UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato di Fisiopatologia della Morte Cellulare
XVI Ciclo
Coordinatore: Prof. Roberto Testi

Tesi di Dottorato

Fenomeni di oncosi controllata nelle piastrine durante la stabilizzazione del coagulo indotto da stimolo immunologico

Relatore:
Prof. Domenico Del Principe

Dottorando:
Dott. Nicola Di Giorgio

Anno Accademico 2003 - 2004

ABSTRACT. Stimoli immunologici attivano piastrine umane, che vanno incontro ad aggregazione e rilascio. Mentre alcune di queste risposte sono state paragonate a fenomeni di apoptosi, altre, come la reazione di rilascio e la stabilizzazione del coagulo, non sono caratteristiche di cellule apoptotiche. In questo lavoro abbiamo voluto studiare l'effetto di uno stimolo immunologico forte (zymosan opsonizzato) sulle piastrine. Abbiamo studiato l'eventuale coinvolgimento dei mitocondri e delle proteasi piastriniche. Lo studio dell'attività mitocondriale, effettuato durante le fasi avanzate di attivazione piastrinica mediante metodo citofluorimetrico con la determinazione della fluorescenza di JC-1, ha evidenziato una completa perdita mitocondriale. Inaspettatamente, nello stesso tempo la riduzione dell'MTT è risultata aumentata ed insensibile al SOD e rotenone. Capsaicina e resinferotossina aumentano ulteriormente la riduzione dell'MTT. L'analisi al Western Blotting non ha evidenziato attivazione della caspasi, mentre vi era attivazione della calpaina. La conclusione è che le piastrine, stimolate con zymosan opsonizzato, vanno incontro a mitoptosi, ma viene mantenuta la vitalità cellulare grazie alla attivazione di reduttasi extramitocondriali.

Parole chiave: piastrine, mitoptosi, apoptosi, stimolo immunologico, stabilizzazione del coagulo.

PREMESSA

La cellula normale è confinata in un ambito abbastanza ristretto di funzioni e struttura, a causa della costrizione dovuta alle cellule vicine, del manifestarsi dei propri programmi genetici e della disponibilità dei necessari substrati metabolici.

Ciò nonostante, essa è in grado di far fronte alle normali esigenze fisiologiche, determinando il suo cosiddetto "stato stazionario" omeostatico.

L'instaurarsi di una condizione che richieda un grado superiore di attività cellulare o più stimoli patologici hanno l'effetto di indurre un certo numero di *adattamenti cellulari*, grazie ai quali viene raggiunto un nuovo stato stazionario alterato, ma che mantiene la vitalità della cellula.

Se vengono superati i limiti della capacità di adattamento, oppure quest'ultimo non può aver luogo, ha inizio una catena di eventi che sono raggruppati nel termine di *danno cellulare*.

Il danno cellulare è reversibile fino ad un certo punto, ma se lo stimolo persiste o è sufficientemente intenso fin dall'inizio, la cellula subisce un danno cellulare irreversibile a cui segue la *morte cellulare* [1]. Quindi, ogni cellula è programmata per funzionare correttamente per un periodo limitato.

È probabile che negli organismi viventi la misura del tempo sia data dal ritmo delle reazioni di ossido-riduzione che avvengono all'interno delle cellule ed il cosiddetto "orologio biologico" potrebbe essere ravvisato nei mitocondri, all'interno dei quali viene utilizzato oltre il 90% dell'ossigeno consumato dalla cellula.

La morte cellulare può manifestarsi morfologicamente sottoforma di necrosi o apoptosi [2,3].

La *NECROSI* è un meccanismo di morte cellulare in cui il nucleo sembra dissolversi, perché la cellula si rigonfia ed il suo contenuto si riversa all'esterno, determinando nell'area circostante una reazione infiammatoria.

Dal punto di vista morfologico, la necrosi è caratterizzata da:

1. danno a livello citoplasmatico (più precoce), con:
    - edema cellulare;
    - formazione di vacuoli citoplasmatici;
    - distruzione membrana plasmatica;
    - blebs;
    - degranulazione del RER;
    - rigonfiamento dell'apparato di Golgi;
    - rigonfiamento dei mitocondri, con successiva frammentazione ed arresto di produzione dell'energia;
2. danni nucleari, caratterizzati da:
    - picnosi;
    - carioressi;
    - cariolisi;
    - vacuolizzazione.

L' *APOPTOSI* [4] è l'altro meccanismo di morte cellulare. La maggior parte, se non tutte le cellule, ha la capacità di autodistruggersi mediante l'attivazione di un programma di morte, al quale sembrano

fare eccezione solo cellule particolarmente specializzate, quali quelle del muscolo cardiaco e del tessuto nervoso. L'apoptosi è stata anche definita suicidio cellulare (oltre che morte cellulare programmata), perché si applica ad un programma svolto attivamente dalla cellula (cioè con dispendio di energia e mediante l'utilizzo di prodotti genici specifici) e, per lo più con significato altruistico, ossia tutte le volte che il sacrificio di cellule singole risulta vantaggioso per l'organismo nel suo complesso. Da un punto di vista morfologico e strutturale, la cellula apoptotica cessa di vivere seguendo un processo di disassemblaggio che vede susseguirsi:

- la perdita del contatto con le altre cellule;
- l'addensamento della cromatina;
- la vescicolazione del citoplasma;
- la modificazione della membrana cellulare (che, però, rimane intatta);

- la frammentazione della cellula nei corpi apoptotici, che vengono inglobati da altre cellule o dai macrofagi.

Quindi, le principali differenze tra apoptosi e necrosi si possono così riassumere:

- la necrosi è un evento acuto che si completa in alcuni minuti; l'apoptosi, invece, richiede alcune ore;
- una volta iniziata, l'apoptosi è irreversibile, mentre la necrosi, fino ad un certo punto, può regredire;
- a differenza della necrosi, l'apoptosi riveste un ruolo evolutivo molto importante, in quanto regola tutta l'esistenza dell'organismo a partire dallo sviluppo embrionale. È, infatti, grazie all'apoptosi che durante la gestazione i tessuti fetali si differenziano e gli organi si modellano; che intere popolazioni cellulari scompaiono, come per es. le cellule neuronali che non sono in grado di stabilire connessioni sinaptiche funzionali, o quelle del sistema immunitario incapaci di esprimere specifici antigeni [(5)]. Quando l'organismo raggiunge la fase adulta,

l'apoptosi assicura l'omeostasi cellulare, decretando la morte giornaliera di dieci miliardi di cellule che lasciano il posto a quelle di nuova formazione. Non solo, ogniqualvolta un danno rischia di compromettere gravemente la funzionalità di una cellula, questa viene irrimediabilmente avviata alla morte programmata per evitare che l'errore si trasmetta alla progenie e si diffonda all'organismo;

- la necrosi può essere indotta da numerosi agenti aggressivi (chimico-fisici, batteriologici e virali) ed il danno cellulare è più in relazione con la natura dell'insulto che con le caratteristiche genetiche della cellula. Nel caso dell'apoptosi, invece, il danno cellulare segue vie precise e mediate da fattori geneticamente determinati. Attualmente, sono conosciuti tre meccanismi coinvolti nel processo apoptotico:

1) uno mediato da recettori;
2) un percorso mitocondriale [6];

3) uno in cui gioca un ruolo fondamentale il reticolo endoplasmatico.

Questi tre meccanismi attivano le caspasi, che sono i veri effettori dell'apoptosi. Si tratta di enzimi proteolitici la cui funzione è quella di tagliare i loro bersagli a valle di una breve sequenza di quattro aminoacidi. Nell'uomo sono stati identificati almeno dieci tipi di tali proteine. Sintetizzate come proenzimi, esse vengono attivate per scissione proteolitica, maturando nella forma adulta ed iniziando a processare i precursori di altre caspasi, in una cascata proteolitica molto simile a quella della coagulazione del sangue

- nella necrosi c'è rilascio del contenuto cellulare nei tessuti, che causa una reazione infiammatoria. Nell'apoptosi, invece, la membrana plasmatica rimane integra ed il processo ordinato di fagocitosi dei corpi apoptotici permette la riallocazione delle sostanze energetiche, composti azotati, carboniosi e fosfati, senza infiammazione locale o generale.

La necrosi è preceduta da una fase caratterizzata da rigonfiamento cellulare, deplezione di ATP, aumento della permeabilità della membrana, rilascio di macromolecole, mitoptosi. Quest'ultima fase è chiamata *ONCOSI* (early primary necrosis), di cui una componente è rappresentata dalla mitoptosi [7].

Una proteasi, la calpaina [8], svolge un ruolo precoce nel processo di oncosi, in quanto provoca un'alterazione della permeabilità della membrana plasmatica, che conduce all'apertura di pori di transizione, con conseguente influsso di calcio extracellulare. Quest'ultimo, a sua volta, controlla la capacità dei mitocondri di rilasciare nel citoplasma il citocromo c ed altri cofattori pro-apoptotici, che attivano le caspasi, iniziando, così, il processo di morte cellulare.

Ma la presenza del citocromo c conduce anche ad un'alterazione della catena di trasporto degli elettroni. Infatti, nel mitocondrio sono presenti due distinti sistemi di trasporto elettronico: il sistema *trans-mono-membrana* della catena respiratoria, in cui gli

equivalenti riducenti vengono trasferiti dai substrati presenti nella matrice, attraverso la membrana interna, sul citocromo c e da questo vengono rinviati sull'ossigeno molecolare all'interno dei mitocondri mediante l'attività della citocromo ossidasi; il sistema *trans-bi-membrana* che opera, invece, il trasferimento di equivalenti riducenti dai substrati presenti nel citosol direttamente sul lato interno della membrana interna per la riduzione dell'ossigeno molecolare. L'attività di quest'ultimo sistema dipende dalla presenza di quantità catalitiche di citocromo c esogeno all'esterno dei mitocondri [(9)].

LE PIASTRINE E LE LORO VIE DI ATTIVAZIONE

Le Piastrine: anatomia strutturale e funzionale

Le piastrine sono piccoli elementi privi di nucleo derivati dalla frammentazione nel midollo osseo, nel polmone ed in piccola parte nella milza dei loro precursori midollari, i megacariociti; ricoprono un ruolo essenziale nei meccanismi dell'emostasi, della trombosi e della coagulazione del sangue mediante un complesso sistema di attività biochimiche e molecolari.

Al microscopio ottico appaiono come piccole cellule prive di nucleo, ovoidali o tondeggianti con un citoplasma pallido e grigio-bluastro omogeneamente punteggiato da granuli rosso-purpurei. Hanno un volume di 7.06±4.85 μm^3, un diametro di 3.6 ±0.7 μm ed uno spessore di 0.9±0.3 μm.

Il loro aspetto discoide appiattito appare chiaramente alla microscopia elettronica; questa indagine morfologica permette di osservare numerosi organelli citoplasmatici e diffuse aperture di un sistema di canali (il sistema canalicolare connesso alla

superficie) attraverso il quale avviene l'esocitosi del contenuto dei granuli piastrinici dopo l'attivazione.

È presente un *glicocalice* di 15-20 nm di spessore costituito da glicoproteine, glicolipidi, mucopolisaccaridi e proteine adsorbite dal plasma.

Il glicocalice ha una superficie carica negativamente, per la presenza di residui di acido sialico sulle proteine e sui lipidi; tale carica negativa minimizza l'adesione fra le piastrine circolanti. Esso è inoltre ricco in carboidrati di membrana associati a glicoproteine in grado di mediare il trasferimento di segnali da agenti stimolatori ed interagisce con gli attivatori delle piastrine per facilitare l'adesione e l'aggregazione.

La *membrana plasmatica* ha una tipica struttura trilaminare costituita da un doppio strato di fosfolipidi all'interno della quale si trovano inseriti glicoproteine, glicolipidi e colesterolo distribuiti, a differenza di ciò che avviene nelle altre cellule, prevalentemente sulla regione esterna della membrana.

La membrana plasmatica contiene le pompe per il sodio e per il calcio ATP dipendenti, essenziali per il mantenimento dell'omeostasi ionica e partecipa all'accelerazione della coagulazione mediante il fattore 3-piastrinico in essa presente. Sulla membrana plasmatica sono espressi numerosi recettori specifici per i diversi agonisti dell'attivazione piastrinica.

Il *sistema canalicolare connesso alla superficie* è una rete di vescicole e canali che si ramifica all'interno del citoplasma ed è in diretta continuità con la membrana plasmatica e con l'ambiente esterno. Questo sistema determina un aumento notevole della superficie piastrinica esposta al plasma.

Tale sistema consente gli scambi molecolari fra lo spazio intra ed extra cellulare e costituisce una riserva interna di membrane necessarie per i mutamenti conformazionali che seguono l'adesione piastrinica. Contiene inoltre glicoproteine che vengono espresse sulla superficie piastrinica dopo l'attivazione.

Il *sistema tubulare denso* (STD) è un sistema chiuso di sottili tubuli membranosi di circa 400-600 Å di diametro, contenenti materiale amorfo moderatamente elettron-denso, che deriva dal reticolo-endoplasmatico liscio dei megacariociti.

Tale sistema risulta essere coinvolto nei meccanismi di regolazione del trasporto intracellulare di Ca^{2+}. È stata infatti riscontrata la presenza di perossidasi, glucosio-6-fosfatasi, adenilato-ciclasi, Ca^{2+} e Mg^{2+}, ATPasi, e di un sistema di immagazzinamento e di liberazione per i cationi bivalenti. Il STD è anche sede di sintesi di prostaglandine ed è stato paragonato al reticolo sarcoplasmatico muscolare.

