

Risposte funzionali dei neutrofili e loro regolazioni
in vivo e in vitro

P. BELLAVITE, M. SCHINELLA, G. ANDRIOLI, G. LIPPI, S. LUSSIGNOLI, A. CARLETTO, U. LIPPI

Estratto da

MEDICINA DI LABORATORIO

Vol. 2, N. 3, 1994

Rassegna

Risposte funzionali dei neutrofili e loro regolazione *in vivo* e *in vitro*

P. BELLAVITE^a, M. SCHINELLA^b, G. ANDRIOLI^a, G. LIPPI^a, S. LUSSIGNOLI^c, A. CARLETTO^d, U. LIPPI^b

Riassunto I granulociti neutrofili sono cellule dotate di un ampio armamentario costituito sia da enzimi e altre sostanze che vengono rilasciate nel processo di esocitosi, sia da molteplici sistemi biochimici e metabolici attivabili, che servono alle difese dell'organismo ma che possono anche entrare nella eziopatogenesi delle patologie infiammatorie. Vengono qui passate in rassegna brevemente le principali risposte funzionali dei neutrofili, le proprietà dei recettori ed i sistemi di trasduzione del segnale attivatorio o inibitorio, frutto di recenti ricerche effettuate nei nostri ed in altri laboratori. È a questi livelli che si può effettuare la regolazione delle risposte dei neu-

trofili a determinati agenti particolati o solubili, esogeni o endogeni, con cui essi vengono a contatto. Tale regolazione può consistere non solo nella messa in moto dei ben noti fenomeni della aggregazione, esocitosi, esplosione metabolica e killing dei batteri, ma anche in modificazioni più fini e sofisticate della responsività della cellula, in dipendenza di sinergismi, antagonismi, pre-attivazioni ("priming") e fenomeni di de-sensibilizzazione. Vengono qui riportati molti esempi di condizioni in cui la modulazione delle risposte dei neutrofili è stata osservata su modelli *in vitro* o in varie situazioni fisiopatologiche *in vivo*. (*Med Lab* 1994;2:192-206).

Introduzione

I granulociti neutrofili, la più ampia popolazione di leucociti del sangue, rappresentano degli "arsenali mobili", impiegati nella prima linea di difesa dalle infezioni. Essi sono dotati, come è ben noto, di molti composti preformati o sistemi enzimatici attivabili e di una complessa serie di apparati strutturali e biochimici che li rendono in grado di migrare dal sangue nei tessuti e di svolgere molte funzioni nell'ambito dei processi di difesa e dell'infiammazione in generale. Difettoso funzionamento o eccessiva attivazione di tali apparati divengono elemento patogenetico in un'ampia serie di malattie consi-

stenti da una parte in una aumentata suscettibilità alle infezioni (soprattutto di natura batterica), dall'altra in un aumentato rischio e gravità di fenomeni autoaggressivi localizzati o sistemici. In questa breve rassegna si prenderanno in esame i principali aspetti della funzione dei neutrofili, soffermandosi quindi in particolare sulle più recenti acquisizioni relative alla loro regolazione.

Dovendo rimanere necessariamente nell'ambito di una sintetica rassegna delle più recenti acquisizioni in questo campo, si prendono in considerazione solo alcuni aspetti di rilevante interesse riguardanti i recettori, i sistemi di trasduzione ed alcuni significativi meccanismi effettori della funzione dei neutrofili.

Recettori

Il primo aspetto della funzione e della regolazione del neutrofilo che conviene considerare riguarda i recettori di membrana, sensibili ai molteplici segnali che possono cogliere il neutrofilo nel sangue o nell'interstizio dei tessuti connettivi. Un elenco provvisorio di tali recettori è presentato in tabella I.

^a Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Università degli Studi, Verona

^b Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale Civile Maggiore, Verona

^c Istituto di Farmacologia, Università degli Studi, Verona

^d Istituto di Patologia Medica, Università degli Studi, Verona

Corrispondenza a: Prof. U. Lippi, Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Ospedale Civile Maggiore, Piazzale Stefani 1, 37126 Verona

Lavoro giunto in Redazione il 27-06-1994

Tabella I. Alcuni tipici composti aventi specifici recettori sui neutrofili.

PRODOTTI BATTERICI
Formilpeptidi
Muramili dipeptidi (peptidoglicano)
Endotossine (LPS)
Glicoproteine con mannosio/fucosio
CITOCHINE
Interleuchina-1
Interleuchina-8
Interferone- γ
Tumor-necrosis factor- α
Platelet-derived growth factor
Granulocyte colony-stimulating factor
Granuloc.-macrof. colony-stimulating factor
IMMUNOGLOBULINE E COMPLEMENTO
Ig monomeriche (rec.: FcI)
Ig aggregate e Immunocomplessi (rec.: FcII e FcIII)
C3b (rec.: CR1)
C3bi (CR3)
C5a
C567
LIPIDI E DERIVATI
Acido arachidonico
Leucotrieni C ₄ , B ₄ , D ₄
Acido idrossieicosatetraenoico
Platelet-activating factor
Esteri del forbolo (rec.: protein chinasi C)
PROTEINE DI ADESIONE
Fibrinogeno, Fibronectina, Fattore X, C3bi, ICAM, ecc...
(rec.: integrine CD11a,b,c/CD18)
Glicoproteine sialilate (rec.: L-selectine)
Endothelial-leukocyte adhesion molecule
(rec.: sialyl-Lewis-X)
Ac. ialuronico (rec.: CD44)
ALTRE SOSTANZE REGOLATRICI
Adenosina (rec.: purinergici A1 e A2)
ATP
Agonisti beta-adrenergici
Oppioidi
Sostanza P
Bradichinina

Come si vede, essi comprendono recettori per proteine e peptidi solubili, per composti derivati dal metabolismo lipidico, per componenti glucidiche e glicoproteiche delle superfici batteriche, per strutture filamentose del connettivo, per lectine. Uno dei recettori più studiati e più conosciuti è quello per il tripeptide n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), un agente chemoattrattante derivato dalle pareti batteriche¹, ma anche presente in proteine mitocondriali². Il recettore per l'fMLP fa parte di una famiglia di recettori, caratterizzati per avere una struttura fatta da sette segmenti transmembrana, che comprende anche i recettori per il C5a, per IL-8, per il PAF, oltre che il classico recettore beta-adrenergico e la batteriorodopsina³. Gli studi sulla struttura di tale recettore hanno costituito uno dei filoni di ricerca più fecondi nel rivelare il modo con cui l'intensità delle sensibilità cellulari viene controllata.

Un altro gruppo interessante di recettori di mem-

brana caratterizzati molto recentemente è rappresentato dalle proteine di adesione. Esse rappresentano, per lo più, non solo un sito di ancoraggio della cellula con altre cellule (vedi endoteli o piastrine), ma anche un sistema di "informazione" che manda segnali centripeti attraverso le strutture del citoscheletro. Le risposte di cellule adese sono in genere molto diverse come qualità e intensità rispetto alle risposte di cellule in sospensione, proprio perché l'adesione stessa rappresenta un co-segnale che sinergizza o antagonizza altri segnali che impegnano altri recettori. Ad esempio, è noto che il *tumor-necrosis-factor* (TNF) è capace di attivare il metabolismo dei neutrofili solo se essi sono aderenti e non se sono in sospensione.

Una caratteristica importante dei recettori è che essi possono essere variati in quantità (*up-/down-regulation*) e in funzionalità (cambiamento di affinità per il ligando, inattivazione, *uncoupling*)⁴. Ciò fa parte di tutta quella serie di modificazioni che controllano la sensibilità delle cellule a diversi fattori nel corso delle varie situazioni fisiopatologiche. È noto che molti tipi di recettori di membrana possono aumentare di numero molto rapidamente (pochi secondi): ciò è dovuto al fatto che nei granuli specifici o secondari vi è un "pool di riserva" di recettori che può essere portato alla membrana col processo di esocitosi, fenomeno che richiede un basso livello di attivazione cellulare. Utilizzando il modello della finestra cutanea è stato visto che lo stesso fatto di passare dal sangue all'essudato extravascolare (in questo caso si tratta di un essudato sterile) induce un aumento dei recettori per l'fMLP e un profondo riarrangiamento delle sensibilità recettoriali per vari agonisti^{5,6}. La responsività all'fMLP aumenta, come anche aumenta la quantità di recettori esposti, mentre cala la responsività al TNF e rimane invariata quella alla concanavalina A e al forbol-miristato acetato (PMA).

In un recente lavoro abbiamo osservato che la espressione delle molecole di adesione sulla membrana leucocitaria richiede un processo a due stadi, consistenti in aumento quantitativo e aumento di funzionalità delle molecole. Infatti, un trattamento con basse dosi di fMLP causa un aumento quantitativo delle integrine (recettori per molecole di adesione inter-cellulare, ICAM), ma queste nuove molecole non sono ancora funzionali, richiedendo per funzionare un secondo segnale, innescato da dosi molto più alte di agonista o da ester del forbolo⁷.

