



Insegnamento: Scienze Biochimiche e biologiche

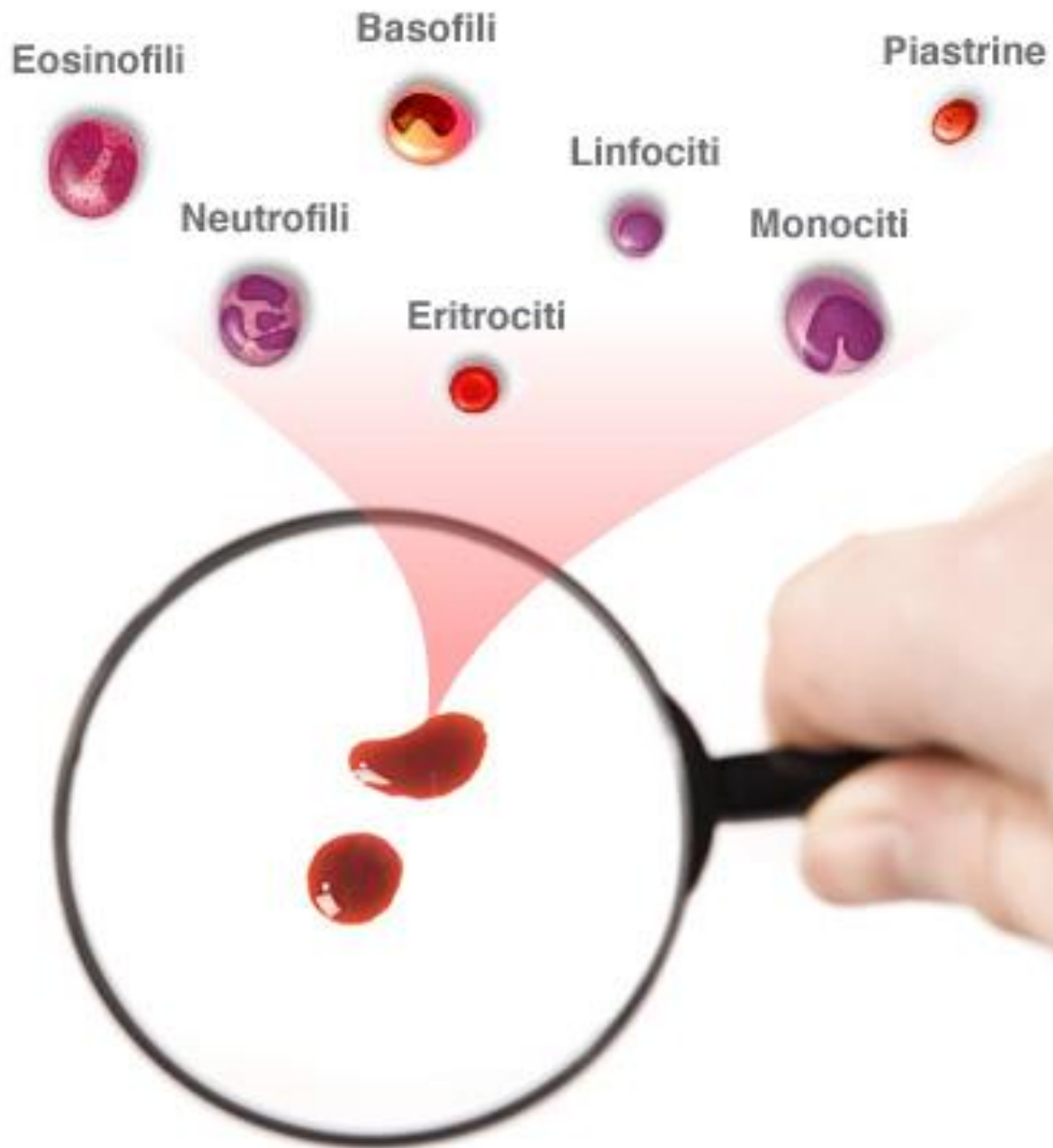
Modulo: Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica



Esame emocromocitometrico

AVVERTENZA SULL'USO DEL MATERIALE DIDATTICO FORNITO AGLI STUDENTI

L'uso del materiale didattico fornito agli studenti deve essere considerato strettamente personale e la sua distribuzione deve essere in ogni caso autorizzata dal docente



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Il sangue



- L'organismo umano contiene **5-6 litri** di **sangue**, un tessuto fluido in continuo movimento che svolge numerose funzioni di fondamentale importanza per l'organismo.

- Il sangue, infatti:

trasporta gas disciolti portando ossigeno dai polmoni ai tessuti e anidride carbonica dai tessuti ai polmoni;

distribuisce le sostanze nutritive assorbite nel tubo digerente o rilasciate dai depositi del tessuto adiposo o dal fegato

trasporta i prodotti del catabolismo dai tessuti periferici ai siti di eliminazione come i reni

trasporta enzimi e ormoni a specifici tessuti-bersaglio

regola il pH e la composizione dei liquidi interstiziali in ogni parte del corpo

riduce le perdite dei liquidi attraverso i vasi danneggiati. Le **reazioni di coagulazione** bloccano le interruzioni nelle pareti vascolari prevenendo modificazioni nel volume del sangue che possono intaccare seriamente la funzione cardiovascolare



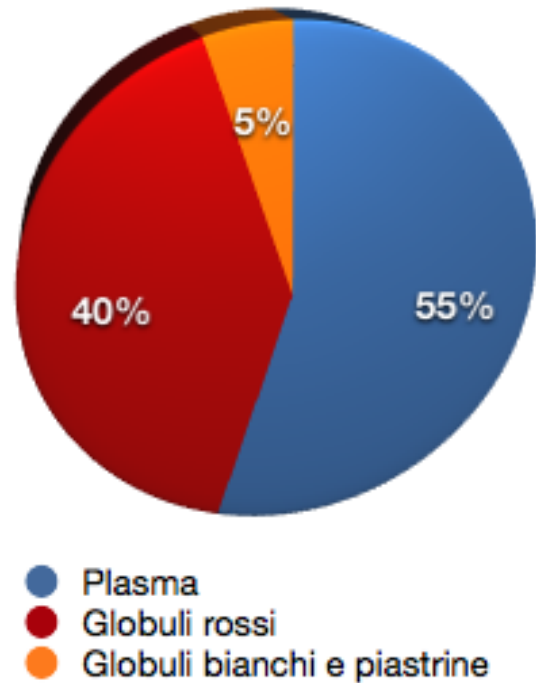
L'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

I **CONTAGLOBULI** di ultima generazione forniscono i seguenti parametri

1. Conteggio totale dei globuli bianchi (WBC)
2. Conteggio totale dei globuli rossi (RBC)
3. Emoglobina (HGB)
4. Emotocrito (HCT)
5. Volume corpuscolare medio (MCV)
6. Contenuto medio emoglobinico (MCH)
7. Concentrazione corpuscolare media emoglobinica (MCHC)
8. Conteggio totale delle piastrine (PLT)
9. Indice di distribuzione volumetrica dei globuli rossi (RDW)
10. Volume piastrinico medio (MPV)
11. Indice di distribuzione volumetrica delle piastrine (PDW)
12. Piastrinocrito (PCT)
13. Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica Indice di distribuzione della concentrazione emoglobinica (HDW)

