Analisi delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie, delle cellule staminali e delle cellule dendritiche su sangue periferico in pazienti ustionati

Vincenza Tortorici[1], Claudio Rizzo[1], Lorena Angileri[1], Nicola D'Arpa[2], Francesco Conte[2], Guido Pagnucco[1], Francesco Gervasi[1]

[1]U.O. Ematologia con Trapianto Midollo Osseo e [2]Centro Ustioni, Azienda di Rilievo Nazionale e di Alta Specializzazione (A.R.N.A.S.) Civico-Benfratelli, G. Di Cristina e M. Ascoli, Palermo

ABSTRACT

Characterization of lymphocytic populations and subpopulations, stem cells and circulating dendritic cells in burned patients. The purpose of this study was to quantify in peripheral blood the dendritic cells (DC), compared with the immune response to the infectious injury under extensive burns of the human body, highlighting the role of DC as clinical biomarkers in burn. We evaluated the profile of myeloid and plasmocytoid DC, the lymphocyte populations (T-B-NK), regulatory T cells (T-reg) and circulating stem cells in healthy subjects, and compared results with burned subjects evolving toward the sepsis. 12 burned patients and 17 healthy controls were studied. The patients were differentiated with reference to fact that they evolved toward sepsis or not. In patients with sepsis we discovered an increase of DC lineage- HLA-DR+ (LIN-DR+), CD209+, hematopoietic stem cells (CD34+) and TCR$\gamma\delta$ T lymphocytes. These changes could indicate the immunologic response that burned patients activate during an infectious process.

INTRODUZIONE

Nei pazienti con gravi ustioni, difetti nella risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata e nella reazione flogistica possono spiegare un'evoluzione sfavorevole dell'infezione anche dopo l'attuazione di una corretta e mirata antibioticoterapia (1-3). L'evoluzione dell'infezione verso la sepsi nei pazienti ustionati sembra essere correlata con il ruolo determinante delle cellule dendritiche (DC) e con l'azione citotossica diretta delle cellule "natural killer" (NK) (4-6). Gli aspetti biologici delle DC nei pazienti ustionati potrebbero essere di fondamentale importanza per capire il ruolo di tali cellule nei confronti della risposta immunitaria in quei pazienti che evolvono verso la sepsi.

Le DC sono cellule professionali presentanti l'antigene (APC) e come tali sono specializzate nella cattura e nella processazione di antigeni in frammenti peptidici che sono successivamente complessati con le molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) e presentati alle cellule T per iniziare la risposta immunitaria. Le DC sono le cellule più potenti nell'indurre una risposta T-linfocitaria ed hanno la peculiare capacità di stimolare non solo cellule T-memoria, ma soprattutto linfociti-T "naive" (7). Quindi, le DC hanno un ruolo centrale (adiuvanti naturali) per l'induzione di una risposta immune antigene-specifica.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare le DC circolanti in corso di ustioni estese del corpo umano, valutando il profilo normale delle DC mieloidi e plasmacitoidi, delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie (T-B-NK), delle T-regolatorie (T-reg) e dei progenitori staminali circolanti CD34+ in controlli sani, confrontandolo con quello dei pazienti ustionati che evolvono o no verso la sepsi. Lo studio ha voluto evidenziare il ruolo delle popolazioni cellulari sopra elencate come biomarcatori nell'ambito della caratterizzazione clinico-diagnostica dell'ustione.

MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 12 pazienti ustionati (pervenuti consecutivamente), di cui 4 hanno sviluppato sepsi, e 17 controlli sani.

