

# I LIPOPOLISACCARIDI DA COOLEY A ZORA

Prima di affrontare questo argomento ritengo sia opportuno fare un breve riassunto sulle caratteristiche principali di quelle sostanze che si racchiudono globalmente sotto il nome di citochine. È da una loro adeguata ed aggiornata conoscenza che deriva una completa ed ottimale comprensione di un razionale che basa la sua efficacia sul potenziamento del loro network.

## **Citochine**

Le citochine sono proteine ad azione simil-ormonale che svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità naturale ed acquisita e vengono prodotte, in seguito a determinati stimoli, da monociti e macrofagi (monochine) e linfociti T attivati (linfocine).

Vi sono poi altre proteine che agiscono sulle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo e sono rappresentate dai CSFs (colony stimulating factors). Tutte queste proteine sono dette interleuchine essendo prodotte dai leucociti ed esercitando la loro azione su se stessi.

Gli interferoni sono state le prime interleuchine ad essere studiate.

Le citochine vengono prodotte durante la fase effettrice dell'immunità naturale o acquisita e mediano o regolano la risposta immunitaria ed antinfiammatoria.

Una singola citochina può essere prodotta da cellule diverse ed esercita la sua azione su cellule diverse (pleiotropismo).

Le citochine esercitano un'azione di controllo (stimolo o inibizione) sulla sintesi di altre citochine, in complessi sistemi di regolazione.

Si legano a recettori specifici presenti sulle cellule bersaglio per i quali hanno un'alta affinità.

A livello delle cellule bersaglio le citochine inducono la produzione di mRNA e dunque la sintesi proteica oppure la divisione cellulare.

**Quattro** sono i **gruppi** principali di **citochine**:

- I° -mediatori dell'immunità naturale
- II° -regolatori di attivazione, crescita e differenziamento linfocitario
- III° -attivatori di cellule infiammatorie non specifiche
- IV° -stimolatori di crescita e differenziamento di leucociti immaturi.

## **I° GRUPPO COMPRENDE**

Interferoni (IFN) - tumor necrosis factor (TNF) - IL1 - IL6.

Gli **IFN** comprendono due proteine:

- a) una costituita da 20 polipeptidi del peso di 18 kDa - prodotta dai macrofagi
- b) una glicoproteina del peso di 20 kDa – prodotta dai fibroblasti

Le **funzioni dell'IFN** sono:

- inibizione della replicazione virale
- inibizione della proliferazione cellulare
- aumento della potenza litica delle cellule natural killer (NK)
- la modulazione dell'espressione delle molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), con aumento di quelle di classe I e riduzione di quelle di classe II, in modo da favorire l'azione dei linfociti T citotossici.

Il **TNF** principale mediatore della risposta dell'ospite verso i germi Gram negativi:

- a) viene prodotto dai macrofagi attivati dal lipopolisaccaride e da cellule T- NK - mastzellen
- b) chimicamente è un trimero di 51 kDa.

Il TNF può determinare l'insorgenza di una coagulazione intravasale disseminata.

**Le funzioni del TNF a basse concentrazioni sono:**

- aumento di adesività delle cellule endoteliali
- attivazione di neutrofili - eosinofili - macrofagi
- aumento di sintesi di IL1- IL6 - IL8 e dello stesso TNF
- co-stimolazione delle cellule T attivate ed induzione produzione anticorpi da linfociti B
- sintesi di CSFs da parte dei macrofagi e delle cellule endoteliali
- aumento di espressione di MHC classe I.

**Le funzioni del TNF ad alte concentrazioni sono:**

- effetto pirogeno endogeno a livello dell'ipotalamo e stimolo alla produzione di prostaglandine
- produzione di IL1 e IL6 da parte dei macrofagi e delle cellule endoteliali
- aumento di sintesi di alcune proteine da parte degli epatociti
- attivazione di alcuni meccanismi della coagulazione
- soppressione della divisione cellulare nel midollo osseo
- induzione della cachessia (con aumento del catabolismo nelle cellule muscolari e adipose)
- riduzione della contrattilità miocardica
- diminuzione della pressione arteriosa
- insorgenza di trombosi arteriose e venose ed alterazioni metaboliche.

L'**IL1** è una citochina prodotta dai macrofagi. Potenzia la risposta dei linfociti T all'antigene e media la risposta infiammatoria. È una proteina di 17 kDa.

Comprende la **IL1a** e la **IL1b** codificate da due geni diversi. La prima svolge la sua azione sulle membrane cellulari mentre la seconda svolge la sua attività in circolo.

L'IL1 agisce sulle cellule T CD4+ - sulle cellule B - sui macrofagi – sull'endotelio inducendo la sintesi di IL6.

**Gli effetti biologici sono:**

- di pirogeno endogeno
- di indurre la sintesi di proteine di fase acuta da parte del fegato
- di indurre la cachessia

A differenza del TNF la IL1 non causa effetti letali neanche ad alte concentrazioni.

Potenzia la produzione dei CSFs.

La **IL6** è una proteina di 26 kDa prodotta dai macrofagi – dalle cellule endoteliali – dai fibroblasti ed altre cellule e viene rilasciata in presenza di IL1 e TNF dei quali potenzia l'azione.

