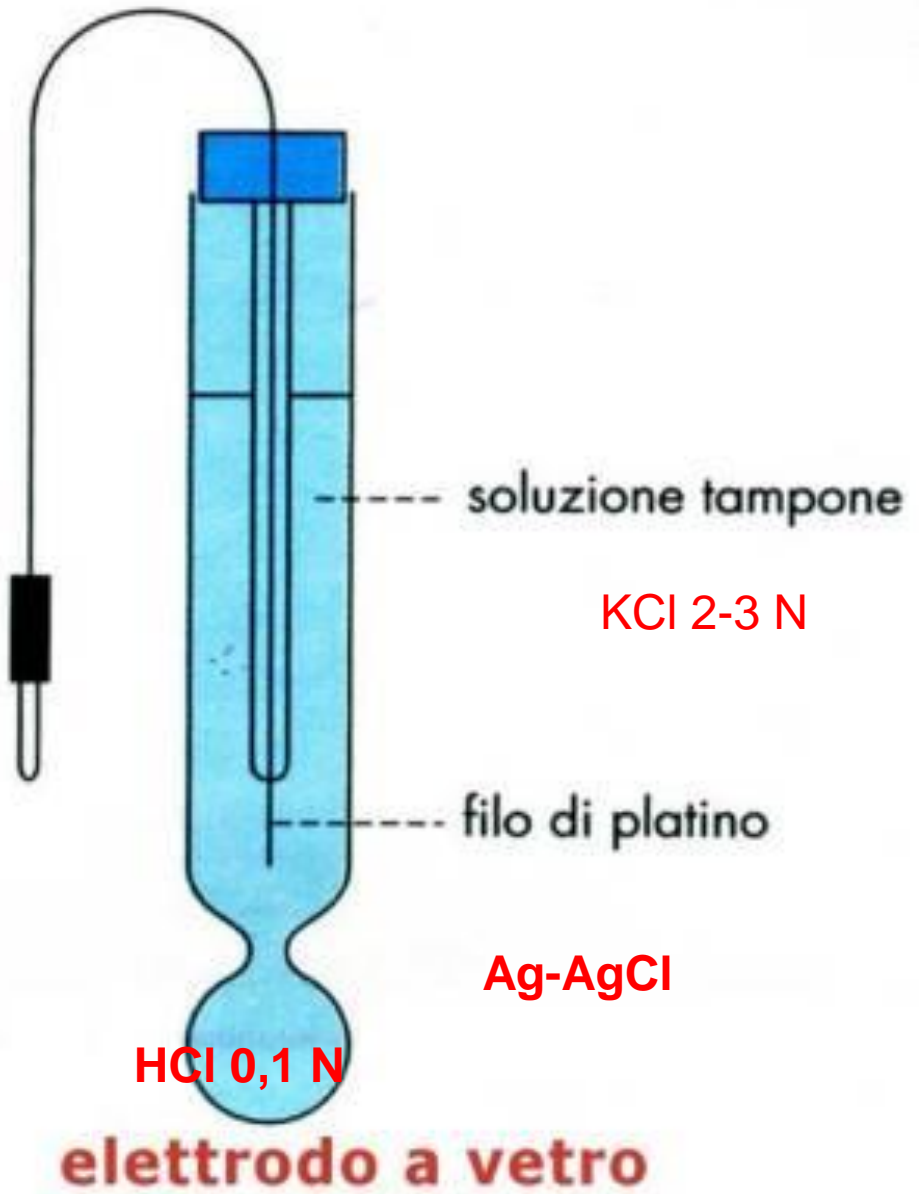
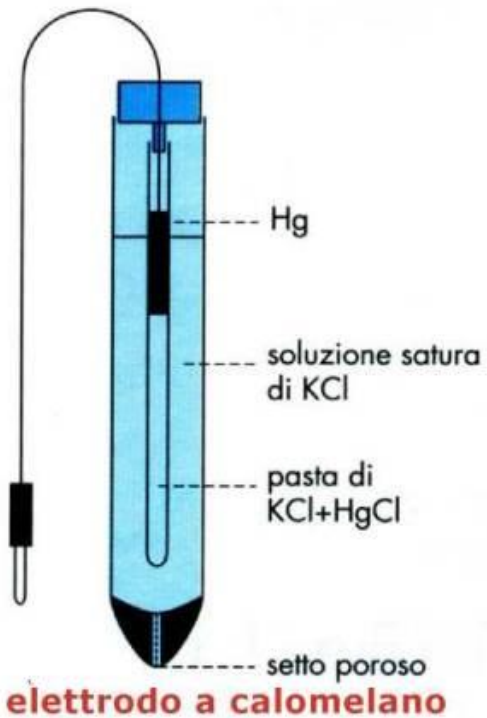
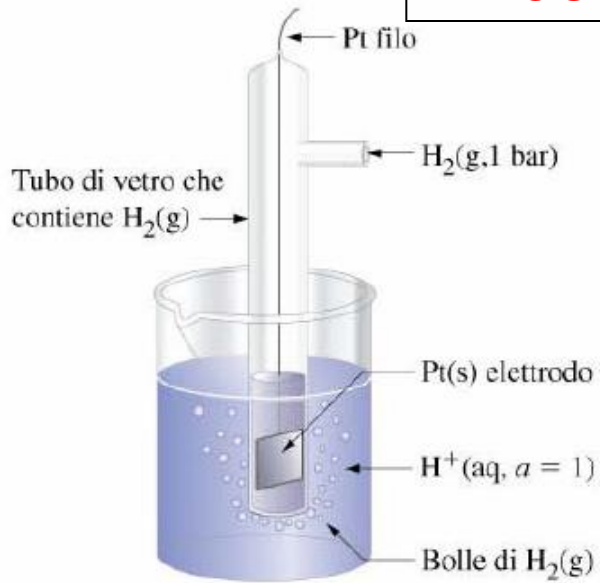
La reazione all'interfaccia é:



Come nel caso precedente, anche in questo elettrodo il potenziale dipende dalla specie anionica che si trova a concentrazione costante (saturo o 1 N), periodicamente rinnovata tramite la bocchetta di aggiunta laterale dell'elettrodo. Un elettrodo a cloruro d'argento 1 N in KCl ha un potenziale pari a $E = 0,239 \text{ V}$.

Questo tipo elettrodo, poiché viene immerso nella soluzione dove si troverà anche quello di misura, potrebbe anche servire per la misura degli ioni Cl^- , come quello a calomelano. Inoltre, poiché contiene Ag, è sensibile alla presenza di eventuali complessanti in soluzione, che potrebbero penetrare attraverso il setto poroso e quindi varierebbero l'equilibrio all'interfaccia e perciò il potenziale.

IDROGENO



ELETTRODI INDICATORI

Un elettrodo indicatore ideale deve rispondere in modo rapido e riproducibile alla variazione di attività dell'analita.

Possiamo distinguere due tipi principali di elettrodi indicatori:

- **METALLICI**
- **A MEMBRANA**

Elettrodi a membrana o ione-selettivi (ISE)

Gli elettrodi a membrana rispondono selettivamente ad una sola specie in soluzione. Sono costituiti da una sottile membrana che separa la soluzione contenente il campione che si vuole determinare dalla soluzione interna contenente lo stesso ione ad una attività definita e costante. La differenza di potenziale attraverso la membrana dipende dalla differenza di attività dello ione nella soluzione interna di riferimento e nel campione.

Classificazione elettrodi indicatori

- **Elettrodi di prima specie:**

Metallo in una soluzione di un suo sale: **Ag in AgNO₃**

- **Elettrodi di seconda specie:**

Metallo rivestito di un suo sale poco solubile : **Ag rivestito di AgCl**

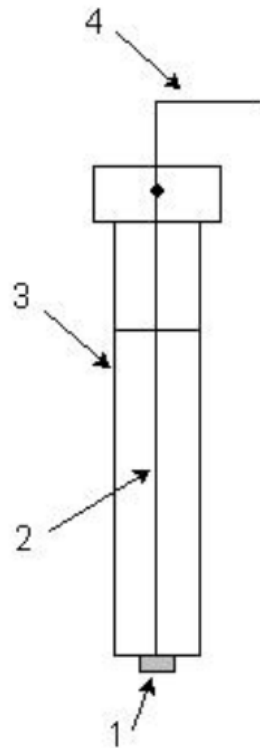
- **Elettrodi di terza specie:**

Elettrodo inerte immerso in una soluzione con una specie ossidata-ridotta : **platino-oro in una soluzione di Fe³⁺/²⁺**)

4.2.5 - Elettrodi di misura

Insieme a quelli di riferimento costituiranno la pila, cioè la cella elettrochimica necessaria per la misura del potenziale di un sistema elettrochimico. Sono molto numerosi ed in continuo aumento perché molto numerose sono le specie chimiche che si possono determinare mediante misure potenziometriche.

4.2.5.1 - Elettrodo al platino: è costituito da un filo di Pt, inerte verso la maggior parte dei reattivi chimici, terminante con una lamina o un anello di Pt, a contatto con la soluzione.



1 = lamina/anello di Pt 2 = filo di Pt
3 = tubo di vetro 4 = cavo schermato

Un elettrodo di questo genere ha un potenziale che è sensibile a qualsiasi coppia ox/red in soluzione; è quindi utilizzabile per seguire la variazione del potenziale E in una titolazione redox (per esempio nella permanganatometria, iodometria, ecc.).

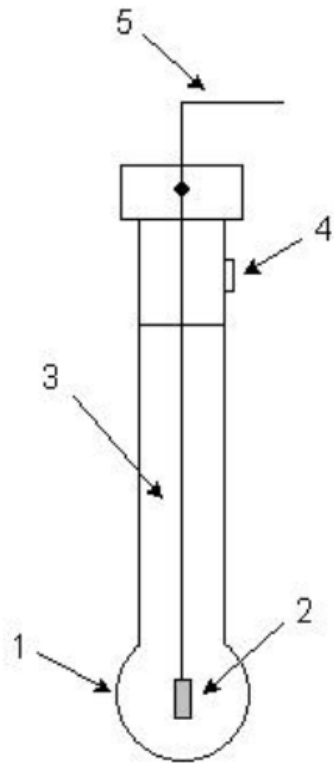
Accoppiando un tale elettrodo ad uno di riferimento (calomelano, AgCl, ecc.), si costituisce la cella (pila):

$E_{\text{cella}} = |E_{\text{riferimento}} - E_{\text{misura}}|$, per cui misurando l' E della cella, si risale all' E dell'elettrodo di misura

Esiste anche una versione compatta dello stesso elettrodo (e ciò si verifica anche per gli altri tipi di elettrodi di misura), detto **elettrodo combinato**, che contiene al suo interno anche un elettrodo di riferimento, costituito da un filo di Ag ricoperto di AgCl immerso in una soluzione di KCl:

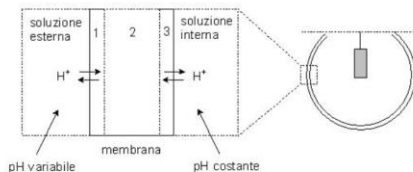
4.2.5.2 – Elettrodo a vetro: è il tipo più diffuso di elettrodo a membrana; è idoneo alla misura del pH. E' costituito da un tubo di vetro che termina con una sottile membrana di vetro speciale, avente la forma di un bulbo, che ha la proprietà di scambiare gli ioni H^+ con la soluzione in cui è immersa; all'interno vi è una soluzione tampone (di solito a pH 7). All'interno del bulbo vi è un elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl.

- 1 = membrana di vetro
- 2 = elettrodo di riferimento interno Ag|AgCl
- 3 = soluzione tampone
- 4 = bocchetta di rabbocco
- 5 = cavo schermato

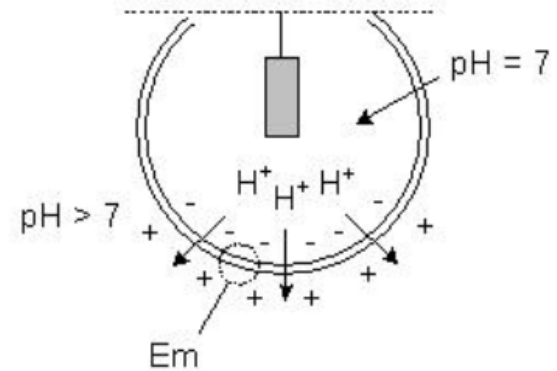
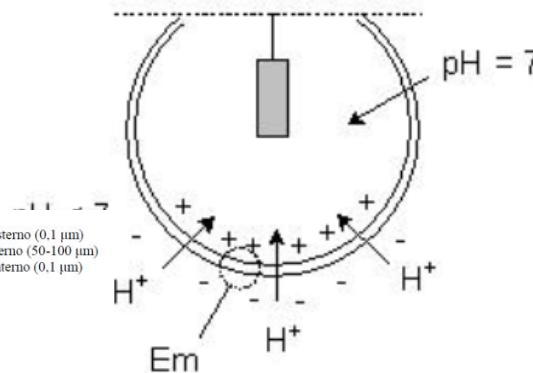


A causa della particolare struttura della membrana (un vetro a base di silicati di Ca e Na, oppure Ba e Li, con spessore inferiore ai 100 μm), che è poroso, si forma una d.d.p all'interfaccia con la soluzione, causa della diversa concentrazione degli H^+ tra la parte interna e quella esterna della membrana, che provoca la formazione di un doppio strato e conseguente potenziale elettrochimico, detto **potenziale di membrana E_m** , esprimibile con una equazione simile all'equazione di Nernst:

$$E_m = k + S^* \cdot \log \frac{[H^+_{esterno}]}{[H^+_{interno}]}$$



- 1: strato idratato esterno (0.1 μm)
- 2: strato anidro interno (50-100 μm)
- 3: strato idratato interno (0.1 μm)

