

## 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 O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 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 O<sub>2</sub><sup>-</sup> prodotte da 0.1 ml di sangue.

I risultati vengono anche espressi come nmoli di O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup> 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'O<sub>2</sub><sup>-</sup>

N° provette	Senza stimolanti		+ Zimosan		+ Zimosan opsonizzato		+ PMA	
	1 A	1 B	2 A	2 B	3 A	3 B	4 A	4 B
<b>Controllo sano</b>								
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 <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1.4		46.5		53.2		68.6	
nmoli O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /10 <sup>6</sup> gran.	2.9		93.1		106.4		137.1	
<b>Difetto di opsonizzazione</b>								
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 <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1.7		8.1		49.7		60.8	
nmoli O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /10 <sup>6</sup> gran.	3.5		16.3		99.6		121.6	
<b>Difetto cellulare</b>								
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 <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.9		0.4		0.2		1.2	
nmoli O <sub>2</sub> <sup>-</sup> /10 <sup>6</sup> gran.	1.8		0.8		0.4		2.5	

Il calcolo delle nmoli O<sub>2</sub><sup>-</sup> /10<sup>6</sup> granulociti è stato fatto assumendo un numero di 5000 granulociti/mm<sup>3</sup> 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' /10<sup>6</sup> 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/mm<sup>3</sup> 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.