

01071/3

455713

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN PATOLOGIA SPERIMENTALE**

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DI TRIESTE

**ATTIVAZIONE DEI MACROFAGI UMANI INDOTTA
DA PROTEINE CATIONICHE GRANULARI
DEGLI EOSINOFILI**

eu

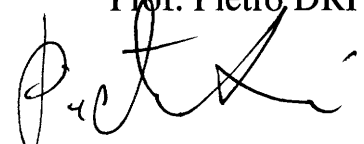
Dott.ssa PAOLA SPESSOTTO '65

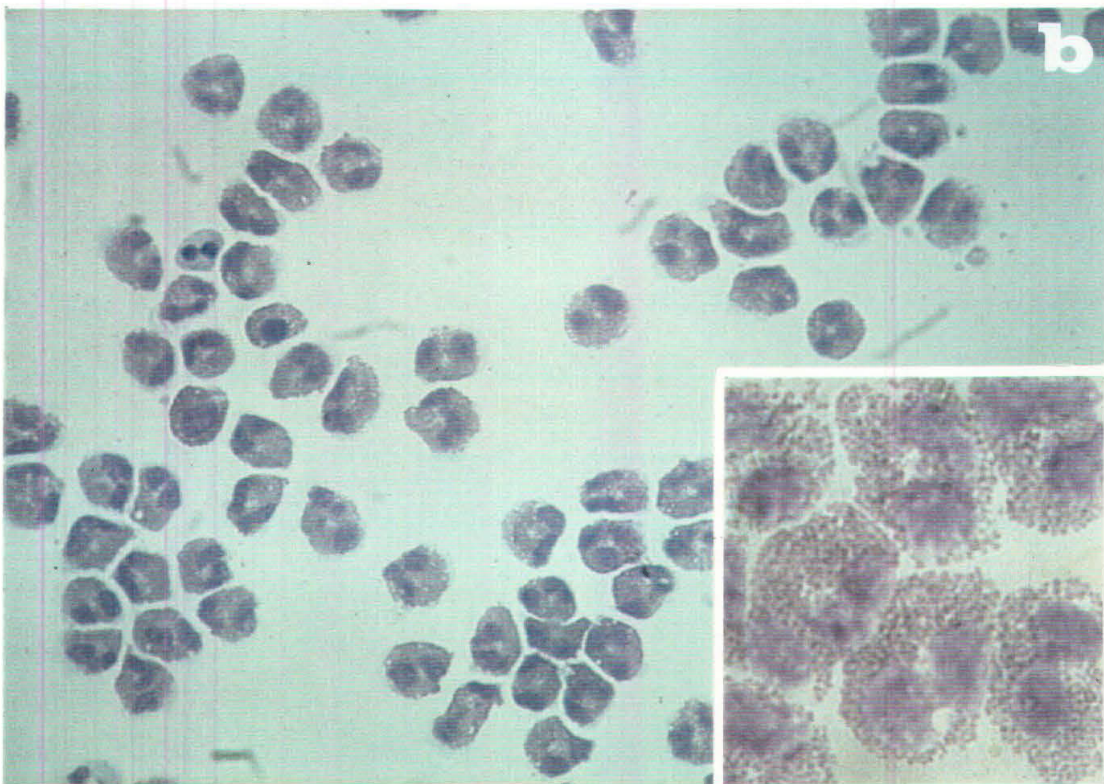
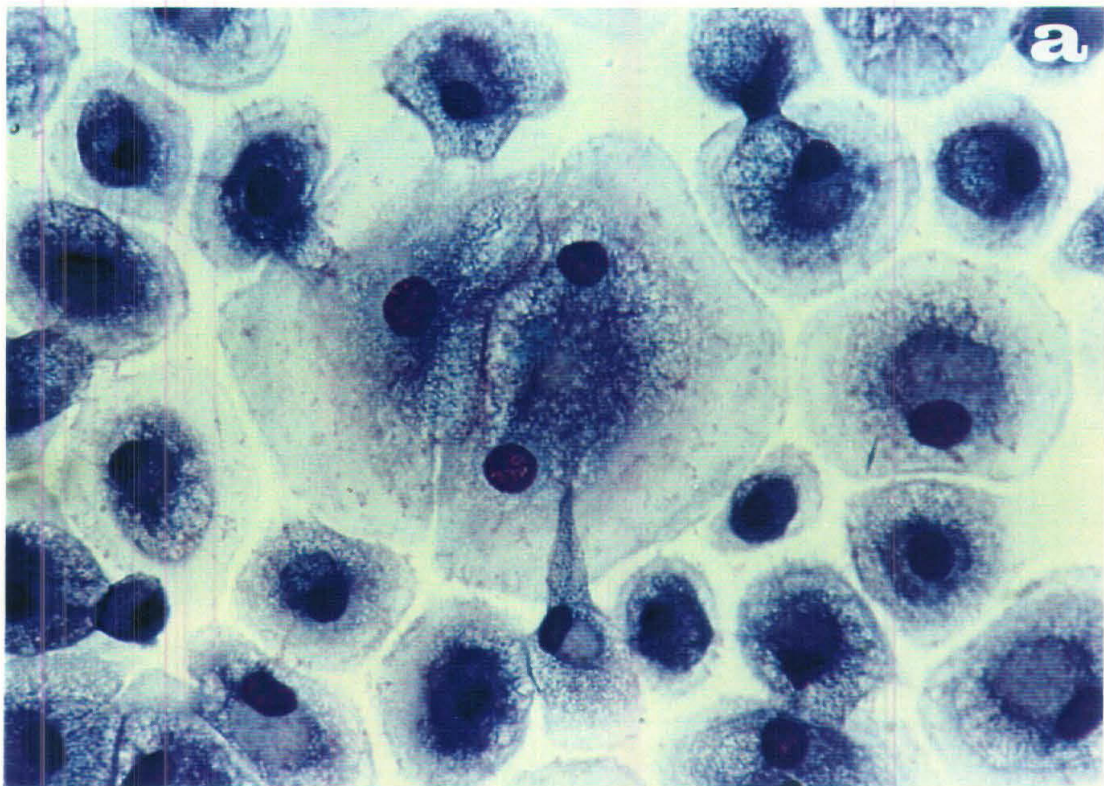
**ISTITUTO DI PATOLOGIA GENERALE
UNIVERSITÀ DI TRIESTE**

Coordinatore:
Prof. Pierluigi PATRIARCA



Tutore:
Prof. Pietro DRI





Macrofagi al 10° giorno di coltura (a) ed eosinofili appena isolati da sangue periferico (b).
Le cellule sono state colorate con Diff-Quik.
Ingrandimento: a,b: 520x, inserto: 1300x

INDICE

	pag
INTRODUZIONE	
PREMESSA	1
GLI EOSINOFILI	3
RUOLI DEGLI EOSINOFILI	4
1. Funzioni associate al potenziale citotossico	4
a. Eosinofili e parassiti	4
b. Eosinofili e reazioni allergiche	7
c. Eosinofili e danno tissutale	8
2. Ruoli collaborativi	9
a. Eosinofili associati a macrofagi in patologie implicanti processi infiammatori di tipo cronico	10
3. Eosinofili e tumori	12
LE PROTEINE CATIONICHE	17
1. Major Basic protein (MBP)	19
2. Eosinophil Cationic Protein (ECP)	20
3. Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN)	21
4. Eosinophil Peroxidase (EPO)	21
I MACROFAGI	25
MATERIALI E METODI	
1. Isolamento di monociti da sangue umano periferico	29
2. Isolamento di macrofagi murini peritoneali	32
3. Isolamento di granulociti eosinofili da sangue umano periferico	32
4. Purificazione delle proteine cationiche	35
5. Misura dell'attività perossidasi	36
6. Misura dell'attività ribonucleasica	37
7. Dosaggi immunoenzimatici (ELISA) sulle frazioni ottenute dalla cromatografia a scambio cationico	37
8. Elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)	38
9. Valutazione del numero di cellule nelle colture	39
10. Dosaggio del contenuto proteico	39
11. Determinazione del rilascio di H ₂ O ₂ da macrofagi	40
12. Determinazione del TNF	41
13. Dosaggio del nitrito (NO ₂ ⁻)	43
14. Analisi statistica	44
15. Altri agenti utilizzati	44

RISULTATI	46
1. Purificazione e caratterizzazione delle proteine cationiche	54
2. Scelta ed ottimizzazione del sistema sperimentale	54
3. Scelta dei parametri di attivazione	59
4. Effetto sulla produzione di H ₂ O ₂	60
4a. Cinetica di produzione di H ₂ O ₂	61
4b. Dose-risposta	65
4c. Comparazione dell'effetto delle proteine cationiche con quello del lipopolisaccaride e dell'interferone- γ	67
5. Effetto sul contenuto proteico	70
6. Effetto sulla produzione di TNF	71
7. Modificazioni morfologiche dei macrofagi esposti alle proteine cationiche	74
8. Attivazione dei macrofagi in coltura con eosinofili interi	75
9. Studi sul probabile meccanismo implicato nell'attivazione	77
9a. Attività enzimatica	78
9b. Cationicità	81
10. Effetto della polimixina B sull'attivazione indotta dalle proteine cationiche	84
11. Effetto dell'ECP su macrofagi murini	87
12. Effetto della digestione enzimatica	89
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	91
BIBLIOGRAFIA	I-XI

INTRODUZIONE

PREMESSA

L'oggetto di questa tesi riguarda il ruolo delle proteine cationiche granulari degli eosinofili nell'attivazione dei macrofagi. Le basi che hanno consentito questo lavoro sperimentale derivano dall'esperienza nel settore della fisiopatologia degli eosinofili acquisita in precedenza. L'interesse nei confronti degli eosinofili è sempre stato rivolto al particolare ruolo svolto da queste cellule nel danno tissutale e nella modulazione delle funzioni di altre cellule infiammatorie.

Gli eosinofili presenti nei tessuti, se opportunamente stimolati, possono andare incontro ad un processo di esocitosi che comporta il rilascio nell'ambiente extracellulare di proteine cationiche contenute nei loro granuli. Il potenziale citotossico di tali proteine è ampiamente documentato; in effetti esse possono rendere conto dell'azione tossica dell'eosinofilo nei confronti di macroparassiti, cellule tumorali, cellule di trapianti e cellule di tessuti normali. Le proteine granulari, comunque, non sono chiamate in causa solo per il loro ruolo proinfiammatorio o per la loro attività citotossica. E' possibile che agiscano quali mediatori in grado di modificare funzioni di altre cellule. Le proteine granulari, infatti, possono legarsi a varie cellule. In particolare, precedenti studi condotti anche nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la eosinofilo perossidasi (EPO) è in grado di legarsi ai macrofagi e a vari tipi di cellule modulandone le funzioni, come in seguito verrà descritto per esteso.

Questi risultati si sono rivelati utili per la nostra ricerca in associazione ad altre osservazioni riportate in letteratura, dimostranti che l'infiltrazione di eosinofili, assieme a macrofagi, nello stroma di alcuni

tumori nell'uomo è associata ad una prognosi favorevole e all'inibizione della crescita o alla eradicazione nel caso di tumori sperimentali.

I macrofagi occupano un posto centrale nei meccanismi dell'immunità specifica e aspecifica, nelle difese dell'organismo dagli agenti infettivi, nella regolazione dell'infiammazione e dei fenomeni riparativi post-necrotici. La loro funzione difensiva nel controllo della crescita tumorale è ampiamente documentata; essa si esplica dopo che i macrofagi residenti e quelli derivati dai monociti reclutati dal sangue vanno incontro ad un processo di attivazione in seguito al quale diventano citotossici nei confronti delle cellule tumorali.

Meno chiaro è invece il ruolo degli eosinofili nella difesa antitumorale, anche se i dati ottenuti *in vitro* e derivanti da diverse osservazioni cliniche fanno ipotizzare un ruolo importante di queste cellule nel controllo della crescita neoplastica.

Lo scopo di questa tesi è quello di vedere se le proteine cationiche contenute nei granuli degli eosinofili sono in grado di attivare i macrofagi.

I risultati indicano che ciò avviene e suffragano l'ipotesi di una cooperazione fra eosinofili e macrofagi nei meccanismi di difesa operanti in alcuni tipi di infiammazione cronica (es. difesa contro macroparassiti) e nel controllo della crescita tumorale.

La stesura di questa tesi è stata organizzata nel seguente modo: nella prima parte introduttiva verranno descritte le caratteristiche funzionali e i ruoli più o meno accertati degli eosinofili in relazione alle proprietà delle loro proteine cationiche, riservando la parte conclusiva al significato dell'attivazione macrofagica; seguirà poi un capitolo dedicato alla descrizione dei materiali, dei metodi e delle tecniche a cui si è fatto ricorso per i vari approcci sperimentali; nella terza parte verranno descritti i risultati ottenuti. Seguiranno infine la discussione globale dei risultati e le conclusioni che potranno essere tratte dagli studi presentati.

GLI EOSINOFILI

Gli eosinofili sono un tipo di granulociti a localizzazione prevalentemente tissutale. Gli eosinofili circolanti nel sangue sono in condizioni normali l'1-3% dei leucociti totali, corrispondenti a 100-400/mm³; il numero totale stimato ($1-1.5 \times 10^9$) è significativamente minore rispetto a quello del midollo osseo (100×10^9) o dei tessuti (150×10^9) (1). Essi rimangono in circolo per 5-7 ore e poi migrano nei tessuti dove svolgono la loro azione prima di essere distrutti dopo 1-2 settimane di permanenza (1). Le sedi preferenziali di migrazione tissutale comprendono la cute, i polmoni, la mucosa uterina ed il tratto gastrointestinale (2).

RUOLI DEGLI EOSINOFILI

Vari sono i ruoli più o meno accertati per l'eosinofilo. In questa sede cercheremo di delineare in un primo tempo le funzioni che classicamente vengono attribuite agli eosinofili e che fanno assumere a queste cellule un ruolo peculiare nella difesa contro certi agenti eziologici, nelle allergie e nella patogenesi del danno tissutale. Tali funzioni sono molto spesso associate al potenziale citotossico di cui si parlerà in seguito.

Successivamente ci soffermeremo ad esaminare i dati, per lo più recenti, che ci consentono di accreditare agli eosinofili anche ruoli "collaborativi" con cellule coinvolte in processi aventi alla base un meccanismo di immunità cellulo-mediata.

Infine, cercheremo di esaminare le informazioni che riguardano le interessanti associazioni degli eosinofili con i tumori.

1. Funzioni associate al potenziale citotossico

a. Eosinofili e parassiti

L'eosinofilo è stato concepito primariamente come cellula effettrice che può portare benefici o danno all'ospite in virtù del suo stesso potenziale citotossico.

L'evidenza dell'accumulo di eosinofili in lesioni infiammatorie causate da macroparassiti ha fatto sospettare una loro funzione di difesa nei confronti di questi organismi, cosa che è stata confermata con modelli sperimentali sia *in vivo*, in cui topi, depletati di eosinofili tramite uno specifico antisiero, si dimostravano molto più suscettibili agli effetti di

infestazioni elmintiche (3) che *in vitro*, in cui eosinofili isolati si sono dimostrati efficientemente elmintotossici e protozootossici (4). Di particolare rilevanza è l'attività citotossica dei granulociti eosinofili nei confronti dello *Schistosoma mansoni* - *japonicum*, *hematobius* - (rappresentanti della classe dei Trematoda) in un particolare stadio del loro ciclo, la schistosomula.

L'interazione tra eosinofili e parassiti è generalmente preceduta dalla risposta immune ai parassiti stessi. I parassiti inducono principalmente la produzione di IgE e di IgG che, assieme al complemento, consentono l'adesione degli eosinofili al parassita e la loro infiltrazione sotto il tegumento, grazie alla presenza di recettori Fc_{ϵ} (specificamente $Fc_{\epsilon}R_{11}$), Fc_{γ} e C3b sulla membrana degli eosinofili.

L'interazione ligando-recettore provoca l'attivazione del granulocita eosinofilo e il rilascio del contenuto dei suoi granuli. La stretta adesione della cellula effettrice consente ai prodotti secretori degli eosinofili di concentrarsi in grande quantità (per il piccolo volume) sul o nel bersaglio (5, 6).

Sebbene anche altre cellule possano uccidere gli elminti, gli eosinofili sono particolarmente tossici per questi parassiti per diverse ragioni. In primo luogo essi possono danneggiare direttamente i parassiti attraverso le proteine cationiche dei granuli, depositate dopo che la cellula si è attaccata alla superficie dei parassiti (7). Queste proteine sono la **MBP** (Major Basic Protein), la **ECP** (Eosinophil Cationic Protein), la **EDN** (Eosinophil Derived Neurotoxin) e la **EPO** (Eosinophil Peroxidase). In secondo luogo, i metaboliti derivati dall'ossigeno (ione superossido, radicale idrossile, perossido di idrogeno e ossigeno singoletto), generati in seguito all'attivazione del

metabolismo ossidativo ("burst" respiratorio), possono a loro volta mediare l'elmintotossicità di per sé (7-10) o in associazione con altri prodotti dell'eosinofilo. In particolare l'azione citotossica della EPO può essere potenziata dalla presenza di H_2O_2 e di un alogenuro. Dalla perossidazione dell'alogenuro ad opera della EPO si genera acido alogenoso, letale per il parassita (11).

L'attività antielmintica implica comunque la partecipazione di altre cellule infiammatorie effettrici, come i neutrofili che possono contribuire all'uccisione dei vermi, e di cellule produttrici di mediatori come le mast-cellule, che secernono ECF-A (Eosinophil Activating Factor of Anaphilaxis) e istamina, i linfociti T, che liberano EAF (Eosinophil Activating Factor) ed i neutrofili stessi che producono PAF (Platelet Activating Factor). Tutti questi fattori sono in grado di amplificare l'espressione dei recettori per Fc_ϵ , Fc_γ e C3b sugli eosinofili (12).

Gli eosinofili, anche se sono molto efficienti nell'uccisione dei macroparassiti, non possiedono un'elevata capacità fagocitante. Infatti, anche se *in vitro* possono fagocitare batteri, funghi, micoplasmi, particelle inerti, complessi antigene-anticorpo, per altro con efficienza di gran lunga inferiore a quella dei neutrofili, non sembra che tale funzione abbia rilevanza *in vivo* ai fini delle difese contro le infezioni (13). Lo si è dimostrato in condizioni di neutropenia indotta da farmaci e nella sindrome di deficienza di adesione leucocitaria (LAD) (14). Soprattutto in quest'ultima condizione, la migrazione dei neutrofili (ma non degli eosinofili) nei tessuti infiammati è praticamente assente e ciò rende gli individui affetti da tale sindrome particolarmente suscettibili all'insorgenza di infezioni ricorrenti gravi.

b. Eosinofili e reazioni allergiche

Una tipica reazione allergica o d'ipersensibilità di tipo I (anafilattica) prevede una prima fase di sensibilizzazione, in cui l'organismo viene in contatto con l'allergene: quest'ultimo stimola la produzione di IgE specifiche che si depositano sulla membrana di mastcellule e basofili dotati del recettore ad alta affinità per il frammento Fc delle IgE ($Fc_\epsilon R_1$). L'evento centrale di questo fenomeno allergico è la degranulazione delle mastcellule e dei basofili provocata dal successivo contatto con l'antigene. Vengono rilasciati mediatori quali l'istamina, potente vasodilatatore, le SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis), una miscela di leucotrieni che provoca contrazione della muscolatura liscia, il PAF e l'ECF-A. Tutti questi prodotti sono fattori di richiamo e di attivazione per gli eosinofili (2). Richiamati nella sede d'infiammazione, gli eosinofili determinano l'andamento delle reazioni tardive della fase di scatenamento liberando a loro volta dei mediatori che prolungano, intensificano ed, entro certi limiti, attenuano le reazioni precoci e contribuiscono all'insorgere del danno tissutale.

Alla loro attivazione consegue, infatti, un forte effetto proinfiammatorio ed un blando effetto antiinfiammatorio:

- il primo è mediato dall'innescò del metabolismo dell'acido arachidonico, da cui si originano i leucotrieni C_4 , D_4 ed E_4 e il PAF, che amplificano l'infiammazione, e dal rilascio delle proteine granulari citotossiche (MBP, ECP ed EPO), che sono in grado di stimolare la degranulazione delle mastcellule ed il rilascio di istamina) (12);

- il secondo è dovuto ad altri prostanoidi quali le prostaglandine E_1 ed E_2 (bloccano la degranulazione dei basofili), dal sistema EPO- H_2O_2 -alogenuro (inibisce l'azione vasocostruttiva del LTC_4 trasformandolo in un

isomero inattivo del LTB₄ e determina l'ingestione da parte degli eosinofili dei granuli rilasciati dalle mastcellule), da MBP ed ECP che sopprimono l'effetto dell'eparina e da alcuni enzimi non granulari quali istaminasi e fosfolipasi D che inattiva il PAF (2).

c. Eosinofili e danno tissutale.

Alla genesi del danno tissutale partecipano in parte i prodotti del metabolismo ossidativo, già ricordati in precedenza (7-10). Sembra, tuttavia, che le sostanze in assoluto maggiormente tossiche per i tessuti dell'ospite siano le proteine granulari. Elevate concentrazioni di tali proteine possono essere misurate nello sputo di pazienti asmatici (15). Eosinofili e proteine cationiche si rinvencono nel lavaggio broncoalveolare di persone affette da asma durante le reazioni polmonari tardive scatenate dall'inalazione dell'antigene (16). Similmente, una ricca infiltrazione di eosinofili con evidente degranolazione è osservabile nella mucosa nasale in seguito ad inalazione dell'antigene. Nei liquidi di lavaggio della mucosa nasale si ritrovano in effetti aumentati livelli di ECP, MBP e EDN (17,18). In pazienti con malattie correlate a certi tipi di eosinofilia, l'impiego di tecniche di immunofluorescenza ha permesso di individuare in vari tessuti quali la cute, il cuore e nell'apparato respiratorio e gastrointestinale la presenza di proteine cationiche granulari (15,19). Altri dati indicano che gli eosinofili, attraverso le proteine cationiche liberate in risposta alla degranolazione o alla citolisi, possono contribuire in maniera rilevante ai processi degenerativi che si accompagnano all'infiammazione. E' stato infatti dimostrato che le proteine cationiche possono essere tossiche per diversi tipi di cellule; ad esempio la EPO e la MBP possono danneggiare

l'epitelio nasale (20), la MBP può far aumentare la contrazione della trachea indotta da acetilcolina (21), la MBP, l'ECP, l'EPO e, in modo minore, la EDN danneggiano l'epitelio tracheale inducendo immobilizzazione delle ciglia, formazione di bolle ed esfoliazione (22).

Queste ultime osservazioni ci consentono un'ulteriore precisazione sull'attività citotossica degli eosinofili che viene intesa non esclusivamente come difensiva ma anche come meccanismo di offesa in grado di provocare lesioni a tessuti e cellule normali e di associarsi alla attività di altre cellule. Ricordiamo, a titolo esemplificativo, il rigetto dei trapianti di rene e di fegato (23), dove la presenza di una marcata eosinofilia tissutale sembra essere associata ad un più precoce rigetto (24).

2. Ruoli collaborativi

Dati recenti sembrano indicare che gli eosinofili svolgono ruoli di "collaborazione" con linfociti e altre cellule coinvolte nella risposta immune e di derivazione mesenchimale.

La scoperta che gli eosinofili posseggono caratteristiche antigeniche comuni a cellule della risposta immunitaria (macrofagi e linfociti) e che in certe condizioni possono secernere citochine fa pensare ad una possibile relazione tra eosinofili e risposta immunitaria cellulo-mediata.

E' stato dimostrato che gli eosinofili possono comportarsi come cellule presentanti l'antigene (APC), in quanto attivano la proliferazione di linfociti T dopo l'elaborazione dell'antigene (25). Questa capacità sarebbe però effettiva non tanto per gli antigeni di derivazione microbica, che devono essere elaborati, quanto per i superantigeni degli Stafilococchi (26).

In ogni caso la capacità di presentare l'antigene è minore se paragonata a quella dei macrofagi (25,26). Gli eosinofili, comunque, potrebbero funzionare come interazione con citochine. e' stato dimostrato, infatti, che il trattamento con GM-CSF induce l'espressione di antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II (25) e la subunità p55 del recettore per l'IL-2 (CD25) (27). Sempre in seguito al trattamento con GM-CSF, gli eosinofili possono esprimere il CD4 (28), ritenuto fino a poco tempo fa presente unicamente su cellule della linea monocito-macrofagica e sui linfociti T-helper.

Gli eosinofili possono produrre e rilasciare citochine, soprattutto in seguito all'aggiunta di vari agenti stimolanti. Oltre a dati iniziali riguardanti la produzione di TGF- β (29) e TGF- α (30), recentemente si è dimostrato che gli eosinofili possono rilasciare IL-6 (31) e produrre, sempre dopo attivazione, IL-1 (32), IL-3, GM-CSF (33,34), IL-5 (35), IL-8 (36), TNF e MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) (37).

a. Eosinofili associati a macrofagi in patologie implicanti processi infiammatori di tipo cronico

Una intensa infiltrazione tissutale di eosinofili si osserva in flogosi granulomatose da parassiti, funghi ed altri agenti eziologici. Il ruolo svolto da queste cellule non è stato ancora definito con certezza.

Nei granulomi originatisi in seguito ad una reazione infiammatoria contro parassiti, in particolare contro gli elminti, gli eosinofili sono molto numerosi e rappresentano la componente cellulare predominante assieme ai macrofagi e alle altre cellule normalmente presenti nelle infezioni croniche granulomatose (38).

Nei granulomi epatici, risultanti dalla reazione contro le uova di *Schistosoma*, si osservano una proliferazione e differenziazione di eosinofili determinate, molto probabilmente, dalle citochine prodotte dai macrofagi (39). Si è visto inoltre che in topi infettati da *Schistosoma mansoni* la deplezione degli eosinofili con un siero specifico anti-eosinofili causava la riduzione delle dimensioni del granuloma ed una ritardata distruzione delle uova del parassita (38).

Per quanto riguarda le reazioni granulomatose dovute a materiale considerato come "corpo estraneo", lo studio istologico su granulomi derivanti da peritoniti causate dall'introduzione accidentale del talco dei guanti utilizzati in sede chirurgica aveva già dimostrato che il numero di eosinofili presenti era notevole (40).

Nei granulomi eosinofilici dell'osso, gli studi immunocistochimici ed ultrastrutturali hanno evidenziato notevoli segni di degranolazione degli eosinofili (41). In particolare, in un paziente affetto dal morbo di Hand-Schüller-Christian, è stato documentato il rilascio extracellulare di eosinofilo perossidasi ed il legame di questa proteina alle cellule coinvolte nella reazione granulomatosa e presenti nel midollo osseo (41). Un altro studio effettuato su due pazienti con granulomi eosinofilici del tessuto osseo ha dimostrato la presenza di MBP, ECP ed EPO all'interno dei fagolisosomi dei macrofagi circostanti, suggerendo un'interazione tra eosinofili e cellule fagocitiche durante lo stadio distruttivo della malattia (42).

Per concludere le esemplificazioni che ci permettono di dare collocazione all'eosinofilo anche nel quadro delle reazioni infiammatorie di tipo cronico, ricordiamo che recentemente è stato dimostrato che infezioni

da Micobatteri provocano il rapido reclutamento di un elevato numero di eosinofili, in grado di ingerire i microorganismi (43).

3. Eosinofili e tumori

La presenza di numerosi eosinofili è stata dimostrata in molti tumori di diversa origine. La componente cellulare dello stroma della maggior parte dei tumori è costituita prevalentemente da macrofagi e linfociti. Tuttavia, in alcune neoplasie si osserva anche un intenso infiltrato di eosinofili, oltre alla presenza di queste cellule.

Proponiamo nella **Tabella 1** un quadro riassuntivo delle associazioni di vari tipi di neoplasie con eosinofilia sia tissutale che periferica.

Una marcata eosinofilia tissutale è stata riscontrata ad esempio nel carcinoma del colon (44,45), nel cancro del retto (46), dello stomaco (47), del polmone (48,49), in adenocarcinomi mammari (50), nel carcinoma naso-faringeo (51), nel carcinoma della cervice uterina (52-54), nel carcinoma squamocellulare della cavità orale (55), del capo e del collo (56) e nel morbo di Hodgkin (57,58). In molti di questi tumori, l'intensa infiltrazione di eosinofili è stata associata ad una prognosi più favorevole (44,47,48, 49,52,54) e, nel caso del carcinoma del colon con l'assenza di metastasi al fegato e ai linfonodi (44,45). Anche per quanto riguarda il cancro polmonare (il tipo istologico non viene specificato dagli autori), si è notata assenza di metastasi (48,49).

Tabella 1. Eosinofilia tissutale e periferica associata a diversi tipi di tumore.

TIPO DI TUMORE	eosinofilia	prognosi		metastasi	rif. bib.
		favorevole	infausta		
carcinoma del colon	tissutale	+		assenza	44,45
cancro del retto	tissutale	?	?		46
carcinoma gastrico	tissutale		+		47
carcinoma naso-faringeo	tissutale	?	?		51
carcinoma squamocellulare della cavità orale	tissutale		+	++	55
carcinoma squamocellulare del capo e del collo	tissutale	+		assenza	56
carcinoma della cervice uterina	tissutale	+			52,53,54
carcinoma squamocellulare del polmone	periferica		+		64
microcitoma**	periferica	+			63
cancro polmonare*	tissutale	+		assenza	48,49
adenocarcinoma mammario	tissutale	?	?		50
tumori della mammella*	periferica	+			61
cancro della vescica**	periferica	+			62
morbo di Hodgkin (primario)	tissutale		+		57,58

(*) il tipo istologico del tumore non viene specificato dagli autori

(**) l'osservazione è stata condotta su pazienti trattati con IL-2

In un recente studio effettuato su un numero elevato di pazienti (120 casi), l'eosinofilia tissutale associata al tumore è risultata un indicatore prognostico favorevole per il carcinoma squamo-cellulare del capo e del

collo ed è stata associata all'assenza di metastasi distali (56). Anche se non riportato nella Tabella, vogliamo ricordare ugualmente uno studio eseguito da alcuni autori su tumori di tipo vascolare (di origine epitelioide), i quali hanno osservato che nelle situazioni di benignità l'infiltrato è composto prevalentemente da linfociti ed eosinofili (59). Un simile infiltrato non è presente negli angiosarcomi, che sono invece delle neoplasie maligne (59).

Altri studi suggeriscono invece che l'infiltrazione di eosinofili si correla ad una prognosi sfavorevole. E' il caso del morbo di Hodgkin (58), del carcinoma gastrico (47) e del carcinoma squamo-cellulare della cavità orale (55). Addirittura, in quest'ultimo caso, il numero delle metastasi sembra aumentare (55) rispetto a tumori simili non infiltrati da eosinofili. In effetti sembrerebbe che gli eosinofili producano una gelatinasi, immagazzinata poi dai neutrofilo e rilasciata da questi in base alla richiesta. Questa metallo-proteinasi potrebbe essere coinvolta nel processo di invasione tumorale (60). In tutti questi studi non c'è comunque alcuna indicazione sull'eventuale presenza o meno di altri tipi cellulari importanti nella difesa antitumorale.

Anche gli studi sull'eosinofilia periferica associata ai tumori non danno indicazioni precise sulla prognosi. Si è osservato che in tumori primitivi della mammella, una elevata eosinofilia nel sangue periferico si accompagna ad una ridotta probabilità di recidive dopo asportazione chirurgica del tumore (61). L'eosinofilia periferica nel cancro della vescica, forse conseguenza della somministrazione di IL-2, indica prognosi favorevole (62); così avviene anche nel microcitoma (63) ma non nel carcinoma squamocellulare del polmone (64).

Tutte queste osservazioni cliniche non sono però sufficienti per chiarire il significato dell'eosinofilia associata a condizioni neoplastiche. Infatti, non sempre è possibile concludere che l'infiltrazione degli eosinofili nei tumori rappresenti una situazione vantaggiosa per la prognosi nè lo può essere in assoluto l'eosinofilia periferica riscontrabile in alcuni pazienti neoplastici.

L'analisi della Tabella ci permette di ricavare altre informazioni: il tipo istologico del tumore non sembra determinante (non tutti i carcinomi infiltrati da eosinofili hanno una prognosi favorevole) nè il distretto di sviluppo del tumore (per esempio, a livello polmonare, l'infiltrazione tissutale consente un esito favorevole, mentre l'eosinofilia periferica è vantaggiosa per il microcitoma ma non per il carcinoma squamocellulare).

A questo punto appare dunque molto probabile che l'azione degli eosinofili nei tumori debba essere coordinata o potenziata da altri tipi cellulari che potrebbero avere un ruolo antitumorale determinante.

Accanto alle osservazioni di tipo clinico, esistono diversi dati che provengono da studi sperimentali.

Si è evidenziata ad esempio un'attiva degranolazione di eosinofili su cellule tumorali intestinali di pazienti trattati con IL-2 (62), ad ulteriore indicazione che gli eosinofili attivati sono coinvolti nella risposta antitumorale indotta dall'interleuchina-2. Da studi effettuati *in vitro*, dimostranti che gli eosinofili attivati da cellule LAK (Lymphokine-Activated Killer) preincubate con IL-2 diventano citotossici nei confronti di linee tumorali, si è giunti alla conclusione che questi granulociti possono effettivamente giocare un ruolo antitumorale importante nella terapia che impiega cellule LAK in associazione ad IL-2 (65). Eosinofili provenienti da

pazienti neoplastici trattati con somministrazione sottocutanea di IL-2 risultano citotossici nei confronti di cellule tumorali allogeniche, probabilmente dopo essere stati attivati indirettamente con IL-5 (63).

