

L (7)
F. ROSSI - P. BELLAVITE - G. BERTON - G. ZABUCCHI

**METABOLISMO DEI GRANULOCITI E DANNI
DA IMMUNOCOMPLESSI**

*Relazione presentata al XIV Congresso
Nazionale della Società Italiana di Allergologia e Immunologia Clinica
(Firenze, 28-30 novembre 1979)*

Estratto dal volume degli Atti, pag. 177



LEONARDO EDIZIONI SCIENTIFICHE - ROMA

METABOLISMO DEI GRANULOCITI E DANNI DA IMMUNOCOMPLESSI

F. ROSSI, P. BELLAVITE, G. BERTON, G. ZABUCCHI

1 - INTRODUZIONE

È nozione ampiamente accettata che i danni prodotti da eventi immunologici sono dovuti alla generazione di un processo infiammatorio e, in particolare, alla azione dei vari tipi di leucociti. Nel corso di reazioni mediate da anticorpi e inquadrabili nei tipi II e III della classificazione di Gell e Coombs, le reazioni infiammatorie sono di tipo acuto e le cellule implicate i granulociti neutrofili. La patogenesi di questo processo infiammatorio è sostenuta dalla attivazione del complemento da parte di immunocomplessi e dalla conseguente generazione di frammenti ad attività permeabilizzante e chemiotattica.

Le prove della importanza dei granulociti nelle lesioni a patogenesi immunologica sono molteplici ^{cfr. 1, 2, 3}: a) vasculiti tipo Arthus (tipo III), arteriti necrotizzanti tipo malattia acuta da siero (tipo III), nefriti acute nefrotossiche da anticorpi antimembrana basale (tipo II) sono inibite in animali resi sperimentalmente agranulocitosici con mostarde azotate o con siero antigranulociti. Le lesioni compaiono quando a questi animali vengono trasfusi granulociti; b) Henson⁴ ha dimostrato al microscopio elettronico granulociti degranulati aderenti alla membrana basale di glomeruli renali in corso di nefriti nefrotossiche sperimentali da anticorpi antimembrana basale; c) i leucociti neutrofili contengono nei granuli una serie di proteasi neutre, in grado di attaccare elastina, collagene, membrana basale, ed enzimi idrolitici attivi a pH acido su molti substrati. L'iniezione di granuli isolati da leucociti neutrofili sottocute riproduce le lesioni caratteristiche tipo Arthus (Galub e Spitznagel, 1966) e nelle cavità articolari manifestazioni analoghe a quelle della artrite-reumatoide (Weissmann ed al., 1969).

Oggetto di questo intervento è la analisi dei meccanismi attraverso i quali i leucociti, arrivati nel focolaio infiammatorio (pareti vasali, glomeruli renali, cavità articolari, connettivo extravasale, ecc.), producono danni al tessuto.

2 - CARATTERISTICHE MORFO-FUNZIONALI DEI GRANULOCITI NEUTROFILI

I granulociti sono cellule terminali, a vita molto breve (poche ore nel sangue e qualche giorno nei tessuti), che maturano nel midollo da una cellula staminale. Questa maturazione consiste fondamentalmente nel dotare queste cellule di un apparato secretorio, costituito da granuli che rappresentano dei depositi di enzimi e di altri fattori, nello specializzare la membrana cellulare e la superficie a ricevere e trasmettere segnali, e nel fornire un macchinario per il movimento cellulare e per la endocitosi.

Le proprietà in base alle quali i granulociti partecipano al processo infiammatorio e alle sue conseguenze sono: 1) la capacità di rispondere a stimoli chemiotattici; 2) la fagocitosi; 3) la attività secretoria; 4) la capacità di esaltare drammaticamente il metabolismo ossidativo. Tutte queste funzioni sono regolate dalla membrana cellulare, che, in seguito a fenomeni di riconoscimento dovuti alla presenza di recettori specifici per fattori immunologici (frammento Fc delle IgG e IgA, fattori complementari), lectine, neuroormoni, istamina ^{cfr. 2}, è capace di generare segnali che interferiscono con vari sistemi biochimici e strutturali intracellulari.

I meccanismi in base ai quali i granulociti esercitano danno nel corso di infiammazioni a patogenesi immunologica sono sostanzialmente due: *il rilascio all'esterno di enzimi e di altri fattori contenuti nei granuli e la produzione di composti di riduzione dell'ossigeno* (superossido anione, acqua ossigenata, radicale idrossile, ossigeno singoletto) in seguito ad attivazione del metabolismo ossidativo.

3 - IL RILASCIO DEI CONTENUTI CELLULARI

a. I granuli citoplasmatici

I granulociti neutrofili contengono nel citoplasma una popolazione eterogenea di granuli che si formano durante la maturazione nel midollo. Ritenuti già da Ehrlich organuli contenenti materiali destinati alla secrezione, sono stati oggetto di numerose ricerche a partire dagli anni 1960 quando un gruppo di ricercatori della Rockefeller University⁵ isolò questi granuli da leucociti di coniglio e iniziò lo studio delle loro caratteristiche biochimiche. È opinione comune che i neutrofili della specie umana contengano due tipi di granuli, gli azurofili e gli specifici in rapporto di 1:2-3, differenti per origine, densità, morfologia e contenuto^{2, 6, 7, 8, 9, 10}. I granuli azurofili, detti anche primari, si formano allo stadio di promielocita per coalescenza di vescicole contenenti materiali densi a livello della faccia concava dell'apparato di Golgi⁸. Hanno forme diverse, un diametro che varia da 0,4 a 0,6 micron e al microscopio elettronico appaiono elettrondensi. I granuli specifici, detti anche secondari, si formano più tardivamente, cioè allo stadio di mielocita (quando la formazione degli azurofili è cessata), dalla coalescenza di vescicole a livello della faccia convessa del Golgi. Sono più piccoli e al microscopio elettronico meno elettrondensi degli azurofili. È possibile che i due tipi non rappresentino popolazioni omogenee, ma esistano delle sub-

popolazioni, differenti per qualche aspetto biochimico e morfologico. Ciò spiega l'isolamento anche di altri tipi di granuli (granuli terziari) ottenuto da alcuni gruppi di ricercatori⁶, cfr. 2, 7.

A parte qualche discrepanza relativa soprattutto alla collagenasi, c'è abbastanza accordo tra i vari Autori circa il contenuto dei due tipi di granuli (tab. 1). Gli azurofili contengono oltre a numerose idrolasi attive a

TABELLA 1

Contenuto dei granuli azurofili e specifici dei leucociti neutrofili umani (2, 6, 7)

	<i>Azurofili</i>	<i>Specifici</i>
Idrolasi acide (caratteristiche) dei lisosomi)	β -glicerofosfatasi β -glucuronidasi N-acetil- β -glucosaminidasi α -mannosidasi α -fucosidasi arilsulfatasi β -galattosidasi proteasi acide (catepsine D e B)	nessuna
Proteasi neutre (serin-proteasi)	elastasi catepsina G proteinasi 3	
Proteasi neutre (metallo-proteasi)	collagenasi	collagenasi metalloproteinasi
Enzimi microbicidi	mieloperossidasi lisozima (1/3)	lisozima (2/3)
Fattori non enzimatici	proteine cationiche mucopolisaccaridi	lattoferrina proteina legante la vit. B12

pH acido, caratteristiche dei lisosomi di altre cellule, proteasi neutre, enzimi microbicidi quali perossidasi e lisozima, e una serie di proteine cationiche dotate di caratteristiche azioni biologiche. Gli specifici sono privi di idrolasi acide ma contengono lisozima, lattoferrina, una proteina legante la vit. B12 e, secondo alcuni Autori⁷, due proteasi neutre, una tipica collagenasi e una seconda proteinasi (metalloproteinasi) attiva su frammenti del collagene.