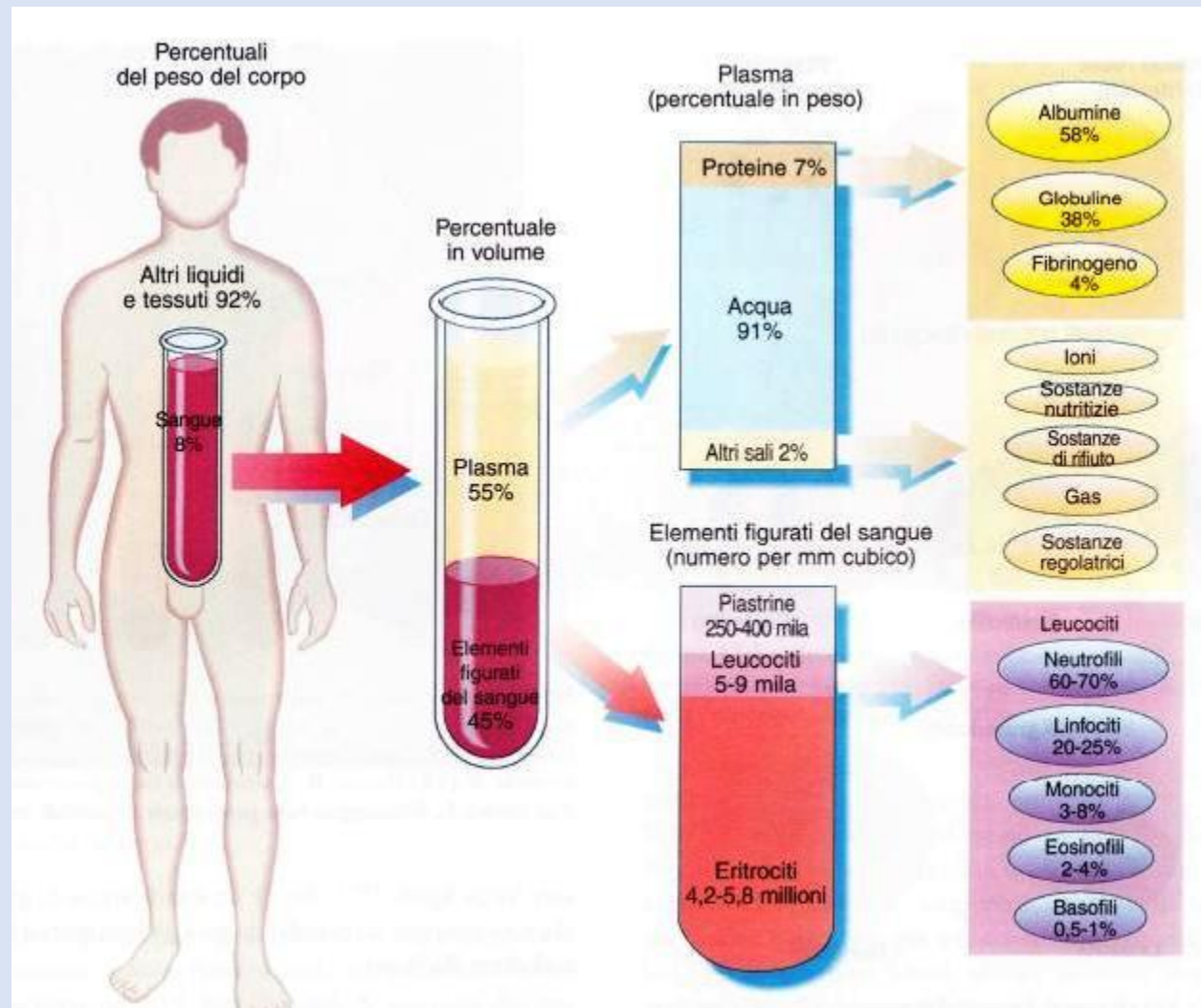
Il sangue

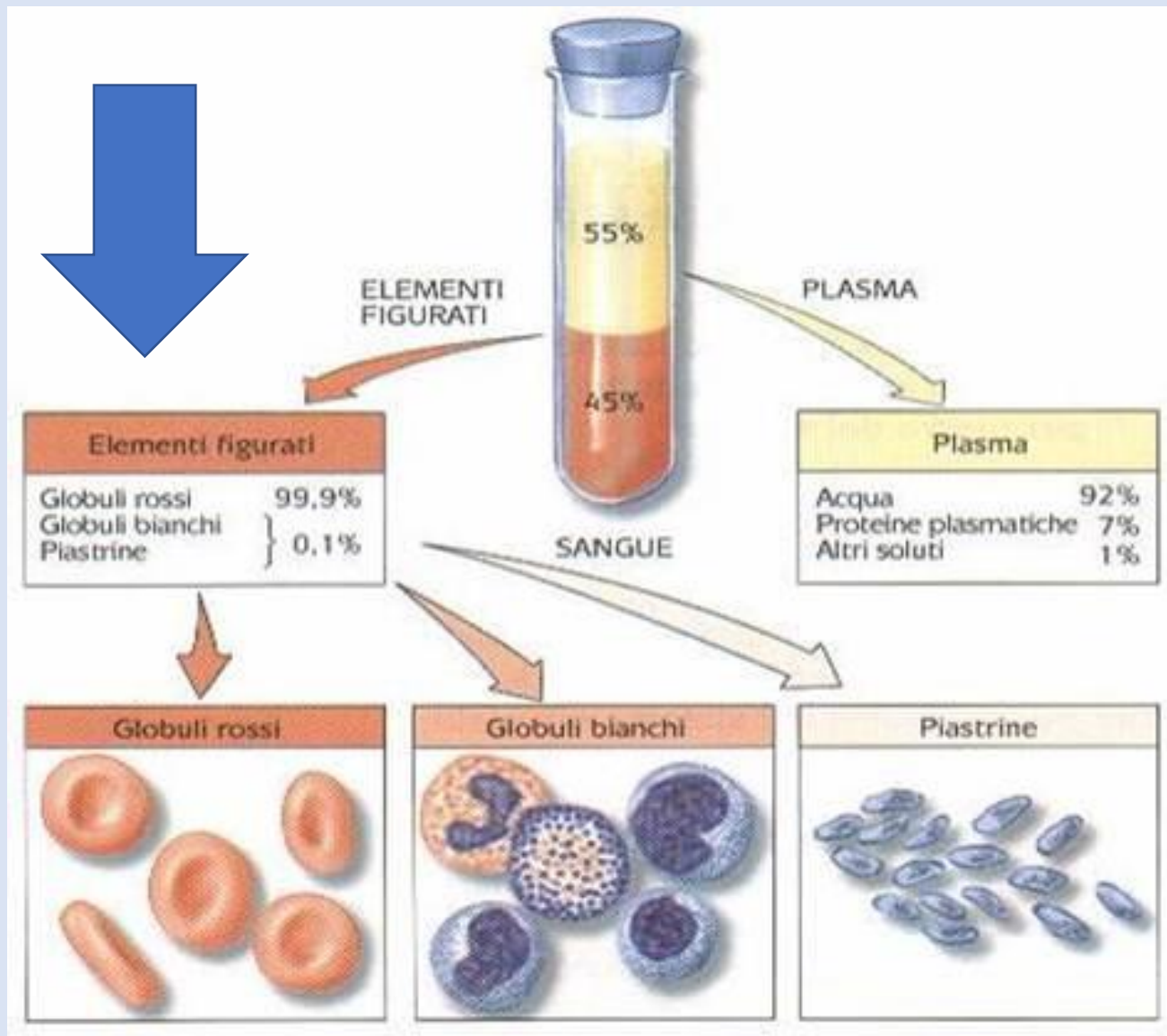
Componenti nel sangue



• E' costituito per il:

1. 55% da una parte liquida trasparente → il plasma
2. per il restante 45% da una parte corpuscolata, formata da cellule e frammenti cellulari.





Il plasma

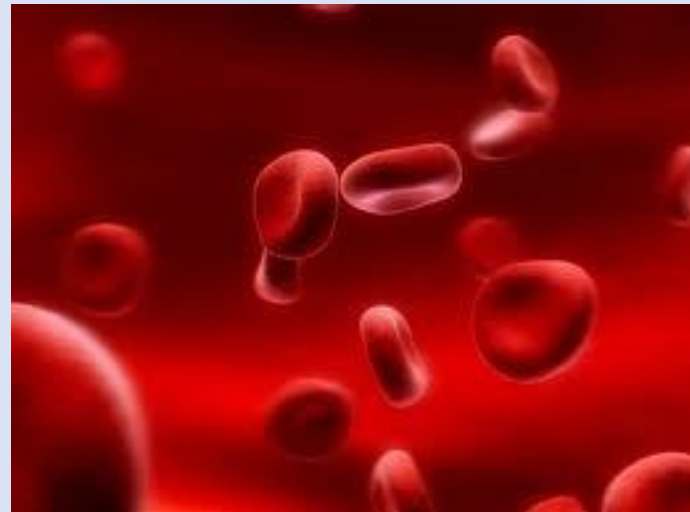
- Rappresenta circa il 55% di tutta la massa sanguigna
- colore giallo paglierino
- formato in gran parte da acqua (oltre il 90%) e da sostanze organiche ed inorganiche disciolte:
 1. gas respiratori (ossigeno ed anidride carbonica)
 2. sostanze nutritive provenienti dall'apparato digerente (zuccheri, aminoacidi, lipidi ...)
 3. sostanze di rifiuto prodotte dalle cellule (urea, acido urico, creatinina, acido lattico...)
 4. sostanze regolatrici (enzimi, ormoni)
 5. sali minerali
 6. proteine (albumina, fibrinogeno, globuline)

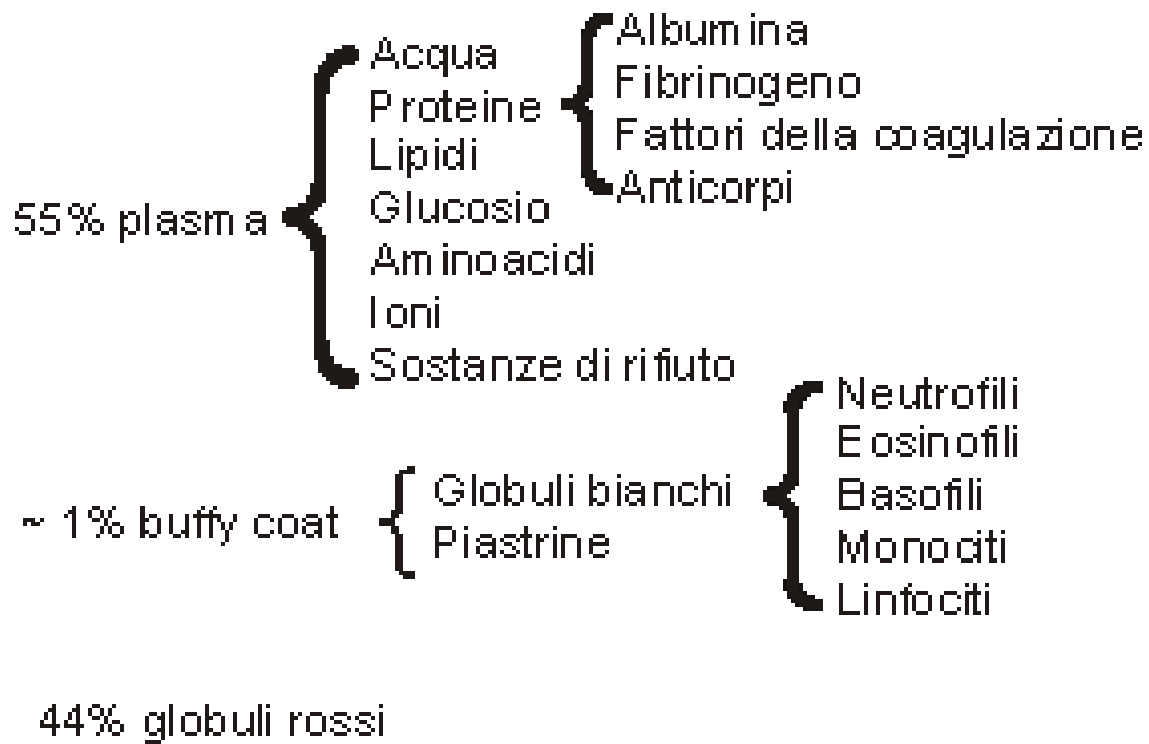
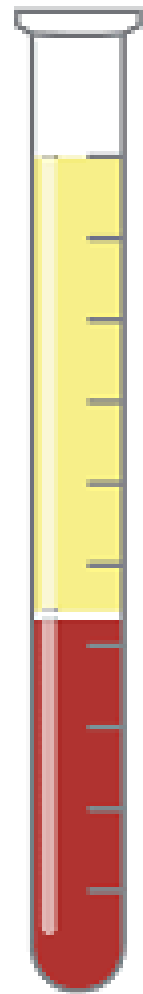
La parte corpuscolata

- ~ 45% della massa sanguigna
- formata dalle cellule vere e proprie del sangue →

- 1. globuli rossi**
- 2. globuli bianchi**

e piastrine





Ematocrito = 45%

- Il midollo osseo è un tessuto molle che occupa i canali delle ossa lunghe e la fascia centrale delle ossa piatte.
- È formato da uno **stroma** (**midollo osseo giallo**) e da un parenchima emopoietico rappresentato dagli elementi precursori delle cellule ematiche (**midollo osseo rosso o tessuto mieloide**).

Emocromo o esame emocromocitometrico



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

contaglobuli

- **Contatore di Coulter**
- Strumento che consente di quantificare le componenti figurate del sangue.
- Ideato da Wallace H. Coulter, che ipotizzò la possibilità di analizzare particelle sospese nei liquidi attraverso un sistema impedenziometrico
- secondo quest'ipotesi, ogni particella che può **interrompere un campo elettrico**, genera una variazione nel voltaggio quantificabile e associabile a numero e tipo di cellule che ha causato l'interruzione.

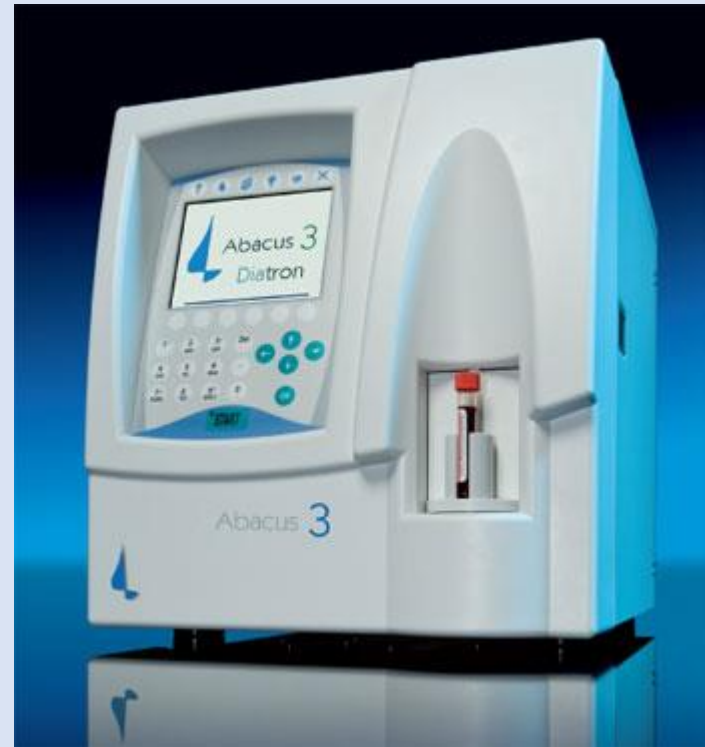


Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Contaglobuli

- Analizzatore ematologico in grado di determinare 18 parametri ematologici con soli **25 μ l di sangue** (50 μ l in modalità prediluita) tra cui la formula leucocitaria a **tre popolazioni!**

Il sistema permette di analizzare fino a **60 campioni/ora**, utilizzando il metodo impedenziometrico per il conteggio delle cellule e la determinazione del loro volume.



