

Бактериальная стимуляция способствует активации синтеза оксида азота в слизистой оболочке ободочной кишки при дивертикулярной болезни

United European Gastroenterology Journal
2017, Vol. 5(5) 715–724
Охраняется авторским правом. ©Автор(ы) 2016 год.
По вопросам получения репринтов статьи и разрешения на публикацию обращаться по адресу:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
Цифровой идентификатор объекта (DOI):
10.1177/2050640616684398
journals.sagepub.com/home/ueg

<Логотип «СЕЙДЖ»>

**Протекторные свойства *L. casei* DG[®]
(*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572)**

Fabio Turcol¹, Paolo Andreozzi¹, Ilaria Palumbo¹, Francesco Paolo Zito¹, Martina Cargioli¹, Walter Fiore², Nicola Gennarelli¹, Giovanni Domenico De Palma¹, Giovanni Sarnelli¹ и Rosario Cuomo¹

Аннотация

Общая информация: Микровоспалительные процессы и изменения микрофлоры кишечника могут играть важную роль в патогенезе дивертикулярной болезни.

Цель исследования: целью данной публикации является оценка экспрессии NO-опосредованных медиаторов и S100B в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с дивертикулярной болезнью (ДБ) в *ex vivo* модели бактериальной инфекции.

Методы исследования: Биоптаты ткани кишечника, полученные от пациентов с дивертикулезом, неосложненной дивертикулярной болезнью с клиническими проявлениями (SUDD) и SUDD с ранее перенесенным острым дивертикулитом (SUDD + AD), стимулировали пробиотиком *L. casei* DG[®] (LCDG) и/или патогеном, энтероинвазивным штаммом *Escherichia coli* (EIEC). Затем оценивали уровни высвобождения S100B, NO и экспрессию iNOS.

Результаты исследования: базальная экспрессия iNOS была существенно повышена у пациентов с SUDD и SUDD + AD. Базальная экспрессия NO была значительно повышена при SUDD + AD. Не выявлено каких-либо различий в высвобождении S100B. Во всех группах экспрессия iNOS значительно повышалась под воздействием EIEC и снижалась под воздействием LCDG. Во всех группах, за исключением SUDD + AD, EIEC способствовал значительному повышению высвобождения NO, в то время как при добавлении LCDG к биопсийному материалу какого-либо повышения не наблюдалось. EIEC не оказывал индуцирующего воздействия на высвобождение S100B.

Выводы: слизистая оболочка ободочной кишки у пациентов с ДБ характеризуется разной степенью реактивности в отношении патогенных раздражителей. LCDG играет важную роль в нейтрализации провоспалительных эффектов со стороны EIEC, что свидетельствует о благоприятном клиническом эффекте применения данного пробиотика при DD.

Ключевые слова

Дивертикулярная болезнь, пробиотик, оксид азота, слизистая оболочка ободочной кишки человека, энтероинвазивный штамм *Escherichia coli*

Статья получена: 25 октября 2016 года; **принята к публикации:** 13 ноября 2016 года.

¹Кафедра клинической медицины и хирургии, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Неаполь, Италия

²«Софар С.п.А.» (Sofar S.p.A.) Треццано-Роза, Италия

Автор, которому следует направлять корреспонденцию:

Rosario Cuomo, кафедра клинической медицины и хирургии, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Виа Серджио Пансини 5, здание 6, 80131 Неаполь, Италия

Эл. почта: rcuomo@unina.it

Дивертикулярная болезнь (ДБ) ободочной кишки – часто встречающееся заболевание в западных странах. Статистические показатели распространенности данной патологии в общей популяции варьируют от 20% до 60%, среди заболеваний желудочно-кишечного тракта данная патология является наиболее частым показанием к госпитализации и посещению больных на дому.^{1,2}

Введение

Дивертикулы толстого кишечника представляют собой мешочкообразные выпячивания ободочной кишки в наиболее слабых участках циркулярного мышечного слоя, в толще которых проходят кровеносные сосуды (*vasa recta*), снабжающие кровью слизистую оболочку.³ Наличие дивертикулов определяется как дивертикулез. Приблизительно у 20% пациентов образование дивертикулов приводит к развитию заболеваний, варьирующих от синдрома, характеризующегося рецидивирующими абдоминальными симптомами (болью, вздутием живота и изменением частоты стула в отсутствие макроскопических признаков острого воспаления), определяемого как неосложненная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями (SUDD), до острого воспаления дивертикула ободочной кишки, определяемого как острый дивертикулит (AD) с типичным спектром осложнений (абсцессы, стенозы, фистулы, перфорации).⁴

Несмотря на значительное бремя данной патологии, патогенез заболевания недостаточно ясен, при этом в развитии заболевания могут играть роль несколько этиологических факторов.⁵⁻⁷

В последнее время в качестве одного из факторов патогенеза клинических проявлений и связанного с ними процесса острого воспаления рассматривают изменения в составе кишечной микрофлоры.⁸ Более того, в целом ряде исследований отмечена роль энтеральной нервной системы (ЭНС) в патофизиологии ДБ.⁷

В последнем исследовании, проведенной нашей исследовательской группой в контексте проблемы воспалительных процессов в кишечнике, наряду с повышенными уровнями экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и высвобождения NO, мы наблюдали повышенное высвобождение S100B – белка, который специфично экспрессируется и синтезируется энтеральными глиальными клетками (EGC).⁹ Ранее мы демонстрировали, что слизистая оболочка кишечника у пациентов с целиакией и язвенным колитом является более «чувствительной» к воздействию провоспалительных и инфекционных раздражителей, чем неповрежденная слизистая оболочка, а также то, что EGC участвуют в регулировании синтеза NO в слизистой оболочке посредством гиперэкспрессии и высвобождения S100B.^{10,11} Аналогичным образом, изменение ECG-опосредованного пути воспаления может быть одним из звеньев патогенеза ДБ.

Клетки EGC способны взаимодействовать с бактериями и дифференцированно реагировать на патогены и пробиотики посредством активации различных уровней экспрессии Toll-подобных рецепторов и синтеза NO.¹² Данная специфика дифференцированного ответа ECG и благоприятное воздействие пробиотиков на процессы воспаления в кишечнике подтверждают гипотезу о роли пробиотиков в регулировании выраженности воспалительного ответа при ДБ, индуцированной патогенными бактериями.

Штамм *Lactobacillus casei* DG (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572; LCDG), широко применяющийся у человека в качестве пробиотика, обладает свойствами регулировать состав кишечной микрофлоры ободочной кишки при хронических воспалительных процессах в кишечнике, а также существенно модифицировать экспрессию Toll-подобных рецепторов.^{13,14}

Различные варианты клинических проявлений ДБ (асимптомный дивертикулез, SUDD и острый дивертикулит [AD]) могут быть обусловлены различной чувствительностью

слизистой оболочки ободочной кишки к провоспалительным раздражителям. Исходя из этого предположения, мы предприняли попытку оценить уровень экспрессии NO-опосредованных медиаторов в слизистой оболочке ободочной кишки пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD), на фоне бактериальной инфекции. Кроме того, мы оценивали потенциальные различия с точки зрения базального уровня высвобождения медиаторов воспаления и способности LCDG регулировать выраженность воспалительного ответа.