b. Modalità e meccanismi del rilascio dei granuli (degranulazione)

È noto da molto tempo che i neutrofili residenti in un focolaio infiammatorio appaiono frequentemente degranulati. La funzione battericida e di-

gestiva dei granuli, ipotizzata già da Metchnikoff e da Ehrlich, è stata recentemente ben documentata con la scoperta che durante la fagocitosi i granuli si fondono con il vacuolo di fagocitosi e vi scaricano il loro contenuto^{11, 12, 13, 14, 15}. È stato inoltre dimostrato che il contenuto dei granuli può essere scaricato all'esterno della cellula sia durante la fagocitosi che in altre circostanze^{16, 17}. In questi ultimi anni i meccanismi, le condizioni, la regolazione, gli aspetti biochimici, la sequenzialità e il controllo farmacologico di questo fenomeno sono stati alquanto approfonditi e alcune eccellenti pubblicazioni ne trattano approfonditamente^{1, 2, 3, 18, 19, 20, 21, 22, 23}.

Il rilascio è di due tipi, *citotossico* e *secretorio* e, nell'ambito di questi due tipi, si possono distinguere più modalità (fig. 1 e tab. 2).

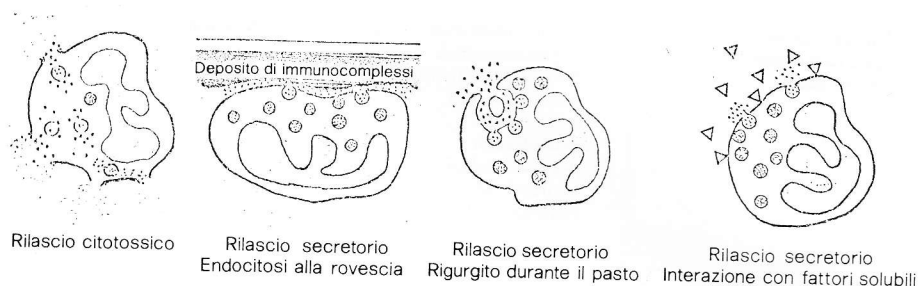


Fig. 1. - Modelli dei meccanismi di rilascio dei granulociti.

Rilascio citotossico. È un fenomeno passivo dovuto a danno e morte cellulare. Si verifica per azione di tossine (leucocidina stafilococcica, Streptolisina O ed S, altre tossine batteriche), di sostanze tensioattive artificiali o formatesi per processi di denaturazione nei focolai infiammatori o in seguito alla fagocitosi di materiali tossici per le membrane dei fagosomi come cristalli di silicio e di urato²⁴. In questi casi vengono rilasciati all'esterno tutti i costituenti cellulari contenuti sia nel citoplasma che negli organuli.

Rilascio secretorio. Indicato comunemente col termine di *esocitosi* o *secrezione*, è un processo attivo a mezzo del quale il contenuto dei granuli azurofili e/o specifici viene scaricato fuori del citoplasma senza danni alla membrana cellulare e senza significativa uscita all'esterno di componenti del citoplasma solubile. Può avvenire in circostanze e con modalità diverse.

1. **Secrezione all'interno del vacuolo di fagocitosi.** I granuli, in continuo movimento nel citoplasma, si avvicinano alla membrana cellulare invaginata — probabilmente orientati dai microtubuli —, si fondono con questa e scaricano il loro contenuto nel fagosoma. È il processo finalisticamente più utile perché ha come effetto lo scarico selettivo di enzimi e di altri fattori a contatto col materiale, con i batteri o con i virus fagocitati e, quindi, la loro uccisione e digestione.

2. **Secrezione all'esterno del leucocita.** Questo tipo di esocitosi può avvenire con tre modalità:

TABELLA 2

Meccanismi e stimoli del rilascio di enzimi o di altri fattori dai granulociti

A. CITOTOSSICO		Tossine Sostanze tensioattive Silicio Cristalli di urato Ogni situazione che provoca morte del leucocita
B. SECRETORIO (esocitosi)	1. Nel fagosoma:	Fagocitosi di batteri, virus, immunocomplessi, immunoglobuline aggregate, detriti cellulari, ecc.
	2. All'esterno del leucocita	2a. <i>Rigurgito durante il pasto</i> : durante la fagocitosi di batteri, virus, immunocomplessi, immunoglobuline aggregate, detriti cellulari, ecc. 2b. <i>Endocitosi alla rovescia</i> : durante l'adesione a sostanze corpuscolate fagocitabili, adese a superfici non fagocitabili (immunocomplessi solubili e insolubili, immunoglobuline aggregate, fattori complementari, ecc.) 2c. <i>Interazione con fattori solubili</i> : C3a, C5a, C567 sostanze tensioattive forbol-miristato acetato ionofori endotossine lectine (concanavalina A)

2a. La prima, più comune, si verifica durante la fagocitosi. Definita da Weissman «*rigurgito durante il pasto*»¹⁶, si verifica attraverso il vacuolo di fagocitosi, vale a dire quando i granuli si fondono con la membrana invaginata e scaricano il loro contenuto prima che il vacuolo sia chiuso (fig. 1).

2b. La seconda, indicata da Henson¹⁷ col termine di «*fagocitosi frustra*» e da Weissman con quello di «*endocitosi alla rovescia*», si verifica quando i leucociti interagiscono con materiali che, pur essendo per le loro caratteristiche potenzialmente fagocitabili, non possono essere fagocitati perché depositati e fermamente attaccati a superfici di ampie dimensioni. Sperimentalmente, il fenomeno si può ottenere mettendo i leucociti a contatto con superfici (membrane millipore, collagene, sferule di sefarosio) sulle quali sono depositati immunocomplessi solubili o insolubili, aggregati di immunoglobuline o frammenti del complemento come il C5a^{17, 25, 29}. Le immunoglobuline efficaci sono quelle per le quali esiste un recettore sulla superficie del leucocita e, in particolare, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA¹⁸. Il modello sperimentale riproduce quello che si verifica in patologia, quando immunocomplessi solubili o insolubili, con o senza complemento, sono depositati a li-

vello delle pareti vasali, della membrana basale dei glomeruli renali o delle fibre collagene del connettivo interstiziale.

2c. La terza modalità si verifica per interazione di fattori solubili con la superficie cellulare. In questo caso l'esocitosi può essere potenziata da un particolare artificio sperimentale che consiste nel trattamento dei leucociti con citocalasina B, una sostanza prodotta da una muffa, l'*Helminthosporium demathoideum*, che si lega alla membrana plasmatica e modifica l'organizzazione funzionale dei microfilamenti^{16, 26, 27, 28}. Alcuni di questi fattori sono di ordine immunologico, come i composti chemiotattici C3a, C5a e C567^{28, 29}, altri sono fattori chemiotattici ad azione diretta, come peptidi di sintesi³⁰, altri, infine, come ionofori³¹, forbol-miristato acetato^{32, 33}, concanavalina A³⁴, sono, per ora, modelli sperimentali utili per lo studio dei meccanismi dell'esocitosi. Secondo alcuni Autori, i composti solubili, come forbol-miristato acetato³², ionofori³³, concanavalina A³⁴, produrrebbero una secrezione selettiva, cioè limitata ai granuli specifici. Questo fatto indicherebbe una fondamentale differenza nei meccanismi di secrezione delle due popolazioni di granuli.