**Gli effetti biologici sono:**

- di indurre la sintesi delle proteine di fase acuta da parte del fegato
- di indurre crescita dei linfociti B normali e patologici, questi ultimi in grado di produrre a loro volta IL6 (azione autocrina)
- di stimolare l'azione dei linfociti T e dei timociti.

La **IL8** comprende citochine infiammatorie di 8-10 kDa prodotte dai linfociti T attivati, dai macrofagi attivati dai lipopolisaccaridi o da altre citochine, dai fibroblasti, dalle cellule endoteliali, dalle cellule epiteliali e dalle piastrine.

**Gli effetti biologici sono:**

attivare specificamente i neutrofilii.

Attivare i polimorfonucleati (PMN), i linfociti T ed i leucociti basofili.

## **II GRUPPO COMPRENDE**

Citochine che regolano l'attivazione, la crescita e la differenziazione dei linfociti: IL2, IL4, transforming growth factor b (TGFb).

L'**IL2**, detta anche TCGF, è responsabile del passaggio dei linfociti T dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Viene prodotta dalle cellule T CD4+ ed in minor misura anche dalle cellule T CD8+.

Ha un peso molecolare di 17 kDa ed è codificata da un gene che si trova sul cromosoma 4.

I linfociti T CD4+ la producono per attivazione antigenica con un picco di secrezione dopo 4 ore dallo stimolo ed un secondo dopo 21 ore.

Le **funzioni dell'IL2** sono:

- di fattore di crescita per i linfociti T che hanno specifici recettori per questa citochina: p55 o TAC a bassa affinità e p70 e p75 ad elevata affinità
- di fattore di crescita delle cellule NK delle quali aumenta la capacità litica con generazione di cellule LAK; occorrono alti livelli di IL2 per stimolare le cellule NK a riposo, dal momento che queste esprimono soltanto p70
- di stimolare le cellule B
- di svolgere un'azione non nota sui macrofagi che posseggono recettori specifici
- di indurre la risposta delle cellule staminali midollari ai CSFs
- di fattore di crescita per i timociti maturi.

La stimolazione delle cellule T determina un rilascio massivo di IL2 con perdita del recettore p55 che, rilasciato in circolo, lega IL2 impedendole di stimolare altre cellule T.

La **IL4**, con peso molecolare di 20 kDa, viene prodotta dai linfociti T helper e dalle mastzellen. Svolge la sua azione sui linfociti Th2 che producono IL5 e IL6 (a differenza dei Th1 che producono IFN $\gamma$  e linfotossina).

Le **funzioni dell'IL4** sono:

- di indurre della sintesi di IgE da parte dei linfociti B
- di fattore di crescita per le mastzellen (azione sinergica con IL3)
- di attivare i macrofagi (minore rispetto allo stimolo da parte dell'IFN $\gamma$ )
- di indurre dell'espressione di CD23 sui linfociti B e sui macrofagi. Il CD23 è un recettore a bassa affinità per la Fc delle IgE.

### **III GRUPPO COMPRENDE**

Citochine che attivano le cellule infiammatorie: IFN $\gamma$ , linfotossina, IL5 e MIF (fattore inibente la migrazione).

L'**IFN $\gamma$**  è una glicoproteina omodimerica con un peso molecolare di 24 kDa. Le due catene che la compongono si distinguono soltanto per la glicosilazione.

Questa citochina è prodotta dalle cellule T CD4+ -T CD8+ e NK in seguito all'attivazione antigenica. L'IL2 è in grado di potenziare la sintesi di IFN $\gamma$ .

Le **funzioni di IFN $\gamma$**  sono:

- di attivare il macrofagi
- di aumentare l'espressione delle MHC classe I e di indurre dell'espressione di MHC classe II con conseguente reclutamento di cellule T CD8+ ed amplificazione della capacità di riconoscimento dell'antigene da parte delle cellule T CD4+.
- di promuovere la maturazione delle cellule T CD8+ e delle cellule B (azione sinergica con IL2)
- di favorire la produzione di IgM e IgG

- di potenziare la sintesi di IgE (azione sinergica con IL4)
- di attivare le cellule NK e le cellule dell'endotelio.

La **linfotossina** è una glicoproteina analoga per il 30% al TNF. La linfotossina ed il TNF competono per lo stesso recettore.

I geni che codificano entrambe le proteine si trovano sul cromosoma 6.

La linfotossina viene prodotta dalle cellule T attivate, spesso insieme all'IFN $\gamma$ .

La sua funzione consiste nell'aumentare l'adesività dei leucociti all'endotelio.

L'**IL5** è una glicoproteina con un peso molecolare di 20 kDa, ed è prodotta dalla sottopopolazione Th2 dei linfociti T CD4+ e dalle mastzellen.

Le **sue funzioni** sono:

- di promuovere la proliferazione e la maturazione delle cellule B (sinergismo con IL2 e IL4)
- di indurre la crescita ed il differenziamento dei leucociti eosinofili (ruolo nella risposta alle infezioni parassitarie).

Le cellule Th2 vengono infatti attivate dagli antigeni parassitari oltre che dagli allergeni.

Il **MIF** o fattore d'inibizione della migrazione aumenta l'espressione delle proteine dette integrine (molecole di adesione)..