Oltre a questi studi condotti sia *in vivo* che *in vitro*, anche altri modelli sperimentali indicano un possibile ruolo degli eosinofili nella difesa antitumorale. In uno di questi, ad esempio, si è visto che l'inibizione della crescita di un tumore scarsamente immunogeno, indotto con metilcolantrene, era associata con l'infiltrazione di fagociti mononucleati e di eosinofili (66).

Più recentemente si è visto che cellule tumorali maligne di topo transfettate con il gene dell'IL-4 non crescono, rispetto a quelle non transfettate, se iniettate in topi singenici. Questa azione inibente la crescita del tumore dipende dall'IL-4 prodotta dalle cellule tumorali transfettate ed è associata ad una reazione infiammatoria la cui componente cellulare è costituita quasi esclusivamente da eosinofili e macrofagi (67). Altri autori hanno dimostrato che l'iniezione di IL-4 nei linfonodi di drenaggio della massa tumorale causava la regressione del tumore e contemporaneamente la formazione di un anello periferico di eosinofili, macrofagi, neutrofilii e linfociti che circondavano le cellule neoplastiche (68). Infine è stato dimostrato che l'azione antitumorale dell'IL-4 poteva essere bloccata da un anticorpo monoclonale che impediva il reclutamento dei granulociti nella reazione infiammatoria associata al tumore. Questi risultati hanno indotto gli autori di questo studio a concludere che l'azione antitumorale, mediata dall'IL-4, era dovuta agli eosinofili (69).

Dati ancora più recenti sembrano comunque rafforzare l'ipotesi che gli eosinofili, potenzialmente dotati di capacità antitumorale, devono essere

coadiuvati dall'azione di altre cellule. D'altra parte, anche i macrofagi, il cui potere citotossico nei confronti delle cellule tumorali è stato più volte documentato (70-72), non sono sufficienti, da soli, per esplicitare ottimamente le loro funzioni.

Si è dimostrato, infatti, che, nonostante la marcata infiltrazione di eosinofili determinata da cellule tumorali transfettate con il gene per l'IL-5, la crescita del tumore rimaneva inalterata (73).

Parallelamente è stato studiato l'effetto dell'infiltrazione macrofagica in seguito all'azione del GM-CSF prodotto da cellule tumorali transfettate con tale gene (74). Anche in questo caso la sola infiltrazione di macrofagi non è sufficiente a far rallentare la crescita tumorale.

Questi risultati portano alla conclusione che deve essere necessaria una cooperazione tra eosinofili e macrofagi affinché si possa verificare *in vivo* un'attività inibente la crescita neoplastica.

LE PROTEINE CATIONICHE

Gli eosinofili contengono in una delle sottopopolazioni di granuli presenti nel citoplasma, i granuli specifici, una serie di proteine che, per il loro carattere basico, vengono definite proteine cationiche (13).

Dal punto di vista strutturale i granuli specifici presentano un "core", il cristalloide, generalmente elettrondenso immerso in una matrice amorfa ed eterogenea. Il core contiene la MBP, mentre nella matrice troviamo la ECP, la EDN e la EPO (75,76).

Le principali proprietà delle proteine granulari degli eosinofili sono riportate nella **Tabella 2**.

Tabella 2. Proprietà e funzioni delle proteine cationiche degli eosinofili.

Proteina	Sito	PM (Kd)	pI	$\mu\text{g}/10^6$ eos	attività
MBP	core	14	10.9	9	-potente elminto e citotossina -causa rilascio di istamina da basofili e mastcellule -neutralizza l'eparina -è battericida -aumenta la reattività bronchiale alla metacolina nei primati -potente antagonista pistrinico -provoca broncospasmo -attiva i neutrofili
ECP	matrice	18-21	10.8	5	-potente elminto e neurotossina -inibisce proliferazione di linfociti -causa rilascio di istamina da mast cellule -ha debole attività RNasica -è battericida -neutralizza l'eparina e altera la fibrinolisi
EDN	matrice	18-19	8.9	3	-potente neurotossina -inibisce la proliferazione di linfociti -ha potente attività RNasica -è una debole elmintotossina
EPO	matrice	66	10.8	12	-in presenza di H_2O_2 + alogenuro: uccide microorganismi e cellule tumorali, causa rilascio di istamina e degranolazione di mast cellule, inattiva leucotrieni -in assenza di H_2O_2 + alogenuro: uccide microfilarie di Brugia; danneggia l'epitelio respiratorio

Adattata da: Gleich GJ, Abu-Ghazaleh RI, Glitz DG. 1994. Eosinophil granule proteins: structure and function. In: Gleich GJ, Kay AB (eds). Eosinophils in allergy and inflammation. Marcel Dekker, Inc.

Appare chiaro come le proteine cationiche condividano tra loro non soltanto proprietà chimiche ma molto spesso anche l'attività biologica. Sembra che, soprattutto la tossicità nei confronti di parassiti e di cellule di mammiferi, sia correlata alla cationicità delle proteine.

1. Major Basic Protein (MBP)

La MBP rappresenta il 55% delle proteine granulari totali ed è caratterizzata da un punto isoelettrico di 10.9, dovuto all'alto contenuto in arginina (13%) (15,77).

La MBP, che non ha alcuna attività enzimatica nota, è dotata di una potente azione antiparassitaria e citotossica.

Uccide infatti larve di elminti e cellule tumorali ed ha un'azione tossica dose-dipendente su molte cellule umane (determina alterazione delle cellule dell'epitelio bronchiale di cui blocca il movimento ciliare) (15).

Si trova a concentrazioni elevate nei liquidi biologici di pazienti affetti da malattie associate ad eosinofilia (vedi pag. 8). Attiva i neutrofili, potenziando il rilascio di acqua ossigenata (13) e di anione superossido (78), l'espressione di molecole di adesione di membrana (13) e la fagocitosi di E. coli non opsonizzato (79). Recentemente è stato individuato sui neutrofili un recettore specifico per la MBP (80). Altre funzioni non citotossiche attribuite alla MBP riguardano il rilascio di istamina da basofili e mast cellule (81), l'attivazione delle piastrine (82) e l'inibizione della produzione di anione superossido, in seguito a stimolazione con PMA, da parte di macrofagi alveolari (83).

Il potere citotossico della MBP si basa, senza dubbio, sull'alta carica positiva che facilita l'attacco alle membrane cellulari. Esistono dati sperimentali che confermano questo meccanismo di tossicità per la MBP. Alcuni poliaminoacidi acidici agiscono infatti come potenti inibitori dell'effetto citotossico della MBP su cellule di linee tumorali (84).

2. Eosinophil Cationic Protein (ECP)

L'ECP, localizzata nella matrice del granulo, ha un punto isoelettrico pari a 10.8. Appartiene alla superfamiglia delle RNasi, della quale fanno parte anche la EDN e l'angiogenina (85). Si distingue dalla EDN per il più alto pI e per il suo potere citotossico più elevato. L'ECP è citotossica per batteri, parassiti e vari tipi cellulari (13). Sembra che questa azione sia correlata alla sua attività perforinica. L'ECP è in grado di formare pori ionici voltaggio-sensibili, come è stato dimostrato in un modello in cui si utilizzavano strati bilipidici planari (86). Risulta coinvolta nella patogenesi di lesioni cardiache con ipereosinofilia e nei processi flogistici attraverso la modulazione dei sistemi della coagulazione, della fibrinolisi e delle chinine (87). Svolge diverse altre funzioni biologiche: riduce la risposta dei linfociti T agli antigeni (87), inibisce la produzione di immunoglobuline e la proliferazione in vitro di plasmacellule umane (88) ed attiva le piastrine (82).

3. Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN)

L'EDN è stata inizialmente identificata per la sua capacità nel provocare quella reazione neurotossica nei conigli denominata fenomeno di Gordon. L'azione tossica della EDN si esplica sulla mielina del midollo spinale, ponte e cervelletto (15,85). Questo effetto neurotossico è condiviso in parte anche dalla ECP. Le due proteine presentano una notevole omologia nella sequenza aminoacidica (85). L'EDN ha un'attività RNasica molto simile a quella della RNasi pancreatica e approssimativamente cento volte più elevata di quella della ECP (85). Recenti studi effettuati su diversi tipi di proteine con attività ribonucleasica (RNasi epatica, per esempio) hanno dimostrato che questa azione enzimatica è necessaria ma non sufficiente per l'effetto neurotossico (86). L'EDN è considerata meno tossica per cellule e parassiti rispetto alla ECP. Se confrontata con le altre proteine cationiche, la EDN ha una attività battericida ed elmintotossica minore. Anche il suo punto isoelettrico è meno elevato (8.9).

4. Eosinophil Peroxidase (EPO)

La EPO è una proteina formata da due subunità di 15 e 55 Kdalton, contenente un gruppo eme. E' localizzata, come la ECP e la EDN, nella matrice dei granuli secondari; il suo contenuto è stato valutato in $12 \mu\text{g}/10^6$ eosinofili (86). Anche il suo punto isoelettrico è molto alto (10.8).

Le diverse funzioni svolte dalla EPO sono correlate alla sua attività enzimatica. Esistono vari tipi di perossidasi che prendono il nome dai particolari tessuti o dal particolare tipo cellulare in cui è stata rilevata la loro presenza. La EPO ha un alto grado di omologia (70% circa) con la mieloperossidasi (MPO), la perossidasi dei leucociti neutrofili (89). Queste due proteine sono state perciò paragonate dal punto di vista enzimatico e si è visto che le loro attività presentano piccole differenze. La EPO è in grado di funzionare ad un pH inferiore a quello della MPO (90,91) e utilizza preferibilmente il bromuro anziché il cloruro, come alogenuro (92).

Le funzioni biologiche della EPO sono state studiate soprattutto come attività del sistema EPO-H₂O₂-alogenuro, che porta alla formazione di ipoalogenuri, potenti agenti ossidanti.

Il sistema EPO-H₂O₂-alogenuro è un potente agente tossico nei confronti di batteri come lo *Staphylococcus aureus* e l'*Escherichia coli* (93,94), di protozoi come il *Toxoplasma gondii* e il *Trypanosoma cruzi* (95), di micobatteri come il *Mycobacterium leprae* e di trematodi come lo *Schistosoma mansoni* (96). Si riconosce un'attività citocida anche nei confronti di mast-cellule, di pneumociti e di cellule tumorali di mammifero (97).

Quando l'enzima si trova legato a parassiti, questo legame potenzia la loro uccisione da parte dei fagociti mononucleati (98). E' molto interessante che il legame della EPO a cellule tumorali renda suscettibile la lisi alla H₂O₂. Le cellule tumorali rivestite di EPO sono infatti lisate da macrofagi; la lisi è inibita dalla catalasi e dall'azide, suggerendo la necessità dell'H₂O₂ e della proteina enzimaticamente attiva (99). Tutto ciò fa pensare che ci sia un'azione sinergica tra la citofilia della EPO, dovuta

probabilmente alla sua alta cationicità, e l' H_2O_2 , rilasciata spontaneamente dai macrofagi, nella distruzione delle cellule tumorali.

L'EPO interagisce anche con le mast cellule: la formazione di complessi di EPO con i granuli è più efficiente dell'EPO da sola nello stimolare la secrezione delle mast cellule stesse (100). Va inoltre ricordata l'attivazione delle piastrine da parte della EPO (82).

Alla EPO viene riconosciuto anche un ruolo antinfiammatorio: essa è in grado di inattivare il leucotriene B_4 , che ha attività chemiotattica, e di convertire i leucotrieni C_4 e D_4 in due isomeri del LTB_4 , cento volte meno attivi del LTB_4 (15).

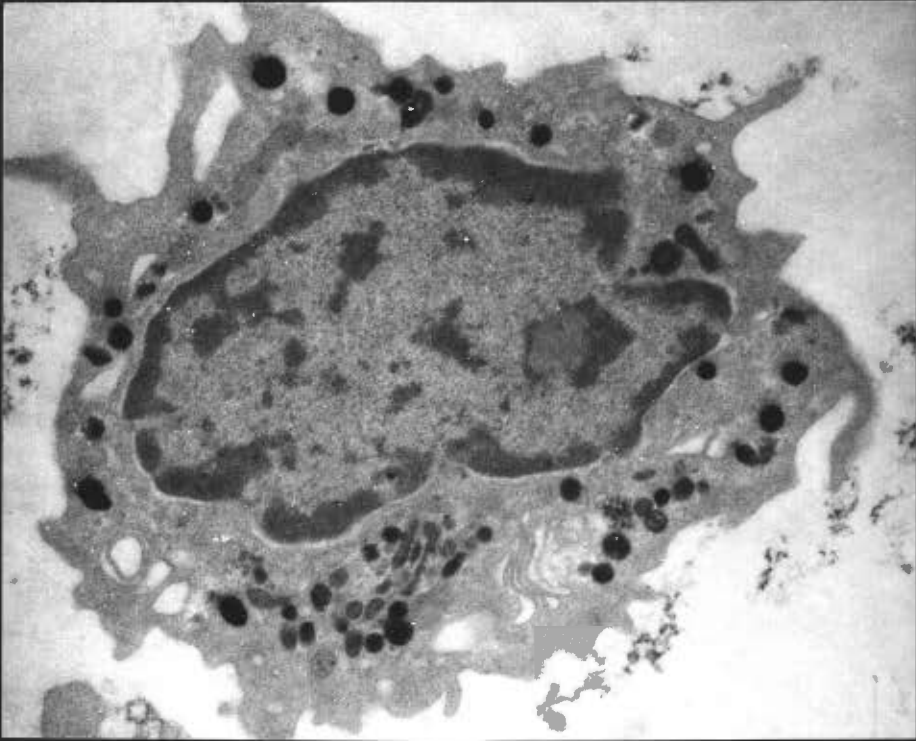
La possibilità per questa proteina di svolgere svariate funzioni biologiche e la dimostrazione che essa è in grado di legarsi a vari tipi cellulari presenti nel focolaio infiammatorio (101-103) sono stati motivi fondamentali della nostra iniziale ricerca. I primi studi effettuati nel nostro laboratorio riguardavano il legame della EPO con linfociti, neutrofili, monociti e neutrofili (101). I risultati suggeriscono l'ipotesi che l'EPO, quale agente ad elevato potere citotossico, venga eliminata dal sito d'infiammazione per sequestrazione in alcune cellule infiammatorie, e cioè neutrofili, monociti, linfociti e mast-cellule.

Nella **Figura 1** si mostra il legame della EPO con monociti evidenziato da tecniche di microscopia elettronica.

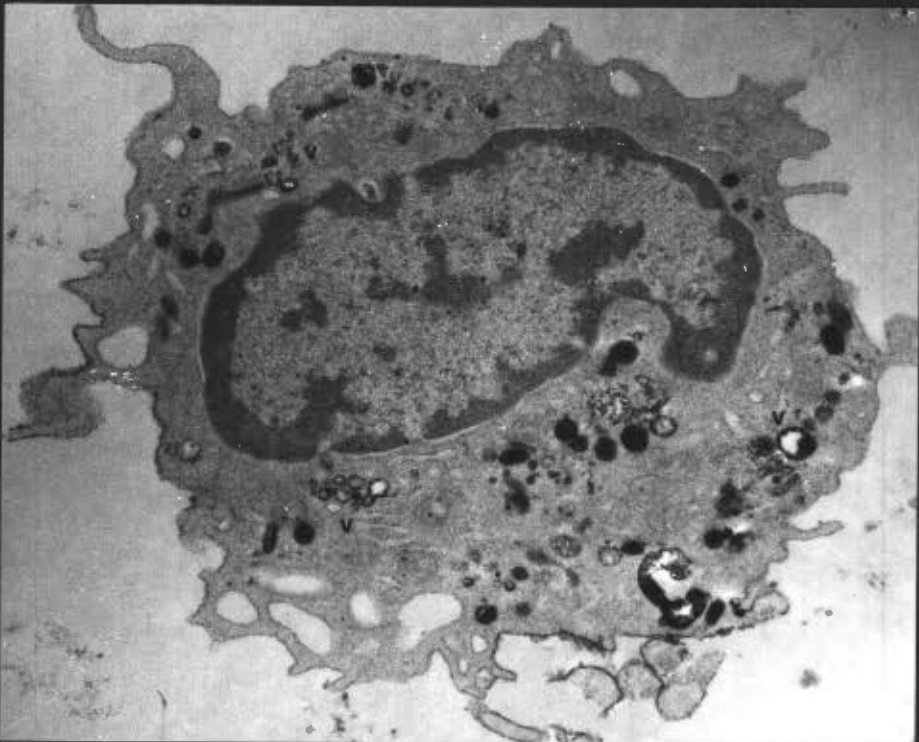
Lo studio diretto successivamente alle caratteristiche morfologiche del legame e avente come bersaglio cellulare il neutrofilo ha messo in evidenza che l'attacco dell'enzima alla membrana ha elevate caratteristiche di specificità (104). Il probabile recettore non è stato comunque ancora caratterizzato.

Figura 1. Immagine al microscopio elettronico di un monocita umano colorato per la reazione perossidasiica dopo 10 minuti di incubazione in assenza di perossidasi esogena (a) e dopo 10 minuti di incubazione con EPO (1 UG/ml) (b). Si noti in b la presenza del prodotto della reazione perossidasiica associato alla membrana ed a strutture vescicolari intracitoplasmatiche (v). (x 11.200)

a



b



Si sono inoltre indagati gli effetti biologici che questo legame comporta per i neutrofili. E' stato dimostrato, in effetti, che l'EPO è in grado di stimolare l'aggregazione dei neutrofili e l'adesione alle cellule endoteliali (104,105).

Infine, altri autori hanno dimostrato che macrofagi e basofili legano alla loro plasmamembrana l'EPO rilasciata nell'ambiente extracellulare, la internalizzano in vescicole endocitiche e la immagazzinano rispettivamente nei fagolisosomi e nei granuli secretori (106).

Per l'ECP e l'EDN non si hanno dati precisi sul loro legame con vari tipi cellulari.

Esistono studi molto interessanti però che, ancora una volta, ci permettono di considerare il significato di una probabile collaborazione tra eosinofili e macrofagi.

In uno di questi, rivolto all'attivazione e citolisi di eosinofili in polmoniti croniche eosinofiliche, la presenza di ECP, assieme a quella della MBP, è stata evidenziata in strutture citoplasmatiche di macrofagi alveolari (107). Anche in questo caso si può supporre che la sequestrazione operata dai macrofagi sia un sistema per l'eliminazione di agenti potenzialmente dannosi o che le proteine segregate possano in qualche modo far rilasciare al macrofago prodotti nocivi risultanti da un processo di attivazione.

Alla luce di tutti questi dati, vista la grande varietà di effetti biologici che le proteine granulari degli eosinofili possono esercitare su altri tipi di cellule e considerando il fatto che in molte situazioni patologiche c'è una stretta associazione tra macrofagi ed eosinofili, abbiamo ipotizzato che l'azione protettiva degli eosinofili in varie patologie potesse esercitarsi anche indirettamente e cioè attraverso un'azione sui macrofagi. Se ciò

avvenisse, si verrebbe a configurare per gli eosinofili un duplice ruolo nelle reazioni difensive in cui sono coinvolti: uno diretto, mediato dai prodotti di riduzione dell'ossigeno e dalle proteine cationiche rilasciate e agenti direttamente sul bersaglio, ed uno indiretto, dipendente dall'azione attivante sui macrofagi da parte delle proteine granulari.

I MACROFAGI

I macrofagi costituiscono una popolazione eterogenea di cellule (108) presenti in quasi tutti i tessuti. Derivano da una cellula circolante, il monocita, che a sua volta proviene da una cellula staminale presente nel midollo osseo (109).

Nonostante le molteplici e distintive caratteristiche fenotipiche e funzionali che il monocita-macrofago può assumere in base alla localizzazione tissutale e alla funzione cui è deputato, sarà sufficiente, per il nostro studio, fare una sommaria distinzione tra macrofagi residenti e macrofagi infiammatori.

I primi, derivati da monociti del sangue e, in parte, dalla proliferazione di macrofagi presenti nei tessuti, acquisiscono caratteristiche biochimiche, funzionali e strutturali che dipendono dal microambiente in cui maturano e dove svolgono funzioni altamente specializzate. Per esempio, nel fegato, dove sono denominati "cellule di Kupffer", svolgono un'azione "disintossicante"; nel polmone (macrofagi alveolari) hanno un ruolo di difesa principalmente contro microorganismi e sostanze di diversa natura inalate con l'aria e contro gli effetti dannosi dei radicali liberi dell'ossigeno;

nell'osso (osteoclasti) hanno la funzione di rimaneggiamento della matrice ossea (110).

I macrofagi infiammatori derivano per la maggior parte da monociti circolanti reclutati nei tessuti da mediatori che si formano nel corso della reazione infiammatoria ed in piccola parte anche da macrofagi residenti.

I macrofagi, sia residenti che appena reclutati nella sede della reazione infiammatoria, presentano bassa attività microbica, citocida e fagocitica, scarse attività secretorie e metaboliche.

Nel corso della reazione infiammatoria, in seguito all'interazione con l'agente eziologico stesso e con fattori liberati dai linfociti, i macrofagi si modificano profondamente sia dal punto di vista strutturale che funzionale assumendo quelle caratteristiche per cui vengono definiti macrofagi attivati. Il concetto di attivazione macrofagica si è sviluppato negli anni sessanta sulla base degli studi di Mackaness e collaboratori, i quali notarono che macrofagi derivati da animali resi resistenti all'infezione di parassiti intracellulari facoltativi dimostravano un'aumentata attività microbica nei confronti di diversi organismi (111). Successivi studi hanno confermato l'esistenza di differenze morfologiche, metaboliche e funzionali tra macrofagi "resting" e macrofagi attivati (112-117). Questi ultimi presentano una elevata attività di sintesi proteica che si riflette in una maggiore attività secretoria e talvolta in un aumento delle dimensioni cellulari, hanno un citoplasma con superficie ricca di estroflessioni, un numero maggiore di mitocondri e livelli elevati di enzimi idrolitici e lisosomiali, nonché una maggiore attività di membrana con aumentata endocitosi.

Numerosi sono gli agenti capaci di attivare i macrofagi. I più importanti dal punto di vista fisiologico sono alcuni componenti della parete batterica (muramildipeptide e lipopolisaccaride), componenti del tessuto connettivo (fibronectina) o del siero (complemento) e prodotti liberati dai linfociti (117). Durante l'infezione l'attivazione dei macrofagi è caratterizzata dal rilascio di particolari linfocine da parte dei linfociti T, sensibilizzati in modo specifico dagli antigeni degli organismi infettivi. L'interferone γ e il GM-CSF sono certamente le linfocine più importanti per l'attivazione macrofagica (117).

Nel senso ormai più largamente accettato, il termine "attivazione" si riferisce alla cellula che ha aumentato la sua capacità di uccidere microorganismi intracellulari e, soprattutto, cellule tumorali. I parassiti maggiormente coinvolti sono il *Mycobacterium tuberculosis*, la *Listeria monocytogenes*, la *Leishmania donovani*, il *Toxoplasma gondii* e alcuni funghi (116). I macrofagi sono anche in grado di eliminare alcuni microorganismi extracellulari come i pneumococchi.

L'attività dei monociti-macrofagi nei confronti dei tumori nell'uomo è stata ed è ampiamente studiata, anche se ancora non del tutto compresa. Si pensa, però, che i macrofagi inibiscano la crescita spontanea di alcune neoplasie. Questa funzione di controllo non coinvolge la fagocitosi. I macrofagi, piuttosto, uccidono le cellule tumorali per mezzo di prodotti di secrezione, quali enzimi lisosomiali, metaboliti dell'ossigeno come l' H_2O_2 , proteasi citolitiche e il TNF (117-120). Si deve, comunque, sottolineare il fatto che solo in seguito al processo di attivazione il macrofago è in grado di esplicare al meglio quelle funzioni che lo rendono cellula fondamentale nel ruolo difensivo e nell'azione antitumorale.

La **Tabella 3** offre un sommario delle principali funzioni nei meccanismi di difesa e dei cambiamenti che avvengono nel macrofago in seguito alla sua attivazione.

Tabella 3. Principali funzioni dei fagociti mononucleati e loro modificazioni in seguito al processo di attivazione.

Attività microbica (\uparrow)
Attività tumoricida (\uparrow)
Chemiotassi (\uparrow)
Fagocitosi (dipendente dalle particelle)
Pinocitosi (\uparrow)
Trasporto e metabolismo del glucosio (\uparrow)
Burst respiratorio associato alla fagocitosi (\uparrow)
Presentazione dell'antigene (\uparrow)
Secrezione
 lisozima (NC)
 prostaglandine, leucotrieni (\downarrow)
 apolipoproteina E, lipoprotein lipasi (\downarrow)
 elastasi (\downarrow)
 componenti del complemento (\uparrow o NC)
 idrolasi acide (\uparrow)
 collagenasi (\uparrow)
 attivatore del plasminogeno (\uparrow)
 proteasi citolitiche (\uparrow)
 argininasi (\uparrow)
 fibronectina (\uparrow)
 IL-1 (\uparrow)
 TNF (\uparrow)
 IFN- α e IFN- β (\uparrow)
 fattore angiogenetico (\uparrow)

\uparrow indica che l'attività o i prodotti aumentano nel macrofago attivato, \downarrow indica diminuzione e NC nessun cambiamento. Questo elenco è basato principalmente su studi fatti con macrofagi di animali o umani infettati con parassiti intracellulari; in alcuni casi i dati sono stati confermati dall'aggiunta di IFN- γ in vitro.

Da: Johnston R.B. 1988. "Current concepts: Immunology - Monocytes and macrophages", The New England Journal of Medicine, 318; 747-752.

MATERIALI E METODI

1. ISOLAMENTO DI MONOCITI DA SANGUE UMANO PERIFERICO.

I monociti sono stati purificati da concentrati di leucociti (buffy coats) preparati dalla Banca del Sangue di Trieste. Questi concentrati di leucociti sono ottenuti eliminando dal sangue il plasma e gran parte dei globuli rossi mediante semplici tecniche di centrifugazione.

Nella **Figura 2** viene rappresentato schematicamente il procedimento adottato che qui di seguito descriviamo.

Dopo diluizione con un uguale volume di PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) addizionato con EDTA (etilendiaminotetraacetato tetrasodico) 1 mM e glucosio 5mM (PBS-EDTA-glucosio) i concentrati di leucociti vengono centrifugati a 250xg per 10 minuti a 4°C per allontanare gran parte delle piastrine che in questi preparati sono molto numerose. Dopo aver eliminato il supernatante, il fondello, costituito da eritrociti e leucociti, viene risospeso nella soluzione PBS-EDTA-glucosio. Circa 35 ml della sospensione vengono stratificati su 15 ml di Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norvegia) in provette tipo "Falcon" da 50 ml. Segue una centrifugazione a 800xg per 25 minuti a 4°C che porta alla formazione di una banda all'interfaccia tra PBS e Lymphoprep, contenente linfociti, monociti e piastrine contaminanti. Dopo aver prelevato e risospeso la banda in PBS-EDTA-glucosio, si centrifuga a 250xg per 10 minuti a 4°C. Seguono due ulteriori lavaggi in PBS-EDTA-glucosio per eliminare il più possibile le piastrine. Le cellule vengono infine risospese in un volume noto di RPMI-1640 addizionato a Hapes 25 mM pH 7.4 (Whittaker M.A., Bioproducts, Inc., Walkerville, MA).

Il numero delle cellule ottenute viene determinato con un contatore elettronico (Coulter Counter Mod. ZBI, Coulter Electronics Ltd, Luton, Inghilterra). Le cellule vengono poi diluite alla concentrazione di 1.5×10^6 monociti/ml. Il numero dei monociti viene calcolato sulla base della formula leucocitaria di un citocentrifugato colorato con una soluzione per preparati ematologici Diff-Quik (Harleco Philadelphia, PA).

Aliquote di 100 μ l della sospensione di cellule (150.000 monociti) vengono aggiunti nei pozzetti di micropiastre per colture cellulari (Costar, Cambridge, MA) ed incubate per 90 minuti in termostato a 37°C in 5% CO₂-95% di umidità. Successivamente i linfociti, che sono cellule non aderenti, vengono eliminati mediante tre cicli di lavaggio con 150 μ l di PBS. Ai monociti adesi si aggiungono 200 μ l di medium di coltura costituito da RPMI-1640 Hepes 25 mM pH 7.4, arricchito con 100 U/ml di penicillina, 100 μ g/ml di streptomina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 2 mM glutamina (Sigma) e 10% siero umano (proveniente da almeno 20 donatori diversi) non scomplementato e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. Il mezzo di coltura viene sostituito con mezzo di coltura fresco ogni quattro giorni.

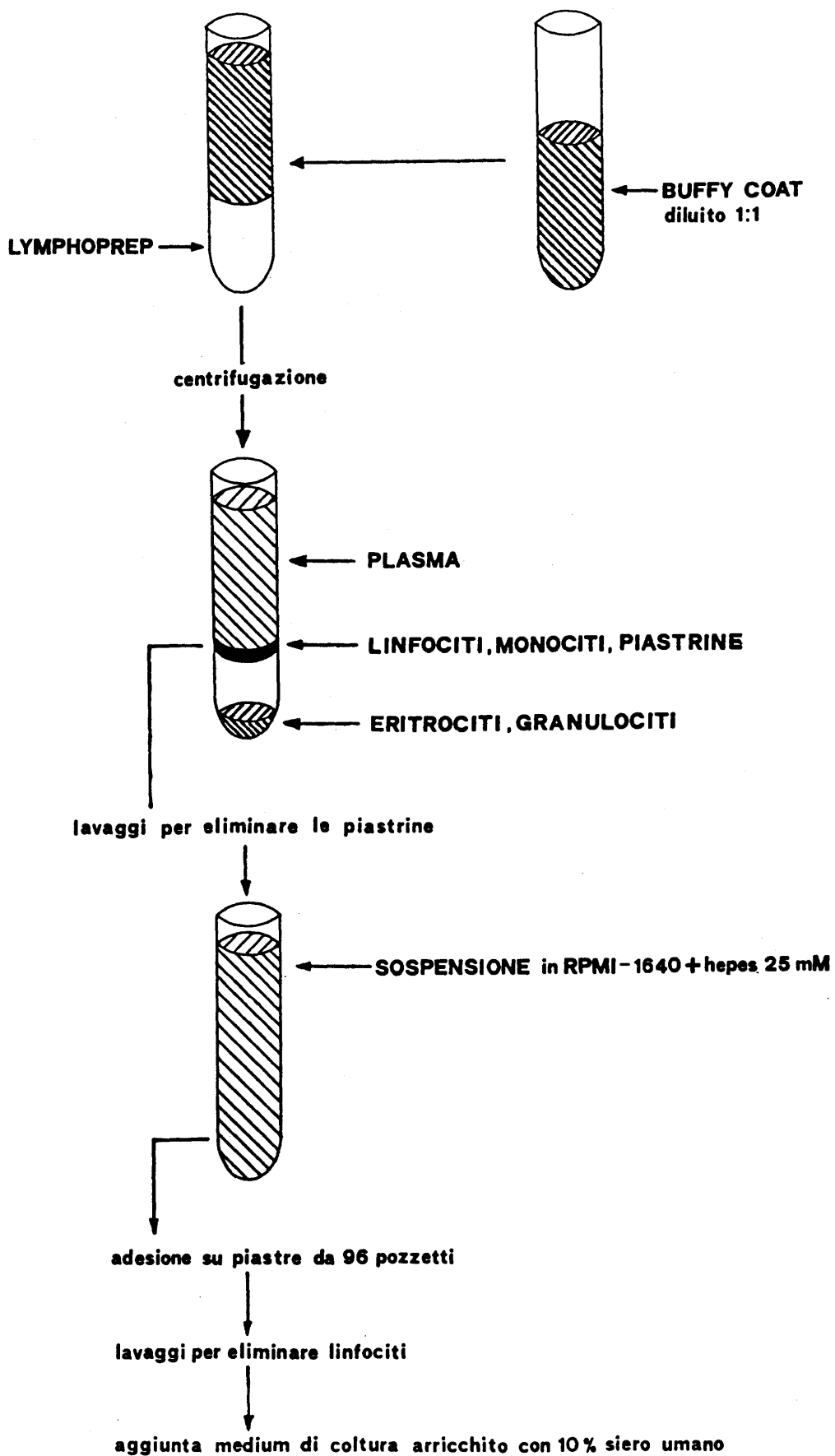


Figura 2. Rappresentazione schematica del metodo impiegato per la purificazione di monociti a partire da concentrati di leucociti (buffy coats)

2. ISOLAMENTO DI MACROFAGI MURINI PERITONEALI.

Topi appartenenti ai ceppi Balb/c, C3H/HeN e C3H/HeJ vengono trattati con una iniezione intraperitoneale di tioglicollato allo scopo di ottenere un essudato ricco di macrofagi (121). La soluzione di tioglicollato (Brewer Thioglycollate Medium, Difco Laboratories, West Molesely, Surrey, Regno Unito) al 10% viene prima autoclavata, raffreddata e conservata al buio per almeno due mesi prima dell'uso. Per ogni topo si inietta circa 1 ml della soluzione. Dopo 5 giorni, i topi vengono uccisi per dislocazione cervicale e dalla cavità peritoneale si estrae l'essudato per mezzo di una siringa dopo aver introdotto circa 2 ml di PBS sterile per agevolare l'operazione. Le cellule così raccolte (> 95% macrofagi, a giudicare dalla conta differenziale su citocentrifugati) vengono lavate con PBS, risospese in RPMI-1640 arricchito con siero fetale bovino (FCS) al 10%, contate e poste in piastre per colture cellulari (80.000 cellule per pozzetto). Questi macrofagi possono essere utilizzati dopo 24 ore di incubazione in un termostato a 37°C in 5% CO₂-95% di umidità.

