

A T T I
DELLA
SOCIETÀ TOSCANA
DI
SCIENZE NATURALI
RESIDENTE IN PISA

MEMORIE - SERIE B

VOL. LXXXIII - ANNO 1976

ARTI GRAFICHE PACINI MARIOTTI - PISA - 1976

I N D I C E

GANDOLFI G., TONGIORGI P. - La presenza di <i>Knipowitschia panizzai</i> (Verga) in acque lagunari ed estuariali tirreniche (Osteichthyes, Gobiidae)	Pag. 1
LUCCHETTI G. - Effetto dei trigliceridi di acidi grassi saturi sulla fibri- nolisi: studio in vitro	» 10
SOLDATINI G.F., NAVARI-IZZO F., LOTTI G., WAGGAN M.R. - Ricerche sui cationi associati alle proteine solubili delle foglie di mais	» 19
MALLEGNI F. - Un caso di assottigliamento biparietale simmetrico in un calvario della necropoli eneolitica del Gaudio	» 31
TOMEI P.E., CAVALLI S. - L'areale dell'Istrice (<i>Hystrix cristata</i> L.) a nord dell'Arno	» 42
LOMBARDI PARDINI E.C. - Le ossa lunghe etrusche del Museo Nazionale di Antropologia di Firenze (Studio metrico e morfologico)	» 49
DEL PRETE C. - Contributi alla conoscenza delle Orchidaceae d'Italia. I. Reperti nuovi o rari per le Alpi Apuane	» 75
BONIFAZI R., D'AMORE C. - I diametri trasversi di un capello al tricociclo- foro: limiti di una metodologia	» 87
TOMEI P.E. - Un prezioso documento sulla avifauna della «bassa Versi- lia». La collezione Gagnani-Rontani	» 93
SORDI M. - Catture occasionali e reperti di specie animali finora non segna- late nell'Alto Tirreno	» 138
MONTI G. - Materiale per una flora micologica della provincia di Pisa. I: macromiceti della selva costiera	» 146
MARI M. - Osservazioni sulla malacofauna delle lagune di Orbetello	» 190
<i>Elenco dei Soci per l'anno 1976</i>	» 207

G. LUCCHETTI (*)

EFFETTO DEI TRIGLICERIDI DI ACIDI GRASSI SATURI SULLA FIBRINOLISI: STUDIO IN VITRO

Riassunto — E' stato studiato l'effetto sulla fibrinolisi, di una serie di trigliceridi di acidi grassi saturi; dai risultati ottenuti, appare evidente che i trigliceridi sono in grado di inibire significativamente l'attività fibrinolitica di alcuni agenti litici quali Streptokinasi, Plasmina ed attivatore del Plasminogeno e che tale inibizione risulta particolarmente marcata per quanto riguarda l'attività dell'attivatore del Plasminogeno.

Sembra inoltre che questa inibizione sia correlata con la dose di trigliceride utilizzata, soprattutto quando i trigliceridi vengono incubati direttamente con gli agenti litici; al contrario, se i trigliceridi vengono aggiunti al sistema di formazione del coagulo di fibrina, solo l'attività dell'attivatore del Plasminogeno risulta significativamente inibita.

Summary — In the present study, the Author wish to report the results obtained with experiments on the effect of suspensions of some triglycerides of saturated fatty acids, on the ability of lytic agents to digest fibrin clots in vitro.

In the first procedure, the lipid suspensions were incubated with the lytic agents (Streptokinase, Plasmin and Plasminogen activator) for 15' at 37° before addition of lytic agents to the clot, and their fibrinolytic activity was then assessed.

In the second experiment the lipids were incorporated in the clots before adding the thrombine. The lipids used markedly inhibited the lytic effects of Plasminogen activator, Plasmin and Streptokinase in decreasing degree and it seems there is not a linear relationship between molecular structure of triglycerides and inhibition of fibrinolysis.