#### **IV GRUPPO COMPRENDE**

Citochine che stimolano l'emopoiesi: IL3, GMCSF, MCSF, GCSF, IL7, IL9, IL10, IL11, IL12, SCF.

Sono chiamate CSFs o colony stimulating factors. La loro attività può essere inibita da: TNF, linfotossina, IFN $\gamma$  e TGF $\beta$ .

La loro attività è invece favorita da IL1 e IL6.

L'**IL3** o multi CSF agisce sulla cellula staminale non ancora indirizzata verso un tipo di maturazione. Viene prodotta dalle cellule T CD4+.

Il **GMCSF** favorisce la maturazione dei granulociti e dei macrofagi; viene prodotto dalle cellule T attivate, dai macrofagi, dai fibroblasti e dalle cellule endoteliali.

Viene prodotto a livello midollare. Promuove anche la maturazione degli eritrociti e delle piastrine.

L'**MCSF** agisce sui precursori della linea monocito-macrofagica e viene prodotta da macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali.

Il **GCSF** è prodotto dalle cellule T attivate dai macrofagi, dai fibroblasti e dall'endotelio con azione mirata sulle cellule progenitrici della serie granulocitaria.

L'**IL7** è un monomero di 25 kDa prodotto dai fibroblasti e dallo stroma del midollo osseo. Esercita uno stimolo proliferativo sulle cellule pro-B e pre-B, sulle cellule T CD4 e CD8. Può potenziare l'effetto di alcuni mitogeni.

L'**IL9** è una proteina di 40 kDa prodotta dalle cellule T helper stimulate da mitogeni, lectine e anticorpi anti CD3.

È attivatrice della crescita delle cellule T (attivatrice policlonale) della serie eritroide (azione sinergica con l'eritropoietina) potenzia con IL3 la funzione delle mastzellen, induce la crescita e la proliferazione della linea megacarioblastica tumorale.

L'**IL10** è prodotta dalle cellule Th2 e dalle cellule B tardivamente nell'ambito della risposta immunitaria e regola negativamente l'azione di altre cellule. Inibisce la produzione di citochine (IFN, IL2, IL3, altre) da parte delle cellule Th1, diminuisce l'espressione delle MHC classe II riducendo la capacità di presentare l'antigene da parte dei macrofagi e delle APC (antigen presenting cells).

L'**IL11**, prodotta dallo stroma del midollo osseo, agisce in sinergismo con IL6 ed IL7 stimolando la megacariopoiesi e la maturazione delle piastrine. Potenzia inoltre lo sviluppo dei macrofagi.

L'**IL12** (cell stimulating factor) è un eterodimero con un peso molecolare di 70 kDa, isolata da cellule B trasformate. Svolge il suo effetto sulle cellule T e sulle NK che posseggono il recettore specifico.

Induce la produzione di IFN $\gamma$  da parte di queste cellule e di altre citochine. Agisce in sinergismo con IL2 nello stimolo di IFN $\gamma$  e nella generazione di cellule LAK. Potenzia infine la proliferazione delle cellule T indotta da diversi mitogeni.

L'**SCF** (stem cell factor) è una citochina multifunzionale prodotta nel midollo osseo. Stimola la crescita delle mastzellen, favorisce con IL3 il rilascio dei mediatori infiammatori. È un fattore di crescita emopoietico a livello delle cellule staminali midollari. Agisce anche stimolando la crescita di cellule pro- e pre- B, timociti fetali e linfociti T CD4 e CD8.

## LA STORIA E L'ATTUALITÀ

Il termine **endotossine** è stato coniato da Pfeiffer nel 1892 per indicare la causa della febbre durante le infezioni batteriche, ma solo nel 1923 Florence Seibert ha dimostrato che le sostanze, causa della cosiddetta "injection fever", erano sì di origine batterica, ma non per questo identificabili con i batteri integri.

Nel 1952 Westphal e Luderitz riuscirono ad isolare le endotossine dal corpo batterico utilizzando il metodo al fenolo. Da quel momento si iniziò a studiare la struttura chimica di queste entità molecolari e fu così coniato il termine, certamente più corretto, di lipopolisaccaride.

Ma prima ancora che i lipopolisaccaridi venissero identificati, un chirurgo del Memorial Hospital di New York, il Dr. William Cooley, studiava e metteva a punto una cura contro il cancro utilizzando un filtrato di batteri da lui denominato MBV, con risultati positivi e ritenuti tali da tutta la Comunità Scientifica Americana. Questo avveniva nel periodo 1891-1936. Cooley fu veramente geniale ed intuitivo infatti, pur non conoscendosi ancora l'esistenza dei lipopolisaccaridi, aveva inventato un metodo per la loro estrazione identificando tale estratto come il vero responsabile dei risultati positivi riscontrati nei pazienti.

Cooley era rimasto colpito dal fatto che in un suo paziente, considerato ormai incurabile data la diffusione metastatica della malattia, improvvisamente e come per miracolo sia le metastasi sia la massa primaria erano regredite senza alcuna spiegazione scientifica plausibile. Studiò bene la storia del paziente e osservò che durante il corso della malattia aveva avuto due infezioni acute da Erisipela, grave malattia cutanea causata dallo *Streptococcus pyogenes*.

