

FUNZIONALITÀ GRANULOCITARIA NEL BOVINO: OSSERVAZIONI "IN VITRO" IN PRESENZA DI DUE CONCENTRAZIONI DI CORPI CHETONICI

Comazzi S., Paltrinieri S., Sartorelli P., Agnes F.
Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Milano

Introduzione

Gli stati chetotici nei ruminanti sembrano causare una depressione delle difese specifiche e aspecifiche dell'organismo: nel bovino sono state segnalate, "in vitro", alterazioni funzionali sia dei linfociti T (Klucinsky et al., 1988-a), sia dei macrofagi e neutrofili (PMN) del latte (Klucinsky et al., 1988-b). Precedenti indagini condotte su granulociti ovini avevano rilevato alcune alterazioni della fagocitosi e della chemiotassi in presenza di corpi chetonici (Paltrinieri et al., 1996). Alla luce del fatto che i PMN bovini presentano alcune peculiarità metaboliche rispetto a quelli ovini (Sartorelli e Paltrinieri, 1991) si è voluto valutare l'effetto esercitato "in vitro" dai corpi chetonici sui PMN bovini.

Materiali e Metodi

L'indagine è stata condotta su 32 bovine da latte di razza Frisona italiana, clinicamente sane, non gravide, appartenenti allo stesso allevamento e quindi sottoposte al medesimo regime alimentare. I PMN sono stati isolati con il metodo descritto da Carlson e Kaneko (1973), che prevede la separazione dei neutrofili per centrifugazione e successiva lisi osmotica degli eritrociti. Dopo valutazione della vitalità mediante metodo di esclusione del Trypan blu si è proceduto alle prove funzionali sia in condizioni basali che in presenza di 2,4 mmol/l o 4,8 mmol/l di acetoacetato e β -OH-butirrato da soli o in associazione. Inoltre, poiché è stato utilizzato acetoacetato sotto forma di sale di litio, composto che può esercitare effetti immunomodulatori (Franklin et al., 1991) è stata saggiata anche l'influenza del cloruro di litio (LiCl) alle stesse concentrazioni.

La chemiotassi è stata valutata in camere a 12 pozzetti (Neuroprobe) utilizzando come attivatore siero omologo, attivato con zymosan, al 50% in Hanks (Boyden, 1962).

Per valutare la capacità di inglobamento sono state utilizzate particelle di lattice di polistirene (1,09 μm , 20 particelle/PMN) con dosaggio spettrofotometrico della quantità di lattice ingerita, dopo solubilizzazione in diossano (Kvarstein, 1969).

L'aderenza e la produzione di anione superossido sono state valutate simultaneamente in micropiastre a 96 pozzetti secondo il metodo descritto da Bellavite et al. (1992). Alcuni pozzetti sono state preincubati con gelatina (5mg/ml PBS) al fine di evitare attivazioni aspecifiche. In altri pozzetti questa procedura è stata, invece, omessa per valutare l'attivazione aspecifica da contatto con la plastica. Come attivatore specifico è stato utilizzato PMA alla concentrazione finale di 10^{-7} mol/l. Ogni prova è stata valutata in quadruplo. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS 6.1.2.

Risultati

I risultati relativi a vitalità, purezza e recupero della popolazione isolata sono riportati in tabella 1.

Vitalità %	Purezza %			Recupero %
	Neutrofili	Eosinofili	Mononucleati	
97,3 $\pm 0,8$	74,6 $\pm 13,3$	9,1 $\pm 9,4$	16,3 $\pm 11,5$	47,2 $\pm 22,0$

Tabella 1: Valori medi (\pm D.S.) relativi a vitalità, purezza e recupero della popolazione cellulare isolata

La quantità di leucociti isolata è risultata strettamente correlata a quella nel sangue di partenza ($P < 0,001$, $r = 0,74$).

I risultati riguardanti l'effetto esercitato da 2,4 e 4,8 mmol/l di corpi chetonici e di LiCl sulla chemiotassi e le relative analisi statistiche sono riportati in tabella 2.

