

Ematologia

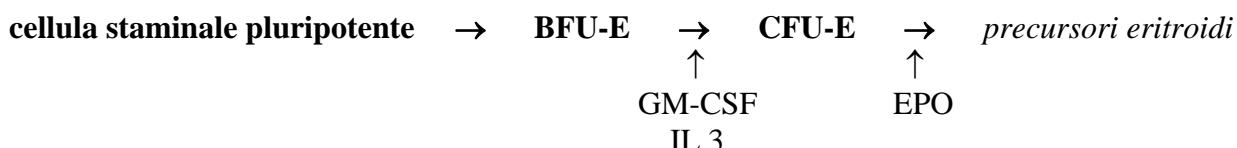
La scoperta che il sangue è costituito da elementi corpuscolati risale alla seconda metà del 1600, ma si è impiegato molto tempo per arrivare a conoscere la forma e il numero delle cellule circolanti. La necessità di misurare accuratamente il numero delle particelle circolanti in un campione di sangue ha avuto da sempre notevole rilevanza, tanto da indurre uno studio costante della tecnologia strumentale in grado di fornire questo tipo di informazioni.

Eritrociti

L'unità anatomo-funzionale dell'eritropoiesi è definita col termine «eritrone»: questo comprende l'intera popolazione cellulare che va dalle cellule staminali orientate in senso eritroide (*progenitori eritroidi* e *precursori eritroidi*) fino agli eritrociti maturi circolanti.

I progenitori eritroidi sono cellule mononucleate identificabili sulla base di test funzionali, cioè in rapporto alla loro capacità di generare in vitro una progenie di cellule eritroidi. La prima tappa è rappresentata dalle CFU-GEMM, cellule progenitrici mieloidi (Colony-Forming Units) dalle quali hanno origine le serie Granulocitaria, Eritroide, Monocitico-Macrofagica e Megacariocitaria. La tappa successiva è costituita dalle BFU-E (Erythroid Burst-Forming Units), che, in terreno di coltura semisolido, sono in grado di dare origine ad aggregati cellulari i quali dopo 14-16 giorni di incubazione danno origine a macrocolonie (burst) di 30-40.000 cellule. Dalle BFE-U originano le CFU-E (Erythroid Colony-Forming Units) che generano in coltura dopo circa 7 giorni aggregati più piccoli costituiti da elementi contenenti emoglobina.

La proliferazione, la maturazione e la differenziazione dei progenitori eritroidi sono stimolate da alcune *citochine* come lo “*stem cell factor*” (*SCF*), l’*interleukina 3* (*IL3*), il *GM-CSF*, l’*interleukina 9* (*IL9*) e l’*eritropoietina* (*EPO*).



L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina dal peso molecolare di 30 Kd. Il gene che codifica la sintesi è localizzato sul cromosoma 7, è composto da circa 3000 coppie di basi e contiene 5 esoni e 4 introni. Nel feto l'EPO viene prodotta principalmente nel fegato, mentre nell'adulto l'organo deputato alla sintesi dell'80% dell'ormone è il rene. L'apporto di ossigeno ai tessuti è il principale fattore fisiologico che regola la produzione di EPO: in risposta all'ipossia viene attivato un "sensore" a livello renale, la cui conformazione varia a seconda che l'ossigeno sia legato o meno: ne consegue un aumento esponenziale del numero di cellule che producono EPO, e quindi un incremento dell'ormone circolante.

La funzione principale dell'EPO sull'eritropoiesi sembra sia la prevenzione della morte cellulare programmata (apoptosi) a livello delle CFU-E e dei proeritroblasti. L'ormone favorisce la sopravvivenza di queste cellule, espandendo in tal modo l'eritropoiesi. L'EPO, inoltre, stimola anche la proliferazione e la maturazione cellulare della serie eritrocitaria.

I precursori eritroidi derivano dai progenitori eritroidi, proliferano e maturano acquistando emoglobina; essi comprendono una gamma di elementi che vanno dagli eritroblasti ai reticolociti midollari e circolanti. Nell'adulto gli eritroblasti si trovano solo nel midollo osseo; quando la

concentrazione di emoglobina supera il 20%, l'eritroblasto cessa di proliferare, espelle il nucleo e diventa reticocolocita. Il reticocolocita è un eritrocita giovane che mantiene i mitocondri, l'RNA messaggero e ribosomiale per la sintesi dell'emoglobina. Dopo 2÷4 giorni le strutture citoplasmatiche si perdono e resta l'eritrocita maturo, che ha una vita di 120 giorni.

