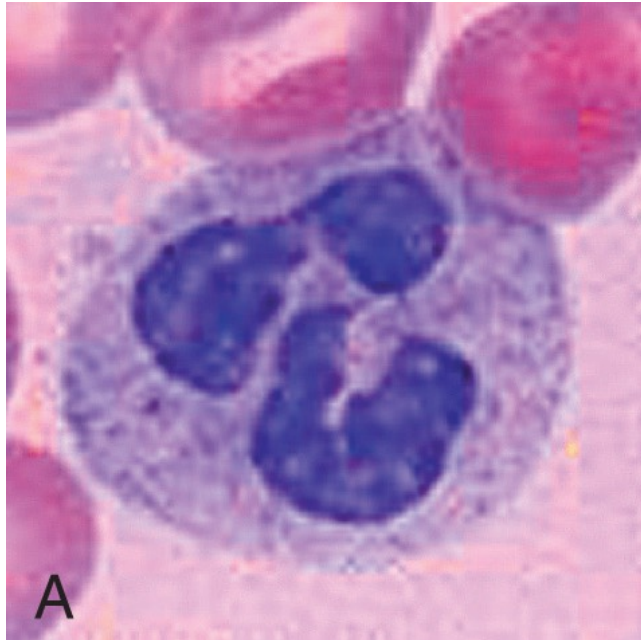


I neutrofili

I neutrofili sono la popolazione cellulare più abbondante nel sangue (60-70% dei leucociti) e sono i primi leucociti ad essere reclutati durante la risposta infiammatoria.

La principale funzione dei neutrofili è di inglobare e distruggere le sostanze estranee.



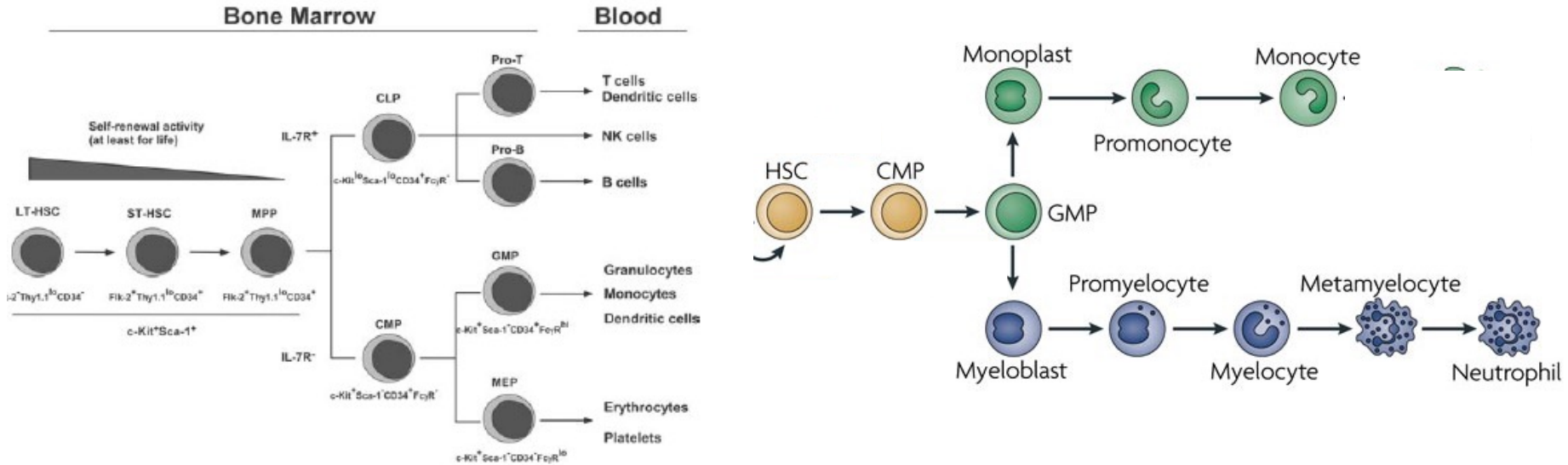
Queste cellule sono state descritte per la prima volta da E. Metchnikoff che in esperimenti in cui inseriva spine di rosa nelle larve di stella di mare dimostrò che i fagociti migrano nei siti offesi e partecipano alla digestione dei microrganismi. Identificò due tipi di cellule i macrofagi e i microfagi corrispondenti ai neutrofili.

Il nucleo lobulato caratteristico dei neutrofili ispirò il nome di polimorfonucleati a Metchnikoff. Con gli eosinofili e i basofili i neutrofili appartengono alla famiglia dei granulociti caratterizzati dalla presenza nel citoplasma di granuli in cui sono accumulate molecole ad azione antimicrobica.

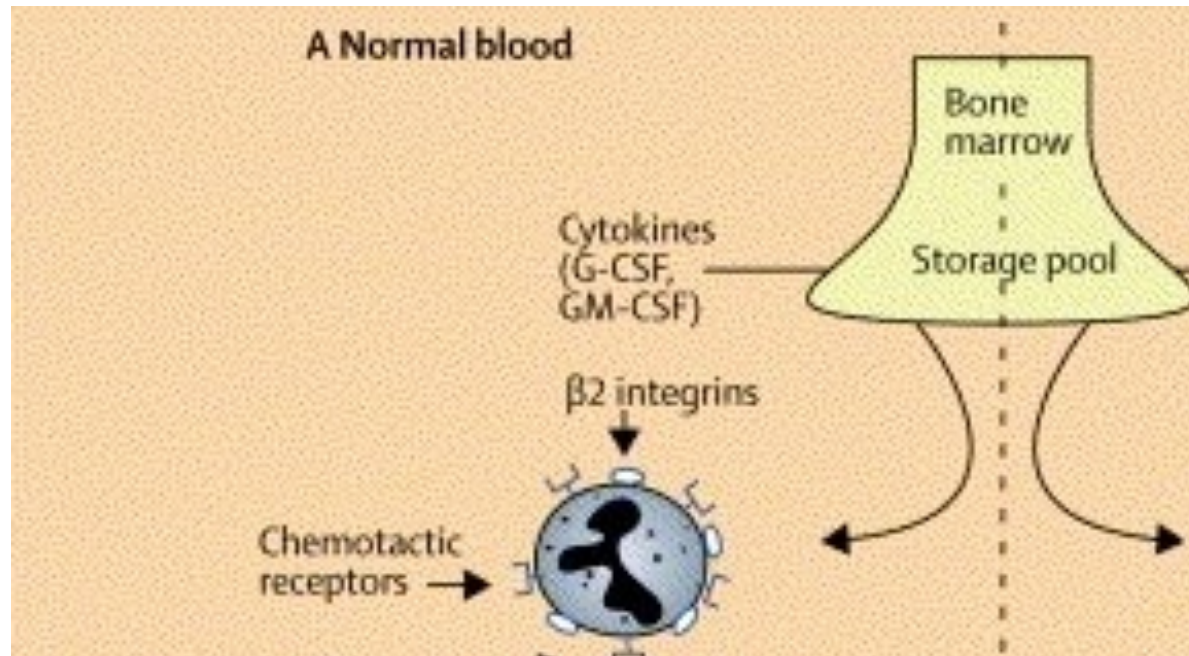
L'importanza di queste cellule nella difesa dell'organismo è dimostrata da diverse evidenze quali l'aumento di infezioni da parte di batteri e funghi in pazienti con neutropenia.

Origine dei neutrofili

I neutrofili sono cellule a vita breve che derivano dalle cellule staminali totipotenti. I neutrofili maturano nel midollo dove circa il 60% delle cellule totali è rappresentata da precursori dei granulociti.



Caratteristiche dei neutrofili



I neutrofili sono rilasciati dal midollo osseo nel circolo sanguigno dove circolano per 6-8h. In presenza di un segnale infiammatorio i neutrofili sono richiamati nel tessuto infiammato.

Fagocitosi

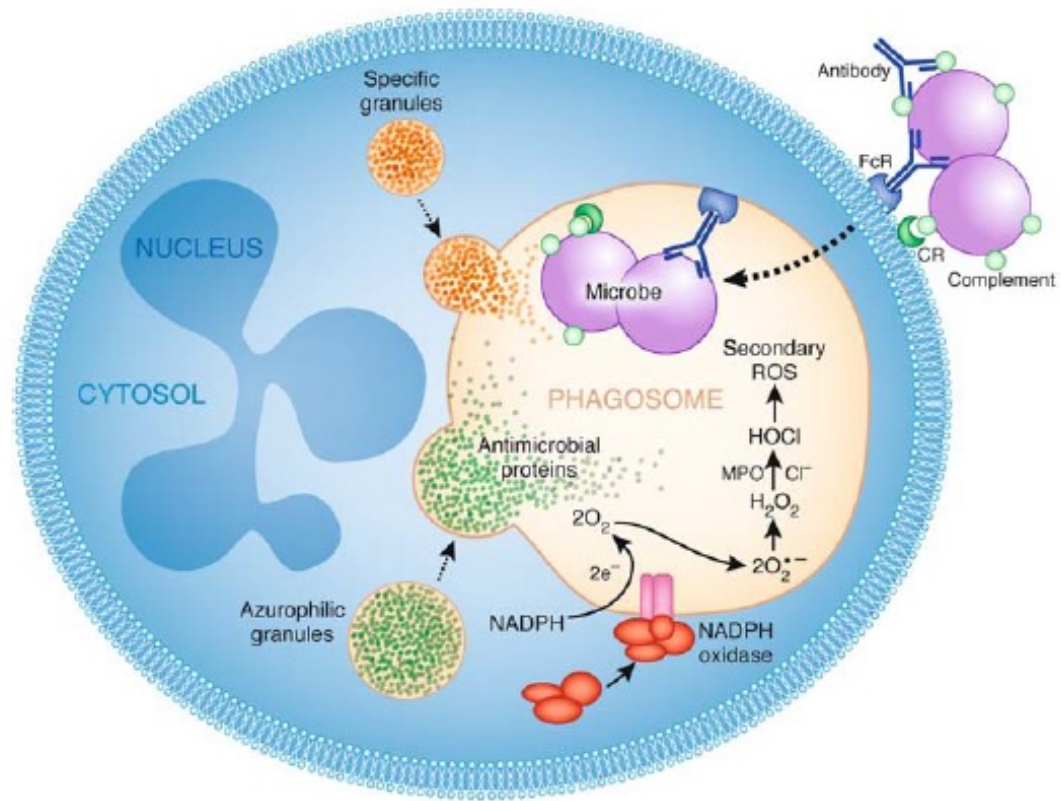


Fig. 1 Neutrophil phagocytosis and microbicidal activity. Following phagocytosis, microbes are destroyed by ROS and antimicrobial proteins released from granules. See text for details. FcR, Fc receptor; CR, complement receptor; MPO, myeloperoxidase

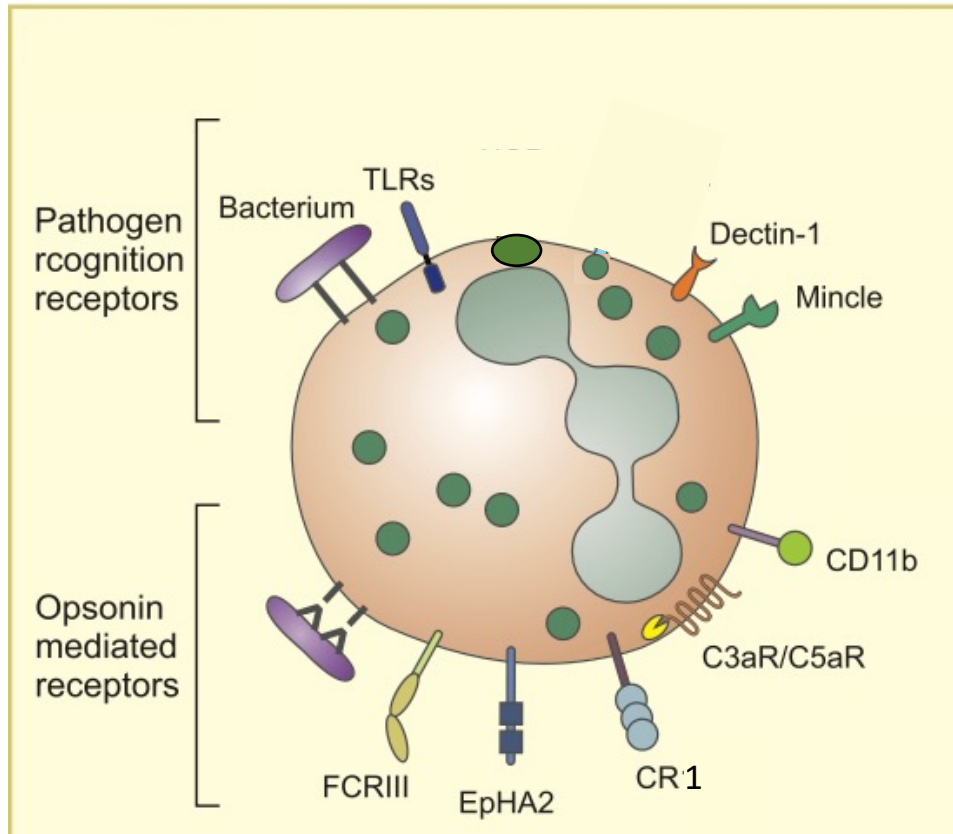
L'accumulo dei neutrofili nella sede di infiammazione è responsabile della eliminazione degli agenti lesivi. Questo avviene attraverso la fagocitosi degli agenti estranei quali microrganismi e la loro eliminazione distruzione degli agenti estranei da parte dei neutrofili.

La fagocitosi comporta tre fasi distinte:

- i) Riconoscimento e adesione alla particella da eliminare
- ii) Ingestione
- iii) Uccisione e degradazione del patogeno

Riconoscimento e adesione

Fagocitosi dei neutrofili

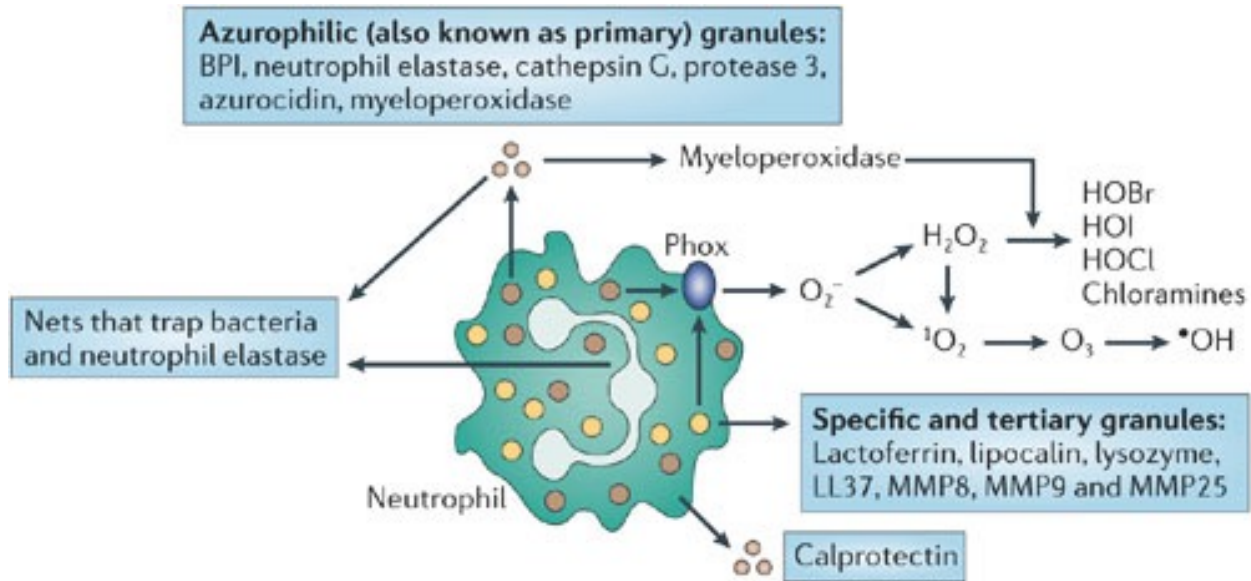


L'internalizzazione/ingestione dei patogeni da parte dei neutrofili può essere mediata da recettori specifici quali dectin che riconosce β -glucani sui funghi o Mincle che riconosce glicolipidi di diversi microrganismi o recettori per le opsonine (C3b, IgG, CR1, Fc γ R).

La captazione dei patogeni e degli antigeni può essere facilitata dalle opsonine. Le opsonine sono fattori dell'ospite come le immunoglobuline e fattori del complemento che si legano alla superficie del patogeno e che sono riconosciuti da recettori espressi dai fagociti. CR1, CR3 recettori del frammento C3b e C3bi (frammento del C3b) del complemento, CD64 recettore ad alta affinità per le IgG.

Il fagosoma dei neutrofili ha un pH alcalino e viene caricato di molecole antimicrobiche in seguito alla fusione con i granuli.

Caratteristiche dei neutrofili



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Le diverse molecole ad azione antimicrobica sono mantenute all'interno dei granulociti nei granuli. Nei neutrofili si distinguono tre tipi di granuli:

Granuli azzurofilici/primari:

Mieloperossidasi, proteasi, elastasi

Granuli specifici: lattoferrina, lisozima

Granuli terziari metalloproteasi.