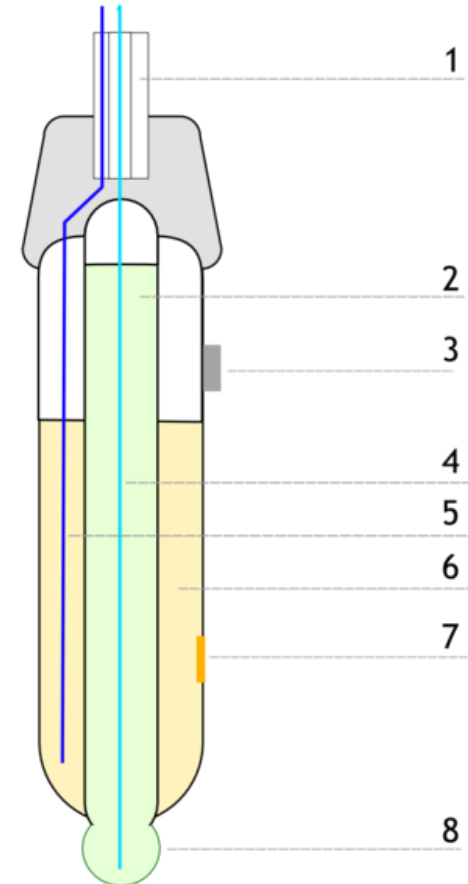


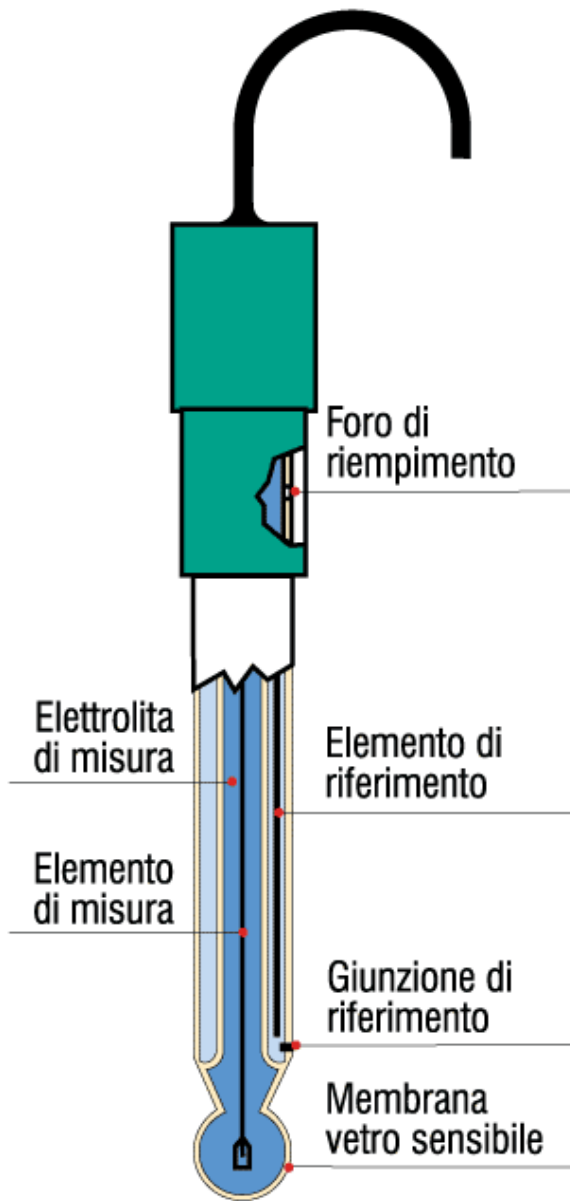
Elettrodo a vetro (a riferimento interno)

- In genere si compone di un tubo di vetro incamiciato da un tubo esterno in cui sono contenuti un filo d'[argento](#) [5, vedi figura], del [cloruro d'argento](#) e un [elettrolita](#) (generalmente una [soluzione](#) di [cloruro di potassio](#)) [6] che fungono da [elettrodo di riferimento](#). Anche nel tubo interno si trovano un filo d'argento [4], del cloruro d'argento e un elettrolita [2], all'elettrolita è aggiunta una [soluzione tampone](#); questi fungono da elettrodo di misura.
- Il tubo interno è in contatto con la soluzione del campione da misurare attraverso una membrana di vetro sottile posta alla sua estremità; il tubo esterno è in contatto con la soluzione del campione da misurare attraverso un diaframma poroso che funge da [ponte salino](#) [7]. Sul tubo esterno è inoltre presente un tappo rimovibile [3] per operazioni di manutenzione, quali il sostituire o riportare a livello l'elettrolita esterno.

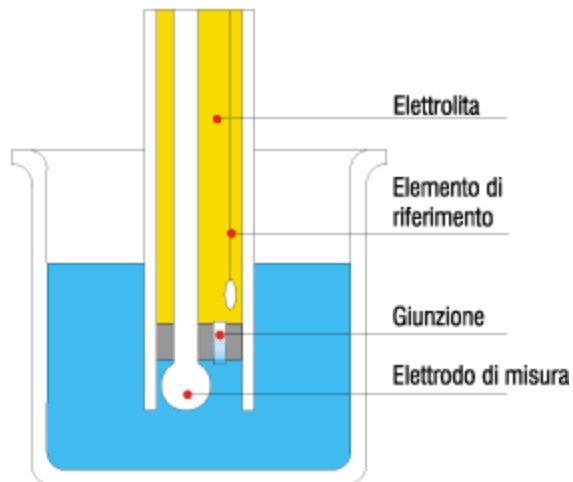
Lo schema elettrochimico complessivo è il seguente

- $\text{Ag} \mid \text{AgCl} \mid \text{soluzione di KCl} \parallel \text{membrana di vetro} \parallel \text{soluzione del campione} \parallel \text{diaframma} \parallel \text{soluzione di KCl} \mid \text{AgCl} \mid \text{Ag}$

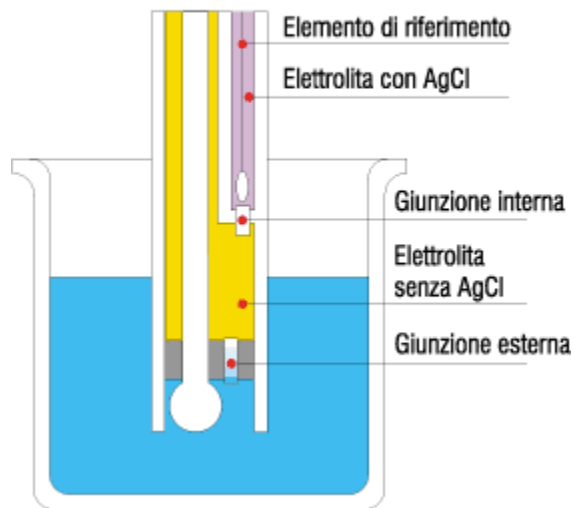




SINGOLA GIUNZIONE



DOPPIA GIUNZIONE



4.2.5.3 - Elettrodi a membrana: l'elettrodo a vetro è solo il primo (ed anche il più diffuso) elettrodo appartenente ad una categoria che si è sviluppata recentemente e che tutt'ora si sta diffondendo: gli elettrodi a membrana, detti anche **elettrodi ionosensibili** (o ionoselettivi o semplicemente selettivi), caratterizzati dalla sigla **ISE** – Ionic Selective Electrode.

Si tratta di elettrodi il cui funzionamento è basato sulla proprietà di certi materiali di scambiare ioni o, in generale, determinate specie chimiche: i materiali in grado di scambiare ioni vengono utilizzati sotto forma di membrana sottile (da cui il nome dell'elettrodo) e la loro selettività dipende dal tipo e del numero di ioni scambiati. Occorre sottolineare che lo stesso meccanismo è alla base del funzionamento dell'elettrodo a vetro, che è infatti in grado di scambiare ioni H^+ con la soluzione in cui è immerso, limitatamente allo strato di gel che si forma sulle due superfici della membrana di vetro.

Negli elettrodi ionoselettivi quando la membrana è posta in soluzione, sulle due facce si formano dei doppi strati elettrici a causa dello scambio ionico e ciò comporta la formazione di potenziali dipendenti dalle specie chimiche che vengono scambiate. Ovviamente la membrana potrà scambiare anche altre specie chimiche (interferenze) oltre a quella per la quale viene utilizzata prevalentemente: tale attitudine è espressa dalla **selettività dell'elettrodo**.

La selettività di un elettrodo a membrana è espressa dall'**equazione di Nicolskj**, generalizzazione della ben nota equazione di Nernst:

$$E = E^0 \pm \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_1^j K_j \cdot a_j^{n/n_j} \right) \quad \text{dove:}$$

Le numerose **tipologie di elettrodi selettivi** si possono così classificare:

- Elettrodi ionoselettivi: il loro potenziale dipende principalmente dall'attività di un determinato ione in soluzione; a seconda delle caratteristiche della membrana si possono dividere in elettrodi a membrana solida e a membrana liquida
- Elettrodi gas-selettivi: sono costituiti da un elettrodo ionoselettivo immerso in una soluzione a contatto con una membrana permeabile ai gas sottoposti ad analisi
- Elettrodi e membrana biocatalitica (biosensori): si ottengono combinando un elettrodo ionosensibile con una membrana biocatalitica, contenente enzimi o batteri che reagiscono con l'analita e formano un prodotto (ione o gas) rilevabile dall'elettrodo ionosensibile.

Elettrodi a membrana o ione-selettivi (ISE)

Tipi di elettrodi ISE:

- elettrodi a membrana di vetro
- elettrodi a membrana liquida
- elettrodi a membrana cristallina

Requisiti fondamentali degli elettrodi ISE

Un elettrodo ISE deve essere:

- ✓ Disponibile commercialmente e di facile costruzione
- ✓ Facilmente maneggiabile
- ✓ Robusto e con scarsa tendenza all'avvelenamento
- ✓ Avere buona riproducibilità e sufficiente *range* di validità
- ✓ Specifico
- ✓ Avere un tempo di risposta accettabile
- ✓ Risposta nernstiana

Elettrodi a membrana di vetro: Elettrodo per il pH

All'interno dell'elettrodo a vetro è contenuto un elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl, che pesca nella soluzione di riferimento di HCl 0,1 M saturata con KCl. La membrana di vetro separa la soluzione interna da quella esterna. Il circuito viene chiuso da un secondo elettrodo di riferimento a calomelano o ad Ag/AgCl, immerso nella stessa soluzione a pH incognito tramite un ponte salino. La differenza di potenziale misurata è quella tra l'elettrodo di riferimento interno e quello esterno.

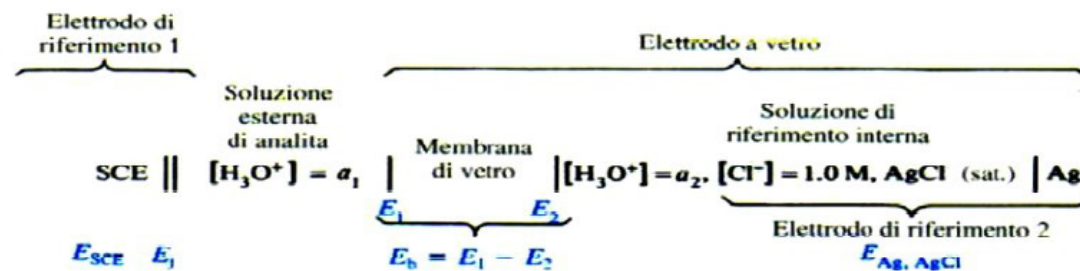
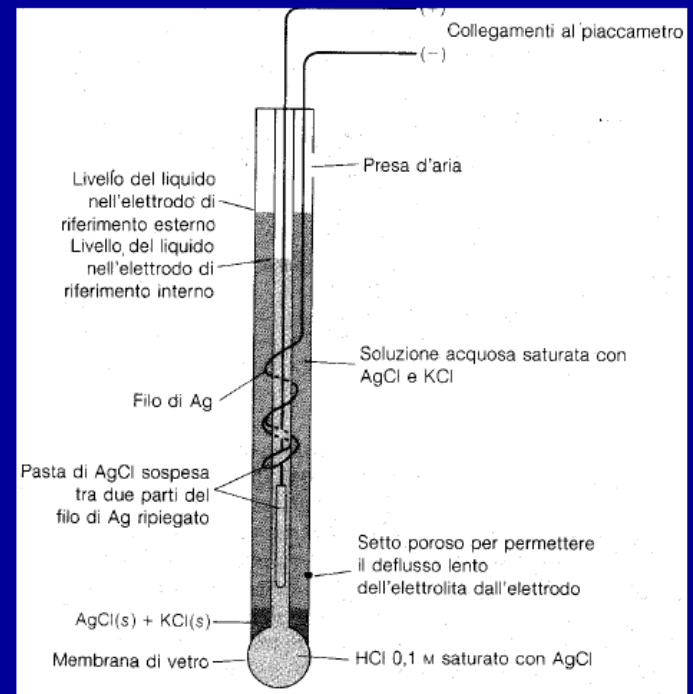


Figura 18-10

Diagramma di una cella elettrodo a vetro/calomelano per la misura del pH.

