

# Ruolo della Galectina-10 nel rimodellamento dell'epitelio nasale di pazienti pediatrici con rinite allergica stagionale

*Role of Galectin-10 in nasal epithelium remodeling of pediatric patients with seasonal allergic rhinitis*

Olga Maria Manna<sup>1\*</sup>, Stefania La Grutta<sup>2</sup>, Velia Malizia<sup>2</sup>, Alberto Fucarino<sup>1</sup>, Salvatore Fasola<sup>2</sup>, Mirella Profita<sup>2</sup>, Fabio Bucchieri<sup>1,2</sup>, Rosalia Gagliardo<sup>2&</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata (BiND), Università degli Studi di Palermo

<sup>2</sup>Istituto di Farmacologia Traslazionale (IFT), Sede secondaria di Palermo, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Palermo

\*primo autore; & autore senior

**Corrispondenza:** Olga Maria Manna **e-mail:** olga.manna5g@gmail.com

**Riassunto:** Ad oggi non sono disponibili evidenze sulle interazioni tra Gal-10 ed i mediatori delle risposte Th1, Th2 e Th17 nel lavaggio nasale di pazienti pediatrici con rinite allergica stagionale (SAR).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la correlazione di Gal-10 ed altri marcatori di infiammazione nel lavaggio e nella citologia nasale di pazienti con SAR. I risultati ottenuti hanno mostrato una significativa correlazione positiva tra Gal-10 e IL-5 e tra Gal-10 e Muc-5AC.

**Parole chiave:** Rinite allergica Stagionale (SAR), infiammazione nasale, rimodellamento.

**Summary:** *There is no evidence currently available on the interactions between Gal-10 and mediators of Th1, Th2 and Th17 responses in the nasal wash of pediatric patients with Seasonal Allergic Rhinitis (SAR). The purpose of this study is to evaluate the correlation of Gal-10 with other inflammatory markers in the nasal wash of patients with SAR. The results showed a significant correlation between Gal-10 and IL-5 and between Gal-10 and Muc-5AC.*

**Keywords:** *Seasonal Allergic Rhinitis (SAR), nasal inflammation, nasal remodeling.*

## INTRODUZIONE

Studi precedenti sulla mucosa nasale in pazienti pediatrici affetti da rinite allergica stagionale (SAR, *seasonal allergic rhinitis*) hanno evidenziato una risposta polarizzata di tipo Th2 con un aumento di IL-5 (1, 2). Recentemente, il riscontro di aumentati livelli di IL-17 nel lavaggio nasale di pazienti adulti e pediatrici con SAR, ha mostrato il coinvolgimento del pathway Th17 nella progressione dell'infiammazione nasale (2, 3). Inoltre, in pazienti pediatrici affetti da SAR il coinvolgimento di IL-23 nella patogenesi della malattia è stato confermato dal progressivo decremento dell'espressione dell'mRNA IL-23p19 dopo immunoterapia sub-linguale (4). Infine, in pazienti pediatrici con SAR sono stati riscontrati bassi livelli di Interferon INF- $\gamma$  (IFN-gamma) a livello della mucosa nasale, e ciò indica una risposta immune di tipo Th1 non significativa (5).

La Galectina 10 (Gal-10), glicoproteina della famiglia delle lectine e attualmente riconosciuta come biomarcatore dell'infiammazione eosinofila di tipo 2, è la proteina costituente dei cristalli di Charcot-Leyden (CLCs) ed è prodotta da eosinofili, basofili e alcune cellule T (6). Gal-10 è nota per la capacità di andare incontro a cristallizzazione rapida e spontanea in specifiche condizioni, quali l'esocitosi dall'eosinofilo in ambiente extracellulare (7). Tuttavia, i processi che conducono alla cristallizzazione di questa proteina nei CLCs in ambiente extracellulare ed il ruolo di Gal-10 nella regolazione dei processi infiammatori risultano ancora poco chiari. La formazione dei CLCs induce il danno tissutale caratteristico di patologie quali l'asma (8), e si è rivelata un potente stimolo immunitario, poiché induce la rapida produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) ed il reclutamento di neutrofili, monociti e cellule dendritiche (9, 10). Oltre a reclutare ed attivare le cellule del sistema immunitario, i CLCs possono indurre la produzione di muco da parte delle cellule epiteliali ed hanno la capacità di interagire con il muco prodotto a livello delle vie aeree attraverso un dominio di riconoscimento dei carboidrati, fornendo un'impalcatura che rende il muco più denso e difficile da espettorare (11).