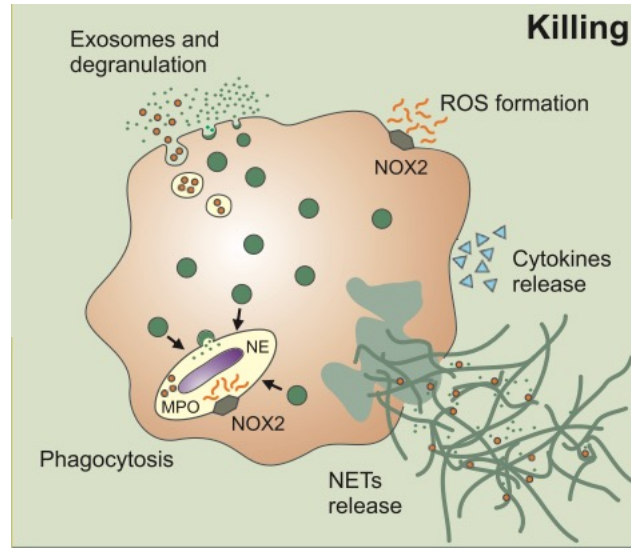
I granuli sono formati dalla fusione di vescicole che gemmano dal Golgi. Sono inoltre presenti delle vescicole secretorie che derivano dalla membrana plasmatica e che sono ricche in integrine e subunità p91 e p22 della NADPH ossidasi, recettori per il C3b del complemento e per l'Fc delle immunoglobuline .

Meccanismi di azione delle proteine antimicrobiche dei neutrofilii

Table 1 Mechanism of action of neutrophil antimicrobial proteins

Antimicrobial peptide	Antimicrobial mechanism ^a
Cationic antimicrobial peptides	
α -defensins (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Permeabilize membrane bilayers containing negatively charged phospholipids ■ Inhibit DNA, RNA as well as protein biosynthesis ■ Inhibition of bacterial cell wall synthesis
LL-37	Transmembrane pore-forming
BPI Bactericidal permeability increased protein	Increase bacterial permeability and hydrolysis of bacterial phospholipids by binding to LPS
Histones	Unknown mechanism
Proteolytic enzymes	
Lysozyme	Degrades bacterial cell wall
Proteinase 3 (PR3)	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Neutrophil elastase (NE), cathepsin G (CG)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cleaves bacterial virulence factors and outer membrane proteins ■ Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Azurocidin	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Metal chelator proteins	
Lactoferrin	<ul style="list-style-type: none"> ■ Alters bacterial growth by binding to iron, an essential bacterial nutrient ■ Binds to the lipid A part of LPS, causing a release of LPS from the cell wall and an increase in membrane permeability
Calprotectin	Alters bacterial growth by sequestering manganese and zinc

Meccanismi di uccisione dei neutrofili



I neutrofili utilizzano diversi meccanismi per eliminare gli agenti infettivi nel fagosoma:

- Produzione delle specie reattive dell'ossigeno
- Rilascio dei peptidi e degli enzimi all'interno del fagosoma
- Esocitosi dei granuli all'esterno della cellula
- Rilascio di NET (Neutrophil Extracellular Trap)

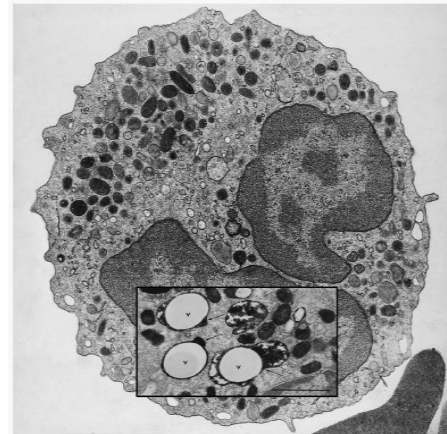
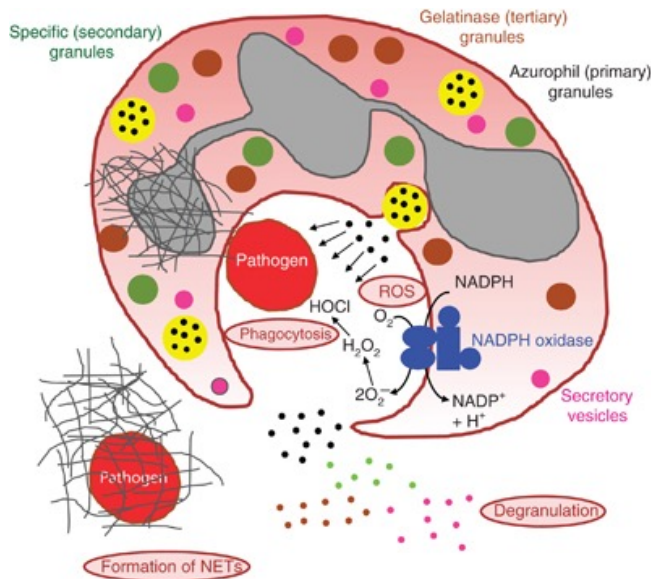
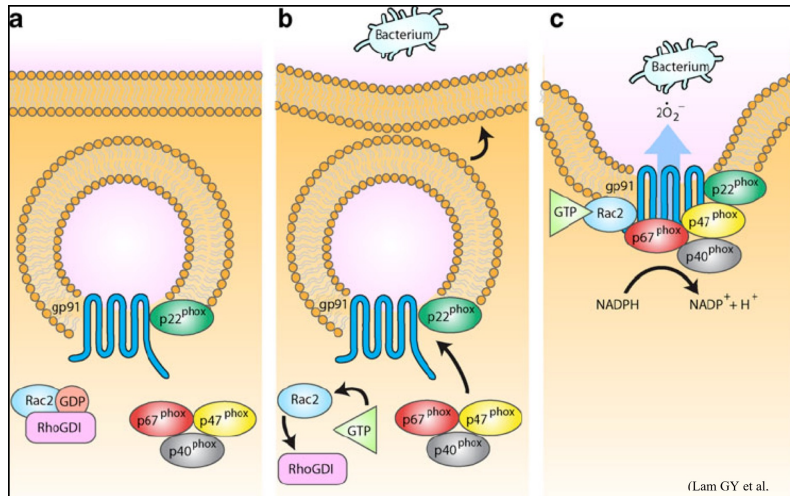


Figure 1. Transmission electron micrograph of a human neutrophil. Inset is an image taken from a neutrophil 20 s after the phagocytosis of latex particles opsonized with IgG (V, vacuole). The section was stained for myeloperoxidase (MPO) to reveal the electron-dense product in the azurophil granules, some of which can be seen degranulating into the phagocytic vacuole (arrows). Bar = 1 μ m. (Figure from 17.)

I ROS generati dalla NADPH ossidasi sono tossici per i patogeni



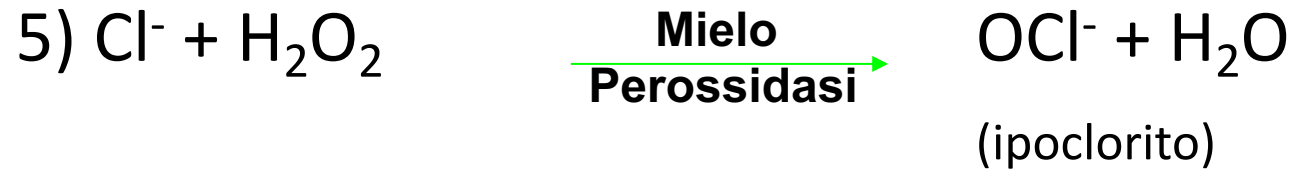
L'NADPH ossidasi media la generazione delle specie reattive dell'ossigeno. L'NADPH ossidasi converte NADPH a NADP+ liberando elettroni che all'interno del fagosoma reagiranno con l'O₂ generando ioni superossido. Questa reazione nei neutrofili prende il nome di esplosione respiratoria (respiratory burst).

NOX2 è un complesso multiproteico composto da due proteine di membrana gp91phox and gp22phox e 4 subunità citoplasmatiche: p40phox, p47phox, p67phox, e la piccola GTPase Rac2. In seguito ad attivazione dei neutrofili p47 fosforilato si associa a p22 mediando l'assemblaggio del complesso.

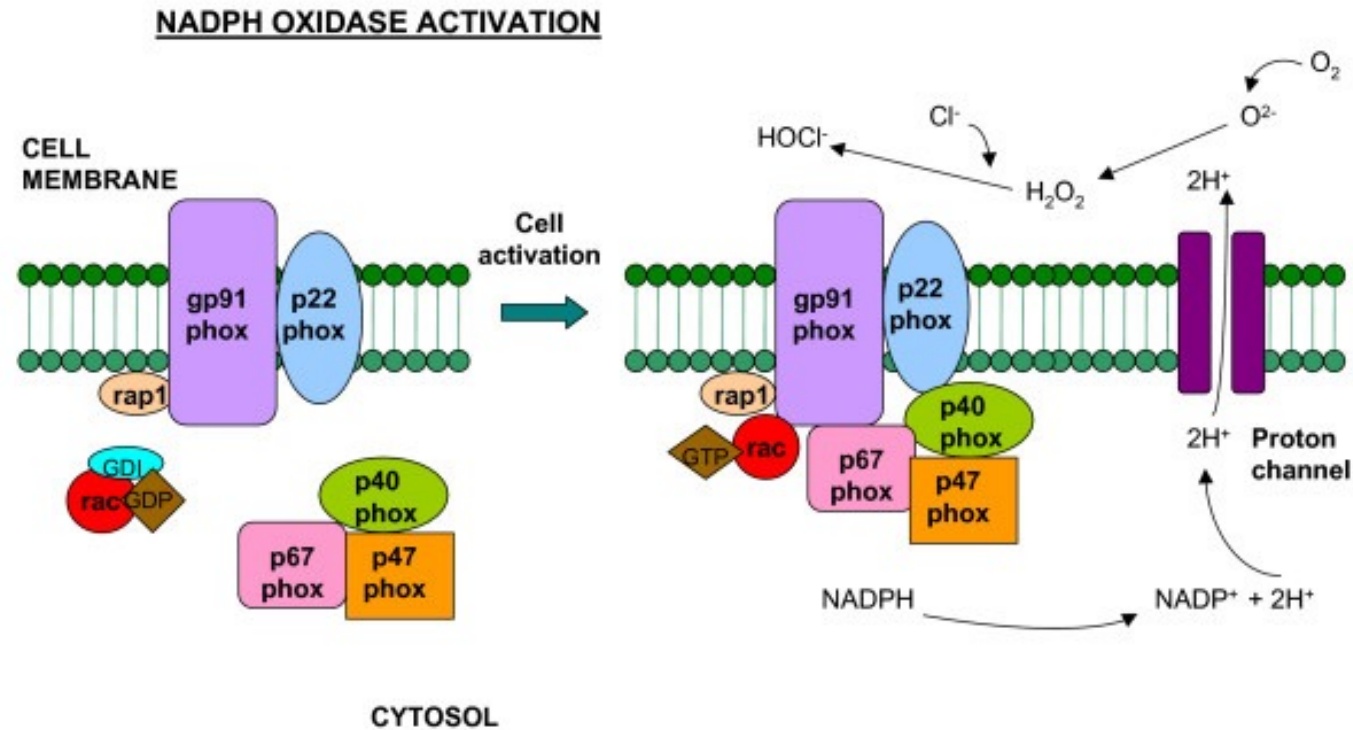
L'attivazione del complesso richiede il reclutamento di RacGTP alla membrana.

Gp91phox e gp22phox nei neutrofili sono localizzate nelle membrane dei granuli secondari e terziari e sulla membrana plasmatica.

ESPLOSIONE RESPIRATORIA

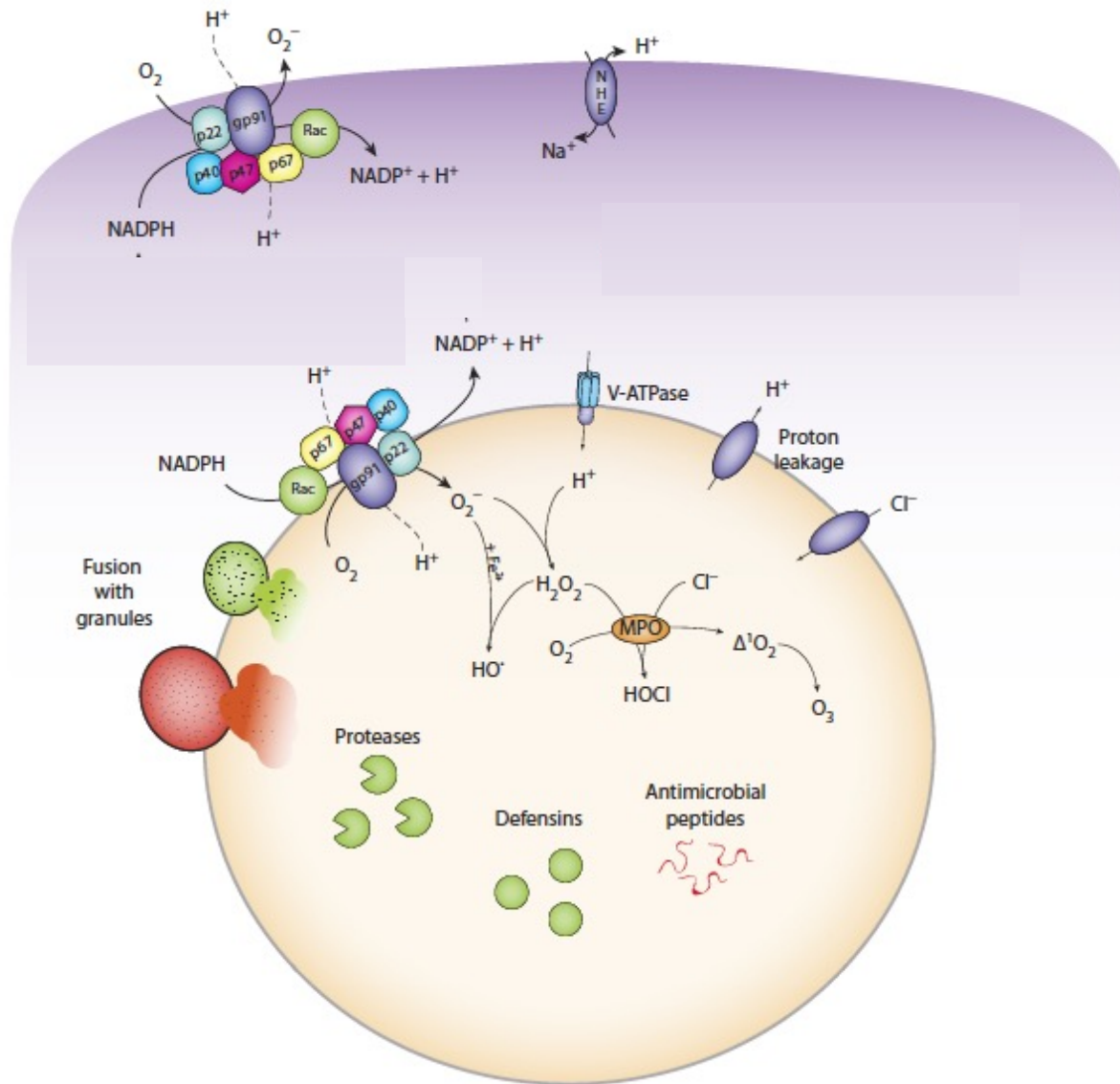


La mieloperossidasi media la produzione di acido ipocloroso (HOCl) nei neutrofili



La mieloperossidasi utilizza H₂O₂ + Cl⁻ per generare acidi ipoalogenati (acido ipocloroso)

Le proteasi contribuiscono all'uccisione dei patogeni da parte dei neutrofili

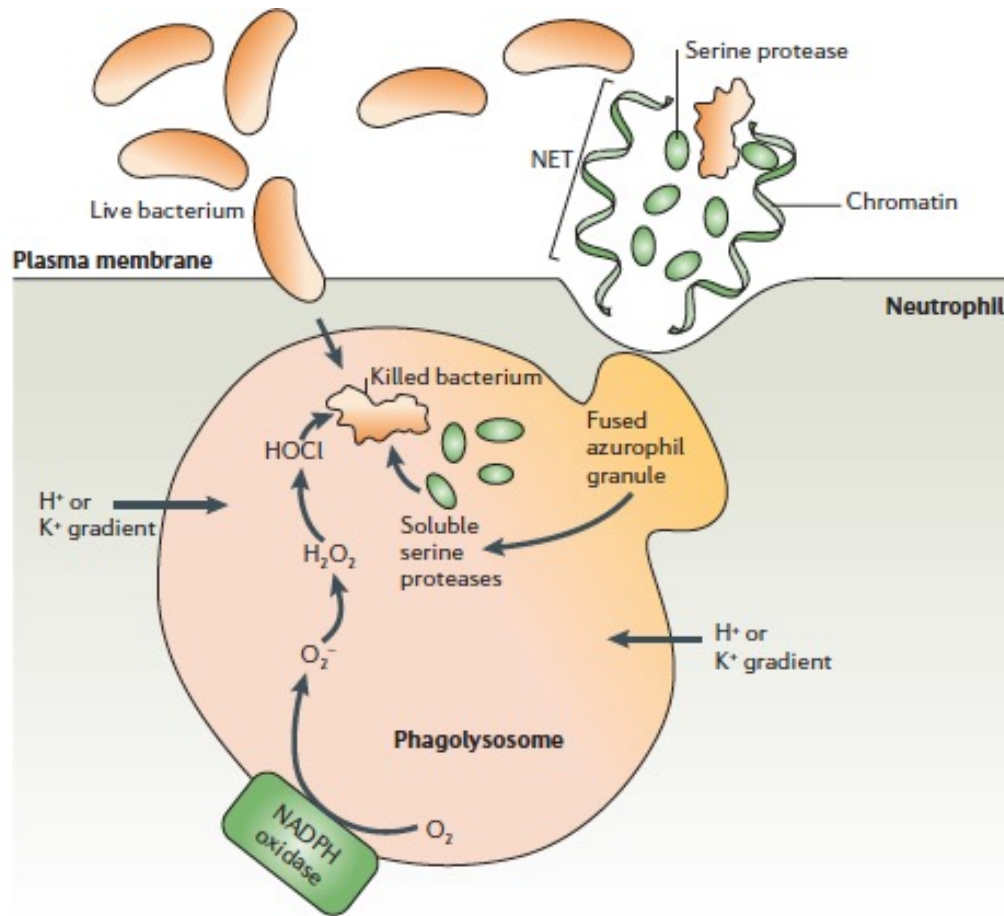


Una combinazione di ROS e proteasi è necessaria per eliminare i patogeni.

