

Pubblicazione Quindicinale dal Vol. I., N. 20 bis
Spedizione e abbonamento postale, Gruppo 7
30 Ottobre 1974

BOLLETTINO DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI BIOLOGIA SPERIMENTALE

*SOTTO L'AUSPICIO
DEL
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE*

*Redazione: Segreteria Generale Soc. It. Biologia Sperimentale -
S. Andrea delle Dame, 8 - 80138 Napoli*

*Amministrazione: Casa Editrice Libreria V. Idelson
Via Alcide De Gasperi, 55 - 80138 Napoli*

Aspetti omeostatici della piastrinemia.

Il tasso piastrinemico tende a rimanere costante in condizioni fisiologiche, per cui la velocità di riproduzione deve essere uguale a quella di distruzione. Poiché molti elementi possono migrare nei tessuti e qui essere distrutti, o attraversare le mucose ed essere perduti con secreti ed escreti, la velocità di riproduzione deve essere tale da regolare anche queste perdite. Infine variazioni artificialmente indotte del tasso delle piastrine circolanti sono seguite entro breve tempo da variazioni che non solo annullano l'incremento o la caduta iniziali, ma possono addirittura sovracompensarli ("rebound thrombocytosis" post trombocitopenica). Questi rilievi suggeriscono l'esistenza di regolazione a feed-back della piastrinemia, forse tramite fattori umorali. Mentre CRADDOCK e Coll. hanno adoperato il plasma di animali resi trombocitopenici o trombocitosici, noi abbiamo saggiato l'effetto delle piastrine lisate. Si sono concentrate $2,09-2,16+3,5-16,85 \times 10^9$ piastrine/ml e se ne sono iniettate 0,8 ml, previa lisi delle piastrine ottenuta per alterno raffreddamento (-30°C) e riscaldamento ($+40^{\circ}\text{C}$), fino a non riscontrare più traccia di piastrine nella sospensione.

Si è poi rapportato il n° di piastrine lisate iniettate al n° totale di piastrine possedute dal ratto recettore, prima dell'iniezione e.v., calcolando pari a 1/20 del p.c. la massa totale di sangue. Le quantità così iniettate variavano dal 15 al 203%; la determinazione della piastrinemia è stata ripetuta dopo 24-48-72-96 ore, con uguali modalità.

I risultati sono stati i seguenti: 1) Le variazioni del tasso piastrinemico sono state di: $-40,4 \pm 22,1$; $-33,9 \pm 27,1$; $-9,8 \pm 33,4$; $+15,3 \pm 35,3$, rispettivamente dopo 24-48-72-96 ore. 2) Le variazioni della piastrinemia dopo 24-48-72-96 ore dall'iniezione sono state funzioni approssimativamente rettilinee del n° di piastrine lisate iniettate. Questi risultati indicano che: a) un fattore responsabile della regolazione a feed-back delle piastrine circolanti si trova nelle piastrine stesse; b) tale fattore liberatosi dalla lisi piastrinica può esercitare il suo effetto sia inibendo la piastrinopoiesi megacariocitica, sia promuovendo la sequestrazione tissutale delle piastrine; c) l'effetto complessivo è dose-dipendente e tende ad esaurirsi già dopo 72 h, quando può essere mascherato da una "rebound thrombocytosis".

Aspetti funzionali del fattore trombocitico regolatore del tasso piastrine- mico.

Il plasma umano normale (SPECTOR: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, **108**, 146) e quello di soggetti trombocitopenici (ABILDGAARD & SIMONE: Scand. Hemat., 1967, **4**, 424; SPECTOR, L.C.; ODELL e Coll. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, **108**, 428; DE GABRIELE & PENINGTON: Brit. J. Hematol., 1967, **13**, 210; SCHULMAN e Coll.: J. Pediatr., 1965, **66**, 604) stimola la trombocitopoiesi (EVATT & LEVIN: J. Clin. Invest., 1969, **48**, 1615; PENINGTON: Brit. Med. J., 1970, **1**, 606). Il fattore umorale è stato ritenuto essere una glicoproteina (LINMAN & PIERRE: J. Lab. Clin. Med., 1963, **62**, 174) o altre plasmaproteine (ABILDGAARD & SIMONE, L.C.; EVATT e Coll.: Blood. J. Hematol., 1972, **40**, 926).

