

## Risposte funzionali dei neutrofili alle flogosi

P. BELLAVITE<sup>a</sup>, M. SCHINELLA<sup>b</sup>, U. LIPPI<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università degli Studi, Verona

<sup>b</sup> Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale Civile Maggiore, Verona

I leucociti polimorfonucleati, o neutrofili, sono dotati, come è ben noto, di molti composti preformati o sistemi enzimatici attivabili e di una complessa serie di apparati strutturali e biochimici che li rendono in grado di migrare dal sangue nei tessuti e di svolgere molte funzioni nell'ambito dei processi di difesa e della flogosi in generale. Tali funzioni si possono ricondurre alla attività microbica, virucida e parassitocida, al rilascio di metaboliti tossici dell'ossigeno (superossido, ossido nitrico), al rilascio di proteine, peptidi e lipidi con effetti regolatori sullo stesso processo infiammatorio, alla adesione agli endoteli e alle componenti del tessuto connettivo, alla aggregazione intravascolare o intratissutale.

Una caratteristica importante dei polimorfonucleati è che essi cambiano le loro sensibilità recettoriali e le loro attitudini funzionali ed effettrici a seconda del contesto microambientale in cui operano. Per questo, nell'ambito dei processi flogistici si assiste a un notevole riassetto delle sensibilità di queste cellule, consistente in un aumento o in un calo di funzionalità a seconda dei casi.

Un primo livello della regolazione riguarda i recettori di membrana, che possono essere variati in quantità (*up-/down-regulation*) e in funzionalità (cambiamento di affinità per il ligando, inattivazione, *uncoupling*). Ciò fa parte di tutta quella serie di modificazioni che controllano la sensibilità delle cellule a diversi fattori nel corso delle varie situazioni fisiopatologiche. È noto che molti tipi di recettori di membrana possono aumentare di numero molto rapidamente (pochi secondi): ciò è dovuto al fatto che nei granuli specifici o secondari vi è un "pool di riserva" di recettori che può essere portato alla membrana col processo di esocitosi, fenomeno che richiede un basso livello di attivazione cellulare.

Il meccanismo di attivazione del neutrofilo è studiato attivamente in molti laboratori. Esso coinvolge una complessa serie di eventi di membrana ed intracellulari disposti in sequenze che partono dai recettori e terminano negli enzimi effettrici (es. NADPH ossidasi) o in apparati meccanici (es. microtubuli e microfilamenti) che attuano il movimento, o in fattori di controllo nucleari che, a livello del

nucleo, attivano la trascrizione di specifici geni. Nel loro insieme, questi eventi vanno sotto il nome di sistema di trasduzione.

I sistemi coinvolti nella trasduzione comprendono come elementi portanti i sistemi delle proteine leganti il guanosin-trifosfato, vari enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico, la adenilato ciclasi, i sistemi che controllano la concentrazione intracellulare dello ione calcio e dello ione idrogeno (pompe, canali, controtrasporti), il potenziale elettrico di membrana, le protein-chinasi e le fosfatasi, le aciltransferasi (miristoilazione di proteine), gli enzimi che controllano il *turn-over* del fosfatidilinositolo, fino ad arrivare ai fattori di controllo della trascrizione (fattori di attivazione o di repressione). Si può quindi capire che la materia è estremamente complessa, soprattutto se si tiene conto anche del fatto che tali sistemi sono disposti in *rete*, fatta sì di sequenze "verticali", ma anche di interazioni incrociate orizzontalmente (*cross-talk*) e di controlli retrogradi.

Un fatto molto importante da tenere in considerazione è che tali risposte non avvengono come un evento "tutto o nulla" e sono innescate in modo differenziato a seconda della concentrazione dell'agonista. Una delle risposte più "precoci" (sia in senso temporale che per quanto riguarda la sensibilità alle piccole dosi di agonisti) dell'attivazione del neutrofilo riguarda la polimerizzazione dell'actina e altri cambiamenti morfologici come la polarizzazione cellulare. Alcuni cambiamenti di forma e di volume dei neutrofili attivati ed il processo di aggregazione possono essere facilmente evidenziati con strumenti di laboratorio come l'STKS e l'H2<sup>1-4</sup>.

A proposito di test semplici, alla portata di tutti i laboratori, che consentano la valutazione quantitativa della attivazione e della regolazione dei neutrofili, si possono qui citare altri, messi a punto dai nostri laboratori negli ultimi anni, quali la misura della produzione di superossido su sangue intero<sup>5,6</sup>, la valutazione simultanea della produzione di superossido e della adesione<sup>7</sup>, la misura della adesione direttamente nella cuvetta di uno spettrofotometro<sup>8</sup>.