I topi deficienti nella elastasi dei neutrofili (NE) sono suscettibili alle infezioni da parte di batteri gram negativi (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*) e da parte di *C. albicans*.

Difetti di NE e catepsina G rendono i topi suscettibili ad infezioni da parte di diversi microrganismi.

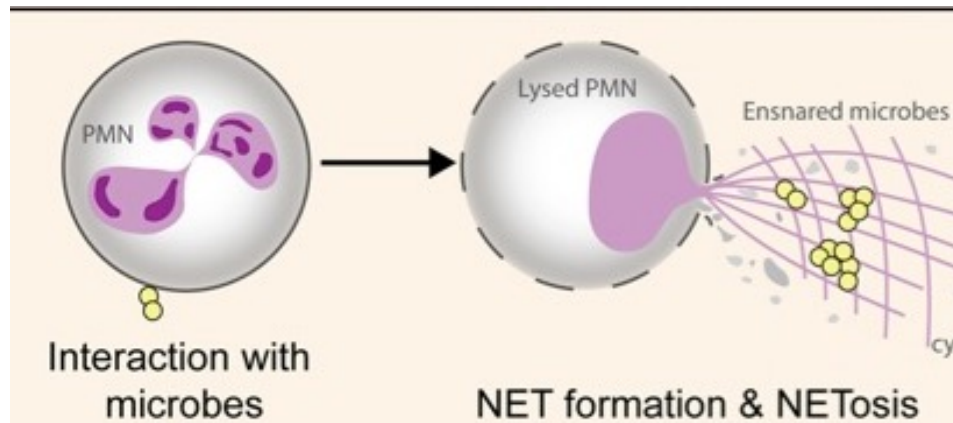
Maturazione del fagosoma nei neutrofili



La fusione con i granuli specifici è necessaria per la generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno del fagosoma infatti nelle membrane dei granuli secondari, terziari e sulle vescicole secretorie sono presenti le componenti gp91phox/p22phox dell'NADPH ossidasi.

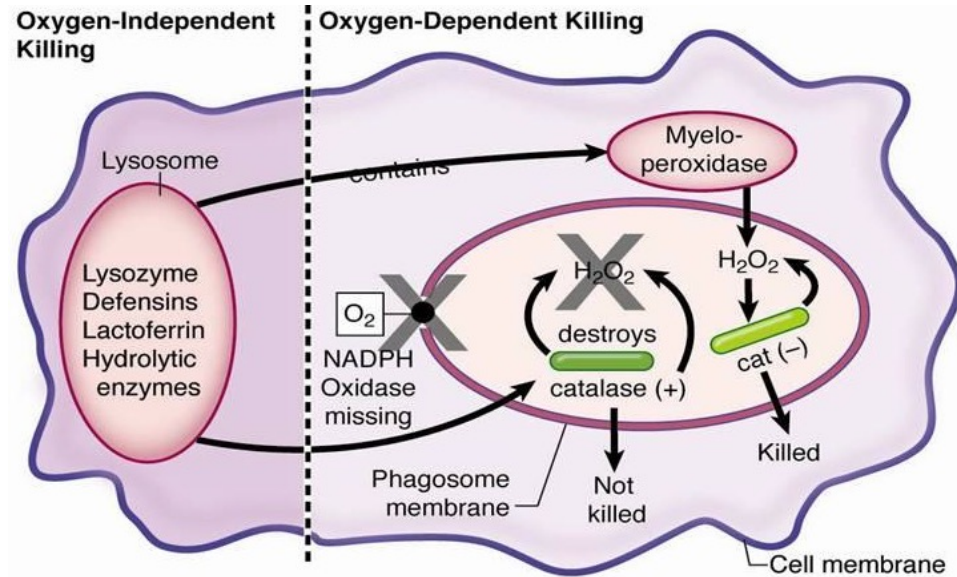
Neutrophil extracellular Traps

I neutrofili estendono la loro attività microbica anche nel processo di morte. Questi infatti vanno incontro a NETosis, una forma attiva di morte in cui i nuclei si rigonfiano e rilasciano la cromatina decondensata. I Net sono una struttura fibrosa costituita da istoni, proteine antimicrobiche (defensine, elastasi, proteasi catepsine...) e proteine citoplasmatiche associate a cromatina decondensata.



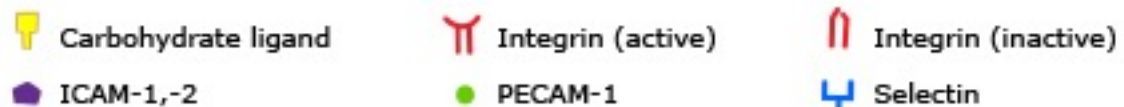
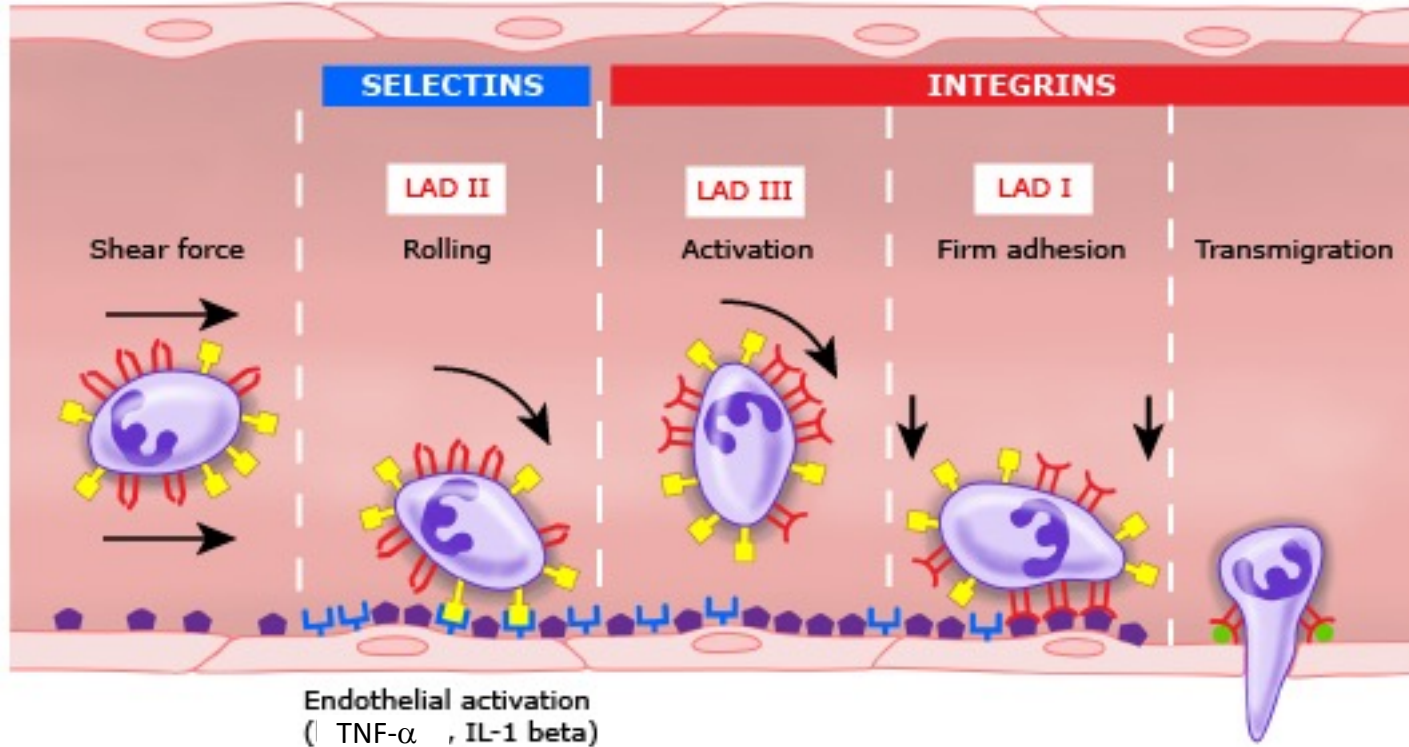
I Net intrappolano i microrganismi e si pensa ne medino l'uccisione esponendoli ad alte concentrazioni di molecole antimicrobiche.

Difetti nel burst ossidativo sono responsabili del Chronic granulomatous disease



Il CGD è una malattia genetica rara dovuta prevalentemente a difetti dei neutrofili. Questa malattia è causata da mutazioni in uno dei geni che codificano le componenti dell'ossidasi fagocitica. Può avere una trasmissione legata al cromosoma X o autosomica recessiva. I pazienti affetti da questa malattia non sono in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno in risposta a infezioni batteriche o fungine. La maggior parte delle infezioni in questi pazienti sono causate da *S. aureus*, *Burkholderia cepacia complex*, *Aspergillus*. Le infezioni interessano la pelle, polmoni, l'intestino.

Difetti nella adesione dei leucociti causano malattia



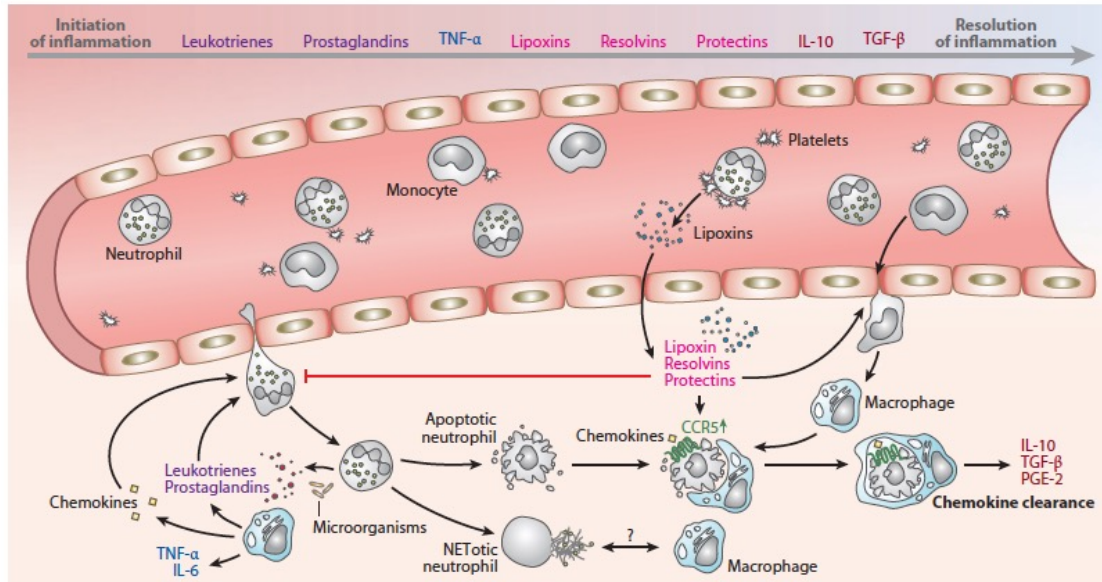
L'incapacità dei neutrofili di migrare ai siti di infezione determinando lo sviluppo di gravi infezioni e di malattie gravi è dovuta a difetti in molecole essenziali nella extravasazione dei neutrofili.

LAD I: malattia autosomica recessiva causata da mutazioni a carico della catena β_2 delle integrine (LFA1, Mac-1).

LAD II: difetto del tetrasaccaride Sialil-Lewis X che causa un difetto di rolling dei leucociti all'endotelio. Mutazione del gene che codifica per la proteina che media il trasporto del Fucosio nel Golgi.

LADIII: difetto di molecole responsabili dell'attivazione delle integrine.

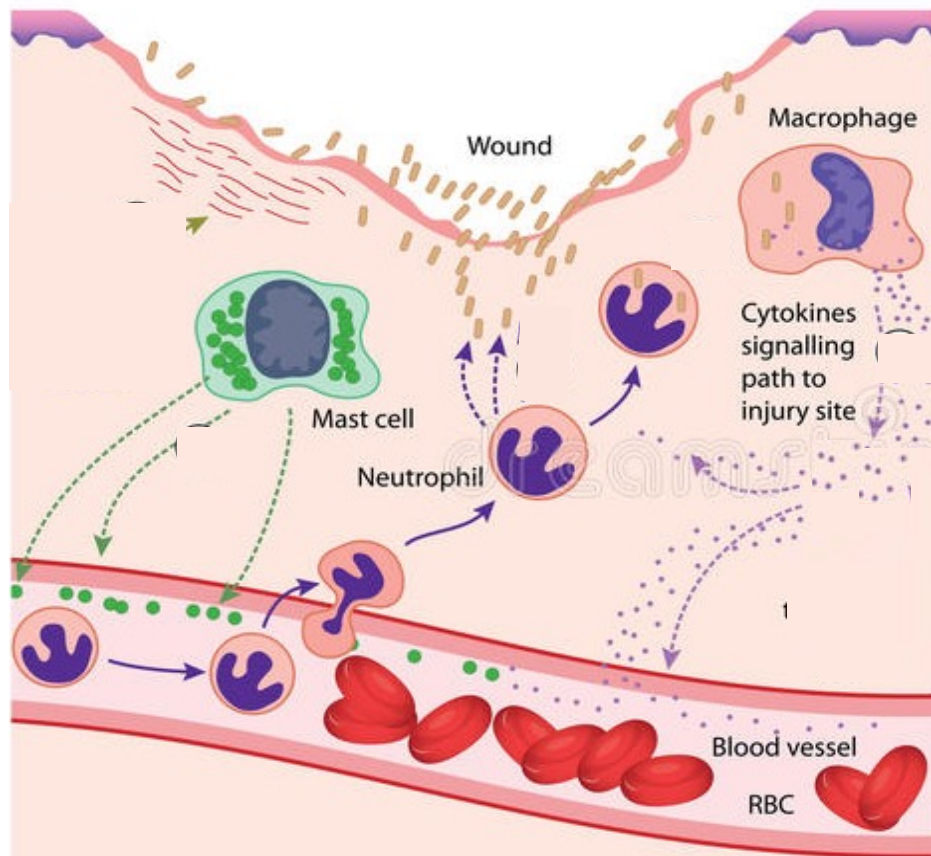
I neutrofili e la risoluzione dell'infezione



Durante le fasi precoci del processo infiammatorio i neutrofili producono leucotrieni e prostaglandine successivamente queste cellule smettono di produrre leucotrieni e producono lipossine e resolvine.

Dopo aver eseguito la loro funzione microbica i neutrofili vanno incontro a morte per apoptosi. La rimozione dei corpi apoptotici viene mediata dai macrofagi.

Cellule responsabili della produzione di citochine proinfiammatorie nel sito leso

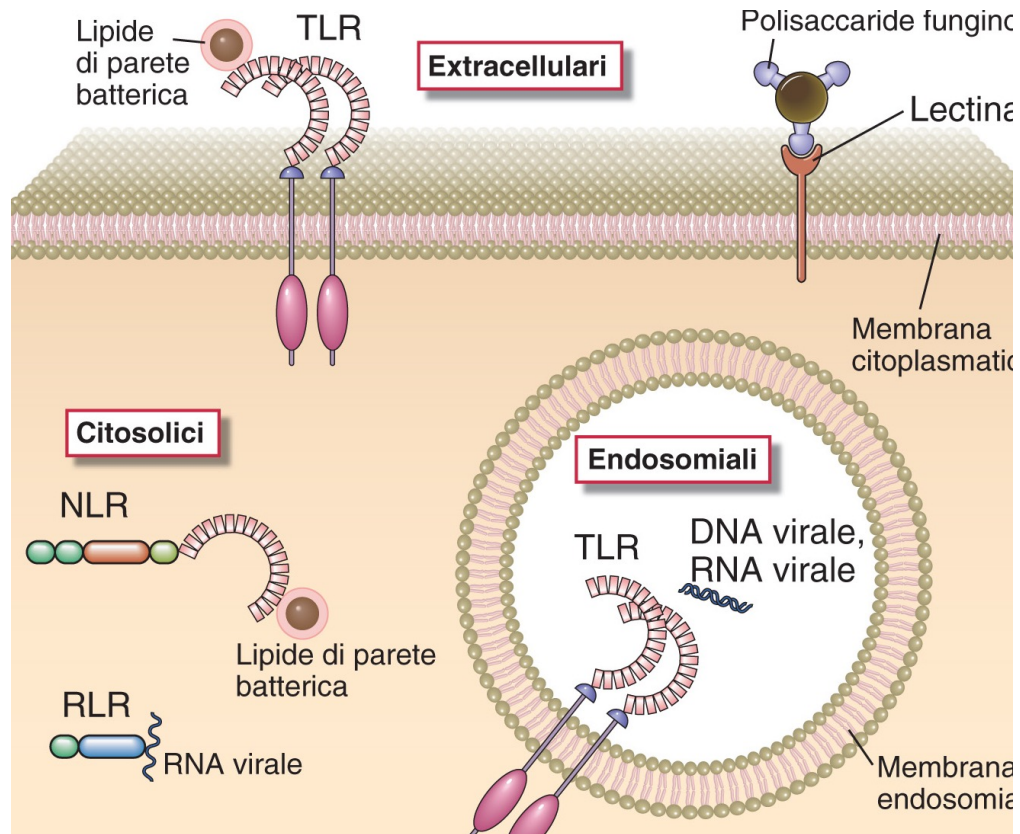


I macrofagi e le cellule dendritiche nel tessuto infetto o leso sono attivati dal riconoscimento di prodotti microbici o di danno tissutale e partecipano al processo infiammatorio attraverso la produzione di citochine e chemochine.