Cooley continuò a tenere in osservazione il paziente per sette anni senza riscontrare alcuna ripresa della malattia. Si convinse quindi che l'unica spiegazione di questa improvvisa guarigione era l'intercorsa infezione da streptococco. Decise allora di provocare artificialmente uno stato da infezione batterica in alcuni pazienti affetti da cancro in fase terminale utilizzando quello stesso ceppo. Inoculò quindi gli streptococchi vivi e virulenti in un paziente causando così uno stato infettivo grave accompagnato da febbre alta e da momentaneo stato di shock. Dopo qualche settimana constatò che, ad esempio, un cancro inoperabile alle tonsille si era ridotto di dimensioni, tanto che il paziente venne sottoposto a intervento chirurgico.

Per evitare lo stato di shock Cooley continuò a studiare il suo metodo arrivando ad utilizzare il filtrato ottenuto non più da batteri vivi, bensì uccisi. Allo *Streptococco* aggiunse la *Serratia marcescens* e chiamò il preparato MBV (Vaccino Multibatterico).

Da quel momento i successi terapeutici furono tanti e tali da destare la curiosità e l'interesse della Comunità Scientifica, pur restando il problema della febbre elevata a cui andavano incontro i pazienti trattati.

In quello stesso periodo si affacciava al mondo scientifico la possibilità di curare il cancro con la radioterapia e con la chemioterapia, metodi che consentivano una perfetta standardizzazione della cura in base alla stadiazione della malattia, al contrario dell'MBV di cui non si conosceva il principio attivo, la cui azione era soggettiva e che quindi non poteva essere perfettamente standardizzato. Fu così che Cooley fu ben presto dimenticato.

La figlia Helen Nauts, anch'essa medico, nel 1953 fondò a New York il Cancer Research Institute dove raccolse in varie monografie i casi di cancro curati con successo dal padre in tutto il mondo con l'MBV, in tutto 896 pazienti, con lo scopo di rendere onore e di continuare a far vivere questa grande

intuizione. Infatti Cooley, senza neppure immaginarlo, aveva inventato l'immunoterapia del cancro e fu un grande profeta poiché sosteneva quello che ai nostri giorni è un dato di fatto ormai acquisito. Cooley per l'ammalato di cancro, oltre alla MBV-terapia, riteneva essere di fondamentale importanza la dieta, l'assunzione di vitamine (consigliava 600 mg/die di Vitamina E per due mesi consecutivi) e di minerali, ferro in particolare. Insomma, aveva scoperto già allora tutto quello che oggi viene riproposto con maggiore scientificità.

Altri studi nel mondo sono stati fatti per l'immunoterapia del cancro, tra questi quelli sul BCG, vaccino contro la tubercolosi, che era stato messo a punto nel 1921 dall'Istituto Pasteur di Lille e che fu individuato soltanto dopo 40 anni come immunostimolatore contro il cancro, ma con risultati condizionati dai pesanti effetti collaterali come febbre elevata, stato di generale malessere, nausea, dolori muscolari e granulomi ed ulcere nel punto d'inoculo.

Nel 1974 a Parigi la Ciba Foundation presentò un vaccino a base di *Corynebacterium parvum*, con risultati promettenti nell'immunoterapia del cancro, ma la Comunità Scientifica decretò che poteva essere considerato solo un coadiuvante alla chemioterapia fortemente immunodepressiva. Inoltre anche questo vaccino, come il BCG, aveva il problema della tossicità con rialzi febbrili fino a 40°C.

Da quel momento le case farmaceutiche abbandonarono la ricerca sui vaccini ad estrazione batterica.

Nel 1975 il Dr. Giuseppe Zora, oncologo dell'Università di Messina, iniziò le ricerche al fine di preparare un vaccino ottenuto da ceppi batterici, ma privo di tossicità e di effetti collaterali, primo fra tutti la febbre. Il principio attivo dell'MBV risultava essere unicamente la frazione lipopolisaccaridica, occorreva quindi ottenere dei lipopolisaccaridi integri nella loro struttura molecolare e contemporaneamente non tossici, partendo da cellule batteriche selezionate con le caratteristiche genotipiche in fase S, ma con l'innocuità fenotipica della fase R.

Sono occorsi sei anni di studi e di tentativi per selezionare i ceppi batterici in grado di poter liberare lipopolisaccaridi con le suddette caratteristiche. A tal proposito effettuò ricerche comparative, che alla fine hanno portato alla scelta di due ceppi Gram-negativi sui quali è stato poi affinato il metodo di filtrazione selettiva dei lipopolisaccaridi.

Il preparato finale denominato RH100 è stato poi sottoposto ai tests di standardizzazione, utilizzando il metodo kit del limulus. Questa metodica, fornita da una ditta americana, consente l'esatto dosaggio del quantitativo di lipopolisaccaridi presenti.

Gli studi sono proseguiti in vivo e in vitro per anni, alla ricerca della dose standard necessaria per ottenere il massimo dell'attività antigenica-immunogenica.

A questa fase sono seguiti numerosi studi clinici pubblicati e presentati a convegni medici i cui risultati sono stati sottoposti al vaglio dal prof. Giuseppe Martines, Ordinario di Terapia Medica all'Università di Chieti, è interessante vedere in sintesi le conclusioni:

RH100 è prodotto definito "omeopatizzato" ma che ha la caratura di "farmaco" nell'accezione più esatta del termine.