Lipids incorporated within the clots, enhanced the lytic action of Plasminogen activator but do not altere the action of Plasmin and Streptokinase. The results obtained in the experiments have been confirmed by statistical analytical evaluation.

(*) Laboratorio Chimico Biologico STIP-Pisa.

INTRODUZIONE

E' da tempo nota la correlazione esistente tra lipemia ed attività fibrinolitica plasmatica; i dati rilevati a questo proposito, nell'uomo e nell'animale da esperimento, sembrano concordare in tal senso ed in genere è stato osservato che ad una più elevata concentrazione di lipidi circolanti corrisponde un decremento dell'attività fibrinolitica (H. B. W. GRIEG [1967], L. B. BILLIMORIA et Al. [1959], D. A. DUBBER et Al. [1967]).

Perfetta concordanza si riscontra anche nei risultati ottenuti nelle prove in vitro, nelle quali è stato rilevato, in particolare, che l'aggiunta di grassi saturi o di beta-lipoproteine al plasma, determina un prolungamento del tempo di lisi euglobulinica; al contrario rimuovendo la frazione lipidica, mediante trattamento del plasma con agenti liposolubilizzanti, si determina l'effetto opposto (G. PRINO et Al. [1969]).

Pareri discordi si riscontrano al contrario, a proposito dei meccanismi per mezzo dei quali i lipidi eserciterebbero questa inibizione e sulla possibilità di una correlazione tra questa azione inibitrice e la struttura chimica delle sostanze grasse.

Per quanto attiene il meccanismo d'azione, M. HOWELL [1964] teorizzò che l'inibizione potrebbe svilupparsi con diverse modalità ed in particolare:

- inibendo il rilascio dell'attivatore del Plasminogeno dalle cellule
- alterando l'attività della Plasmina
- interferendo nell'attività dell'attivatore del Plasminogeno
- bloccando l'adsorbimento del Plasminogeno e dell'attivatore sul reticolo fibrinico.
- Impedendo la diffusione dell'attivatore nel coagulo.

E. L. BEARD [1971], osservò a questo proposito che ratti alimentati con dieta iperlipidica (40%) mostravano una diminuzione del rilascio dell'attivatore del Plasminogeno da parte delle cellule, mentre più recentemente CHOPIN et Al. [1973] hanno rilevato, sulla base di esperienze in vitro, che determinate sostanze grasse interferiscono con l'attività dell'attivatore del Plasminogeno saturando i suoi legami specifici per il Plasminogeno.

Per quanto attiene la correlazione tra inibizione della lisi e struttura chimica, si ammette in genere che l'inibizione della fibrinolisi venga esercitata indifferentemente da tutte le sostanze grasse anche se con particolare intensità da parte dei chilomicroni e le beta-lipoproteine, ma in genere non viene riconosciuta una correlazione tra struttura chimica ed attività farmacologica.

Lo stesso grado di inibizione sembrano esercitare, ad esempio, beta-lipoproteine, lipidi insaturi, lipidi saturi e colesterolo (CHOPIN et Al. [1973]).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare in questo senso una categoria di grassi, i trigliceridi di acidi grassi saturi, che tanta importanza ha nel determinismo di iperlipemie patologiche e che tuttavia non è mai stata coinvolta, in modo esauriente, in ricerche sulla fibrinolisi.

Abbiamo scelto, a questo proposito, una serie di trigliceridi di acidi grassi saturi, la cui importanza alimentare è stata anche recentemente dimostrata (G. LUCCHETTI [1975]).

MATERIALE E METODI

Materiale:

Sospensioni lipidiche-sospensioni stock dei diversi trigliceridi sono state preparate mediante diluizione in plasma umano mancante di attivatore del Plasminogeno, fino ad ottenere una concentrazione di 50μ EQ/l (dose 1). Da queste, mediante diluizione 1/2, sono state preparate altre sospensioni stock contenenti 25μ EQ/l (dose 2).