Le citochine e le chemochine rilevanti nella infiammazione acuta includono:

- TNF- α
- IL-1 β
- IL-6
- IL-8
- CCL2

La produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6) e IL-8 dipende dal riconoscimento di microrganismi e molecole del danno tissutale da parte dei macrofagi, mastociti e cellule dendritiche



Le cellule dell'immunità innata presentano recettori denominati PRR (Pathogen recognition receptor) deputati al riconoscimento di agenti infettivi (Pathogen associated molecular patterns =PAMPs) o sostanze rilasciate da cellule morte (Damage associated molecular patterns=DAMPs).

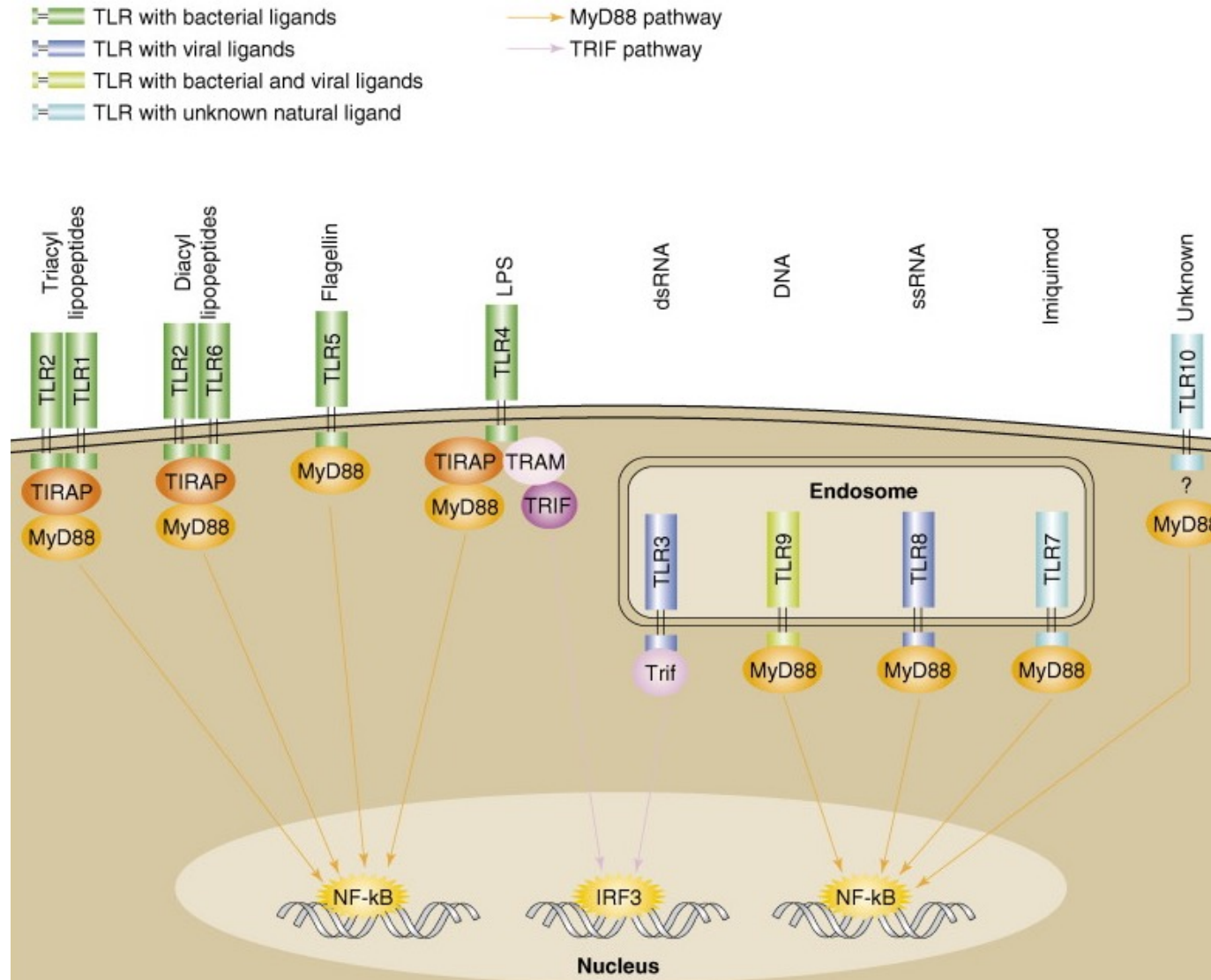
Questi includono:

I Toll like receptor (TLR)= TLR1-10 (uomo) e TLR 1-9, TLR11-13 (topo) =lipidi della parete batterica, flagellina, DNA batterico, RNA.

Nod like receptors (NLR)= più di 20 proteine espresse intracellularmente es NALP1-3 (lipoproteine)

RIG-I-like receptors (RLR)=RIG-1, MDA5, LGP2 (RNA virale)

I Toll Like Receptor umani



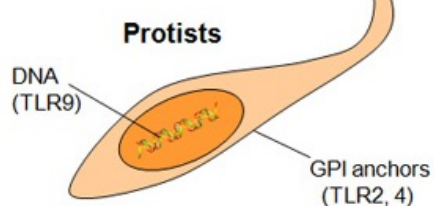
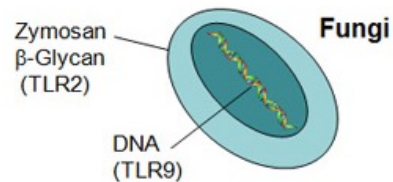
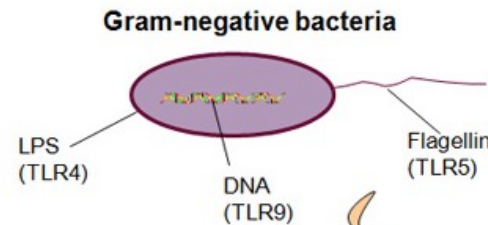
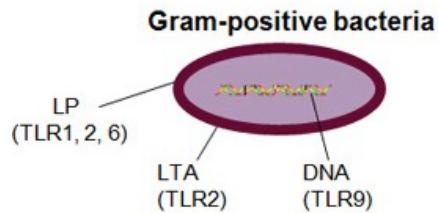
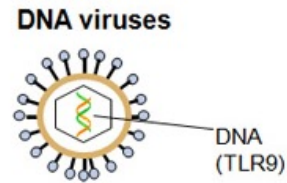
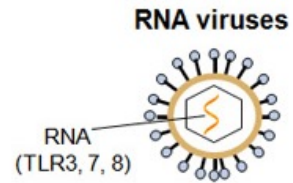
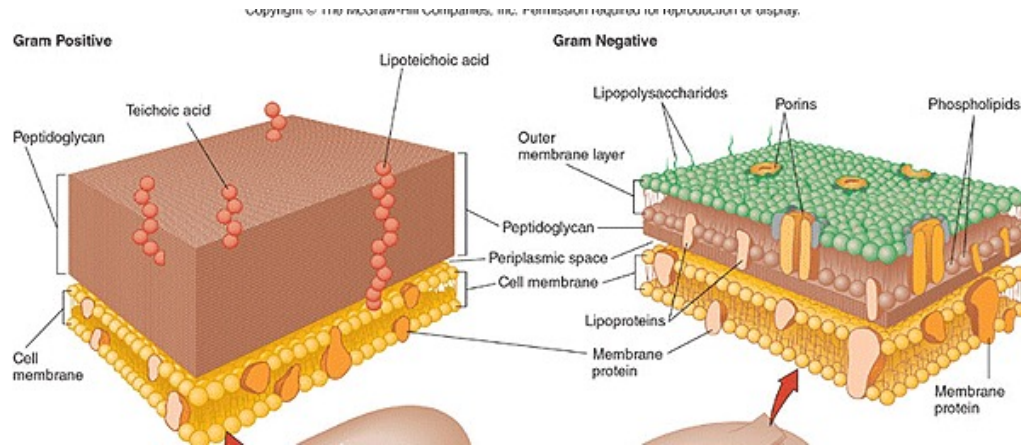
In base alla localizzazione i TLR possono essere distinti in TLR di membrana o presenti nelle vescicole intracitoplasmatiche quali gli endosomi.

Il TLR4 è stato il primo TLR descritto e si lega al Lipopolisaccaride una componente della membrana esterna dei batteri Gram-negativi.

TLR1-10 nell'uomo

TLR1-9 e **TLR11-13** nel topo

Specificità dei TLR



Il **TLR4** riconosce il lipopolisaccaride presente sulla parete dei batteri Gram negativi.

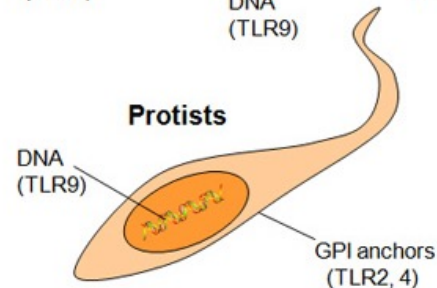
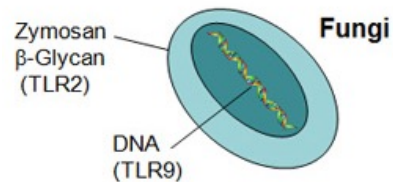
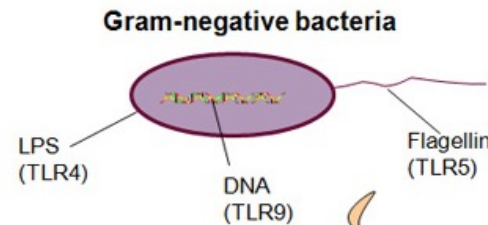
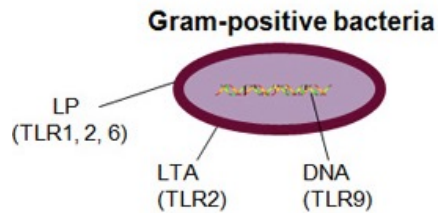
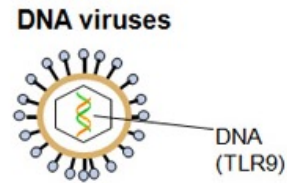
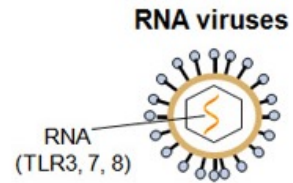
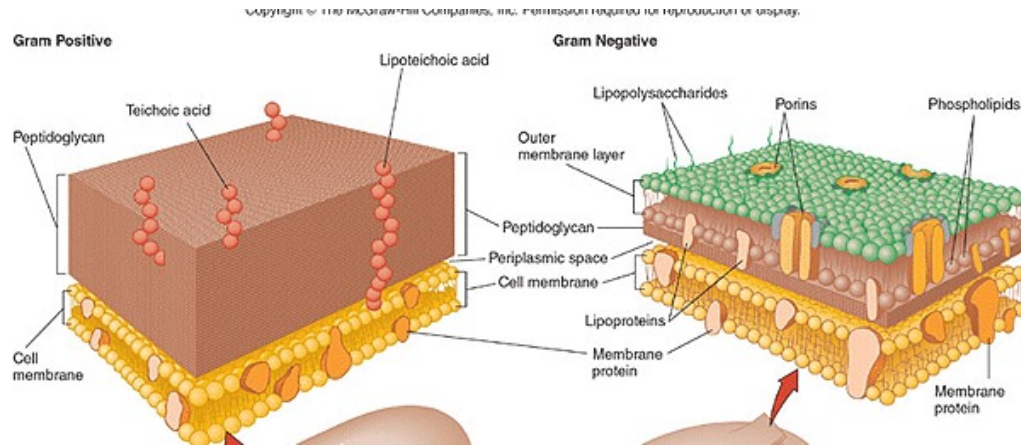
Il **TLR5** riconosce la flagellina

Il **TLR9** riconosce i motivi CpG non metilati di DNA frequenti nel DNA batterico e virale

Il **TLR3** riconosce l'RNA a doppio filamento

Il **TLR7** e il **TLR8** riconoscono l'RNA a singolo filamento

Specificità dei TLR



Il **TLR2** riconosce una vasta serie di PAMPs presenti nei batteri, funghi e parassiti che includono:

Lipopeptidi= batteri

Peptidoglicano e acido lipoteico= batteri Gram positivi

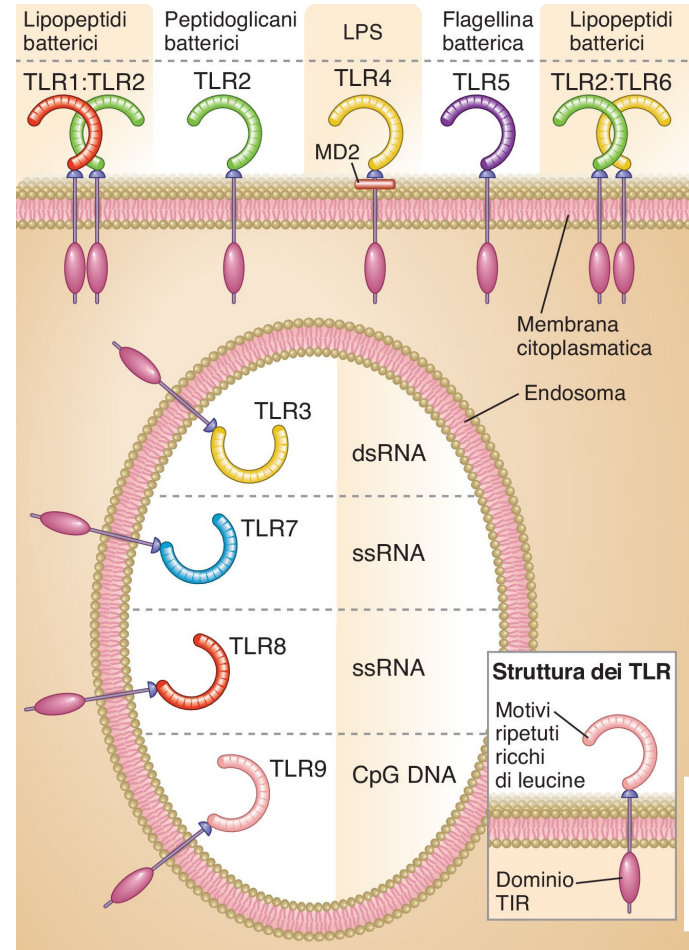
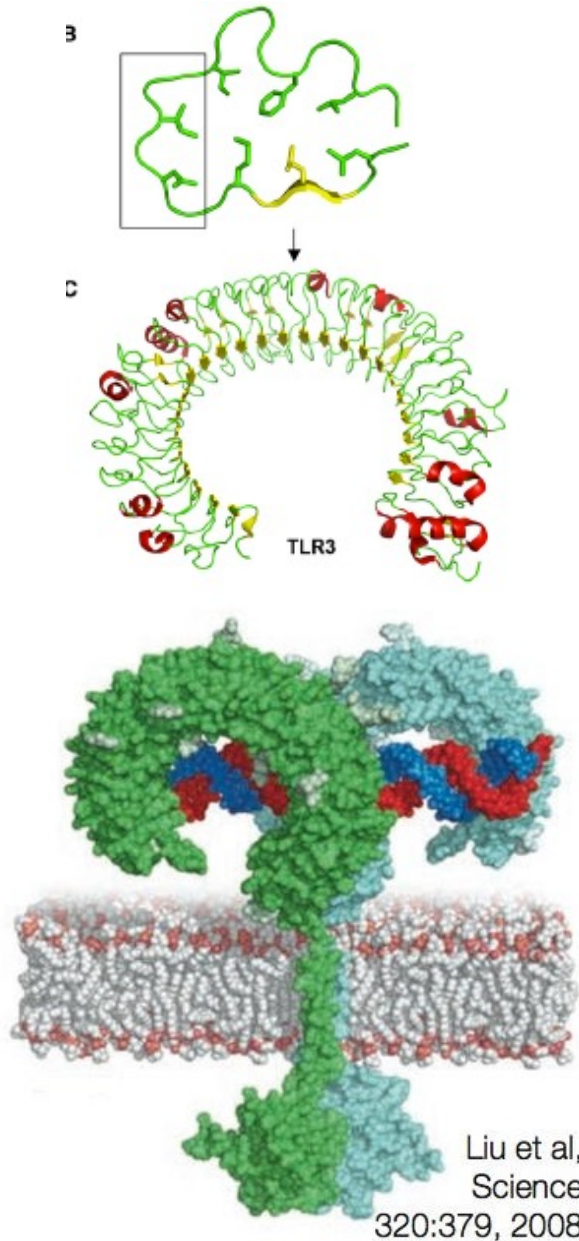
Lipoarabinomannano= micobatteri