RH100 ha conquistato la dignità di farmaco allopatico perché ha superato positivamente le prove sperimentali correttamente condotte e scientificamente significative.

RH100 è un farmaco perché, dopo le prove sperimentali, è stato utilizzato nei diversi protocolli clinici secondo schemi terapeutici uniformi, costanti per ogni tipo di malattia trattata, con dosaggi modulati e calibrati in rapporto alla patologia.

RH100 è farmaco perché è stato somministrato secondo le norme dei trials clinico-terapeutici.

I pazienti trattati sono stati studiati nelle varie fasi del trattamento ed i dati sono stati valutati. A conferma e supporto a quanto premesso nella valutazione generale dei risultati ottenuti nei diversi trials clinici, si può osservare che la terapia con RH100 è, oltre che scevra di effetti collaterali e/o indesiderati, efficace talora nel risolvere la patologia, talaltra nel prolungare la sopravvivenza. Sempre migliora la qualità della vita.

Di particolare interesse sono anche i risultati ottenuti, ed in un certo senso ancora preliminari, nelle patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla, ecc.

Nel trattamento dell'infezione da HIV i risultati sono rilevanti per la "ripresa" delle difese immunitarie ma non tali da modificare la prognosi. In oncologia il protocollo terapeutico con RH100 è pervenuto a questo risultato: 46% di sopravvivenza media a 48 mesi dall'inizio del trattamento con RH100 in pazienti con prognosi infausta a tre-sei mesi in vari tipi di cancro.

A questo punto si potrebbe obiettare che la terapia con RH100, poiché non esclude il trattamento anche con gli altri farmaci, abbia un effetto irrilevante o addirittura placebo ed i risultati ottenuti siano attribuibili solo alla somministrazione dei farmaci specifici per ogni patologia. Ciò è opinabile, possibile, ma assai poco probabile. Infatti, in sede conclusiva e ad integrazione, una "divagazione" di immunologia generale appare molto appropriata sulla base induttiva che amplia i concetti dei capitoli iniziali e meglio completa la comprensione dello stimolo dei lipopolisaccaridi. Atteso che RH100 è un immunomodulatore preparato però secondo le "procedure farmacologiche omeopatiche" ne deriva un principio attivo dinamizzato che, pur a dosi altamente diluite, stimola il sistema immunitario, che come è noto si attiva per vari tipi di stimolo ma assai meglio con molecole molto piccole ma altamente selettive come i lipolisaccaridi.

Nella fase induttiva della risposta immune specifica, oltre alla nota e non casuale capacità di modulazione tra i linfociti T e i linfociti B (riconoscimento antigene nativo e l'identificazione esclusiva dei frammenti peptidici) che sviluppa le fasi di presentazione e di processing, entrano in azione, a seguito dello stimolo, una serie di molecole definite co-stimolatori quali le citochine IL1, ecc., che aumentano la produzione del fattore di crescita autologo dei linfociti T.

Questo è il meccanismo di RH100.

Da quanto sin qui esposto, sulla sua azione, se ne deduce che è possibile ottenere risultati terapeutici incoraggianti, efficaci in alcune sindromi e malattie, soprattutto se non ancora trattate, se non addirittura risolutivi. A questo riguardo si pensi a due aree della medicina clinica che sono in forte espansione morbigena: quella delle sindromi da stress e quella delle sindromi geriatriche.

Sono due aree che possono ampliare l'uso terapeutico del farmaco RH100 con risultati proficui.

Alla prima appartengono le molteplici e multiformi sindromi cosiddette "patologie da stress", foriere nell'evolvere subacuto e cronico di malattie gravi ed anche a prognosi infausta, che colpiscono ora l'uno ora l'altro distretto organico. La casualità e l'etiopatogenesi di queste malattie da stress risiede nella depressione del sistema immunitario dovuta ai rapporti ed alle correlazioni che, ormai è notorio, vi sono fra psiche, sistema endocrino, sistema immunitario.

Si è definita così una nuova complessa disciplina: la "psico-neuro-endocrino-immunologia".

L'espressioni cliniche di questa "depressione immunologia" vanno dall'insorgenza delle neoplasie, alla scarsa reattività agli stimoli infiammatori. A ragione di questo status il soggetto, crollate le difese, è esposto ad ogni offesa, che prima l'equilibrio immunitario correlato ai sistemi superiori e più complessi ben controllava.

Alla seconda, quella della senescenza, si correlano le sindromi proprie del “tramonto” psico-biologico dell’uomo. Emerge con il trascorrere degli anni verso e nella senectus la figura dell’immunodepresso verso cui la clinica deve assumere posizione di diagnosi esatta e di terapia possibile.

Forse che profeticamente Cicerone avesse intuito questo deficit nell’affermare “senectus ipsa morbus?”. Il processo di senescenza infatti riduce e smorza sino all’estinzione le attività e le reattività biologiche. Il timo, modulatore della funzione T cellulare attivo nell’infanzia, invecchia con l’uomo, anzi forse anticipa la vecchiaia, cadendo le difese ed aumentando i processi di autoimmunità.

Con il vertiginoso aumento della vita media per garantire dignità alla stessa e non solo stati di sopravvivenza umanoide, si può trovare una soluzione nel somministrare, accanto agli altri farmaci geriatrici, anche opportuni dosaggi periodici di RH100.

