



*Azienda Ospedaliera
Ordine Mauriziano
di Torino*



DIPARTIMENTO AREA MEDICA
S.S.D. D.U. – IMMUNOLOGIA CLINICA ed ALLERGOLOGIA
Dirigente Responsabile: Prof. Giovanni ROLLA
Largo Turati, 62 Torino
Telefono: 011/508. 2421 / 2926
e-mail grolla@mauriziano.it

Relazione Annuale Assegno di Ricerca A.A. 2014-2015

Meccanismi di regolazione dell'attivazione dei basofili nelle malattie allergiche

Introduzione.

I basofili giocano un ruolo importante nella patogenesi delle malattie allergiche, sia come cellule effettrici, che come cellule dell'immunità innata, capaci di condizionare la risposta linfocitaria in senso Th2. I meccanismi di regolazione dell'attivazione e della degranolazione dei basofili sono solo parzialmente conosciuti. Il test di attivazione dei basofili (BAT) è diventato un importante test in vitro basato sulla citofluorimetria a flusso che permette di quantificare i basofili e la loro attivazione superando come efficacia e velocità i vecchi saggi di quantificazione di rilascio dei mediatori.

I marker di attivazione dei basofili usati per il BAT test sono il CD63 e il CD203c, e l'analisi combinata di questi due marcatori con il contenuto e il successivo rilascio di istamina, possono essere studiati in citofluorimetria per valutare funzionalmente la risposta in vitro dei basofili dopo stimolazione.

L'ipotesi prevalente è che la degranolazione dei basofili sia un continuum, che inizia con una degranolazione minima persistente, che, in condizioni particolari, sfocia in una degranolazione massiva, detta anafilattica. Secondo questo modello, l'espressione di CD63 sulla membrana dei basofili sembra essere correlato alla degranolazione anafilattica, mentre l'espressione di CD203 rifletterebbe l'attivazione dei basofili, senza necessariamente accompagnarsi ad un significativo rilascio di mediatori.

II°Anno di Assegno di Ricerca: Espressione sulla membrana dei basofili dei recettori delle citochine epiteliali Th2 nei pazienti asmatici: rapporto con fenotipo e gravità.

I basofili, insieme a mastociti ed eosinofili, sono le cellule effettrici più spesso associate con infiammazione delle vie aeree in pazienti con asma, e un marker di attivazione e differenziazione dei basofili, il CD203c, è stato correlato con le esacerbazioni dell'asma. I basofili possono avere un ruolo importante nell'avvio della risposta infiammatoria Th2, venendo attivati direttamente dalle citochine tessutali (IL25, IL33 e TSLP) rilasciate dalle cellule epiteliali in risposta a segnali di danno causati da allergeni, batterici, virus o inquinanti. Il danno epiteliale delle vie aeree è frequente nei pazienti asmatici e le citochine tessutali rilasciate dall'epitelio sono presenti nelle biopsie bronchiali di questi pazienti. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione dei recettori delle citochine epiteliali (IL25 R, IL33 R e TSLP R) sulla membrana dei basofili in relazione alla gravità e al controllo dell'asma.

Metodi.

20 pazienti asmatici (12 lievi/moderati, 8 gravi), 15 con asma eosinofilo e 5 con asma non eosinofilo, sono stati arruolati nello studio. L'espressione sulla membrana dei basofili di IL25 R, TSLP R e IL33 R è stata analizzata prima e dopo la stimolazione con IgE, fMLP, LPS e LTA-SA (Acido Lipoteicoico derivato da S.Aureus).

Risultati.

L'espressione di TSLP R e IL25 R era significativamente aumentata nei pazienti con asma eosinofilo rispetto a quelli con asma non eosinofilo in condizioni basali (TSLP R: 5.4 ± 3 vs 2.1 ± 1.7 , $p = 0.01$; IL25 R: 13 ± 6.7 vs 5.9 ± 2.5 , $p = 0.01$) e dopo stimolazione con IgE (TSLP R: 5.9 ± 2.7 vs 2.6 ± 1.4 , $p = 0.02$; IL25 R: 34.2 ± 15.5 vs 19.2 ± 3.4 , $p = 0.05$).

L'atopia e la gravità dell'asma erano associati ad una più bassa (9 ± 4.3 negli atopici vs 18.1 ± 7.3 nei non atopici, $p=0.02$) e più alta (8.8 ± 4.3 nei lievi/moderati vs 15.6 ± 7.8 nei gravi, $p=0.05$) espressione di IL25 R, rispettivamente. L'espressione di IL33 R non era rilevabile.

Conclusioni e Prospettive Future

L'elevata espressione dei recettori per le citochine di derivazione epiteliale (IL25 e TSLP) sulla membrana dei basofili dei pazienti con asma eosinofilo suggerisce l'importanza del ruolo delle citochine epiteliali nell'indirizzare la risposta immunitaria verso il tipo Th2.

Ulteriori studi sono necessari per capire esattamente questa nuova funzione biologica dei basofili, pensando all'IL25 receptor come nuovo biomarker di gravità di malattia.

