

Istologia - Lezione n. 15

Il sangue

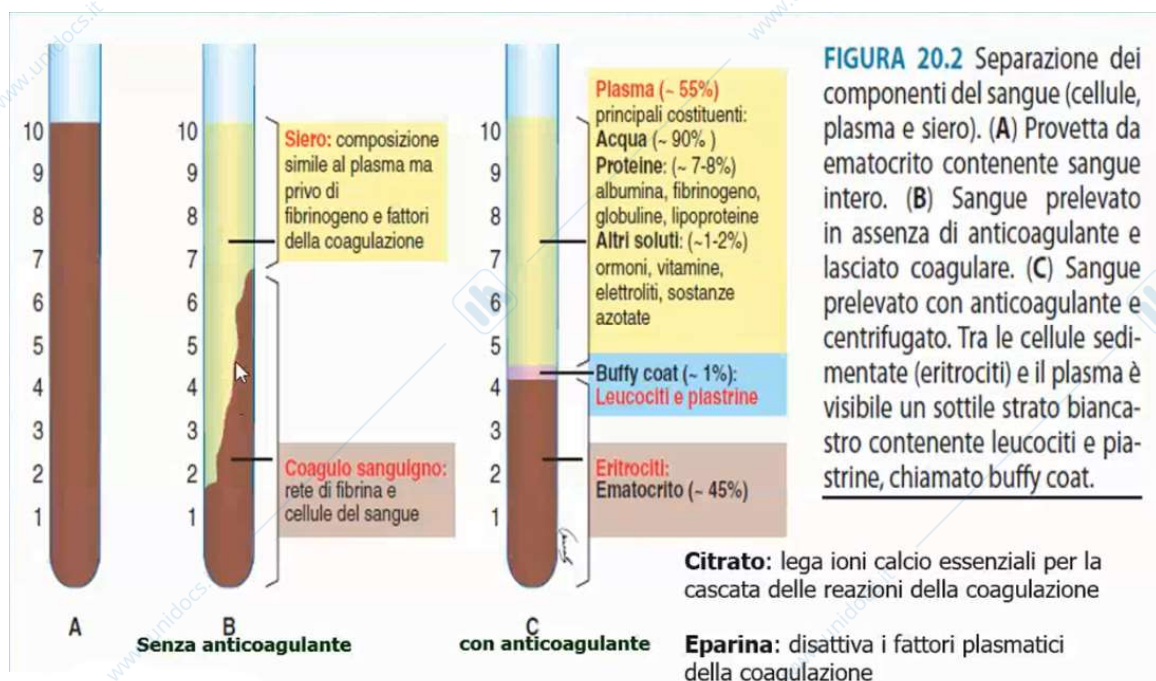
Prof. Francesca Paino – 09/11/2020 – Bertaglia Davide, Grippa Matilde

Il sangue appartiene alla categoria dei tessuti connettivi, ma è un tipo di tessuto molto particolare e specializzato: a differenza degli altri connettivi non è un elemento di struttura, bensì è totalmente liquido e scorre in un sistema di vasi sanguigni, inoltre è composto da una matrice extracellulare completamente fluida che non presenta fibre né altre molecole tipiche dei connettivi, come i glicosamminoglicani. In aggiunta, le sue cellule non sono prodotte al suo interno ma nel midollo osseo emopoietico, e vengono definite elementi corpuscolati (o figurati), così chiamati poiché non sono delle vere e proprie cellule. Escludendo i globuli bianchi infatti, che sono cellule a tutti gli effetti, le altre due componenti corpuscolari del sangue hanno delle particolarità: i globuli rossi (o eritrociti o emazie) sono privi del nucleo dato che lo perdono maturando, e le piastrine (o trombociti) sono frammenti di una cellula molto più grande, il megacariocita.

Il sangue svolge diverse funzioni:

- Si assicura gli scambi gassosi tra tessuti e polmoni, dato che gli eritrociti al suo interno garantiscono il trasporto di ossigeno e anidride carbonica tramite l'emoglobina.
- Nutre ogni distretto dell'organismo, perché attraverso la rete di vasi sanguigni giunge ovunque trasportando i nutrienti necessari.
- Trasporta le varie scorie e i rifiuti emessi dei tessuti al loro luogo di smaltimento, i reni.
- Mantiene costante la temperatura interna.
- Regola il metabolismo.
- Regola l'equilibrio acido-base (tramite i sistemi tampone) mantenendo il pH costante.
- Regola l'equilibrio idrico.
- E' sede della risposta immunitaria.

In un individuo ci sono in media 5-6 litri di sangue, alla temperatura di 37 °C circa, con un pH tra i 7.2 e i 7.4.



CASO PROVETTA B

Estraendo del sangue in una provetta, senza inserire degli anticoagulanti, si può notare come il coagulo si localizzi nella parte inferiore della stessa e abbia una consistenza gelatinosa, contenendo al suo interno tutti gli elementi corpuscolati (eritrociti, leucociti e piastrine) che risultano intrappolati da una rete di fibrina. Il liquido sovrastante invece è detto siero, ed ha una composizione molto simile al plasma, pur non contenendo fattori di coagulazione e fibrinogeno, che sono precipitati nel coagulo.