Meccanismi della esocitosi. La esocitosi si svolge in fasi successive che vedono la sequenziale partecipazione della membrana cellulare (eventi di membrana) e di sistemi biochimici e strutturali intracellulari (eventi intracellulari).

a. *Eventi di membrana.* All'origine c'è l'interazione tra i vari tipi di stimoli e la membrana cellulare. L'interazione può essere *specific*a, nel senso che coinvolge la partecipazione di strutture recettoriali della superficie cellulare, o *aspecific*a, nel senso che avviene indipendentemente dall'esistenza di recettori specifici. Gli stimoli che agiscono mediante un'interazione specifica, sono, per lo più, di ordine immunologico, come frammenti Fc di anticorpi delle classi IgG1, 2, 3, 4 e IgA, C3b, C3a, C567. L'azione di questi stimoli è molto più efficace quando sono in forma insolubile o comunque corpuscolata per adesione a superfici, tale cioè da indurre quelle modificazioni della membrana plasmatica e della periferia del leucocita che si traducono in movimenti o nella formazione di pseudopodi o invaginazioni (edocitosi completa o frustra). L'interazione tra stimoli e membrana modifica questa struttura e, da queste modificazioni si generano segnali che agiscono su sistemi bersaglio la cui risposta si traduce in una attività cellulare come movimento (casuale o direzionale), endocitosi, secrezione, eccitazione metabolica.

La natura delle modificazioni della membrana, sul piano molecolare e funzionale, la loro unicità o molteplicità sono oggetto di numerose ricerche. I dati più interessanti finora riscontrati sono un rapido cambiamento dei flussi ionici (aumento di ingresso di calcio e di sodio e aumentata uscita di potassio) parallelo alla secrezione di enzimi granulari³⁵ e una modificazione del potenziale di membrana^{36, 37}.

b. *Eventi intracellulari.* La sequenza di eventi intracellulari, di ordine biochimico e strutturale, che segue alla stimolazione di membrana non è ancora stata chiarita. Per un approfondimento della materia si rimanda a trattazioni specializzate^{12, 20, 22, 23, 38, 39, 40, 41, 42}. È noto che la esocitosi richiede la integrità dei sistemi fornitori di energia, in particolare della glicolisi,

la disponibilità di ioni calcio, la integrità strutturale e funzionale del sistema che forma il citoscheletro (microtubuli e microfilamenti) e coinvolge la partecipazione dei nucleotidi ciclici e delle reazioni da questi regolate (tab. 3). In analogia a quanto avviene in altre cellule, pare che la funzione secretoria sia regolata dalla concentrazione dei nucleotidi ciclici AMPc e GMPc e dalla loro interazione con i microtubuli²⁰. Questi concetti derivano da un duplice ordine di prove e cioè dall'effetto sulla esocitosi di sostanze che modificano l'integrità e l'assemblaggio dei microtubuli e di sostanze che influenzano la concentrazione intracellulare dei nucleotidi ciclici.

Sostanze come la colchicina e la vinblastina che provocano disassemblaggio dei microtubuli inibiscono o riducono il rilascio di enzimi lisosomali dai leucociti sottoposti a stimoli diversi come la fagocitosi^{16, 40, 41} e l'esposizione a sostanze adese su superfici^{16, 40} e a fattori chemiotattici²⁹. Al contrario, sostanze come D₂O che producono assemblaggio dei microtubuli aumentano il rilascio⁴². È stato inoltre dimostrato che la formazione di microtubuli (il processo che avviene per assemblaggio di una proteina dimerica chiamata tubulina) aumentata in leucociti neutrofili in seguito ad esposizione ad agenti che stimolano la esocitosi e che la colchicina inibisce sia la secrezione che l'assemblaggio della tubulina^{28, 34, 43}.

Le prove dell'importanza dei nucleotidi ciclici presentate da vari gruppi^{2, 22, 38, 40, 42} possono essere così sintetizzate (tab. 3): sia l'AMPc esogeno sia le sostanze che provocano un aumento intracellulare di questo nucleotide ciclico (per es. prostaglandina E1, sostanze β -adrenergiche come epinefrina

TABELLA 3

Fattori di controllo della secrezione nei granulociti neutrofili umani

<i>Inibizione</i>	<i>Stimolazione</i>
β -stimolanti (simpaticomimetici)	parasimpaticomimetici
aumento AMPc	aumento GMPc
disassemblaggio microtubuli	assemblaggio microtubuli
	ioni calcio

o isoproterenolo) diminuiscono o bloccano l'esocitosi; al contrario, sostanze che aumentano il GMPc (come acetilcolina o carbamilcolina) aumentano l'esocitosi. In analogia con altri sistemi secretori come le mastcellule, i due sistemi di nucleotidi ciclici esercitano un effetto opposto. La loro azione sarebbe mediata dall'effetto sui microtubuli: l'AMPc inibisce la polimerizzazione della tubulina e quindi la formazione di microtubuli e la secrezione dei costituenti granulari. Al contrario il GMPc promuove la formazione di microtubuli e quindi il rilascio viene attivato.

L'importanza dei microfilamenti non è chiara. Queste strutture contrattili, composte di actina e miosina, si trovano alla periferia delle cellule, particolarmente concentrate in zone adiacenti a membrane in movimento, cioè in corrispondenza di protrusioni e di pseudopodi. Questa particolare distribuzione, che corrisponde a zone della membrana modificate da stimoli esterni (zone di contatto con particelle fagocitabili, regioni di interazione con stimolanti solubili del tipo delle lectine, zone di formazione di pseudopodi, zone di protrusione che formano il polo avanzante della cellula durante il movimento chemiotattico) sembra essere regolata dai microtubuli³⁹. Il sistema microfilamentare viene comunque considerato come una barriera meccanica che impedisce, e in ogni caso regola, l'avvicinamento dei granuli alla membrana plasmatica e la loro fusione con la faccia interna di questa.

Conseguenze dell'esocitosi

Le conseguenze del rilascio del contenuto dei granuli dipendono dal meccanismo del rilascio, dalle proprietà biologiche dei vari fattori rilasciati e dalla sede in cui avviene il fenomeno (nel fagosoma o all'esterno) (tab. 4).

TABELLA 4

Conseguenze della esocitosi



Il rilascio per secrezione *nel fagosoma*, costituisce un meccanismo fondamentale per l'uccisione e la digestione degli agenti fagocitanti. Di questa azione sono responsabili sostanze ad attività non enzimatica (proteine cationiche e lattoferrina) ed enzimi quali le idrolasi acide, le proteasi neutre, il lisozima e la perossidasi.

Le conseguenze della esocitosi *all'esterno del fagocita*, sono di diverso ordine, comportando, in ogni caso, una serie di danni più o meno gravi al tessuto ed una amplificazione del processo infiammatorio. Nel caso della patologia da immunocomplessi l'esocitosi avviene: i) durante la fagocitosi degli immunocomplessi insolubili; ii) durante l'adesione alla membrana

plasmatica di immunocomplessi precipitati su superfici quali fibre collagene, membrane basali e pareti vasali; iii) per azione di fattori complementari e di altri fattori solubili ad azione tensioattiva o « ligante », derivati da denaturazione di strutture cellulari o acellulari del tessuto.