A parte i classici eventi implicati nella adesione-

chemiotassi-fagocitosi-killing, dalla recente letteratura sui neutrofili emerge un dato: contrariamente a quanto si riteneva in passato, i neutrofili sono in grado di attuare una discreta sintesi proteica ed in particolare di sintetizzare recettori per il complemento, attivatore del plasminogeno, proteine "heat-shock", fibronectina e, soprattutto, un'ampia serie di citochine. I messaggeri di tali proteine possono essere messi facilmente in evidenza nel citoplasma dei neutrofili con le moderne tecniche di biologia molecolare (*Northern-blotting*). Questo fatto colloca il neutrofilo in una posizione non solo di cellula effettrice nelle difese, ma anche di cellula regolatrice del processo infiammatorio e immunitario, nonché della sua possibile evoluzione verso la flogosi cronica<sup>9</sup>. In particolare, pare importante la produzione di IL-1, IL-6 e TNF, che hanno molte funzioni, tra cui la stimolazione della produzione di proteine della fase acuta, la stimolazione dei linfociti T e B, l'induzione della espressione di proteine adesive sulle cellule endoteliali e la stimolazione della crescita e differenziazione delle cellule emopoietiche (in concerto con G-CSF e GM-CSF).

Tra i fenomeni che in questi ultimi anni hanno avuto la maggior attenzione da parte dei ricercatori è la produzione di radicali liberi dell'ossigeno da parte dei neutrofili. Anche se tracce di radicali dell'ossigeno si producono normalmente come by-prodotti nella respirazione mitocondriale (di per sé scarsa nel neutrofilo) e nel metabolismo ossidativo dell'acido arachidonico, le principali vie attraverso cui si formano prodotti dell'ossigeno attivato sono due: la via della NADPH ossidasi e quella dell'ossido nitrico sintetasi.

La regolazione della attività metabolica, secretoria e biosintetica dei neutrofili si svolge essenzialmente secondo due direttive, una che tende ad aumentare le risposte, l'altra che tende a ridurle. La prima via potrebbe essere definita secondo un termine largamente usato come "priming", in altre parole "preattivazione", o "sensibilizzazione"; la seconda via consiste nella perdita di responsività dovuta a molti meccanismi che vanno dalla desensibilizzazione recettoriale all'esaurimento metabolico o all'inibizione attiva.

Il fenomeno del potenziamento della funzione granulocitaria da parte di sopranatanti di cellule mononucleate è noto da tempo, ma solo negli ultimi dieci anni se ne sono precisati molti aspetti sul piano molecolare. Molti mediatori dell'infiammazione, tra cui ad esempio il PAF, il TNF, l'LPS, la sostanza P, sono capaci di attivare il metabolismo leucocitario e la secrezione di enzimi solo a concentrazioni molto alte, mentre a concentrazioni basse agiscono come chemoattrattanti o provocano un cambiamento della responsività cellulare ad altri stimolanti. In pratica, un primo contatto con prodotti batterici in basse dosi o con citochine prepara i neutrofili a ri-

spondere in modo più rapido e consistente a un secondo stimolo.

Tale fenomeno serve certamente ad aumentare il potere battericida delle cellule, ma pare avere un'importante ruolo anche nella patogenesi di varie malattie. L'aumento della produzione di metaboliti attivi dell'ossigeno da parte dei neutrofili può essere tossico per le cellule e i tessuti attraverso molti meccanismi che coinvolgono fenomeni infiammatori acuti<sup>10</sup>, ma anche a tempi medio-lunghi per fenomeni che possono coinvolgere danni endoteliali o ossidazione delle lipoproteine<sup>11</sup> e quindi innesco dei fenomeni aterosclerotici. Non si deve poi trascurare il rischio mutageno e cancerogeno dei radicali liberi dell'ossigeno. È chiaro quindi che il meccanismo del *priming* e il suo possibile controllo sono oggetto di intensi studi che, finora, non hanno portato a conclusioni definitive.

Il *priming* avviene anche *in vivo*, come mostrato da vari modelli sperimentali. Ad esempio, è stato visto che un danno acuto polmonare insorge dopo iniezione intravenosa di una combinazione di un agente "primante" come il LPS e di un agente attivante, come il C5a, ma non dei due agenti separatamente. Il *priming* è stato studiato estensivamente nelle cellule dell'essudato. La tecnica della finestra cutanea può essere usata come un modello *in vivo* del processo infiammatorio e rende possibile lo studio degli effetti della migrazione e della chemiotassi sulla funzione dei neutrofili<sup>12</sup>. Altre situazioni in cui è stata evidenziata una pre-attivazione dei neutrofili e quindi una accentuata responsività sono lo shock, le infezioni batteriche acute, l'artrite reumatoide, la terapia con G-CSF e la atopica.