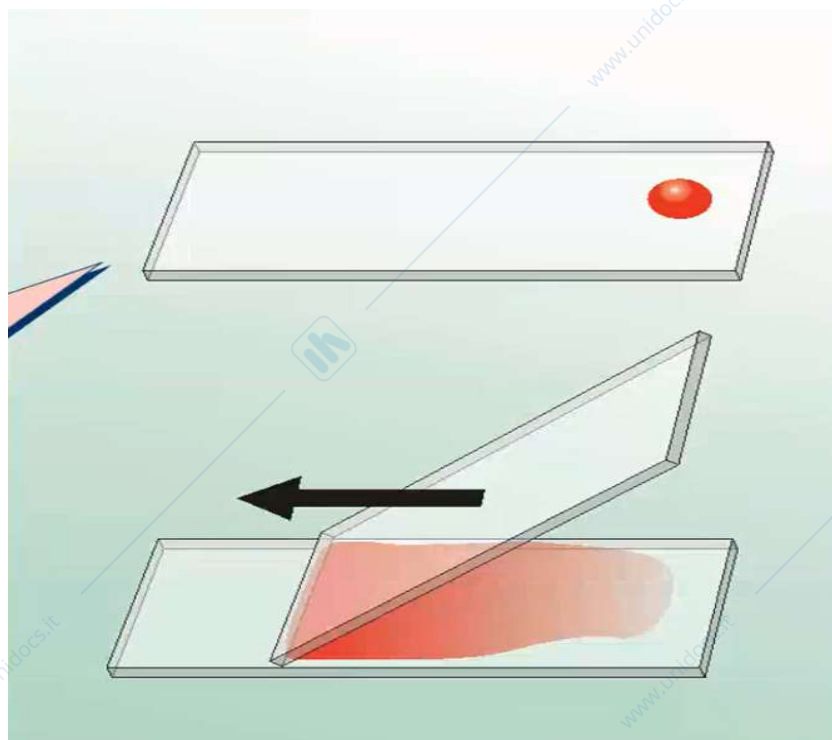
CASO PROVETTA C

Se preleviamo del sangue e utilizziamo degli anticoagulanti, ad esempio il Citrato o l'Eparina, si può notare come si formino tre strati ben differenziati:

- Nello strato più basso si depositano gli eritrociti, costituendo l'ematocrito (ovvero il 45% in volume).
- Al centro abbiamo il buffy coat, uno strato sottile di colore biancastro (l'1% in volume) che contiene i leucociti e le piastrine.
- Nello strato superiore abbiamo una soluzione giallastra, il plasma (il 55% in volume), che è formato quasi solo da acqua (al 90%), da proteine come il fibrinogeno e le globuline (al 7-8%) e anche da una minima percentuale di vitamine ed elettroliti (il 2%).

CAMPIONI DI SANGUE

Per ottenere un elemento istologicamente analizzabile, si effettua quello che viene definito striscio di sangue: si pone su un vetrino una goccia di sangue e con un altro vetrino inclinato di 45 gradi la si tocca e la si striscia, lasciandola poi essiccare e colorandola, per visualizzare al meglio gli elementi sanguigni. La prima colorazione usata è stata quella di Romanovsky, basata su una serie di coloranti acidi e basici, mentre adesso si usano le più moderne miscele di Wright, un misto di blu di metilene e di eosina. Quando si osserva lo striscio al microscopio si nota un fondo chiaro, ovvero il plasma, che viene eliminato dalle colorazioni e dai lavaggi e che quindi risulta praticamente come una superficie vuota, evidenziando gli elementi figurati rimanenti.



IL PLASMA

Nella componente proteica di esso si trovano quasi esclusivamente proteine prodotte dal fegato, tranne le globuline gamma, che invece originano dalle plasmacellule. All'interno della matrice extracellulare abbiamo quindi:

- Albumina, che trasporta ormoni e metaboliti insolubili.
- Globuline Alpha e Beta, che trasportano ioni metallici, vitamine e lipidi liposolubili.
- Globuline Gamma, per l'appunto non prodotte dal fegato ma da plasmacellule (quindi Linfociti B attivati), che dunque sono anticorpi.
- Proteine della coagulazione (Fibrinogeno e Protrombina), responsabili del processo di coagulazione.
- Proteine del complemento, che intervengono nella difesa contro i microorganismi e in reazioni infiammatorie, circondando gli antigeni estranei e opsonizzandoli.

