

INTERAZIONE TRA MACROFAGI PERITONEALI DI CAVIA ED E.COLI IN VITRO

G.D. Rottini, G. Zabucchi, P. Bellavite, P. Dri e P. Patriarca
Istituto di Microbiologia ed Istituto di Patologia Generale della
Università di Trieste.

Abbiamo recentemente dimostrato, nel corso di ricerche sulla patogenicità di E. coli, che ceppi con normale sintesi del polisaccaride di superficie non vengono fagocitati in vitro dai leucociti polimorfonucleati (PMN) e non inducono in queste cellule l'attivazione del metabolismo ossidativo che normalmente si accompagna alle fasi più precoci del processo di endocitosi (1, 6). Ceppi derivati da E. coli K-12 o privati del loro polisaccaride superficiale (trattandoli a 100° per 60' o coltivandoli a 45°) vengono facilmente fagocitati ed inducono una normale risposta metabolica nei PMN. Aggiungendo al sistema batteri+PMN il polisaccaride estratto da ceppi non fagocitabili, la resistenza alla fagocitosi viene ripristinata e la stimolazione metabolica inibita (1).

Con questa ricerca si è voluto valutare il comportamento in vitro dell'altro tipo di fagocita professionale, il macrofago, saggiato con il ceppo di E. coli J53 facilmente fagocitabile dai PMN, e con un ceppo non fagocitabile, O111:K58. Si è voluto inoltre saggiare l'attività antifagocitaria esplicita sui macrofagi peritoneali di cavia (MP) del polisaccaride (PS) estratto da un ceppo di E. coli K+ (O44:K74) e da un ceppo K- (O111:K58).

Materiale e metodi.

E. coli: i ceppi J53, O111:K58 e O44:K74 provengono dalla collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Trieste.

Macrofagi peritoneali di cavia: le cavie sono state iniettate sterilmente per via endoperitoneale con 15 ml di caseina 1.2% in NaCl 0.9% cinque giorni prima dell'esperimento. Le cellule sono state prelevate per paracentesi dopo iniezione endoperitoneale di 50 ml di salina, con lavaggio ripetuto per 2-3 volte. Il liquido peritoneale è stato centrifugato a 400 x g per 10 min a 0° ed il pellet è stato risospeso in salina ipotonica, NaCl 0.2%, per lisare le emazie contaminanti. Dopo 1-2 min il liquido di sospensione è stato riportato a concentrazione isotonica con l'aggiunta di un volume appropriato di NaCl 1.2%. Dopo ulteriore centrifugazione a 400 x g le cellule sono state risospese alla concentrazione voluta in tampone Krebs-Ringer-fosfati (KRP), 0.5 mM Ca⁺⁺, 0.2 mM glucosio. Per ogni esperimento è stata impiegata una sospensione di cellule pari a 80-90% di mononucleati (MP).

Polisaccaride: è stato estratto dai ceppi di E. coli O44:K74 e O111:K58, secondo la metodica precedentemente descritta (1): estrazione con calore in salina, digestione con RNAsi, ultracentrifugazione ed estrazione fenolica. L'assenza di RNA e di proteine è stata controllata con lo spettro di assorbimento in UV.

Determinazione dell'attività fagocitaria e batterica: è stato segui

to essenzialmente lo schema di McRipley e Sbarra, descritto in un precedente lavoro (2, 6) impiegando i MP al posto dei PMN. Stimolazione metabolica dei MP: lo stimolo metabolico indotto è stato valutato attraverso la misurazione del consumo di ossigeno da parte dei MP stimolati dai batteri. E' stato impiegato il metodo polarografico con l'elettrodo di Clark, secondo la metodica precedentemente descritta (6). Negli esperimenti sono stati impiegati 2×10^7 MP e 6×10^8 batteri (ratio 1:30). Prima dei batteri è stato aggiunto al medium di saggio (KRP, 5 mM Ca^{++} , 0.2 mM glucosio) KCN 0.5 mM, in modo da ridurre la respirazione batterica senza interferire significativamente con la risposta metabolica dei MP (5). Il PS è stato aggiunto alla sospensione di MP prima di iniziare la registrazione del consumo di ossigeno, i batteri sono stati aggiunti 3 min dopo.

