

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Изменение состава микрофлоры и экспрессии толл-подобных рецепторов в слизистой оболочке толстого кишечника при ректальном пути введения *Lactobacillus casei* DG у пациентов с язвенным колитом легкой степени

**Renata D’Inca • Michela Barollo • Marco Scarpa •
Alessia Rosaria Grillo • Paola Brun • Maria Grazia Vettorato •
Ignazio Castagliuolo • Giacomo Carlo Sturniolo**

Статья поступила: 22 декабря 2009 г./ Принята к печати: 29 июля 2010 г./ Опубликована онлайн: 25 августа 2010 г.

© «Шпрингер Сайенс + Бизнес Медиа, ЛЛС» (Springer Science+Business Media, LLC). 2010 г.

Аннотация

Общая информация Дисбаланс кишечной микробиоты, по-видимому, способствует развитию хронических воспалительных расстройств желудочно-кишечного тракта, таких как язвенный колит (UC). Несмотря на имеющееся предположение о том, что биодобавка в виде пробиотика является эффективным подходом к лечению колита, её влияние на кишечную микрофлору и баланс цитокинов слизистой оболочки до сих пор не было исследовано.

Цель Оценить влияние *Lactobacillus casei* (*L. casei*) DG, – пробиотического штамма, на микробиоту, связанную со слизистой оболочкой толстого кишечника, баланс цитокинов и экспрессию толл-подобных рецепторов (TLR).

Методы Двадцать шесть пациентов с левосторонним язвенным колитом легкой степени были распределены случайным образом в одну из трех групп для 8-недельного периода лечения: Первая группа, состоящая из 7 пациентов, получала перорально только одну 5-аминосалициловую кислоту (5-ASA), вторая группа (8 пациентов) получала перорально 5-ASA плюс перорально *L. casei* DG, и третья группа (11 пациентов) получала перорально 5-ASA и ректально *L. casei* DG. Образцы биопсии были взяты из области сигмовидной кишки для культивирования микроорганизмов, связанных со слизистой оболочкой и оценки уровней цитокинов и матричной РНК (мРНК) рецепторов TLR, определяемых с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR).

R. D’Inca _ M. Barollo _ M. G. Vettorato _ G. C. Sturniolo
Кафедра хирургических и гастроэнтерологических исследований,
Падуанский университет, Падуя, Италия

A. R. Grillo _ P. Brun _ I. Castagliuolo (&)
Кафедра гистологии, микробиологии и медицинских биотехнологий,
Падуанский университет, виа Габелли,
63, 35121 Падуя, Италия
e-mail: ignazio.castagliuolo@unipd.it

M. Scarpa
Департамент онкохирургии,
Онкологический центр Венето, Падуя, Италия

Результаты Прием 5-ASA отдельно или вместе с пероральным введением *L. casei* DG не смогли статистически достоверно повлиять на микрофлору толстого кишечника и экспрессию TLR, но такое достоверное влияние имело место при сочетании 5-ASA с ректальным введением *L. casei* DG. Изменение микробиоты толстого кишечника происходило за счет увеличения числа *Lactobacillus spp.* и уменьшения числа *Enterobacteriaceae*. Уровни мРНК рецепторов TLR-4 и интерлейкина (IL) 1- β были также достоверно снижены наряду с достоверным увеличением уровня IL-10 в слизистой оболочке.

Выводы Непосредственное воздействие *L. casei* DG на микробиоту слизистой оболочки и влияние на иммунную систему этой оболочки, по-видимому, необходимо как связующее звено в развитии положительного эффекта пробиотика у пациентов с язвенным колитом.

Ключевые слова *Lactobacilli* (*Лактобактерии*). Клизма. Язвенный колит. Толл-подобный рецептор

Введение

Растущее количество экспериментальных данных подтверждает гипотезу о том, что кишечная микробиота заметно влияет на функцию слизистой оболочки кишечника и лимфоидную ткань, связанную с этой оболочкой [1]. Потенциально, кишечная микробиота может повредить слизистую оболочку либо путем непосредственного высвобождения токсинов, либо косвенно, вызывая нежелательные иммунные реакции. Таким образом, изменения в микробиоте слизистой оболочки кишечника, были связаны с различными воспалительными нарушениями [2]. С другой стороны, микрофлора, растущая на слизистой поверхности, выполняет полезную трофическую, иммуномодулирующую, и противовоспалительную функцию [1, 2]. Принято считать, что воздействие на кишечную микробиоту путем диетического добавления живых бактерий, то есть пробиотиков, влияет на иммунную систему организма хозяина. Это широко используют для профилактики и лечения различных воспалительных нарушений кишечника, в том числе воспалительных заболеваний кишечника (IBD) и резервуарного илеита [3, 4].

Влияние пробиотиков на иммунную систему слизистой оболочки может быть косвенным, что обусловлено микробиологической окружающей средой, или прямым в результате затрагивания активности иммунных и неиммунных клеток слизистой оболочки [1, 5]. Хорошо известно, что растворимые факторы, полученные из бактерий, находящихся в просвете кишечника, могут влиять на физиологическую активность слизистой оболочки кишечника [6–8]. Полученные из бактерий короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) могут, таким образом, влиять на активность транскрипционных факторов, регулирующих пролиферацию клеток. Более того, недавно мы сообщали, что пероксид водорода (H₂O₂), продуцируемый бактериями, действует как сигнальная молекула, инициирующая деятельность активируемого пероксисомами рецептора (PPAR)- γ в эпителиальных клетках толстого кишечника [6–9]. Иммунные и неиммунные клетки в слизистой оболочке кишечника различают консервативные микробиологические структуры через, так называемые, образ-распознающие рецепторы (PRR), включая толл-подобные рецепторы (TLR) и изоформы нуклеотид-связывающих доменов олигомеризации (NOD) [10]. Стимуляция этих рецепторов запускает сложные сигнальные каскадные пути, ведущие к выбросу иммуномодулирующих цитокинов, которые заметно влияют на реактивность иммунных клеток. Поскольку комменсальные бактерии отличаются по их способности стимулировать рецепторы TLR, цитокиновая картина значительно различается после стимуляции указанных рецепторов, а разные бактериальные колонии могут способствовать появлению отчетливых воспалительных или противовоспалительных реакций [11, 12].