Zimosano=funghi

TLR11= profilin nei protozoi

TLR13= RNA ribosomale batterico

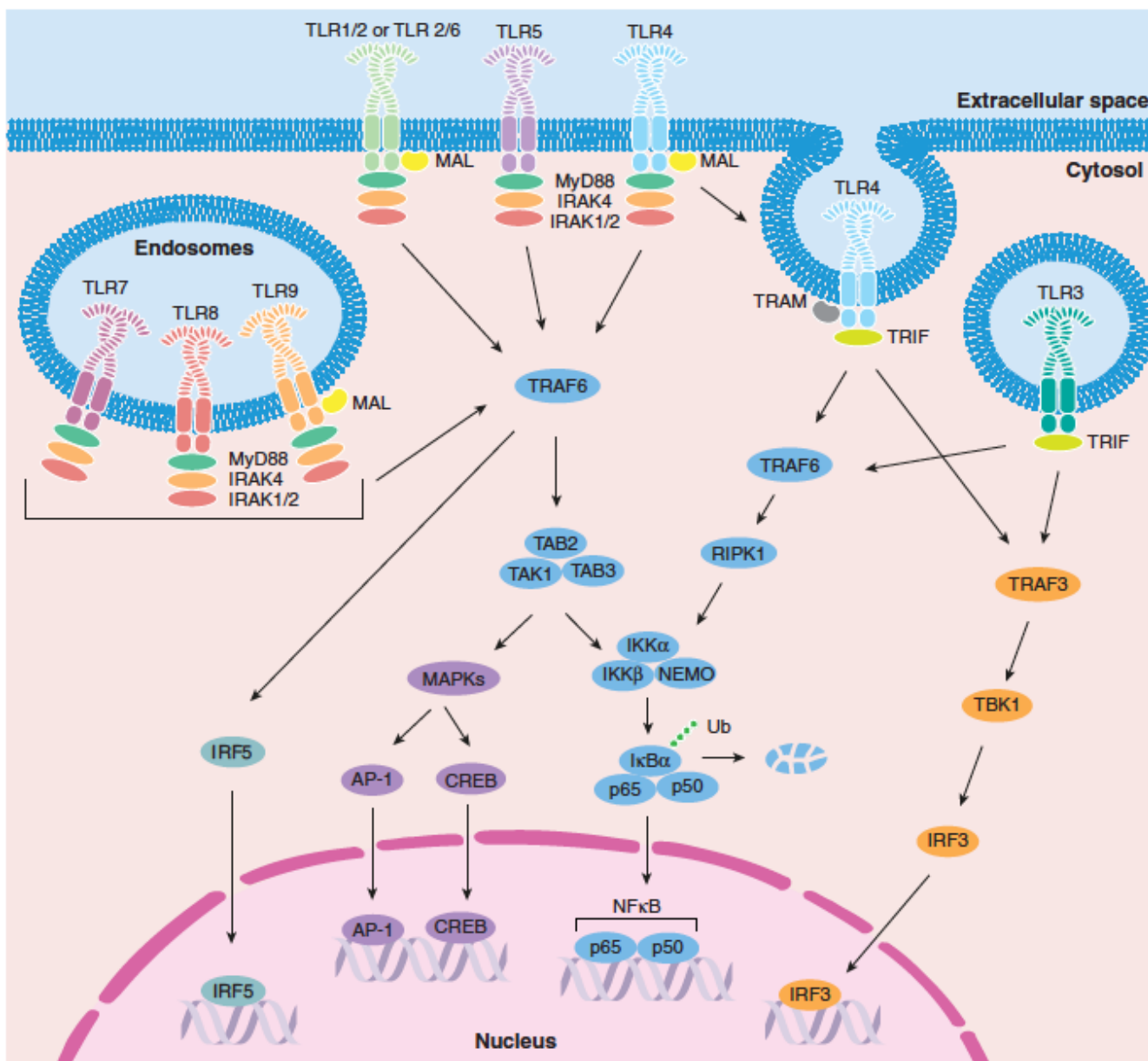
Struttura dei TLR



I toll like receptor sono glicoproteine integrali di membrana che presentano:

- nella regione extracellulare ripetizioni di sequenze ricche in leucina definite Leucin rich domain (**LRD**).
- una regione transmembrana
- nella regione intracitoplasmatica un dominio responsabile dell'attivazione cellulare definito **TIR** (Toll/IL-1 receptor homology domain)

Segnalazione da parte dei TLR

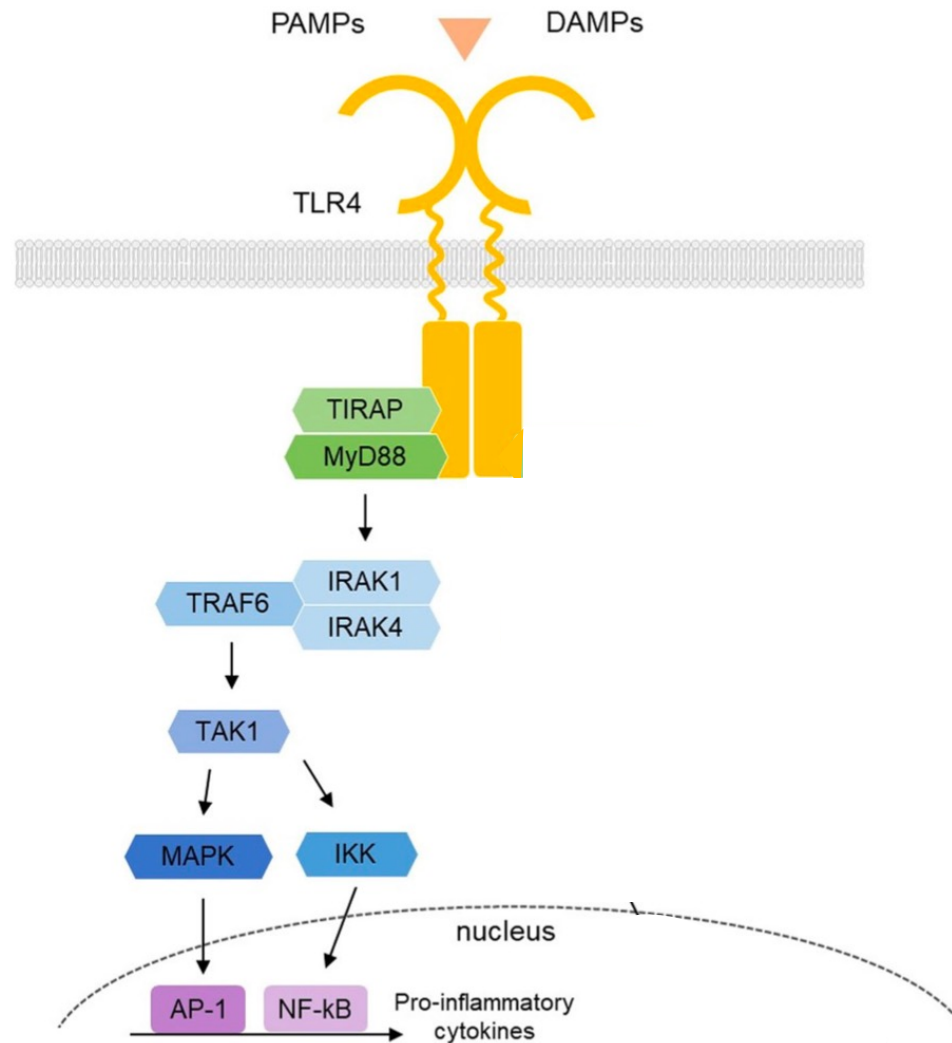


L'interazione fra il TLR con il suo ligando determina un cambiamento conformazionale nel dominio intracellulare TIR che induce il reclutamento di proteine adattatrici che legano il dominio intracitoplasmatico mediante l'interazione omotipica TIR-TIR. I TLR trasducono il segnale mediante due vie principali.

- **MyD88** → porta alla produzione di citochine infiammatorie
- **TRIF** → induce l'espressione degli interferoni di tipo I (IFN α/β)

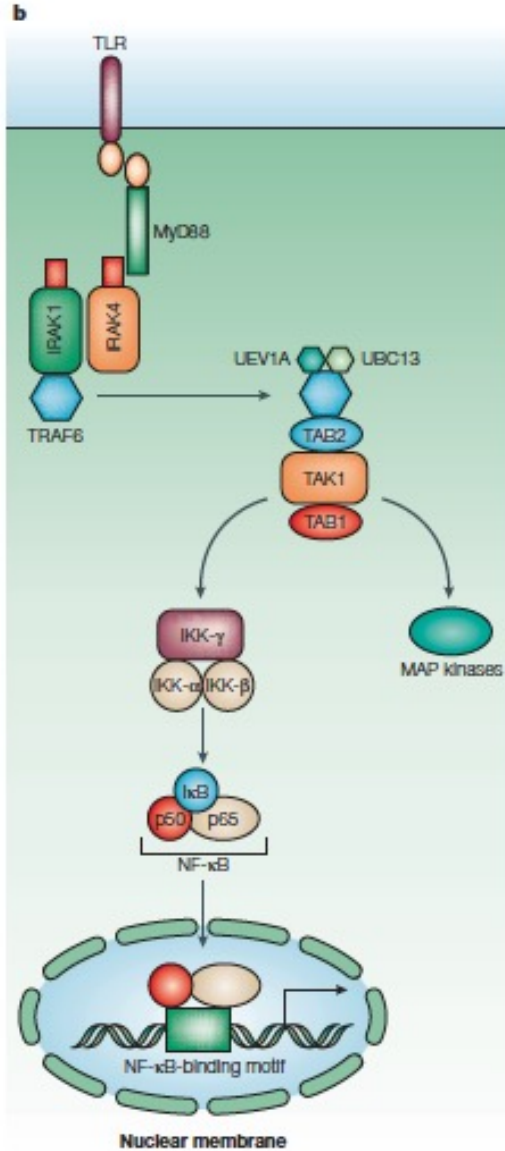
Tutti i TLR trasducono il segnale attraverso un meccanismo che utilizza MyD88 tranne il TLR3 che utilizza esclusivamente TRIF.

Via di segnalazione del TLR4



In seguito all'interazione del TLR con il ligando, MyD88 viene reclutato al recettore attraverso il dominio TIR. MyD88 contiene oltre al dominio TIR un Death domain (DD) che permette l'interazione con le serin/treonin chinasi della famiglia IRAK (IL-1 receptor associated Kinase, IRAK1 e IRAK4).

Il complesso così formato induce l'associazione e l'attivazione della E3 ubiquitina ligasi TRAF6 che si complessa con il complesso costituito da TAK1 (TGF-β activated kinase) e TAB2/3 stimolando l'attivazione dell'IκB kinase complex (IKK complex) che degrada l'inibitore di NF-κB permettendo al dimero p50/p65 di traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione.

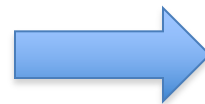


La cascata di trasduzione del segnale dipendente da MyD88 culmina nella attivazione della chinasi TAK1 che attiva NF- κ B e la via delle MAPK (mitogen activated protein kinase). La via delle MAP chinasi cumina con l'attivazione di fattori trascrizionali quali AP1.

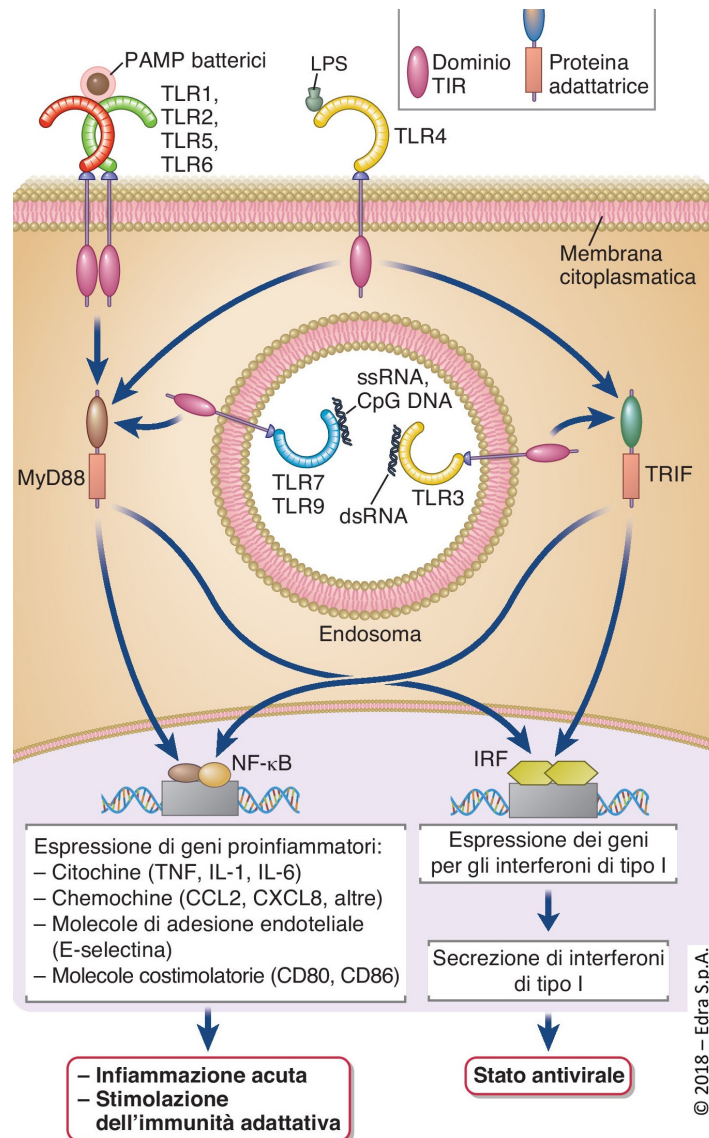
NF- κ B e fattori trascrizionali attivati dalle MAPK mediano la trascrizione delle citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β) e delle chemochine (IL-8, MCP-1).

Espressione di geni proinfiammatori:

- Citochine (TNF, IL-1, IL-6)
- Chemochine (CCL2, CXCL8, altre)
- Molecole di adesione endoteliale (E-selectina)
- Molecole costimolatorie (CD80, CD86)



Vie di trasduzione del segnale e funzioni dei TLR



La cascata di trasduzione dipendente da MyD88 culmina nella attivazione di NF-κB e delle MAPK.

NF-κB e i fattori trascrizionali attivati dalle MAPK mediano la trascrizione delle citochine proinfiammatorie (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-1β) e delle chemochine (IL-8, MCP-1).

004.003.07002347010.sp
 Immunologia cellulare e molecolare (10a edizione)
 Vie di trasduzione del segnale e funzioni dei TLR 1, 2, 5 e 6 allungano la cascata adattativa MyD88 e attivano il fattore trascrizionale NF-κB e AP-1. TLR3 utilizza l'adattatore TRIF e attiva il fattore trascrizionale IRF3 e IRF7. TLR4 può attivare entrambe le vie. TLR7, TLR9 utilizzano MyD88 all'interno dell'endosoma e attivano sia NF-κB che IRF3/IRF7. IRF3, insieme a IRF7 (Interferon-β/γ Regulatory Factor) formano il complesso di regolazione del interferone. NF-κB Nuclear-κB Factor-β/γ. IRF3 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ. IRF7 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ. NF-κB Nuclear-κB Factor-β/γ. IRF3 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ. IRF7 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ. NF-κB Nuclear-κB Factor-β/γ. IRF3 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ. IRF7 Interferon-β/γ Nuclear-β/γ.

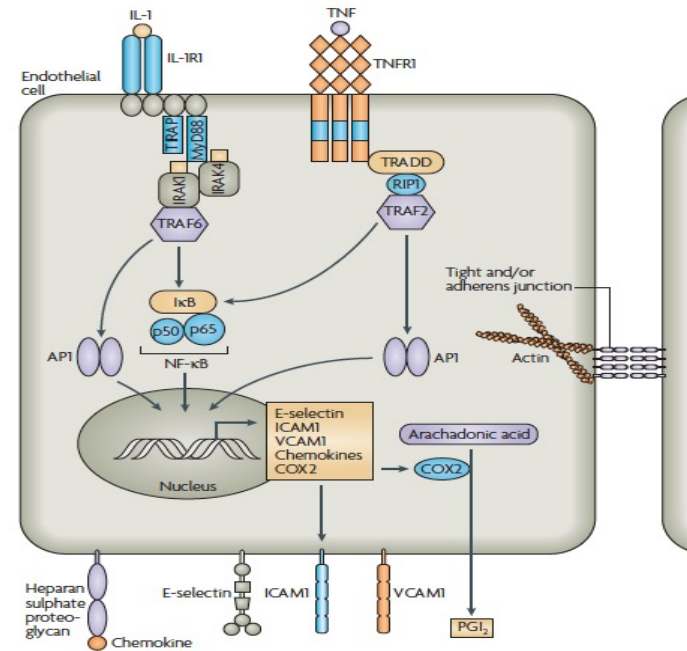
Le principali citochine pro-infiammatorie: TNF- α , IL-1, IL-6



Il **TNF- α** è sintetizzato come proteina omotrimerica di membrana non glicosilata. Il taglio della forma di membrana causa il rilascio di frammenti polipeptidici tre dei quali polimerizzano.