3. ISOLAMENTO DI GRANULOCITI EOSINOFILI DA SANGUE UMANO PERIFERICO.

I granulociti sono stati purificati secondo il metodo pubblicato da Cramer et al (122). Brevemente, al sangue raccolto in A.C.D. (Laboratori Don Baxter Spa, Trieste) come anticoagulante, viene aggiunto EDTA 1mM finale e destrano (Dextran T-500, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala,

Svezia) al 4.5% in soluzione fisiologica in rapporto di 1 ml per ogni 5 ml di sangue per far sedimentare i globuli rossi. Dopo circa 30 minuti di sedimentazione a temperatura ambiente, il plasma ricco di leucociti (supernatante post-destrano) viene raccolto e diluito 1:1 in una soluzione di PBS-citrato-BSA. Questa soluzione è costituita da PBS arricchito con citrato trisodico 13 mM, portata a pH 7.4 e a 290 ± 2 mosm/l. L'osmolarità viene controllata con un osmolimetro crioscopico (Osmomat 030, Gonotec, Berlino). Alla soluzione di PBS-citrato si aggiunge albumina serica bovina (BSA) (frazione V, Miles Scientific, Naperville) allo 0.5% finale. Il plasma ricco di leucociti, così diluito, viene centrifugato a 250xg per 7 minuti. Il fondello di cellule viene lavato una volta con PBS-citrato-BSA a 250xg per 7 minuti e quindi risospeso ad una concentrazione di $20-25 \times 10^6$ cellule/ml in una soluzione di Percoll (Pharmacia) portata alla densità di 1.0853 g/ml con PBS-citrato-BSA. La densità viene controllata con un densitometro (modello DMA45, Paar, Graz). Aliquote di 4 ml di questa sospensione vengono stratificate in provette monouso da 10 ml su un cuscino di Percoll di densità 1.1275 g/ml e su ciascuna di esse si stratifica 1 ml circa di PBS-citrato-BSA. Dopo centrifugazione a 1000xg per 20 minuti a 18°C, si ottengono, in ciascuna provetta, due bande ben distinte: una all'interfaccia tra PBS e Percoll 1.0853 e una tra Percoll 1.0853 e cuscino, separate da una zona intermedia (**Fig. 3**).

Gli eosinofili, presenti all'interfaccia tra Percoll 1.0853 ed il cuscino vengono raccolti, diluiti in PBS-citrato-BSA e centrifugati a 250xg per 7 minuti a 4°C. Il supernatante viene eliminato e gli eritrociti che contaminano il fondello contenente gli eosinofili vengono eliminati con una lisi ipotonica. Per far ciò, il fondello viene risospeso in 3 volumi di soluzione

ipotonica costituita da tampone fosfato 1 mM pH 7.4 e, dopo 30 secondi, si ripristina l'isotonicità del mezzo aggiungendo 7 volumi di soluzione ipertonica (NaCl 1.3% in tampone fosfato 1mM pH 7.4). La concentrazione della sospensione cellulare viene determinata utilizzando un contatore elettronico. La popolazione cellulare ottenuta viene caratterizzata sulla base della conta differenziale dei citocentrifugati colorati con Diff-Quik. Di solito i granulociti eosinofili costituiscono il 92-98% della popolazione, il rimanente 2-8% è costituito da granulociti neutrofili.

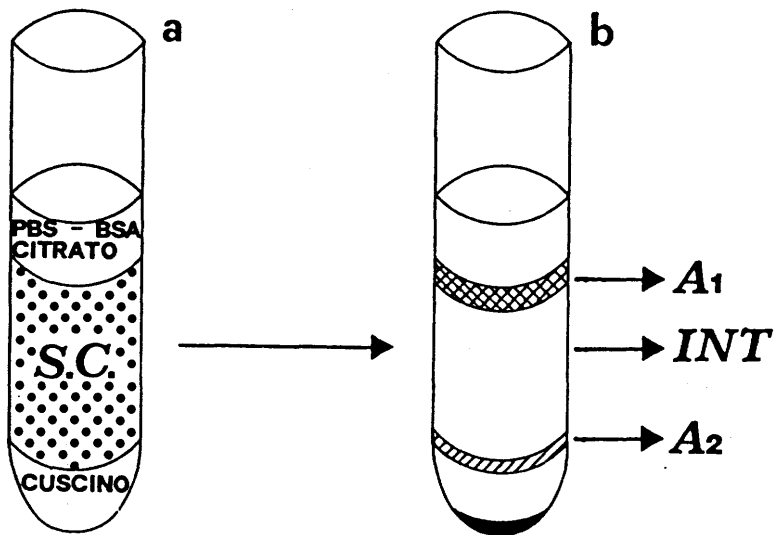


Figura 3. Purificazione degli eosinofili. Schema della stratificazione della sospensione (a) e della distribuzione degli anelli dopo centrifugazione (b). SC = sospensione cellulare in Percoll 1.0853 gr/ml. A1 = anello tra PBS-citrato-BSA e Percoll 1.0853 gr/ml. INT = zona intermedia. A2 = anello tra Percoll 1.0853 e cuscino

4. PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE CATIONICHE

Per la purificazione delle proteine cationiche eosinofile da noi utilizzate, il materiale di partenza era rappresentato da un pool di popolazioni di eosinofili ottenuti seguendo il metodo appena descritto e conservate a -20°C . Sono state utilizzate circa 2×10^9 cellule con una percentuale media di eosinofili pari al 97.5%.

Dopo scongelamento, le cellule vengono prima sonicate e successivamente omogenizzate in un omogenizzatore tipo Potter. Si effettua poi una prima estrazione con tampone acetato 20 mM pH 4.0 per 1 ora a 0°C . Con la successiva centrifugazione a $100.000 \times g$ per 30 minuti, gran parte delle proteine solubili e delle proteine non integrali di membrana vengono eliminate. Il pellet risultante viene nuovamente estratto con tampone acetato 0.1 M pH 4.7 contenente Na_2SO_4 0.1 M e cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) (BDH Limited Poole, Inghilterra) 0.05% a 4°C per 2 ore. Il supernatante, derivato da un'ulteriore centrifugazione a $100.000 \times g$ per 30 minuti, viene mantenuto in ghiaccio, mentre il pellet subisce una seconda estrazione sempre per mezzo dello stesso tampone per 60 minuti. Con una successiva centrifugazione si ottiene un supernatante che viene aggiunto al primo. Così riuniti, i supernatanti derivati dalle due estrazioni vengono dializzati per 5 ore contro tampone fosfato 25 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M. Il materiale dializzato, centrifugato per 30 minuti a $100.000 \times g$, viene quindi caricato su una colonna a scambio cationico MONO S HR5/5 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) utilizzando un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

(Pharmacia) ed eluito con un gradiente lineare di NaCl in tampone fosfato 25 mM pH 7.4.

Su tutte le frazioni eluite vengono successivamente dosate l'attività ribonucleasica (RNasi) e l'attività perossidasi (i metodi sono descritti qui di seguito).

5. MISURA DELL'ATTIVITA' PEROSSIDASICA.

Questo saggio si basa sulla valutazione spettrofotometrica dell'ossidazione del guaiacolo per opera della perossidasi in presenza di H₂O₂. Il saggio è costituito da fosfato 100 mM pH 7.4 contenente guaiacolo 30 mM a cui vengono aggiunti il campione, tampone Krebs-Ringer Fosfato (KRP) (NaCl 122 mM, KCl 4.9 mM, Na₂HPO₄ 16.7 mM, MgCl₂ 1.2 mM) e CTAB 0.02% fino ad un volume di 1 ml. Dopo una preincubazione a 25°C per 1-2 minuti, la reazione di ossidazione del guaiacolo catalizzata dalla perossidasi viene fatta partire aggiungendo alla miscela H₂O₂ (0.11 mM finale). La formazione di guaiacolo ossidato (tetraguaiacolo) viene monitorata seguendo l'incremento di densità ottica a 470 nm per un minuto. L'attività perossidasi viene espressa in unità guaiacoliche (UG) corrispondenti alle μ moli di tetraguaiacolo formate per minuto di reazione (0.01 μ moli TG/ml assorbono 0.266 D.O)

6. MISURA DELL'ATTIVITA' RIBONUCLEASICA.

Il saggio viene effettuato mediante tecniche spettrofotometriche. Le ribonucleasi catalizzano l'idrolisi dell'RNA, portando alla formazione di prodotti il cui massimo di assorbimento è spostato verso lunghezze minori di quelle del composto non idrolizzato (123).

E' possibile, dunque, sfruttando questo principio, misurare l'attività ribonucleasica valutando nel tempo il decremento di densità ottica a 300 nm. Il volume del saggio è di 1 ml, di cui 0.5 ml sono rappresentati dal tampone substrato costituito da acido ribonucleico (RNA) estratto da fegato di vitello (Sigma) 1 mg/ml, disciolto in una soluzione di acetato di sodio 0.1 M pH 5.5. Il campione, aggiunto al tampone substrato, viene diluito con acqua e portato a 0.5 ml. L'attività dei campioni viene paragonata con uno standard di RNasi pancreatica bovina (Sigma).

7. DOSAGGI IMMUNOENZIMATICI (ELISA) SULLE FRAZIONI OTTENUTE DALLA CROMATOGRAFIA A SCAMBIO CATIONICO.

Per questi dosaggi sono stati impiegati anticorpi policlonali specifici (anti ECP, anti EDN ed anti MBP) sviluppati in coniglio e gentilmente forniti dal Prof. G. Gleich della Mayo Clinic and Mayo Foundation, Rochester, MN. Aliquote delle frazioni vengono distribuite nei pozzetti di una piastra per ELISA (MaxiSorp, Nunc, Danimarca) dopo essere state diluite nel tampone $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 9.6. Dopo incubazione per 18 ore in una stufa a secco a 37°C per permettere l'adsorbimento sulla plastica delle

proteine contenute nelle frazioni, la piastra viene incubata per 1 ora a 4°C con PBS arricchito con BSA 3% per saturare i siti di legame aspecifico. Si fanno quindi tre lavaggi con PBS-T (PBS addizionato a Tween-20 0.05%), seguiti dall'aggiunta del primo anticorpo diluito 1:400 nel tampone usato per i lavaggi. Dopo un'incubazione di 1 ora a 4°C e tre successivi lavaggi, la piastra viene trattata con una soluzione di eparina 20 U/ml per 25 minuti, lavata e quindi incubata per 45 minuti sempre a 4°C con il secondo anticorpo anti-immunoglobuline di coniglio, ottenuto nella capra, coniugato con fosfatasi alcalina e diluito 1:500 in PBS-T arricchito con siero di capra al 2%. Dopo tre lavaggi viene aggiunto il substrato per l'enzima coniugato all'anticorpo, costituito da p-nitro-fenil-fosfato (PNPP) 1 mg/ml sciolto nella seguente soluzione: glicina 0.1 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM pH 10.4. Le letture si effettuano a 405 nm, utilizzando un lettore per micropiastre (Titertek Multiskan MCC/340, Labsystem, Finlandia).

8. ELETTROFORESI IN GEL DI POLIACRILAMIDE (SDS-PAGE).

L'elettroforesi è stata eseguita secondo il metodo proposto da Laemmli (124). Per caratterizzare l'EPO si è utilizzato il sistema BRL V1517 Vertical Electrophoresis Unit (BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Le corse elettroforetiche per ECP ed EDN sono state fatte con il sistema Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, California). I campioni sono stati diluiti 1:1 in un tampone TRIS-HCl 0.1 M pH 6.8, urea 4 M, glicerolo 20%, sodiododecilsolfato (SDS) 2% e β-mercaptoetanololo 1%, bolliti per 10 minuti e caricati infine su un gel di

poliacrilamide al 15% (pH 8.8) con uno "stacking" gel al 4% (pH 6.8). La corsa elettroforetica è stata condotta a 20 mA per gel, collegando il sistema elettroforetico ad un bagnetto termostato a 4°C. Dopo l'elettroforesi, i gels sono stati colorati con il Blu Coomassie o con i reagenti per la rivelazione argantica (125).

9. VALUTAZIONE DEL NUMERO DI CELLULE NELLE COLTURE.

Il numero dei macrofagi presenti nei pozzetti è stato determinato secondo il metodo descritto da Nakagawara e Nathan (126). In breve, dopo aver lavato i pozzetti per tre volte con PBS, si aggiungono 100 μ l di una miscela costituita da acido citrico 0.1 M pH 2.2, contenente CTAB 1% e Amido Black 0.05%. Questa miscela solubilizza le membrane delle cellule aderenti, lasciando intatti i nuclei che possono venir rimossi e contati. Dopo circa 1 ora il contenuto dei pozzetti viene prelevato, diluito in Isoton (Coulter Scientific, Milano) ed i nuclei contati con un contatore elettronico.

10. DOSAGGIO DEL CONTENUTO PROTEICO.

Il contenuto delle cellule nei pozzetti è stato determinato con il metodo descritto da Bradford (127), apportando delle lievi modifiche. I pozzetti vengono lavati tre volte con PBS e le cellule contenute in essi vengono prima solubilizzate con 50 μ l di NaOH 0.15 N. Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 200 μ l di miscela

"Bradford", contenente Coomassie Brilliant Blue G250 0.04% w/v, etanolo 4.7% v/v, H₃PO₄ 8.5% v/v. L'assorbimento del colore blu che si sviluppa può essere subito registrata a 620 nm con un lettore di piastra per ELISA. La quantità di proteine viene calcolata sulla base di uno standard di albumina serica bovina (BSA).

11. DETERMINAZIONE DEL RILASCIO DI H₂O₂ DA MACROFAGI.

L'H₂O₂ prodotta dai macrofagi viene misurata utilizzando un metodo che si basa sull'ossidazione dell'acido omovanillico (4-idrossi-3-metossi fenil acetico)(HVA, Sigma) da parte della perossidasi di rafano di tipo VI (HRP, Sigma). L'HVA è un composto non fluorescente che in presenza di H₂O₂ ed HRP viene ossidato in un composto fluorescente. L'intensità della fluorescenza risulta proporzionale alla quantità di H₂O₂ presente nel mezzo di incubazione (128).

Dopo tre lavaggi con PBS, i macrofagi aderenti nei pozzetti vengono incubati con 100 μ l di una miscela contenente KRP, CaCl₂ 0.5 mM, glucosio 5 mM, HVA 0.4 mM, HRP 10 μ g/ml, NaN₃ 1 mM in presenza o meno dell'agente stimolante che, nel nostro caso, è un estere del forbolo, più precisamente il forbolo-12 miristato-13 acetato (PMA, Sigma). Dopo 45 minuti di incubazione a 37°C, le miscele vengono prelevate dai pozzetti, centrifugate e diluite 10 volte in un tampone glicina/NaOH 25 mM pH 11 contenente EDTA 25 mM allo scopo di amplificare la fluorescenza. I campioni vengono così letti in uno spettrofotofluorimetro modello 650-10S (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT) ad una lunghezza d'onda di eccitazione

di 315 nm e ad una lunghezza di emissione di 425 nm. I valori di fluorescenza vengono convertiti in nanomoli di H_2O_2 sulla base di una curva standard costruita impiegando quantità note di H_2O_2 .

12. DETERMINAZIONE DEL TNF.

La misura del TNF viene fatta mediante un saggio biologico. Esso prevede l'utilizzo della linea cellulare WEHI-164, subclone 13, costituita da cellule di un fibrosarcoma murino, particolarmente sensibile all'azione citotossica del TNF, come riportato da Espevik e Nissen-Meyer (129). La citotossicità viene valutata sulla base della capacità che le cellule vive e quindi metabolicamente attive hanno di ridurre il composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT, Sigma). Questo sale solubile viene ridotto ad opera degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale. In seguito alla riduzione, l'MTT precipita sottoforma di cristalli color viola associati alle cellule.

Le cellule WEHI utilizzate per il dosaggio vengono coltivate in bottiglie per colture (PBI International, Milano) con RPMI-1640 arricchito con FCS al 10%. Vengono fatte crescere a $37^\circ C$ in un termostato a $CO_2/95\%$ di umidità e utilizzate quando raggiungono la confluenza. Le cellule vengono quindi staccate con PBS contenente EDTA 5 mM, lavate, risospese nel medium di coltura e contate con un contatore elettronico. Aliquote di 100 μl della sospensione cellulare, diluita a 2×10^5 cellule/ml, vengono aggiunte a pozzetti di micropiastre (Costar) e dopo 4 ore di incubazione nel termostato per permettere alle cellule di aderire, vengono

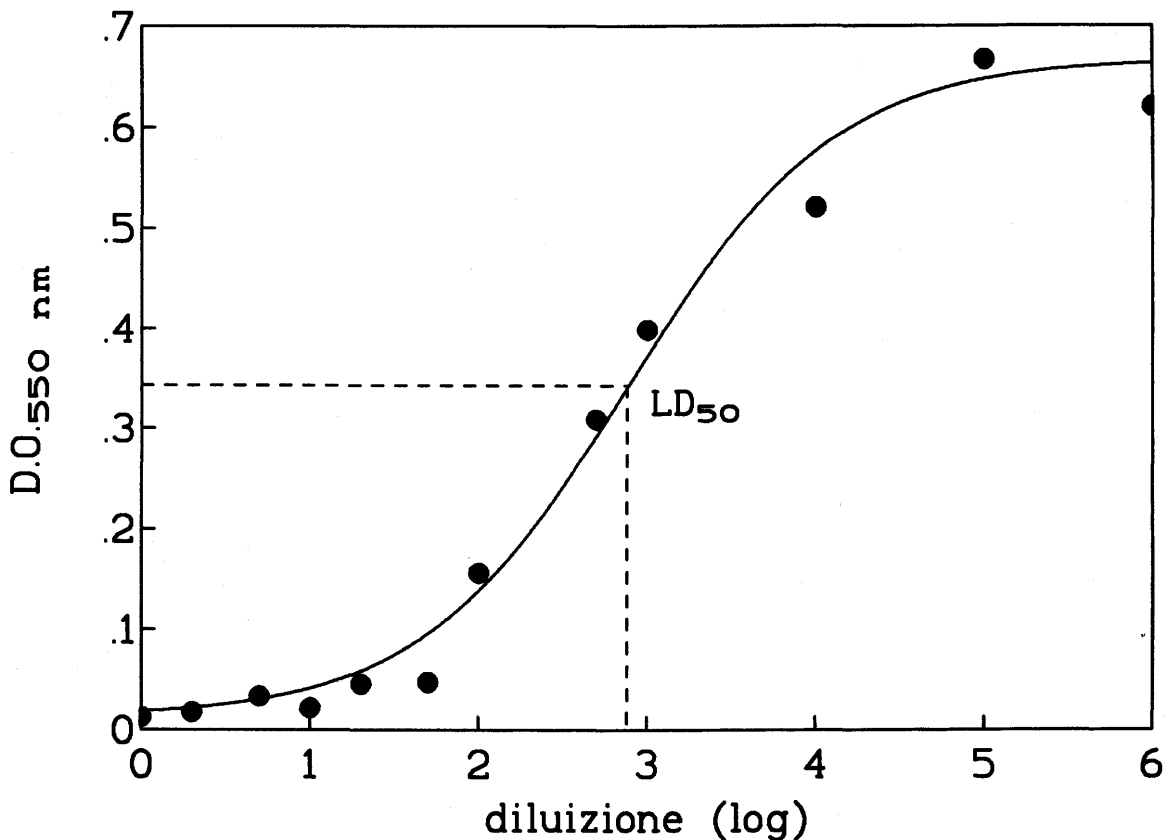


Figura 4. Esempio di una tipica curva di dose-risposta nel saggio di citotossicità con cellule del clone 13 della linea WEHI-164. In ascissa vengono riportate le diluizioni di un supernatante ottenuto da colture di macrofagi. Il 50 % di mortalità cellulare (coincidente con la metà del valore massimo di densità ottica) permette di ottenere le unità arbitrarie di TNF che corrispondono al reciproco della rispettiva diluizione.

aggiunti 100 μ l dei supernatanti provenienti dalle colture di macrofagi, conservati a -20°C fino al momento dell'uso e diluiti sequenzialmente (da 1:10 a 1:10⁶) in RPMI-1640-Hepes con siero umano al 10%. Dopo un'incubazione di circa 18 ore a 37°C , si aggiunge l'MTT, sciolto in PBS, alla concentrazione finale di 0.28 mg/ml e si incuba per altre 4 ore durante le quali avviene la riduzione del composto. Al termine di questa incubazione, il medium viene aspirato e i cristalli di MTT ridotto associati alle cellule vengono dissolti in 200 μ l di DMSO.

La quantità di MTT ridotto viene quindi valutata spettrofotometricamente la reazione mediante un lettore di micropiastre alla lunghezza d'onda di 550 nm. I valori di densità ottica, corrispondenti alle varie diluizioni dei supernatanti vengono utilizzati per costruire una curva ad andamento sigmoide dalla quale si ricava la diluizione in cui si osserva il 50% della citotossicità (LD₅₀) (Fig. 4). Il reciproco di questa diluizione viene assunto come numero di unità (arbitrarie) di TNF presenti nei supernatanti. Durante ogni esperimento la sensibilità della linea cellulare al TNF è stata controllata impiegando uno standard di TNF α ricombinante prodotto da gene umano nel lievito *Pichia pastoris* (Bissendorf Biochemicals, GMBH, Hannover, Germania).

13. DOSAGGIO DEL NITRITO (NO₂⁻).

La produzione di NO₂⁻ è stata misurata seguendo il metodo pubblicato da Migliorini et al (130). Brevemente, 100 μ l di supernatanti provenienti dalle colture di macrofagi murini, conservati a -20°C fino al momento dell'uso, vengono trasferiti nei pozzetti di micropiastre (Nunc, Danimarca). Immediatamente prima del saggio, uguali volumi di una soluzione di naftiletilendiamino diidrocloreuro 0.1% in acqua distillata e di una soluzione di sulfanilamide 1% in H₃PO₄ al 5%, vengono mescolati in modo da ottenere il cosiddetto "reattivo di Griess". Questo reattivo viene aggiunto (100 μ l) ai vari pozzetti. e dopo 10 minuti a temperatura ambiente l'assorbimento del composto colorato formato dall'interazione NO₂⁻-reattivo di Griess viene misurato con un lettore per micropiastre utilizzando

una lunghezza d'onda corrispondente a 550 nm. Come standard, viene utilizzato NaNO_2 .

14. ANALISI STATISTICA.

La significatività dei dati è stata calcolata utilizzando il test t di Student su dati appaiati.

15. ALTRI REAGENTI UTILIZZATI.

Dalla **Sigma Chemical Co** sono stati ottenuti i seguenti materiali:

- lipopolisaccaride (LPS) da *E. coli* 055:B5 (estratto fenolico)
- polimixina B solfato
- catalasi
- eparina (purificata dalla mucosa intestinale di maiale)
- acido poli-L-glutamico
- acido poliaspartico
- papaina
- tripsina
- proteinasi K

Il lisozima proviene dalla Società Italiana Antibiotici (SPA, Milano).

La mieloperossidasi (MPO) è stata gentilmente fornita dal Dr. R. Menegazzi.

L'IL-5 è stata donata dal Dr. G. Plaetinck (Roche Research Gent, Ghent, Belgio).

L'IFN- γ ricombinante umano è stato fornito dalla Genentech (San Francisco, CA).

Tutte le soluzioni sono state preparate usando acqua distillata apirogena (Laboratori Don Baxter Spa, Trieste)

RISULTATI

1. PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE CATIONICHE.

Le proteine cationiche, utilizzate nel nostro studio (EPO, ECP ed EDN), sono state purificate partendo da un omogenato di cellule (97.5% eosinofili), dopo solubilizzazione e cromatografia su una colonna a scambio cationico. Le frazioni sono state eluite con un gradiente di NaCl (0-2 M) (vedi Materiali e Metodi).

Nel profilo di eluizione proteica riportato nella **Figura 5**, possono essere identificati tre picchi principali ben delimitati, corrispondenti a tre gruppi di frazioni. Il primo picco, eluito ad una concentrazione ionica tra 0.2 e 0.4 M, è costituito dalle frazioni 27-34, il secondo dalle frazioni 37-42 (NaCl 0.5-0.65 M) ed il terzo dalle frazioni 70-76 (NaCl 1.4-1.7 M).

Questi picchi del profilo cromatografico sono distinguibili anche sulla base dell'attività enzimatica. Nella **Figura 6** vengono rappresentate graficamente l'attività RNasica (in blu) e perossidasi (in rosso) delle frazioni. L'attività RNasica è quasi completamente localizzata nei primi due picchi della cromatografia, mentre quella perossidasi caratterizza principalmente il picco corrispondente al gruppo di frazioni 70-76.

Sulla base della distribuzione dell'attività enzimatica (è noto, infatti, che ECP, ed in particolare, EDN, posseggono attività RNasica) e del profilo di eluizione che, essendo funzione della forza ionica, dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche delle nostre proteine (pI, densità di carica), è possibile quindi postulare che l'EDN sia localizzata nel primo picco, l'ECP nel secondo e l'EPO nel terzo.

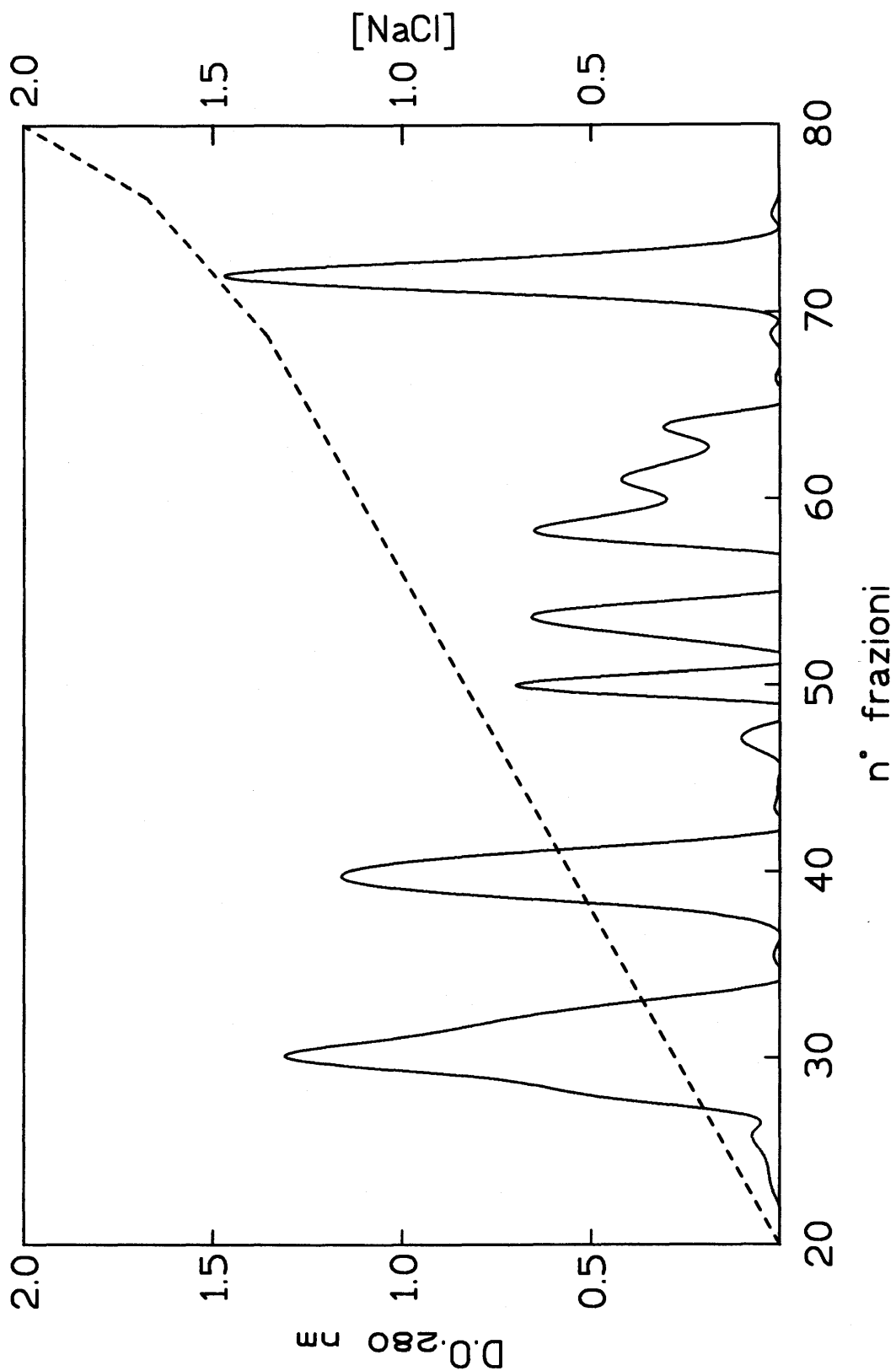


Figura 5. Profilo di eluizione dell'omogenato derivato da 2×10^9 cellule (97.5% eosinofili) ottenuto con un gradiente di NaCl in tampone fosfato 25 mM pH 7.4 utilizzando una colonna a scambio cationico MONO S HR5/5. La concentrazione di NaCl è rappresentata dalla linea tratteggiata.

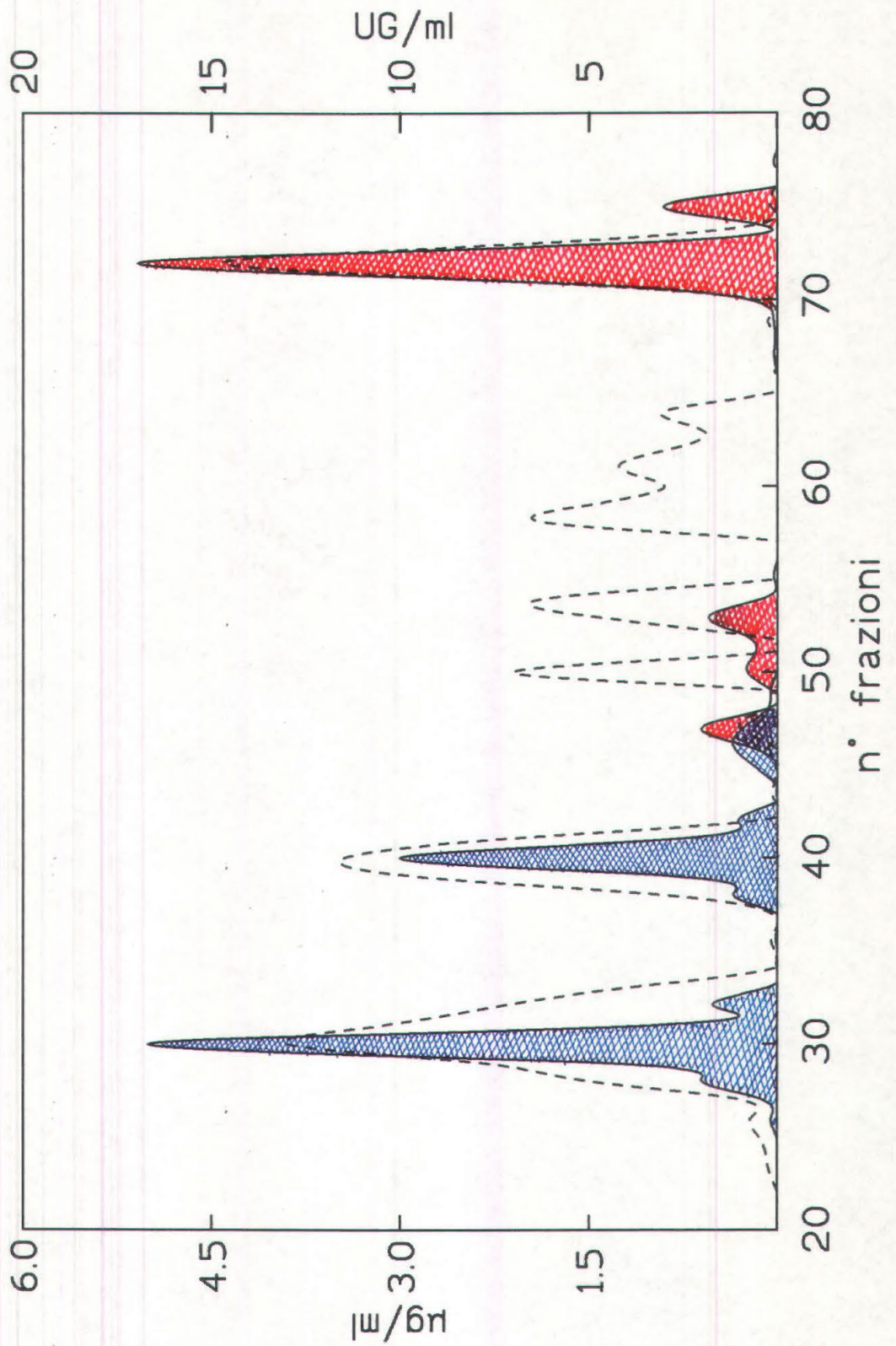


Figura 6. Attività RNasica (in blu) e perossidasi (in rosso) delle frazioni eluite con la colonna a scambio cationico. La linea tratteggiata rappresenta il profilo di eluizione (vedi Fig. 5).