Questi su descritti sono due esempi clinici precisi e definiti, anche severi, riconducibili a patogenesi d’immunodeficienza acquisita e con larga percentuale d’incidenza nella popolazione.

L’importanza di avere un preparato con molecole lipopolisaccaridiche integre deriva dalla conclusione che i lipopolisaccaridi detossificati, ovvero denaturati della frazione molecolare responsabile della tossicità (Lipide A), provocano una risposta immunitaria d’intensità equiparabile a quella della molecola in toto.

Gli studi di tossicità acuta e cronica sui ratti Wistar hanno dimostrato l’assenza degli effetti collaterali, riscontrati invece a seguito dell’inoculo di lipopolisaccaridi standard, ovvero astenia, inappetenza, rannicchiamento, rigidità muscolare, arruffamento del pelo, tremore, rialzi febbrili. Consecutivi inoculi per via intraperitoneale non hanno causato alterazioni degli organi prelevati. Trattasi, quindi, di un principio attivo assolutamente atossico. La mancanza di mortalità e quindi l’impossibilità di valutare una dose minima letale (DL50) è ascrivibile al fatto che la quantità di lipopolisaccaridi così ottenuti è in dose infinitesimale e perciò perfettamente ascrivibile alla Farmacopea Omeopatica Europea.

Dodici nanogrammi di lipopolisaccaridi di RH100 sono stati inoculati nel peritoneo di topi. Il gruppo di controllo è stato inoculato con 50 microgrammi di lipopolisaccaridi standard (E. coli). Dal liquido peritoneale sono stati raccolti i macrofagi per la valutazione di attività immunitaria con il metodo universalmente riconosciuto della chemiluminescenza.

L’attività immunitaria è stata misurata sino a 48 ore dall’inoculo.

Grande è la differenza di attività immunitaria riscontrata tra i due gruppi, tanto che alle 18 ore la risposta era dosabile nei trattati con RH100, essendo essa molto elevata rispetto ai valori registrati nel gruppo di controllo. Inoltre è risultato sufficiente un solo inoculo di 12 nanogrammi per provocare una risposta immunitaria che è risultata persistere fino a 48 ore.

L’osservazione al microscopio elettronico a trasmissione mostrava i macrofagi allo stato attivo, ovvero con citoplasma e nucleo rigonfio, cromatina addensata, ergastoplasma evidente, abbondanza di ribosomi, di lisosomi e di vacuoli, numerose estroflessioni di membrana, segno evidente di una spiccata attività fagocitante.

Il preparato inoculato per via intraperitoneale a topi Balb/c+ che incorrono in neoplasia spontanea della mammella, ha determinato una diminuzione del 38% per la comparsa di tumore negli animali pretrattati dimostrando di svolgere, una funzione preventiva. In questo ceppo si deve sapere che il tumore insorge spontaneamente in età adulta nel 99% dei casi.

Negli animali trattati in varie fasi della crescita neoplastica, la risposta è stata ottima quando il trattamento è stato effettuato in presenza di masse con un diametro massimo di 3-5 mm: l’80%

regredisce rispetto ai controlli non trattati in cui la crescita neoplastica avviene molto rapidamente e porta a morte l'animale entro 20 giorni.

Le stesse prove sono state fatte su ratti Wistar trapiantati in peritoneo con sarcoma ascite di Yoshida che in una settimana ne provoca la morte. Nei trattati prima del trapianto il sarcoma ascite non ha attecchito nel 27% dei casi; nei trattati subito dopo il trapianto, l'ascite si è sviluppata molto lentamente nel 65% dei casi, con conseguente notevole prolungamento della vita.

Inoltre l'ascite raccolta presenta un aspetto molto differente rispetto ai gruppi di controllo, inoculati con soluzione fisiologica presentandosi trasparente, non emorragica. Al microscopio si sono osservate poche cellule sarcomatose e una ricca popolazione macrofagica.

I lipopolisaccaridi sono molecole complesse, grosse ed è proprio al loro elevato peso molecolare dovuta l'attività antigenica-immunogenica. Infatti, in generale, gli antigeni non hanno potere immunogenico, ovvero di stimolare una risposta immunitaria completa, bensì determinano soltanto la produzione di anticorpi specifici.

I lipopolisaccaridi hanno tutte le caratteristiche per essere definiti "antigenici-immunogenici", ovvero l'estraneità all'individuo ospite, la complessità della struttura molecolare e l'elevato peso molecolare svolgono un ruolo di coinvolgendo nella risposta di tutto il sistema immunitario, sia cellulare sia umorale.

A questo proposito la migliore e sempre attuale definizione dei lipopolisaccaridi resta comunque quella data da La Placa: "Non esistono probabilmente altre sostanze biologiche dotate di così multiforme attività. Praticamente si può dire che non esiste sistema o funzione dell'organismo che non possa essere interessato dalla loro azione".

