

Научная статья в открытом доступе

Lactobacillus casei DG и постбиотическое уменьшение воспалительной реакции слизистой оболочки: модель органной культуры *ex-vivo* с признаками постинфекционного синдрома раздраженного кишечника

Debora Compare, Alba Rocco, Pietro Coccoli, Debora Angrisani, Costantino Sgamato, Barbara Iovine, Umberto Salvatore and Gerardo Nardone*

Аннотация

Общая информация: данные о роли микрофлоры в постинфекционном синдроме раздраженного кишечника (ПИ-СРК) являются убедительными. *Lactobacillus spp.* положительно влияют на симптомы СРК, хотя механизмы, посредством которых пробиотики оказывают свое благотворное влияние, в основном неизвестны. Цель исследования – оценить роль *DG Lactobacillus casei (LC-DG)* и их постбиотики в модулировании воспалительного/иммунного ответа при ПИ-СРК на модели органной культуры *ex-vivo*.

Методы: *ex vivo* на культурах слизистой подвздошной кишки и толстой кишки, взятых от 10 пациентов с ПИ-СРК, у которых преобладает диарейный подтип (D), и от 10 здоровых контрольных пациентов, использовали применение липополисахаридов (ЛПС), LC-DG и постбиотики. Уровни мРНК интерлейкинов (ИЛ) -1 α , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени и экспрессии белка Toll-подобного рецептора 4 (*TLR-4*) с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. В начале исследования уровни мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8, а также экспрессия белка TLR-4 были значительно выше, в то время как уровни мРНК ИЛ-10 были ниже при ПИ-СРК, чем в контрольной группе, как в подвздошной кишке, так и в толстой кишке. LC-DG и постбиотики значительно снижали уровни мРНК провоспалительных цитокинов и *TLR-4*, в то время как повышали уровень ИЛ-10 после стимуляции ЛПС. Защитный эффект был более выражен для постбиотиков, чем для лечения LC-DG.

Заключение: LC-DG и его постбиотики ослабляют воспалительный ответ слизистой оболочки модели органной культуры *ex-vivo* ПИ-СРК.

Ключевые слова: постинфекционный синдром раздраженного кишечника, пробиотики, постбиотики.

* Адрес почты: nardone@unina.it
Отделение клинической медицины и хирургии,
гастроэнтерология,
Неаполитанский университет имени Фридриха II, Виа С. Пансини 5,
80131, Неаполь, Италия

Введение

Синдром раздраженного кишечника (СРК) является наиболее распространенным функциональным желудочно-кишечным расстройством, поражающим до 20% населения в Европе и США [1]. СРК не является предрасполагающим фактором для возникновения тяжелых заболеваний, но сильно влияет на качество жизни и несет значительную экономическую нагрузку как на прямые, так и на косвенные расходы во всем мире [2]. В соответствии с преобладающим симптомом СРК подразделяется на СРК с развитием запоров (СРК-С), СРК с диареей (СРК-D), смешанным СРК (СРК-M) и СРК без подтипа (СРК-У) [3]. Желудочно-кишечные расстройства, висцеральная гиперчувствительность, дисфункция оси кишечника и нарушения психосоциального или психосоматического поведения вовлечены в патофизиологию СРК, но точные механизмы остаются в значительной степени неизвестными [4]. В последнее время исследования на тему СРК были сосредоточены на причинных факторах, таких как воспаление слизистой оболочки и местная иммунная активация [5], которые могут быть связаны с нарушениями микрофлоры кишечника. Доказательства того, что кишечные микробы играют роль в патогенезе СРК, убедительны. Избыточный бактериальный рост в тонкой кишке (SIBO) часто выявляется у пациентов с СРК, и симптомы при SIBO в значительной степени совпадают с симптомами СРК [6]. В последнее время качественные изменения кишечной микрофлоры у пациентов с СРК были также выявлены при помощи метагеномных подходов [7]. Исходя из того, что СРК развивается у 30% людей, перенесших острый гастроэнтерит, патогенетическая роль микрофлоры кишечника хорошо обоснована в основном для постинфекционного ПИ-СРК D [8]. Как следствие, воздействие на микрофлору становится привлекательным вариантом лечения этого заболевания [9]. В недавнем систематическом обзоре уделялось особое внимание эффективности *Lactobacillus spp* при СРК, и было обнаружено положительное влияние на облегчение симптомов [10]. Тем не менее, мало исследований посвящено механизмам, посредством которых пробиотики оказывают свое положительное действие. Все данные, в основном полученные с помощью анализа штаммов *Lactobacilli*, подтверждают факт, что положительные эффекты могут зависеть от секретируемых факторов, полученных из пробиотиков, которые недавно были определены как медиаторы постбиотиков [11].