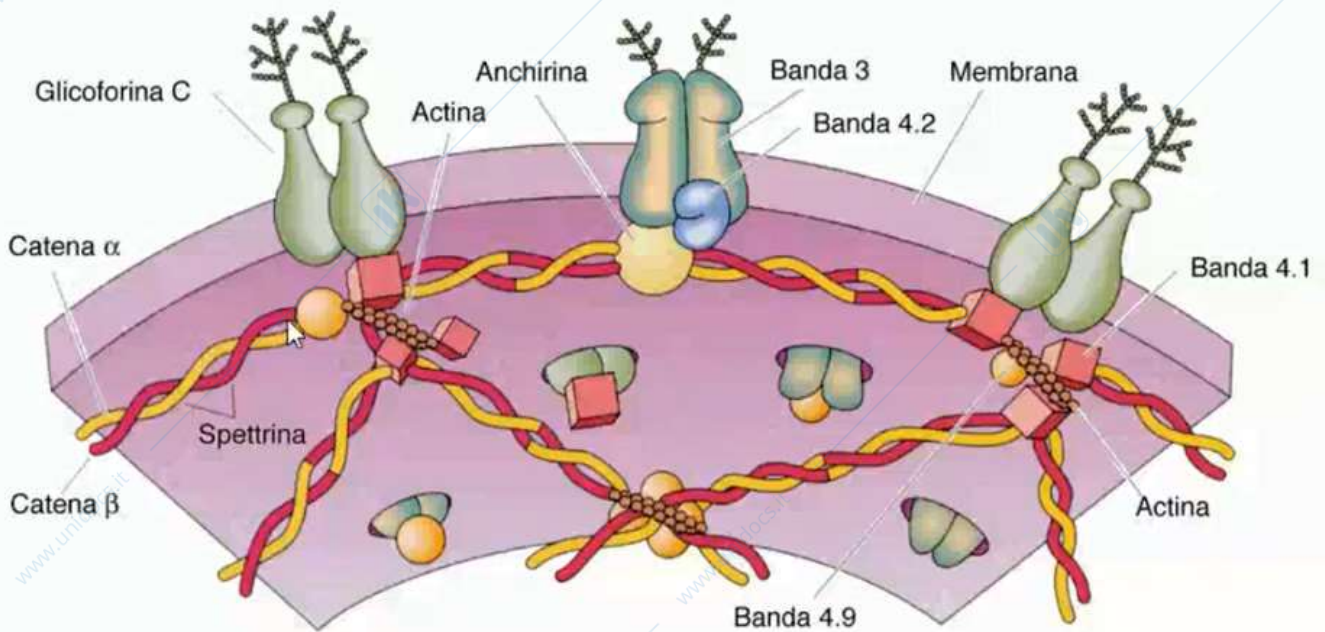
In esso è presente anche una componente lipidica, anche se in quantità minore, contenente:

- Lipoproteine plasmatiche (i chilomicroni), che trasportano i trigliceridi al fegato.
- Lipoproteine a bassa densità.
- Lipoproteine a densità molto bassa.

GLOBULI ROSSI

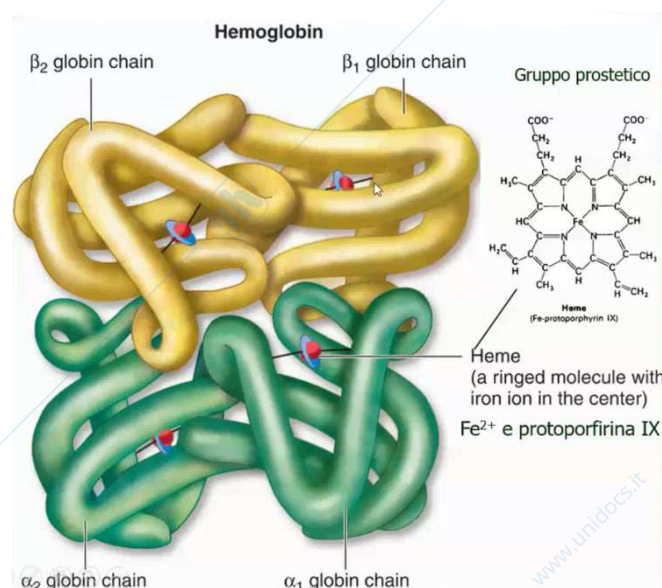
Sono la componente più rappresentata all'interno del sangue. Il loro numero varia tra uomini e donne, ma comunque sono circa 4-5 milioni per millimetro cubo, e ogni secondo ne vengono immessi in circolo circa 3 milioni. Il ricambio è frequente perché hanno vita breve e vengono smaltiti dal midollo osseo o anche dalla milza, tramite l'emocateresi. Si presentano come dei dischi biconcavi, depressi su entrambe le facce, una forma che permette loro di aumentare notevolmente la superficie di scambio per l'ossigeno e l'emoglobina rispetto a una composizione sferica. Hanno un diametro di circa 8 micron, eppure riescono ad entrare persino nei capillari più stretti (2-3 micron di diametro), poiché la flessibilità è una delle loro caratteristiche fondamentali, garantita sia dalla sua membrana che dal citoscheletro.