Материалы и методы исследования

Пациенты

Забор биопсийного материала производили во время проведения эндоскопического исследования у 40 последовательного обратившихся больных, распределенных следующим образом: 10 пациентов с дивертикулезом (3 женщин; средний возраст 70 лет, диапазон значений: 59–77 лет), 10 пациентов с SUDD (3 женщины, средний возраст 63 года, диапазон значений: 44–92 года), 10 пациентов с SUDD + AD (2 женщины, средний возраст 60 лет, диапазон значений: 31–77 лет) и 10 лиц без признаков желудочно-кишечного заболевания (6 женщин; средний возраст 53 года; диапазон значений: 33–75 лет), отобранных в качестве контрольной группы (CTRL-группа). Показания для проведения эндоскопии включали: скрининговое обследование на выявление колоректального рака, обследование в рамках динамического наблюдения по поводу аденомы, боль в области живота, изменение характера и частоты стула, кровотечение из прямой кишки. Участников для CTRL-группы отбирали только среди лиц, прошедших скрининговое обследование на выявление колоректального рака.

У каждого пациента был выполнен забор шести биоптатов, взятых в произвольном порядке из участка сигмовидной кишки; у пациентов с дивертикулами забор биопсийного материала выполняли в участках, граничащих с дивертикулумом.

От всех участников было получено информированное согласие, также было получено разрешение на проведение исследования от независимого комитета по этике Неаполитанского университета имени Фридриха II.

Выращивание культур тканей биопсийных образцов слизистой оболочки

Цельные биопсийные образцы помещали на стерильную металлическую решетку, слизистой поверхностью вниз и серозной поверхностью вверх, с целью поляризации биопсийного материала. Металлическую решетку помещали в середину чашки с центральной лункой для культуры тканей («БД Юроп» [BD Europe], Ле-Пон-де-Кле, Франция) на 24 ч, культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM)-F12, («Сигма-Олдрич» [Sigma-Aldrich], штат Миссури, США) и инкубировали при температуре 37 °C, с постоянной подачей газовой смеси (95% кислород-5% углекислый газ). Затем биоптаты подвергали воздействию патогенных бактерий и/или бактерий-пробиотиков, при этом воздействие во всех случаях оказывалось на серозную поверхность образцов.

Бактериальные штаммы

Энтероинвазивный штамм *Escherichia coli* (EIEC; ATCC, Роквилл, штат Мэриленд, США) был выбран с учетом его выраженного негативного воздействия на желудочно-кишечный тракт,¹⁵ тогда как штамм *L. casei* DG® (LCDG; *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572, Энтеролактис, «Софар С.п.А.» [Sofar S.p.A.], Треццано-Роза, Милан, Италия, депонированный компанией «Софар» (Sofar) в Институте Пастера в Париже под номером I1572), был выбран с учетом его свойств пробиотика.¹⁴ Бактерии культивировали и сохраняли в соответствии с ранее описанной методикой.¹²

План проведения экспериментального исследования

Обработку биопсийного материала осуществляли в соответствии со схемами, приведенным в Таблице 1, производили забор супернатантов, биоптаты помещали в буфер (Lonza) для исследования методом радиоиммунопреципитации (РИП); весь материал хранили при - 80 °С для последующих исследований.

Экстракция белка и вестерн-иммуоблоттинг

Исследование по методу вестерн-блоттинга и анализ результатов выполнены в соответствии с ранее описанной методикой.¹² Были использованы антитела: кроличьи антитела к iNOS (1:500 разведение по объему, «Санта Круз Биотекнолоджи» [Santa Cruz Biotechnology], Санта-Круз, штат Калифорния, США) или мышинные антиактиновые антела (1:1000 по объему, Санта-Круз).

Таблица 1. План проведения экспериментальных исследований.

	0 ч	2,5 ч 24 ч
BASAL (только среда)		
EIEC	+EIEC	
EIEC + LCDG	+ EIEC	+ LCDG
LCDG + EIEC	+LCDG	+ EIEC
EIEC и LCDG	+EIEC и LCDG	

— = CULTURE MEDIUM
 — = EIEC
 — = LCDG

ч – часы; EIEC – энтероинвазивный штамм *Escherichia coli*; LCDG – штамм *Lactobacillus casei DG*.

Количественное определение NO

Количественное определение NO проводили в соответствии с ранее описанной методикой.¹²

Определение белка S100B методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА)(ELISA)

Определение белка S100B методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) – ELISA («Биовендор Р энд Д» [Biovendor R&D], Брно, Чешская республика) выполняли на биопсийных супернатантах, в соответствии с протоколом компании-производителя.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием метода дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественных сравнений Бонферрони. Приведенные данные представлены в виде среднего \pm SD и n-количества проведенных экспериментов. Уровень статистической значимости определен для величины $p < 0,05$.

Результаты

Базальные уровни экспрессии iNOS и высвобождения NO, белка S100B и цитокинов

У пациентов с дивертикулезом отмечался повышенный уровень экспрессии iNOS, в сравнении с данными CTRL-группы, однако различия были статистически не значимы (Рисунок 1(a)). У пациентов с SUDD и SUDD + AD базальная экспрессия iNOS была достоверно повышена в сравнении с пациентами контрольной группы (+2,04- и +2,86-кратное повышение в сравнении с CTRL-группой, соответственно; $p < 0,05$) (Рисунок 1(a)). У пациентов с дивертикулезом и SUDD уровень высвобождения NO в сравнении с пациентами CTRL-группой был повышен, однако различия были статистически не значимы (Рисунок 1(b)). У пациентов с SUDD + AD базальная экспрессия NO была достоверно повышена, в сравнении с пациентами CTRL-группы (+7,77-кратное повышение в сравнении с CTRL-группой; $p < 0,05$) (Рисунок 1(b)).

Поскольку в раннее проведенных работах было показано, что экспрессия белка энтероглиального происхождения S100B связана с высвобождением NO, мы исследовали вероятность разной интенсивности высвобождения S100B в CTRL-группе и в случаях отдельных заболеваний. Как показано на Рисунке 1(c), в CTRL-группе, в группах пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD + AD наблюдали различные уровни высвобождения S100B, однако выявленные различия были статистически не релевантны.

