

L 74

UN NUOVO TEST DI FUNZIONALITA' FAGOCITARIA BASATO SULLA MISURA DELLA PRODUZIONE DI ANIONE SUPEROSSIDO (O_2^-). II. CONDIZIONI DI APPLICABILITA' E RISULTATI OTTENUTI IN CASI PATOLOGICI

P. Bellavite, P. Dri* e V. Della Bianca**

Riassunto

P. Bellavite, P. Dri e V. Della Bianca

Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla misura della produzione di anione superossido (O_2^-). II. Condizioni di applicabilità e risultati ottenuti in casi patologici

LAB, J. Res. Lab. Med., VII, 1, 77-82, (1980).

La misura della produzione di superossido (O_2^-) da parte dei granulociti stimolati con zimosan opsonizzato è un buon indice di funzionalità fagocitaria. Il metodo "diretto" richiede meno di 1 ml di sangue, in quanto non prevede l'isolamento dei leucociti; il saggio viene eseguito in solo 15 min. di incubazione più 10 min. di centrifugazione delle provette, ed è molto sensibile nel rivelare eventuali deficit umorali o cellulari. Il test "in due fasi" consente di distinguere tra difetti di opsonizzazione e difetti di attivazione metabolica leucocitaria. Anche di quest'ultima variante del metodo sono state determinate le condizioni migliori di applicabilità, sulla base di esperimenti eseguiti con sangue di soggetti normali e portatori di anomalie del sistema fagocitario.

Summary

P. Bellavite, P. Dri and V. Della Bianca

A new test for phagocytic function that measures superoxide anion (O_2^-) production. II. Optimal assay conditions and preliminary results

LAB, J. Res. Lab. Med., VII, 1, 77-82, (1980).

The measurement of superoxide anion (O_2^-) produced by granulocytes challenged with opsonized zymosan has been found to be a rapid and sensitive index of phagocytic function. The "direct test" requires less than 1 ml of whole blood and it is carried out in 25 min (15 min incubation plus 10 min centrifugation) and reveals disorders of phagocytic function dependent on both humoral and cellular factors. The "two stage" test allows distinguishing humoral defects (those dependent on opsonization) from those dependent on the functional integrity of the granulocytes. In this paper we describe the optimal experimental conditions for the execution of the "direct" and "two stage" tests. The preliminary results obtained with blood from normal humans and blood from subjects with phagocytic disorders are also reported.

Introduzione

In un precedente lavoro ¹ abbiamo descritto un nuovo test di funzionalità fagocitaria che si basa sulla misura del superossido prodotto da parte dei granulociti del sangue stimolati con zimosan. Di questo metodo sono stati esposti i fondamenti teorici, le modalità di esecuzione e i vantaggi che presenta rispetto ad altri metodi analoghi.

Il test - nella sua variante "diretta" - consiste nella incubazione di sangue intero con zimosan, in presenza di citocromo c. Nel mezzo di saggio avviene la opsonizza-

zione dello zimosan da parte del plasma, la stimolazione dei fagociti da parte dello zimosan opsonizzato e la conseguente produzione di O_2^- , che viene dosato in base alla riduzione del citocromo c. Nel lavoro citato è stata anche descritta una variante del test, chiamata "in due fasi", che consente di esaminare separatamente le fasi umorale e cellulare del meccanismo della fagocitosi, allo scopo di stabilire più precisamente a quale livello si trovi un eventuale difetto.

Lo scopo del test è quello di indagare simultaneamente le due tappe fondamentali del processo fagocitario: la opsonizzazione e la attivazione metabolica dei leucociti. Il metodo consente di accertare se pazienti particolarmente suscettibili alle infezioni o comunque esposti a tale rischio (per malattie o per terapie immunodepressive), sono portatori di un difetto in questo settore delle difese immunitarie.

Questo lavoro è stato realizzato con il contributo del C.N.R. N° 78.02258.04 Istituto di Patologia Generale, Università di Padova - Sede di Verona

*Istituto di Patologia Generale dell'Università - Trieste

**Servizio di Batteriologia e Immunologia, Ospedale Civile - Pordenone
Lavoro giunto in Redazione il 20-11-1979

Qui riportiamo i primi risultati ottenuti, in riferimento a: 1) prove preliminari di applicabilità del metodo in varie condizioni sperimentali, 2) possibili interferenze da parte di altri elementi cellulari presenti nel sangue, 3) valori medi ottenuti in soggetti normali e studio di casi patologici. Saranno infine discusse le possibilità di utilizzazione del test in clinica, come una delle principali prove di laboratorio da eseguirsi nei casi di pazienti in cui si sospetti l'esistenza di difetti di funzionalità fagocitaria.

