

49. E. CONESTABILE, V. BACCARINI e E. CECCHI. — I globuli rossi della malattia di Marchiafava-Micheli osservati al microscopio elettronico.

Riassunto. — Dopo una breve rassegna del quadro clinico e dei dati biologici che conducono alla diagnosi della malattia di Marchiafava-Micheli, gli AA. riferiscono i risultati dello studio al microscopio elettronico dei globuli rossi di un caso occorso alla loro osservazione. E' stato in tal modo possibile confermare quanto precedentemente osservato da Matthes e coll. circa la presenza, nel 60-70% degli elementi, di una anomalia stromatica che conferisce ai medesimi un particolare aspetto grossolano macchiato o aereolato. Tale anomalia, presente in maniera evidente all'acme di una crisi, subisce, viceversa, una notevole riduzione nelle fasi di quiescenza clinica. Gli AA. discutono il significato da attribuire al fenomeno descritto, e, fra le altre, prospettano l'ipotesi che possa rappresentare il risultato di un'interreazione fra properdin e stroma del globulo rosso.

Résumé. — Après avoir brièvement donné le tableau clinique et les données biologiques qui conduisent au diagnostic de la maladie de Marchiafava-Micheli, les auteurs donnent les résultats d'une étude faite avec le microscope électronique des globules rouges d'un cas qu'ils ont pu examiner. De cette façon il a été possible de confirmer ce que Matthes et collaborateurs avaient déjà remarqué à propos de la présence, dans 60-70% des éléments, d'une anomalie stromatique qui leur donne un aspect particulier, taché, grossier ou aureolé. Cette anomalie, tout particulièrement évidente au moment où la crise est à son maximum, subit, au contraire, une diminution remarquable lors des phases de quiescence clinique. Les auteurs discutent la signification que l'on peut attribuer au phénomène décrit et, entre autres, formulent l'hypothèse qu'il puisse représenter les résultats d'une inter-réaction entre properdin et stroma du globule rouge.

Summary. — After a brief outline of the clinical picture and biological data which lead to a diagnosis of Marchiafava-Micheli disease, the results of an electron-microscopic study of the red globules in a case under the authors' observation are described. It was possible to confirm the prior observation of Matthes and his colleagues that in 60-70% of these bodies there was a stromatic anomaly which gave them a grossly marked or aereolated appearance. Such anomalies, particularly evident

at the peak of the crisis, undergo a marked reduction in the quiescent clinical phase. The authors discuss the significance to be attributed to this phenomenon and suggest, amongst others, the hypothesis that this may represent the results of an interaction between Properdin and the stroma of the red globules.

Zusammenfassung. — Nach einer kurzen Übersicht des klinischen Bildes und der biologischen Daten die zur Diagnose der Krankheit von Marchiafava-Micheli führen berichten die Verfasser über die Beobachtungen die sie während eines von ihnen verfolgten Falles an den roten Blutkörperchen am Elektronenmikroskop angestellt haben. Es konnten so die Beobachtungen von Matthes und Mitarbeitern bestätigt werden und zwar: dass man im 60-70% der Elemente eine stromatische Anomalie vorfindet welche ihnen ein besonderes grossfleckiges Aussehen verleiht. Diese Anomalie, die während dem Gipfelpunkt der Krise deutlich zum Vorschein kommt, geht während den Phasen des klinischen Ruhezustandes stark zurück. Die Verfasser diskutieren die Bedeutung welche dieser Äusserung zuzuschreiben ist und stellen unter anderem die Hypothese, dass sie das Ergebniss einer Intereaktion zwischen dem Properdin und dem Stroma des roten Körperchens darstellen kann.

