

**L'ANGOLO DELLO SPECIALISTA**

# I lisati batterici nella prevenzione delle infezioni respiratorie: il ruolo delle barriere epiteliali

Guido Ferlazzo

Laboratorio di Immunologia e Biotecnologie Terapeutiche, Dipartimento di Patologia Umana e DETEV, Università degli Studi di Messina; UOC di Patologia Clinica, AOU Policlinico "G. Martino", Messina

## Riassunto

Le infezioni delle vie aeree rappresentano a livello mondiale una delle più rilevanti cause di malattia, sia in termini di morbilità che di mortalità e costi economici. A oggi, disponiamo di un vasto repertorio di opzioni terapeutiche per la prevenzione e il trattamento di queste patologie e, tra queste, i lisati batterici hanno dimostrato di essere un valido ausilio nella prevenzione delle infezioni respiratorie.

Gli effetti protettivi che si ottengono a seguito della somministrazione di un lisato batterico si ritiene siano connessi a diverse proprietà immunogeniche e immunomodulanti, come ad esempio l'incremento di molecole di adesione su cellule dell'immunità innata, quali monociti/macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, ma anche l'attivazione di meccanismi dell'immunità acquisita, quali l'espansione clonale di linfociti T specifici e la secrezione di IgA secretorie a livello mucosale.

Nonostante tali evidenze, il meccanismo d'azione immunologico dei lisati batterici sembra in realtà risiedere anche in altri, forse più rilevanti, processi protettivi. A tal proposito, recenti studi sperimentali hanno con chiarezza evidenziato in modelli sperimentali animali che la protezione conferita dal lisato batterico nei confronti di una successiva infezione si basa essenzialmente su meccanismi di immunità innata ma è al tempo stesso indipendente dalle funzioni di neutrofili, mastociti e macrofagi alveolari. Di fatto, da tali studi emerge un rilevante ruolo delle cellule epiteliali del tratto respiratorio quali effettori innati in grado di esercitare un ruolo protettivo a seguito della somministrazione dei lisati.

Questi nuovi risultati sperimentali hanno indotto a rivalutare il ruolo degli epitelii come parte integrante delle nostre difese immunitarie. Bisogna considerare che i microrganismi potenzialmente in grado di invadere i nostri tessuti devono comunque prima oltrepassare gli strati epiteliali, i quali, similmente ad altre componenti dell'immunità innata, sono anch'essi in grado di "percepire" la presenza di microrganismi e rispondere a ciò incrementando le funzioni di barriera, inviando segnali di attivazione ai leucociti e anche direttamente eliminando i patogeni mediante il rilascio di molecole antimicrobiche. Similmente, mimando la presenza dei patogeni, i lisati batterici che vengano a contatto con le superfici mucosali possono indurre i sopracitati effetti, contrastando quindi l'invasione microbica nelle fasi iniziali del processo infettivo.

In questo articolo ci proponiamo di revisionare queste recenti acquisizioni scientifiche, includendo nuovi risultati ottenuti presso il nostro laboratorio ed enfatizzando le loro ricadute nella pratica clinica per un più mirato e selettivo utilizzo dei lisati batterici nella prevenzione delle infezioni respiratorie ricorrenti.

## Introduzione

Le infezioni del tratto respiratorio rappresentano una delle più comuni cause di patologia nell'uomo, con importanti conseguenze sia in termini di morbilità che di mortalità e costo economico<sup>1</sup>. Una vasta gamma di opzioni terapeutiche e profilattiche è attual-

mente disponibile e, fra queste, i lisati batterici hanno progressivamente ottenuto un loro spazio e consenso nella pratica medica in quanto positivamente associati alla prevenzione delle malattie infettive del tratto respiratorio, sia nell'adulto che nell'età dello sviluppo<sup>2-4</sup>. I lisati batterici sono una misce-

la di frammenti di batteri, generalmente ottenuti dalla lisi di molteplici tipi di cellule batteriche. La frammentazione viene ottenuta usando metodi chimici o meccanici. La lisi batterica ottenuta mediante un processo meccanico sembra consentire una migliore preservazione delle strutture proteiche dei

## Conflitto di interessi

Il nostro laboratorio di ricerca ha ricevuto finanziamenti da BG Clinical S e PharmaNDev, due aziende coinvolte in studi clinici inerenti i lisati batterici.

**How to cite this article:** Ferlazzo G. I lisati batterici nella prevenzione delle infezioni respiratorie: il ruolo delle barriere epiteliali. Rivista SIMG 2022;29(3):40-47.

© Copyright by Società Italiana di Medicina Generale e delle Cure Primarie



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribution – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