Danni al tessuto. Gli effetti principali dipendono dalla azione di enzimi, in particolare delle proteasi neutre^{44, 45, 46, 47, 57}. La elastasi ha come substrato i proteoglicani della matrice cartilaginea, la elastina dei legamenti, delle pareti vasali e dei setti polmonari, il fibrinogeno e i fattori del complemento; le collagenasi scindono prevalentemente il collagene tipo I (dando due frammenti indicati come TCA e TCB), ma anche proteoglicani e proteine plasmatiche come il fibrinogeno e fattori del complemento; la catepsina G, priva di attività elastasica è attiva su molti substrati proteici. Accanto alle proteasi neutre hanno grande importanza gli enzimi idrolitici attivi a pH acido. Tra questi le proteasi acide, che agiscono non solo su strutture cellulari e tissutali ma anche su molecole solubili (chininogeni) con produzione di chinine vasoattive, e tutte le altre idrolasi tipicamente lisosomiali attive su substrati diversi come lipidi, glucidi, acidi nucleici, mucopolisaccaridi, composti fosforilati, ecc.

Interazione con altri sistemi e amplificazione del processo infiammatorio. Sostanze liberate dai granulociti, di natura enzimatica e non, interagiscono con sistemi polimolecolari solubili con formazione di mediatori vasoattivi e chemiotattici. Con questi meccanismi l'esocitosi diventa uno dei momenti patogenetici di amplificazione e di espansione del processo infiammatorio.

a. *L'attivazione del complemento.* Fattori rilasciati dai leucociti attivano il complemento con più modalità: possono attivare sia la via classica che la via alternata⁴⁸ o agire direttamente (proteasi neutre) su singole componenti come C3 e C5 con generazione di frammenti attivi^{48, 49, 50}.

b. *Generazione di polipeptidi vasoattivi.* Peptidi vasoattivi ad attività ipotensiva, vasodilatatrice e permeabilizzante, chiamate leucochine, sono formate per azione di proteasi acide⁵¹ e neutre⁵² su precursori plasmatici.

c. *Interazione col sistema della coagulazione.* I leucociti neutrofili hanno una attività procoagulante assimilabile a quella della tromboplastina tissutale, probabilmente attribuibile a costituenti (fosfolipidi) della membrana dei granuli^{53, 54, 55}. Una attività procoagulante è esplicata anche da proteine cationiche non enzimatiche in grado di precipitare monomeri di fibrina solubili con formazione di coaguli⁵⁶.

Un'altra modalità di interazione con la coagulazione da parte di prodotti liberati dai granulociti consiste in una azione antieparinica di alcune proteine cationiche⁵⁶ e nella digestione di fattori della coagulazione, in particolare di fibrinogeno, e di fattori V, VII, VIII, XII, XIII da parte di proteasi neutre^{2, 47, 57}.

d. *Interazione col sistema fibrinolitico.* Ci sono numerose dimostrazioni che i leucociti attivano la fibrinolisi². Due meccanismi sono stati individuati, una lisi diretta della fibrina e del fibrinogeno da parte di proteasi neutre^{57, 58} e la secrezione di un attivatore del plasminogeno (una proteasi neutra dei granuli azurofili) attivo sul plasminogeno plasmatico e su un pla-

sminogeno contenuto negli stessi leucociti⁵⁸. Attraverso queste interazioni prodotti rilasciati dai leucociti, oltre a generare frammenti chemiotattici e permeabilizzanti dalla degradazione del fibrinogeno e della fibrina, attivano il plasminogeno a plasmina e questa, a sua volta, amplifica il processo infiammatorio attivando il fattore di Hageman, la formazione di chinine e il complemento.

e. *Interazione con la liberazione di istamina.* Un altro importante meccanismo di amplificazione del processo infiammatorio consiste nella secrezione da parte dei granulociti di fattori che provocano liberazione di istamina dalle mastcellule. Si tratta della azione di proteasi⁵⁹ e di proteine cationiche non enzimatiche⁶⁰.

I rapporti tra fattori granulocitari e istamina sono però ancora più complessi. Infatti i granulociti contengono e possono liberare un inibitore del rilascio di istamina⁶¹ e un enzima (istaminasi) che degrada l'istamina⁶².

3 - LE MODIFICAZIONI METABOLICHE DEI LEUCOCITI

Si tratta del secondo fenomeno da cui dipendono i danni provocati al tessuto da parte dei granulociti.

La attivazione del metabolismo respiratorio durante la fagocitosi

Una delle caratteristiche peculiari di queste cellule è la spiccata attitudine a modificare il metabolismo respiratorio in relazione ad attività funzionali e a mutamenti delle condizioni ambientali. La situazione più paradigmatica è la fagocitosi. Durante questa funzione si verifica una drammatica modificazione metabolica consistente in un aumento del consumo di O_2 , insensibile ai veleni della respirazione mitocondriale, associata a produzione di H_2O_2 e di O_2^- ed ad una attivazione del metabolismo glucidico attraverso lo shunt degli esosomono fosfati. Queste modificazioni metaboliche sono quantitativamente assai rilevanti e si verificano con estrema rapidità. Usando metodiche a sensibilità molto elevata l'aumento della respirazione, della produzione di $^{14}CO_2$ da glucosio-1- ^{14}C , di H_2O_2 e di O_2^- sono apprezzabili entro pochi secondi dalla aggiunta, ad una popolazione di granulociti, di una sospensione di particelle fagocitabili (fig. 2).

La tabella 5 riassume le principali modificazioni metaboliche di granulociti neutrofili durante la fagocitosi, incluse quelle non riguardanti il metabolismo ossidativo. Per maggiori dettagli si rimanda a monografie specifiche^{2, 63, 64, 65, 66}. La fig. 2, mostra la cinetica e l'intensità dell'attivazione della respirazione e della produzione di H_2O_2 , di O_2^- e di $^{14}CO_2$ da glucosio 1- ^{14}C .

Molte ipotesi sono state avanzate circa le basi enzimatiche di questa stimolazione metabolica. Risultati conseguiti nel nostro laboratorio e confermati da altri Autori^{2, 63, 64, 65, 66, 67}, dimostrano che l'evento chiave è l'attivazione di un sistema enzimatico che ossida l' $NADPH$ ($NADPH$ ossidasi). Le caratteristiche cinetiche, la natura e la localizzazione di questo sistema enzimatico sono ancora in fase di chiarificazione.

L'attivazione del metabolismo glucidico attraverso l'HMP è in gran parte spiegato con una variazione del rapporto $NADP^+/NADPH$ e in parte

con l'attività del ciclo del glutatione (glutation-perossidasi più glutation-reduttasi) durante la degradazione di una parte dell' H_2O_2 formata dalla NADPH ossidasi.

Il problema della localizzazione della NADPH ossidasi è ancora controverso. Si confrontano due ipotesi basate su risultati sperimentali ottenuti

