

# I monociti tra reattività e displasia

G. Da Rin

Dipartimento di Medicina dei Servizi, S.C. Medicina di Laboratorio, ASL n. 3, Bassano del Grappa (VI)

## Riassunto

L'affidabilità della conta dei monociti è importante nella diagnosi di diverse patologie; i monociti aumentano infatti in corso di malattie infettive ed infiammatorie, sindrome mielodisplastiche e la diagnosi di leucemia mielomonocitica cronica è basata sulla presenza di un numero di monociti superiore a  $1 \cdot 10^9$  /L. Nella nostra sperimentazione alcune discrepanze tra i diversi strumenti è stata osservata nella conta dei monociti; queste discrepanze indicano che le diverse tecnologie non sempre riconoscono lo stesso tipo di cellula e questo può dipendere dall'eterogeneità dei monociti (dimensioni, morfologia nucleare, granularità e funzionalità).

Il metodo di riferimento per la conta dei monociti dovrebbe pertanto essere il citofluorimetro, questo metodo non è però utile nella diagnosi differenziale tra mielodisplasie e reattività nel sangue periferico in quanto a questo livello le cellule perdono le alterazioni fenotipiche. Una distinzione tra displasia e monocitosi reattiva è diagnosticamente impegnativa, sarebbe auspicabile avere a disposizione nuovi strumenti che aiutino in questa diagnosi differenziale.

## Summary

### Monocytes between reactivity and dysplasia

Reliability of the monocyte count can be important in diagnosis of different diseases; in fact, an increase in monocyte count is mainly observed in inflammation and infection disease, myelodysplastic syndromes, and moreover, the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia is particularly based on the presence of  $>1 \cdot 10^9$  monocytes/L. In our tests some discrepancies between instruments in monocyte counts were observed; these discrepancies may indicate that the different technologies don't always recognize the same type of cell and it may be dependent on the difficulty in identifying monocytes consequently the monocyte heterogeneity (size, nuclear morphology, granularity, and functionality).

The reference method for monocyte count could be improved by using a flow cytometry method, however this method is not useful in differentiating myelodysplasia from reactive monocytosis

because phenotypic aberrations are lost on blood cells. The reliable distinction of dysplasia from reactive monocytosis can be challenging. Additional diagnostic tools to aid in this differential diagnosis would be highly desirable.

*Key words:* monocyte count, flow cytometry, blood cell analyzers.

Quasi 20 anni fa è stato evidenziato che i monociti del sangue periferico oltre ad essere eterogenei dal punto di vista morfologico (dimensioni diverse 15-20  $\mu\text{m}$ , morfologia nucleare varia, differenti gradi di granularità citoplasmatica), differiscono anche nel loro fenotipo e funzione.

Inizialmente, per separare le diverse sottopopolazioni, sono state utilizzate procedure basate su gradiente di centrifugazione e centrifugazione controcorrente, che ha permesso la separazione di sottopopolazioni di monociti sulla base di dimensioni e densità.

Impiegando queste tecniche, la maggior parte degli au-

tori ha distinto fra due sottopopolazioni principali. Akiyama ha definito una popolazione principale detta "Monocita normale" ed una minore "Monocita intermedio"<sup>1</sup>.

Il monocita normale è caratterizzato principalmente dalle maggiori dimensioni, dalla più alta espressione dell'antigene di superficie OKM1 e più alta attività perossidasi. Il monocita normale libera una maggior quantità di interleukina-1 (IL-1) e colony-stimulating factor (CSF) mentre il monocita intermedio produce una maggiore quantità di interferone  $\alpha$ .

Successivamente la definizione delle sottopopolazioni

monocitarie è stata fatta sulla base dell'espressione degli antigeni di superficie<sup>2</sup>.

I monociti umani, fino ad allora, identificati solo mediante l'espressione del CD14, sono stati ulteriormente classificati in base alla differente espressione sia del CD14 (una glicosil-fosfatidilinositol-proteina mancante della porzione intracitoplasmatica) recettore del complesso lipopolisaccarid (LPS) e LPS-binding protein sia del CD16 recettore per la regione Fc delle IgG (FcγRIII) che gioca un ruolo importante nella clearance degli immunocomplessi.

Le cellule CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> sono larghe ~ 18 μm di diametro e rappresentano circa l'80-90% dei monociti circolanti, quelle CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> sono più piccole di diametro ~ 14 μm e costituiscono circa il 10%. Questi monociti CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> aumentano durante le infezioni, producono elevati livelli di tumor necrosis factor (TNF), bassi o assenti livelli di IL-10 una citochina anti-infiammatoria e sono chiamati anche monociti proinfiammatori.

E' ragionevole sospettare che queste due popolazioni di monociti possono rappresentare la "punta di un iceberg". Con lo sviluppo di nuovi marcatori e migliori tecniche di analisi, queste popolazioni potrebbero essere suddivise ulteriormente. Per esempio, i monociti umani sono stati già classificati anche in base all'espressione del CD 64 (FcγRI), così come all'espressione della molecola di adesione CD 56<sup>3,4</sup>.