Materiali e Metodi

I materiali e i metodi utilizzati sono stati descritti in un precedente lavoro ¹. I dettagli sperimentali e eventuali variazioni apportate ai tempi e modi di esecuzione, sono riportati nelle didascalie delle Figure e Tabelle.

Risultati

Le condizioni ottimali di stimolazione dei fagociti sono state determinate in seguito a una serie di esperimenti preliminari, i cui risultati sono riportati nelle Figure 1, 2, 3 e 4.

Produzione di O_2^- in funzione del tempo e della quantità di sangue

L'andamento nel tempo del fenomeno in esame appare nella Figura 1. Si vede che mentre il sangue non trattato con zimosan rilascia quantità bassissime di superossido, sotto stimolazione si ha un incremento progressivo che ha un andamento diverso a seconda dei metodi usati: col sangue intero (metodo "diretto") è lento nei primi minuti e poi lineare fino a circa 15-20 min. La minor velocità iniziale dipende dal fatto che la stimolazione inizia quando lo zimosan comincia ad essere opsonizzato, cosa che richiede un certo tempo. Ciò è confermato dal fatto che col sangue lavato, stimolato con zimosan opsonizzato in precedenza, l'andamento è più rapido e lineare già nei primi minuti. I tempi di saggio adottati negli esperimenti successivi sono stati di 15 min per il metodo rapido e di 10 min per quello in due fasi. Sulla base delle esperienze acquisite si è visto che quando si usa sangue con alta concentrazione di PMN ($> 10^4$ PMN/mm³) è opportuno diminuire leggermente il tempo di incubazione per non eccedere le capacità di misura del sistema. In Figura 2 è mostrata la relazione tra rilascio di O_2^- e quantità di sangue usata nel saggio. Con quantità inferiori a 0.1 ml di sangue si ottiene una scarsa stimolazione metabolica, probabilmente perchè si ha un'eccessiva diluizione del plasma e delle cellule nel mezzo di incubazione. Con quantità superiori a 0.3 ml la misura non è più lineare, probabilmente perchè la produzione di O_2^- è superiore alle capacità di cattura da parte del citocromo c. La quantità di 0.2 ml è stata perciò considerata quella ottimale per ottenere una misura attendibile e ben evidenziabile di O_2^- .

Influenza del numero di granulociti e delle altre cellule ematiche

La capacità del metodo di evidenziare correttamente la produzione di O_2^- anche in condizioni di leucopenia o di

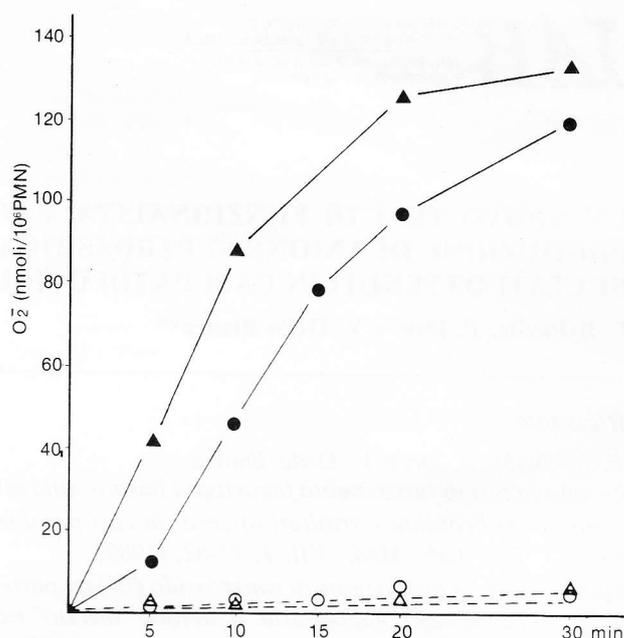


Fig. 1 - Andamento nel tempo della produzione di superossido da parte di PMN umani