L'emoglobinuria notturna parossistica, o malattia di Marchiafava-Micheli (MM), appartiene con l'emoglobinuria da freddo, da marcia, da favismo, alle emoglobinurie vere da distinguersi pertanto dalle pseudoemoglobinurie, che presentano solo emoglobinuria senza contemporanea emoglobinemia. Rientra nel gruppo delle anemie emolitiche da causa eritrocitaria così come l'ittero emolitico costituzionale, la talassemia, l'anemia a cellule falciformi. La diagnosi poggia su dati clinici e biologici inequivocabili. I dati clinici possono così riassumersi: in soggetti di media età, per lo più di sesso maschile, inizia in genere subdolamente uno stato anemico, che si fa sempre più intenso, ma che può, attraverso alternative di peggioramenti e miglioramenti, consentire anche un decorso di decine di anni. Le condizioni generali possono persistere a lungo discrete e consentire anche una capacità lavorativa pressochè normale. Possono aversi manifestazioni dolorose in sede sacrolombare o addominale, progressiva astenia, subittero delle sclere, e, ad un certo momento, emissione di urine di colore scuro, che danno la reazione dell'emoglobina senza presenza di emazie nel sedimento. Le crisi di emoglobinuria insorgono quasi sempre con carattere notturno, hanno durata variabile, ma per lo più

di pochi giorni per consentire poi un apparente ritorno alla normalità salvo il persistere dello stato anemico.

I dati biologici sono di importanza fondamentale ai fini della esatta diagnosi. Oltre ai caratteri delle urine emesse in periodo di crisi con emoglobina libera ed emosiderina, si riscontra un'anemia normocromica, ma talora anche iper o ipocromica, aniso-poichilocitosi, policromatofilia delle emazie e spesso presenza nelle medesime di corpi di Jolly, leucopenia e linfo-monocitosi relativa. I reticolociti sono aumentati specialmente in coincidenza di una crisi e sono la documentazione della iperattività eritrocitaria midollare. Dal punto di vista ematochimico è dato osservare un'intensa iperbilirubinemia a reazione indiretta, non di rado anche presenza nel siero di metalbumina, ossiemoglobina e metemoglobina. Tutti i dati sopra elencati non sono però sufficienti ai fini della diagnosi per la quale HAM ⁽¹⁾ dà valore ai seguenti:

1) i globuli rossi del paziente sono emolizzati da siero umano fresco contenente un componente termolabile;

2) a pH normale del sangue si ha spesso, ma non sempre, emolisi durante incubazione per 1 h. a 37°;

3) l'emolisi si produce sempre aumentando l'acidità del siero entro o al di sotto dei limiti fisiologici di variazione del pH;

4) l'emolisi è sempre ridotta o annullata ad un pH alcalino o superiore;

5) la distruzione del fattore emolitico col calore o con altri mezzi, inibisce l'emolisi nel siero acidificato;

6) l'aggiunta di siero fresco di cavia come fonte di complemento non ristabilisce l'emolisi nel siero inattivato dal calore;

7) qualsiasi siero umano fresco, compatibile, allorchè acidificato emolizza i globuli rossi lavati del paziente;

8) il siero del paziente non emolizza globuli rossi compatibili di soggetto normale (dimostrando così l'assenza di emolisine nel siero del paziente).

Questi elementi, pur fochettando l'importanza del o dei fattori serici nell'operare in vitro l'emolisi degli eritrociti nella malattia di MM, non ne specificano la natura. HAM e DINGLE ⁽²⁾ dimostrarono che l'attività emolitica del siero era perduta con la distruzione di uno qualunque dei componenti il complemento e che questa, viceversa, poteva incrementarsi per aggiunta di complemento di cavia al siero normale. Cro-

SBY (3) ha creduto di poter riconoscere in un componente del sistema di coagulazione — la trombina — il fattore implicato nell'emolisi in vitro degli eritrociti di MM. Oggi, le esperienze di HINZ, JORDAN e PILLEMER (4) hanno dimostrato che non uno solo, bensì tre fattori serici: properdin, magnesio e complemento (che insieme formano il « sistema properdin ») sono a ciò indispensabili. Il properdin, così come la trombina è una β -euglobulina di cui ha in comune anche il punto isoelettrico. Le esperienze dei suddetti AA. hanno dimostrato:

1) che l'allontanamento del properdin dal siero mediante azione dello zymosan a 37° o di uno qualunque dei componenti del complemento rende il siero incapace di attività emolitica;

2) che il siero privato del properdin viene reintegrato nella sua attività emolitica per aggiunta del medesimo, mentre la sua aggiunta al siero privato dei componenti del complemento non dimostra eguale potere;

3) che l'allontanamento del Mg e del Ca mediante resine a scambio cationico abolisce l'attività emolitica del siero, attività che si ripristina aggiungendo quantità non eccessive di Mg;

4) che esiste un rapporto fra il contenuto in properdin e l'attività emolitica del siero;

5) che l'attività emolitica della trombina è dovuta al suo contenuto in properdin che ne rappresenta quindi il principio attivo.

