

S T U D I O

GENI E COMPORTAMENTI

Scienza e arte della vita

**AGGIORNAMENTI IN
PSICONEUROENDOCRINOIMMUNOLOGIA**

A cura di
Francesco Bottaccioli

edizioni
red!

Red Edizioni, Milano © 2009

Coordinamento editoriale: Diletta D'Amelio
Realizzazione editoriale: Redint Studio, Milano
Disegni: Sandor Breznay, Milano

Stampa: L.E.G.O. Spa, Lavis (TN)

www.rededizioni.it

Un metodo comparativo e integrato per lo studio dei sistemi complessi

di Riccardo Ortolani, Paolo Bellavite, Salvatore Chirumbolo, Giuseppe Tridente, Antonio Vella

In questo intervento si presenta un metodo di valutazione multiparametrico del sistema immunitario, concepito per lo studio dei sistemi complessi e per l'integrazione con lo studio degli altri sistemi (psichico, neurologico ed endocrino).

I sistemi complessi

Lo sviluppo di tecnologie sofisticate nelle diverse branche della medicina, capaci di fornire una enorme quantità di dati, è sicuramente una condizione fondamentale per ottenere informazioni e conoscenza della biologia dei sistemi complessi; tuttavia, non è assolutamente sufficiente per conoscere lo stato dei sistemi e la dinamica delle loro relazioni. Per questo serve un approccio multidisciplinare che superi le tecnologie analitiche integrando

ed elaborando i dati in una visione d'insieme. Il sistema immunitario è un sistema complesso in quanto: a) *strutturato in una rete* di numerosissime componenti cellulari che comunicano tra loro sia direttamente sia attraverso mediatori solubili; b) *dinamico e cognitivo*, risponde agli stimoli, si adatta agli stessi e ne mantiene la memoria; c) *integrato* al sistema nervoso ed endocrino con i quali comunica a tutti i livelli.

Il nostro lavoro parte dalla determinazione di una serie di valori, tipici di ciascun soggetto, relativi alle numerose specie cellulari del sangue periferico, che possono essere identificate e tipizzate con metodi prevalentemente citofluorimetrici. In ambito immunologico le sottopopolazioni linfocitarie rappresentano uno strumento con grandi potenzialità per studiare lo stato e, soprattutto, la dinamica del sistema. Tuttavia, ci siamo presto resi con-

to che per gli aspetti clinici non è sufficiente ottenere e fornire una serie di dati di laboratorio, ma tali dati vanno integrati con altre informazioni ed elaborati secondo tre passaggi che sono qui sinteticamente enunciati.

- La raccolta e misurazione dei parametri biologici (relativi ai diversi sistemi: immunitario, endocrino, nervoso) ha bisogno di essere integrata e correlata temporalmente con gli *eventi esterni* (ambiente di vita, abitudini di vita: alimentazione, attività fisica, fumo, alcool, droghe; eventi eccezionali particolarmente stressanti: morte di persone care, separazioni, perdita del lavoro; infezioni eccetera) e con gli *interventi esterni* (farmaci di varia natura, vaccini, interventi chirurgici eccetera).
- Il secondo passaggio, fondamentale per la conoscenza dello stato dei sistemi di quella persona, è quello di elaborare i dati attraverso un *confronto*: il metodo prevede di comparare il valore di ogni singolo parametro di una persona con l'insieme dei valori dello stesso parametro di un gruppo di altre persone (campione selezionato dalla popolazione generale oppure da un gruppo di soggetti con una o più caratteristiche in comune). Dalla comparazione (calcolo del rango percentile) otteniamo un valore (da 0 a 100) che indica la *posizione* in cui quel soggetto si trova rispetto agli altri per quel determinato parametro (per esempio: 75° rango percentile significa che il 75% dei soggetti con i quali abbiamo fatto la comparazione hanno valori di quel parametro inferiori a quelli del soggetto considerato). I valori dei ranghi percentili fanno emergere le caratteristiche di quel soggetto: per alcuni parametri egli potrà essere posizionato tra quelli che hanno valori alti (>80° rango percentile), per altri potrà essere posizionato tra quelli che hanno valori bassi (<20° percentile), per altri parametri ancora potrà essere posizionato su valori attorno alla mediana ($\geq 20^\circ$ percentile e $\leq 80^\circ$ percentile).