Il *citoscheletro* contiene dal 30% al 50% del totale delle proteine piastriniche (actina, miosina, talina, proteine leganti l'actina, vimentina α e β tubulina, proteine associate ai microtubuli), ed è costituito principalmente da tre componenti strutturali:

- Una rete di microfilamenti actinici diffusa in tutto il citoplasma.

- Un agglomerato di microtubuli alla periferia della piastrina.
- Una sistema di corti filamenti di actina che definisce la superficie interna della membrana plasmatica.

Le piastrine contengono quattro tipi distinti di *granuli*:

- Gli α granuli rappresentano il tipo predominante. Di forma ovale o tondeggiante hanno un diametro fra i 300 ed i 500 nm ed è possibile distinguere in essi, alla microscopia elettronica, una zona elettrondensa occupante il nucleo del granulo, una zona periferica a bassa densità elettronica e da 1 a 6 strutture tubulari che risiedono nella zona elettrolucente periferica. All'interno di tali zone è possibile identificare molte diverse proteine quali: la β-tromboglobulina, il fattore piastrinico 4, la trombospondina, il fibrinogeno, l'albumina, l'IgG, la fibronectina, il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), la GPIIb-IIIa, la β-amiloide, il fattore V, la multimerina, i fattori di crescita insulino-simili (IGF-1 ed IGF-2), il fattore legante le proteine V/Va, il TGFβ, ed un attivatore del plasminogeno simile

a quello tissutale. Molte altre proteine sono presenti sulla membrana degli α-granuli.

- I *granuli densi* hanno un aspetto ad "occhio di bue", un diametro tra i 200 e i 300 nm ed una concentrazione media pari a circa 5 elementi per piastrina. I loro principali costituenti sono: ADT, ATP, fosfatidilinositolo (PPI), calcio, magnesio e serotonina incorporata dal plasma, GTP, GDP, P-selettina e granulofisina.
- I *lisosomi* sono piccole vescicole di circa 200 nm che possono essere identificate solo mediante l'utilizzo di adeguate colorazioni citochimiche o immunocitochimiche. Sono gli unici granuli piastrinici contenenti idrolasi acide, ossia enzimi con una massima attività a pH compreso tra 3,5 e 5,5; contengono inoltre la β-esosaminidasi e la β-glicerofosfatasi. A seguito dell'attivazione piastrinica vengono espresse la glicoproteina di membrana lisosomiale e le proteine lisosomiali associate alla membrana 1 e 2 (LAMP1 e LAMP2). I lisosomi sembrano avere un ruolo di grande rilievo nella lisi dei trombi nelle primissime fasi

della risposta emostatica.

- I *microperossisomi* sono piccoli granuli di circa 90 nm contenenti catalasi, enzima in grado di catalizzare la trasformazione del perossido di idrogeno in H_2O.

Sono inoltre riconoscibili all'interno del citoplasma delle piastrine altri organuli:

- Le *vescicole rivestite* sono organelli di 70-90 nm con un caratteristico "ruvido" rivestimento moderatamente elettrondenso. Il rivestimento poliedrico è composto di clatrina, una proteina di 180-kDa costituita da una catena pesante ed una leggera. Particolari colorazioni (alcian blu ed acido tannico) permettono di osservare segmenti rivestiti di membrana al livello della membrana plasmatica, del sistema canalicolare connesso alla superficie, delle vescicole e delle fossette rivestite. La funzione di tali vescicole è quella di trasferire molecole dal plasma ai granuli piastrinici. Il numero di vescicole rivestite nelle piastrine aumenta dopo la stimolazione con ADP.

- I *mitocondri* sono più piccoli (0,1 μm^3) rispetto a quelli presenti nelle altre cellule e sono circa 6 per ogni piastrina. Tali organelli rappresentano la sede di attività per tutti i costituenti della catena respiratoria e per quasi tutti gli enzimi del ciclo di Krebs.
- Le piastrine contengono piccole particelle di *glicogeno* che hanno un ruolo essenziale nel loro metabolismo.

Dopo la stimolazione piastrinica, i granuli si aprono all'interno del sistema canalicolare connesso alla superficie e, mediante contrazioni, liberano tutto il loro contenuto [10,11].

Lipidi e proteine

I *fosfolipidi* costituiscono circa l'80% dei lipidi presenti nelle piastrine e sono principalmente rappresentati dalla fosfatidilcolina, dalla fosfatidiletanolammina, dalla sfingomielina, dalla fosfatidilserina e dal fosfatidilinositolo. La maggior parte dei fosfolipidi carichi negativamente è trasportata sulla faccia interna

della membrana plasmatica, ad opera di una aminofosfolipide-traslocasi, al fine di prevenire il contatto tra questi lipidi e le proteine plasmatiche della coagulazione. Tale contatto si verifica solo dopo l'attivazione piastrinica mediante esposizione dei fosfolipidi sequestrati.

Sono inoltre presenti percentuali minori di lipidi neutri (colesterolo) e di acidi grassi liberi.

Le *glicoproteine di membrana* (Tab. 1) sono molecole in grado di ricevere segnali dall'esterno della piastrina e facilitare le interazioni fra cellula e cellula.

La GPIIb/IIIa è un membro della famiglia delle integrine ed è il principale recettore di membrana piastrinico. È anche presente negli α-granuli e nel sistema canalicolare connesso alla superficie, da cui può essere mobilizzata e trasportata sulla membrana plasmatica a seguito dell'attivazione piastrinica. Gli spostamenti della proteina tra i vari compartimenti cellulari permettono ad essa di trasportare il fibrinogeno plasmatico agli α-granuli dove viene

immagazzinato. Un cambiamento conformazionale indotto dalla stimolazione piastrinica e mediato da variazioni di concentrazione di Ca^{2+}, permette la formazioni di forti legami della GPIIb/IIIa con il fibrinogeno ed il fattore di Von Willebrand (VWF) causando l'adesione di piastrine adiacenti e quindi la loro aggregazione.

La GPIb media le interazioni tra le piastrine ed il VWF; inoltre contribuisce, mediante residui di acido sialico, alla carica negativa della membrana plasmatica e costituisce un sito di legame per la trombina. Una stabile adesione piastrinica richiede l'interazione del complesso GPI-IX con il VWF.

Altre glicoproteine quali: la GPIa-IIa, la GPIc-IIa e la $\alpha_v\beta_3$, mediano l'adesione piastrinica al collagene, alla fibronectina, alla laminina ed alla vitronectina mentre la PECAM-1 lega le molecole analoghe all'eparina. L'espressione sulla membrana di P-selettina, molecola in grado di consentire l'adesione di neutrofili e monociti alle piastrine attivate ed all'endotelio, è utilizzata, infine, come indice di attivazione piastrinica.

Tabella 1 Caratteristiche delle maggiori glicoproteine della membrana piastrinica.

Glico-proteina (GP)	Subunità	*Peso molecolare*	Funzione	*Assente o diminuita in:*
GP Ia	Singola catena	167.000	Interazione collagene-piastrina	
GP Ib	α e β	$\alpha = 143.000$ $\beta = 22.000$	Recettore per il fattore di von Willebrand e per la trombina.	Sindrome di Bernard-Soulier
GP Ic	α e β	$\alpha = 134.000$ $\beta = 27.000$	*Sconosciuta*	
GP IIa	*Singola catena*	157,000	*Sconosciuta*	
GP IIb	α e β	$\alpha = 132.000$ $\beta = 23.000$	Recettore per il fibrinogeno e per il fattore di von Willebrand quando presente come complesso con GP IIIa	Tromboastenia di Glanzmann
GP IIIa	*Singola catena*	114,000	Determinante per gli alloanticorpi PLA-1	Tromboastenia di Glanzmann
GP V	Singola catena	82,000	Substrato per trombina	Sindrome di Bernard-Soulier
GP IX (GP 17)	Singola catena	17,000-22,000	Sconosciuta	Sindrome di Bernard-Soulier

Il *fattore piastrinico 4* viene liberato anch'esso dagli α-granuli; tale fattore è capace di legare i mucopolisaccaridi di superficie delle cellule endoteliali, neutralizzando l'attività anticoagulante di tali molecole eparino-simili. Esso lega inoltre ad alta affinità l'eparina e ne neutralizza l'attività. Il suo ruolo nella chemiotassi di neutrofili e monociti è invece ancora controverso, ma tale proteina è sicuramente in grado di potenziare i meccanismi dell'aggregazione piastrinica.

Le *proteine b-tromboglobulina simili* (proteina basica piastrinica, β-tromboglobulina, β-tromboglobulina-F, ed il FP4 a bassa affinità) presentano una minore affinità per l'eparina, rispetto al FP4. La β-tromboglobulina-F ha un'azione chemiotattica nei confronti dei neutrofili e ne stimola l'esocitosi.

La *trombospondina* è uno dei principali componenti del contenuto degli α-granuli, si lega a componenti della membrana plasmatica dopo la secrezione e svolge un importante ruolo nella stabilizzazione del coagulo.

Il *fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)* è contenuto negli α-granuli ma è presente anche in altre cellule. È un mitogeno la cui attività è stata studiata prevalentemente sulle cellule muscolari lisce e sugli osteoblasti e sembra avere un ruolo anche nella progressione tumorale, nello svilupparsi della fibrosi, dell'aterosclerosi e nella guarigione delle ferite.

La *fibronectina* è liberata degli α-granuli dopo la stimolazione piastrinica mediata da trombina o da collagene. Il suo ruolo non è del tutto chiaro, ma potrebbe facilitare il legame delle piastrine a diverse proteine nei siti di lesione.

La *trombostenina* (actomiosina piastrinica) è una proteina contrattile costituita dalla miosina, grande molecola asimmetrica formata da due catene pesanti e due leggere e dall'actina, proteina globulare capace di polimerizzare e formare un lungo filamento.

Durante l'attivazione si assiste alla formazione di polimeri di actomiosina e quindi di unità contrattili, in grado di partecipare ai cambiamenti di forma, alla coesione ed all'aggregazione delle

piastrine nonché alla retrazione del coagulo. Molte molecole quali troponina, tropomiosina, spectrina, α-actina e calmodulina sembrano regolare tali processi [10,11].

Biochimica delle piastrine

Alle piastrine, in passato ritenute particelle inerti o artefatti, oggi sono riconosciute capacità metaboliche, contrattili, secretive e di minima sintesi proteica.

Esse sono costituite per il 60% da proteine, per il 15% da lipidi e per l'8% da carboidrati; contengono: Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Zn^{2+}, vitamina B12, acido folico e acido ascorbico. Le concentrazioni di Na^{2+} e di K^{+} sono mantenuti costanti dall'attività di pompe di membrana ATP-dipendenti.

Le piastrine non stimolate contengono tra le 100 ed le 500 nM di Ca^{2+} citoplasmatico. Esistono due pools di Ca^{2+} nelle piastrine: un pool citoplasmatico regolato da un meccanismo di antiporto Na^{2+}-

Ca^{2+}, ed un pool contenuto nel sistema tubulare denso a più lenta mobilizzazione e regolato da ATPasi Ca^{2+}-Mg^{2+} dipendente.

Metabolismo energetico delle piastrine

Il *metabolismo energetico* delle piastrine è caratterizzato da un grande utilizzo della glicolisi anaerobia e della sintesi di glicogeno. Le piastrine consumano rapidamente grandi quantità di energia durante l'aggregazione, la secrezione e la retrazione del coagulo.

La maggiore fonte di energia piastrinica è il glucosio che, captato dal plasma, viene utilizzato per le funzioni di sintesi ed immagazzinato sotto forma di glicogeno. Oltre agli enzimi della glicolisi le piastrine contengono anche quelli necessari alla fosforilazione ossidativa utilizzata per la produzione di ATP, ed alla ossidazione degli acidi grassi.

Metabolismo nucleotidico

I nucleotidi adenosinici costituiscono il 90% dei nucleotidi liberi piastrinici e sono localizzati in tre pools distinti: il pool citoplasmatico utilizzato per il mantenimento di varie funzioni cellulari, non intaccato durante il meccanismo di secrezione piastrinica e ciclicamente ricostituito, il pool di riserva dei granuli densi liberato in modo irreversibile durante la secrezione piastrinica e non ricostituito ed una minima quantità di ADP legato all'actina.

La stimolazione piastrinica determina una marcata attivazione delle vie di produzione dell'ATP, una riduzione delle sue concentrazioni piastriniche ed un aumento di quelle dell'ipoxantina, suo metabolita. Sono inoltre presenti piccole quantità di nucleotidi guanosinici, citidinici ed uridinici.

Metabolismo dell'acido arachidonico

L'acido arachidonico è liberato dai fosfolipidi di membrana a seguito della stimolazione piastrinica e per azione della fosfolipasi A_2 (Fig. 3) o del complesso fosfolipasi C-digliceridolipasi. L'acido arachidonico può essere poi catabolizzato dalla lipossigenasi in perossi ed idrossi-acidi grassi o dalla cicloossigenasi in trombossani, prostaglandine, malondialdeide ed acido idrossieptadecatrienoico (Fig. 1). Molti di questi prodotti sono potenti induttori della secrezione e della aggregazione piastrinica.

Fattori piastrinici della coagulazione

Il *fattore 3 piastrinico (FP3)* è una lipoproteina termostabile che rimane strettamente associata alla membrana piastrinica dopo l'attivazione da parte dell'ADP o di altri agonisti e che acquisisce la capacità di legare i fattori plasmatici della coagulazione. Dopo l'attivazione si viene a formare un complesso Ca^{2+}-FP3 in grado di attivare sia il fattore X che la protrombina (fatt. II).