● e ○ ——— ○: Prove eseguite secondo il metodo "diretto" rispettivamente in presenza e in assenza di 1 mg di zimosan.
▲ e △ ——— △: Prove eseguite incubando la sospensione cellulare, preparata secondo il metodo "in due fasi", rispettivamente in presenza e in assenza di 1 mg di zimosan precedentemente opsonizzato con plasma umano fresco

leucocitosi è stata valutata con l'esperimento riportato in Figura 3. A campioni dello stesso sangue sono stati sottratti (mediante filtrazione attraverso fibre di nylon) o aggiunti PMN dello stesso soggetto, isolati mediante sedimentazione del sangue in destrano ². Si sono così ottenuti campioni di sangue con diverse concentrazioni di PMN. I risultati dimostrano che la produzione di O_2^- è in funzione lineare della quantità di granulociti pre-

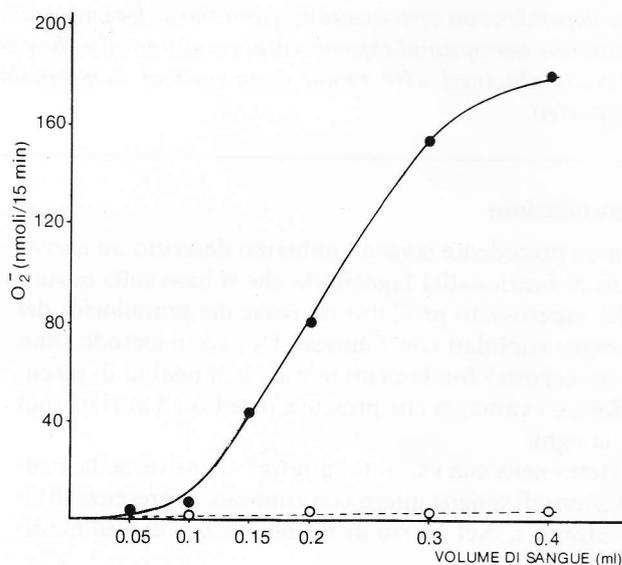


Fig. 2 - Produzione di superossido da parte di quantità diverse di sangue. Prove eseguite secondo il metodo "diretto"

●: Sangue incubato in presenza di 1 mg di zimosan;
○: Sangue incubato in assenza di zimosan.
La concentrazione dei PMN nel sangue usato in questo esperimento è di 5000/mm³

senti, almeno fino a 9.000 PMN/mm³. Ciò dimostra anche le altre cellule presenti nel sangue non producono superossido in quantità tali da alterare i risultati del test. A questo proposito, è stato recentemente dimostrato anche da altri che i globuli rossi, le piastrine e i linfociti non vanno soggetti ad attivazione metabolica in presenza di sostanze che invece stimolano i PMN³. Per valutare l'incidenza dei monociti, ne abbiamo misurato, in preparazioni prive di PMN, la produzione di O₂⁻: essa ammonta, nelle nostre condizioni, a circa 40 nmoli/15 min/10⁶ monociti. Questi dati sono in accordo con quelli di altri autori⁴ che riportano una produzione di O₂⁻ pari a circa la metà di quella dei PMN. L'interferenza dei monociti è perciò quantitativamente trascurabile quando nel sangue la percentuale di tale tipo cellulare rimane inferiore al 5% circa. In caso contrario, si potranno correggere i valori ottenuti con opportuni calcoli.

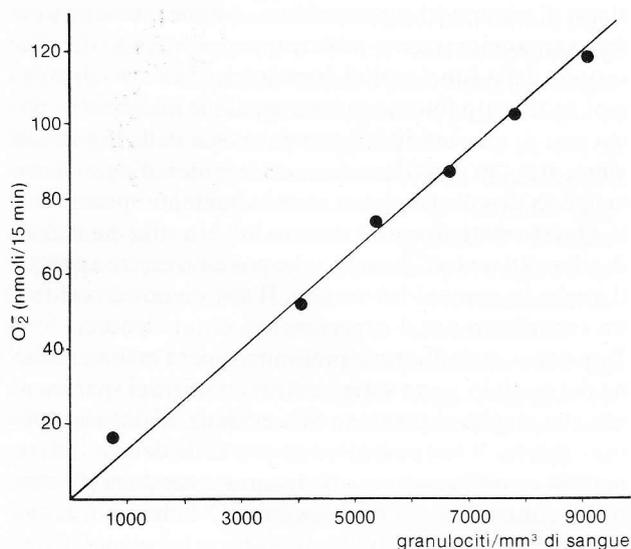


Fig. 3 - Produzione di superossido da parte di 0.2 ml di sangue con diverse concentrazioni di granulociti. Prove eseguite secondo il metodo "diretto", incubando il sangue con 1 mg di zimosan

Condizioni di opsonizzazione dello zimosan.