Influenza del PS sulla fagocitosi: i MP hanno la capacità di fagocitare emazie di montone non pretrattate, che possono essere rivestite con il polisaccaride "libero", non legato nel complesso LPS, di E.coli. Quale indice dell'inibizione della fagocitosi è stato valutato il rapporto tra la fagocitosi di emazie rivestite con PS e quella di emazie non rivestite. Le emazie sono state rivestite con PS incubando per 30 min a 37° una sospensione di emazie al 5% in KRP con pari volume di estratto dei ceppi 044:K74 e 0111:K58. Dopo l'incubazione le emazie sono state lavate tre volte e risospese in KRP, 1 mM glucosio. Tubi di Leighton contenenti un vetrino coprioggetti sono stati caricati con 0.5 ml di sospensione di MP (10^7) in KRP, Ca^{++} , glucosio e con 50 μ l di sospensione di emazie 2.5% rivestite e non con il PS. Dopo 30 min di incubazione a 37° in posizione orizzontale, i vetrini coprioggetti, sui quali i MP si depositano sino a formare uno strato monocellulare, sono stati lavati dolcemente con KRP, fissati con metanolo e colorati con il Giemsa. Per ogni esperimento sono stati contattati in duplicato circa 250 MP, controllando la presenza o l'assenza di emazie fagocitate. Il rivestimento delle emazie è stato controllato in emoaagglutinazione passiva, impiegando sieri omologhi anti-OK Behringwerke, Marburg/Lahn, RFT.

Risultati.

La figura 1-A dimostra che il ceppo J53 viene ucciso dai MP, mentre il ceppo 0111:K58 è virtualmente insensibile all'attività battericida dei MP. I dati sull'attività fagocitaria (figura 1-B) risolvono il problema se la mancata uccisione del ceppo 0111:K58 rifletta una impedita ingestione oppure una resistenza alla uccisione intracellulare. Per il ceppo 0111:K58 praticamente la totalità dei batteri vivi si trova libera nel surnatante al termine del periodo di incubazione, mentre solo una minima percentuale (0.2%) è associata alle cellule. Per il ceppo J53 il 37% dei batteri sopravvissuti è associato ai MP. Pertanto la mancata uccisione del ceppo 0111:K58 riflette una mancata ingestione.

E' noto che anche nei MP, come nei PMN, il processo di fagocitosi è accompagnato sin dalle sue fasi più precoci da una serie di modificazioni del metabolismo ossidativo, tra cui un aumentato consumo di ossigeno (5). La tabella 1 mostra come la stimolazione del consumo di ossigeno da parte dei MP ripeta il risultato delle conte vitali. Il ceppo J53, che viene fagocitato, stimola la respirazione dei MP, mentre il ceppo 0111:K58 non provoca alcuna stimo-

lazione. Quest'ultimo ceppo, privato del PS con trattamento a 100° per 60 min, acquista la capacità di stimolare metabolicamente i MP. Il PS purificato, estratto da ceppi resistenti alla fagocitosi, inibisce il consumo di ossigeno indotto nei MP da E.coli J53 e O111:K58 trattati con calore. Impiegando il ceppo J53 vivo si osserva una inibizione significativamente inferiore (figura 2). L'azione antifagocitaria del PS è confermata dai dati riportati nella tabella 2. La fagocitosi di emazie rivestite con estratto polisaccaridico di ceppi di E.coli non fagocitabili è ridotta del 47,4-72,5% rispetto al controllo.