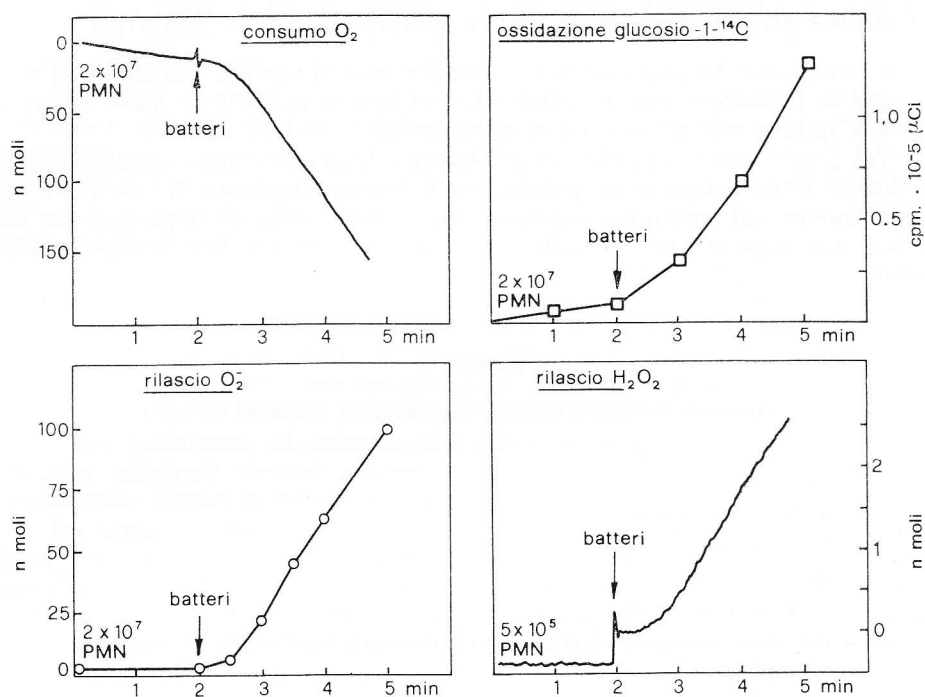


Fig. 2. - Andamento nel tempo dei vari eventi della attivazione metabolica

TABELLA 5

Modificazioni biochimiche dei granulociti neutrofili durante la fagocitosi

1. Aumento del consumo di ossigeno (insensibile a cianuro, rotenone e antimicina A).
2. Produzione di H_2O_2 e O_2^- .
3. Aumento del catabolismo glucidico attraverso il ciclo dei pentoso-fosfati (HMP).
4. Aumentata ossidazione di NADPH.
5. Aumento della glicolisi.
6. Aumento del turnover dei fosfolipidi.

su frazioni subcellulari separate con vari metodi di centrifugazione frazionata: secondo alcuni l'enzima è localizzato nei granuli azurofilii^{68, 69}, secondo altri nella membrana plasmatica⁷⁰. I risultati più recenti ottenuti nel nostro laboratorio su frazioni subcellulari di leucociti di cavia hanno dimostrato che la ossidasi di cellule attivate è associata a frazioni identificabili con membrane e non con granuli specifici o azurofilii.

Attivazione del metabolismo ossidativo indipendente dalla fagocitosi

L'attivazione del metabolismo ossidativo non si verifica nei leucociti solo durante la fagocitosi, ma in molte altre situazioni durante le quali sostanze di varia natura interagiscono con la superficie cellulare (tab. 6).

Tra i vari fattori in grado di stimolare i leucociti vanno segnalati quelli di ordine immunologico, in particolare i fattori chemiotattici derivati dal complemento, gli immunocomplessi solubili ed insolubili depositati su superfici non fagocitabili e quelli facilmente rinvenibili nei focolai infiammatori.

TABELLA 6

Agenti che stimolano il metabolismo ossidativo dei granulociti neutrofili

detergenti
anticorpi anti-leucociti
fosfolipasi C
acidi grassi
forbol-miristato acetato
immunocomplessi solubili o adesi a materiali non fagocitabili
C5a, C567
callicreina
concanavalina A libera o legata a sferule di sefarosio
ionofori
citocalasina E
ioni lantanio
endotossine
N-formil peptidi

Meccanismo della stimolazione metabolica

Come il fenomeno della esocitosi, anche l'attivazione metabolica è un evento che si svolge in fasi successive e coinvolge la membrana plasmatica. All'origine c'è un processo di riconoscimento che può essere specifico, cioè coinvolgere una interazione tra recettori cellulari e sostanze di varia natura, o aspecifico. Questa interazione può avvenire con sostanze presentate in forma corpuscolata, o adese a superfici, e in forma solubile. Nel caso di

stimoli corpuscolati o adesi a superfici vengono indotte delle modifiche della membrana plasmatica e di strutture intracellulari tali da portare ad atti di endocitosi o a tentativi di endocitosi (fagocitosi frustra).

Alla fase di riconoscimento segue una seconda fase, *la modificazione della membrana plasmatica*, che rappresenta il momento chiave della stimolazione metabolica. Sono stati riscontrati diversi tipi di modificazioni, come variazioni della distribuzione di molecole evidenziate sulla base di modificazioni della fluorescenza di sonde inserite nella membrana^{71, 72}, modificazioni della permeabilità agli ioni e del potenziale di membrana^{35, 36, 37}, ma il loro significato non è stato ancora precisato.

Da chiarire rimane anche la fase successiva, cioè il rapporto tra le modificazioni indotte nella membrana plasmatica e *l'informazione inviata al bersaglio*, che, in questo caso, è l'enzima che viene così attivato. Ovviamente i meccanismi e la natura dei segnali debbono essere inquadrati in schemi differenti a seconda che l'enzima sia localizzato all'interno della cellula o sulla membrana plasmatica.

A parte questi problemi, pare opportuno in questa sede sottolineare alcuni fattori di un certo rilievo e precisamente: i) la molteplicità degli stimoli che inducono la stimolazione metabolica; ii) l'esistenza di stimoli fagocitabili e di stimoli non fagocitabili; iii) l'importanza di stimoli immunologici come il frammento Fc delle immunoglobuline modificato dalla reazione con gli antigeni, il C3b, il C5a che reagiscono specificamente con recettori di superficie; iv) l'esistenza di stimoli non immunologici che interagiscono con specifici substrati (lectine, enzimi) o che hanno azioni specifiche (sostanze tensioattive, forbol-miristato acetato ecc.).

Da tutto ciò che è stato detto riguardo al meccanismo e al tipo di stimoli, risulta evidente l'analogia tra il fenomeno dell'esocitosi e quello della stimolazione metabolica. Nei fatti i due eventi sono sempre associati. Resta tuttavia da chiarire se, oltre ad una comunanza di stimoli, i due fenomeni sono necessariamente dipendenti dalle stesse modificazioni della membrana e dalla partecipazione degli stessi sistemi biochimici e strutturali intracellulari quali i microtubuli, i microfilamenti, i nucleotidi ciclici ecc.

Resta comunque il fatto che, in varie situazioni, come la fagocitosi e la chemiotassi, le due attività, eccitazione metabolica ed esocitosi, sono esplicate contemporaneamente dai leucociti. È lecito quindi ammettere che ciò si verifichi in ogni processo infiammatorio compresi quelli a patogenesi immunologica.

Significati e conseguenze dell'attivazione metabolica

Le conseguenze principali della stimolazione della respirazione dipendono dall'azione dei composti di riduzione dell'ossigeno. È opinione condivisa da tutti gli Autori che la respirazione attivata dalla fagocitosi o da altri eventi si realizzi tramite una riduzione monovalente dell'ossigeno con formazione di O_2^- . Esso può ridurre altre molecole, ritrasformandosi in O_2 , oppure dismutare, spontaneamente o per azione della superossido dismutasi, dando O_2 ed H_2O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$). L'acqua ossigenata che si forma può essere degradata dalla catalasi, dalla mieloperossidasi o dalla glutathione-perossidasi, oppure può interagire con molecole della cellula o del

tessuto qualora venga rilasciata o si formi per dismutazione dell' O_2^- all'esterno. Il superossido anione e l'acqua ossigenata sono le due principali specie prodotte. Accanto a queste è stata dimostrata² anche la formazione di una certa quantità di radicale idrossile ($OH\cdot$) e di ossigeno singoletto (1O_2). Il radicale idrossile si forma dalla reazione tra O_2^- e H_2O_2 in presenza di Fe^{2+} secondo la reazione di Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH\cdot$). L'ossigeno singoletto si può formare durante la dismutazione dell' O_2^- ($2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow ^1O_2 + H_2O_2$), dalla reazione tra superossido anione e radicale idrossile ($O_2^- + OH\cdot \longrightarrow ^1O_2 + OH^-$) e tra superossido anione e H_2O_2 ($O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow ^1O_2 + OH^- + OH\cdot$) e dal sistema $MPO + \text{alogeno} + H_2O_2$.

