

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ 17^{ΗΣ} ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 1996

ΠΡΟΕΔΡΙΑ ΙΩΑΝΝΟΥ ΠΕΣΜΑΖΟΓΛΟΥ

ΙΑΤΡΙΚΗ.— 'Η 'Επίδραση τοῦ νατρίου στὴν ἐνεργοποίηση τῶν αἱμοπεταλίων, ὑπὸ τοῦ 'Αντεπιστέλλοντος Μέλους κ. Παναγιώτη Γ. 'Ιατρίδη*.

Τὰ αἱμοπετάλια εἶναι μικρὰ ἄχρσα, ἀπύρρηνα πρωτοπλασματικά τεμάχια τῶν μεγακαρυοκυττάρων τὰ ὁποῖα βρίσκονται στὸν μυελὸ τῶν ὀστέων (Wright, 1910). Τὰ αἱμοπετάλια μετὰ τὴν ἐλευθέρωσή των εἰσέρχονται στὴν κυκλοφορία καὶ συμβάλλουν σημαντικά στὴν αἱμόσταση καὶ στὸν μηχανισμό τῆς πήξης τοῦ αἵματος. 'Επίσης μεταφέρουν ἀγγειοκινητικὲς οὐσίες ὅπως ἡ σεροτονίνη, οἱ κατεκολαμίνες, ἡ θρομβοξάνη (Ellis καὶ συνεργάτες, 1976), καθὼς καὶ αὐξητικούς παράγοντες ποὺ συμβάλλουν στὴν ἀρτηριοσκλήρυνση (Ross καὶ Glomset, 1976) καὶ ἐπιτείνουν τὴν μετάσταση κακοήθων ὄγκων (Hilgard, 1973).

Κατὰ τὴν διάρκεια τοῦ μηχανισμοῦ τῆς αἱμόστασης, μετὰ τὸν τραυματισμὸν ἐνὸς ἀγγείου καὶ τῆς λύσης τῆς συνέχειας τοῦ τοιχώματός του, ὁ μηχανισμὸς τῆς πήξης τοῦ αἵματος καὶ ἡ συνάθροιση καὶ συγκόλληση τῶν αἱματοπεταλίων συμβάλλουν στὴν διακοπὴ τῆς αἱμορραγίας (Wintrobe, 1993, Vermyless, 1978). 'Η ἄμεση ἀγγειοσυστολὴ καὶ ἡ δημιουργία τοῦ αἱμοπεταλιακοῦ ἐμβόλου ἀποτελοῦν τὴν πρωτογενῆ αἱμόσταση (Zucker, 1974, Chen καὶ Tsai, 1948). Κατὰ τὴν πρωτογενῆ αἱμόσταση τὰ αἱμοπετάλια προσκολλοῦνται καὶ συναθροίζονται στὸ τοίχωμα τοῦ τραυματισμένου ἀγγείου (Bizzozero, 1882). 'Ο μηχανισμὸς αὐτὸς τῆς συνάθροισης τῶν αἱμοπεταλίων χαρακτηρίζεται ἀπὸ μιὰ σειρά ἐπαλλήλων ἀντιδράσεων, ποὺ ξεκινᾷ ἀπὸ τὸ ἐρέθισμα τῶν αἱμοπεταλίων καὶ στὴν συνέχεια τὴν ἐνεργοποίησι, συστολὴ, καὶ ἔκκριση τῶν ἐνδοαἱμοπεταλιακῶν κοκκίων. 'Ετσι ὁλοκληρώνεται ὁ κύκλος τῆς αἱμοπεταλιακῆς λειτουργίας (White καὶ συνεργάτες, 1974).

'Η προσκόλλησι τῶν αἱμοπεταλίων στὸ τοίχωμα τοῦ ἀγγείου ἐπιτυγχάνεται μὲ τὴν ἀλληλοεπίδραση μεταξὺ τῆς αἱμοπεταλιακῆς μεμβρανικῆς γλυκοπρωτεΐνης Ib (Olson καὶ συνεργάτες, 1983) καὶ τοῦ πλασματικοῦ παράγοντα von Wil-

* PANAYOTIS G. IATRIDIS, *The effects of sodium on platelet activation.*

lebrand (Weiss, 1980). 'Αφού τὰ αίμοπετάλια ενεργοποιηθούν από τὸ κολλαγόνο τοῦ τοιχώματος τοῦ ἀγγείου ἢ ἀπὸ τὸ ADP ποὺ ἐλευθερώνουν τὰ ἐρυθρὰ αίμοσφαίρια (Marr καὶ συνεργάτες, 1965) ἢ ἀπὸ ὑπενδοθηλιακοὺς συνδετικούς ἰστούς (Hounour καὶ Mitchell, 1976), συναθροίζονται καὶ συγκολλοῦνται μεταξύ τους. Ὑπὸ τὴν ἐπίδραση τῶν ἰόντων ἀσβεστίου ἢ γλυκοπρωτεΐνη IIb καὶ τὸ σύμπλεγμα IIIa τῆς αίμοπεταλιακῆς μεμβράνης, ἀλληλοαντιδροῦν μὲ τὸ ἰνωδογόνο (Bennett καὶ Villaire, 1979, Nachman καὶ Leung, 1982) καὶ τὴν θρομβοσπονδίνη τοῦ πλάσματος (Jaffe καὶ συνεργάτες, 1982) καὶ προκαλοῦν τὴν συνάθροιση καὶ συγκόλληση τῶν αίμοπεταλίων.

Κατὰ τὴν διάρκεια τῆς συγκόλλησης τὰ αίμοπετάλια ενεργοποιοῦνται, ἀλλάζουν σχῆμα ἀπὸ δισκοειδῆ σὲ μικρὰ σφαιρίδια. Στὸ ἐσωτερικὸ τῶν αίμοπεταλίων τὰ ὄργανίδια ποὺ ἀποθηκεύουν διάφορες οὐσίες συγκεντρώνονται στὸ κέντρο τῶν αίμοπεταλίων καὶ περιβάλλονται ἀπὸ ἓνα δακτύλιο ἀκτινομουσίνης καὶ μικροσωληναρίων (White, 1968). 'Επίσης ἡ πυκνότης τοῦ ἐνδοαίμοπεταλιακοῦ ἀσβεστίου αὐξάνει καὶ προκαλεῖ μιὰ σειρά ἐνεργειῶν ποὺ συμβάλλουν στὴν περαιτέρω ενεργοποίηση τῶν αίμοπεταλίων ὅπως ἡ φωσφοριλίωση τῆς μυοσίνης καὶ ἡ κινητοποίηση τοῦ ἐλεύθερου ἀραχιδονικοῦ ὀξέος ἀπὸ τὰ φωσφολιπίδια τῆς αίμοπεταλιακῆς μεμβράνης.