I dati della presente ricerca svolta nell'ambito del contratto di collaborazione alla ricerca, stipulato in data 1/5/2013, relativo ad un assegno di ricerca biennale sono stati presentati nei seguenti congressi:

Boita M, Nebiolo F, Raie A, Bussolino C, Fornero M, Bucca C, Heffler E. and Rolla G. **Basophils membrane expression of Th2 epithelial cytokines receptors in asthma: relationship with phenotype and severity**. Accettato per presentazione orale in una Poster Discussion Session all' EAACI 2015, Barcellona, Spagna, 6-10/6/2014, sessione numero 11, titolo della sessione "Origins of asthma", abstract numero 357.

I dati della presente ricerca svolta nell'ambito del contratto di collaborazione alla ricerca, stipulato in data 1/5/2013, relativo ad un assegno di ricerca biennale sono stati pubblicati nelle seguenti riviste:

1. **Boita M**, Heffler E, Pizzimenti S, Raie A, Saraci E, Omedè P, Bussolino C, Bucca C, Rolla G. **Regulation of B-Cell-Activating Factor Expression on the Basophil Membrane of Allergic Patients**. Int Arch Allergy Immunol. 2015 Apr 22;166(3):208-212.

Abstract numero 3

Title: *Espressione sulla membrana dei basofili dei recettori delle citochine epiteliali Th2 nei pazienti asmatici: rapporto con fenotipo e gravità.*

Boita M, Nebiolo F, Raie A, Bussolino C, Fornero M, Bucca C, Heffler E and Rolla G.
Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Torino, Italia

Introduzione

I basofili, insieme a mastociti ed eosinofili, sono le cellule effettrici più spesso associate con infiammazione delle vie aeree in pazienti con asma, e un marker di attivazione e differenziazione dei basofili, il CD203c, è stato correlato con le esacerbazioni dell'asma. I basofili possono avere un ruolo importante nell'avvio della risposta infiammatoria Th2, venendo attivati direttamente dalle citochine tessutali (IL25, IL33 e TSLP) rilasciate dalle cellule epiteliali in risposta a segnali di danno causati da allergeni, batterici, virus o inquinanti. Il danno epiteliale delle vie aeree è frequente nei pazienti asmatici e le citochine tessutali rilasciate dall'epitelio sono presenti nelle biopsie bronchiali di questi pazienti. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'espressione dei recettori delle citochine epiteliali (IL25 R, IL33 R e TSLP R) sulla membrana dei basofili in relazione alla gravità e al controllo dell'asma.

Metodi

20 pazienti asmatici (12 lievi/moderati, 8 gravi), 15 con asma eosinofilo e 5 con asma non eosinofilo, sono stati arruolati nello studio. L'espressione sulla membrana dei basofili di IL25 R, TSLP R e IL33 R è stata analizzata prima e dopo la stimolazione con IgE, fMLP, LPS e LTA-SA (Acido Lipoteicoico derivato da S.Aureus).

Risultati

L'espressione di TSLP R e IL25 R era significativamente aumentata nei pazienti con asma eosinofilo rispetto a quelli con asma non eosinofilo in condizioni basali (TSLP R: 5.4 ± 3 vs 2.1 ± 1.7 , $p = 0.01$; IL25 R: 13 ± 6.7 vs 5.9 ± 2.5 , $p = 0.01$) e dopo stimolazione con IgE (TSLP R: 5.9 ± 2.7 vs 2.6 ± 1.4 , $p = 0.02$; IL25 R: 34.2 ± 15.5 vs 19.2 ± 3.4 , $p = 0.05$). L'atopia e la gravità dell'asma erano associati ad una più bassa (9 ± 4.3 negli atopici vs 18.1 ± 7.3 nei non atopici, $p = 0.02$) e più alta (8.8 ± 4.3 nei lievi/moderati vs 15.6 ± 7.8 nei gravi, $p = 0.05$) espressione di IL25 R, rispettivamente. L'espressione di IL33 R non era rilevabile.

Conclusioni

L'elevata espressione dei recettori per le citochine di derivazione epiteliale (IL25 e TSLP) sulla membrana dei basofili dei pazienti con asma eosinofilo suggerisce l'importanza del ruolo delle citochine epiteliali nell'indirizzare la risposta immunitaria verso il tipo Th2. I nostri dati suggeriscono che l'espressione di IL25R potrebbe essere utilizzata come biomarker di gravità di malattia.

Supported by a grant of Italian Ministry for University and Research and Fondazione Scientifica Mauriziana Onlus Torino (Italy)



BASOPHILS MEMBRANE EXPRESSION OF TH2 EPITHELIAL CYTOKINES RECEPTORS IN ASTHMA: RELATIONSHIP WITH PHENOTYPE AND SEVERITY.