La formazione del FP3 necessario all'attivazione del fattore X è indipendente dall'attivazione piastrinica, mentre il FP3 coinvolto nella formazione della protrombinasi (complesso costituito dal fatt. Va, Xa, dal Ca^{2+} e da fosfolipidi che incrementa ed accelera la formazione di trombina) diviene disponibile solo dopo l'aggregazione e la secrezione [10,11,12].

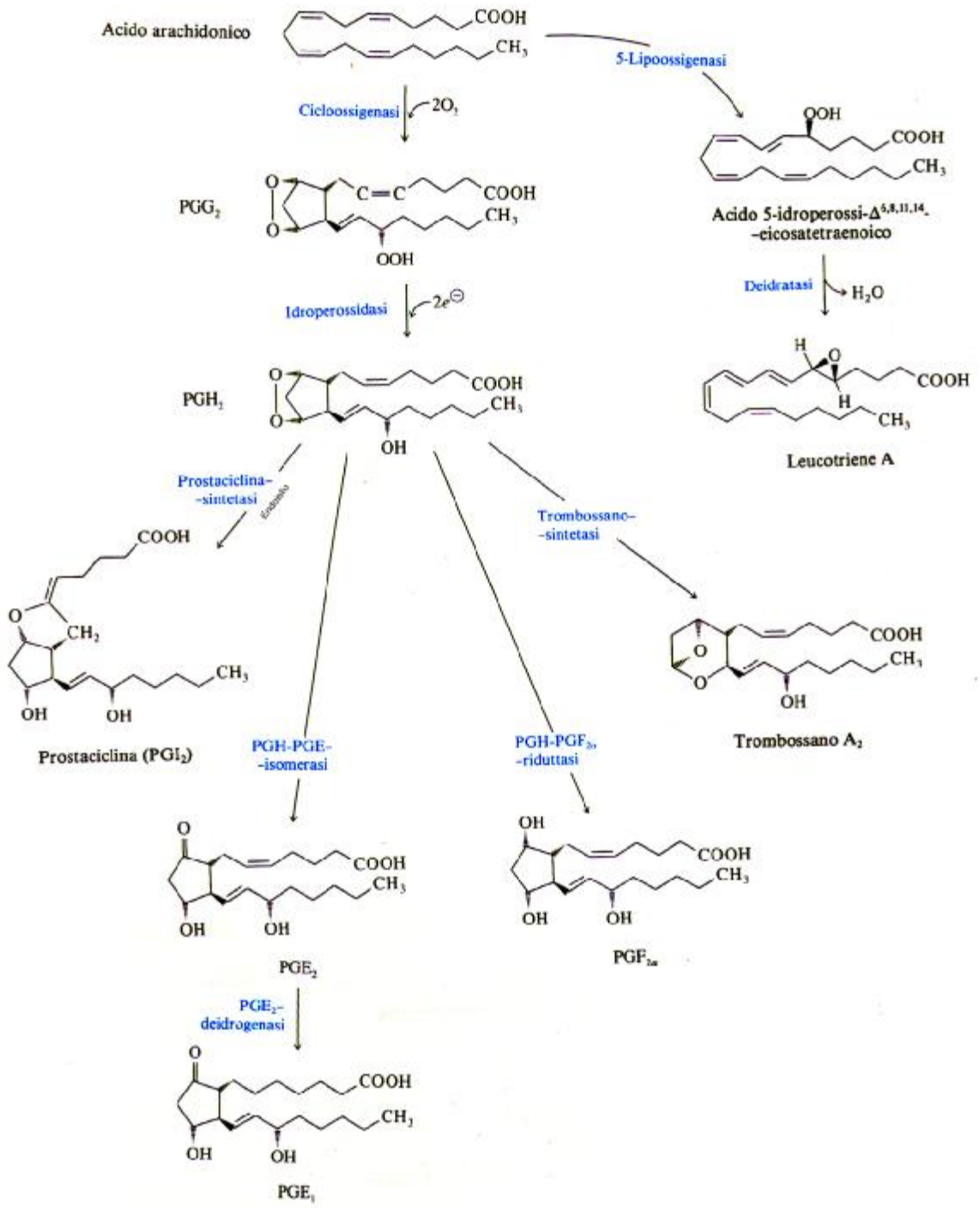


Figura 1 Derivati dell'acido arachidonico

Biochimica dell'attivazione piastrinica

L'arresto della fuoriuscita di sangue dal letto vascolare in caso di danno endoteliale, prende il nome di emostasi, un processo in cui le piastrine giocano un ruolo chiave. Questi elementi normalmente non interagiscono con la superficie endoteliale e con le altre cellule del sangue ma, quando esposte a superfici vascolari danneggiate, aderiscono al collagene sottoendoteliale, si attivano, si aggregano e formano il tappo piastrinico in grado di arrestare temporaneamente l'emorragia.

Numerosi agenti biologici sono in grado di determinare l'attivazione piastrinica (Tab. 2) e la maggior parte di quelli fisiologicamente importanti agiscono legando specifici recettori di membrana. Le conseguenze biochimiche dell'azione di tali agonisti piastrinici sono complesse e non completamente definite.

Nel corso dell'attivazione piastrinica, i fosfolipidi di membrana vengono trasformati in messaggeri intracellulari tramite vie biochimiche intercorrelate. Tra esse sembrano essere

particolarmente rilevanti il ciclo del fosfatidil-inositolo attivato dalla fosfolipasi C e la via dell'acido arachidonico-trombossano A_2 attivata dalla fosfolipasi A. Ulteriori fasi di tale processo sono la liberazione del Ca^{2+} intracellulare, modulata dal sistema dell'AMPc e la fosforilazione di proteine stimolanti l'attivazione delle proteine contrattili piastriniche. Queste ultime sono responsabili della trasformazione da dischi piatti a sfere spinose delle piastrine, nonché della loro aggregazione e secrezione.

Tabella 2 Sostanze che attivano le piastrine.

Sostanze che attivano le piastrine direttamente (Agenti aggreganti "primari")	§ Adenosina 5'difosfato (ADP) § Epinefrina e norepinefrina § 5-Idrossitriptamina (serotonina) § Periodato, radicali liberi dell'O_2^-e dell'OH § Forbolo miristato acetato § Trombina § Vasopressina
Sostanze che inducono la reazione di rilascio e/o la produzione di prostaglandine (Agenti aggreganti "secondari")	§ *Agenti infettivi e loro prodotti* § Complessi antigene-anticorpo; batteri; virus; endotossine ed esotossine batteriche; tubercolina § *Proteine* § Fattore bovino VIII; proteina C reattiva; DNA; ferritina; immunoglobine; fattore attivante le piastrine (PAF); monomeri di fibrina § *Enzimi* § Alcuni componenti del complemento; papaina; plasmina; fosfolipasi. § *Miscellanea* § Acetilcolina; arachidonato; carraginina; collagene e varie microfibrille; acidi grassi; lectine; polilisina ed altri polipeptidi cationici; molte particelle e superfici estranee; fluido amniotico; blu di metilene; mieloperossidasi neutrofilica; fitoemoagglutinine; ristocetina; veleni di serpenti; applicazioni terapeutiche di ultrasuoni; luce ultravioletta; bilirubina non coniugata; cristalli di acido urico

Metabolismo del fosfatidilinositolo

Le trasduzioni del segnale dai recettori di membrana ai compartimenti ed alle molecole che regolano la mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare, la fosforilazione delle proteine e le altre risposte piastriniche sembrano essere mediate da interconversioni dei fosfatidilinositoli (inositolo monofosfato-PI-, fosfatidilinositolomonofosfato-PIP- e fosfatidilinositolodifosfato- PIP2).

Nelle piastrine il clivaggio dei fosfatidilinositoli avviene prevalentemente ad opera di una forma di fosfolipasi C di membrana Ca^{2+} dipendente.

Dopo l'attivazione piastrinica si verifica l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5 difosfato in 1,2-diaciglicerolo (DAG) e 1,4,5-inositolotrifosfato (IP3), seguita dalla conversione di DAG in acido fosfatidico (PA) e dalla rigenerazione di PIP2 mediata da specifiche trasferasi e chinasi.

Il DAG è, con la fosfatidilserina, un cofattore della protein-chinasi C ed agisce incrementando notevolmente l'affinità per il Ca^{2+} di questo enzima. La protein-chinasi C catalizza la fosforilazione di proteine, ancora non ben identificate, ed esercita un feedback negativo sulle risposte piastriniche alla stimolazione, che potrebbe essere la conseguenza della fosforilazione dell'IP3.

L'IP3, l'acido lisofosfatidico e probabilmente l'acido fosfatidico hanno proprietà ionoforetiche le quali consentono la mobilizzazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari. La fosforilazione proteica indotta della protein-chinasi C e la mobilizzazione di Ca^{2+} agiscono sinergicamente scatenando la secrezione piastrinica.

Sistema delle prostaglandine e dei trombossani

Il primo passo nella formazione delle prostaglandine è costituito da un segnale di membrana che facilita l'ingresso o la traslocazione di calcio nei siti contenenti la fosfolipasi A_2. L'idrolisi calcio-dipendente del fosfatidilinositolo e della fosfatidilcolina da parte

della fosfolipasi A_2 conduce alla formazione di acido arachidonico. Questo acido grasso è trasformato dalla ciclossigenasi citoplasmatica in labili endoperossidi ciclici intermedi (PGG2 PGH2), in una reazione inibita dall'aspirina e da suoi analoghi. Gli endoperossidi ciclici sono trasformati in tre classi distinte di composti aventi diverse attività biologiche: i trombossani (TX), le prostaglandine (PG) e le prostacicline (presenti solo nelle cellule endoteliali) (Fig. 1).

L'acido arachidonico viene trasformato a sua volta negli acidi idrossi-eicosatetranoici (HPETE e HETE) mediante una via catalizzata dall'enzima lipossigenasi.

I *trombossani* originano dalla trasformazione degli endoperossidi ciclici catalizzata dall'enzima piastrinico trombossanosintetasi. Il trombossano A_2 attiva le proteine contrattili nelle piastrine e nel muscolo liscio, è un potente vasocostrittore e induttore della secrezione piastrinica, induce e mantiene il cambiamento morfologico delle piastrine ed in vitro stimola la formazione di DAG

e IP3. Ha un emivita breve ed è trasformato rapidamente in un composto inerte, il trombossano B_2. Insieme all'acido arachidonico può attivare la protein-chinasi C.

Secondo alcuni autori il trombossano A_2 è il principale mediatore della secrezione piastrinica ed è in grado di accelerare molte reazioni intermedie, tuttavia non sono ancora definiti chiaramente gli esatti meccanismi biochimici del suo funzionamento.

Dati sperimentali suggeriscono però che anche gli endoperossidi e la malondialdeide abbiano un ruolo nella secrezione piastrinica.

Le *prostaglandine* E-2, D-2 ed F2α vengono prodotte attraverso una reazione non enzimatica e liberate dalle piastrine attivate. Il loro ruolo non è stato ancora del tutto definito, ma sembra possano agire come agenti modulatori o facilitatori delle azioni del TXA_2 e di altri agenti aggreganti.

La *PGD-2* è un inibitore della attivazione piastrinica ed esercita, con la prostaciclina, un feed-back negativo sull'aggregazione. La *PGE-1* stimola l'adenilato ciclasi, la secrezione indotta

dall'adrenalina, dalla trombina e da altri agenti ed inibisce l'aggregazione indotta dall'ADP ed altre funzioni piastriniche determinando la formazione di macromolecole inibitorie nel plasma. Tale PG solitamente non si riscontra nelle piastrine umane, ma viene utilizzata sperimentalmente per stimolare l'adenilato ciclasi e causare un aumento delle concentrazioni di cAMP. La PGF_a non sembra avere rilevanti attività biologiche.

L'AMP ciclico ed i suoi enzimi regolatori

Molti dati sperimentali indicano che l'AMP ciclico è uno dei principali mediatori delle risposte delle piastrine a diversi stimoli. Le concentrazioni di tale composto nelle piastrine non stimolate sono basse, difficilmente valutabili e sempre mantenute entro limiti molto stretti dagli enzimi di sintesi (adenilato-ciclasi) e di degradazione (le fosfodiesterasi). L'AMP ciclico inibisce in vitro, ad alte concentrazioni, l'aggregazione piastrinica indotta dall'ADP. Il fatto che tale fenomeno si realizzi solo ad alte concentrazioni

sembra spiegato dalla grande efficienza delle fosfodiesterasi che è capace di degradare rapidamente l'AMPc e dall'impossibilità da parte di quest'ultimo di attraversare la membrana plasmatica. L'utilizzo sperimentale di un dibutiril-AMPc in grado di superare la membrana plasmatica e di resistere alle fosfodiesterasi ha dimostrato infatti una potente azione inibitoria di questo analogo sul cambiamento conformazionale e sulla aggregazione piastrinica.

Gli inibitori dell'aggregazione, come la prostaciclina, causano un aumento dei livelli di AMPc nelle piastrine stimolando l'adenilato ciclasi ed antagonizzando in questo modo l'azione del TXA_2 e della PGH_2.

Farmaci che bloccano le fosfodiesterasi, come le metilxantine o la papaverina, bloccano anche il ciclo del fosfatidilinositolo e l'attivazione della protein-chinasi C.