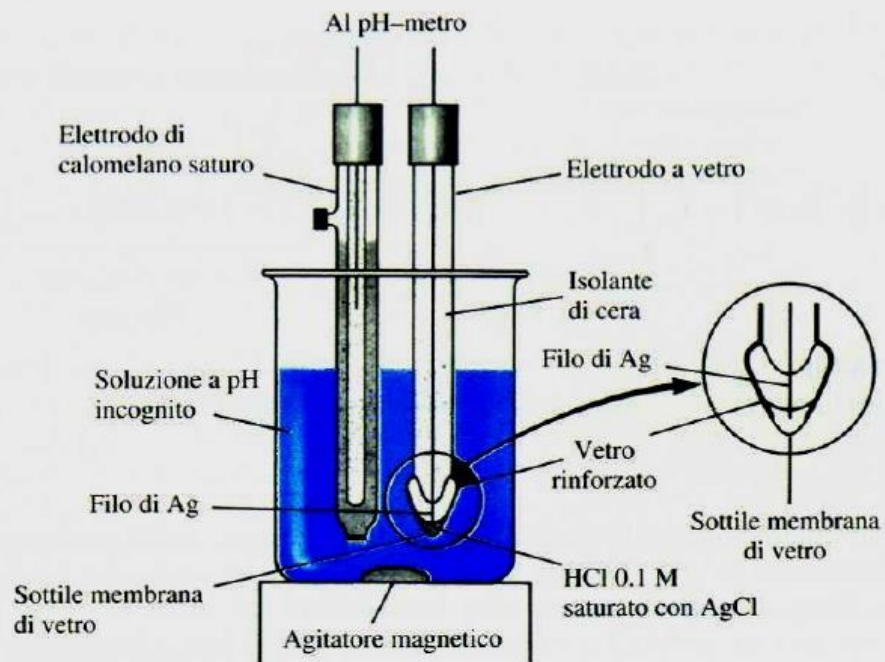
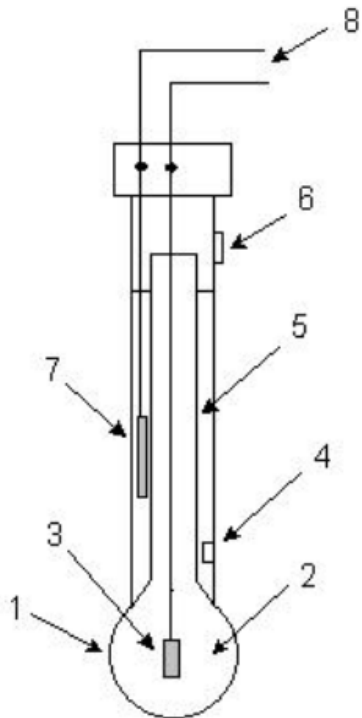


Figura 18-9
 Tipico sistema di elettrodi per la misura del pH.



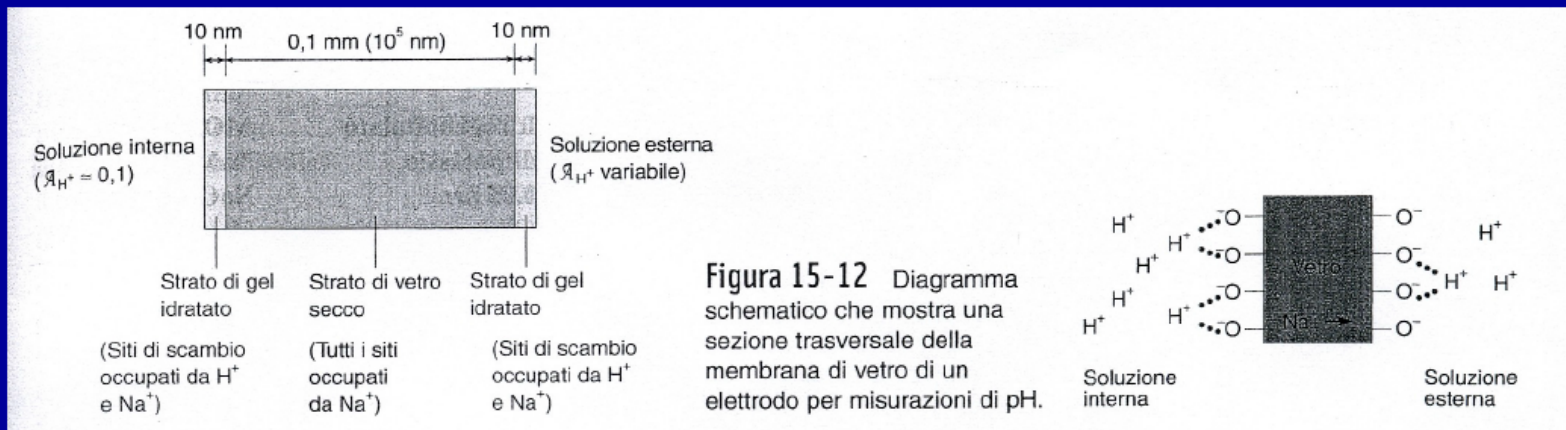
L'uso di elettrodi di misura combinati aumenta la semplicità dell'apparecchiatura e riduce i rischi di rottura durante la misura o la titolazione.



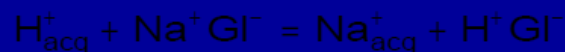
- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| 1 = membrana | 2 = soluzione tampone |
| 3 = riferimento interno | 4 = setto poroso |
| 5 = soluzione di KCl | 6 = bocchetta |
| 7 = elettrodo Ag/AgCl | 8 = cavo coassiale |

Come si vede, la presenza del riferimento interno (Ag/AgCl) consente di misurare il potenziale di membrana E_m ; un secondo elettrodo di riferimento, non comunicante con la soluzione tampone, ma comunicante con l'esterno mediante un setto poroso (necessario per stabilire il contatto elettrico e chiudere il circuito), a potenziale costante, permette di misurare il potenziale dell'elettrodo a vetro E_v senza ricorrere ad un elettrodo esterno di riferimento. Da notare la presenza dello bocchetta di rabbocco periodico della soluzione di KCl, necessaria per il corretto funzionamento del riferimento ad Ag/AgCl

In prima approssimazione, il potenziale dell'elettrodo a vetro dipende dalla composizione della membrana stessa (silice contenente percentuali diverse di ossidi di metalli alcalini e alcalino-terrosi) e dal suo stato di idratazione superficiale; oltre che, naturalmente, dall'attività degli ioni idrogeno nella soluzione interna (nota e costante) e nella soluzione incognita, a_{H^+} .



Affinché lo scambio sia possibile, è necessario che le due superfici della membrana siano idratate. L'idratazione avviene mediante reazioni di scambio ionico



Nonostante la misurazione del pH sia forse la più comune in campo chimico, essa è soggetta a numerosi tipi di limitazioni.

- **L'errore alcalino.** L'elettrodo a vetro ordinario diventa sensibile agli ioni di metalli alcalini e dà letture basse a valori di pH maggiori di 9.
- **L'errore acido.** I valori registrati dall'elettrodo a vetro tendono ad essere un po' alti quando il pH è inferiore a circa 0.5.
- **La disidratazione.** Una membrana disidratata può provocare una irregolare prestazione dell'elettrodo.
- **La forza ionica insufficiente.** Si è trovato che errori significativi (di 1 o 2 unità di pH) possono verificarsi quando il pH di campioni a bassa forza ionica, come l'acqua di lago o di torrente, viene misurato con un sistema di elettrodi vetro/calomelano. È stato dimostrato che la fonte primaria di tali errori è l'irriproducibilità dei potenziali di giunzione.
- **Il pH dei tamponi standard.** Qualsiasi imprecisione nella preparazione del tampone usato per la calibrazione o qualsiasi cambiamento nella sua composizione durante la conservazione provoca un errore nelle successive misure del pH. L'azione dei batteri sui componenti di un tampone organico costituisce una comune causa di deterioramento.

Misure potenziometriche con elettrodi ione selettivi (ISE ion Selective Electrode)

- Basati sullo stesso principio del pHmetro (scala logaritmica)
- **Materiale attivo del bulbo:** vetri o Sali organici insolubili (devono permettere lo scambio cationico all'interfaccia)
- ✓ **Alluminosilicati per cationi monovalenti : Na+, Li+, NH4+,.**
- ✓ Sali organici insolubili come il solfuro di argento per rame, piombo, cadmio,..
- Tali materiali di scambio ionico vengono incorporati in **PVC** dando una membrana solida e degli strumenti per la misura del **calcio, potassio, nitrati**

attenzione alla temperatura ed alle pellicole di proteine!!

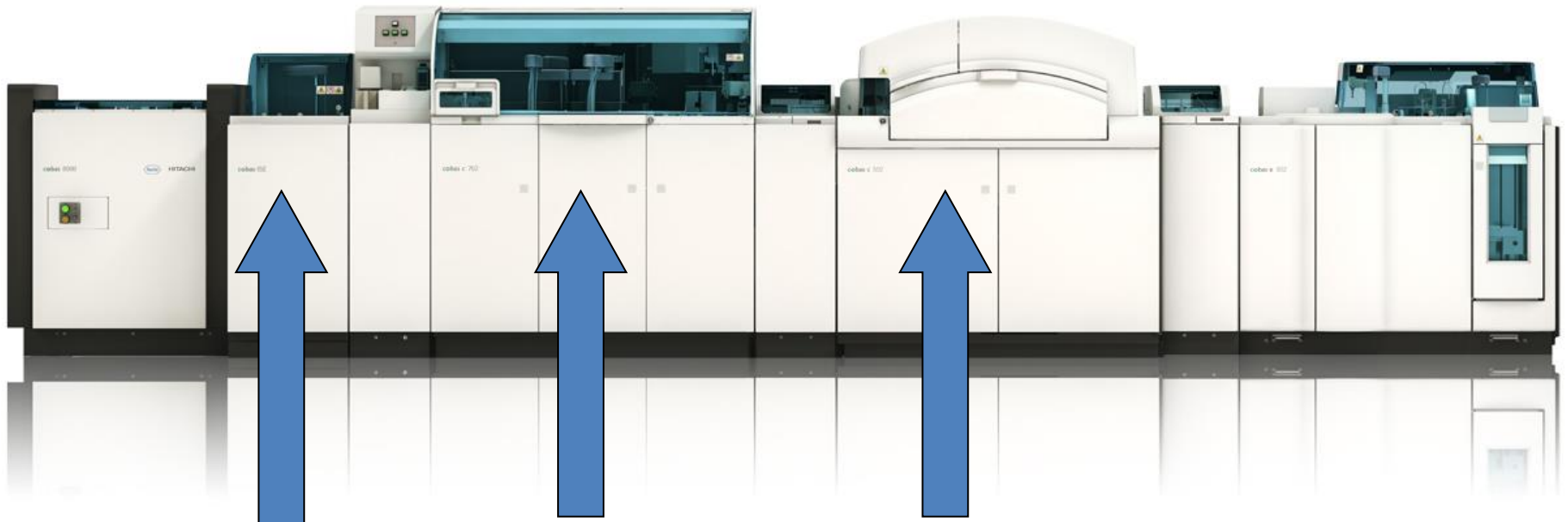


21. - 1

Tab. 1.3. Elettrodi a ioni selettivi della ditta Orion

Ione sensibile	Tipo	Campo di concentrazione (M)	Attività limite
Ammoniaca	Diffusione	$10^0 - 10^{-6}$	10^{-6}
Bromuro	Monocristallo	$10^0 - 5 \cdot 10^{-6}$	10^{-6}
Cadmio	Monocristallo	$10^0 - 10^{-1}$	10^{-10}
Calcio	Liquido	$10^0 - 10^{-1}$	10^{-6}
Cloruro	Monocristallo	$10^0 - 5 \cdot 10^{-5}$	10^{-6}
Rameico	Monocristallo	$10^0 - 10^{-1}$	10^{-1}
Cianuro	Monocristallo	$10^{-2} - 10^{-6}$	10^{-6}
Fluoruro	Combinato	$10^0 - 10^{-1}$	10^{-6}
Ioduro	Monocristallo	$10^0 - 2 \cdot 10^{-1}$	10^{-10}
Piombo	Monocristallo	$10^0 - 10^{-7}$	10^{-7}
Potassio	Liquido	$10^0 - 10^{-5}$	10^{-5}
Sodio	Monocristallo	$10^0 - 10^{-6}$	10^{-6}
Sodio	Combinato	$10^0 - 10^{-6}$	10^{-1}

ISE COBAS (Roche)



fotometria

ECLIA

Potenziometria (ISE)

ISE

CARATTERISTICHE ANALITICHE

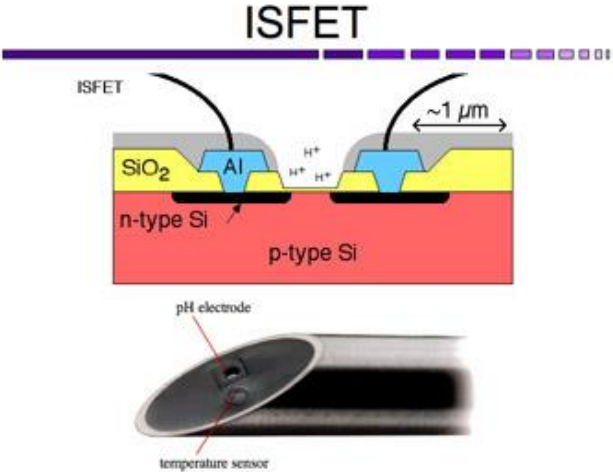
Le prestazioni di un elettrodo iono-selettivo si valutano attraverso i seguenti parametri:

- **sensibilità:** dovrebbe valere circa $59,16 / n$ mV / unità pIone, ammettendo che l'elettrodo abbia una sensibilità prossima al 100%
- **limite di rivelabilità:** si aggira mediamente, per elettrodi efficienti, intorno a valori limite di 10^{-6} moli/l
- **intervallo di linearità:** si aggira mediamente tra 1 e 10^{-4} moli/l
- **precisione:** dipende dalla precisione del mVmetro di misura che, per l'uso con questi elettrodi, deve avere una precisione di 0,1 mV

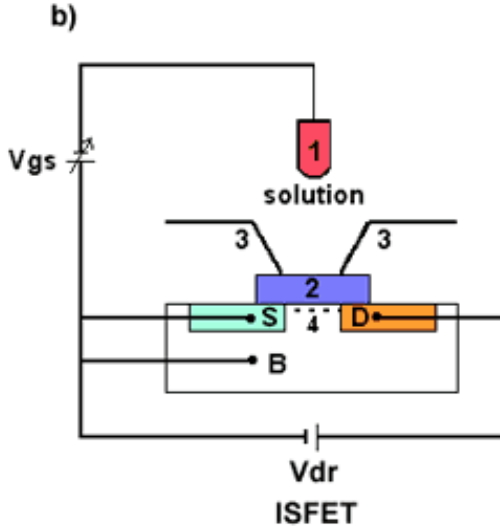
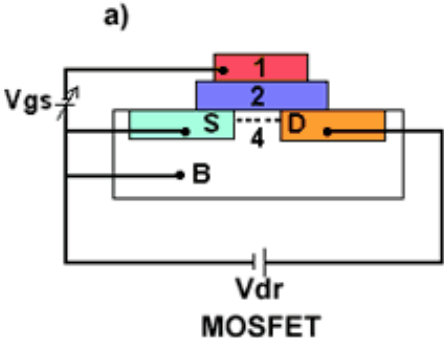
Limitano però i risultati, molte interferenze aspecifiche e specifiche. Per quanto riguarda queste ultime, si deve dire che è inevitabile che ioni aventi carica e ingombro sterico simile all'analita, siano in grado di scambiare con la membrana, determinando variazioni del potenziale di membrana. Uno svantaggio dell'uso di questi elettrodi, è costituito dalla vita piuttosto breve delle membrane e quindi degli elettrodi stessi, che portano ad oscillazioni anche notevoli nel tempo, della costante di elettrodo.