- Il terzo passaggio è quello di rappresentare le *posizioni*, relative a un certo numero di parametri, nel loro insieme, ottenendo così una specie di *impronta* di quel determinato soggetto, per quel determinato numero di parametri in quel determinato momento. La rappresentazione grafica aiuta molto nella lettura di ogni singolo parametro e, più ancora, nella lettura d'insieme. La sequenza di posizioni di quel determinato soggetto in quel determinato momento difficilmente (se non praticamente impossibile) sarà uguale a quella di altri soggetti; in un certo senso, sarà assolutamente unica e irripetibile. La sovrapposizione tra l'insieme delle posizioni di quel soggetto in quel determinato momento e l'insieme delle posizioni dello stesso soggetto in un tempo successivo (settimane, mesi, anni) permette di seguire i movimenti dei suoi parametri nel tempo. In generale questo approccio potrebbe essere un aiuto per leggere e studiare la *dinamica* dei sistemi, nel singolo individuo, in gruppi selezionati, in un campione della popolazione generale (Figura 1).

Il lavoro che si sta facendo e, soprattutto, che è previsto per il prosieguo è di ricercare le associazioni tra le posizioni dei vari parametri, tra le posizioni dei parametri e gli eventi e interventi temporalmente associati, meglio ancora tra pattern di posizioni di parametri ed eventi, interventi e sintomi clinici. Da tali associazioni ci si aspetta di comprendere meglio le dinamiche del sistema immunitario nei singoli individui e in relazione alle loro esperienze patofisiologiche.

Una modalità per ricercare questo potrebbe essere la ricerca in un'ampia banca dati (*si veda* il paragrafo 'Banca dati') dei soggetti che hanno uno, due, o meglio, più parametri in posizioni simili. Per esempio ci si potrebbe chiedere cosa hanno in comune, nella clinica o in altri eventi della loro storia patobiografi-