Dalle sospensioni stock sono state poi preparate le sospensioni di lavoro prelevandone 0,1 ml ed aggiungendovi 0,9 ml di soluzione fisiologica.

Gli acidi grassi esterificati totalmente con glicerolo erano i seguenti:

acido butirrico (C4), acido capronico (C6), acido caprilico (C8), acido caprinico (C10), acido laurico (C12), acido miristico (C14), acido palmitico (C16), acido stearico (C18), acido arachico (C20).

Sistema di formazione del coagulo:

a - Plasminogeno bovino: soluzione preparata disciogliendo il Plasminogeno in soluzione fisiologica fino alla concentrazione di 0,1%.

b - Streptokinasi: la sostanza liofilizzata e purificata è stata disciolta in soluzione fisiologica sino ad ottenere una soluzione contenente 100 Unità/0,1 ml.

c - Plasma umano: il plasma umano utilizzato in questi esperimenti era privo dell'intrinseca attività dell'attivatore del Plasminogeno.

d - Attivatore del Plasminogeno: 0,01 ml di plasma umano sono stati mescolati con 0,1 ml di soluzione di Streptokinasi.

e - Plasmina: 0,01 ml di plasma umano sono stati addizionati di 0,01 ml di soluzione di Streptokinasi ed 1 ml di soluzione di Plasminogeno.

f - Trombina (bovina): il flacone liofilizzato è stato diluito con soluzione fisiologica sino ad ottenere una concentrazione di 5 NIH unità/0,1 ml.

g - Fibrinogeno bovino: il fibrinogeno è stato marcato con iodio radioattivo 131 secondo la metodica di N. ALKJAERSIG et Al. [1959]; la concentrazione finale della soluzione era di 2,5 mg/0,1 ml.

Metodica analitica:

In un primo esperimento a 0,4 ml di plasma umano sono stati aggiunti in successione 0,1 ml di Plasminogeno, 0,1 ml di Fibrinogeno I^{131} e 0,1 ml di Trombina; una aliquota (0,1 ml) della sospensione di ogni trigliceride è stata preincubata con 0,1 ml di ciascuna sostanza litica (Streptokinasi, Plasmina, attivatore del Plasminogeno), mescolando la miscela in b.m. termostata a 37° sotto agitazione continua per 15'.

0,1 ml della miscela è stato quindi aggiunto al coagulo di fibrina precedentemente preparato e la lisi dello stesso è stata misurata confrontando la radioattività presente nel surnatante con quella dell'intero coagulo secondo la tecnica descritta da E.L. BEARD et Al. [1969], dopo una incubazione di 15' a 37°.

Nella seconda prova 0,1 ml di ciascuna delle sospensioni lipi-

diche è stata aggiunta al sistema di formazione del coagulo, direttamente prima dell'aggiunta della Trombina. Dopo 15' a 37° è stata valutata la capacità di ciascun agente litico a digerire i coaguli di fibrina arricchiti dei lipidi.

In ambedue i tipi di esperimento e per ogni agente litico, sono state eseguite delle prove di controllo nelle quali le sospensioni lipidiche sono state sostituite con una stessa quantità di soluzione fisiologica.

Analisi statistica:

Sui dati ricavati dagli esperimenti sopradescritti sono state eseguite delle valutazioni statistiche usando le metodiche di uso comune e comunque riportate da L. CAVALLI-SFORZA [1970]; innanzitutto è stato effettuato un controllo della significatività delle differenze riscontrate tra i valori delle prove di controllo e quelli riscontrati per ogni agente litico e per ambedue le dosi utilizzate, mediante il test t di Student.

