

# INDAGINE PRELIMINARE SULL'ADERENZA DI GRANULOCITI NEUTROFILI DI CANE IN CORSO DI NEOPLASIE DEL SISTEMA EMATOPOIETICO

PALTRINIERI S., SARTORELLI P.

*Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Milano.*

## RIASSUNTO

L'attività adesiva dei granulociti neutrofili (PMN) isolati da 2 cani colpiti da linfoma multicentrico e da 2 cani colpiti da leucemia mieloide acuta è stata valutata paragonandola a quella osservata in 10 cani sani. La popolazione cellulare isolata dai soggetti patologici mediante gradienti di densità in Percoll è risultata meno pura di quella dei soggetti di controllo. In particolare in corso di leucemia mieloide sono stati recuperati neutrofili a densità inferiore rispetto alla norma e cellule neoplastiche contaminanti. L'attività adesiva osservata nei diversi casi è risultata molto variabile: nella popolazione isolata in corso di leucemia mieloide acuta sono state rilevate anomalie funzionali almeno in parte ascrivibili alla presenza di cellule neoplastiche.

## INTRODUZIONE

Lo studio delle funzioni granulocitarie nei soggetti colpiti da neoplasie del sistema ematopoietico riveste notevole importanza: anomalie della funzionalità dei polimorfonucleati (PMN) sono state infatti rilevate in leucemie mieloidi umane (Kaplan *et al.*, 1992; Ohtsuki *et al.*, 1992); citochine di derivazione anche granulocitaria (es. interleukina 1), possono inoltre influenzare lo sviluppo delle cellule tumorali (Munker *et al.* 1993; Baumann *et al.*, 1992; Carter *et al.*, 1992). Infine nei linfomi non-Hodgkin's umani, ai quali sono assimilabili quelli del cane (Teske, 1994) sono particolarmente frequenti forme infettive da germi opportunisti, non sempre associate a neutropenia, forse ad indicare un difetto nelle funzionalità delle difese aspecifiche dell'organismo (Brown, 1984).

Tra i diversi processi che presiedono all'intervento difensivo dei PMN, l'aderenza assume particolare importanza ed è mediata da proteine di membrana tra le quali le integrine e le selectine (Gearing e Newman, 1993; MacKay e Imhof, 1993). L'aderenza leucocitaria può essere indagata indirettamente con metodi immunoistochimici o in citofluorimetria per evidenziare la presenza delle molecole di adesione o, secondo un approccio funzionale, valutando direttamente l'adesione delle cellule a substrati inerti o biologicamente attivi.

Nella presente nota si riferiscono dati preliminari sull'aderenza, valutata in micropiastre, di neutrofili isolati da sangue di cani affetti da linfoma e leucemia mieloide rispetto a soggetti di controllo.

## MATERIALE E METODI

Sono stati esaminati 2 cani colpiti da forme aleucemiche di linfoma, diagnosticate mediante biopsia per aspirazione con ago sottile ed esame citologico, 2 soggetti colpiti da leucemia mieloide acuta, diagnosticata mediante

esame emocromocitometrico e valutazione morfologica delle cellule tumorali, e 10 cani di controllo, senza sintomatologia clinica apparente.

Dai ogni animale sono stati prelevati 3 ml di sangue dalla vena cefalica dell'avambraccio prima di ogni eventuale trattamento. Dopo esame emocromocitometrico i leucociti sono stati isolati con Percoll utilizzando gradienti discontinui a due diverse densità (1,092 e 1,071) al di sopra dei quali è stato stratificato il sangue (Zwahlen *et al.*, 1994). Dopo centrifugazione le bande ottenute sono state sottoposte a lisi ipotonica e successivi lavaggi. Al termine le cellule isolate sono state diluite a  $2 \times 10^6$  cell/ml in Hanks e albumina 0,2%; la vitalità cellulare è stata valutata con il metodo di esclusione del Trypan blu ed il grado di purezza su citocentrifugati colorati con May Grünwald-Giemsa.