batteri e quindi anche delle proprietà antigeniche di questi lisati<sup>5</sup>. Anche in virtù delle loro potenziali capacità immunogeniche, i lisati batterici sono comunemente impiegati proprio con la finalità di ottenere una serie di effetti immunologici possibilmente protettivi per l'organismo<sup>6</sup>. Tali effetti includono un'aumentata espressione di molecole di adesione su monociti e neutrofilii, l'attivazione delle cellule dendritiche, di linfociti T e B e anche la produzione di immunoglobuline secretorie di tipo A, nonché la produzione di anticorpi specifici per i batteri inclusi nella miscela del lisato<sup>7</sup>. Vale comunque la pena sottolineare che molti di questi effetti, a volte ottenuti *in vitro* o in modelli sperimentali, possono di fatto esplicitare una reale efficacia a seconda della loro via di somministrazione. Ad esempio, la produzione di IgA secretorie appare strettamente associata alla stimolazione di plasmacellule mucosali che riconoscono i *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) contenuti nei lisati mediante alcuni recettori di membrana (*Pattern Recognition Receptors*, PRR) in grado di modularne la produzione mucosale di IgA. È interessante sottolineare che tale produzione immunoglobulinica non è necessariamente ristretta ad antigeni presenti nel lisato ma può anche essere diretta verso patogeni precedentemente incontrati dall'organismo e contro cui si abbiano dei linfociti B della memoria in grado di produrre anticorpi specifici. Sebbene questo sia un elemento di rilievo nei possibili diversi meccanismi d'azione dei lisati batterici, appare evidente come tale effetto possa essere espletato esclusivamente a livello locoregionale, dove il lisato viene a contatto con le mucose. Ipotizzando una profilassi di malattie respiratorie, si rende necessaria la somministrazione intranasale o sublinguale mentre quella *per os* prediligerebbe semmai la produzione di IgA nel tratto digerente. Nonostante siano quindi state riportati diversi effetti immunologici protettivi conseguenti la somministrazione dei lisati batterici<sup>6-8</sup>, i meccanismi d'azione immunologici non sembrano essere stati ancora completamente elucidati e ciò ha periodicamente rappresentato un punto di critica e discussione riguardo questi prodotti batterici che, di fatto, rappresentano un concreto sup-

porto alla risposta immunitaria e quindi, se opportunamente utilizzati, un valido ausilio nella prevenzione delle più comuni infezioni respiratorie.

A questo riguardo, alcuni interessanti risultati sono stati più di recente ottenuti in un modello murino di infezione respiratoria. In tale studio, veniva effettuato un trattamento per aerosol con un lisato batterico di *Haemophilus influenzae*, seguito da una dose letale di batteri vivi di *Streptococcus pneumoniae*<sup>9</sup>. Lo studio dimostra che, a seguito della somministrazione del lisato, si otteneva una completa protezione contro l'infezione pneumococcica e che tale protezione era totalmente dipendente da meccanismi di immunità innata, quindi indipendente dall'attivazione di linfociti T e B antigene-specifici. Inoltre, l'effetto protettivo nei confronti di successive infezioni batteriche era indipendente dall'azione di neutrofilii, mastociti o macrofagi alveolari, suggerendo quindi l'intervento di altri effettori cellulari nella risposta difensiva attivata dai lisati batterici.

Anche alla luce di questi risultati sperimentali, appare interessante riconsiderare il ruolo delle cellule epiteliali delle mucose, in quanto anche esse rappresentano degli effettori cellulari, particolarmente utili nelle prime fasi della risposta immunitaria innata, essendo di fatto parte integrante delle cosiddette *barriere naturali*<sup>10,11</sup>. Qualsiasi microrganismo che abbia accesso all'interno dell'organismo umano deve necessariamente superare degli strati di cellule epiteliali<sup>12,13</sup> e queste cellule sono in grado di avvertire la presenza dei microrganismi in quanto dotate di PRR in grado di riconoscere i diversi patogeni. Sebbene l'espressione di PRR sulle cellule epiteliali sia meno rappresentata rispetto a quella leucocitaria, il legame con i patogeni eventualmente venuti a contatto con la superficie mucosale consente alle cellule epiteliali di rispondere alla loro presenza aumentando varie funzioni di barriera, inviando segnali per il reclutamento dei leucociti e persino eliminare direttamente alcuni patogeni mediante il rilascio di fattori antimicrobici<sup>14-17</sup>.

Gli effetti immunologici dei lisati batterici, come prima accennato, sono stati finora

studiati direttamente su cellule leucocitarie quali linfociti T, B cellule NK e cellule presentanti l'antigene quali le cellule dendritiche. Poiché i lisati batterici esprimono PAMP in grado di legarsi ai PRR espressi anche sulle cellule epiteliali della mucosa<sup>18</sup>, abbiamo di recente analizzato l'effetto dei lisati batterici sulle cellule epiteliali del tratto respiratorio umano. Inoltre, considerato che l'epitelio mucosale è intimamente connesso, fisicamente e funzionalmente, con altre cellule immunitarie di derivazione emopoietica<sup>19,20</sup>, abbiamo studiato come cellule dell'epitelio bronchiale umano, in presenza di lisati batterici, possano interagire con altri importanti effettori della risposta mucosale innata, quali cellule dendritiche e *Innate Lymphoid Cells* (ILC).

Per poter ottenere un effetto sulla mucosa respiratoria, appare evidente che la via di somministrazione di questi preparati è fondamentale: nel caso di alcuni preparati di lisato batterico somministrati per via sublinguale, grazie al contatto diretto tra lisato e mucosa orofaringea, il lisato è in grado di stimolare le cellule di quest'ultima, che d'altronde rappresenta proprio la sede di ingresso degli agenti patogeni. Per analizzare i possibili effetti sulle cellule epiteliali del tratto respiratorio, abbiamo quindi utilizzato un lisato batterico ottenuto per via meccanica (*Polyvalent Mechanical Bacterial Lysates*, PMBL) costituito da una miscela dei principali batteri causa di infezioni respiratorie e che appunto prevede una somministrazione sublinguale.