Действительно, стимуляция рецепторов TLR4 липополисахаридом (LPS) опосредует секрецию цитокинов Th1-типа, в то время как стимуляция рецепторов TLR2 фрагментами пептидогликана и липотейхоевых кислот повышает барьерную функцию кишечного эпителия и высвобождение цитокинов Th2-типа [13–15]. Таким образом, повышающая регуляция рецепторов TLR4, наблюдаемая у пациентов с IBD, способствует, по-видимому, росту чувствительности слизистой оболочки к провоспалительным эффектам бактериальных эндотоксинов, в то время как лиганды рецепторов TLR2 могут способствовать сохранению целостности слизистой оболочки [16, 17].

Как и другие исследователи, мы сообщали, что введение пробиотиков мышам с искусственным колитом, вызванным декстраном сульфата натрия (DSS), снижает тяжесть поражения только в том случае, если терапию назначали до начала воспалительного процесса. Это наводит на предположение, что противовоспалительное действие такой терапии связано с изменениями в чувствительности иммунной системы слизистой оболочки (MALT) к бактериальным продуктам [14, 18, 19]. Действительно, пероральная добавка, содержащая *L. crispatus* M247, модифицирует микробиоту толстого кишечника и повышает уровень рецепторов TLR2, и одновременно снижает экспрессию рецепторов TLR4 в слизистой оболочке толстой кишки *in vivo*. Более того, вызванное пробиотиками подавление уровня TLR4 в эпителиальных клетках, сопровождается ослаблением провоспалительных эффектов, опосредованных действием LPS [18]. Поскольку рецепторы TLR способствуют установлению уровня реагирования слизистой оболочки на продукты, выделяемые микробиотой кишечника, и регулированию интенсивности воспалительных реакций [14, 18], вполне вероятно, что иммуномодулирующие эффекты пробиотиков зависят, по крайней мере, частично, от изменения рецепторов TLR.

Несмотря на то, что в некоторых исследованиях указывалось о благоприятных эффектах после введения пробиотических добавок, большинство данных о механизмах действия этих добавок были получены в экспериментах на животных. Лишь небольшое количество контролируемых исследований все же было проведено на людях, но на данный момент нет фенотипических маркеров, способных прогнозировать эффекты *in vivo*. Цель данного исследования состояла в оценке и сравнении эффекта перорального и ректального введения *Lactobacillus casei* DG (*L. casei* DG), – пробиотического штамма, широко используемого у людей, на прикрепление микробиоты к слизистой оболочке сигмовидной части толстого кишечника. При этом анализировали влияние пробиотика на характер экспрессии цитокинов в слизистой оболочке и на уровни образ-распознающих рецепторов (PRR), в частности, рецепторов TLR2 и TLR4.

Материалы и методы

План исследования

Двадцать шесть пациентов с левосторонним язвенным колитом (UC) легкой степени, посещающие наше гастроэнтерологическое отделение, были признаны подходящими для данного исследования. На основе установленных критериев и результатов эндоскопических и гистологических исследований степень заболевания этих пациентов была оценена как легкая [20, 21]. У пациентов наблюдали: 2-3 стула ежедневно, кровь менее чем в 50% случаев, гиперемию с нечетким сосудистым рисунком слизистой оболочки толстого кишечника, хронический воспалительный инфильтрат собственной пластинки и слабое нарушение структуры или острый воспалительный инфильтрат с повреждением слизистой оболочки и абсцессами в криптах, но без признаков изъязвлений. Пациентов, которым в течение 3 месяцев до предстоящего исследования назначался антибиотик, стероиды, иммунодепрессанты, антидиарейные или спазмолитические препараты, исключали из участия. Исследование проводили в соответствии с принципами хельсинкской декларации, и после информирования о своих намерениях и методологии лечения, всех кандидатов

попросили подписать заявления о согласии. Пациенты были рандомизированы в одну из трех групп для 8- недельного периода лечения: первой группе, состоящей из 7 пациентов, был назначен пероральный прием только 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA) по 2,4 г/сут; второй группе, состоящей из 8 пациентов, был назначен пероральный прием 5-ASA по 2,4 г/сут совместно с пероральным приемом *L. casei* DG ($8 \times 9 \times 10^8$ КОЕ) два раза в день. Третьей группе, которая включала 11 пациентов, был назначен пероральный прием 5-ASA (2,4 г/сут) с ректальным введением *L. casei* DG (8×10^8 КОЕ) в виде клизмы, два раза в день.

До начала и в конце периода лечения все пациенты прошли сигмоидоскопию. Для оценки состава микрофлоры слизистой оболочки и уровня мРНК цитокинов делали биопсию из сигмовидной области толстого кишечника. В контрольную группу для этого исследования были включены 6 пациентов, проходящих колоноскопию в рамках скрининга колоректального рака и с макроскопически нормальной слизистой.

Сбор и обработка биопсийного материала

Очищение кишечника проводили с использованием полиэтилен-гликолевого препарата. Во время сигмоидоскопии 5 образцов биопсии были получены из ректосигмоидального соединения (20 см от заднего прохода) с помощью стандартных щипцов и обрабатывались немедленно. Два образца биопсии для бактериологической экспертизы помещали в предварительно взвешенные флаконы, содержащие 1,5 мл стерильного физиологического раствора ледяной температуры; два других образца замораживали в жидком азоте для извлечения общей тканевой РНК; и один образец был зафиксирован в 4%-ном параформальдегиде (PFA) для обычного гистологического исследования.