Secondo HINZ e coll. l'emolisi che si verifica in vitro allorchè il sistema properdin viene a contatto con eritrociti di MM potrebbe essere frutto di un'intereazione del properdin con lo stroma degli eritrociti.

In base ai dati clinici e biochimici suddetti abbiamo posto la diagnosi di malattia di MM in un paziente occorso alla nostra osservazione di cui riferiamo oltre alla storia clinica ed alle consuete ricerche eseguite anche i risultati delle indagini compiute al microscopio elettronico intese a confermare o meno le anomalie morfologiche delle membrane eritrocitarie.

Caso - P. P. O. da Petriola (Macerata) anni 32, mezzadro.

anamnesi familiare: negativa

anamnesi fisiologica: primogenito, nato a termine da parto eutocico; allattamento materno; normale sviluppo psichico e fisico. Ha prestato servizio militare. Sposato a 29 anni con donna apparentemente sana

dalla quale ha avuto due figli. La moglie non ha avuto aborti. Negatives e altre malattie veneree.

anamnesi patologica remota: non ha avuto i comuni esantemi dell'infanzia. A 24 anni, mentre lavorava in Belgio in qualità di minatore ha cominciato ad avvertire dolori al fianco D. Comparvero frequentemente dei rialzi termici, che si accompagnavano ad emissione di urine scure. A 25 anni rimanendo invariate le sue condizioni fu rimpatriato e sottoposto a terapia imprecisata dalla quale trasse giovamento sicchè fu poi in grado di riprendere il suo lavoro, se pure in misura ridotta. A 30 anni fu ricoverato all'Ospedale Civile di Macerata perchè soggetto a periodi di iperpiressia che si accompagnavano ad emissione di urine scure; il paziente era anche notevolmente anemizzato. Sottoposto a terapia trasfusionale e cortisonica ritrasse un discreto giovamento e nello spazio di due mesi riprese in parte le sue occupazioni.

anamnesi patologica prossima: nell'agosto del 1956 fu nuovamente ricoverato all'Ospedale di Macerata per iperpiressia e violenti dolori addominali. Dopo circa un mese ha chiesto ed ottenuto il trasferimento nel nostro Istituto.

Esame obiettivo al momento dell'ingresso: condizioni generali notevolmente scadute. Sensorio integro. Decubito indifferente. Cute e mucose visibili notevolmente pallide con sfumatura subitterica. Pannicolo adiposo scarso. Masse muscolari ipotoniche ed ipotrofiche. Nulla al capo; dentatura sana; lingua umida impaniata; nulla alla faringe. Respiro frequente. Polso alla radiale; piccolo, ritmico, frequenza 100.

Apparato linfoghiandolare: nella regione inguinale D. si apprezzano alcune linfoghiandole ingrossate, isolate l'una dall'altra, non aderenti alla cute, dure, indolenti. Nulla alle rimanenti stazioni linfatiche.

Apparato respiratorio: torace simmetrico, mobile con gli atti del respiro. Apici alla prominente. Basi in sede, mobili. Suono di percussione chiaro polmonare f.v.t. normotrasmesso; m.v. normale.

Apparato digerente: lingua umida, impaniata; addome piano trattabile, modicamente dolente in corrispondenza del punto colecistico. Sul quadrante inferiore D. piccola cicatrice da pregressa appendicectomia. Fegato: limite superiore al V° spazio sull'emiclaveare; limite inferiore a 3 cm dalla arcata costale, di consistenza dura, con margine netto. Milza: polo superiore alla IV costa sull'ascellare media; polo inferiore a 4 cm dall'arcata costale di consistenza dura.

Apparato osteoarticolare: apparentemente indenne.

Sistema nervoso: indenne.

RICERCHE:

Esame emocromocitrometrico: globuli rossi: 1.800.000 - globuli bianchi: 4.000 - Hb 50% - V.G. 1,36 - N. 60. - E 2 - L 38 - Spiccata anisopoichilocitosi; assenza di elementi immaturi.

Orine: color marsala - p.sp. 1016 - reazione: acida - albumina: ass. glucosio: ass. Urobilina: presente (+ +); pigmenti biliari: ass. Pigmento ematico: ass. Rari leucociti, modica fosfaturia.