Contaglobuli








- Le cellule risucchiate in **un vortice di bolle di aria** sono costrette a passare attraverso alcuni forellini dove sono collocati gli elettrodi di rilevamento, che genereranno un'onda con un'ampiezza direttamente **proporzionale alla grandezza** della cellula che l'ha generata.

Contaglobuli

- **Negli anni 70**, il sistema fu affinato da parte della ditta Technicon (oggi Bayer) con l'introduzione di un **citofluorimetro** a 488 nm, che legge la luce emessa dalla colorazione basica o acida di ciascuna delle cellule del sangue, differenziando il singolo tipo di cellula.
- Ciò ha reso possibile in associazione al metodo di Coulter di ottenere la **formula leucocitaria**.

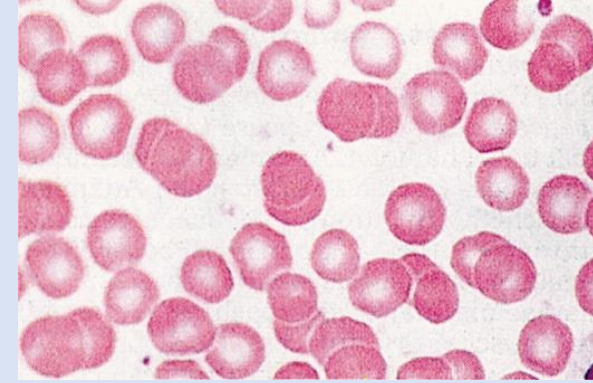
METODI AUTOMATIZZATI PER L'ESECUZIONE DELL'ESAME EMOCROMOCITOMETRICO CONTAGLOBULI

- 1. Conteggio totale dei globuli rossi (RBC)**
- 2. Conteggio totale dei globuli bianchi (WBC)**
- 3. Emoglobina (HGB)**
- 4. Ematocrito (HCT)**
- 5. Conteggio totale delle piastrine (PLT)**
- 6. Volume Corpuscolare Medio (MCV)**
- 7. Contenuto Medio Emoglobinico (MCH)**
- 8. Concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC)**

CELLULE DEL SANGUE	DURATA	FUNZIONE	
ERITROCITA		120 giorni	Trasporto di ossigeno
LINFOCITA		?	Difesa immunitaria dell'organismo
NEUTROFILO		7 ore	Difesa dell'organismo contro le infezioni
EOSINOFILO		?	Difesa dell'organismo contro i parassiti, allergie
BASOFILO		?	Inflammation Allergia
MONOCITA		3 giorni	Difesa immunitaria dell'organismo (precursore dei macrofagi nei tessuti)
PLASTINE		7-8 giorni	Coagulazione del sangue

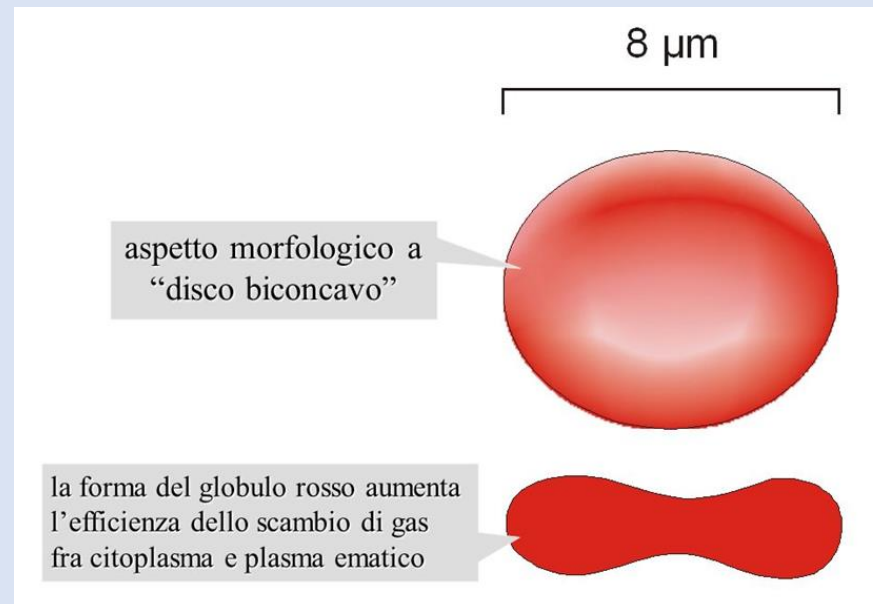
Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Globuli rossi



- eritrociti o emazie
- cellule di colore rosso per la presenza dell'emoglobina, proteina contenente ferro, che si lega alternativamente con l'ossigeno e l'anidride carbonica.

Hanno forma discoidale e concava su entrambe le superfici, un diametro di circa $7 \mu\text{m}$ e sono privi di nucleo e di organuli citoplasmatici.



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

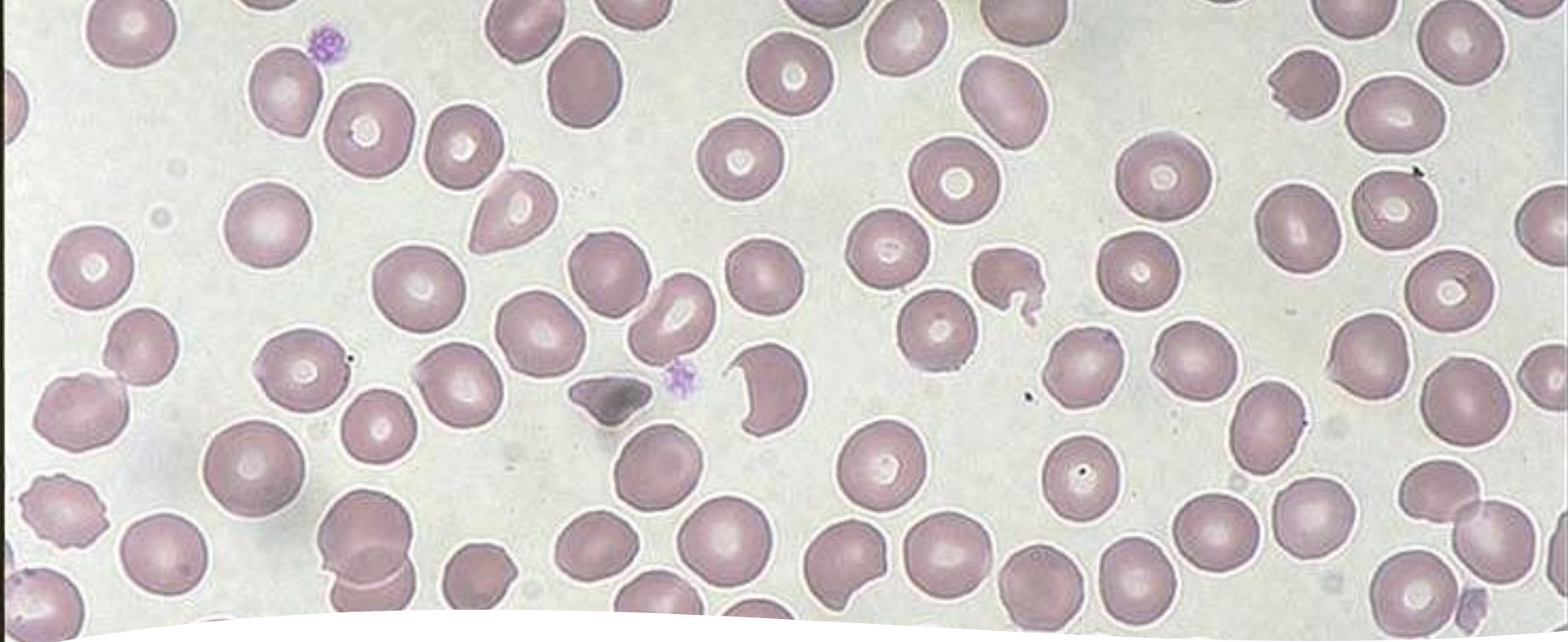
globuli rossi

- **Prodotti** nel **midollo osseo rosso** da **cellule progenitrici dotate di nucleo**, grazie a un complesso meccanismo a cascata definito ***eritropoiesi***
- lo sviluppo completo → passa attraverso un processo di trasformazione di varie cellule intermedie
- Tale processo richiede un periodo che va dai **7 ai 10 giorni circa**
- La produzione viene controllata dalla quantità di ossigeno che arriva ai tessuti attraverso il flusso ematico

Globuli rossi

- **Vita media di circa 120 giorni**
- La produzione dei globuli rossi da parte del midollo osseo viene stimolata dall'**eritropoietina**
- Nota anche come EPO → glicoproteina che viene sintetizzata soprattutto dal rene e in minima parte dal fegato
- La sua produzione è regolata dalla concentrazione di ossigeno nel sangue





Globuli rossi

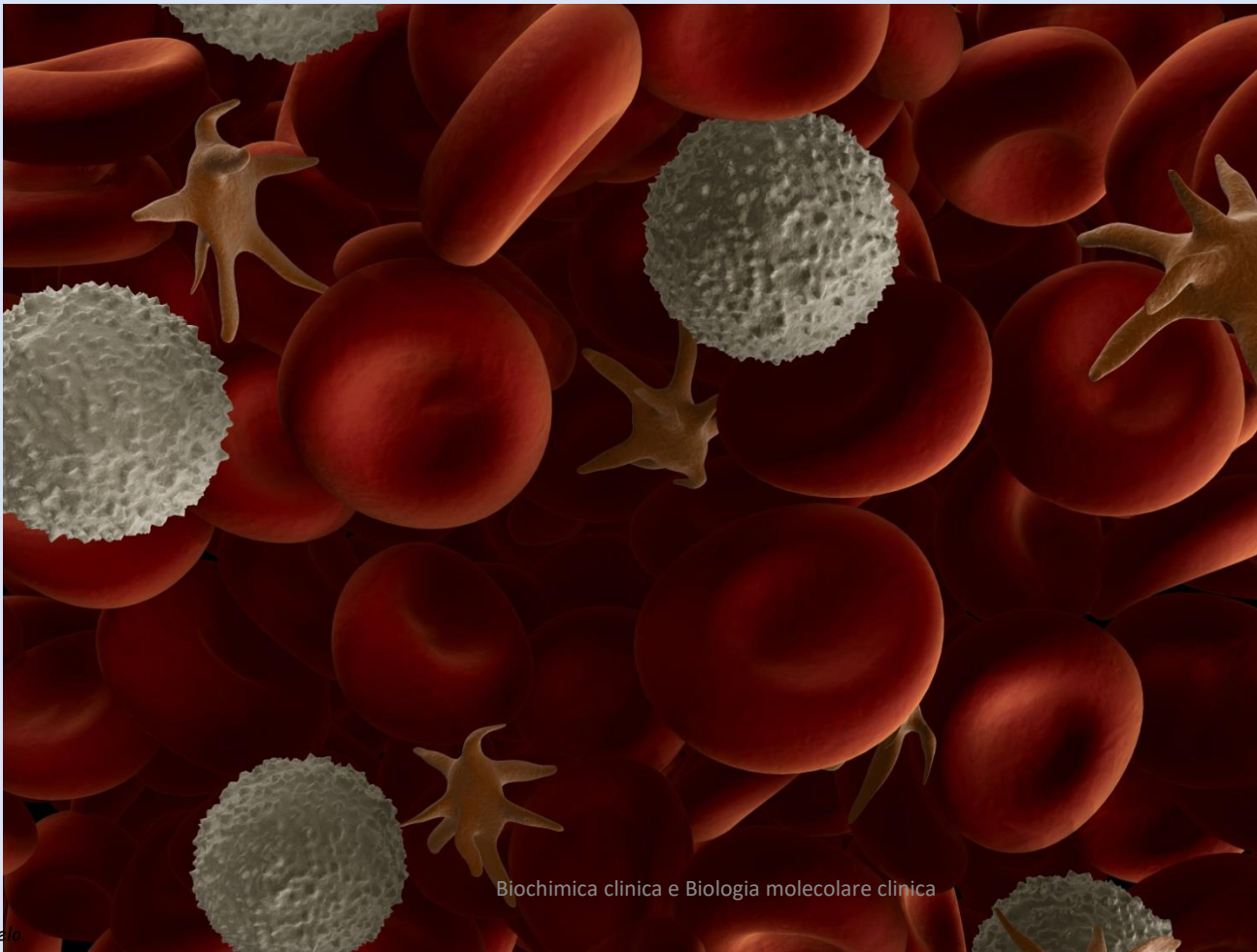
- In un millimetro cubo (μl) di sangue si trovano circa 5.000.000 globuli rossi:
 - da 3,9 a 4,9 milioni nelle donne
 - da 4,4 a 5,6 milioni negli uomini.
- Sulle membrane dei globuli rossi sono presenti delle molecole (dette antigeni) che differenziano i gruppi sanguigni.

