

## Azione immunomodulante dell'ossigeno

Anneo Violante

Cattedra di Analisi Cliniche, Facoltà di Scienze M.F.N, Università di Roma "La Sapienza"

### ABSTRACT

#### Immunomodulating action of oxygen

The aim of this work was to study the influence of oxygen as a modulator of the immune response. This study was carried out with different methodological approaches. Cytofluorimetric measurements highlighted an increase of the lymphocytes T and of the subclasses Helper and Suppressor. No influence was observed either on other cells or on the interleukin-2 receptors.

### RIASSUNTO

Con questo lavoro si è voluto studiare l'influenza che l'ossigeno può avere come modulatore della risposta immunitaria. Lo studio è stato condotto con diverse metodiche. Misure citofluorimetriche hanno evidenziato un aumento dei linfociti T e delle sottoclassi Helper e Suppressor. Nessuna influenza è stata rilevata su altre cellule e per i recettori dell'interleuchina 2.

### INTRODUZIONE

Negli anni '60 una serie di ricerche ha permesso di constatare che l'O<sub>2</sub>, somministrato a topi portatori del tumore ascite di Ehrlich, svolgeva azione antiblastica (1-3). Tali ricerche avevano il loro punto di partenza nel concetto, sviluppato da Warburg, sulla relazione tra ridotta capacità respiratoria cellulare e stato di malignità (4). Secondo Warburg le turbe bioenergetiche da ipossia locale determinavano un aumento della velocità di utilizzo del glucosio con produzione prevalente di acido lattico e quindi una resa energetica ridotta: in effetti, i tessuti tumorali producono acido lattico in quantità maggiore dei rispettivi tessuti normali.

Successivamente Macbeth e Bekesi (5) poterono stabilire che la prevalenza glicolitica non era caratteristica dei soli tessuti neoplastici. Peraltro, studi sul rapporto ossigenazione e stato tumorale (6,7) stabilirono che la respirazione non era quantitativamente limitata nelle cellule neoplastiche in quanto, esponendole all'ossigeno, il loro livello glicolitico si abbassava. Ciò dimostrava che nelle cellule tumorali non vi era un danno respiratorio irreversibile.

Aisenberg (8) aveva affermato che "in vitro" la capacità respiratoria delle cellule neoplastiche era simile a quella della maggioranza delle cellule normali. Inoltre, l'effetto deprimente dell'ossigeno sulla glicolisi (effetto Pasteur, secondo la dizione di Warburg) si rivelava quantitativamente simile a quello dei tessuti normali, e il tasso di consumo dell'ossigeno nei tumori "in vivo" era intermedio tra quello dei tessuti normali con bassa attività metabolica e quelli con attività elevata. In conclusione, l'insieme di queste osservazioni portava a ritenere non sostenibile

l'ipotesi del danno respiratorio irreversibile avanzata da Warburg.

Ulteriori ricerche tendevano comunque a dimostrare che i tumori "in vivo" si trovano in condizioni di ipossia locale. Usando elettrodi inseriti nei tessuti di oltre 200 pazienti affetti da vari tumori cutanei, Urbach (9) rilevò che la pressione di ossigeno (pO<sub>2</sub>) era più bassa (del 25%) di quella delle zone cutanee immediatamente adiacenti. A sua volta Rampan (10), misurando la pO<sub>2</sub> della periferia di melanomi e sarcomi umani mediante microelettrodi di platino, trovò valori che non superavano il 50% di quelli della cute vicina. Da successive misure computerizzate della pO<sub>2</sub>, capaci di valutare con maggiore precisione il grado di ossigenazione dei tessuti, i valori medi della pO<sub>2</sub> nei tessuti tumorali risultavano più bassi dei corrispondenti tessuti normali (11-16). Altri ricercatori, utilizzando la medesima tecnologia, hanno acquisito dati sullo stato di ossigenazione di tumori della mammella, della cervice, di melanomi ecc., constatando anch'essi che la media dei valori della pO<sub>2</sub> era molto più bassa che nei tessuti normali (17-19).

Negli ultimi anni, sulla base di questi rilevamenti sono state proposte strategie per ridurre e, possibilmente, eliminare lo stato di ipossia riscontrato nei tumori (20,21). Teicher (20), ipotizzando che lo stato di ipossia potesse svolgere un'azione di protezione sulle cellule tumorali nei confronti di alcune terapie citotossiche, sosteneva che una aumentata concentrazione di O<sub>2</sub> negli individui affetti da neoplasie potesse rappresentare una via vantaggiosa per migliorare lo stato di ossigenazione delle masse tumorali, favorendo in tal modo le terapie antiblastiche. A tal fine

proponeva alcune tecniche per migliorare il rilascio di O<sub>2</sub> nei tessuti periferici. Griffin e coll. a loro volta (21) hanno formulato l'ipotesi che l'associazione di MTH (Mild Temperature Hypertermia) con la somministrazione di una miscela di O<sub>2</sub> al 95% e CO<sub>2</sub> al 5%, potesse costituire un mezzo efficace per migliorare l'azione della radioterapia.