Le indagini immunoenzimatiche eseguite utilizzando tre anticorpi policlonali (anti-ECP, anti-EDN ed anti-MBP), mostrano che EDN ed ECP sono presenti nei picchi in cui è localizzata l'attività RNasica (**Tabella 4**).

Tabella 4. Indagine immunoenzimatica sulle frazioni ottenute dalla cromatografia a scambio cationico.

frazioni	anti-ECP	anti-EDN	anti-MBP
27-34	+/-	++++	-
37-42	++	+/-	-
45-48	+	-	+/-
52-55	-	-	+/-
57-65	-	-	-
70-76	-	-	-

La positività agli anticorpi, indicata con il segno +, è espressa secondo un criterio arbitrario di valutazione basato sulla densità totale del pool di frazioni. Il segno - indica reazione negativa, il simbolo +/- corrisponde ad una reattività molto bassa all'anticorpo.

La **Figura 7** riporta lo spettro di assorbimento del pool delle frazioni 70-76, contenenti l'attività perossidasi. L'analisi dello spettro ci permette di aggiungere altre importanti informazioni sulle caratteristiche e sulla purezza del materiale proteico in esse contenuto. Lo spettro riportato nella figura è quello tipico della EPO. Come ogni altra proteina contenente il gruppo prostetico eme, anche la EPO possiede un picco caratteristico di

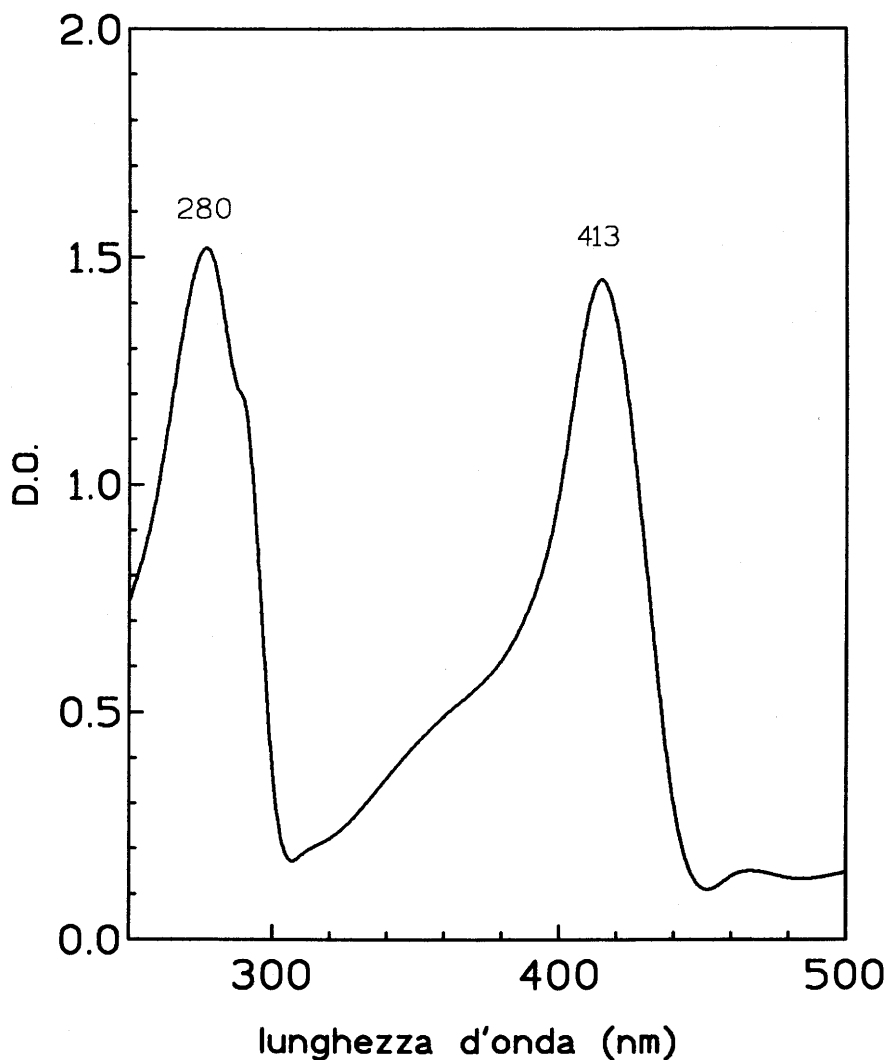


Figura 7. Spettro di assorbanza del pool delle frazioni 70-76.

di massimo assorbimento nella banda di Soret, localizzabile tra i 412 ed i 415 nm (131,132). Lo spettro della **Figura 7** mostra un picco di assorbimento avente un massimo a 413 nm. Il rapporto tra l'assorbanza a 413 e quella a 280 nm ($rz = \text{reinheit zahl}$) viene normalmente usato come indice di purezza per la EPO. Si considera pura una proteina che ha un rz pari a 1. Nel nostro caso l' rz delle frazioni 70-76 è uguale a 0.975, indicando un alto grado di purezza della nostra preparazione di EPO.

A questo punto l'analisi elettroforetica si è rivelata necessaria per completare la caratterizzazione del nostro materiale proteico e per escludere la presenza di eventuali contaminanti. La presenza di un singolo picco di proteine nel profilo di eluizione non dà garanzia dell'esistenza di una singola proteina: l'elevata carica positiva di EPO, ECP ed EDN rende infatti possibile la formazione di aggregati e complessi con altre proteine che potrebbero essere coeluite con le proteine di nostro interesse. La **Figura 8** mostra le proprietà elettroforetiche dell'EPO utilizzata nel nostro studio.

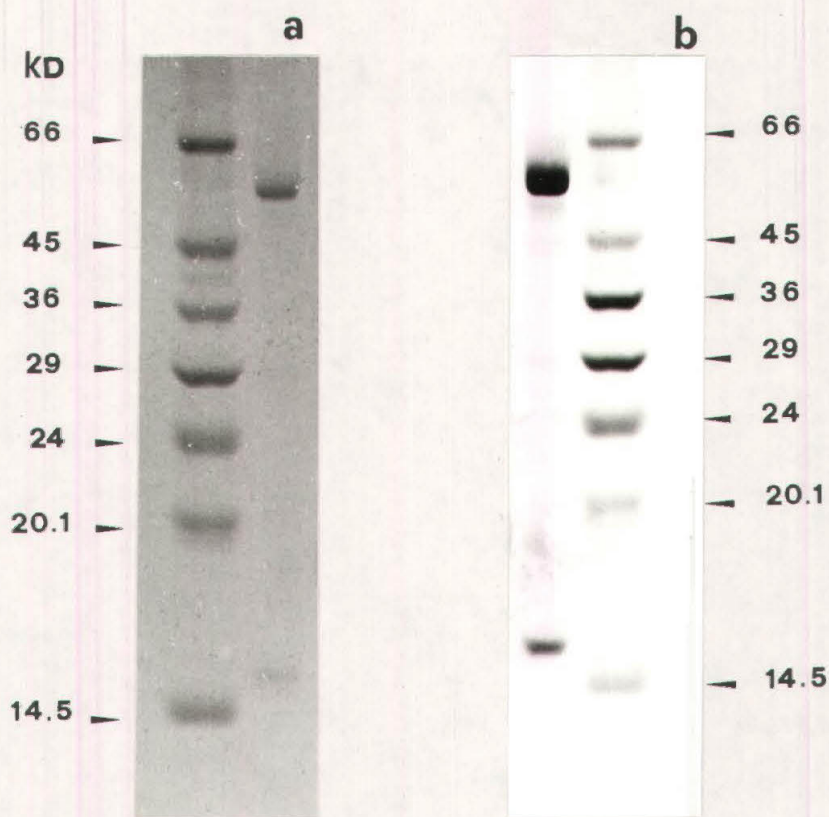


Figura 8. Analisi elettroforetica (SDS PAGE) delle frazioni 70-76 (EPO). L'elettroforesi è stata effettuata in condizioni riducenti. I gels sono stati colorati con il blu Coomassie (a) e con i reagenti per l'impregnazione argentea (b). Per ogni condizione vengono riportati i pesi molecolari degli standards.

Nei due gels, colorati sia con il Coomassie (**Fig. 8a**) che con i reagenti per l'impregnazione argentica (**Fig. 8b**), si possono osservare due distinte bande di 55 e 15 KDa. Queste corrispondono ai noti pesi molecolari delle subunità pesante e leggera dell'EPO purificata (132).

Le proprietà elettroforetiche dell'ECP e dell'EDN sono rappresentate nella **Figura 9**. Entrambe le colorazioni a cui sono stati sottoposti i gels indicano la presenza di una sola banda sia per ECP che per EDN (133).

Il pool di frazioni contenenti la EPO è stato sottoposto a dialisi per ripristinare le condizioni fisiologiche del medium che corrispondono ad una concentrazione di NaCl pari a 0.154 M. Questo procedimento non è stato necessario per le altre due proteine: la diluizione nel mezzo di coltura dei macrofagi è stata sufficiente per eliminare qualsiasi effetto derivante dalla loro concentrazione salina.

Abbiamo voluto escludere che le preparazioni di proteine cationiche contenessero citochine. E' noto infatti che gli eosinofili, dopo attivazione, possono produrre diverse citochine e queste, agendo sui macrofagi, potrebbero interferire con le attività delle proteine cationiche, oggetto di questo studio.

La fonte del materiale da cui siamo partiti e la modalità di preparazione potevano far escludere a priori la presenza di citochine. Infatti, sono stati utilizzati eosinofili di soggetti normali e la solubilizzazione delle proteine cationiche è stata fatta sulla componente particolata dell'omogenato dopo eliminazione della parte solubile (citoplasma), in cui si

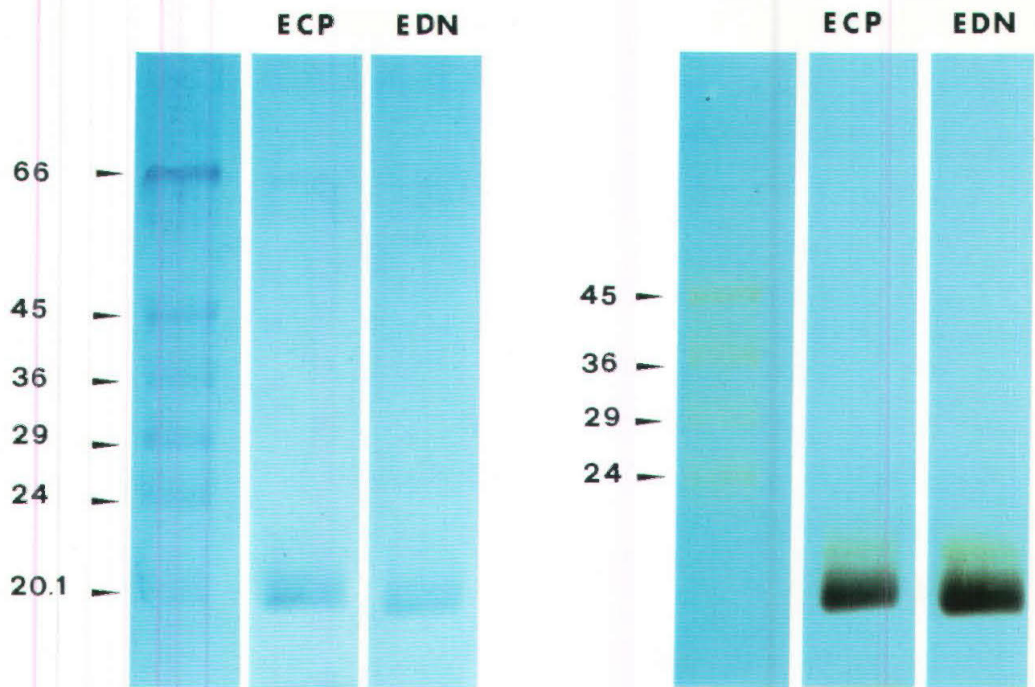


Figura 9. Analisi elettroforetica (SDS PAGE) delle frazioni 27-34 (EDN) e 37-42 (ECP). L'elettroforesi è stata effettuata in condizioni riducenti. I gels sono stati colorati con il blu Coomassie (a) e con i reagenti per l'impregnazione argentica (b). Per ogni condizione vengono riportati i pesi molecolari degli standards.

localizzerebbero le citochine. Abbiamo comunque dosato una delle probabili citochine prodotte dagli eosinofili attivati e cioè il TNF che, sulla base di dati di letteratura, ha un effetto attivante i macrofagi (134). Utilizzando un test di tipo ELISA fornito dalla Genzyme Corporation (Cambridge, MA), non è stato possibile rilevarne alcuna traccia nei nostri campioni (dati non mostrati).

2. SCELTA ED OTTIMIZZAZIONE DEL SISTEMA SPERIMENTALE.

La scelta di utilizzare macrofagi umani, fra i diversi tipi di macrofagi che avremmo potuto impiegare, è stata determinata fondamentalmente dalle seguenti ragioni:

1. le proteine granulari, oggetto del nostro studio, sono state isolate da eosinofili umani e quindi ci è sembrato più ragionevole usare macrofagi umani come cellule bersaglio della loro azione;
2. i risultati ottenibili da un tale modello possono essere più facilmente estensibili all'interpretazione di quei fenomeni fisiopatologici che riguardano innanzitutto l'uomo e in cui sono coinvolti gli eosinofili;
3. i macrofagi umani si possono agevolmente ottenere coltivando "in vitro" monociti purificati da sangue periferico.

Inizialmente abbiamo voluto ottimizzare il sistema di coltura dei monociti e verificare se era possibile ottenere da essi cellule aventi caratteristiche assimilabili a quelle dei macrofagi tissutali.

Il primo passo riguardava la fonte di approvvigionamento. Anzichè utilizzare sangue intero non sempre disponibile, abbiamo cercato di impiegare "buffy coats" che derivano sempre da donazioni ma che vengono scartati dalle banche del sangue dopo la separazione del plasma e dei globuli rossi. Questi buffy coats contengono la maggior parte dei leucociti dell'intera donazione. I monociti ottenuti dai buffy coats sono morfologicamente e funzionalmente indistinguibili da quelli isolati dal sangue intero (dati non mostrati).

Quando vengono posti in coltura, i monociti vanno incontro ad una serie di modificazioni che riguardano le caratteristiche morfologiche (forma e dimensioni cellulari), il contenuto di proteine, l'attività degli enzimi lisosomiali, l'espressione di recettori di membrana e la capacità di produrre H_2O_2 e O_2^- (135). Si ritiene che questi cambiamenti che si osservano *in vitro* corrispondano a quella sequenza di eventi che *in vivo* conducono i monociti, dopo migrazione nei tessuti, a differenziarsi e ad assumere le caratteristiche dei macrofagi. Affinchè ciò avvenga sono necessarie adeguate condizioni di coltura ed in particolare la presenza di fattori di crescita che normalmente sono contenuti nel siero. Alcuni autori utilizzano siero fetale bovino (FCS) (136), altri siero umano (137). Abbiamo preferito seguire il modello che più si avvicina alle condizioni "fisiologiche", cioè quello che prevede l'impiego di siero umano, la cui concentrazione ottimale si aggira attorno al 10% (137).

La **Figura 10** mostra l'aspetto di monociti a vari giorni di coltura (2, 4 e 6) in presenza di siero umano alla concentrazione dell'1% (**Fig. 10 a, c, e**) e del 10% (**Fig. 10 b, d, f**). Le differenze morfologiche osservabili coltivando i monociti alle due diverse concentrazioni di siero sono già evidenziabili a tempi brevi di coltura e diventano, comunque, più accentuate il 6° giorno.

La **Figura 11**, in cui le cellule sono viste ad un ingrandimento maggiore, rende più facilmente evidenti tali differenze. Vengono mostrati monociti appena purificati (**Fig. 11a**) e dopo sei giorni di coltura (**Fig. 11b e c**). Le dimensioni delle cellule coltivate per 6 giorni sia all'1% (**Fig. 11b**) che al 10% (**Fig. 11c**) sono senz'altro maggiori rispetto a quelle dei monociti appena isolati. In presenza di siero al 10% le cellule sono fondamentalmente rotondeggianti, voluminose e con un citoplasma intensamente basofilo. L'accentuata basofilia del citoplasma è una caratteristica delle cellule attive dal punto di vista dei processi di sintesi. Utilizzando il siero all'1%, le cellule assumono forma prevalentemente fibroblastica, sono meno voluminose e il loro citoplasma, meno abbondante, presenta una basofilia meno accentuata.

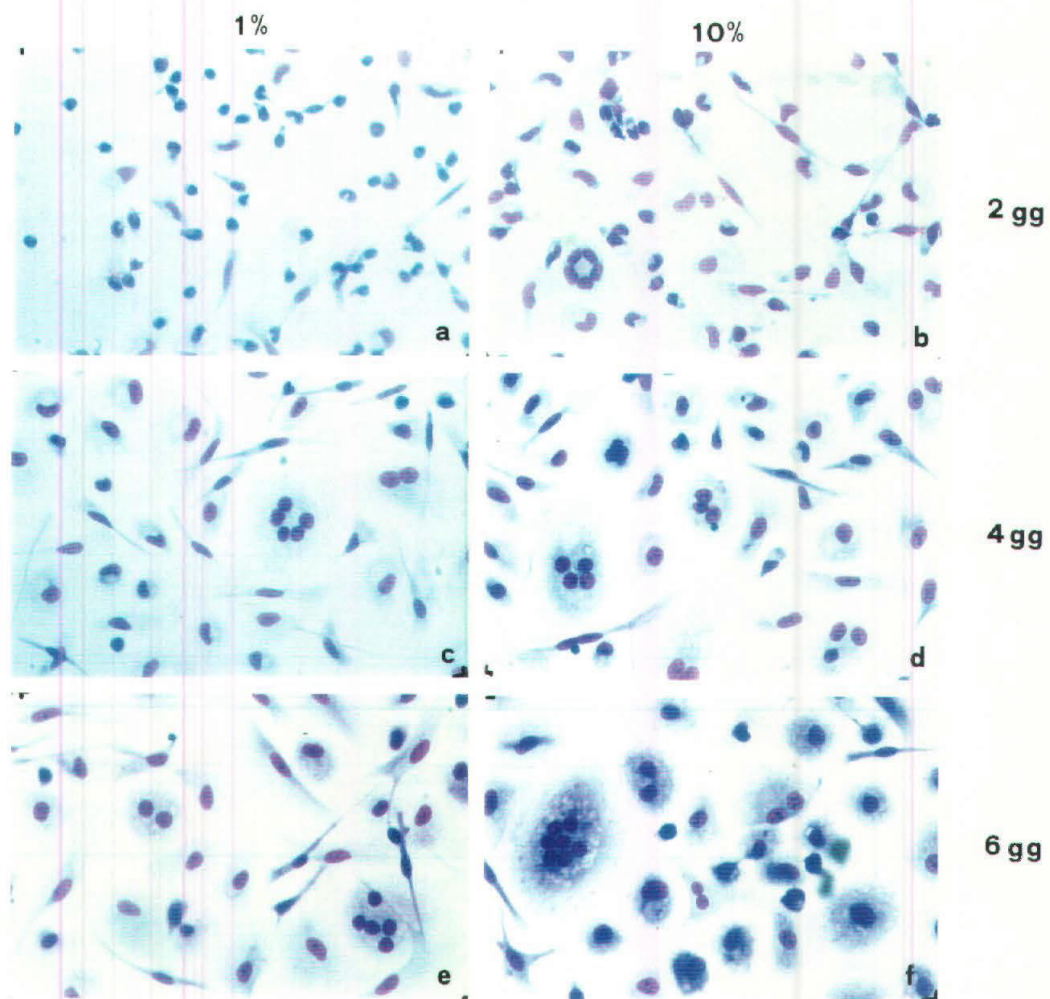


Figura 10. Monociti a 2 (a, b), 4 (c, d) e 6 (e, f) giorni di coltura. Le cellule sono state coltivate in medium contenente siero umano all'1% (a, c, e) o al 10% (b, d, f) su dischetti di plastica per colture (Thermanox, Nunc, Inc), fissate con metanolo e colorate con Diff-Quik. Ingrandimento: 218x

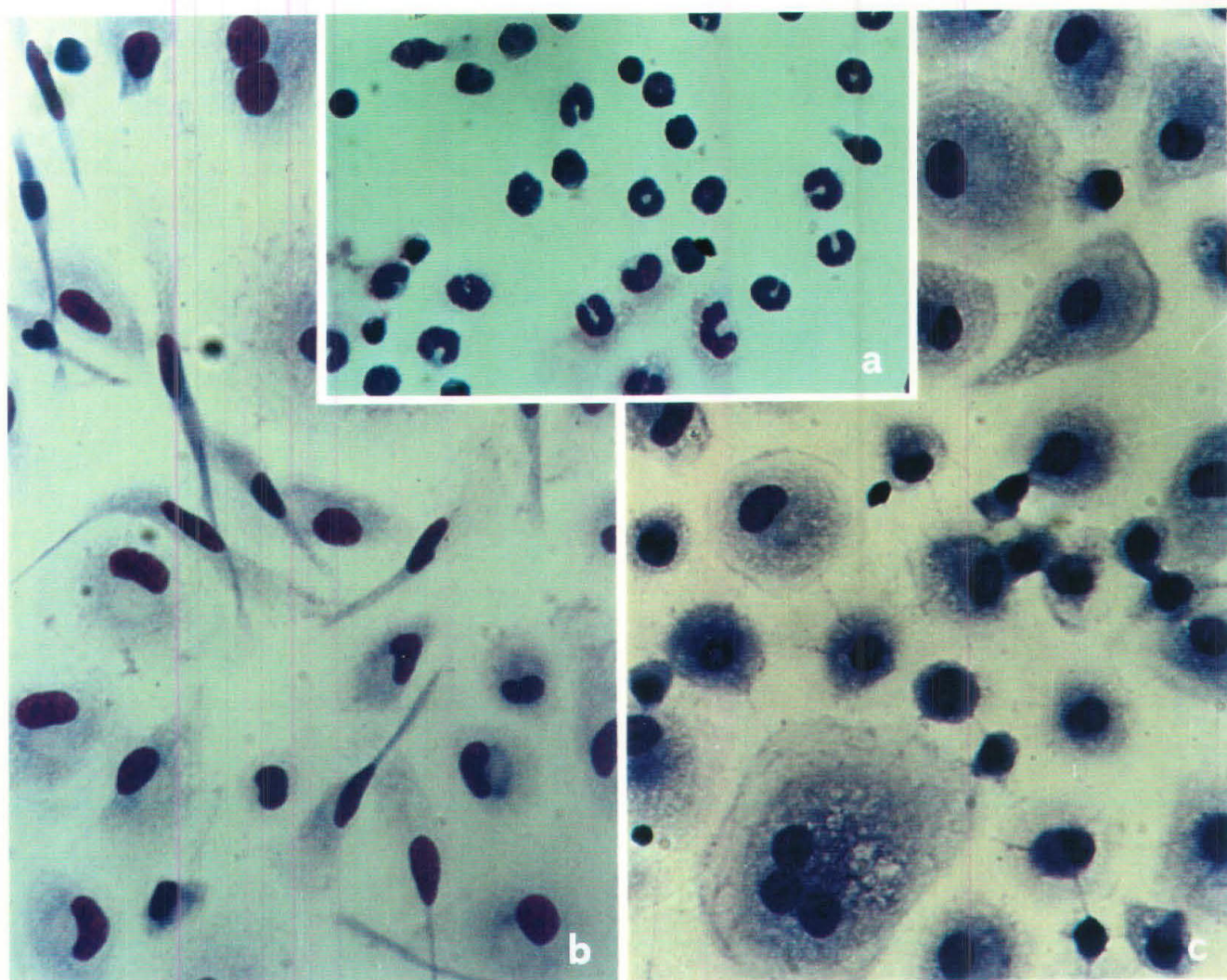


Figura 11. Monociti al 1° (a) e al 6° (b, c) giorno di coltura. Le cellule sono state coltivate in medium contenente siero umano all'1% (b) o al 10% (c) su dischetti di plastica per colture (Thermanox, Nunc, Inc), fissate con metanolo e colorate con Diff-Quik. Ingrandimento: 520x

3. SCELTA DEI PARAMETRI DI ATTIVAZIONE.

Da un punto di vista funzionale, i macrofagi residenti sono cellule poco attive metabolicamente (cioè producono quantità poco significative di O_2^- e H_2O_2), possiedono bassa attività secretoria, scarsa o nulla attività citotossica e scarsa capacità di cooperare nella risposta immunitaria (presentazione dell'antigene) (109,118,119). In presenza di fattori specifici di origine non immunologica (per es. il lipopolisaccaride) ed immunologici (per es. l'IFN- γ), questi macrofagi si modificano dal punto di vista morfologico, metabolico e funzionale. Presentano un aumento di sintesi proteica e di espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe II, una più alta capacità battericida e citocida, secernono citochine come l'IL-1 e il TNF, producono grandi quantità di H_2O_2 (110,112-117). I macrofagi così modificati vengono indicati come macrofagi attivati e corrispondono a quelli dell'ipersensibilità ritardata, direttamente coinvolti nell'uccisione di microorganismi intracellulari facoltativi, parassiti ed eventualmente cellule tumorali (116,117).

Per lo studio del ruolo delle proteine cationiche nell'attivazione dei macrofagi, abbiamo deciso di misurare parametri che risultassero di semplice interpretazione e significativi per le possibili implicazioni funzionali. Come indice del potenziale citotossico dipendente dai prodotti di riduzione dell'ossigeno abbiamo misurato la produzione di H_2O_2 , mentre come indice dell'attività citotossica dipendente dalle citochine abbiamo registrato la secrezione di TNF. A questi parametri sono stati poi affiancati il dosaggio del contenuto proteico e l'analisi delle modificazioni morfologiche.

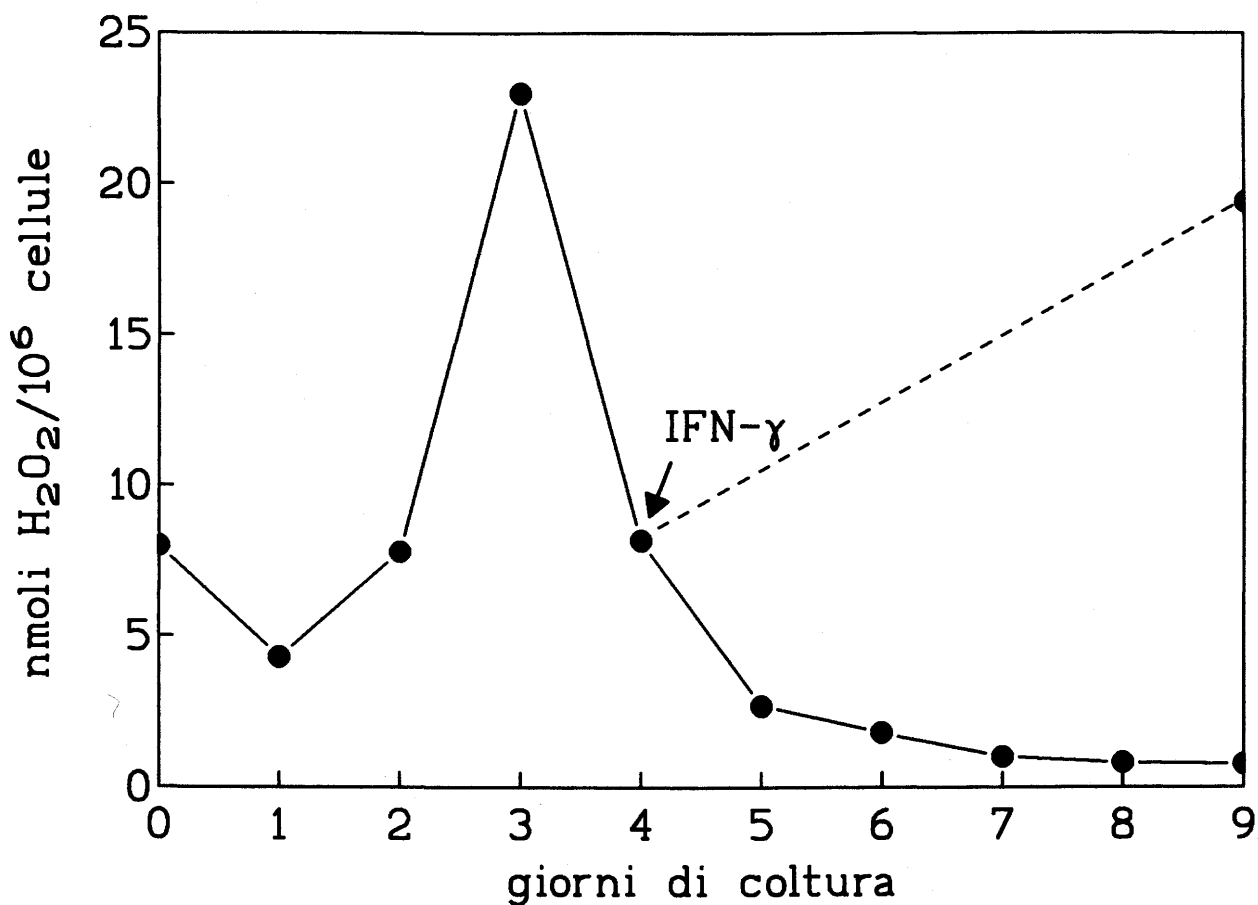


Figura 12. Rilascio di H₂O₂ indotto da PMA da parte di monociti-macrofagi in funzione del giorno di coltura. Viene rappresentato anche l'effetto dell'IFN- γ aggiunto al 4° giorno di coltura (linea tratteggiata).

4. EFFETTO SULLA PRODUZIONE DI H₂O₂.

La **Figura 12** mostra il profilo di secrezione di H₂O₂, indotta dal PMA, da parte di monociti coltivati per diversi periodi di tempo in presenza di siero umano al 10%. Il PMA, che è un estere del forbolo, con un meccanismo non recettoriale, stimola in maniera massimale la produzione di H₂O₂ mediante l'attivazione della protein-chinasi C.

Come si può osservare dalla figura, la capacità delle cellule di produrre H_2O_2 diventa massima al terzo giorno di coltura. Al quarto giorno si osserva un rapido decremento che si stabilizza a partire dal giorno 6-7 su valori appena rilevabili e corrispondenti al 5-10% di quelli osservati al terzo giorno di coltura (135).

Sempre nella stessa figura viene mostrato l'effetto di un noto e potente attivatore dei macrofagi, l'interferone τ (138). Questa citochina, aggiunta al quarto giorno di coltura, ristabilisce la capacità di produrre H_2O_2 e la mantiene elevata nel tempo.

4a. Cinetica di produzione di H_2O_2

Le **Figure 13, 14 e 15** mostrano l'andamento della produzione di H_2O_2 in funzione del tempo di esposizione dei macrofagi alle proteine granulari, aggiunte al quarto giorno di coltura. I dosaggi sono stati effettuati, dopo tempi diversi di incubazione, su colture di macrofagi lavate dal medium contenente le proteine e poi stimulate con PMA per 45 minuti. Per ogni grafico sono riportati i risultati ottenuti con due diverse popolazioni di macrofagi, impiegando le proteine cationiche alla concentrazione di 50 nM.

La massima stimolazione con EPO si ottiene dopo 24 ore di incubazione, quando la quantità di H_2O_2 prodotta risulta 2-4 volte superiore a quella dei macrofagi di controllo (**Fig. 13**). Dopo le 24 ore il rilascio di H_2O_2 diminuisce progressivamente ma resta comunque a valori sempre più elevati, rispetto a quelli di controllo, per almeno 70 ore.