Мы также проанализировали вероятность разных уровней высвобождения интерлейкина (IL)-1b, IL-6 и IL-10 в CTRL-группе, группах пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD + AD. Выявлено повышение уровня высвобождения IL-1b, в диапазоне наблюдений от данных участников CTRL- группы до пациентов с ранее перенесенным AD, даже если только в последней из названных групп определяли достоверное повышение высвобождения IL-1b (+8,26-кратное повышение в сравнении с CTRL-группой $p < 0,05$) (Рисунок 2(a)). Относительно IL-6, также отмечалась тенденция к повышению уровня высвобождения при анализе показателей CTRL-группы и пациентов с ДБ, даже если выявленные различий не достигали статистически значимого уровня (Рисунок 2(b)). Аналогично в отношении IL-10, наблюдали повышение интенсивности высвобождения в диапазоне наблюдений от CTRL-группы до пациентов с SUDD + AD, в этом случае также отмечалось статистически достоверное повышение высвобождения IL-10, в сравнении с CTRL-группой, только у пациентов с SUDD с ранее перенесенным острым дивертикулитом (+11,25-кратное повышение в сравнении с CTRL-группой; $p < 0,05$) (Рисунок 2(c)). Данные, полученные при анализе характера воздействия бактерий на высвобождение цитокинов у пациентов всех степеней клинических проявлений заболевания, характеризовались высокой вариабельностью, статистически значимых результатов получено не было (данные не приводились).

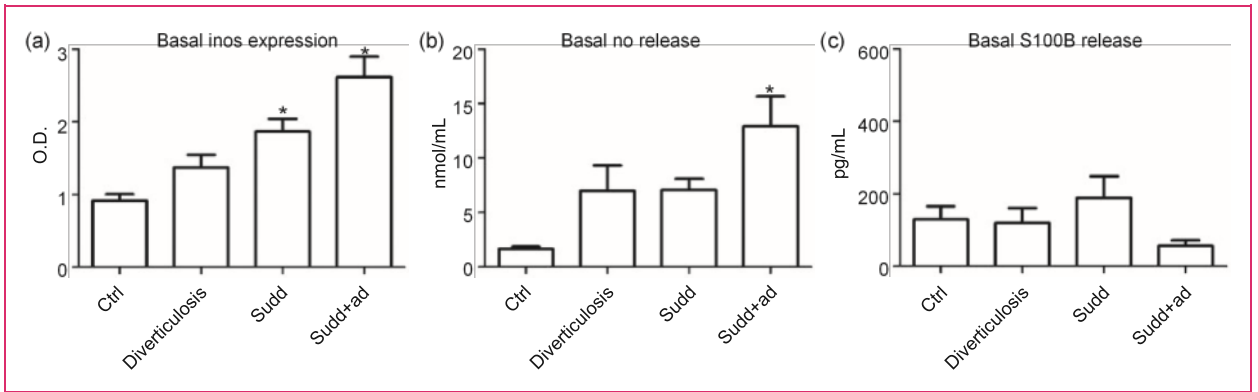


Рисунок 1, Базальная экспрессия iNOS и высвобождение NO и белка S100B у пациентов и здоровых участников. (a) Анализ базальной экспрессии iNOS, определяемый методом вестерн-блоттинг, в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD). (b) Уровень высвобождения NO, определяемый методом Грисса, в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD). (c) Уровень высвобождения белка S100B, определяемый методом твердофазного ИФА (ELISA), в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD). Все результаты представлены в виде среднего±SEM с n = 10 экспериментов, выполненных трехкратно. * p < 0,05 в сравнении с CTRL-группой. iNOS – индуцибельная NO-синтаза; NO – оксид азота; SUDD – неосложненная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями; AD – острый дивертикулит; ОП – оптическая плотность; ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ; CTRL-группа: контрольная группа.

Надписи на Рисунке 1

(a)	(a)
(b)	(b)
(c)	©
O.D.	ОП
Basal iNOS expression	Базальный уровень экспрессии iNOS
Basal NO release	Базальный уровень высвобождения NO
Basal S100B expression	Базальный уровень экспрессии S100B
pg/mL	пг/мл
Ctrl	Контрольная группа
Diverticulosis	Дивертикулез
Sudd	Sudd
Sudd + ad	Sudd + ad

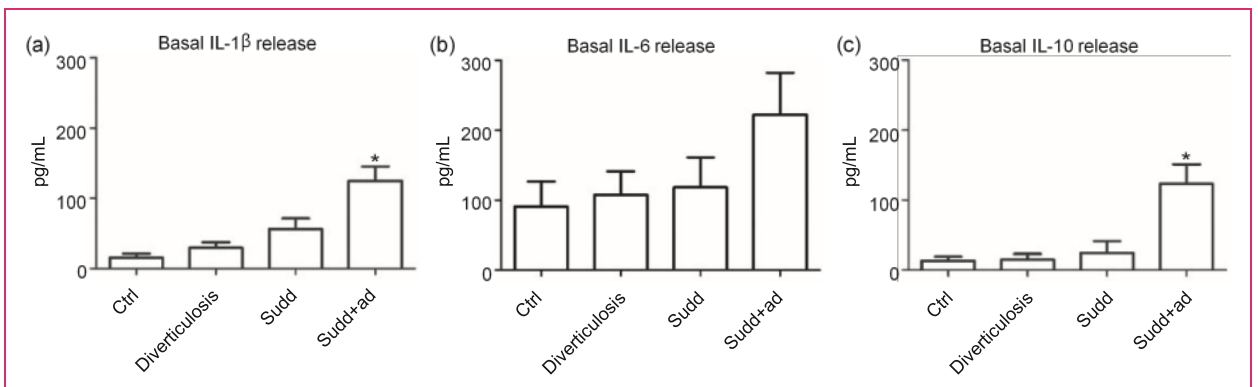


Рисунок 2, Базальное высвобождение цитокинов в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов и здоровых участников. Базальные уровни высвобождения (a) IL-1β, (b) IL-6 и (c) IL-10, определяемые методом твердофазного ИФА (ELISA), в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с дивертикулезом, SUDD и SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD). Все результаты представлены в виде среднего±SEM с n = 10 экспериментов, выполненных трехкратно.

* $p < 0,05$ в сравнении с CTRL-группой. IL – интерлейкин; ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ; Sudd – неосложненная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями; AD – острый дивертикулит; CTRL-группа – контрольная группа.

Надписи на Рисунке 2

(a)	(a)
(b)	(b)
(c)	(c)
Basal IL-1 β expression	Базальный уровень экспрессии IL-1 β
Basal IL-6 release	Базальный уровень высвобождения IL-6
Basal IL-10 expression	Базальный уровень экспрессии IL-10
pg/mL	пг/мл
Ctrl	Контрольная группа
Diverticulosis	Дивертикулез
Sudd	Sudd
Sudd + ad	Sudd + ad

Влияние бактериального воздействия на экспрессию iNOS

После исследования базальных уровней, с целью оценки возможных различий в регулирующем воздействии бактериальной стимуляции на медиаторы воспаления в CTRL-группе и у пациентов с конкретными заболеваниями, проведена оценка уровня экспрессии iNOS в биоптатах слизистой оболочки.

В CTRL-группе стимуляция штаммами EIEC сопровождалась достоверным повышением уровня экспрессии iNOS (+2,11-кратное повышение, в сравнении с базальным уровнем; $p < 0,05$; Рисунок 3(a)). При добавлении штаммов LCDG до или после стимуляции штаммами EIEC статистически значимых изменений уровня экспрессия iNOS не отмечалось (Рисунок 3(a)), однако при одновременном добавлении штаммов LCDG и EIEC выявлено достоверное снижение экспрессии iNOS, в сравнении с уровнем экспрессии, индуцированной только штаммами EIEC (-1,50-кратное снижение в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC; $p < 0,05$) (Рисунок 3(a)).