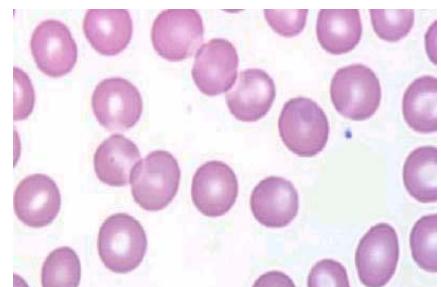
Le caratteristiche dei ***precursori eritroidi*** e del ***pool maturativo*** sono riassunte nella seguente tabella:

Cellula	Diametro	Nucleo	Nucleoli	Citoplasma
Pro-eritroblasto	20-25 μ m	rotondo, aumento rapporto N/C	1 o 2, poco evidenti	Intensamente basofilo; zona chiara perinucleare (arcoplasma) che corrisponde all'app. del Golgi
Eritroblasto basofilo	16-18 μ m	rotondo	assenti	Intensamente basofilo, presenza di arcoplasma
Eritroblasto policromatofilo	9-12 μ m	rotondo	assenti	Diminuzione della basofilia per aumento del contenuto di emoglobina
Eritroblasto ortocromatico	8-10 μ m	rotondo, eccentrico, in via di espulsione	assenti	Colore quasi identico a quello degli eritrociti
Reticocolocito	7-8 μ m	assente		Piccola quota di sostanza basofila che si colora con blu di cresilene.

Le caratteristiche dell'***eritrocita*** (globulo rosso) sono le seguenti:

Cellula priva di nucleo, a forma di disco biconcavo, dimensioni 7x2,5 μ m in numero variabile da 4 a 5,5 milioni/ μ L di sangue.
Produzione → Midollo osseo. La produzione è regolata dall'EPO, prodotta dal rene in funzione del grado di ipossia.
Sangue → tutti gli eritrociti circolano liberamente. Vita 120 giorni.
Struttura → membrana lipoproteica plastica deformabile. Il citoplasma contiene emoglobina in soluzione.
Metabolismo → utilizzazione ATP (prodotto per glicolisi anaerobia) per il mantenimento della membrana e del gradiente osmotico Na ⁺ K ⁺ . Protezione dell'emoglobina dall'ossidazione permanente (metemoglobin-reduttasi) e dalla denaturazione ossidativa (shunt esosomonofosfato e glutathione).
Funzione → respirazione tessutale (trasporto O ₂ e CO ₂).

Il globulo rosso maturo è un disco biconcavo con diametro medio di 8 micrometri (μ m), spessore di 2 μ m, ed un volume di 90 femtolitri (fL) [nella figura eritrociti normali, *colorazione May Grunwald- Giemsa*].



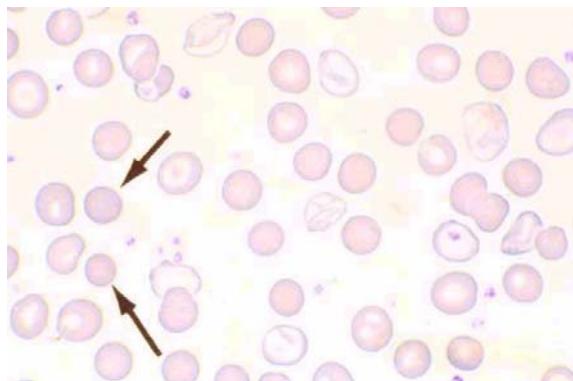
Privo di nucleo e di mitocondri, la cellula ha perduto la capacità di sintetizzare proteine. Il suo metabolismo è sufficiente a provvedere alle necessità durante i 4 mesi di vita in circolo.

L'eritrocita anucleato è flessibile e capace di estreme modificazioni di forma, e l'emoglobina provvede efficientemente al trasporto ed alla cessione dell'ossigeno. L'appropriata funzione e durata di vita dell'eritrocita dipendono dalle relazioni tra la *membrana* ed il *metabolismo cellulare*.