#### PMBL induce l'adesione cellula-cellula e la proliferazione dell'epitelio delle vie aeree

L'invasione microbica viene spesso facilitata da un'alterazione dell'integrità della barriera epiteliale, principalmente regolata da proteine di giunzione cellulare che vengono incrementate nel caso l'epitelio riceva segnali di contatto con i patogeni. Per analizzare se il lisato batterico possa incrementare, come ipotizzato, le funzioni di barriera dell'epitelio delle vie aeree, sono state utilizzate colture cellulari primarie di epitelio bronchiale umano esposte al PMBL. Dopo 24 h di coltura abbiamo valutato l'espressione di due molecole di adesione cardinali

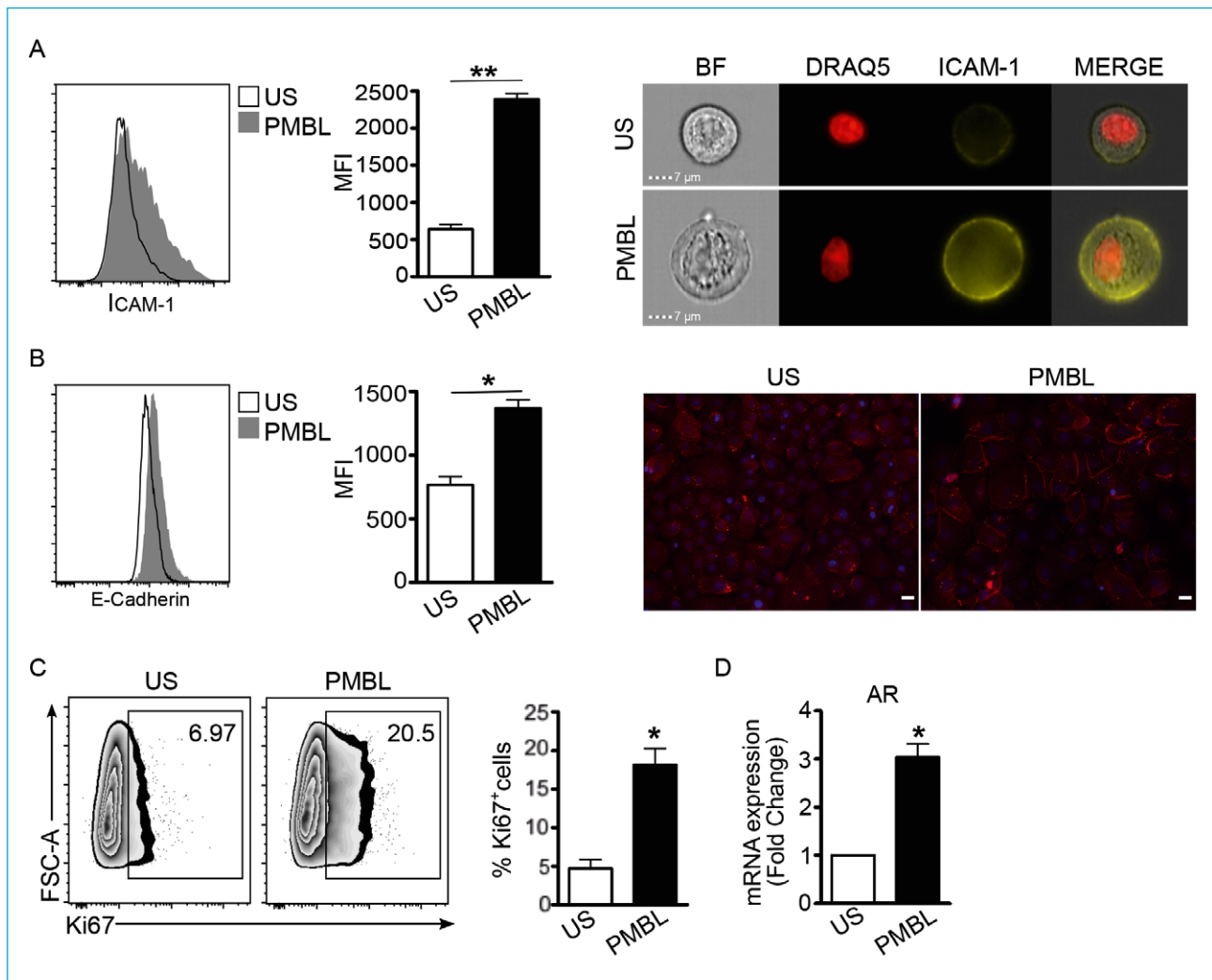
nelle giunzioni epiteliali: ICAM-1 (CD54) e E-cadherin (CD324). ICAM-1 è costitutivamente espressa a bassi livelli sulle cellule epiteliali, ma viene incrementata nelle fasi iniziali dell'infezione batterica<sup>21</sup>. In analogia con quanto avviene durante un'infezione, la presenza del PMBL nella coltura cellulare induceva un aumento di oltre quattro volte

nell'espressione di questa molecola di adesione (Fig. 1a). E-cadherin era similmente incrementata sulle cellule epiteliali bronchiali a seguito dello stimolo con PMBL e, di rilievo, veniva osservata una differente distribuzione di questa molecola di adesione cellulare che, dopo il trattamento con i lisati batterici, traslocava dal citoplasma alla

membrana plasmatica (Fig. 1b). Vale la pena ricordare che l'espressione di E-cadherin sulla membrana cellulare è funzionale per l'adesione cellulare, mentre viene successivamente in parte internalizzata per il riciclo o la degradazione, in dipendenza dei segnali presenti nel microambiente<sup>22</sup>. L'omeostasi delle barriere mucosali dipen-