Nella rinite allergica l'eccessiva produzione di mucina può rompere l'equilibrio fluido delle vie aeree ostacolando la clearance mucociliare, con conseguente ostruzione ed infezione. In modelli sperimentali di rinite allergica è stato dimostrato che l'ipersecrezione di Mucina 5AC (MUC5AC, *mucin glycoprotein 5AC*) è indotta dal *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) attraverso le citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  e IL-6, confermando così il ruolo di MUC5AC come principale mu-

cina delle vie aeree (12). Ad oggi, non vi sono dati a supporto di una relazione tra MUC5AC e Gal-10 in pazienti con rinite allergica. Complessivamente, è noto che l'infiammazione in corso di rinite allergica sia caratterizzata dall'attivazione di un complesso network immunologico ed infiammatorio, tuttavia non vi sono evidenze sulle interazioni tra Gal-10 ed alcuni mediatori delle risposte Th1, Th2 e Th17 nel lavaggio nasale di pazienti pediatriche con SAR.

Lo scopo di questo studio è stato di valutare, durante il periodo di esposizione allergica, il ruolo di Gal-10, nella regolazione dei meccanismi di infiammazione, produzione di muco e rimodellamento dell'epitelio nasale in pazienti con rinite allergica stagionale.

## **MATERIALI E METODI**

### **Pazienti**

Studio *cross-sectional*, approvato dal Comitato Etico Palermo 1 (verbale 08/2014), su 31 bambini con rinite allergica stagionale di età compresa tra i 6 ed i 16 anni reclutati durante la stagione pollinica delle graminacee (marzo-luglio; [www.pollnet.it](http://www.pollnet.it)). I criteri di inclusione sono stati i seguenti: diagnosi di rinite allergica da almeno un anno; mono-sensibilità alle graminacee identificata tramite positività al Prick Test (Graminacee Mix) e Immunoglobuline E Specifiche (IgE > 0.70 kU/l). I criteri di esclusione sono stati i seguenti: infezioni respiratorie delle alte vie nelle precedenti 4 settimane; uso di corticosteroidi sistemici/topici, uso di decongestionanti o antistaminici sistemici/topici nelle 4 settimane precedenti all'inizio dello studio; fumo attivo; storia di asma o segni e sintomi di patologie respiratorie; malformazioni maggiori del setto nasale o polipi nasali.

### **Parametri Nasali**

La sequenza temporale delle procedure nasali è stata la seguente: ossido nitrico nasale (nasal Nitric Oxide, nNO), citologia nasale e lavaggio nasale. Le misurazioni di nNO sono state effettuate utilizzando un sensore elettrochimico (Hypair FeNO, MediSoft, Belgium), secondo le indicazioni ATS/ERS (13). La citologia nasale è stata effettuata in rinoscopia anteriore, a livello della porzione mediana del turbinato inferiore, utilizzando curette in plastica (Rhinoprobe TM). Le cellule sono state strisciate su vetrino e sottoposte a colorazione secondo metodo May-Grünwald-Giemsa per la successiva valutazione del rinocitogramma (14). Il lavaggio nasale è stato ottenuto dai pazienti selezionati iniettando, tramite una siringa, 3 ml di soluzione salina isotonica, pre-riscaldata a 37°C, in ciascuna narice; dopo dieci secondi il fluido del lavaggio nasale è stato raccolto in un contenitore di propilene sterile (percentuale di recupero della soluzione iniziale di circa il 70%). I campioni ottenuti sono stati processati secondo la metodica precedentemente descritta da Pizzichini et al. (15), con lievi modifiche (16). I surnatanti ottenuti sono stati conservati a -80°C per le successive analisi dei marcatori di interesse. I livelli dei mediatori Gal-10, MUC-5AC, IL-5, IL-17, IL-23, e INF- $\gamma$  nel lavaggio nasale dei pazienti con SAR sono stati misurati attraverso saggio ELISA, utilizzando kits commerciali, in accordo con le istruzioni dei produttori (Novus Biologicals, Novus, USA per il dosaggio di Gal-10 e MUC5AC; R&D Systems, Oxon, UK per il dosaggio di IL-5; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, per il dosaggio IL-17; Affimetrix, eBioscience, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, per il dosaggio di IL-23; Abcam, Cambridge, MA, per il dosaggio di INF- $\gamma$ ).