У пациентов с дивертикулезом стимуляция штаммами EIEC сопровождалась достоверным повышением экспрессии iNOS (+2,86-кратное повышение в сравнении с базальным уровнем; $p < 0,05$) (Рисунок 3(b)). При добавлении штаммов LCDG в биопсийные образцы перед добавлением, после добавления, или одновременно с введением штаммов EIEC, показатели экспрессии iNOS были достоверно снижены, в сравнении с показателями при стимуляции штаммами EIEC (-1,59-, -1,79- и +1,61-кратное снижение в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC, соответственно; $p < 0,05$) (Рисунок 3(b)).

У пациентов с Sudd отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии iNOS достоверно под воздействием стимуляции штаммами EIEC (+2,14-кратное повышение, в сравнении с базальным уровнем; $p < 0,05$) (Рисунок 3(c)).

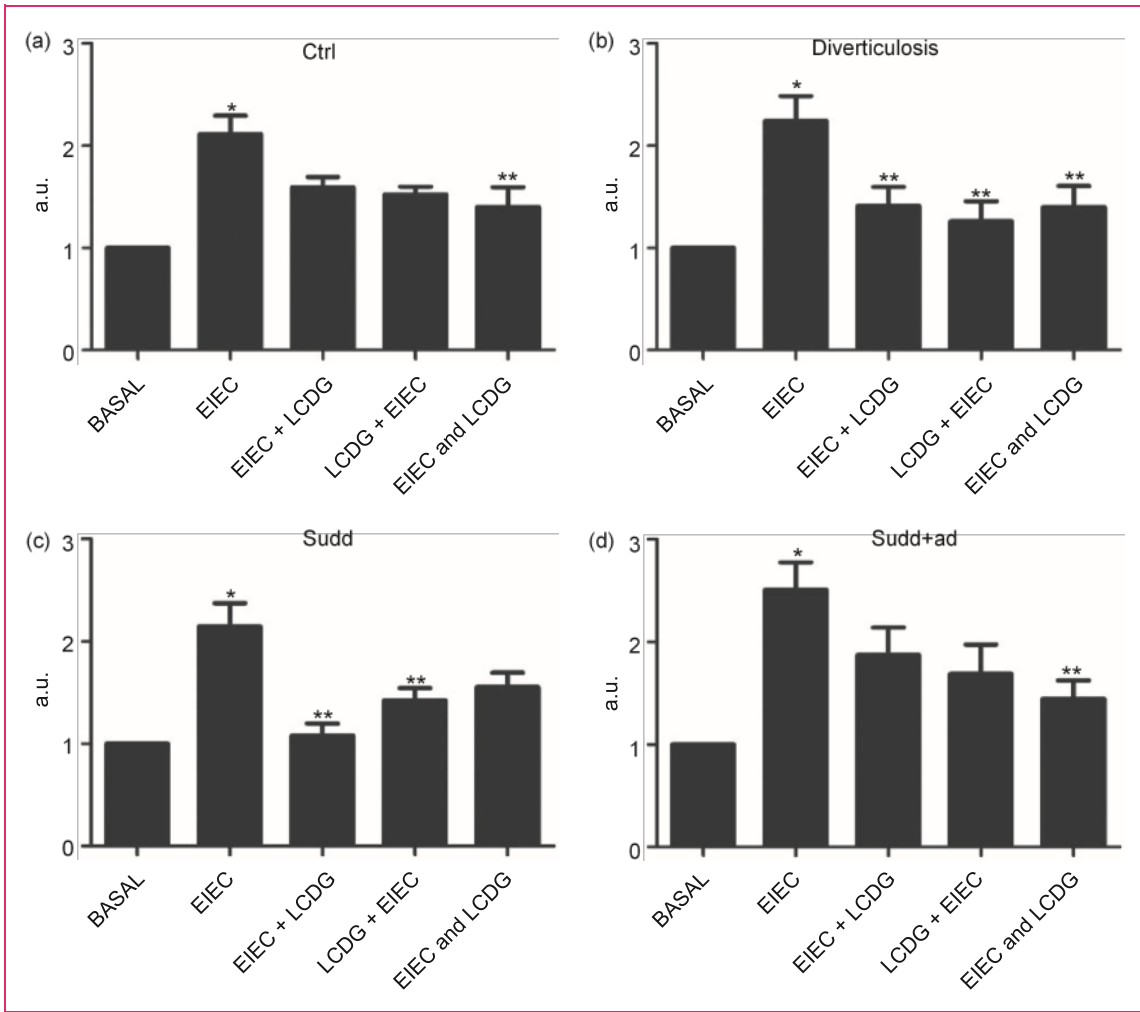


Рисунок 3. Экспрессия iNOS у пациентов и здоровых участников после бактериальной стимуляции. Вестерн-блоттинг анализ экспрессии iNOS в слизистой оболочке ободочной кишки of (a) здоровых участников контрольной группы, (b) пациентов с дивертикулёзом, (c) пациентов с SUDD и (d) пациентов с SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD) через 24 ч после стимуляции энтероинвазивным штаммом *Escherichia coli* (EIEC) и/или штаммом *L. casei* DG (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572; LCDG) EIEC + LCDG – штаммы LCDG, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов EIEC; LCDG + EIEC – штаммы EIEC, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов LCDG; EIEC и LCDG – штаммы EIEC и LCDG, добавленные одновременно. Все результаты представлены в виде среднего±SEM of n ¼10 экспериментов, выполненных трехкратно.

*p <0,05, в сравнении с CTRL-группой; ** p <0,05, в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC. iNOS – индуцибельная NO-синтаза; SUDD – неосложненная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями; AD– острый дивертикулит; CTRL-группа – контрольная группа; a.u. – произвольные единицы.

Надписи на Рисунке 3

(a)	(a)
(b)	(b)
(c)	(c)
(d)	(d)
a.u.	a.u.
Ctrl	Контрольная группа
Diverticulosis	Дивертикулёз
SUDD	SUDD
SUDD + AD	SUDD + AD
BASAL	БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ
EIEC	EIEC
EIEC + LCDG	EIEC + LCDG
LCDG + EIEC	LCDG + EIEC
EIEC and LCDG	EIEC и LCDG

Добавление штаммов LCDG до или после стимуляции штаммами EIEC сопровождалось снижением уровня экспрессии iNOS, в сравнении с уровнем экспрессии при стимуляции штаммами EIEC ($-2,01$ - и $-1,50$ -кратное снижение в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC, соответственно; $p < 0,05$) (Рисунок 3(с)). При одновременном добавлении штаммов EIEC и LCDG, отмечалось снижение уровня экспрессия iNOS, даже если изменения не достигали уровня статистической значимости. В группе пациентов с Sudd + AD стимуляция штаммами EIEC также способствовала достоверному повышению уровня экспрессии iNOS ($+2,50$ -кратное повышение, в сравнении с базальным уровнем; $p < 0,05$) (Рисунок 3(d)). При добавлении штаммов LCDG к биопсийным образцам до или после стимуляции штаммами EIEC статистически значимого снижения уровня экспрессии iNOS, в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC, не отмечалось (Рисунок 3(d)). Напротив, при одновременном добавлении штаммов EIEC и LCDG уровень экспрессии iNOS достоверно снижался, в сравнении с уровнем при изолированной стимуляции штаммами EIEC ($-1,73$ -кратное снижение в сравнении с группой стимуляции штаммами EIEC; $p \neq NS$) (Рисунок 3(d)).