Ancora, sul rapporto ossigeno e chemioterapia sono state pubblicate recentemente alcune ricerche che sembrano convalidare l'azione favorente della ossigenazione iperbarica sulle terapie antitumorali (22,23).

C'è da segnalare, infine, qualche tentativo di terapia iperbarica direttamente sullo sviluppo tumorale eseguito su criceti portatori di carcinoma da benzantracene. Con tale intervento si è constatata una significativa riduzione del tumore ed una minore tendenza a metastatizzare negli animali trattati rispetto ai controlli (24). Un altro studio (25) effettuato su topi portatori di rhabdomyosarcoma ha dimostrato che l'ossigenazione dell'animale tumorigeno mediante iperbarismo migliora l'efficacia della terapia antitumorale associata. Una nota discordante è quella di Linden e coll. (26) che, con una ricerca condotta su topi portatori di un sarcoma sperimentale (MCG 101), hanno rilevato che l'esposizione all'ossigenoterapia iperbarica non induce significativi mutamenti nella crescita di quel tumore.

Gli studi ora esposti sono stati affiancati recentemente da ricerche che hanno posto in rilievo dati importanti sul probabile rapporto tra ossigenazione e stato immunitario. L'esposizione iperbarica, infatti, sembra indurre modifiche nei parametri immunologici ed in particolare sul numero delle cellule linfatiche e mononucleari in vari tessuti umani ed animali (27-31). La variazione delle sottopopolazioni linfocitarie riscontrata, sarebbe correlata alla tensione ed ai tempi di esposizione all'ossigeno in camera iperbarica (32).

Tali ricerche suggeriscono che il sistema immunitario possa essere influenzato dal grado di ossigenazione dei tessuti e delle cellule immunocompetenti (32). Una serie di osservazioni su colture cellulari di vari tessuti esposte a gradi diversi di ossigenazione (34-37), dimostrava infatti che vi sono concentrazioni ottimali alle quali le colture possono rispondere positivamente.

Sulla base dei risultati ottenuti con la somministrazione di O<sub>2</sub> in topi portatori del tumore ascite di Ehrlich appariva probabile che l'ipotesi del deficit energetico non potesse soddisfare pienamente gli assunti teorici e che l'azione antitumorale riscontrata nei topi tumorigeni da uno di noi (3, 38) dovesse attribuirsi anche ad altri fattori che occorreva individuare per potenziarne l'azione. Si è di conseguenza ipotizzato che un'adeguata somministrazione di ossigeno potesse influire sul sistema immunitario.

Si sono così avviate ricerche su questa ipotesi che sono state condotte con differenti metodiche, sempre più complesse man mano che le sperimentazioni fornivano dati incoraggianti.

## MATERIALI E METODI

Nelle prime fasi gli esperimenti sono stati condotti

stimolando le colture brevi di linfociti con immissione di ossigeno direttamente nelle provette contenenti le sospensioni linfocitarie utilizzando dosatori per l'O<sub>2</sub> in uso corrente nei reparti di rianimazione. Si è adottato successivamente, come sistema più sicuro, il termostato a flusso continuo di ossigeno, mediante il quale si potevano stimolare costantemente le cellule in coltura in un ambiente sterile ed a temperatura costante a 37°C. In seguito sono stati sottoposti al medesimo trattamento (incubazione a 37°C in termostato a flusso continuo di ossigeno) campioni di sangue intero.

In queste fasi dello studio gli effetti della stimolazione sono stati valutati mediante osservazione microscopica dei linfociti (colture e campioni di sangue), strisciati su vetrini e colorati panotticamente.

In studi ulteriori le classi e sottoclassi linfocitarie di campioni di controllo e di campioni incubati a 37°C in termostato a flusso continuo di ossigeno sono state infine valutate mediante citofluorimetria. È stato utilizzato il citometro Ortho Citoron Absolute con anticorpi monoclonali della Ortho (CD3/CD19; CD4/CD8; HLA-DR/CD3; CD16/CD3; CD3/CD25).