Globuli rossi



parametro	sigla e descrizione	valori di riferimento (variabili)	diminuzione	aumento
Globuli rossi Eritrociti	RBC (Red Blood Cells): il numero di GR per μL di sangue	4.000.000- 5.200.000 (donna) / 4.200.000- 5.700.000 (uomo)	anemia	poliglobulia o eritrocitosi

Globuli bianchi



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Globuli bianchi

- **Leucociti**
- Cellule quasi sferiche
- Hanno la capacità di muoversi per conto proprio
- Sono in grado di **modificare la loro forma** e appiattendosi riescono ad uscire dai vasi capillari e penetrare nei tessuti, dove svolgono la loro importantissima funzione di **difesa contro i microrganismi patogeni** o contro sostanze estranee penetrate all'interno dell'organismo.
 - ◉ Tra i globuli bianchi troviamo diversi tipi cellulari:
 1. **granulociti**, che presentano nel citoplasma numerosi granuli caratteristici (sono detti anche **polimorfonucleati**, a causa della forma irregolare del nucleo cellulare che presenta dei lobi caratteristici), suddivisi a loro volta in
 - ◉ **neutrofili** (40-80% di tutti i leucociti) → con capacità fagocitaria
 - ◉ **eosinofili** (1-6%) → con capacità fagocitaria
 - ◉ **basofili** (<1-2%) → non hanno capacità fagocitaria e contengono *istamina*, sostanza che innesca il processo infiammatorio.
 2. **i monociti**, (2-10%) → posseggono capacità fagocitaria. Sono i progenitori dei **macrofagi** presenti nei tessuti
 3. **i linfociti** (20-40%) → i leucociti più piccoli, con un diametro simile a quello dei globuli rossi, si distinguono in tre principali sottopopolazioni, **i linfociti B, i linfociti T e le cellule natural killer**.
I linfociti → prodotti nel midollo osseo, ma anche da altri organi linfatici come la milza, il timo, le tonsille, i linfonodi.

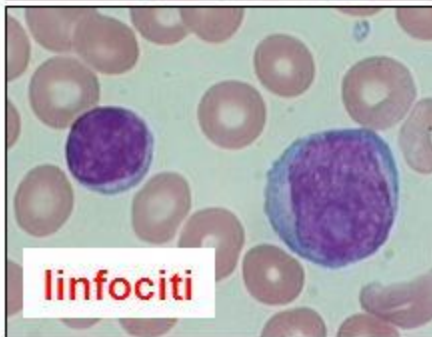
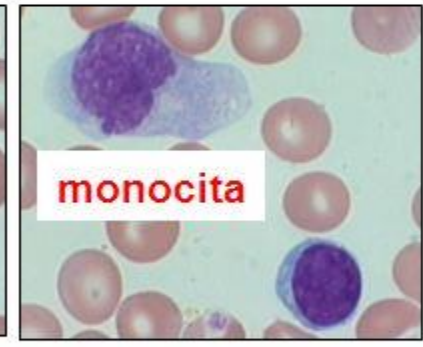
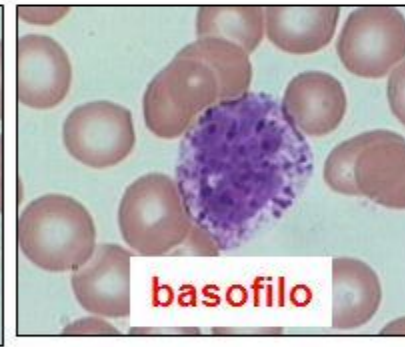
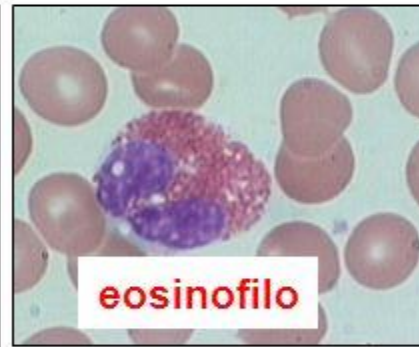
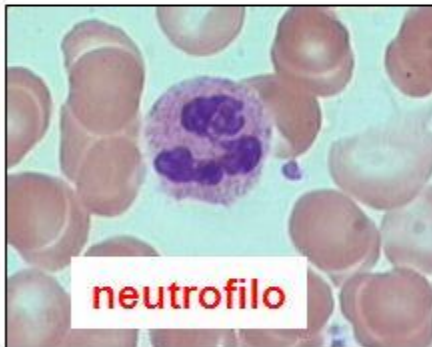
I globuli bianchi nel sangue periferico

formula leucocitaria

neutrofili 40 - 80 %
linfociti 20 - 40 %
monociti 2 - 10 %
eosinofili 1- 6 %
basofili <1- 2%

numeri assoluti

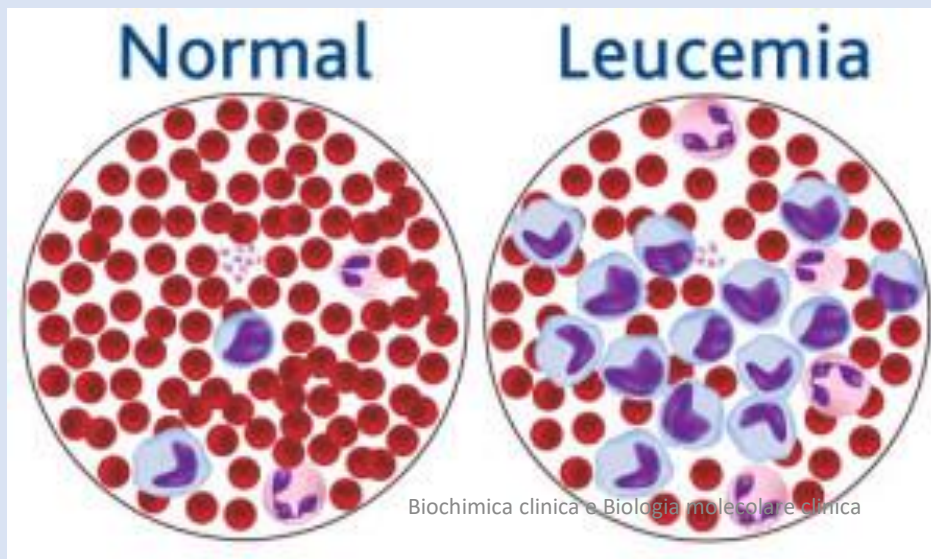
neutrofili $2-7 \times 10^9/L$
linfociti $1-3 \times 10^9/L$
monociti $0.2-1 \times 10^9/L$
eosinofili $0.02-0.5 \times 10^9/L$
basofili $0.02-0.1 \times 10^9/L$



Globuli bianchi

- In un millimetro cubo (μl) di sangue si trovano normalmente da **4.000 a 10.800 globuli bianchi**
- Diminuzione \rightarrow **leucopenia**
- Aumento \rightarrow **leucocitosi**
- Aumentano in caso di malattie infettive.

- Nelle leucemie raggiungono valori di centinaia di migliaia.



Emoglobina (HGB o Hb)

- Proteina coniugata costituita da quattro gruppi *eme* (contenenti il ferro) legati alla globina, una proteina formata da due coppie di catene polipetidiche.
- Costituente principale dei **globuli rossi**, deputata al trasporto dell'**ossigeno** nel sangue verso tutti i tessuti dell'organismo.

Emoglobina (HGB o Hb)

- Il valore dell'emoglobina nel sangue viene determinato mediante l' *emocromo*.

- ◉ *I valori di riferimento*

I valori dell'emoglobina normalmente variano:

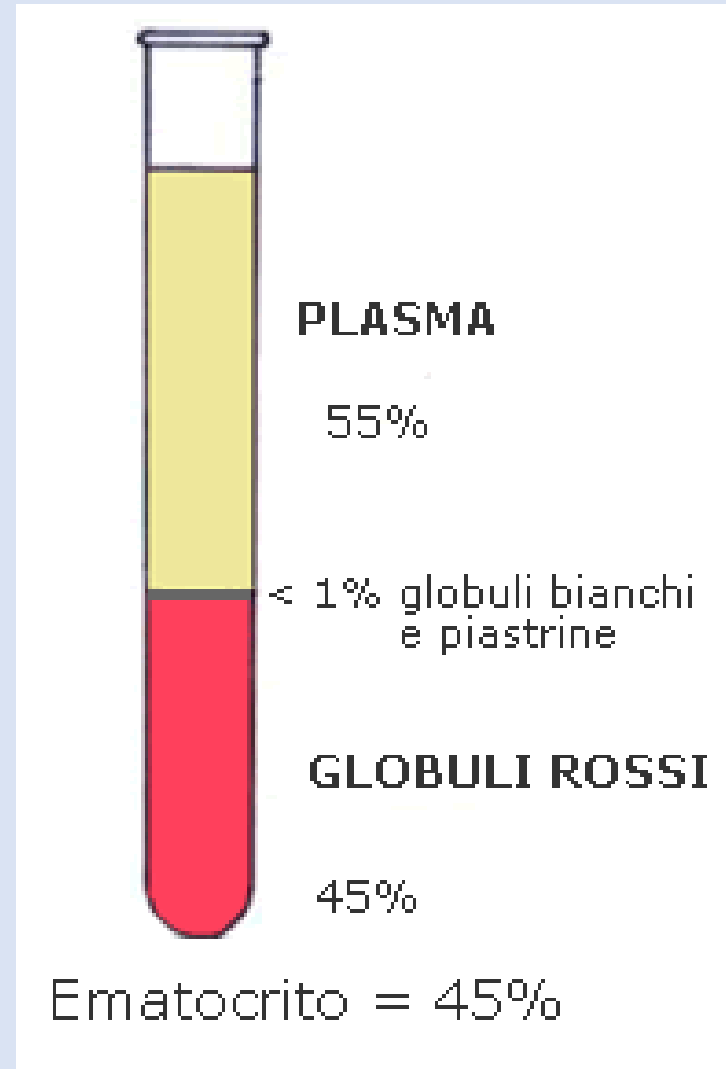
tra 13 e 17 g/dl negli uomini

tra 12 e 16 g/dl nelle donne.