Sviluppo dei transistori ioni selettivi ad effetto di campo (tecnologia ISFET Ion Selective Field Effect Transistor)

con miniaturizzazione elettrodi (H⁺ Na⁺ K⁺ Ca²⁺ ...)



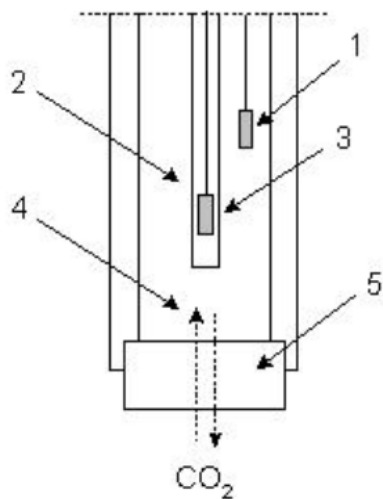
- 1: reference
- 2: gate oxide
- 3: insulating resin
- 4: channel
- S: source
- D: drain
- B: bulk



Misura di gas in soluzione

- Si possono usare dei pHmetri modificati
- Interfaccia costituita da una sottile membrana di teflon
- **L'anidride carbonica, l'ammoniaca, l'ossido di azoto,.. fanno variare il pH della pellicola liquida attorno all'elettrodo**

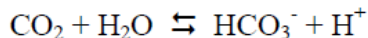
4.2.5.3.3 – Elettrodi gas-selettivi: sono costituiti da una membrana permeabile ai gas ma impermeabile agli ioni che separa la soluzione analitica da una soluzione interna a diretto contatto con un opportuno elettrodo ionoselettivo, che possiede al suo interno un proprio elettrodo di riferimento; inoltre, lontano dalla membrana, è presente un secondo elettrodo di riferimento esterno. La membrana permeabile è molto sottile (0,1÷0,01 mm) per favorire una elevata velocità di diffusione del gas; anche la soluzione interna ha uno spessore molto piccolo per limitare i tempi di risposta. Come esempio si considera un **elettrodo sensibile alla CO₂**:



- 1: elettrodo di riferimento
- 2: elettrodo ionoselettivo (elettrodo a vetro)
- 3: elettrodo di riferimento interno all'elettrodo ionoselettivo
- 4: soluzione elettrolitica interna
- 5: membrana permeabile ai gas

In questo elettrodo la membrana è di Teflon spugnoso, idrofobica; la soluzione interna è costituita da NaHCO₃ 0,01 M ed NaCl 0,1 M (necessario per il riferimento esterno, di norma un elettrodo ad Ag/AgCl); l'elettrodo ionoselettivo è un normale elettrodo a vetro.

Nella soluzione interna si stabilisce il seguente equilibrio:



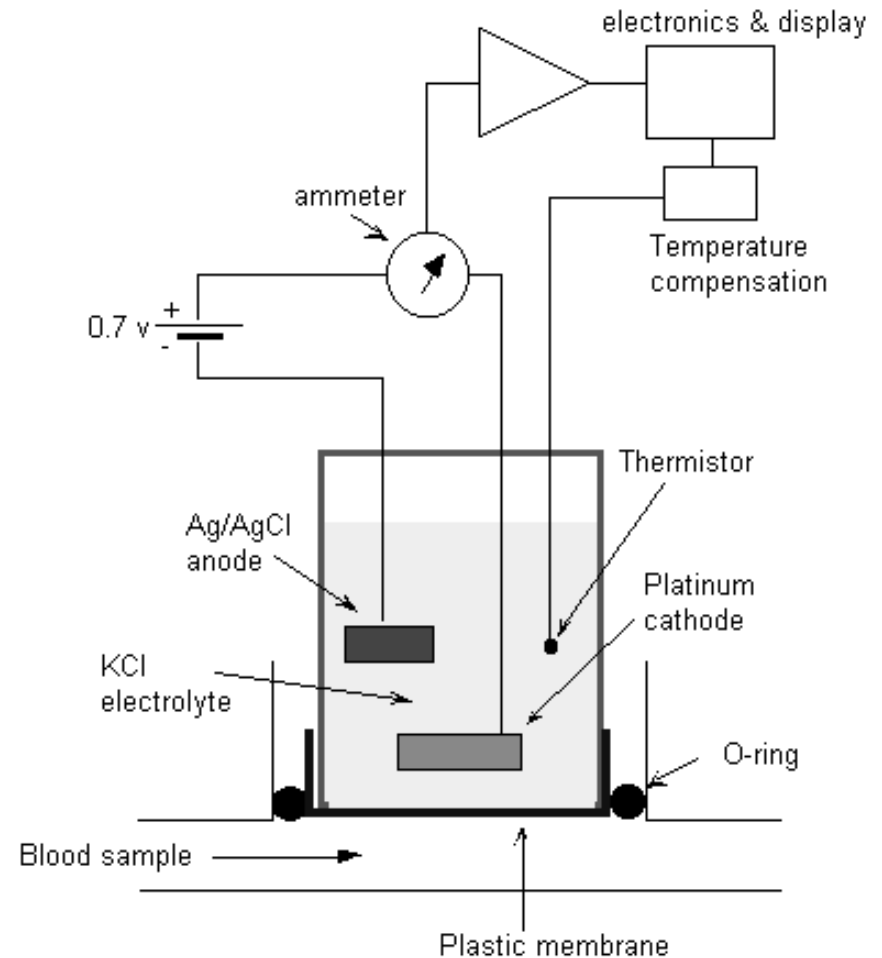
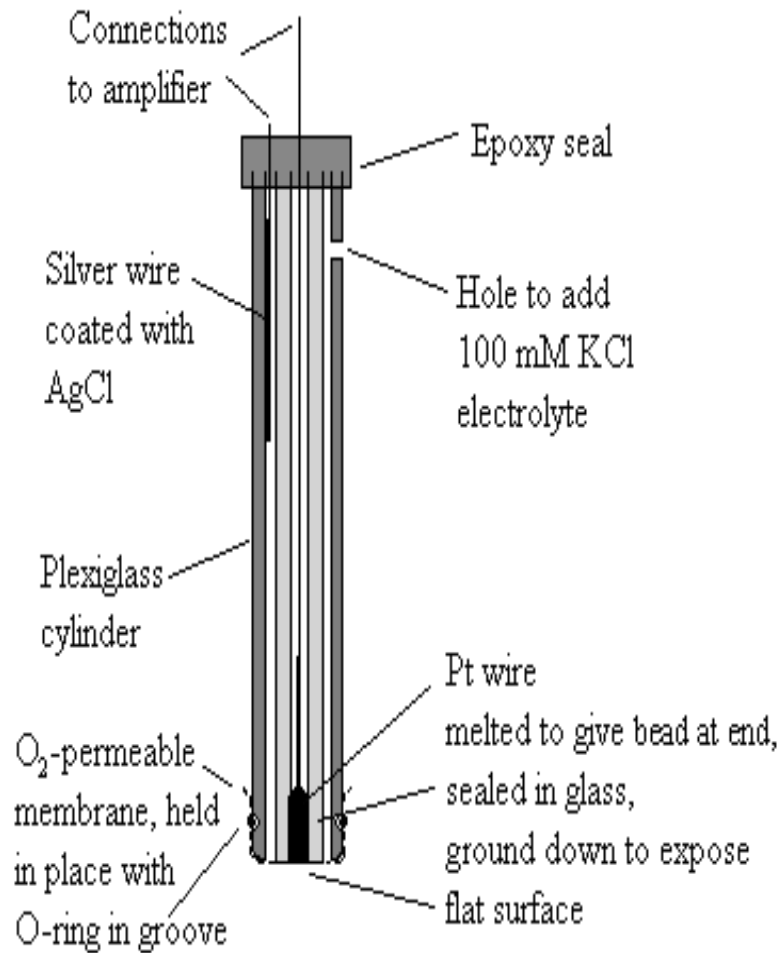
Quando l'elettrodo viene immerso nel campione la diffusione della CO₂ al suo interno provoca una rapida variazione di pH che viene rilevata dall'elettrodo a vetro: la risposta dell'intero sistema è perciò legata alla concentrazione di CO₂ nel campione, che può essere valutata mediante un'apposita retta di lavoro. Interferiscono gli acidi organici in grado di permeare la membrana.

Sono commercializzati elettrodi gas-selettivi sensibili a varie specie chimiche gassose come: CO₂, NH₃, SO₂, H₂S, HCN.

Misura della pressione parziale di ossigeno (Elettrodo di Clarke)

- **Misurazione voltammetrica anodica (amperometrica)**
- Catodo di platino
- Anodo di Ag-AgCl
- Soluzione di tampone fosfato con KCl (per stabilizzare l'anodo)
- Gli elettrodi sono separati dalla soluzione di misura da una sottile membrana di polipropilene a permeabilità selettiva per l'ossigeno (20 mcm)
- Ai due elettrodi si applica una tensione di polarizzazione costante di circa 650 mV
- L'ossigeno che diffonde sull'anodo viene ridotto sull'elettrodo
- **Il flusso di elettroni richiesto per ridurre l'ossigeno e riportare in equilibrio il sistema viene misurato come una corrente che risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'ossigeno disciolto**
- La risposta è lineare
- Sensibilità +- 5 mmHg
- Accuratezza ottima

Elettrodo di Clarke



COBAS 123



ACIDO/BASE 37.0°C

pH 7.343
PCO2 38.7 mmHg
PO2 ↓ 66.4 mmHg
tCO2 21.7 mmol/L
HCO3 20.5 mmol/L
BEecf -5.2 mmol/L

ELETTROLITI

Na+ 139.5 mmol/L
K+ 4.85 mmol/L
Ca++ 1.16 mmol/L

STATO EMOGLOBINA/OSSIGENO

tHb 12.4 g/dL
SO2 92.9 %
Hct(c) 37.1 %
SO2(c) 91.2 %

Emogasanalisi avvertenze

- **Sangue arterioso o venoso eparinato**
- **Analisi a caldo entro 30-60 minuti**
- **Conservazione in ghiaccio ed analisi entro 2-3 ore**
- **Eliminare bolle d'aria**
- **Verificare coaguli**
- **Riscaldare e ruotare prima del processing
(variazione nella tensione dei gas e nel pH)**

Numero di massa
*massa espressa in Daltons
 contribuita dai protoni + neutroni
 presenti nel nucleo atomico*

A
E
Z
 Simbolo dell'elemento

Numero atomico
*numero dei protoni presenti
 nel nucleo*

Numero atomico

7

N

Azoto
14,0067

[He] 2s² 2p³

Simbolo atomico
 Nome dell'elemento
 Peso atomico

Configurazione elettronica

numero di massa (p⁺ + n⁰)

A

numero atomico (p⁺)

Z X

simbolo chimico

Carbonio-12

¹²₆C

Ossigeno-16

¹⁶₈O

Uranio-238

²³⁸₉₂U

Numero atomico e numero di massa

Il **numero atomico** di un **elemento** è costituito dal **numero di protoni** che si trovano nel nucleo

Il **numero di massa** di un **atomo** è dato dalla **somma del numero di protoni e di neutroni**

Carbonio

Numero atomico = 6

⇒ }
 6 protoni
 6 neutroni
 6 elettroni

Numero di massa = 12

Carbon Atom

protons = 6

neutrons = 6

6 + 6 = 12

Atomic Mass = 12

● - neutron
 ● - proton
 ● - electron

wikiHow

Isotopi

Un isotopo è un atomo di uno stesso elemento chimico, e quindi con lo stesso numero atomico Z, ma con differente numero di massa A, e quindi differente massa atomica M. La differenza dei numeri di massa è dovuta ad un diverso numero di neutroni presenti nel nucleo dell'atomo a parità di numero atomico. Il rame ad esempio presenta due isotopi che possono essere così rappresentati:

⁶³
Cu
 29

Rame-63

⁶⁵
Cu
 29

Rame-65

Abbondanza naturale del Carbonio		
Isotopo	Concentrazione	t _{1/2}
¹² C	98,99 %	stabile
¹³ C	1,11 %	stabile
¹⁴ C	1 · 10 ⁻¹⁰ %	5730 anni

Spettrometria di massa

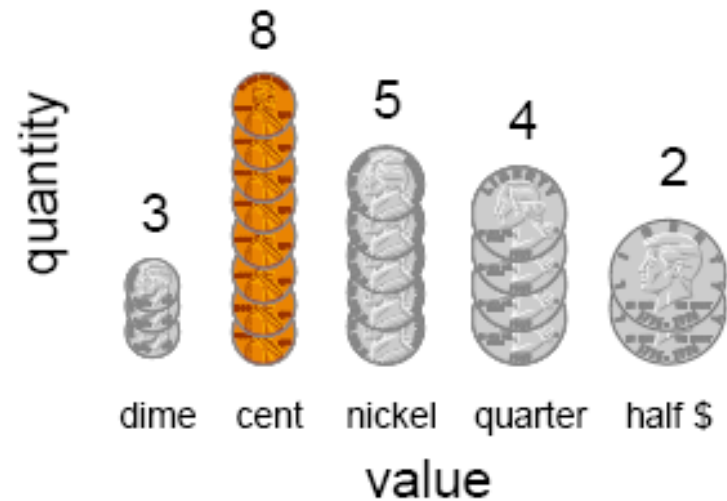
- *Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica.*
- *Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto.*