- La membrana è ricca di fosfolipidi e colesterolo, ma anche di una serie di proteine importanti, come le glicoforine A B e C, che presentano ramificazioni di acido sialico, un acido che ha carica negativa e che quindi conferisce alla membrana esterna una carica negativa che impedisce l'agglutinazione degli eritrociti. Spesso infatti capita che il passaggio tra un capillare e l'altro non sia istantaneo, quindi per evitare che gli eritrociti si appiccichino l'uno all'altro bloccando le vie sanguigne, queste cariche li tengono ad una certa distanza reciproca. Altre proteine utili in questo senso sono poi le proteine della banda 3, dei trasportatori di anioni, proteine di membrana che si collegano al citoscheletro.
- Il citoscheletro forma una sorta di guscio al di sotto della membrana plasmatica, una rete fibrillare piuttosto compatta che la sostiene e la rende molto flessibile, donando la capacità di deformazione all'eritrocita. Esso è formato da catene di Spettrina, una proteina costituita da una catena alfa e una beta avvolte in un'elica che forma la maglia al di sotto della membrana. Inoltre, a rafforzare questa maglia abbiamo proteine come l'actina e proteine della banda 4.1, che stabilizzano il citoscheletro e fungono da ponte con le proteine della membrana plasmatica (ad esempio, la 4.1 prende contatto con la glicoforina C, oppure proteine come anchirina, che possono prendere contatto con glicoforina C oppure con proteine della banda 3). Le interazioni che avvengono tra le proteine di membrana e del citoscheletro vengono considerate interazioni verticali, mentre quelle tra proteine del citoscheletro stesso (actina, spettrina e anchirina) sono chiamate interazioni orizzontali.



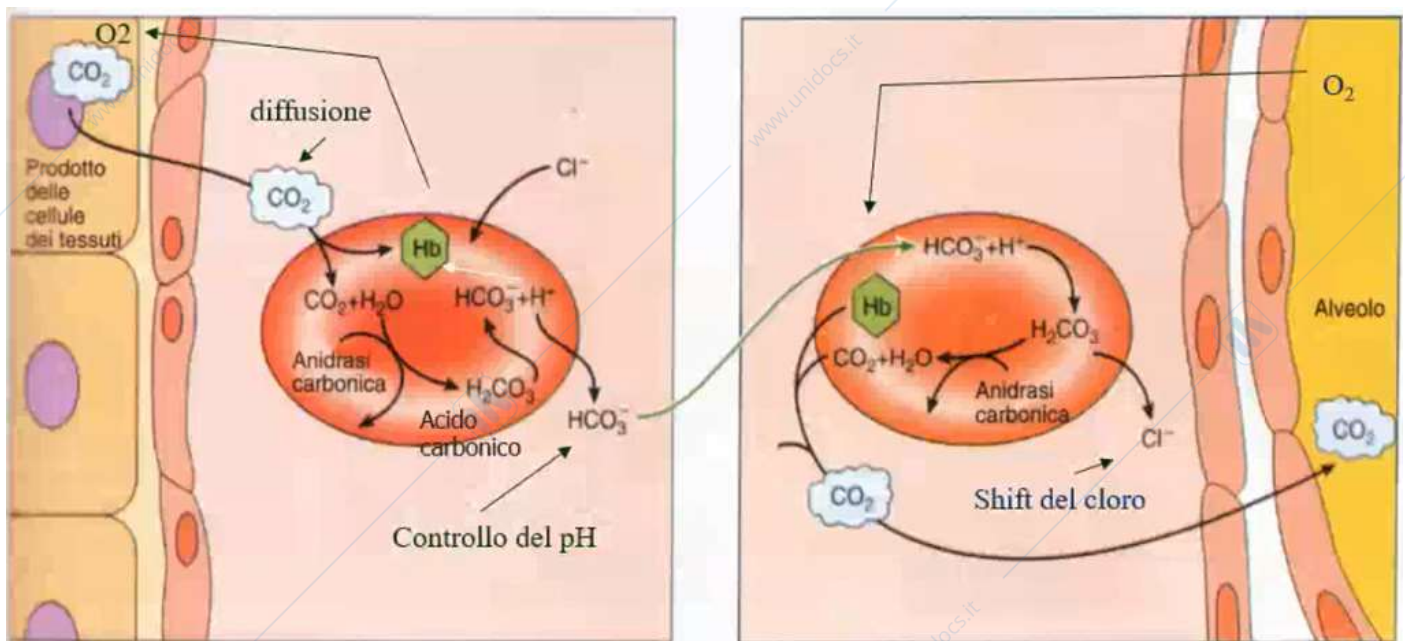
Il citoscheletro forma una sorta di lattice esagonale bidimensionale: spettina, actina e proteine della banda 4.1. Si lega alla membrana tramite **l'anchirina**.