Meccanismo di attivazione

Il meccanismo di attivazione del neutrofilo è studiato attivamente in molti laboratori. Esso coinvolge una complessa serie di eventi intracellulari disposti in sequenze che partono dai recettori e termi-

nano negli enzimi effettori (es. NADPH ossidasi) o in apparati meccanici (es. microtubuli e microfilamenti) che attuano il movimento, o in fattori di controllo nucleari che, a livello del nucleo, attivano la trascrizione di specifici geni. Nel loro insieme, questi eventi vanno sotto il nome di sistemi di trasduzione. La loro importanza è grande perché garantiscono non solo la trasmissione del segnale dall'esterno all'interno della cellula, ma anche la sua *regolazione* e il suo *"smistamento"*, la sua *selettività*. La regolazione è quel processo per cui le risposte funzionali dipendono non solo dalla quantità di un singolo stimolante, ma anche dall'omeostasi generale della cellula: ad esempio, la cellula è in grado di regolare la *durata* della attivazione, mediante sistemi di feed-back su alcuni passaggi della trasduzione, e l'*intensità* della attivazione, in dipendenza di segnali co-stimolatori o antagonisti provenienti sia da altri recettori che da precedenti modificazioni della sensibilità cellulare, in altre parole dalla sua "storia".

La selettività delle risposte è quel fenomeno per cui uno stesso recettore è in grado di mettere in moto diverse risposte, ma non necessariamente tutte simultaneamente, per cui il segnale viene indirizzato preferenzialmente verso una funzione, o un certo gruppo di geni, piuttosto che verso altri. D'altra parte, è possibile che diversi segnali, coinvolgenti recettori tra loro completamente diversi e indipendenti, "convercano" verso l'attivazione di uno o pochi meccanismi effettori finali. Anche questa convergenza è garantita dai sistemi di trasduzione.

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

Non per tutti i recettori e non per tutti i momenti della vita cellulare sono implicati necessariamente tutti e gli stessi sistemi di trasduzione, in quanto alcuni passaggi possono essere by-passati in particolari condizioni sperimentali. Ad esempio, due elementi del processo di trasduzione paiono avere un'importanza cruciale secondo la maggior parte degli studi: l'aumento di calcio intracellulare

($[Ca^{2+}]_i$) e l'attivazione della protein chinasi C. Tuttavia, esistono anche vari modelli sperimentali che mostrano come sia possibile attivare pienamente i leucociti anche in virtuale assenza di calcio e che inibitori della protein chinasi C non inibiscono il *"burst"* metabolico da parte di alcuni agonisti.

La sequenza di trasduzione della attivazione dei neutrofili concorda fondamentalmente con quella messa in luce negli ultimi 10 anni dalla biologia cellulare su un gran numero di cellule attivate da agonisti. La via classica di attivazione potrebbe essere proposta, in modo semplificato, come segue:

a. Legame di un agonista che si lega al recettore di membrana e lo attiva, nel senso che cambia la sua conformazione così da trasmettere un segnale in forma di modificazione biofisica della proteina dal lato esterno a quello interno della membrana (si è visto che l'attivazione deve essere sostenuta da un legame ripetuto continuamente nel tempo (*"ongoing interaction"*)).

b. Il recettore attivato interagisce con una proteina legante il GTP (G-proteina del tipo G_{i2a}), la quale a sua volta si dissocia in varie subunità, di cui una (alfa), dotata di attività GTPasica, va ad interagire con enzimi che formano secondi messaggeri.

c. La G-proteina va ad attivare una fosfolipasi di tipo C, specifica per il fosfatidilinositolo. I prodotti di scissione del fosfatidilinositolo sono l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3), che agisce come messaggero della liberazione di calcio dai depositi intracellulari (legandosi a un recettore disposto su organelli detti calciosomi), e il diacilglicerolo, che agisce a livello di membrana come un fattore attivante la protein chinasi C.

d. La protein chinasi C (PKC) si trasloca dal citosol alla membrana plasmatica e fosforila una serie di proteine di membrana e citosoliche⁸⁻¹¹. È possibile raggiungere la protein chinasi C direttamente, saltando tutti i passaggi precedenti, con l'uso di suoi specifici attivatori permeabili alla membrana, che sono gli esteri del forbolo (di cui il più noto ed usato è il PMA), agenti che hanno dato quindi un impulso fondamentale alla definizione del ruolo giocato dalla fosforilazione delle proteine nel neutrofilo. La fosforilazione di proteine contribuisce, mediante l'introduzione di gruppi fosfato su residui serinici, treoninici o tirosinici, al cambiamento di attività di enzimi, al cambiamento di legame con i substrati, al cambiamento di distribuzione intracellulare di specifiche molecole.

e. La fosforilazione di alcune specifiche proteine, grazie ai drastici cambiamenti delle loro proprietà elettrico-conformazionali, promuove le risposte effettrici finali, tra cui si possono citare le seguenti: a) alcune componenti citosoliche della NADPH ossidasi, una volta fosforilate, si assemblano con altre componenti di membrana costituendo un complesso attivo, b) la fosforilazione della vimentina¹² e della

catena leggera della miosina¹³ sarebbe coinvolta nelle funzioni del citoscheletro e nei movimenti cellulari, c) la fosforilazione della catena beta delle integrine sarebbe coinvolta nella adesione cellulare, d) la fosforilazione di un substrato miristoilato ricco di alanina ("MARCKS") causa il distacco dei filamenti di actina dalla membrana facilitando l'esocitosi dei granuli¹⁴, e) anche componenti di membrana della NADPH ossidasi come il citocromo b₅₅₈¹⁵ e una proteina di 32 kDa¹⁶ vengono fosforilate durante la attivazione cellulare. Non bisogna infine dimenticare che la fosforilazione di fattori nucleari attivatori o inibitori controlla la trascrizione genica e quindi l'espressione di specifiche proteine.

Quello suesposto non deve essere considerato uno schema "rigido", necessario e sufficiente per la attivazione. A completare, integrare e correggere la cascata di eventi sopra elencati si devono aggiungere altri che hanno certamente grande importanza:

f. L'aumento di calcio libero intracellulare, dovuto al rilascio da depositi intracellulari e ingresso attraverso la membrana, è essenziale per le risposte innescate da fattori chemiotattici e dalla fagocitosi, ma non da esteri del forbolo, che oltrepassano le prime vie di trasduzione. Inoltre, se le cellule vengono trattate con piccole quantità di PMA o di concanavalina A (dosi sub-stimolatorie) e poi trattate con agonisti recettoriali, l'attivazione avviene anche in condizioni di deplezione totale di calcio^{17,18}.

g. L'accelerata scissione e turn-over del fosfatidilinositolo non sono gli unici cambiamenti dei lipidi di membrana connessi alla attivazione del neutrofilo. Oltre alla fosfolipasi C specifica per il fosfatidilinositolo, si attivano anche una fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina (che diventa quindi fonte ulteriore di produzione di diacilglicerolo), la fosfolipasi D (che diventa fonte di acido fosfatidico, un altro importante secondo messaggero, coinvolto probabilmente nella attivazione della NADPH ossidasi¹⁹⁻²¹), la fosfolipasi A₂ (che idrolizza fosfolipidi e 1-alkilfosfolipidi, generando acido arachidonico e 1-O-alkil-sn-glicerolo-3-fosforilcolina). Si deve infine aggiungere che dal metabolismo dell'1-O-alkil-sn-glicerolo-3-fosforilcolina si forma, per azione di una acetyl-CoA transferasi, l'1-O-alkil-2-acetyl-sn-glicerolo-3-fosforilcolina, meglio conosciuto come Platelet-activating factor (PAF).

h. La liberazione di acido arachidonico è molto importante nella attivazione del neutrofilo per due ragioni: innanzitutto perché tale acido grasso costituisce, come è ben noto, il precursore di varie famiglie di molecole importanti nella infiammazione, come gli idrossiacidi, i leucotrieni, le prostaglandine, i trombossani. Inoltre, l'acido arachidonico, indipendentemente dai suoi prodotti metabolici, è anche un attivatore "diretto" della NADPH ossidasi²²⁻²⁴. L'importanza dell'acido arachidonico di membrana risulta confermata anche da recenti dati indi-

canti che l'intensità del "burst" respiratorio in risposta a formilpeptidi è direttamente correlata alla concentrazione di acido arachidonico presente nei neutrofili²⁵ e che l'aumento di acido arachidonico nel neutrofilo, ottenuto con una dieta ricca di fosfatidilcolina di soia somministrata a volontari sani comporta un aumento della attività battericida cellulare²⁶.