Concept : Mass analysis

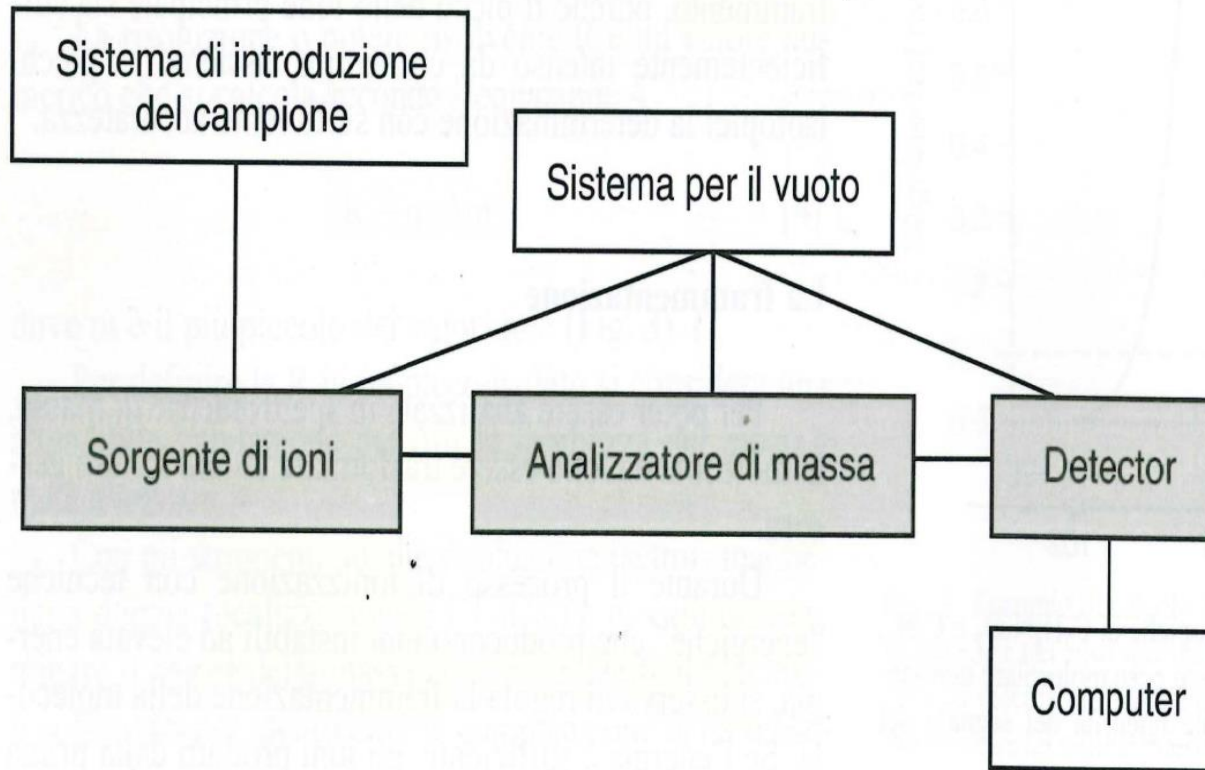
- **Sorting and Counting**

- *Pocket change (mixture of coins)*
- *Penny, dime, nickel, quarter, half \$*
- *Sorting change by value or size*
- *Concept of visual interpretation*

- *Mixture of molecules*
- *Molecules of different weight, size*
- *Separation by mass*
- *spectrum*



Spettrometria di massa schema tecnico generale



SM Ionizzazione

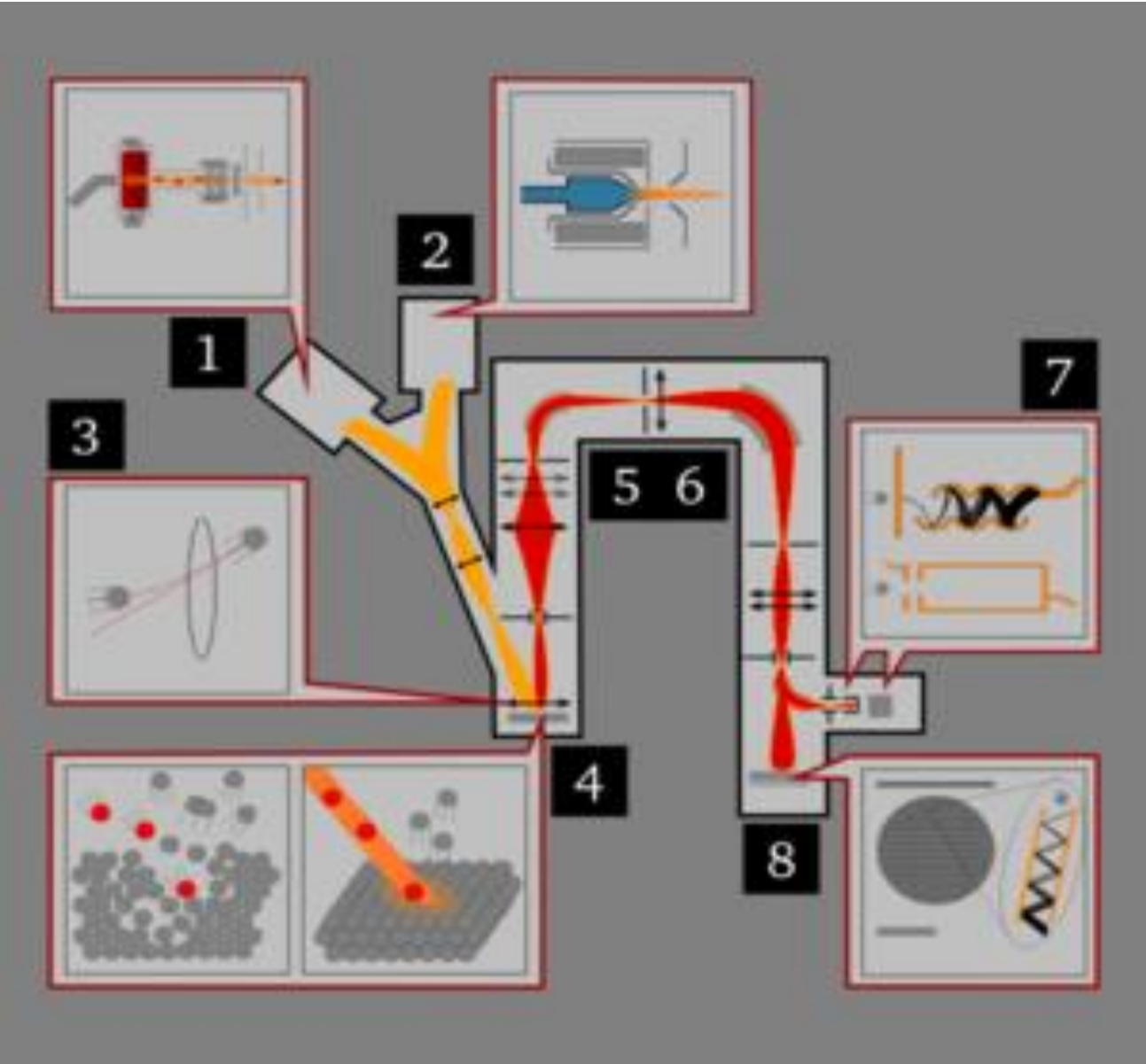
TABELLA III. Le diverse tecniche di ionizzazione usate nella spettrometria di massa

EI	<i>Electron Impact Ionization</i>	Ionizzazione elettronica (o Ionizzazione a impatto elettronico)
CI	<i>Chemical Ionization</i>	Ionizzazione chimica
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>	Bombardamento con atomi veloci
LSIMS	<i>Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry</i>	Spettrometria di massa di ioni secondari in fase liquida
FD	<i>Field Desorption</i>	Desorbimento di campo
PD	<i>Plasma Desorption</i>	Desorbimento al plasma
LD	<i>Laser Desorption</i>	Desorbimento con laser
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization</i>	Ionizzazione mediante desorbimento al laser assistita da matrice
TSP	<i>Thermospray</i>	Ionizzazione spray termico
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	Ionizzazione elettrospray
SELDI	<i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionization</i>	Ionizzazione mediante desorbimento al laser su superficie arricchita
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>	Ionizzazione chimica a pressione ambiente

SM Analizzatori

TABELLA IV. Tipologia e caratteristiche degli analizzatori di massa

	<i>Risoluzione</i>	<i>Tipo risoluzione</i>	<i>Accuratezza</i>	<i>Tipo accuratezza</i>	<i>Limite max rapp. m/z</i>	<i>Tipo range di massa</i>
Quadrupolo	1.000-2.000	Bassa	0,1 u	Bassa	500-3000	Bassa
Trappola ionica	1.000-2.000	Bassa	0,1 u	Bassa	500-3000	Bassa
TOF	500-1.000	Bassa/Alta	0,0001u	Alta	500->10 ⁶	Alta
	2.000-10.000					
Settore magnetico	5.000-100.000	Alta	0,0001u	Alta	1.000-15,000	Media
FT-MS	5.000-1.000.000	Alta	0,0001u	Alta	1.000-10.000	Media



The MALDI Concept

*The
concept:*

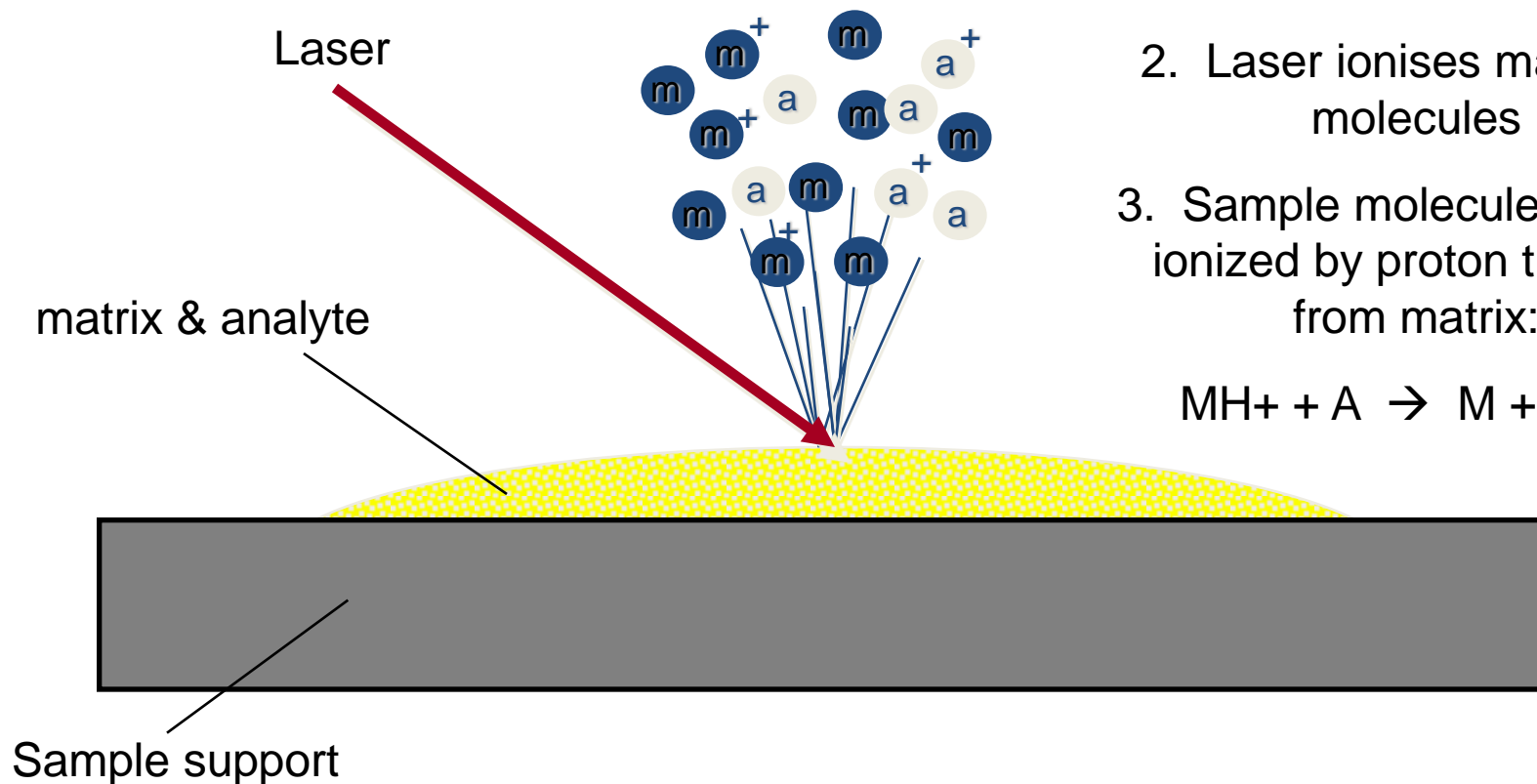
- mixing of an analyte and a matrix

*The
result:*

- Generation of gas phase ions

MALDI Mechanism

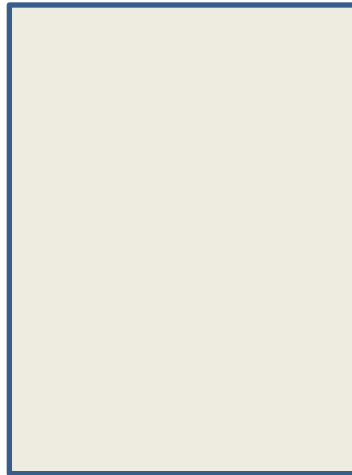
1. Sample (A) is mixed with excess matrix (M) and dried on a MALDI target
2. Laser ionises matrix molecules
3. Sample molecules are ionized by proton transfer from matrix:



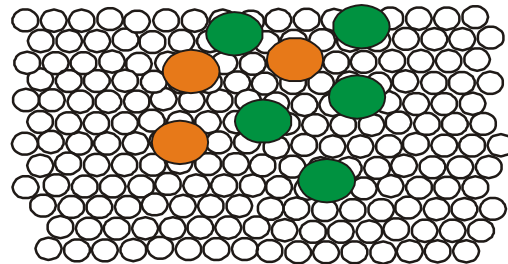
MALDI-TOF MS: basic principles

At a glance

ion detector



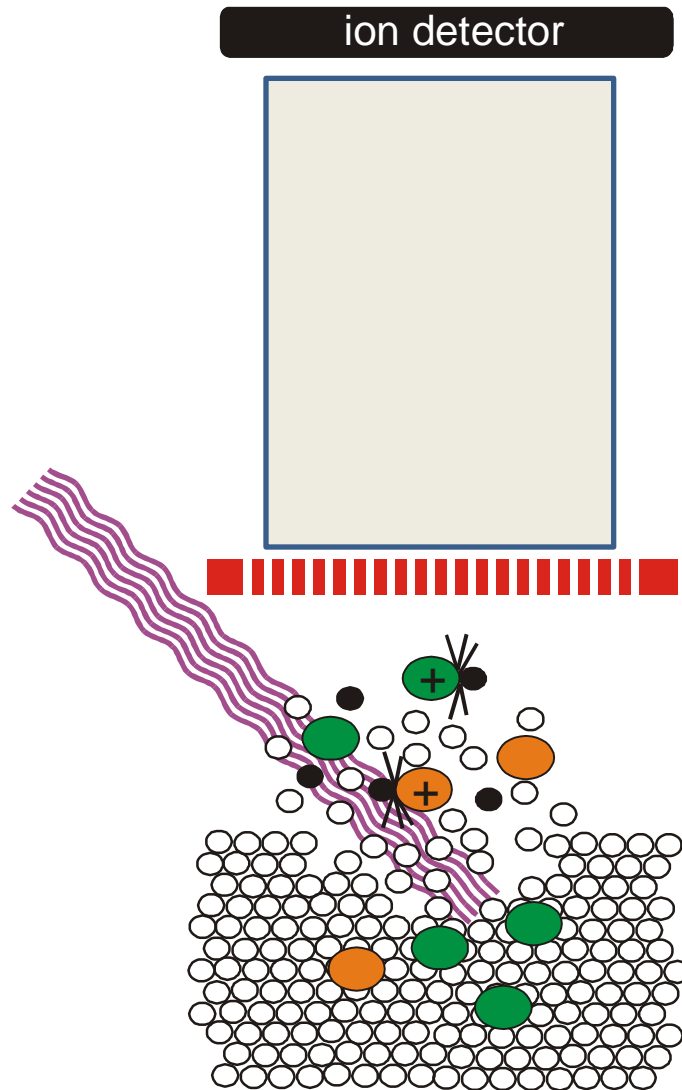
in vacuum
< 10^{-7} Torr (1 atm=760 torr)



analyte molecules
incorporated in
matrix crystals

MALDI-TOF MS: basic principles

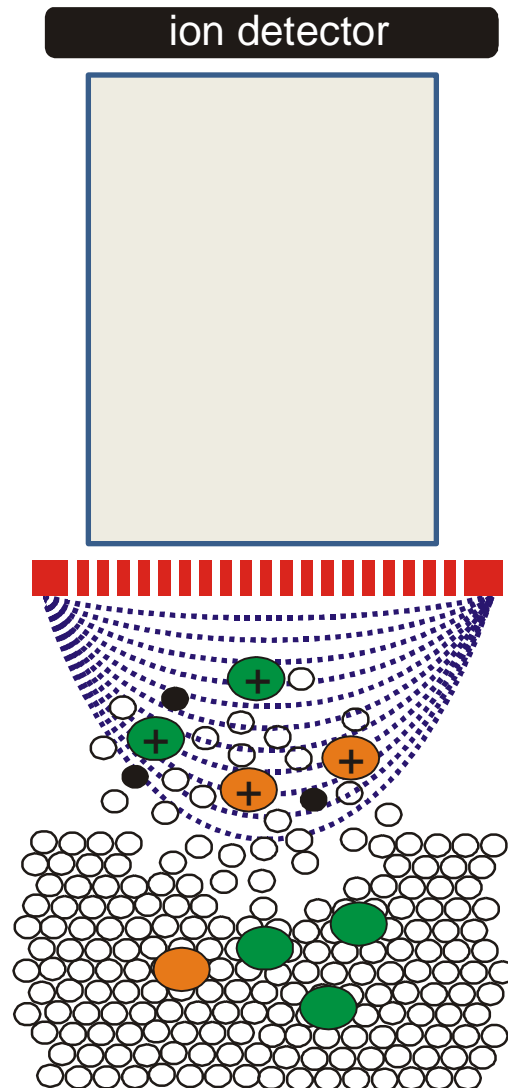
At a glance



laser pulse:
desorption of matrix and
analyte molecules,
ionization by charge
transfer

MALDI-TOF MS: basic principles

At a glance

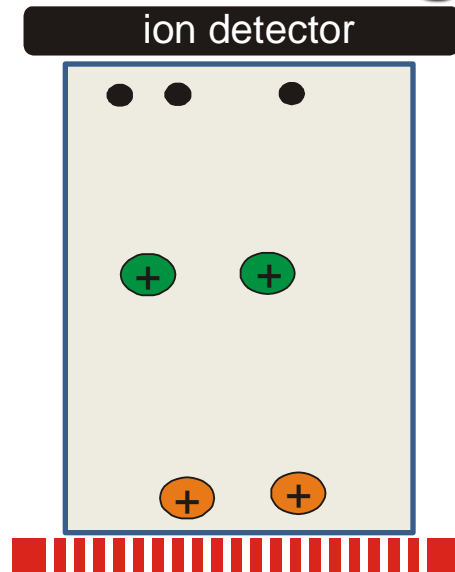


build-up of an
electromagnetic field

acceleration of ions

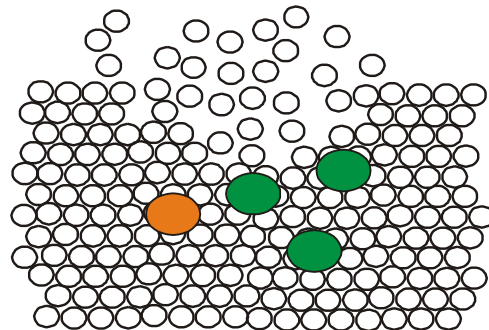
MALDI-TOF MS: basic principles

At a glance



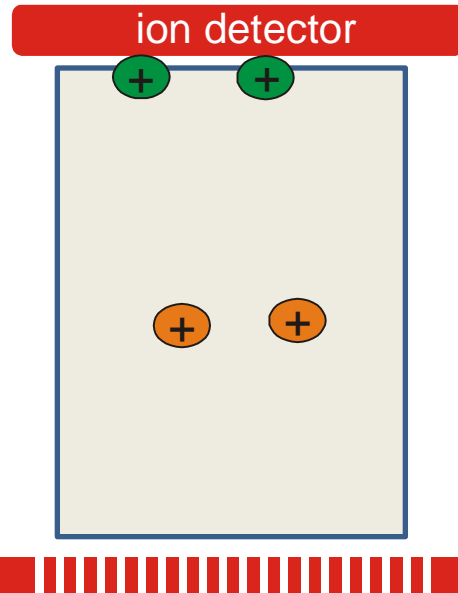
separation of ions in a
field free drift range of a
fixed length by velocity
(Time Of Flight)
 $L \approx 1 \text{ m}$

no further acceleration!



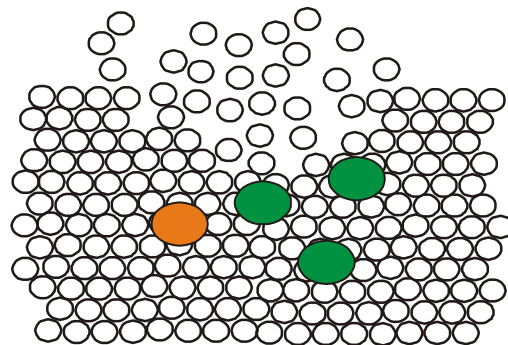
MALDI-TOF MS: basic principles

At a glance



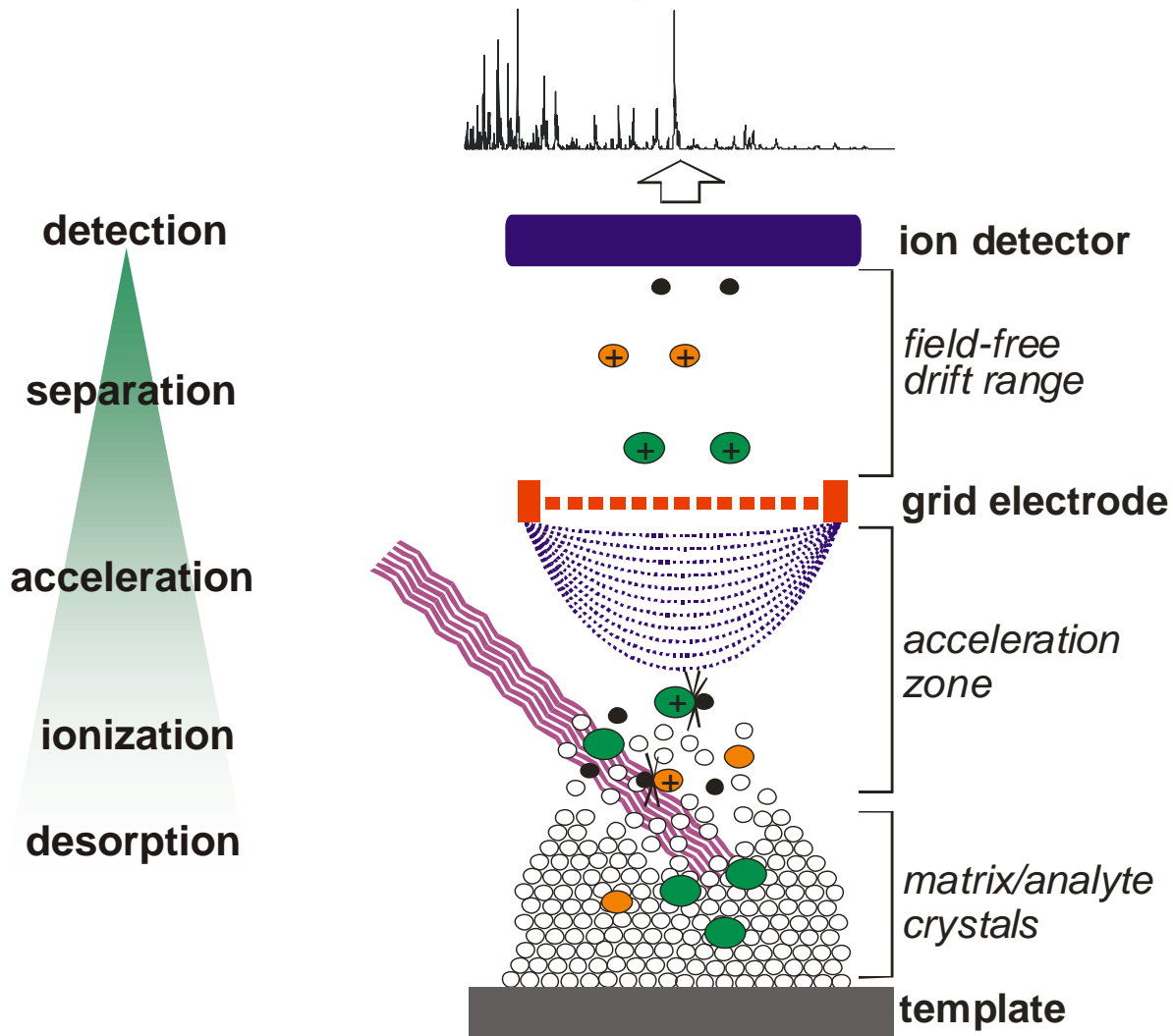
detection
of ions at a detector

time resolved output to
oscilloscope and computer



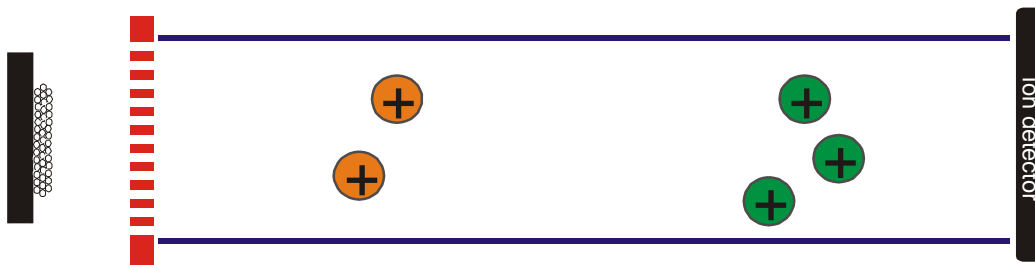
MALDI-TOF MS: basic principles

At a glance



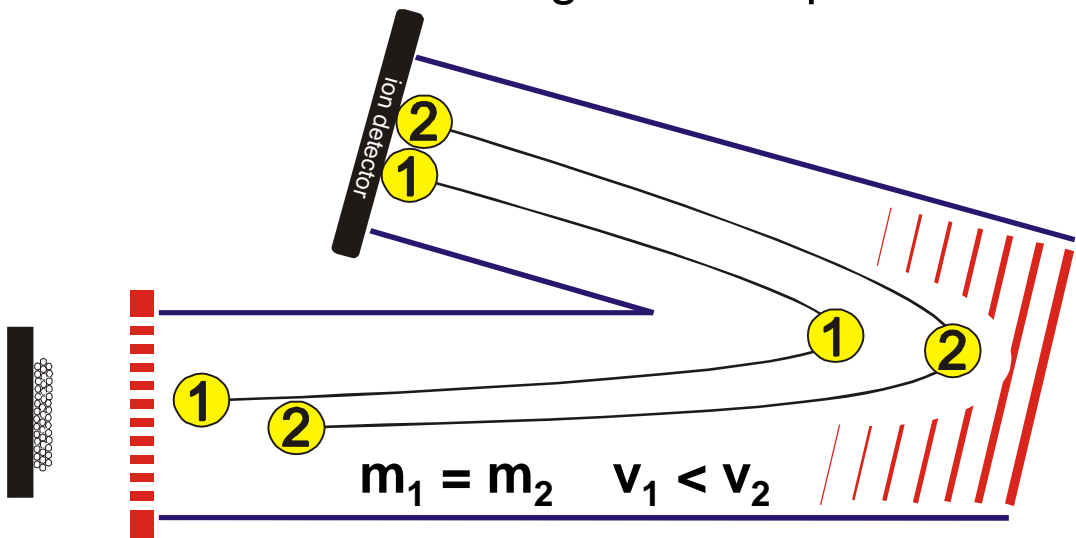
MALDI-TOF MS: Linear and reflector modes