L'AMPc riduce le risposte piastriniche e sembra agire determinando la fosforilazione di numerose proteine quali la protein-chinasi, alcune proteine di membrana, la fosfolambaina e la

trombolambaina. Queste ultime sono in grado di stimolare l'azione della pompa per il Ca^{2+} presente a livello del sistema tubulare denso. Una chinasi AMPc dipendente può inoltre fosforilare la chinasi della catena leggera della miosina.

Le relazioni fra le sostanze proaggreganti e l'AMPc non sono del tutto chiare e l'ipotesi secondo la quale tali sostanze sarebbero in grado di determinare una riduzione dei livelli di AMPc nelle piastrine è stata messa in discussione. L'adrenalina, la serotonina, il collagene, il PAF e la trombina inibiscono l'adenilatociclasi, mentre l'ADP determina un aumento di AMPc nelle piastrine non agendo però sulle fosfodiesterasi o sull'adenilatociclasi.

Il GMPc sembra essere un modulatore della reattività piastrinica ed un regolatore del legame degli agonisti dei recettori α-adrenergici; le sue concentrazioni intrapiastriniche risultano essere inversamente proporzionali a quelle dell'AMPc.

I nucleotidi ciclici possono anche dissociare le protein-chinasi in sub-unità attive e forse attivare la fosfolipasi A.

Molti dati suggeriscono l'esistenza di correlazioni fra il sistema delle prostaglandine/trombossani e quello dei nucleotidi ciclici. Il TXA_2 e la PGH-2 inibiscono l'accumulo di AMPc mediato dalla PGE-1 mentre i livelli di AMPc sembrano poter regolare l'attività della cicloossigenasi piastrinica.

Ruolo degli ioni Calcio

L'attivazione piastrinica è apparentemente associata ad un aumento del Ca^{2+} citoplasmatico, in gran parte derivato dalla mobilizzazione delle riserve del sistema tubulare denso e dalle molecole di PIP2 che liberano Ca^{2+} nel citoplasma quando vengono idrolizzate. Il Ca^{2+} immagazzinato è liberato ad opera di messaggeri quali l'IP3, la PA e la LPA; esperimenti in vitro hanno dimostrato la capacità dell'AMPc di regolare la captazione di Ca^{2+} da parte di vescicole di membrana piastrinica.

Il Ca^{2+} mobilizzato è utilizzato in parte per facilitare gli ulteriori legami degli agonisti ai recettori piastrinici, ed in parte per attivare il sistema contrattile piastrinico.

L'attivazione delle diverse funzioni piastriniche ad opera della mobilizzazione del Ca^{2+} citoplasmatico è un fenomeno graduale in cui ciascuna funzione piastrinica richiede determinate concentrazioni di Ca^{2+} per innescarsi. Le concentrazioni necessarie aumentano nei vari passaggi del processo che conduce alla formazione del coagulo. Tali passaggi sono dati da: cambiamento di forma, aggregazione, secrezione dei granuli densi, secrezione degli α-granuli, liberazione dell'acido arachidonico e scissione dell'idrolasi acida.

Produzione di radicali liberi dell'Ossigeno

È stato dimostrato che le piastrine umane sono capaci di produrre piccole quantità di radicali liberi dell'ossigeno (ione superossido, perossido di idrogeno, radicale idrossilico) [13,14]. In particolare, nei

primi anni ottanta è stato identificato un sistema enzimatico legato alla membrana e NADH dipendente capace di produrre H_2O_2. Tale ossidasi sembra avere un ruolo nella trasduzione dello stimolo. Infatti è stato dimostrato che i secondi messaggeri di numerosi agonisti esercitano la loro azione modulando l'attività di protein-chinasi e fosfatasi. La fosforilazione di alcune proteine su residui tirosinici appare essere in grado di determinare una attivazione dell'ossidasi con la conseguente produzione di H_2O_2. L'H_2O_2 a sua volta è capace di fosforilare substrati proteici determinando una amplificazione del processo [15].

Ruolo delle tirosin-chinasi e delle tirosin-fosfatasi

Numerosi agonisti, come la trombina, l'ADP, il PAF e il TXA_2, per i quali esistono recettori di membrana strutturalmente distinti, sono capaci di indurre la fosforilazione di residui tirosinici su un gruppo di proteine delle piastrine. Tale evento costituisce una caratteristica comune della trasduzione del segnale nelle

piastrine (Fig. 2). È stato proposto che tirosin-chinasi e tirosin-fosfatasi di tipo non recettoriale, svolgano la funzione di mediare la trasduzione dello stimolo delle integrine [16].

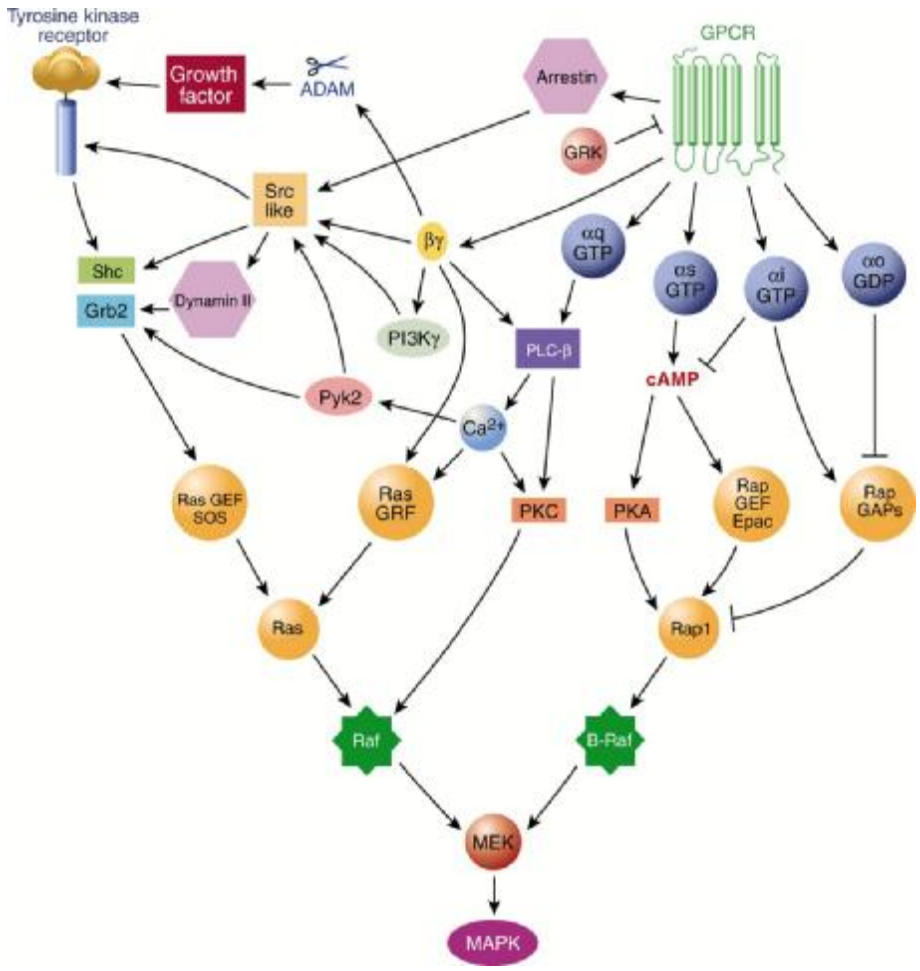


Figura 2 Regolazione del sistema delle protein-chinasi da parte di proteine G associate ai recettori

Questo dato è confermato dal fatto che gli inibitori delle protein-chinasi inibiscono le funzioni piastriniche, mentre gli inibitori delle

tirosin-fosfatasi, (vanadato) e l'H_2O_2 aumentano la fosforilazione su residui tirosinici di proteine piastriniche, l'attivazione e la fase di rilascio.

Attivazione delle proteine contrattili

La mobilizzazione di quantità sufficienti di Ca^{2+} citoplasmatico permette l'attivazione della chinasi della catena leggera della miosina e la conseguente fosforilazione di quest'ultima che può essere ottenuta anche mediante l'azione della protein-chinasi C. Tale passaggio richiede la presenza della calmodulina e regola l'accorciamento e la contrazione della actomiosina piastrinica. L'actina monomerica polimerizza a formare i filamenti actinici e lega "i ponti" miosinici formando l'actomiosina piastrinica.

Le unità contrattili che si vengono così a formare sono responsabili dei fenomeni di contrazione dei microtubuli, della secrezione e probabilmente della retrazione del coagulo che seguono l'attivazione piastrinica [10,11,12].

Altre funzioni piastriniche

È stato dimostrato che le piastrine svolgono oltre alla funzione emostatica, una funzione regolatrice in numerosi processi fisiologici e patologici. Lo studio di tali funzioni piastriniche apre dunque la strada a nuovi e stimolanti progetti di ricerca in svariati campi d'azione.

Sembra ormai appurata un'attività piastrinica di *mantenimento dell'integrità endoteliale*. Uno dei meccanismi coinvolti in tale processo, sembra essere la microvescicolazione. Quest'ultima consiste nella frammentazione delle piastrine in piccoli elementi. Tali elementi sono formati da una membrana plasmatica che esprime i recettori caratteristici delle piastrine e che contiene piccole quantità di citoplasma. Le microvescicole si legano alla superficie endoteliale in una serie di "continui e reversibili contatti emostatici" in grado di mantenere, in condizioni di normale logoramento, la continuità e la non trombogenicità dell'endotelio.

Le piastrine producono inoltre un fattore di crescita contenuto negli α–granuli capace di indurre proliferazione di cellule endoteliali in coltura [17].

È stata dimostrata nelle piastrine un'*attività simil-fagocitosica* il cui ruolo fisiologico non appare ancora ben definito. Le ipotesi più accreditate attribuiscono a tale attività un ruolo nella formazione di vegetazioni nell'endocardite batterica e nell'eliminazione dal sangue di diverse particelle [17].

Appare sempre più rilevante il ruolo delle piastrine nel trasporto di molte sostanze. La maggior parte della serotonina presente nel sangue è contenuta nelle piastrine, e sono state dimostrate anomalie nel trasporto di tale amina in pazienti affetti da sindrome di Down e da sclerosi multipla. Grandi quantità di fosfatasi acida-β-glicerolica e di potassio possono essere liberati dalle piastrine. Il rilascio di K^+ durante la coagulazione è una causa comune di pseudoiperkaliemia.

Diverse sostanze vasoattive rilasciate dalle piastrine possono essere importanti nella patogenesi della *trombosi,* del *rigetto di organi trapiantati,* dell'*embolia polmonare,* della *sindrome da distress repiratorio dell'adulto e* della *coagulazione intravascolare disseminata* [17].

I mitogeni piastrinici, primo fra tutti il PDGF, stimolano la proliferazione di fibroblasti, di cellule muscolari lisce, di cellule del tessuto osseo, di cellule gliali, di condrociti [18] e di cellule tumorali .

Il PDGF è certamente uno dei più importanti fattori mitogeni e chemiotattici conosciuti per le cellule mesenchimali. Il ruolo delle piastrine nella *proliferazione, nella migrazione e nella trasformazione neoplastica* di tali cellule è molto rilevante. L'attivazione del recettore del PDGF determina l'innescarsi di una cascata di reazioni intracellulari che includono l'induzione di geni quiescenti. Questi sono in grado di regolare l'attivazione di fattori di trascrizione fondamentali nei processi di proliferazione e differenziazione cellulare [19].

Nell'ambito di studi finalizzati ad identificare gli agenti regolatori della riparazione delle fratture è emerso un possibile ruolo del PDGF e del TGF-β_1. I due fattori, liberati dalle piastrine a livello dell'ematoma di frattura, sembrano modulare, insieme all'αFGF ed al βFGF, la proliferazione e la differenziazione delle cellule mesenchimali, nonché la sintesi della matrice extracellulare [20].

Esistono prove rilevanti a favore di un possibile ruolo del PDGF nel modulare la proliferazione e la migrazione nell'intima delle cellule muscolari della tonaca media di vasi danneggiati. Tali dati confermano il ruolo di rilievo del PDGF nella regolazione delle funzioni delle cellule muscolari lisce e del rimodellamento vascolare [21].

La presenza di recettori per il PDGF a livello del SNC nel periodo embrionario sembra correlata ad un'azione regolatrice del fattore di crescita *sullo sviluppo del SNC*, mentre l'eccessiva espressione e la mutazione del gene che codifica per il

recettore sono state associate a diversi *tumori cerebrali* [22].

L'identificazione del PDGF e del suo recettore nelle cellule dell'osteosarcoma, ne sottolinea un ruolo di rilievo nella stimolazione della crescita tumorale [23].

Le piastrine si sono dimostrate in grado di intervenire nella *regolazione dei processi infiammatori*. Esse hanno ,ad esempio la capacità di modulare, tramite la β-tromboglobulina, il fattore piastrinico 4 (PF-4) e le interazioni tra la P-selectina piastrinica e la β_2-integrina dei neutrofili, la risposta di questi ultimi nelle prime fasi dell'infiammazione [24,25].

Negli ultimi tempi diversi dati sperimentali hanno rafforzato l'ipotesi di un ruolo delle piastrine nella *modulazione del dolore*. La liberazione da parte delle piastrine, di serotonina, istamina (5HT), ATP, tromboglobulina, PAF e precursori delle bradichinine, risulta essere correlata all'insorgenza di dolore [26].

In pazienti affetti da cefalea muscolo-tensiva è stata riscontrata, nelle fasi di dolore, un'alterata funzionalità piastrinica

ed una aumentata liberazione dei fattori citati, mentre in pazienti affetti da emicrania è risultata incrementata l'attività della via dell'L-arginina e dell'ossido nitrico a livello piastrinico [27,28].