	Basale	Attivato	Attivato +A	Attivato +B	Attivato +A+B	Attiv. + LiCl
2,4 mmol/l	38 \pm 8,3	105 \pm 26,5 ###	96 \pm 28,6 n.s.	98 \pm 30,7 n.s.	93 \pm 30,1 n.s.	99 \pm 31,2 n.s.
4,8 mmol/l	48 \pm 10,5	131 \pm 18,7 ###	125 \pm 21,3 *	127 \pm 18,6 n.s.	120 \pm 24,1 *	123 \pm 22,1 *

Tabella 2: valori medi (\pm D.S.) relativi alle distanze in μm percorse dai neutrofili nelle prove eseguite in presenza di 2,4 e 4,8 mmol/l di corpi chetonici o cloruro di litio. Legenda:### = $P < 0,001$ vs basale; * = $P < 0,05$ vs attivato; ns = non significativo vs attivato, A = Acetoacetato, B = β -OH-Butirato

I risultati delle prove di inglobamento non hanno mostrato differenze statisticamente significative né dopo aggiunta dei corpi chetonici, da soli o in associazione, né dopo aggiunta di LiCl.

Analogamente né i corpi chetonici né il LiCl hanno influenzato l'aderenza. Per quanto riguarda invece l'effetto dei diversi tipi di attivazione sono stati riscontrati valori di aderenza statisticamente superiori rispetto a quella basale dopo stimolazione aspecifica ($P < 0,001$); l'aggiunta di PMA ha determinato un notevole incremento della capacità adesiva sia rispetto ai valori basali ($P < 0,001$), sia rispetto a quelli ottenuti con la sola stimolazione aspecifica ($P < 0,05$). L'aderenza non è stata ulteriormente stimolata quando i due tipi di attivazione sono stati concomitanti.

La produzione di anione superossido basale e dopo stimolazione aspecifica è risultata nel bovino praticamente nulla, mentre il PMA si è dimostrato un potente attivatore ($P < 0,001$ vs basale, $P < 0,001$ vs aspecifica). Nei campioni incubati con PMA si è riscontrato un effetto inibitore dell'acetoacetato, a concentrazioni di 2,4 mmol/l, ($P < 0,01$) e attivatore in presenza di cloruro di litio ($P < 0,01$); nei pozzetti sottoposti ad attivazione mista tutti i corpi chetonici ed il cloruro di litio hanno determinato una riduzione della produzione di anione superossido ($P < 0,001$). A concentrazioni più elevate di corpi chetonici (4,8 mmol/l) non sono state rilevate influenze significative.

Discussione

La metodica di isolamento utilizzata ha fornito una popolazione cellulare sostanzialmente idonea allo studio della funzionalità granulocitaria "in vitro". La percentuale di PMN isolata è risultata sufficientemente elevata da consentire una corretta valutazione delle prove funzionali eseguite. La contaminazione di monociti ed eosinofili, che potrebbe, in varia misura, interferire con le prove funzionali effettuate è risultata abbastanza contenuta.

Le prove di chemiotassi hanno confermato come il siero attivato con zymosan rappresenti un ottimo attivatore nella specie bovina (Sartorelli et al., 1990; Zwahlen a Roth, 1990) addirittura più potente che nella pecora (Paltrinieri et al., 1996).

L'analisi dei risultati della chemiotassi mette in evidenza come l'attività chemiotattica dei PMN bovini sia inibita solamente da concentrazioni elevate di corpi chetonici (4,8 mmol/l) di acetoacetato sia da solo ($P < 0,05$) che associato al β -OH-butirrato ($P < 0,05$), ma non dal solo β -OH-butirrato. Ciò potrebbe essere imputabile, più che ad un'azione

diretta dell'acetoacetato, all'influenza del litio, dal momento che il cloruro di litio ha esercitato anch'esso un'azione inibente la chemiotassi ($P < 0,05$). Da notare inoltre è la differenza rispetto alla specie ovina nella quale già a ridotte concentrazioni di β -OH-butirrato (2,4 mmol/l) la chemiotassi risultava inibita (Lucchini, 1997).

I risultati delle prove di inglobamento e aderenza evidenziano una elevatissima variabilità individuale che non permette di trarre considerazioni riguardo l'influenza dei corpi chetonici su queste tappe della fagocitosi.

In tale ottica vanno interpretati probabilmente anche i discordanti risultati sulla produzione di anione superossido, in accordo con recenti studi che non evidenziano influenze da parte del β -OH-butirrato a dosi subchetotiche (Hoeben et al., 1997)

Rimangono comunque da sottolineare la scarsissima produzione di anione superossido in condizioni basali, già segnalata in letteratura nei ruminanti (Guelfi e Courdouhji, 1987), nonché il potente effetto attivatore indotto su questo parametro e sull'aderenza dal PMA e sulla aderenza anche solo dal semplice contatto con la plastica, che fanno ritenere sostanzialmente idonee alla specie bovina le metodiche da noi utilizzate.