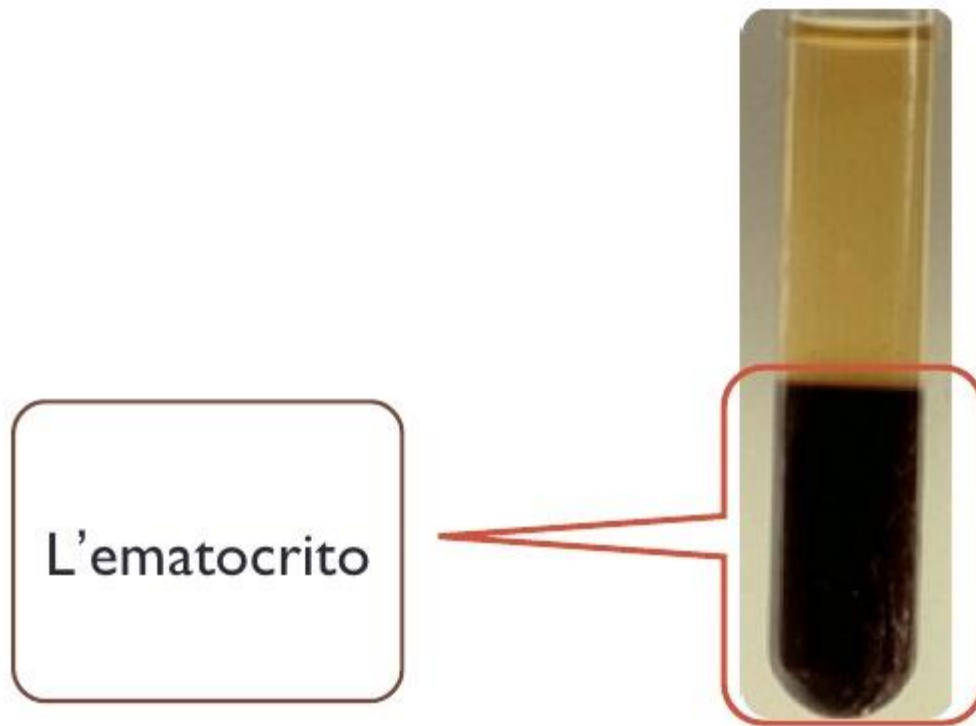
Se il valore dell'emoglobina diminuisce di una percentuale superiore al 20% rispetto ai valori normali si parla di *anemia*.

Ematocrito (HCT o Ht)

- *E' il volume percentuale di sangue che è costituito da cellule.*
- Un ematocrito di 44, significa che il 44% del volume del sangue è costituito da cellule e il rimanente da plasma.
- *Valori di riferimento.*
- **I valori normali:**
 1. nella **donna** variano fra il 36 e il 46%
 2. nell'**uomo** fra il 38 e il 52%.



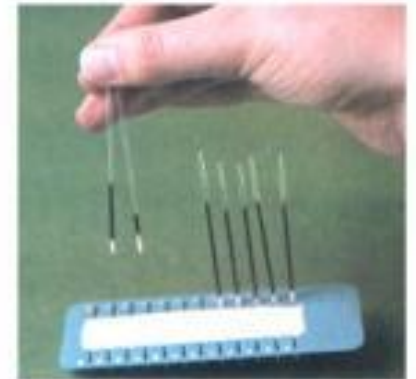
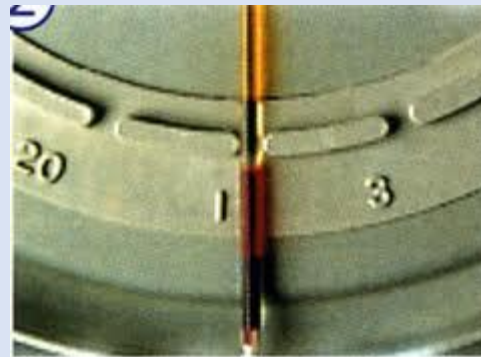
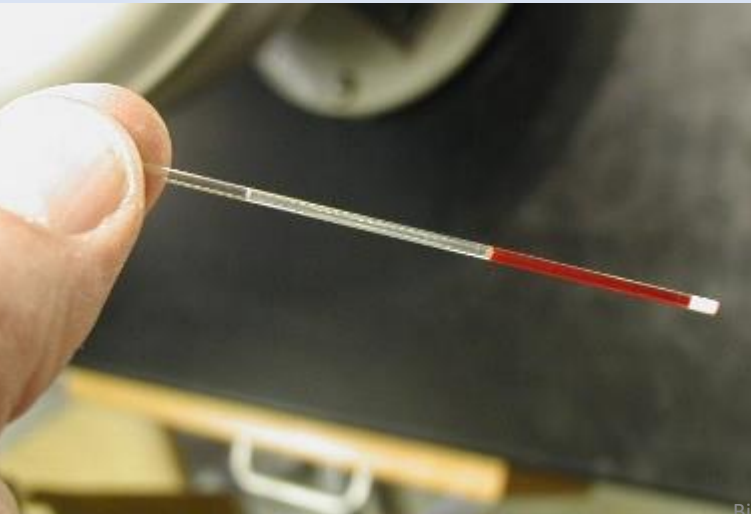
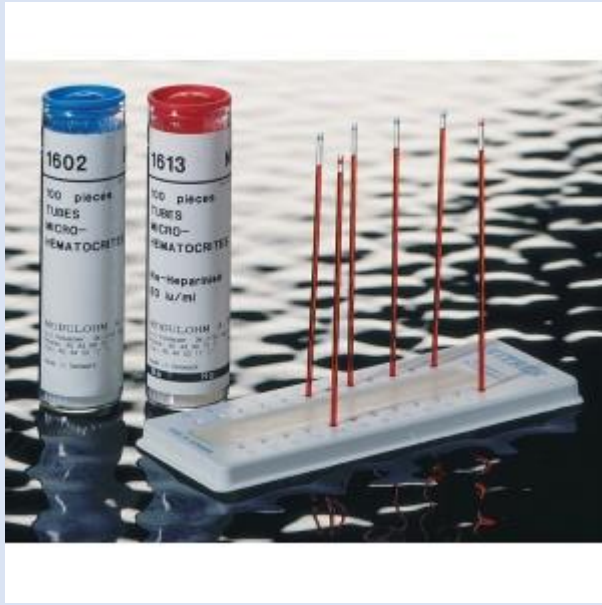
Ematocrito (HCT o Ht)



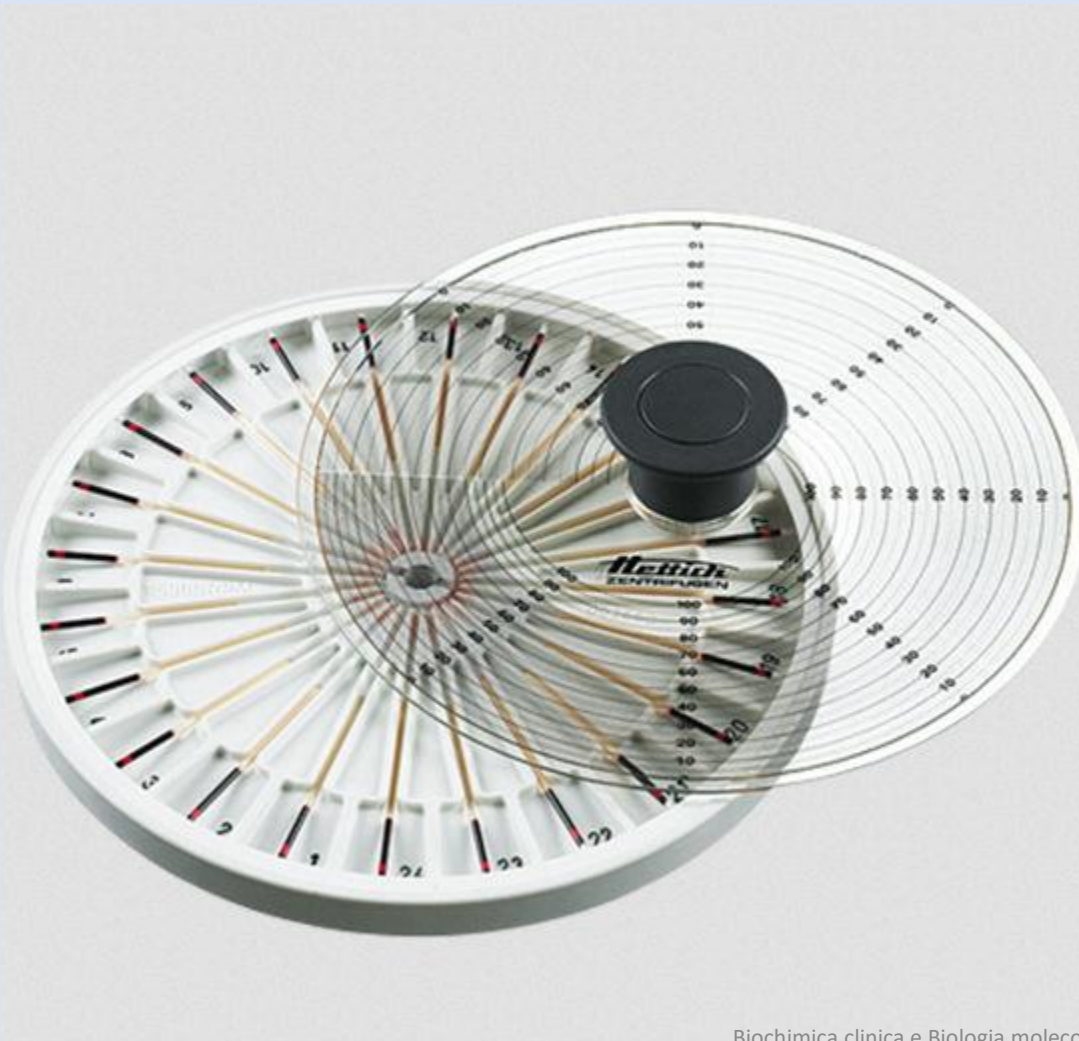


Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Ematocrito (HCT o Ht)