**FIGURA 1.**

**PMBL incrementa l'espressione di molecole di adesione e di fattori di proliferazione sulle cellule dell'epitelio respiratorio. (A) Espressione di ICAM-1 valutata su cellule di epitelio delle vie aeree superiori stimolate per 24h con PMBL e analizzate mediante citometria a flusso. L'istogramma citofluorimetrico è rappresentativo di tre esperimenti. I valori medi di fluorescenza ottenuti nei tre esperimenti, insieme agli standard errors ( $\pm$  SEM), sono riassunti alla destra dell'istogramma (US: non stimolate; PMBL: stimolate con PMBL per 24h). La figura di citometria per immagini mostra l'analisi in Brightfield (BF), DRAQ5 (nucleus) e ICAM-1. (B) Similmente ad (A), analisi di espressione di E-cadherin in citometria a flusso e in microscopia a fluorescenza. Scale bar: 20  $\mu$ m. (C) La proliferazione delle cellule epiteliali delle vie aeree superiori è stata valutata mediante l'espressione intranucleare di Ki67. I dot plots citofluorimetrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti e alla loro destra sono riassunti i valori medi ottenuti nei tre esperimenti ( $\pm$  SEM). (D) L'espressione genica dell'Amphiregulin è stata analizzata mediante RT-PCR sulle cellule epiteliali delle vie aeree superiori dopo stimolazione con PMBL per 6 ore. I dati rappresentano l'aumento dell'espressione ottenuta in tre esperimenti ( $\pm$ SEM) (\*  $p < ,05$ , \*\*  $p < ,01$ ; paired t-test).**



de anche dalla regolazione della proliferazione delle cellule epiteliali, necessaria per la rigenerazione dell'epitelio danneggiato. Alterazioni dell'integrità degli epitelii, ad esempio a causa di una infezione, possono predisporre a sovrainfezioni associate alla diminuita funzione di barriera meccanica<sup>23</sup>. Abbiamo osservato che la stimolazione delle cellule epiteliali bronchiali con PMBL promuoveva la proliferazione di queste cellule, come evinto dalla maggior espressione del marker di proliferazione Ki67 (Fig. 1c). Tale proliferazione epiteliale causata dai lisati batterici potrebbe essere associata al rilascio di Amfipregulina, un fattore di crescita epiteliale la cui espressione genica veniva indotta dalla stimolazione con PMBL (Fig. 1d).

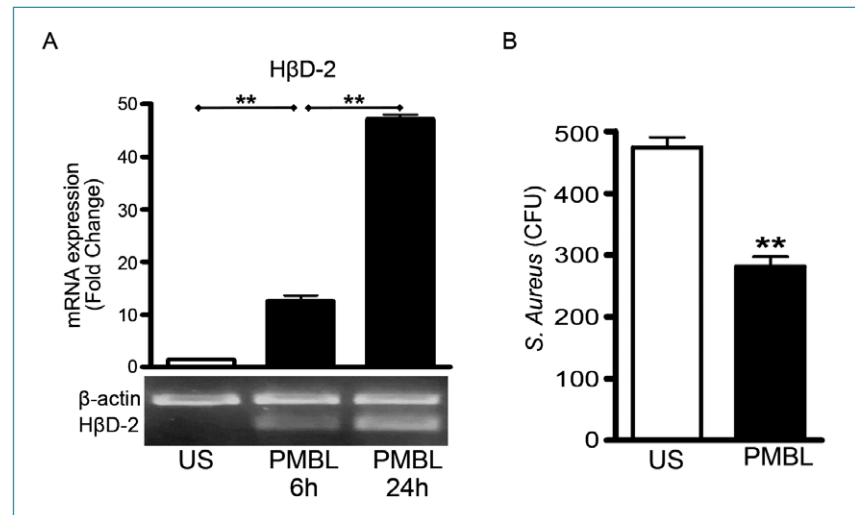
Nell'insieme, questi risultati suggeriscono un ruolo attivatorio dei PMBL sulle cellule epiteliali delle vie aeree umane in grado di migliorarne l'integrità di barriera, fattore determinante nel corso di infezioni respiratorie ricorrenti in grado di danneggiare cronicamente l'epitelio mucosale.

### PMBL induce la produzione del peptide antimicrobico $\beta$ -defensina 2 nelle cellule epiteliali delle vie aeree

Come sappiamo il trattamento con lisati batterici trova un impiego preminente nella prevenzione delle infezioni ricorrenti del tratto respiratorio<sup>24</sup>. Le cellule mucosali, come già menzionato, possono avvertire la presenza di patogeni mediante PAMP e, oltre a incrementare le barriere fisiche, possono esercitare un'azione microbica diretta, particolarmente efficace contro le infezioni batteriche. A tal fine, infatti, a seguito dei segnali derivati dal contatto con i patogeni, possono rilasciare peptide antimicrobici in grado di destabilizzare, in virtù di una precipua carica elettrica, la membrana dei batteri. La  $\beta$ -defensina 2 umana (hBD-2) è uno dei principali peptidi antimicrobici e viene prodotto principalmente dai neutrofili, ma anche dalle cellule epiteliali a seguito di vari stimoli pro-infiammatori, quali citochine e stimolazione batterica. Mimando un'infezione batterica, i PMBL erano in grado di indurre l'espressione *de novo* di hBD-2 nelle cellule epiteliali

### FIGURA 2.

**PMBL induce l'espressione genica di hBD-2 sulle cellule epiteliali delle vie aeree superiori attivando un'azione anti-batterica diretta.** (A) L'espressione genica di hBD-2 è stata analizzata mediante RT-PCR dopo stimolazione con PMBL per 6 e 24h. I dati in figura sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. (B) Il test di attività antimicrobica è stato effettuato aggiungendo a una coltura di *S. aureus* il sovrinatante di coltura di cellule epiteliali delle vie aeree stimolate (PMBL) o meno (US) con PMBL. L'esperimento è stato condotto in triplicato e i dati rappresentano il numero di CFU ( $\pm$  SEM) di *S. aureus* ottenuti dopo l'aggiunta del sovrinatante (\*\*  $p < ,01$ ; paired t-test).



delle vie aeree (Fig. 2a), dimostrando che le cellule epiteliali possono implementare anche questo tipo di difese immunologiche a seguito del contatto con PMBL. In linea con questi risultati, il sovrinatante di colture cellulari di cellule epiteliali delle vie aeree trattate con PMBL era in grado di contenere la crescita delle colonie di *Staphylococcus aureus* (Fig. 2b).