Linear time-of-flight mass spectrometer



- mass range up to 350 kDa
 - high sensitivity
 - low resolution

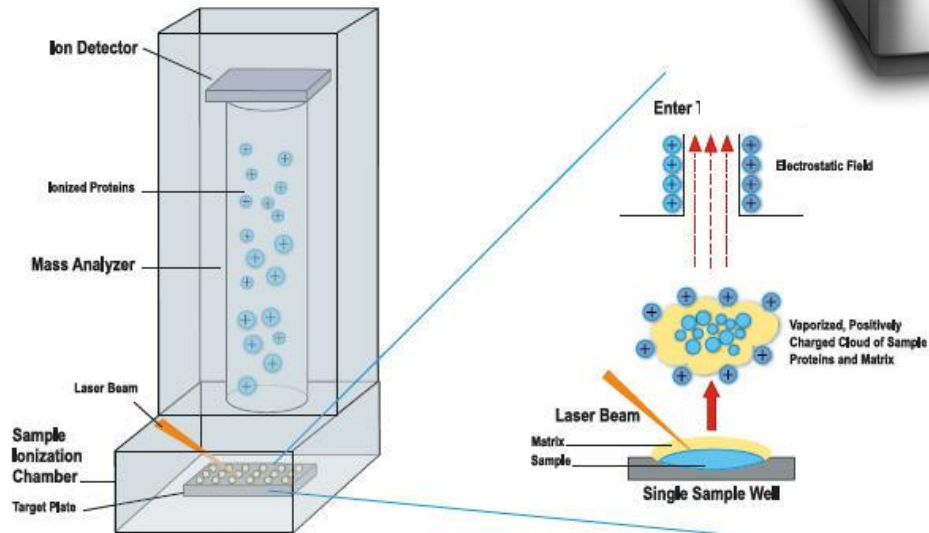
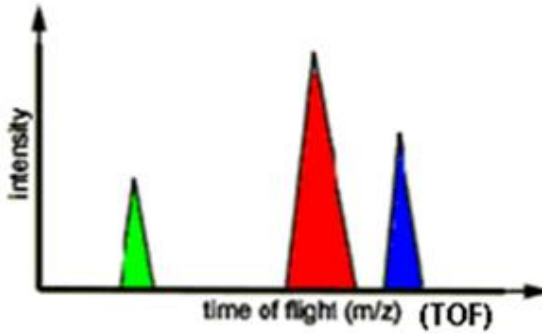
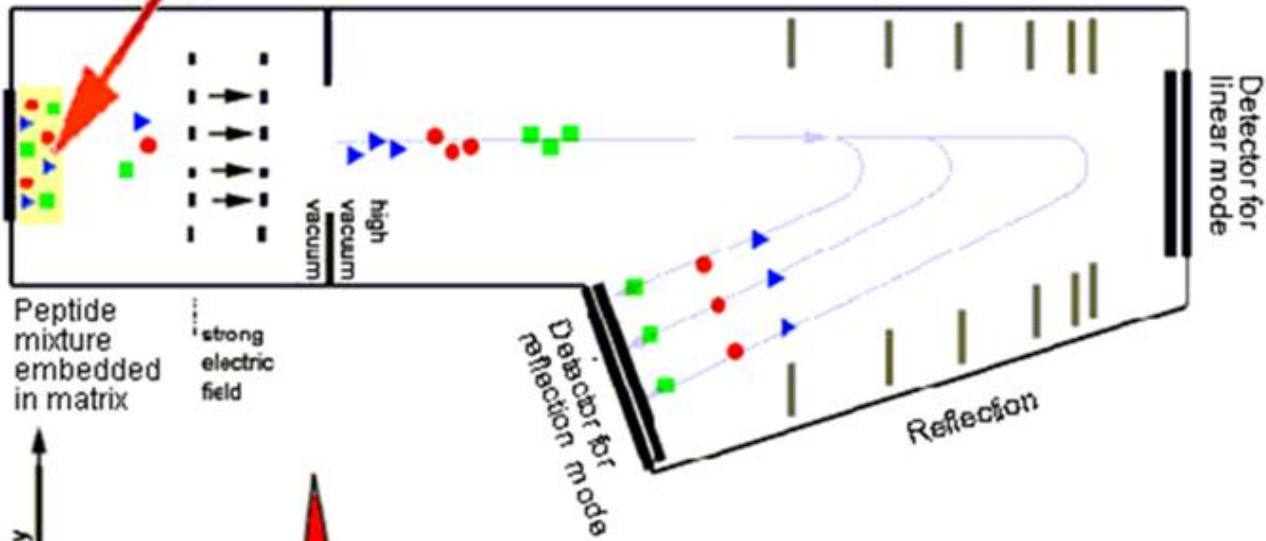
Reflector time-of-flight mass spectrometer



- mass range up to 5000 Da
 - low sensitivity
 - high resolution

MALDI

TOF (Time of Flight) detection





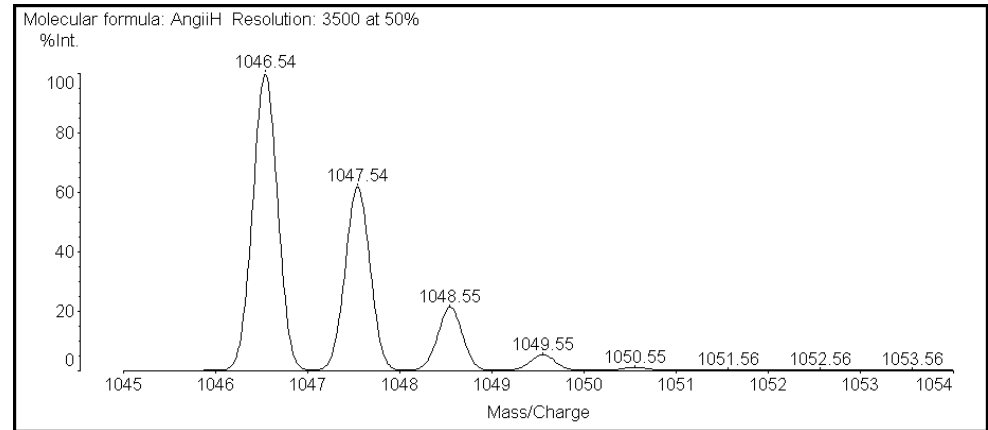
Mass Resolution

High resolution:

Isotopic distribution

Accurate mass

Angiotensin II most abundant peak: 1046.54 Da



Low resolution:

Isotope limited

Angiotensin II average mass: 1047.2 Da

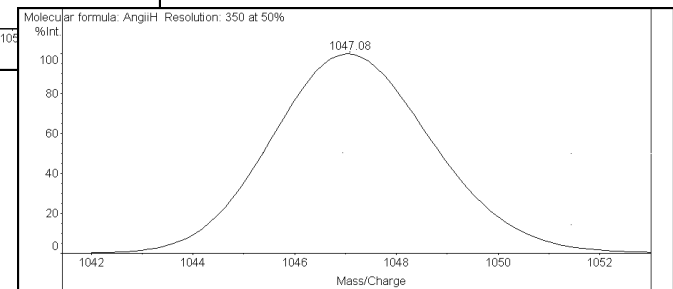
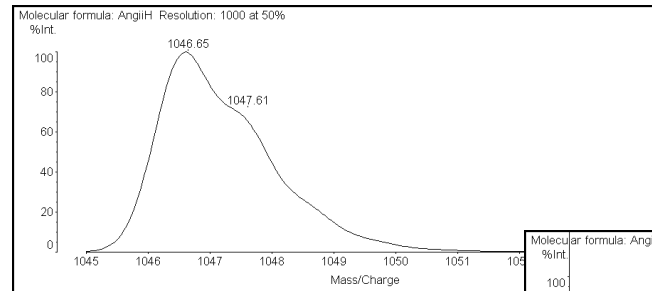


TABELLA V. Alcuni dei biomarcatori di neoplasia dosati con spettrometria di massa

<i>Organo</i>	<i>Campione</i>	<i>Biomarker proteico</i>	<i>sens</i>	<i>spec</i>	<i>Tecnologia MS</i>
Mammella	Siero**	C ₃ adesArg	93	91	SELDI-TOF
	Siero**	Kininogeno ad alto PM; apolipo A-II	94	81	SELDI-TOF
	Siero*	3 picchi (4,3-8,1KDA)	93	91	SELDI-TOF
	Aspirato**	Hb catena β			SELDI-TOF
	Aspirato**	Vit D binding protein			LCMSMS
Ovaio	Siero**	Aptoglobina subunità α			SELDI-TOF
	Plasma**	Apolipo AI; Transthyretina inib α -tripsina catena pesante H4	74	97	SELDI-TOF
	Plasma**	Hb catena α e β ; transferrina			LCMSMS
	Plasma**	Amiloidea 1 Fibrinopeptide A			SELDI-TOF
	Plasma*	3 picchi + Ca125			SELDI-TOF
	Plasma*	Pattern complesso	100	95	SELDI-TOF
Endometrio	Tessuto**	Chaperonina 10; α 1-antitripsina	95		LCMSMS
	Plasma*	13 picchi	100	95	SELDI-TOF
Colon-retto	Cellule**	Protimosina α ; Apo-CI; Apo-AI			SELDI-TOF
	Siero*	2 picchi 4-8 kDa	95	95	SELDI-TOF
	Tessuto**	Vimentina			MALDI-TOF
Prostata	Siero**	Zn- α 2-glicoproteina			LCMSMS
	Siero*	9 picchi (4,4-9,5 kDa)	83	97	SELDI-TOF
	Siero*	21 picchi	97	97	SELDI-TOF
Pancreas	Siero*	4 picchi (8,7-14,8 kDa)	91	91	SELDI-TOF
	Siero*	4 picchi (8,7-14,8 kDa) + CA19-9	100		SELDI-TOF
Vescica	Siero*	5 picchi (3,3-133 kDa)	78		SELDI-TOF
Polmone	Siero*	48 Picchi	89	91	SELDI-TOF
Stomaco	Siero*	3 picchi	96	92	SELDI-TOF

N.B. Non sono riportati i singoli Autori, ma i dati desunti da *Roboz J 2005 (43) e da **Lu M. 2008(44) I dati di sensibilità e specificità non sono relativi alla popolazione generale ma alla coorte di valutazione e di apprendimento del test.