Azotemia: g. 0,21‰.

Glicemia: g. 0,90‰.

Bilirubinemia: mg 3%.

Reazione di Takata-Dahamoto: negativa.

Proteine totali: g. 7,20%.

Albumine: gr. 52,08%.

Globuline totali: g. 46,51%.

α_1 - globuline: 14,58%.

α_2 - globuline: 3,88%.

β - globuline: 13,05%.

γ - globuline: 15%.

Rapporto $\frac{\text{albumine}}{\text{globuline}} = 1,11$.

Reticolociti: 83‰.

Test di Coombs diretto e indiretto: negativi.

Ricambio emoglobinico: indice emolitico 1,61.

Sedimetria: indice di Katz 56,25.

Sierodiagnosi per tifo e paratifi: negativa.

Sierodiagnosi per melitense: negativa.

Gruppo sanguigno: A Rh+.

Resistenze globulari: normali.

Miologramma (materiale prelevato da puntura apofisi spinosa 4^a lombare):

Emocitoblasti	2	Proeritroblasti	1
Mieloblasti	1	Eritroblasti bas.	4
Promielociti N	5	Eritroblasti pol.	27
Promielociti E	1	Eritroblasti orto.	32
Mielociti N	8	Mitosi rosse	2
Mielociti E	2		
Metamielociti N	15		
Metamielociti E	1		
Plasmacellule	1		

Ricerca della emolisina bifasica di Donath-Landsteiner: negativa.

Prova di Hegglin-Meier: intensamente positiva.

Prova di Ham: positiva.

Test di Crosby: positivo.

Esame coprologico: feci color castano chiaro - reazione acida - residui vegetali - numerosissime cisti di flagellati del genere *chilomastix* - blastocisti - funghi fermentoidi.

Radiografia del torace: negativa per lesioni pleuro-parenchimali in atto.

DECORSO:

Durante la degenza nel nostro Istituto il paziente ha presentato episodi febbrili con emissione di orine di color rosso scuro con sedimento marrone scuro che all'esame chimico e microscopico si sono dimostrate ricche in emoglobina disciolta, con urobilina e con sedimento pulverulento privo quasi di emazie che dava per aggiunta di ferricianuro potassico e acido cloridrico all'1% una colorazione turchina intensa dovuta alla presenza di emosiderina. Le crisi suddette iniziavano sempre durante la notte e duravano alcuni giorni per poi consentire un apparente ritorno alla normalità con emissione di orine di colore giallo-oro. In una delle crisi suddette vennero eseguite le seguenti ricerche:

ricerca delle agglutinine da freddo: negativa

esame spettroscopico delle orine per ricerca delle porfirine sia sul campione diretto che dopo estrazione eterea: negativa.

Un'ulteriore indagine ci è parso interessante eseguire nel nostro paziente simile a quella che per primi condussero MATTHES e coll. ⁽⁵⁾ e successivamente confermata nei suoi risultati anche da BRAUNSTEINER e coll. ⁽⁶⁾. La ricerca in parola venne suggerita ai primi AA. dalla asserzione da DACIE ⁽⁷⁾ che la capacità dei globuli rossi dei soggetti con malattia di MM di sottostare all'emolisi ad opera di sieroemolisine di diversa provenienza dipende da un'anormalità della membrana dei globuli stessi; oltre alla suddetta anomalia stromatica concorrono all'istituirsi della emolisi un fattore serico, presente anche nei soggetti sani, e modifiche nell'equilibrio ionico con spostamento del pH verso l'acidità. Che il fattore serico sia concomitante e non determinante lo dimostra la capacità dei sieri normali di provocare l'emolisi in vitro quando posti a contatto con eritrociti provenienti da malati del genere e la possibilità del verificarsi in vivo di gravi crisi emolitiche dopo trasfusioni di sangue, appunto per l'azione del fattore serico sui globuli rossi del paziente.