Nel caso che il test di funzionalità fagocitaria venga applicato nella sua variante "in due fasi", diviene importante conoscere le condizioni di opsonizzazione dello zimosan. La Figura 4 dimostra che mentre lo zimosan non opsonizzato non stimola il rilascio di O₂⁻ da parte dei PMN, aumentando la concentrazione del plasma nel mezzo di incubazione per l'opsonizzazione, cresce anche la capacità stimolante del materiale usato. Già con il 10-15% di plasma si raggiunge il massimo effetto opsonizzante. È evidente perciò che eventuali difetti a livello umorale possono essere meglio svelati usando concentrazioni relativamente basse (5-15%) di plasma nel mezzo di incubazione.

Interferenza da parte dell'emolisi.

Il metodo qui descritto viene eseguito su sangue e potrebbe per questo andare soggetto ad interferenze da

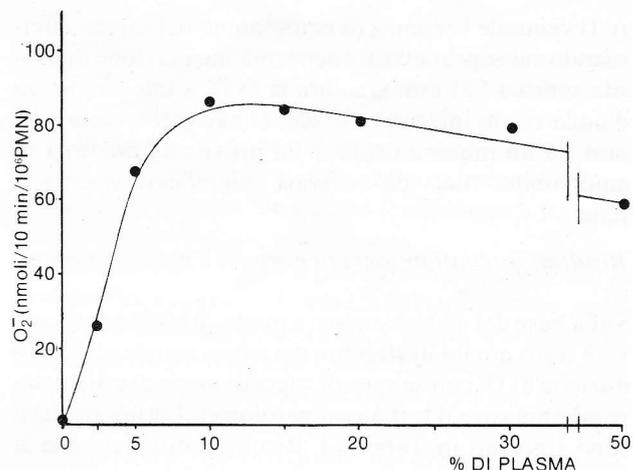


Fig. 4 - Produzione di superossido da parte di PMN incubati con zimosan opsonizzato con diverse concentrazioni di plasma.

Lo zimosan è stato incubato per 20 min. a 37°C, con agitazione, sospeso in tampone Krebs-Ringer-Fosfati contenente 5 mM glucosio e 0.5 mM CaCl₂ e diverse concentrazioni di plasma umano fresco. Al termine è stato lavato con lo stesso tampone e quindi usato per la stimolazione dei PMN. La produzione di O₂⁻ è stata misurata secondo il metodo "in due fasi", cioè utilizzando una sospensione cellulare preparata dal sangue mediante lavaggio con tampone Krebs-Ringer-Fosfati. I valori riportati sono la media di due esperimenti

parte di eventuale emolisi. Per valutare questa possibilità è stata eseguita una prova di produzione di O₂⁻ in presenza di emolisato di globuli rossi. Dalla Figura 5 si nota che c'è effettivamente una progressiva diminuzione del superossido misurato, con l'aumentare della concentrazione di emoglobina nel saggio. L'inibizione potrebbe essere dovuta alla cattura dell'O₂⁻ da parte della stessa emoglobina⁵, oppure alla SOD dei globuli rossi emolizzati⁶. Per quanto l'inibizione non sia totale, è evidente che questo metodo deve essere applicato a sangue in cui non siano presenti fenomeni marcati di emolisi. In caso contrario, si deve effettuare il saggio con sangue lavato con tampone.

L'esperienza acquisita finora col metodo qui descritto dimostra che usando sangue di soggetti esenti da malattie emolitiche, non si presenta alcun problema di interferenze da emolisi. A scopo pratico, è possibile verifica-