Образцы биопсии были обезвожены для гистологического анализа, залиты в парафин и нарезаны на микротоме в виде слайдов толщиной 5 мкм, а затем окрашены в стандартном гематоксилин-эозиновом красителе (H&E). Тяжесть заболевания определена количественно в соответствии со шкалой Флорена [22].

Образцы биопсии для микробиологического исследования (примерно 4-6 мг каждого) сначала промывали в 500 мкл нормального, стерильного физиологического раствора с добавлением 0,016% дитиозеритрита для удаления слизи. Затем трижды промывали в 500 мкл стерильного физиологического раствора, каждый раз встряхивая в течение 30 с. Надосадочную жидкость после второго и четвертого промываний объединяли, центрифугировали (2000 об/мин в течение 10 мин) и высеивали в надлежащие агаровые чашки для оценки поверхностной микрофлоры. После четвертого промывания образцы биопсии подвергали гипотоническому лизису в дистиллированной стерильной воде, а затем центрифугировали в течение 30 минут. Продукты распада, оставшиеся после гипотонического лизиса, собирали центрифугированием (2000 об/мин в течение 10 мин) и подвергали бактериологическому культивированию [23].

Бактериологический анализ

Были проанализированы бактериальные культуры от всех пациентов с UC и контрольных пациентов, включенных в исследование. Растворы после промывки биопсийных материалов и клеточные лизаты высеивали на неселективные (сердечно-мозговой агар, ВНА) и селективные среды для *Enterobacteriaceae spp.* (агар Макконки) и *Lactobacillus spp.* (SL агар Рогозы). Чашки с агаром ВНА и Макконки культивировали в анаэробных и аэробных условиях, в то время как чашки с SL агаром Рогозы культивировали только при анаэробных условиях. Анаэриобиоз достигался путем инкубации чашек в банках Gas Pak (Anaero-Gem™; компания «ЛКСОИД Лтд.» (OXOID Ltd.)). Чашки инкубировали при 37 °C в течение 24 ч в условиях аэриобиоза и в течение 72 ч в условиях анаэриобиоза. Все полученные колонии были подвергнуты морфологическому анализу путем окрашивания по

Граму (Biolife S.r.l.) и изучению молекулярных характеристик, выполненных методом ПЦР-амплификации 16S рибосомальной РНК (16S рРНК), как описано в другой публикации [24]. Продукты амплификации секвенировали с использованием набора реагентов для циклического секвенирования ABI PRISM™ Big Dye™.

РНК-экстракция и полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой

Один или два образца биопсии для каждого момента времени были гомогенизированы с помощью прибора Retsch MM300 (Компания «КВИАГЕН» (QIAGEN), Италия) в 250 мкл OMNIzol™ (компания «Евроклоне» (Euroclone), Милан, Италия). Общая РНК была экстрагирована согласно стандартному протоколу экстракции на основе применения тиоцианата гуанидиновой кислоты–фенола-хлороформа [9], а контаминирующая ДНК была удалена с помощью DNазы, свободной от RNаз (RQ1 RNase-Free DNase, компания «Промега» (Promega), Италия). Случайно праймированные комплементарные ДНК (кДНК) были получены из 2 мкг общей РНК с использованием обратной MuLV транскриптазы (компания «Апплайд Биосистемс» (Applied Biosystems), Фостер Сити, CA).

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени (RT-PCR)

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени структур IL-1b, IL-8, IL-10, альфа-фактора некроза опухоли (TNF-а) и мРНК рецепторов TLR4 и TLR2 был выполнен с использованием детектора последовательностей ABI Prism 7700 (компания «Апплайд Биосистемс»). Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемые для амплификации специфических мРНК приведены в Табл.1. Для количественного ПЦР-анализа в реальном времени был использован набор реагентов SYBR Green PCR Core (компания Апплайд Биосистемс), согласно протоколу производителя. Стандартные кри-

Табл. 1. Последовательности праймеров используемых для проведения количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с обратно транскрибированной РНК (кДНК)

Ген	Последовательность	Ампликон (bp)	T _A
<i>Gapdh</i>	FW: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' RV: 5'-GGTCCACCACTGACACGTTG-3'	63	60
<i>IL-1b</i>	FW: 50'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3' RV: 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3'	73	60
<i>TNF-a</i>	FW: 5'-CCCAGGGACCTCTCTAATC-3' RV: 5'-ATGGCTACAGGCTTGCTACT-3'	84	60
<i>IL-8</i>	FW: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' RV: 5'-AATTTCTGTGTTGGCGCAG-3'	190	60
<i>IL-10</i>	FW: 5'-ACGGCGCTGTCATCGATT-3' RV: 5'-TTGGAGCTTAAAGGCATTCTTC-3'	82	60
<i>TLR4</i>	FW: 5'-ACCAGAGTTTCCTGAAATGG-3' RV: 5'-AGGACCGACACACCAATGAT-3'	57	165
<i>TLR2</i>	FW: 5'-GGCCAGCAAATTACCTGTGT-3' RV: 5'-ATACCACAGGCCATGGAAAC-3'	56	167

bp – основные пары, FW – прямой праймер, RV – обратный праймер, T_A – температура отжига праймеров

вые были получены путем амплификации соответствующих кДНК, субклонированных в реагенте pGEM®-T Vector (компания «Промега», Италия). Экспрессия всех целевых генов была нормализована к эндогенному контрольному гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), также количественно определяемому методом ПЦР в реальном времени (RT-PCR).