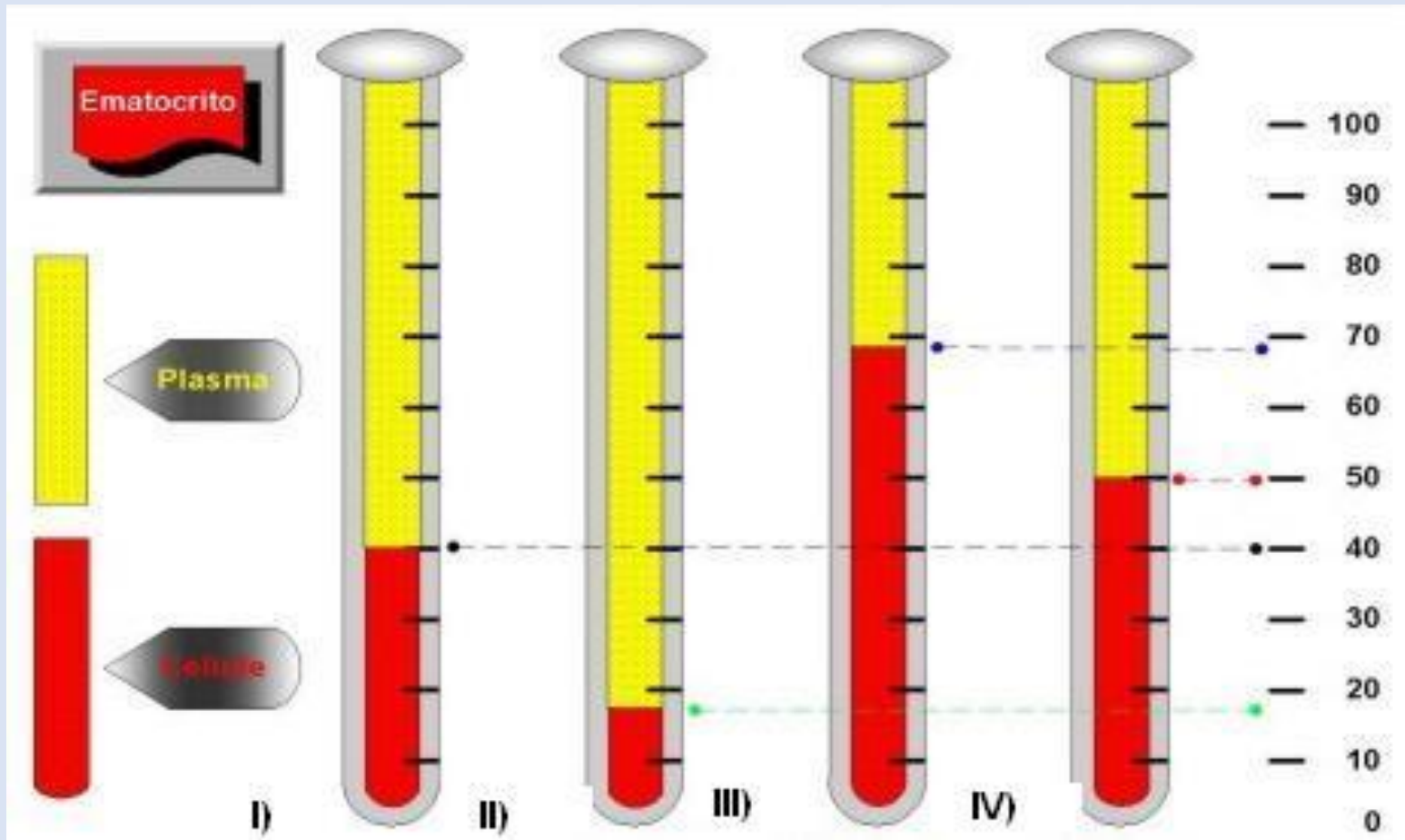


Ematocrito (HCT o Ht)



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Ematocrito (HCT o Ht)



Ematocrito (HCT o Ht)

➤ Nello sport

Di norma il valore è abbastanza stabile; tuttavia i valori possono subire variazioni considerevoli.

- Ovviamente all'aumentare dell'ematocrito **aumenta la viscosità** del sangue perché il sangue diventa "più solido e meno liquido".
 - Durante lo sforzo fisico la richiesta di ossigeno aumenta fino a 20 volte, determinando aumenti del flusso ematico sino a quasi 25 volte.
 - Quanta più emoglobina è disponibile tanto più ossigeno può essere trasportato, ritardando la crisi del sistema atletico
-
- Più emoglobina significa più globuli rossi e in definitiva un valore di ematocrito più alto
 - Alti valori di ematocrito (oltre che dannosi alla salute) possono anche essere negativi per la performance sportiva perché se il sangue è troppo denso non scorre facilmente nei piccolissimi capillari che irrorano i muscoli.
 - Ai fini di una **campagna antidoping** corretta è fondamentale conoscere come può variare l'ematocrito fisiologicamente.

Conteggio totale delle piastrine (PLT)

- **Trombociti**
- Non sono cellule vere e proprie, ma **frammenti citoplasmatici di cellule di grandi dimensioni** (i megacariociti), il cui compito è di permettere la coagulazione del sangue, in caso di lesioni con emorragie
- Hanno forma tondeggiante e in un millimetro cubo di sangue se ne trovano tra **200.000 e 400.000**.

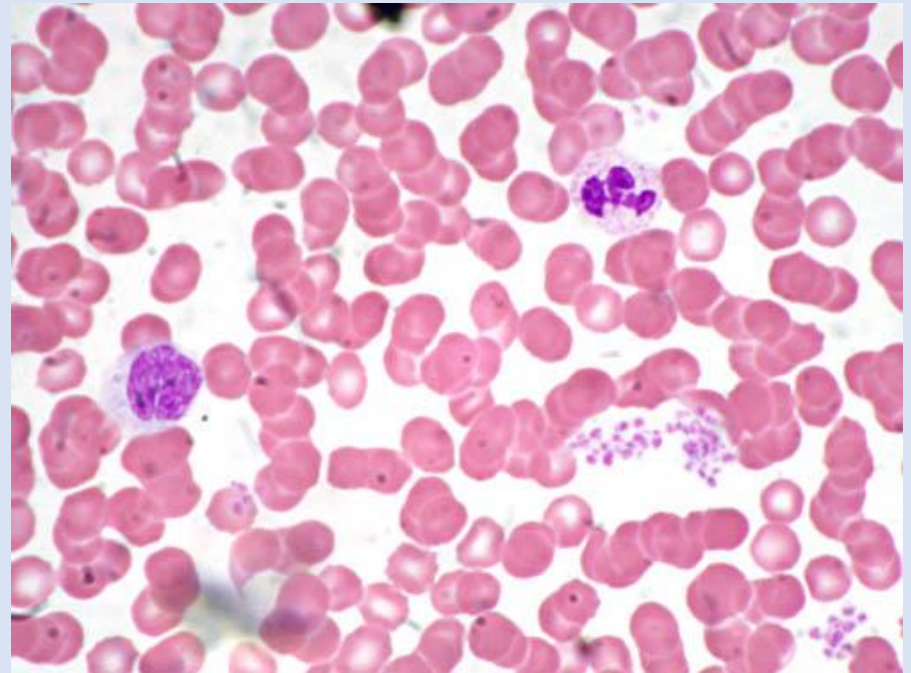


Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Conteggio totale delle piastrine (PLT)

- Vita breve, dell'ordine dei 7-10 giorni e sono continuamente rimpiazzate.

diminuzione	aumento
piastrinopenia o trombocitopenia	piastrinosi o trombocitosi



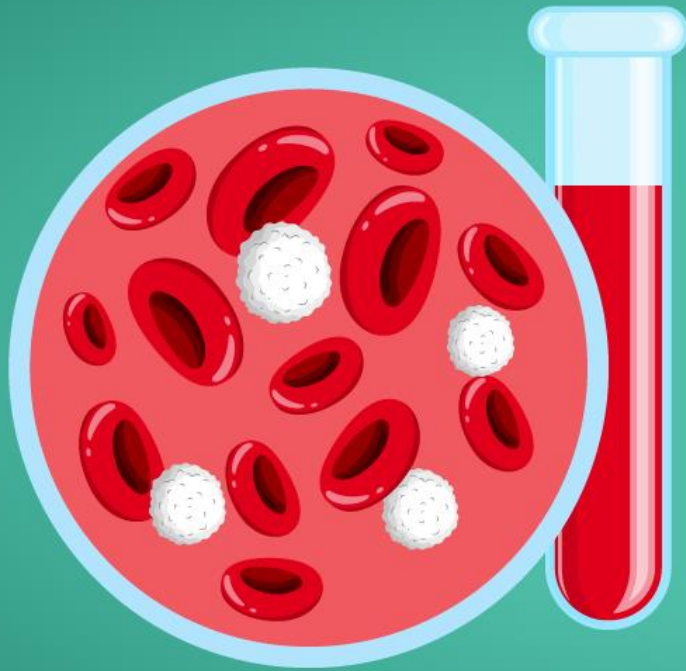
INDICI CORPUSCOLARI

- Sono rappresentati:
 1. volume cellulare medio (*mean cell volume*, **MCV**)
 2. contenuto cellulare medio di emoglobina (*mean cell hemoglobin*, **MCH**)
 3. concentrazione cellulare media di emoglobina (*mean cell hemoglobin concentration*, **MCHC**).
- Largamente utilizzati nella classificazione delle anemie
- La concentrazione dell'emoglobina e l'ematocrito sono indici comunemente utilizzati per esprimere la loro gravità.

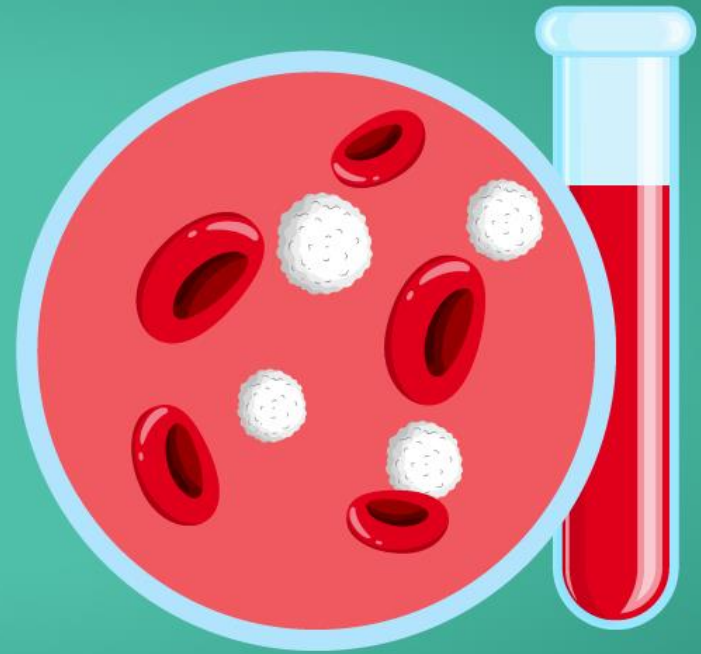
ANEMIA (dal greco senza sangue)

- A differenza di quello che si pensa “anemia” non è sinonimo di carenza di ferro, bensì di emoglobina (anche se spesso la causa è la mancanza di ferro).
 - *Varie cause*
- Poiché la molecola che trasporta O₂ è l'emoglobina (Hb) → **Riduzione della capacità di trasporto dell'ossigeno** da parte del sangue periferico
- **ANEMIA** → una diminuzione della quantità totale di Hb circolante all'interno degli RBC
- Si ha diagnosi di anemia per Hb
 - ☐ inferiore a 12,5 g/dl nell'uomo
 - ☐ inferiore a 11,5 g/dl nella donna





NORMAL



ANEMIA



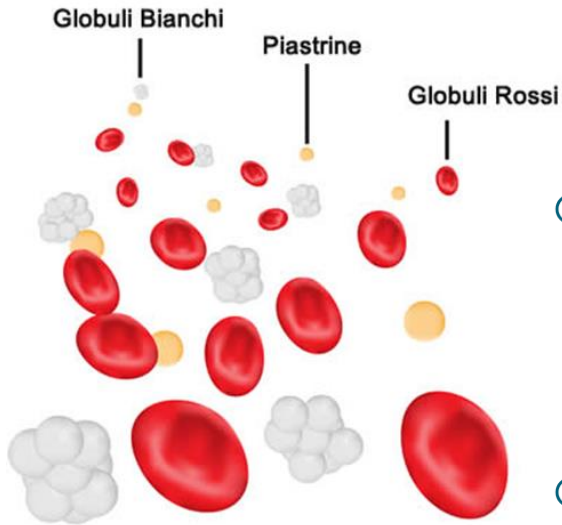
Conjuntiva normal

Conjuntiva palida = anemia

Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

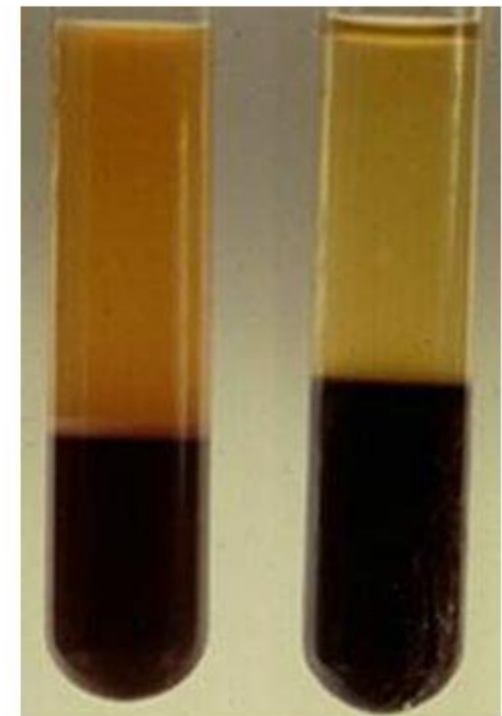
Anemia emolitica:

NORMALE



- Cause intrinseche (ellissocitosi, sferocitosi, deficit enzimatici G6PD)
- Cause estrinseche (autoimmuni, da farmaco, infettive...)