i. È stato chiaramente dimostrato che l'attivazione del "burst" respiratorio da parte di agonisti recettoriali come i formilpeptidi e il C5a è molto più rapida di quella che si ottiene con il PMA²⁷, suggerendo che la via "fisiologica" non necessariamente passa attraverso la protein chinasi C, fatto poi chiaramente dimostrato dalla mancata inibizione da parte di inibitori di tale protein chinasi. Esistono quindi vie di trasduzione che non necessitano della fosforilazione di proteine e che consistono, probabilmente, in un effetto diretto delle G-proteine sui sistemi effettori del "burst" respiratorio. Ciò concorda con il fatto che è possibile attivare in un sistema "cell-free" la NADPH ossidasi e che tale attivazione non necessita di fosforilazioni ma di un fattore essenziale rappresentato da GTP o suoi analoghi. Secondo alcuni autori²⁸, la principale via di attivazione della NADPH ossidasi passa per la formazione di acido arachidonico e non per la fosforilazione di proteine.

l. Le differenti risposte funzionali del neutrofilo possono essere mediate da vie di trasduzione che, partendo da uno stesso recettore, "divergono" a un determinato punto, che può essere approssimativamente individuato con l'uso di inibitori. Ad esempio, si può riportare il fatto che: a) la tossina della pertosse inibisce tutte le risposte all'fMLP (indicando che fino a questo punto tutte le vie vanno assieme), mentre b) la deplezione di calcio inibisce il "burst" respiratorio e l'esocitosi ma non il cambiamento di forma, che non è inibito neanche da inibitori di chinasi, indicando che questo fenomeno, che avviene con l'impegno di un minimo numero (< 1%) di recettori²⁹, è mediato da un meccanismo "semplice" e prossimale al recettore; c) il trattamento con l'inibitore di protein chinasi staurosporina inibisce il "burst" ma non l'esocitosi³⁰; d) il difenilene iodonio, inibitore di flavoproteine, blocca la produzione di radicali liberi ma non l'adesione³¹; e) la adenosina, agonista di recettori purinergici A₂ che aumenta il livello di cAMP, inibisce fortemente il "burst" da fMLP ma molto meno e a dosi molto più alte la adesione da parte dello stesso agonista³¹.

m. Nella attivazione dei neutrofili sono coinvolte almeno due classi di G-proteine con attività GTPasica intrinseca: a) grossi eterotrimeri consistenti di subunità alfa (39-52 kDa), beta (35-36 kDa) e gamma (7-10 kDa) e b) piccole, monomeriche G-proteine omologhe al prodotto dell'oncogene Ras (20-30

kDa)³. Queste ultime costituiscono una famiglia un membro della quale, detto *Rap1A*, viene traslocato alla membrana durante l'attivazione³², copurifica con il citocromo *b₅₅₈* che è una componente essenziale della NADPH ossidasi³³ e viene dissociato dalla fosforilazione ad opera della PK A (fornendo quindi una plausibile spiegazione del perché l'attivazione della PK A cAMP-dipendente inibisce il "burst")³⁴. Un altro membro della superfamiglia *ras*, detto *Rac1*, è particolarmente importante nella attivazione del neutrofilo, in quanto, in associazione al fattore *rhoGDI* (*GDP-dissociation inhibitor*) rappresenta uno dei fattori citosolici della NADPH ossidasi (vedi sotto).

n. Esistono varie protein chinasi, di cui le più importanti funzioni sono la protein chinasi C (attivata da calcio e diacilglicerolo) e la protein chinasi A (attivata da cAMP). Con una estrema semplificazione, si potrebbe dire che la PK C è implicata nella trasduzione del segnale attivatore, mentre la PK A è implicata in circuiti di retroazione modulatori. Tuttavia, non si deve trascurare il fatto che una attività protein chinasi è associata direttamente a molti recettori, soprattutto a quelli dei fattori di crescita. Ovviamente, tale attività diretta, che per lo più predilige residui tirosinici, by-passa molti dei passaggi sopra delineati. È stato evidenziato recentemente che un importante evento nella trasduzione attraverso quest'ultima via è dato dalla autofosforilazione di alcuni specifici residui aminoacidici della parte carbossi-terminale del recettore. In tal modo, si rendono disponibili dei siti per il legame, al recettore stesso, di altre proteine quali il prodotto dell'oncogene *src*, le eterotrimeriche G-proteine e un enzima cui recentemente si è dato grande importanza, la fosfatidilinositol 3-fosfato chinasi, enzima che, a sua volta, sarebbe collegato alla attivazione delle piccole G-proteine come il *rac* (vedi sotto)³⁵. L'inibizione selettiva della fosfatidilinositol 3-fosfato chinasi mediante il metabolita fungino wortmannina blocca il "burst" respiratorio indotto da fMLP³⁶.

Tutte queste considerazioni portano alla conclusione che l'attivazione del neutrofilo può seguire diverse vie, un concetto già espresso sulla base di studi riguardanti la regolazione dell'enzima NADPH ossidasi³⁷⁻⁴⁰.

Sistemi effettori

L'effetto della attivazione cellulare mediato dai meccanismi sopra delineati in risposta a prodotti batterici, detriti cellulari, agenti chemiotattici, regolatori endogeni, si estrinseca secondo molte e diverse risposte funzionali (Tabella II).

Un fatto molto importante da tenere in considerazione è che tali risposte non avvengono come un

Tabella II. Risposte funzionali di neutrofili ad agonisti.

CAMBIAMENTO DI FORMA: estroflessione di lamelle, polarizzazione
AUMENTO DI VOLUME
CHEMIOCINESI E CHEMIOTASSI
ADESIONE a superfici o fibre: "rolling" (rotolamento) e "spreading" (adesione forte con appiattimento)
AGGREGAZIONE
ESOCITOSI: granuli azurofili e specifici
BURST RESPIRATORIO: rilascio di superossido (O ₂ ⁻) e derivati perossido di idrogeno (H ₂ O ₂), acido ipocloroso (HOCl), radicale idrossile (HO [•])
Produzione di OSSIDO NITRICO (NO [•]) e derivati nitrito (NO ₂), nitrato (NO ₃), perossinitrito (ONOO ⁻)
SINTESI DI CITOCHINE: IL-1, IL-1ra, IL-8, IL-12, TGFβ1, INFα, TNF
RILASCIO DI ACIDO ARACHIDONICO e derivati
SINTESI DI PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF)
SINTESI DI ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO

evento "tutto o nulla" e sono innescate in modo differenziato a seconda della concentrazione dell'agone. Una delle risposte più "precoci" (sia in senso temporale che per quanto riguarda la sensibilità alle piccole dosi di agonisti) dell'attivazione del neutrofilo riguarda la polimerizzazione dell'actina e altri cambiamenti morfologici come la polarizzazione cellulare. Un esempio delle modificazioni morfologiche connesse alla attivazione dei leucociti è riportato in figura 1. Alcuni cambiamenti di forma e di volume dei neutrofili attivati, nonché il fenomeno della aggregazione, sono interessanti anche per una considerazione pratica: abbiamo visto che esse possono essere facilmente evidenziate con strumenti di laboratorio come l'*STKS* e l'*H2*⁴¹⁻⁴⁵.

In uno screening su 91 pazienti ospedalizzati abbiamo individuato 24 pazienti, affetti da gravi patologie come sepsi, cancro, ustioni, che mostravano un aumento dello scattering nell'analizzatore *H2* (rivelato dal valore "Y-bar" uguale o superiore a 37.00 unità arbitrarie) in neutrofili di sangue periferico, indice di un aumento di volume e quindi di una attivazione *in vivo*. In nessuno di 20 soggetti sani di controllo il valore *Y-bar* era superiore a 37.00 unità arbitrarie⁴³. È interessante notare il fatto che i neutrofili pre-attivati *in vivo* sono risultati meno responsivi al trattamento *in vitro* con formilpeptidi, documentando così il fenomeno della desensibilizzazione, o de-attivazione, cellulare in casi patologici (il problema della desensibilizzazione sarà trattato anche in una sezione successiva). Sulla base di queste prime esperienze, pare quindi che il test di valutazione dello scattering dei neutrofili possa essere considerato un valido mezzo di *screening* della attivazione e della funzionalità dei neu-

trofili in corso di patologie gravi che coinvolgono le risposte sistemiche alla flogosi.