Методы

Целью данного исследования было оценить роль *Lactobacillus casei DG (LC-DG)* и его постбиотиков в модулировании воспалительного иммунного ответа на модели органной культуры *ex-vivo* ПИ-СРК D. 92 пациента с диагнозом ПИ-СРК (поставленный по Римским критериям III для диагностики СРК D), направленных в гастроэнтерологическое отделение Неаполитанского университета имени Фридриха II Неаполя в период с декабря 2014 года по июнь 2015 года, были включены в исследование. В общей сложности 10 из 13 пациентов с СРК (6 мужчин; средний возраст 52 года) приняли участие в исследовании. Пациенты подтвердили дебют СРК после эпизода острого гастроэнтерита с диареей и/или рвотой, по крайней мере, за год до включения в исследование, что соответствовало определению ПИ-СРК [12]. 10 человек для контрольной группы (5 мужчин; средний возраст 48 лет) были отобраны среди тех, кто был направлен на проведение колоноскопии, указанной в рамках скрининга рака прямой кишки (возраст, анемия, положительный результат анализа кала на скрытую кровь, ректальное кровотечение, полипы в анамнезе, наследственный анамнез по колоректальному раку). Критериями включения был возраст ≥ 18 и ≤ 70 лет и нормальные результаты при эндоскопических и

гистологических исследованиях. Наличие любого из следующих критериев исключало пациентов из исследования: выявленные воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, дивертикулез, язвенный колит, ишемический колит, микроскопический колит, целиакия); местная или системная антибиотикотерапия и пробиотическая терапия в течение последнего месяца; прием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), ингибиторов протонного насоса или H₂-антагонистов, антиагрегантов и/или антикоагулянтных препаратов; предполагаемая или установленная беременность или лактация; положительный анализ кала на содержание паразитов; активная злокачественная опухоль любого рода или злокачественные новообразования в анамнезе; клинически значимые заболевания почек, печени; гематологические, сердечные, неврологические, психиатрические, иммунологические, желудочно-кишечные, метаболические или эндокринные заболевания; злоупотребление алкоголем, наркотиками или психотропными препаратами, которые могут влиять на бдительность и физическое восприятие и неспособность соответствовать протоколу. Всем пациентам была проведена илеоколоноскопия с взятием множественных биоптатов подвздошной кишки и левой ободочной кишки как для гистологии, так и для культивирования органов *ex vivo*.

Пробиотический и постбиотический препараты

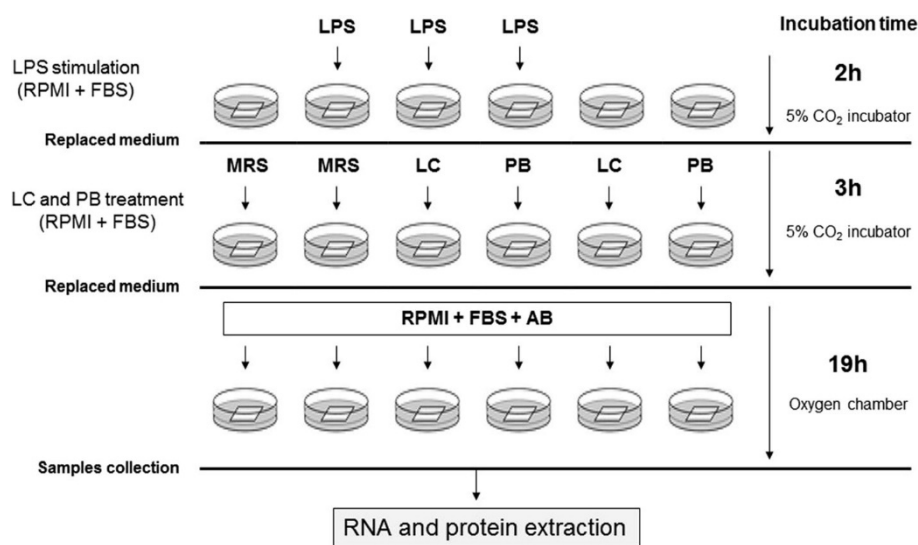
Lactobacillus Casei DG были получены посредством высушивания в компании «СОФАР» (Милан, Италия) и хранились при температуре ниже 25°C до использования. Бактерии в соотношении 1:100 выращивали в бульоне MRS («Биокар Диагностикс» (Biocar Diagnostic), Бове, Седекс, Франция) до OD₆₀₀ = 0,6. Бактериальные культуры высевали для подсчета эффективных колониеобразующих единиц (КОЕ). Кривую роста бактерий оценивали через 24 часа после выращивания при 37°C в обычной среде или в 5% CO₂-инкубаторе для эукариотических клеток или в кислородной камере, которая была заполнена кислородом под давлением. Профиль роста определяли путем расчета удельной скорости роста (μ), которая представляет собой изменение количества клеток в единицу времени $\mu = (OD_1 / OD_2) / (T_2 - T_1)$. Постбиотик был получен центрифугированием при 10000 g в течение 15 минут культуры *LC-DG* в экспоненциальной фазе с эквивалентным количеством КОЕ.

Экспериментальные исследования

Экспериментальные исследования суммированы на рис. 1. Образцы биоптатов слизистой оболочки подвздошной кишки и левой ободочной кишки немедленно помещали на планшеты с культурами (системы культивирования Netwell, [«Костар» (Costar), Кембридж, Массачусетс, США] с ячеистой сеткой 500 мм, с лунками диаметром 15 мм). Культуры помещали в лунки, содержащие 1 мл RPMI-раствор («Гибко Лабораторис» (Gibco Laboratories), Норт-Андовер, Массачусетс, США), 10%ную эмбриональную бычью сыворотку (FBS) («Гибко Лабораторис», Норт-Андовер, Массачусетс, США), с 100 мкг/мл липополисахаридов (ЛПС) или без них («Сигма-Олдрич» (Sigma-Aldrich), Милан, Италия) и без антибиотиков в течение 2 ч при 37°C в 5% -ном инкубаторе с диоксидом углерода. Затем среду заменяли на 10% FBS, содержащую *LC-DG* (1×10^7 КОЕ) или постбиотики или равный объем неферментированной бактериальной MRS-среды в качестве контроля. Через 2 часа при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе среду удаляли и заменяли RPMI с 10% FBS, содержащим 3% пенициллина/стрептомицина («Гибко Лабораторис», Норт-Андовер, Массачусетс, США) и 50 мкг/мл гентамицина. Затем ткани переносили в кислородную камеру при 37°C, которая была заполнена кислородом под давлением («ВиталЭйре» (VitalAire), Милан, Италия), на оставшиеся 19 ч культивирования.