Статистический анализ

Данные представлены, где это необходимо, в виде «медиана (диапазон)». Для сравнения уровней цитокинов и рецепторов TLR на момент включения пациентов в исследование и после терапии использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Для сравнения непрерывных переменных величин у пациентов с UC и здоровых субъектов из группы контроля применяли U-критерий Манна-Уитни. Всякий раз, когда было несколько сравнений, применяли дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса (ANOVA). Линейную связь между непрерывными переменными квантифицировали на основе критерия рангов Спирмена. Статистическая значимость была установлена на уровне $P < 0,05$.

Результаты

Микрофлора прямой кишки и маркеры воспаления слизистой оболочки у пациентов с язвенным колитом

Бактериальная микрофлора, культивируемая из ректосигмоидального соединения у пациентов с UC и контрольных субъектов, была охарактеризована по основным качественным и количественным различиям (Табл.2). В то время как общее число аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, культивируемых после лизиса биопсийных образцов, было сопоставимо в обеих группах, общее количество *Enterobacteriaceae spp.* было выше при значительно меньшем содержании *Lactobacillus spp.* у пациентов с UC, чем у здоровых субъектов из группы контроля. Более высокий уровень воспалительных цитокинов IL-1b обнаружен в слизистой оболочке прямой кишки у пациентов с язвенным колитом (рис.1). Более того, у пациентов с UC наблюдали статистически значимое увеличение медианных уровней мРНК рецептора TLR4. Хотя уровень мРНК рецептора TLR2 был примерно в десять раз ниже у пациентов с UC, чем в контрольной группе, это различие не достигало статистической значимости (рис. 1), и не было статистически значимого различия в уровнях мРНК цитокинов, наблюдаемых в разных группах пациентов с UC.

Изменение микрофлоры в толстом кишечнике у пациентов с UC при ректальном введении *L. casei* DG

В течение восьми недель пероральный прием 5-ASA не вызывал значительных изменений в микробиоте слизистой оболочки у наших пациентов с UC (Табл. 3), так же как и пероральные добавки с *L. casei* DG не оказывали существенного влияния на содержание *Enterobacteriaceae spp.* или *Lactobacillus spp.* (Табл.3). Напротив, клизмы с *L. casei* DG оказали заметное влияние на микрофлору толстого кишечника. Если число *Lactobacillus spp.*, культивированных из образцов биопсии, значительно возросло, то число *Enterobacteriaceae spp.* значительно снизилось (Табл.3). Наблюдаемые эффекты, по-видимому, не были вызваны механическим действием клизм, поскольку 8-недельный период ежедневного применения ректальных клизм с 5-ASA не влиял на микрофлору толстого кишечника в другой группе больных язвенным колитом, изученной нами (данные не приведены).

Изменение уровней мРНК рецепторов TLR2 и TLR4 слизистой толстого кишечника при введении с *Lactobacillus casei* DG в виде клизм

Сохраненные бактериальные структуры, способные изменять активность иммунной системы слизистой оболочки, распознаются рецепторами PRR, такими как TLR. Уровни мРНК рецепторов TLR2 и TLR4 в слизистой оболочке толстого кишечника у пациентов с

УС не были достоверно измененными через 8 недель введения 5-ASA (рис. 2), и они не были достоверно измененными после перорального приема с добавкой *L. casei* DG. Однако эти уровни изменялись после периода лечения пациентов, получающих ректальную клизму с *L. casei* DG. В действительности, наблюдалось снижение уровня мРНК рецепторов TLR4 в слизистой оболочке толстого кишечника у 9 из 11 пациентов, получающих ректальные клизмы ($p < 0,004$). При любом другом режиме лечения уровни мРНК рецепторов TLR2 достоверно не изменялись.

Изменение уровней мРНК цитокинов в слизистой толстого кишечника при введении *Lactobacillus casei* DG в виде клизм

Поскольку дисбаланс в продукции про- и противовоспалительных цитокинов слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с IBD связан с активным процессом болезни и поступлением пробиотиков с иммуномодулирующими эффектами, мы оценили изменения уровней этих цитокинов в ректосигмоидальных образцах биопсии, взятых после 8 недель применения добавок *L. casei* DG. Различия в уровнях цитокинов слизистой оболочки до

Табл. 2. Среднее содержание бактерий в слизистой оболочке, выявленное после культивирования видов из биопсийного материала

	Контроль (n = 6)	Язвенный колит (n = 26)
Общее количество аэробов и факультативно-анаэробных бактерий, культивированных после лизиса образцов биопсии	3,1 (диапазон 0,5–35) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	6,5 (диапазон 1,1–72,8) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	0,7 (диапазон 0–18) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	8,7 (диапазон 2,6–58) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани*
<i>Lactobacillus spp.</i>	12,6 (диапазон 0–8,) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	2.4 (диапазон 0–19) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани*

* P < 0,01 по сравнению с контрольной группой здоровых субъектов.