Ἡ ἀλλαγὴ τοῦ σχήματος τῶν αίμοπεταλίων συμβάλλει στὴν διάχυση τῶν ἐνδοαίμοπεταλιακῶν κοκκίων (Grette, 1962, Day καὶ Holmsen, 1971) καὶ τὴν ἐλευθέρωση διαφόρων αίμοπεταλιακῶν οὐσιῶν ὅπως τὸ ADP, ἀσβέστιο, σεροτονίνη, κατεκολαμίνες, PAF (ἐνεργοποιὸς παράγοντας τῶν αίμοπεταλίων), αὐξητικούς παράγοντες καὶ φωσφολιπίδια. Τὸ ἐλευθερούμενο αίμοπεταλιακὸ ADP ενεργοποιεῖ μεταξύ ἄλλων τὶς αίμοπεταλιακὰς προσταγλανδίνες μὲ τελικὸ σχηματισμὸ τῆς θρομβοξάνης (TXA₂), ἡ ὁποία συναθροίζει καὶ συγκολλᾷ περισσότερα αίμοπετάλια, συμβάλλοντας στὴν αὐξηση τοῦ αίμοπεταλιακοῦ ἐμβόλου καὶ στὴν περαιτέρω πρόκληση τῆς ἐξαγγείωσης τοῦ αἵματος. Τὰ ἐλευθερούμενα φωσφολιπίδια συμβάλλουν στὸν μηχανισμό τῆς πήξης τοῦ αἵματος καὶ τῆς δημιουργίας μὴ διαλυτοῦ δικτύου ἰνώδους ποὺ περιβάλλει καὶ σταθεροποιεῖ τὸ πρωτογενὲς αίμοπεταλιακὸ ἔμβολο.

Ἀπὸ τὰ διάφορα ἰόντα ποὺ ἐπιδροῦν στὴν λειτουργία τῶν αίμοπεταλίων, τὸ ἀσβέστιο ἔχει μελετηθῇ τὸ περισσότερο. Ἐπὶ πλέον τὸ νάτριο ἔχει ἐπίσης μελετηθῇ καὶ διάφοροι ἐρευνητὲς ἀπέδειξαν τὴν ὑπαρξὴ σημαντικοῦ ρόλου τοῦ νατρίου στὴν λειτουργία τῶν αίμοπεταλίων. Τὸ 1977 ὁ Feinberg καὶ συνεργάτες ἀπέδειξαν γιὰ πρώτη φορὰ τὴν σχέση νατρίου καὶ αίμοπεταλιακῆς λειτουργίας. Οἱ ἐν λόγω ἐρευνητὲς ἀπέδειξαν ὅτι κατὰ τὴν διάρκεια τῆς συνάθροισης τῶν αίμοπεταλίων λαμ-

βάνει χώρα αύξηση της διακίνησης του έξωκυτταρικού νατρίου εντός του αίμοπεταλίου. Άλλοι έρευνητές (LeBreton and Feinberg, 1974, Massini and Luscher, 1974) διεπίστωσαν ότι κατά την διάρκεια της ένεργοποίησης των αίμοπεταλίων με ADP δέν υπήρχε διακίνηση του άσβεστίου στο αίμοπετάλιο. Σε πειράματα, όπου ή με ADP συνάθροιση των αίμοπεταλίων άναστέλλετο με την άφαίρεση του άσβεστίου του πλάσματος με EDTA, ή άλλαγή του σχήματος των αίμοπεταλίων έπιτελειτό με την δακίνηση του έξωκυτταρικού νατρίου εντός των αίμοπεταλίων. Όταν ή άλλαγή σχήματος έξουδετερώνεται με την προσταγλανδίνη PGE₂, ή ένδοδιακίνηση του νατρίου έπίσης άναχαιτίζετο (Sandler και συνεργάτες, 1980). Επίσης οί αύτοι έρευνητές παρατήρησαν ότι κατά την διάρκεια της συνάθροισης των αίμοπεταλίων με έπινεφρίνη ή με βαζοπρεσσίνη, δέν διαπιστώθηκε διακίνηση του νατρίου εντός των αίμοπεταλίων.

Οί Sandler και συνεργάτες (1980) άνακοίνωσαν ότι με την προσθήκη Βεραπαμίλης (άναστολέας της ένδοδιακίνησης του άσβεστίου) ή Άμελορίδης (άναστολέας της ένδοδιακίνησης του νατρίου) για την έξουδετέρωση της διακίνησης άφ' ένός του άσβεστίου και άφ' έτέρου του νατρίου εντός των αίμοπεταλίων, ή συνάθροιση των αίμοπεταλίων άναστέλλετο. Τα αίμοπετάλια με Βεραπαμίλη δέν συναθροίζοντο με την προσθήκη της έπινεφρίνης ένώ παρουσίασαν κανονική συνάθροιση με την προσθήκη του ADP (LeBreton and Feinberg, 1974). Από την άλλη μεριά όμως ή Άμελορίδη έξουδετέρωνε την με ADP συνάθροιση των αίμοπεταλίων και την ένδοδιακίνηση του νατρίου. Τα έν λόγω πειράματα καθιστούν έμφανές ότι ή διακίνηση του νατρίου εντός των αίμοπεταλίων συμβάλλει στην ένεργοποίηση των αίμοπεταλίων με ADP ένώ ή ένεργοποίηση των αίμοπεταλίων με την έπινεφρίνη χρειάζεται ιόντα άσβεστίου.