La *membrana* è costituita da due strati molecolari che consistono di molecole di fosfolipidi compattamente affiancate, con estremità polari rivolte verso la fase aquosa da entrambi i lati. La superficie esterna è relativamente ricca di fosfatidilcolina, sfingomielina e glicolipidi; la porzione interna della membrana contiene prevalentemente fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol. Alterazioni della forma del globulo rosso possono essere la conseguenza di alterazioni dei lipidi plasmatici, e capaci di influenzare la sopravvivenza cellulare. Le proteine

interne, principalmente glicoforina A, attraversano lo strato lipidico bimolecolare e sono in contatto con la fase acquosa ai due lati della membrana. Circa il 60% della molecola di glicoforina A è costituita da carboidrati e da catene oligosaccaridiche. Le catene sono attaccate all'estremità esterna della molecola, e servono a fornire una carica negativa alla superficie del globulo rosso, caratteristica importante per evitare l'agglutinazione delle cellule. Le proteine periferiche, formano una trama reticolare sulla superficie interna della membrana. Due sono i componenti più abbondanti, la spectrina e l'actina. La forma biconcava della cellula rossa e molte delle sue proprietà meccaniche possono proprio essere determinate dalle proteine periferiche di membrana. Si ritiene che un'anomalia di queste proteine sia responsabile delle deformazioni cellulari che si

osservano nei pazienti con ellissocitosi ereditaria e sferocitosi (nella figura *sferociti*). La presenza di sferociti è spesso indice di *sferocitosi ereditaria o anemia emolitica*.



Il metabolismo, poiché il globulo rosso è anucleato, è del tutto peculiare. In assenza di mitocondri, è assai scarsa la capacità di metabolizzare acidi grassi e aminoacidi. L'energia è generata pressoché esclusivamente attraverso la degradazione del glucosio. E' opportuno suddividere questa attività

metabolica nella principale via anaerobia ed altre vie secondarie. La via non-ossidativa o anaerobia (*ciclo di Embden-Meyerhof*) è responsabile dell'utilizzo di circa il 90% del glucosio cellulare. Nella conversione del glucosio a lattato, il guadagno netto di molecole di ATP fornisce i fosfati ad alta energia, necessari per il mantenimento della forma e della flessibilità cellulare, per preservare i lipidi di membrana e per rifornire di energia le pompe metaboliche che controllano gli scambi di sodio, potassio e calcio.

Quando l'ATP è deficitario a causa dei difetti acquisiti o ereditari della glicolisi, la sopravvivenza della cellula è drasticamente ridotta e ne consegue un'anemia emolitica.

Il ciclo di Embden-Meyerhof ha un ruolo essenziale nel mantenere i piridin-nucleotidi in forma ridotta per provvedere alla riduzione della metaemoglobina (*via della emoglobina-reduttasi*) ed alla sintesi del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (*ciclo di Rapaport-Luebering*). La quantità di 2,3-DPG prodotta dipende dall'attività della glicolisi, determinata dall'enzima fosfofruttochinasi. Questo enzima è sensibile al pH: esso aumenta l'entità della glicolisi con l'aumentare del pH e ne diminuisce l'attività con la diminuzione del pH. Il significato del 2,3-DPG sta nella sua capacità di modulare la liberazione dell'ossigeno a seconda delle esigenze dei tessuti. Questa risposta è attivata da una variazione della proporzione di ossigeno estratta dai tessuti; ogni volta che il sangue venoso contiene un'aumentata produzione di emoglobina deossigenata, la glicolisi viene stimolata ad una maggiore produzione di DPG. Ciò diminuisce l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno consentendo una maggiore liberazione di questo per una data tensione di ossigeno nei tessuti.

Altra via metabolica è lo *shunt degli esoso-monofosfati* (*via del fosfogluconato*). Questo sistema energetico accoppia il metabolismo ossidativo con la riduzione del piridin-nucleotide e del glutathione proteggendo il globulo rosso da ossidanti ambientali. Quando questa via metabolica è funzionalmente deficitaria o quando ossidanti ambientali ne eccedono la capacità riducente, si verifica una denaturazione della globina e l'emoglobina forma un precipitato noto come "Corpi di Heinz" lungo la superficie interna della membrana eritrocitaria. Questa forma di distruzione ossidativa del globulo rosso si verifica solitamente nei pazienti con deficienza della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi legata al cromosoma X, l'enzima principale della via metabolica del fosfogluconato.