I lipopolisaccaridi più attivi hanno un coefficiente di sedimentazione di 25000 S e sono composti da tre regioni classificate con i numeri romani: la regione I ha un polisaccaride-O-specifico, a sua volta formato da unità oligosaccaridiche ripetute con enorme variabilità, come le lettere dell'alfabeto. È questa la regione antigenica responsabile della specificità sierologica. La regione II, detta core in quanto comune a tutti i lipopolisaccaridi, è costituita da un oligosaccaride composto da sequenze ripetute di acido 2-chetodesossioctonico (KDO). Essa è il punto di passaggio e di legame con la regione III, comunemente denominata lipide A. Il lipide A è formato da glicofosfolipidi costituiti da uno scheletro di glucosamina cui si legano acidi grassi a catena lunga. Questa regione è responsabile della tossicità molecolare. Svolge un'accertata funzione immunogenica. Infatti, i lipopolisaccaridi detossificati ovvero privati del lipide A, sono antigenici ma non immunogenici in quanto viene ridotto il peso molecolare e la complessità strutturale, mentre permane soltanto l'estraneità.

I lipopolisaccaridi sono i più potenti e completi immunostimolatori e immunomodulatori che la natura possiede.

Inducono resistenza aspecifica alle infezioni, attivano i monociti-macrofagi, i linfociti B e T helper, con produzione di immunoglobuline, attivano la via classica e alternativa del complemento, causano necrosi dei tumori specificatamente attraverso la produzione del fattore TNF, inducono apoptosi attraverso la produzione del fattore FAS-L.

I lipopolisaccaridi sono antigeni timo-indipendenti, macrofago-dipendenti ed attivatori policlonali dei B linfociti. Sono timo-indipendenti in quanto l'iniziale induzione dell'attività immunologica è legata unicamente ai monociti-macrofagi ed ai B linfociti.

La presenza dei monociti-macrofagi è necessaria per il legame iniziale, ovvero il lipopolisaccaride si lega al macrofago attraverso siti recettoriali di membrana, lo attiva ed induce la produzione di sostanze

aspecifiche che a loro volta stimolano i B linfociti che proliferano e maturano. Si è stabilito che il monocita-macrofago attivato dai lipopolisaccaridi agisce direttamente contro le cellule estranee all'organismo quali le cellule tumorali, i virus e i batteri, attraverso la fagocitosi.

Il monocita-macrofago capta il lipopolisaccaride e lo interna nel citoplasma degradandolo, riducendolo quindi in frammenti trasportabili all'interno del nucleo e immunologicamente riconoscibili anche dai T linfociti, con conseguente attivazione anche di quest'ultimi.

Oltre all'azione diretta, il monocita-macrofago attivato dai lipopolisaccaridi secreta numerosi fattori solubili: le citochine, il perossido d'idrogeno, le proteinasi e gli enzimi lisosomiali fattori tutti che sono stati studiati per la loro capacità di intervenire nella morte delle cellule neoplastiche. In tutto si è calcolato che le sostanze secrete dal monocita-macrofago attivo sono cento, finora biochimicamente note e definite. Tra queste, per l'attività d'immunostimolazione e di immunomodulazione, sono di particolare interesse la IL1, la IL12, i fattori di crescita CSF, il TGF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$ , il complemento della via classica e della via alternativa.

IL1 è la citochina che innesca tutto il processo immunologico cellulare, ovvero stimola i linfociti B a produrre anticorpi, attiva e stimola i linfociti Th a secernere le altre citochine (in particolare IL2 e IFN $\gamma$ ) stimola la chemiotassi dei neutrofili, la citotossicità delle cellule NK e l'azione citocida degli stessi monociti-macrofagi. La IL1, attraverso l'attivazione dei Th linfociti a produrre IL2, innesca un meccanismo a catena che coinvolge tutte le altre popolazioni cellulari e la produzione di tutte le citochine secondo un processo reversibile di autoregolazione e di reciproca sorveglianza immunologica. I linfociti Th1 sono preposti alla modulazione della risposta cellulo-mediata, mentre i linfociti Th2, anch'essi attivati dalla IL1, sono preposti alla risposta anticorporea.

La IL12 è la citochina, individuata in tempi più recenti. La sua azione sembra essere di primaria importanza nel cancro, tanto è vero che la sintesi di IL12 è del tutto assente nelle cellule del linfoma di Burkitt e nelle linee cellulari mieloidi. Attiva i linfociti Th1 e le cellule NK a produrre grandi quantità di IFN $\gamma$ , il quale a sua volta inibisce la sintesi di IL10 da parte dei monociti-macrofagi. È un fattore antiproliferativo che svolge un importante ruolo contro i patogeni endo- ed eso-cellulari. È stata dimostrata l'automodulazione della produzione di IL12 e di IFN $\gamma$ , poiché la IL12 stimola la sintesi dell'IFN $\gamma$  il quale, a sua volta, aumenta la sintesi di IL12.

Fei Song et al., in un lavoro datato 1996, riportano che proprio la IL12 è un importante induttore di produzione di IFN $\gamma$  da parte delle cellule T e NK.

La IL12 è un fattore essenziale per indurre l'immunità protettiva contro i patogeni intracellulari. Nello studio gli autori dimostrano che i topi Balb/c infettati da *Leishmania major* se trattati con IL12, producono attraverso le cellule T CD4, IFN $\gamma$ .