Per l'analisi statistica dei dati si sono utilizzati i consueti indici statistici parametrici (media e deviazione standard); la significatività delle differenze tra le medie è stata valutata con il t di Student.

## RISULTATI

I primi dati sono stati raccolti mediante osservazione microscopica su strisci di cellule provenienti da colture linfocitarie stimulate mediante aggiunta di ossigeno. In tali campioni i valori percentuali medi dei grandi linfociti passavano da 3% (controlli) a 17% (coltura stimulate): la differenza tra i valori medi era statisticamente significativa.

I risultati ottenuti con l'uso del termostato a flusso continuo di ossigeno, che consente di ottenere una stimolazione programmata e controllata, seguiti da osservazione microscopica di strisci colorati, sono riassunti nella tabella 1 (sospensioni linfocitarie) e 2 (campioni di sangue intero). In entrambi i casi si osserva la presenza di un maggiore numero di grandi linfociti nelle colture stimulate, con una differenza tra i valori medi statisticamente significativa.

Lo studio al citofluorimetro condotto sui campioni di sangue intero e basato sul confronto tra campioni di controllo e campioni esposti ad ossigenazione, ha evidenziato nei campioni stimolati un aumento dei linfociti totali dovuto alla maggiore concentrazione, statisticamente da significativa a molto significativa, delle cellule T ed alcune sottoclassi di tale popolazione, i linfociti Helper e Suppressor. Nessuna variazione statisticamente significativa era invece evidente per le cellule B, per i T-attivati, per le Natural Killer e per il recettore per la interleuchina-2 (Tab. 3). Si può pertanto asserire che, per un livello di significatività del 99%, i valori dei linfociti totali, T, Helper e Suppressor dei campioni stimolati sono più elevati rispetto a quelli di controllo.

**TABELLA 1**

Effetti della stimolazione mediante trattamento di sospensioni linfocitarie a in termostato a flusso continuo di ossigeno; osservazione microscopica (valori medi, unità:  $10^6/L$ )

Leucociti	Linfociti		Grandi linfociti	
	Totali	Controlli	Stimolati	Controlli
7157	2221	1913(*)	243	551(*)

(\*) differenza con in controlli statisticamente significativa ( $p > 0,01$ )

**TABELLA 2**

Effetti della stimolazione mediante trattamento di campioni di sangue intero in termostato a flusso continuo di ossigeno; osservazione microscopica (valori medi, unità:  $10^6/L$ )

Leucociti	Linfociti		Grandi linfociti	
	Totali	Controlli	Stimolati	Controlli
7527	2286	3484(*)	350	971(*)

(\*) differenza con in controlli statisticamente significativa ( $p > 0,01$ )

**TABELLA 3**

Effetti della stimolazione mediante trattamento di campioni di sangue intero in termostato a flusso continuo di ossigeno; misure citofluorimetriche (valori medi  $\pm$  deviazione standard, unità:  $10^6/L$ )

Campione	Linfociti ( $10^6/L$ )							
	Totali	T	B	Helper	Suppressor	T-attivati	Recettore IL-2	Natural Killer
Controllo								
Media $\pm$ DS	2050 $\pm$ 924	1456 $\pm$ 651	176 $\pm$ 131	864 $\pm$ 461	559 $\pm$ 252	165 $\pm$ 99	92 $\pm$ 132	310 $\pm$ 256
Stimolato								
Media $\pm$ DS	2648 $\pm$ 1001	1912 $\pm$ 673	225 $\pm$ 135	1122 $\pm$ 517	742 $\pm$ 300	197 $\pm$ 104	106 $\pm$ 172	356 $\pm$ 289
P	<0,0001**	0,002**	0,082 <sup>#</sup>	0,014**	0,002**	0,138 <sup>#</sup>	0,666 <sup>#</sup>	0,439 <sup>#</sup>

\*\*Differenza (stimolato-controllo) statisticamente assai significativa

<sup>#</sup>Differenza (stimolato-controllo) statisticamente non significativa

## DISCUSSIONE

Lo studio condotto sull'azione immunomodulante dell'ossigeno evidenzia che il sistema immunitario umano presenta potenzialità ancora da valutare.

La presente ricerca era finalizzata ad indagare "in vitro" il possibile effetto dell'ossigeno sullo stato immunitario.