### **Analisi Statistica**

I dati ottenuti sono presentati come n (%) o media  $\pm$ SD. Le correlazioni sono state valutate in accordo al test del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman e sono mostrate in Figura 1.

## **RISULTATI**

Trentuno bambini con SAR sono stati inclusi nello studio e sottoposti alla misurazione di nNO e ad analisi del profilo infiammatoria nella citologia nasale e nel lavaggio nasale.

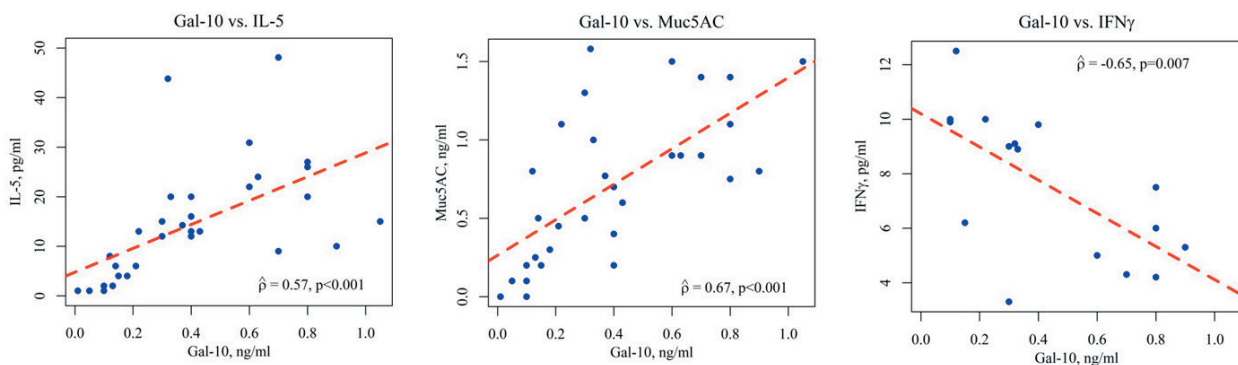
Le caratteristiche demografiche dei pazienti selezionati, le misurazioni di nNO, i valori di eosinofili provenienti dall'analisi della citologia nasale, e le determinazioni dei mediatori Gal-10, MUC-5AC, IL-5, IL-17, IL-23, e INF- $\gamma$  nel lavaggio nasale sono mostrati in Tabella 1 (n % o media  $\pm$ SD).

Le correlazioni statisticamente significative identificate sono riportate in Figura 1.

CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE DEI PAZIENTI E PROFILO INFIAMMATORIO DEL LAVAGGIO NASALE	
<b>Età, anni, media (SD)</b>	10.47 (2.40)
<b>Genere, n (%)</b>	
Maschio	23 (71.88)
Femmina	9 (28.12)
Durata malattia, anni, media (SD)	5.00 (2.82)
<b>Eosinofili (%), media (SD)</b>	5.12 (3.40)
<b>Gal-10, ng/ml, media (SD)</b>	0.40 (0.28)
<b>Muc5AC, ng/ml, media (SD)</b>	0.72 (0.48)
<b>IL-5, pg/ml, media (SD)</b>	14.38 (11.78)
<b>IFN<math>\gamma</math>, pg/ml, media (SD)</b>	7.56 (2.70)
<b>IL-17, pg/ml, media (SD)</b>	2.59 (3.50)
<b>IL-23, pg/ml, media (SD)</b>	7.76 (4.11)
<b>nNO, ppb, media (SD)</b>	1495.76 (617.20)

**Tab. 1:** La tabella mostra le caratteristiche demografiche dei pazienti (età; genere; durata malattia) e profilo infiammatorio del lavaggio nasale raccolto.

*The table shows patients' demographic characteristics (age; gender; disease duration) and inflammatory profile of the collected nasal lavage.*



**Fig. 1:** Le correlazioni statisticamente significative identificate, ovvero quelle positive tra i valori di Gal-10 ed IL-5 ( $Rho=0.57$ ;  $p<0.001$ ), e tra Gal-10 e Muc-5AC ( $Rho=0.67$ ;  $p<0.001$ ), e quella negativa tra i valori di Gal-10 ed INF- $\gamma$  ( $Rho= - 0.65$ ;  $p=0.007$ ) misurati nel lavaggio nasale dei pazienti pediatrici con rinite allergica stagionale (Spearman Rank Test).