I campioni di sangue sono stati processati all'esordio e al 3°, 7°, 10°, 14° e 20° giorno. L'analisi immunofenotipica in citometria a flusso è stata condotta su campioni raccolti con K_3-EDTA e allestiti con metodica "lyse no wash" (8), che permette di studiare le popolazioni del sangue periferico, utilizzando per l'acquisizione il citofluorimetro Cyan ADP tm (Beckman Coulter) a tre laser (405nm, 488 nm, e 633 nm). Per l'analisi è stato utilizzato il "software" Summit 5.3 off-line (Beckman Coulter). Lo studio fenotipico degli antigeni di membrana è stato effettuato mediante marcatura con anticorpi monoclonali specifici, direttamente coniugati con isiotiocianato di fluoresceina (Fitc), ficoeritrina (Pe) o fluorocromi tandem [(Pe-Texas-Red, "energy couple dye" (ECD), ficoeritrina + cianina 5 (Pe-Cy5.5), ficoeritrina + cianina 7 (Pe-Cy7), allofi-cocianina (APC), alloficocianina + cianina 7 (APC-Cy7)].

I campioni sono stati cosí trattati:

- conteggio delle cellule del campione al contaglobuli automatico (LH 780, Beckman Coulter) e diluizione, se necessario, ad una concentrazione di $10x10^6$ cellule,
- 100 µL di sangue intero aggiunti in ogni tubo,

- successiva aggiunta di 10 µL di anticorpo monoclonale,
- agitazione e incubazione 15 min a temperatura ambiente al buio,
- aggiunta di 2 mL di soluzione lisante (tetraammoniocloruro),
- agitazione e incubazione per 15 min a temperatura ambiente,
- acquisizione al citometro.

L'acquisizione è stata effettuata su 500.000 eventi, con l'esclusione dei debris sulla "dot plot" (foward scatter vs. side scatter). Ciò ha permesso di determinare uno spazio multidimensionale che ha consentito l'analisi contemporanea di 9-10 parametri, due fisici (forward scatter e side scatter) e fino ad otto immunologici in relazione all'espressione della fluorescenza delle popolazioni cellulari analizzate. L'analisi e la quantificazione delle diverse popolazioni dendritiche, nonché delle sottopopolazioni linfocitarie, è stata effettuata impiegando una strategia di "gating" sequenziale basata sul fatto che le DC vengono identificate dal "lineage" negativo (LIN-) e dall'espressione del HLA-DR (9). Il "gate" è una finestra disegnata dall'operatore che permette di analizzare selettivamente una popolazione cellulare in base alle caratteristiche morfologiche e/o immunologiche. I "gate" logici mirano a migliorare la definizione della popolazione da studiare per l'ottenimento di informazioni che non siano viziate dalla presenza di contaminanti.

Il pannello di anticorpi monoclonali, riportato nella Tabella 1, è stato costruito secondo i criteri e le strategie di seguito esposte. CD3 è espresso sulla superficie dei T linfociti maturi; CD14 è espresso ad elevate intensità sui monociti ed a bassa intensità anche dai granulociti; CD16 è espresso progressivamente durante la maturazione mieloide, utile nel caratterizzare e quantificare i linfociti NK; CD19 è associato ai linfociti B; CD11c è espresso sugli elementi della serie mieloide, a maggiore intensità su quelli della serie monocitaria, ma è presente anche sulle DC; CD123 è espresso sui precursori mieloidi, DC di derivazione mieloide, basofili, mastcellule,