Gli effetti di ECP ed EDN differiscono sostanzialmente da quelli della EPO. Infatti, la produzione massima di H_2O_2 si ottiene dopo 72 ore di

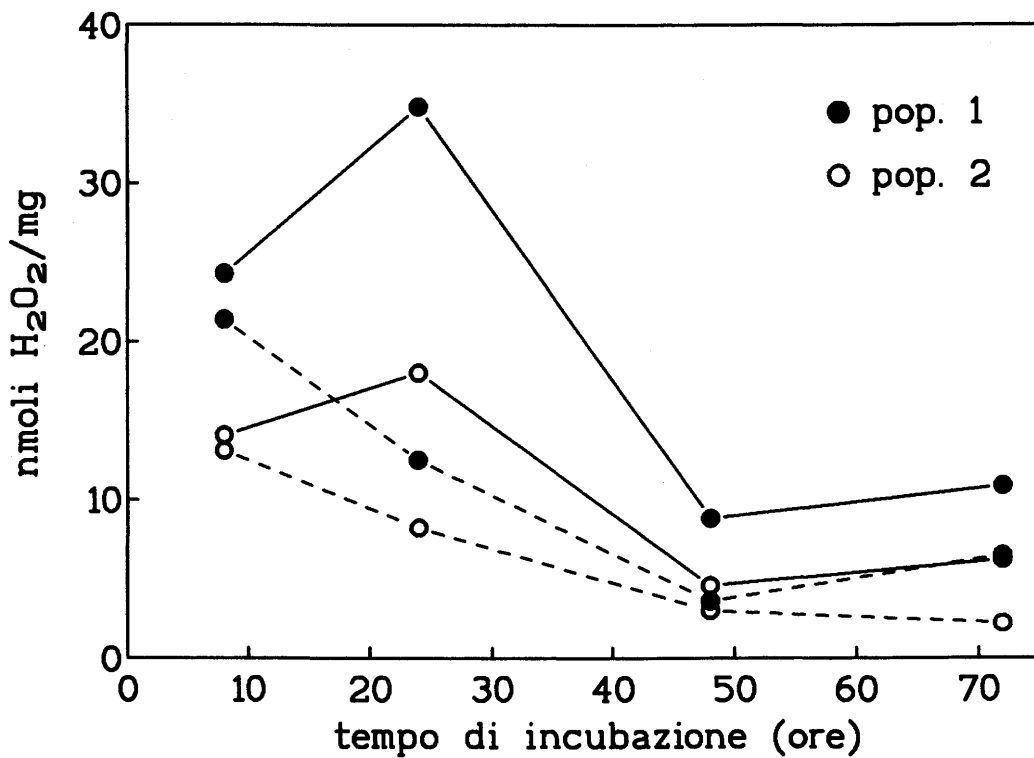
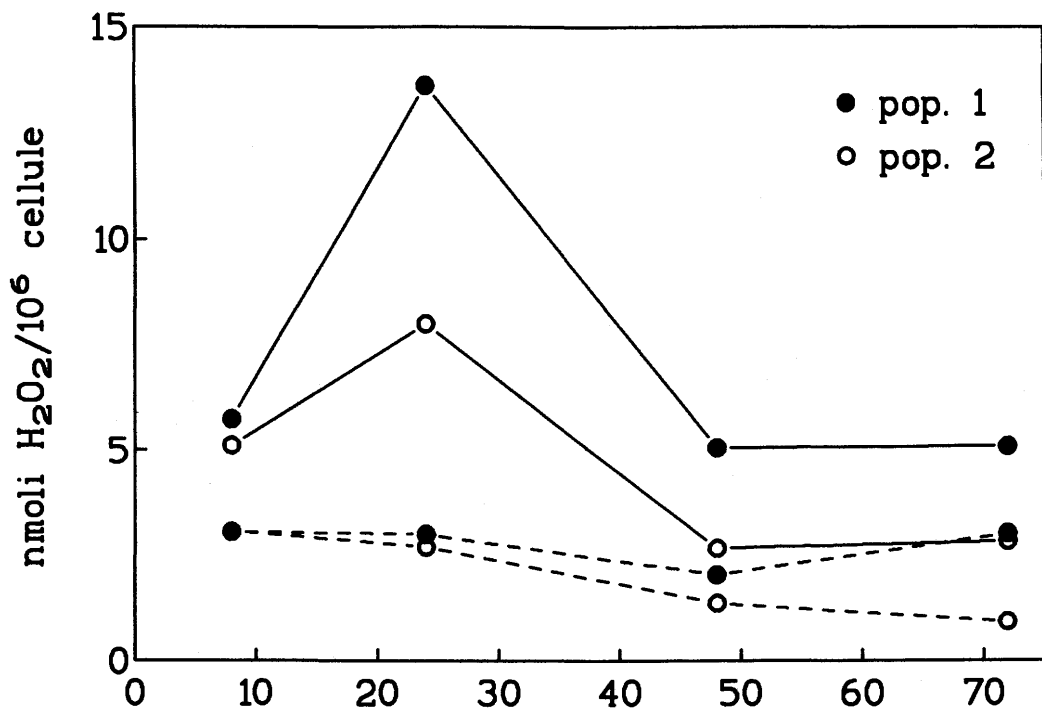


Figura 13. Cinetica di produzione di H_2O_2 indotta da PMA da parte di macrofagi incubati con EPO 50 nM a partire dal 4° giorno di cultura. Vengono riportati i dati ottenuti con due diverse popolazioni di macrofagi. I risultati sono stati espressi in base al numero di cellule (a) e al contenuto proteico (b). linea tratteggiata = macrofagi di controllo; linea continua = macrofagi trattati con EPO

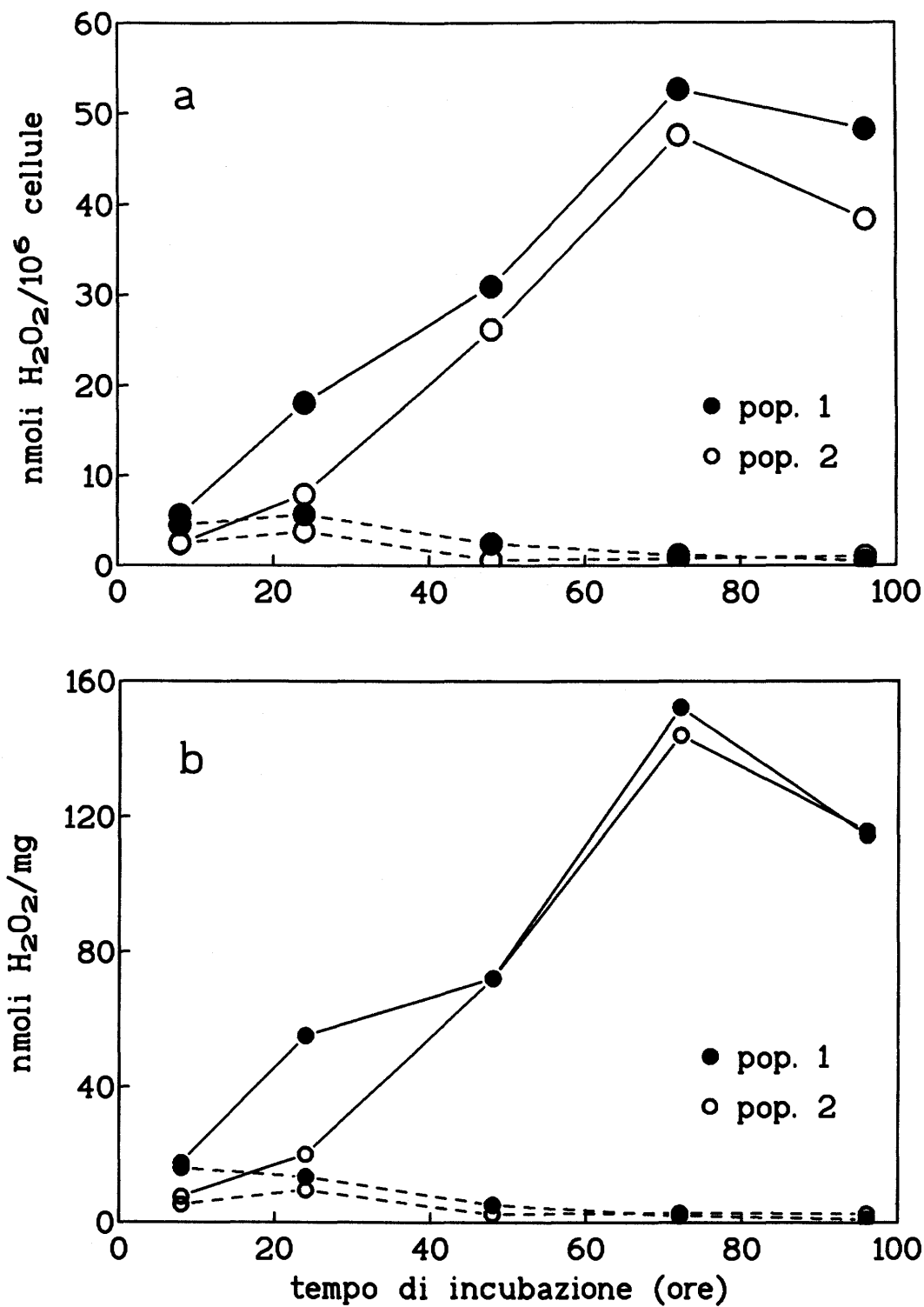


Figura 14. Cinetica di produzione di H₂O₂ indotta da PMA da parte di macrofagi incubati con ECP 50 nM a partire dal 4° giorno di coltura. Vengono riportati i dati ottenuti con due diverse popolazioni di macrofagi. I risultati sono stati espressi in base al numero di cellule (a) e al contenuto proteico (b). linea tratteggiata = macrofagi di controllo; linea continua = macrofagi trattati con ECP

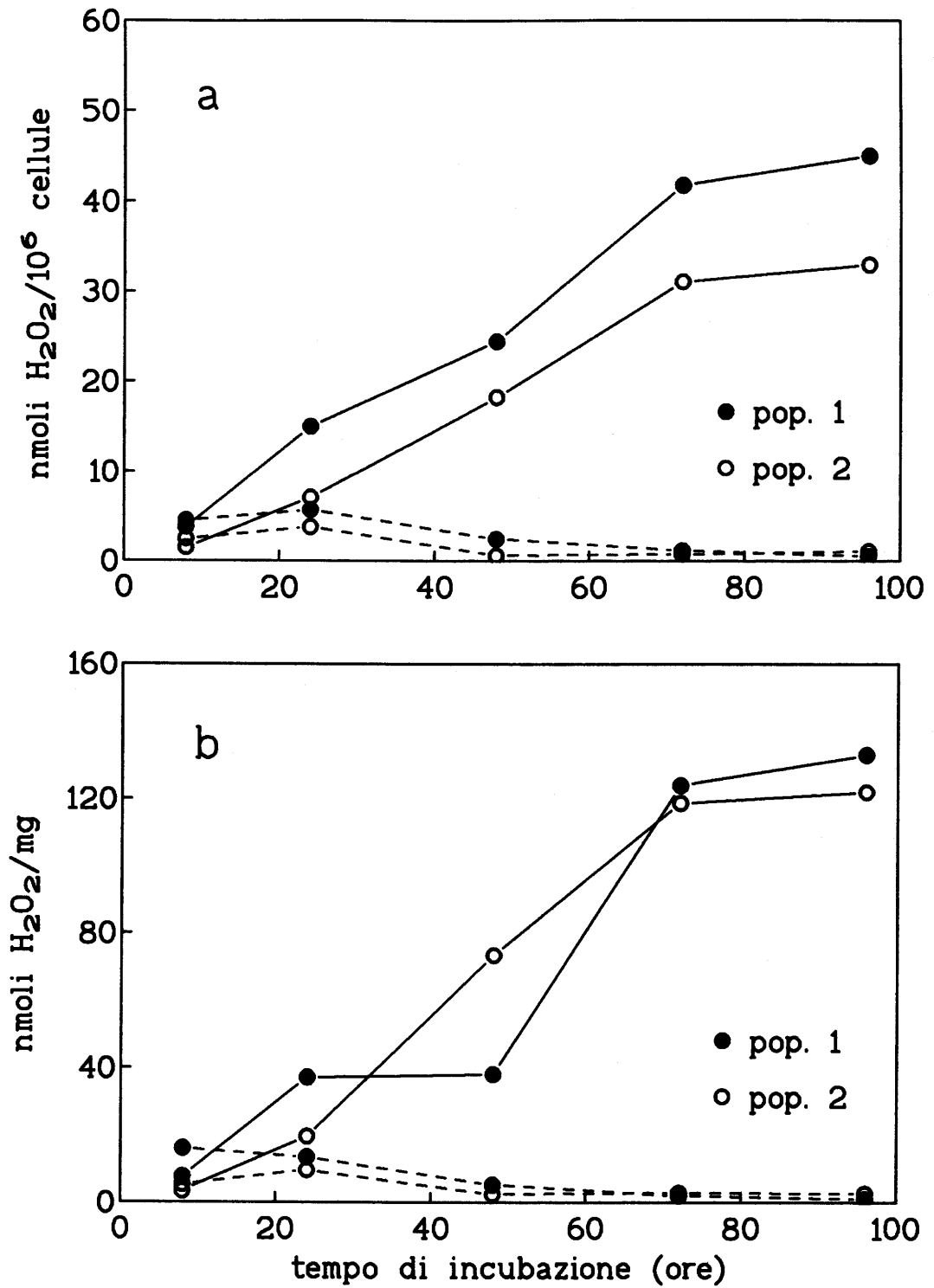


Figura 15. Cinetica di produzione di H₂O₂ indotta da PMA da parte di macrofagi incubati con EDN 50 nM a partire dal 4° giorno di coltura. Vengono riportati i dati ottenuti con due diverse popolazioni di macrofagi. I risultati sono stati espressi in base al numero di cellule (a) e al contenuto proteico (b). linea tratteggiata = macrofagi di controllo; linea continua = macrofagi trattati con EDN

incubazione (**Figg. 14 e 15**) e la quantità prodotta è di più di 50 volte superiore a quello rilasciata dai macrofagi non trattati.

Altre considerazioni emergono dall'analisi dei grafici. Si nota che esiste una certa variabilità di risposta fra le due popolazioni cellulari. Ciò è dovuto al fatto che le popolazioni di monociti sono molto eterogenee (108) e questa eterogeneità si riflette in una diversa velocità di differenziamento ed intensità di risposta metabolica. Questo diverso comportamento si ha anche impiegando altri agenti stimolanti. Dopo l'incubazione con IFN- γ o LPS, per esempio, si assiste ugualmente a risposte variabili per intensità (dati non mostrati). Nonostante questa variabilità dal punto di vista quantitativo, il fenomeno dell'attivazione da EPO, ECP ed EDN è stato osservato in tutti gli esperimenti.

4b. Dose-risposta

La **Figura 16** riporta i dati relativi alla produzione di H₂O₂ da parte di macrofagi incubati con diverse concentrazioni di proteine cationiche. I risultati sono stati riuniti in un unico grafico per mettere a confronto diretto l'effetto delle tre proteine anche se la produzione di H₂O₂ è stata misurata dopo 24 ore per la EPO e dopo 72 ore per ECP ed EDN.

Ancora una volta è molto evidente la maggior potenza di ECP ed EDN rispetto alla EPO. La concentrazione alla quale si ha la massima risposta è comunque uguale per le tre proteine. La secrezione di H₂O₂ aumenta all'aumentare della concentrazione delle proteine granulari e raggiunge la saturazione a partire dalla concentrazione di 50 nM. Non vengono riportati i dati relativi a concentrazioni superiori a 200 nM, poichè

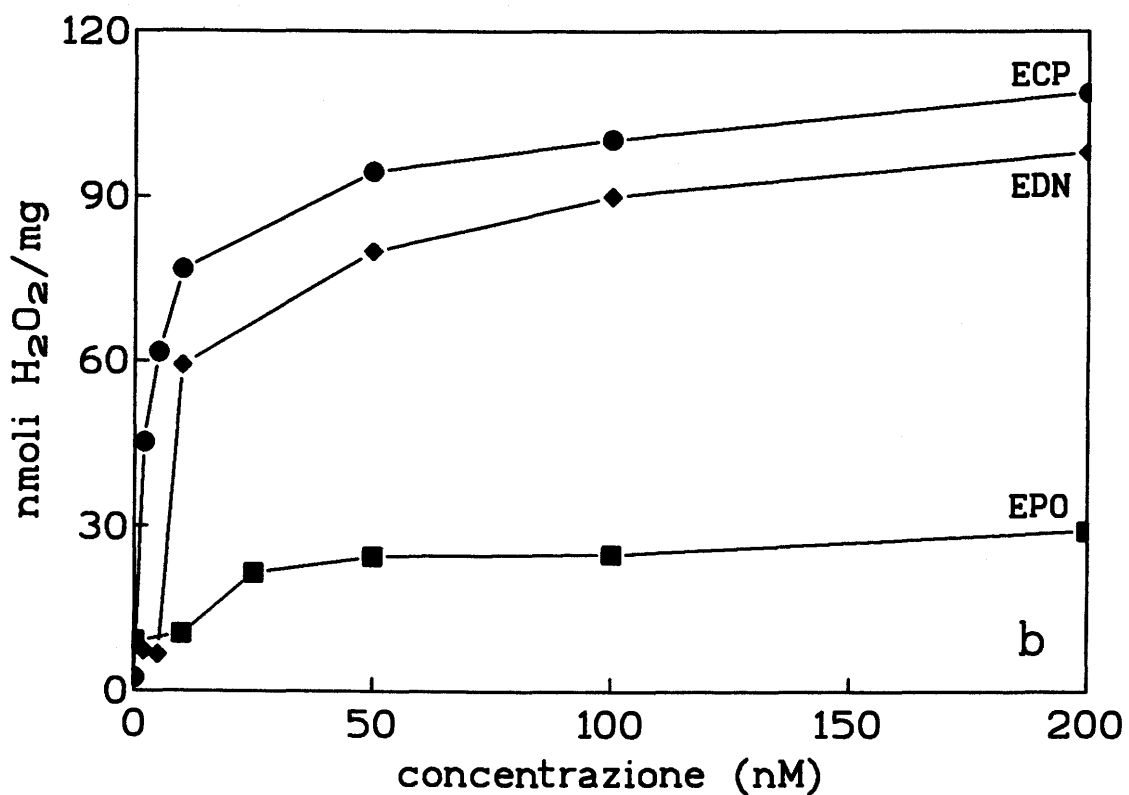
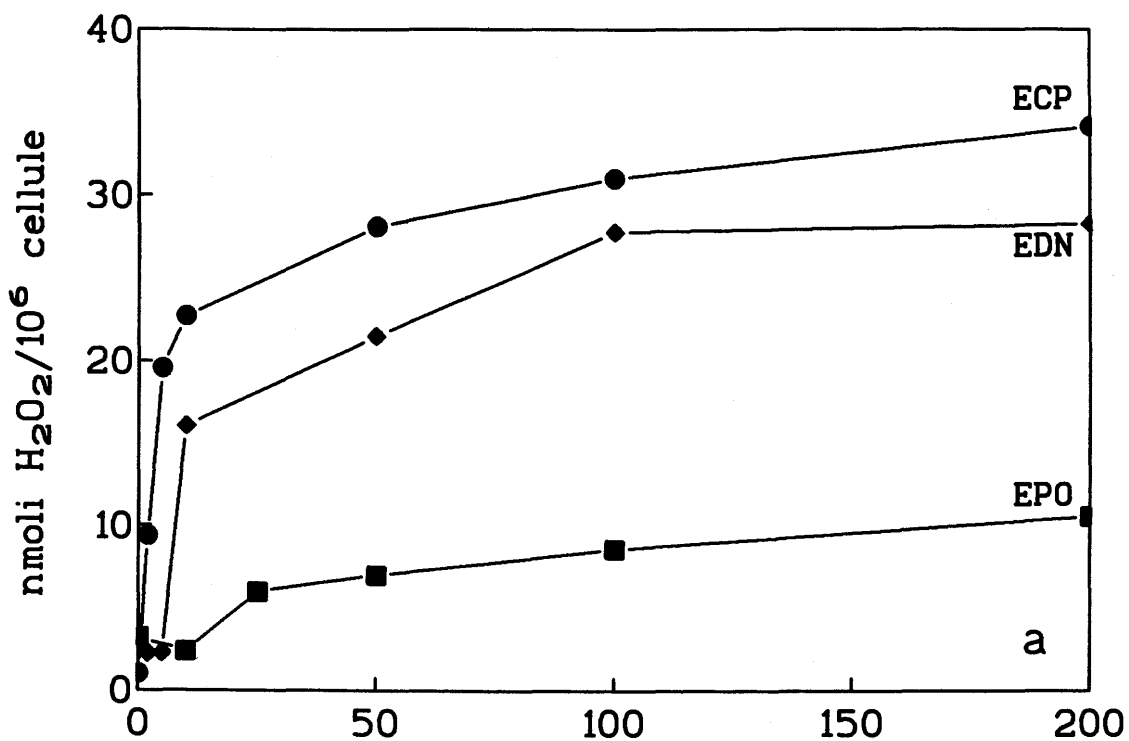


Figura 16. Produzione di H_2O_2 indotta da PMA da parte di macrofagi incubati con dosi diverse di ECP, EDN ed EPO. Le curve derivano dai dosaggi eseguiti dopo 24 ore di incubazione con EPO e dopo 72 con ECP ed EDN. I risultati, espressi in base al numero di cellule (a) e al contenuto proteico (b), sono la media di due esperimenti.

queste erano tossiche per le cellule. Infatti, con dosi superiori a 200 nM si osservava un massivo distacco dei macrofagi inizialmente aderenti.

Alla luce di questi risultati, abbiamo deciso di usare le proteine cationiche nei successivi esperimenti alla concentrazione di 50 nM.

4c. Comparazione dell'effetto delle proteine cationiche con quello del lipopolisaccaride e dell'interferone γ .

L'IFN- γ e il lipopolisaccaride sono i più noti attivatori dei macrofagi per quanto riguarda il potenziamento del metabolismo ossidativo respiratorio (respiratory burst) (138,139).

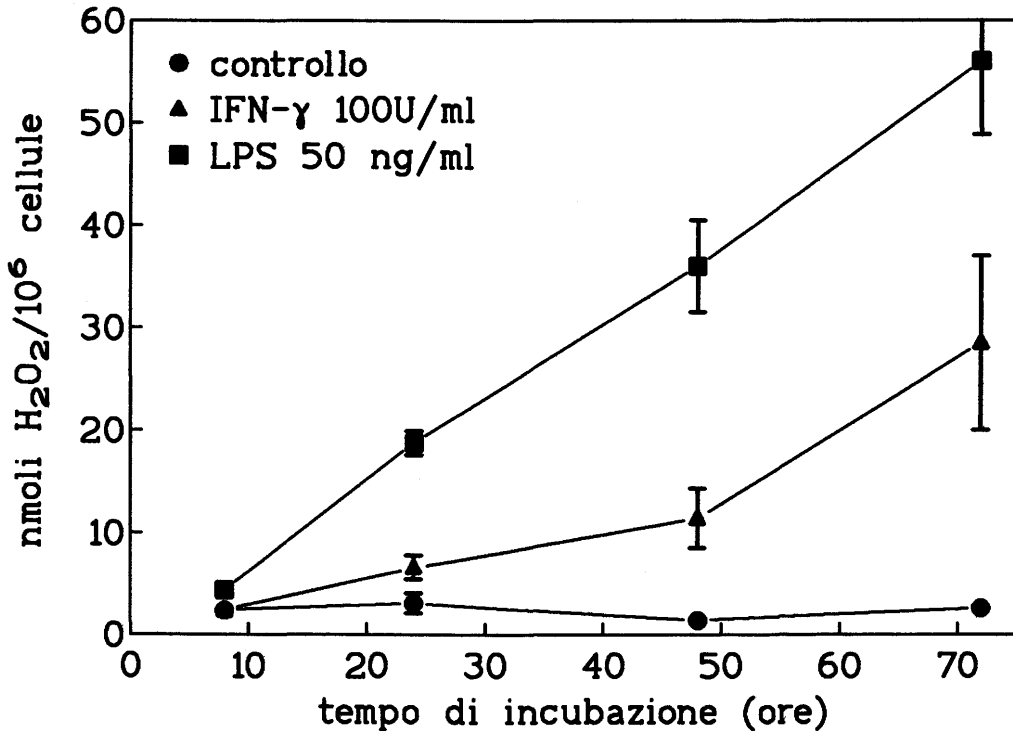


Figura 17. Cinetica di produzione di H_2O_2 indotta da PMA da parte di macrofagi incubati con LPS 50 ng/ml e IFN- γ 100 U/ml a partire dal 4° giorno di coltura. I risultati sono la media \pm ES (errore standard) di dati ottenuti con 4 diverse popolazioni di macrofagi.

Abbiamo perciò confrontato gli effetti di EPO, ECP ed EDN sulla produzione di H₂O₂ con quelli di questi due attivatori.

La **Figura 17** rappresenta il profilo di produzione di H₂O₂ indotto con PMA da parte di macrofagi esposti a IFN- γ ed LPS per vari periodi di tempo.

La **Tabella 5** mostra che la quantità di H₂O₂ prodotta da macrofagi incubati per 24 ore con EPO è paragonabile a quella rilasciata da macrofagi incubati con LPS o IFN- γ per lo stesso periodo di tempo.

Tabella 5. Effetto di EPO, LPS e IFN- γ sul rilascio di H₂O₂ da macrofagi umani indotto da PMA.

	nmoli/45'/10 ⁶ cellule	nmoli/45'/mg
controllo	4.3 ± 0.9 (14)	19.1 ± 4.3 (14)
EPO 50 nM	14.1 ± 2.8* (14)	41.2 ± 8.9** (14)
LPS 50 ng/ml	18.4 ± 3.9*** (6)	46.3 ± 14.9* (6)
IFN- γ 100 U/ml	10.5 ± 1.0**** (12)	37.7 ± 6.1* (12)

I dosaggi per il rilascio di H₂O₂ sono stati effettuati su macrofagi incubati con EPO, LPS ed IFN- γ per 24 ore come descritto nei Materiali e Metodi. La produzione basale di H₂O₂ (in assenza di PMA) non era dosabile in tutte le varie condizioni. I risultati sono la media ± ES del numero degli esperimenti indicato in parentesi. La significatività delle differenze tra i macrofagi di controllo e quelli trattati è espressa come segue:

- * p<0.001
- ** p<0.01
- *** p<0.005
- **** p<0.0001

La **Tabella 6** riassume i risultati dell'effetto di ECP ed EDN ottenuti in diversi esperimenti e quelli relativi all'effetto di IFN- γ ed LPS.

Tabella 6. Effetto di ECP, EDN, LPS ed IFN- γ sul rilascio di H₂O₂ da macrofagi umani indotto da PMA.

	nmoli/45'/10 ⁶ cellule	nmoli/45'/mg
controllo	2.92 ± 0.47 (16)	3.53 ± 0.58 (16)
ECP 50 nM	49.47 ± 8.30* (7)	149.8 ± 40.86* (7)
EDN 50 nM	22.34 ± 4.90* (6)	58.7 ± 23.47* (6)
LPS 50 ng/ml	49.18 ± 8.52* (8)	122.5 ± 43.30* (8)
IFN- γ 100 U/ml	25.67 ± 4.14* (10)	31.15 ± 3.75* (10)

I dosaggi per il rilascio di H₂O₂ sono stati effettuati su macrofagi incubati con ECP, EDN, LPS ed IFN- γ per 72 ore come descritto nei Materiali e Metodi. La produzione basale di H₂O₂ (in assenza di PMA) non era dosabile in tutte le varie condizioni. I risultati sono la media ± ES del numero degli esperimenti indicato in parentesi. La significatività delle differenze tra i macrofagi di controllo e quelli trattati è espressa come segue:

* p<0.0001

Dai risultati riportati nelle due tabelle si nota che l'ordine di potenza delle proteine granulari è il seguente: **ECP > EDN > EPO**. L'entità di stimolazione della ECP è paragonabile a quella dell'LPS e maggiore di quella dell'IFN- γ ; l'EDN ha invece un effetto molto simile a quello dell'IFN- γ e decisamente minore dell'LPS; l'EPO determina la stessa risposta di IFN- γ ed

decisamente minore dell'LPS; l'EPO determina la stessa risposta di IFN- γ ed LPS quando il rilascio di H₂O₂ viene misurato dopo 24 ore di incubazione, mentre dopo tempi più lunghi di incubazione la risposta all'EPO risulta minore della risposta all'LPS e all'IFN- γ .

5. EFFETTO SUL CONTENUTO PROTEICO.

La **Tabella 7** riassume i dati ottenuti in diversi esperimenti, relativi al contenuto proteico dei macrofagi. Anche in questo caso la valutazione è stata effettuata dopo 24 ore di incubazione con EPO e dopo 72 ore dall'aggiunta di ECP ed EDN.

Tabella 7. Effetto delle proteine cationiche sul contenuto proteico dei macrofagi.

	n° esperimenti	$\mu\text{g}/10^6$ cellule
controllo	16	308 \pm 29.3
EPO 50 nM	16	416 \pm 28.9*
LPS 50 ng/ml	5	347 \pm 29.5 ^{NS}
IFN- γ 100 U/ml	13	360 \pm 41.1 ^{NS}
controllo	8	552 \pm 58
ECP 50 nM	8	391 \pm 40**
EDN 50 nM	7	556 \pm 79 ^{NS}
LPS 50 ng/ml	6	564 \pm 64 ^{NS}
IFN- γ 100 U/ml	6	570 \pm 37 ^{NS}

Il contenuto proteico delle cellule aderenti è stato misurato dopo 24 ore di incubazione con l'EPO e dopo 72 con l'ECP e l'EDN, come descritto nei Materiali e Metodi. I risultati sono la media \pm l'ES degli esperimenti effettuati. La significatività delle differenze tra le cellule di controllo e le cellule trattate vengono indicate come segue: * $p < 0.01$; ** $p = 0.02$; NS, non significativo

In seguito a stimolazione con EPO, i macrofagi vanno incontro ad un aumento di circa il 30% del loro contenuto proteico (+ 108 $\mu\text{g}/10^6$ cellule) rispetto ai macrofagi di controllo. Questo aumento non è ascrivibile all'EPO aggiunta nel pozzetto. In effetti la quantità di EPO aggiunta in ogni pozzetto corrisponde a 0.7 μg . Ammettendo che tutta l'EPO si leghi alle cellule o venga internalizzata senza essere degradata, l'aumento del contenuto proteico dovrebbe essere al massimo di 14 $\mu\text{g}/10^6$ cellule.

LPS, IFN- γ ed EDN non causano variazioni apprezzabili nel contenuto proteico dei macrofagi. Invece con ECP il contenuto proteico delle cellule aderenti diminuisce in modo significativo. Questi risultati suggeriscono che l'azione attivante di queste proteine coinvolge meccanismi di modulazione della sintesi proteica distinti.

L'effetto appena mostrato delle proteine cationiche sul contenuto proteico dei macrofagi spiega le discrepanze che si potevano osservare sulla produzione di H_2O_2 espressa in termini di attività per mg di proteina o di attività per 10^6 cellule. Analizzando le **Tabelle 5 e 6**, appare chiaro come l'indice di attivazione per l'EPO risulti minore e quello dell'ECP maggiore se riferito ai mg di proteine, anziché al numero di cellule.

6. EFFETTO SULLA PRODUZIONE DI TNF

I macrofagi sono stati incubati, sempre dal quarto giorno di coltura, con varie concentrazioni delle proteine granulari e il TNF prodotto è stato misurato su supernatanti di macrofagi esposti per 24 ore alla EPO e

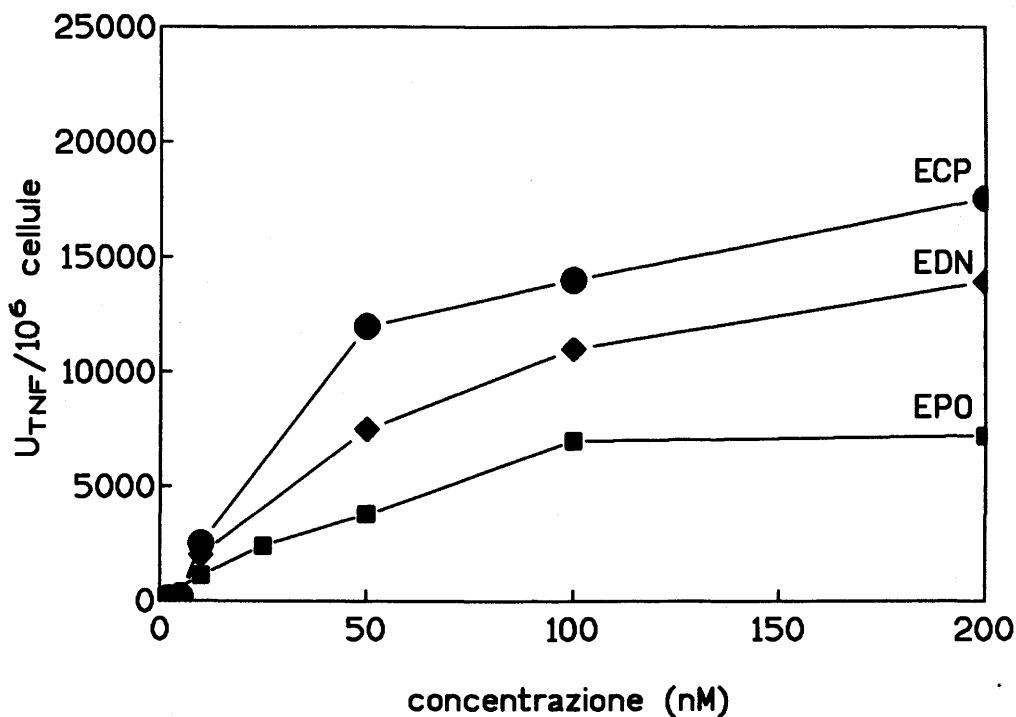


Figura 18. Produzione di TNF da parte di macrofagi incubati a partire dal 4° giorno di coltura con diverse quantità di ECP, EDN ed EPO. Il dosaggio è stato effettuato su supernatanti prelevati dopo 24 ore dall'aggiunta dell'EPO e dopo 72 dall'aggiunta di ECP ed EDN.

per 72 alla ECP e alla EDN, i tempi di incubazione cioè in cui si aveva la massima attività di produzione di H₂O₂.