Οί Ίατριδής και Ling-Indeck (1986) άπέδειξαν ότι τó ιονοφόρο του νατρίου Μονενσίνη έπαυζάνει την συνάθροιση των αίμοπεταλίων και την σύνθεση της αίμοπεταλιακής TXA₂ υπό την επίδραση μικρών ποσοτήτων έπινεφρίνης, νορεπινεφρίνης, κολλαγόνου και A23187 (ιονοφόρο του άσβεστίου). Επίσης οί αύτοι έρευνητές άπέδειξαν ότι ή Άμελορίδη έξουδετέρωνε την συνάθροιση των αίμοπεταλίων και την σύνθεση της TXA₂ υπό την επίδραση φυσιολογικών ποσοτήτων έπινεφρίνης, νορεπινεφρίνης, κολλαγόνου και A23187.

Οί Connolly και Limbird (1983a) και οί Motulsky και Insel (1983) υπέθεσαν ότι τó νάτριο συμβάλλει στην ά-άδρενεργική ένεργοποίηση των αίμοπεταλίων. Οί αύτοι έρευνητές άπέδειξαν ότι ή συνάθροιση των αίμοπεταλίων με έπινεφρίνη έξαρτάται από την παρουσία νατρίου στο πλάσμα ένώ ή συνάθροιση των αίμοπεταλίων με θρομβίνη είναι άνεξάρτητη από την παρουσία ή μή νατρίου στο πλάσμα.

Για την επιβεβαίωση των ανωτέρω οι αυτοί έρευνήτες μεταχειρίστηκαν Μονεν-σίνη (ιονοφόρο του νατρίου) ή ούαβαίνη (γλυκοσίδη που αναστέλλει την ένδοδιακίνηση του νατρίου), για να αποδείξουν την σχέση της επινεφρινικής δράσης επί του α - α δρενεργικού υποδοχέα.

Οι Connolly και Limbird (1983b) έμελέτησαν περαιτέρω την δράση του νατρίου στην ενεργοποίηση των αίμοπεταλίων με επινεφρίνη, ADP και μικρές ποσότητες θρομβίνης κατά την διφασική συνάθροιση των αίμοπεταλίων. 'Απέδειξαν ότι ή επίδραση του νατρίου αφορά την δεύτερη φάση της αίμοπεταλιακής συνάθροισης ή όποια όφειλεται στην έλευθέρωση της TXA₂. Οι 'Ιατρίδης και Ling-Indeck (1986) έμελέτησαν την δράση του νατρίου κατόπιν ραδιοανοσοδοκιμασίας της TXA₂ κατά την διάρκεια της συνάθροισης των αίμοπεταλίων μετά προσθήκης Μονενσίνης (ιονοφόρο του νατρίου) και μικρές ποσότητες αίμοπεταλιακών αγωνιστών. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι ή αύξηση της πρόσληψης του νατρίου με την βοήθεια της Μονενσίνης, αυξάνει την σύνθεση της TXA₂ ενώ ή προσθήκη 'Αμελορίδης (άνταγωνιστή της πρόσληψης του νατρίου) αναστέλλει την σύνθεση της TXA₂.

Το 1985 οι Sweatt και συνεργάτες απέδειξαν ότι ή έλευθέρωση του άραχιδονικού όξέος αναστέλλετο όταν το νάτριο αφαιρείτο από το έξωτερικό περιβάλλον των αίμοπεταλίων. Οι αυτοί έρευνήτες απέδειξαν ότι ή ενεργοποίηση του μηχανισμού ανταλλαγής του έξωκυτταρικού νατρίου με το ένδοκυτταρικό ύδρογόνο συμβάλλει στην έλευθέρωση του άραχιδονικού όξέος κατά την αίμοπεταλιακή ενεργοποίηση με επινεφρίνη, ADP ή με θρομβίνη. Όταν το pH είναι όξινό μεταξύ 7.3 και 6.8, ή έλευθέρωση του άραχιδονικού όξέος με επινεφρίνη αναστέλλετο. Οι Sweatt και συνεργάτες (1986 α,β) και Banga και συνεργάτες (1986) έπρότειναν ότι ή επινεφρίνη και το ADP χρειάζονται την ανταλλαγή του έξωκυτταρικού νατρίου με το ένδοκυτταρικό ύδρογόνο για την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂. 'Η σύνθεση των προσταγλανδινικών ένδοπεροξειδίων και της TXA₂ οδηγούν στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (Banga και συνεργάτες, 1986).

'Ο Brass (1984) έμελέτησε την επίδραση της βαθμίδωσης του νατρίου στην όμοιόσταση του άσβεστίου στα μη ενεργοποιημένα αίμοπετάλια. Το αντίκειμενο της μελέτης ήταν ή διαλεύκανση του κατά πόσον ή ανταλλαγή του έξωκυτταρικού νατρίου με το ένδοκυτταρικό άσβέστιο έπιδρά στην όμοιόσταση του άσβεστίου στα αίμοπετάλια. Τα έρευνητικά άποτελέσματα του εν λόγω έρευνητή έδειξαν ότι ή ανταλλαγή του νατρίου με το άσβέστιο δέν άποτελεί τον κύριο παράγοντα στην ένδοδιακίνηση του άσβεστίου.

Οι Zavieso και συνεργάτες (1986) απέδειξαν ότι ή ένδοδιακίνηση του καλίου στα κύτταρα έπηρεάζει την πυκνότητα του ένδοκυτταρικού ύδατος. Όπως σε όλα