Контрольные образцы обрабатывали аналогичным образом без добавления ЛПС, *LC-DG* или постбиотиков.

Рисунок 1. Схема экспериментальных исследований



LPS stimulation (RPMI + FBS) – стимуляция ЛПС (RPMI + FBS)

Samples collection – замещенная среда

LC and PB treatment (RPMI + FBS) – лечение LC и постбиотиками (RPMI + FBS)

Samples collection – отбор образцов

Incubation time – период выращивания

5% CO₂ incubator – 5% CO₂-инкубатор

Oxygen chamber – кислородная камера

2h, 3h, 19h – 2 часа, 3 часа, 19 часов

RNA and protein extraction – извлечение РНК и белков

Препараты из выделенных РНК и белков

Препараты из выделенных РНК и белков приготовлены из биоптата кишечника с использованием реагента TRIzol («Лайф Текнолоджи» (Life Technology), Карлсбад, Калифорния, США). Каждый биоптат помещали в 200 мкл реагента TRIzol и гомогенизировали с использованием стеклянного тefлона. После гомогенизации образцы центрифугировали при 12000 г в течение 10 минут при 4 °С, а водную фазу, содержащую РНК, и органическую фазу, содержащую белки, обрабатывали отдельно в соответствии с протоколом данных. Общее количество и качество РНК оценивали с помощью нанодропа РНК и выделяли на денатурирующем агарозном геле. РНК хранили при -80 °С до использования в реальном времени.

ПЦР в режиме реального времени

1 мкг суммарной РНК использовали для синтеза сДНК в соответствии с протоколом набора iScript cDNA Synthesis («Био-Рад Лабораторис» (Bio-Rad Laboratories), Геркулес,

Калифорния, США). Затем сДНК амплифицировали в системе обнаружения PCR iCycler iQ в реальном времени («Био-Рад Лабораторис», Геркулес, Калифорния, США) с использованием iTM SYBR Green Supermix («Био-Рад Лабораторис», Геркулес, Калифорния, США). Проводили реакции ПЦР в реальном времени и относительную экспрессию генов количественного определения [13]. Каждый эксперимент проводился в трех экземплярах. Относительную количественную оценку экспрессии генов проводили с использованием метода 2- $\Delta\Delta$ CT. Последовательности праймеров анализируемых интерлейкинов (ИЛ) приведены в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры, используемые для ПЦР в режиме реального времени

ИЛ-1 α	F:5'-CGCCAATGACTCAGAGGAAGA-3' R:5'-AGGGCGTCATTCAGGATGAA-3'
ИЛ-6	F:5'-TACCCCAGGAGAAGATTCC-3' R:5'-GCCATCTTTGGAAGGTTTCAG-3'
ИЛ-8	F:5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC R:5'-ATGGTTCCTCCGTTCCGGTGGT-3'
ИЛ-10	F:5'-GAACCAAGACCCAGACATC-3' R:5'-CATCTTCTTCACCTGCTCCAC-3'

Вестерн-блоттинг

Концентрацию белка определяли с помощью материалов компании «Био-Рад» (Bio-Rad) («Био-Рад Лабораторис», Геркулес, Калифорния, США) и 20 мкг разбавляли загрузочным буфером и нагревали до 95°C в течение 10 минут. Затем белковые лизаты помещали в 10% гель SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF (MILLIPORE). Мембраны исследовали в течение ночи при 4°C с кроличьими анти-TLR4 (1: 1000; «Новус» (Novus), Литлтон, Колорадо, США) и кроличьими анти- α -актиновыми (1: 1000; компания («Санта Круз Биотехнологии» (Santa Cruz Biotechnology), Даллас, Техас) антителами. Каждое исследование проводилось в трех экземплярах. Сигналы были обнаружены после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой кролика (1:5000; («Санта Круз Биотехнологии», Даллас, Техас, США), с использованием набора ECL («Адванста» (Advansta), Менло-Парк, Калифорния, США). Плотность полос оценивали с использованием программного обеспечения Image J 1,40 г.

Статистический анализ

Все собранные данные были обобщены отдельно для каждого пациента во всех экспериментальных исследованиях и выражены как среднее \pm стандартное отклонение. Для сравнения показателей были использованы U-критерий Манна – Уитни и монофакторный анализ ANOVA. Значение $p < 0,05$ было установлено в качестве уровня значимости. Статистический анализ был выполнен с помощью SPSS для Windows (версия 19.0; «АйБиЭм Корпорейшн» (IBM Corporation), Нью-Йорк, США). Prism для Windows 5 (версия 5.02; «ГрафПад Софтвэйр» (GraphPad Software), Ла-Холья, Калифорния, США) и использовался для графического представления.