Oltre alle modificazioni morfologiche, volumetriche e citoscheletriche, altre risposte "precoci" sono

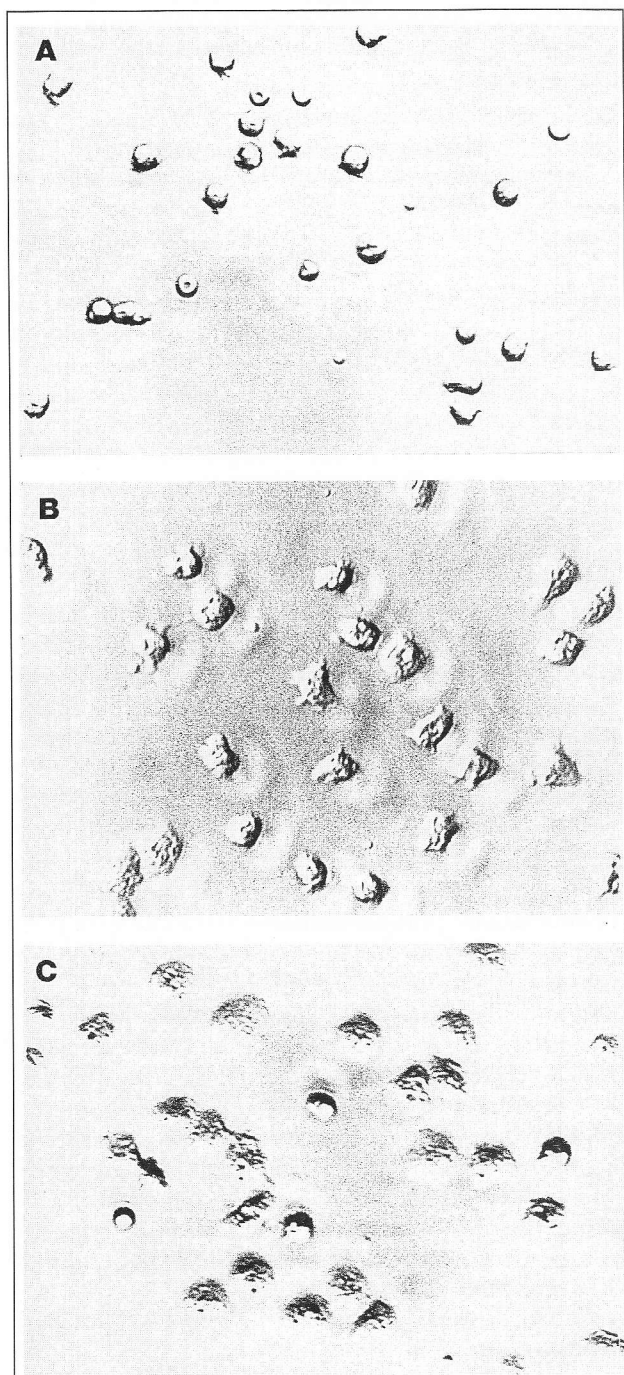


Figura 1. Immagine al microscopio a contrasto di fase di neutrofili in coltura su piastre rivestite di siero bovino fetale. A: cellule non stimolate, appaiono rotondeggianti e con poche protrusioni di membrana; B: 30 minuti dopo l'aggiunta di 5×10^{-7} M fMLP, le cellule appaiono di forma irregolare o francamente polarizzata, con molti pseudopodi; C: 30 minuti dopo l'aggiunta di 10 ng/ml PMA, le cellule appaiono con superficie rugosa e irregolare, molto appiattite per il fenomeno dello "spreading" massimale sulla superficie della piastra di coltura.

l'aumento di calcio intracellulare, la esposizione di nuovi recettori, la chemiotassi. Recenti studi hanno mostrato che basse dosi (tra 10^{-9} e 10^{-8} M) di fMLP sono in grado di attivare il cambiamento di forma e inibire l'adesione, mentre per attivare il rilascio massivo di enzimi lisosomiali, l'adesione integrine dipendente e il "burst" respiratorio sono necessarie alte dosi (tra 10^{-7} e 10^{-6} M)^{7,46-48}.

A parte i classici eventi implicati nella adesione-chemiotassi-fagocitosi-killing, dalla recente letteratura sui neutrofili emerge un dato abbastanza inatteso: contrariamente a quanto si riteneva in passato, i neutrofili sono in grado di attuare una discreta sintesi proteica ed in particolare di sintetizzare recettori per il complemento, attivatore del plasminogeno, proteine "heat-shock", fibronectina e, soprattutto, un'ampia serie di citochine. I messaggeri di tali proteine possono essere messi facilmente in evidenza nel citoplasma dei neutrofili con le moderne tecniche di biologia molecolare (Northern-blotting). Questo fatto colloca il neutrofilo in una posizione non solo di cellula effettrice nelle difese, ma anche di cellula regolatrice del processo infiammatorio e immunitario, nonché della sua possibile evoluzione verso la flogosi cronica⁴⁹. In particolare, pare importante la produzione di IL-1, IL-6 e TNF, che hanno molte funzioni, tra cui la stimolazione della produzione di proteine della fase acuta, la stimolazione dei linfociti T e B, l'induzione della espressione di proteine adesive sulle cellule endoteliali e la stimolazione della crescita e differenziazione delle cellule emopoietiche (in concerto con i colony-stimulating factors G-CSF e GM-CSF).

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

NADPH ossidasi

L'esplosione metabolica che genera la massima parte dei radicali liberi dell'ossigeno è sostenuta dalla attivazione di un enzima, la NADPH ossidasi. Secondo i modelli più recenti, l'attività della NADPH ossidasi è dovuta a un complesso multimerico che si assembla in forma di catena di trasporto di elettroni che comprende FAD ed eme, probabilmente legati a un citocromo b eterodimerico, e vari fattori di controllo (v. figura 2). Un esame particolareggiato di tutti questi fattori è fuori dagli scopi di questa rassegna, per cui ci si limita a una descrizione sintetica.

Almeno quattro componenti della NADPH ossidasi sono state caratterizzate mediante purificazione e clonaggio: esse sono la *gp91-phox*, detta anche subunità beta del citocromo b_{558} , la *p22-phox*, o subunità alfa del citocromo b_{558} , la *p47-phox* e la *p67-phox*, detti fattori citosolici di attivazione. La assoluta necessità di tali fattori per la piena funzione enzimatica è dimostrata dalla loro mancanza in specifiche varianti della malattia granulomatosa cronica (CGD), grave malattia ereditaria in cui manca proprio la produzione di radicali dell'ossigeno, e da esperimenti di ricostituzione in sistemi "cell-free" o in sistemi di trasfezione genica. Altre componenti della NADPH ossidasi, su cui ancora però non esiste consenso unanime per quanto riguarda il loro ruolo, sono proteine di 32 kDa⁵⁰⁻⁵², di 14-18 kDa^{53,54} e di 45 kDa⁵⁵.

Negli ultimi anni gli studi sulla struttura e la funzione del citocromo b_{558} si sono molto approfonditi, dimostrando che si tratta di una molecola particolarmente originale e complessa e portando, fra l'altro, alle seguenti acquisizioni: a) studi spettroscopici mostrano che il citocromo potrebbe avere più gruppi eme⁵⁶; b) il citocromo b_{558} nella subunità beta contiene una "consensus sequence" per il NADPH e siti dove potrebbe legarsi il FAD, per cui secondo alcuni tale citocromo sarebbe l'unica vera componente dotata di attività catalitica della ossidasi⁵⁷⁻⁵⁹. Tuttavia, questa conclusione non concorda totalmente con altri dati che attesterebbero la possibilità di separare flavoproteine dal citocromo b e un rapporto stechiometrico tra FAD e citocromo b molto a favore di quest'ultimo^{10,60,61} e la identificazione di altre componenti di membrana come proteine di 32 kDa che si trovano associate al citocromo b_{558} in preparazio-

ni attive⁵⁰⁻⁵² o la presenza di flavoproteine distinte dal citocromo b_{558} ; c) associata al citocromo b_{558} si trova anche una proteina di circa 21 kDa, con grosse omologie col prodotto dell'oncogene *ras*, detta *Rap1A*^{33,34}. Secondo alcuni autori, però, questa proteina non sarebbe essenziale per l'attività^{57,62}.

A seguito della stimolazione, la *p47-phox* e *p67-phox* traslocano dal citosol alla membrana e diventano parte di un complesso ossidasico associato al citoscheletro^{63,64}. Entrambe i fattori citosolici contengono domini di omologia con il prodotto dell'oncogene *src* (SH3), che paiono importanti per i segnali di mutuo riconoscimento molecolare. La traslocazione e l'interazione dei fattori citosolici con il citocromo b_{558} richiede la preventiva fosforilazione⁶⁵⁻⁶⁷. Un terzo fattore citosolico, denominato inizialmente *sigma-1*, è stato caratterizzato, usando sistemi *cell-free*, e trovato composto da due proteine di 22 e 24 kDa⁶². Si tratta di un complesso fatto da una proteina della famiglia *Rac* (*Rac1* secondo alcuni autori o *Rac2* secondo altri) con un fattore chiamato inibitore della dissociazione del GDP (*rhoGDI*), una proteina che si associa con la G-proteina *Rho*. In pratica il ruolo di queste due piccole proteine sarebbe quello di regolare la NADPH ossidasi nel modo illustrato in figura 2. È noto che le piccole G-proteine *Rap1A*, *Rac1* e *Rac2* sono isoprenilate, una importante modifica posttraslazionale che facilita l'associazione con la membrana. Tuttavia, il modello presentato in figura 2 non deve ritenersi definitivo: secondo alcuni recenti evidenze, anche la forma di *rac1* legante il GDP è in grado di attivare la NADPH ossidasi (non solo quindi quella legante il GTP, come previsto dai classici modelli delle G-proteine)⁶⁸. Inoltre, secondo altri autori, la proteina *rac* non si associa alla plasmamembrana durante l'attivazione e serve solo per trasdurre segnali di traslocazione agli altri fattori citosolici⁶⁹.