Tutti questi composti sono altamente reattivi come ossidanti e come riducenti⁷³ e, in base a queste proprietà, possono esercitare un notevole effetto sulla stessa cellula che li produce o sull'ambiente extracellulare. Come si vede dalla tab. 7 gli effetti vengono suddivisi in base al sito dove questi composti vengono rilasciati.

Se scaricati nel vacuolo di fagocitosi, rappresentano uno dei principali sistemi di cui i leucociti dispongono per l'attività battericida. Questo sistema, indicato come *ossigeno-dipendente*, opera sia con meccanismo diretto, basato sulla reattività chimica delle varie specie con lipidi, proteine, acidi nucleici

TABELLA 7

Effetti dei composti di riduzione dell'ossigeno derivati dal metabolismo ossidativo dei granulociti neutrofili

RILASCIO NEL FAGOSOMA:

Effetto utile: attività battericida, modificazioni del materiale ingerito

Effetto dannoso: danni alla membrana del fagosoma seguiti da morte cellulare ed esocitosi tossica

↓
rilascio di fattori cellulari

↓
danno al tessuto

↓
amplificazione del processo infiammatorio

RILASCIO ALL'ESTERNO:

Attività microbica e citocida

Danno a strutture cellulari e acellulari:

perossidazione di lipidi
depimerizzazione dell'acido ialuronico
danni endoteliali
degenerazione e necrosi delle cellule del parenchima
emolisi

Modificazioni funzionali:

aumento della permeabilità vasale per danno endoteliale
e per secrezione di istamina
regolazione dell'aggregazione piastrinica
blastizzazione dei linfociti
generazione di fattori chemiotattici nel plasma
attivazione della esocitosi piastrinica

batterici e virali, sia con un meccanismo indiretto, che comporta l'intervento della MPO e del cloro a loro volta scaricati nel vacuolo².

Un'altra conseguenza dello scarico nel vacuolo o all'interno della cellula è il danno al leucocita stesso, seguito dalla liberazione all'esterno di enzimi e di altri fattori con le conseguenze di cui si è già parlato a proposito dell'esocitosi. La perdita di vitalità e i processi degenerativi a cui vanno incontro i leucociti dopo un soggiorno di una certa durata in un focolaio infiammatorio e durante la fagocitosi, anche in vitro, sono, in gran parte, dovuti all'azione di radicali liberi dell'ossigeno, soprattutto del radicale idrossile che è un potente ossidante⁷⁴.

Rilasciati all'esterno dei leucociti, sia durante la fagocitosi, sia in tutte le altre condizioni che si trovano nel focolaio infiammatorio, i vari composti di riduzione dell'ossigeno interagiscono con molecole del tessuto con conseguenze di vario ordine. Alcune sono di tipo chiaramente regressivo e si manifestano come fenomeni *degenerativi e necrotici* a carico delle cellule del parenchima, del connettivo e delle pareti vasali e a carico delle strutture acellulari del tessuto. Altri effetti non sono direttamente dannosi, ma provocano manifestazioni funzionali che comportano una regolazione del processo infiammatorio. È questa una materia di recente impostazione che probabilmente avrà sviluppi notevoli come appare da alcuni esempi. Tra gli effetti dei composti di riduzione dell'ossigeno sono rilevanti, la generazione di fattori chemiotattici nel plasma⁷⁵, la depolimerizzazione dell'acido ialuronico⁷⁶, la modificazione del collagene⁷⁷, le modificazioni dell'endotelio vasale⁷⁸ con probabile responsabilità nell'aumento di permeabilità⁷⁹ e nell'aumento di adesività, la regolazione della aggregazione piastrinica⁸⁰, l'attivazione della esocitosi piastrinica⁸¹, l'attivazione della secrezione di istamina da parte delle mast-cellule⁸², l'attivazione della blastizzazione dei linfociti⁸³. È importante far rilevare come tutto questo possa provocare, con una amplificazione del processo infiammatorio, un aumento di generazione di stimoli per l'attivazione metabolica e per l'esocitosi di altri leucociti.

RIASSUNTO

La relazione tratta del ruolo dei leucociti polimorfonucleati nella patogenesi dei danni da immunocomplessi. L'accento viene particolarmente posto sulle due principali funzioni che provocano danno tessutale: i) l'esocitosi, vale a dire la secrezione di enzimi e di altri fattori contenuti nei granuli; ii) l'attivazione del metabolismo ossidativo che comporta la produzione e il rilascio di composti tossici (superossido anione, acqua ossigenata, radicale idrossile), derivanti dalla riduzione dell'ossigeno.

Il fenomeno dell'interazione tra fattori immunitari e leucociti, il rapporto tra stimolo e risposta cellulare, i sistemi di regolazione della risposta stessa vengono discussi sia per quanto riguarda l'esocitosi che il metabolismo ossidativo.

SUMMARY

This paper deals with the role of polymorphonuclear leucocytes in the pathogenesis of immunocomplexes injury. The main mechanisms by which these cells cause tissue damage are described, namely: i) the secretion in the extracellular fluids of granule components (exocytosis); ii) the generation and the release of toxic compounds (superoxide anion; hydrogen peroxide, hydroxyl radical) derived from the activation of the oxidative metabolism (respiratory burst).

The interaction between leucocytes and immunological factors, the stimulus-cell response coupling, the mechanisms of control of the cell response are discussed with regard to the exocytosis and the respiratory burst.

Questo lavoro è stato eseguito con il contributo del C.N.R., contratto N. 78.02258.04.