τὰ εὐκαρυωτικά κύτταρα, τὰ αἰμοπετάλια περιέχουν κάλιο (Cooley καὶ Cohen, 1967, Kiem καὶ συνεργάτες, 1979, Gorodetsky καὶ Marx, 1990). Οἱ Marx καὶ συνεργάτες (1992) ἀπέδειξαν ὅτι ὁ ὅγκος τῶν αἰμοπεταλίων ρυθμίζεται ἀπὸ τὴν ἀντλία τοῦ νατρίου/καλίου ATPase. Οἱ αὐτοὶ ἐρευνητὲς ἀπέδειξαν πειραματικά ὅτι ἡ ἀναστολὴ τῆς ἀντλίας τοῦ νατρίου/καλίου ATPase μὲ οὐαβαίνη συντελεῖ στὴν αὐξηση τοῦ ἐνδοαίμοπεταλιακοῦ ὕδατος καὶ κατὰ συνέπεια στὴν αὐξηση τοῦ μέσου ὅγκου τῶν αἰμοπεταλίων. Ἐπίσης ἡ οὐαβαίνη προκαλεῖ μεγαλύτερη ἔκφραση τοῦ ὑποδοχέα τοῦ ἰνωδογόνου (GPIIb) στὴν ἐπιφάνεια τῶν αἰμοπεταλίων ποὺ ὁδηγεῖ σὲ μικροσυναθροίσεις τῶν αἰμοπεταλίων καὶ αὐξημένη δράση τοῦ ADP. Ὁ Finnotti (1992) ἀπέδειξε ὅτι ἡ μεμβρανικὴ νάτριο/κάλιο ATPase ἀντιδρᾷ διαφορετικὰ κατὰ τὴν ἐνεργοποίηση τῶν αἰμοπεταλίων μὲ θρουψίνη ἢ θρομβίνη, διότι ὑπάρχουν διαφορετικοὶ ὑποδοχεῖς γιὰ κάθε μία ἀπὸ τὶς ἐν λόγω πρωτεΐνες. Κατὰ συνέπεια ἡ ἐνεργοποίηση τῶν αἰμοπεταλίων εἶτε μὲ θρομβίνη εἶτε μὲ θρουψίνη ἐπιτυγχάνεται διὰ μέσου τῆς μεμβρανικῆς νάτριο/κάλιο ATPase.

Ἀπὸ ὅσα παραθέσαμε παραπάνω εἶναι φανερό ὅτι τὸ νάτριο εἶτε σὰν νάτριο/κάλιο ATPase εἶτε σὰν ἐλεύθερο νάτριο συμβάλλει ἐνεργὰ στὴν ἐνεργοποίηση τῆς καθόλου λειτουργίας τῶν αἰμοπεταλίων.

Ἔως προσφάτως ὁ μηχανισμὸς τῆς δράσης τοῦ νατρίου στὰ αἰμοπετάλια δὲν ἦταν γνωστός. Ὑποθέσαμε ὅτι ἓνας τρόπος δράσης τοῦ νατρίου εἶναι ἡ πιθανὴ αὐξηση τῆς πυκνότητας τοῦ ἐνδοαίμοπεταλιακοῦ ἀσβεστίου $[Ca^{++}]_i$.

Σὲ μιὰ σειρὰ πειραμάτων μελετήσαμε τὴν ἐνδοαίμοπεταλιακὴ πυκνότητα τοῦ ἀσβεστίου μὲ Quin-2, φθοριοῦχο ἐλεγκτὴ (Tsien, 1980), σύμφωνα μὲ τὴν μέθοδο τοῦ Rink καὶ συνεργάτες (1982), κατόπιν προσθήκης διαφόρων πυκνοτήτων Μο-νενσίνης (ιονοφόρο νατρίου) καὶ A23187 (ιονοφόρο ἀσβεστίου) στὸ ἐξωκυτταρικοῦ ὑγρὸ (buffer) τοῦ αἰμοπεταλιακοῦ αἰωρήματος. Τὸ πλούσιο σὲ αἰμοπετάλια πλάσμα ἐπιδόθηκε γιὰ 30 λεπτά μὲ 20 mM Quin-2 σὲ 37° C (Rink καὶ συνεργάτες 1982). Μετὰ τὴν ἐπώαση, τὸ πλούσιο σὲ αἰμοπετάλια πλάσμα ἐχωρίζετο σὲ δείγματα τῶν 5 ml τὸ καθένα. Σὲ κάθε δείγμα προσετίθετο 50ml EGTA. Τὰ δείγματα ἐφυγοκεντροῦντο σὲ 400 xg γιὰ 15 λεπτά σὲ 22° C. Τὸ ὑπερκείμενο πτωχὸ σὲ αἰμοπετάλια ἀφαιρεῖτο καὶ στὸ αἰμοπεταλιακὸ ἔζημα προσετίθετο 5ml HEPES-Tyrode buffer pH 7.4 σὲ 37° C (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.5 mM Na₂ HPO₄, 5 mM γλυκόζης καὶ 10 mM HEPES). Τὸ τελικὸ ἐναιώρημα τῶν αἰμοπεταλίων περιεῖχε $1-1,5 \times 10^8$ αἰμοπετάλια σὲ κάθε κυβικὸ ἑκατοστό. Ἡ ἐξωκυτταρικὴ πυκνότητα τοῦ ἀσβεστίου ἐρυθμίζετο μὲ τὴν προσθήκη 15 ml CaCl₂ (100 mM) σὲ κάθε αἰμοπεταλιακὸ ἐναιώρημα 5 λεπτά πρὶν τὴν καταμέτρηση τοῦ ἐνδοκυτταρικοῦ ἀσβεστίου (Hallam καὶ συνεργάτες, 1984a,b).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

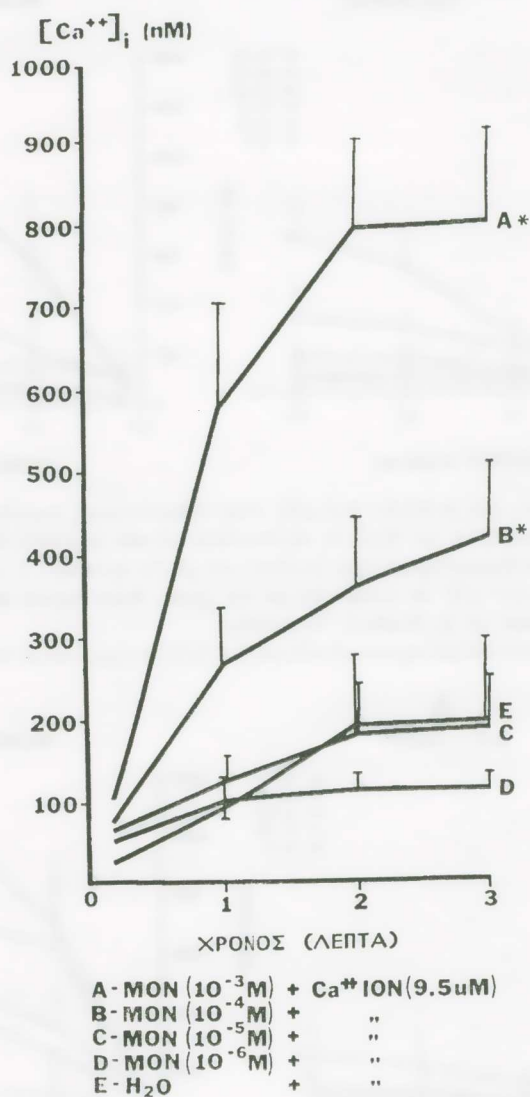
Όπως είναι όρατο (εικόνα 1), η προσθήκη διαφόρων ποσοτήτων Μονενσίνης και κάτω του όριου ποσότητες A23187 (ιονοφόρο άσβεστίου), σαφώς αύξανε την ένδοαιμοπεταλιακή πυκνότητα του άσβεστίου σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η προσθήκη 10-3M (A) και 10-4M (B) Μονενσίνης παρουσίαζε την μεγαλύτερη αύξηση του ένδοκυτταρικού άσβεστίου, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική.