### Le cellule epiteliali in presenza di PMBL favoriscono la produzione di IL-22 conseguente il *cross-talk* cellule dendritiche/ILC3

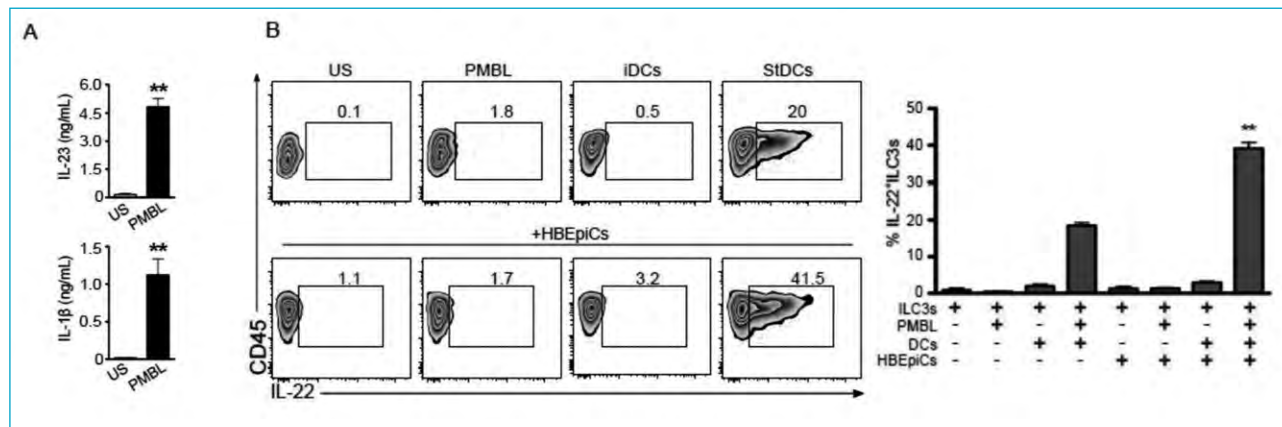
Le cellule epiteliali rappresentano componenti essenziali del *network* immunitario mucosale e, come tali, sono connesse alle funzioni di altri effettori dell'immunità innata quali cellule dendritiche e ILC<sup>18,19</sup>. La produzione di interleuchina (IL-) 23 da parte di cellule dendritiche supporta la produzione innata di IL-22 da parte di ILC di tipo 3. A sua volta, il legame di questa citochina al suo recettore espresso sulle cellule epiteliali induce una serie di effetti, tra i quali la proliferazione epiteliale

e la produzione di peptide antimicrobici, fenomeni inducibili nelle cellule epiteliali delle vie aeree stimolate con lisati batterici, come descritto nei paragrafi precedenti.

Come precedentemente dimostrato<sup>8</sup>, i PMBL sono in grado di indurre la maturazione delle cellule dendritiche e la loro produzione di citochine infiammatorie, incluse IL-23 e IL1 $\beta$  (Fig. 3a). Entrambe queste citochine sono in grado di indurre, a loro volta, il rilascio di IL-22 da parte di ILC3. Quando le cellule dendritiche e le ILC3 venivano poste in contatto con PMBL in presenza di cellule epiteliali delle vie aeree, le ILC3 rilasciavano un quantitativo significativamente maggiore di IL-22 (Fig. 3b). Pertanto, la produzione di IL-22 era dipendente dalla stimolazione delle cellule dendritiche con i PMBL e la presenza di cellule epiteliali delle vie aeree giocava un ruolo determinante nell'attivazione delle ILC3 per il rilascio di IL-22, una citochina cruciale per il mantenimento di diversi meccanismi di barriera mucosale.

**FIGURA 3.**

Le cellule dendritiche stimolate con PMBL in presenza di cellule epiteliali bronchiali incrementano la produzione di IL-22 da parte di ILC3. (A) La concentrazione di IL-23 e IL-1 $\beta$  veniva valutata mediante ELISA nel mezzo di coltura di dendritiche stimolate con PMBL per 48h. (B) La produzione di IL-22 nelle ILC3 veniva analizzata dopo coltura overnight nelle condizioni indicate sia in assenza (pannelli superiori) che in presenza (pannelli inferiori) di cellule epiteliali delle vie aeree: le ILC3 erano coltivate in assenza di stimoli (US); stimolate con PMBL (PMBL); stimolate con il sovrinatante di colture di cellule dendritiche stimolate per 48h con o senza PMBL (StDCs/iDCs, rispettivamente). I dot plots citofluorimetrici mostrati in figura sono rappresentativi di tre esperimenti. I dati complessivi sono riassunti nella tabella a destra dei dot plots e rappresentano le percentuali di ILC3 secernenti IL-22 ( $\pm$ SEM) (\*  $p < ,05$ , \*\*  $p < ,01$ ; paired t-test).