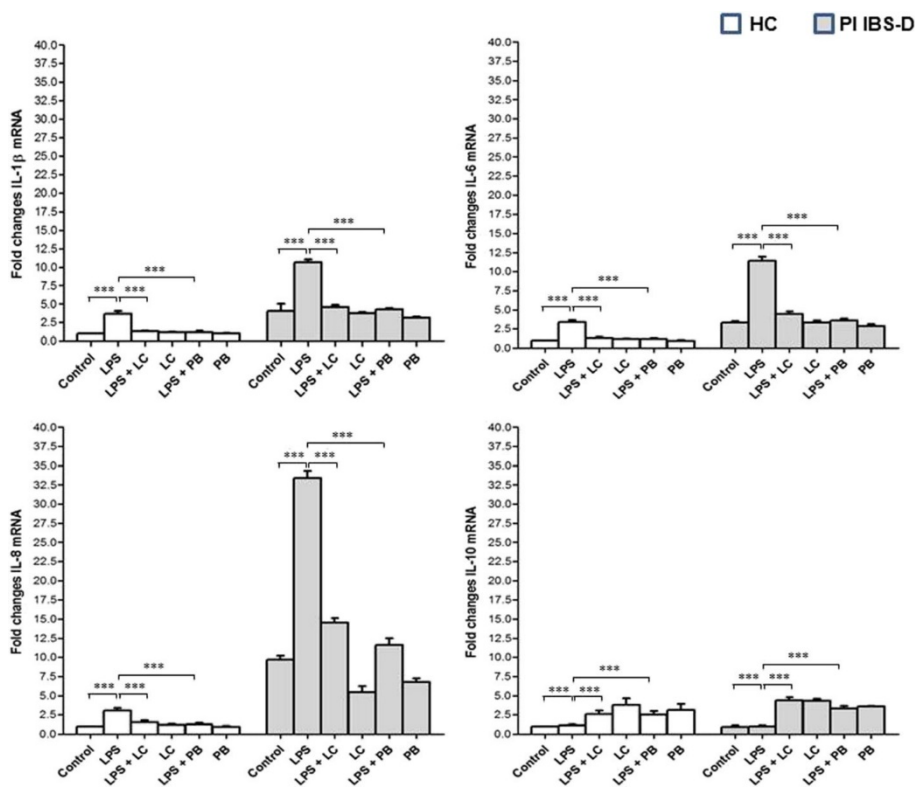
Результаты

Влияние LC-DG и пробиотиков на уровни мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10

В начале исследования уровни мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 были выше, в то время как уровни мРНК ИЛ-10 были ниже при ПИ-СРК D, чем в контрольной группе, независимо от отдела кишечника, где исследовали слизистую (рисунки 2 и 3). Примечательно, что у пациентов с ПИ-СРК D уровни мРНК ИЛ-6 были выше в толстой кишке, чем в слизистой оболочке подвздошной кишки, в то время как уровни мРНК ИЛ-8 были выше в подвздошной кишке, чем в слизистой оболочке толстой кишки. Стимуляция слизистой оболочки кишечника с помощью 100 мкг/мл ЛПС значительно увеличивала уровни мРНК всех цитокинов относительно исходного уровня как у пациентов контрольной группы, так и у пациентов с ПИ-СРК D (рисунки 2 и 3). Однако величина воспалительного ответа слизистой оболочки кишечника, то есть разница между уровнями мРНК, индуцированной ЛПС, и исходными значениями, была выше у пациентов с СРК, чем в контрольной группе, как в слизистой оболочке подвздошной кишки, так и толстой кишки (ИЛ-1 α $p < 0,0001$, ИЛ-6 $p < 0,0001$ и ИЛ-8 $p < 0,0001$). Напротив, величина противовоспалительного ответа существенно не различалась между группой с ПИ-СРК D и контрольной группой, независимо от участка слизистой оболочки.