Η εικόνα 2 παρουσιάζει αποτελέσματα από πειράματα, όπου διάφορες πυκνότητες του νατρίου (145, 125, 100, 45, 25 και nM) περιείχοντο στο έξωκυτταρικό υγρό (buffer) του αίμοπεταλιακού αίωρήματος. Όπως είναι καταφανές, η ένδοαιμοπεταλιακή πυκνότητα του άσβεστίου εξαρτάτο από την έξωκυτταρική πυκνότητα του νατρίου. Η προσθήκη Μονενσίνης συγχρόνως με A23187 (εικόνα 2-B) αύξανε προοδευτικά την ένδοαιμοαιμοπεταλιακή πυκνότητα του άσβεστίου σε συνάρτηση με τον χρόνο. Στον μάρτυρα ή προσθήκη ύδατος και A23187 (εικόνα 2-A) δεν παρουσίαζε σημαντική αύξηση του ένδοαιμοπεταλιακού άσβεστίου σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Διάφορες πυκνότητες άσβεστίου (750, 500, 250, 125, και 0nM) περιείχοντο στο έξωκυτταρικό υγρό (buffer) του αίμοπεταλιακού αίωρήματος (εικόνα 3). Η προσθήκη Μονενσίνης και A23187 (εικόνα 3-B) αύξανε σημαντικά, σε συνάρτηση με τον χρόνο, την πυκνότητα του ένδοαιμοπεταλιακού άσβεστίου όταν η έξωκυτταρική πυκνότητα του άσβεστίου ήταν 750 ή 500 nM. Στον μάρτυρα ή προσθήκη ύδατος και A23187 (εικόνα 3-A) δεν προκάλουσε αύξηση του ένδοαιμοπεταλιακού άσβεστίου σε συνάρτηση με τον χρόνο.

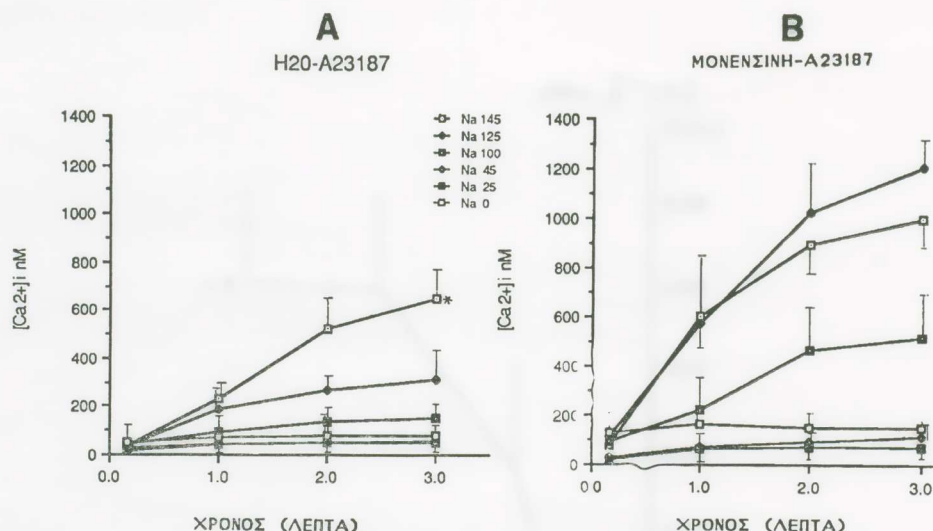
Όπως είναι γνωστό, η ούαβαίνη αναστέλλει την διακίνηση του νατρίου στα αίμοπετάλια. Σε μια σειρά πειραμάτων (εικόνα 4) σε έκτεθειμένα ή μη σε ούαβαίνη αίμοπετάλια, η ένδοαιμοπεταλιακή πυκνότητα του άσβεστίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, ελαττώνετο σημαντικά υπό την επίδραση της μονενσίνης και ύδατος (εικόνα 4Γ), ή A23187 και ύδατος (εικόνα 4Α). Η σύγχρονη επίδραση της μονενσίνης και του A23187 (εικόνα 4Β), δεν ελάττωνε σημαντικά, σε συνάρτηση με τον χρόνο, την ένδοαιμοπεταλιακή πυκνότητα του άσβεστίου στα έκτεθειμένα σε ούαβαίνη αίμοπετάλια.

Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι η πυκνότης του ένδοαιμοπεταλιακού άσβεστίου εξηρτάτο από την πυκνότητα της Μονενσίνης (ιονοφόρο του νατρίου) και κατά συνέπεια του βαθμού διακίνησης του νατρίου εντός των αίμοπεταλίων. Η εικόνα 5 παρουσιάζει σχηματικά την δράση της ένδοδιακίνησης του νατρίου στα αίμοπετάλια και την πιθανή αύξηση της ένδοαιμοπεταλιακής πυκνότητας του άσβεστίου ή οποία συμβάλλει στην αύξηση της σύνθεσης της θρομβοζάνης. Η αύξηση της



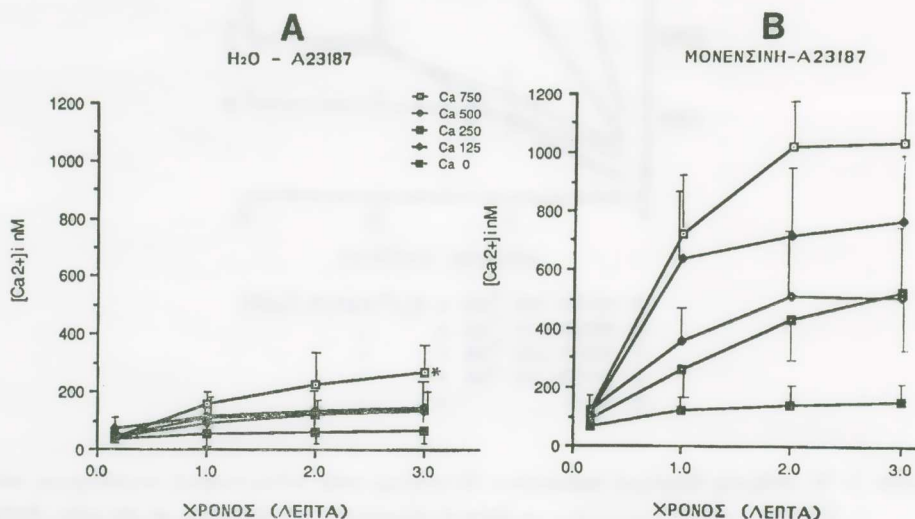
Εικόνα 1: 'Η επίδραση διαφόρων πυκνοτήτων Μονενσίνης στην ένδοκυτταρική συγκέντρωση του άσβεστίου στα έμπλουτισμένα με Quin-2 αίμοπετάλια σε συνάρτηση με τόν χρόνο. Κάθε σημείο αποτελεί τόν μέσο όρο 5 πειραμάτων με \pm Σταθερή 'Απόκλιση.

* Δηλώνει στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,01$) συγκριτικά με τόν μάρτυρα (E).



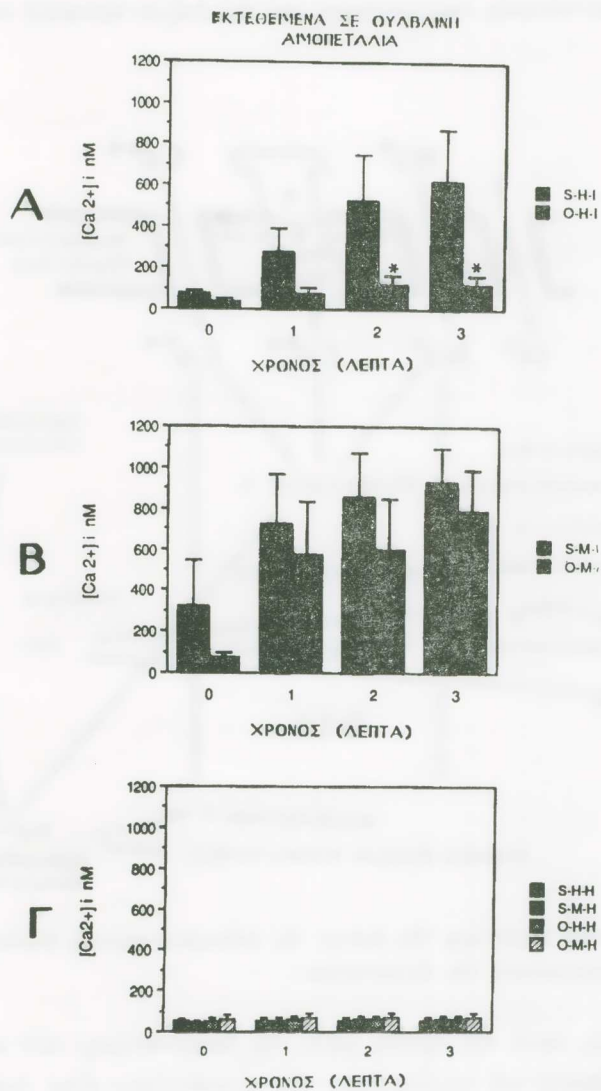
Εικόνα 2: Η επίδραση του A-23187 (9.5 μ M) στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του άσβεστίου στα εμπλουτισμένα με Quin-2 αίμοπετάλια με την παρουσία διαφόρων πυκνοτήτων νατρίου στο εξωκυτταρικό υγρό (buffer) και με την προσθήκη ή (Α) H₂O ή (Β) Μονενσίνης (1×10^{-4} M) σε συνάρτηση με τον χρόνο. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο 5 πειραμάτων με \pm Σταθερή Απόκλιση.

* Δηλώνει στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,01$) συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα.



Εικόνα 3: Η επίδραση του A-23187 (9.5 μ M) στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση του άσβεστίου στα εμπλουτισμένα με Quin-2 αίμοπετάλια με την παρουσία διαφόρων πυκνοτήτων άσβεστίου στο εξωκυτταρικό υγρό (buffer) και με την προσθήκη ή (Α) H₂O ή (Β) Μονενσίνης (1×10^{-4} M) σε συνάρτηση με τον χρόνο. Κάθε σημείο αποτελεί τον μέσο όρο 5 πειραμάτων με \pm Σταθερή Απόκλιση.