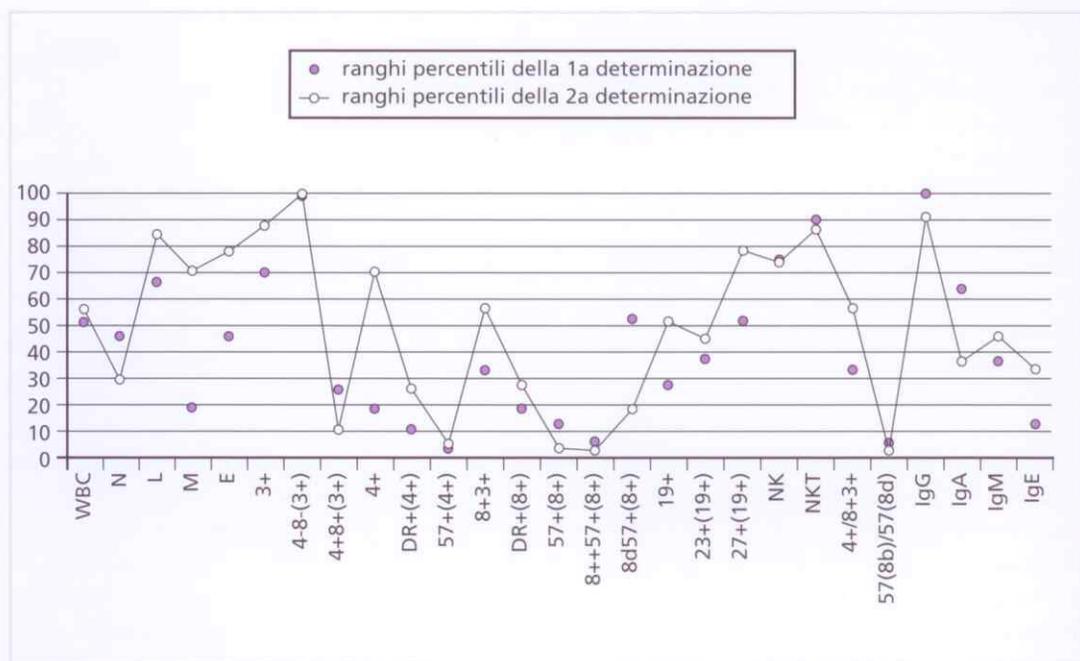


Figura 1. Confronto tra due determinazioni dello stesso soggetto in tempi diversi (ranghi percentili dei valori assoluti).

ca (inclusi genere, razza, abitudini di vita, età, lavoro, abitazione), due o più soggetti i quali mostrano alcuni parametri nelle stesse posizioni. Se di uno o più soggetti che hanno somiglianze ho informazioni cliniche e/o diagnostiche, le similitudini presenti ci suggeriscono in quali direzioni diagnostiche indirizzarsi. La possibilità di eseguire la ricerca informatizzata di queste omologie potrebbe essere di grande aiuto sia per le ipotesi diagnostiche, qualora la diagnosi sia incerta, sia per le risposte a terapie di varia natura.

Qualora si seguisse uno, o meglio, più soggetti prima e dopo una terapia e alcuni di questi avessero risposto bene alla terapia potremmo ipotizzare che un soggetto con pattern simile a quello di coloro che hanno risposto bene, potrebbe avere qualche possibilità in più di essere tra coloro che risponderanno bene. Infatti, da che cosa dipende una buona risposta alla terapia? Dipende sicuramente anche dallo stato di disequilibrio in

cui i sistemi si trovano; se si riesce in qualche modo a evidenziare le varie tipologie (sottogruppi) di disequilibri sulla base di pattern di posizioni di parametri, si possono ottenere informazioni predittive di tipo prognostico sia clinico sia terapeutico.

Creare una banca dati

Quanto detto sopra è possibile attraverso la creazione di una banca dati e di un software realizzato ad hoc. Dal 2000 nel Servizio di Immunologia Clinica si è iniziato a raccogliere e registrare i dati degli esami diagnostici effettuati (studio delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie), integrandoli, quando disponibili, con altri dati immunologici, non immunologici, clinici, farmacologici.

A oggi la banca dati è costituita da circa 8000 registrazioni. Ognuna di queste raccoglie da un minimo di 30 parametri a un massimo di

200 parametri circa. La maggior parte sono parametri di tipo immunologico (popolazioni dei globuli bianchi, principali popolazioni linfocitarie e, soprattutto, numerose sottopopolazioni linfocitarie, immunoglobuline, autoanticorpi).

Di una buona parte delle registrazioni (circa 1000) sono registrati anche dati sierologici relativi alle comuni infezioni virali erpetiche che più significativamente modificano i parametri immunologici (EBV, CMV, HSV, VZV). Oltre ai dati immunologici, di una parte di soggetti sono presenti anche dati della funzionalità tiroidea e, in alcuni casi, anche surrenalica. Di una parte sono stati raccolti e inseriti anche dati fisiologici (attività lavorativa, fumo, alcol, alimentazione, gravidanze, attività fisica), dati clinici (patologie pregresse, patologie in atto), dati sul trattamento farmacologico (terapie pregresse e terapie attuali). Naturalmente, è previsto per il prosieguo di implementare e completare la banca dati con il maggior numero di informazioni per ciascun paziente.

Riguardo alla clinica, grazie alla numerosità del campione a oggi è possibile costituire circa trenta gruppi. I più rappresentati sono: HIV (1350 soggetti circa: costituiscono una banca dati separata), autoimmunità, artrite reumatoide, immunodeficit, infezioni ricorrenti, autismo, sindrome di down, HCV, allergie, astenia cronica, donatori. Metà circa delle registrazioni appartengono a soggetti diversi, l'altra metà a soggetti di cui si hanno più di una determinazione, anche fino a 15, distribuite negli anni. Questo permette di avere osservazioni dello stesso soggetto nel tempo, monitorandone in tal modo la dinamica.

