

GIUSEPPE GARDENGHI (*)

UNA ESERCITAZIONE SUL SANGUE

Un'esercitazione didattica sul sangue risulta di sicuro effetto sull'attenzione degli studenti e richiede un modestissimo lavoro di preparazione da parte dell'insegnante. Il materiale biologico è sempre abbondante in qualsiasi momento dell'anno; l'attrezzatura necessaria semplice e di facile reperibilità.

Il sangue. Nella sua definizione più ampia il sangue è un tessuto liquido che contribuisce alla diffusione e al trasporto di numerose sostanze come sali minerali, aminoacidi, proteine, ormoni, vitamine, anticorpi, ossigeno, anidride carbonica ecc. ai diversi distretti dell'organismo dove queste sostanze possono essere utilizzate o anche eliminate.

Il sangue può essere contenuto in un complesso di cavità (le lacune del corpo) o in un insieme di vasi che si aprono in cavità (si parla allora di apparato circolatorio aperto) o in un sistema di soli vasi (apparato circolatorio chiuso). Il sangue è costituito da una parte liquida chiamata *plasma* in cui sono generalmente contenute in sospensione delle cellule che possiamo chiamare genericamente *emociti*; il tutto può essere tenuto in movimento dalle contrazioni del corpo dell'ani-

male, dal movimento delle ciglia che possono tappezzare le cavità che contengono il sangue o, come più spesso accade, dalla contrattilità di un tratto più o meno lungo di vaso (cuore).

I trasportatori di ossigeno. Spesso il sangue funziona da trasportatore di O_2 a quelle cellule situate nel profondo dei tessuti che non potrebbero assumerlo direttamente dall'ambiente; il rifornimento dell' O_2 , così come l'eliminazione della CO_2 , sono possibili grazie alla presenza nel sangue di sostanze, dalla natura chimica assai complessa, capaci di legarsi a questi due gas con un legame che si stabilisce se la loro pressione parziale è elevata e si scioglie se questa è bassa. Queste sostanze vengono spesso chiamate *pigmenti respiratori o trasportatori di O_2* . Il trasporto avviene mediante il gioco di differenze di pressione: ad elevate pressioni parziali di O_2 , come si può avere a livello della branchia o del polmone, il pigmento si lega all' O_2 mentre a basse pressioni di O_2 , come si ha nei tessuti, il pigmento cede il gas ai tessuti; analogamente, ma con direzione contraria, succede per la CO_2 .

Nel regno animale i trasportatori di O_2 possono essere raggruppati in un numero assai ristretto di categorie. Cito in primo luogo le *emoglobine*, diffuse in molti gruppi animali, che possono essere disciolte nel plasma come ad esempio in parecchi Policheti, in alcuni Molluschi (*Planorbis*), in qualche Insetto (1), in parecchi Crostacei (*Daphnia*, *Artemia*); op-

(*) Dott. Giuseppe Gardenghi, dell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna.

(1) Negli Insetti, data la loro respirazione tracheale che permette l'entrata dell'aria fin nell'intimo dei tessuti, i trasportatori di O_2 perdono di importanza; solo in qualche forma acquatica (larve di *Chironomus*) o parassita (larve di *Gastrophilus*) si può trovare emoglobina disciolta nel plasma.

pure che possono essere contenute in cellule, chiamate *emazie* o *eritrociti*, sospese nel liquido sanguigno come si riscontra nei Vertebrati e in altri gruppi animali di cui si parlerà più avanti.