Tabella 1
Pannello degli anticorpi monoclonali utilizzato per lo studio

Fluorocromo		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Isiotiocianato di fluorosceina	*Antigene*	Bianco	CD 11 C	CD 209	CD 4	CD 45	TCR γδ
	Clone		K B90	D CN46	S 3.5	2 D1	IMMU-510
	Ditta		Dako	Becton Dickinson	Invitrogen	Becton Dickinson	Immunotech
Ficoeritrina (Pe)	*Antigene*	Bianco	CD 123	CD 86	CD 3	CD 25	TCR αβ
	Clone		7 G3	FUN-1	UCHT1	C D25	BMA 031
	Ditta		BD	BD	Dako	Invitrogen	Immunotech
Pe Texas Red	*Antigene*	Bianco				CD 4	
	Clone					S 3-5	
	Ditta					Invitrogen	
Energy couple dye (ECD)	*Antigene*	Bianco	HLA-DR	CD 14	CD 45		CD 45
	Clone		IMMU-357	RMO52	J.33		J.33
	Ditta		Immunotech	Immunotech	Beckman Coulter		Beckman Coulter
Ficoeritrina + cianina 5 (Pe Cy.5)	*Antigene*	Bianco	CD 14	CD 83	CD 20 + CD 19		
	Clone		TUK4	HB15E	B-Ly1 7/HIB-19		
	Ditta		Invitrogen	Becton Dickinson	Dako/ Becton Dickinson		
Ficoeritrina + cianina 7 (Pe Cy.7)	*Antigene*	Bianco	CD 19	CD 19	CD 8	CD 8	
	Clone		SJ25-C1	SJ25-C1	3B5	3B5	
	Ditta		Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	
Alloficocianina (Apc)	*Antigene*	Bianco	CD 3	CD 3	CD 56	CD 3	CD 34
	Clone		SKT	SKT	B159	SKT	581
	Ditta		Becton Dickinson	Becton Dickinson	Becton Dickinson	Becton Dickinson	Becton Dickinson
Alloficocianina + cianina 7 (Apc Cy.7)	*Antigene*	Bianco	CD 16	CD 16	CD 16		CD 3
	Clone		3-G8	3-G8	3-G8		SK 7
	Ditta		Becton Dickinson	Becton Dickinson	Becton Dickinson		Becton Dickinson

macrofagi e megacariociti; CD209 è un marcatore specifico delle DC di origine mieloide-monocitaria in relazione ai diversi stati maturativi, influenza il contatto iniziale tra DC e cellule T e una efficiente migrazione delle DC dal sangue verso i tessuti in relazione ai diversi stati maturativi; HLA-DR è "antigene leucocitario umano", espresso costitutivamente su diversi tipi cellulari, tra cui linfociti B immaturi e maturi, monociti macrofagi, DC e cellule di Langerhans. Il TCR$\gamma\delta$ è un tipo meno comune di recettore per l'antigene dei linfociti T espresso su linfociti T CD4+ e CD8+ (TCR), che è espresso su una piccola popolazione di linfociti T; questa forma di TCR non riconosce complessi formati da peptidi con molecole MHC autologhe.

Il pannello utilizzato per lo studio delle DC, contenuto nel tubo 2, consentiva di identificare gli eventi "lineage" deboli e/o negativi e di quantificare le 4 sottopopolazioni di DC:

DR+ CD123+ CD11c-	plasmacitoidi
DR+ CD123+ CD11c+	(descrizione solo fenotipica)
DR+ CD123- CD11c+	mieloidi
DR+ CD123- CD11c-	DC indifferenziate

Sono state inoltre distinte 4 sottopopolazioni che identificano la presenza di molecole costimolatorie, associate alla maturazione delle DC del sangue periferico:

CD209+ CD86+ CD83+	matura
CD209+ CD86- CD83+	(descrizione solo fenotipica)
CD209+ CD86+ CD83-	immatura
CD209+ CD86- CD83-	(descrizione solo fenotipica)

L'analisi citometrica consentiva inoltre di determinare la percentuale delle cellule DC123+ e DC11c+ riferita sia alla totalità degli eventi acquisiti (500.000) sia alla popolazione dendritica circolante ("gate").

I risultati ottenuti sono stati statisticamente analizzati con il test T di Student, considerando significative le differenze con $P < 0,05$.