L'elevata numerosità ed eterogeneità clinica di soggetti mostra la variabilità e la ricchezza di risposte immunologiche che l'intera popolazione è in grado di esprimere. Tutte le sottopopolazioni linfocitarie, sia nei valori percentuali sia nei valori assoluti, variano sensibilmente con l'età, in particolare nelle prime

due decadi di vita e nelle età avanzate, con il sesso e con la razza.

Ritenendo il parametro età la variabile che ha il 'peso' maggiore si è deciso, in questa prima fase, di impostare la selezione dei soggetti in base a questo parametro. Il metodo proposto prevede pertanto il confronto del singolo soggetto con gli altri a lui più vicini per età: precisamente, i 100 soggetti della banca dati che immediatamente lo precedono come età e i 100 soggetti che immediatamente lo seguono come età.

Al confronto con la banca dati in generale abbiamo aggiunto la possibilità di un confronto con il gruppo di appartenenza (qualora noto: per esempio, artrite reumatoide, autismo eccetera) sempre secondo il parametro età. In questo caso abbiamo ridotto i soggetti per il confronto ai 25 immediatamente di età inferiore e ai 25 immediatamente di età superiore, essendo i soggetti appartenenti al gruppo un numero sensibilmente ridotto rispetto alla popolazione generale presente in banca dati.

La banca dati ideale dovrebbe avvicinarsi il più possibile alla popolazione generale. In pratica, dovrebbero essere presenti tutte le condizioni di salute possibili, associate a tutti i vari equilibri omeodinamici che i diversi soggetti adattandosi sono stati in grado di costituire e che sono compatibili con la vita. Ciò richiederebbe un adeguato campionamento statistico che fosse rappresentativo dell'intera popolazione. Ovviamente, ciò non è possibile nel nostro servizio. Né, tuttavia, sarebbe, in tal senso, rappresentativa la sola popolazione di soggetti presunti 'sani'. L'unica condizione di cui si deve tenere conto è quella di un equilibrio: evitare cioè che nelle popolazioni usate come confronto ci siano gruppi o patologie 'troppo' rappresentate. Nel caso della nostra banca dati, il problema si è posto (per ora) solo con i soggetti HIV+ i quali, proprio perché il nostro servizio è un importante centro di riferimento diagnostico, rappresentano una popolazione molto

numerosa e con valori dei parametri immunologici molto lontani dai valori più rappresentati. Pertanto, tali soggetti sono stati esclusi dalla banca dati della popolazione generale e costituiscono un sottogruppo studiato a parte per gli scopi del caso.

Soggetti 'sani' e letteratura

I riferimenti convenzionalmente utilizzati per valutare i parametri biologici sono i range derivati da soggetti ritenuti 'sani' (corrispondono comunemente ai criteri per abilitare alla donazione di sangue, quindi sono normalmente i donatori di sangue). Non rappresentando questa popolazione tutte le fasce di età, per avere i riferimenti relativi ai bambini e ai ragazzi si fa riferimento alla letteratura.

Per integrare il confronto anche con i range di riferimento convenzionalmente utilizzati, si sono raccolti i valori della letteratura relativi ai soggetti sani (fino a ora soprattutto relativa alle prime due decadi di vita), si è poi fatta una media pesata, così da arrivare a un unico valore di riferimento che possa essere inserito nella rappresentazione grafica. In questo modo, è possibile osservare la posizione del soggetto sia rispetto alla popolazione selezionata dalla banca dati sia rispetto alla media pesata delle mediane della letteratura corrispondente all'età del soggetto (*si veda* Figura 2). A una osservazione generale, la distribuzione delle medie pesate delle mediane della letteratura corrisponde approssimativamente alla distribuzione della maggior parte della popolazione della banca dati (*si veda* Figura 3). Il fatto che i valori della letteratura relativi ai soggetti sani si posizionino dove è posizionata la maggior parte dei soggetti della banca dati è molto confortante per la validazione della banca dati stessa. Il fatto si spiega, probabilmente, sia per la numerosità dei casi ('legge dei grandi numeri') sia per la par-

ziale (con il tempo sempre maggiore) eterogeneità dei soggetti presenti. Alcuni articoli in letteratura confermerebbero tali ipotesi.