La **Figura 18** mostra che le curve dose-risposta per la produzione di TNF sono abbastanza simili a quelle già viste per il rilascio di H₂O₂. Anche in questo caso la dose ottimale di stimolazione è per tutte e tre le proteine 50 nM.

L'attività citotossica dei supernatanti dei macrofagi, utilizzati nei nostri esperimenti, viene totalmente abolita da un anticorpo monoclonale diretto contro il TNF- α di derivazione umana (mAb Wi-AT-4 Bissendorf Biochemicals gmbh, Hannover, Germania). Questo indica che il saggio

biologico per il TNF da noi impiegato mette in evidenza in maniera specifica l'attività di questa citochina.

La **Tabella 8** mostra i risultati ottenuti con più popolazioni di macrofagi incubati con le dosi ottimali delle proteine cationiche.

Tabella 8. Effetto delle proteine cationiche, LPS ed IFN- γ sulla produzione di TNF da parte di macrofagi umani.

	U _{TNF} /10 ⁶ cellule	n. esp.
controllo	401 ± 60	6
EPO 50 nM	4975 ± 1168*	6
LPS 50 ng/ml	10062 ± 3805**	4
IFN- γ 100 U/ml	522 ± 114 ^{NS}	4
controllo	47 ± 21	6
ECP 50 nM	26600 ± 11000**	6
EDN 50 nM	15650 ± 5470**	6
LPS 50 ng/ml	32550 ± 14400**	6
IFN- γ 100 U/ml	60 ± 31 ^{NS}	6

I supernatanti per il dosaggio del TNF sono stati prelevati dopo 24 ore di incubazione con l'EPO e dopo 72 con l'ECP e l'EDN. I risultati sono la media ± l'ES degli esperimenti effettuati. La significatività delle differenze tra le cellule di controllo e le cellule trattate viene riportata come segue:

* p < 0.01

** p < 0.05

NS, non significativo

Nonostante l'elevato valore dell'errore standard, indice della notevole variabilità delle diverse popolazioni di macrofagi, la quantità di TNF nei supernatanti delle colture trattate con le proteine cationiche e con il lipopolisaccaride è significativamente superiore rispetto a quella presente nei supernatanti di macrofagi di controllo. Come per il rilascio dell'H₂O₂, anche per la produzione di TNF, l'ordine di potenza delle tre proteine è il seguente: **ECP > EDN > EPO**. Va inoltre sottolineato che la quantità di TNF prodotto da

ECP ed EDN potrebbe essere sottostimata rispetto a quello della EPO, in quanto durante le 72 ore di incubazione la degradazione o l'inattivazione della citochina da parte dei macrofagi e di diverse sostanze nel mezzo di coltura potrebbe essere non del tutto trascurabile. Le proteine granulari, dunque, sono anche potenti induttori della produzione di TNF. Esse si dimostrano almeno efficaci quanto l'LPS e certamente differiscono dall'IFN- γ che, pur favorendo la produzione di H₂O₂, non stimola, o stimola molto poco, la secrezione di TNF.

7. MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE DEI MACROFAGI ESPOSTI ALLE PROTEINE CATIONICHE.

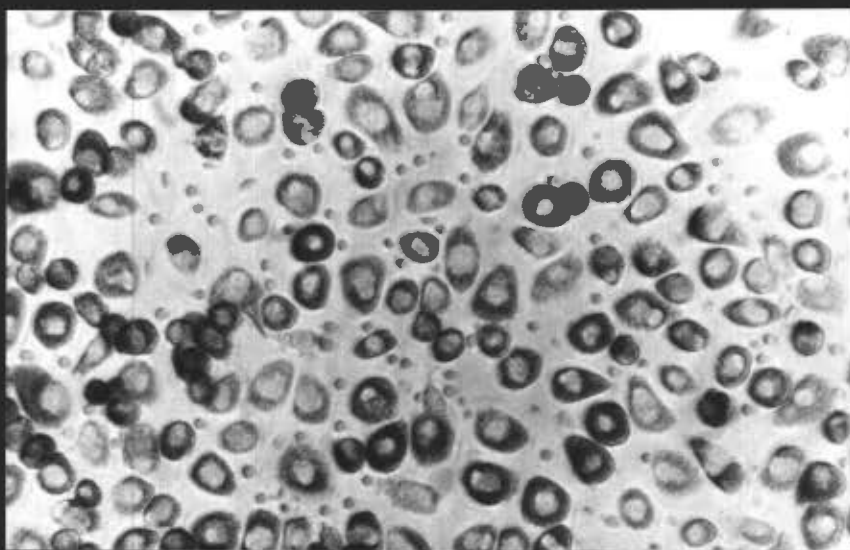
E' noto che le alterazioni funzionali, caratteristiche del processo di attivazione, si accompagnano spesso a modificazioni della morfologia cellulare (113).

La forma dei macrofagi non stimolati è tipicamente rotondeggiante. I macrofagi attivati invece presentano processi citoplasmatici allungati, che li fanno assomigliare molto spesso a cellule fibroblastiche, ed una pronunciata "estensibilità" ("spreading") del citoplasma. Questi aspetti sono molto evidenti nelle colture incubate con endotossina e meno marcati con l'IFN- γ , dove prevale invece una tendenza all'aggregazione cellulare (dati non mostrati) (140).

Le **Figure 19 e 20** mostrano gli aspetti di colture di macrofagi non stimolati (**Fig 19a, Fig. 20a**) e trattati rispettivamente con EPO (**Fig. 19b**), ECP (**Fig. 20b**) ed EDN (**Fig 20c**).

Figura 19. Immagini al microscopio ottico rovesciato, in contrasto di fase, di colture di macrofagi non stimolati (a) ed incubati per 24 ore con EPO 50 nM (b). Ingrandimento: 400x

a



b

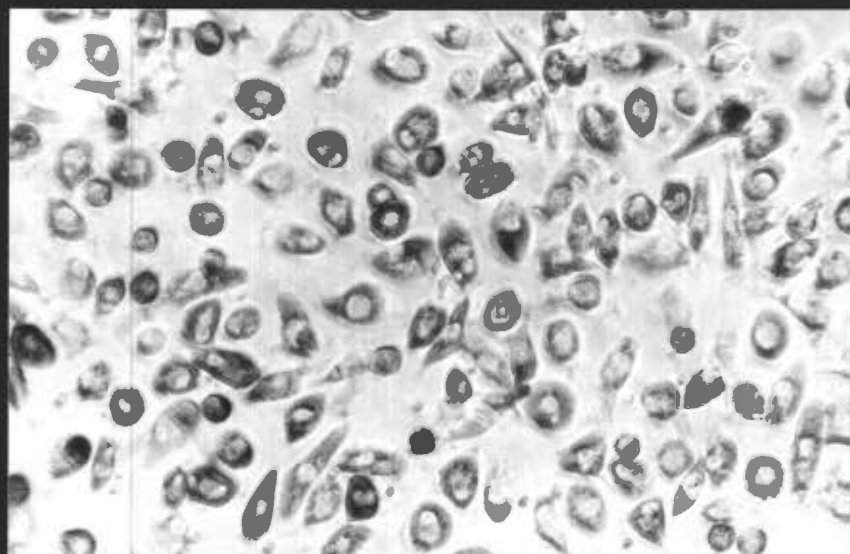
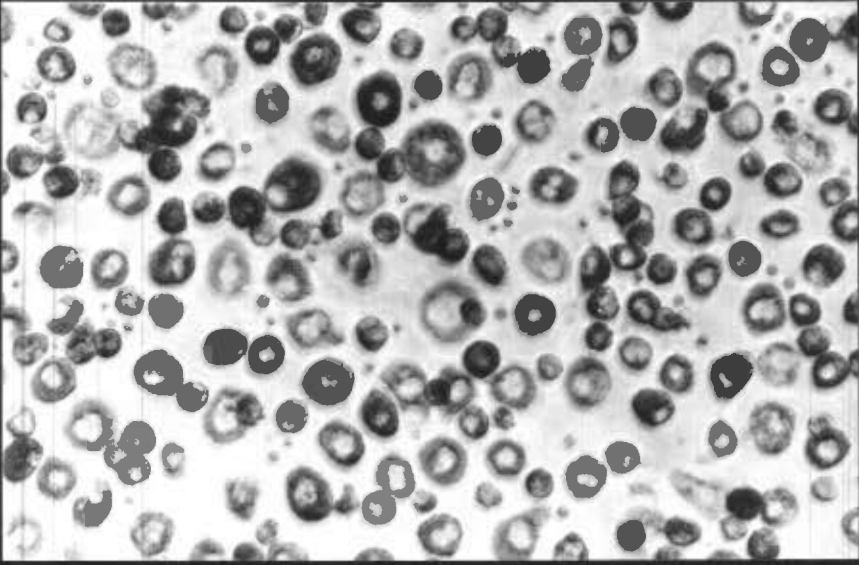
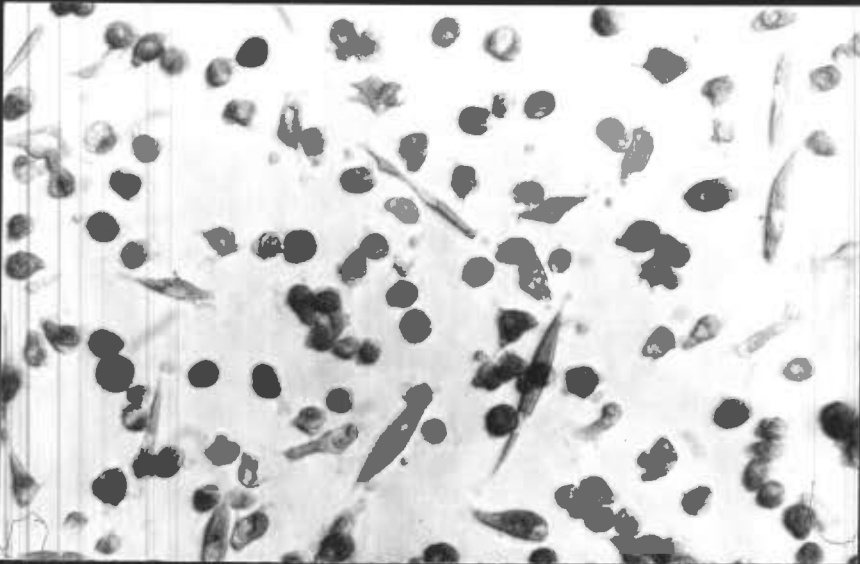


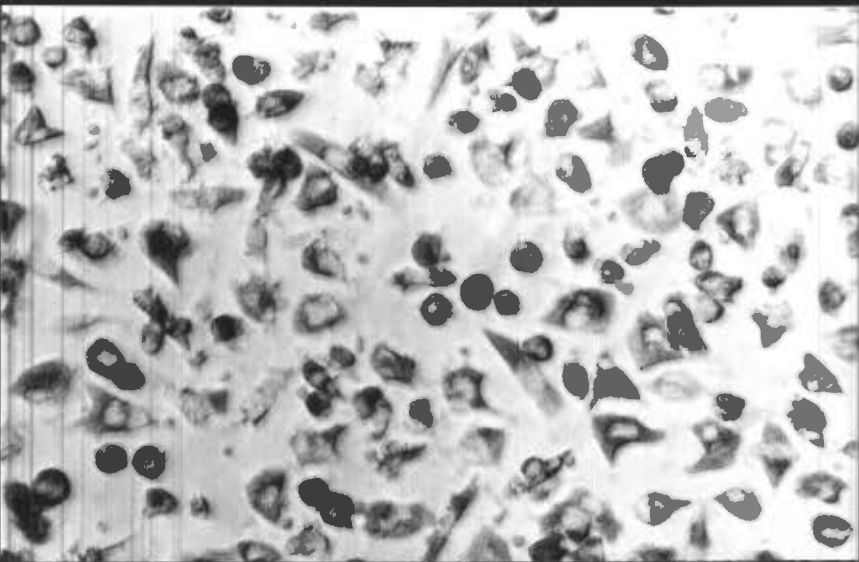
Figura 20. Immagini al microscopio ottico rovesciato, in contrasto di fase, di colture di macrofagi non stimolati (a) ed incubati per 72 ore con ECP 50 nM (b) ed EDN 50 nM (c). Ingrandimento: 400x



a



b



c

Le cellule non trattate mostrano il fenotipo caratteristico dei macrofagi non stimolati: hanno dimensioni forse maggiori delle cellule esposte alle proteine cationiche e sono rotondeggianti, anche il loro nucleo ha forma circolare e il citoplasma è abbondante e granuloso. Dopo 24 ore di incubazione con EPO, sono visibili alcune cellule allungate ad una o due estremità del nucleo che assumono una forma simile ad una pera o ad un fuso.

Anche tra i macrofagi coltivati con ECP c'è una buona percentuale di cellule con aspetto fibroblastico e le rimanenti cellule, nonostante siano rotondeggianti, hanno dimensioni minori rispetto a quelle di controllo. L'EDN determina un effetto simile a quello dell'ECP, anche se la percentuale di cellule fibroblastiche sembra inferiore.

8. ATTIVAZIONE DI MACROFAGI IN COCOLTURA CON EOSINOFILI INTERI.

I risultati presentati indicano che le proteine granulari degli eosinofili sono in grado di attivare i macrofagi.

Per vedere se questo effetto può essere rilevante anche in condizioni che riproducano più da vicino quanto avviene nei tessuti, dove eosinofili e macrofagi possono trovarsi contemporaneamente presenti, abbiamo deciso di stabilire se i macrofagi venivano attivati quando coltivati insieme agli eosinofili. Alla base di questi esperimenti sta l'osservazione che gli eosinofili possono secernere spontaneamente proteine dei loro granuli e che queste possono legarsi a vari tipi di cellule, compresi i macrofagi: questo fenomeno è stato osservato nel midollo osseo ed in colture di

eosinofili in presenza di IL-5 (41,106). Questa secrezione spontanea darebbe ragione della presenza, anche nel sangue di individui normali, di proteine eosinofiliche (141).

Abbiamo pertanto allestito delle colture di macrofagi e ad esse sono state aggiunte popolazioni pure (> 95 %) di eosinofili umani normali in assenza ed in presenza di IL-5, una citochina che permette la sopravvivenza degli eosinofili in coltura ed è in grado di indurre una modesta secrezione di proteine granulari degli eosinofili.

I risultati di due di questi esperimenti sono riportati nella **Tabella 9**.

Tabella 9. Produzione di H₂O₂ da parte di macrofagi coltivati in presenza di eosinofili.

	24 ore		48 ore	
	nmoli H ₂ O ₂ /10 ⁶ cellule		nmoli H ₂ O ₂ /10 ⁶ cellule	
	Pop. A	Pop. B	Pop. A	Pop. B
Macrofagi	1.31	5.03	0.47	1.61
Macrofagi + IL-5 2 ng/ml	2.75	3.69	1.25	2.36
Macrofagi + eosinofili	9.39	14.12	4.46	4.78
Macrofagi + eosinofili + IL-5 2 ng/ml	5.97	9.07	2.53	4.53

Ad ogni pozzetto di macrofagi al 4° giorno di coltura sono stati aggiunti 30.000 eosinofili. Dopo 24 o 48 ore di incubazione, i pozzetti sono stati lavati e incubati con la miscela per la misura dell'H₂O₂.

E' evidente che in entrambe le popolazioni la presenza degli eosinofili aumenta la capacità dei macrofagi di produrre H₂O₂. L'azione attivante

sembra più marcata per i macrofagi coltivati con eosinofili in assenza di IL-5.

E' da escludere che l'aumento registrato dipenda dalla presenza degli eosinofili (noti produttori di H_2O_2) poichè, prima del dosaggio, le colture vengono lavate accuratamente e gli eosinofili, che non sono aderenti, vengono eliminati insieme al medium di incubazione. La conferma che in seguito al lavaggio tutti gli eosinofili vengono eliminati dai pozzetti, è stata ottenuta dosando in alcuni pozzetti l'attività perossidasi, impiegando come substrato la tetrametil benzidina (TMB) (142). Questa attività era completamente assente nei pozzetti delle coculture dopo i lavaggi.

9. STUDI SUL PROBABILE MECCANISMO IMPLICATO NELL'ATTIVAZIONE.

Gli esperimenti successivi sono stati rivolti alla comprensione del meccanismo(i) implicato(i) nell'attivazione dei macrofagi da parte delle proteine cationiche. Gran parte di questi studi sono stati effettuati sull'attivazione intesa in senso metabolico, cioè come effetto sulla produzione di H_2O_2 . Abbiamo privilegiato questo parametro rispetto alla secrezione di TNF per la minore variabilità della risposta. Gli esperimenti in cui è stata misurata anche la produzione di TNF verranno puntualmente indicati.

Per la nostra indagine sul possibile meccanismo d'azione delle proteine granulari ci siamo chiesti se gli effetti osservati potessero dipendere:

- 1) dalla loro **attività enzimatica**, considerato il fatto che la EPO è una perossidasi e la ECP e la EDN hanno attività RNasica;
- 2) dalla loro **cationicità**, dal momento che tutte e tre hanno un punto isoelettrico maggiore di 8.9.

9a. Attività enzimatica.

Inizialmente abbiamo esaminato la possibilità che l'EPO potesse agire attraverso la sua attività enzimatica. Il cosubstrato richiesto dalla EPO è l' H_2O_2 . Nei nostri saggi non veniva aggiunta esternamente H_2O_2 ; tuttavia non si poteva escludere che l'enzima potesse utilizzare piccole quantità di acqua ossigenata prodotta dagli stessi macrofagi, anche se non stimolati. Abbiamo allora effettuato degli esperimenti di attivazione dei macrofagi, aggiungendo assieme all'EPO della catalasi, un enzima che converte l' H_2O_2 in H_2O . La **Figura 21a** mostra che la catalasi non ha alcun effetto sulla stimolazione da EPO, facendo così escludere che l'EPO stessa possa agire con un meccanismo enzimatico.

Un altro dato, sia pure indiretto, ci permetterebbe di concludere che l'attivazione determinata dalla EPO sia indipendente dalla sua attività enzimatica. La mieloperossidasi (MPO), presente nei neutrofili, è omologa per il 75% circa all'EPO, anche se da essa geneticamente distinta e la sua attività enzimatica è per molti aspetti simile a quella della EPO (143). La **Figura 21b** mostra che la mieloperossidasi non esercita alcun effetto attivante la produzione di H_2O_2 sui macrofagi (**Fig. 21b**). Inoltre, la MPO, aggiunta per 24 ore ai macrofagi, non determina alcun rilascio di TNF nei supernatanti delle loro colture (dati non mostrati).

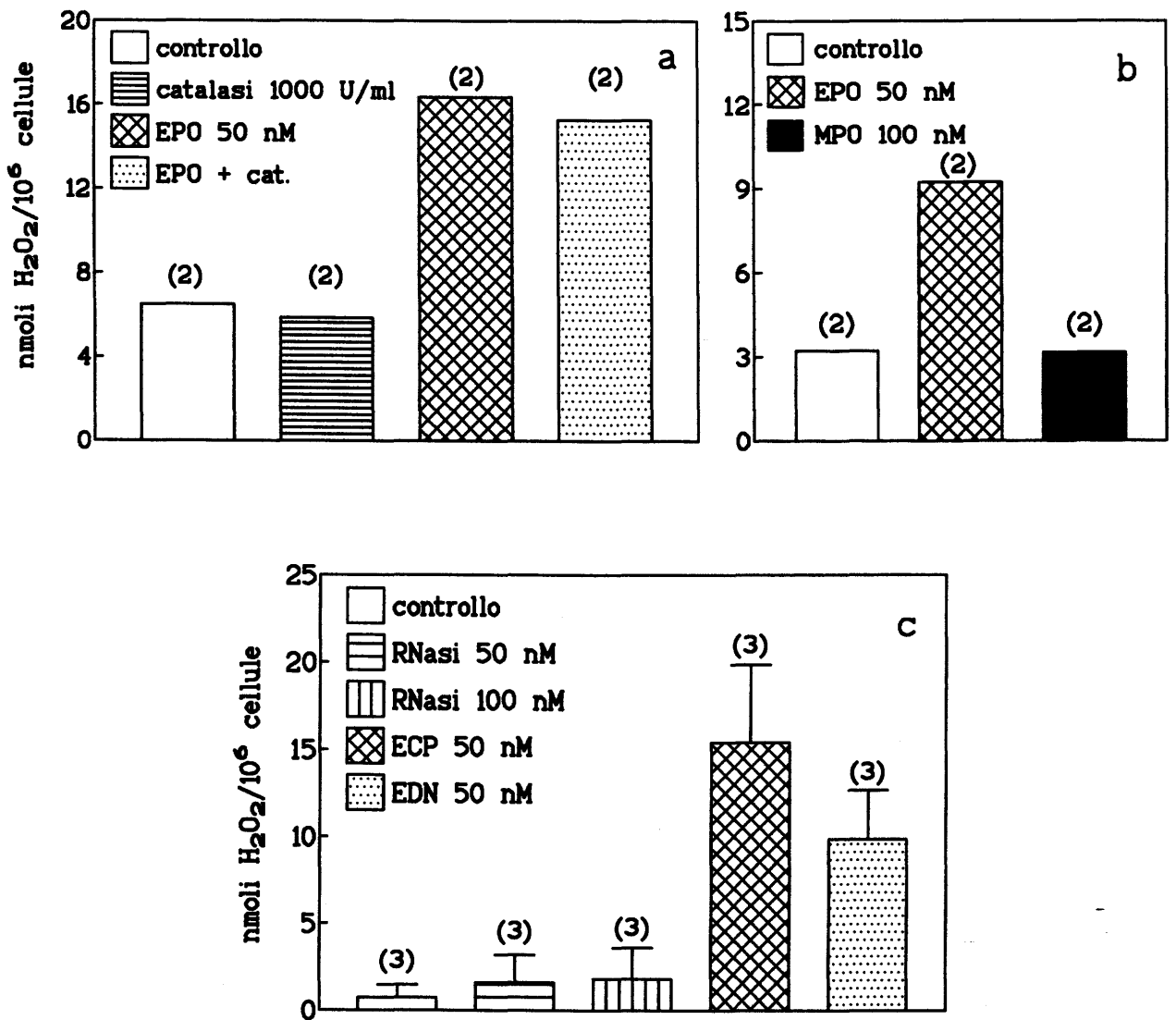


Figura 21. Indagini sul possibile coinvolgimento dell'attività enzimatica delle proteine cationiche nell'effetto del potenziamento del rilascio di H₂O₂. I dosaggi sono stati effettuati dopo 24 ore di incubazione (a, b) e dopo 72 (c). I dati sono la media dei risultati ottenuti in esperimenti il cui numero è riportato in parentesi. Le barre in c rappresentano l'ES.

Come per l'EPO, anche per l'ECP e l'EDN non sembra importante l'attività enzimatica per il loro effetto attivante i macrofagi. Infatti, l'aggiunta alle colture di macrofagi di una ribonucleasi pancreatica bovina

in quantità enzimaticamente paragonabile a quelle di EDN ed ECP non fa aumentare il rilascio di H₂O₂ (Fig. 21c). Inoltre la bollitura non interferisce con l'effetto di queste due proteine cationiche (Tabella 10).

Tabella 10. Effetto della bollitura sull'azione attivante di EPO, ECP ed EDN.

	nmoli/45'/10 ⁶ cellule		nmoli/45'/mg	
	Pop. A	Pop. B	Pop. A	Pop. B
controllo	4.00	12.10	11.80	40.25
EPO 50 nM	20.20	15.00	35.40	52.45
EPO 50 nM bollita	1.80	11.10	12.30	37.70
controllo	1.22	1.95	1.78	2.15
ECP 50 nM	40.79	42.49	71.25	103.75
ECP 50 nM bollita	39.71	48.99	51.51	115.15
EDN 50 nM	30.60	23.86	44.56	33.68
EDN 50nM bollita	30.24	19.07	49.29	25.26

Le proteine cationiche sono state bollite per 10 minuti, centrifugate e poi diluite alla concentrazione di 50 nM nel medium di coltura. La produzione di H₂O₂ è stata misurata dopo 24 ore dall'aggiunta dell'EPO e dopo 72 dall'aggiunta di ECP ed EDN.

Al contrario l'attività della EPO viene abolita dalla bollitura. Questa diversa sensibilità alla bollitura potrebbe dipendere dal fatto che la EPO è un dimero con un peso molecolare relativamente elevato (circa 70 KDa), formato da due subunità. La bollitura, oltre che denaturare le subunità, scinde il dimero, ed altera quindi profondamente la capacità dell'EPO di

interagire con i macrofagi. Il dato sulla denaturazione attraverso il calore suggerisce, quindi, che l'azione attivante dell'EPO si può esplicare solo se viene mantenuta l'integrità conformazionale della proteina.

La ECP e la EDN sono monomeri di peso molecolare relativamente basso, rispettivamente 21 e 18-19 KDa. La bollitura potrebbe avere solo effetti marginali sulla loro conformazione e quindi alterare l'azione attivante i macrofagi.

9b. Cationicità

Le **Figure 21b** e **22** mostrano rispettivamente che la mieloperossidasi (pI 10.5) e il lisozima (pI 11) non hanno alcun effetto stimolatorio sui macrofagi.

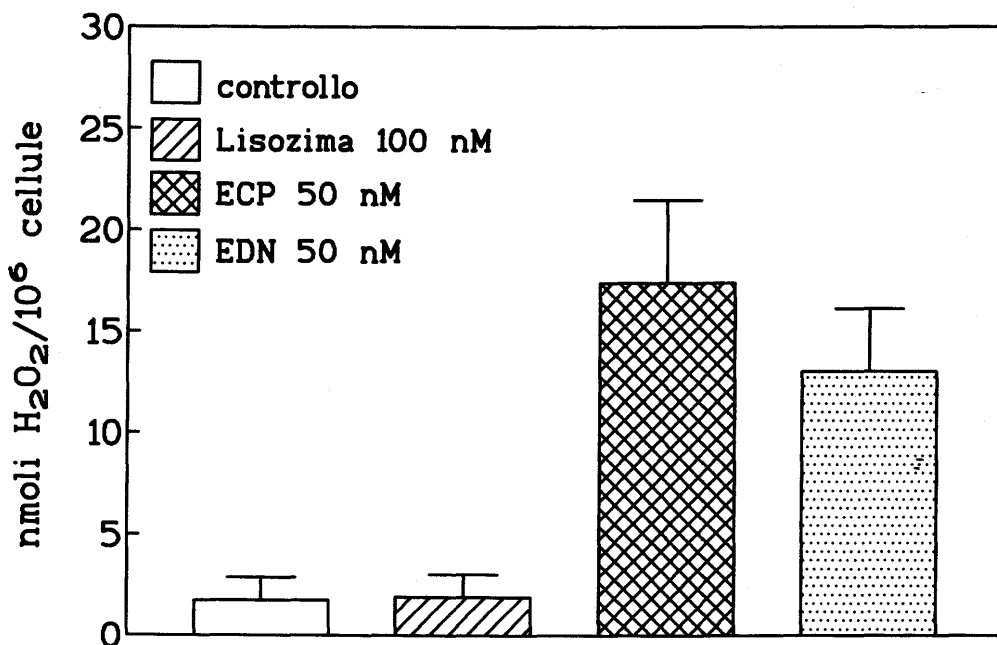


Figura 22. Effetto del lisozima sul rilascio di H₂O₂ indotto da PMA da parte di macrofagi. I dosaggi sono stati effettuati dopo 72 ore di incubazione. I dati sono la media ± ES dei risultati ottenuti da quattro esperimenti.

Ciò suggerisce che il meccanismo d'azione delle proteine granulari non è necessariamente aspecifico, dovuto cioè alla carica elettrica.

Tuttavia, non si può escludere che la cationicità abbia un qualche ruolo nell'interazione di queste proteine con la membrana cellulare dei macrofagi. Se ciò fosse vero, la presenza di altre proteine cationiche dovrebbe interferire con l'effetto stimolante sui macrofagi. I dati mostrati nella **Tabella 11** sembrano escludere questa possibilità. Infatti, aggiungendo contemporaneamente lisozima ed ECP ai macrofagi, non si ha alcun effetto competitivo sulla produzione di H₂O₂ e di TNF.

Tabella 11. Effetto del lisozima sul rilascio di H₂O₂ da parte di macrofagi incubati con ECP.

	nmoli H ₂ O ₂ /mg		U _{TNF} /10 ⁶ cellule	
	Pop. A	Pop. B	Pop. A	Pop. B
controllo	0.92	0.56	ND	ND
Lisozima 100 nM	0.85	0.48	ND	ND
ECP 50 nM	57.14	16.26	22800	11900
ECP + lisozima	51.94	13.61	7900	11150

I dosaggi per la produzione di H₂O₂ sono stati effettuati dopo 72 ore di incubazione. Anche i supernatanti per la misura del TNF sono stati prelevati dopo lo stesso tempo di incubazione.

Infine l'attività di ECP ed EDN non viene inibita, anzi risulta addirittura potenziata, dall'eparina, un polisaccaride solforato dotato di alta

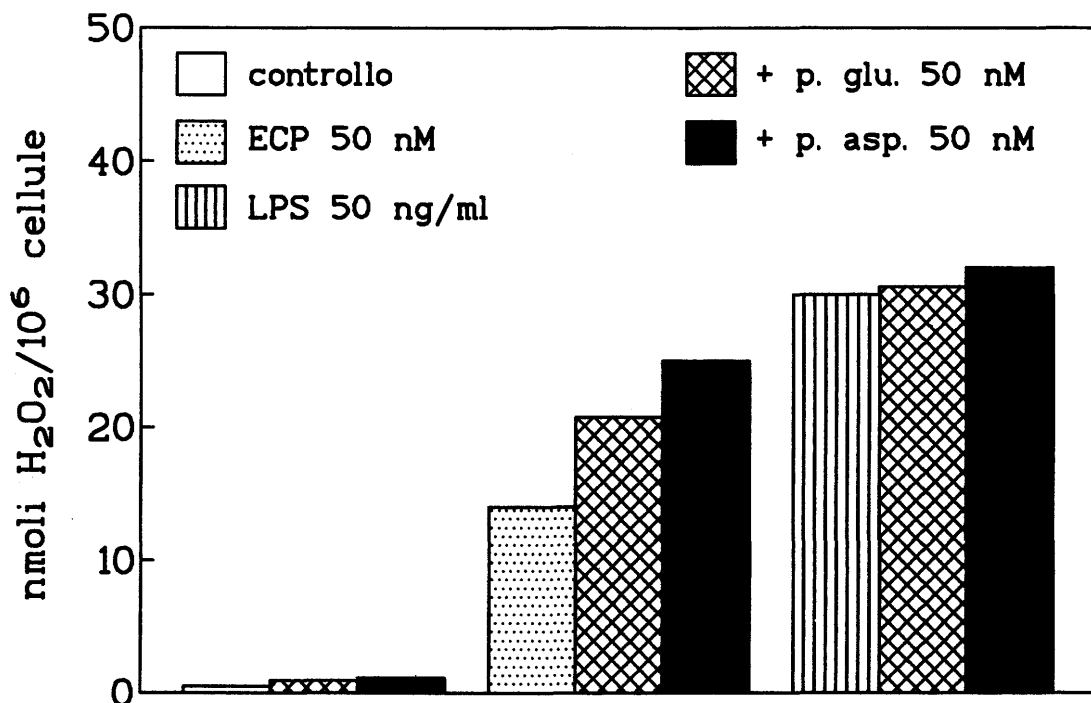


Figura 24. Effetto degli acidi poligluttammico e poliaspartico sul rilascio di H₂O₂ da parte di macrofagi incubati con ECP 50 nM ed LPS 50 ng/ml. I dosaggi sono stati effettuati dopo 72 ore di incubazione. I risultati sono la media dei dati ottenuti da due diverse popolazioni di macrofagi.

potenziano, anzichè inibire, l'effetto attivante dell'ECP sui macrofagi, mentre non alterano quello dell'LPS (Fig. 24).

Questo dato, per certi versi inaspettato, depone ulteriormente a sfavore di un ruolo importante della cationicità delle proteine granulari degli eosinofili nell'azione attivante i macrofagi.

10. EFFETTO DELLA POLIMIXINA B SULL'ATTIVAZIONE INDOTTA DALLE PROTEINE CATIONICHE.

Poichè gli effetti sin qui descritti dell'EPO, ECP ed EDN sulla stimolazione della produzione di H₂O₂ e di TNF sono simili a quelli prodotti dall'LPS, è stato necessario escluderne la presenza nei nostri campioni.