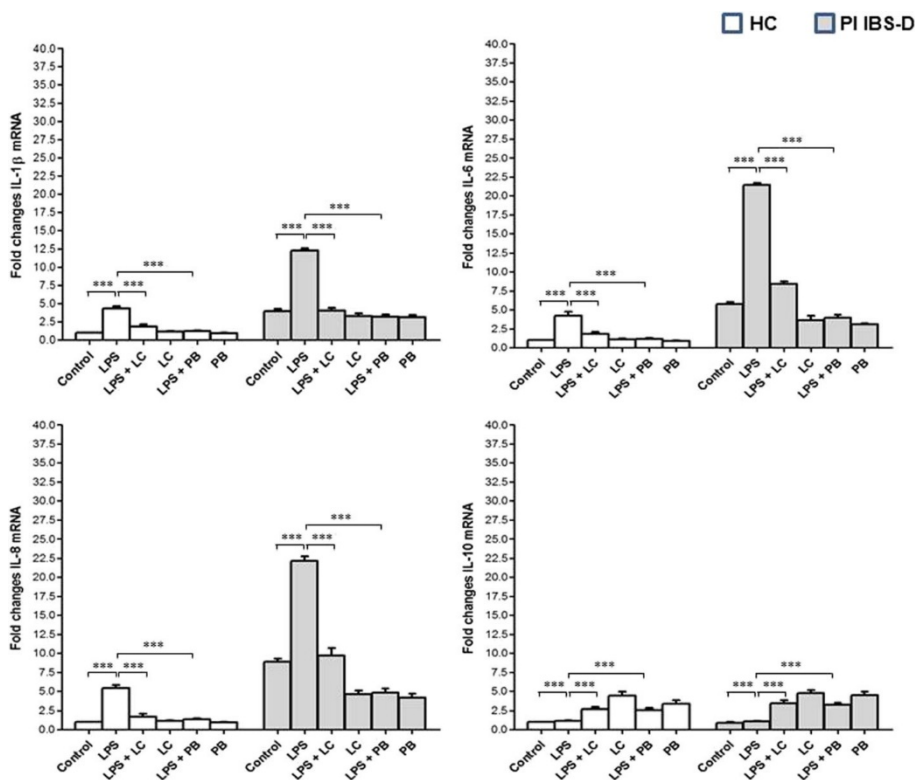
При ПИ-СРК D лечение толстой кишки с помощью LC-DG значительно снижало уровни всех провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α $p < 0,002$, ИЛ-6 $p < 0,0001$ и ИЛ-8 $p < 0,0001$) по отношению к исходному уровню. Лечение LC-DG было подвздошной кишки было эффективным в снижении уровней мРНК ИЛ-1 α и ИЛ-8 ($p < 0,0002$ и $p < 0,0001$ соответственно), но не влияло на уровни мРНК ИЛ-6. Терапия LC-DG значительно увеличила уровни м-РНК ИЛ-10 как в слизистой оболочке толстой кишки, так и в подвздошной кишке ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$ соответственно). Аналогичным образом, лечение постбиотиками было эффективным в отношении снижения уровней мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 как в толстой кишке ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ и $p < 0,0001$ соответственно), так и в подвздошной ($p < 0,0001$, $p < 0,0006$ и $p < 0,0001$ соответственно). Напротив, уровни м-РНК ИЛ-10 значительно увеличились как в слизистой оболочке подвздошной кишки, так и в слизистой оболочке толстой кишки ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$ соответственно). Защитное действие LC-DG и постбиотиков не было подкреплено предварительной обработкой ЛПС. Интересно, что эффект был более выраженным при лечении постбиотиками, чем LC-DG во всех случаях.

Рисунок 2. Кратные изменения уровней мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 в слизистой оболочке подвздошной кишки пациентов с СРК D и в контрольной группе. Исходные уровни мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 выше, а уровни мРНК ИЛ-10 ниже у пациентов с ПИ-СРК D, чем у пациентов из контрольной группы. Стимуляция слизистой оболочки кишечника с помощью 100 мкг/мл ЛПС значительно увеличивает уровни мРНК всех цитокинов относительно исходного уровня как у пациентов контрольной группы, так и у пациентов с ПИ-СРК D. Напротив, применение ЛПС не влияло на уровни мРНК ИЛ-10 как в контрольной группе, так и при СРК D. Терапия LC-DG была эффективной по отношению к снижению уровней мРНК ИЛ-1 α и ИЛ-8 и повышению уровней мРНК ИЛ-10. Лечение постбиотиками было эффективным по отношению к снижению уровней мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 и повышению уровней мРНК ИЛ-10. *** $p < 0,0001$. HC: контрольная группа; ПИ-СРК D (PIBS-D): постинфекционный синдром раздраженного кишечника подтип D; ЛПС: липополисахарид; LC: Lactobacillus Casei DG; PB: постбиотик



Foldchanges – кратные изменения

Рисунок 3. Кратные изменения уровней мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 в слизистой оболочке левой ободочной кишки пациентов с СРК D и в контрольной группе. Исходные уровни мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 были выше, а уровни мРНК ИЛ-10 были ниже у пациентов с ПИ-СРК D, чем у пациентов из контрольной группы. Стимуляция слизистой оболочки кишечника с помощью 100 мкг/мл ЛПС значительно увеличивает уровни мРНК всех цитокинов относительно исходного уровня как у пациентов контрольной группы, так и у пациентов с ПИ-СРК D. Напротив, лечение ЛПС не влияло на уровни мРНК ИЛ-10 как в контрольной группе, так и при СРК D. Терапия LC-DG и постбиотиками была эффективной по отношению к снижению уровней мРНК ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8 и повышению уровней мРНК ИЛ-10. *** p < 0,0001. HC: контрольная группа; ПИ-СРК D (PIBS-D): постинфекционный синдром раздраженного кишечника подтип D; ЛПС: липополисахарид; LC: Lactobacillus Casei DG; PB: постбиотик