Una popolazione di monociti CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> CD 64<sup>+</sup> ha un'elevata capacità fagocitaria come i CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> (che esprimono anche loro il CD 64) ma esprime alti livelli di MHC classe II come i CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Questa sottopopolazione riferita come monociti transizionali può attivare i linfociti T. Il loro sviluppo in relazione ai CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> è ancora da chiarire. Un'altra piccola sottopopolazione esprime il CD 56. IL CD56 o NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) è una glicoproteina transmembrana che ha un ruolo nel meccanismo di adesione tra le cellule. Questa sottopopolazione può arrivare fino a 1-2% delle cellule mononucleate ed è stata descritta come più matura dei classici monociti CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>.

I monociti CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> CD 56<sup>+</sup> sono aumentati nei pazienti con malattie infiammatorie croniche dell'intestino<sup>5</sup>.

## Differenziazione

Già nel 1939 Ebert and Florey riportarono l'osservazione che i monociti del sangue periferico migrano nei tessuti e si differenziano in macrofagi. Più recenti ricerche hanno evidenziato che i monociti possono differenziarsi principalmente in due diverse popolazioni, macrofagi e cellule dendritiche. I macrofagi sono in grado di degradare il materiale fagocitato e sono importanti localmente soprattutto per la clearance delle cellule morte nei tessuti normali e infiammati; le cellule dendritiche al contrario hanno scarse capacità proteolitiche ma sono specializzate nella cattura e nella processazione di antigeni in frammenti peptidici. I peptidi ottenuti sono poi complessati con le molecole del sistema MHC e quindi presentati alle cellule T<sup>5</sup>.

Diversi studi hanno analizzato la differenziazione delle sottopopolazioni monocitarie in vitro, la maggior parte di questi studi mostra una predisposizione dei monociti CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> a differenziarsi in cellule dendritiche pre-

sentanti l'antigene, tuttavia è stato visto che per la differenziazione è importante non solo il fenotipo dei monociti ma anche i fattori presenti in coltura<sup>6</sup>. Questi studi vanno tuttavia presi con cautela, ad esempio, molte cellule sono isolate da positiva selezione con monoAb contro molecole di superficie come il CD 16: l'interazione dell'anticorpo con il recettore può portare ad un certo grado di attivazione e questo può differentemente influenzare l'attività funzionale delle cellule.

## Ruolo nell'infezione ed infiammazione

La sottopopolazione di monociti CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> aumenta nel sangue periferico durante malattie infiammatorie ed infettive (arteriosclerosi, artrite reumatoide, sepsi, HIV) e cancro; questo suggerisce un loro ruolo in questi processi, ruolo che deve ancora essere formalmente dimostrato<sup>7</sup>.

Se questo aumento deriva da una mobilitazione dal pool marginale similmente a quanto succede con un intenso esercizio fisico è ancora da chiarire.

## Monociti e displasia

Nel corso di malattie mielodisplastiche o disordini mielodisplastici/mieloproliferativi come la CMML i monociti possono presentare segni di displasia (anomalie della morfologia nucleare o anomalie delle granulazioni e del citoplasma) possono essere presenti in circolo pro monociti e la monocitosi (monociti >1,000/μL [1.0 × 10<sup>9</sup>/L]) diventa uno dei criteri diagnostici<sup>8</sup>.

## Performance tecnologiche e necessità cliniche

L'affidabilità della conta dei monociti è quindi molto importante nella diagnosi differenziale delle diverse patologie. Le nuove generazioni di analizzatori ematologici pur dimostrando tra loro una buona correlazione evidenziano alcune discrepanze soprattutto nel caso di campioni con anomalie quantitative e/o qualitative. Questo può essere in relazione all'eterogeneità morfo-funzionale di questa popolazione e sta ad indicare che le differenti tecnologie non sempre riconoscono lo stesso tipo di cellule.

La conta microscopica, 100-200 cellule, ha il limite dell'imprecisione, inaccuratezza e della scarsa sensibilità, pertanto l'utilizzo del citofluorimetro va sicuramente sostenuto come metodo di riferimento per la conta dei monociti.

Anche il metodo citofluorimetrico però a livello di sangue periferico non aiuta nella diagnosi differenziale tra displasia e reattività perché, come evidenziato in letteratura, il sangue non è il comparto corretto per la ricerca di alterazioni fenotipiche in caso di mielodisplasia; questo è dovuto al fatto che la mielodisplasia è una malattia che risiede principalmente a livello del midollo dove esiste una mieloipoiesi inefficace che provoca una pressione selettiva nei confronti delle cellule anomale per raggiungere il sangue periferico<sup>9,10</sup>.

La nostra sperimentazione conferma che, nei casi in cui le anomalie morfologiche di tipo displastico siano sfumate, una distinzione tra displasia e monocitosi reattiva è diagnosticamente impegnativa; sarebbe perciò auspicabile avere a disposizione nuovi strumenti che aiutino in questa diagnosi differenziale.

## Bibliografia

1. Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, Neubauer RH, Oliver C, Favilla T, et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest* 1983; 72: 1093-105.
2. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74:2527-34.
3. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Emst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes. *Eur J Immunol* 2001; 31:48-56.
4. Sconocchia G, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, Grube M, Rezvani K, Fujiwara H, et al. Phenotype and function of a CD56<sub>+</sub> peripheral blood monocyte. *Leukemia* 2005; 19:69-76.
5. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953-64.
6. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006; 211:609-18.
7. Ziegler-Heitbrock L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2006; 81:584-92.
8. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2292-302.
9. Lacroix-Gazaille C, Chaury MP, Le Guyader A, Faucher JL, Bordessoule D, Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica* 2007; 92:859-60.
10. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:799-806.