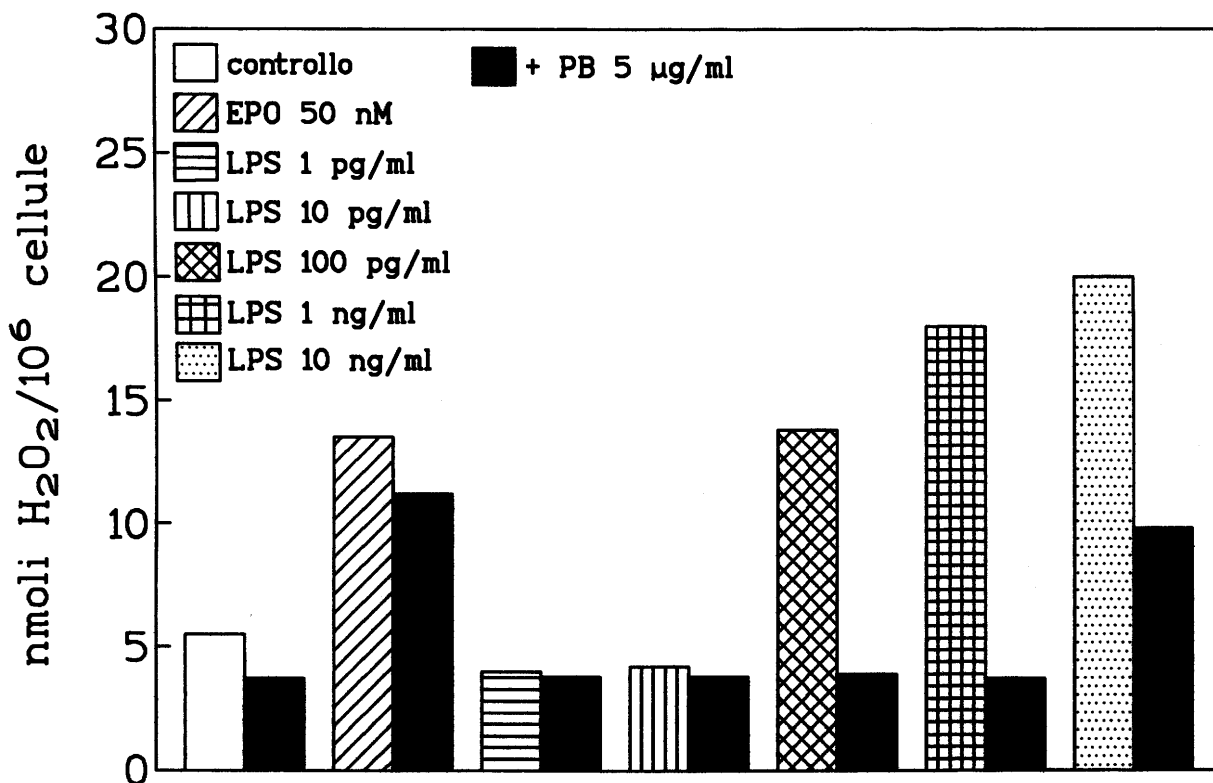


Figura 25. Effetto della polimixina B sul rilascio di H₂O₂ da parte di macrofagi incubati con EPO 50 nM e varie dosi di LPS. I dosaggi sono stati effettuati dopo 24 ore di incubazione.

Per quanto riguarda l'EPO, l'ipotesi di un'eventuale contaminazione è stata subito scartata perchè, in seguito a bollitura (vedi **Tabella 10**), la proteina perdeva il suo effetto attivante. L'LPS è invece resistente all'effetto del calore. Questo studio è stato comunque esteso e completato da esperimenti condotti con la polimixina B, considerata uno dei più importanti inibitori dell'endotossina. L'EPO e l'LPS sono stati preincubati con la polimixina B (5 µg/ml) prima dell'aggiunta ai macrofagi. Dopo 24 ore sono stati effettuati i dosaggi dell'H₂O₂. La polimixina B abolisce la produzione di H₂O₂ indotta da 100 pg/ml e 1 ng/ml di LPS e riduce del 50% quella determinata da 10 ng/ml di LPS, ma non ha alcun effetto sul rilascio di H₂O₂ causato dalla EPO (**Fig. 25**). Anche l'effetto stimolatorio

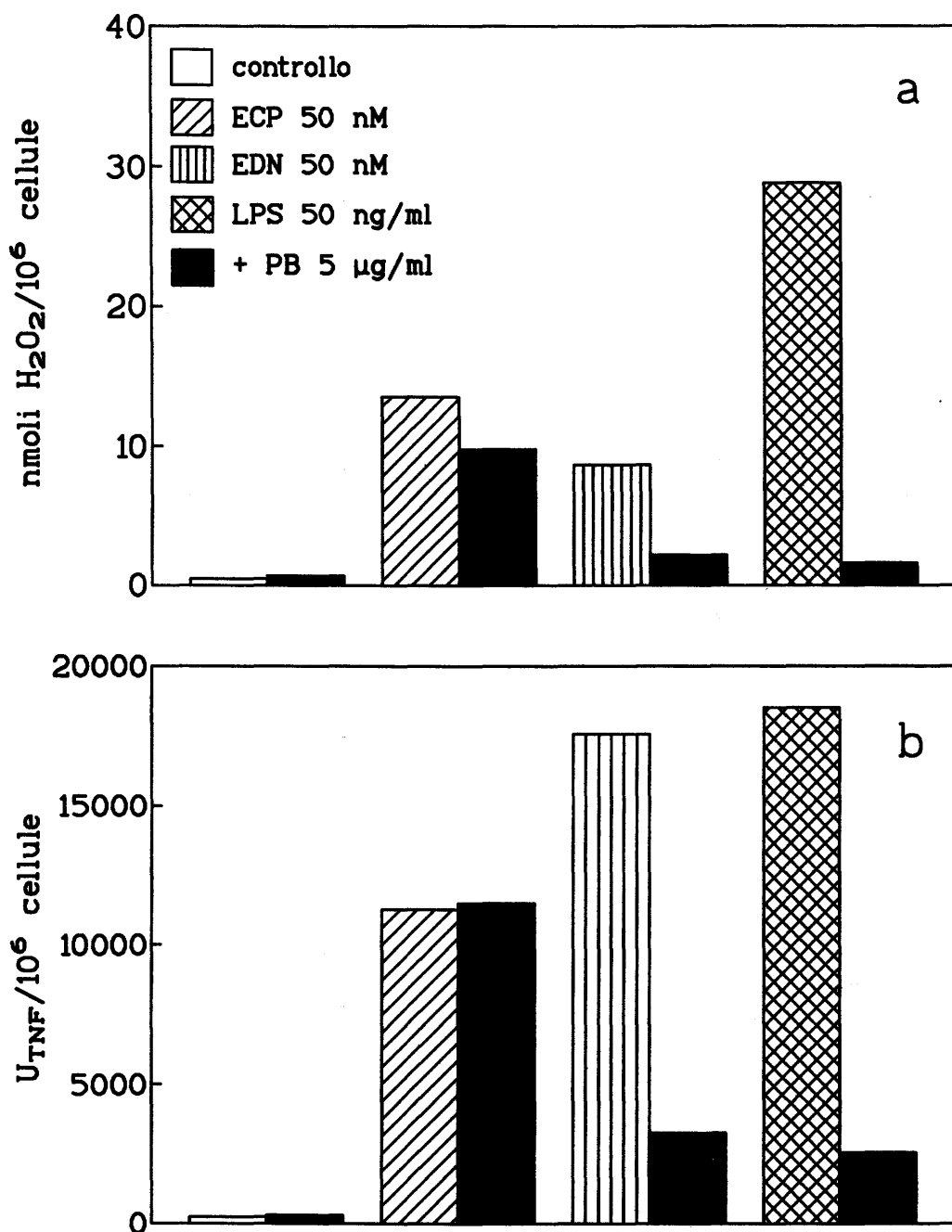


Figura 26. Effetto della polimixina B sul rilascio di H₂O₂ (a) e TNF (b) da parte di macrofagi incubati con ECP 50 nM, EDN 50 nM ed LPS 50 ng/ml. I dosaggi sono stati effettuati dopo 72 ore di incubazione.

dell'ECP è insensibile alla polimixina B (Fig. 26). L'inibizione da parte dell'antibiotico è invece notevole nella stimolazione dell'H₂O₂ e del TNF da parte dell'EDN (Fig. 26).

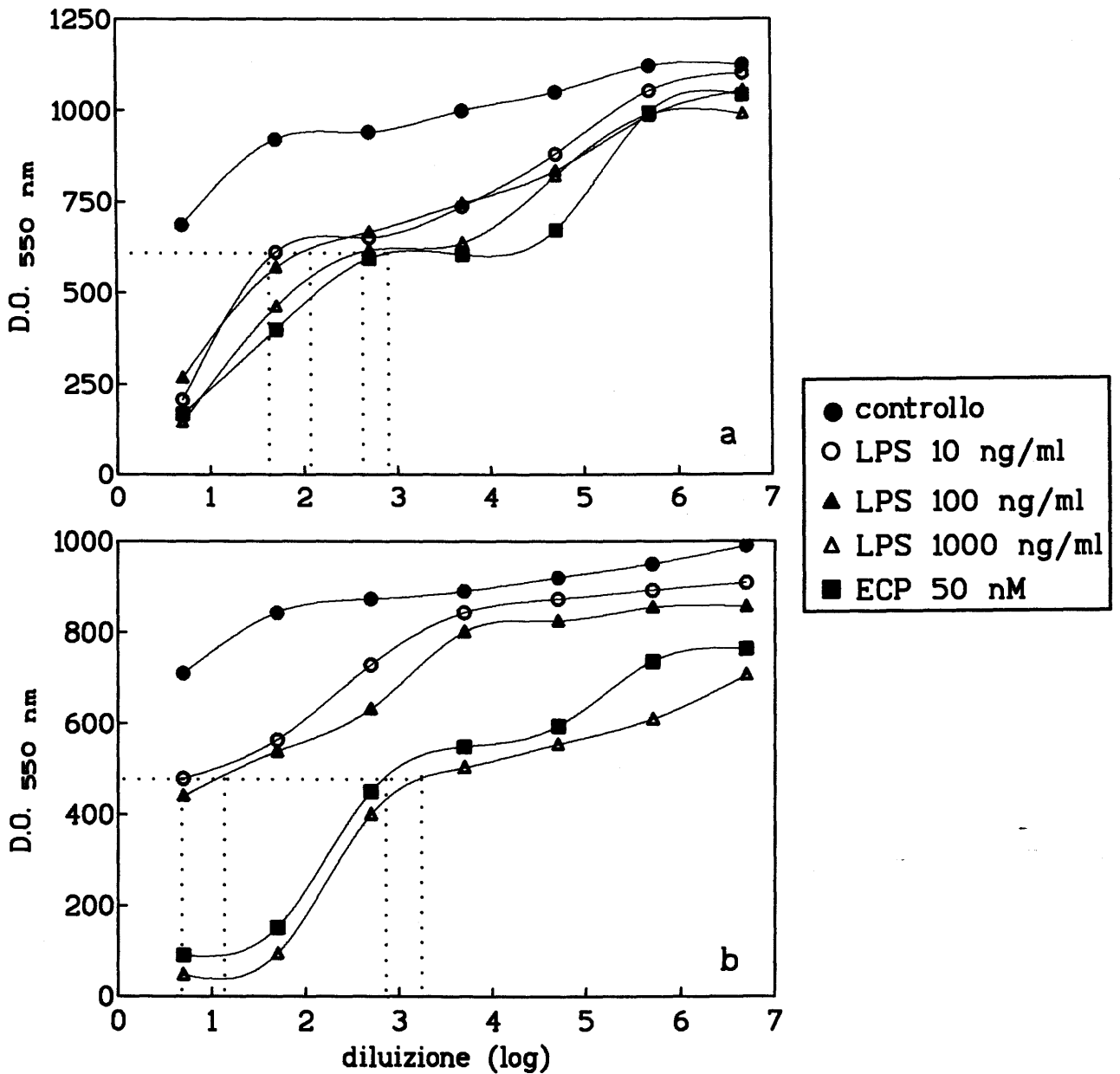


Figura 27. Attività citotossica di supernatanti ottenuti da colture di macrofagi murini incubati con ECP 50 nM e diverse quantità di LPS per 4 (a) e 24 (b) ore.

11. EFFETTO DELL'ECP SU MACROFAGI MURINI.

Volendo mettere in evidenza possibili differenze nel meccanismo di azione tra ECP ed LPS, abbiamo pensato di utilizzare un modello cellulare diverso ricorrendo all'utilizzo di macrofagi peritoneali di topo. Dopo aver

incubato questi macrofagi con ECP e varie quantità di LPS per diversi intervalli di tempo, abbiamo misurato la secrezione di TNF. Anche in questo caso l'effetto dell'ECP (50 nM) è molto simile a quello dell'LPS e quantitativamente risulta paragonabile a quello causato da 1 $\mu\text{g/ml}$ di lipopolisaccaride (**Figura 27**).

Risultati simili si sono ottenuti anche con macrofagi derivanti da un ceppo di topi insensibili all'LPS (C3HeJ). Questi macrofagi non producono TNF in seguito all'incubazione con LPS o con ECP (**Tabella 12**).

Tabella 12 . Produzione di NO_2^- e TNF da parte di macrofagi di topi C3HeN/C3HeJ.

	nmoli NO_2^- /pozz.		$U_{\text{TNF}}/10^6$ cellule	
	C3HeN	C3HeJ	C3HeN	C3HeJ
controllo	0.86	0.81	ND	ND
ECP 50 nM	3.48	0.76	1100	ND
EDN 50 nM	3.41	0.75	300	ND
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	2.75	0.76	720	ND

I supernatanti delle colture di macrofagi murini sono stati prelevati dopo 24 ore dall'aggiunta delle sostanze stimolanti e dosati per la misura di NO_2^- e di TNF come descritto nei Materiali e Metodi.

ND = non dosabile

Con queste cellule abbiamo misurato anche la secrezione di NO_2^- , che non viene invece prodotto dai macrofagi umani (144). La produzione di questo metabolita è considerato un valido parametro dell'attivazione

macrofagica (145). Dopo 24 ore, la risposta intermini di produzione di NO_2^- è qualitativamente simile a quella ottenuta misurando il TNF (**Tabella 12**).

12. EFFETTO DELLA DIGESTIONE ENZIMATICA.

La conformazione della proteina è fondamentale nell'attivazione determinata dall'EPO: lo dimostra l'effetto della bollitura che, provocando la sua denaturazione, abolisce completamente la produzione di H_2O_2 e di TNF.

Sembra invece che per ECP ed EDN non sia necessario il mantenimento dell'integrità conformazionale. Questo dato suggerisce che l'effetto stimolatorio di queste proteine dipenda da regioni sequenziali delle molecole che rimangono inalterate in seguito alla bollitura.

Siamo dunque ricorsi ad un processo di digestione enzimatica, utilizzando tre proteasi con diversi siti di azione: tripsina, papaina e proteinasi K. Prima del trattamento enzimatico, ECP ed EDN (e LPS e IFN- γ) sono state autoclavate. Successivamente sono state incubate a 37°C per 10 minuti con tripsina 9 $\mu\text{g/ml}$ (finale 0.15 $\mu\text{g/ml}$), poi per altri 10 minuti con papaina 12 $\mu\text{g/ml}$ (finale 0.2 $\mu\text{g/ml}$) ed infine per ancora 10 minuti con proteinasi K 15 $\mu\text{g/ml}$ (finale 0.25 $\mu\text{g/ml}$). Dopo questo trattamento, le proteine cationiche e le proteasi sono state diluite nel mezzo di coltura e aggiunte ai macrofagi.

La **Figura 28** mostra che la sola miscela di proteasi, usata come controllo, non altera la produzione di H_2O_2 dei macrofagi, dopo la

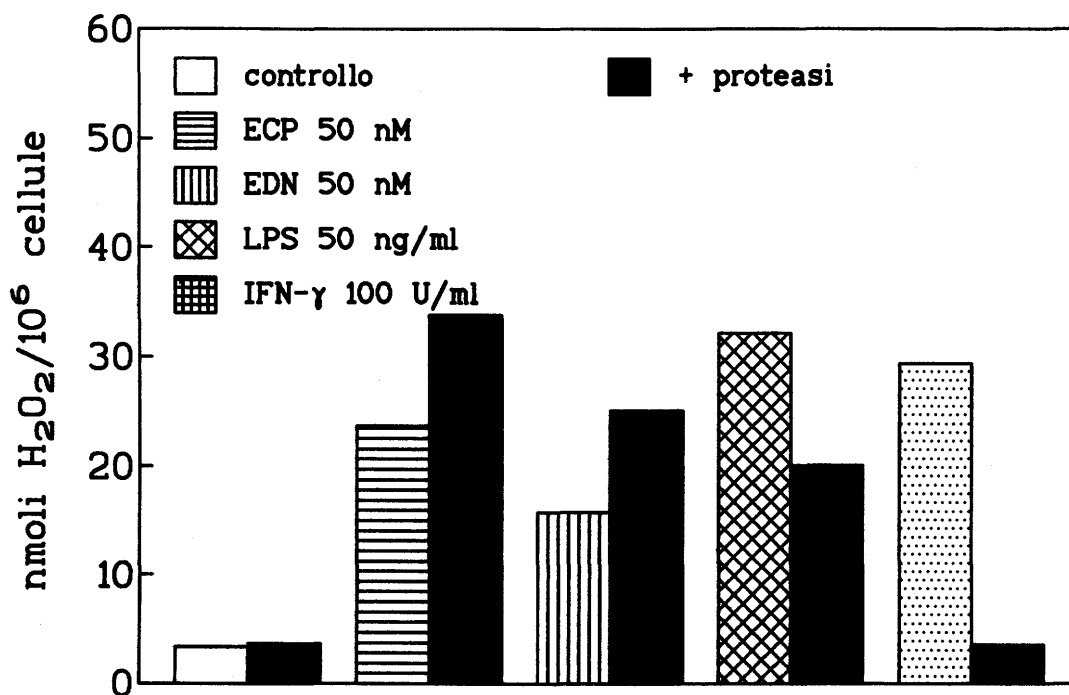


Figura 28. Effetto di tripsina, papaina e proteinasi K (proteasi) sul rilascio di H₂O₂ da parte di macrofagi incubati con ECP 50 nM, EDN 50 nM, LPS 50 ng/ml ed IFN- γ 100 U/ml. I dosaggi sono stati effettuati dopo 72 ore di incubazione con gli agenti stimolanti. I risultati sono la media dei dati ottenuti da due diverse popolazioni di macrofagi.

la digestione enzimatica, l'effetto di ECP ed EDN viene rafforzato, quello dell'LPS diminuisce, mentre quello dell'IFN- γ è abolito completamente.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella parte introduttiva di questa tesi, si è cercato di mettere in rilievo l'importanza degli eosinofili in particolari condizioni patologiche. Sembra che l'azione difensiva degli eosinofili sia dipendente dall'interazione delle proteine cationiche granulari rilasciate nei tessuti durante la reazione infiammatoria con i loro bersagli.

L'ipotesi da cui è nato il presente lavoro ha avuto origine considerando da una parte la molteplicità dei ruoli svolti dalle proteine cationiche e dall'altra dalle osservazioni dimostranti come in molte patologie ci sia una stretta associazione tra macrofagi ed eosinofili.

Abbiamo infatti ipotizzato che l'azione "difensiva" degli eosinofili, mediata principalmente dalle proteine cationiche granulari, potesse esercitarsi non solo direttamente ma anche indirettamente, attraverso il potenziamento delle funzioni difensive dei macrofagi. Si configurerebbe, quindi, per questi prodotti degli eosinofili un'attività immunomodulante, con azione cioè simile a quella delle citochine.

I dati presentati in questa tesi suffragano questa ipotesi, identificando una nuova modalità attraverso cui gli eosinofili possono partecipare alle difese dell'organismo. **Si dimostra, infatti, che le proteine cationiche sono in grado di attivare i macrofagi.**

L'effetto attivante delle proteine cationiche è stato valutato sulla base della secrezione di prodotti di riduzione dell'ossigeno (misurati nei nostri esperimenti come produzione di H₂O₂), della produzione di citochine (misurata come secrezione di TNF), dell'effetto sul contenuto proteico e delle modificazioni morfologiche.

La prima parte del lavoro ha riguardato la purificazione e la caratterizzazione del materiale utilizzato in questo studio e la messa a punto del modello cellulare da noi adottato (ottenimento e caratterizzazione di macrofagi da monociti di sangue periferico).

La dimostrazione della purezza delle nostre proteine si basa, fondamentalmente, sui risultati ottenuti con l'elettroforesi (SDS-PAGE). Le proprietà elettroforetiche non possono essere, in assoluto, prova della purezza di una proteina (nel nostro caso le proteine granulari degli eosinofili). In effetti, però, qualsiasi altro approccio sperimentale è da solo e di per sé limitativo per un giudizio insindacabile sulla purezza. Considerando comunque il fatto che l'elettroforesi è ormai accettata come indice soddisfacente di purezza, valutando inoltre la simmetria dei picchi di eluizione, l'assenza di citochine contaminanti, lo spettro di assorbimento (per l'EPO) e le indagini immunoenzimatiche (per ECP ed EDN), le proteine da noi utilizzate possono senz'altro essere giudicate "pure".

La messa a punto del sistema per il differenziamento dei monociti in macrofagi ci ha consentito di standardizzare un metodo di coltura per ottenere facilmente per le nostre proteine cationiche un bersaglio di cellule umane. Il metodo si è dimostrato molto pratico e soprattutto adatto al nostro scopo.

Riassumendo, i risultati chiave ottenuti, riguardanti l'attivazione dei macrofagi, sono stati i seguenti:

- **tutte e tre le proteine cationiche utilizzate, cioè EPO, ECP ed EDN**

1) potenziano il rilascio di H_2O_2 indotto da PMA,

- 2) sono potenti stimolatori della produzione di TNF,
- 3) modificano l'aspetto morfologico delle cellule in coltura;
- l'**EPO**, inoltre, induce un incremento del contenuto proteico dei macrofagi, l'**ECP** una diminuzione, mentre l'**EDN** lo mantiene inalterato;
 - la presenza di **eosinofili** normali nelle colture dei macrofagi potenzia il rilascio di H₂O₂ da parte di questi ultimi.

Questi risultati indicano che le proteine cationiche sono potenti attivatori dei macrofagi e che agiscono con meccanismi tra loro diversi.

Un aspetto discriminante riguarda il tempo di incubazione richiesto per ottenere una risposta ottimale per il rilascio di H₂O₂ da parte dei macrofagi. L'EPO determina il suo effetto massimo di stimolazione dopo 24 ore di incubazione, mentre ECP ed EDN dopo 72. I dati ottenuti da questo studio sulla cinetica di produzione di H₂O₂ accostano ECP ed EDN all'IFN- γ e all'LPS, mentre da questo punto di vista l'EPO differisce dai due più noti attivatori dei macrofagi. Pur agendo per tempi più lunghi della EPO, l'ECP e l'EDN attivano la produzione di H₂O₂ a livelli simili a quelli della EPO già alle prime ore di incubazione e successivamente in quantità molto più elevate. L'entità della stimolazione è in effetti molto diversa per EPO e per ECP ed EDN. Nei risultati è stato indicato un ordine di "efficacia" che qui riproponiamo: **ECP > EDN > EPO**.

Le tre proteine cationiche hanno, però, in comune la concentrazione alla quale determinano il loro massimo effetto di stimolazione sui macrofagi. Questa concentrazione (50 nM) è minore di quella che si osserva nei liquidi di secrezione in situazioni patologiche in cui la presenza

di queste proteine è associata al danno cellulare (15-19). Le dosi superiori a 200 nmoli/litro si sono dimostrate tossiche per le nostre cellule, a giudicare dal distacco massivo dei monociti-macrofagi inizialmente aderenti. L'effetto citotossico della EPO, studiato precedentemente nei confronti dei neutrofili (104), era già evidente alla concentrazione 50 nM. Ciò fa supporre che i macrofagi siano cellule più resistenti dei neutrofili, forse perchè dotate di sistemi di neutralizzazione più efficaci per mediatori potenzialmente tossici.

L'effetto sul contenuto proteico dei macrofagi consente di mettere in evidenza come l'azione attivante di queste proteine possa coinvolgere meccanismi di modulazione distinti della sintesi proteica. L'incremento del contenuto proteico si ha solo in seguito all'incubazione con l'EPO: questo fenomeno non viene osservato con nessun altro agente stimolante da noi considerato (LPS e IFN- γ). L'entità dell'incremento (30% circa) potrebbe far pensare ad un aumento della sintesi di proteine "strutturali" e quindi ad un aumento delle dimensioni cellulari. Questa supposizione sembra però in contrasto con quanto emerge dallo studio sulle modificazioni morfologiche: le cellule incubate con EPO non appaiono più voluminose delle cellule non trattate. A questo punto, anche se ulteriori indagini sono necessarie per chiarire tale effetto, ci sembra lecito avanzare l'ipotesi che l'EPO condizioni un differenziamento specifico, anche se non ancora individuato, della linea monocito-macrofagica.

Non siamo in grado di dare un preciso significato alla diminuzione determinata invece dall'ECP, anche perchè potenti attivatori come l'LPS o l'IFN- γ , che per efficacia di stimolazione possiamo ritenere abbastanza simili alla nostra proteina, non hanno alcun effetto in questo senso.

I risultati ottenuti sulla secrezione di TNF da parte di macrofagi esposti alle proteine granulari riconfermano l'ordine di efficacia che abbiamo individuato valutando la produzione di H₂O₂. In questo studio, inoltre, è stato visto che l'IFN- γ non fa produrre TNF ai macrofagi, pur rimanendo sempre un potente attivatore del metabolismo ossidativo. Questo risultato è in accordo con i dati di letteratura che dimostrano che l'IFN- γ induce la secrezione di TNF da macrofagi umani solo se questi sono pretrattati con LPS (146). EPO, ECP ed EDN, perciò, si dimostrerebbero attivatori addirittura più completi dell'IFN- γ in quanto stimolano sia la produzione di TNF che di H₂O₂.

Secondo dati di letteratura, in altri modelli sperimentali, il TNF può stimolare nei monociti la produzione di H₂O₂ (134). Nel nostro caso, il rilascio di H₂O₂ non è certamente ascrivibile alla possibile contaminazione da TNF nelle proteine purificate in quanto l'assenza di questa citochina è stata confermata nello studio sulla purezza (vedi pag. 54). In secondo luogo, il TNF rilasciato abbondantemente nel mezzo di coltura per esposizione alle proteine non risulta in grado di attivare i macrofagi. Abbiamo infatti incubato le nostre cellule con diverse quantità di TNF ricombinante senza osservare alcun effetto sul potenziamento del metabolismo ossidativo (dati non mostrati). Le differenze con i dati di letteratura sono probabilmente dovute al diverso modello sperimentale e alla diversa fonte di cellule da noi utilizzate rispetto agli altri autori.

Gli effetti sulla produzione di TNF e H₂O₂ sono accompagnati anche da alterazioni morfologiche che, come per gli altri parametri studiati, sono più accentuate con ECP ed EDN rispetto a EPO. I macrofagi incubati con ECP ed EDN presentano un aspetto simile a quello indotto dall'LPS, mentre

l'effetto dell'EPO è paragonabile a quello dell'IFN- γ . E' difficile fare una precisa correlazione tra intensità di stimolazione e modificazioni morfologiche. Sembrerebbe, comunque, esclusa la possibilità di una associazione tra metabolismo ossidativo e alterazioni della forma cellulare: l'IFN- γ , attivatore potente per la produzione di H₂O₂, non altera in modo evidente l'aspetto delle colture. D'altra parte anche la secrezione di TNF non è direttamente proporzionale ai cambiamenti osservati: le colture incubate con EPO, che stimola un'abbondante produzione di TNF, hanno un aspetto simile a quelle trattate con IFN- γ , in cui la quantità di citochina prodotta è minima.

Esistono probabilmente molte vie di attivazione, solo alcune delle quali si associano a modificazioni morfologiche. D'altra parte, questi cambiamenti potrebbero essere osservati solo se la sostanza stimolante ha molti effetti sulle cellule. In questo senso l'attivatore più completo tra le nostre proteine potrebbe essere l'ECP.

I risultati ottenuti con le proteine cationiche sono stati successivamente estesi allo studio sull'attivazione dei macrofagi coltivati con eosinofili normali interi. La presenza degli eosinofili aumenta in effetti la capacità dei macrofagi di produrre H₂O₂. L'effetto è più marcato in assenza di IL-5. Questa citochina era stata aggiunta in alcune coculture allo scopo di aumentare la sopravvivenza degli eosinofili e favorire una modesta secrezione di proteine granulari. Il dato ottenuto sembra contraddittorio rispetto alle suddette proprietà dell'IL-5, ma può essere spiegato ammettendo che nelle colture senza IL-5 ci sia una più elevata mortalità degli eosinofili. Di fatto, quindi, nelle colture senza IL-5, i macrofagi risulterebbero esposti a quantità maggiori di proteine cationiche.

Come è già stato ricordato, esistono diversi dati sul legame delle proteine cationiche a diversi tipi cellulari (41,42,101-104,106,107), ma non è mai stata descritta l'esistenza di un recettore specifico sulle cellule interessate. Anche la nostra indagine non è stata approfondita in questo senso, per cui non possiamo sapere se gli effetti che abbiamo studiato siano dovuti a segnali generati in seguito al legame delle proteine a recettori specifici presenti sui macrofagi o se è necessaria l'internalizzazione delle proteine affinché venga inviato il messaggio indispensabile per l'attivazione. Lo studio sul probabile meccanismo coinvolto nell'attivazione ci permette comunque di ricavare alcune utili informazioni su cui impostare future ipotesi di lavoro.

Per quanto riguarda la EPO, i nostri dati suggeriscono che la stimolazione dei macrofagi, probabilmente, non richiede un'attività catalitica intatta della proteina, perlomeno ad un livello extracellulare. Infatti,

- 1) l'EPO è attiva in assenza di H_2O_2 aggiunta esternamente e
- 2) la sua attività è interamente mantenuta anche in presenza di catalasi, un enzima che rimuove l' H_2O_2 .

Questo fatto, però, non esclude che l'EPO internalizzata dalle cellule possa interagire con l' H_2O_2 prodotta all'interno dei macrofagi, generando così quei segnali richiesti per la loro attivazione.

Inoltre, la mancanza di un effetto stimolante i macrofagi della mieloperossidasi è un'ulteriore indicazione, sia pure indiretta, della non necessità dell'attività perossidasi nell'azione della EPO. Il risultato ottenuto con la MPO non è in accordo con i dati riportati da altri autori che hanno dimostrato che la mieloperossidasi umana ricombinante stimola la

produzione di TNF nei macrofagi murini (147). Tale discordanza può derivare, oltre che dalla diversa fonte di macrofagi (murini anzichè umani), dal diverso tipo di MPO utilizzata. La MPO ricombinante è costituita da una singola catena polipeptidica di 84 kDa, mentre la MPO nativa è un tetramero di 150 kDa composto da due catene leggere e due catene pesanti. L'enzima ricombinante è, inoltre, più ricco in residui di mannosio rispetto alla MPO naturale (148).

Un'ulteriore considerazione da aggiungere per spiegare le differenze osservate è che la MPO ricombinante è stata usata ad una concentrazione (580 nM) che è più di 5 volte superiore rispetto alla dose di MPO impiegata nel nostro studio. Gli autori che hanno condotto lo studio sulla MPO ricombinante attribuiscono gli effetti osservati all'attività perossidasi. Anche utilizzando altri tipi di perossidasi (MPO di origine canina, perossidasi di rafano e lattoperossidasi), gli stessi autori hanno infatti sempre dimostrato un effetto stimolatorio sui macrofagi (149).

Gli effetti della EPO da noi osservati differiscono, quindi, per il meccanismo d'azione dalla stimolazione della secrezione delle mast cellule descritta da Henderson et al. (100) e da diverse altre funzioni della EPO, come la distruzione di funghi (150), batteri (93,94), schistosomula (96), toxoplasma (95) e cellule tumorali (97), dal momento che tutti questi effetti dipendono dall'attività catalitica della EPO e richiedono l'aggiunta di H₂O₂ esogena. In letteratura sono stati descritti finora solo due casi in cui l'azione dell'EPO è indipendente dall'attività enzimatica della proteina: l'attivazione delle piastrine (82) e la stimolazione per l'aggregazione e l'adesione alle cellule endoteliali dei neutrofili (105).

ECP ed EDN hanno attività ribonucleasica. Non si hanno notizie sull'attivazione dei macrofagi da parte di RNasi. Poichè, impiegando nel nostro sistema RNasi pancreatica bovina, non abbiamo ottenuto alcun effetto sulla produzione di H₂O₂, possiamo dedurre, sempre indirettamente, che, anche in questo caso, l'attività enzimatica sembra importante per l'attivazione indotta da queste due proteine.

Diversi approcci sperimentali indicano poi che l'effetto sulla produzione di H₂O₂ o sulla secrezione di TNF non è dovuto alla cationicità delle proteine granulari.