La IL12 attivata è composta da due subunità: p35 secreta da una sola parte del dimero p70, e p40, che può essere secreta da entrambi. Le subunità di IL12 sono codificate da due geni diversi. In uno studio Alies Snijders et al. hanno osservato che monociti purificati e stimolati con lipopolisaccaridi, producono p70 e p40 e che la produzione di p40 è superiore rispetto a quella di p70. Gli autori concludono che la produzione delle due subunità di IL12 è differentemente regolata per ciascuna di esse e che il livello di produzione di IL12 attiva da parte dei monociti, stimolati da lipopolisaccaridi, viene determinata dal livello di espressione della subunità p35.

I fattori di crescita prodotti dai monociti-macrofagi attivati dai lipopolisaccaridi sono il G-CSF, l'M-CSF, a loro volta stimolatori della maturazione di colonie monocitiche e macrofagiche.

L'M-CSF stimola la produzione e la maturazione dei neutrofili ed entrambi inducono funzioni specifiche dei monociti-macrofagi maturi, ovvero il killing intracellulare legato alla produzione dei perossidi ed il killing esogeno contro le cellule tumorali.

Il TNF $\alpha$  è un fattore ormai accertato e preponderante nell'uccisione delle cellule tumorali, la cui morte si verifica per necrosi. Induce l'attivazione degli stessi monociti-macrofagi, degli eosinofili e dei neutrofili, favorisce indirettamente la maturazione dei linfociti T.

Gli interferoni direttamente secreti dal monocita-macrofago attivo sono di tipo alfa e beta con specifica azione antivirale ed attivanti le cellule NK, i linfociti T ed i neutrofili.

Il monocita-macrofago attivato dai lipopolisaccaridi innesca il processo cellulare che porta alla produzione finale di complemento della via classica e della via alternativa in particolare. Il lipopolisaccaride agisce direttamente sul fattore C3 del complemento innescando così la via veloce dell'attività complementare, la quale a sua volta provoca rottura della membrana delle cellule neoplastiche con conseguente lisi.

Come si è detto in precedenza i lipopolisaccaridi sono attivatori policlonali dei B linfociti i quali vengono indotti alla proliferazione e alla maturazione. I B linfociti sono le cellule preposte alla sintesi delle immunoglobuline ed è proprio questo il punto in cui si innesca il processo che coinvolge l'attività del sistema immunitario umorale.

I linfociti B maturi migrano dal midollo osseo agli organi linfatici periferici, milza e linfonodi. In generale ogni linea cellulare di linfociti B è specifica per un solo antigene e quindi per la produzione di un solo anticorpo antigene-specifico, i lipopolisaccaridi sono policlonali in quanto stimolano indifferentemente tutte le linee di B linfociti. Il lipopolisaccaride si lega ai siti globulinici della membrana citoplasmatica, così provocando un vero e proprio turbamento cellulare che permette il trasferimento dell'informazione all'interno della cellula sia per traslocazione diretta sia per mediazione di messaggeri secondari. Interviene infine l'RNA ribosomiale che induce, per il segnale trasmesso dal DNA, la produzione d'immunoglobuline aspecifiche.

Il legame lipopolisaccaride-linfocita B avviene rapidamente ed è stato calcolato che il segnale arriva al citoplasma in 45-60 minuti. Questo processo cellulare è favorito dalla presenza di ioni  $Ca^{++}$

I linfociti B maturi e attivi, dopo il primo segnale, producono immunoglobuline di tipo M e in una seconda fase di tipo G o di tipo A.

I lipopolisaccaridi stimolano l'azione citotossica delle cellule NK, grossi linfociti granulari che si differenziano dai macrofagi oltre che per il diverso contenuto enzimatico anche per l'assenza degli pseudopodi di membrana e quindi della capacità fagocitaria. La cellula NK attivata dal lipopolisaccaride aderisce alla cellula bersaglio (cellula neoplastica), muove i suoi granuli azzurrofilo citoplasmatici verso il sito di adesione e li proietta contro il bersaglio, dando luogo al killing o lisi cellulare. Le cellule NK attive intervengono nei processi d'inibizione dei tumori primitivi, nel controllo della metastatizzazione e delle infezioni, regolano la risposta immunoglobulinica e l'attivazione dei linfociti T e B, intervengono nei processi di differenziazione e di produzione degli eritrociti e dei granulociti, secernono IFN $\gamma$  e FAS-L citochina che si lega ai FAS di membrana. Infatti i lipopolisaccaridi oltre che indurre necrosi cellulare, attraverso la produzione del fattore TNF, sono induttori di apoptosi, ovvero di suicidio cellulare, in particolare proprio mediante l'attivazione delle cellule NK, le quali producono il fattore FAS-L che si lega al recettore di membrana FAS, il quale a sua volta trasmette il segnale apoptotico al loco genetico p53 del DNA cellulare.

Lo studio della secrezione di citochine conseguente allo stimolo dei lipopolisaccaridi è stato fatto a diverse concentrazioni e su cellule in cultura. Culture di cellule PBMC sono state lavate in gradiente di densità, risospese nel medium e quindi sottoposte ai tests radioimmunologici per la valutazione della citotossicità delle cellule NK, la secrezione di TBF, di IL2 e di IFNg. La maggiore attività dei lipopolisaccaridi è stata riscontrata alla concentrazione di 10-15 nanogrammi, in rapporto allo standard, la cui attività massima è valutabile alla concentrazione di 50-100 microgrammi.

Maurizio Pianezza