

SOCIETÀ ITALIANA DI FISIOLOGIA

RIUNIONE PRIMAVERILE DELL'ANNO SOCIALE 1978/79
Firenze 25-26 maggio 1979

ISTITUTO DI FISIOLOGIA UMANA
Viale Morgagni, 63 - Cap. 50134 - Firenze - Tel. (055) 411.658-432.131

L'aggregazione Piastrinica in presenza di Melatonina (MLT).

Nel 1954 BRACCO, M. CURTI, P.C. e BALLERINI, G. (1), e l'anno dopo ZUCKER, H.D. & BORRELLI J. (2) identificarono nella serotonina il "fattore vasocostrittore piastrinico" liberato dalle piastrine nel corso dell'emostasi.

La serotonina potrebbe essere assunta, dal mezzo circostante, dalle piastrine per semplice diffusione (3), ovvero per un processo attivo di trasporto (4) da parte di un recettore responsabile anche dell'aggregazione da 5-OH-triptamina (5). Nelle piastrine la 5-OH-triptamina si trova nei "dense bodies" (6,7), insieme con ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP e UTP (8,9), Ca e Mg (10, 11).

Oltre che la 5-ossi, anche la 5-metossitriptamina è un potente aggregante (12). La O-metilazione della serotonina (e di catecolamine) avviene in presenza di S-metioninadenosina, come donatore di metile (13) e della idrossiindol-O-metiltransferase, trovata nell'epifisi di mammiferi (14) e di uccelli (15); nell'epifisi di uomo il contenuto non è correlato con lo stato di calcificazione della ghiandola, né con l'età (16). La O-metilazione viene catalizzata sia sulla serotonina, che su altri ossi-indoli ed N-acetilderivati (14).

Le piastrine metabolizzano il glucosio extracellulare ed il glicogeno endogeno per glicolisi, attraverso il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa (17), ed i rispettivi estratti hanno anche attività acetyl-CoA-carbossilasi. Non sono perciò remote le possibilità di una N-acetilazione della serotonina addirittura nelle piastrine, tanto più che la stimolazione delle abcnule fa crescere il tasso piastrinamico nei ratti (18) e che la Melatonina (MLT) ha un ciclo circadiano nel sangue (19, 20, 21).

Per le predette considerazioni abbiamo ritenuto utile contributo alla conoscenza della complessa fisiologia delle piastrine, *lo studio dell'influenza della MLT sull'aggregazione piastrinica*.

Ci siamo giovati del plasma ricco e povero di piastrine (PRP e PPP) ottenuto con siringhe di plastica dal sangue della vena cubitale di uomo, o dalla carotide o dal cuore destro di ratti maschi in narcosi nembutalica.

L'incoagulabilità si è ottenuta: a) con Na-citrato 3,8% (1:9; v:v); con Eparina (mg 1:10 ml), con EDTA (2,5%; 1:9; v:v); con soluzione tamponata (pH = 7,4) e isotonica (300 mOsmoli) di Na-ossalato. La ricalcificazione avveniva con soluzioni 184 mg%, 368mg%, 736 mg% di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. L'aggregazione si registrava con aggregometro ELVI 840 a 2 canali indipendenti, con agitazione magnetica a 1000 rpm, in cuvette di plastica termostata-

te a 37° C, su 250 µl di plasma con luce emessa da microlampada al tungsteno a 640 nm.

La MLT è scarsamente solubile in acqua e soluzioni saline fisiologiche. Si sono adoperate soluzioni saturate a 37° C in PPP, in corrente di N₂ saturo alla stessa temperatura di umidità; ovvero soluzioni 0,30 mMol. in miscela etanolo, acqua (MLT mg 3,4; Etanolo 95%, ml 0,5; acqua distillata o soluzione fisiologica salina q.b. a 5 ml).

Alcuni ratti sono stati iniettati 12-36 ore prima i.p. con 5 ml di una soluzione fatta con le stesse modalità e contenente 0,03 mM di MLT, perfettamente tollerata senza nessuna manifestazione apparente.

I risultati finora ottenuti si possono riassumere nei punti seguenti:

- 1) La MLT in plasma saturo a temperatura ambiente provoca i seguenti effetti sul PRP umano:
 - a) disaggrega (20 µl) istantaneamente, per breve tempo, reversibilmente, se aggiunta a PRP (200x10³ piastrine/µl);
 - b) l'ADP (10 µl), aggiunto 264 sec. dopo la MLT, anziché aggregare disaggrega, previa aggregazione di breve durata, irreversibilmente;
 - c) se la MLT viene aggiunta in fase di aggregazione da ADP, la curva di disaggregazione:
 - α) viene sempre profondamente alterata;
 - β) l'alterazione consiste in un immediato e completo ripristino della trasmittanza ai valori iniziali della durata di pochi secondi;
 - γ) l'aggregazione viene successivamente invertita in disaggregazione totale o parziale, in relazione soprattutto all'intervallo fra l'aggiunta di ADP e quella di MLT, ed alla concentrazione di MLT.