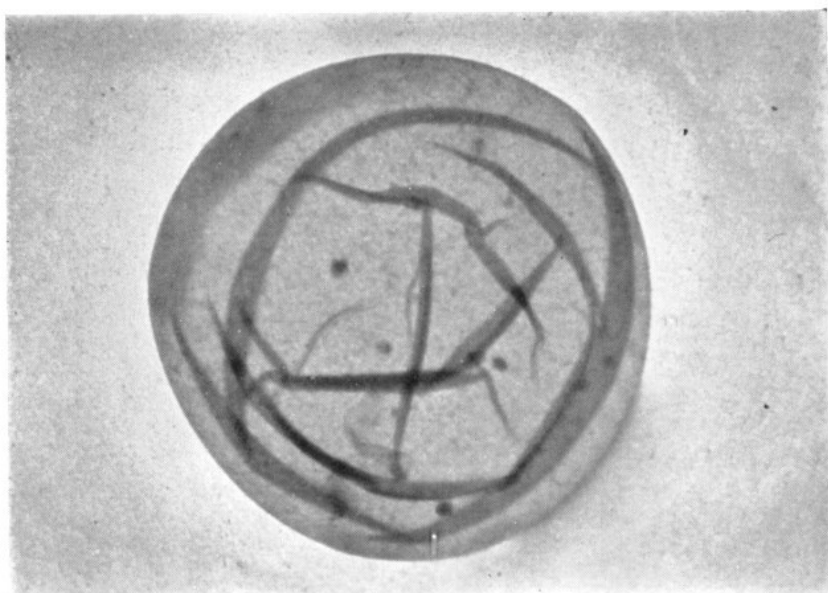


Fig. 1. - Emazia di soggetto normale - (10.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

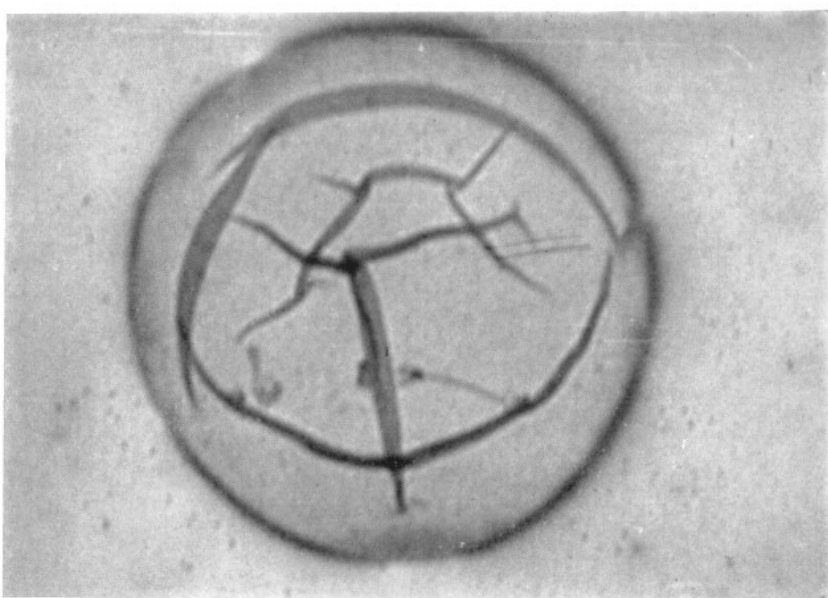


Fig. 2. - Emazia di soggetto normale - (10.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

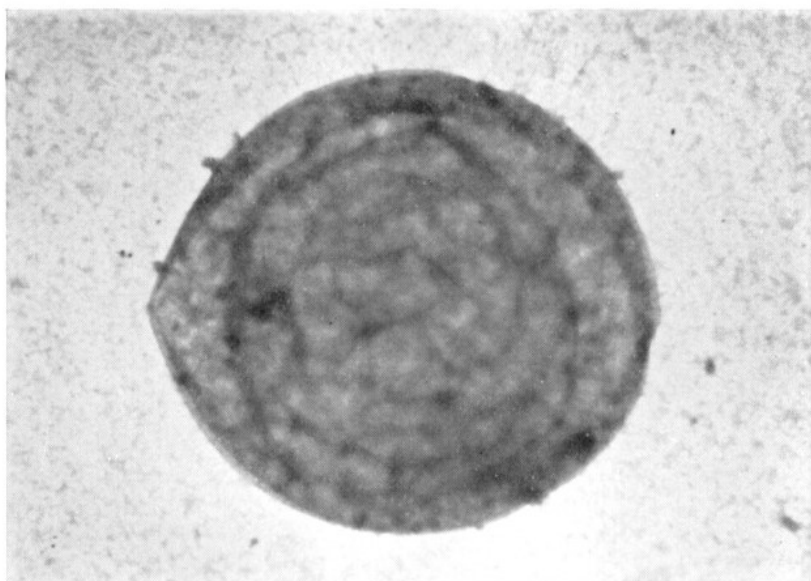


Fig. 3. - Emazie di soggetto con M M in periodo di crisi - (10.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