Per l'esecuzione delle prove di aderenza sono state utilizzate micropiastre a 96 pozzetti (Bellavite *et al.*, 1992) una parte dei quali preincubati con gelatina per valutare l'aderenza basale: negli altri pozzetti questa procedura è stata omessa per valutare l'attivazione aspecifica dei PMN al contatto con la plastica. In ogni pozzetto sono state poste  $2 \times 10^5$  cellule totali e, dopo incubazione ed eliminazione mediante lavaggi delle cellule non aderenti, le cellule adese sono state lisate; è stata quindi valutata colorimetricamente la attività della fosfatasi acida, proporzionale al numero delle cellule adese.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Da un punto di vista ematologico (tabella 1) tutti i soggetti patologici mostravano un certo grado di anemia e di leucocitosi neutrofila, più evidenti negli animali leucemici, nei quali peraltro la maggior parte degli elementi mieloidi si presentava a stadi precoci di maturazione ed erano evidenziabili elementi indifferenziati.

Gr.	cani	Eritrociti	Hb	Ht	Leucociti	Neutrofilii	Eosinofili	Basofili	Linfociti	Monociti	Cellule
N°	N°	(n/mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)	(n/mm <sup>3</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	anomale (%)
1	1	4903300	12,3	35	19719	82	1	0	15	2	0
	2	3677850	8,3	23	31398	91	0	0	4	5	0
2	3	1685000	4	14	89650	68	0	0	11	5	16
	4	2170800	5,1	15	78924	63	0	0	12	11	14

Tabella 1: valori relativi ai parametri ematologici rilevati negli animali colpiti da linfoma (Gr.1) e da leucemia mieloide (Gr.2)

Come già riscontrato in precedenti lavori svolti presso il nostro Istituto (Lupo, 1994) in corso di neoplasia il grado di purezza dei PMN dopo isolamento con Percoll è molto più variabile che nei controlli (tabella 2).

I PMN degli animali colpiti da linfoma hanno mostrato una notevole variabilità individuale nelle capacità adesive con una scarsa risposta all'attivazione aspecifica (tabella 2). In entrambi i casi era presente un'intensa neutrofilia. Nel soggetto n° 1 si riscontra un'elevata aderenza basale, con un quadro funzionale simile a quello da noi osservato in animali con neutrofilie da flogosi purulente, pur non presentando il soggetto in esame segni evidenti di infezione. Nel cane n°2 l'elevata neutrofilia appare almeno in parte imputabile alla ridottissima attività adesiva dei PMN, con liberazione del *pool* marginale, in analogia con quanto segnalato in condizioni di ridotta funzionalità granulocitaria quali la

*leukocyte adhesion deficiency* (LAD), patologia ereditaria segnalata anche nel cane (Giger, 1995). Un ampliamento della casistica si rende necessario per valutare quanto questi quadri siano ripetibili e correlabili alla presenza di un linfoma.

Gr. N°	cane N°	Neutrofili (%)	Cellule anomale (%)	Vitalità (%)	Recupero PMN (%)	aderenza basale (D.O.)	Aderenza attivata (D.O.)	% attivazione
1	1	95	0	97	11,6	0,741	0,808	+ 9%
	2	84	0	98	38,5	0,021	0,026	+ 24%
2	3a	73	18	97	26,4	0,455	0,938	+ 106%
	3b	46	38	97	2,1	0,045	0,061	+ 36%
	4a	98,5	0,5	99	54,1	0,239	0,248	+ 4%
	4b	53	21	98	17,1	0,164	0,273	+ 66%
Controlli		96,9 ± 1,9	//	97,1 ± 1,5	23,6 ± 9	0,228 ± 0,103	0,338 ± 0,120	+ 48%

Tabella 2: valori relativi alle popolazioni isolate con Percoll ed all'aderenza osservata negli animali colpiti da linfoma (Gr. 1) e da leucemia mieloide (Gr.2) e valori medi osservati nei soggetti di controllo: nel gruppo 2 sono riportati i valori ottenuti nelle bande a densità superiore (3a, 4a) e inferiore (3b, 4b)