Nel plasma di ratto i risultati sono diversi, in relazione soprattutto all'anticoagulante usato (citrato, ossalato, EDTA, Eparina). I risultati si possono riassumere nei punti seguenti:

- 1) La MLT aggiunta a plasma citratato, nel corso dell'aggregazione da ADP è inattiva, a concentrazione ≤ 2nM/ml dopo intervalli di tempo dall'aggiunta di ADP ≤ 38 SEC.;
- 2) Aggiunta al plasma contemporaneamente all'ADP, la MLT può aumentare l'ampiezza dell'aggregazione, e modificare la forma della curva;
- 3) Su alcuni plasmici citratati la MLT può invertire in disaggregazione l'effetto normale aggregante dell'ADP; la %le di detto effetto può passare da 0 al 53%;
- 4) Aggiunta a concentrazione ≤ 1,35 nM/ml la MLT generalmente non incide sulle condizioni delle piastrine sospese. A concentrazioni maggiori di quella predetta, la trasmittanza sale di poco (variazioni di forma?) e mantiene costante il valore aggiunto, o tende lentamente a riportarsi al valore iniziale;

- 5) Se la MLT si scioglie in 1 vol. di etanolo a 95% e poi si porta a 10 voll. con acqua, o soluzione fisiologica NaCl, e si aggiunge sino a ottenere concentrazioni di MLT nella cuvetta anche oltre che doppia di quella di MLT in plasma, o non si rileva modificazione alcuna, o l'eventuale aumento della trasmittanza non appare diverso da quello che darebbe lo stesso volume della stessa miscela (etanolo+acqua; etanolo+soluz. fisiol.) senza MLT. La causa potrebbe dipendere soprattutto: a) dalla presenza di etanolo; b) dall'alterata interazione della MLT con le plasmaproteine;
- 6) Tutti gli effetti della MLT, sciolta in acqua o soluz. fisiologica, ovvero in PPP, non differiscono apparentemente nei ratti iniettati 12-36 ore prima con forti dosi di MLT. La ragione potrebbe dipendere dalla rapida escrezione o inattivazione della MLT iniettata;
- 7) I risultati sopra riassunti e ottenuti su plasma citratato, non sono essenzialmente diversi da quelli ottenuti con plasma raccolto con EDTA, eparina, od ossalato, sempre che ci sia in ogni caso la concentrazione adeguata di Ca^{++} .

Non mutano neanche i risultati in presenza di adrenalina o 5-OH-triptamina.

Conclusioni

Le concentrazioni di MLT adoperate sono dello stesso ordine di grandezza o inferiori a quelle di adrenalina e serotonina necessarie per aggregare. La MLT non ha mai interferito con l'andamento della curva di aggregazione da ADP nel PRP di ratto, mentre ha sostanzialmente modificato quello del PRP umano. Nel PRP di ratti l'effetto della MLT precedente l'aggiunta di ADP è in relazione con la concentrazione della MLT, e col tempo trascorso dall'aggiunta, e può tradursi, in una variabile %le di plasmici, in una inversione dell'azione dell'ADP. Risulta da queste ricerche se non provata quanto meno probabile l'ipotesi che nelle piastrine possa coesistere la MLT accanto alla serotonina, e che dal rapporto di concentrazione dei due (e forse di altri) composti indolici, dalla trasformazione reversibile o meno dell'uno nell'altro, possa in parte dipendere il processo di adesione e di aggregazione piastrinica ed una parte delle turbe della funzionalità delle piastrine.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BRACCO M., CURTI P.C. & BALLERINI G., Boll. Soc. Piemonte Chir., 1954, **24**, 634-638
- 2) ZUCKER H.D. & BORRELLI J., J. Appl. Physiol., 1955, **7**, 425-431
- 3) BORN G.V.R. & BRICKNELL J., J. Physiol., 1959, **147**, 153-161
- 4) BORN G.V.R. & GILLSON R.E., J. Physiol., 1959, **146**, 472-491
- 5) BAUMGARTNER H.R. & BORN G.V.R., Nature (London), 1968, **218**, 137-141

- 6) TRAUZER J.P., DA PRADA M. & PLETSCHER A., *Nature (London)*, 1966, **212**, 1574-1575
- 7) DA PRADA M., PLETSCHER A., TRAUZER J.P. & KNUCHEL H., *Nature (London)*, 1967, **216**, 1315-1317
- 8) DA PRADA M. & PLETSCHER A., *Biochem. J.*, 1970, **119**, 117-119
- 9) DA PRADA M. & PLETSCHER A., *Life Sci.*, 1970, **69**, 1271-1282
- 10) BERNES K.H., DA PRADA M. & PLETSCHER A., *Biochim. Biophysica Acta*, 1970, **215**, 547-9
- 11) BERNES K.H., PLETSCHER A. & DA PRADA M., *Nature (London)*, 1969, **224**, 261-263
- 12) MOHAI F., BORN G.V.R. & JUNGBOEN K., Platelets receptors. In: CAEN J. (Ed.), *Platelet aggregation*, 1971, Masson & C^{ie}, Paris, 147-153
- 13) AXELROD J., *Science*, 1957, **126**, 400-401
- 14) AXELROD J. & WEISSBACH H., *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 211-213
- 15) AXELROD J., WURTMAN R.J. & WINGET C.M., *Nature (London)*, 1964, **201**, 1134-1135
- 16) WURTMAN R.J., AXELROD J. & BARZIAS J., *Clin. Endocr. Metabol.*, 1964, **24**, 299-301
- 17) DOBY J.C.C., HIRSCH J. & DE GRECHY G.C., *Haematologica*, 1970, **4**, 405
- 18) DE BELLA L., M.T. ROSSI & G. SCOFERA, *Progr. Brain Res.* (in corso di pubblicazione)
- 19) WETTERBERG L., *J. Neural Transmission, Suppl.* 13, 1978, 209-310
- 20) RIZZY H.J.: *The Pineal*. Edes Press Annual Research Reviews, 1977, vol. 2, pag. 184. Churchill & Livingstone
- 21) BELKIN R.: *The Pineal*. Edes Press Annual Research Reviews, 1976, vol. 1, pag. 187. Churchill & Livingstone.