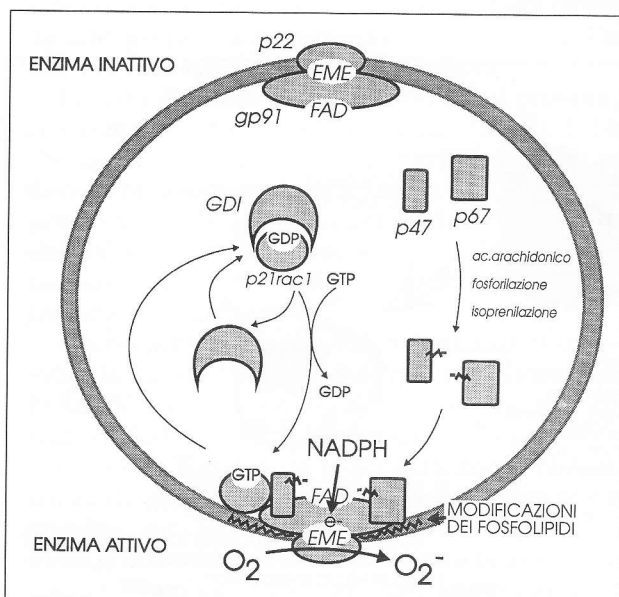


Figura 2. Schema della attivazione della NADPH ossidasi. Per le abbreviazioni e la spiegazione, vedi il testo.

Ossido nitrico sintetasi

L'ossido nitrico (NO) è una molecola regolatrice per leucociti, cellule endoteliali e muscolari dei vasi sanguigni, neuroni del sistema nervoso periferico e del cervello, che ha ricevuto negli ultimi anni molte attenzioni da parte degli studiosi in molti campi, anche per le sue potenziali ampie applicazioni farmacologiche. La formazione di NO da parte di una ben precisa reazione biochimica fu scoperta a seguito delle ricerche sull'EDRF (endothelial-derived relaxing factor), una sostanza vasodilatatrice a breve vita (secondi) prodotta dall'endotelio a contatto con acetilcolina. L'identità di EDRF e NO fu stabilita nel 1987^{70,71}.

L'ossido nitrico è prodotto dall'ossido nitrico sintetasi (NOS), un enzima monoossigenasico, contenente eme e flavoproteine, che catalizza la conversione di L-arginina e ossigeno a L-citrullina e NO.

Vi sono almeno tre distinte forme di NOS, quella neuronale, quella endoteliale e quella macrofagica. Quest'ultima, a differenza delle prime due, richiede l'attivazione della cellula da parte di lipopolisaccaride (LPS) o citochine per essere trascritta e quindi espressa. Anche se la maggior parte delle conoscenze sulla NOS fagocitaria sono state acquisite sui macrofagi, è noto che anche i neutrofili hanno questo enzima e producono ossido nitrico e che la via metabolica della NOS è completamente distinta dalla NADPH ossidasi⁷²⁻⁷⁴.

L'importanza della produzione di NO da parte dei neutrofili deriva dalle sue molteplici azioni nel campo delle difese biologiche e della regolazione dei vasi sanguigni. Innanzitutto l'ossido nitrico ha azione microbica e tumoricida⁷⁵⁻⁷⁷, sia direttamente, sia indirettamente per la sua interazione con l'anione superossido, interazione che genera perossinitriti e quindi, dalla loro decomposizione, radicale ossidrilico e radicale NO₂, specie molto più reattive dello stesso NO^{75,78}. Inoltre, la produzione di ossido nitrico da parte dei leucociti può venire ad aggiungersi a quella da parte dell'endotelio come fattore di vasodilatazione nella flogosi acuta. Infine, l'NO può rappresentare uno dei mediatori della inibizione della aggregazione piastrinica da parte dei leucociti, inibizione con ampie conseguenze fisiopatologiche nei disturbi dell'emostasi⁷⁹.

Eccessivi livelli di ossido nitrico potrebbero mediare buona parte delle patologie cardiovascolari legate ad esempio allo shock settico, che è associato alla presenza in circolo di LPS e di numerose citochine, che attivano la NOS. Inoltre, è noto che le citochine esercitano un effetto inotropo negativo sul cuore, che appare dovuto alla produzione di ossido nitrico, poiché è inibito da inibitori della NOS.

Questo effetto inotropo negativo potrebbe spiegare la depressione della contrattilità miocardica in cardiomiopatie (soprattutto virali, inclusa l'AIDS) associate all'infiammazione e in caso di danno da ischemia-riperfusion⁷⁸.

Regolazione

La regolazione della attività metabolica, secretoria e biosintetica dei neutrofili si svolge essenzialmente secondo due direttive, una che tende ad aumentare le risposte, l'altra che tende a ridurle. La prima via potrebbe essere definita secondo un termine largamente usato come "priming", in altre parole "pre-attivazione", o "sensibilizzazione"; la seconda via consiste nella perdita di responsività dovuta a molti meccanismi che vanno dalla desensibilizzazione recettoriale all'esaurimento metabolico o all'inibizione attiva. La figura 3 rappresenta in modo riassuntivo i dinamici cambiamenti della responsività dei neutrofili, che sono qui di seguito analizzati in maggiore dettaglio.

Priming

Il fenomeno del potenziamento della funzione granulocitaria da parte di sopranatanti di cellule mononucleate è noto da tempo⁸⁰, ma solo negli ultimi 10 anni se ne sono precisati molti aspetti sul piano molecolare. Molti mediatori dell'infiammazione, tra cui ad esempio il PAF, il TNF, l'LPS, la sostanza P, sono capaci di attivare il metabolismo leucocitario e la secrezione di enzimi solo a concentrazioni molto alte, mentre a concentrazioni basse agiscono come chemoattrattanti o provocano un

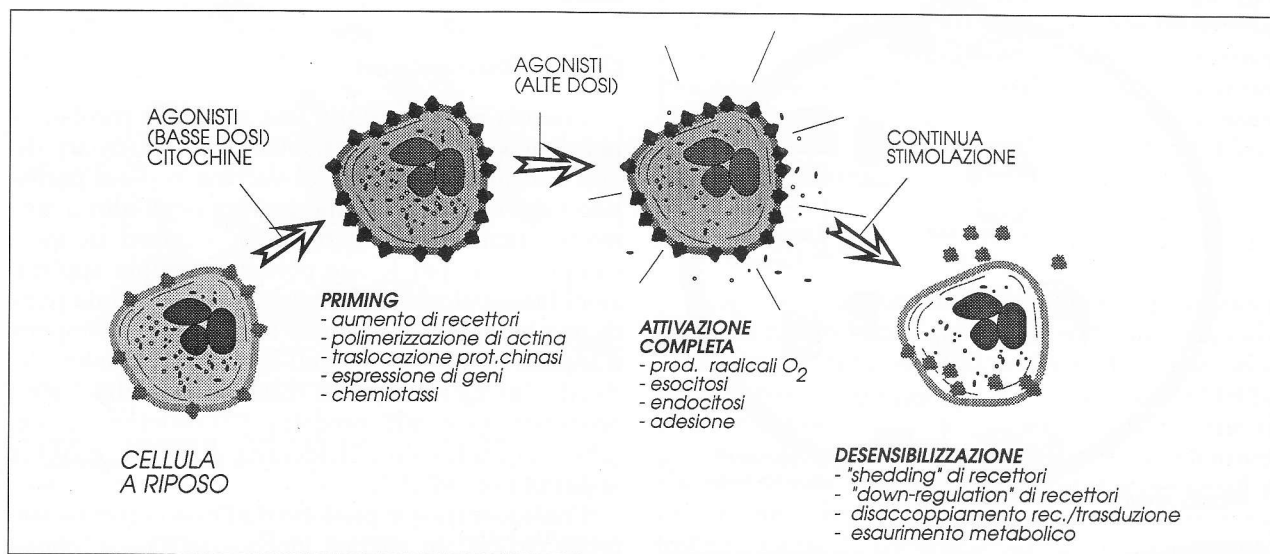


Figura 3. Risposte funzionali dei neutrofili e loro possibili modificazioni in aumento o in diminuzione, a seconda del sopravvenuto contatto con agenti stimolanti in diverse dosi.

cambiamento della responsività cellulare ad altri stimolanti. In pratica, un primo contatto con prodotti batterici in basse dosi o con citochine prepara i neutrofili a rispondere in modo più rapido e consistente a un secondo stimolo.