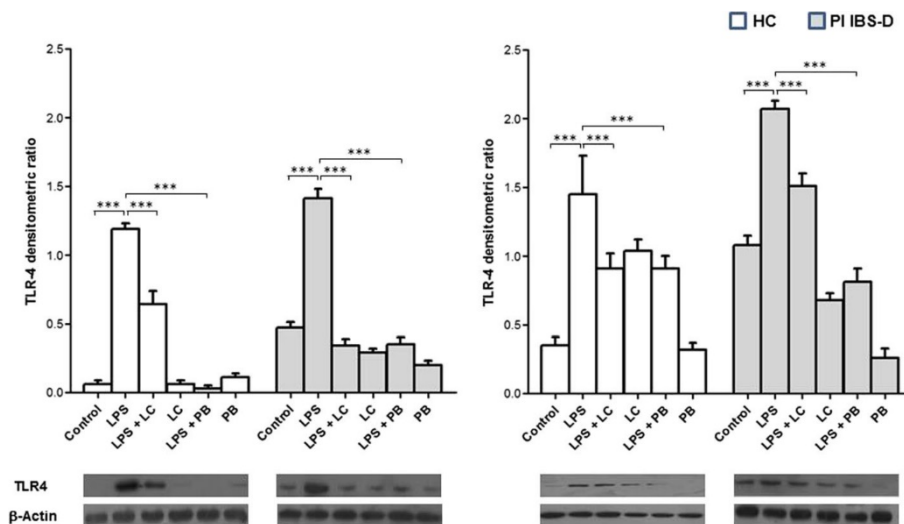


Влияние LC-DG и постбиотиков на биосинтез белка TLR-4 после стимуляции ЛПС

В начале исследования скорость биосинтеза белка TLR-4 был значительно выше у пациентов с ПИ-СРК D по сравнению с контрольной группой как на слизистой оболочке подвздошной кишки, так и на слизистой оболочке толстой кишки. Точнее, скорость была в 7,4 раза выше в слизистой оболочке подвздошной кишки ($p < 0,0001$) и в 3 раза выше в слизистой оболочке толстой кишки ($p < 0,001$) у пациентов с ПИ-СРК D по сравнению с контрольной группой. Стимуляция ЛПС значительно улучшала биосинтез белка TLR-4 как у пациентов контрольной группы, так и у пациентов с СРК D ($p < 0,0001$) с более выраженным эффектом в слизистой оболочке толстой кишки. Синтез белка был ослаблен лечением LC-DG и постбиотиками как у пациентов в контрольной группе, так и у пациентов с СРК D ($p < 0,0001$). Интересно, что защитный эффект был более выражен на слизистой оболочке подвздошной кишки, чем толстой кишки (рисунок 4).

Рисунок 4. Биосинтез белка TLR-4 в слизистой оболочке подвздошной кишки и левой ободочной кишки пациентов контрольной группы и с СРК D. Исходные уровни белка TLR-4 были выше у пациентов с ПИ-СРК D по сравнению с контрольной группой как на слизистой оболочке подвздошной кишки, так и на слизистой оболочке толстой кишки. Стимуляция слизистой оболочки кишечника ЛПС 100 мкг/мл увеличивала скорость биосинтеза белка TLR-4 как у пациентов в контрольной группе, так и у пациентов с

СРК D с более выраженным эффектом в слизистой оболочке толстой кишки. Терапия *LC-DG* и постбиотиками снижала скорость биосинтеза белка TLR-4 как у пациентов контрольной группы, так и у пациентов с СРК D, особенно в слизистой оболочке подвздошной кишки. *** $p < 0,0001$. . HC: контрольная группа; ПИ-СРК D (PIBS-D): постинфекционный синдром раздраженного кишечника подтип D; ЛПС: липополисахарид; LC: *Lactobacillus Casei DG*; PB: постбиотик



Обсуждение

В нашем исследовании основная экспрессия провоспалительных цитокинов, а именно ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ИЛ-8, была значительно выше, а экспрессия ИЛ-10 значительно ниже в слизистой оболочке кишечника пациентов с ПИ-СРК D в сравнении контрольной группой.

Повышенное количество лимфоцитов в собственной пластинке кишечника и уровней мРНК провоспалительных цитокинов с параллельным снижением уровней мРНК противовоспалительных цитокинов было описано в слизистой оболочке толстой кишки при ПИ-СРК [14 15].

Кроме того, у пациентов с ПИ-СРК наблюдалась повышенная экспрессия мРНК ИЛ-1 α в терминальном отделе подвздошной кишки и слизистой оболочке прямой кишки [16]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что иммунная дисфункция и нарушение регуляции нейроиммунных взаимодействий могут являться факторами предрасположенности к развитию СРК [8]. На основе этой патофизиологической модели возникает инфекция, которая будет вызывать постоянные нарушения кишечной микрофлоры с чрезмерным ростом патогенных микроорганизмов и заметным сокращением бактериального разнообразия. Нарушение микробной экологии может быть причиной «хронического воспаления слабой степени» слизистой оболочки кишечника, которое обычно наблюдается у пациентов с СРК. Кроме того, измененное взаимодействие между хозяином и микрофлорой может также способствовать патофизиологии СРК.

TLR представляют собой первую линию защиты хозяина от патогенных микроорганизмов путем активации ответов в клетках врожденной иммунной системы [17]. Brint и соавт. впервые сообщили о 4-х-кратном увеличении экспрессии мРНК TLR-4 в слизистой оболочке прямой кишки пациентов с СРК по сравнению с контрольной группой [18]. Тем не менее, в этом исследовании не были рассмотрены праваяободочная кишка и слизистая оболочка терминального отдела подвздошной кишки, места наиболее высоких

концентраций бактерий, и где происходит большинство иммунологических реакций. Более того, даже если ПИ-СРК может представлять наиболее релевантный подтип для оценки экспрессии TLR, из-за инфекционного происхождения, эта подгруппа пациентов была исключена из исследования. В нашем исследовании скорость биосинтеза белка TLR-4 была значительно выше у пациентов с ПИ-СРК D по сравнению с контрольной группой, как на слизистой оболочке подвздошной кишки, так и на слизистой оболочке толстой кишки. Интересно, что хотя в контрольной группе скорость биосинтеза белка TLR-4 существенно не различалась между слизистой оболочкой подвздошной кишки и толстой кишки, у пациентов с ПИ-СРК D мы обнаружили значительное повышение в слизистой оболочке подвздошной кишки.