Leucociti

Granulociti e monociti derivano da un unico progenitore comune *CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Monocyte)* che è in grado di dare origine, in coltura, a colonie granulocitarie e macrofagiche.

La granulocitopoesi ha luogo nel midollo osseo. La sua base citomorfologica è costituita da una serie di compartimenti cellulari; ossia un insieme di cellule con caratteristiche morfologiche comuni.

Le caratteristiche della **granulo-monocitopoesi** sono riassunte nella seguente tabella:

Cellula	Diametro	Nucleo	Nucleoli	Citoplasma
Mieloblasto	20-25 μ	Rotondo	Da 2 a 5	Da debolmente basofilo a intensamente basofilo. Non si apprezzano granulazioni, o queste sono molto rare
Promielocita	20-30 μ	Ovalare	Da 1 a 2	Lievemente basofilo. Numerose granulazioni azurofile: compaiono le granulazioni specifiche.
Mielocita	12-20 μ	rotondo o ovalare	1 o 2	Debolmente acidofilo. Sono presenti fini granulazioni specifiche molto numerose, più rare le granulazioni azurofile.
Metamielocita	12-18 μ	reniforme	Assenti	Intermedie fra quelle del mielocito e del granulocito
Granulocita (Neutrofilo, Eosinofilo, Basofilo)	12-20 μ	A bastoncello	Assenti	Acidofilo, con fini granulazioni specifiche, rare granulazioni azurofile.

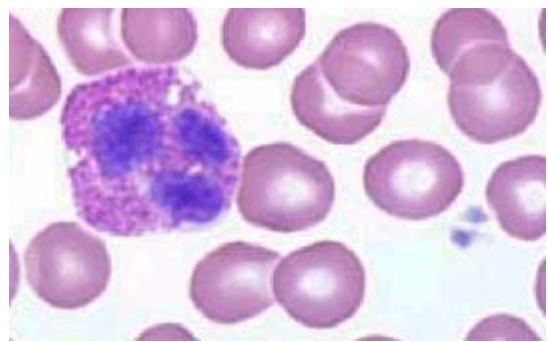
Nel sangue circolano in media 70×10^7 **granulociti neutrofili**/kg di peso corporeo. Il tempo medio di permanenza in circolo dei granulociti è di 9-10 ore. Una volta che essi hanno lasciato il sangue e sono entrati nei tessuti per svolgervi le loro funzioni, non fanno più ritorno al sangue.

Ogni giorno sono rinnovati in media $1,6 \times 10^9$ granulociti/Kg di peso corporeo, il che corrisponde in un uomo di 70 Kg a più di 110 miliardi.

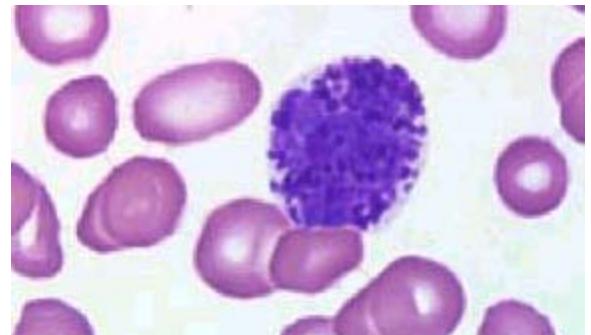
L'organo che produce i granulociti neutrofili, è il midollo osseo, dove le cellule staminali proliferano e si differenziano in elementi morfologicamente riconoscibili chiamati mieloblasti. Dai mieloblasti, attraverso una serie di divisioni cellulari e di processi maturativi, si producono i mielociti, quindi i metamielociti, che non sono più capaci di dividersi e maturano a granulociti, i quali hanno inizialmente un nucleo a bastoncello e poi multilobulato (nell'immagine a destra leucocita polimorfonucleato nel sangue).