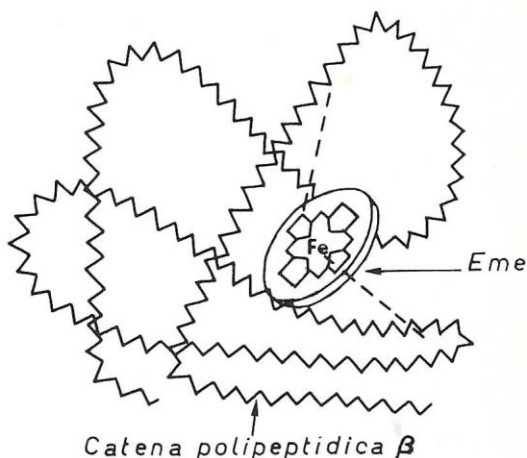
Chimicamente le emoglobine sono delle proteine coniugate costituite da una parte proteica la *globina* la cui composizione in aminoacidi è caratteristica di ciascuna specie e da un gruppo non proteico, l'*eme*, comune a tutte le emoglobine. L'*eme* è una ferroporfirina con un atomo di ferro bivalente al centro della molecola (v. fig. 1). Spesso le emoglobine sono dei polimeri, nei Vertebrati ad esempio sono dei tetrameri, costituite cioè da 4 unità fondamentali comprendenti quindi 4 catene polipeptidiche e 4 gruppi eme. Nell'emoglobina umana, dopo la nascita, le 4 catene sono uguali a 2 a 2 e vengono chiamate α e β ; ogni catena α è formata da 141 aminoacidi, ogni catena β da 146, in totale 574 aminoacidi. Il peso molecolare dei 4 gruppi eme sommato a quello delle 4 catene di aminoacidi risulta di 68.000 circa. Ricordo che mentre le due catene α si trovano nella primissima emoglobina fetale e si mantengono per tutta la vita, le catene β compaiono solo poco prima della nascita; durante la vita fetale, nella molecola dell'emoglobina, si susseguono diverse catene simili alle β , distinguibili da queste per alcuni aminoacidi.

Assai simili alle emoglobine sono le *eritrocruorine* (es. nel plasma degli Oligocheti) e le *clorocruorine* (nel plasma di alcuni Policheti).

Molto diffuse sono anche le *emocianine*, sempre disciolte nel plasma, contenenti nella molecola il rame. Esse si trovano nei Molluschi Cefalopodi, in quasi tutti i Gasteropodi, nella maggioranza dei Crostacei e in molti Aracnidi.

Ricordo infine altri due pigmenti respiratori meno diffusi, l'*emeritrina*, nella cui molecola è presente il ferro, riscontrabile nelle emazie celomiche dei Sipunculoidei, raramente nei Policheti, in alcuni Priapulidi e Brachiopodi e l'*emovanadina*, contenuta in cellule (vanadociti), nella cui molecola è presente il vanadio come si riscontra in certi Tunicati.

Sulla natura chimica di questi 3 ulti-



1) Rappresentazione schematica di un monomero dell'emoglobina.

mi pigmenti respiratori poco si sa: certamente si tratta di proteine legate direttamente al metallo (metalloproteine) senza alcun gruppo simile all'*eme*.

Le cellule del sangue. Nei diversi gruppi animali le cellule sospese nel plasma (dette anche elementi figurati), considerate soprattutto dal punto di vista funzionale, possono essere distinte in tre categorie. 1) Cellule a funzione respiratoria contenenti cioè il pigmento trasportatore di O_2 , dette *emazie*, non sempre presenti negli animali provvisti di sangue; queste cellule hanno spesso forma discoidale che è molto vantaggiosa per gli scambi gassosi in quanto la superficie cellulare risulta assai estesa rispetto al volume della cellula stessa. 2) Cellule sempre presenti che svolgono soprattutto funzione difensiva (legata alla capacità fagocitaria) contro microrganismi, corpuscoli estranei, ecc.; hanno di solito forma globosa e vengono chiamate *amebociti*, *leucociti* a seconda del gruppo animale. 3) Cellule che prendono parte attiva alla coagulazione del sangue, dette *coagulociti*, *trombociti*, *piastrine* a seconda della forma e del gruppo. Non in tutti gli animali sono presenti cellule di questo tipo.

Per chi volesse trarre qualche considerazione comparativa o filogenetica, elenco rapidamente i tipi di cellule che si incontrano nel sangue dei principali grup-

pi animali che ne sono provvisti e anche l'origine embriologica delle cavità e dei vasi in cui il sangue è contenuto.

Nei Platelminti manca un apparato circolatorio differenziato, esistono solo delle lacune di origine blastocelica (cioè derivate dalla cavità della blastula) ripiene di liquido in cui sono sospese cellule capaci di movimenti ameboidi (amebociti).