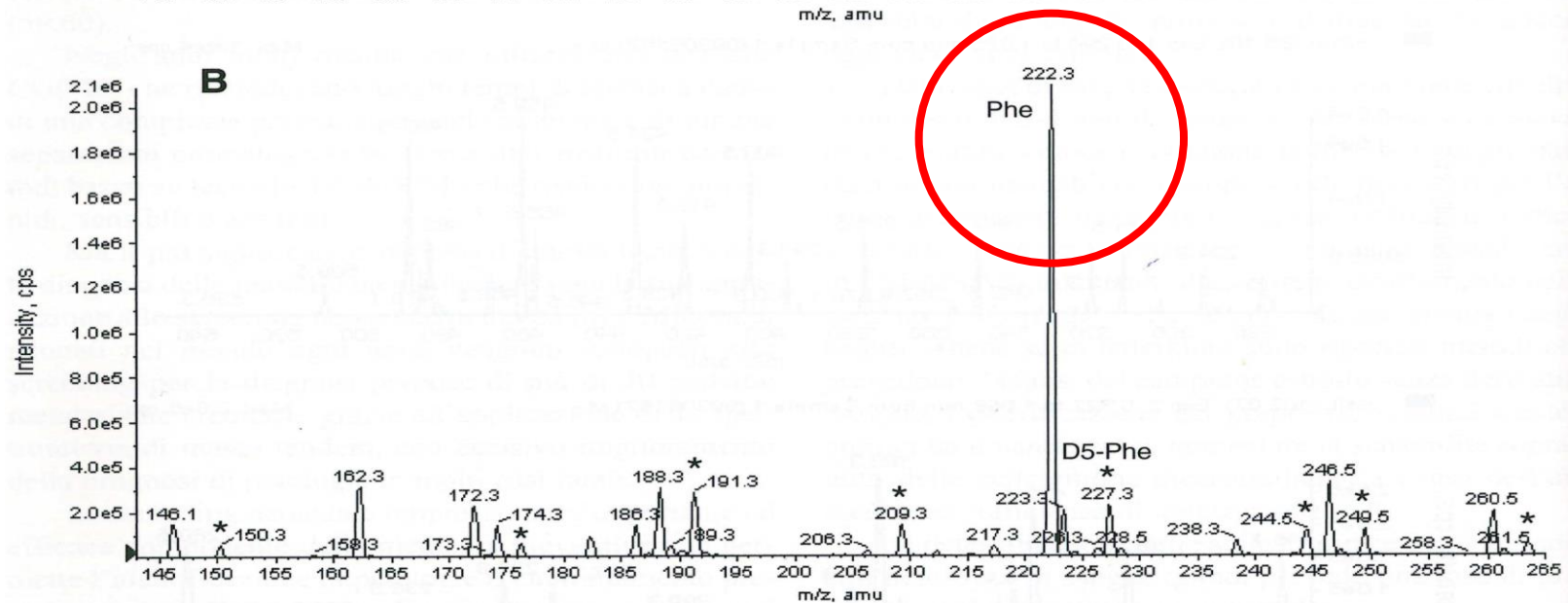
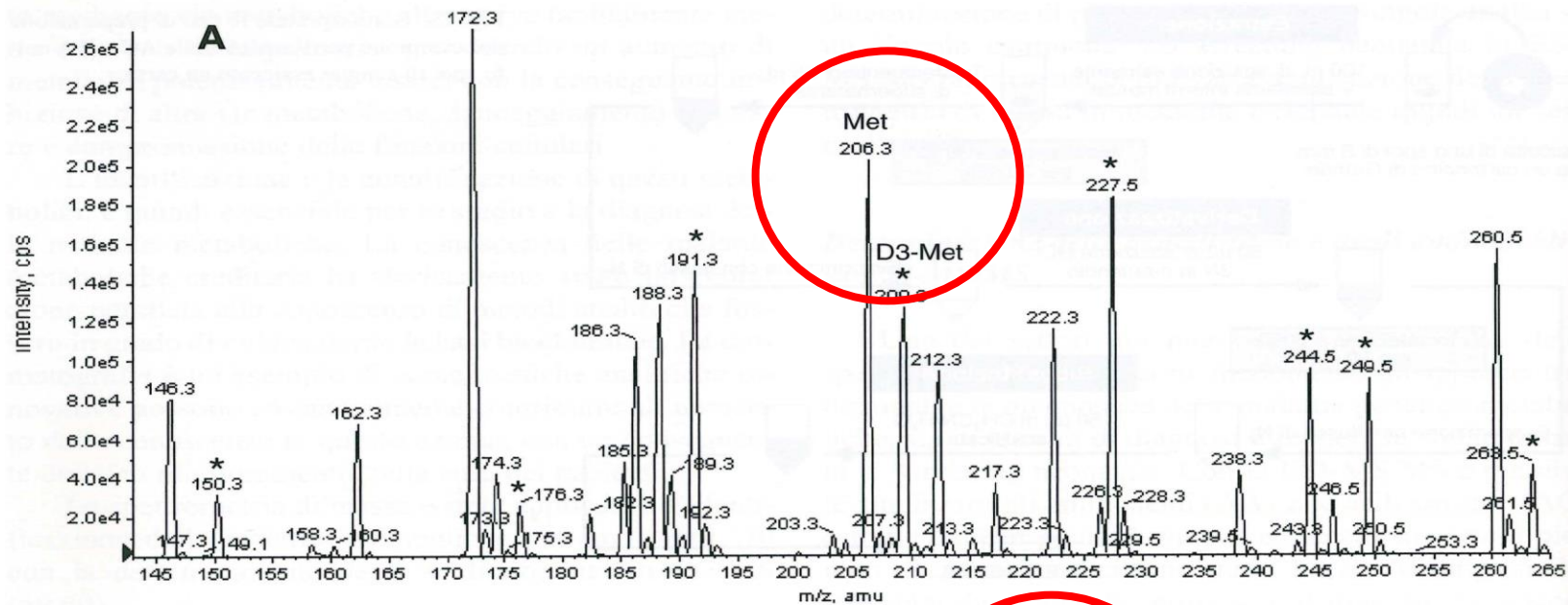


Fig. 27. Sono riportati gli spettri ottenuti dall'analisi degli aminoacidi in ESI-MS/MS di spot di sangue essiccato su carta rispettivamente di un bambino affetto da Omocistinuria (A) e da un neonato affetto da Fenilchetonuria (B). Gli asterischi (*) indicano i segnali degli standard interni.

TABELLA VI. Sono indicati alcuni farmaci per cui è descritto un metodo di analisi in MS; sono indicati il metodo generale, il tempo di analisi, il range analitico o il limite di rivelabilità inferiore (LLOD) [Dati da Telekes (2008) (67) e Saint Marcoux (2007) (66)]

<i>Farmaco</i>	<i>Metodo</i>	<i>Tempo anal minuti</i>	<i>Range analitico o LLOD</i>
FARMACI IMMUNOSOPPRESSIVI			
Micofenolato MPA +(MPAG) +(AcMPAG)	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	MPA 0,1-50 mg/L, MPAG 1-500 mg/L, AcMPAG 0,05-10 mg/L
MPA	LC-ESI-MSMS i- SRM	8	MPA 2,5-800 µg/L
MPA e MPAG	LC-ESI-MSMS i- SRM	6	MPA 0,1-30 mg/L, MPAG 1-300 mg/L
CsA e metaboliti	LC-APCI-MS i+ SIM	10	CsA 1-2500
CsA	LC-ESI-MSMS i+ SRM	2	CsA 10-2000 ng/mL
Everolimus	LC-ESI-MSMS i+ SRM	2	Everolimus 0,5-40 ng/mL
Sirolimus, tacrolimus e CsA	LC-ESI-MSMS i+ SRM	3	Tacrolimus, sirolimus 1,0-80,0 ng/mL, CsA25-2000 ng/mL
Tacrolimus e sirolimus	LC-ESI-MSMS i+ SRM	2,05	Tacrolimus 0,52-155,5 ng/mL, sirolimus 0,47-
FARMACI ANTIMICOTICI			
Itraconazolo	LC-ESI-MSMS i+SIM	4	Itraconazolo 4-1000 µg/L
Itraconazolo e idrossiitraconazolo	LC-ESI-MSMS i+ SRM	5	Itraconazolo 10-10000 µg/L, idrossiitraconazolo 10-10000 µg/L
Voriconazolo	LC-ESI-MSMS i+SIM	10	Voriconazolo 60-1000 µg/L
Voriconazolo	LC-ESI-MSMS i+ SRM	3	Voriconazolo 0,38-15,3 mg/L
Posaconazolo	LC-APCI i+ SRM	4	Posaconazolo 5-5000 µg/L
Caspofungina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	30	Caspofungina 0,2-2,0 e
Amphotericina B	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	Amphotericina B 2-150 mg/L
FARMACI ANTIVIRALI			
Amprenavir, indinavir, ritonavir, lopinavir, nelfinavir saquinavir; 3 NNRTIs: nevirapina, efavirenz e delavirdina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	9	Amprenavir 0,02-20 mg/L, indinavir 0,04-30 mg/L, ritonavir 0,05-30 mg/L, saquinavir 0,02-10 mg/L, nelfinavir 0,05-20 mg/L, lopinavir 0,04-20 mg/L, nevirapina 0,1-20 mg/L, efavirenz 0,1-20 mg/L, delavirdina 0,1-
Amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir saquinavir	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	6	Amprenavir 0,05-10 mg/L, indinavir 0,01-10 mg/L, lopinavir 0,1-20 mg/L, nelfinavir 0,05-10 mg/L, ritonavir 0,05-10 mg/L M8-nelfinavir 0,01-5 mg/L
Zidovudina, lamivudina, AZT-5'-glicuronide (AZTG), 3'-amino-3'-deoxitimidina (AMT), AZT-5'-fosfato (AZTP) e 3TC-5'-fosfato (3TCP)	LC-ESI-MSMS i+/-SRM	9	AZT 0,1-200 mg/L, AZTG 0,1-10 mg/L, AMT 0,1-5 mg/L, 3TC 0,1-20 µg/L
Zidovudina (AZT), lamivudina (3TC)	LC-ESI-MSMS i+/-SRM,	6	AZT 0,0025-2,5 mg/L, 3TC 0,0025-5 mg/L
FARMACI ANTIDEPRESSIVI			
Citalopram	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	10	Citalopram 0,50-250 ng/mL
Citalopram, fluvoxamina e paroxetina	LC-APCI-MSMS i+ SRM	6	Citalopram e fluvoxamina 20-800 ng/mL, paroxetina 10-600 ng/mL
Doxepin e nordoxepi	LC-ESI-MSMS i+ SRM	3	Doxepin 0,32-81,1 ng/mL, nordoxepin 0,18-45,1 ng/mL
Fluoxetina e norfluoxetina	LC-ESI-MS i+ SRM	6	Fluoxetina 2,5-250 ng/mL, norfluoxetina 10-250 ng/mL
Fluoxetina e norfluoxetina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	0,5-50 ng/mL
Mianserina e N-desmetilmianserina	LC-ESI-MS i+ SRM	3	Mianserin 1-60 ng/mL, N-desmetilmianserin 0,5-14 ng/mL
Paroxetina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	2,06	Paroxetina 0,2-20,0 ng/mL
Paroxetina e 4-idrossi-3-methoxy parossetina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	6	Paroxetina 0,75-100 ng/mL, metabolite 5-100 ng/mL
Sertralina	LC-APCI-MSMS i+ SRM	4	Sertralina 0,10-100 ng/mL
7 antidepressivi: amitriptilina, nortriptilina, doxepin, dosulepin, dibenzepin, opipramol e melitracen	LC-APCI-MSMS i+ SRM	12	10-1500 ng/mL
20 antidepressivi: amoxapina, amitriptilina, citalopram, clomipramina, dothiepin, doxepin, fluoxetina imipramina, maprotilina, mianserina, paroxetina, sertralina, trimipramina, nortriptilina, monodesmetilcitalopram, desmetilclomipramina, desipramina, norfluoxetina, desmetilmianserina, N desmetilsertralina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	6,05	10-500 ng/mL

TABELLA VI. (continuazione)

<i>Farmaco</i>	<i>Metodo</i>	<i>Tempo anal minuti</i>	<i>Range analitico o LLOD</i>
FARMACI ANTIPSICOTICI			
Amisulpride	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	4	Amisulpride 0,50-500,5 ng/mL
Aripiprazolo	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	7,05	Aripiprazolo 0,10-100 ng/mL
Clozapina	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	4	Clozapina 1-1000 ng/mL
Haloperidolo	LC-ESI-MSMS i+ SRM,	3	Haloperidolo 0,1-50,0 ng/mL
Olanzapina	LC-APCI-MSMS i+ SRM	16	Olanzapina 0,25-50 ng/mL
Olanzapina	LC-APCI-MSMS i+SIM	7	Olanzapina 1-1000 ng/mL
Olanzapina e desmetilolanzapina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	Olanzapina 0,05-50 ng/mL, desmetilolanzapina 0,1-100 ng/mL
Risperidone e 9-OH risperidone	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	Risperidone e 9-OH risperidone 0,1-100 ng mL
FARMACI ANALGESICI e FANS			
Idrocodone +idromorfone	LC-ESI-MSMS i+ SRM	2,5	
Fenilbutazone, indometacina, flunixin, piroxicam, diclofenac, ketoprofene, ac mefenamico, ossifenilbutazone, ibuprofene, ac salicilico, tolmetin, naproxen	LC-ESI-MSMS i+ SRM	10	Range dinamico 0,05-25 µg/mL
FARMACI ANTINEOPLASTICI			
Actinomicina D + vincristina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	8	LLOD 0,5 ng/mL
Busulfano	LC-E I-MS MRM	4	LLOD 10 µg/mL
Imatinib	LC-ESI-MSMS i+ SRM		LLOD 10 ng/ml
Tamoxifen + 5 metaboliti	LC-ESI-MSMS i+ SRM		LLOD 0,25 ng/mL
Procarbazina	LC-E I-MS MRM		LLOD 0,5 ng/mL
FARMACI CARDIOVASCOLARI			
Carvedilolo	GCMS	15	LLOD 3 ng/mL
Amlodipina	LC-ESI-MSMS i+ SRM	4	

Taxa	Note
<i>Bacillus anthracis</i>	Highly pathogenic organism. Select agent (USA) - Handle isolate with extreme caution and send to a reference laboratory for identification confirmation following your laboratory's select agent protocol. Further select agent information can be found at http://www.bt.cdc.gov/labissues/
<i>Yersinia pestis</i>	

of identification by serological tests

Taxa	Note
<i>Salmonella enterica</i> ssp. arizonae	Confirm by serological tests
<i>Salmonella</i> group	
<i>Salmonella</i> ser. Gallinarum	
<i>Salmonella</i> ser. Paratyphi A	
<i>Salmonella</i> ser. Typhi	
<i>Shigella</i> group	
<i>Shigella sonnei</i>	



Testi consigliati

- Titolo: Principi e tecniche di chimica clinica ;Autore: [Luigi Spandrio](#);
Editore: Piccin; Edizione: 2000
- Titolo: Biochimica e biologia molecolare; Autore: [Wilson Keith, Walker John](#) ; Sottotitolo: Principi e tecniche; Edizione italiana a cura di M.S. Pilone e L. Pollegioni ; Editore: Raffaello Cortina Editore ; Edizione: 2006
- Titolo: Tecniche di biochimica clinica ; Autore: [Valerio Anna](#) ; Editore: Cleup ; Edizione: 2008
- Titolo: Biochimica applicata alla diagnostica di laboratorio; Principi e metodologie; Autore: :[Paola Turini](#), [Valeria Giarnieri](#), [Pietro Tarola](#);Editore: Seu; Edizione: IV 3/2012

Grazie per l'attenzione....

*“L'apprendere molte cose
non insegna
l'intelligenza”*

Eraclito (Efeso 535-475 a.C)