Tale fenomeno è detto "priming"⁸¹ e serve certamente ad aumentare il potere battericida delle cellule⁸²⁻⁸⁴, ma pare avere un'importante ruolo anche nella patogenesi di varie malattie. L'aumento della produzione di metaboliti attivi dell'ossigeno da parte dei neutrofili può essere tossico per le cellule e i tessuti attraverso molti meccanismi che coinvolgono fenomeni infiammatori acuti⁸⁵, ma anche a tempi medio-lunghi per fenomeni che possono coinvolgere danni endoteliali o ossidazione delle lipoproteine⁸⁶ e quindi innescare dei fenomeni aterosclerotici. Non si deve poi trascurare il rischio mutageno e cancerogeno dei radicali liberi dell'ossigeno^{87,88}. È chiaro quindi che il meccanismo del *priming* e il suo possibile controllo sono oggetto di intensi studi che, finora, non hanno portato a conclusioni definitive.

Il *priming* avviene anche *in vivo*, come mostrato da vari modelli sperimentali. Ad esempio, è stato visto che un danno acuto polmonare insorge dopo iniezione intravenosa di una combinazione di un agente "primante" come LPS e di un agente attivante, come il C5a, ma non dei due agenti separatamente⁸⁹. Il *priming* è stato studiato estensivamente nelle cellule dell'essudato. La tecnica della finestra cutanea può essere usata come un modello *in vivo* del processo infiammatorio e rende possibile lo studio degli effetti della chemiotassi e della migrazione sulla funzione dei neutrofili. Il fatto che in questo modello si ottenga un forte effetto "priming" è stato messo in luce inizialmente da Briheim et al.⁹⁰ e poi il fenomeno è stato caratterizzato nei dettagli da altri gruppi incluso quello veronese della Prof. Bambara in collaborazione con Bellavite^{5,6,48}.

La lista di agenti capaci di causare il *priming in vivo* e *in vitro* è molto ampia (v. Tabella III). Il fatto che un certo agente possa indurre il *priming* non deve però essere considerato come una obbligatoria proprietà di tale agente: infatti l'effetto dipende anche dalle dosi e dai protocolli sperimentali. In particolare, vari studi dimostrano una "selettività" del *priming* per vari agonisti.

Anche per quanto riguarda i meccanismi del *priming* la questione è tutt'altro che semplice. La Tabella IV riporta i possibili meccanismi che sono stati considerati come responsabili del *priming* da vari autori. Tuttavia, la letteratura non è concorde sul ruolo giocato da vari sistemi di trasduzione nel *priming*, perché sono stati trovati sempre alcuni modelli sperimentali che smentivano la assoluta necessità di un certo meccanismo. Inoltre, si è visto che con opportuni inibitori si possono dissociare le vie di trasduzione del *priming* usate da diversi

Tabella III. Agenti che inducono il fenomeno del "priming" nel neutrofilo.

IN VITRO

Fattori chemiotattici
Ionomicina
TNF- α
IL-1 α e IL-1 β
Granulocyte-colony-stimulating factor
Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
IL-6
Interferone- γ
Lipopolisaccaride (endotossina)
fMLP (priming omologo e eterologo)
Muramyl dipeptide
Ormone della crescita e *insulin-like growth factor-1*
Contatto con linfociti T attivati
Diacylglicerolo
Platelet-activating factor
C5a
Sostanza P

IN VIVO

Shock
Artrite (fluido sinoviale)
Artrite reumatoide
Essudato nelle ferite
Infezioni batteriche acute
Finestra cutanea
Infusione di endotossina
Atopia
Infusione di granulocyte-colony-stimulating factor
Dieta ricca di fosfatidilcolina di soia

Tabella IV. Meccanismi del "priming" proposti in letteratura.

Aumento di calcio intracellulare
Attivazione di fosfolipasi A2 e rilascio di ac. arachidonico
Attivazione di fosfolipasi D e accumulo ac. fosfatidico (GM-CSF)
Aumento di produzione intracellulare di PAF
Sintesi e miristolazione di substrato di protein chinasi C
Traslocazione e attivazione di protein chinasi C
Aumento di recettori per agonisti come fMLP e LPS
Aumento di attività della NADPH ossidasi
Riduzione di produzione AMPciclico

agenti⁹¹. Si deve quindi concludere, allo stato attuale delle conoscenze, che, come esistono varie vie di attivazione, esistono molteplici meccanismi di *priming* e che verosimilmente diversi agenti capaci di "primare" i neutrofili possono usare vie di trasduzione diverse, come già sostenuto da vari autori^{92,93}.

Desensibilizzazione

Le condizioni che sono state riportate avere un effetto depressore sulla funzione leucocitaria sono riportate in Tabella V. In tale elenco sono compresi anche alcuni trattamenti farmacologici, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, visto che i farmaci con effetti inibitori dei granulociti sono moltissimi.

Tabella V. Agenti che riducono la responsività funzionale del neutrofilo.

IN VITRO

Contatto con superfici biologiche
 Desensibilizzazione omologa (fMLP, TNF, siero attivato)
 Desensibilizzazione eterologa o crociata (C5a, PAF, PMA, TNF)
 Prostaciclina
 IL-2
 α 1-antichimotripsina
 Very-Low-Density Lipoproteins
 Tossine batteriche (pertosse, antrace)
 Esaurimento metabolico
 Proteina C reattiva
 Platelet-derived growth factor e piastrine
 Beta-endorfine e oppioidi
 Adenosina
 Anestesia
 Molti (ma non tutti) farmaci antiinfiammatori e calcio-antagonisti
 Pentossifillina
 Sali d'oro

IN VIVO

Essudazione (fattore-specifica)
 Sepsis addominale
 Trattamento con IL-2 o TNF
 Emodialisi
 Ustioni gravi
 Traumatismi gravi
 Policitemia vera
 Infezioni virali (CMV, epatite B, influenza, HIV-1)
 Cirrosi alcolica e epatite

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

In questo contesto, un ruolo-chiave pare essere giocato dall'aumento di AMPciclico. Tutti gli agenti che aumentano questo secondo messaggero inibiscono le risposte leucocitarie come la adesione e il *burst* respiratorio. L'azione dell'AMPciclico potrebbe essere dovuta alla attivazione della protein chinasi A e quindi all'inattivazione del recettore o della trasduzione a livello della fosfolipasi C.

Il sistema in cui la desensibilizzazione recettoriale è stata studiata più a fondo è quello del recettore beta-adrenergico. Il segmento COOH terminale intracitoplasmatico del recettore beta adrenergico contiene vari residui serinici e treoninici che sono potenziali siti di fosforilazione per l'enzima beta-adrenergic receptor kinase e PK A. La fosforilazione del recettore da parte di una delle due chinasi ri-

duce la sua affinità per la G- proteina, portando alla desensibilizzazione⁹⁴. Per quanto riguarda i recettori 7-TMS dei neutrofili, essi hanno tutti, a livello del segmento COOH terminale, molte serine e treonine. Inoltre, a livello del terzo segmento transmembrana, essi hanno un potenziale sito per la PK C. La attivazione di PK C con PMA desensibilizza i recettori chemiotattici^{95,96}.

Un interessante meccanismo di desensibilizzazione del neutrofilo, recentemente descritto, è lo "shedding" dei recettori. Questo fenomeno, descritto per vari recettori come ad esempio quelli del TNF, dell'IL-6 e dell'endotossina⁹⁷⁻¹⁰⁰, ha una duplice funzione: da una parte causa la desensibilizzazione della cellula per quello specifico agente, dall'altra causa l'immissione nei liquidi biologici di molecole in grado di "catturare" il ligando prima che venga a contatto con la cellula. In altre parole, i recettori solubili delle molecole mediatrici dell'infiammazione diventano degli anti-mediatori e quindi entrano nella rete di controllo dell'infiammazione stessa¹⁰¹.

Anche l'adesione del neutrofilo alle cellule endoteliali può essere modulata col meccanismo dello "shedding", che si applica alle L-selectine¹⁰², mentre l'adesione mediata da integrine è modulata da cambiamenti di affinità del recettore per i suoi ligandi (v. tab. 1).

La desensibilizzazione può essere omologa o eterologa. La desensibilizzazione omologa è un fenomeno ben noto in varie specie cellulari e nel neutrofilo è stata descritta in varie situazioni, come ad esempio *in vitro* mediante ripetute aggiunte di fattori chemiotattici in alte dosi^{103,104} ed *in vivo* nei neutrofili dell'essudato nei confronti degli agonisti IL-8 e C5a, la cui presenza è stata evidenziata nel fluido della finestra cutanea in alte concentrazioni¹⁰⁵. Una desensibilizzazione eterologa è quella che si osserva in neutrofili trattati con chemoattrattanti o isolati dalla finestra cutanea, neutrofili che si sono visti avere ridotta responsività al TNF⁵, oppure in neutrofili trattati prima con esteri del forbole e poi con fMLP o PAF^{106,107}.

Secondo alcuni autori la desensibilizzazione indotta con ripetuto contatto tra cellula e agonista sarebbe reversibile con la rimozione del ligando e dopo un certo tempo¹⁰⁸.

Un tipo particolare di desensibilizzazione, detta "classe-specifica" è stata proposta per i recettori C5a e fMLP, in quanto essi hanno una simile struttura (v. sopra) e presumibilmente simili meccanismi di controllo crociati^{107,109}.