All'opposto del fenomeno del *priming* si colloca il caso in cui la cellula leucocitaria mostra una ridotta funzionalità. Le ragioni di ciò possono essere varie e comprendono l'effetto di molti farmaci, soprattutto della serie degli antiinfiammatori, di citochine quali l'IL-2 e il PDGF, di oppioidi e beta-endorfine, di tossine batteriche.

Oltre a ciò, sono da segnalare i casi in cui la attività metabolica dei neutrofili è ridotta da un pretrattamento con un agonista. Si tratta, essenzialmente, del fenomeno della desensibilizzazione recettoriale omologa che nel neutrofilo è particolarmente evidenziabile su modelli *in vitro*. Un meccanismo classico sottostante a questo fenomeno è la "down regulation" o "sequestrazione" dei recettori, anche se recentemente sono stati studiati anche altri eventi come il disaccoppiamento tra il recettore e i successivi meccanismi di trasduzione del segnale.

In questo contesto, un ruolo-chiave pare essere giocato dall'aumento di AMPciclico. Tutti gli agenti che aumentano questo secondo messaggero inibiscono le risposte leucocitarie come la adesione e il burst respiratorio. L'azione dell'AMPciclico potrebbe essere dovuta alla attivazione della protein-chi-

nasi A e quindi all'inattivazione del recettore o della trasduzione a livello della fosfolipasi C.

Un interessante meccanismo di desensibilizzazione del neutrofilo, recentemente descritto, è lo "shedding" dei recettori. Questo fenomeno, descritto per vari recettori come ad esempio quelli del TNF, dell'IL-6 e dell'endotossina, ha una duplice funzione: da una parte causa la desensibilizzazione della cellula per quello specifico agente, dall'altra causa l'immissione nei liquidi biologici di molecole in grado di "catturare" il ligando prima che venga a contatto con la cellula. In altre parole, i recettori solubili delle molecole mediatrici dell'infiammazione diventano degli anti-mediatori e quindi entrano nella rete di controllo dell'infiammazione stessa.

La desensibilizzazione nei confronti di mediatori molto attivi come il TNF probabilmente rappresenta un importante meccanismo di auto-protezione delle cellule. La mitigazione delle risposte inducibili dal TNF, dalle endotossine e da altri prodotti batterici può essere un sistema per controllare gli effetti deleteri dell'eccessiva infiammazione. Naturalmente, il rovescio della medaglia di questo fenomeno è la ridotta funzionalità cellulare anche come killing batterico, fatto che potrebbe spiegare la aumentata suscettibilità alle infezioni nel periodo postoperatorio, nei grandi ustionati, nei diabetici, nel neonato e in corso di terapie a base di antiinfiammatori che inibiscono la funzionalità leucocitaria.

### Bibliografia

1. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M. Volume, conductivity and scatter changes of activated polymorphonuclear leukocytes: an estimation by Coulter counter STKS analyzer. *Int J Clin Lab Res* 1992; 21:321-4.
2. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M. Volumetric changes in phorbol myristate acetate activated neutrophils: a rapid and simple assay using Coulter counter STKR and STKS hematological analyzers. *Haematologica* 1992;77:226-32.
3. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. High scatter of neutrophils on Bayer-Technicon H2 analyzer: a screening test of morphological defective responsiveness to *in vitro* chemotactic stimulation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:11-7.
4. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. Assessment of neutrophil aggregation by Coulter STKR and STKS haematological analysers. *Clin Lab Haematol* 1994;16:43-55.
5. Bellavite P, Dri P, Della Bianca V. Un nuovo test di funzionalità fagocitaria basato sulla misura dell'anione superossido ( $O_2^-$ ). Condizioni di applicabilità e risultati ottenuti in casi patologici. *LAB, J Res Lab Med* 1980;VII:77-82.
6. Bellavite P, Dri P, Della Bianca V, Serra MC. The measurement of superoxide anion production by granulocytes in whole blood. A clinical test for the evaluation of phagocyte function and serum opsonic activity. *Eur J Clin Invest* 1983;13:363-8.
7. Bellavite P, Chirumbolo S, Mansoldo C, Gandini G, Dri P. A simultaneous assay for oxidative metabolism and adhesion of human neutrophils. Evidence for correlations and dissociations of the two responses. *J Leukocyte Biol* 1992;51:329-35.
8. Lippi U, Schinella M, Nicoli M, Bellavite P, Lippi G. A simple assessment of human neutrophil adhesiveness. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:41-4.
9. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992;13:169-71.
10. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
11. Abdalla DSP, Campa A, Monteiro HP. Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* 1992;97:149-59.
12. Biasi D, Bambara LM, Carletto A, Caraffi M, Serra MC, Chirumbolo S, Bellavite P. Factor-specific changes of the oxidative metabolism of exudate human neutrophils. *Inflammation* 1993;17:13-23.