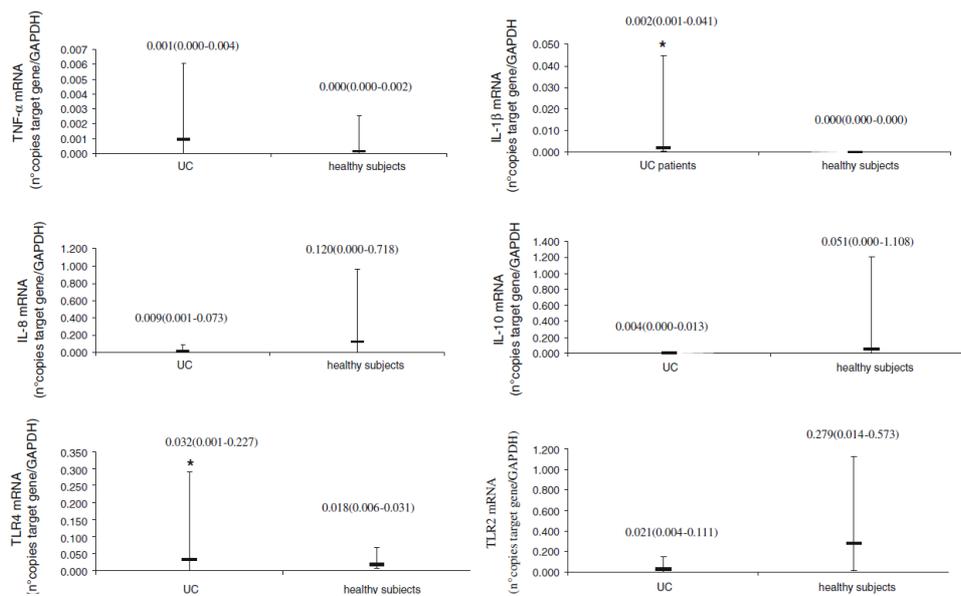


Рис. 1. Уровни воспалительных цитокинов и рецепторов TLR в слизистой оболочке у пациентов с УС и контрольных субъектов. Образцы биопсии слизистой оболочки были собраны из области ректосигмоидального соединения во время сигмоидоскопии у субъектов, подвергающихся эндоскопии для скрининга колоректального рака (n = 6) или с легкой формой левостороннего колита (n = 26). Общая РНК

была извлечена для количественного определения TNF- α , IL-1 α , IL-8, IL-10, TLR4 и TLR2 с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Значения были нормализованы с использованием GAPDH в качестве гена «домашнего хозяйства» (жизненно важные гены) и выражены в виде копий мРНК целевого гена /копий мРНК гена GAPDH. * P < 0,05 по сравнению с контрольной группой здоровых субъектов

Надписи на рисунке:

TLR4	Рецептор TLR4	IL-1 β	Интерлейкин-1 β
IL-8	Интерлейкин-8	UC	Язвенный колит
TNF- α	Альфа-фактор некроза опухоли	Healthy subjects	Здоровые субъекты
TLR2	Рецептор TLR2	UC patients	Пациенты с язвенным колитом
IL-10	Интерлейкин-10		

Табл. 3. Влияние добавок *Lactobacillus casei* DG на содержание бактерий в слизистой оболочке толстого кишечника у пациентов с язвенным колитом

	Содержание 5-ASA в слизистой рта (n = 7)	Содержание 5-ASA + <i>L. casei</i> DG в слизистой рта (8 x 10 ⁸ КОЕ) (n = 8)	Содержание 5-ASA в слизистой рта, плюс содержание <i>L. casei</i> DG в прямой кишке (8 x 10 ⁸ КОЕ) (n = 11)
<i>Enterobacteriaceae spp</i>	9,5 (диапазон 2,1–65,4) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	7,9 (диапазон 4,5–53,4) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	2,4 (диапазон 0–11) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани *
<i>Lactobacillus spp.</i>	2,1 (диапазон 0–21,8) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	2,9 (диапазон 0–25,2) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани	10,5 (диапазон 0–75,4) x 10 ³ КОЕ/10 мг ткани*

* P < 0,01 по сравнению с пациентами с UC, получающими перорально 5-ASA, или 5-ASA плюс перорально *L. casei* DG

лечения в исследуемых группах были статистически незначимыми (данные не показаны). Содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-8 и TNF- α) и противовоспалительного цитокина (IL-10) после 8 недель перорального применения вещества 5-ASA с или без пероральных добавок *L. casei* DG оставалось стабильным (рис. 3). Напротив, наблюдалось увеличение содержания мРНК цитокина IL-10 у пациентов, получавших перорально 5-ASA плюс ректально – *L. casei* DG, по сравнению с теми, кто принимал перорально только 5-ASA (p = 0,05), и значительное снижение уровней мРНК цитокинов IL-1 β и TNF- α по сравнению со значениями у пациентов, получавших перорально 5-ASA плюс перорально – *L. casei* DG (P = 0,04 и P = 0,05, соответственно). Через 8 недель лечения пациенты, получающие перорально 5-ASA плюс клизмы с *L. casei* DG, показали лучший общий баланс цитокина, что выражалось более высокими уровнями IL-10 в слизистой оболочке и снижением уровня провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α .

Клиническая и гистологическая оценка

После 8-недельного периода лечения все три группы исследуемых субъектов имели более низкие оценки по критерию Трулав-Витса, и балл был статистически значимым у пациентов с UC, которые получали перорально только 5-ASA (Табл. 4). Пациенты с UC, которые получали ректально или перорально добавку *L. casei* DG, тем не менее, показали значительное улучшение их гистологических баллов тяжести заболевания (Табл. 4), которые непосредственно коррелировали с уровнями мРНК рецептора TLR4 в слизистой оболочке ($\tau = 0,376$ и P = 0,024).