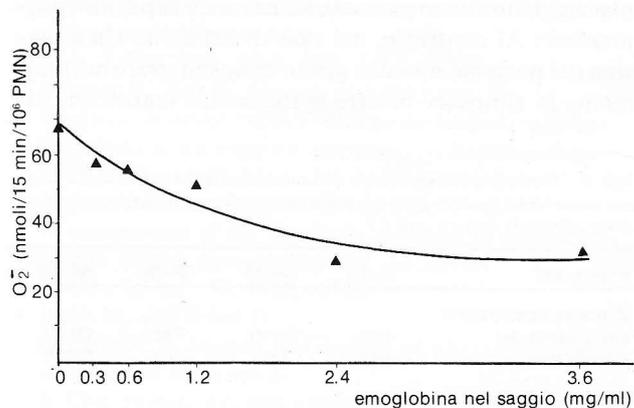


Fig. 5 - Effetto dell'emolisi sulla produzione di superossido da parte dei PMN. Le prove sono state eseguite secondo il metodo "diretto", incubando sangue intero con 1 mg di zimosan, in presenza di quantità diverse di un emolisato di globuli rossi dello stesso soggetto. L'emolisato è stato preparato sottoponendo le cellule a ripetuti trattamenti di "gelo-sgelo" e quindi centrifugando a 8000 g per 5 min

re l'eventuale presenza di emoglobina nel saggio effettuando sui sopranatanti anche una misurazione di densità ottica a 575 nm. Qualora la O.D. a tale lunghezza d'onda risulti inferiore a 0.200, si può essere sicuri che non c'è un inquinamento della prova con quantità di emoglobina tali da alterare significativamente i risultati.

Risultati ottenuti in soggetti normali e in casi patologici.

Sulla base del metodo messo a punto, il lavoro successivo è stato quello di stabilire dei valori standard di produzione di O_2^- con sangue di soggetti normali e di iniziare ad applicare il test a casi patologici. I primi risultati sono riportati in Tabella I. Risulta molto evidente la differenza tra i valori normali e quelli dei pazienti portatori di difetti della funzionalità fagocitaria. E' quindi possibile affermare che il test può essere adottato con sicurezza nella diagnosi di questo tipo di malattie.

Tab. I - Produzione di superossido da parte di sangue umano misurata secondo il metodo "diretto"

	Sangue + Zimosan	Sangue senza Zimosan
Controllo (28 soggetti apparentemente sani)	87.9 ± 16.7	2.5 ± 1.9
Malattia granulomatosa cronica (paziente A.Z.)	0.07	0.0
Deficienza di C4 (paziente C.B.)	2.8	0.8

Valori in nmoli O_2^- /15 min/10⁶ PMN ± deviazione standard

Il metodo oggetto di questo lavoro è quindi efficace nel segnalare l'esistenza di una patologia del sistema fagocitario. Un passo avanti nelle indagini diagnostiche può essere fatto col test "in due fasi", che consente di discriminare tra i due grandi gruppi, umorale e cellulare, di deficit della fagocitosi. Come si vede dalla Tabella II, il test in due fasi ha dimostrato che nella CGD il difetto risiede a livello dei sistemi respiratori cellulari mentre il plasma dello stesso paziente ha normale capacità opsonizzante. Al contrario, nel caso di deficit da C4 il plasma del paziente non è in grado di opsonizzare normalmente lo zimosan, mentre le sue cellule fagocitarie di-

Tab. II - Produzione di superossido misurata secondo il metodo "in due fasi" con sangue di un paziente affetto da malattia granulomatosa cronica e di un paziente affetto da deficienza di C4

n° provette*:	1A-1B	2A-2B	3A-3B	4A-4B
Zimosan opsonizzato con plasma del:	Paz.	Contr.	Paz.	Contr.
Cellule del:	Paz.	* Paz.	Contr.	Contr.
Esperimento 1 (malattia granulomatosa cronica)	0.7	0.6	144.0	96.6
Esperimento 2 (deficienza di C4)	2.8	80.0	3.7	104.0

*Le prove sono state allestite secondo il metodo "in due fasi" descritto da Bellavite et al. ¹

I valori sono in nmoli/10 min/10⁶ PMN

mostrano normale attivazione metabolica quando cimentate con zimosan opsonizzato con plasma del controllo.

Il fatto che si sia trovato un difetto di opsonizzazione dello zimosan in un caso di deficienza di C4 può sembrare strano in base alla considerazione che lo zimosan attiva il complemento attraverso la via alternata⁷. La nostra osservazione è però sostenuta anche da quella precedente di altri autori⁸, che hanno descritto la stessa incapacità di opsonizzare normalmente lo zimosan in un paziente C4 deficiente, almeno con basse concentrazioni di plasma (5-10%). In effetti, anche nel nostro caso, prove eseguite secondo il test "in due fasi" con concentrazioni crescenti di plasma hanno dimostrato un progressivo miglioramento del potere di opsonizzazione fino a raggiungere livelli normali attorno al 20% di plasma (dati non riportati in Tab.).