Esistono due tipi di recettori per il TNF- α (TNFR1 e TNFR2) che sono espressi su quasi tutti i tipi cellulari. L'interazione del TNF- α oltre a portare all'attivazione di NF- κ B può causare morte cellulare. Nel processo infiammatorio attiva l'endotelio inducendo l'espressione di molecole di adesione e la produzione di eicosanoidi e chemochine.

Il TNF- α è prodotto principalmente dai macrofagi e dai monociti.

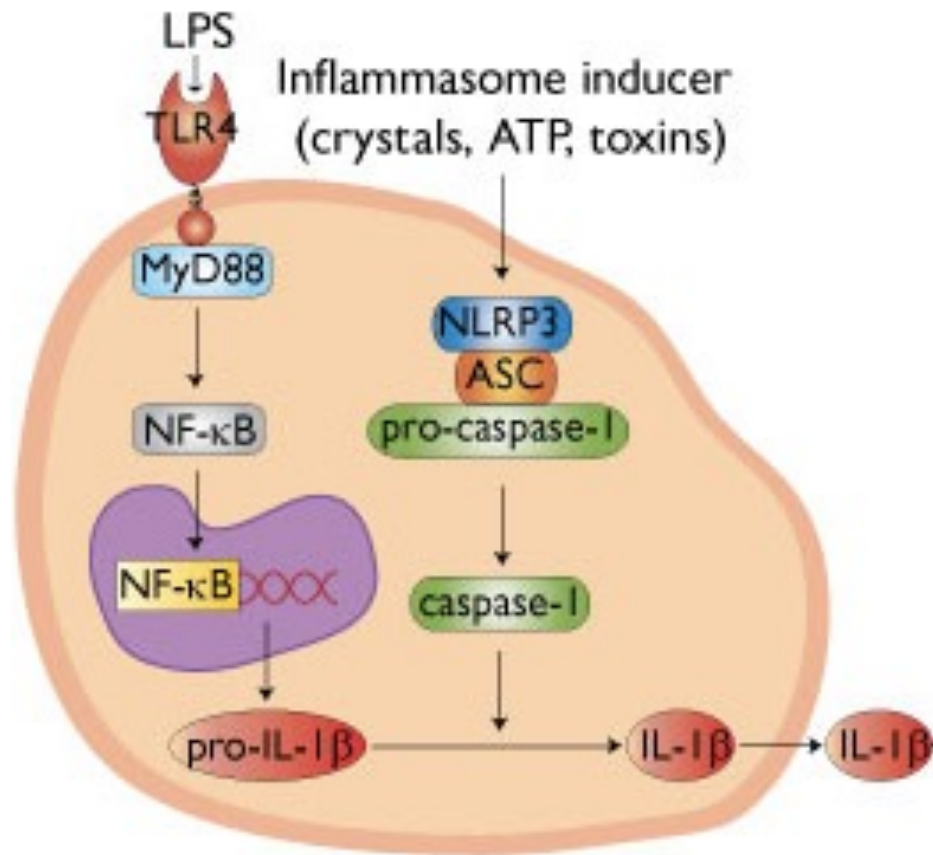


L'**IL-1** viene prodotta da molti tipi cellulari.

Esistono due forme: IL-1 α e IL-1 β . La principale forma prodotta è l'IL-1 β che ha bisogno di due segnali per essere prodotta: stimolazione del TLR e attivazione dell'inflammasoma per attivare la caspasi che effettua un taglio nella pro-IL-1 β . Nell'infiammazione ha ruoli simili al TNF- α .

IL-6 stimola la produzione dei neutrofili nel midollo. Induce la sintesi delle proteine di fase acuta nel fegato.

La forma attiva dell'IL-1 β dipende anche dall'attivazione dei Nod like receptors NLRP (NLR family, Pyrin-Domain-Containing –Proteins)



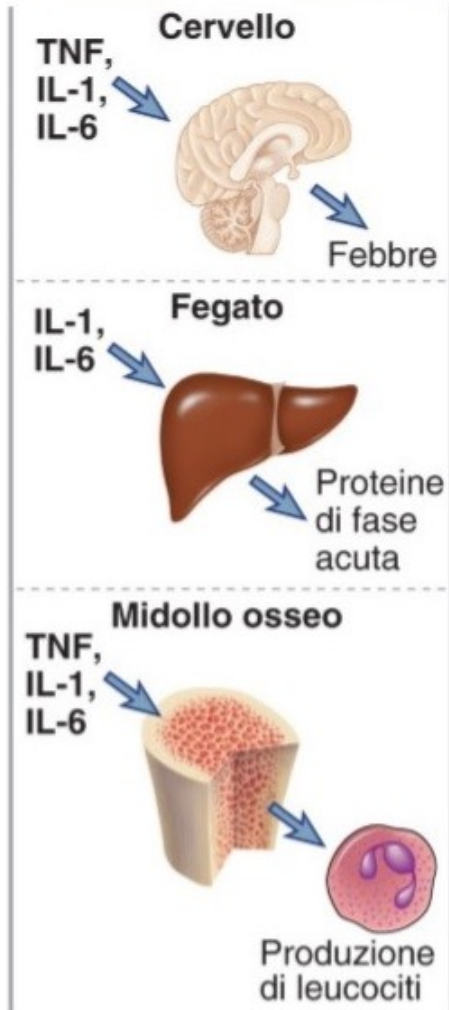
IL-1 β è espressa come precursore pro-IL1 β e la sua attivazione richiede la processazione da parte della caspasi 1. Le molecole NLRP in seguito ad attivazione formano complessi multimolecolari definiti inflammasoma in cui viene reclutata la cistein proteasi caspasi-1 responsabile dell'attivazione dell'IL-1 β . Il reclutamento della cistein proteasi avviene attraverso l'adattatore ASC.

IL-6



- Stimola la produzione di neutrofili nel midollo
- Induce la sintesi delle proteine di fase acuta nel fegato
- Promuove il differenziamento dei linfociti T CD4+
- Induce la proliferazione di altre cellule (cheratinociti)

Effetti sistemici protettivi



Effetti sistemici dell'inflammatione

Gli effetti sistemici dell'inflammatione sono definiti reazione di fase acuta e sono mediati principalmente dal TNF- α , l'IL-1 β e l'IL-6. Queste citochine oltre ad agire localmente sono rilasciate a livello sistemico.

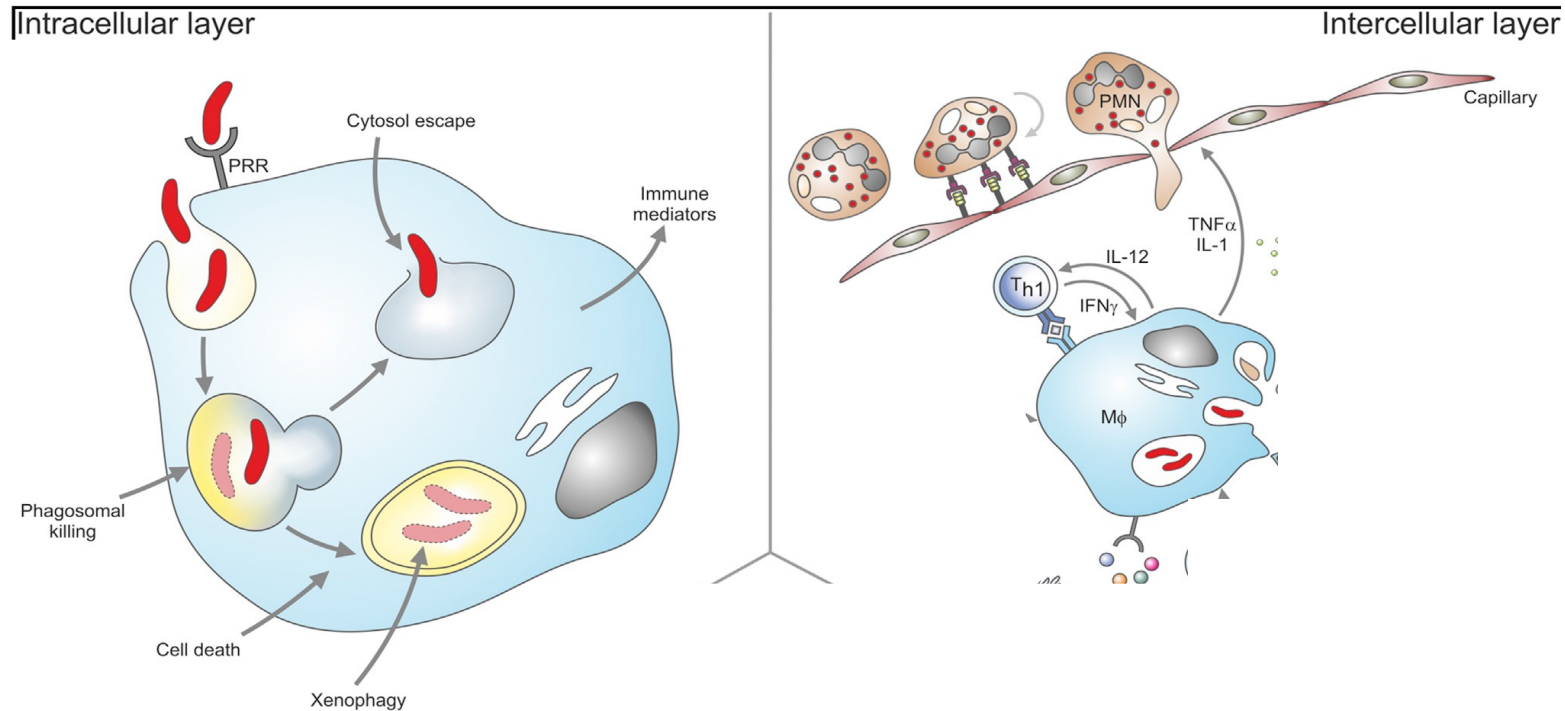
La risposta di fase acuta è costituita da:

- **febbre.** L'IL-1 β e il TNF- α stimolano la sintesi di prostaglandine aumentando i livelli di ciclossigenasi nelle cellule vascolari e perivascolari dell'ipotalamo. Nell'ipotalamo le prostaglandine, specialmente la PGE₂, stimolano la produzione di neurotrasmettitori che regolano la temperatura corporea.
- **aumento dei livelli plasmatici delle proteine di fase acuta.** La concentrazione di alcune proteine plasmatiche può aumentare di centinaia di volte nell'inflammatione acuta. Tra queste le più note sono la proteina C-reattiva (PCR), il fibrinogeno e la proteina sierica A. L'IL-6 stimola la produzione di queste proteine da parte degli epatociti. Il fibrinogeno si lega agli eritrociti determinando la formazione di ammassi di eritrociti che sedimentano più velocemente. In questo modo si misura la VES. Misurazioni della VES e dei livelli di PCR sono utilizzate per valutare la presenza di inflammatione.
- **leucocitosi.** L'aumento del numero di leucociti in circolo è dovuto al rilascio di cellule dal midollo osseo. La popolazione cellulare che risulta aumentata è determinata dal tipo di infezione es: neutrofili in infezioni batteriche.

Funzione delle citochine pro-infiammatorie

Citochina	Dimensione	Principale fonte cellulare	Principali bersagli cellulari
Fattore di necrosi tumorale (TNF- α)	17kD secreto come omotrimerico	Macrofagi	Cellule endoteliali: attivazione Neutrofili: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Interleuchina-1 β (IL-1 β)	Forma matura 17 kD precursore 33 kD	Macrofagi, cellule endoteliali, alcune cellule epiteliali	Cellule endoteliali: attivazione Ipotalamo: febbre Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Interleuchina-6 (IL-6)	19-26 kD	Macrofagi, cellule endoteliali	Fegato: sintesi di proteine di fase acuta
Chemochine	8-12kD	Macrofagi, cellule endoteliali	Leucociti: attivazione, migrazione nei tessuti

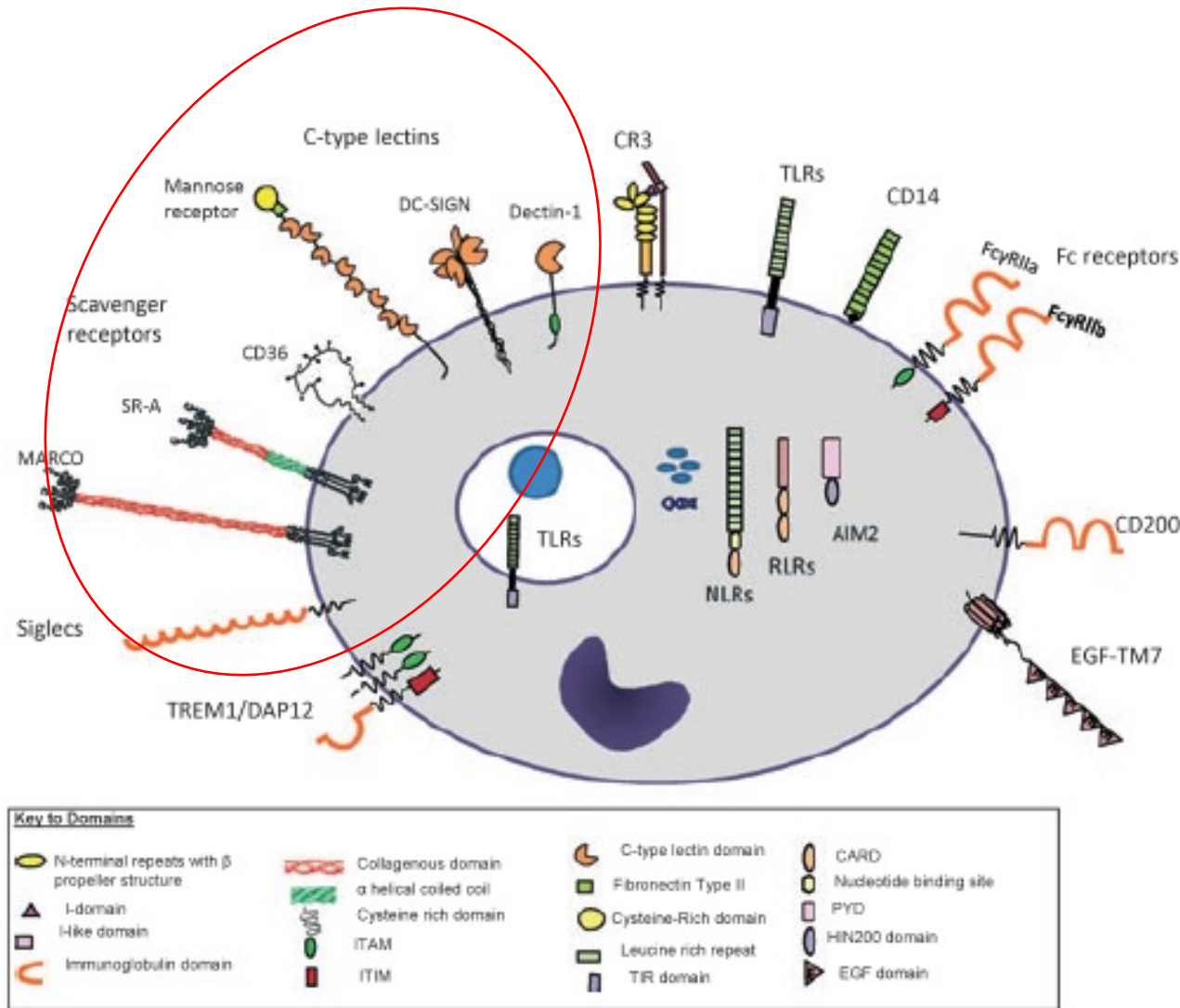
Funzioni difensive mediate dai macrofagi nelle infezioni microbiche



Nel corso delle infezioni microbiche i macrofagi esplicano le funzioni difensive a diversi livelli.
a livello intercellulare: secernono mediatori in grado di reclutare i leucociti aumentando la risposta difensiva contro i patogeni.

a livello cellulare: captano e distruggono i microrganismi

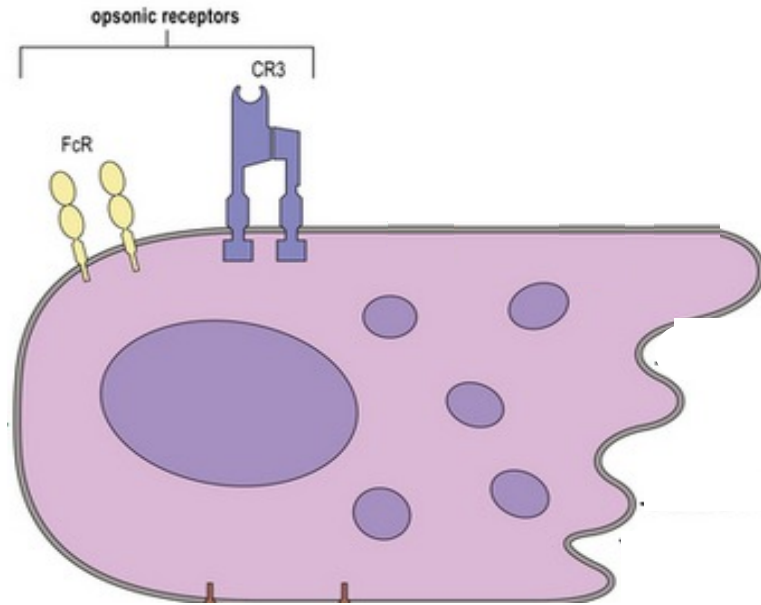
Recettori deputati al riconoscimento dei microorganismi da parte dei macrofagi