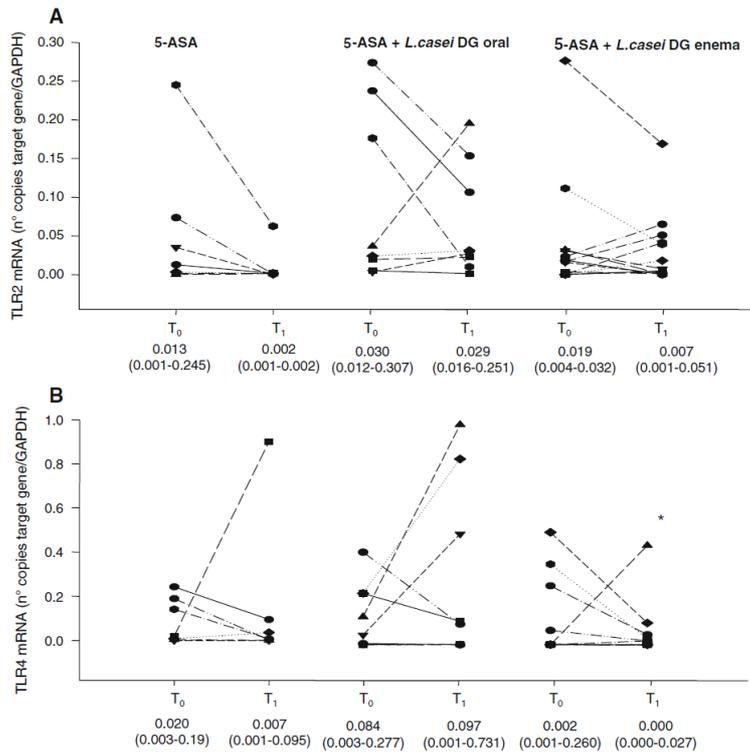


Рис. 2. Влияние добавки *L. casei* DG на уровни рецепторов TLR2 и TLR4 в толстом кишечнике. Образцы биопсии слизистой оболочки были взяты при сигмоидоскопии в исходный момент времени (T₀) и через 8 недель лечения (T₁). Уровни мРНК рецептора TLR2 (панель А) и рецептора TLR4 (панель В) были определены количественно с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Значения были нормализованы с использованием GAPDH в качестве гена «домашнего хозяйства» (жизненно важные гены) и выражены в виде числа копий мРНК целевого гена /копий мРНК гена GAPDH. * P < 0,05 по сравнению с группой, принимавшей 5-ASA, плюс *L. casei* DG в виде клизмы на момент T₀.

Надписи на рисунке:

TLR4 mRNA	мРНК рецептора TLR4
-----------	---------------------

Обсуждение

Данное исследование подтверждает концепции о том, что у пациентов с UC можно посредством ректального введения пробиотического штамма *L. casei* DG изменять активность иммунной системы, связанную со слизистой оболочкой толстого кишечника. Наше исследование, на самом деле показывает, что этот конкретный пробиотик, никогда не испытанный ранее у пациентов с язвенным колитом, действительно обладает противовоспалительными эффектами, когда он вводится ректально два раза в день в количестве 8×10^8 КОЕ. Возможные механизмы действия данного штамма обусловлены модуляцией микробной флоры, прикрепленной к слизистой оболочке кишечника, что может способствовать изменению иммунного ответа этой оболочки через сигнальные молекулы, сдвигая, в конечном счете, общий баланс цитокинов.

Кишечная микрофлора недавно была признана, как важный регулятор гомеостаза слизистой оболочки кишечника [1]. Изменения в составе кишечной микробиоты, в основном, характеризуются модификациями в соотношении некоторых типов бактерий, связанных с локальными воспалительными нарушениями толстого кишечника, такими как IBD, а также с системными патологиями, например, ожирением и атопической аллергией [25–29]. Разные экспериментальные модели показали, что некоторые виды люминальных бактерий являются более патогенными, чем другие. На самом деле, виды *Bacteroides* могут

быть особенно агрессивными, в то время как *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacteria spp.* обычно ассоциируются с более здоровой слизистой оболочкой [30].

Наше исследование подтвердило, что в слизистой оболочке сигмовидной кишки у пациентов с UC находится меньшее количество *Lactobacillus spp.*, чем в контрольной группе здоровых субъектов, и большее количество *Enterobacteriaceae spp.* в микрофлоре, прикрепленной к эпителию слизистой у этих пациентов, по сравнению с контролем. Добавление пробиотиков для восстановления микробного гомеостаза кишечника с целью уменьшения воспаления и, в конечном итоге, улучшения течения болезни, по-видимому, имеет смысл во многих отношениях [31]. Действительно, несколько клинических исследований с использованием различных пробиотических препаратов, таких как сложные бактериальные смеси, включая VSL № 3, или отдельные штаммы, например, *E.coli* Nissle 1917 или бифидобактерии, доказали эффективность в поддержании ремиссии и предотвращении рецидива у этих пациентов [32–34].

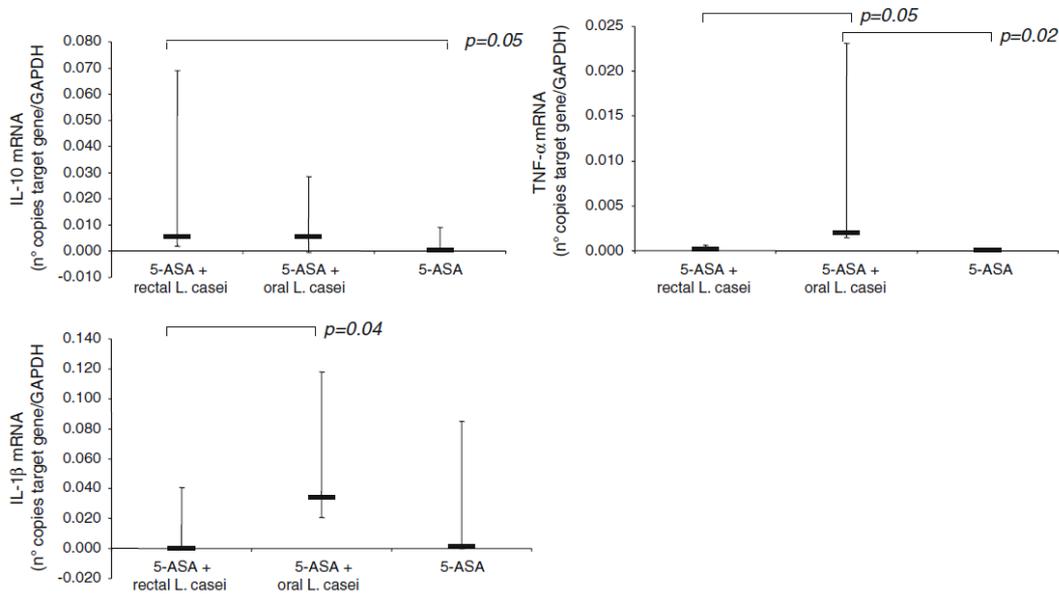


Рис. 3. Влияние добавок *L. casei* DG на уровни мРНК цитокинов в толстом кишечнике. Образцы биопсии слизистой оболочки были взяты во время сигмоидоскопии после 8-недельного периода лечения. Уровни мРНК, кодирующие структуры TNF-а, IL-1b, и IL-10, измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR).. Значения были нормализованы с использованием GAPDH в качестве гена «домашнего хозяйства» (жизненно важные гены) и выражены в виде копий мРНК целевого гена /копий мРНК гена GAPDH. Уровни достоверности P указаны для каждого измеренного цитокина.