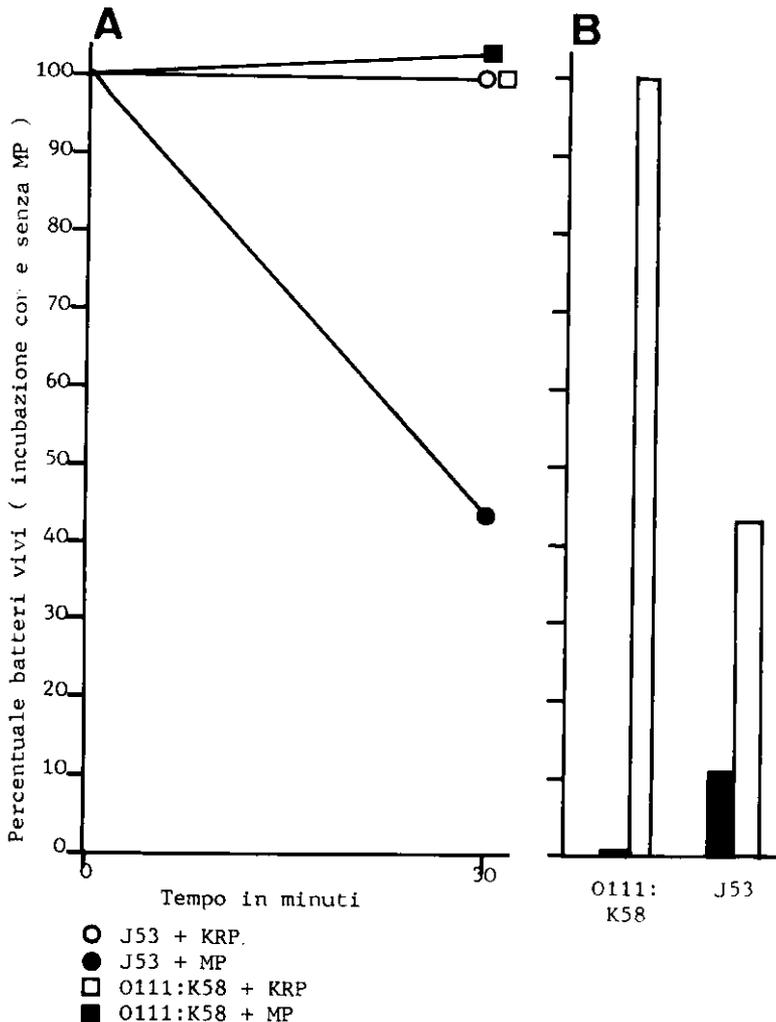


Figura 1 - A : conte vitali dei ceppi O111:K58 e J53 incubati con e senza macrofagi peritoneali di cavia (valori medi di 4 esperimenti). B : attività fagocitaria dei MP. Ogni colonna rappresenta la percentuale di batteri presenti nel surnatante (colonna chiara) e nel pellet (colonna scura) (valori medi di 2 esperimenti).

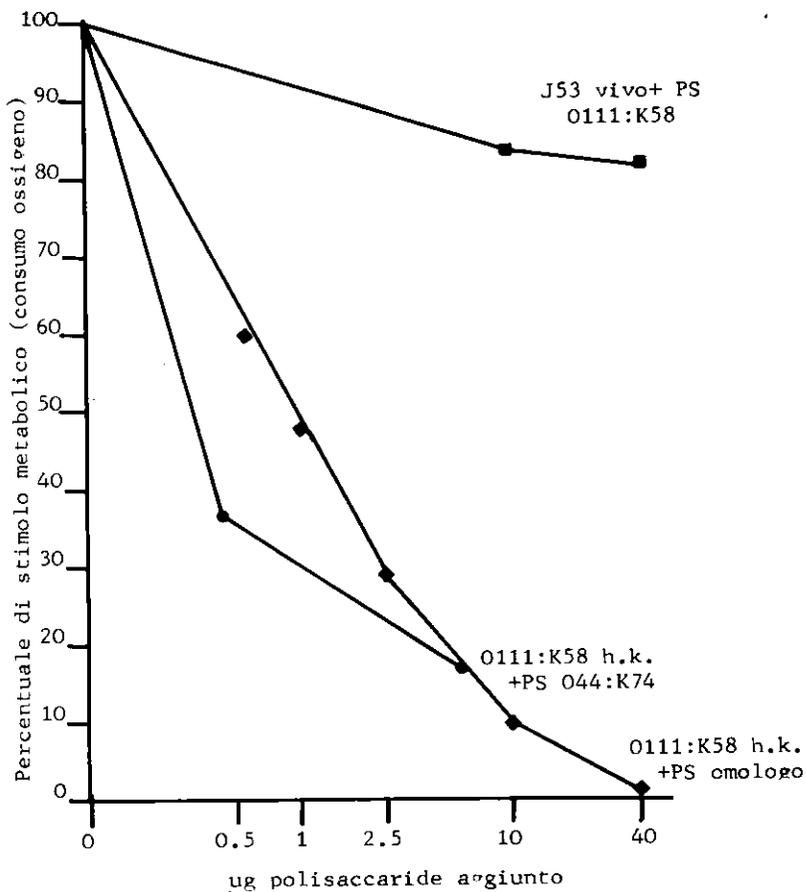


Figura 2 - Effetto del polisaccaride estratto da E.coli 0111:K58 e 044:74 sulla stimolazione metabolica indotta nei macrofagi peritoneali di cavia da E.coli J53 vivo e da E.coli 0111:K58 trattato con calore (h.k.).