У всех участников с исследованными образцами изолированное добавление LCDG не сопровождалось достоверным изменением экспрессии iNOS (данные не приводились).

Влияние бактериальной стимуляции на высвобождение NO

В CTRL-группе стимуляция штаммами EIEC сопровождалась статистически значимым повышением уровня высвобождения NO (Рисунок 4(a)). При добавлении штаммов LCDG к биопсийным образцам перед добавлением, после добавления, или одновременно с добавлением штаммов EIEC, уровень высвобождения NO не отличался от базального уровня (Рисунок 4(a)).

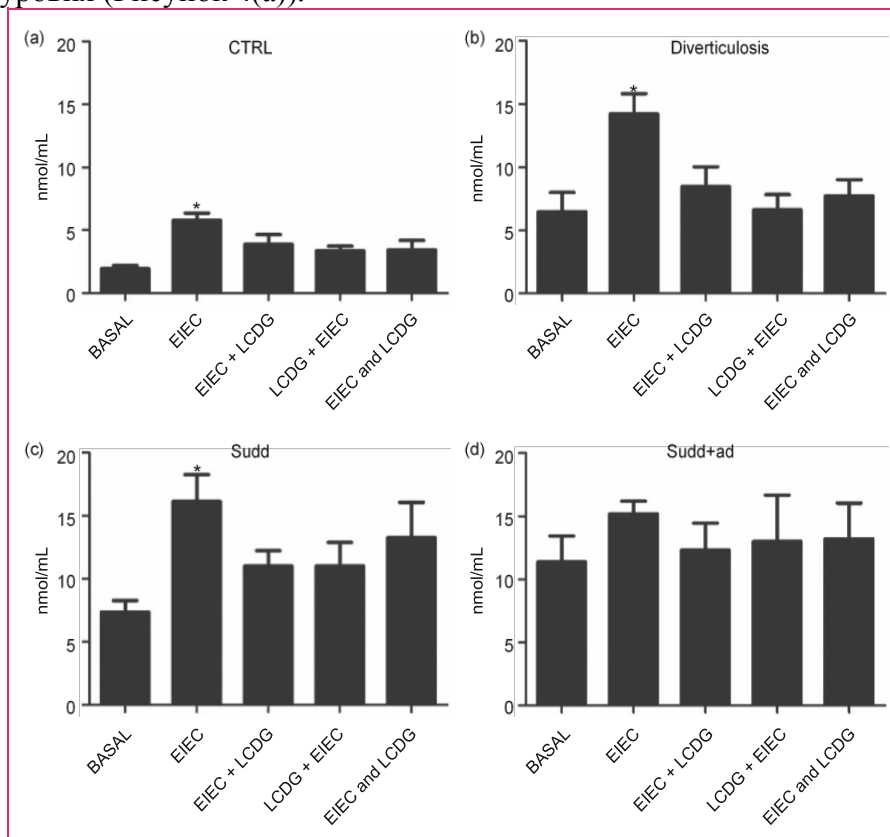


Рисунок 4. Высвобождение NO у пациентов и здоровых участников после бактериальной стимуляции. Уровень высвобождения NO, определяемый методом количественного определения Грисса, через 24 ч после стимуляции энтероинвазивным штаммом *Escherichia coli* (EIEC) и/или штаммом *L. casei* DG (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572; LCDG) в слизистой оболочке ободочной кишки (а) здоровых участников контрольной

группы, (b) пациентов с дивертикулезом, (c) пациентов с SUDD и (d) пациентов с SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD).

EIEC + LCDG – штаммы LCDG, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов EIEC; LCDG + EIEC – штаммы EIEC, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов LCDG; EIEC и LCDG – штаммы EIEC и LCDG, добавленные одновременно. Все результаты представлены в виде среднего±SEM of n ¼10 экспериментов, выполненных трехкратно.

* p <0,05 в сравнении с CTRL-группой; ** p <0,05 в сравнении с группой добавления штаммов EIEC. NO – оксид азота; SUDD – неосложненная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями; AD – острый дивертикулит; CTRL-группа – контрольная группа; а.у.: произвольные единицы.

Надписи на Рисунке 4.

nmol/mL	нмоль/мл
(a)	(a)
(b)	(b)
(c)	(c)
(d)	(d)
a.u.	а.у.
Ctrl	Контрольная группа
Diverticulosis	Дивертикулез
SUDD	SUDD
SUDD + AD	SUDD + AD
BASAL	БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ
EIEC	EIEC
EIEC + LCDG	EIEC + LCDG
LCDG + EIEC	LCDG + EIEC
EIEC and LCDG	EIEC и LCDG

Аналогичным образом, у пациентов с AD и пациентов с SUDD (Рисунок 4(b) и 4(c)) стимуляции штаммами EIEC сопровождалась достоверным повышением уровня высвобождения NO, в то время как не отмечалось какого-либо повышение уровня высвобождения NO при добавлении штаммов LCDG к биопсийным образцам перед добавлением, после добавления, или одновременно с добавлением штаммов EIEC. Скорее, при добавлении штаммов LCDG перед добавлением штаммов EIEC у пациентов с дивертикулезом отмечалось достоверное снижение уровня высвобождения NO (-2,35-кратное снижение, в сравнении с группой добавления штаммов EIEC; p<0,05) (Рисунок 4(b)).

У пациентов с SUDD + AD базальный уровень высвобождения NO был выше, чем в других группах (Рисунок 4D). В данных условиях стимуляции штаммами EIEC не сопровождалась достоверным повышением уровня высвобождения NO (Рисунок 4D). Аналогичным образом, не выявлено каких-либо различий, с точки зрения высвобождения NO, при добавлении штаммов LCDG к биопсийным образцам перед добавлением, после добавления или одновременно с добавлением штаммов EIEC (Рисунок 4D).

У всех пациентов с исследованными биопсийными образцами изолированное добавление штаммов LCDG не вызывало существенной модификации высвобождения NO (данные не приводились).