### La somministrazione sublinguale di PMBL induce un aumento di peptidi antimicrobici nella saliva

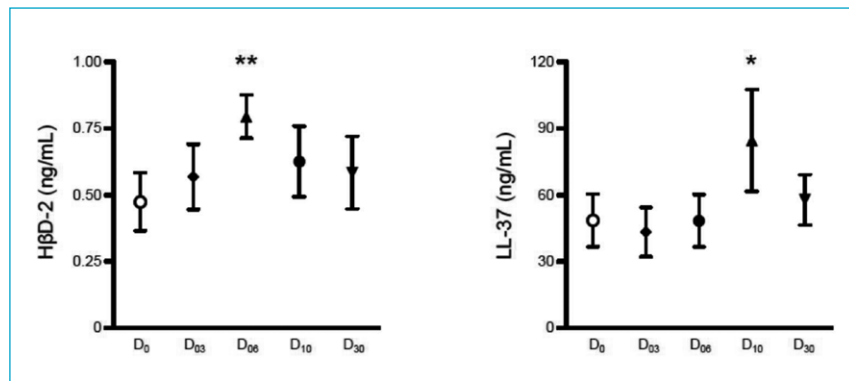
Poiché PMBL è in grado di indurre la produzione *de novo* dell'espressione del peptide cationico hBD-2 nelle cellule di epitelio delle vie aeree, abbiamo anche condotto

uno studio *in vivo* per valutare se la somministrazione di PMBL potesse risultare in una produzione locoregionale di peptidi antimicrobici. A questo scopo abbiamo utilizzato una formulazione sublinguale di PMBL e campioni di saliva sono stati raccolti in otto volontari sani in condizioni basali, durante i dieci consecutivi giorni di trattamento con

PMBL e dopo 30 giorni dall'inizio del trattamento. Il quantitativo di hBD-2 e LL-37, rispettivamente appartenenti al gruppo delle  $\beta$ -defensine e delle catelicidine, veniva quindi analizzato nei diversi campioni di saliva. Un incremento significativo di entrambi i peptidi antimicrobici era riscontrabile durante il trattamento, dove la concentrazione di hBD-2 e LL-37 raggiungeva un picco rispettivamente a giorno 6 e 9 (Fig. 4). L'effetto appariva strettamente associato alla somministrazione del lisato in quanto la sospensione del trattamento, che prevede una dispensazione continua per dieci giorni, riportava i valori vicini alla concentrazione basale dopo soli venti giorni dall'ultima somministrazione.

**FIGURA 4.**

La somministrazione sublinguale di PMBL determina un aumento nella saliva dei livelli di peptidi antimicrobici. La concentrazione di hBD-2 ed LL-37 veniva analizzata mediante ELISA in campioni di saliva di individui sani prima della somministrazione del lisato (D0), durante il trattamento della durata di 10 giorni e dopo 20 giorni dall'interruzione della somministrazione di PMBL (D30). Per ogni peptide antimicrobico, i dati erano raccolti in otto soggetti sani agli intervalli di tempo indicati. I valori in figura rappresentano la media delle concentrazioni ( $\pm$  SEM) ottenute in tutti i partecipanti allo studio (\*  $p < ,05$ , \*\*  $p < ,01$ ; paired t-test).

**Discussione**

La crescente problematica delle resistenze antibiotiche nei batteri responsabili delle più diffuse infezioni respiratorie, richiede l'implementazione di nuovi metodi profilattici che possano ridurre il ricorso alle terapie antibiotiche. In tal senso, i lisati batterici, se opportunamente utilizzati, rientrano tra i trattamenti che potrebbero contribuire al contenimento della resistenza agli antibiotici<sup>25,26</sup>. I nuovi dati sperimentali qui descrit-

ti, dimostrano che i lisati batterici sono in grado di rafforzare una serie di funzioni di barriera mucosale tramite l'attivazione di diversi meccanismi protettivi direttamente nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio. Infatti, la stimolazione con PMBL induce l'espressione di molecole di adesione e la proliferazione degli epiteliali delle vie aeree, funzioni mirate al miglioramento dell'integrità della barriera epiteliale. Inoltre, le cellule epiteliali attivate da questi lisati batterici possono esercitare una potente attività microbicida secernendo hBD-2, un peptide antimicrobico epitelio-specifico. La possibilità di indurre il rilascio di peptidi antimicrobici mediante la stimolazione con PMBL è anche confermata *in vivo* a seguito della loro somministrazione per via sublinguale.

Una via di somministrazione locoregionale, aerea, intranasale o anche sublinguale, quest'ultima attualmente raccomandata per alcuni lisati batterici disponibili in commercio, appare particolarmente interessante alla luce dei nuovi dati associati all'epitelio respiratorio appena esposti. A seguito del discioglimento della compressa di lisato sotto la lingua, si consente ai frammenti batterici di venire a contatto con la mucosa epiteliale dell'orofaringe, che di fatto rappresenta la via d'ingresso di ogni patogeno delle vie aeree. I microbi, per invadere l'organismo umano, devono inizialmente attraversare uno strato di cellule epiteliali e quest'ultime, rappresentando la prima linea di difesa contro le infezioni, possono avvertire la presenza dei patogeni e rispondere incrementando le funzioni di barriera e inviando segnali ai leucociti per il loro richiamo nelle sedi di infezione. Non sorprende quindi che anche i lisati batterici, mimando un'infezione, siano similmente in grado di attivare queste tipo di difese immunitarie innate.

In effetti, un ruolo delle cellule epiteliali nei meccanismi protettivi di alcune preparazioni di lisati batterici era stato precedentemente riportato, sebbene solo in modelli sperimentali animali<sup>9,27</sup>.