Ulteriori conferme dell'azione algogena delle piastrine, sono giunte da studi effettuati iniettando in volontari, a livello intradermico, preparati di piastrine autologhe. Tali studi hanno dimostrato la capacità delle piastrine di indurre dolore, iperalgesia ed indurimento nella sede di inoculo. I primi due effetti sono riconducibili all'azione di un fattore solubile, mentre l'ultimo a quella di un fattore di membrana [29].

La possibilità di liberare potenti sostanze algogene e di produrre endocannabinoidi consolida pertanto il possibile ruolo delle piastrine nella modulazione del dolore.

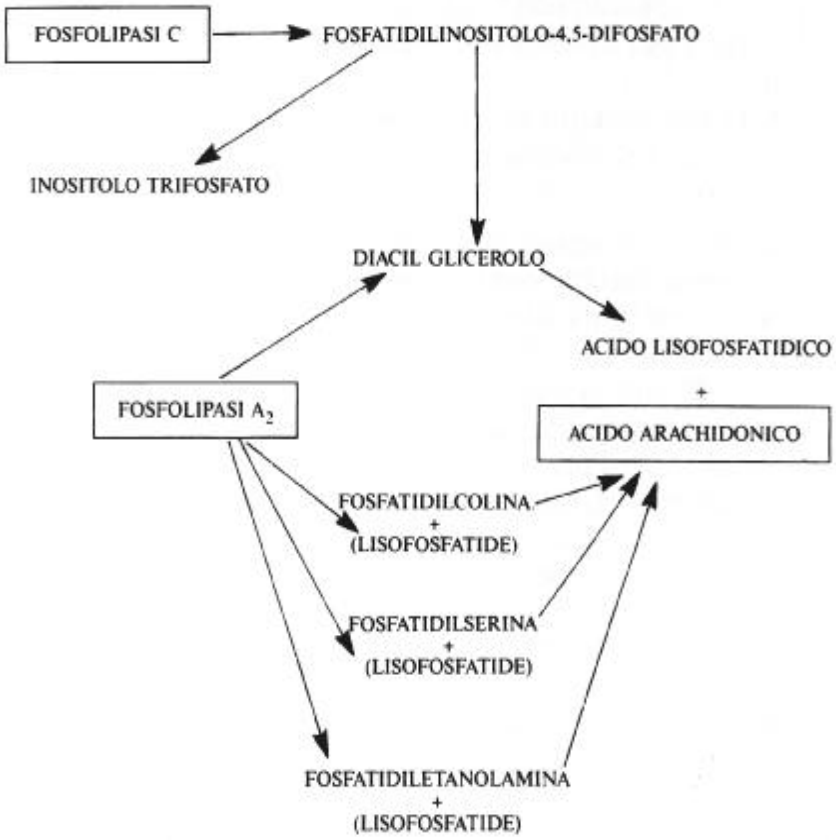


Figura 3 Siti di azione delle fosfolipasi della membrana piastrinica

L'APOPTOSI NELLE PIASTRINE

A partire dalla sua scoperta, nel 1972 ad opera di Kerr, l'apoptosi è stata per molto tempo attribuita esclusivamente alle cellule nucleate. Per riconoscere un meccanismo apoptotico anche in cellule anucleate, come le piastrine, ci sono voluti più di venti anni, durante i quali l'apoptosi nelle piastrine è stata dimostrata in differenti modelli *in vivo* e *in vitro*.

I rilievi evidenziati da questi studi possono essere così schematizzati:

1. *Agonisti piastrinici causano un fenomeno simil-apoptotico nelle piastrine*: i deboli agonisti naturali piastrinici (ADP ed epinefrina) e l'agonista artificiale analogo del trombossano U46619 inducono eventi simil-apoptotici nelle piastrine, in assenza dell'esposizione della PS (fosfatidilserina). Invece, gli agonisti forti naturali piastrinici (trombina e collagene) inducono, anch'essi,

l'espressione di markers apoptotici, ma in presenza dell'esposizione della PS [30].

2. *Le piastrine esprimono:*
   a. *numerosi membri della famiglia delle caspasi* (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9);
   b. *mRNA per i "recettori della morte"* inclusi DR3, DR5, DR4, TRAIL, recettore del TNF p55 e RIP;
   c. *mRNA per la famiglia di Bcl-2* inclusi Bcl-x, Bfl-1, Bad, Bak, Bax e Mc11.
3. *È presente attivazione di caspasi 3 durante la conservazione delle piastrine:* ciò è stato studiato mediante la presenza di proteolisi della *gelsolina*, marker di attività della caspasi. Infatti, essa è una proteina legante l'actina del citoscheletro, che viene distrutta durante l'apoptosi, con la formazione di un frammento di circa 41 Kda [31].

4. *Piastrine lavate ed incubate a 37°C mostrano un progressivo deterioramento funzionale, pur mantenendo intatta la membrana plasmatica:* le piastrine conservate a 37°C subiscono perdite nella risposta di aggregazione, associate a rilascio di citocromo C dai mitocondri, scissione di procaspasi 9 ed esposizione di PS. Anche la TEM (microscopia elettronica a trasmissione) di piastrine lavate ed incubate a 37°C mostra aspetti morfologici tipici di apoptosi, evidenziabili in un cambiamento dalla forma discoide a quella sferica, simile alle cellule attivate, ma con l'assenza di pseudopodi e di protrusioni sulla superficie cellulare [32].
5. *Il citocromo C è rilasciato dai mitocondri di piastrine lavate ed incubate a 37°C:* infatti, esso veniva rilevato nel citosol dopo 5 ore di incubazione piastrinica.
6. *Le piastrine mantengono il potenziale trans-membrana mitocondriale* ($\Delta\psi_m$) *durante la conservazione prolungata:*

ciò è stato verificato basandosi sul ruolo dell'ATP. Siccome l'apoptosi è un processo attivo energia-dipendente, richiede ATP. Quindi, se la fosforilazione ossidativa è impedita la cellula interrompe il suo funzionamento non appena le riserve intracellulari di ATP si esauriscono. L'inefficienza della catena di trasporto degli elettroni, che causa la sovrapproduzione di O_2 reattivo o la deplezione di ATP, spesso, conduce ad una depolarizzazione mitocondriale. Quindi, è stato studiato il cambiamento di $\Delta\psi m$ sotto severe condizioni di deplezione di ATP e si è visto che la riduzione nel rilascio di quest'ultimo non è associata a cambiamenti di $\Delta\psi_m$ [33].

7. *Nelle piastrine è presente esposizione di PS sulla superficie cellulare* [34]*:* i meccanismi che inducono esposizione di PS nelle piastrine sono ancora poco conosciuti; pare, comunque, che essa dipenda da un aumento della concentrazione intracellulare di calcio,

dall'attività di caspasi, dalla presenza di fosfolipidi *scramblase*, che mediano i movimenti transmembrana calcio dipendenti di PS ed altri fosfolipidi e dall'organizzazione del citoscheletro.

INTRODUZIONE

È stato recentemente riportato che le piastrine ricapitolano alcuni fenomeni tipici della morte cellulare programmata, come la formazione di bleb, i cambiamenti di dimensioni, la formazione di microvescicole e la migrazione della fosfatidilserina attraverso il doppio strato verso la faccia esterna della membrana [32]. Modificazioni suggestive di apoptosi sono state inoltre riportate in piastrine conservate o in quelle soggette a stress sperimentale [35]. Wadhawan e collaboratori hanno mostrato che la senescenza delle piastrine è associata con il rilascio di citocromo c da parte dei mitocondri piastrinici e con il signaling calpaina – mediato. Sono state osservate modificazioni che fanno pensare alle cellule in apoptosi quando le piastrine venivano stimolate dalla trombina [30], dallo ionoforo del calcio [32], dall'acido arachidonico [30], dall'U46619 [30] e dall'estere del forbolo [30], o dall'aderenza ai collageni trombogenici tipo I, III e IV [30]. Modificazioni simili nella

morfologia piastrinica sono state inoltre osservate quando le piastrine venivano conservate in coltura o come PCs [35,36]. Originariamente, questi cambiamenti sono stati descritti come "attivazione piastrinica", e solo dal 1997 alcuni ricercatori [37] hanno iniziato a considerare queste modificazioni morfologiche come apoptotiche. Mentre gli eventi precoci dell'attivazione piastrinica sono stati ampiamente studiati, gli eventi tardivi, come la reazione di rilascio, non sono stati riportati nelle cellule apoptotiche. Inoltre, è stato dimostrato che l'apoptosi è innescata dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate dal danno mitocondriale. Durante i primi anni ottanta noi abbiamo dimostrato che la generazione di ROS ha un'importanza cruciale nell'attivazione delle piastrine umane. Abbiamo inoltre dimostrato che gli stimoli immunologici generano ROS mediante un meccanismo che coinvolge il sistema della membrana plasmatica [26]. Questi dati hanno suggerito di indagare se gli stimoli immunologici possano indurre eventi simil-apoptotici nelle piastrine. Lo zymosan

opsonizzato attiva le piastrine inducendole all'aggregazione ed al rilascio di fattori quando vengono messe a contatto con materiali particellari. Invero è stato dimostrato che lo zymosan, un attivatore della via alternativa del complemento, attiva le piastrine nel plasma in una via dipendente dal complemento e dal fibrinogeno [38]. Accanto alla via alternativa del complemento e al componente C3 del complemento, sono inoltre necessari altri componenti, come il C5, il C6 e il C7 ed in aggiunta è richiesto il legame delle IgG alle particelle di zymosan anche per l'attivazione piastrinica zymosan – indotta. L'attivazione delle piastrine coinvolge una serie di eventi coordinati, che sono regolati per mantenere l'emostasi. Il cambiamento conformazionale nel dominio extracellulare della glicoproteina IIb – IIIa innesca segnali outside-in che provocano l'aggregazione piastrinica. D'altro canto, le piastrine posseggono recettori di superficie che permettono loro di aderire al sito di danno tissutale e di diffondere. La diffusione è accompagnata dalla secrezione di alcuni fattori, come l'ADP, la serotonina ed il

trombossano, che attivano o innescano le piastrine. Durante l'attivazione piastrinica, segnali inside-out aumentano l'affinità di diverse integrine piastriniche verso proteine di adesione, come il fibrinogeno, risultando nell'aggregazione piastrinica. Successivamente alla loro attivazione, le piastrine continuano ad essere esposte all'agonista a lungo dopo la formazione del coagulo e ciò può essere responsabile degli eventi successivi all'aggregazione, come la retrazione del coagulo, la formazione di microvescicole e di pseudopodi. In questo lavoro abbiamo studiato il ruolo dell'attività redox e della funzione mitocondriale durante gli eventi tardivi in piastrine opsonizzate e stimolate ed abbiamo dimostrato che lo zymosan opsonizzato induce uno sconvolgimento mitocondriale (mitoptosi) e la retrazione del coagulo, ma aumenta un'attività redox delle piastrine, che si mantengono vitali.

MATERIALI E METODI

Preparazione di una sospensione piastrinica [39]

La sospensione purificata di piastrine è stata preparata utilizzando campioni di sangue fresco con un 2% di acido diaminotetracetico etilene (EDTA, BDH) (9:1 v/v) come anticoagulante. Il campione di sangue è stato prelevato da soggetti volontari non sottoposti a trattamenti farmacologici da almeno dieci giorni. Inoltre, è stata adottata una particolare cura per minimizzare la contaminazione dei leucociti, riuscendo ad ottenere meno di 1 leucocito per 10^8 piastrine. Il plasma ricco di piastrine (PRP) è stato ottenuto centrifugando i campioni di sangue a 100 x g per 15 minuti a temperatura ambiente. I sovranatanti sono stati poi delicatamente disposti a strati su un apparecchio Ficoll *(Ficoll 400, Pharmacia)* e centrifugati a 80 x g per 20 minuti. I risultanti sovranatanti sono stati mescolati con un giusto volume di buffer salino fosfato di Dulbecco *(PBS, Gibco)* e lavati due volte.

Attivazione della sospensione piastrinica

Lo zymosan A è stato bollito in acqua distillata per 20 minuti, lavato tre volte con 0,15M NaCl, incubato (50mg/ml) con plasma citrato autologo per 30 minuti a 37°C e poi lavato ancora tre volte in PBS Dulbecco.

Il PRP è stato attivato attraverso il mescolamento con un egual volume di zymosan opsonizzato per 30 minuti a 37°C.

Per inibire la generazione di prostaglandine, derivanti dalla via della ciclossigenasi, sono stati aggiunti 100mM di aspirina *(ASA, Bayer)*.

Per inibire sia la via ciclossigenasica che quella lipossigenasica, sono stati aggiunti 300µg/ml di 5,8,11,14 acido eicosatetraenoico *(ETYA, RO 3-1428, Roche).*

Per inibire la respirazione mitocondriale è stato utilizzato 1 mM di KCN *(Merck)*, mentre è stata aggiunta teofillina 10 µg/ml

(Sigma) per inibire l'aggregazione piastrinica ed il rilascio dei granuli.

Le sospensioni di piastrine attivate dallo zymosan sono state valutate attraverso la generazione di anioni O_{2-} e la generazione O_{2-} mediata da fattori chemotattici non legati al metabolismo di prostaglandine, aggiungendo 0,5mM di NADH *(Sigma).*

Per inibire l'ossidazione NADH dipendente è stata impiegata superossido-dismutasi (SOD) *(Sigma)* 50µg/ml.