Fra gli Anellidi che hanno cavità celomatica (di origine mesodermica) e apparato circolatorio chiuso, scavato nel mesenchima, si hanno diverse condizioni. 1) Sangue nell'apparato circolatorio con pigmento (generalmente emoglobina) disciolto nel plasma e rari amebociti in esso sospese (molti Policheti fra cui i Nereidi, gli Eunicidi; molti Oligocheti e diversi Irudinei. 2) Apparato circolatorio con sangue privo di pigmento respiratorio e rare cellule presenti, ma liquido celomatico con emazie nucleate contenenti emoglobina (*Terebella*). Questa condizione può essere spinta fino a forme che mostrano la riduzione o la scomparsa dell'apparato circolatorio la cui funzione è vicariata dal celoma; in casi simili si parla di sangue celomico.

Nei Sipunculoidei si ha un'ampia cavità celomatica contenente diversi tipi di cellule fra cui sono abbondanti le emazie, nucleate, discoidali, contenenti emeritina.

Nei Molluschi che hanno apparato circolatorio di tipo aperto di origine blastocelica, le cellule del sangue sono amebociti di forma e volume vari, dotati di forte attività fagocitaria. Fra i Bivalvi però si hanno casi in cui, accanto agli amebociti, si incontrano emazie nucleate contenenti emoglobina dalla forma simile a quella delle emazie dei Vertebrati (molti Arcidi, alcuni Tellinidi e Solenidi).

Negli Artropodi, che hanno apparato circolatorio di tipo aperto derivato e dal blastocelico e dal celoma, il sangue (detto emolinfa) non contiene emazie ma amebociti spesso accompagnati da altre cellule fra cui coagulociti (v. coagulazione) e leucociti che presentano diverse affinità tintoriali (Crostacei, Araneidi) similmente a quanto si ha nei Vertebrati.

Gli Echinodermi, nella cavità celomatica e nei vasi e seni da questa derivati

o a questa adiacenti, presentano amebociti dotati di fortissima attività fagocitaria. Ricordo però che alcuni Oloturoidei (*Cucumaria*, *Synapta*) e alcuni Ofiuroidei presentano emazie nucleate contenenti emoglobina.

I Tunicati hanno apparato circolatorio ridotto, scavato nel mesenchima; le cellule ivi presenti sono i vanadociti, emazie contenenti emovanadina e altre cellule come amebociti e linfociti.

I Cefalocordati hanno apparato circolatorio ben differenziato, non completamente chiuso, di origine mesenchimatica; il sangue porta in sospensione solo poche cellule del tipo dei linfociti dei Vertebrati.

Vediamo infine più dettagliatamente le cellule del sangue dei Vertebrati che sono gli animali più spesso impiegati per esercitazioni sul sangue. L'apparato circolatorio è chiuso, scavato nel mesenchima. Le cellule si distinguono nettamente in tre categorie: quelle della serie rossa cioè le emazie o eritrociti o globuli rossi contenenti emoglobina, le cellule della serie bianca o leucociti o globuli bianchi e i trombociti.

Le emazie dei Vertebrati non Mammiferi hanno quasi sempre forma discoidale a contorno ellittico e sono provviste di nucleo; nei Mammiferi invece hanno quasi sempre contorno circolare e quando sono mature, cioè quando si è completata l'eritropoiesi ed esse sono entrate in circolo, mancano di nucleo (v. fig. 2).

I leucociti, a seconda che contengano o no granuli nel citoplasma, vengono distinti in granulati e agranulari. I primi chiamati granulociti, vengono distinti in acidofili, basofili e neutrofili a seconda se i granuli citoplasmatici si colorano rispettivamente con coloranti acidi (es. eosina che colora in rosso) o basici (es. bleu di metilene che colora in bleu) o se si colorano debolmente con i due tipi di coloranti. Fra i leucociti agranulari vengono compresi i linfociti e i monociti. I linfociti hanno nucleo voluminoso e poco citoplasma fortemente basofilo, la cromatina si presenta addensata in macchie. I monociti, spesso assai grandi, sono le cellule più grosse del sangue; il nucleo può avere forma di ferro di cavallo o presentare

delle strozzature, la cromatina si presenta a reticolo. I monociti hanno un forte potere fagocitario per cui sono anche detti macrofagi.