I meccanismi molecolari con cui si attua la desensibilizzazione sono molto vari, a seconda delle condizioni in cui il fenomeno si realizza, ma si possono sostanzialmente riassumere nei seguenti: a) perdita di sensibilità o di numero dei recettori, b) disaccoppiamento tra recettore e sistema di trasdu-

zione come le G-proteine, c) innesco di sistemi di modulazione endogeni come aumento di AMPciclico, sintesi di lipocortina, attivazione di fosfatasi, ecc..., d) inattivazione di componenti dei sistemi effettori: ad esempio, si è visto che la inibizione della NADPH ossidasi ottenuta col riscaldamento (*heat-shock*) è dovuta ad una particolare termolabilità del fattore citosolico $p67^{110}$.

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

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato effettuato con contributi dell'Università di Verona (fondi 60%) e della ditta Guna (Milano).

Bibliografia

- Marasco WA, Phan SH, Krutzsh H, Showell HJ, Feltner DE, Nairn R, Becker EL, Ward P. Purification and identification of Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1984;259:5430-9.
- Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med* 1982;155:264-75.
- Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev* 1993;73:797-821.
- Sklar LA, Mueller H, Omann G, Oades Z. Three states for the formyl peptide receptor on intact cells. *J Biol Chem* 1989;264:8483-6.
- Biasi D, Bambara LM, Carletto A, Caraffi M, Serra MC, Chirumbolo S, Bellavite P. Factor-specific changes of the oxidative metabolism of exudate human neutrophils. *Inflammation* 1993;17:13-23.
- Biasi D, Bambara ML, Carletto A, Caramaschi P, Serra MC, Guzzo P, Santonastaso C, Bellavite P. Molecular mechanisms of priming: exudate human neutrophils are primed to fMet-Leu-Phe but have normal intracellular calcium and cAMP responses. *Bull Molec Biol Med* 1993;18:225-35.
- Bellavite P, Chirumbolo S, Lippi G, Andrioli G, Bonazzi L, Ferro I. Dual effects of formylpeptides on the adhesion of endotoxin-primed human neutrophils. *Cell Biochem Funct* 1993;11:231-9.
- Helfman DM, Appelbaum BD, Vogler WR, Kuo JF. Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase C and its substrates in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;111:847-53.
- Gennaro R, Florio C, Romeo D. Activation of protein kinase C in neutrophil cytoplasts. Localization of protein substrates and possible relationship with stimulus-response coupling. *FEBS Lett* 1985;180:185-90.
- Bellavite P, Dusi S, Cassatella MA. Studies on the nature and activation of O_2^- -forming NADPH oxidase of leukocytes. II. Relationships between phosphorylation of a component of the enzyme and oxidase activity. *Free Rad Res Commun* 1987;4:83-98.
- O'Flaherty JT, Jacobson DP, Redman JF, Rossi AG. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca^{2+} -independent and Ca^{2+} -dependent mechanisms. *J Biol Chem* 1991;265:9146-52.
- Huang CK, Hill JM, Bormann BJ, Mackin WM, Becker EL. Chemotactic factors induced vimentin phosphorylation in rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem* 1984;259:1386-9.
- Irita K, Takeshige K, Minakami S. Protein phosphorylation in intact pig leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1984;805:44-52.
- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991;351:320-2.
- Heyworth PG, Segal AW. Activation and phosphorylation of cytochrome b_{245} and associated proteins in human neutrophils. *Eur J Clin Invest* 1985;15:Abs. 291.
- Papini E, Grzeskowiak M, Bellavite P, Rossi F. Protein kinase C phosphorylates a component of NADPH oxidase of neutrophils. *FEBS Lett* 1985;190:204-8.
- Grzeskowiak M, Della Bianca V, Cassatella M, Rossi F. Complete dissociation between the activation of phosphoinositide turnover and of NADPH oxidase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils depleted of Ca^{2+} and primed by subthreshold doses of phorbol myristate acetate. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:785-94.
- Rossi F, Grzeskowiak M, Della Bianca V. Double stimulation with FMLP and Con A restores the activation of the respiratory burst but not of the phosphoinositide turnover in Ca^{2+} -depleted human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:1-11.
- Bellavite P, Corso F, Dusi S, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Rossi F. Activation of a NADPH-dependent superoxide production in plasma-membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1988;263:8210-14.
- Rossi F, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Calzetti F, Gandini G. Phosphatidic acid and not diacylglycerol generated by phospholipase D is functionally linked

- to the activation of the NADPH oxidase by fMLP in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:320-7.
21. Agwu DE, McPhail L, Sozzani S, Bass DA, McCall CE. Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1991; 88:531-9.
22. Bromberg Y, Pick E. Unsaturated fatty acids stimulate NADPH-dependent superoxide production by cell-free system derived from macrophages. *Cell Immunol* 1984;88:213-21.
23. Sakata A, Ida E, Tominaga M, Onoue K. Arachidonic acid acts as an intracellular activator of NADPH oxidase in Fcg receptor-mediated superoxide generation in macrophages. *J Immunol* 1987; 138:4353-9.
24. Rubinek T, Levy R. Arachidonic acid increases the activity of the assembled NADPH oxidase in cytoplasmic membranes and endosomes. *Biochim Biophys Acta* 1993;1176:51-8.
25. Bellavite P, Guarini P, Biasi D, Carletto A, Trevisan MT, Bambara LM, Corrocher R. Correlation between fatty acids composition and superoxide production in blood neutrophils. *Eur J Clin Invest* 1994;24 (2):Abs. 155.
26. Jannace PW, Lerman RH, Santos JJ, Vitale JJ. Effects of oral soy phosphatidylcholine on phagocytosis, arachidonate concentrations, and killing by human polymorphonuclear leukocytes. *Am J Clin Nutr* 1992;56:599-603.
27. Wymann MP, von Tschanner V, Deranleau DA, Baggiolini M. The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real-time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process. *J Biol Chem* 1987;262:12048-53.
28. Henderson LM, Moule SK, Chappel JB. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate, not phosphorylation. *Eur J Biochem* 1993; 211:157-62.
29. Sklar LA, Hyslop PA, Oades ZG, Omann GM, Jesaitis AJ, Painter RG, Cochrane CG. Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the human neutrophil. Transient responses and occupancy-response relations at the formyl peptide receptor. *J Biol Chem* 1985;260:11461-7.
30. Dewald B, Thelen M, Wymann MP, Baggiolini M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces the exocytosis in human neutrophils. *Biochem J* 1989;264:879-84.
31. Bellavite P, Chirumbolo S, Mansoldo C, Gandini G, Dri P. A simultaneous assay for oxidative metabolism and adhesion of human neutrophils. Evidence for correlations and dissociations of the two responses. *J Leukocyte Biol* 1992;51:329-35.
32. Maridonneau-Parini I, De Gunzburg J. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J Biol Chem* 1992;267:6396-402.
33. Quinn MT, Parkos CA, Walker L, Orkin SH, Dinanuer MC, Jesaitis AJ. Association of a ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils. *Nature* 1989;342:198-200.
34. Bokoch GM, Quilliam LA, Bohl BP, Jesaitis AJ, Quinn MT. Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b₅₅₈ of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A. *Science* 1991;254:1794-6.
35. Wennstrom S, Hawkins P, Cooke F, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M, Jackson T, Claesson-Welsh L, Stephens L. Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol* 1994;4:385-93.
36. Thelen M, Wirthmueller U. Phospholipases and protein kinases during phagocyte activation. *Curr Opin Immunol* 1994;6:106-12.
37. McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J Biol Chem* 1984;259:5768-75.
38. Dewald B, Thelen M, Baggiolini M. Two transduction sequences are necessary for neutrophil activation by receptor agonists. *J Biol Chem* 1988; 263:16179-84.
39. Bellavite P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radical Biol Med* 1988; 4:225-61.
40. Bellavite P, Serra MC, Bazzoni F, Miron S, Dusi S. Triggering and regulation of the free radical production by phagocytes. In: *Free Radicals, Lipoproteins and Membrane Lipids* (A. Crastes de Paulet, L. Douste Blazy, R. Paoletti eds.) New York: Plenum Press 1990: 23-44.
41. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M. Volume, conductivity and scatter changes of activated polymorphonuclear leukocytes: an estimation by coulter counter STKS analyzer. *Int J Clin Lab Res* 1992; 21:321-4.
42. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M. Volumetric changes in phorbol myristate acetate activated neutrophils: a rapid and simple assay using Coulter Counter STKR and STKS hematological analyzers. *Haematologica* 1992;77:226-32.
43. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. High scatter of neutrophils on Bayer-Technicon H2 analyzer: A screening test of morphological defective responsiveness to in vitro chemotactic stimulation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:11-7.
44. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. Assessment of neutrophil aggregation by Coulter STKR and STKS haematological analysers. *Clin Lab Haemat* 1994;16:43-55.
45. Lippi U, Schinella M, Nicoli M, Bellavite P, Lippi G. A simple assessment of human neutrophil adhesiveness. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:41-4.
46. Bellavite P, Chirumbolo S, Lippi G, Guzzo P, Santonastaso C. Homologous priming in chemotactic peptide stimulated neutrophils. *Cell Biochem Funct* 1993;11:93-100.
47. Bellavite P, Chirumbolo S, Santonastaso C, Guzzo P, Signorini A. Various specific functional responses of human neutrophils exhibit different dose-dependence on formylpeptides. Montpellier: Proc VIIth GIRI Meeting 1993:21-2.
48. Bellavite P, Carletto A, Biasi D, Caramaschi P, Poli F, Suttora F, Bambara LM. Studies of skin-window exude human neutrophils. Complex patterns of adhe-