E' stata cercata poi l'esistenza di una correlazione tra l'attività fibrinolitica ed il numero degli atomi di carbonio della molecola dell'acido grasso esterificato con glicerolo. Infine è stata effettuata una analisi della varianza a tre criteri di classificazione (Trigliceridi, agenti litici, dosi) sulle differenze riscontrate tra i valori di controllo e quelli degli agenti litici in esame, alle due dosi utilizzate. L'analisi della varianza è stata effettuata con lo scopo di valutare l'influenza dei trigliceridi sull'attività fibrinolitica in relazione all'agente litico ed alla dose di sostanza lipidica utilizzata.

RISULTATI

Dai risultati ottenuti nel primo esperimento, appare con chiara evidenza l'azione inibitrice esercitata dai trigliceridi di acidi grassi saturi sulla fibrinolisi; in particolare viene depressa l'attività di tutti e tre gli agenti litici anche se con particolare intensità quella dell'attivatore del Plasminogeno.

In questo caso, infatti, si riscontra un calo dell'attività fibrinolitica, rispetto ai controlli, che arriva al 33%, mentre l'attività della Plasmina e della Streptokinasi viene inibita con minore intensità (rispettivamente 23 e 20%).

TABELLA 1 - *Lisi percentuale dei coaguli di fibrina dopo incubazione degli agenti litici con i trigliceridi.*

Trigliceride	Streptokinasi			Plasmina			A. Plasminogeno		
	C	1	2	C	1	2	C	1	2
C:4	55,0	51,7	50,0	57,1	51,4	50,8	98,9	50,0	45,9
C:6	52,7	49,3	46,7	56,2	50,6	50,5	59,2	45,6	47,3
C:8	53,8	49,8	49,8	57,3	51,0	45,8	57,4	45,9	38,5
C:10	50,6	50,6	44,0	57,7	46,7	51,3	57,8	48,5	40,4
C:12	52,9	52,9	51,2	54,9	49,9	45,9	58,6	41,0	46,9
C:14	52,7	52,0	49,8	56,8	52,8	50,5	58,6	42,2	42,2
C:16	50,9	59,9	46,0	56,5	50,0	47,4	57,2	46,9	45,7
C:18	54,4	50,2	48,3	55,7	48,6	47,9	57,8	43,3	47,4
C:20	54,4	51,7	49,0	55,8	44,6	42,9	58,8	47,6	34,8

C = controlli; 1 = dose di 25 μ Eq/l; 2 = dose di 50 μ Eq/l.

Ogni dato è rappresentativo della media di tre determinazioni.

L'analisi statistica effettuata con le modalità sopra ricordate, ha messo in evidenza innanzitutto che l'attività fibrinolitica dei tre agenti litici viene inibita dai trigliceridi in maniera altamente significativa ($P < 0,01$) qualunque sia la dose utilizzata.

L'analisi della varianza a tre criteri di classificazione ha indicato che esiste, tra gli agenti litici utilizzati, una differenza di attività altamente significativa ($P < 0,01$) e che la depressione di attività subita ad opera dei trigliceridi è in relazione alla dose ($P < 0,01$).

Al contrario non è stata riscontrata alcuna correlazione tra numero di atomi di carbonio ed attività litica.

TABELLA 2 - *Analisi della varianza relativa ai dati ottenuti nel primo esperimento (differenza tra i dati dei controlli e quelli dei tre agenti litici).*

sorgente di varianza	g.d.l.	Devianza	Varianza	F	P
a. litici (a)	2	5250,98	2625,49	581,37	0,01
dosi (d)	1	470,44	470,44	104,17	0,01
lipidi (l)	8	31,00	3,875	0,85	n.s.
a $\times$ d	2	75,24	37,62	8,33	n.s.
a $\times$ l	16	148,00	9,250	2,05	n.s.
d $\times$ l	8	744,50	93,07	20,60	0,01
a $\times$ d $\times$ l	16	473,7	29,60	0,05	n.s.
Errore	122	551,0	4,51	—	—

n.s. = differenze non significative.