I macrofagi esprimono diversi recettori deputati al riconoscimento dei patogeni. Questi includono

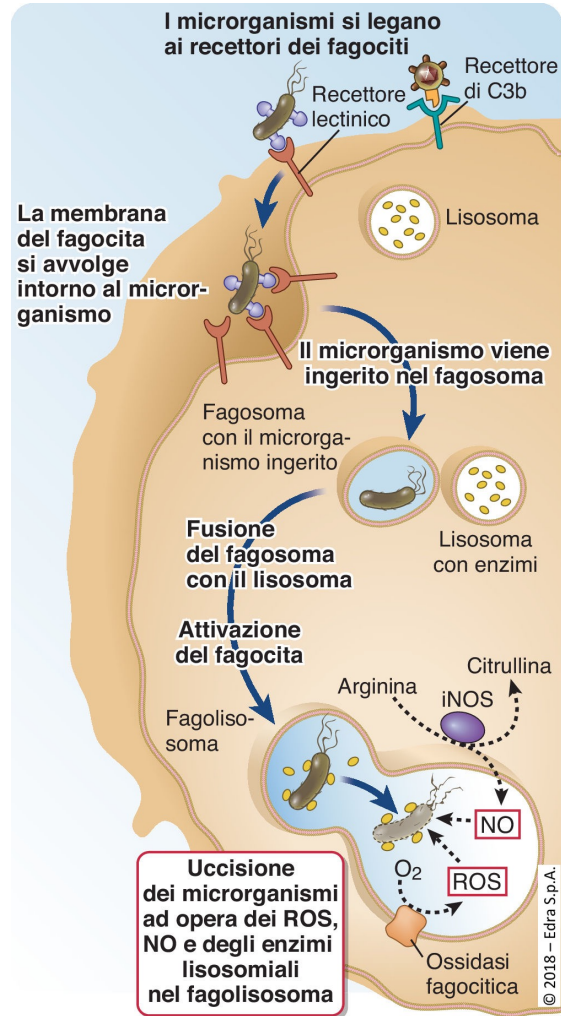
- i) recettori che mediano la captazione del patogeno come i recettori lectinici di tipo C (mannose receptor, DC-SIGN) gli Scavenger receptor (lipopeptidi batterici)
- ii) recettori opsonici.
- iii) “sensing” receptor. I sensing receptor avviano una cascata di segnalazione intracellulare che culmina con l’espressione di geni coinvolti nella risposta difensiva contro i patogeni e nell’attivazione della risposta infiammatoria.

Recettori opsonici dei macrofagi



La captazione dei patogeni e degli antigeni può essere facilitata dalle opsonine. Le opsonine sono fattori dell'ospite come le immunoglobuline e fattori del complemento che si legano alla superficie del patogeno e che sono riconosciuti da recettori espressi dai fagociti. CR1, CR3 recettori del frammento C3b e C3bi del complemento, CD64 recettore ad alta affinità per le IgG.

Fagocitosi ed eliminazione intracellulare del microbo



I microorganismi vengono internalizzati nei fagosomi che si fondono con i lisosomi a formare i fagolisosomi in cui i microbi sono uccisi da:

- Specie reattive dell'ossigeno (O_2^- , H_2O_2)
- Enzimi lisosomiali
- NO e dagli enzimi proteolitici.

Eliminazione dei patogeni da parte dei macrofagi

L'eliminazione dei patogeni internalizzati avviene nel fagolisosoma. Il fagolisosoma è ricco in proteasi, idrolasi ed ha un pH acido. Il fagosoma va incontro ad un processo di maturazione.

L'acquisizione dell'attività litica del vacuolo dipende dall'interazione di questo con il pathway endocitico. Il pathway endocitico è organizzato in un continuo di organelli che va dagli early endosomes fino al lisosoma.

il fagosoma appena formato acquisisce rapidamente le caratteristiche degli early endosomes originando dalla fusione con questi ed esprime la molecola Rab5. Il pH del fagosoma a questo stadio è di circa 6.

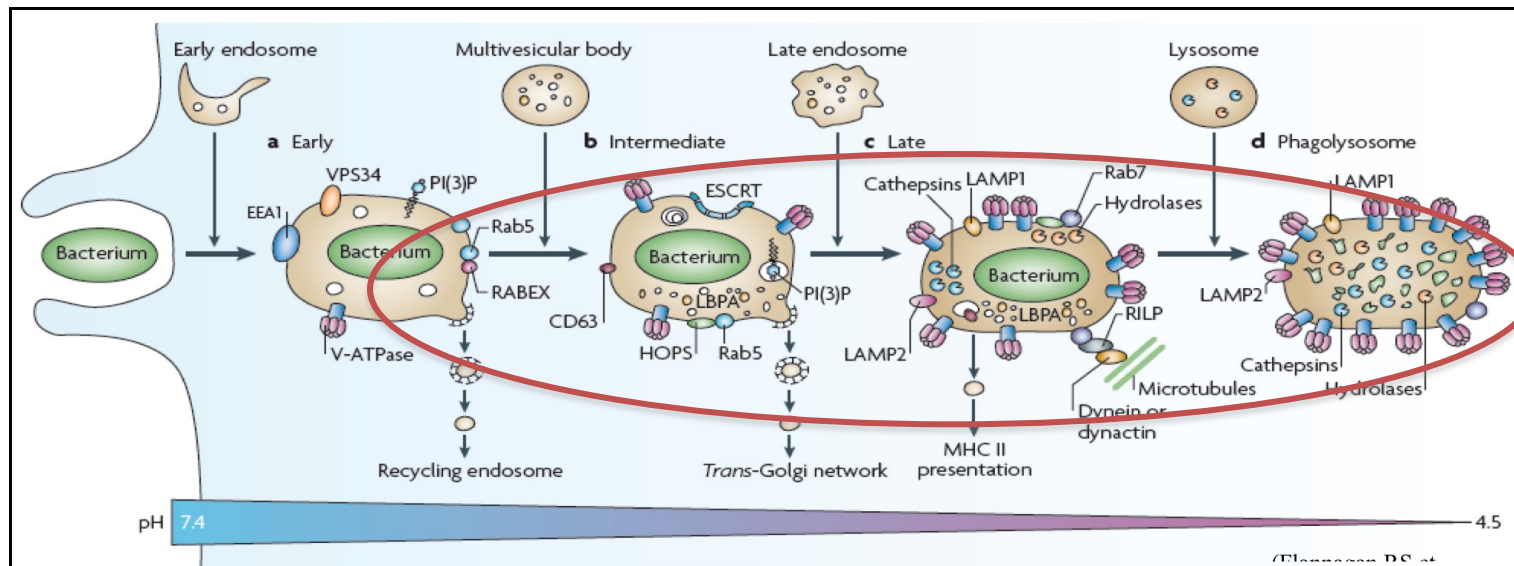
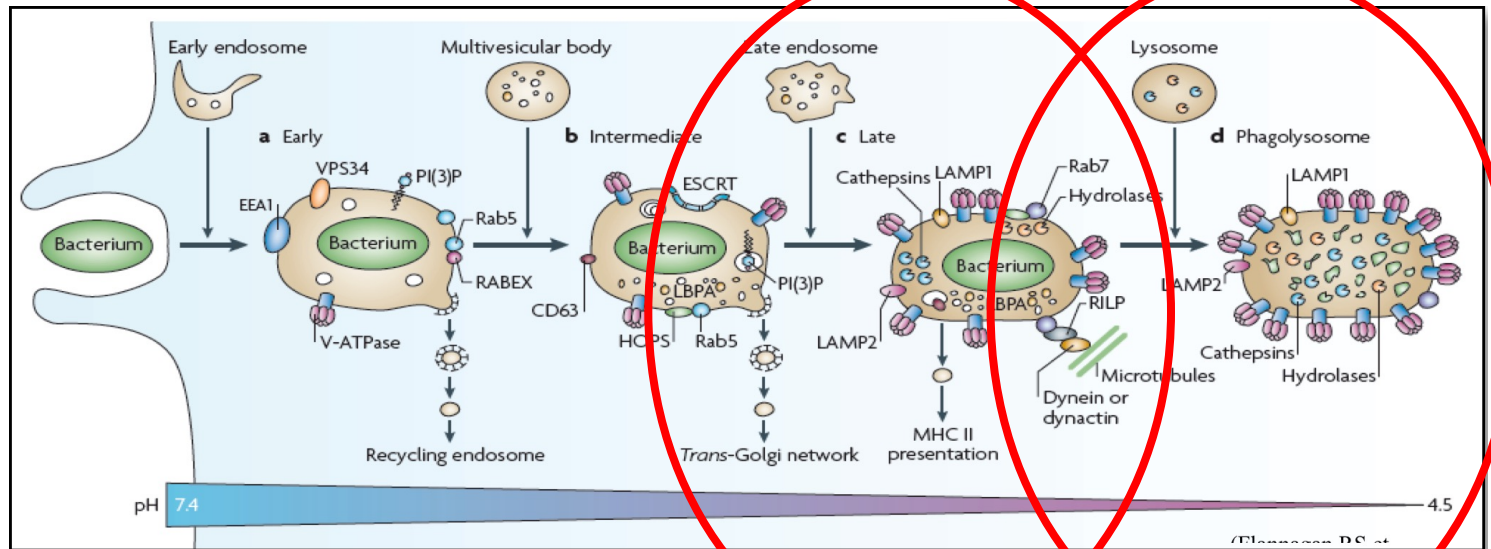


Table 1 Molecular markers of sorting and late endosomes, lysosomes, early and late phagosomes and phagolysosomes

The pH values listed for the endocytic organelles are from Chinese hamster ovary cells [31]. The phagosomal pH acidifies to pH ~ 5 within the first 5 min [213].

Organelle	Markers	pH
Sorting endosome; early phagosome	EEA1, Rab5, PI(3)P, syntaxin 13, transferrin, VAMP-3	≈ 6.0
Late endosome; late phagosome	Rab7, Rab9, mannose 6-phosphate receptor, syntaxin 7, LAMPs, lysobisphosphatidic acid	5.5–6.0
Lysosome; phagolysosome	LAMPs, mature cathepsin D, fluid-phase markers chased for ≥ 2 h	4.5–5.5

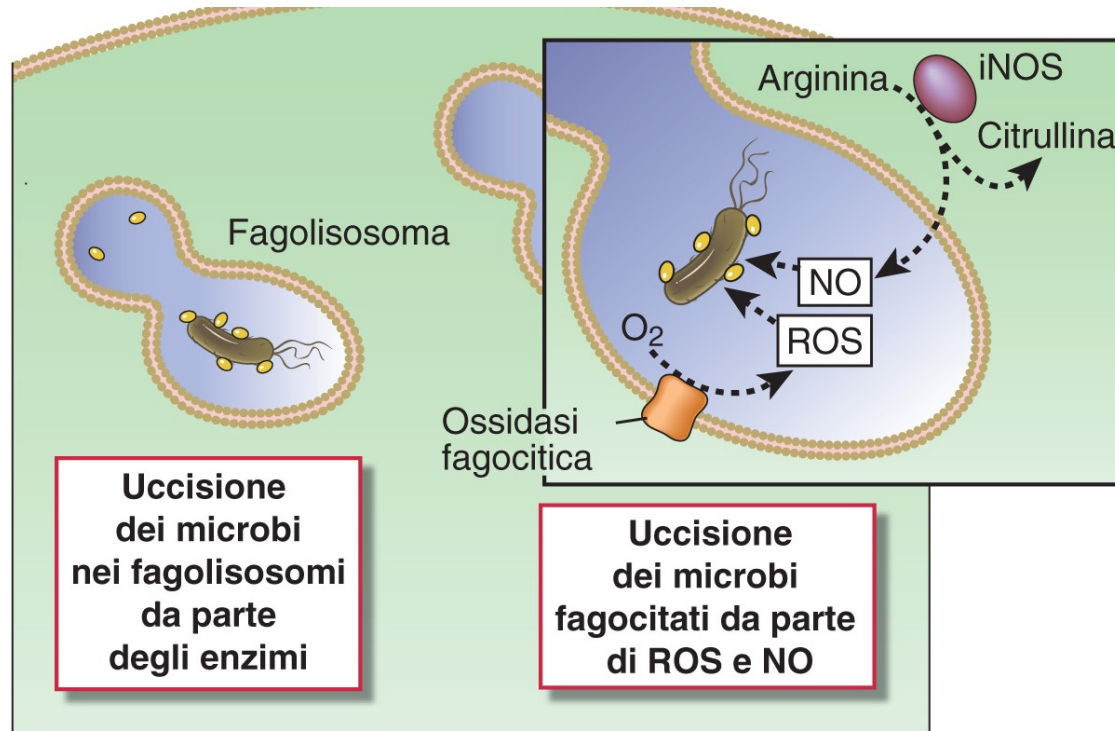
Maturazione del fagosoma



Nello stadio di maturazione successivo il fagosoma precoce si fonde con gli endosomi tardivi e acquisisce un pH più acido (5.5-6) dovuto all'azione della pompa di protoni V-ATPasi. Il fagosoma tardivo esprime la molecola Rab7.

Il processo di maturazione del fagosoma culmina con la formazione del fagolisosoma dovuto alla fusione del fagosoma tardivo con il lisosoma mediante l'azione di proteine SNARE (VAMP7, VAMP8, Syntaxin). Questo compartimento ha un pH acido (4.5) ed è ricco di enzimi litici che lo rendono ostile alle sostanze fagocitate.

Meccanismi di uccisione dei macrofagi



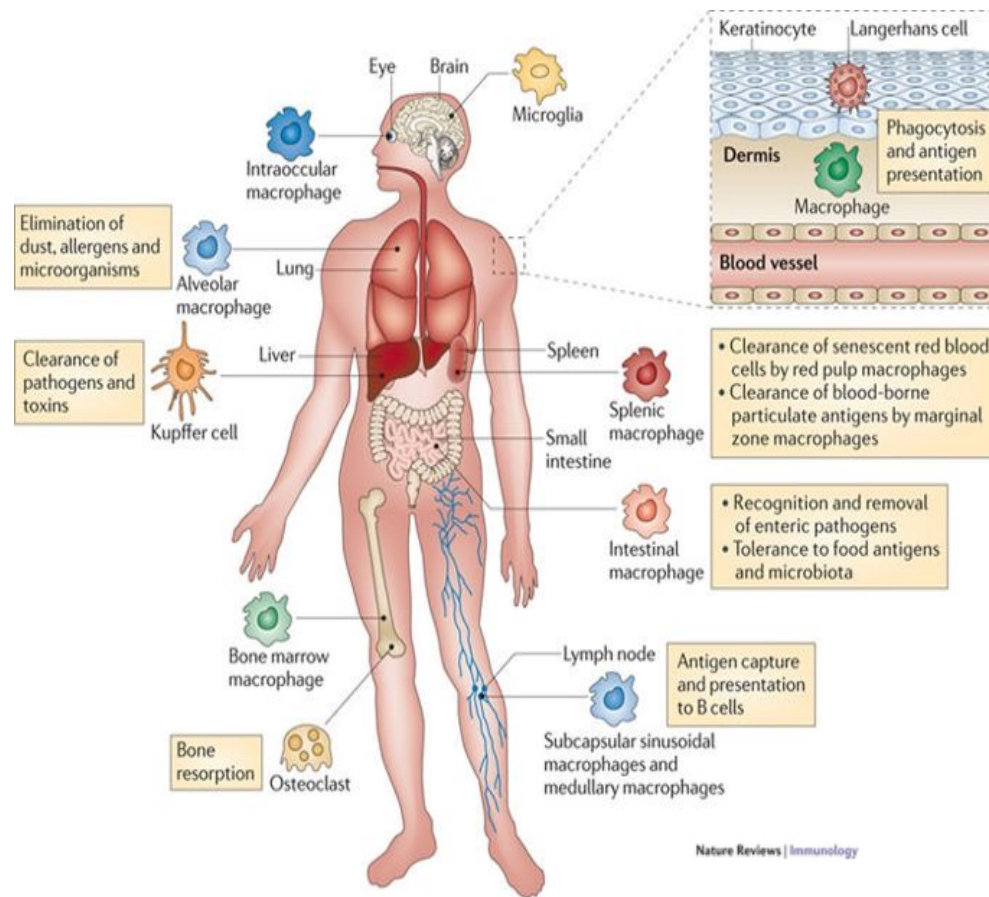
ROS (NADPH ossidasi)

NO (iNOS)

Enzimi lisosomiali

Ossido nitrico sintetasi: catalizza la formazione di ossido nitrico a partire dall'arginina.