Влияние бактериальной стимуляции на высвобождение белка S100B

В CTRL-группе воздействие штаммов EIEC способствовало достоверному повышению высвобождения белка S100B (+2,76-кратное повышение в сравнении с базальным уровнем; p<0,05) (Рисунок 5(a)). При одновременном добавлении штаммов LCDG и EIEC, уровни высвобождения S100B достоверно снижались, в сравнении с уровнями при изолированной стимуляции штаммами EIEC (-2,90-кратное снижение, в сравнении с изолированной стимуляцией штаммами EIEC; p<0,05) (Рисунок 5(a)).

Что касается пациентов из групп SUDD и SUDD + AD, бактериальная стимуляция не сопровождалась статистически значимыми изменениями уровней высвобождения S100B (Рисунок 5(b), 5(c) и 5(d)).

Кроме того, при изолированном добавлении штаммов LCDG к биопсийным образцам наблюдали статистически не значимые изменения уровня высвобождения S100B (данные не приводились).

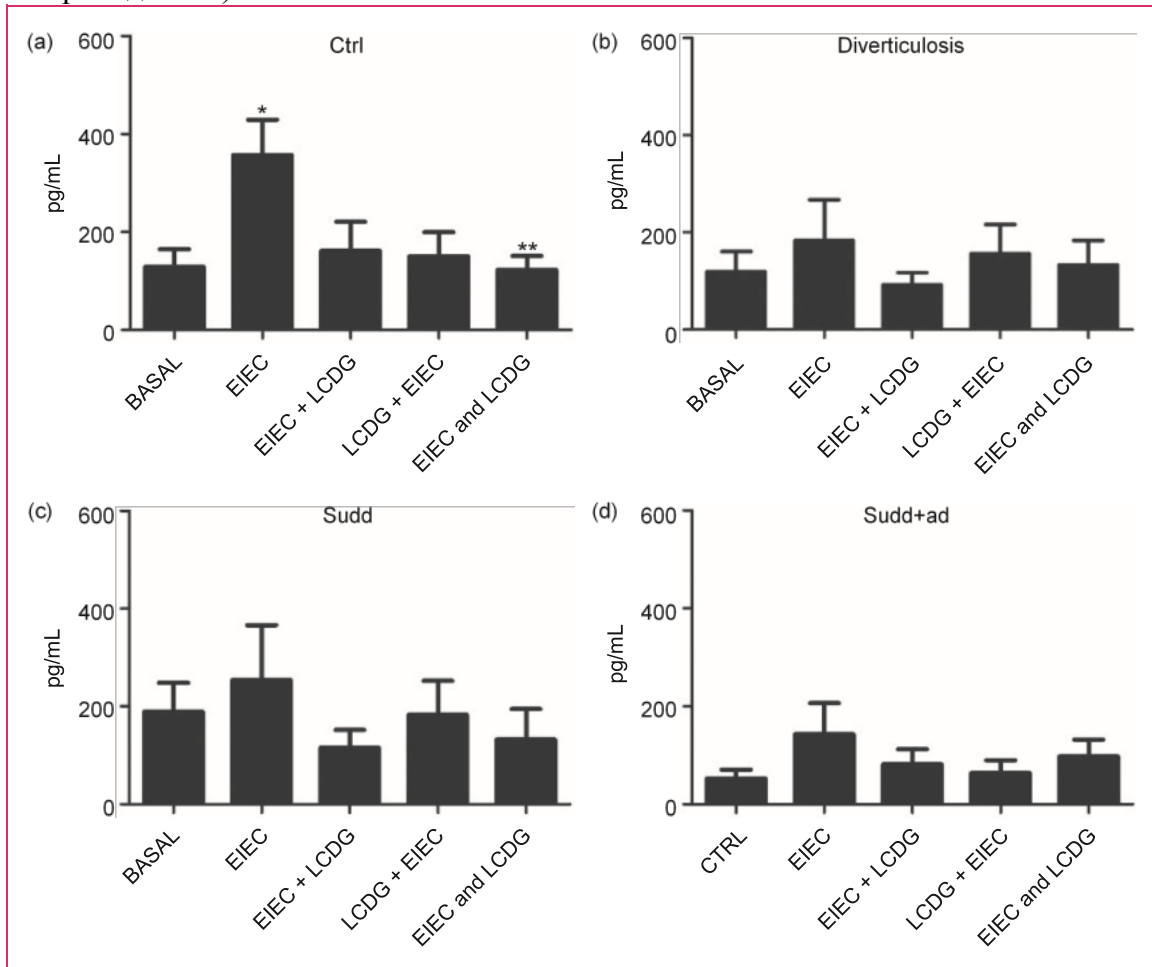


Рисунок 5. Высвобождение белка S100B у пациентов и здоровых участников после бактериальной стимуляции. Уровень высвобождения белка S100B, определяемый методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (ELISA), через 24 ч после стимуляции энтероинвазивным штаммом *Escherichia coli* (EIEC) и/или штаммом *L. casei DG* (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572; LCDG) в слизистой оболочке ободочной кишки (a) здоровых участников контрольной группы, (b) пациентов с дивертикулезом, (c) пациентов с SUDD и (d) пациентов с SUDD с эпизодами острого дивертикулита в анамнезе (SUDD + AD). EIEC + LCDG – штаммы LCDG, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов EIEC; LCDG + EIEC – штаммы EIEC, добавленные через 2,5 ч после добавления штаммов LCDG; EIEC и LCDG – штаммы EIEC и LCDG, добавленные одновременно. Все результаты представлены в виде среднего±SEM of n/410 экспериментов, выполненных трехкратно.

*p <0,05 в сравнении с CTRL-группой; **p <0,05 в сравнении с EIEC. ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ; SUDD – несложная дивертикулярная болезнь с клиническими проявлениями; AD – острый дивертикулит; CTRL-группа – контрольная группа; а.у. – произвольные единицы.

Надписи на Рисунке 5

pg/mL	пг/мл
(a)	(a)
(b)	(b)
(c)	(c)
(d)	(d)
a.u.	a.u.
Ctrl	Контрольная группа
Diverticulosis	Дивертикулез
SUDD	SUDD
SUDD + AD	SUDD + AD
BASAL	БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ
EIEC	EIEC
EIEC + LCDG	EIEC + LCDG
LCDG + EIEC	LCDG + EIEC

Обсуждение

Результаты исследования продемонстрировали активацию NO-зависимых процессов воспаления, связанных с уровнями экспрессии iNOS и высвобождения NO, прогрессивно возрастающих в диапазоне патологических состояний от дивертикулеза до SUDD с ранее перенесенным дивертикулитом. Кроме того, в исследовании показан дифференцированный характер ответа слизистой оболочки ободочной кишки у пациентов с указанными заболеваниями на инфекционные раздражители, а также роль пробиотика LCDG в предупреждении данных эффектов.