Le dimensioni e le percentuali relative dei vari leucociti variano nelle diverse classi dei Vertebrati e perfino nelle diverse specie; nell'ambito di un singolo individuo si osservano delle variazioni nelle percentuali legate a diversi fattori (ciclo stagionale, condizioni fisiologiche particolari, ecc.). Nella fig. 3 riporto il quadro ematologico dell'uomo con i valori medi delle percentuali delle diverse cellule sanguigne.

I trombociti (così chiamati perché intervengono nella formazione del trombo, cioè del coagulo) nei Vertebrati non Mammiferi sono cellule provviste di nucleo, assai più piccole delle altre, spesso dalla forma affusata o irregolare. Nei Mammiferi, in rapporto alla coagulazione, si trovano degli elementi privi di nucleo, discoidali, detti piastrine o anche trombociti. Le piastrine così come i trombociti dei Vertebrati non Mammiferi sono formazioni assai labili che si distruggono durante la coagulazione del sangue, così che, in uno striscio di sangue di Mammifero, è facile vedere piastrine dalla forma stellata o irregolare.

Un discorso sulle origini delle cellule sanguigne nei diversi gruppi animali mi porterebbe troppo lontano dallo scopo del presente articolo e per giunta, data la scarsità delle notizie sull'argomento, trop-

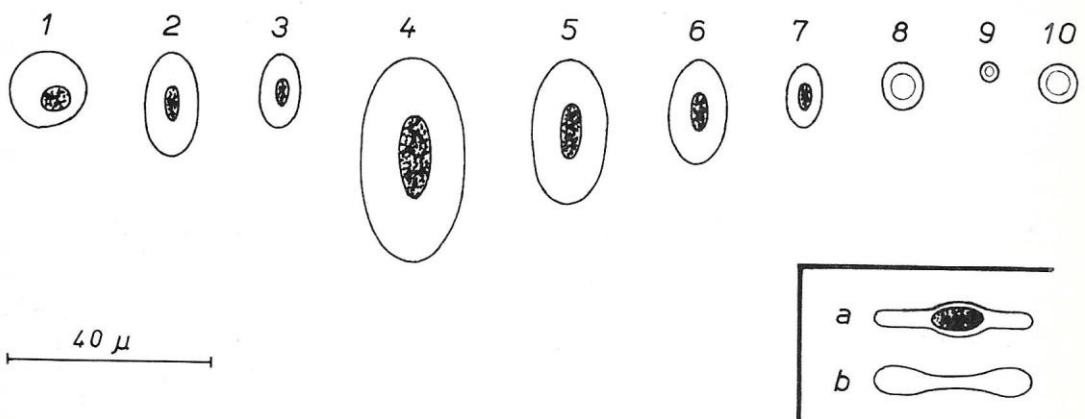
pe volte dovrei scrivere « poco si sa » o « niente si sa »; pertanto mi limito a ricordare la condizione che si ha nei Vertebrati nei quali la formazione degli elementi figurati del sangue ha luogo in particolari sedi (organi ematopoietici) quali il fegato, la milza in momenti precoci della vita e poi il midollo osseo; nei Pesci l'organo eritropoietico definitivo è il mesorene.












La coagulazione. Un'importante caratteristica del sangue di quasi tutti gli animali è la capacità di coagulare appena fuoriesce dal corpo. Questa capacità risulta di grande vantaggio (e quindi si è affermata durante l'evoluzione) in quanto permette la sopravvivenza di animali che, in seguito ad una ferita anche di piccola entità, sarebbero condannati alla morte per dissanguamento.

Poco si sa sulla coagulazione del sangue degli invertebrati. Negli Insetti con sangue coagulabile (alcuni ordini di Insetti hanno sangue non coagulabile) e in molti altri Artropodi il coagulo inizia attorno ad emociti di tipo particolare detti coagulociti e poi si estende al plasma. I coagulociti emettono talvolta lunghi pseu-

2) (Sotto) Forme e misure relative degli eritrociti di alcuni Vertebrati: 1, lampreda; 2, razza; 3, pesce rosso; 4, tritone; 5, rana; 6, lucertola; 7, pollo; 8, elefante; 9, gazzella; 10, uomo. In basso a destra: a, profilo biconvesso di un eritrocita nucleato; b, profilo biconcavo di un eritrocita anucleato.