Табл. 4. Клиническая и гистологическая оценка

	Содержание 5-ASA в слизистой рта	Содержание 5-ASA + <i>L. casei</i> DG в слизистой рта	Содержание 5-ASA в слизистой рта плюс содержание <i>L. casei</i> DG в прямой кишке	Анализ ANOVA по Краскелу-Уоллису
Критерий Трулав-Витса T_0	4 (1–8)	5 (4–5)	3 (2–5)	P = 0,4925
Критерий Трулав-Витса T_8	0,5 (0–3)	3 (0–6)	0,5 (0–1,5)	P = 0,2466
Р-значение по Вилкоксоу	0,043	0,114	0,108	P = 0,7563
Критерий Флорена T_0	2 (2–3)	3 (3–2)	2 (1–3)	P = 0,5108
	1 (1–2)	1,5 (1–2)	0,5 (0–2)	

Критерий Флорена T_8 Р-значение по Вил- коксоу	0,109	0,028	0,043	
---	-------	-------	-------	--

Данные представлены в виде медианы (межквартильный диапазон, IQR)

Для изучения микробов слизистой оболочки толстого кишечника был использован смешанный подход. Вначале были культивированы образцы биопсии, и микроорганизмы идентифицированы методом анализа генов 16S рибосомальной РНК. Хорошо известно, что большое количество кишечных микробов трудно или даже совсем невозможно культивировать, и поэтому простые методы культивирования могут дать только частичное представление о микробиоте толстого кишечника [35]. В связи с этим, независимо от культивирования, были использованы методы молекулярной генетики, основанные на анализе гена 16S рРНК, чтобы предложить более широкую картину комплекса кишечного микробного сообщества [36, 37]. Хотя будучи, в общем, более чувствительными, по сравнению с культивированием, молекулярные подходы могут иметь отдельные недостатки, такие как высокая стоимость секвенирования методом Сэнгера и смещение из-за выбора праймеров, что может ограничить способность метода обнаруживать менее распространенный вид микроорганизмов [36, 37]. Действительно, методики культивирования микроорганизмов делают возможным изучение жизнеспособных микробов, напрямую взаимодействуя с эпителием толстого кишечника [38, 39]. Поскольку применялась стратегия культивирования, имелась возможность сконцентрировать наш анализ на *Lactobacillus spp.* и *Enterobacteriaceae spp.*, так как обычно именно эти бактерии культивируются, и изменения уровней их содержания в микробиоте толстого кишечника описаны у пациентов с язвенным колитом [40, 41].

Остается предметом спора, какое количество микробов следует добавлять для эффективной колонизации кишечника и прикрепления этих микробов к слизистой оболочке, когда пробиотики используются в качестве терапевтических средств формирования кишечной микробиоты. Из-за трудностей анализа кишечной микробиоты лишь немногие исследования пытались ответить на этот вопрос. Например, Venturi и соавт. сообщили, что пероральные добавки с пробиотиком VLS №3 увеличивали содержание *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* в кале, но не модифицировали содержание любых других видов, обитающих в кишечнике [42]. В нашем исследовании, микрофлора слизистой оболочки не проявила каких-либо качественных или количественных изменений после 8 недель перорального приема *L. Casei* DG, но это могло быть связано с тем, что доза *L. casei* DG оказалась недостаточной, чтобы обеспечить адекватное наличие живых бактерий в дистальном отделе желудочно-кишечного тракта. При введении *L. casei* DG в виде клизмы, происходило значительное изменение состава микрофлоры, прикрепленной к эпителию толстого кишечника, при этом резко увеличивались виды бактерий, которые считаются менее приспособленными поддерживать воспалительную среду. Несколько исследований действительно четко продемонстрировали, что бактерии, прикрепленные к эпителиальным клеткам, могут напрямую влиять на различные ключевые биологические функции, в том числе на дифференциальную активность транскрипционных факторов, участвующих в воспалительных процессах [9, 34, 43, 44].

Иммунные клетки кишечного эпителия и слизистой оболочки различают сохраненные микробные структуры через образ-распознающие рецепторы (PRR), что способствует запуску врожденных иммунных реакций [45]. Тщательно изученные рецепторы TLR4 и TLR2 являются основными структурами, которые опосредуют эффекты LPS и пептидогликана [12]. Взаимодействуя с кишечной микробиотой, рецепторы PRR запускают ряд сигналов, которые влияют на различные виды физиологической активности, такие как производство цитопротективных факторов и иммуномодулирующих цитокинов [1].

Поскольку чрезмерная стимуляция рецептора TLR может оказывать вредное воздействие на организм хозяина (например, стойкая продукция воспалительных цитокинов может привести к повреждению ткани), передача сигналов через рецептор TLR тщательно регулируется в здоровом кишечнике с помощью нескольких механизмов [46]. Тем не менее, в последних исследованиях подчеркнута актуальность передачи сигналов через рецепторы PRR в слизистой оболочке кишечника, в связи с тем, что при раке толстой кишки зарегистрировано увеличение экспрессии рецепторов TLR4. В экспериментальных исследованиях также отмечалось, что развитие рака толстой кишки, связанного с воспалением, сопровождается наличием рецепторов LPS [47]. Как описано Cario и соавт. [16], у пациентов с язвенным колитом в слизистой оболочке толстой кишки имелись повышенные уровни TLR4. Это же наблюдалось и у наших пациентов с легкой степенью UC, что может быть актуальным не только потому, что сохраняется воспалительный процесс, но также и из-за повышенного риска развития рака [48]. Таким образом, пробиотически-опосредованное подавление рецепторов TLR4 смогло бы представлять дополнительную пользу для пациентов с язвенным колитом.