Оксид азота (NO) является важным медиатором процессов прямого и опосредованного расслабления мышечных волокон стенки кишечника.¹⁷ NO также является важным звеном воспалительных процессов в кишечнике и антибактериального ответа.¹⁸ Данные, полученные в ранее проведенных исследованиях, демонстрируют повышенную выраженность эндогенно NO-опосредованных ответов у пациентов с дивертикулезом¹⁹ и патологической активностью нитрергической системы, а также изменения активности NO-синтазы в кишечнике пациентов с SUDD.^{20,21} Продольные мышечные волокна демонстрируют патологический характер релаксационных ответов на воздействие NO и содержат измененные уровни iNOS у пациентов с неосложненной ДБ.²¹

Тогда как в ранее проведенных исследованиях внимание, как правило, было сосредоточено лишь на однородной выборке пациентов – в большей степени с диагнозом дивертикулеза, чем с SUDD или ранее перенесенным AD, – в нашей первой серии экспериментов мы стремились определить, существует ли корреляция между нарастанием тяжести течения заболевания с повышением уровней экспрессии iNOS и высвобождения NO в слизистой оболочке ободочной кишки у пациентов с различной степенью клинических проявлений ДБ. Полученные данные подтвердили указанную гипотезу, поскольку в биоптатах слизистой оболочки ободочной кишки уровень экспрессии iNOS был приблизительно в 1,5 раза выше, чем у пациентов с дивертикулезом, в 2 раза выше, чем у пациентов с SUDD, и приблизительно в 3 раза выше, чем у пациентов с ранее перенесенным AD, в сравнении с пациентами CTRL-группы. Полученные данные указывают на наличие «воспалительного нитрергического градиента», нарастающего в диапазоне от результатов, полученных у пациентов в CTRL-группы, до результатов, полученных у пациентов с SUDD и SUDD с ранее перенесенным AD. В действительности, известно, что в то время как NO физиологически высвобождается в режиме «по требованию» на короткий период времени после активации конституционально экспрессируемых эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) или нейрональной NO-синтазы (nNOS), экспрессия iNOS индуцируется только после клеточной активации и обеспечивает синтез NO в течение продолжительного времени, в патофизиологическом (воспалительном) контексте.²² Полученные данные согласовываются с данными предыдущих публикаций, в которых показано, что инфильтраты иммунных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки увеличиваются пропорционально тяжести течения заболевания.²³

Наличие воспалительного градиента дополнительно подтверждается данными анализа базального уровня высвобождения цитокинов в слизистой оболочке ободочной кишки пациентов в настоящем исследовании. В действительности, полученные данные демонстрируют общее повышение уровня высвобождения IL-1b, IL-6 и IL-10, коррелирующее с повышением степени тяжести заболевания.

В исследовании также оценивали базальный уровень высвобождения NO в биопсийных образцах ободочной кишки, выявлено, что данный уровень был в 4 раза выше у пациентов с дивертикулезом и SUDD, и в 8 раз выше у пациентов с ранее перенесенным AD, чем у участников CTRL-группы. Различия в уровнях экспрессии iNOS и высвобождения NO в группах пациентов с дивертикулезом и SUDD недостаточно ясны, однако, согласно предположений других авторов, они могут быть обусловлены различиями и изменениями в

механизмах нитрергической нейро-мышечной трансмиссии у пациентов данных двух подгрупп,^{19,21} у которых в синтезе NO могут участвовать и другие синтазы, помимо iNOS и nNOS.

С учетом того, что слизистая оболочка ободочной кишки у участников CTRL-группы и пациентов с ДБ продемонстрировала различия в базальных уровнях экспрессии и высвобождения NO-опосредованных медиаторов, а также с учетом того, что изменения в составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта, согласно гипотезе, влияют на этиологию ДБ,^{24,25} мы задались вопросом, обладает ли слизистая оболочка ободочной кишки в указанной группе пациентов также различной степенью «чувствительностью» к воздействию патогенных и непатогенных бактерий. Установлено, что после провокации патогенными штаммами бактерии EIEC, экспрессия iNOS была достоверно выше, чем на исходном уровне, как в CTRL-группе, так и в группе пациентов с ДБ. И наоборот, при провокации биопсийного материала с использованием пробиотика LCDG не наблюдали какого-либо статистически значимого повышения относительно исходного уровня. С целью определения возможного профилактического или лечебного эффекта пробиотика, к биопсийным образцам соответствующие штаммы добавляли перед добавлением, после добавления и одновременно с добавлением штаммов EIEC. Даже при определенных различиях в выборках пациентов, наличие LCDG блокировало повышение экспрессии iNOS, индуцированное воздействием EIEC. Проведено также исследование интенсивности высвобождения NO, полученные результаты были сопоставимы с результатами, полученными iNOS, с той разницей, что у пациентов с перенесенным ранее AD, EIEC-индуцированное повышение синтеза NO не достигало статистически значимого уровня. Это, вероятно, может быть обусловлено изначально повышенным базальным уровнем NO, не позволяющим оценить какие-либо изменения, индуцированные последующей бактериальной стимуляцией. В совокупности, полученные данные указывают на наличие различной степени реактивности слизистой оболочки кишечника у пациентов с любой степенью тяжести заболевания по отношению к патогенной стимуляции, а также на роль пробиотиков в нейтрализации данных эффектов. Хотя точные механизмы, лежащие в основе данного эффекта пробиотика, не ясны, наблюдения, свидетельствующие о том, что LCDG эффективно снижает уровни EIEC-индуцированной экспрессии iNOS и высвобождения NO, дополнительно подтверждают ранее полученные данные, свидетельствующие о перспективных эффектах применения пробиотиков при ДБ.¹³

В последние годы, результаты различных исследований свидетельствуют о наличии связи между выраженными отклонениями в функциях ENS и EGC и нарушенными паттернами кишечной моторики, лежащими в основе развития ДБ. Пациенты с дивертикулитом демонстрируют снижение плотности EGC и интерстициальных клеток Кахаля, а также уровня иммунореактивности белка S100B в миэнтерических ганглиях.²⁶ Хотя общая плотность глиальных клеток при ДБ снижена, в одном из исследований, проведенном в 2010 году, показано, что в подгруппе миэнтерических ганглиев развиваются бульбарные протрузии, почти полностью состоящие из глиальных клеток,²⁷ однако эти данные о феномене активации EGC до настоящего времени не подтверждены в других исследованиях. Ранее в наших публикациях мы отмечали, что EGC-производный белок S100B, который является основной сигнальной молекулой, участвующей в развитии и прогрессировании воспалительного статуса в кишечнике, обеспечивает регуляцию синтеза NO посредством взаимодействия с iNOS.¹¹ Исходя из этого, проведено исследование роли S100B при ДБ. Данные оценки базального уровня S100B экспрессии не выявили каких-либо статистически значимых различий в CTRL-группе и группах пациентов с ДБ, даже при наличии явной тенденции к снижению экспрессии S100B у пациентов с ранее перенесенным дивертикулитом. В CTRL-группе отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии S100B при стимуляции биопсийных образцов штаммами EIEC, и не отмечалось при стимуляции штаммами LCDG. Штаммы LCDG также проявляли превентивные и лечебные эффекты, поскольку при комбинированной стимуляции