3) (A destra) Quadro riassuntivo delle cellule del sangue umano. Il numero delle cellule si intende per mm³ di sangue. Le percentuali si intendono rispetto ai leucociti.



Eritrociti o Emazie	Piastrine	Leucociti 5-9'000 per mm ³				
		Granulociti			Linfociti	Monociti
4-5'000'000 per mm ³	2-400'000 per mm ³	Neutrofili 60-70%	Acidofili 1-3%	Basofili 0,5%	20-35%	3-8%
						
						

10 μ

dopodi filiformi formando una rete nelle cui trame il plasma coagula (alcuni Crostacei, Merostomi, Aracnidi). In vari Crostacei non si trovano coagulociti specializzati, ma la coagulazione ha luogo solo mediante agglutinazione di emociti.

Nei Vertebrati la coagulazione ha luogo in maniera simile nelle varie classi pur con differenze legate alla diversa composizione chimica del sangue e alle diverse cellule in esso contenute. Come esempio di coagulazione del sangue ricordo quella dei Mammiferi che è la meglio conosciuta. Si tratta di una complessa serie di reazioni chimiche che richiede fra l'altro la presenza di diversi enzimi: nel punto di rottura delle pareti di un vaso, dal nucleo dei leucociti fermatisi in quel punto e dalle piastrine viene liberata la *protrombina* che in presenza di *trombochinasi* (enzima prodotto dall'endotelio dei vasi) e di ioni calcio si trasforma in *trombina*; questa fa precipitare il *fibrinogeno*, sostanza normalmente presente nel sangue, sotto forma di un reticolo (*fibrina*) che imprigiona nelle sue maglie le cellule del sangue fino a formare una sorta di tappo che arresta la fuoruscita del sangue. Ricordo che tra le maglie del coagulo rimane una parte liquida che viene chiamata *siero*.

➤ *Osservazioni in vivo.* Il sangue che circola nei capillari e ancor più un cuore che pulsa costituiscono sempre uno spet-

tacolo che rimane a lungo impresso nella mente dello studente.

Osservando al microscopio a piccolo ingrandimento (40-100 X) giovani girini di rana o di rospo quando hanno ancora le branchie esterne o giovani tritoni premetamorfici, si può vedere il sangue circolare nei capillari delle loro branchie. Anche la parte più sottile della coda di un girino di rana lascia vedere per trasparenza il sangue circolante nei capillari. Se si vuole che questi Anfibi rimangano fermi durante l'osservazione, si può addormentarli aggiungendo all'acqua in cui soggiornano un anestetico di facile uso come potrebbe essere il cloretone (che è l'alcool triclوروبutilico terziario, detto anche acetonecloroformio) nella dose di 1 parte di soluzione satura acquosa per circa 100 parti di acqua. Non bisogna lasciare i girini nella soluzione di anestetico per più di 5-10 minuti altrimenti gli animali muoiono.

Disponendo di un esemplare vivo di pipistrello si può osservare per trasparenza, al microscopio con piccolo ingrandimento, il sangue che circola nei capillari delle membrane alari.

Assai interessante è anche l'osservazione dell'embrione di pollo che lascia vedere non solo il sangue che scorre nei vasi ma anche il cuore che pulsa. Per condurre osservazioni *in vivo* sull'embrio-

ne di pollo conviene usare uova che abbiano avuto un tempo di incubazione di 2-3 giorni. Uova incubate si possono ottenere in diverse maniere; la cosa più semplice è acquistarle da uno dei frequenti incubatoi o covatoi industriali, oppure, disponendo di un termostato o anche di una sorgente di calore costante a 40° C, si possono mettere ad incubare alcune uova fresche acquistate in campagna da un allevamento di tipo tradizionale in cui non manchi il gallo.