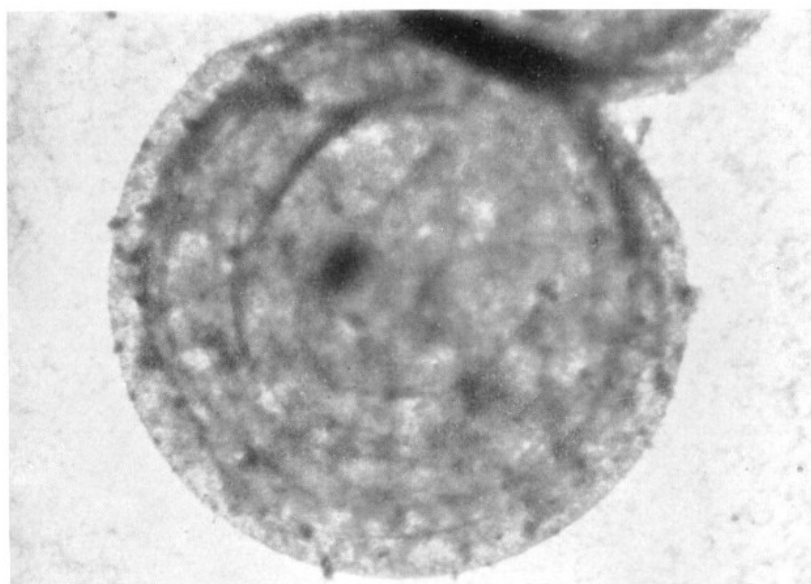


Fig. 4. - Emazie di soggetto con M M in periodo di crisi - (10.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

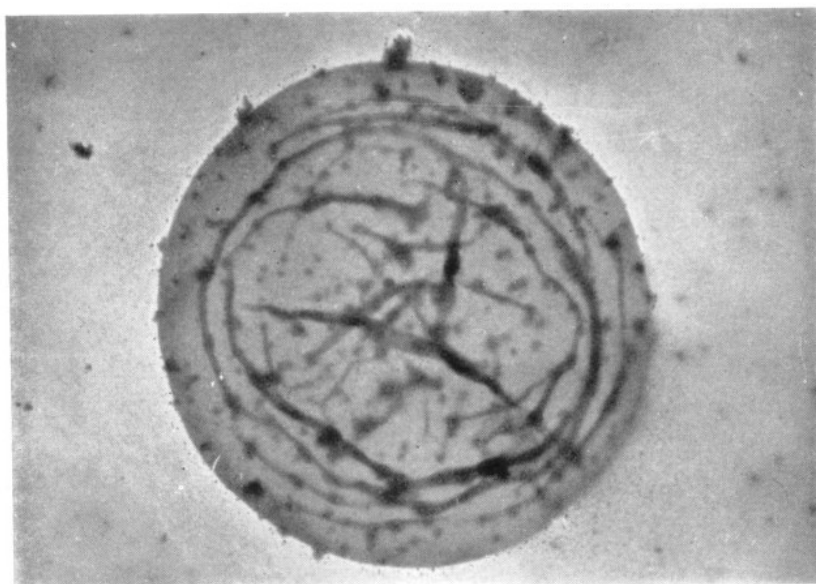


Fig. 5. - Emazie di soggetto con M M in periodo di intervallo fra le crisi - (10.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