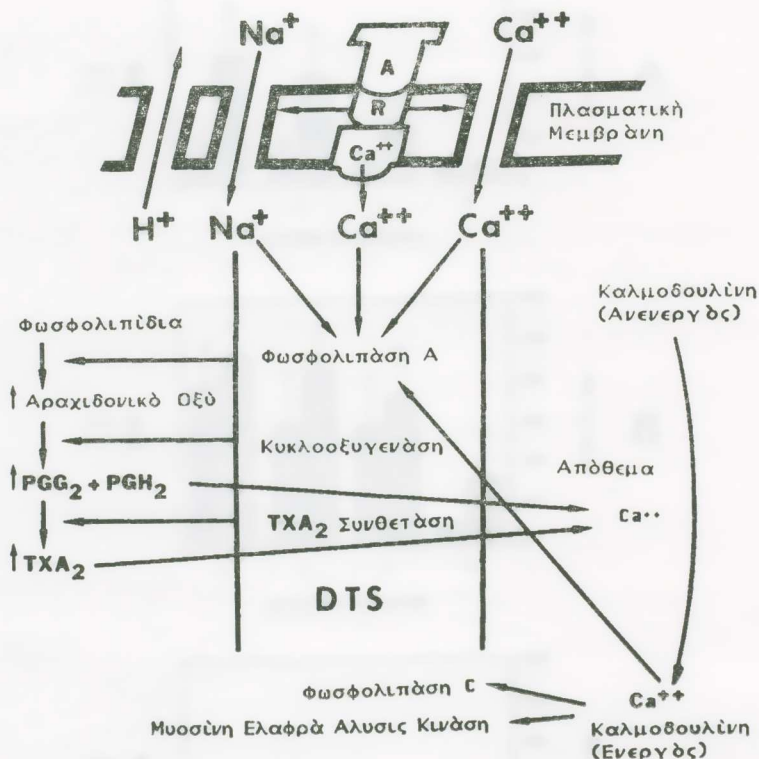
* Δηλώνει στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,01$) συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα.



Εικόνα 4: Συγκριτικά ιστοδιαγράμματα της ενδοαιμοπεταλιακής πυκνότητας του ασβεστίου σε εκτεθειμένα σε ούαβαίνη αιμοπετάλια μετά την προσθήκη (Α) ύδατος και A23187 (9,5 μ M), (Β) Μονενσίνη και A23187, και (Γ) ύδατος και Μονενσίνη (1×10^{-4} M). * Δηλώνει στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,01$) συγκριτικά με τον αντίστοιχο μάρτυρα.

M=Μονενσίνη, H=H₂O, I=A23187, O=Ούαβαίνη, Σ=NaCl (Saline)

σύνθεσης της θρομβοξάνης άφ' ενός συναθροίζει τὰ αίμοπετάλια κατά την δεύτερη φάση της αίμοπεταλιακής ενεργοποίησης καί άφ' έτέρου προκαλεί τοπικώς άγγειο-συστολή.



Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση της δράσης της ένδοαιμοπεταλιακής διακίνησης του νατρίου στην ενεργοποίηση των αίμοπεταλίων.

Συνοπτικώς, κατά την πρώτη φάση της ενεργοποίησης των αίμοπεταλίων ο ρόλος της διακίνησης του νατρίου εντός των αίμοπεταλίων είναι πολύ σημαντικός, άφου θέτει σέ λειτουργία ένδοαιμοπεταλιακούς μηχανισμούς πού έχουν σάν τελικό άποτέλεσμα την συνάθροιση καί συγκόλληση των αίμοπεταλίων καί την τελική συμ-μετοχή των στην φυσιολογία της αίμόστασης. Ή ένδαγγειακή όμως συνάθροιση καί συγκόλληση των αίμοπεταλίων είναι βλαβερή, άφου προκαλεί θρόμβωση καί διακοπή της αίμάτωσης ζωτικων ή μη όργάνων.

Ή μερική άναστολή της ενεργοποίησης των αίμοπεταλίων με διάφορες φαρμα-κευτικές ουσίες, όπως ή άσπιρίνη, ή ίνδοσίδη ή άλλες, έχει σάν σκοπό την ελάττωση

τῆς ἐνδαγγειακῆς συνάθροισης καὶ συγκόλλησης τῶν αἰμοπεταλίων καὶ κατὰ συνέπεια τῆς θρόμβωσης.

Ἡ πλήρης διαλεύκανση τῆς δράσης τῆς ἐνδοαίμοπεταλιακῆς διακίνησης τοῦ νατρίου χρήζει συμπληρωματικῆς μελέτης γιὰ τὴν πλήρη κατανόηση τῆς συμβολῆς τοῦ νατρίου στὴν καθόλου λειτουργία τῶν αἰμοπεταλίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Banga, H. S., E. R. Simons, L.F. Brass and S.E. Rittenhouse, Activation of phospholipase A and C in human platelets exposed to epinephrine: Role of glycoproteins IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9197-9201, 1986.
- Bannett, J.S. and G. Vilair, Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.* 64:1393-1401, 1979.
- Bizzozero, J., Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virchow's Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 90: 261-332. 1882.
- Brass, L.F. The effect of Na^+ on Ca^{2+} homeostasis in unstimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 259(20): 12571-12575, 1984.
- Chen, T.I. and C. Tsai, The mechanism of haemostasis in peripheral vessels. *J. Physiol. Lond.* 107: 280-288, 1948.
- Connolly, T.M. and L.E. Limbird, The influence of Na^+ in the α -adrenergic receptor system of human platelets. *J. Biol. Chem.* 258 (6): 3907-3912, 1983a.
- Connolly, T. M. and L. E. Limbird, Removal of extraplatelet Na^+ eliminates indomethacin-sensitive secretion from human platelets stimulated by epinephrine, ADP and bin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5320-5324, 1983b.
- Cooley, M. H. and P. Cohen, Potassium transport in blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 70: throm 69-79, 1967.
- Day, H. J. and H. Holmsen, Concepts of the blood platelet release reaction. *Ser. Haemat.* 4(1): 3-27, 1971.
- Ellis, E. F., O. Oelz, L. J. Roberts III, N. A. Payne, B. J. Sweetman, A.S. Nies and J. A. Oates. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A_2 . *Science* 193: 1135-1137, 1976.
- Feinberg, H., W. W. C. Sandler, M. Scorer, G. C. LeBreton, B. Grossman, and G. V. R. Born, Movement of sodium into human platelets induced by ADP. *Biochim. Biophys. Acta*, 470: 317-324, 1977.
- Gorodetsky, R. and G. Marx, Multi-elemental analysis of platelets and autologous plasma by X-ray fluorescence spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 4:194, 1990.
- Grette, K. Studies on the mechanism of thrombin-catalyzed hemostatic reactions in blood platelets. *Acta Physiol. Scand.* 56: 9-93, 1962.