Per aprire l'uovo e mettere bene in evidenza l'embrione conviene procedere in questo modo. Disporre l'uovo con l'asse maggiore orizzontale e tenerlo fermo in qualche maniera, per esempio appoggiandolo sul fondo di una scatola, disposta capovolta, nel cui fondo sia stato praticato un foro più piccolo dell'uovo (v. fig. 4); incidere delicatamente il guscio calcareo e toglierlo a pezzetti fino ad ottenere una finestra di 2-3 cm di diametro; non resta che sollevare la membrana testacea, e l'embrione è visibile.

Per fare qualche striscio di sangue di embrione di pollo, conviene usare uova incubate per almeno 5-6 giorni; aperto l'uovo, si taglia con le punte di una forcina un grosso vaso dell'area extraembrionale, si aspira con una sottile pipetta un poco di sangue, se ne depone una piccola goccia su un vetrino portaoggetto e si esegue subito lo striscio. Per ottenere strisci di sangue di larve di Anfibi, conviene usare girini abbastanza grandi; si taglia la coda dell'animale e si striscia sul vetrino la superficie del taglio.

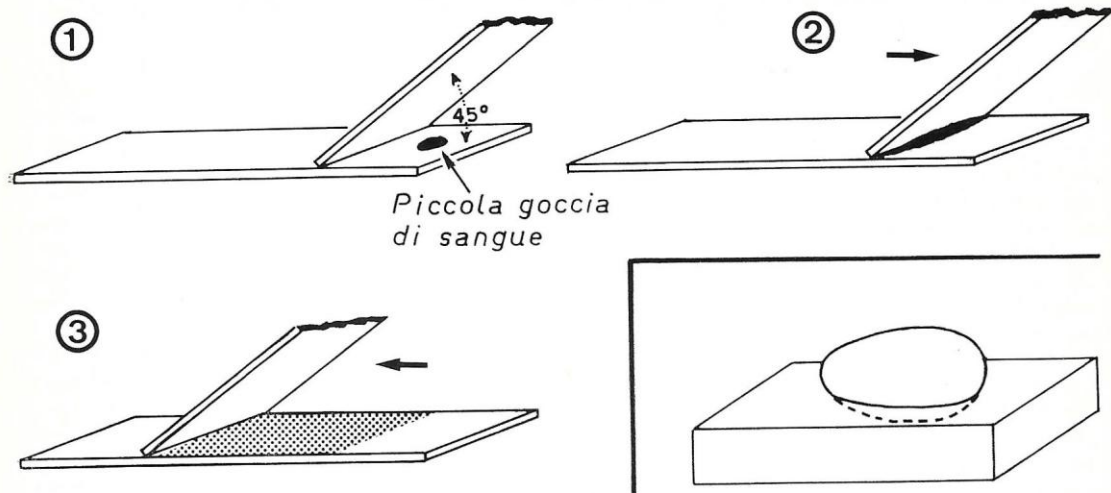
Preparazione e colorazione degli strisci. Il modo migliore per eseguire uno striscio è quello di appoggiare una piccola goccia di sangue vicino ad una estremità del vetrino portaoggetto ben pulito ed asciutto; con un altro vetrino si esegue lo striscio procedendo secondo le indicazioni della fig. 4. Siccome non sempre lo striscio riesce bene, conviene ripetere l'operazione su 5 o 6 vetrini.

Lo striscio va asciugato il più rapidamente possibile; si può anche lasciare asciugare lo striscio all'aria, ma conviene scaldare il vetrino sulla fiamma dalla parte dove non c'è lo striscio fino ad una

temperatura non superiore a quella tollerata dalla mano. A questo punto è già possibile fare una prima osservazione al microscopio per controllare se le cellule sono ben distribuite sul vetrino; tuttavia per una buona osservazione delle varie cellule presenti nel sangue è necessario colorare lo striscio.

La colorazione più completa per il sangue è quella combinata May-Grünwald-Giemsa per la quale non è necessaria la fissazione delle cellule in quanto il liquido di May-Grünwald fissa e colora al tempo stesso. Si tratta di 2 liquidi che si trovano in commercio già preparati. Per la colorazione si procede in questo modo. Il vetrino va appoggiato su una carta assorbente o disposto in una vaschetta mantenendolo sollevato dal fondo. Si fanno cadere diverse gocce di liquido di May-Grünwald in modo da ricoprire lo striscio; dopo 3 minuti si aggiunge lentamente acqua distillata fino ad avere sul vetrino 2 parti di acqua e 1 parte di liquido colorante; si lascia agire la soluzione per altri 5 minuti quindi si lava in acqua distillata. Subito dopo si esegue la seconda parte della colorazione impiegando il liquido di Giemsa diluito nella proporzione di 1 goccia per 1 ml d'acqua distillata; il colorante viene versato a gocce sullo striscio e lasciato agire per 5-8 minuti; si lava con acqua di fonte e infine si asciuga lo striscio con carta assorbente.