Il globulo rosso è costituito da un 66% di acqua e il 33% di proteine, di cui il 95% è emoglobina. L'emoglobina è la proteina responsabile del trasporto di ossigeno e anidride carbonica, quindi all'interno dell'eritrocita è predominante, dato che rappresenta la base della funzione principale della cellula. Essa è costituita da quattro catene polipeptidiche, due alfa e due beta, quindi è una proteina tetramerica. In ogni subunità c'è un gruppo eme, detto gruppo prostetico, costituito da un anello aromatico chiamato protoporfirina 9 formato da 4 anelli pirrolici, al cui centro c'è uno ione ferroso ($2+$). Il suo stato d'ossidazione è importante perché è quello che permette il legame reversibile con l'ossigeno. L'emoglobina assume nomi differenti a seconda dell'elemento che lega: viene definita ossiemoglobina se lega l'ossigeno, oppure carboamminoemoglobina se lega l'anidride carbonica. L'emoglobina inoltre può legare anche il monossido di carbonio e l'ossido nitrico, ma entrambe le interazioni sono tossiche poiché irreversibili: il composto non si slega dalla proteina e blocca quindi il flusso di ossigeno, che porta alla morte dei tessuti e in seguito anche dell'organismo.



In realtà esistono quattro tipi di emoglobine, dipendentemente dal tipo di catene che li compongono, perché ci sono anche le catene gamma e delta oltre alle più comuni alfa e beta. Nell'adulto l'emoglobina più presente è l'alfa₂beta₂, quella standard, ma c'è un 2% di alfa₂delta₂ e un altro 2% di alfa₂gamma₂ che è emoglobina residua fetale. La capacità di trasporto dell'ossigeno per quest'ultima è maggiore. C'è da dire però che questi diversi tipi di emoglobina non sono divisi equamente in ogni eritrocita, ma solo in alcuni.

Il compito dei globuli rossi è trasportare la CO₂ e l'ossigeno. Parlando della CO₂, essa viene trasportata nel sangue sotto tre forme: una piccola quantità (circa il 10%) viaggia nel plasma sotto forma di CO₂ disciolta, una quota (circa il 70%) viene trasportata sotto forma di ione bicarbonato all'interno dell'eritrocita e infine un'ultima parte (il 20%) viene legata all'emoglobina. Il processo di inclusione dell'anidride nell'eritrocita è a carico di un particolare enzima, l'anidrasi carbonica, che trasforma la CO₂ prima in acido carbonico e poi in ione bicarbonato. Qualunque sia la via di trasporto, il punto di arrivo finale è costituito dagli alveoli polmonari, dove l'anidride viene scaricata e sostituita con l'ossigeno.



ALTERAZIONI DEI GLOBULI ROSSI

Alterazioni nei legami verticali o orizzontali possono provocare un'alterazione nella forma o nella funzione dei globuli rossi. Le alterazioni nella forma vanno sotto il nome **poichilocitosi**; quando invece, all'interno del sangue si hanno eritrociti che possono presentare forme differenzi, queste alterazioni prendono il nome di **anisocitosi**; un altro tipo di alterazione che può presentarsi è legata alla diminuzione del numero di globuli rossi o della quantità di emoglobina, che determina vari tipi di **anemia**; la variazione di colore va sotto il nome di **ipocromia**, mentre quella delle dimensioni è detta **microcitosi/macrocitosi**.

Esistono infine le inclusioni eritocitarie (corpi di Howel-Jolly) che contengono residui di cromatina.

Se si vanno a considerare le patologie legate ad alterazioni verticali tra le glicoproteine della membrana e le glicoproteine del citoscheletro si ha la **sferocitosi ereditaria**, che provoca la sfericità nell'eritrocita, che non è più biconcavo, perché si perde il contatto tra la membrana e il citoscheletro. Si parla di patologie legate ad alterazioni orizzontali quando si ha un'alterazione nell'interazione tra le proteine del citoscheletro (ad esempio si possono avere difetti nelle subunità alfa o beta della spectrina, nella proteina della banda 4.1, nell'anchirina); queste provocano **ellissocitosi** e anche in questo caso si hanno delle alterazioni nelle funzioni dell'eritrocita.

Al microscopio: nel caso della sferocitosi non si vede l'alone chiaro al centro della cellula perché non si realizza il legame tra anchirina e spectrina. Gli eritrociti risultano poco deformabili e vanno facilmente incontro a emolisi. Anche nel caso dell'ellissocitosi si ha emolisi, ma il processo risulta più compensato.

L'anemia falciforme (o drepanocitosi) è una tipologia di alterazione che però non deriva da alterazioni di tipo verticale o orizzontale, ma da una mutazione genetica puntiforme nel gene delle catene beta dell'emoglobina che, anziché legare l'acido glutammico (amminoacido polare), lega la valina, che è idrofobica. Ciò dà origine a un'emoglobina che non ha la sua solita struttura, ma cristallizza e precipita andando a formare la tipica struttura a falce.

Chi soffre di anemia falciforme ha problemi vaso occlusivi a causa della forma degli eritrociti, accompagnati da altri sintomi quali dolore osseo, toracico o addominale, la possibilità che si verifichino ischemie ed emorragie cerebrali, infarti ossei con necrosi (microfratture) o ulcere trofiche agli arti inferiori.

Com'è possibile che la variazione di un solo amminoacido vada a cambiare la struttura dell'intero eritrocita? Perché l'emoglobina non ha più una forma tetramericata, ma va a formare aggregati di emoglobina cristallizza che precipita all'interno dell'eritrocita; essa non è più distribuita all'interno del citoplasma, ma nel precipitare si accumula da un lato solo della cellula e il globulo rosso diventa una struttura compatta.