BIBLIOGRAFIA

1. GOLDSTEIN I. M. - Polymorphonuclear leucocyte lysosomes and immune tissue injury. *Progr. Allerg.* 20: 301, 1976.
2. KLEBANOFF S. J., CLARK R. A. - In: *The Neutrophil: function and clinical disorders*, North Holland Publ. Co., Amsterdam, cap. 5, p. 217, 1978.
3. COCHRANE C. G. - Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leucocytes. *Adv. Immunol.* 9: 97, 1968.
4. HENSON P. M. - Pathologic mechanisms in neutrophil mediated injury. *Am. J. Pathol.* 68: 593, 1972.
5. COHN Z. A., HIRSCH J. G. - The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 112: 983, 1960.
6. SPITZNAGEL J. K. - Advances in the study of cytoplasmic granules of human neutrophil polymorphonuclear leucocytes. In: *The Phagocytic cell in Host Resistance* (J. H. BELLANTI e D. H. DAYTON eds.), Raven Press, New York, p. 77, 1975.
7. BAGGIOLINI M., BRETZ U., DEWALD B. - Biochemical and structural properties of the vacuolar apparatus of polymorphonuclear leucocytes. In: *Movement, Metabolism and Bactericidal Mechanisms of Phagocytes* (F. ROSSI, P. L. PATRIARCA e D. ROMEO eds.), Piccin Medical Books, Padova, p. 89, 1977.
8. BAINTON D. F., FARQUHAR M. G. - Origin of granules in polymorphonuclear leucocytes. Two types derived from opposite faces of Golgi complex in developing granulocytes. *J. Cell. Biol.*, 28: 277, 1966.
9. BAINTON D. F., ULLYOT J. L., FARQUHAR M. G. - The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow: Origin and content of azurophil and specific granules. *J. Exp. Med.* 134: 907, 1971.
10. OLSSON I. - Isolation of human leucocyte granules using colloidal silica-polysaccharide density gradient. *Exp. Cell. Res.* 54: 325, 1969.
11. ROBINEAUX J., FREDERIC J. - Contribution à l'étude des granulations neutrophiles des polynucéaires par la microcinematographie au contraste de phase. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 149: 486, 1955.
12. HIRSCH J. G., COHN Z. A. - Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.* 112: 1005, 1960.
13. HIRSCH J. G. - Cinematographic observations on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *J. Exp. Med.* 116: 827, 1962.
14. ZUCKER-FRANKLIN D., HIRSCH J. G. - Electron microscope studies of the degranulation of rabbit peritoneal leucocytes during phagocytosis. *J. Exp. Med.* 120: 569, 1964.
15. BAINTON D. F. - Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis of microorganisms. *J. Cell Biol.* 58: 249, 1973.
16. WEISSMANN G., ZURIER R. B., HOFFSTEIN S. - Leucocyte proteases and the immunological release of lysosomal enzymes. *Am. J. Pathol.* 68: 539, 1972.
17. HENSON P. M. - The immunological release of constituents from neutrophil leucocytes. The role of antibody and complement on non phagocytizable surface or phagocytizable particles. *J. Immunol.* 107: 1535, 1971.
18. BECKER E. L., HENSON P. M. - In vitro studies of immunologically induced secretion of mediators from cells and related phenomena. *Adv. Immunol.* 17: 93, 1973.
19. HENSON P. M. - Mechanisms of mediators release from inflammatory cells. In: *Mediators of Inflammation* (G. Weissmann ed.), Plenum Press, New York, 9, 1974.
20. ZURIER R. B., WEISSMANN G., HOFFSTEIN S., KAMMERMAN S., HSIN HSING TAI - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effect of cAMP and cGMP autonomic agonists and agents which effect microtubular function. *J. Clin. Invest.* 297: 309, 1974.
21. GOLDSTEIN I. M., HOFFSTEIN S. J., WEISSMANN G. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human polymor-

- phonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 66: 647, 1975.
22. SMITH R. J., IGNARRO L. J. - Bioregulation of lysosomal enzyme secretion from human neutrophils: Use of Guanosine-3':5'-monophosphate and calcium in stimulus-secretion coupling. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 108, 1975.
 23. DEPORTER D. A. - Microtubules, cyclic AMP and lysosomal enzyme release. A review. *Biomedicine* 28: 5, 1978.
 24. WEISSMANN G., RITE G. A. - Molecular basis of gouty inflammation: Interaction of monosodium urate crystals with lysosomes and lysosomes. *Nature (New Biol.)* 240: 167, 1972.
 25. HAWKINS D. - Biopolymer membrane. A model for the study of polymorphonuclear response to immune complexes. *J. Immunol.* 107: 344, 1971.
 26. DAVIES P., ALLISON A. C., FOX R. I., POLYZONIS M., HOSWELL A. D. - The exocytosis of polymorphonuclear leucocyte lysosomal enzymes induced by cytochalasin B. *Biochem. J.* 128: 78, 1972.
 27. GOLDSTEIN I. M., BRAI M., OSLER A. G., WEISSMANN G. - Lysosomal enzyme release from human leukocytes: mediation by the alternative pathway of complement activation. *J. Immunol.* 11: 33, 1973.
 28. GOLDSTEIN I. M., HOFFSTEIN S., GALLIN J., WEISSMANN G. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 2916, 1973.
 29. BECKER E. L., SHOWELL H. J. - The ability of chemotactic factor to induce lysosomal enzyme release. II. The mechanism of release. *J. Immunol.* 112: 2055, 1974.
 30. SHOWELL H. J., FREER R. J., ZIGMOND S. H., SCHIFFMANN E., ASWANIKUMAR S., CORCORAN B., BECKER E. L. - The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion by neutrophils. *J. Exp. Med.* 143: 1154, 1976.
 31. ZABUCCHI G., SORANZO M. R., ROSSI F., ROMEO D. - Exocytosis in polymorphonuclear leukocytes induced by A23187 and calcium. *FEBS Letters* 54: 44, 1975.
 32. ESTENSEN R. D., WHITE J. G., HOLMES B. - Specific degranulation of human polymorphonuclear leucocytes. *Nature (London)* 248: 347, 1974.
 33. WRIGHT D. G., BRALOVE D. A., GALLIN J. I. - The differential mobilization of human neutrophil granules. Effect of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am. J. Path.* 87: 273, 1977.
 34. HOFFSTEIN S., SOBERMAN R., GOLDSTEIN I., WEISSMANN G. - Concanavalin A induces microtubule assembly and specific granule discharge in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 68: 781, 1976.
 35. NACCACHE P. H., SHOWELL H. J., BECKER E. L., SHA'AFI R. I. - Changes of ion movements across rabbit polymorphonuclear leukocyte membrane during lysosomal enzyme release. Possible ionic basis for lysosomal enzyme release. *J. Cell Biol.* 75: 635, 1977.
 36. KORCHAK H. M., WEISSMANN G. - Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic response to surface stimulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 3818, 1978.
 37. GALLIN E. K., GALLIN J. I. - Interaction of chemotactic factors with human macrophages. Induction of transmembrane potential changes. *J. Cell Biol.* 75: 277, 1977.
 38. WEISSMANN G., GOLDSTEIN I., HOFFSTEIN S., CHAUVET G., ROBINEAUX R. - Yin/Yang modulation of lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leucocytes by cyclic nucleotides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 256: 222, 1975.
 39. OLIVER J. M. - Cell biology of leukocyte abnormalities. Membrane and cytoskeletal function in normal and defective cells. A review. *Am. J. Path.* 93: 219, 1978.
 40. ZURIER R. B., HOFFSTEIN S., WEISSMANN G. - Mechanism of lysosomal enzyme release from human leukocytes. I. Effect of cyclic nucleotides and colchicine. *J. Cell Biol.* 58: 27, 1973.
 41. MALAWISTA S. E. - Microtubules and mobilization of lysosomes in phagocytizing human leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253: 738, 1975.
 42. ZURIER R. B., WEISSMANN G., HOFFSTEIN S., KAMMERMAN S., TAI H. H. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effect of cAMP and cGMP autonomic agonists and agents which affect microtubule function. *J. Clin. Invest.* 53: 297, 1974.
 43. HOFFSTEIN S., GOLDSTEIN I., WEISSMANN G. - Role of microtubule assembly in lysosomal enzyme secretion from human polymorphonuclear leucocytes. A reevaluation. *J. Cell Biol.* 73: 242, 1977.
 44. JANOFF A. - Human granulocyte elastase. *Am. J. Path.* 68: 579, 1972.
 45. JANOFF A. - Neutrophil protease in in-