Anche nei due casi di leucemia mieloide esaminati il comportamento dei PMN è risultato differente (tabella 2). I PMN compaiono in discreta percentuale anche nella banda a densità inferiore, solitamente ricca di linfociti; questo conferma la presenza di sottopopolazioni di PMN a densità diversa dalla norma già segnalate in corso di neoplasie mieloidi (Thomsen *et al.*, 1991). Gli elementi immaturi si distribuiscono in entrambe le bande, soprattutto in quella a densità inferiore. Nel cane n° 3 l'aderenza basale delle cellule a maggiore densità (3a) è risultata superiore a quella degli animali di controllo, con intensa risposta alla stimolazione aspecifica; Le cellule a minore densità (3b) hanno invece evidenziato un'aderenza basale notevolmente ridotta, non interamente giustificabile con il minor numero di cellule presenti: il bassissimo recupero osservato in quest'ultima banda potrebbe indicare l'esistenza di una sottopopolazione di PMN anomala anche da un punto di vista funzionale. Nel cane n°4 entrambe le popolazioni cellulari isolate mostrano un'aderenza basale sovrapponibile a quella dei controlli, tenuto conto del diverso numero di cellule presenti (98,5% e 53%): le due popolazioni differiscono tuttavia per la risposta alla stimolazione aspecifica, praticamente assente nelle cellule a densità superiore e più marcata in quelle a densità inferiore. In entrambi i soggetti esaminati queste alterazioni potrebbero dipendere, oltre che da difetti intrinseci dei fagociti, anche dalla interferenza delle cellule neoplastiche e/o degli altri elementi cellulari, presenti, seppure in percentuali diverse, nelle popolazioni isolate.

In conclusione sono state rilevate anomalie fisico-chimiche e funzionali nei PMN isolati dai soggetti patologici, con spiccate differenze non solo tra animali affetti dallo stesso tipo di neoplasia, ma anche tra popolazioni cellulari isolate dallo stesso soggetto. Ciò conferma l'estrema variabilità riscontrabile nei tumori. Nei diversi casi variano la densità dei PMN e di eventuali cellule tumorali e, di conseguenza, la popolazione cellulare isolata. E' possibile che le alterazioni osservate siano almeno in parte secondarie all'influenza di altri tipi cellulari o che siano imputabili alla presenza di elementi immaturi e/o neoplastici: va tuttavia considerata anche la possibilità che questi elementi, o gli stessi PMN immessi in circolo in condizioni di neoplasia presentino un anomalo contenuto in fosfatasi acida. Alterazioni del corredo enzimatico dei PMN sono state segnalate in corso

di leucemie mieloidi croniche nell'uomo, per quanto riguarda mieloperossidasi elastasi e lattoferrina (Davey *et al.* 1988) e nel cane per quanto riguarda perossidasi e  $\alpha$ -naftil-acetato esterasi (Madewell *et al.* 1991).

**SUMMARY** - Adhesive properties of neutrophils (PMN) isolated from 2 dogs with multicentric lymphoma and from 2 dogs with acute myeloid leukaemia were investigated and compared with the results obtained from 10 healthy dogs. The Percoll density gradient sedimentation showed a cell population less pure in pathologic than in control dogs. Hypodense PMNs as well as neoplastic cells were isolated in leukaemic dogs. Adhesive ability showed marked individual differences: PMNs isolated from leukaemic dogs showed functional abnormalities maybe due to the contaminating neoplastic cells.

**BIBLIOGRAFIA** - Baumann M.A. *et al.* (1992) *Am. J. Hematol.* 39:269-274 - Bellavite P. *et al.* (1992) *J. Leukocyte Biol.*, 51:392-335 - Brown A.E. (1984) *Am. J. Med.* 76:421 - Carter A. *et al.* (1992) *Am. J. Haematol.* 40:245 - Davey F. R. *et al.* (1988) *Hum. Pathol.* 19:454-459 - Gearing A.J.H., Newman W. (1993) *Immunol. Today*, 14:506-512 - Giger U. (1995) Atti 28° incontro di aggiornamento permanente SCIVAC, Riccione 1995 - Kaplan S.S. *et al.* (1992) *Acta Haematol.* 87:16-21 - Lupo F. (1994) Valutazione di differenti metodiche per l'isolamento dei granulociti neutrofilii da sangue di cane: Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, A.A. 1993-94 - Madewell B.R. *et al.* (1991) *Comp. Haematol. Int.* 1:117-120 - Mackay C.R. and Imhof B.A. (1993) *Immunol. Today*, 14:99-102 - Munker R. *et al.* (1993) *Acta Haematol.* 90:77-83 - Ohtsuki T. *et al.* (1992) *Am. J. Hematol.* 41:50-56 - Teske E. (1994) *Vet. Quarterly* 4:209-219 - Thomsen M.K. *et al.* (1991) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28:143-156 - Zwahlen R.D. *et al.*: *Vet. Pathol.* (1994), 31:61-66