RISULTATI

I 12 pazienti ustionati sono stati studiati alla diagnosi (esordio) e successivamente il 3°, 7°, 10°, 14°, 20° giorno. Si sono inoltre differenziati tali pazienti in riferimento al fatto che essi abbiano sviluppato o no la sepsi. Analizzando le medie dei risultati delle analisi dei pazienti ustionati con sepsi rispetto a quelli privi di sepsi, e i controlli, abbiamo notato nei diversi giorni la variazione antigenica delle seguenti popolazioni: LIN-DR+, CD209+, DR+CD123+CD11c-, DR+CD123+CD11c+, DR+CD123-CD11c+, DR+CD123-CD11c-, CD3-CD16+CD56+, TCR$\gamma\delta$ e CD34+ (Figura 1). In particolare, si evidenziava un costante aumento della popolazione dendritica LIN-DR+ (Figura 1a); una variazione in aumento delle CD209+ fino al 7° giorno, una diminuzione fino al 14° giorno e un nuovo aumento a partire dallo stesso (Figura 1b); un andamento pressoché costante della sottopopolazione DR+CD123+CD11c- fino al 14° giorno, per poi aumentare bruscamente al di sopra dei valori medi di controllo (Figura 1c); un costante aumento della popolazione dendritica indifferenziata DR+CD123-CD11c- con un ulteriore incremento dal 14° giorno (Figura 1d); un andamento oscillante dei valori di CD3-CD16/CD56+, sempre al di sotto dei valori rilevati nei pazienti senza sepsi e dei valori di controllo, fino al 10° giorno, da cui iniziava una brusca discesa per raggiungere il valore minimo al 14° giorno (Figura 1e); un brusco aumento dei valori TCR$\gamma\delta$ a partire dal 14° giorno per superare i valori medi di controllo fra il 14° ed il 20° giorno (Figura 1f); e un valore massimo, molto al di sopra dei valori medi di controllo, di CD34+ al 7° giorno, che tendeva a rientrare nei valori medi di controllo tra il 14° e il 20° giorno (Figura 1g).

Successivamente, sono state messe a confronto le diverse percentuali antigeniche tra i pazienti studiati. La Figura 2 mostra le differenze significative tra i pazienti ustionati e i soggetti non ustionati di controllo. L'analisi tra i pazienti con sepsi rispetto ai controlli ha dato i seguenti risultati:

DR+CD123+CD11c+	diminuzione 64%
DR+CD123-CD11c+	diminuzione 73%
CD209+CD86+CD83+	diminuzione 73%
CD3+	diminuzione 11%
CD3-CD16+CD56+	diminuzione 50%
CD19+	aumento 48%.

L'analisi tra i pazienti senza sepsi rispetto ai controlli ha dato i seguenti risultati:

DR+CD123+CD11c+	diminuzione 57%
DR+CD123-CD11c+	diminuzione 70%
CD209+CD86+CD83+	diminuzione 78%
CD3+	diminuzione 15%
CD4+CD25+	diminuzione 60%
TCR $\gamma\delta$	diminuzione 61%
Globuli bianchi	aumento 70%
CD3+CD4+	aumento 19%.

Infine, nei 4 pazienti ustionati che sviluppavano la sepsi rispetto agli 8 pazienti ustionati che non la sviluppavano le variazioni significative ottenute riguardavano le seguenti popolazioni:

Globuli bianchi	diminuzione 37%
CD3-CD16+CD56+	diminuzione 43%
CD34+	aumento 85%.

DISCUSSIONE

Le DC umane sono fenotipicamente e funzionalmente eterogenee (10, 11). Le DC mieloidi rappresentano un gruppo composto da tre tipi cellulari: cellule di Langerhans, DC derivate dai monociti CD14+ del sangue, DC dermiche o interstiziali (12). Le DC mieloidi si trovano nel sangue in forma immatura. L'espressione di molecole costimolatorie come CD40, CD209, CD80 e CD86 e gli antigeni HLA può essere utilizzata per valutare il grado di maturazione e lo stadio di differenziazione delle DC. Altri due marcatori (CD83 e p55), che sono espressi ad alto livello sulle cellule mature, aiutano in modo quasi definitivo a caratterizzare la DC. Le DC plasmacitoidi rappresentano un sottotipo cellulare unico, capace di rilasciare grandi quantità di interferone di tipo I dopo l'incontro con virus o sotto altro stimolo; sono importanti non solo per la produzione di questa citochina ad attività antivirale, ma anche per la generazione delle