биопсийного материала штаммами EIEC и LCDG, явного EIEC-индуцированного повышения экспрессии S100B не наблюдалось. Напротив, с учетом того, что биоптаты пациентов имели признаки дивертикулита различной степени выраженности, бактериальная стимуляция не сопровождалась каким-либо достоверным воздействием на экспрессию S100B. С учетом данного факта, S100B, по всей видимости, не вовлечен в процессы синтеза NO. Тем не менее, учитывая результаты ранее проведенных исследований,²⁸ участие EGC в развитии данной патологии не может быть ни подтверждено, ни опровергнуто.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что результаты исследования продемонстрировали, что слизистая оболочка ободочной кишки пациентов с морфологическими признаками повреждения на фоне дивертикулеза, SUDD и ранее перенесенного AD характеризуется изначально различными уровнями экспрессии iNOS и высвобождения NO, и что данные уровни возрастают в соответствии с возрастанием степени тяжести заболевания. Показано также, что слизистая оболочка ободочной кишки пациентов с различной степенью выраженности ДБ обладает различной степенью реактивности по отношению к патогенным раздражителям, а также что применение LCDG может быть эффективным в нейтрализации воспалительных эффектов, индуцированных EIEC. Изменения в составе кишечной микрофлоры часто наблюдаются у пациентов с клинически манифестной ДБ;²⁹ с учетом этого факта, коррекция кишечной микрофлоры с применением пробиотиков может оказать благоприятное влияние на течение заболевания. Указанные данные дополнительно подтверждают положительную роль LCDG в контексте воспалительного ответа, описанную в более ранних публикациях.¹⁴

Полученные в настоящем исследовании предварительные данные могут стать основанием для проведения дополнительных исследований, направленных на изучение concept of различной степени реактивности слизистой оболочки кишечника у пациентов с различной степенью клинических проявлений ДБ на воздействие внутриполостных раздражителей, а также на оценку, в рамках крупных когортных исследований, реальной терапевтической эффективности применения пробиотиков с целью профилактики развития дивертикулита. Необходимо также проведение дополнительных исследований с целью оценки взаимосвязи функции клеток EGC и развития ДБ, в целях более глубокого понимания патофизиологических механизмов развития данной патологии и разработки на этой основе инновационных терапевтических подходов.

Официальная информация

Вклад авторов в исследование: F.T. принимал участие в разработке концепции исследования, в проведении экспериментальной части исследования, в сборе, статистическом анализе и интерпретации данных, подготовке проекта и редактировании рукописи публикации; P.A. принимал участие в сборе, статистическом анализе и интерпретации данных, подготовке проекта и редактировании рукописи публикации; I.P. принимал участие в проведении экспериментальной части исследования, в сборе, статистическом анализе и интерпретации данных; F.P.Z. принимал участие в сборе и статистическом анализе данных; M.C. принимал участие в сборе и статистическом анализе данных; W.F. принимал участие в разработке концепции исследования и редактировании рукописи публикации; N.G. принимал участие в заборе биопсийных образцов; G.D.P. принимал участие в заборе биопсийных образцов; G.S. принимал участие в редактировании рукописи публикации; R.C. принимал участие в разработке концепции исследования, в сборе, статистическом анализе и интерпретации данных, подготовке проекта и редактировании рукописи публикации

Заявление о конфликте интересов

W.F. является штатным сотрудником компании «Софар С.п.А.» (Sofar S.p.A.). Остальные авторы публикации заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование исследования

Исследование проведено при финансовой поддержке, полученной в виде гранта от компании «Софар С.п.А.» (Sofar S.p.A.)

Ссылки на литературу

1. Everhart JE and Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology* 2009; 136: 1134–1144.
2. Strate LL, Modi R, Cohen E, et al. Diverticular disease as a chronic illness: Evolving epidemiologic and clinical insights. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1486–1493.
3. Slack WW. The anatomy, pathology, and some clinical features of diverticulitis of the colon. *Br J Surg* 1962; 50: 185–190.
4. Cuomo R, Barbara G, Pace F, et al. Italian consensus conference for colonic diverticulosis and diverticular disease. *United European Gastroenterol J* 2014; 2: 413–442.
5. Weinreich J, Möller SH and Andersen D. Colonic haustral pattern in relation to pressure activity and presence of diverticula. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12: 857–864.
6. Trotman IF and Misiewicz JJ. Sigmoid motility in diverticular disease and the irritable bowel syndrome. *Gut* 1988; 29: 218–222.
7. Ulmer TF, Rosch R, Mossdorf A, et al. Colonic wall changes in patients with diverticular disease—is there a predisposition for a complicated course? *Int J Surg* 2014; 12: 426–431.
8. Zeng MY, Inohara N and Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*. Epub ahead of print 24 August 2016. DOI: 10.1038/mi.2016.75.
9. Cirillo C, Sarnelli G, Turco F, et al. Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: e372–e382.
10. Esposito G, Cirillo C, Sarnelli G, et al. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 918–925.
11. Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, et al. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enterogial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1209–e112.
12. Turco F, Sarnelli G, Cirillo C, et al. Enterogial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* 2014; 63: 105–115.
13. Tursi A, Brandimarte G, Elisei W, et al. Randomised clinical trial: Mesalazine and/or probiotics in maintaining remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease—a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 741–751.
14. D'Inca R, Barollo M, Scarpa M, et al. Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and Toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1178–1187.
15. Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142–201.
16. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, et al. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1246–1252.
17. Burleigh DE. Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* 1992; 102: 679–683.
18. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87–94.
19. Espin F, Rofes L, Ortega O, et al. Nitrogenic neuro-muscular transmission is up-regulated in patients with diverticulosis. *Neurogastroenterol Motility* 2014; 26: 1458–1468.
20. Commane DM, Arasaradnam RP, Mills S, et al. Diet, ageing and genetic factors in the pathogenesis of diverticular disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2479–2488.

21. Golder M, Burleigh DE, Ghali L, et al. Longitudinal muscle shows abnormal relaxation responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease. *Colorectal Dis* 2007; 9: 218–228.
22. Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 2000; 6: 347–373.
23. Tursi A, Brandimarte G, Elisei W, et al. Assessment and grading of mucosal inflammation in colonic diverticular disease. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 699–703.
24. Tursi A. New physiopathological and therapeutic approaches to diverticular disease of the colon. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 299–307.
25. Maconi G, Barbara G, Bosetti C, et al. Treatment of diverticular disease of the colon and prevention of acute diverticulitis: A systematic review. *Dis Colon Rectum* 2011; 54: 1326–1338.
26. Bassotti G, Battaglia E, Bellone G, et al. Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J Clin Pathol* 2005; 58: 973–977.
27. Wedel T, Bussing V, Heinrichs G, et al. Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis. *Neurogastroenterol Motility* 2010; 22: 407–414, e93–e94.
28. Ochoa-Cortes F, Turco F, Linan-Rico A, et al. Entericglial cells: A new frontier in neurogastroenterology and clinical target for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22: 433–449.
29. Spiller RC. Changing views on diverticular disease: Impact of aging, obesity, diet, and microbiota. *Neurogastroenterol Motility* 2015; 27: 305–312.