(si considerano come valori dell'emoglobina di un'anemia moderata Hb di circa 8g/dl, ma con ampie variazioni individuali da 5 a 11 g/dl).

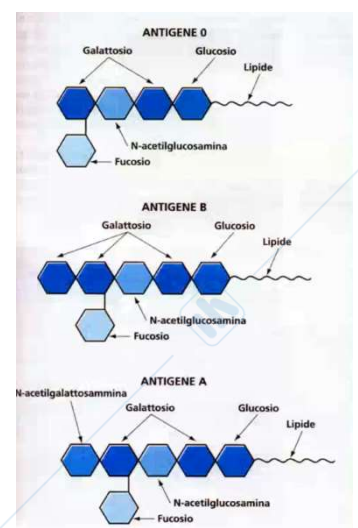
Sulla membrana degli eritrociti ci sono una serie di molecole (glicoproteine e glicolipidi) che presentano catene di zuccheri. Sono importanti dal punto di vista clinico perché determinano sistemi antigenici che sono fondamentali ai fini trasfusionali (in particolare i sistemi ABO e Rh).

Il **sistema ABO** prende in considerazione la presenza di particolari antigeni sulla membrana denominati A e B (si ha il caso di AB quando i due antigeni sono compresenti e si parla di ricevente universale), mentre il sistema O non contiene né l'antigene A né il B ed è definito donatore universale.

Le proteine e i lipidi sulla superficie dei globuli rossi sono legati a dei carboidrati che formano un film protettivo intorno alla cellula. Il tipo di sangue ABO è determinato dalla tipologia di zuccheri che sono usati per costruire questi carboidrati.

Proteine e lipidi contengono degli zuccheri che vengono agganciati al lipide o alla proteina grazie a degli enzimi. I geni non codificano direttamente per gli antigeni di membrana, ma per gli enzimi che aggiungono le catene di polisaccaridi.

Ad esempio il gene O codifica per un enzima che non è funzionale e quindi non si legano specifici glucidi, mentre negli antigeni A e B i geni codificano per enzimi diversi il gene A codifica per un particolare zucchero che si chiama **N-acetilgalattosamina**. Se è attivo il gene B abbiamo l'enzima che lega al lipide o alla proteina il **galattosio**. I gruppi sanguigni dipendono dagli antigeni di membrana, che a loro volta dipendono dalla presenza di enzimi all'interno della cellula, e i geni codificano per questi enzimi, che poi comportano variazioni nelle catene laterali glucidiche. Antigeni A, B o O sono glicoproteine o glicolipidi che hanno catene laterali di zuccheri; l'enzima, che viene codificato dagli specifici geni, è quello che aggiunge specifici zuccheri alla proteina o al lipide di partenza.

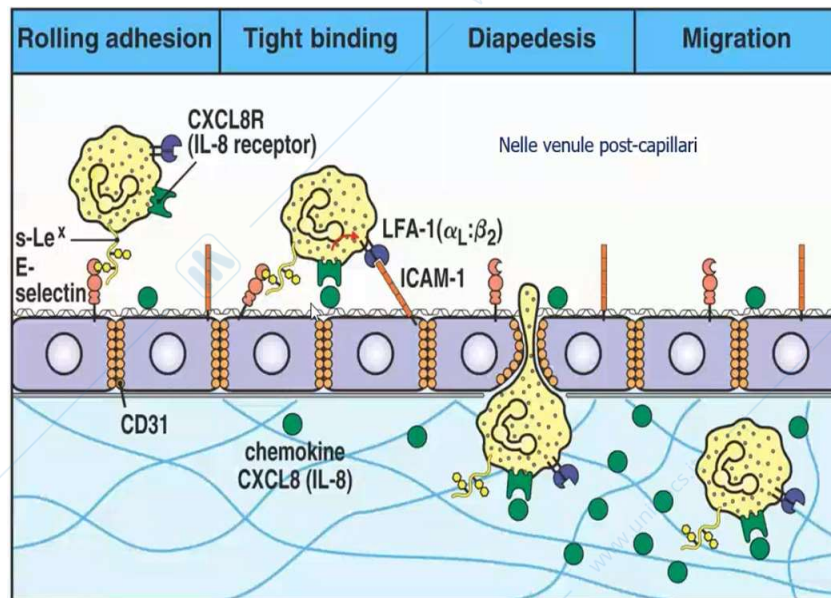


I GLOBULI BIANCHI O LEUCOCITI

I **leucociti** sono cellule responsabili della difesa immunitaria. Si distinguono in:

- granulari, o **granulociti** (perché presentano granulazioni all'interno del citoplasma), che a loro volta si distinguono in base alla tipologia di colorante che legano, in **neutrofil** (sono neutri, non hanno particolare affinità per coloranti né acidi né basici), **eosinofili** (o acidofili, legano l'**eosina**) e **basofili** (legano coloranti basici)
- Agranulari, o **agranulociti**, si dividono in **linfociti** e **monociti**.