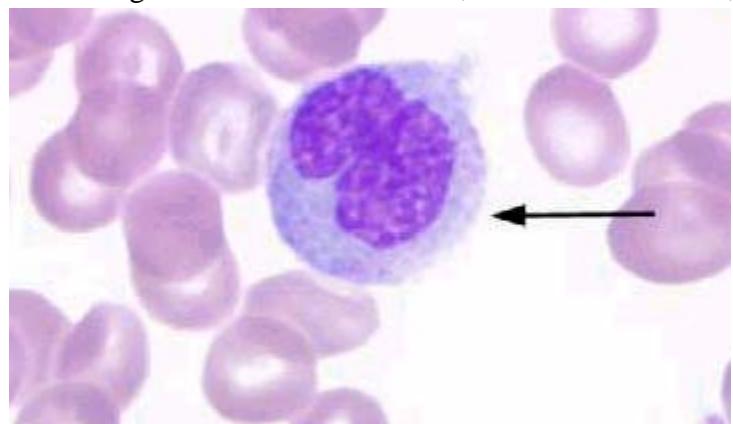
La produzione e la cinetica dei **granulociti eosinofili** sono simili a quelle dei granulociti neutrofili. I granulociti eosinofili possiedono le stesse caratteristiche funzionali e metaboliche dei neutrofili, ma la loro capacità di “killing” è inferiore e il loro ruolo nella difesa dalle infezioni è del tutto secondario. Gli eosinofili sono coinvolti in reazioni immunitarie evocate da proteine estranee e da complessi antigeno-anticorpo capaci di fissare il complemento. Gli eosinofili sono attratti, per chemiotassi, dalla fibrina e dagli enzimi proteolitici che promuovono la formazione di fibrina e istamina, della quale ne modulano gli effetti. Il ruolo fisiologico degli eosinofili non è chiaro; in patologia l'eosinofilia di solito accompagna le malattie allergiche e le malattie infiammatorie su base immune o infettiva.



I **granulociti basofili**, che sono sempre meno del 3% e generalmente dell'1% dei leucociti circolanti, sono prodotti nel midollo in modo analogo agli altri granulociti. Dal sangue migrano ai tessuti, dove svolgono funzioni simili a quelle dei mastociti tissutali, che originano anch'essi da cellule staminali midollari orientate in senso granulo-monocitico. Le funzioni dei basofili sono principalmente secretorie: in risposta a diversi stimoli (meccanici, fisici e immunologici) essi liberano istamina. Gli anticorpi reaginici (IgE), si legano tramite Fc a recettori specifici della membrana del basofilo innescando un meccanismo di degranulazione con liberazione di istamina.



La **monocitopoiesi** ha sede nel midollo osseo dove a partire dalle CFU-GM si formano i monoblasti, i promonociti e infine i **monociti** che lasciano il midollo, circolano nel sangue (nella figura seguente monocita nel sangue) e vanno a popolare i vari tessuti. In genere le cellule del tessuto monocito-macrofago che popolano i tessuti possono essere distinte in tre categorie. La prima è costituita da istiociti deputati a riconoscere, sequestrare e digerire materiali estranei, cellule senescenti, complessi antigeno-anticorpo ecc., con meccanismi analoghi a quelli dei granulociti neutrofili. La seconda è costituita da macrofagi con attività altamente e variamente specializzata in funzione della loro collocazione anatomica, come ad esempio le cellule di Kuppfer del fegato, i macrofagi della polpa rossa della milza, i macrofagi degli isolotti eritroblastici del midollo. La terza è costituita da monociti con il compito di riconoscimento degli antigeni e nella dinamica della risposta immunitaria. Sono le cosiddette “antigen presenting cells” dei linfonodi e della cute (cellule di Langhans del derma).



I **linfociti** (immagine a destra) sono gli elementi circolanti responsabili della risposta immunitaria sia cellulare che umorale. Nel corso dei primi anni di vita i linfociti costituiscono il 30-70% del totale dei globuli bianchi presenti nel sangue periferico ed il 10-30% degli elementi cellulari midollari. Negli adulti la percentuale varia tra il 20 e il 40%; il valore assoluto in termini numerici nel soggetto sano oscilla tra 1500 e 4000 unità/mmc.