Nella precedente nota si è visto che il lisato piastrinico si comporta come il plasma di soggetti o animali trombocitotici. Per escludere l'eventuale presenza di plasmaproteine abbiamo denaturato il lisato piastrinico per ebollizione a B.M. di acqua per 30' in provette con microrefrigerante a ricaduta e l'abbiamo iniettato con modalità identiche a quelle seguite nell'iniezione di lisato di piastrine. Il liquido, filtrato per filtri di pasta di vetro e riportato al volume di 0,8 ml (corrispondenti a $7,11 \times 10^9$ piastrine/ml), è stato iniettato

I risultati sono stati i seguenti: 1) In tutti gli animali (ratti) il tasso piastrinico cala significativamente nelle prime 24 ore dopo l'iniezione.

2) Detto tasso prende ad aumentare in seguito per riportarsi approssimativamente ai livelli di partenza dopo 72-96 ore dall'iniezione.

Il fattore piastrinico responsabile dell'inibizione della trombocitopoiesi e dell'aumentata sequestrazione tissutale delle piastrine non è evidentemente legato alle proteine né plasmatiche né piastriniche, precipitabili col calore, e non è evidentemente legato alle proteine né plasmatiche né piastriniche, precipitabili col calore, e non è termolabile nelle condizioni predette. Il plasma da solo può similmente abbassare il tasso piastrinico, ma non in tutti gli animali, né per corrispondente entità, senza contare che il suo effetto appare diverso nel tempo. Non è responsabile del predetto andamento neanche l'esperimento in sé (trauma, narcosi, stress), in quanto i ratti ugualmente trattati, ma non iniettati, *tendono* a mostrare un abbassamento modesto del tasso piastrinico. Si può concludere perciò per la natura probabilmente aproteica del fattore trombocitico a regolazione negativa del tasso piastrinico.

Intercorrelazione fra piastrinopoesi ed eritropoesi.

In numerose leucosi acute e nelle ricadute, e quasi sempre nelle mielofibrosi, all'anemia si associa trombocitopenia. Nelle remissioni invece si assiste ad aumento in circolo e delle piastrine e degli eritrociti. HARKER & FINCH (J. Clin. Invest., 1969, **48**, 963) hanno osservato spesso trombocitosi in pazienti anemici per emorragia o sideropenia. E trombocitosi si associa in genere a poliglobulia dopo splenectomia. DE CABRIELE & PENINGTON (Br. J. Hematol., 1967, **13**, 210) rilevarono diminuzione della piastrinemia nei ratti con iperglobulia per trasfusione di eritrociti o permanenza in ipossia. L'eritropoietina al contrario non fa salire il tasso piastrinamico. Nei conigli iniettati con eritropoietina umana o salassati aumenta l'incorporazione di ³⁵S-metionina nelle piastrine (SHREINER & LEVIN: Ciba Found. Symp., 1973, **13**, p. 229).

Nei topi ipossici l'aumento del valore ematocritico si associa alla diminuzione delle piastrine circolanti e ad aumento della loro massa. Evidentemente il numero delle piastrine non è l'unico fattore da far intervenire nella correlazione con il tasso degli eritrociti. L'età delle piastrine e un insieme di altre caratteristiche contribuiscono a modificare la biologia delle piastrine stesse. Se si considera anche il sequestro delle piastrine nella milza e nel polmone, si ha modo di rendersi conto della contraddittorietà dei vari reperti. In ratti sani, iniettati e.v. con lisato piastrinico disciolto in 0,8 ml, corrispondente in quantità assoluta, a $1,68 \div 13,48 \times 10^9$ piastrine/ml, le variazioni medie del tasso eritrocitico sono minime e rientrano nella norma, non presentando nei diversi giorni nessuna significatività.

Il tasso piastrinamico invece varia ampiamente (-40,59%, -33,86%, -9,78%, +15,29%, rispettivamente dopo 24-48-72-96 ore). Né l'iniezione e.v. del lisato piastrinico denaturato al calore, che pur provoca sul tasso di piastrine in circolo variazioni simili a quelle riscontrate nei ratti trattati con lisato non denaturato, né l'iniezione di plasma omologo, né l'esperimento in sé modificano sostanzialmente nel tempo il tasso degli eritrociti circolanti. Si può concludere che il n° degli eritrociti in circolo non è nella stessa misura, né nella stessa direzione, sempre ugualmente influenzato dal tasso piastrinamico.

Tasso leucocitario e trombopenia.