La maggior parte dei leucociti si trova al di fuori del torrente circolatorio ematico. Vengono immessi dal midollo osseo e vi rimangono per poche ore per poi passare nel connettivo lasso o nel tessuto linfatico. Possono fuoriuscire dal torrente perché attratti da stimoli chimici esterni ai vasi sanguigni (**chemiotassi**) aderendo alla parete endoteliale e poi fuoriuscendovi. Questo processo si chiama **diapedesi**. Una volta fuori si muovono nel connettivo grazie ad un movimento ameboide.



LA DIAPEDESI

All'interno del tessuto in cui si forma l'infezione vengono prodotte delle sostanze chemo-attrattive (**chemochine**) che vanno a stimolare le cellule endoteliali. Queste esprimono sulla loro superficie delle **e-selectine**, che vengono riconosciute a loro volta dalle molecole presenti sui leucociti, in particolare **s-lex**. Questa interazione serve a frenare il leucocita che scorre insieme al plasma.

Poi iniziano le fasi del processo: una fase di **rolling** in cui il leucocita inizia a rotolare sulle cellule endoteliali grazie ad altri recettori di membrana che riconoscono i ligandi presenti sulle cellule endoteliali.

In particolare ci sono recettori che riconoscono le chemochine che si depositano sulla membrana delle cellule endoteliali, oppure delle proteine, dette **I-cam** o **integrine**; questi ligandi danno origine ad un'interazione che frena il leucocita.

Si ha poi la fase di **arresto**. Quando il leucocita è fermo emette uno pseudopodio a livello delle giunzioni cellula-cellula dell'endotelio, che si sono indebolite perché sono state liberate dai mastociti, a livello tissutale, le istamine e le eparine che vanno a compromettere i legami cellulari.

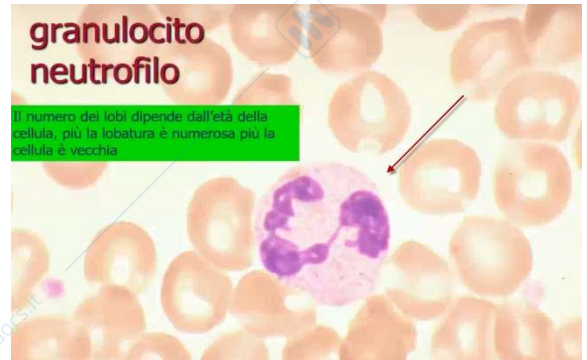
Infine si ha la diapedesi (**extravasazione**), in cui il leucocita si insinua tra le due cellule endoteliali.

Quando si trova nel tessuto connettivo, il leucocita è trascinato nel sito in cui è necessaria la risposta immunitaria (fase di **migrazione** all'interno del connettivo).

I GRANULOCITI

NEUTROFILI

Nello striscio di sangue la moltitudine di cellule è rappresentata dagli eritrociti, ma appaiono ben evidenti anche i leucociti. Il granulocita neutrofilo ha un nucleo (colorato con **ematossilina** o **blu di metilene**) plurilobato, ma non multinucleato. È un solo nucleo che presenta lobature, che sono tanto più numerose quanto più è anziana la cellula. Sono di forma sferica, costituiscono il 60-70% del totale e hanno dimensioni intorno ai 9-12 micron. Il citoplasma è molto chiaro con granulazioni a stento visibili, perché non ha affinità per nessuna tipologia di colorante. Le granulazioni sono vescicole piene di enzimi litici che servono a smaltire e uccidere i microrganismi con cui vengono a contatto.



Esistono tre tipi di granuli:

- **azzurrofilo** (o granulociti primari) che contengono le idrolasi acide;
- i granuli secondari, più piccoli e numerosi, che sono più specifici perché contengono il **lisozima** o la **collagenasi di tipo V**;
- granuli terziari che contengono **collagenasi** e **gelatinasi**. Questi ultimi sono enzimi che servono a scindere o degradare la matrice cellulare del tessuto connettivo in cui i granulociti devono farsi strada per raggiungere il sito di infezione.

Mentre il lisozima serve ad alterare la parete batterica, perché i neutrofili costituiscono la prima difesa contro i batteri. Una volta espletata la loro funzione vanno incontro a morte producendo pus.

Al microscopio si può notare una sporgenza nel nucleo (struttura a bacchetta di tamburo) che è il corpo di Barr (in questo caso il sangue apparterrà ad un individuo di sesso femminile).