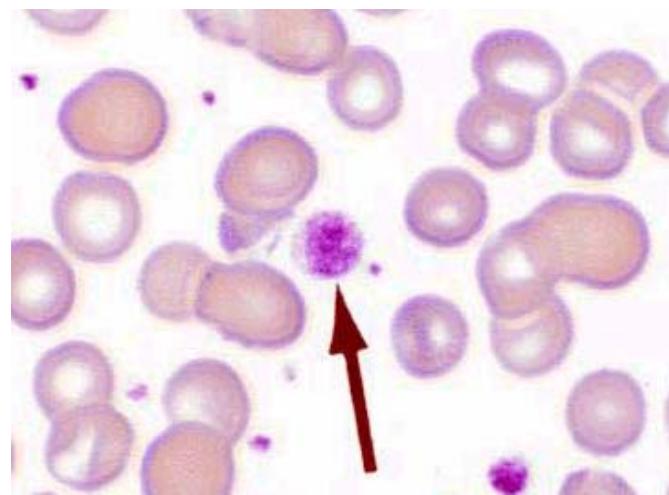


In base al tipo di risposta immunitaria cui sono deputati si possono distinguere in linfociti T, B e Null. In condizioni di non attivazione, la differenziazione morfologica tra queste popolazioni non è possibile ed è necessario ricorrere alla tipizzazione degli antigeni di membrana, presenti sulla membrana citoplasmatica mediante tecniche di *citofluorimetria*. I T-linfociti, timo-dipendenti, sono responsabili dell'immunità di tipo cellulare. Queste cellule vengono a contatto con l'ospite non desiderato, *non-self*, inibendone la crescita e uccidendo gli elementi estranei. Le cellule T, insieme con altre cellule del sistema immunitario, aiutano la difesa dell'organismo contro infezioni virali o di altro tipo. Intervengono nella distruzione di elementi cellulari che siano andati incontro a mutazione spontanea. I B-linfociti sono responsabili dei meccanismi dell'immunità umorale. Alcuni linfociti della linea B, dopo stimolazione da antigene, rispondono trasformandosi in plasmacellule. Esse producono e immettono nel sangue vari tipi di immunoglobuline, dette anche anticorpi. I linfociti che non mostrano caratteristiche né tipo B né tipo T, sono definiti "Null". In tutti gli schemi biologici ci sono settori di regolazione che aiutano la produzione, la crescita e lo sviluppo cellulare ed altri fattori che hanno invece funzione inibitoria, in modo da mantenere un equilibrio del sistema. I linfociti T che aiutano la funzione delle cellule B e delle plasmacellule sono detti "helper". Altre cellule T capaci di deprimere l'attività delle reazioni immunitarie sono definite "suppressors". La determinazione della percentuale delle cellule T "helper" e "suppressors" è indice importante dell'integrità del sistema immunitario di un individuo.

Piastrine

Le **piastrine** sono piccole cellule prive di nucleo, altamente specializzate. Esse circolano in numero variabile da 150.000 a 400.000/mmc. Le piastrine si distribuiscono nel circolo (70%) e nella milza (30%) e sono fra loro in continuo interscambio. Le piastrine circolanti in parte vengono consumate durante il processo emostatico e in parte muoiono per senescenza.

Conoscendo il numero delle piastrine circolanti e la durata della sopravvivenza piastrinica, introducendo un fattore di correzione che tenga conto del numero di piastrine intrappolate nella milza, è possibile calcolare la quantità di piastrine prodotte e distrutte giornalmente, "turnover" piastrinico.



Un soggetto normale con 300.000 piastrine/mmc, sopravvivenza piastrinica di 10 giorni e recupero piastrinico del 60%, ha un turnover di 37.500 piastrine/mmc/die.

Contrariamente a quanto accade per la granulocitopoiesi, non esiste un pool piastrinico di riserva a livello midollare; i meccanismi di autoregolazione fanno sì che ad una piastrinopenia da aumentata distruzione periferica, segua inizialmente un aumento del numero e del volume medio dei megacariociti e, successivamente, un aumento della produzione piastrinica fino ad un massimo di 6-8 volte il valore normale. Per tanto in caso di piastrinopenia secondaria a patologia midollare, si assiste ad una diminuzione del volume dei megacariociti ed una riduzione della produzione piastrinica.

La funzione delle piastrine è quella di impedire la fuoriuscita di sangue da una lesione endoteliale con la formazione del tappo emostatico. Il conteggio piastrinico viene anch'esso eseguito con metodo automatico. Come per gli eritrociti, anche per le piastrine i contatori automatici sono in grado di fornire la curva di distribuzione dei volumi, sulla base della quale vengono valutati il grado di anisocitosi (ampiezza di distribuzione piastrinica, PDW) e il volume piastrinico medio (MPV). Moltiplicando il parametro MPV per il numero di piastrine, viene calcolato il piastrinocrito, analogo all'ematoцитro per gli eritrociti