Discussione e Conclusioni

Il test di misura del superossido su sangue intero può essere vantaggiosamente utilizzato come metodo di valutazione della funzionalità fagocitaria. Tale tipo di indagini ha trovato finora scarsa attenzione in clinica e i pochi casi di pazienti in cui una patologia della fagocitosi viene presa in considerazione tra le ipotesi diagnostiche vengono di solito inviati a centri altamente specializzati. Questo stato di cose è dovuto in parte alla mancanza di adeguati metodi di studio che possano essere applicati anche in comuni laboratori. Il test da noi descritto è un contributo per il superamento di tale lacuna.

Dopo una serie di prove preliminari per l'ottimizzazione del metodo, sono state scelte le condizioni sperimentali che meglio si prestano alla evidenziazione di eventuali difetti. Il test così messo a punto dà dei risultati ripetibili e con variazioni abbastanza ristrette nell'ambito dei controlli sani finora eseguiti. Ciò che è più degno di nota è però la sensibilità dimostrata nel segnalare l'esistenza di un difetto di uno dei sistemi che portano alla attivazione metabolica: sia nei casi di CGD che nei casi di deficit di frazioni complementari la produzione di O_2^- da parte del sangue dei pazienti è risultata eguale o molto vicina a zero. Le successive prove eseguite "in due fasi" sono state altrettanto efficaci nel discriminare tra difetti cellulari e difetti umorali.

Rispetto agli altri metodi possibili per valutare lo stesso fenomeno biologico, quello qui proposto presenta indubbi vantaggi. Innanzitutto una importante innovazione sta nel fatto che si può esaminare contemporaneamente nella sua globalità il sistema fagocitario, sia nei suoi meccanismi umorali che in quelli cellulari: le condizioni sperimentali adottate tendono a riprodurre *in vitro* ciò che avviene *in vivo* quando nel sangue o nel focolaio infiammatorio sono presenti particelle estranee, plasma e fagociti.

La piccola quantità di sangue necessaria per eseguire il test "diretto" (circa 1 ml) permette di estendere l'uso della metodica anche a casi particolari come neonati o pazienti in shock, oppure a casi in cui si voglia effettuare un "monitoraggio" della funzione fagocitaria con

5

prelievi successivi nel tempo. Ulteriori caratteristiche vantaggiose del nostro metodo sono la sua brevità di esecuzione (disponendo delle soluzioni pronte, o dei materiali liofilizzati e pronti all'uso, si può portare a termine in mezz'ora) e la semplicità della strumentazione necessaria (un bagno termostato, una centrifuga da tavolo e uno spettrofotometro).

L'esperienza finora acquisita ha fatto emergere alcuni problemi che, pur non essendo particolarmente rilevanti, devono essere segnalati. Con il test "diretto", che usa sangue intero, la concentrazione di plasma nel mezzo di incubazione varia ovviamente a seconda dell'ematocrito. Di ciò si deve tenere conto nel valutare i risultati quando questo parametro si allontani troppo dai valori normali. Ad esempio, mentre con un ematocrito del 45% la concentrazione finale del plasma nel saggio sarà dell'11%, con un ematocrito del 70% scenderà al 6%, fatto questo che potrà dar luogo a risultati falsamente bassi.

E' opportuno inoltre sottolineare che, se il difetto è a livello umorale, un risultato del test "diretto" che dia valori bassissimi di produzione di O_2^- non significa sempre che il difetto sia totale. Poichè infatti il plasma viene ad essere diluito nel mezzo di saggio, anche con un difetto parziale si può determinare una drastica diminuzione delle possibilità di opsonizzazione dello zimosan. Questo fatto è utile perchè aumenta la sensibilità del metodo; quando però viene trovato un caso patologico è opportuno, per precisare l'entità del difetto, valutare la capacità opsonizzante del plasma a varie diluizioni.

Valori molto alti di rilascio di superossido (120-150 nmoli/15 min/10⁶ PMN) sono stati ottenuti col test "rapido" in alcuni casi di pazienti con infezioni batteriche in atto. Ciò potrebbe significare non solo che non sussistevano difetti nel sistema fagocitario, ma che vi era un'esaltata risposta metabolica. Il fatto che in caso di infezione la fagocitosi possa essere addirittura maggiore che nei soggetti apparentemente sani è stato documentato anche da altri⁹.