Alla luce dei risultati ottenuti dallo studio sull'attività enzimatica e sulla cationicità, non è possibile trarre conclusioni definitive sul probabile meccanismo d'azione. Possiamo però affermare che

- 1) le caratteristiche enzimatiche delle proteine non sono coinvolte,**
- 2) l'effetto stimolatorio non è inibito da sostanze altamente cationiche quali il lisozima,**
- 3) la neutralizzazione della carica non è in grado di alterare la loro capacità di attivare i macrofagi.**

Poichè alcuni effetti delle proteine cationiche erano molto simili a quelli dell'LPS, si è presentata la necessità di escludere la presenza del lipopolisaccaride dai nostri campioni proteici. Per l'EPO la mancanza di una contaminazione è stata dimostrata sia attraverso il dato ottenuto dalla bollitura che per mezzo degli esperimenti con la polimixina B. La prova dell'assenza dell'LPS nell'ECP ci viene offerta in modo convincente solo dalla polimixina. Si può comunque prendere in considerazione anche il fatto che nel modello murino l'effetto stimolatorio dell'ECP 50 nM è paragonabile

a quello di **1 $\mu\text{g/ml}$ di LPS**, mentre con macrofagi umani bastano 50 ng/ml di LPS per ottenere una stimolazione simile a quella della proteina, usata sempre alla stessa concentrazione. Se l'azione della ECP fosse veramente dovuta al lipopolisaccaride contaminante, allora avremmo dovuto osservare sui macrofagi murini un effetto in termini quantitativi diverso da quello visto sui macrofagi umani. Per l'EDN non si è potuta escludere la contaminazione da LPS con nessuno dei due approcci sperimentali considerati. Anche se tecnicamente non ci è dato modo di dimostrare in modo diretto l'assenza del lipopolisaccaride, riteniamo che anche nell'effetto dell'EDN non sia coinvolto l'LPS per le seguenti ragioni:

- 1) innanzitutto le soluzioni adoperate per la purificazione del materiale proteico, a partire dalla raccolta delle cellule, erano apirogene;
- 2) il processo cromatografico è stato effettuato dopo un lavaggio della resina con polimixina B;
- 3) è poco probabile che l'LPS, eventualmente presente, si sia complessato con l'EDN e non con le altre due proteine cationiche;
- 4) le frazioni eluite tra il picco dell'ECP e quello dell'EDN, utilizzate quale controllo, non possiedono alcuna attività stimolante. Quest'ultimo risultato ci offre una prova indiretta dell'assenza di endotossina nelle soluzioni adoperate per la cromatografia e nelle frazioni raccolte durante l'eluizione.

Si potrebbe, infine, anche ipotizzare che l'inibizione da polimixina B derivi da una sua interferenza con l'EDN nel legame alla cellula. Infatti, essendo ambedue cationiche, esse potrebbero competere per un probabile sito recettoriale "anionico" comune sulla superficie dei macrofagi.

Questo fenomeno non si verificherebbe per la ECP, dotata di una più elevata carica positiva e avente forse un sito recettoriale più specifico.

I risultati ottenuti suggeriscono la possibilità che le proteine cationiche agiscano in maniera differenziale. Se consideriamo l'LPS un termine di paragone per l'effetto stimolatorio, allora dobbiamo riconoscere che l'EPO esercita un tipo di attivazione molto diverso, mentre l'ECP ha un comportamento molto simile all'LPS in termini sia qualitativi che quantitativi. Ammettendo inoltre che l'EDN agisca, come probabile, indipendentemente dall'LPS, anche per questa proteina si possono fare le stesse conclusioni avanzate per l'ECP.

Si sono fatte diverse prove per mettere in evidenza possibili differenze nel meccanismo di azione di ECP ed EDN rispetto a quello dell'LPS. Per esempio, volendo agire sulla carica delle proteine, abbiamo visto che la neutralizzazione della carica, ottenuta in due diverse condizioni sperimentali, potenziava l'effetto di ECP ed EDN. Utilizzando l'eparina anche la stimolazione da parte del lipopolissaccaride veniva rafforzata, mentre con l'acido poliglutammico e poliaspartico non si osservava alcuna alterazione nel comportamento dell'LPS.

La digestione enzimatica, oltre a suggerire che l'azione attivante di ECP ed EDN potrebbe essere dovuta a particolari sequenze peptidiche che, dopo trattamento enzimatico, risultano maggiormente disponibili per interagire con i macrofagi, mette in evidenza una diversità rispetto all'effetto del lipopolisaccaride. Il trattamento enzimatico fa infatti diminuire l'attivazione da LPS. Quest'ultimo risultato è inaspettato, in quanto gli

effetti biologici dell'LPS sono dovuti essenzialmente alla frazione lipidica e non proteica del lipopolisaccaride.

L'effetto dell'ECP sui macrofagi peritoneali di topo è invece molto simile a quello dell'LPS. I risultati inoltre sembrano rafforzare l'ipotesi che sia implicata proprio la stessa via di attivazione (vedi Tabella 12). Resterebbe da chiarire però come mai l'ECP sia attiva sui macrofagi murini alla stessa dose impiegata nei macrofagi umani, mentre la sensibilità all'LPS sia diversa nei due tipi di cellule.

Abbiamo perciò pensato all'effettiva possibilità che soprattutto per ECP la via di attivazione fosse in comune con quella dell'LPS, ma che il recettore coinvolto potesse essere diverso. Ciò avrebbe potuto spiegare in parte le differenze registrate. Abbiamo perciò impiegato un anticorpo monoclonale (MEM-18) diretto contro l'antigene CD14, il recettore per il complesso LPS-LBP (LPS Binding Protein), noto per inibire il legame di tale complesso al suddetto recettore e l'azione attivante dell'LPS (151). I risultati non sono stati purtroppo informativi perchè l'anticorpo monoclonale esercitava di per sè un effetto attivante, monitorato sia come produzione di H_2O_2 che di TNF, sui macrofagi.

I nostri approcci sperimentali non ci consentono, quindi, di chiarire il meccanismo che permette alle tre proteine di agire. Sono necessarie senza dubbio indagini più approfondite.

Le considerazioni conclusive che possiamo fare riguardano il significato biologico degli effetti esercitati dalle proteine cationiche. Il fatto che EPO, ECP ed EDN stimolino due funzioni che nei macrofagi sono

correlate alla citotossicità ci fa supporre che esse possano agire da modulatori endogeni della capacità tumoricida e citocida dei macrofagi.

La capacità tumoricida degli eosinofili *in vitro* è ben documentata e si basa essenzialmente su due meccanismi effettori: **1)** un meccanismo EPO-H₂O₂-alogenuro "ossigeno-dipendente" (97) e **2)** un meccanismo "ossigeno-indipendente" mediato dalle proteine cationiche EPO, ECP, EDN ed MBP (152). Tuttavia la rilevanza *in vivo* di questi meccanismi non è stato ancora ben definito. Infatti il primo dipende in modo assoluto da H₂O₂, che non sempre può essere disponibile alla concentrazione richiesta dal sistema, mentre il secondo è operativo *in vitro* a concentrazioni di proteine basiche (1-100 μ M), difficilmente ottenibili *in vivo*.

Considerando il fatto che sia gli eosinofili che i macrofagi sono presenti in diversi tipi di tumore in strettissima prossimità e che concentrazioni molto basse di EPO, ECP ed EDN (nM) sono richieste per stimolare i macrofagi, i nostri risultati suggeriscono un terzo meccanismo basato sulla cooperazione tra eosinofili e macrofagi, operante attraverso una via di attivazione della capacità tumoricida dei macrofagi controllata dagli eosinofili. Si viene perciò a configurare un nuovo gruppo di proteine che singolarmente sono in grado di modulare finemente l'attività di altre cellule (nel nostro caso i macrofagi), forse indipendentemente dalle proprietà fisiche (es. la cationicità) ed enzimatiche per le quali sono state finora maggiormente conosciute e studiate.

Gli effetti biologici svolti dalle proteine, che potremmo far rientrare quindi nel gruppo delle sostanze simili alle citochine, non devono far dimenticare l'altro importante significato dell'interazione con la membrana

cellulare. In effetti il legame delle proteine cationiche con la membrana dei macrofagi potrebbe essere il primo ingranaggio di un processo il cui fine ultimo sarebbe l'inattivazione di un agente potenzialmente dannoso nell'ambiente extracellulare. Si sa che i macrofagi sono in grado di sequestrare la collagenasi dei neutrofili e di riusarla successivamente per degradare la matrice extracellulare (153). Ancora, i macrofagi legano sulla propria membrana altri enzimi granulari quali la lattoferrina (154), l'elastasi e la catepsina G (155). E' possibile che questo accada anche per le proteine cationiche eosinofile e che durante questa fase di "sequestrazione" dall'ambiente extracellulare esse riescano a modificare la funzionalità dei macrofagi.

Il "sequestro" di una sostanza potenzialmente dannosa è senz'altro utile per autolimitare la reazione infiammatoria, ma l'attivazione conseguente di cellule che a loro volta possono produrre agenti tossici in sedi specifiche, come i metaboliti dell'ossigeno, può risultare comunque in un beneficio per l'ospite.

Considerando le situazioni patologiche in cui la componente cellulare è rappresentata principalmente da macrofagi ed eosinofili, l'attivazione dei macrofagi può costituire un suppletivo sistema di difesa per l'uccisione di parassiti ma anche una fonte di danno tissutale dovuto alla produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno e di citochine. Nelle situazioni neoplastiche l'attivazione dei macrofagi potrebbe avere delle conseguenze contrastanti: se alla stimolazione, ad esempio, conseguisse una maggior produzione di fattori di crescita verrebbe favorita l'espansione ed eventualmente la metastatizzazione del tumore; se risultasse, invece, aumentato il potenziale citotossico dei macrofagi sarebbe prevalente l'azione antineoplastica.

BIBLIOGRAFIA

1. Spry CJF. 1988. In: The eosinophils: a comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. Oxford University Press.
2. Beeson PB, Bass DA. 1977. The eosinophil. In the series "Major problems in international medicine". Vol. XIV, Lloyd H Smith jr. MD Editor.
3. Mahmoud AAF, Warren KS, Peters PA. 1975. A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by antieosinophilic serum. *J Exp Med*; 142:805
4. Butterworth AE, David JR, Franks D, Mahmoud AAF, David PH, Sturrock RF, Houba V. 1977. Antibody-dependant eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: damage by purified eosinophils. *J Exp Med*; 145:136
5. Vadas MA, Butterworth AE, Sherry B, Dessein A, Hogan M, Bout D, David JR. 1980. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*, I Stable and irreversible antibody-dependent adherence. *J Immunol*; 124:1441
6. Glauert A, Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V. 1978. The mechanism of antibody-dependant eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. A study by phase contrast and electron microscopy. *J Cell Sci*; 34:173
7. Butterworth AE. 1984. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol*; 23:143
8. Yazdanbakhsh MA, Tai PC, Spry CJF, Gleich GJ, Roos D. 1987. Synergism between eosinophil cationic proteins and oxygen metabolites in killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*; 138:3443
9. Petreccia DC, Nauseef WH, Clark RA. 1987. Respiratory burst of normal human eosinophils. *J Leuk Biol*; 41:283
10. Kanofsky JR, Hoogland H, Wever R, Weiss SJ. 1988. Singlet oxygen production by human eosinophils. *J Biol Chem*; 263:9692
11. Jong EC, Mahmoud AAF, Klebanoff SJ. 1981. Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*; 126:468
12. Venge P. 1981. The eosinophil granulocyte and its role in the inflammatory process. In: The inflammatory process. Venge P (ed). Almquist and Wiksell Int Stockholm, Sweden, pp. 305-327
13. Weller PF. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N Eng J Med*; 324:1110
14. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, Waldrop TC et al. 1985. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency; their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis*; 152:668

15. Gleich GJ, Adolphson CR. 1986. The eosinophilic leukocyte structure and function. *Adv Immunol*; 39:177
16. Durham SR, Loegering DA, Dunnette S, Gleich GJ, Kay AB. 1989. Blood eosinophils and eosinophil-derived proteins in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 84:931
17. Bascom R, Pipkorn U, Proud D, et al . 1989. Major basic protein and eosinophil-derived neurotoxin concentrations in nasal-lavage fluid after antigen challenge: effect of systemic corticosteroids and relationship to eosinophil influx. *J Allergy Clin Immunol*; 84:338
18. Andersson M, Andersson P, Venge P, Pipkorn U. 1989. Eosinophils and eosinophil cationic protein in nasal lavages in allergen-induced hyperresponsiveness: effect of topical glucocorticosteroid treatment. *Allergy*; 44:342
19. Hällgren R, Colombel JF, Dhal R, Fredens K, Kruse A, Jacobsen NO, Venge P, Rambaud JC. 1989. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med*; 86:56
20. Ayars GH, Altman LC, McManus MM, Agosti JM, Baker C, Luchtel DL, Loegering DA, Gleich GJ. 1989. Injurious effect of the eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-halide system and major basic protein on human nasal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis*; 140:125
21. Brofman JD, White SR, Bkake JS, Munoz NM, Gleich GJ, Leff AR. 1989. Epithelial augmentation of trachealis contraction caused by major basic protein of eosinophils. *J Appl Physiol*; 66:1867
22. Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. 1989. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis*; 139:801
23. Foster PF, Sankarij H, Williams JW. 1988. Study of eosinophilia and hepatic dysfunction as a predictor of rejection in human liver transplantation. *Transplan Proc*; 20:676
24. Lautenshlager I, von Willebrand E, Häyry P. 1985. Blood eosinophilia, steroids and rejection. *Transplantation*; 40:354
25. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Cardaba B, Fernandez JC, Gallardo S, Tramon P, Leyva Cobian F, Palomino P, Lahoz C. 1992. Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol*; 22:1919
26. Mawhorter SD, Kazura JW, Boom WH. 1994. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology*; 81:584
27. Plumas J, Gruart V, Aldebert D, Truong MJ, Capron M, Capron A, Prin L. 1991. Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit. *Eur J Immunol*; 21:1265
28. Lucey DR, Dorsky DI, Nicholson-Weller PF. 1989. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus I gp120. *J Exp Med*; 169:327

29. Wong DTW, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY, Gordon JR, Rand TH, Galli SJ, Weller PF. 1991. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor β_1 . **Blood**; 78:2702
30. Elovic A, Galli SJ, Weller PF, Chang ALC, Chiang T, Chou MY, Donoff RB, Gallagher GT, Matossian K, McBride J, Tsai M, Todd R, Wong DTW. 1990. Production of transforming growth factor alpha by hamster eosinophils. **Am J Pathol**; 137:1425
31. Melani C, Mattia GF, Silvani A, Carè A, Rivoltini L, Parmiani G, Colombo MP. 1993. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. **Blood**; 81:2744
32. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. 1990. Murine eosinophils and IL-1: α IL-1 mRNA detection by in situ hybridization. **J Immunol**; 144:3117
33. Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich GJ. 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. **J Exp Med**; 174:745
34. Moqbel R, Hamid Q, Ying S, Barkans J, Hartnell A, Tsiopoulos A, Wardlaw AJ, Kay AB. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. **J Exp Med**; 174:749
35. Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A, Capron M. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. **J Exp Med**; 175:293
36. Braun RK, Franchini M, Erard F, Rihs S, De Vries IJM, Blaser K, Hansel TT, Walker C. 1993. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. **Eur J Immunol**; 23:956
37. Costa JJ, Matossian K, Resnick MB, Beil WJ, Wong DT, Gordon JR, Dvorak AM, Weller PF, Galli SJ. 1993. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor α and macrophage inflammatory protein-1 α . **J Clin Invest**; 91:2673
38. Olds GR, Mahmoud AAF. 1980. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni. Eosinophil-mediated destruction of eggs. **J Clin Invest**; 66:1191
39. El-Cheikh MC, Dutra HS, Borojevic R. 1991. Eosinophil granulocyte proliferation and differentiation in schistosomal granulomas are controlled by two cytokines. **Lab Invest**; 64:93
40. Davies JD, Neely J. 1972. The histopathology of peritoneal starch granulomas. **J Pathol**; 107:265
41. Zabucchi G, Soranzo M, Menegazzi R, Cattin L, Vecchio M, Lanza F, Patriarca P. 1991. Eosinophilic granuloma of the bone in Hand-Schüller-Christian disease: extensive *in vivo* eosinophil degranulation and subsequent binding of released eosinophil peroxidase (EPO) to other inflammatory cells. **J Pathol**; 163:225.

42. Janin A, Torpier G, Capron M, Courtin P, Gosselin B. 1992. Immunopathological study of eosinophils in eosinophil granuloma of bone: evidence for release of three cationic proteins and subsequent uptake in macrophages. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**; 421:255
43. Castro AG, Esaguy N, Macedo PM, Aguas AP, Silva MT. 1991. Live but not heat-killed Mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils *in vivo* and are ingested by the attracted granulocytes. **Infect Immun**; 59:3009
44. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow II TG, Kimball PM, Boohaker EA. 1983. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. **Cancer Res**; 2997
45. Pretlow TP, Boohaker EA, Pitts AM, MacFadyen AJ, Bradley EL, Pretlow II TG. 1984. Heterogeneity and subcompartmentalization in the distribution of eosinophils in human colonic carcinomas. **Am J Pathol**; 116:207
46. Fisher ER, Paik SM, Rockette H, Jones J, Caplan R, Fisher B and other NSABP collaborators. 1989. Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer. **Hum Pathol**; 20:159
47. Iwasaki K, Torisu M, Fujimura T. 1986. Malignant tumor and eosinophils. Prognostic significance in gastric cancer. **Cancer**; 58:1321
48. Muller E, Kolb E. 1979. Local responses in primary and secondary human lung cancer. Patterns of cellular (eosinophils and macrophages) and extracellular (acid mucopolysaccharide) reactions. **Br J Cancer**; 40:403
49. Kolb E, Muller E. 1979. Local responses in primary and secondary human lung cancers. Clinical correlation. **Br J Cancer**; 40:410
50. Vaage J, Pepin KG. 1986. Immunospecific eosinophil infiltration of a mouse mammary carcinoma. **Cancer Res**; 46:5344
51. Looi LM. 1987. Tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. A pathologic study of 422 primary and 138 metastatic tumors. **Cancer**; 59:466
52. Pastrnak A, Jansa P. 1984. Local eosinophilia in stroma of tumor related to prognosis. **Neoplasma**; 31:323
53. Young M, Nuss R, Benrubi G. 1985. Stromal and peripheral eosinophilia in cervical carcinoma. **Eur J Gynaecol Oncol**; 6:94
54. Kapp DS, LiVolsi VA. 1983. Intense eosinophilic stromal infiltration in carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic study of 14 cases. **Gynecol Oncol**; 16(1):19
55. Horiuchi K, Mishima K, Ohsawa M, Sugimura M, Aozasa K. 1993. Prognostic factors for well differentiated squamous cell carcinoma in the oral cavity with emphasis on immunohistochemical evaluation. **J Surg Oncol**; 53:92
56. Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD 3d, Askin FB. 1992. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg**; 106:27
57. Rodat O, Harousseau JL, Reynaud C, Milpied N, Stalder JF, Chupin M. 1982. Eosinophilic fasciitis and Hodgkin's disease. **Sem Hop Paris**; 58:2207

58. Enblad G, Sundstrom C, Glimelius B. 1993. Infiltration of eosinophils in Hodgkin's disease involved lymph nodes predicts prognosis. *Hematol Oncol*; 11:187
59. Tsang WY, Chan JK. 1993. The family of epithelioid vascular tumors. *Histol Histopathol*; 8:187
60. Stahle Backdahl M, Parks WC. 1993. 92 kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*; 142:995
61. Ownby HE, Roi LD, Isenberg RR, Brennan MJ. 1983. Peripheral lymphocyte and eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. *Cancer*; 52:126
62. Huland E, Huland H. 1989. Local continuous high dose of interleukin 2: a new therapeutic model for the treatment of advanced bladder carcinoma. *Cancer Res*; 49:5469
63. Rivoltini L, Viggiano V, Spinazze S, Santoro A, Colombo MP, Takatsu K, Parmiani G. 1993. *In vitro* anti-tumor activity of eosinophils from cancer patients treated with subcutaneous administration of interleukin 2. Role of interleukin 5. *Int J Cancer*; 54:8
64. Matsumoto S, Tamai T, Yanagisawa K, Kawamura S, Fujita S. 1992. Lung cancer with eosinophilia in the peripheral blood and the pleural fluid. *Inter Med*; 31:525
65. Ishimitsu T, Torisu M. 1993. The role of eosinophils in interleukin 2/lymphokine activated killer cell therapy. *Surgery*; 113:192
66. Forni G, Giovarelli M, Santoni A, Modesti A, Forni M. 1987. Interleukin 2 activated tumor inhibition in vivo depends on the systemic involvement of host immunoreactivity. *J Immunol*; 138:4033
67. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. 1989. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell*; 57:503
68. Modesti A, Masuelli L, Modica A, D'Orazi G, Scarpa S, Bosco MC, Forni G. 1993. Ultrastructural evidence of the mechanism responsible for interleukin 4 activated rejection of a spontaneous murine adenocarcinoma. *Int J Cancer*; 53:993
69. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. 1992. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*; 257:548
70. Dumont S, Hartmann D, Poindron P, Oberling F, Faradji A, Bartholeyns J. 1988. Control of the antitumoral activity of human macrophages produced in large amounts in view of adoptive transfer. *Eur J Cancer Clin Oncol*; 24:1691
71. Alexander P. 1973. Activated macrophages and the antitumor action of BCG. *Natl Cancer Inst Mong*; 39:127
72. Fidler I J. 1985. Macrophages and metastasis, a biological approach to cancer therapy: Presidential address. *Cancer Res*; 45:4714
73. Krüger-Krasagakes S, Li W, Richter G, Diamanstein T, Blankenstein T. 1993. Eosinophils infiltrating interleukin-5 gene transfected tumors do not suppress tumor growth. *Eur J Immunol*; 23:995

74. Dorsch M, Hock H, Kunzendorf U, Diamanstein T, Blankenstein T. 1993. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *Eur J Immunol*; 23:186
75. Peters MS, Rodriguez M, Gleich GJ. 1986. Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy. *Lab Invest*; 54:656
76. Egesten Am Alumets J, von Mecklenburg C, Palmegren N, Olsson I. 1986. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem*; 34:1399
77. Barker RL, Loegering DA, Arakawa KC, Pease LA, Gleich GJ. 1990. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding eosinophil major basic protein. *Gene*; 86:285
78. Moy JN, Gleich GJ, Thomas LL. 1990. Noncytotoxic activation of neutrophils by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol*; 145:2626
79. Sarmiento EU, Thomas LL, Moy JN. 1991. Eosinophil granule major basic protein (MBP) enhances neutrophil phagocytosis of unopsonized *E. coli*. *J All Clin Immunol*; ABS 831
80. Parmley R, Thomas LL, Moy J. 1993. Characterization of a neutrophil receptor for eosinophil major basic protein (MBP). *J Immunol*; ABS 821
81. O'Donnell MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. 1983. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J Exp Med*; 157:1981
82. Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ. 1990. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med*; 172:1271
83. Rankin JA, Harris P, Ackerman SJ. 1992. The effects of eosinophil-granule major basic protein on lung macrophage superoxide anion generation. *J Allergy Clin Immunol*; 89:746
84. Barker LR, Gundel RH, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, Pease LR, Hamann KJ. 1991. Acidic polyamino acids inhibit human eosinophil granule major basic protein toxicity. Evidence of a functional role for proMBP. *J Clin Invest*; 88:798
85. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. 1986. Biochemical and functional similarities between eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83:3146
86. Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. 1992. Eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2d ed. New York: Raven Press; pp: 663-700
87. Gleich GJ, Glitz DG, Abu-Ghazaleh RI. 1994. Eosinophil granule proteins: structure and functions. In: Gleich GJ, Kay AB (eds). *Eosinophils in allergy and inflammation*. Marcel Dekker, Inc. New York; pp. 1-20

88. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Jiang Y, Mikawa H. 1992. Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation in vitro in human plasma cells. *Cell Immunol*; 141:422
89. Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP, Gleich GJ. 1989. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. *J Exp Med*; 169:1757
90. Zgliczynski JM, Selvaraj RJ, Paul BB, Stelmaszynska T, Poskitt PKF, Sbarra AJ. 1977. Chlorination by the myeloperoxidase-H₂O₂-Cl. Antimicrobial system at the acid and neutral pH. *Proc Soc Exp Biol Med*; 154:418
91. Wever R, Hamers MN, de Graaf CJ, Weening RS, Roos D. 1982. Characterization of the peroxidase in human eosinophils. In: Rossi F, Patriarca P (eds). *Biochemistry and function of phagocytes*. Plenum Press, New York and London; p. 501
92. Cramer R, Soranzo MR, Patriarca P. 1981. Evidence that eosinophils catalyze the bromide-dependent decarboxylation of amino acids. *Blood*; 58:1112
93. Migler R, DeCatholet LR, Bass DA. 1978. Human eosinophil peroxidase: role in bactericidal activity. *Blood*; 51:445
94. Jong EC, Henderson WR, Klebanoff SJ. 1980. Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J Immunol*; 124:1378
95. Locksely RM, Wilson CB, Klebanoff SJ. 1982. Role for endogenous and acquired peroxidase in the toxoplasmacidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest*; 69:1099
96. Jong EC, Mahmoud AAF, Klebanoff SJ. 1981. Peroxidase-mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol*; 126:468
97. Jong EC, Klebanoff SJ. 1980. Eosinophil-mediated mammalian tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J Immunol*; 124:1949
98. Ramsey PG, Martin T, Chi E, Klebanoff SJ. 1982. Arming of mononuclear phagocytes by eosinophil peroxidase bound to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*; 128:415
99. Nathan CF, Klebanoff SJ. 1992. Augmentation of spontaneous macrophage-mediated cytotoxicity by eosinophil peroxidase. *J Exp Med*; 155:1291
100. Henderson WR, Chi EY, Klebanoff SJ. 1980. Eosinophil peroxidase induced mast cell secretion. *J Exp Med*; 152:265
101. Zabucchi G, Soranzo MR, Menegazzi R, Bertoncin P, Nardon E, Patriarca P. 1989. Uptake of human eosinophilperoxidase and myeloperoxidase by cells involved in the inflammatory process. *J Histochem Cytochem*; 37:499
102. Zabucchi G, Menegazzi R, Soranzo MR, Patriarca P. 1986. Uptake of human eosinophil peroxidase by human neutrophils. *Am J Pathol*; 124:510
103. Dvorak AM, Klebanoff SJ, Henderson WR, Monahan RA, Pyne K, Galli SJ. 1985. Vesicular uptake of eosinophil peroxidase by guinea pig basophils and by cloned mouse mast cells and granule-containing lymphoid cells. *Am J Pathol*; 118:425
104. Spessotto P. AA 1988-89. Tesi di laurea. Interazione della eosinofilo-perossidasi con neutrofili umani: modalità di legame ed effetti biologici.
105. Zabucchi G, Menegazzi R, Cramer R, Nardon E, Patriarca P. 1990. Mutual influence between eosinophil peroxidase (EPO) and neutrophils: neutrophils reversibly inhibit

- EPO enzymatic activity and EPO increases neutrophil adhesiveness. *Immunol*; 69:580
106. Dvorak AM, Ackerman SJ, Furitsu T, Estrella P, Letourneau L, Ishizaka T. 1992. Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin 5. II. Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. *Am J Pathol*; 140:795
 107. Janin A, Torpier G, Courtin P, Capron M, Prin L, Tonnel AB, Hatron PY, Gosselin B. 1993. Segregation of eosinophil proteins in alveolar macrophage compartments in chronic eosinophilic pneumonia. *Thorax*; 48:57
 108. Wang SY, Mak KL, Chen LY, Chou MP, Ho CK. 1992. Heterogeneity of human blood monocytes: two subpopulation with different sizes, phenotypes and functions. *Immunology*; 77:298
 109. Loms Ziegler-Heitbrock HW. 1989. The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol*; 49:1
 110. West MA .1990. in Mechanism of leukocyte activation. Edited by Arnost Kleinzeller, Guest Editors Sergio Grinstein, Ori D. Rostein
 111. Mackaness GB. 1970. The monocyte and cellular immunity. *Semin Hematol*; 7:172
 112. North RJ. 1978. The concept of the activated macrophage. *J Immunol*; 121:806
 113. Cohn ZA. 1978. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and feature. *J Immunol*; 121:813
 114. Karnovsky ML, Lazdins JK. 1978. Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol*; 121:809
 115. Johnston RB Jr. 1981. Enhancement of phagocytosis-associated oxidative metabolism as a manifestation of macrophage activation. *Lymphokines*; 3:33
 116. Sharma SD, Remington JS. 1981. Macrophage activation and resistance to intracellular infection. *Lymphokines*; 3:181
 117. Adams DO, Hamilton TA. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol*; 2:283
 118. Johnston RB Jr, Zucker-Franklin D. 1988. Monocytes and macrophages. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM (eds). Atlas of blood cells: function and pathology. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger
 119. Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*; 79:319
 120. Beutler B, Cerami A. 1987. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Eng J Med*; 316:379
 121. Ogmundsdottir HM, Weir DM. 1980. Mechanism of macrophage activation. *Clin Exp Immunol*; 40:223

122. Cramer R, Dri P, Zabucchi G, Patriarca P. 1992. A simple method for isolation of eosinophilic granulocytes from human blood. *J Leuk Biol*; 52:331
123. Zöllner N, Hobom G. 1965. Ribonuclease. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York: Verlag Chemie Academic Press, pp:793-799
124. Laemmli UK. 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680
125. Tsai CM, Frasch CE. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*; 119:115
126. Nakawara A, Nathan CF. 1983. A simple method for counting adherent cells: application to cultured monocytes, macrophages and multinucleated giant cells. *J Immunol Meth*; 56:261
127. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248
128. Rossi F, Zabucchi G, Dri P, Bellavite P, Berton G. 1980. O_2^- and H_2O_2 production during the respiratory burst in alveolar macrophages. In: Escobar ME, Friedman H (eds). *Advances in experimental medicine and biology*. Vol 121A, pp 53-74. New York: Plenum Press
129. Espevik T, Nissen-Meyer J. 1986. Highly sensitive line, WEHI-164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Meth*; 95:99
130. Migliorini P, Corradin G, Corradin SB. 1991. Macrophage NO_2^- production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ . *J Immunol Meth*; 139:107
131. Bolscher BGJM, Plat H, Wever R. 1984. Some properties of human eosinophil peroxidase: a comparison with other peroxidases. *Biochim Biophys Acta*; 784:177
132. Carlson MGCh, Peterson CGB, Venge P. 1985. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J Immunol*; 134:1875
133. Ackerman SJ, Loegering DA, Venge P, Olsson I, Harley JB, Fauci AS, Gleich GK. 1983. Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule: major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin. *J Immunol*; 131:2977
134. Baron P, Costantin G, D'Andrea GA, Ponzin D, Scarpin E, Scarlato G, Trinchieri, Rossi F, Cassatella MA. 1993. Production of tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines by human mononuclear phagocytes stimulated with myelin P2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4414
135. Nakagawara A, Nathan CF, Cohn ZA. 1981. Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *J Clin Invest*; 68:1243
136. Davies DE, Lloyd JB. 1989. Monocyte-to-macrophage transition in vitro. *J Immunol Meth*; 118:9

137. Musson RA. 1983. Human serum induces maturation of human monocytes *in vitro*. *Am J Pathol*; 111:331
138. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. 1983. Identification of interferon γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*; 158:670
139. Pabst MJ, Johnston RB Jr. 1980. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed *in vitro* to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med*; 151:101
140. Hovi T, Lehto VP, Virtanen I. 1985. Interferon affects the formation of adhesion plaques in human monocyte cultures. *Exp Cell Res*; 159:305
141. Venge P, Dahl R, Peterson CGB. 1988. Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effect of anti-asthmatic medication. *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 87:306
142. Dobrina A, Menegazzi R, Carlos TM, Nardon E, Cramer R, Zacchi T, Harlan JM, Patriarca P. 1991. Mechanism of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest*; 88: 20
143. Cramer R, Soranzo MR, Dri P, Rottini GD, Bramezza M, Cirielli S, Patriarca P. 1982. Incidence of myeloperoxidase deficiency in an area of northern Italy: histochemical, biochemical and functional studies. *Br J Haematol*; 51:81
144. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*; 167:1358
145. Stuehr DJ, Marletta MA. 1989. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J Immunol*; 139:518-
146. Chantry D, Turner M, Brennan, Kingsbury A, Feldman M. 1990. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocyte. *Cytokine*; 2:60
147. Lefkowitz DL, Mills KC, Moguilevsky N, Bollen A, Vaz A, Lefkowitz SS. 1993. regulation of macrophage function by human recombinant myeloperoxidase. *Immunol Lett*; 36:43
148. Moguilevsky N, Garcia-Quintana L, Jacquet A, Tournay C, Fabry L, Pierard L, Bollen A. 1991. Structural and biological properties of human recombinant myeloperoxidase produced by Chinese hamster ovary cell lines. *Eur J Biochem*; 197:605
149. Lefkowitz DL, Mone J, Mills K, Hsieh TC, Lefkowitz SS. 1989. Peroxidases enhance macrophage-mediated cytotoxicity via induction of tumor necrosis factor. *PSEBM*; 190:144
150. Leher RI. 1969. Antifungal effects of peroxidase system. *J Bacteriol*; 99:361
151. Dentener MA, Bazil V, von Asmuth EJU, Ceska M, Buurman WA. 1993. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*; 150:2885
152. Nakajima H, Loegering DA, Gleich FJ. 1988. Cytotoxicity of eosinophil granule proteins for tumor cell. *Faseb J*; 2:A811

153. Senior RN, Campbell EJ. 1983. In: Clinics in laboratory medicine - Symposium on tissue immunopathology, p. 465
154. Bennet RM, Merrit MM, Gabor G. 1986. Lactoferrin bind to neutrophilic membrane DNA. *Brit J Haematol*; 63:105
155. Campbell EG. 1982. Human leukocyte elastase, cathepsin G, and lactoferrin: family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79:6941