Nel secondo esperimento, nel quale i trigliceridi venivano aggiunti direttamente al sistema di formazione del coagulo, si nota una depressione significativa ($P < 0,05$) dell'attività dell'attivatore del Plasminogeno, ma sembra altresì che l'attività della Plasmina e della Streptokinasi non vengano influenzate. Il test di Student effettuato rispetto ai controlli non ha dato infatti valori di « t » statisticamente significativi.

Per quanto attiene l'attività dell'attivatore del Plasminogeno, esiste, anche in questo caso, una correlazione dose-effetto ed infatti con la dose di 50 μ Eq/l si ottiene la depressione maggiore. L'analisi della varianza ha confermato quanto sopra ed in particolare in soli rapporti F significativi sono stati quelli relativi alla dose e all'interazione tra dose ed agenti litici.

TABELLA 3 - *Lisi percentuale dei coaguli di fibrina arricchiti dei trigliceridi.*

Trigliceridi	Streptokinasi			Plasmina			A. Plasminogeno		
	C	1	2	C	1	2	C	1	2
C:4	55,6	55,6	55,1	58,1	53,1	58,3	59,1	57,0	54,6
C:6	52,1	54,3	55,4	58,2	54,2	55,2	58,2	57,0	55,1
C:8	51,8	52,9	54,8	58,3	58,3	57,1	58,4	57,1	54,7
C:10	50,8	52,0	56,1	57,7	58,5	57,7	58,6	56,7	52,6
C:12	54,9	49,8	52,0	54,4	59,5	59,0	57,2	55,0	53,8
C:14	55,7	49,3	53,7	53,8	56,3	56,8	58,8	53,4	51,9
C:16	50,8	49,8	52,1	57,5	55,7	55,7	56,3	52,6	53,2
C:18	52,0	54,5	51,7	56,3	57,4	59,0	58,9	53,5	54,0
C:20	53,3	51,6	52,4	55,3	56,1	56,0	58,9	55,9	51,7

C = controlli; 1 = dose di 25 μ Eq/l; 2 = dose di 50 μ Eq/l.

Ogni dato è rappresentativo della media di tre determinazioni.

TABELLA 4 - *Analisi della varianza relativa ai dati ottenuti nel secondo esperimento (differenza tra i dati dei controlli e quelli dei tre agenti litici).*

sorgente di varianza	g.d.l.	Devianza	Varianza	F	P
a. litici (a)	2	16,36	8,18	2,71	n.s.
lipidi (l)	8	38,41	4,80	1,59	n.s.
dose (d)	1	39,88	39,88	10,89	0,01
a $\times$ l	16	82,62	5,16	1,71	n.s.
a $\times$ d	2	588,06	294,03	96,40	0,05
d $\times$ l	8	32,61	4,07	1,32	n.s.
a $\times$ d $\times$ l	16	6,10	0,38	0,12	n.s.
Errore	122	366,24	3,02	—	—

n.s. = differenze non significative.

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti nelle esperienze sopra descritte, ci sembra di poter concludere che l'azione inibente dei trigliceridi di acidi grassi saturi sulla fibrinolisi viene chiaramente confermata.

La diminuzione di attività litica della Streptokinasi, Plasmina ed attivatore del Plasminogeno, quando questi vengono incubati con i trigliceridi, è piuttosto marcata (20-30%); purtuttavia solo l'azione dell'attivatore del Plasminogeno viene inibita anche nel secondo esperimento e cioè nel caso in cui i trigliceridi vengono aggiunti direttamente al sistema di formazione del coagulo.

Questa differenza non è di facile interpretazione; nel primo caso, si può ragionevolmente ritenere che l'inibizione dell'attività fibrinolitica sia determinata da un blocco stechiometrico parziale dei recettori attivi delle tre sostanze litiche. Un ruolo fondamentale, in questo caso, sarebbe giocato ovviamente dall'affinità chimica che sarebbe quindi maggiore per i recettori dell'attivatore del Plasminogeno.