In definitiva sembra di poter concludere che solo la chemiotassi potrebbe essere influenzata dalla presenza di corpi chetonici, peraltro a concentrazioni molto elevate, nonostante la simultanea depressione indotta dal cloruro di litio ci induca a ritenere il litio come probabile responsabile di tale fenomeno. Va altresì ricordato che "in vivo" la chemiotassi rappresenta una delle prime tappe dell'intero processo fagocitario, ed un suo deficit potrebbe condizionare l'integrità delle capacità difensive degli animali chetosici.

I neutrofili bovini sembrano differire da quelli di pecora nella risposta a stimoli attivatori in presenza di corpi chetonici. In particolare, mentre nella pecora la presenza di corpi chetonici sembra indurre notevoli modificazioni nella chemiotassi sia a concentrazioni medie che a concentrazioni superiori ed interferisce anche nella fagocitosi, nel bovino tali influenze non sono riscontrabili. Ciò potrebbe essere imputabili a particolarità intrinseche delle cellule bovine, che già erano emerse in altri lavori, per quanto riguarda il metabolismo energetico rispetto a PMN umani (Sartorelli et al., 1990) e ovini (Sartorelli e Paltrinieri, 1991). L'ampiamiento della casistica, accanto ad una maggiore standardizzazione dei soggetti, potrebbe consentire di ridurre l'elevata variabilità riscontrata e di definire se il pannello di test da noi

messo a punto nella pecora sia realmente adatto alla valutazione della funzionalità granulocitaria nel bovino.

Bibliografia

- 1) Bellavite P., Chirumbolo S., Mansoldo C., Gandini G., Dri P.: Simultaneous assay for oxidative metabolism and adhesion of human neutrophils: evidence for correlations and dissociations of the two responses. *Journal of leukocyte biology*. **51**, 329-335, 1992
- 2) Boyden S.: Chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.*, **115**, 453-466, 1962.
- 3) Carlson G.P., Kaneko J.J.: Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **142**, 853-856, 1973.
- 4) Franklin S.T., Young J.W., Nonnecke B.J.: Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J.Dairy Sci.*, **74**, 2507-2514, 1991.
- 5) Guelfi J.F., Courdouhji M.K.: Exploration de quelques fonctions des polynucleaires neutrophiles sanguins du mouton. *Ev.Med.Vet.*, **138**, 995-998, 1987.
- 6) Hoeben D., Heyneman R., Burvenich C.: Elevated levels of β -Hydroxybutiric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol.Immunopathol.*, **58**, 165-170, 1997
- 7) Klucinski W., Miernik-Degorska E., Degoski A., Targowski S., Winnicka A.: Effect of ketone bodies on the mitogenic response of bovine milk lymphocytes. *J.Vet.Med.A*, **35**, 626-631, 1988-a
- 8) Klucinski W., Degorski A., Miernik-Degorska E., Targowski S., Winnicka A.: Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *J.Vet.Med.A*, **35**, 632-639, 1988-b.
- 9) Kvarstein B.: The effect of temperature, metabolic inhibitors, and EDTA on phagocytosis of polystyrene latex particles by human leukocytes. *Scand. J.Clin.Lab.Invest.*, **24**, 271-277, 1969.
- 10) Lucchini D.: Effetto "in vitro" di due concentrazioni di corpi chetonici sulla funzionalità dei granulociti neutrofilici di pecora. Tesi di laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, AA 1996.97.
- 11) Paltrinieri S., Sartorelli P., Agnes F.: In vitro effects of ketone bodies on sheep neutrophil functions. *Eur.J.Haematol.(suppl.96)*, **57**, 18, 1996
- 12) Sartorelli P., Pizzoli R., Dominoni S.: Valutazione "in vitro" dell'attività fagocitaria dei granulociti neutrofilici di bovino. *Atti S.I.S.Vet.*, **44**, 397-399, 1990
- 13) Sartorelli P., Paltrinieri S.: Attività fagocitaria "in vitro" di granulociti neutrofilici di pecora. *Atti S.I.S. Vet.* **45**, 1065-1067, 1991

14) Zwahlen D.R., Roth D.R.: Chemotactic competence of neutrophils from neonatal calves.
Inflammation. **14**, 109-123, 1990.

RICERCA ESEGUITA CON CONTRIBUTO M.U.R.S.T. EX 40%