

Misura della produzione di superossido da parte di granulociti nel sangue intero.

* P. Bellavite, * V. della Bianca, ** P. Dri.

* Istituto di Patologia Generale dell'Università di Padova, Sede di Verona, Strada Le Grazie, 37134 Verona.

** Istituto di Patologia Generale dell'Università di Trieste, Via Fleming 22, 34100 Trieste.

INTRODUZIONE

Viene qui descritto un test per la valutazione quantitativa della funzionalità metabolica dei granulociti e della capacità opsonizzante del plasma. Il principio base del metodo è la misura della produzione di superossido (O_2^-) da parte dei granulociti durante l'incubazione di sangue intero con zimosan e con forbolo-miristato-acetato (PMA). Incubando il sangue in presenza di zimosan non preventivamente opsonizzato la opsonizzazione avviene ad opera del plasma contenuto nello stesso sangue. Solo quando adeguatamente opsonizzato lo zimosan è in grado di interagire con i recettori della membrana dei granulociti e di attivare il metabolismo cellulare. I granulociti attivati producono e rilasciano all'esterno notevole quantità di O_2^- , che reagisce col citocromo c, presente nel mezzo di incubazione riducendolo secondo la reazione $O_2^- + Fe^{++}$ citocromo c $\rightarrow O_2 + Fe^{++}$ citocromo c (1-3). Il citocromo c ridotto viene misurato spettrofotometricamente in base alla differenza di assorbanza a 550-468 nm (4). In parallelo vengono eseguiti controlli in presenza di superossidodismutasi (SOD), enzima che catalizzando la reazione $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$, impedisce che il citocromo c venga ridotto dal superossido (5).

Con tale metodica si possono rivelare sia difetti umorali dei sistemi di opsonizzazione, sia difetti cellulari nei meccanismi di riconoscimento, di attivazione metabolica e di produzione di O_2^- (4-6). Per distinguere i difetti umorali da quelli cellulari si possono eseguire delle prove in presenza di zimosan pretrattato con sieri normali o di forbolo-miristato-acetato, un potente stimolante solubile dei granulociti. In questo caso viene saltato lo stadio della opsonizzazione e si valuta solo la funzionalità granulocitaria.

I principali vantaggi di questo test sono: 1) valutando contemporaneamente sia la funzione opsonizzante del plasma che la funzione dei granulociti, permette di individuare un'ampia parte di difetti del sistema fagocitario; 2) il test viene eseguito con un piccolo campione di sangue (1-2 ml) e non richiede l'isolamento dei granulociti; 3) la tecnica è semplice e prevede l'uso di strumenti comunemente presenti in tutti i laboratori.

MATERIALI

Sangue. Il sangue viene raccolto con siringa di plastica contenente 10 unità di eparina per ogni ml di sangue. Prima del saggio il sangue viene conservato a temperatura ambiente per non più di 5 ore.

Reagenti. Zimosan, Tipo A; forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA); Citocromo c, tipo VI; superossidodismutasi (SOD) e N-etilmaleimide sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA. Gli altri reagenti sono del massimo grado di purezza. La soluzione Krebs-Ringer fosfati contenente glucosio e calcio (KRP) è così composta: 21 ml di tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4 + 100 ml di sol. fisiologica (NaCl 0.9%) + 4 ml di KCl 0.154 M + 1 ml di $MgCl_2$ 0.154 M + 0.63 ml di $CaCl_2$ 0.1 M + 100 mg di glucosio per ogni 100 ml di soluzione.

Lo Zimosan viene sospeso in 0.9% NaCl alla concentrazione di 20 mg/ml, facendo attenzione che non rimangano degli aggregati e bollito a bagnomaria per 10 minuti. Viene quindi centrifugato a 1000 x g per 10 minuti e risospeso in KRP alla concentrazione di 10 mg/ml. Lo Zimosan opsonizzato viene preparato incubando lo Zimosan sospeso in KRP alla concentrazione di 10 mg/ml con 15% di un pool di sieri umani freschi. Dopo l'incubazione (20 minuti a 37° C con agitazione) lo Zimosan opsonizzato viene centrifugato e risospeso in KRP alla concentrazione di 10 mg/ml. Il PMA viene sciolto in dimetilsolfossido alla concentrazione di 0.1 mg/ml. Citocromo c e SOD vengono sciolti in KRP alla concentrazione di 30 mg/ml e di 2 mg/ml rispettivamente.

METODO

Il test completo prevede la misura della produzione di superossido in assenza e in presenza di agenti che stimolano il metabolismo ossidativo dei granulociti. Allo scopo vengono allestite 4 paia di provette di plastica da 10 ml, secondo lo schema presentato in tabella 1.

Tab. 1 - Preparazione delle provette per la misura del superossido.

	Senza stimolanti		+ Zimosan		+ Zimosan opsonizzato		+ PMA	
	1 A	1 B	2 A	2 B	3 A	3 B	4 A	4 B
KRP	0.35	0.33	0.30	0.28	0.30	0.28	0.35	0.33
Zimosan	-	-	0.05	0.05	-	-	-	-
Zimosan opsonizzato	-	-	-	-	0.05	0.05	-	-
PMA	-	-	-	-	-	-	0.005	0.005
Citocromo c	-	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
SOD	-	0.02	-	0.02	-	0.02	-	0.02

I valori si riferiscono a volumi in ml.