M. Buita¹, F. Nebiolo¹, A. Raiti¹, C. Bussolano¹, M. Fornero¹, C. Bucca¹, E. Heffler¹ and G. Rolla¹

¹ Department of Medical Science, University of Turin and Ospedale Mauriziano Umberto I, Largo Turati 62, 10128, Turin (Italy)

BACKGROUND

Basophils, together with mast cells and eosinophils, are effector cells most often associated with airway inflammation in patients with asthma and a marker of basophil activation and differentiation (CD203c) has been related to asthma exacerbation. Basophils can have also an important role in the initiation of Th2 inflammation, as these cells may be activated directly by tissue cytokines (IL-25, IL-33 and TSLP) released by epithelial cells in response to damage signals from allergens, bacteria, virus or pollutants. Airway epithelial damage is frequently observed in asthma and tissue cytokines have been reported to be overexpressed in bronchial biopsies of asthmatic patients.

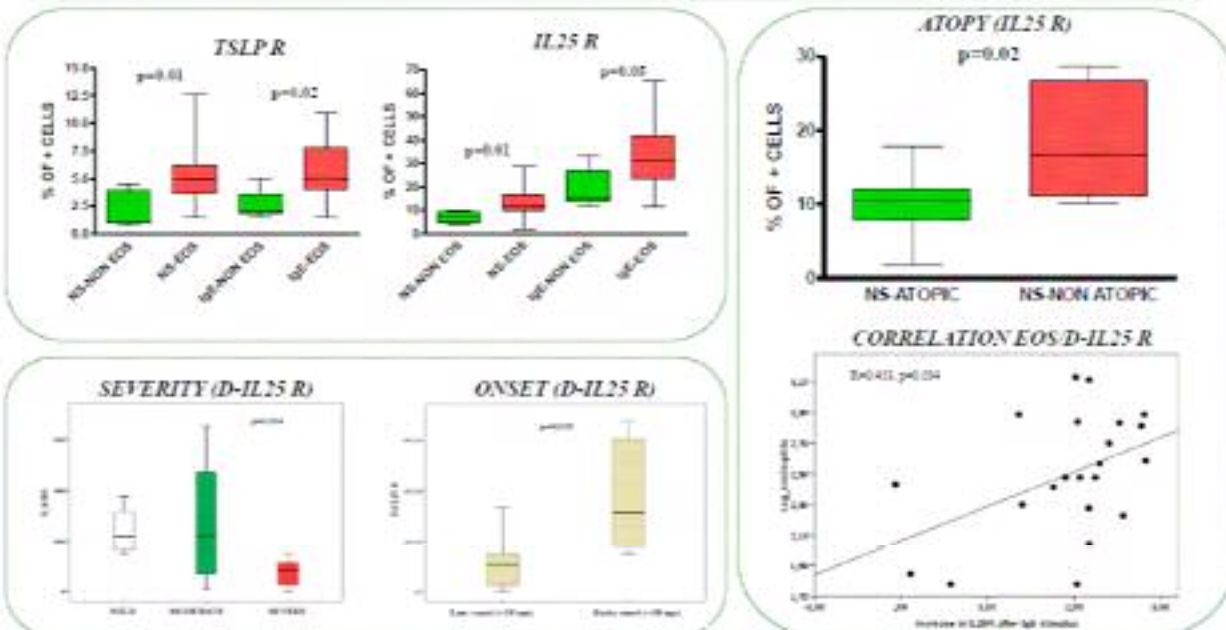
AIM and METHODS OF THE STUDY

We investigated whether IL-25, IL-33 and TSLP receptors expression levels on basophil membrane are associated with the severity and control of asthma.

20 patients with asthma (12 mild/moderate, 8 severe), 9 (36%) treated with oral glucocorticoids, 6 (24%) with early onset, 10 (40%) atopic, 10 (50%) with eosinophilic asthma have been enrolled in the study. Basophils membrane expression of IL25 R, TSLP R and IL33 R was analyzed before and after IgE, GMPLP, LPS, LTA-SA (Lipoteichoic Acid from *S. Aureus*) stimulation.

RESULTS

- TSLP R and IL25 R expression was significantly increased in eosinophilic compared to non-eosinophilic asthma at baseline (TSLP R: 5.4 ± 3 vs 2.1 ± 1.7 , $p=0.01$; IL25 R: 13 ± 6.7 vs 5.9 ± 2.5 , $p=0.01$) and after IgE stimulation (TSLP R: 5.9 ± 2.7 vs 2.6 ± 1.4 , $p=0.02$; IL25 R: 34.2 ± 15.5 vs 19.2 ± 3.4 , $p=0.05$).
- The increase in IL25 R after IgE (D-IL25 R) was significantly greater in patients with early onset asthma ($p=0.015$) and was significantly lower in those with severe asthma ($p=0.01$).
- Atopy was associated with lower IL25 R expression (9.9 ± 4.3 vs 18.1 ± 7.3 , $p=0.02$).
- IL25 R was closely directly related to the blood eosinophils count ($R=0.453$, $p=0.034$).



CONCLUSIONS

- The high expression of epithelial cytokines (IL-25 and TSLP) receptors on basophils of patients with eosinophilic asthma suggests the important role of tissue cytokines in driving Th2 immunity.
- Basophils IL25 R modulation, seems to be related to eosinophilic and early onset asthma
- The blunted increase of IL25 R expression in severe asthma deserves further investigation and could be used as biomarker of asthma severity.