I dati riguardanti le varie sottopopolazioni linfocitarie dei campioni sottoposti ad ossigenazione hanno evidenziato differenze statisticamente significative rispetto ai controlli: le variazioni nel numero dei linfociti totali erano infatti dovute all'aumento dei linfociti T e delle sottopopolazioni T-Helper e T-Suppressor. Tali dati sembrano confermare l'ipotesi che l'ossigeno, in certe condizioni sperimentali, possa svolgere azione immunostimolante su alcuni settori delle cellule immunocompetenti. In effetti, altre cellule e/o fattori, ossia linfociti B, T-attivati, Natural Killer, e recettori delle IL-2, risultano meno sensibili alla stimolazione da parte dell'ossigeno, anche se per ciascun com-

ponente si riscontra tendenza all'aumento dopo stimolazione.

Questi risultati sono confortati da quanto riferito in letteratura sulla possibile stimolazione immunitaria in pazienti con varia patologia e in animali di laboratorio, indotta da esposizione ad ossigenazione con o senza l'impiego di camera iperbarica (28, 29, 32). E' risultato infatti da queste ricerche che l'ossigeno aveva possibilità di stimolare alcuni settori delle cellule immunocompetenti.

E' stata anche evidenziata una risposta all'ossigeno dose-dipendente (24). Altri Autori (30) rilevavano, a basso regime di iperbarismo, moderata o scarsa stimolazione immunitaria; altri ricercatori (31), ad alto regime iperbarico (atmosfera al 100%) trovavano una iniziale diminuzione della popolazione cellulare nel timo e nella milza a cui seguiva una secondaria risposta proliferativa dei linfociti T a livello splenico.

Questi studi farebbero ritenere che, in condizioni ottimali, l'ossigenazione può rappresentare un fattore determinante per sostenere l'efficace funzionalità dei tessuti

immunocompetenti. Migliorando lo stato di ossigenazione dei tessuti si provocherebbero modificazioni positive sia dello stato immunitario che della situazione energetica dell'organismo, che sarebbe pertanto in grado di opporre una più efficace resistenza agli agenti patogeni.

A tal fine è importante rilevare che alcune recenti ricerche (25) hanno dimostrato che l'ossigenazione iperbarica è in grado di contenere lo sviluppo tumorale da sola o in concomitanza con terapia antitumorale. Il medesimo trattamento potrebbe costituire un valido ausilio terapeutico per le malattie che richiedono un potenziamento delle difese immunitarie oltre che un utile appoggio per le terapie antitumorali.

### RINGRAZIAMENTI

Le misure citofluorimetriche sono state eseguite in collaborazione con il Reparto di Patologia Clinica dell'Istituto Regina Elena, diretto dal Professor Giuseppe Gandolfo.