*The statistically significant correlations identified, in particular the positive ones between Gal-10 and IL-5 values ( $Rho=0.57$ ;  $p<0.001$ ), and between Gal-10 and Muc-5AC ( $Rho=0.67$ ;  $p<0.001$ ), and the negative one between Gal-10 and INF- $\gamma$  values ( $Rho= - 0.65$ ;  $p=0.007$ ) measured in the nasal lavage of pediatric patients with seasonal allergic rhinitis (Spearman Rank Test).*

## CONCLUSIONI

Questo studio ha valutato le interazioni tra Gal-10 ed alcuni mediatori delle risposte infiammatorie di tipo Th1, Th2 e Th17, e Muc5AC nel lavaggio nasale di pazienti pediatrici con SAR durante il periodo di esposizione allergica.

La correlazione positiva tra i valori di Gal-10 e quelli di IL-5 conferma precedenti evidenze ottenute da studi *in vitro* e condotti in pazienti adulti, ed estende ai pazienti pediatrici con SAR la stretta relazione funzionale tra la risposta immunologica di tipo Th2 e la potenziale formazione di CLCs nelle alte vie aeree. Inoltre, la correlazione positiva tra Gal-10 e Muc-5AC, mucina la cui espressione è aumentata nell'epitelio respiratorio dei soggetti con asma (17), indica che la loro concomitante presenza nei fluidi del lavaggio nasale dei pazienti studiati è un potenziale indicatore di infiammazione eosinofila e iperproduzione di muco.

La correlazione negativa tra Gal-10 e INF- $\gamma$  potrebbe indicare un'assenza di interazione tra questi due marcatori nel complesso meccanismo di cristallizzazione di Gal-10 e formazione di CLCs nella SAR.

Tali risultati indicano che l'interazione tra Gal-10 e mediatori come IL-5 e Muc-5AC nella mucosa nasale di bambini affetti da rinite allergica stagionale potrebbe promuovere l'infiammazione di tipo Th2 e l'aumento della produzione di muco, favorire la formazione di CLCs e condurre al rimodellamento dell'epitelio nasale.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Ciprandi G., et al. *Relationships between allergic inflammation and nasal airflow in children with seasonal allergic rhinitis*. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2005; 94:2; 58–61.
- (2) Malizia V., et al. *Endotyping Seasonal Allergic Rhinitis in Children: A Cluster Analysis*. Front. Med. (Lausanne). 2022;8:806911.
- (3) König K., et al. *Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis*. Allergy Asthma Clin. Immunol. 2015; 11:26.
- (4) Nieminen K., et al. *Clinical outcome and IL-17, IL-23, IL-27 and FOXP3 expression in peripheral blood mononuclear cells of pollen-allergic children during sublingual immunotherapy*. Pediatr. Allergy Immunol. 2010; 21:e174–84.
- (5) Sogut A., et al. *Regulatory- T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity*. Int. Arch. Allergy Immunol. 2012;157:349–53.
- (6) Ueki S., et al. *Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation*. Curr. Allergy Asthma Rep. 2016;16:54.
- (7) Delemarre T., et al. *A substantial neutrophilic inflammation as regular part of severe type 2 chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. J. Allergy Clin. Immunol. 2021;147:179-188.e2.
- (8) Choi Y., et al. *Biological function of eosinophil extracellular traps in patients with severe eosinophilic asthma*. Exp. Mol. Med. 2018; 50:1-8.
- (9) Persson E.K., et al. *Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment*. Science. 2019;364:eaaw4295.
- (10) Gevaert E., et al. *Charcot-Leyden crystals promote neutrophilic inflammation in patients with nasal polyposis*. J. Allergy Clin. Immunol. 2020;145:427-430.e4.
- (11) Lachowicz-Scroggins M.E., et al. *Extracellular DNA, neutrophil extracellular traps, and inflammasome activation in severe asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2019;199:1076-1085.
- (12) Wang W., et al. *Mucin 5 subtype AC expression and upregulation in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats*. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2012;147:1012-9.
- (13) Dweik R.A., et al. *Applications ATSC on I of ENOL (FENO) for Clinical Applications. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011; 184:602– 15.
- (14) Heffler E., et al. *Nasal cytology: methodology with application to clinical practice and research*. Clin. Exp. Allergy. 2018; 48:1092–106.
- (15) Pizzichini E., et al. *Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 154:308–17.
- (16) Albano G.D., et al. *Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach*. PLoS ONE. 2013; 8:1–13.
- (17) Santus A., et al. *Mucins and Asthma: are we headed to the revolutionary road?* J. Clin. Med. 2019; 8:1955.