Da quanto detto risulta che il test qui descritto è un valido ausilio diagnostico per lo studio di una buona parte dei difetti di funzionalità fagocitaria. Il metodo "diretto" ci dice semplicemente se c'è o no una patologia di questo settore delle difese dell'organismo. In base ai risultati si decide se è il caso di approfondire le indagini, cosa che può essere attuata in primo luogo con il test "in fue fasi" e poi con altre prove quali dosaggio di frazioni complementari, studi su cellule isolate, misura di attività enzimatiche.

Il campo di applicazione del test potrà essere molto vasto. Infatti, come è stato ampiamente documentato nel precedente lavoro¹, sono numerose le condizioni in cui sono stati dimostrati difetti nei poteri di opsonizzazione del plasma o nelle frazioni cellulari coinvolte nella attivazione metabolica dei granulociti. In particolare, le condizioni più importanti in cui il test potrebbe fornire importanti informazioni sono: a) bambini affetti da infezioni batteriche ricorrenti, per escludere o affermare l'esistenza di deficienze congenite dei granulociti

(malattia granulomatosa cronica) o del sistema complementare (in particolare di fattori della via alternata, di C3, di C5), b) pazienti affetti da malattie di varia natura, in cui è comunque presente un "alto rischio" di infezioni, c) controllo di terapie potenzialmente dannose a livello del sistema fagocitario (corticosteroidi, sulfamidici, fenilbutazone, tetraciclina).

A queste considerazioni si può aggiungere anche che in prospettiva il metodo di misura del superossido potrà fornire interessanti conoscenze a livello sperimentale. Con opportune modifiche il metodo descritto può essere applicato a svariate preparazioni cellulari, come ad esempio leucociti di essudati infiammatori, macrofagi di vari distretti, monociti o altri tipi di cellule (tumoral, leucemiche) in cui si desidera mettere in evidenza produzione di superossido. E' attualmente in corso di sperimentazione la applicazione del metodo anche al controllo della funzionalità di concentrati leucocitari preparati, con varie tecniche, a scopo trasfusionale.

Un'altra prospettiva di estensione del metodo consiste nella possibilità di utilizzare diversi agenti stimolanti al posto dello zimosan. Con una tale variante è possibile studiare lo stato delle difese fagocitarie nei confronti di determinati batteri. Nel caso che un paziente sia affetto da infezioni recidivanti di cui sia sempre responsabile lo stesso microorganismo, si potrebbe testare *in vitro* la risposta leucocitaria a quel particolare agente infettivo, per verificare se esiste un difetto specifico.

Gli Autori ringraziano il Prof. Filippo Rossi e il Prof. Pierluigi Patriarca per i loro utili suggerimenti.

Bibliografia

1. Bellavite P., Dri P., Berton G. e Zabucchi G.
Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla misura della produzione di anione superossido (O_2^-). I Principi generali ed esecuzione
Lab. J. Res. Lab. Med., VII, 1, 67, (1980).
2. Cramer R., Dri P., Gavioli A. e Patriarca P.
Studio delle proprietà biochimiche dei leucociti polimorfonucleati di un soggetto carente di mieloperossidasi
LAB, J. Res. Lab. Med., III, 1, 13, (1976).
3. Sagone A.L. Jr., King W.G. and Metz E.M.
A comparison of the metabolic response to phagocytosing in human granulocytes and monocytes
J. Clin. Invest., 57, 1352, (1976).
4. Reiss M. and Roos D.
Difference in oxygen metabolism of phagocytosis monocytes and neutrophils
J. Clin. Invest., 61, 480, (1978).
5. Winterbourn C.C., McGrath B.M. and Carrel R.W.
Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins
Biochem. J., 155, 493, (1976).
6. Rotilio G., Rigo A., Bracci R., Bagnoli F., Sargentini I. and Brunori M.

Determination of red blood cell superoxide dismutase and glutathione peroxidase in newborns in relation to neonatal hemolysis
Clin. Chim. Acta, 81, 131, (1977).

7. Götze O. and Müller-Eberhard H.J.
The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation
J. Exp. Med., 134, 90, (1971).

8. Klebanoff S.J. and Clark R.A.
Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: a re-evaluation
J. Lab. Clin. Med., 89, 675, (1977).

9. Stossel T.P.
Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infections and with phagocytic disorders
Blood, 42, 121, (1973).