Si spiegherebbe in questo senso anche la correlazione dose-effetto riscontrata; potrebbe essere quindi interessante, a questo proposito, saggiare dosi superiori per valutare la dose-soglia, il limite cioè oltre il quale ad un aumento della dose non corrisponde più una diminuzione dell'attività fibrinolitica.

Nel secondo esperimento, con i trigliceridi inglobati nel coagulo, si può ritenere che l'attivatore del Plasminogeno venga ostacolato dai lipidi bloccandone l'adsorbimento e la penetrazione; in questo caso cioè il coagulo verrebbe stabilizzato in qualche modo dalla presenza di lipidi.

Questa stabilizzazione, sulla base dei risultati ottenuti, non avrebbe invece efficacia nei confronti della Plasmina e della Streptokinasi che avrebbero la possibilità di esplicare per intero la loro attività.

Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra struttura molecolare delle sostanze grasse ed attività fibrinolitica, tuttavia ci sembra di poter affermare che la sola diversità della lunghezza della catena degli acidi grassi esterificati, non è fattore escludente una correlazione del genere, ma valutazioni che coinvolgono una maggiore diversificazione delle strutture dovrebbe essere effettuate.

BIBLIOGRAFIA

- ALKJAERSIG N., FLECHTER A.P., SHERRY S. (1959) - Mechanism of clot dissolution by Plasmin. *Jour. Clin. Invest.*, **38**, 1086-1091.
- BEARD E.L., BUSUTTIL R.W., GOTTSALK S.K. (1969) - Stress induced release of Plasminogen activator from lysosomes. *Thromb. Diathes. Haemorrh.*, **21**, 20-26.
- BEARD E.L. (1971) - Retention of Plasminogen activator and acid phosphatase in lysosomes of lipemic rats. *Thromb. Diates. Haemorrh.*, **25**, 134-139.
- BILLIMORIA J.D., DRYSDALE J., JAMES D.CO., MACLAGEN N.F. (1959) - Determination of fibrinolysis activity of whole blood. *Lancet*, **2**, 272-478.
- CAVALLI-SFORZA L. (1970) - Analisi statistica per medici e biologi. Boringhieri Ed. Torino.
- CHOPIN S.F., BEARD E.L. (1973) - In vitro effects of lipids on fibrinolysis. *Thromb. Diathes. Haemorrh.*, **29**, 286, 292.
- DUBBER A., RIFKIND B., GALE M., MC NICOL G., DOUGLAS A. (1967) - The effect of fat feeding on fibrinolysis, « stypven » time and platelet aggregation. *Jorn. of Ather. Res.*, **7**, 225-230.
- FINNEY D.J. (1952) - Statistical method in biological assay. p. 99-117, Hofner Publ. Co. New York.
- GRIEG H.B.W. (1956) - Inhibition of fibrinolysis by alimentary lipemia. *Lancet*, **1**, 270-276.
- HOWELL M. (1964) - Effects of plasma lipids on fibrinolysis. *Brit. Med. Bull.*, **20**, 200-204.
- LUCCHETTI G. (1975) - Einfluß von Diät-Reisöl auf Vermehrung und Wachstum der ratte *Ernährungs-Umschau*, **22**, 332-335.
- NAIMI S., GOLDSTEIN R., NOTHMAN M.M., WILGRAM G.F., PROGER S. (1962) - Cardio-vascular lesions and changes in blood coagulation and fibrinolysis associated with diet-induced lipemia in the rat. *J. Canad Invest.*, **41**, 1708-1719.
- NAIMI S., GOLDSTEIN R., PROGER S. (1963) - Studies of circulation and fibrinolysis of the arterial and venous blood in normal subjet and patient with atherosclerosis *Circulation* XXVII, 904-917.
- PRINO G., MANTOVANI M. (1969) - Aspetti farmacologici della fibrinolisi. *Bol. Chim. Farm.*, **108**, 655-817.

(ms. pres. il 6 novembre 1976; ult. bozze il 9 maggio 1977).