I leucociti esercitano numerose funzioni: hanno citogenesi, attività, funzioni, regolazione dipendenti da molte complesse correlazioni umorali e nervose, in parte correlate con quelle delle piastrine. Nella leucosi mieloide cronica, all'aumento dei granulociti circolanti e diminuzione relativa dei linfociti si accompagna in genere piastrinosi. Viceversa nella forma acuta, all'aumento delle forme immature si accompagna di norma diminuzione del n° delle piastrine. Tutto ciò fa pensare all'esistenza di fattori comuni alla fisiopatologia delle piastrine e dei leucociti. Per verificare l'eventuale correlazione nei ratti iniettati e.v. con lisato di piastrine corrispondente a $1,68 \times 10^9 \div 13,48 \times 10^9$ piastrine, abbiamo determinato il n° dei leucociti nel sangue periferico (autocitometro) e la formula leucocitaria. I risultati sono stati che le variazioni del numero totale dei leucociti, dei linfociti o granulociti non sono state significative e univoche dopo 24-48-72-96 ore. Le variazioni riscontrate sono state indipendenti dalle dosi, tuttavia con le dosi più alte ($=13,48 \times 10^9$) i risultati si invertirono: mentre infatti le variazioni del tasso linfocitario rimangono sempre positive, quelle dei granulociti diventano negative per le quantità più piccole di piastrine lisate, fortemente positive invece per le quantità più grandi di piastrine iniettate; cioè mentre le alte dosi di lisati piastrinici provocano granulocitosi le piccole danno invece granulopenia. Uguale inversione non si rileva per i linfociti. Il lisato piastrinico denaturato col calore induce una granulocitosi tanto più accentuata quanto più tempo passa dall'iniezione. L'andamento del fenomeno è molto più irregolare dopo iniezione del lisato non denaturato. Le variazioni percentuali del tasso dei Linfo+Monociti sono invece caratterizzate da numerose e profonde irregolarità. Se ne può concludere che l'estratto trombocitopenizzante termostabile di piastrine è ostacolato nel suo effetto sul tasso dei granulociti circolanti da componenti (proteici) termolabili e che il suo effetto non si estende al tasso dei Linfo+Monociti circolanti. Ultima caratteristica dell'estratto è quella di non essere dose-dipendente.

Alcuni aspetti del midollo dopo trattamento con il principio trombocitopenizzante piastrinico.

La trombocitosi post-transfusionale si tramuta al 5°-6° giorno in una "rebound thrombocytopenia" (ODELL e Coll.: *Acta Haematol.*, 1967, **38**, 34; EVATT & LEVIN: *J. Clin. Invest.*, 1969, **48**, 1615), considerata espressione di ridotta piastrinopoiesi in quanto cala l'incorporazione nelle piastrine di ^{75}Se -metionina e di $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (SHREINER & LEVIN: *J. Clin. Invest.*, 1970, **49**, 1709; HARKER: *Am. J. Physiol.*, 1970, **218**, 1376). I megacariociti del midollo sono numerosi e più piccoli e i nuclei meno lobulati, soprattutto al 4° giorno della trombocitosi. Nel midollo di ratti normali iniettati e.v. con lisati piastrinici (l.p.) (v. note precedenti) abbiamo visto dopo 96 ore dall'iniezione singola: 1) che la serie eritroide (E) rappresenta in media il $13.28 \pm 7.805\%$ di tutta la popolazione cellulare; che la stessa serie (E) è stata di $10.29 \pm 5.815\%$ nei ratti iniettati e.v. con lisati piastrinici denaturati con il calore; di $13.106 \pm 3.441\%$ nei ratti iniettati e.v. con plasma; e infine di $7.071 \pm 5.512\%$ negli sham-operated.

Il lisato di piastrine non sembra quindi modificare significativamente dopo 96 ore dalla iniezione endovena la quota relativa della popolazione eritroide nel midollo. 2) I granulociti (Gr) hanno rappresentato il $23.215 \pm 7.825\%$ nei ratti iniettati con l.p.; $19.419 \pm 6.816\%$ nei ratti iniettati con l.p. denaturato; $18.512 \pm 4.915\%$ nei ratti iniettati con plasma; $19.829 \pm 5.910\%$ nei ratti sham-operated. Neanche sui granulociti maturi il l.p. ha manifestato effetti significativi. 3) Il rapporto E/Gr è stato di: 0.682 ± 0.68 nei ratti iniettati con l.p.; 0.570 ± 0.309 nei ratti iniettati con l.p. denaturato; $0.736 \pm 0.221\%$ nei ratti iniettati con plasma; 0.379 ± 0.235 nei sham operated. L'unica differenza significativa tra i predetti rapporti è quella fra i ratti iniettati con plasma e gli sham-operated ($0.001 < P < 0.01$). I risultati indicano nel complesso che il l.p. ha forse esaurito dopo 96 h il suo effetto sugli elementi eritroidi e mieloidi maturi del midollo, ovvero che i suoi effetti sono prevalentemente extra-midollari. Occorrono esami più completi e più vasti prima di poterne tirare le ultime conclusioni.