C a m p i o n e	nanoatomi ossigeno minuto/2x10 ⁷ MP	differenza [♠]
MP da soli	40.4	-
J53 da solo	24.0	-
MP + J53	105.3	+ 40.9
O111:K58 vivo da solo	21.3	-
MP + O111:K58 vivo	61.5	0
O111:K58 h.k.°	0	-
MP + O111:K58 h.k.°	92.1	+ 51.7

Tabella 1 - Risposta metabolica, espressa quale consumo di ossigeno, di macrofagi peritoneali di cavia (MP) esposti a ceppi fagocitabili e non fagocitabili di E.coli.

° = trattati a 100° per 60 min

♠ = consumo di ossigeno dei MP stimolati, sottratti i valori del consumo di ossigeno dei MP e dei batteri da soli.

R e a z i o n e	n° MP contati	numero MP con emazie	MP senza emazie	% MP fago citanti emazie	% inibi- zione fa- gocitosi
MP + emazie non rivestite con PS	256	104	152	40.7 %	-
MP + emazie rive- stite PS O44:K74	257	55	202	21.4 %	- 47.4 %
MP + emazie rive- stite PS O111:K58	249	28	221	11.2 %	- 72.5 %

Tabella 2 - Inibizione della fagocitosi di emazie di montone da parte del PS estratto da ceppi non fagocitabili di E.coli. I valori esprimono la media di due esperimenti.

Discussione.

I dati riportati dimostrano l'esistenza di ceppi di E. coli resistenti alla fagocitosi ed all'azione battericida dei macrofagi peritoneali. Come precedentemente descritto per i PMN (1,6,7), il ceppo J53, sensibile alla fagocitosi da PMN, induce nei MP un aumento del consumo di ossigeno KCN-insensibile, assente nella interazione tra MP e il ceppo non fagocitabile O111:K58. I risultati depongono per una mancata uccisione del ceppo fagocitosi-insensibile legata al blocco delle fasi più precoci del processo di endocitosi, come risulta sia dall'assenza di batteri associati alle cellule dopo incubazione (figura 1-B), sia dall'assenza di stimolazione metabolica. Questi dati sono in accordo con quelli di Steibigel et al. (8) su monociti umani. L'inibizione della fagocitosi e della stimolazione metabolica nei MP è correlata all'attività biologica del PS di superficie: i) il ceppo J53, fagocitabile e capace di indurre lo stimolo metabolico, è un derivato da K-12 che non ha la capacità di sintetizzare normali catene polisaccaridiche dell'outer layer (7); ii) il ceppo O111:K58, resistente alla fagocitosi da MP, induce una stimolazione respiratoria efficiente soltanto dopo essere

stato privato con calore del suo polisaccaride di superficie; iii) il PS estratto da ceppi resistenti alla fagocitosi inibisce la stimolazione respiratoria indotta nei MP dal ceppo O111:K58 trattato con calore; iiii) la fagocitosi di emazie di montone viene significativamente ridotta rivestendo le emazie con PS. Similmente a quanto osservato nell'interazione tra E.coli e PMN, il PS inibisce scarsamente lo stimolo indotto nei MP dal ceppo fagocitabile J53 vivo. E' presumibile che l'adesione del PS sulla superficie batterica (1) avvenga con maggiore facilità quando il ceppo sia stato privato con calore del proprio PS, rispetto ad un ceppo con le proprie strutture di superficie integre.

Appare quindi evidente che i macrofagi peritoneali hanno un comportamento sovrapponibile a quello dei polimorfonucleati per quanto concerne la fagocitosi di E.coli, anche in rapporto all'importanza del polisaccaride di superficie quale fattore antifagocitario. Medearis et al. (3) avevano osservato in vivo che un mutante di E.coli O111:K58, deficitario nella sintesi del PS di superficie, veniva fagocitato dai MP con maggiore efficienza rispetto al ceppo parentale. I nostri dati confermano in vitro l'attività antifagocitaria del PS, rimanendo ancora un problema aperto se questa azione sia legata alla presenza di una specifica unità oligosaccaridica o piuttosto alla struttura completa della molecola stessa.