Distribuzione tissutale dei macrofagi



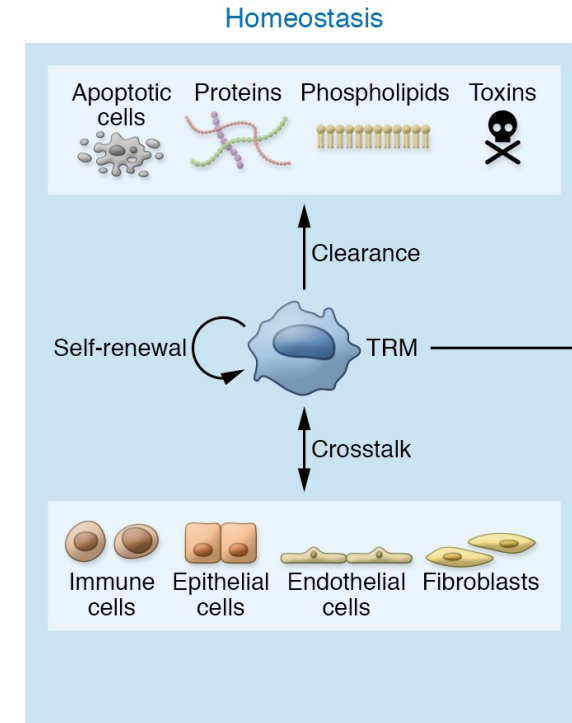
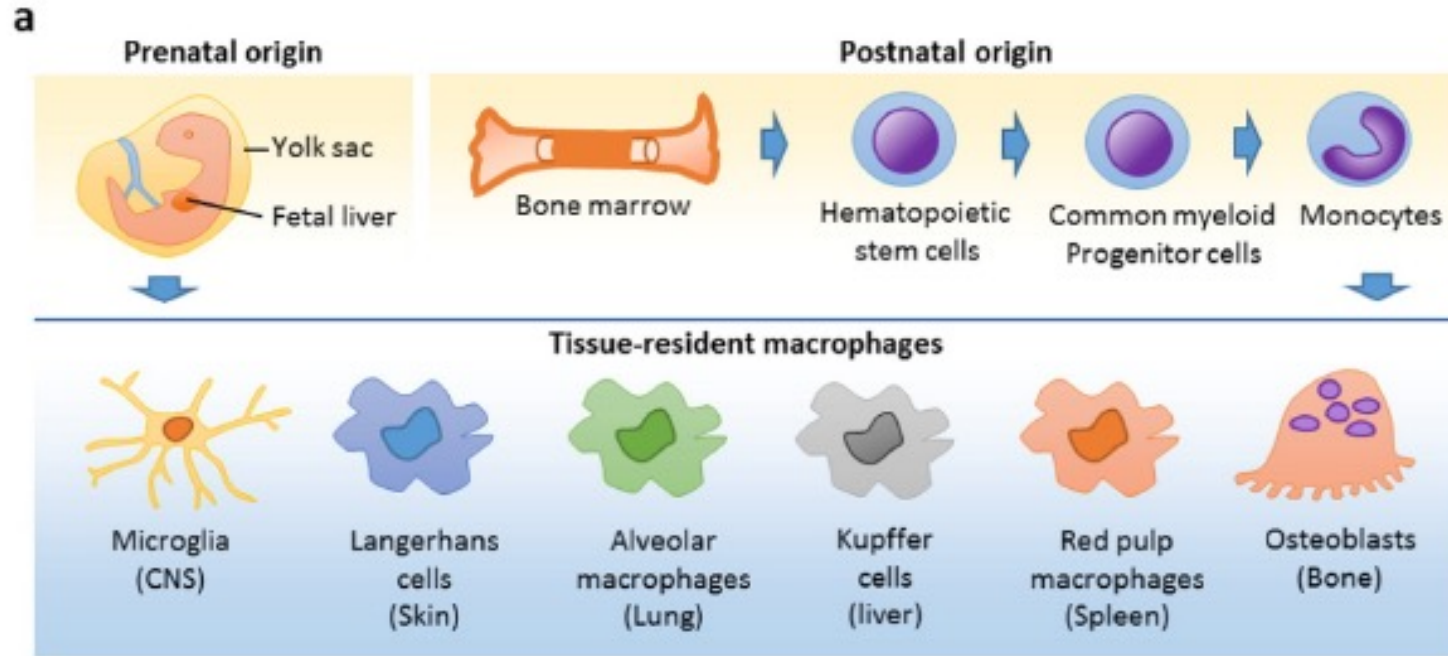
I macrofagi residenti nei diversi tessuti includono gli **osteoclasti** (osso), i **macrofagi alveolari** (polmone), gli **istiociti** (tessuto connettivo) le **cellule di Kupffer** (fegato),. L'intestino è popolato da diversi tipi di macrofagi che insieme alle cellule dendritiche mantengono la tolleranza alla flora intestinale e agli alimenti. Popolazioni distinte di macrofagi popolano gli organi immuno-privilegiati come il cervello (**microglia**), l'occhio e i testicoli

I macrofagi

1) residenti nei diversi tessuti mantengono l'equilibrio dei tessuti.

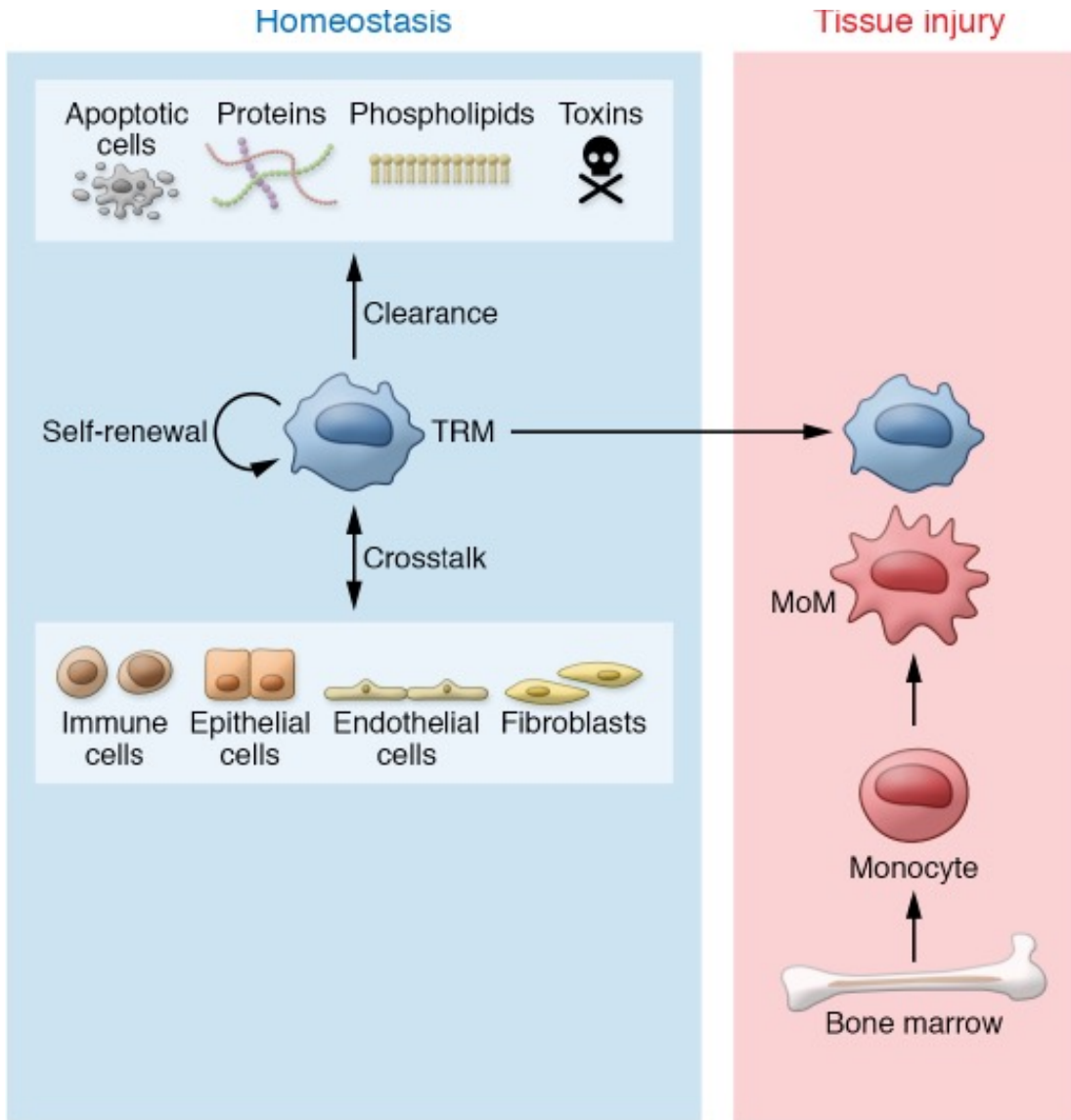
2) agiscono da sentinelle delle infezioni e del danno tissutale ingerendo le sostanze estranee e attivando la risposta infiammatoria che media il reclutamento di altre cellule quali i monociti e i neutrofili.

Origine dei macrofagi tissutali



In molti tessuti i macrofagi originano da precursori cellulari che derivano dal sacco vitellino e differenziano in macrofagi come parte dello sviluppo prenatale. Questi macrofagi residenti nel tessuto possono avere una vita molto lunga (mesi nel cervello, fegato, polmone e pelle) e possono autorinnovarsi mantenendo il loro pool cellulare senza un contributo da parte dei monociti. In altri tessuti quali ad esempio l'intestino, i macrofagi che si autorinnovano coesistono con i macrofagi che derivano dai monociti.

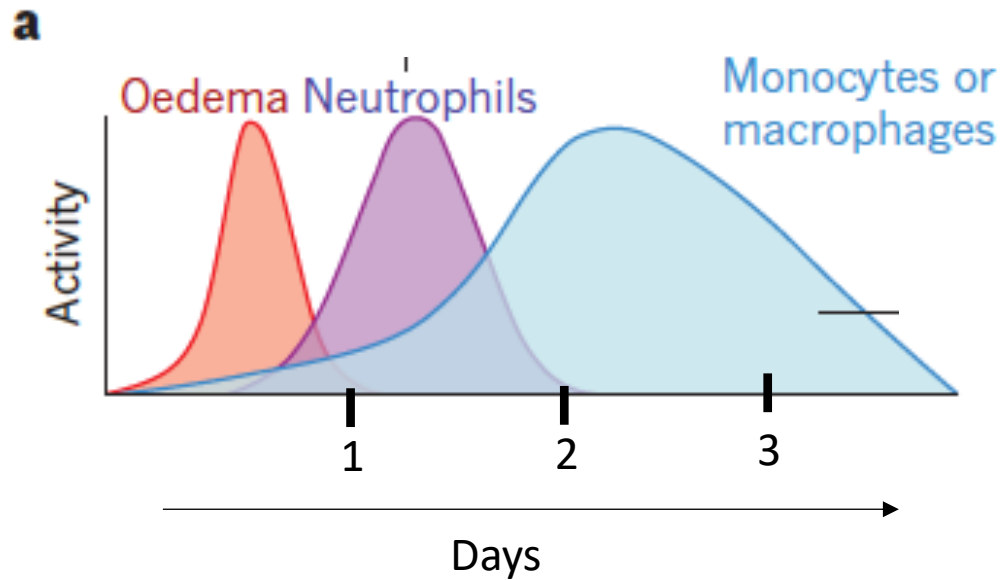
I macrofagi residenti nei tessuti e derivati dai monociti



Durante il processo infiammatorio i macrofagi nel tessuto interessato derivano dal differenziamento dei monociti. Durante il processo infiammatorio si osserva un aumento sia dei macrofagi che risiedono nel tessuto o che derivano dai monociti.

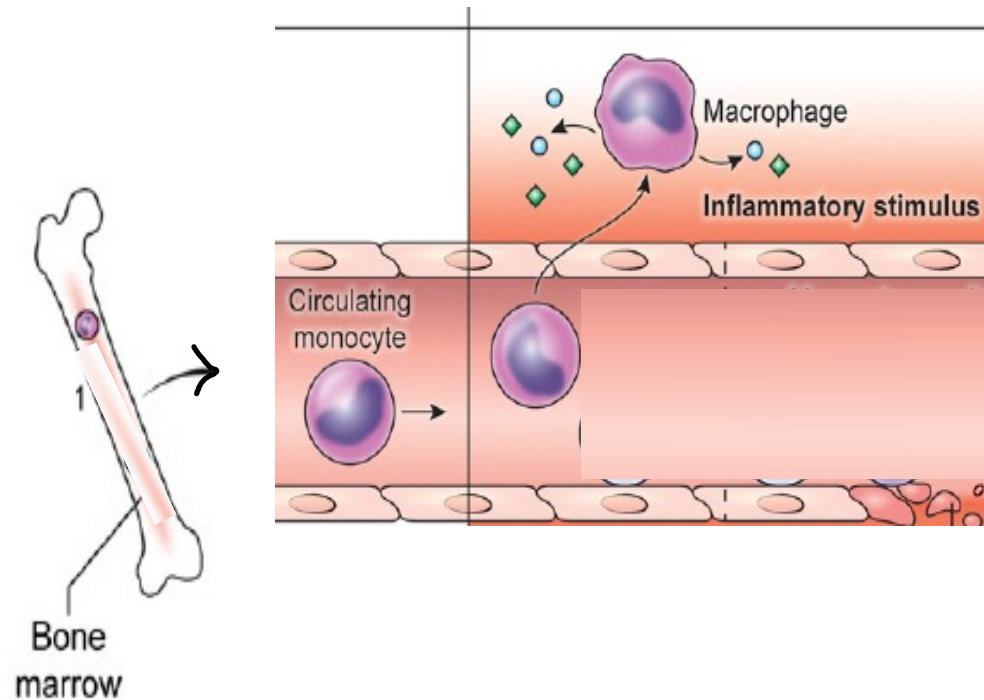
TRM= tissue resident macrophages, MoM= monocyte derived macrophages

Infiltrati leucocitari nell'inflammatione acuta



Nel processo infiammatorio acuto i neutrofili rappresentano la componente cellulare che per prima infila il tessuto (6-24 ore). Successivamente i neutrofili sono sostituiti dai monociti (24-48 ore).

Reclutamento dei monociti nel sito leso

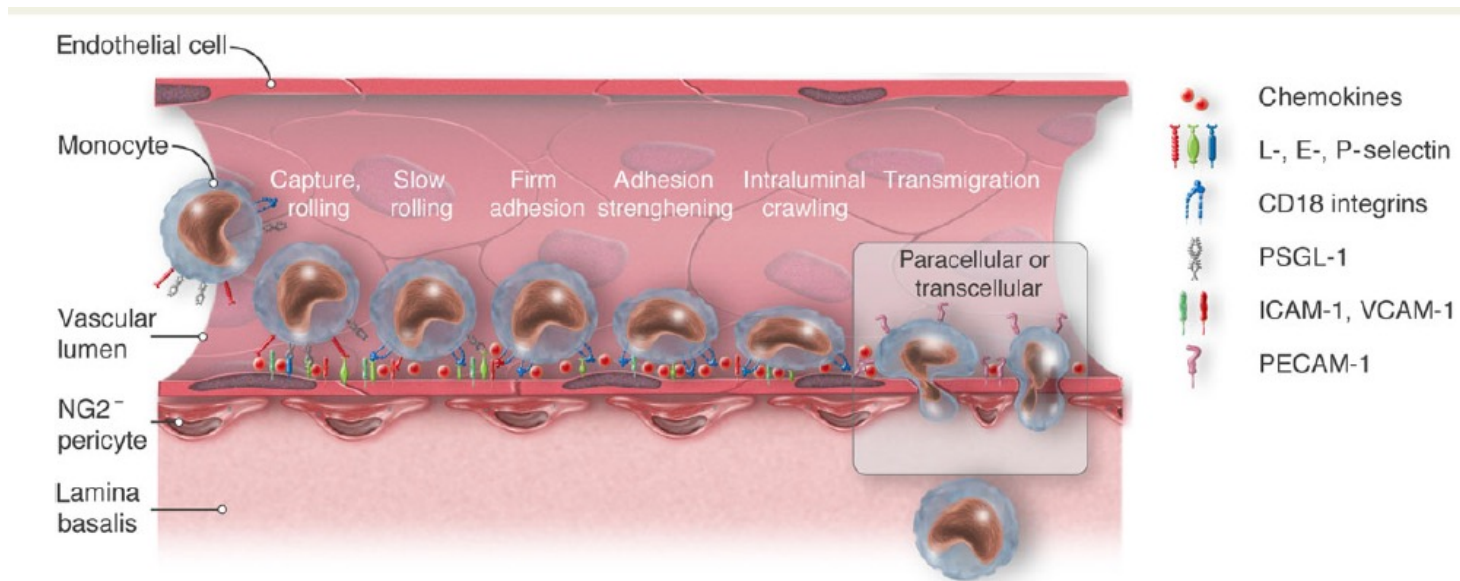


Durante l'induzione della risposta infiammatoria acuta i monociti vengono reclutati dal circolo sanguigno e raggiungono i siti di infiammazione richiamati dalla chemochina CCL2.

Tale chemochina è prodotta dai macrofagi, monociti, fibroblasti e cellule epiteliali.

I monociti sono caratterizzati dalla capacità di fagocitare, produrre specie reattive dell'ossigeno e molecole pro-infiammatorie quali l'IL-6, TNF- α , CCL2.

Extravasazione dei monociti



Nella extravasazione dei monociti l'interazione fra il PSGL-1 espresso dai monociti con le P- e E-selettine media l'adesione debole e il rolling.

L'adesione forte è mediata dall'interazione VLA-4 con VCAM1 e dalla chemochina CCL2 che lega il recettore CCR2.

Il crawling dipende da LFA1, Mac1 e ICAM-1 e ICAM-2.