L'approccio qui proposto fa sorgere alcune domande cui si potrà rispondere solo mediante lo sviluppo della banca dati e l'esperienza clinica: è sufficiente confrontare il soggetto con una popolazione ritenuta di riferimento? È sufficiente per interpretare bene il dato e dargli un significato nell'insieme e nella complessità confrontarlo con una popolazione selezionata come riferimento ideale, oppure il confronto solo con i 'sani' fa perdere informatività? E ancora: esiste il 'sano' oppure esiste un 'continuum' di soggetti che si adattano agli 'stress' in modo diverso?

Proprio nell'affronto di un sistema complesso come quello immunitario, si tende correttamente a pensare che esista una gradualità di salute dove essere 'più sano' significa non tanto avere i parametri 'normali', quanto avere in quel momento una maggiore capacità adattativa.

Conclusioni

Il riscontro di associazioni tra fattori di varia natura (genetici, costituzionali, infettivi e ambientali, abitudini alimentari, fenomeni di dipendenza quali fumo, alcol, droghe in genere, stress e dolore psicologico, farmaci, vaccini, interventi chirurgici eccetera) e il quadro immunologico ha indubbe ricadute per la comprensione e la prevenzione di molte patologie che coinvolgono il sistema immunitario. Il confronto all'interno di una banca dati, pur rappresentando dei limiti (la banca ideale richiederà tempo), presenta sin d'ora molti vantaggi per la conoscenza della singola persona e della fisiologia e fisiopatologia dei sistemi.

Solo se si considera una banca dati rappresentativa di una popolazione generale è possibile dire che il parametro di quel soggetto è in