Riassunto.

E. coli O111:K58 è insensibile all'attività fagocitaria e battericida dei macrofagi peritoneali di cavia e non stimola, in queste cellule, l'incremento del consumo di ossigeno che accompagna, sin dalle fasi più precoci, il processo di endocitosi. E. coli J53 viene facilmente fagocitato ed ucciso e stimola metabolicamente i fagociti. Il ceppo O111:K58, privato con calore del suo polisaccaride di superficie, induce uno stimolo metabolico efficiente, indice di attività fagocitaria in atto. L'aggiunta di polisaccaride estratto da ceppi di E. coli non fagocitabili, sia K^+ che K^- , al sistema batteri + macrofagi inibisce la stimolazione metabolica e, presumibilmente, la fagocitosi. Emazie di montone rivestite con i polisaccaridi estratti vengono fagocitate dai macrofagi in percentuale dal 47 al 72% inferiore rispetto ai controlli. Nell'interazione in vitro tra E. coli e macrofagi peritoneali i risultati depongono per un comportamento sovrapponibile a quanto da noi osservato impiegando l'altro tipo di fagocita professionale, il polimorfonucleato.

Summary.

E. coli O111:K58 withstand phagocytic killing by guinea pig peritoneal macrophages and do not induce in these cells the regular respiratory burst that accompanies phagocytosis. E. coli J53 is rapidly killed by macrophages and greatly stimulates their respiration. Macrophages exposed to E. coli O111:K58 that have heated to 60°C for 60 min do exhibit a respiratory burst, suggesting that they phagocytose heat treated E. coli O111:K58. Addition of the purified polysaccharide, extracted from either K^+ or K^- non phagocytosable E. coli, to a mixture of macrophages and phagocytosable E. coli inhibits the respiratory burst, suggesting

that E. coli are not phagocytosed any more under these conditions. The rate of phagocytosis by macrophages of sheep red blood cells coated with the purified polysaccharide, extracted from either K⁺ or K⁻ non phagocytosable E. coli; is reduced by 47-72% as compared with that of uncoated erythrocytes. The results indicate that the surface polysaccharide of E. coli inhibits phagocytosis of different kinds of particles by macrophages.

Bibliografia.

- 1) DRI, P., ROTTINI G.D., BELLAVITE P., PATRIARCA P. Antiphagocytic activity of the cell-wall polysaccharide of E. coli. 7th Intern. Cong. R.E.S., Pamplona, 15-20 Sept. 1975.
- 2) McRIPLEY, R.J., SBARRA A.J. Role of the phagocyte in host-parasite interaction. XI. Relationship between stimulated oxidative metabolism and hydrogen peroxide formation and intracellular killing. J. Bacteriol. 94, 1417-1424, 1967.
- 3) MEDEARIS, D.N., CAMITTA B.M., HEATH E.C. Cell-wall composition and virulence in Escherichia coli. J. Exp. Med. 128, 399-414, 1968.
- 4) NETER, E., BERTRAM L.F., ZAK D.A., MURDOCK M.R., ARBESMAN C.E. Studies on haemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera. J. Exp. Med. 96, 1-15, 1952.
- 5) ROMEO D., ZABUCCHI G., MARZI T., ROSSI F. Kinetic and enzymatic features of metabolic stimulation of alveolar and peritoneal macrophages challenged with bacteria. Exptl. Cell Res. 78, 423-432, 1973
- 6) ROTTINI, G.D., DRI P., SORANZO M.R., PATRIARCA P.L. Correlation between phagocytic activity and metabolic response of polymorphonuclear leukocytes toward different strains of Escherichia coli. Infect. Immun. 11, 417-423, 1975
- 7) SCHMIDT, G.S. Genetical studies on the lipopolysaccharide structure of Escherichia coli K-12. J. Gen. Microbiol. 77, 151-160, 1973
- 8) STEIGBIGEL, R.T., LAMBERT jr. L.H., REMINGTON J.S. Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. J. Clin. Invest. 53, 131-142, 1974.