- rence to serum-coated surfaces in dependence on fMLP doses. *Inflammation* 1994; in corso di stampa.
49. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992;13:169-71.
50. Serra MC, Bellavite P, Davoli A, Bannister JV, Rossi F. Isolation from neutrophil membranes of a complex containing active NADPH oxidase and cytochrome b₂₄₅. *Biochim Biophys Acta* 1984; 788:138-46.
51. Glass GA, DeLisle DM, De Togni P, Gabig TG, Magee BH, Markert M, Babior BM. The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Further studies of the purified enzyme. *J Biol Chem* 1986;261:13247-51.
52. Umei T, Babior BM, Curnutte JT, Smith RM. Identification of the NADPH-binding subunit of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1991;266:6019-22.
53. Fukuhara Y, Ise Y, Kakinuma K. Immunological studies on the respiratory burst oxidase of pig neutrophils. *FEBS Lett* 1988;229:150-6.
54. Berton G, Dusi S, Serra MC, Bellavite P, Rossi F. Studies on the NADPH oxidase of phagocytes. Production of a monoclonal antibody which blocks the enzymatic activity of pig neutrophils NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1989;264:5564-8.
55. Yea CM, Cross AR, Jones OTG. Purification and some properties of the 45 kDa diphenylene iodonium-binding flavoprotein of neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 1990;265:95-100.
56. Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ. Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem* 1992;267:7303-9.
57. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. Cytochrome b₅₅₈: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 1992; 256:1459-62.
58. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent HA, Chavan AV, Haley RC, Garcia RC, Rosen H, Scrace G. Cytochrome b₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J* 1992;284:781-8.
59. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993;18:43-7.
60. Bellavite P, Papini E, Zeni L, Della Bianca V, Rossi F. Studies on the nature and activation of O₂⁻-forming NADPH oxidase of leukocytes. Identification of a phosphorylated component of the active enzyme. *Free Rad Res Comms* 1985;1:11-29.
61. Kakinuma K, Fukuhara Y, Kaneda M. The respiratory burst oxidase of neutrophils. Separation of an FAD enzyme and its characterization. *J Biol Chem* 1987;262:12316-22.
62. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan C, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 1991; 353:668-70.
63. Woodman RC, Ruedi JM, Jesaitis AJ, Okamura N, Quinn MT, Smith RM, Curnutte JT, Babior BM. Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. *J Clin Invest* 1991;87: 1345-51.
64. Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM, Volpp BD, Pearson DW, Rosen H, Clark RA. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b₅₅₈. *J Clin Invest* 1991;87:352-6.
65. Rotrosen D, Leto TL. Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem* 1990;265:19910-5.
66. Nauseef WM, Volpp BD, McCormick S, Leidal KG, Clark RA. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J Biol Chem* 1991;266:5911-7.
67. Dusi S, Rossi F. Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox. *Biochem J* 1993;296:367-71.
68. Bromberg Y, Shani E, Joseph G, Gorzalczany Y, Sperling O, Pick E. The GDP-bound form of rac1 is a potent activator of NADPH oxidase - A challenge of the dogma? *Eur J Clin Invest* 1994;24:A177.
69. Le Cabec V, Mohn H, Gacon G, Maridonneau-Parini I. The small G-protein rac is not recruited to the plasma membrane upon NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:1216-24.
70. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1987;333:664-6.
71. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9.
72. Wright CD, Mulsch A, Busse R, Osswald H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:813-9.
73. Riesco A, Caramelo C, Blum G, Monton M, Gallego MJ, Casado S, Lopez Farre A. Nitric oxide-generating system as an autocrine mechanism in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 1993; 292:791-6.
74. Condino-Neto A, Muscara MN, Grumach AS, Carneiro-Sampaio MMS, De Nucci G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol* 1993;35:485-90.
75. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157: 87-94.
76. Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991;3:65-70.
77. Malawista SE, Montgomery RR, Van Blaricom G. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1992; 90:631-6.

78. Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 1993;73:217-22.
79. Salvemini D, De Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6328-32.
80. Cross AS, Lowell GH. Stimulation of polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity by supernatant of activated human mononuclear cells. *Infect Immun* 1978;22:502-7.
81. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 1984;160:1657-71.
82. Issekutz AC, Lee KY, Biggar WD. Enhancement of human neutrophil bactericidal activity by chemotactic factors. *Infect Immun* 1979;24:295-301.
83. Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986;68:708-11.
84. Edwards SW, Say JE, Hughes V. Gamma interferon enhances the killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. *J Gen Microbiol* 1988;134:37-42.
85. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
86. Abdalla DSP, Campa A, Monteiro HP. Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* 1992;97:149-59.
87. Weitzman SA, Weitburg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985; 227:1231-3.
88. Birnboim HC. DNA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis* 1986;7:1511-7.
89. Forehand JR, Pabst MJ, Phillips WA, Johnston RB Jr. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. *J Clin Invest* 1989;83:74-83.
90. Briheim G, Stendahl O, Coble BI, Dahlgren C. Exudate polymorphonuclear leukocytes isolated from skin chambers are primed for enhanced response to subsequent stimulation with the chemoattractant fMet-Leu-Phe and C3 opsonized yeast particles. *Inflammation* 1988;12:141-52.
91. Stewart AG, Harris T. Adenosine inhibits platelet-activating factor, but not tumour necrosis factor- α -induced priming of human neutrophils. *Immunology* 1993;78:152-8.
92. Koenderman L, Yazdanbakhsh M, Roos D, Verhoeven AJ. Dual mechanisms in priming of the chemoattractant-induced respiratory burst in human granulocytes. *J Immunol* 1989;142:623-8.
93. Balazovich KJ, Almeida HI, Boxer LA. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. *J Lab Clin Med* 1991;118:576-84.
94. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 1990;4:2881-9.
95. Smith CD, Uhing RJ, Snyderman R. Nucleotide regulatory protein-mediated activation of phospholipase C in human polymorphonuclear leukocytes is disrupted by phorbol esters. *J Biol Chem* 1987; 262:6121-7.
96. Dryden P, Allen B, Wong S, Reaney A, Merali T, Salari H. Protein kinase C impairs the coupling of the GTP-binding protein to LTB₄ receptor in neutrophils. *Prostaglandins* 1992;44:11-24.
97. Porteu F, Nathan C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 1990;172:599-607.
98. Bazil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human neutrophils. *J Immunol* 1991;147:1567-74.
99. Spinaz GA, Keller U, Brockhaus M. Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. *J Clin Invest* 1992;90:533-6.
100. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 1993; 23:473-80.
101. Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gents R, Lesslauer W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 1992;77:510-4.
102. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: Tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;13:93-100.
103. Zigmond SH, Sullivan SJ, Lauffenburger DA. Kinetic analysis of chemotactic peptide receptor modulation. *J Cell Biol* 1982;92:34-43.
104. Simchowicz L, Atkinson JP, Spilberg I. Stimulus-specific deactivation of chemotactic factor-induced cyclic AMP response and superoxide generation by human neutrophils. *J Clin Invest* 1980;66:736-47.
105. Follin P, Wymann MP, Dewald B, Ceska M, Dahlgren C. Human neutrophil migration into skin chambers is associated with production of NAP-1/IL8 and C5a. *Eur J Haematol* 1991;47:71-6.
106. O'Flaherty JT, Jacobson DP, Redman JP. Bidirectional effects of protein kinase C activators. Studies with human neutrophils and platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1989;264:6836-43.
107. Didsbury JR, Uhing RJ, Tomhave E, Gerard C, Gerard N, Snyderman R. Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11564-8.
108. English D, Roloff JS, Lukens JN. Regulation of human polymorphonuclear leukocyte superoxide release by cellular responses to chemotactic peptides. *J Immunol* 1981;126:165-71.
109. Henson PM, Schwartzman NA, Zanolari B. Intracellular control of human neutrophil secretion. II.

- Stimulus specificity of desensitization induced by six different soluble and particulate stimuli. *J Immunol* 1981;127:754-9.
110. Erickson RW, Malawista SE, Garret MC, Van Blaricom G, Leto TL, Curnutte JT. Identification of a thermolabile component of the human neutrophil NADPH oxidase. A model for chronic Granulomatous disease caused by deficiency of the p67-phox cytosolic component. *J Clin Invest* 1992;89:1587-95.