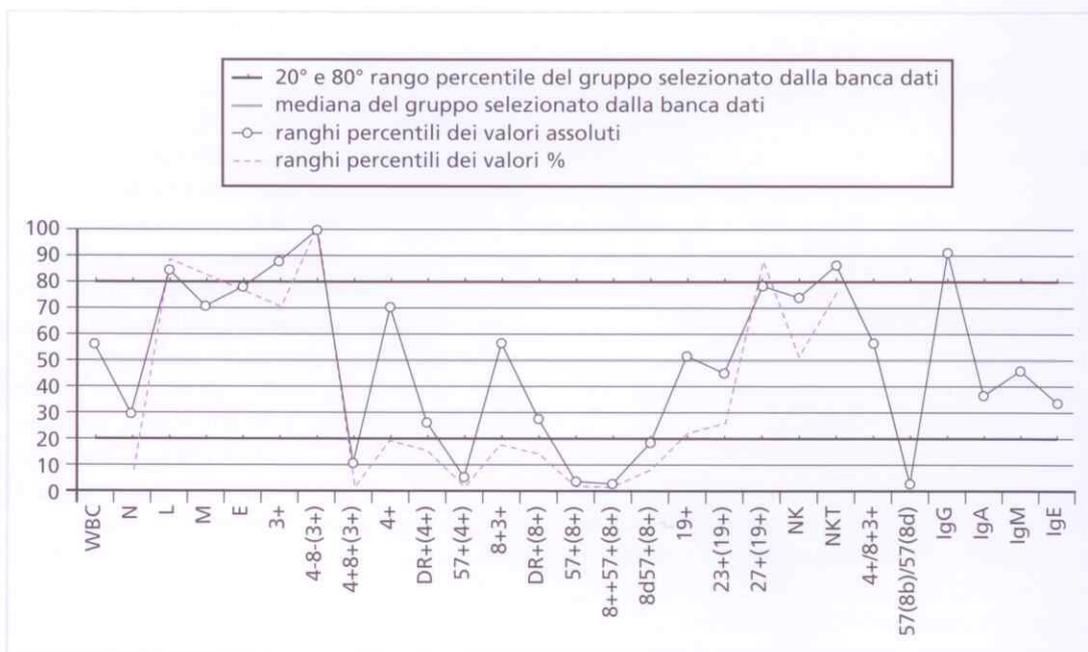


Figura 2. Esempio di immunogramma di un soggetto con malattia linfoproliferativa dei linfociti $T_H\delta$.

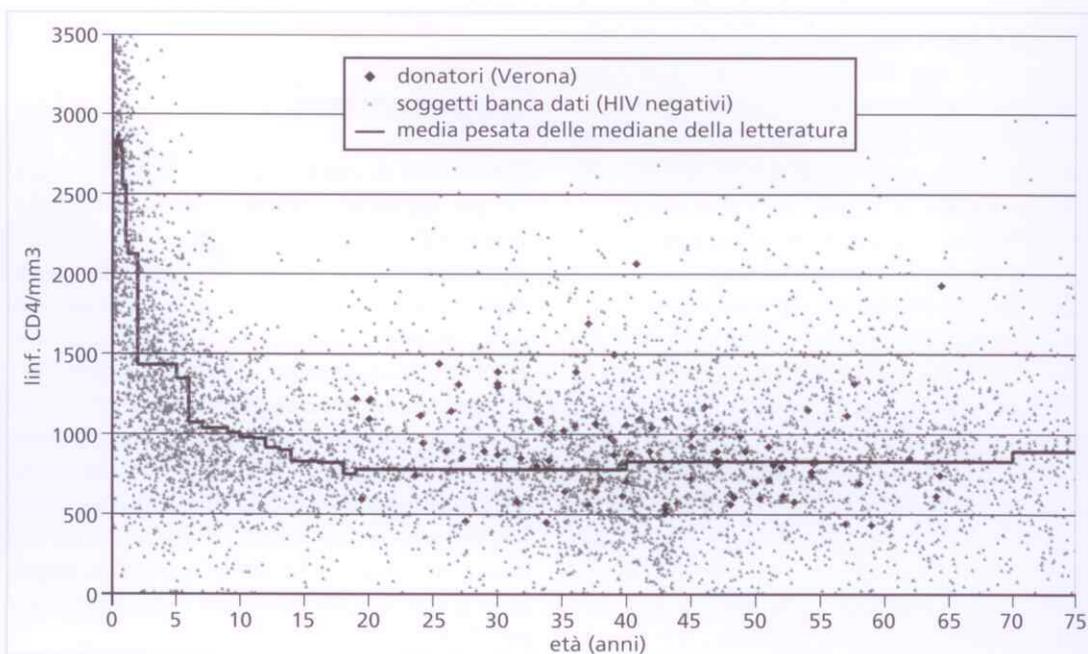


Figura 3. Distribuzione dei linfociti T CD4 positivi nelle varie età: sovrapposizione tra la media pesata delle mediane della letteratura,

i soggetti HIV negativi presenti in banca dati e un gruppo di donatori di Verona.

una posizione elevata anche rispetto ai soggetti che presentano patologie, altrimenti si potrà solamente dire che è in posizione elevata rispetto ai 'sani'.

Solo se si considerano i gruppi con precise caratteristiche cliniche si può confrontare un soggetto con clinica simile ed evidenziarne le posizioni rispetto al gruppo di appartenenza, creando così dei sottogruppi utili per una futura predittività clinica e, soprattutto, di risposta alle terapie. Per esempio, un valore di 500 linfociti CD8+ per un soggetto con una infezione in atto da CMV potrebbe essere sovrapponibile a quello dei soggetti 'sani' della stessa età; tuttavia, al confronto con quelli dei soggetti con la stessa infezione in atto, risulterebbe significativamente basso, suggerendo un deficit di risposta.