- Hallam, T. J., A. Sanchez and T. J. Rink, Stimulus-response coupling in human platelets. *Biochem. J.* 218: 819-827, 1984a.
- Hallam, T. J., N. T. Thompson, M. C. Scrutton and T. J. Rink, The role of cytoplasmic free calcium in the response of quin 2-loaded human platelets to vasopressin. *Biochem. J.* 221: 819-901, 1984b.
- Hilgard, P., The role of blood platelets in experimental metastases. *Br. J. Cancer*, 28: 429-435, 1973.
- Homour, A. J. and J. R. A. Mitchell, Platelet clumping *in vivo*. *Nature Lond.* 197: 1019-1020, 1967.
- Iatridis, P. G. and L. L. Ling-Indeck, The role of Na^+ flux on platelet aggregation thromboxane A_2 synthesis and $[\text{Ca}^{++}]_i$ in platelets. *Federation Proc.* 45:221, 1986.
- Jaffe, E. A., L. L. K. Leung, R. L. Nachman, R. I. Levin and D. F. Mosher, Thromboponding is the endogenous lectin of human platelets. *Nature Lond.* 295:246-248, 1982.
- Kiem, J., H. Borberg, G. V. Iyengar, K. Kasperek, M. Siegers, L. E. Feinendegen, and Gross. Elemental composition of platelets II. *Clin. Chem.* 25: 705-710, 1979.
- LeBreton, G. C. and H. Feinberg, ADP-induced changes in intraplatelet Ca ion concentration. *The Pharmacologist* 16: 699, 1974.
- Marr, J., J. J. Barboriak and S. A. Johnson, Relationship of appearance of adenosine diphosphate, fibrin formation and platelet aggregation in the haemostatic plug *in vivo*. *Nature Lond.* 205: 259-262, 1965.
- Marx, G., A. Blankenfeld, R. Panet, and R. Gorodetsky, Model for regulation of platelet volume and responsiveness by the trans-membrane Na^+K^+ -pump. *J. Cell.Physiol.* 151(2): 249-254, 1992.
- Massini, P. and E. F. Luscher, On the significance of the influx of calcium ions into stimulated human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 436: 652-663, 1976.
- Motulsky, H. J. and P. A. Insel, Influence of sodium on the α -adrenergic receptor system on human platelets, *J. Biol. Chem.* 258(6): 3913-3919, 1983.
- Nachman, R. L. and L. L. Leung, Complex formation of platelet membrane glycoproteins Iib and IIIc with fibrinogen. *L. Clin. Invest.* 69: 263-269, 1982.
- Olson, J. D., J. L. Moore, M. F. Collins and B. S. Michael, Adhesion of human platelets to purified solid-phase von Willebrand factor: Studies of normal and Bernard-Soulier platelets. *Thromb. Res.* 32: 115-122, 1983.
- Rink, T. J., S. W. Smith and R. Y. Tsien, Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca^{2+} -independent activation for shape change and secretion. *FEBS Lett.* 148(1): 21-26, 1982.
- Ross, R., and J. A. Glomset, The pathogenesis of atherosclerosis, *N. Engl. J. Med.* 295: 369-377, 1976.
- Sandler, W. C., G. C. LeBreton and H. Feinberg, Movement of sodium into human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 600: 448-455, 1980.
- Sweatt, J. D., I. A. Blair, E. J. Cragoe and L. L. Limbird, Inhibitions of Na^+H^+ exchange block epinephrine and ADP-induced stimulation of human platelet phospholipase

- C by blockade of arachidonic acid release at a prior step. *J. Biol. Chem.* 261 (19): 8660-8666, 1986a.
- Sweatt, J. D., T. M. Conolly, E. J. Cragoe and L. E. Limbird, Evidence that Ca^{2+} -B exchange regulates receptor-mediated phospholipase A₂ activation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261(19): 8667-8673, 1986b.
- Sweatt, J. D., S. L. Johnson, E. J. Cragoe and L. E. Limbird, Inhibitors of Na^{+} /H⁺ exchange block stimulators-provoked arachidonic acid release in human platelets. *J. Biol. Chem.* 260(24): 12910-12919, 1985.
- Tsien, R. Y., New calcium indicators and buffers with high selectivity, against magnesium and protons, design synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396-2404, 1980.
- White, J. G., Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood* 31(5): 604-622, 1968.
- White, J. G., G. H. R. Rao and J. M. Gerrard, Effects of the ionophore A23187 on blood platelets. *Am. J. Path.* 77: 135-190, 1974.
- Weiss, H. J., Congenital disorders of platelet function. *Sem. Hematol.* 17: 228-241, 1980.
- Wintrobe, M. M. In: *Clinical Haematology*, Philadelphia, Lea and Febiger, 371-450, 1974.
- Wright, J. H., The histogenesis of the blood platelet. *J. Morphology* 21 (2): 263-278, 1910.
- Zavoico, G. B., E. J. Cragoe, Jr. and M. B. Feinstein, Regulation of intracellular, pH, in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261(28): 13160-13167, 1986.
- Zucker, M. B. Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypofibrinemic rats. *Am. J. Physiol.* 148: 275-288, 1947.

S U M M A R Y

The effects of sodium on Platelet activation

Platelet stimulation results in an increase in cytosolic free Ca^{2+} -concentration. Platelet $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase leads to several calcium-mediated events associated with platelet activation, such as phosphorylation of myosin light chains and mobilization of free arachidonic acid from membrane phospholipids. Na^{+} influx may play a role in mediating platelet activation. Na^{+} influx and/or increase in $[\text{Na}^{+}]_i$, affect Ca^{2+} uptake by platelets, platelet shape change, platelet aggregation, and platelet α_2 receptors. Na^{+} influx increase by monensin (a Na^{+} ionophore), enhances platelet aggregation and thromboxane A₂ (TXA₂) synthesis. Amiloride, a selective inhibitor of Na^{+} flux, inhibits both platelet aggregation and TXA₂ synthesis. An increase in platelet $[\text{Ca}^{2+}]_i$, induced by monensin and sub optimal concentrations of calcium ionophore (A23187), suggests that Na^{+} influx can contribute in the mobilization of Ca^{2+} in platelets.