La SOD inattivata dal calore è stata anche impiegata come esperimento controllo. Gli esperimenti controllo sono stati eseguiti usando i sovranatanti ricavati da piastrine messe a riposo, piastrine messe a riposo più inibitori, piastrine messe a riposo più inibitori e NADH, piastrine attivate non zymosan opsonizzate, piastrine attivate non zymosan opsonizzate più inibitori. Dopo incubazione, le sospensioni piastriniche sono state centrifugate a 200 x g per 20 minuti ed i sovranatanti privi di cellule sono stati raccolti ed utilizzati come fonte di fattori chemotattici per i PMNs.

Riduzione dell'MTT [40]

È stata eseguita attraverso l'analisi di citoflussimetria, eseguita con un classificatore di cellule Ortho 50H (*Ortho Diagnostic System, USA)* allestito con un Elio-Neon (*Spectra Physics, USA)* ed un laser ad Argon di 400mW (*Innova 90-4, Coherent, USA).* I dati (amplificazione lineare) sono stati analizzati per mezzo di un computer (MCA 3000, Bruker, Francia) connesso ad un citometro.

Il Right Angle Scatter (RAS) è stato misurato a 488 nm per ricercare l'aumento della refrigerazione cellulare, dovuto alla riduzione di MTT. Il Forward Angle Scatter (FAS) e/o l'ampiezza della estinzione dell'impulso assiale della luce (diametro) sono stati misurati al fine di selezionare le popolazioni cellulari secondo la loro misura.

Per ogni campione, sono state analizzate 10.000 cellule dopo sblocco del segnale per eliminare gli aggregati ed i frammenti cellulari.

JC-1 mitocondriale [41]

Il JC-1 (5,5-6,6 tetracloro-1,1-3,3 tetraetilbenzimidazolo carbocianina-iodato) è un catione lipofilico utilizzato per rivelare variazioni nel potenziale membranoso mitocondriale delle singole cellule. JC-1 è stato disciolto in DMSO fino ad 1 mg per ml di soluzione. Quest'ultima è stata ulteriormente diluita in un buffer di piastrine, in assenza di albumina, lo stesso giorno della colorazione. Le piastrine filtrate su gel ($2x10^6$) sono state incubate con 15 µM di JC-1 per 10 minuti, in un ambiente oscuro a temperatura ambiente. Alla fine è stato aggiunto 1 ml di buffer privo di calcio ed i campioni sono stati analizzati immediatamente attraverso un citofluorimetro.

Il JC-1 è un colorante più vantaggioso rispetto alla rodamina ed ad altre carbocianine (capaci di entrare selettivamente nei mitocondri), in quanto cambia reversibilmente il suo colore da verde ad arancione, quando il potenziale della membrana aumenta (sopra valori di circa 80-100mV). Questa proprietà del JC-1 è

dovuta alla formazione reversibile di J-aggregati sulla membrana polarizzata, che causa cambiamenti della luce emessa, da 530 nm (emissione di forme monomeriche di JC-1) a 590 nm (emissione di J-aggregati) quando eccitato a 490 nm. Entrambi i colori possono essere rilevati usando i filtri comunemente montati in tutti i citofluorimetri, in modo che l'emissione verde possa essere analizzata nel canale di fluorescenza 1 (FL1) e l'emissione arancione nel canale 2 (FL2) [35].

Tutte le immagini sono coperte da segnali di fluorescenza verde ed arancione per meglio illustrare i cambiamenti nelle emissioni di JC-1 basati sullo stato di polarizzazione della membrana. Così, i segnali di fluorescenza rossa sono indicativi di membrane polarizzate, mentre le membrane depoalarizzate sono indicate da una fluorescenza verde.

Western Blotting di Caspasi e Calpaina [42]

Dopo il prelievo, le piastrine sono state sonicate in 0,4 ml di un mezzo lisato contenente 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM di fenil-metil sulfonil fluoridro ed un cocktail completo di inibitore proteasi *(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)* usando un sonicatore Ultrasuoni Processore liquido XL *(Heat System- Ultrasonic Inc., NY, USA)*.

Gli omogeneizzati sono stati centrifugati per 5 minuti a 18500 g (a 4°C) ed i sovranatanti sono stati aspirati e conservati a – 80° C fino al momento della loro utilizzazione.

Dopo il mixing con un buffer caricato su gel di sodio-dodecil-solfato e riscaldamento per 4 minuti a 95°C, i campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide sodio-dodecil-solfato e le proteine trasferite su una membrana di nitrocellulosa.

Le macchie sono state bloccate con latte secco non grasso in TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6, più 0,1% Tween-20) e sondate con un anticorpo policlonale anti-caspasi 3, che riconosce la

forma clivata di 17 KDa (1:1000, *Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA*) o con un anticorpo monoclonale pro-caspasi 3/ CPP32 (1:1000, *BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)*.

Gli immunoblots sono stati trattati con perossidasi di rafano coniugata con un anticorpo anti-rabbit o anti-mouse (1:4000) e rivelati usando un aumento di chemiluminescenza *(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).*

Un anticorpo monoclonale contro la β-actina *(1:4000, Sigma, Milan, Italy)* è stato usato come controllo per la proteina caricata su gel.

Rilascio di LDH [43]

La latticodeidrogenasi è stata valutata secondo il metodo di Doery *et al.* in RPS o SPS ed in un sovranatante di PMNs incubati con sovranatanti di piastrine. I valori sono stati espressi come percentuale di un livello enzimatico determinato nel sovranatante di cellule sottoposte a tre cicli di congelamento-scongelamento.

Retrazione del coagulo [44]

Gli esperimenti di retrazione del coagulo sono stati eseguiti secondo il procedimento di *Tuszynski et al.* Il gel filtrato di piastrine ($2x10^8$) è stato pre-incubato a 37°C per 10 minuti con zymosan. I coaguli si sono formati senza mescolamento e sono stati incubati a 37°C per 30 minuti. I tubi sono stati, poi, trasferiti in ghiaccio.

L'avvenuta retrazione è stata determinata attraverso la percentuale di sovranatante rispetto al controllo.

Gli esperimenti di controllo sono i seguenti:

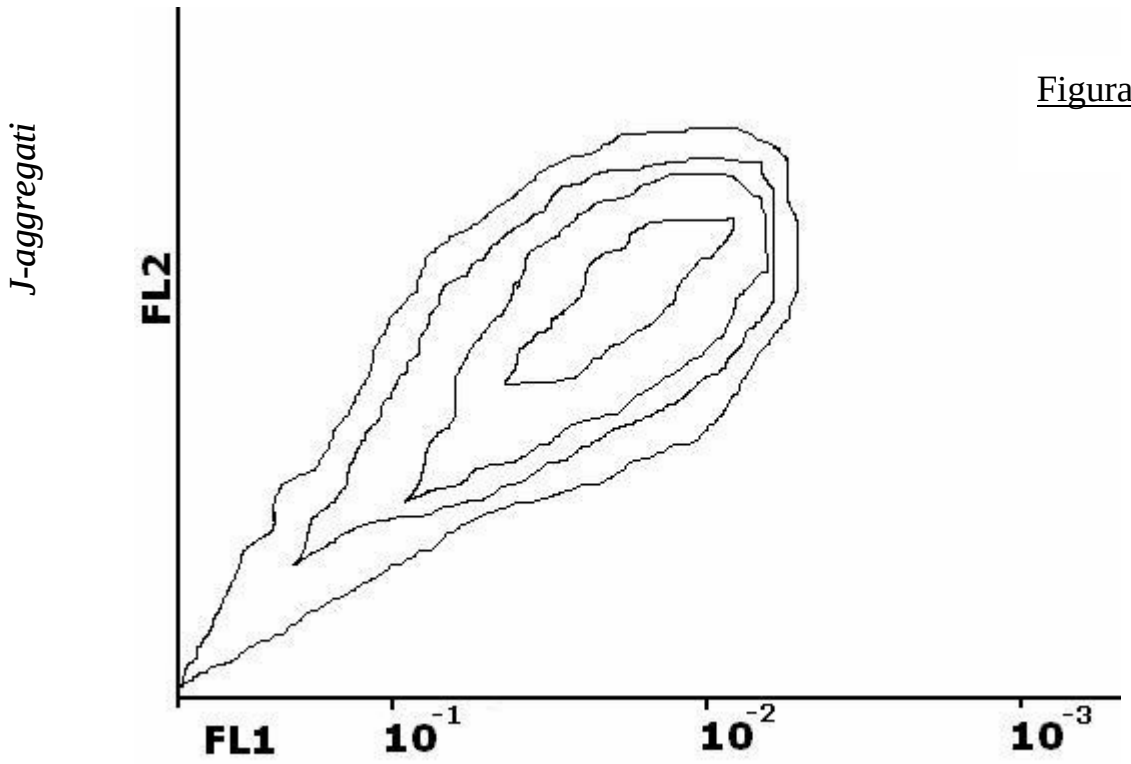
1. aggiunta di trombina alla sospensione piastrinica, senza aggiunta di fibrinogeno (che non conduce alla formazione del coagulo);
2. aggiunta di trombina alla soluzione di fibrinogeno, in assenza di piastrine (che porta alla formazione di un coagulo di fibrina non retratto).

RISULTATI

Lo studio è stato eseguito su piastrine a riposo ed al termine della retrazione del coagulo.

L'opsonizzazione induce nelle piastrine un danno mitocondriale (Figg. 4a e 4b)

Figura 4a



JC-1 Monomeri

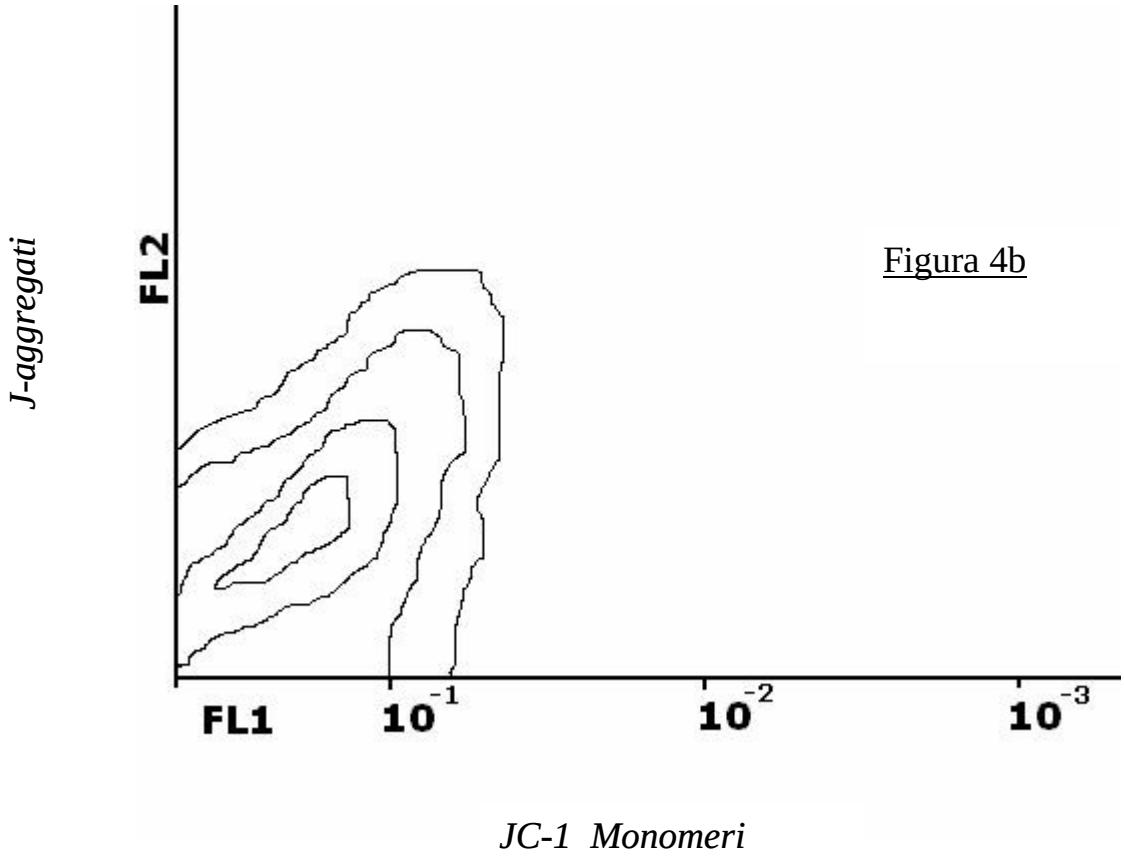


Figura 4b

Infatti, si nota una diminuzione sia della fluorescenza rossa/arancione sia di quella verde, segno di un danno mitocondriale.

Di contro, vi è un aumento della riduzione di MTT (Figg. 5 e 6).