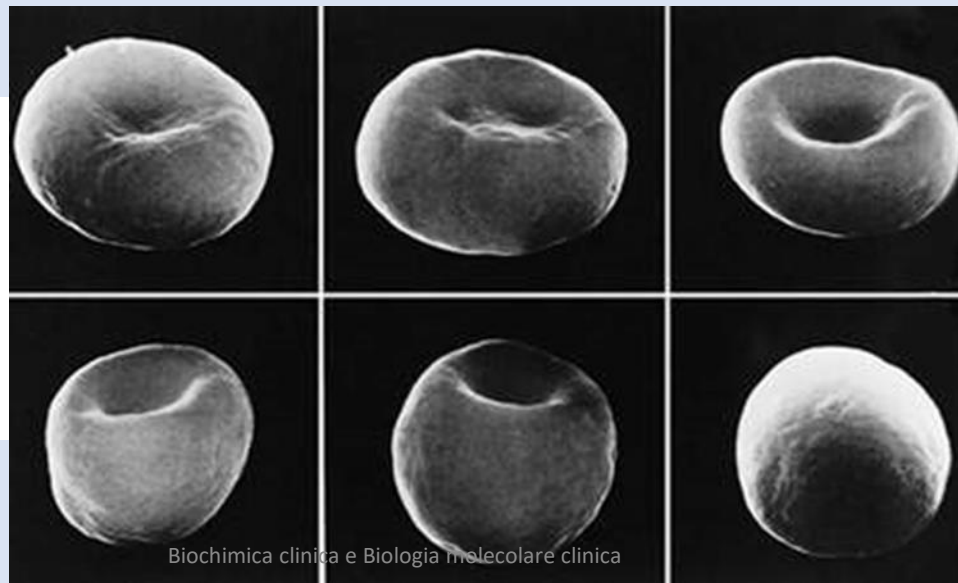
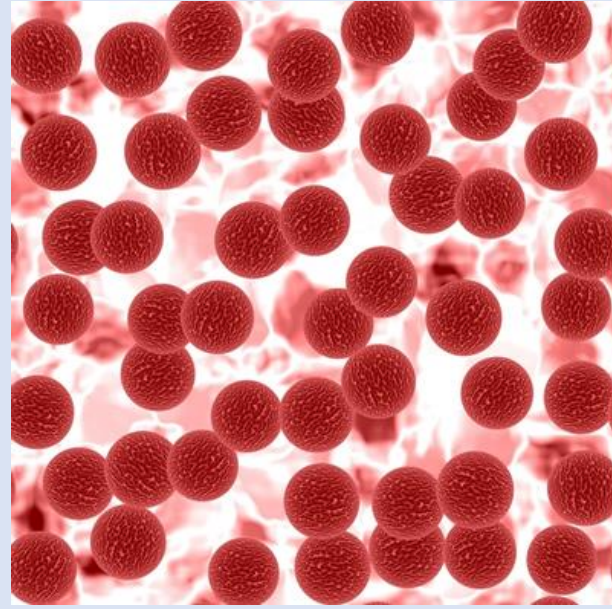
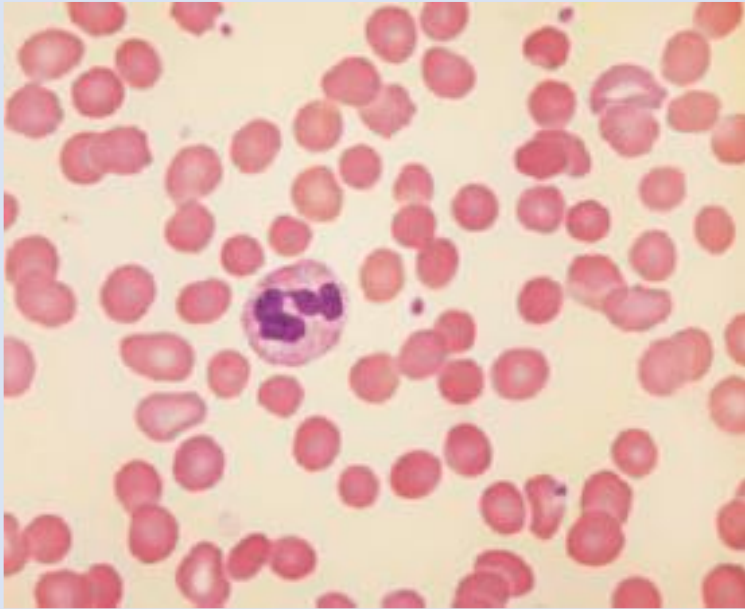
ANEMIA EMOLITICA EREDITARIA



emolisi

normale

MICROSFEROCITI NELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO



Soprattutto nella sferocitosi ereditaria, ma anche, in minore misura, nelle anemie immunoemolitiche.

Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

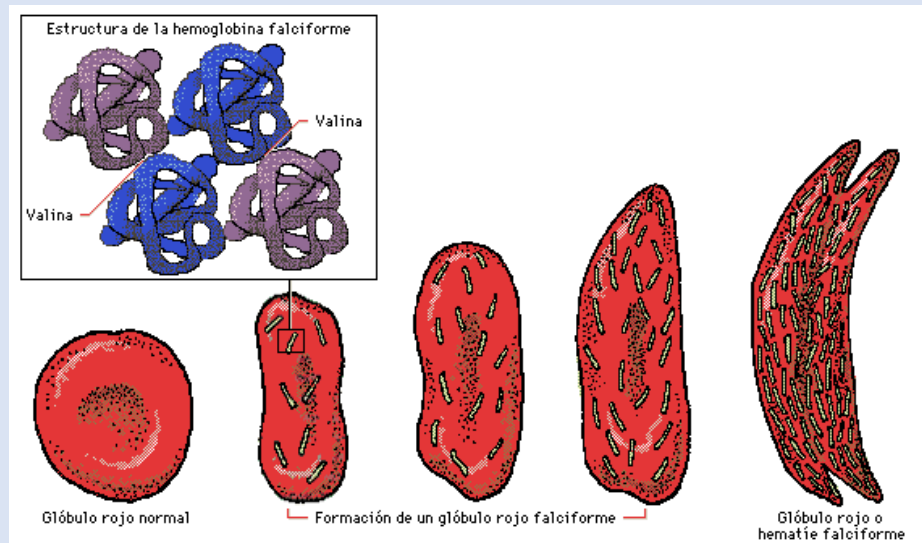
ANEMIA FALCIFORME



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

ANEMIA FALCIFORME

- L'anemia drepanocitica, o anemia falciforme (*"drepanos"* significa falce).
- Malattia del sangue su base genetica
- I globuli rossi circolanti, in condizioni di bassa tensione di ossigeno o di circolazione lungo i capillari, assumono una **forma irregolarmente cilindrica, spesso ricurva**, che, allo striscio di sangue periferico, assomiglia a una mezzaluna o una **falce**.
- Per questo motivo l'anemia drepanocitica è anche detta *anemia falciforme*.



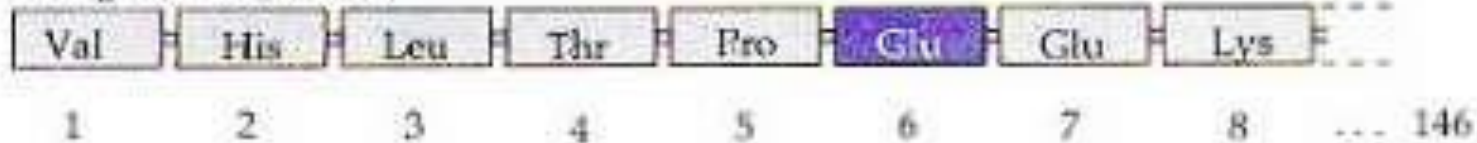
Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

ANEMIA FALCIFORME

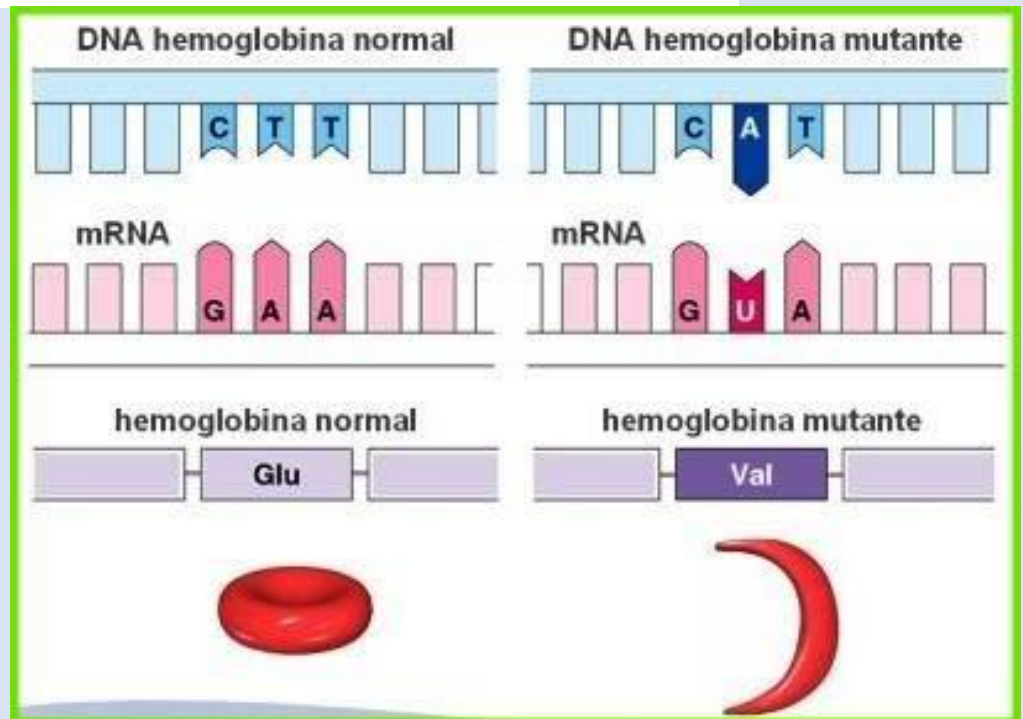
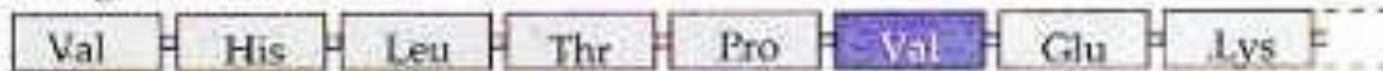
- Malattia ereditaria caratterizzata dalla **produzione di emoglobina strutturalmente anomala**.
- Le varianti emoglobiniche, clinicamente importanti, derivano da mutazioni del gene della β -globina.
- L'anemia a cellule falciformi deriva da una mutazione puntiforme che porta alla sostituzione della **valina** al posto **dell'acido glutammico** nella posizione 6 della catena β della globina.
- L'emoglobina risultante, **HbS**, possiede alterate proprietà fisico-chimiche che portano alla malattia a cellule falciformi.