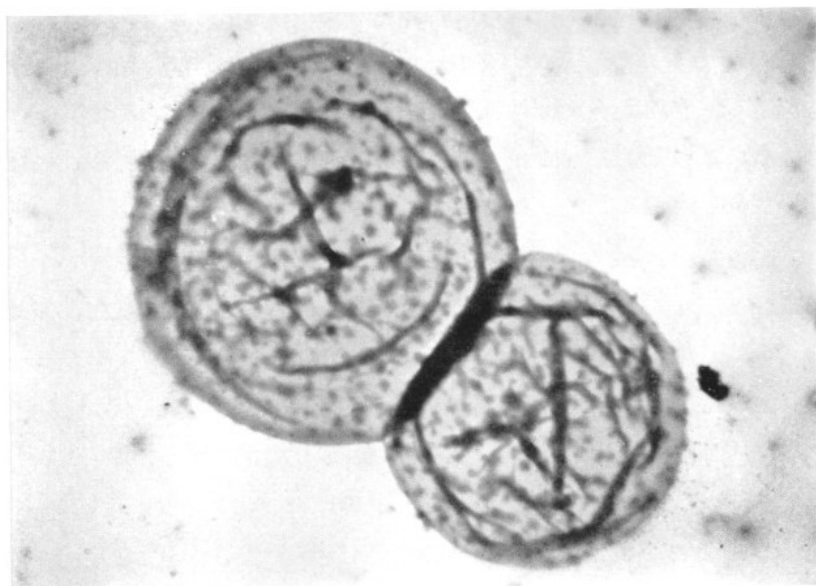


Fig. 6. - Emazie di soggetto con M M in periodo di intervallo fra le crisi - (8.000 $\times$) - Fissazione in acido osmico.

Tornando alle ricerche di MATTHES e coll. ⁽⁵⁾ queste si proposero di offrire la dimostrazione morfologica dell'anormalità della membrana degli eritrociti nei casi di malattia di MM e pertanto i globuli stessi di un caso occorso al loro studio vennero sottoposti all'esame del microscopio elettronico previa emolisi del sangue con acqua distillata, fissazione con una soluzione di acido osmico 1% e allestimento dei preparati per l'esame finale. Poichè il paziente che servì all'indagine aveva subito trasfusioni di sangue al momento della ricerca, ciò giustificò per gli AA. il contemporaneo riscontro di una certa quota di eritrociti normali con aspetto omogeneo, vicino ad altri che presentavano invece alterazioni morfologiche di struttura conferenti ai globuli un aspetto macchiato o areolato, con una particolare fragilità della membrana documentata dalla presenza di spaccature nella medesima. Secondo MATTHES e coll. ⁽⁵⁾ queste alterazioni nell'aspetto delle membrane eritrocitarie sono del tutto differenti da quelle dimostrate da LINDMANN ⁽⁸⁾ in altre anemie emolitiche congenite o in altri tipi di anemie. Gli AA. hanno eseguito anche altre esperienze sottoponendo campioni di sangue del soggetto con MM e di un controllo normale ad un preventivo trattamento con ossigeno e con CO₂ prima a temperatura ambiente per 10' e poi a 37° per un'ora e infine a fissazione con acido osmico senza provocazione dell'emolisi artificiale e riscontrarono che gli eritrociti del p. presentavano, oltre ad un'intensa anisocitosi, delle forme « a stramonio » la cui percentuale era maggiore nei campioni sottoposti all'azione del CO₂ che dell'ossigeno e che in tutti e due i trattamenti aumentavano dopo incubazione rispettivamente in ambiente di CO₂ o di ossigeno.

BRAUNSTEINER e coll. ⁽⁶⁾ confermarono quanto osservato da MATTHES e coll. ⁽⁵⁾ circa l'anomalia stromatica delle emazie nella malattia di MM, anomalia che riscontrarono in circa il 60-70% degli elementi. La differenza fra l'aspetto liscio, regolare, degli eritrociti normali e quello grossolano, quasi granulare, dell'emoglobinuria notturna parossistica era nel loro caso tanto evidente da far credere fosse avvenuta una grossolana precipitazione. Anche gli AA. suddetti ritennero tali alterazioni come patognomoniche della malattia non avendole potute dimostrare in nessuna altra anemia, neppure in quelle ad impronta emolitica.

Nel nostro caso abbiamo ritenuto opportuno eseguire la stessa ricerca in due periodi distinti di malattia, e, precisamente, all'acme di una crisi emolitica e in periodo di apparente normalità. La tecnica seguita è stata quella di MATTHES e coll. ⁽⁵⁾. Prelevato il sangue dalla vena del cubito sia al paziente in esame che ad un soggetto normale si mescolò rispettivamente una parte di ogni campione con trenta parti di acqua distillata e si lasciò a contatto per 3' agitando in modo da consentire il

verificarsi dell'emolisi. Trascorso tale periodo si prelevò tre parti di ogni soluzione e vi si aggiunse una parte di una soluzione di acido osmico all'1%.