Per i lisati batterici attualmente autorizzati per le patologie umane, i meccanismi d'azione finora proposti si limitavano all'attivazione leucocitaria, sia di effettori dell'immunità innata (macrofagi, cellule dendritiche)

che di quella acquisita (linfociti T e B)<sup>6,8</sup>. Questi nostri nuovi dati indicano un ulteriore meccanismo d'azione protettivo in cui le cellule epiteliali, stimolate dal lisato batterico, possono direttamente contrastare l'invasione microbica. Una limitazione per poter sfruttare questo meccanismo d'azione, che appare di grande rilievo nell'ottica di una prevenzione delle infezioni respiratorie, è ovviamente rappresentata dalla via di somministrazione che dovrà essere di tipo locoregionale, in quanto una somministrazione sistemica non potrà consentire il contatto dei lisati con le cellule della mucosa respiratoria. Ciò suggerisce che la via di somministrazione degli attuali preparati commerciali potrebbe non essere ideale e solo la somministrazione sublinguale sarebbe, tra quelle attualmente autorizzate, utile per attivare tale meccanismo almeno a livello orofaringeo. D'altronde, una somministrazione che preveda il contatto diretto con le mucose delle vie aeree consente anche di attivare le plasmacellule mucosali per la produzione di IgA secretorie nel tratto respiratorio, meccanismo che viceversa verrebbe aggirato da una somministrazione sistemica, ad esempio *per os*.

La proliferazione delle cellule epiteliali danneggiate e la concomitante espressione di molecole coinvolte nella formazione di *tight junctions* cellulari può localmente contribuire alla formazione di una più efficiente barriera fisica in grado di contrastare la possibile invasione microbica, a prescindere se di origine batterica o virale, ma anche ad alleviare la flogosi e velocizzare la rigenerazione dei tessuti danneggiati dai microbi. La capacità delle cellule epiteliali di eliminare direttamente i patogeni batterici rappresenta un altro importante aspetto di resistenza innata alle infezioni<sup>11,18</sup> e i nostri dati suggeriscono che tale resistenza possa essere indotta anche dai lisati batterici, in quanto i PMBL utilizzati in questo studio erano in grado di indurre la produzione di peptide antimicrobici in cellule epiteliali bronchiali umane. I peptidi antimicrobici possono rapidamente uccidere un ampio spettro di batteri patogeni ed è stato precedentemente dimostrato che fenomeni che riducano l'espressione di queste sostanze comportano un maggiore suscettibilità

all'invasione microbica e alla conseguente malattia infettiva<sup>28</sup>. Un ulteriore esempio di questo concetto è stato fornito mediante l'espressione transgenica di defensina nelle cellule di Paneth che, incrementando l'eliminazione batterica, rendevano gli animali da esperimento resistenti alla somministrazione di *Salmonella typhimurium*<sup>26</sup>.

In aggiunta a un meccanismo diretto di rilascio di peptidi antimicrobici conseguente al riconoscimento dei frammenti batterici tramite PRR, le cellule epiteliali possono rilasciare questi peptidi anche in risposta alla presenza di IL-22<sup>29</sup>. I nostri risultati dimostrano che le cellule dendritiche stimolate con PMBL rilasciano elevati quantitativi di IL-23 e IL-1 $\beta$ , citochine a loro volta sono in grado di indurre il rilascio di IL-22 da parte delle ILC di tipo 3. Vale la pena ricordare che sia le cellule dendritiche che le ILC3 sono leucociti ben rappresentati a livello mucosale e, in linea con questi nostri risultati, è stato precedentemente dimostrato che le cellule dendritiche intraepiteliali stimolate con flagellina batterica producono elevate quantità sia di IL-23 che del peptide ad attività antimicrobica RegIII $\gamma$  con meccanismi dipendenti da IL-22<sup>30</sup>. A livello intestinale, è stato anche osservato che la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro comporta la diminuzione di fattori antimicrobici come appunto la lectina battericida RegIII $\gamma$ , predisponendo all'infezione da enterococchi resistenti alla vancomicina<sup>31,32</sup>. Ciò sottolinea come strategie mirate all'incremento della produzione di peptidi antimicrobici possa risultare efficace contro la formazione di batteri antibiotico-resistenti. Alla luce dei nuovi meccanismi d'azione qui descritti, la somministrazione di PMBL potrebbe anche restaurare, a livello della mucosa respiratoria, una produzione di peptide antimicrobici precedentemente diminuita a causa dell'utilizzo di antibiotici. La capacità dei lisati di indurre produzione di IL-22 da parte delle ILC3, cellule strettamente associate all'omeostasi degli epiteliali mucosali, è un aspetto rilevante tra i meccanismi d'azione dei lisati batterici per la prevenzione delle infezioni respiratorie. La IL-22 è una citochina capace sia di evocare una risposta antimicrobica diretta mediante il rilascio di peptide antimicrobici da parte

dell'epitelio, sia di guidare i processi rigenerativi mucosali. Il ruolo rilevante di questa citochina nella protezione contro agenti infettivi è stato ben evidenziato in un modello murino di infiammazione intestinale. La mancanza di espressione del recettore per la IL-23 nelle cellule epiteliali intestinali causa una riduzione della produzione di IL-22 a livello mucosale, un ridotto rilascio di peptidi antimicrobici e una espansione di batteri flagellati in grado di causare la morte dell'animale in un modello di colite indotta da destrano sodio solfato<sup>33</sup>.