Nel caso non siano reperibili ambedue i coloranti di May-Grünwald e di Giemsa, la colorazione si può eseguire con uno solo dei due. Usando il liquido di May-Grünwald si procede come nella prima parte della colorazione più sopra descritta; se invece si usa solo il liquido di Giemsa, occorre fissare prima lo striscio con un bagno di pochi minuti in alcool metilico (è velenoso) o in alcool etilico assoluto. Non potendo disporre di nessuno dei due coloranti si può eseguire anche una banale colorazione con emallume ed eosina, preceduta dalla fissazione, nel modo che passo a descrivere: si colora lo striscio con emallume per circa 10 minuti, si lava in acqua di fonte per 5-10 minuti; si colora quindi con eosina (so-



4) Corretta esecuzione di uno striscio di sangue: 1 - Posizione di partenza; 2 - spostare indietro il vetrino che serve per strisciare fino a toccare la goccia di sangue; 3 - spostare avanti così che il sangue viene tirato e forma un sottile strato di cellule. In basso a destra, un esempio di come si può, con una scatola capovolta, tenere fermo l'uovo durante l'apertura.

luzione acquosa all'1%) per circa 1 minuto; si sciacqua in acqua distillata e si asciuga con carta assorbente.

Se si vuole allestire preparati duraturi di sangue conviene coprire lo striscio col vetrino coprioggetto. A tale scopo si deve asciugare perfettamente lo striscio, si mette su di questo qualche goccia di balsamo del Canada di tipo neutro e si appoggia delicatamente sullo striscio il vetrino coprioggetto previamente pulito.

L'osservazione al microscopio si può fare direttamente sullo striscio con l'obbiettivo ad immersione (si usa l'olio di legno di cedro) anche se questo non è protetto dal vetrino coprioggetto. Se il microscopio non è corredato con un obbiettivo ad immersione, si possono distinguere bene le varie cellule anche con un forte obbiettivo a secco.

Termino con qualche parola di incoraggiamento: anche se le operazioni che ho cercato di illustrare non dovessero nelle prime volte riuscire alla perfezione, se gli strisci e le colorazioni non risultassero proprio da manuale di ematologia, l'osservazione al microscopio delle cellule del

sangue è comunque possibile e tutto l'insieme delle operazioni ha un valore didattico certamente superiore alla semplice osservazione di uno striscio di sangue acquistato già pronto dalle varie ditte che spesso fanno affari contando sulla pigrizia altrui.

- 1) N. BECCART, V. MAZZI - *Manuale di microscopia*. Ed. Vallardi, Milano.
- 2) G. COLOSI - *Zoologia e Biologia generale*. Un. Tip. Ed. Torinese.
- 3) P. GRASSÉ - *Traité de Zoologie*. Ed. Masson, Parigi.
- 4) A. W. HAM - *Istologia*. Ed. Sansoni, Firenze.
- 5) S. LEGHISSA - *Compendio di Citologia e Istologia*. Un. Tip. Ed. Torinese.
- 6) A. P. M. LOCKWOOD - *Aspects of Physiology of Crustacea*. Ed. Oliver e Boyd, Edimburgo e Londra.
- 7) G. MORUZZI, C. A. ROSSI, A. RABBI - *Principi di Chimica Biologica*. Libr. Univ. Tinarelli, Bologna.
- 8) L. RAUNICH - *Embriologia e Morfogenesi*. Ed. Azzoguidi, Bologna.
- 9) *Physiology of Echinodermata*. Ed. Richard A. Booloottian, Los Angeles.
- 10) *Physiology of Mollusca*. Ed. K. M. Wilbur e C. M. Yonge, Academic Press, Nuova York e Londra.