Наши данные соответствуют как основополагающим, так и клиническим данным о причинной роли дисбактериоза кишечника в патогенезе СРК, что подтверждает идею о том, что модуляция кишечной микрофлоры может быть привлекательным вариантом лечения этого заболевания. Рандомизированные контролируемые исследования показали, что пробиотики эффективны при модулировании симптомов заболевания у пациентов с СРК [19–24]. Тем не менее, большинство исследований было выполнено для неспецифического СРК, а не для ПИ-СРК D, так что точная роль пробиотиков в ведении этих пациентов еще предстоит выяснить. Кроме того, природа симптомов, используемых в качестве суррогатных конечных точек в клинических исследованиях, не доказывает «противовоспалительный» эффект пробиотиков при СРК. С другой стороны, оценка влияния пробиотиков на слизистую оболочку кишечника требует повторных эндоскопических исследований с обширным отбором биоптатов, что невозможно из-за приемлемости пациентов и этических соображений. Действие пробиотиков было изучено на изолированных клетках и клеточных линиях, клеточных культурах и мышинных моделях [25–27]. Эти модели не совсем точно передают уникальную микросреду кишечника, поскольку во всех из них отсутствуют важные для человека компоненты, такие как слизь и микрофлора [27]. Поэтому разработка модельной системы, которая напоминает кишечник человека, имеет большое значение для тестирования действия пробиотиков как на здоровые, так и на пораженные ткани. Использование полных жизнеспособных образцов биоптата кишечника человека в культуре является идеальной моделью, особенно для анализа биологических явлений, происходящих в течение первых 24–48 ч, после которых эпителий в биоптатах становится нежизнеспособным [11]. Используя такую модель, мы проанализировали влияние пробиотического штамма *LC-DG* на слизистую оболочку подвздошной кишки и толстой кишки пациентов с ПИ-СРК D. Штамм, который мы использовали в экспериментах, был выбран на основании его человеческого происхождения, непатогенности, устойчивости к кишечной кислоте и желчи, способности адгезировать к эпителиальным клеткам человека и колонизации желудочно-кишечного тракта человека. В нескольких исследованиях было обнаружено уменьшение количества *Lactobacilli spp.* в фекалиях и слизистой оболочке у пациентов с СРК [28–30], в то время как интервенционные испытания продемонстрировали способность *Lactobacilli* улучшать симптомы и модулировать воспалительный ответ у этих пациентов [10]. Однако, насколько нам известно, отсутствуют точные данные о влиянии *LC-DG* на воспалительную реакцию слизистой оболочки. В нашем исследовании мы продемонстрировали, что лечение с помощью *LC-DG* на примере биоптата слизистой кишечника значительно снижало уровни мРНК всех провоспалительных цитокинов, а также биосинтез белка TLR-4, в то время как повышало уровни мРНК противовоспалительного ИЛ-10 в слизистой оболочке подвздошной кишки и толстой кишки пациентов с ПИ-СРК D. Интересно, что предварительная обработка ЛПС не влияла на противовоспалительное действие *LC-DG*.

Пробиотики действуют через молекулярные и клеточные механизмы, которые контрастируют с адгезией патогенных бактерий, усиливают врожденный иммунитет, уменьшают вызванное микроорганизмами воспаление и способствуют сохранению кишечных эпителиальных клеток, барьерной функции и защитным реакциям. Тем не менее, постбиотики, полученные из *Lactobacilli*, по-видимому, улучшают положительный эффект пробиотиков [11]. Интересно, что в нашем исследовании модулирующее влияние на воспалительный ответ слизистой оболочки кишечника было еще более успешным, когда мы использовали постбиотик, полученный из культур *LC-DG*.

Мы понимаем, что относительно небольшое количество пациентов, включенных в наше исследование, не позволяет нам обобщать наши результаты. Однако сильными сторонами нашего исследования являются строгий отбор пациентов, использованная нами модель органной культуры *ex vivo*, отбор слизистой оболочки подвздошной и левой ободочной кишки и анализ влияния пробиотического штамма *LC-DG* и его постбиотиков на воспалительную реакцию слизистой оболочки кишечника.

Выводы

LC-DG и его постбиотики ослабляют воспалительный ответ слизистой оболочки на примере модели органной культуры *ex-vivo* ПИ-СРК D. Эти данные обеспечивают биологическую достоверность терапевтической эффективности этого пробиотического штамма в клинических условиях. Хорошо разработанные клинические исследования помогают подтвердить терапевтическую эффективность *LC-DG* и его постбиотиков для пациентов.