ANEMIA FALCIFORME

Emoglobina normale



Emoglobina falciforme



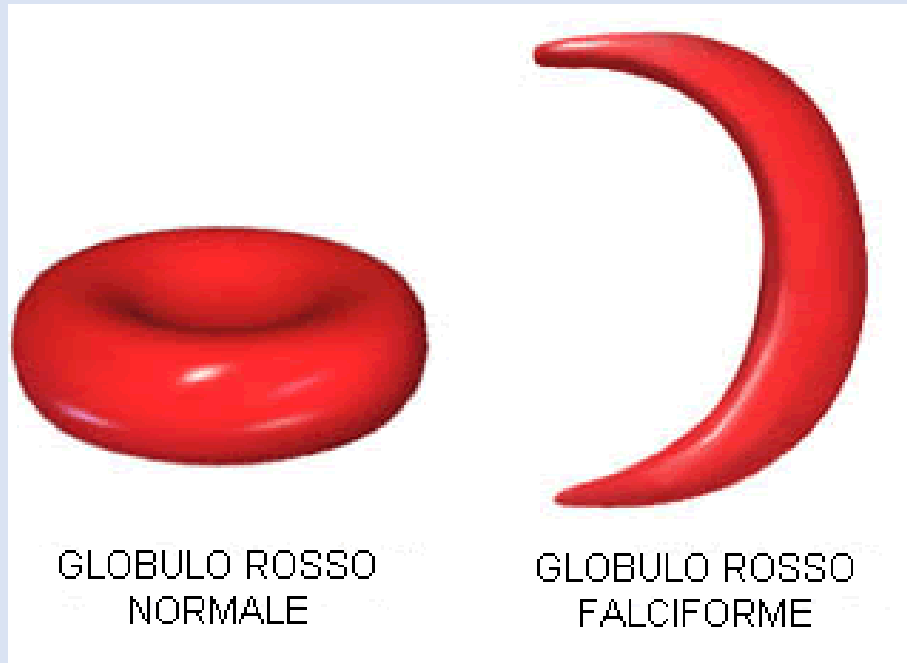
Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

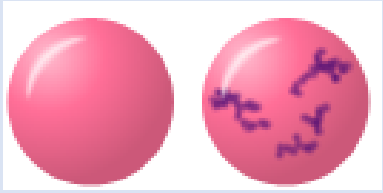
ANEMIA FALCIFORME

- In condizioni di bassa tensione di ossigeno, le molecole di HbS si aggregano e polimerizzano.
- Questa modificazione trasforma l'emoglobina da un liquido fluido a **un gel viscoso** portando alla formazione **di fibre di HbS**
- Una zona idrofobica “**appiccicosa**” che determina anormale associazione dell'Hb.
- Conseguente **distorsione** degli eritrociti che assumono una forma a falce.
- La **falcizzazione** delle emazie → inizialmente un fenomeno reversibile. In seguito all'ossigenazione l'HbS torna allo stato depolimerizzato.
- Con il ripetersi di falcizzazione e ritorno allo stato normale, si verifica un danno alla membrana e le cellule rimangono a forma di falce.

ANEMIA FALCIFORME

- Esse hanno difficoltà a mantenere il normale volume intracellulare
- Di conseguenza, la concentrazione intracellulare di emoglobina aumenta, le cellule si disidratano e il citoplasma diventa più denso.





RETICOLOCITI

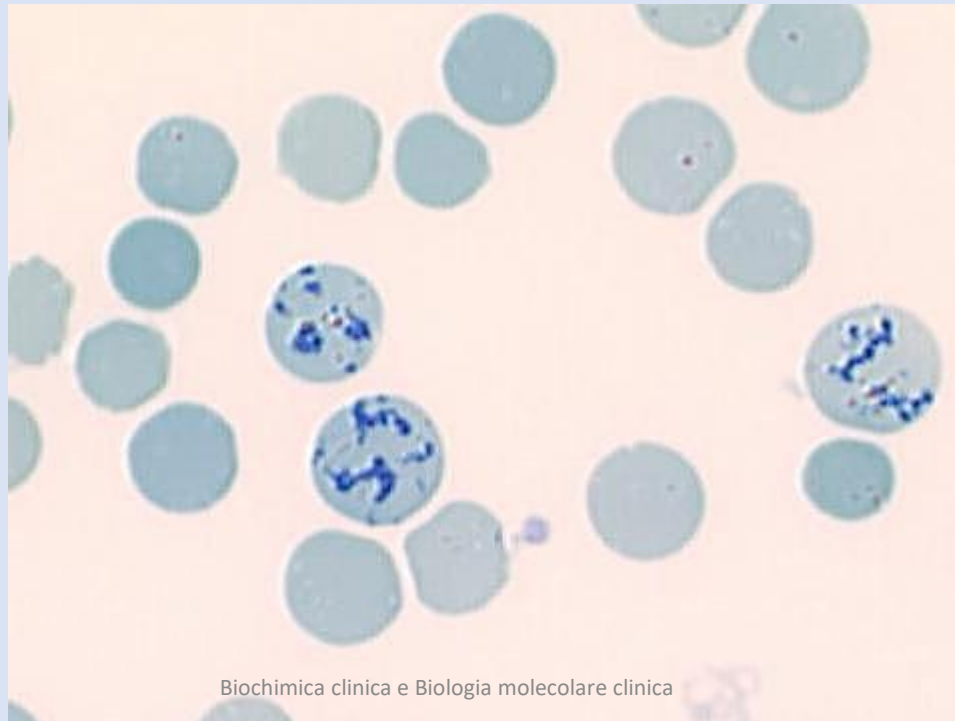
- Eritrociti giovani, privi di nucleo, che sono stati appena immessi nel circolo sanguigno e conservano per qualche tempo (circa 24 h) un esiguo numero di ribosomi.
- I **Ribosomi** restano per continuare a **produrre emoglobina**.
- Con una particolare colorazione (blu cresile brillante) precipitano sotto forma di sostanza granulosa e filamentosa: **reticolare**
- Negli eritrociti, e nei reticulociti in particolare, possono essere visibili alcuni inclusi citoplasmatici: i Corpi di Jolly e gli anelli di Cabot.

RETICOLOCITI

- I reticolociti → globuli rossi giovani, ancora immaturi
- Sono lo **0,5% - 2,5%** dei globuli rossi circolanti.
- Per esempio, in un soggetto che ha 5 milioni di globuli rossi per μl , i reticolociti saranno all'incirca 40-100 mila per μl
- Il numero di reticolociti è espresso come valore **percentuale** rispetto al numero degli eritrociti circolanti
- L'interpretazione di questo valore deve tenere conto anche di altri fattori.

RETICOLOCITI

- Nell'adulto vengono prodotti circa 2 milioni di globuli rossi al secondo.
- Durante la maturazione della cellula, c'è uno stadio, che dura **1-2 giorni**, in cui il nucleo viene espulso.
- Questo stadio corrisponde al **reticolocito**.
- Esso diventerà poi eritrocito maturo (che avrà una vita di 120 giorni circa).



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

RETICOLOCITI

- In **un individuo anemico** → il numero di globuli rossi circolanti sarà diminuito ed il valore percentuale "normale" dei reticolociti risulterà aumentato.
- Le **cellule immature (reticolociti)** sono identificate con colorazione sopravvitale di residui precipitati di RNA (blu brillante di cresile)

Schema di camera conta gloguli
(mod. Burker)



A microscopic view of red blood cells (erythrocytes) against a dark red background. The cells are biconcave and vary in focus, with some appearing sharp and others blurred.

**MARKER NELLO
SPORT
DOPING
ERITROPOIETINA**

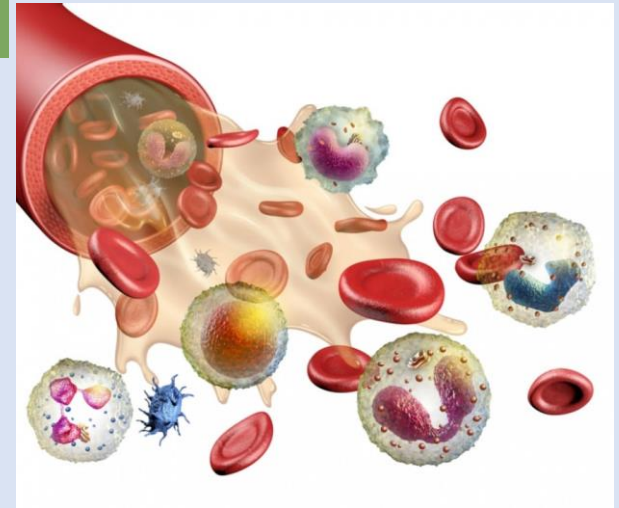
Eritropoietina - EPO

L' eritropoietina (o EPO) è un ormone prodotto dai reni e serve a regolare la produzione dei globuli rossi da parte del midollo osseo.

L' EPO è anche un **farmaco** utilizzato per curare l'anemia in pazienti affetti da malattie renali.

L'eritropoietina però favorisce l'aumento della viscosità del sangue, lo rende denso quasi come marmellata impedendone un flusso scorrevole.

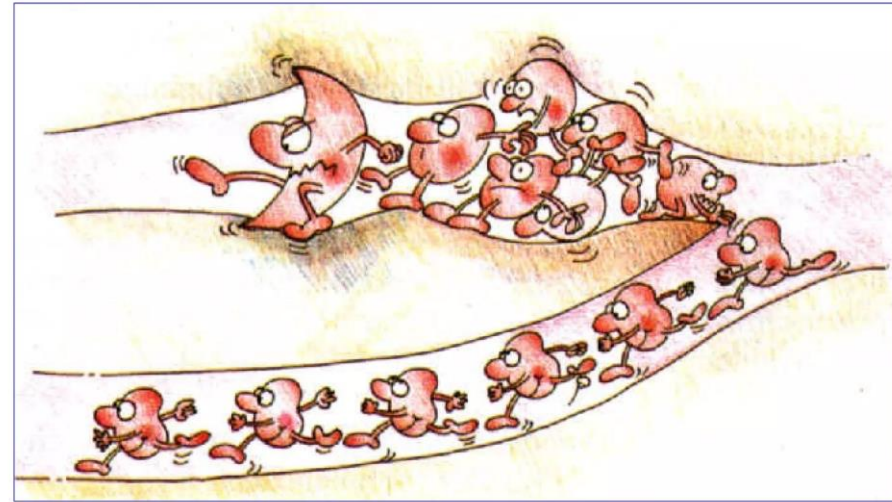
Il farmaco può essere impiegato come sostanza dopante dagli atleti perché aumentando i globuli rossi si migliora il trasporto di ossigeno ai muscoli e al cuore migliorando così la performance sportiva.



...Esattamente come succede quando il traffico diventa congestionato e le auto non riescono a circolare...



**In pratica si crea un INGORGIO!!!
Ci sono troppi GLOBULI ROSSI IN
CIRCOLO !!!**



L'uso dell' EPO comporta gravi rischi per la salute a causa dell'aumento della densità del sangue e della pressione arteriosa (ictus, trombosi, infarto).

L'ematocrito può essere definito come il rapporto percentuale tra i **globuli rossi** e la parte liquida del sangue, detta **plasma**.

Nel ciclismo è stato posto un **limite del 50%** per l'ematocrito. L'atleta che supera questo limite viene escluso dalle competizioni a scopo cautelativo (come accadde a Marco Pantani nel 1999).