Le figg. 1-2 corrispondono allo stroma di emazie di soggetto normale. E' evidente la struttura liscia e delicata come di una sottile pellicola, priva o con minime granulosità.

Le figg. 3-4 rappresentano lo stroma di eritrociti del p. in periodo di crisi emoglobinurica. Risalta la intensa granulosità che ricopre quasi tutto lo stroma conferendo al medesimo un aspetto quanto mai grossolano. Circa l'80% degli elementi da noi esaminati presentava un aspetto del genere.

Le figg. 5-6 corrispondono allo stroma di emazie del p. in periodo di quiescenza delle manifestazioni emoglobinuriche. Dal confronto con le figg. 3-4 si rileva come l'anormalità per quanto presente sia in questo periodo assai meno intensa che in quello di crisi; la granulosità è infatti assai più rada e sottile sicchè riesce possibile la visione delle sottostanti porzioni stromatiche.

A conclusione delle loro ricerche MATTHES e coll. ⁽⁵⁾ asseriscono che la dimostrazione morfologica da essi apportata della alterazione delle membrane eritrocitarie è la premessa per l'alterazione del sistema fisiologico: emoglobina-membrana.

BRAUNSTEINER e coll. ⁽⁶⁾ sostengono il significato di fenomeno secondario da attribuire all'anomalia stromatica degli eritrociti nell'emoglobinuria notturna parossistica, il cui difetto fondamentale potrebbe consistere nella mancanza di un enzima o nella presenza di un composto abnorme dello stroma che condiziona la precipitazione della matrice.

Secondo HARRIS e coll. ⁽⁹⁾ il fattore che emolizza gli eritrociti sarebbe simile ad un enzima che necessita per agire la presenza di un metallo e che differisce dal complemento umano emolitico per la sua dipendenza dal Mg e la sua inibizione ad opera del Ca e che non ha rapporto con l'attività ac-globulinica.

Oggi si conosce l'importanza del sistema properdin nel condizionare l'emolisi in vitro degli eritrociti di emoglobinuria notturna parossistica sicchè si può anche supporre: 1) che in questa malattia gli eritrociti siano ad esso particolarmente sensibili per una particolare fragilità della loro membrana; 2) che la sua concentrazione serica possa subire degli incrementi periodici scatenando le crisi caratteristiche della malattia.

L'immagine anomala dimostrabile attraverso la microscopia elettronica potrebbe essere il risultato di una interazione fra properdin e stroma degli eritrociti.

Resta da stabilire se l'anomalia morfologica eritrocitaria di cui ab-

biamo trattato sia primitiva oppure se sia indotta col concorso di fattori estranei al globulo rosso stesso e la cui natura permane incerta. Entro questo ordine di idee è logico discutere anche l'eventuale, se pure non esclusivo, ruolo del sistema properdin e delle variazioni del pH ambientale verso l'acidità oltre i limiti fisiologici di tali variazioni.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Fisica e Istituto di Reumatologia dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) HAM T. H.: A syllabus of Laboratory Methods in Clinical Diagnosis - Cambridge, Mass. Harvard Univ. Press, 1950.
 - (²) HAM T. H. e DINGLE J. H. - J. Clin. Invest., 18: 637 (1939).
 - (³) CROSBY W. H. - Blood, 5: 843 (1950).
 - (⁴) HINZ C. F. Jr., JORDAN W. S. e PILLEMER L. - J. Lab. and Clin. Med., 44: 844 (1955).
 - (⁵) MATTHES M., SCHUBOTHE H. e LINDEMANN B. - Acta Haematol., 5: 493 (1954).
 - (⁶) BRAUNSTEINER H., GISINGER E. e PARESCH F. - Blood, 8: 733 (1956).
 - (⁷) DACIE J. V. - Blood, 4: 1183 (1949).
 - (⁸) LINDEMANN B. - Arch. Exper. Path., 207: 569 (1949).
 - (⁹) HARRIS J. W., JORDAN W. S., PILLEMER L. e DESFORGES J. F. - Clin. Invest., 30: 646 (1951).
-