La risposta dei neutrofili

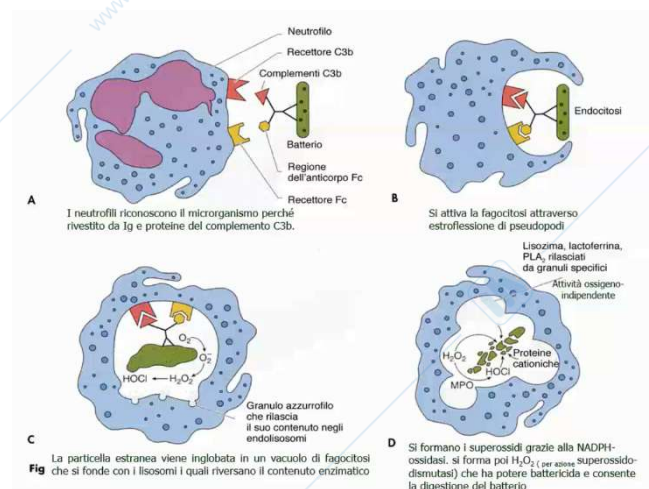
I neutrofili riconoscono il microrganismo che viene circondato da proteine del complemento e anticorpi (immunoglobuline), dette **opsonine**, perché sulla membrana ci sono i recettori appostiti per questi elementi (in particolare per le **IgG**).

Il microrganismo viene opsonizzato e il neutrofilo si aggancia al batterio, lo circonda con pseudopodi (fagocitosi) e lo interiorizza nel vacuolo di fagocitosi.

Questo poi si fonde con i lisosomi (**fagolisosoma**) in modo da poter degradare il batterio.

Il meccanismo di smaltimento del batterio avviene attraverso due modalità:

- ossigeno-indipendente in cui si liberano enzimi che vanno intaccare a la membrana batterica come lisozima e **actoferrina**;



- ossigeno-dipendente dove si ha la formazione di superossidi grazie ad enzimi come **NADPH** e ossidasi; dalla loro formazione si libera anche perossido di idrogeno che ha la più alta funzione battericida.

Dopo l'uccisione del batterio si formano vescicole (corpi residui) che poi vengono portate all'esterno.

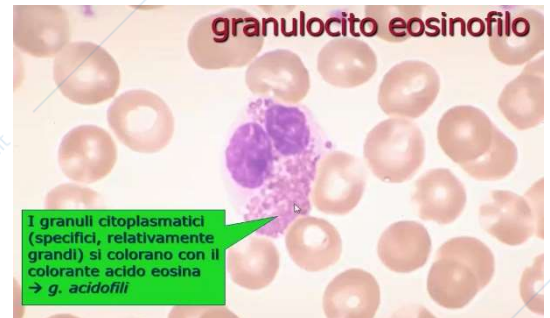
La formazione di perossido in eccesso porta anche alla morte del granulocita.

Si noti che la funzione antibatterica continua anche dopo la morte del neutrofilo perché si forma una trama tra residui del batterio e il neutrofilo (**net**) che continua ad avere potere battericida.

I neutrofili, inoltre, producono e rilasciano **leucotrieni** che innescano il processo infiammatorio.

EOSINOFILI

Sono granulociti anche detti acidofili, sono bilobati. Le granulazioni del citoplasma sono molto evidenti. Hanno azione antiparassitaria, in particolare contro gli elminti (parassiti intestinali). Non attuano fagocitosi. Presentano all'interno del citoplasma delle granulazioni specifiche che vanno ad alterare sia il sistema nervoso sia la struttura del parassita. Sono anche associati ai basofili nelle reazioni allergiche moderando gli effetti infiammatori (eliminano i complessi antigene-anticorpo). Rimangono in circolo per 6-10 ore, poi migrano nel connettivo dove sopravvivono per 8-12 giorni.



Contengono un cristalloide, una grossa vescicola che contiene proteine basiche a lamelle parallele, e numerose proteine. In particolare contiene 4 proteine maggiori:

- proteina basica maggiore (major basic protein o **MBP**) che contribuisce alla distruzione della membrana degli elminti
- proteina cationica degli eosinofili (eosinophil cationic protein o **ECP**) che neutralizza l'eparina nei processi infiammatori
- perossidasi (eosinophil peroxidase o **EPO**) che lega i microrganismi e facilita la fagocitosi
- neurotossina (eosinophil-derived neurotoxin o **EDN**) che altera il sistema nervoso degli elminti
- inoltre possiede enzimi idrolitici (istaminasi), collagenasi e catepsina che servono a degradare il collagene per rendere possibili gli spostamenti nel connettivo e infine i granuli azzurrofilici (lisosomi).

BASOFILI

Sono granulociti con granulazioni che si colorano allo stesso modo del nucleo tanto da renderli indistinguibili al microscopio. Anche in questo caso il nucleo è bilobato e si ha produzione di eparina e istamina (hanno una funzione molto simile a quella dei mastociti all'interno del connettivo). Sono responsabili delle risposte nei processi infiammatori dovute ad allergie (asma e orticaria), sono dotati di movimenti ameboide e hanno scarsa fagocitosi. Possiedono recettori per le immunoglobuline E (**IgE**) che servono nelle risposte allergiche; in particolare, quando c'è il legame recettore-IgE il basofilo rilascia granuli specifici contenenti **istamina** (vasodilatatore) ed **eparina** (anticoagulante). Producono anche **leucotrieni**, lipidi che vanno a stimolare la contrazione della mucosa liscia dei vasi sanguigni aumentando la permeabilità vascolare, e diversi enzimi come la **perossidasi**, la **sulfatasi acida** e la **arilsulfatasi**.