Solo se si conosce il pattern di posizioni più frequente in una patologia, in presenza di un soggetto con pattern simile posso ragionevol-

mente suggerire di approfondire la ricerca diagnostica in quella direzione.

Tale approccio, al momento limitato ad alcuni parametri immunologici, potrebbe in futuro comprendere altri parametri (quantificabili) immunologici (per esempio citochine), endocrinologici (ormoni), neurologici (per esempio neurotrasmettitori), psicologici (scale eccetera) permettendo così una valutazione più completa della capacità adattativa dei singoli e della popolazione in generale. Esso potrebbe rappresentare uno strumento di studio e, soprattutto, di supporto ad avvalorare l'importanza di considerare l'individuo e i sistemi nella loro integrazione. Auspichiamo che possa anche contribuire a migliorare la conoscenza nella diagnosi e, soprattutto, a verificare e valorizzare gli approcci terapeutici che, partendo da una visione olistica della persona, non si limitano a riequilibrare una sola parte ma affrontano la cura considerando più aspetti possibili.

Bibliografia

- BERRINGTON J.E., BARGE D., FENTON A.C., CANT A.J., SPICKETT G.P., Lymphocyte Subsets in Term and Significantly Preterm UK Infants in the First Year of Life Analysed by Single Platform Flow Cytometry, *Clin. Exp. Immunol.*, 2005; 140: 289-292.
- COMANS-BITTER W.M., DE GROOT R., VAN DEN BEEMD R., NEIJENS H.J., HOP W.C., GROENEVELD K., HOOIJKAAS H., VAN DONGEN J.J., Immunophenotyping of Blood Lymphocytes in Childhood. Reference Values for Lymphocyte Subpopulations, *J. Pediatr.*, 1997; 130(3): 388-393.
- DENNY T., YOGEV R., GELMAN R., SKUZA C., OLESKE J., CHADWICK E., CHENG S.C., CONNOR E., Lymphocyte Subsets in Healthy Children During the First 5 Years of Life, *JAMA* 1992 Mar 18; 267(11):1484-8. Erratum in: *JAMA* 1992 Jun 17; 267(23): 3154.
- ERKELLER-YUKSEL F.M. ET AL., Age-related Changes in Human Blood Lymphocyte Subpopulations, *J. Pediatr.*, 1992; 120(2): 216-222
- GROSSI E., COLOMBO R., CAVUTO S., FRANZINI C., The REALAB Project: A New Method for the Formulation of Reference Intervals Based on Current Data, *Clinical Chemistry*, 2005; 51(7): 1232-1240.
- JENTSCH-ULLRICH K., KOENIGSMANN M., MOHREN M., FRANKE A., Lymphocyte subsets' Reference Ranges in an Age- and Gender-balanced Population of 100 Healthy Adults - A Monocentric German Study, *Clinical Immunology*, 2005; 116(2): 192-197.
- LORIA A., SALAS R., Patient Data for Evaluating Reference Values, *Rev. Invest. Clin.*, 1989; 41(4): 381-385.
- ROBINSON M., O'DONOHUE J., DADIAN G., WANKOWICZ A., BARLTROP D., HOBBS J.R., An Analysis of the Normal Ranges of Lym-

phocyte Subpopulations in Children Aged 5-13 Years, *Eur. J. Pediatr.*, 1996; 155(7): 535-539.

SHEARER W.T., ROSENBLATT H.M., GELMAN R.S., OYOMOPITO R., PLAEGER S., STIEHM E.R., WARA D.W., DOUGLAS S.D., LUZURIGA K., MCFARLAND E.J., YOGEV R., RATHO-

RE M.H., LEVY W., GRAHAM B.L., SPECTOR S.A.; Pediatric AIDS Clinical Trials Group, Lymphocyte Subsets in Healthy Children from Birth Through 18 Years of Age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 Study, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2003; 112 (5): 973-80.