Infine, dopo aver dimostrato che i PMBL possono determinare un rilascio di peptidi antimicrobici da parte delle cellule epiteliali con cui vengono a contatto, sia direttamente via PRR sia via IL-22 mediante l'intervento di effettori leucocitari quali le cellule dendritiche e le ILC3, abbiamo anche confermato *in vivo* la capacità dei PMBL di indurre il rilascio di peptidi antimicrobici nell'orofaringe di individui a seguito di una somministrazione sublinguale di lisati batterici.

Il livello di protezione che questo aumento nell'orofaringe di sostanze ad attività antibatterica sia in grado di conferire nei confronti di eventuali infezioni rappresenta un aspetto fondamentale che dovrà essere successivamente identificato per meglio determinarne il valore profilattico o terapeutico nei pazienti.

## Conclusioni

Sebbene l'epitelio sia stato a lungo considerato come una struttura piuttosto "passiva" nel ricevere segnali citochinici da tradurre in una risposta protettiva, recenti risultati enfatizzano un ruolo cruciale dell'epitelio nella risposta immune mucosale e i nostri dati indicano che tali risposte possono anche essere indotte mediante i lisati batterici.

Questi nostri studi indicano quindi un ruolo centrale, e forse principale, delle cellule epiteliali delle vie aeree nei possibili meccanismi protettivi possibilmente indotti dai lisati batterici. D'altro canto, alla luce di questi risultati, la via di somministrazione dei lisati assume un ruolo cruciale. Perché sia possibile attivare questo importante meccanismo mediato dalle cellule epiteliali è necessario

che i lisati vengano a contatto con le mucose dell'albero respiratorio, richiedendo quindi una via di somministrazione locoregionale, quale, ad esempio, quella sublinguale o, ancor preferibile ma attualmente non autorizzata, intranasale o aerosolica.

Certamente abbiamo oggi una migliore interpretazione della natura delle difese immunitarie che possono essere attivate da queste miscele di frammenti batterici e abbiamo solo recentemente identificato un importante meccanismo d'azione orchestrato direttamente dalle cellule epiteliali delle vie respiratorie, purché queste ultime possano giungere in contatto con i lisati. Poter sfruttare tale meccanismo dal punto di vista clinico dipende quindi dalla via di somministrazione e potrebbe essere particolarmente utile in tutte quelle condizioni in cui le attività antibatteriche o di rigenerazione epiteliale possano rappresentare importanti fattori protettivi.

## Bibliografia

- 1 GBD Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect* 2018;18:1191-1210.
- 2 Razi CH, Harmanci K, Abaci A, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:763-769.
- 3 Lau, S. Bacterial lysates in food allergy prevention. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013;13:293-295.
- 4 Lau S, Gerhold K, Zimmermann K, et al. Oral application of bacterial lysate in infancy decreases the risk of atopic dermatitis in children with 1 atopic parent in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1040-1047.
- 5 Suarez N, Ferrara F, Pirez M, et al. Characterization of bacterial lysates by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *SOJ Biochemistry* 2017;3:1-7.
- 6 Villa E, Garelli V, Braido F, et al. May we strengthen the human natural defenses with bacterial lysates? *World Allergy Organ J* 2010;3:S17-23.
- 7 Suarez, N, Ferrara F, Rial A, et al. Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:545.
- 8 Morandi B, Agazzi A, D'Agostino A, et al.

A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells. *Immunol Lett* 2011;138:86-91.

- 9 Clement CG, Evans SE, Evans CM, et al. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1322-1330.
- 10 Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneux PL. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology* 2020;160:171-182.
- 11 Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004;23:327-333.
- 12 Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-144.
- 13 Hewitt RJ, Lloyd CM. Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nat Rev Immunol* 2021;21:347-362.
- 14 Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;1:141-150.
- 15 Cleaver JO, You D, Michaud DR, et al. Lung epithelial cells are essential effectors of inducible resistance to pneumonia. *Mucosal Immunol* 2014;7:78-88.
- 16 Leiva-Juarez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol* 2018;11:21-34.
- 17 Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009;30:131-141.
- 18 Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, et al. Inducible innate resistance of lung epithelium to infection. *Annu Rev Physiol* 2010;72:413-435.
- 19 Keir M, Yi Y, Lu T, et al. The role of IL-22 in intestinal health and disease. *J Exp Med* 2020;217:e20192195.
- 20 Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8:193-204.
- 21 Huang GT, Eckmann L, Savidge TC, et al. Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1996;98:572-583.
- 22 van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3756-3788.



- <sup>23</sup> Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity* 2015;42:216-226.
- <sup>24</sup> Cazzola M, Anapurapu S, Page CP. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis. *Pulm Pharmacol Ther* 2012;25:62-68.
- <sup>25</sup> Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis* 2020;20:e216-e230.
- <sup>26</sup> Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 2019;4:1432-1442.
- <sup>27</sup> Ferrara F, Rial A, Suarez N, et al. Polyvalent bacterial lysate protects against pneumonia independently of neutrophils, IL-17A or caspase-1 activation. *Front Immunol* 2021;12:562244.
- <sup>28</sup> Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, et al. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003;422:522-526.
- <sup>29</sup> Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* 2015;33:747-785.
- <sup>30</sup> Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 2012;36:276-287.
- <sup>31</sup> Brandl K, Plitas G, Mihu CN, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* 2008;455:804-807.
- <sup>32</sup> Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20858-20863.
- <sup>33</sup> Aden K, Rehman A, Falk-Paulsen M, et al. Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation. *Cell Rep* 2016;16:2208-2218.



*Realizzato con il contributo incondizionato di Zambon Italia S.r.l.*