- flammation. *Ann. Rev. Med.* 23: 177, 1972.
46. LAZARUS G. S., DANIELS J. R., CIAN J., BURLEIGH M. C. - Role of granulocyte collagenase in collagen degradation. *Am. J. Path.* 68: 565, 1972.
 47. OLSSON J. - Biochemical properties of neutral proteases of human neutrophils. In: *Movement, Metabolism and Bactericidal Mechanisms of Phagocytes* (F. ROSSI, P. PATRIARCA and D. ROMEO, eds.), Piccin Med. Books, Padova, 1977, p. 103.
 48. TEDESCO F., TINCANI A., PATRIARCA P. - Polymorphonuclear leucocytes and the complement system: Their relationship in inflammation. In: *Movement, Metabolism and Bactericidal Mechanisms of Phagocytes* (F. ROSSI, P. PATRIARCA and D. ROMEO eds.), Piccin Medical Books, Padova, p. 129, 1977.
 49. WARD P. A., HIEL S. H. - C5 chemotactic fragments produced by an enzyme in lysosomal granules of neutrophils. *J. Immunol.* 104: 535, 1970.
 50. VENGE P., OLSSON I. - Cationic presence of human granulocytes. VI. Effect on the complement system and mediators of chemotactic activity. *J. Immunol.* 115: 1505, 1975.
 51. GREENBAUM L. M. - Leucocyte kininogenases and leukokininases from normal and malignant cells. *Am. J. Path.* 68: 613, 1977.
 52. MOVAT H. Z., STEINBERG S. G., HOBAL F. M., RANADIVE M. S. - Demonstration of a kinin-generating enzyme in the lysosome of human polymorphonuclear leukocytes. *Lab. Invest.* 29: 669, 1973.
 53. RAPAPORT S. I., HJORT P. - The blood clotting properties of rabbit peritoneal leucocytes in vitro. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 17: 222, 1967.
 54. NIEMETZ J. - Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity. *J. Clin. Invest.* 51: 307, 1972.
 55. KOCIBA G. J., GRIESEMER R. A. - Disseminated intravascular coagulation induced with leukocyte procoagulant. *Am. J. Path.* 69: 407, 1972.
 56. HAWIGER J., COLLINS R. D., HORN R. G. - Precipitation of soluble fibrin monomer complexes by lysosomal protein fraction of polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131: 349, 1969.
 57. OHLSON K., OLSSON I. - The neutral proteins of human granulocytes. Isolation, partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur. J. Biochem.* 36: 473, 1973.
 58. SABA H. I., HENSON J. C., WALKER R. I., ROBERTS H. R. - Effect of lysosomal cationic proteins from polymorphonuclear leucocytes upon fibrinogen and fibrinolysis system. *Thromb. Res.* 7: 543, 1957.
 59. BURKE J. S., URINHARA T., MACMORINE D. R. L., MOVAT H. Z. - A permeability factor released from phagocytosing PMN leukocytes and its inhibition by protease inhibitors. *Life Sci.* 3: 1505, 1964.
 60. RANADIVE H. S., COCHRANE C. G. - Mechanisms of histamine release from mast cells by cation protein (Band 2) from neutrophil lysosomes. *J. Immunol.* 106: 506, 1971.
 61. KELLY M. T., WHITE A. - An inhibitor of histamine release from human leukocytes. *J. Clin. Invest.* 53: 1343, 1974.
 62. ZEIGER R. S., TWAROG F. J., COLTEN H. R. - Histaminase release from human granulocytes. *J. Exp. Med.* 144: 1049, 1976.
 63. KARNOVSKY M. L. - Metabolic basis of phagocytic activity. *Physiol. Rev.* 42: 143, 1962.
 64. ROSSI F., ROMEO D., PATRIARCA P. - Mechanisms of phagocytosis-associated oxidative metabolism in polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 12: 127, 1972.
 65. ROSSI F., PATRIARCA P., ROMEO D. - Metabolic changes accompanying phagocytosis. In: *The Reticuloendothelial System* (M. ESCOBAR et al. eds.), Plenum Press, New York, 1979, vol. II (in press).
 66. BABIOR B. M. - Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl. J. Med.* 298: 659, 721, 1978.
 67. PATRIARCA P., CRAMER R., MONCALVO S., ROSSI F., ROMEO D. - Enzymatic basis of metabolic stimulation in leukocytes during phagocytosis: the role of activated NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 145: 255, 1971.
 68. PATRIARCA P., CRAMER R., DRI P., FANT L., BASFORD R. E., ROSSI F. - NADPH oxidizing activity in rabbit polymorphonuclear leukocytes: localization in azurophilic granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 830, 1973.
 69. IVERSON D. B., WANG-IVERSON P., SPITZNAGEL J. K., DE CHATELET L. R. - Subcellular localization of NAD(P)H oxidase(s) in human neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 176: 175, 1978.
 70. DEWALD B., BAGGIOLINI M., CURNUTTE J. T., BABIOR B. M. - Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 63: 21, 1979.

71. ROMEO D., ROSSI F. - Role of cell surface in the regulation of oxidative metabolism of the phagocyte. *Acta Vitam. Enzymol.* 27: 145, 1973.
72. ROMEO D., CRAMER R., ROSSI F. - Use of 1-anilino-8-naphtalene to study structural transitions in cell membrane of PMN leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 582, 1970.
73. FRIDOVICH I. - Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: *Free radicals in pathology* (W. A. PRIYOR ed.), Academic Press, Vol. I, p. 239, 1976.
74. SALIN M. L., McCORD J. M. - Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leucocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 56: 1319, 1975.
75. McCORD J. M. - 1978, Personal communication.
76. McCORD J. M. - Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185: 529, 1974.
77. GREENWALD R. A., MOY W. W. - Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheum.* 22: 251, 1979.
78. SACKS T., MOLDOW C. F., CRADDOCK P. R., BOWENS T. N., JACOBS H. S. - Oxygen radicals mediated endothelial cell damage by complement stimulated granulocytes. *J. Clin. Invest.* 61: 461, 1978.
79. BJÖRK J., DEL MAESTRO R. F., ARFORS K. E. - International meeting on Inflammation, Verona 1979. Abstracts Book.
80. LEVINE P. H., WEINGER R. S., SIMON J. A., SEON K. L., KRINSKY N. I. - Leucocyte-platelet interaction. Release of hydrogen peroxide by granulocytes as modulator of platelet reactions. *J. Clin. Invest.* 57: 955, 1976.
81. HANDIN R. I., KARABIN R. and BOXER J. - Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J. Clin. Invest.* 59: 959, 1977.
82. OHMORI H., KOMORYIA K., AZUMA A., KUROZUMI S., HASHIMOTO Y. - Xanthine oxidase-induced histamine release from isolated rat peritoneal mast-cells: involvement of hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* 28: 333, 1979.

LA STAMPA E LA TIPOGRAFIA

La stampa è un'arte che ha accompagnato l'umanità fin dai primi tempi della civiltà. Ha permesso di diffondere le conoscenze, di conservare le tradizioni e di creare nuove opere d'arte. La tipografia, in particolare, è la disciplina che si occupa della preparazione e della stampa dei testi. Ha visto nascere grandi maestri e artisti, che hanno dato forma e bellezza alle parole stampate. Oggi, con l'avvento della tecnologia, la stampa si è evoluta, ma il suo ruolo rimane fondamentale nella comunicazione e nella cultura.

La storia della stampa è ricca di eventi e personaggi. Dallo sviluppo delle prime macchine a ruota, alla rivoluzione industriale, fino all'era digitale, ogni fase ha portato innovazioni e cambiamenti. La tipografia ha sempre cercato di migliorare la qualità della stampa, sia in termini tecnici che estetici. Oggi, con i computer e i software, la stampa è diventata ancora più precisa e versatile. Ma non bisogna dimenticare le radici di questa arte, che continuano a ispirare i professionisti del settore.

La stampa ha un ruolo importante nella nostra società. È uno strumento che ci permette di accedere a informazioni, di esprimere le nostre idee e di partecipare alla vita culturale. La tipografia, con la sua arte e la sua scienza, contribuisce a rendere la stampa più piacevole e efficace. In un'epoca di rapidi cambiamenti, la stampa rimane una delle attività più preziose e durature. È un'arte che si rinnova, che si adatta e che continua a essere una parte integrante della nostra vita quotidiana.