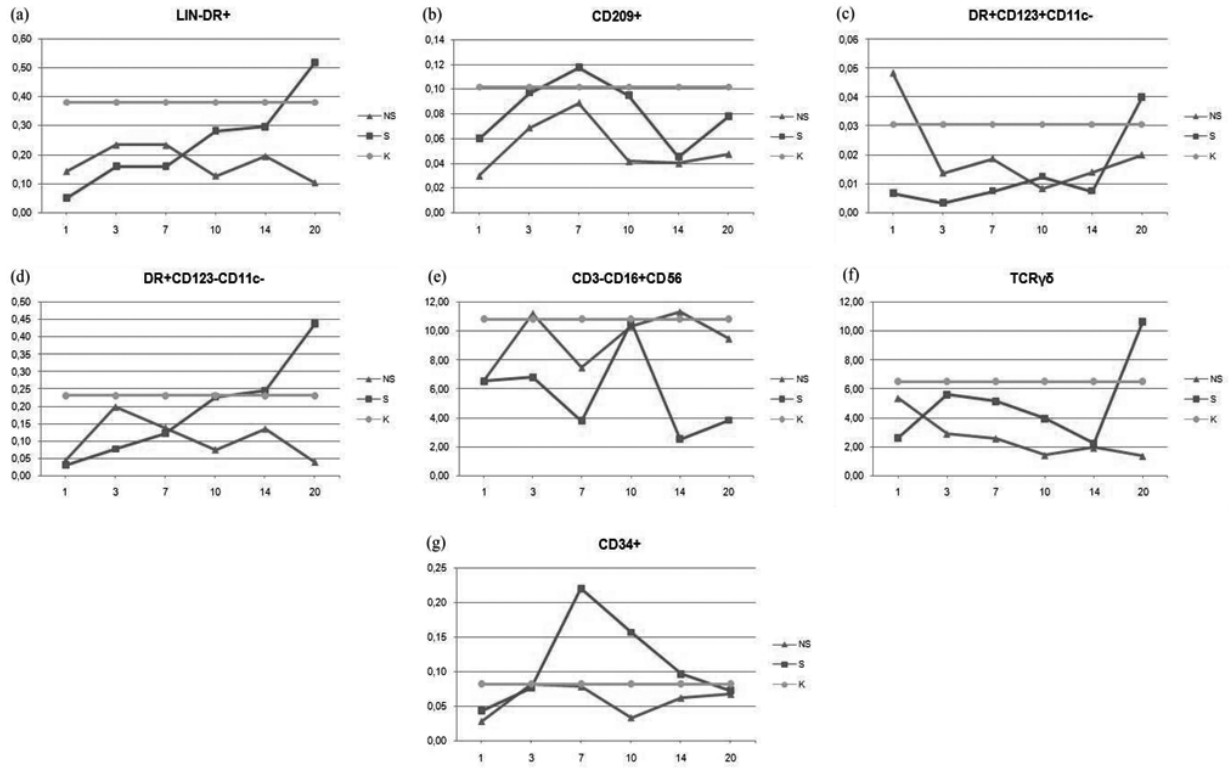


Figura 1
Andamento delle variazioni antigeniche rilevate nei pazienti ustionati studiati, con sepsi (S) e senza sepsi (NS), e nei controlli (K).

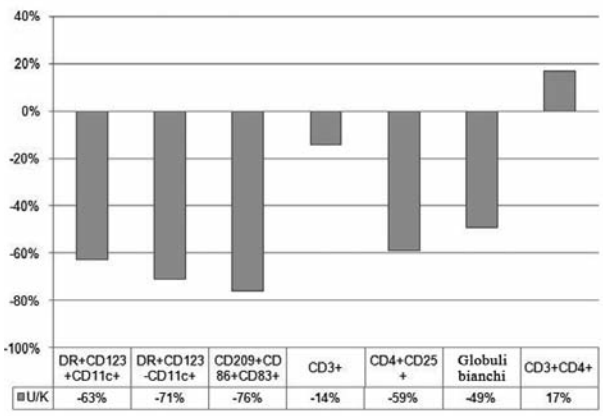


Figura 2
Variazioni significative (P <0,05) nelle popolazioni cellulari dei pazienti ustionati (U) rispetto ai soggetti non ustionati di controllo (K).

plasmacellule dai linfociti B e la risposta anticorpale (13).