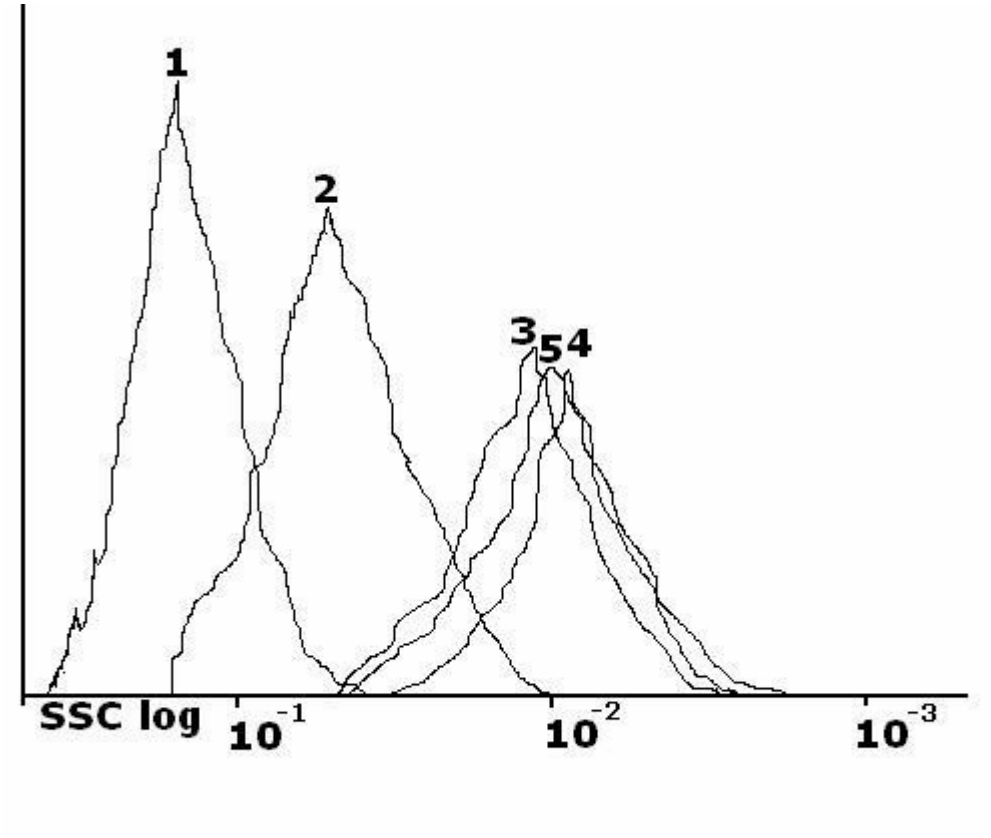


Figura 5:

- curva 1: PLT + MTT
- curva 2: PLT + MTT + Zymosan
- curva 3: PLT + Rotenone + MTT + Zymosan
- curva 4: PLT + Antimicina A + MTT + Zymosan
- curva 5: PLT + Resinferotossina + MTT + Zymosan.

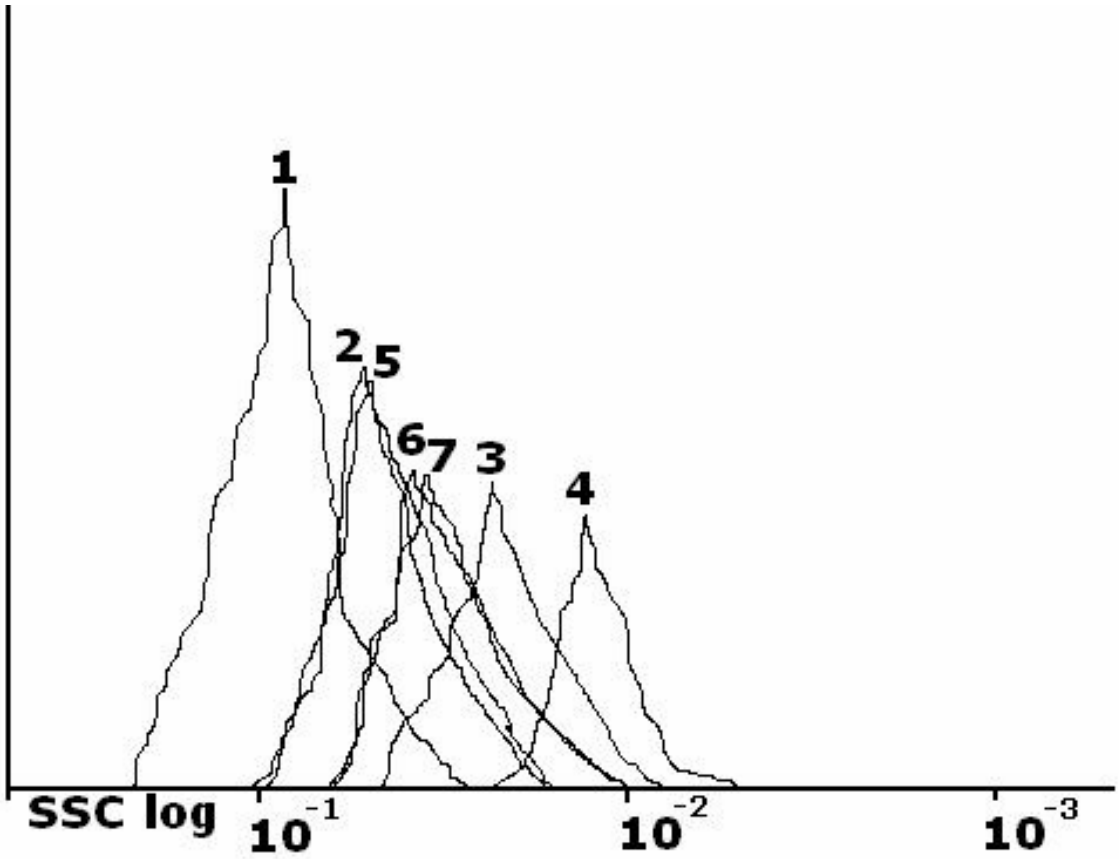


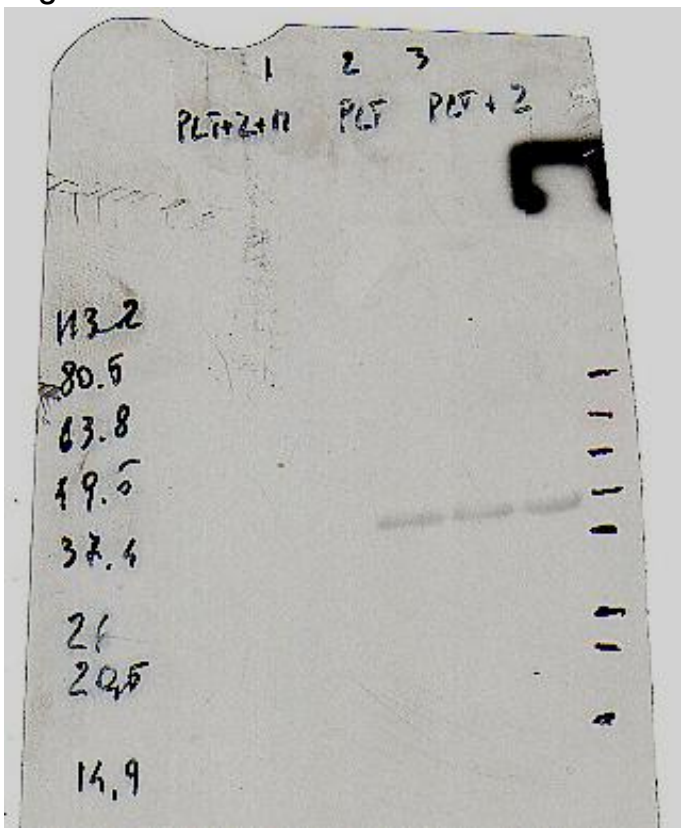
Figura 6:

- curva 1: PLT + MTT
- curva 2: PLT + MTT + Zymosan
- curva 3: PLT + Rotenone + MTT + Zymosan
- curva 4: PLT + Antimicina A + MTT + Zymosan
- curva 5: PLT + Resinferotossina + MTT + Zymosan
- curva 6: PLT + Diidrocapsaicina + MTT + Zymosan
- curva 7: PLT + SOD + MTT + Zymosan.

È interessante notare come l'aggiunta di Rotenone, Antimicina A e Capsaicina aumenti tale riduzione. Non si è, invece evidenziata attivazione di caspasi (Fig. 7).

Mentre, molto precocemente si ha attivazione di calpaina, come già dimostrato per altri agonisti [45,46,47,48].

Figura 7



DISCUSSIONE

L'adesione e l'aggregazione piastrinica sono eventi primari successivi all'attivazione, ma dopo l'aggregazione le risposta tardive continuano per dare origine alla retrazione del coagulo, alla formazione di microvescicole e a cambiamenti di tipo apoptotico. I segnali che conducono a questi processi sono ancora da chiarire.

Noi abbiamo studiato se, nelle piastrine stimolate con zymosan opsonizzato, gli eventi tardivi possano riflettere cambiamenti apoptotici. In realtà, le piastrine mostrano formazione di microvescicole ed esposizione di fosfatidilserina, eventi considerati simil-apoptotici, ed alterazioni dei mitocondri.

È stato dimostrato che lo zymosan attiva le piastrine nel plasma attraverso una via dipendente dal complemento e dal fibrinogeno [38]. L'attivazione di proteine del complemento C5 e C9 genera complessi C5b-7, C5b-8 e C5b-9, denominati complessi terminali. L'unione di questi complessi, sulla membrana plasmatica, induce apoptosi o necrosi, mentre la quantità sub-litica di proteine

influisce sull'attività delle cellule [49,50,38], la quale dipende dall'incremento percentuale dell'afflusso intracellulare di calcio dall'esterno delle cellule.

È opinione ampiamente accettata che la proteolisi di proteine che regolano la sopravvivenza e l'elevato livello intracellulare di calcio possono provocare uno sconvolgimento mitocondriale [32].

Nel nostro studio, per determinare la funzione mitocondriale, abbiamo impiegato un metodo citofluorimetrico, utilizzando un colorante fluorescente, il catione lipofilico JC-1 (5,5-6,6 tetracloro-1,1-3,3 tetraetilbenzimidazolo-carbocianino iodato). Questa molecola esiste in forma monomerica, che emette a 527 nm, dopo eccitazione a 490 nm.

In presenza di un alto potenziale transmembrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$), si formano i cosiddetti J-aggregati, associati con un ampio cambiamento di emissione (590 nm). I J-aggregati danno fluorescenza rossa/arancione, mentre la forma monomerica dà fluorescenza verde. Nelle cellule apoptotiche il decremento del

$\Delta\psi_m$ induce la perdita della fluorescenza rossa/arancione, mentre rimane visibile solo una residua fluorescenza verde.

Nel nostro studio, invece, abbiamo osservato una perdita sia della fluorescenza verde sia di quella rossa/arancione. La possibilità di una perdita cellulare [51,52] è esclusa, in quanto dai nostri esperimenti risulta che lo zymosan opsonizzato aumenta invece la riduzione dell'MTT. Quest'ultimo è un sale di tetrazolio che viene ridotto a formazano dalle cellule viventi [53]. Secondo la visione generalmente accettata, l'MTT è ridotto a formazano nei mitocondri intatti attraverso il sistema della succinato-tetrazolio reduttasi della catena respiratoria o attraverso enzimi extramitocondriali. Il formazano prodotto dalle sospensioni cellulari correla con il numero di cellule viventi metabolicamente attive ed il test colorimetrico per l'MTT viene anche utilizzato come test di proliferazione cellulare, determinando indirettamente la percentuale di cellule vitali; anche la morte cellulare può essere ben quantificata dal test all'MTT. Recentemente, è stato portato a

termine un test colorimetrico basato sul tetrazolio per identificare piastrine vitali a riposo [54].

Per conciliare l'apparente conflitto tra i dati raccolti con lo studio della fluorescenza di JC-1 ed i risultati ottenuti dalla riduzione del sale di tetrazolio, si può ipotizzare che nelle piastrine stimolate con zymosan opsonizzato si verifichi un accumulo anomalo del marcante, eventualmente successivo ad una depolarizzazione della membrana plasmatica. Ciò tuttavia non è verosimile, dal momento che è stato dimostrato che la caduta della depolarizzazione della membrana si verifica molto tardi (dopo almeno 60 minuti) [55].

È stato dimostrato che la riduzione dell'MTT si verifica maggiormente a livello intracellulare in cellule intatte, anche se i cristalli di formazano possono essere rivelati nelle regioni vicine alla membrana plasmatica [56]. È stato recentemente affermato che l'MTT viene ridotto principalmente da enzimi non mitocondriali. In realtà, è stato osservato che molte reduttasi cellulari dell'MTT si

trovano al di fuori dei mitocondri, all'interno della membrana e coinvolgono un meccanismo NAD(P)H dipendente che è insensibile agli inibitori della catena respiratoria. È stato suggerito che questa attività è costituita da una reduttasi NADH:citocromo b5 [57]. Quest'ultima (b5R; EC 1.6.2.2) è una flavoproteina che catalizza il trasferimento di elettroni dal NADH al citocromo b5. Esistono due forme di NADH citocromo b5 reduttasi, localizzate in differenti compartimenti cellulari e coinvolte in diverse vie metaboliche [58]. La forma solubile è rilevata, soprattutto, negli eritrociti di diverse specie, inclusa quella umana, mentre la forma legata alla membrana è presente nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri, nei nuclei e nella membrana plasmatica di cellule somatiche. La forma b5R trasferisce elettroni dal NADH al citocromo b5 legato alla membrana, che a sua volta trasferisce i suoi elettroni a differenti accettori di elettroni delle cellule. È stato perciò suggerito un ruolo di quest'attività enzimatica nei processi redox, dal momento che può regolare il ciclo di parecchi composti. Per esempio, essa

potrebbe mantenere ascorbato e coQ in una forma ridotta ed in questo modo supportare la loro capacità anti-ossidante. L'evidenza che, nelle piastrine stimolate con zymosan opsonizzato, l'opsonizzazione determina la riduzione dell'MTT, insensibile al rotenone, un inibitore della catena respiratoria, potrebbe indicare un ruolo di questi enzimi nel controllo dello stress ossidante. Recentemente, è stato dimostrato che, accanto alla forma classica di citocromo b5 reduttasi, nei tessuti umani è largamente espresso il NCB5OR, che costituisce il primo esempio di flavoproteina contenente citocromo b5 e domini di citocromo b5 reduttasi. Questo enzima riduce il citocromo c, la metaemoglobina, il ferrocianide e l'ossigeno molecolare [59]. È stato inoltre dimostrato che questa nuova NAD(P)H-reduttasi, localizzata nel reticolo endoplasmatico, riduce preferenzialmente i substrati, piuttosto che trasferire elettroni all'ossigeno molecolare [60]. Potrebbe essere interessante indagare se questo enzima giochi un ruolo nelle risposte piastriniche.