Le provette vengono preincubate in bagno termostato per 5 minuti a 37° C. Quindi a ciascuna provetta vengono aggiunti 0.1 ml di sangue e si incuba per 15 minuti con continua agitazione (circa 100 colpi/minuto). L'incubazione è bloccata con l'aggiunta di 2 ml di KRP freddo (+ 4° C) contenente 1 mM N-etilmaleimide (un inibitore della produzione di O₂⁻) e le provette vengono centrifugate a 1500 × g per 10 minuti. Si legge la densità ottica dei sopranatanti misurando la differenza di assorbimento (ΔO.D.) tra 550-468 nm in ciascuna provetta. Le ΔO.D. delle provette B (con SOD) vengono considerate come bianco e vengono sottratte alle rispettive ΔO.D. delle provette A. Le risultanti differenze (A - B) vengono moltiplicate per 2.5 (ml finali) e divise per 0.0245 (coefficiente di estinzione μM del citocromo c.) e si ottengono le nmoli di O₂⁻ prodotte da 0.1 ml di sangue.

I risultati vengono anche espressi come nmoli di O₂⁻/10⁶ granulociti, in base alla conta totale e differenziale dei globuli bianchi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allo scopo di meglio chiarire la procedura dei calcoli da eseguire, un esempio di possibili risultati ottenibili in condizioni normali e patologiche è riportato in tabella 2.

Tab. 2. Esempio di risultati ottenuti con il test di misura dell'O₂⁻

N° provette	Senza stimolanti		+ Zimosan		+ Zimosan opsonizzato		+ PMA	
	1 A	1 B	2 A	2 B	3 A	3 B	4 A	4 B
Controllo sano								
O.D. 550	0.453	0.462	0.857	0.510	0.917	0.522	0.994	0.488
468	0.389	0.412	0.311	0.420	0.299	0.425	0.224	0.390
ΔO.D.	0.064	0.050	0.546	0.09	0.618	0.097	0.77	0.098
A - B	0.014		0.456		0.521		0.672	
nmoli O ₂ ⁻	1.4		46.5		53.2		68.6	
nmoli O ₂ ⁻ /10 ⁶ gran.	2.9		93.1		106.4		137.1	
Difetto di opsonizzazione								
O.D. 550	0.462	0.440	0.550	0.480	0.900	0.510	0.950	0.492
468	0.395	0.390	0.420	0.430	0.310	0.408	0.260	0.398
ΔO.D.	0.067	0.050	0.130	0.050	0.590	0.102	0.690	0.094
A - B	0.017		0.080		0.488		0.596	
nmoli O ₂ ⁻	1.7		8.1		49.7		60.8	
nmoli O ₂ ⁻ /10 ⁶ gran.	3.5		16.3		99.6		121.6	
Difetto cellulare								
O.D. 550	0.480	0.478	0.460	0.470	0.471	0.450	0.465	0.455
468	0.398	0.405	0.402	0.416	0.408	0.389	0.398	0.400
ΔO.D.	0.082	0.073	0.058	0.054	0.063	0.061	0.067	0.055
A - B	0.009		0.004		0.002		0.012	
nmoli O ₂ ⁻	0.9		0.4		0.2		1.2	
nmoli O ₂ ⁻ /10 ⁶ gran.	1.8		0.8		0.4		2.5	

Il calcolo delle nmoli O₂⁻ /10⁶ granulociti è stato fatto assumendo un numero di 5000 granulociti/mm³ di sangue.

Nel nostro laboratorio i valori medi per soggetti adulti sani sono quelli riportati nella tabella 3.

Tab. 3. Produzione di superossido da granulociti nel sangue intero

	senza stimolanti	+ Zimosan	+ Zimosan opsonizzato	+ PMA
Maschi	2.3 ± 1.9 (48)	85.8 ± 20 (87)	117.4 ± 25.9 (12)	107.0 ± 39.5 (25)
Femmine	2.9 ± 1.9 (11)	82.6 ± 18.5 (27)	105.3 ± 30.5 (5)	101.5 ± 32.2 (9)

Valori in nmoli O_2^- /5' /10⁶ granulociti, ± SD.

In parentesi il numero dei soggetti.

Valori leggermente più bassi si ottengono con partite di zimosan vecchie o mal conservate, che tendono a formare aggregati e quindi a non dare una stimolazione ottimale. Il metodo dà valori lineari in funzione alla concentrazione dei granulociti fino a circa 8000 granulociti/mm³ di sangue. In caso di neutrofilia marcata è opportuno ridurre il tempo di incubazione a 10-12 minuti o aumentare la concentrazione di citocromo c. Conviene inoltre segnalare che i difetti di opsonizzazione si riscontrano abbastanza frequentemente (2-5% dei casi) in soggetti apparentemente sani e asintomatici, come anche osservato da altri autori (7).

Lavoro finanziato con il contributo n° 81.01803.04 del C.N.R.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rossi F. and Zatti, M. (1964). Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *Brit. J. Exp. Pathol.* 45, 548.
- 2) Babior, B.M. (1978). Oxygen dependent microbial Killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298, 659, 721.
- 3) Dri, P., Bellavite, P., Berton, G. and Rossi, F. (1979) Interrelationship between oxygen consumption, superoxide anion and hydrogen peroxide formation in phagocytosing guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 23, 109.
- 4) Bellavite, P., Dri, P., Berton, G. e Zabucchi, G. (1980) 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.* 7, 67.
- 5) Michelson, A.M., Mc Cord, J.M. and Fridovich (1977). *Superoxide and Superoxide Dismutases*, Academic Press, London.
- 6) Klebanoff, S.J. and Clark, R.A. (1978) *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders*. North Holland, Amsterdam.
- 7) Soothill, J.F. and Harvey, A.M. (1976). Defective opsonization, A common immunity deficiency. *Arch. Dis. Child.* 51, 91.