### BIBLIOGRAFIA

- Violante A. Ossigeno contro i tumori? *Fed. Med Gen.* 1981; 34.
- Violante A. Attuali vedute sul biochimismo energetico della cellula neoplastica. *Riv Oncol* 1985; 1:50-65.
- Violante A. Alcune considerazioni sul biochimismo energetico della cellula neoplastica. *Patologo Clinico* 1986; 6:107-116.
- Warburg O. On the origin of cancer cell. *Science* 1956; 123:309-314.
- Machbeth M, Bekesi A. Oxygen consumption and anaerobic glycolysis of human malignant and normal tissue. *Cancer Res* 1962; 22:244-248.
- Shapot VS. Some biochemical aspects of the relationship between the tumor and the host. *Advances in Cancer Research* 1972; 15:253-286.
- Shapot VS. On the multiform relationship between the tumor and the host. *Advances in Cancer Research* 1980; 30:89-150.
- Aisenbreg AG. The glycolysis and respiration of tumor. Academic Press, NY 1961 (citato da Shapot, rif. n° 6).
- Urbach. Pathophysiology of malignancy: tissue oxygen tension of benign and malignant tumor of skin. *Proc Soc Exp Biol* 1956; 9:644-654.
- Rampam IE. *Vestn: Akad Med Nauk SSSR* 1967; 22:81-87.
- Fleckenstein J. Distribution of oxygen pressure in the periphery and centre of malignant head and neck tumors. Berlin: Blackwell Ueberreuter Wissenschaft 1990:81-90.
- Hockel M, Schlenger C, Knoop J, et al. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res* 1991; 60:98-102.
- Kallinowski K, Zander M, Hockel N, et al. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized pO<sub>2</sub> histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:953-961.
- Schramm C, Fleckenstein M, Weber L. Morphological assessment of skeletal muscle injury caused by pO<sub>2</sub> measurement with hypodermic needle probes. *Clin Oxyg Press Meas Blackwell Ueberreuter Wissenschaft* 1990:38-50.5
- Singbartl C, Meztger B, et al. Investigation on the reproducibility of intramuscular pO<sub>2</sub> measurement in patients by means of the tissue pO<sub>2</sub> histograph. *Clin Oxyg Press Meas Blackwell Ueberreuter Wissenschaft* 1990:25-29.
- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, et al. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancer by computerized O<sub>2</sub> tension measurement. *Cancer Res* 1991; 51:3316-3322.
- Lartigau M, LeRidant P, Lembrin L, et al. Oxygenation of head and neck tumors. *Cancer* 1993; 71:2319-2325.
- Martin S, Lartigau B, et al. Changes in the oxygenation of head and neck tumors during carbon breathing. *Rad Ther Oncol* 1993; 27:123-130.
- Okunieff L, Hoeckel D, Dunphy M, et al. Oxygen tension distribution are sufficient to explain the local response of human breast tumors treated with radiation alone. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1993; 26:631-636.
- Theicher M, et al. Antiangiogenic can increase tumor oxygenation and response to radiation therapy, *Rad Oncol Invest* 1995; n° 6.
- Griffin M, Okajima Y, Barrios F, Song J. Mild temperature hyperthermia combined with carbogen breathing increase tumor partial pressure of oxygen (pO<sub>2</sub>) and radiosensitivity. *Cancer Res* 1996; 56:5590-5593.
- Pakdaman A. Symptomatic treatment of brain tumor patients with sodium selenite, oxygen and other supportive measures. *Biol Trace Elem Res* 1998; 62(1-2).
- Kalns J, Krock L, Pepmeier E Jr. The effect of hyperbaric oxygen on growth and chemosensitivity of metastatic prostate cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:363-367.
- McDonald K, Bradfield J, et al. Effect of hyperbaric oxygenation on existing oral mucosa carcinoma. *Laryngoscope* 1996; 106: 957-959.
- Van der Klein J, Koilman L, et al. Tumor oxygenation: the influence of normobaric and hyperbaric oxygen. *Adv Exp Med Biol* 1996; 388:385-390.
- Lindsen G, Granstom C, et al. Cell proliferative modulation of MCG 101 sarcoma from mice exposed to hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med* 1997; 24:123-129.
- Bitterman N, Lamat N, Rosenwald T, Kinarty A, Melamed Y. Effect of a single exposure to hyperbaric oxygen on blood mononuclear cells in human subjects. *Undersea Hyperb Med* 1993; 20:197-204.
- Bitterman N, Kinarty A, Melamed Y, Lamat N. Effects of hyperbaric oxygen on tissue distribution of mononuclear cell subsets in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 77:2355-2359.
- Krassnov MN, Kasparov AA, Pirtskhlava ma, et al. Phenotype of peripheral blood lymphocytes of health donors and patients with corneal allotransplantation under conditions of hyperbaric oxygenation. *Vestn Oftalm* 1996; 112:6-14.
- Pogaballo Av., Kazantseva NV, et al. An evaluation of the immunotropic and hemopoietic effects of hyperbaric oxygenation as an experimental pathological model. *Eksp Klin Farmakol* 1997; 60:72-75.
- Xu J, Suzuki V, et al: Differential sensitivities to hyperbaric oxygen of lymphocyte subpopulation of normal and autoimmune mice. *Immunol Lett* 1997; 59:78-84.
- Lee J, Hester V, Coggin D, et al. Increased oxygen tension modulates the cellular composition of the adaptive immune system in Balb c-mice. *Cancer Biother* 1993; 8:241-255.
- Lee J, Hester V, Coggin D, et al. Increased oxygen tension influences subset composition of the cellular immune system in aged mice. *Cancer Biother* 1994; 9:39-54.
- Karlberg M, Kiessling N, Low H, Mattson J. Role of aerobic conditions in the control of cell proliferation. *Int Arch allergy Apl Immunol* 1981; 65:250.
- Makoto Y, Lartigau B, et al. Optimal oxygen tension condition for functioning cultured hepatocytes in vitro. *Artificial*

- Oergans 1995; 20:169-177.
36. Krieger F, Landsiedel M, Lawrence Y. Differential in vitro effects of physiological and atmospheric oxygen tension on normal human peripoheral blood mononuclear cell proliferation, cytokine, and immunoglobulin production. *Int J Immunopharmac.* 1996; 18:545-552.
37. Lawrence A, Colinas I, Walsh Y. Influence of oxygen partial pressure an human and mouse myeloid cell line characteristics. *Fund Appl Toxil* 1996; 29:287-293.
38. Violante A. Azione immunodulante ed antiplastica dell'ossigeno. *Dati preliminari. Diagnostica* 1998; 3: 22-23.