La riduzione dell'MTT era insensibile alla SOD, suggerendo in tal modo che la riduzione del marcante si verificava a livello intracellulare. Infatti, è stato dimostrato che una catena di trasporto degli elettroni è localizzata sulla membrana plasmatica di molte cellule, incluse le piastrine, ma l'insensibilità della riduzione dell'MTT alla capsaicina ed alla resinferotossina, inibitori dei chinoni, esclude un ruolo della NADH ossidasi della membrana plasmatica. È stato dimostrato che gli agonisti vanilloidi sono inibitori dell'aggregazione piastrinica e questo effetto è mediato da un'alterazione della fluidità della membrana plasmatica. Questi dati possono spiegare l'aumento della riduzione del tetrazolio, poiché la differente microviscosità della membrana potrebbe condizionare la conformazione dell'enzima o la sua mobilità, modificando l'attività enzimatica.

CONCLUSIONI

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che le piastrine stimolate da un agente immunologico vanno incontro a mitoptosi, ma conservano la vitalità durante gli eventi tardivi, grazie all'attivazione di reduttasi extramitocondriali. Studi recenti hanno sviluppato il concetto di un rimodellamento controllato delle proteine redox come parte del processo di attivazione nelle piastrine. È stato proposto che queste reazioni possano avere un ruolo nell'attivazione cellulare, basata sulla capacità di generare, ridurre e riarrangiare i ponti disolfuro delle proteine 17-23-25. D'altra parte, in questo lavoro dimostriamo che durante gli eventi tardivi dell'attivazione piastrinica vengono stimolate reduttasi intracellulari che verosimilmente giocano un ruolo critico nella difesa contro lo stress ossidativo. Deve essere ricordato che interconnessioni tra reduttasi attivano a loro volta diversi sistemi enzimatici (epossidi, monossigenasi) che sono importanti nel regolare le funzioni cellulari.

Bibliografia

1. Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R. *Mechanisms and functions of cell death.* Annu. Rev. Cell Biology. 1991; 7:398-663.
2. Majno G, Joris I. *Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death.* Am. J. Pathology. 1995; 146:3-15.
3. Van Cruchten S, Van den Broeck. *Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis.* Anat. Histol. Embryol. 2002; 31:214-223.
4. Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. *Cell death: the significance of apoptosis.* Int. Rev. Cytology. 1980; 68:251-306.
5. Cohen J.J., Duke R.C. *Apoptosis and programmed cell death in immunity.* Annual Review Immunology. 1992; 10:267-293.
6. Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. *Mitochondrial control of nuclear apoptosis.* J. Exp. Med. 1996; 183: 1533-1544.
7. Skulachev VP. *Programmed death phenomena: from organelle to organism.* Ann. NY Acad Sci. 2002; 959:214-237.
8. Liu X., Van Vleet T., Schnellmann RG. *The role of calpain in oncotic cell death.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2004; 44:349-370.
9. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. *Platelet-derived exosomes of septic individuals*

possess proapoptotic NAD(P)H oxydase activity: a novel vascular redox pathway. Crit Care Med. 2004; 32(3):818-25.

10. E. Ascari, G. Bonadonna, et al., *Lo studio della funzione piastrinica in laboratorio*. ed Giunti, 1998

11. T.F. Deuel, N.J. Silverman et al., *Platelet derived growth factor: a multifunctional regulator of normal and abnormal cell growth Biofactors* 1988: 1, 213-217.

12. M.E Bolander, *Regulation of fracture repair by growth factors Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*1992: 200, 165-170.

13. N. Koyama, C.E. Hart et al., Different functions of the platelet-derived growth factor-alpha and -beta receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooht muscle cells *Circ. Res.* 1994: 75, 682-691.

14. Weiner, Howard L, The role of growth factor receptor in central nervous system development and neoplasia *Neurosurgery* 1995: 37, 179-193; discussion 193-194.

15. I. Sulzbacker, M. Traxler et al., Platelet- derived growth factor-AA and -alfa receptor expression suggests an autocrine and/or paracrine loop in osteosarcoma *Mod. Pathol.* 2000: 13, 632-637.

16. E. Brandt, F. Petersen et al., The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation *J. Leukoc. Biol.* 2000: 67, 471-478.

17. M. Ringkamp, M. Schmelz et al., Activated human platelets in plasma excite nociceptors in rat skin, in vitro *Neurosci. Lett.* 1994: 170, 103-106.

18. R. Leira, J. Castillo et al., Platelet function in tension headache *Neurologia* 1990: 5, 78-81.

19. P. Sarchielli, A. Alberti et al., Nitric oxide pathway,Ca^{2+} and serotonin content in platelets from patients suffering from chronic daily headache *Cephalalgia* 1999: 19, 810-816.

20. J. Blunk, G. Osiander et al., Pain and inflammatory hyperalgesia induced by intradermal injections of human platelets and leukocytes *Eur. J. Paini* 1999: 3, 247-259.

21. P. Ataliotis, Platelet-derived growth factor A modulates limb chondrogenesis both in vivi and in vitro *Mech. Dev.* 2000: 94, 13-24.

22. K.K. Brown, P.M. Henson et al., Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta2 (DC18) integrins *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1998: 18, 100-110.

23. M. Van der Stelt, A.M. Paoletti et al., The effect of hydroxylation of linoleoyl amides on their cannabinomimetic properties., *FEBS Lett.* 1997: **415**, 313-316.

24. M. Van der Stelt, W.S. Nieuwnehuizen et al., Dioxygenation of *N*-linoleoyl amides by soybean lipoxygenase-I *FEBS Lett.* 1997: **411**, 287-290.

25. G. Van Zadelhoff, G.A. Veldink et al., With anandamide as substrate plant 5-lipoxygenases behave like 11-lipoxygenases *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998: **248**, 33-38.

26. D. Del Principe, A. Menichelli et al., Hydrogen peroxide has a role in the aggregation human platelets *FEBS Lett.* 1985: **185**, 142-146.

27. G.V.R. Born, M.J. Cross, The aggregation of platelets, *J. Physiol*., 1963: **168**, 178-182.

28. J. Tao, B. Rose et al., Variability of the thrombin-and ADP induced- Ca^{2+} response among uman platelets measured using fluo-3 and fluorescent videomicroscpy *Biochim. Biophys. Acta* 1966: **1311**, 164-174.

29. C.J. Hillard, D.M. Wilkinson et al., Characterization of the kinetics and distribution of *N*-arachidonylethanolamine

(anandamide) hydrolisys by rat brain *Biochim. Biophys. Acta* 1995: 1257, 249-256.

30. Tonon G, Luo X, Greco NJ, Chen W, Shi Y, Jamieson GA. *Weak platelet agonists and U46619 induce apoptosis-like events in platelets, in the absence of phosphatidylserine exposure.* Thromb Res. 2002; 107(6):345-50.

31. Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. *The mechanism of apoptosis in human platelets during storage.* Transfusion. 2000; 40(11):1320-9.

32. Wadhawan V, Karim ZA, Mukhopadhyay S, Gupta R, Dikshit M, Dash D. *Platelet storage under in vitro condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton.* Arch Biochem Biophys. 2004; 422(2): 183-90.

33. Richter C, Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. *Control of apoptosis by the cellular ATP level.* FEBS Lett. 1996; 378:107-110.

34. Krysko O., De Ridder L., Cornelissen M. *Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in J cells as evidenced by immunogold labeling tecnique.* Apoptosis. 2004; 9(4):495-500.

35. Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL. *Apoptotic activity in stored human platelets*. Transfusion. 2003 Apr;43(4):526-35.

36. Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. Transfus Apheresis Sci. 2003 Jun;28(3):285-95.

37. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. Br J Haematol. 1997 Dec;99(4):824-31.

38. Spycher MO, Nydegger UE. Participation of the blood platelet in immune reactions due to platelet-complement interaction. Infusionsther Transfusionsmed. 1995 Feb;22(1):36-43.

39. Del Principe D., Menichelli A., Galli E., Persiani M., Perlini R., D'Arcangelo C., Businco L., Rossi P. *Superoxide-Dependent Chemotactic Activity for PMNs Derived from Opsonized Zymosan-Stimulated Human Platelets.* Pediatr. Res. 1982; 16:1000-1003.

40. Huet O., Petit J.M., Ratinaud M.H., Julien R. *NADH-Dependent Dehydrogenase Activity Estimation by Flow Cytometric Analysis of 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-*

diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. Cytometry. 1992; 13:532-539.

41. Cossarizza A. *Measure of Mitochodrial Membrane Potential (Δψ) with the Fluorescent Probe JC-1.* Purdue University Cytometry Laboratories CD-Rom Series, volume 3.

42. Carloni S., Mazzoni E., Balduini W. *Caspase-3 and Calpain activities after acute and repeated ethanol administration during the rat brain growth spurt.* Journal of Neurochemistry. 2004; 89:197-203.

43. Del Principe D., Menichelli A., Di Giulio S., De Matteis W., Giordani M., Pentassuglio A. M., Finazzi-Agrò A. *Stimulated Platelets Release Factor(s) Affecting the In Vitro Response of Human Polymorphonuclear Cells.* Journal of Leukocyte Biology. 1990; 48:7-14.

44. Rooney M.M., Parise L.V. Lord S.T. *Dissecting Clot Retraction and Platelet Aggregation.* The Journal of biological chemistry. 1996; 271:8553-8555.

45. Fox J., Taylor R.G., Taffarel M., Boyles J.K., Goll D.E. *Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa.* J. Cell. Biol. 1993; 120: 1501-1507.

46. Kuboki M., Ishii H., Horie S., Kazawa M. *Procalpain I in cytoplasm is translocated onto platelet and granule*

membranes during platelet stimulation with thrombin and then activated on the membranes. Biochem. Biophis. Res. Commun. 1992; 185: 1122-1127.

47. Saido T.C., Nagao S., Shiramine M., Tsukaguchi M., Sorimachi H., Murofushi H., Tsuchiya T., Ito H., Suzuki K. *Autolytic transformation of μ-calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms.* J. Biochem. 1992; 111: 81-86.

48. Saido T.C., Suzuki H., Yamazaki H., Tanoue K., Suzuki K. *In situ capture of μ-calpain activation in platelets.* J. Biol. Chem. 1993; 268: 7422-7426.

49. Niculescu F, Rus H. Mechanisms of signal transduction activated by sublytic assembly of terminal complement complexes on nucleated cells. Immunol Res. 2001;24(2):191-9.

50. Niculescu F, Niculescu T, Rus H. C5b-9 terminal complement complex assembly on apoptotic cells in human arterial wall with atherosclerosis. Exp Mol Pathol. 2004 Feb;76(1):17-23.

51. Wiedmer T, Sims PJ. Cyanine dye fluorescence used to measure membrane potential changes due to the assembly of complement proteins C5b-9. J Membr Biol. 1985;84(3):249-58.

52. Wiedmer T, Sims PJ. Effect of complement proteins C5b-9 on blood platelets. Evidence for reversible depolarization of membrane potential. J Biol Chem. 1985 Jul 5;260(13):8014-9.

53. David Bernhard, Wolfgang Schwaiger, Roman Crazzolara, Inge Tinhofer, Reinhard Koflera, Adam Csordas. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. Cancer Letters 195 (2003) 193–199

54. Maekawa Y, Yagi K, Nonomura A, Kuraoku R, Nishiura E, Uchibori E, Takeuchi K. A tetrazolium-based colorimetric assay for metabolic activity of stored blood platelets. Thromb Res. 2003 Mar 15;109(5-6):307-14.

55. Cossarizza A., Baccarani Contri M., Kalashnikova G., Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-agrregate forming lipophilic cation 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 197:40-45.

56. Bernas T, Dobrucki JW. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. Arch Biochem Biophys. 2000 Aug 1;380(1):108-16

57. Berridge MV, Ralph SJ, Tan AS, Jeffery K. Changes in cell surface antigens during stem cell ontogeny. Exp Hematol. 1984 Feb;12(2):121-9.

58. Alena Leroux, Luisa Mota Vieira and Axel Kahn. Transcriptional and translational mechanisms of cytochrome b5 reductase isoenzyme generation in humans. Biochem. J. (2001) 355, 529±535

59. Zhu H, Qiu H, Yoon HW, Huang S, Bunn HF. Identification of a cytochrome b-type NAD(P)H oxidoreductase ubiquitously expressed in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 21;96(26):14742-7.

60. Zhu H, Larade K, Jackson TA, Xie J, Ladoux A, Acker H, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J, Cross AR, Lukat-Rodgers GS, Rodgers KR, Bunn HF. NCB5OR is a novel soluble NAD(P)H reductase localized in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):30316-25.