L'abilità nell'identificazione e nell'enumerazione delle DC e dei loro "subset" nel sangue periferico di pazienti ustionati sembra essere fondamentale per capire il ruolo di queste cellule nella evoluzione clinica di tali pazienti. Analizzando le popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria nei pazienti ustionati con sepsi rispetto a quelli che non sviluppano la sepsi in citometria a flusso multiparametrica (8 colori) nei diversi giorni si sono evidenziate maggiori variazioni tra il 14° ed il 20° giorno. Tali variazioni riguardavano l'aumento delle popolazioni LIN-DR+, CD209+, DR+CD123-CD11c-, TCRγδ e CD34+ circolanti, nonché la diminuzione della popolazione NK, evidenziate considerando le medie dell'espressione dei vari antigeni sulle popolazioni cellulari oggetto di studio. Valori significativi delle variazioni delle popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria nei pazienti ustionati con sepsi rispetto a quelli che non sviluppano la sepsi riguardavano l'aumento delle CD34+ e la diminuzione dei globuli bianchi e delle cellule CD3-CD16+CD56+. Possiamo ipotizzare che le variazioni delle popolazioni cellulari indicate siano associate ad una risposta immunologica inefficace che i pazienti ustionati con sepsi attivano durante il processo infettivo. Tali eventi sembrano correlati con il manifestarsi della sepsi e mettono in evidenza il ruolo della determinazione citometrica delle cellule CD34+ precursori degli elementi emopoietici, dei leucociti e delle cellule NK come marcatori di sepsi nei pazienti ustionati.

Dai dati ottenuti nei pazienti ustionati rispetto ai controlli si evidenziava la diminuita circolazione della sottopopolazione dendritica mieloide DR+CD123-CD11c+ (71%), della sottopopolazione dendritica DR+ CD123+ CD11c+ (63%), della sottopopolazione dendritica matura CD209+CD86+CD83+ (76%) e della popolazione caratterizzante le cellule T-reg CD4+CD25+ (59%). La diminuzione delle DC probabilmente contribuisce all'im-

munosoppressione osservata dopo l'ustione. Nel nostro studio non abbiamo osservato un significativo ruolo delle DC nello sviluppo della sepsi. Ciò nonostante, sulla base di studi effettuati sul ruolo delle DC in difesa alle infezioni batteriche e sepsi, appare plausibile che queste siano indispensabili per il mantenimento della risposta immunitaria, ipotizzando l'utilità di strategie terapeutiche che mirino a mantenere livelli ottimali delle DC al fine di migliorare la prognosi del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Areschoug T, Gordon S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. Cell Microbiol 2009;11:1160-9.
2. Shojaeian J, Jeddi-Tehrani M, Dokouhaki P, et al. Mutual helper effect in copulsing of dendritic cells with 2 antigens: a novel approach for improvement of dendritic-based vaccine efficacy against tumors and infectious diseases simultaneously. J Immunother 2009;32:325-32.
3. Wijewardana V, Brown KN, Barratt-Boyes SM. Studies of plasmacytoid dendritic cell dynamics in simian immunodeficiency virus infection of nonhuman primates provide insights into HIV pathogenesis. Curr HIV Res 2009;7:23-9.
4. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. Ann Surg 1995;222:482-90.
5. Bender BS, Winchurch RA, Thupari JN, et al. Depressed natural killer cell function in thermally injured adults: successful in vivo and in vitro immunomodulation and the role of endotoxin. Clin Exp Immunol 1988;71:120-5.
6. Suzuki F, Pollard RB. Alterations of interferon production in a mouse model of thermal injury. J Immunol 1982;129:1806-10.
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000;18:767-811.
8. Wood BL, Arroz M, Barnett D, et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007;72:S14-22.
9. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunology 1994;82:487-93.
10. de Vries IJ, Eggert AA, Scharenborg NM, et al. Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. J Immunother 2002;25:429-38.
11. Efron P, Moldawer LL. Sepsis and dendritic cell. Shock 2003;20:386-401.
12. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2588-92.
13. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity 2003;19:225-3.