Сокращения

FBS: фетальная бычья сыворотка; СРК: синдром раздраженного кишечника; СРК С: синдром раздраженного кишечника с преобладанием запоров; СРК D: синдром раздраженного кишечника с преобладанием диарей; СРК М: синдром смешанного раздраженного кишечника; СРК U: синдром раздраженного кишечника без подтипа; ИЛ: интерлейкин; LC-DG: *Lactobacillus casei* DG; ЛПС: липополисахариды; ПИ-СРК D: постинфекционный синдром раздраженного кишечника с преобладанием диарей; ПИ-СРК: постинфекционный синдром раздраженного кишечника; SIBO: избыточный бактериальный рост в тонкой кишке; TLR: Toll-подобные рецепторы

Список благодарностей

Не предусмотрен

Финансирование

«Софар С.п.А.» (SOFAR S.p.A.)

Доступность данных и материалов

Набор данных, сгенерированный в ходе настоящего исследования, доступен по обоснованному запросу автора (проф. G. Nardone).

Вклад авторов

ДСИ Изучение концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, составление рукописи, статистический анализ. AR Изучение концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, составление рукописи, статистический анализ. PC Подбор пациентов, сбор данных и составление рукописи. DA Подбор пациентов, сбор данных и составление рукописи. CS Подбор пациентов, сбор данных и составление рукописи. VI

Compareetal. BMC Gastroenterology (2017) 17:53

Экспериментальные процедуры и анализ и интерпретация данных. US Экспериментальные исследования и анализ и интерпретация данных. GN Критика рукописи, составление рукописи, авторское наблюдение. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант этой рукописи.

Конфликт интересов

GN получил финансирование от «Софар С.п.А.» на проведение экспериментов в исследовании.

Согласие на публикацию

Не предусмотрено

Одобрение этическим комитетом и согласие на участие

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом «Карло Романо» Неаполитанского университета имени Фридриха II (протокол № 150/13). Письменное информированное согласие было получено от всех участников.

Примечание издателя

«Шпрингер Нэйчер» (Springer Nature) остается нейтральным в отношении правообладания, указанного на опубликованных картах и в сведениях об авторах.

Получено: 9 ноября 2016 г. Принято к печати: 28 марта 2017 г. Опубликовано: 14 апреля 2017 г.

Список литературы

1. Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:712–721.e4.
2. Canavan C, West J, Card T. Review article: the economic impact of the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40:1023–34.
3. Shih DQ, Kwan LY. All roads lead to Rome: update on Rome III criteria and new treatment options. *Gastroenterol Rep*. 2007;1:56–65.
4. Chey WD, Kurlander J, Eswaran S. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *JAMA*. 2015;313:949–58.
5. Dupont HL. Review article: evidence for the role of gut microbiota in irritable bowel syndrome and its potential influence on therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:1033–42.
6. Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, Moayyedi P. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:1279–86.
7. Collins SM. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:497–505.
8. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2009;136:1979–88.
9. Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, Fiorucci S. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016;22:2219–41.
10. Tiequn B, Guanqun C, Shuo Z. Therapeutic effects of Lactobacillus in treating irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Intern Med*. 2015;54:243–9.
11. Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, et al. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*. 2012;61:1007–15.
12. Spiller RC. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:641–61.
13. Iovine B, Nino M, Irace C, et al. Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts *in vitro*. *Biochimie*. 2009;91:364–72.
14. Sundin J, Rangel I, Fuentes S, et al. Altered faecal and mucosal microbial composition in post-infectious irritable bowel syndrome patients correlates with mucosal lymphocyte phenotypes and psychological distress. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41:342–51.
15. Sundin J, Rangel I, Repsilber D, Brummer RJ. Cytokine response after stimulation with key commensal bacteria differ in post-Infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS) patients compared to healthy controls. *PLoS One*. 2015;10:e0134836.
16. Gwee KA, Collins SM, Read NW, et al. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut*. 2003;52:523–6.
17. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373–84.
18. Brint EK, MacSharry J, Fanning A, et al. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:329–36.
19. Stevenson C, Blaauw R, Fredericks E, et al. Randomized clinical trial: effect of Lactobacillus plantarum 299 v on symptoms of irritable bowel syndrome. *Nutrition*. 2014;30:1151–7.
20. Sisson G, Ayis S, Sherwood RA, Bjarnason I. Randomised clinical trial: a liquid multi-strain probiotic vs. placebo in the irritable bowel syndrome—a 12 week double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40:51–62.
21. Ludidi S, Jonkers DM, Koning CJ, et al. Randomized clinical trial on the effect of a multispecies probiotic on visceroperception in hypersensitive IBS patients. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26:705–14.

22. Begtrup LM, de Muckadell OB, Kjeldsen J, et al. Long-term treatment with probiotics in primary care patients with irritable bowel syndrome- a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48:1127–35.
23. Yoon JS, Sohn W, Lee OY, et al. Effect of multispecies probiotics on irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29:52–9.
24. Fong FL, Shah NP, Kirjavainen P, El-Nezami H. Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen- presenting cells. *Int Rev Immunol.* 2015;25:1–11.
25. Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, et al. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *J Immunol Res.* 2015;2015:501361.
26. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31:153–8.
27. Tsilingiri K, Rescigno M. Should probiotics be tested on ex vivo organ culture models? *Gut Microbes.* 2012;3:442–8.
28. Shukla R, Ghoshal U, Dhole TN, Ghoshal UC. Fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls using real- time polymerase chain reaction: an evidence of dysbiosis. *Dig Dis Sci.* 2015;60:2953–62.
29. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut.* 2012;61:997–1006.
30. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, et al. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22:512–9.