Обнаружение того факта, что *L. casei* DG вызывает подавление уровней рецепторов TLR4 толстого кишечника, соответствует нашим результатам недавнего исследования пробиотического штамма *L. crispatus* M247, способного прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника, значительно снижая экспрессию рецепторов TLR4 в указанных клетках, как *in vivo*, так и *in vitro*. Данные эффекты были опосредованы не через рецепторы TLR2, а через высвобождение пероксида водорода (H₂O₂) микробами, прикрепляющимися к эпителиальным клеткам [9, 14]. Уменьшая уровни TLR4, *L. casei* DG могут сделать слизистую оболочку более чувствительной к комменсальным непатогенным грамположительным бактериям, распознаваемым рецепторами TLR2, которые в состоянии вызывать защитные реакции [14, 15, 49]. Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что в слизистой оболочке толстого кишечника человека можно изменять экспрессию ключевого рецептора консервативных бактериальных структур, таких как LPS, которые, как принято считать, запускают воспалительные реакции. Постоянство стабильных уровней рецепторов TLR2, связанных с индукцией сильного противовоспалительного цитокина, такого как IL-10, может благоприятствовать развитию противовоспалительной среды. Такое положение чрезвычайно интересно, поскольку лучшая комбинация условий наличия цитокиновой среды и сниженной реактивности рецепторов TLR к бактериям кишечного просвета достигалась пероральным применением препарата 5-ASA одновременно с клизмой, содержащей *L. casei* DG, что, по-видимому, гарантирует адекватную нагрузку живых бактерий на слизистую оболочку.

Весьма также интересно, что с помощью добавки *L. casei* DG удалось снизить гистологический критерий, в то время как тяжесть заболевания, измеренная методом классификации по Трулав-Виттсу, статистически достоверно не изменилась. Это совершенно не удивительно, так как оценка по классификации Трулав-Виттса менее чувствительна у пациентов с легкой активностью язвенного колита [50]. Прямая корреляция между тяжестью воспалительного повреждения и экспрессией мРНК рецепторов TLR4, по-видимому, более важна, чтобы дополнительно подтверждать значимость гистологических данных. Мы считаем, что гистологическую оценку следует считать наиболее точной мерой оценки эффекта пробиотических добавок.

Таким образом, проведенное нами исследование продемонстрировало, что ректальное назначение *L. casei* DG играет важную иммуномодулирующую роль в изменении состава микрофлоры и экспрессии рецепторов TLR в слизистой оболочке толстого кишечника у пациентов с легкой степенью язвенного колита. Наши результаты показали, что у пациентов с язвенным колитом (UC) после соответствующей схемы лечения, уровни *Lactobacillus spp.* были повышены, а уровни *Enterobacteriaceae spp.* понижены. Наблюдали

также падение уровней TLR4, которое происходило параллельно с сокращением провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β , и увеличение противовоспалительного цитокина IL-10. Таким образом, ректальное введение пробиотиков, таких как *L. casei* DG, может воздействовать на микробиоту толстого кишечника и, следовательно, иммунная система слизистой, создавая общую противовоспалительную цитокиновую среду, вероятно, оказывает благоприятный эффект для уменьшения риска воспаления и рака слизистой оболочки. Конечно, необходимо крупномасштабное рандомизированное исследование для подтверждения и уточнения этих результатов.

Выражение благодарности Авторы очень благодарны мисс Линде Инверсо за редактирование рукописи. Источник финансирования: Министерство образования и науки Италии и Падуанский университет.

Конфликт интересов: Не заявлен

Ссылки на литературу

1. Kelly D, Conway S, Aminov R. Commensal gut bacteria: Mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol.* 2005;26: 326–333.
2. Sartor RB. Enteric microflora in IBD: Pathogens or commensal? *Inflamm. Bowel Dis.* 1997;3:230–235.
3. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, et al. Once daily high dose probiotic therapy (VLS#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* 2004;53:108–114.
4. Gionchetti P, Rizzello F, Heiwug U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: A double-blind, placebocontrolled trial. *Gastroenterology.* 2003;124:1202–1209.
5. Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: Possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21:426–430.
6. White NR, Mulligan P, King PJ, et al. Sodium butyrate-mediated Sp3 acetylation represses human insulin-like growth factor binding protein-3 expression in intestinal epithelial cells. *J Pediatric Gastroenterol Nutr.* 2006;42:134–141.
7. Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, et al. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J Nutr.* 2006;136:1483–1487.
8. Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2004;127:777–791.
9. Voltan S, Martines D, Elli M, et al. Lactobacillus crispatus M247-Derived H2O2 Acts as a Signal Transducing Molecule Activating Peroxisome Proliferator Activated Receptor-c in the Intestinal Mucosa. *Gastroenterology.* 2008;135:1216–1227.
10. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 2005;54:1182–1193.
11. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting edge: Different Toll-like receptors agonist instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via different modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol.* 2003;171:4984–4989.

12. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430:257–263.
13. Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol*. 2004;12:484–488.
14. Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, et al. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1138–1148.
15. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007;132:1359–1374.
16. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68: 7010–7017.
17. Cario E, Podolsky DK. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Mol Immunol*. 2005;42:887–893.
18. Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43: 197–204.
19. Nanda Kumar NS, Balamurugan R, Jayakanthan K, et al. Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:1834–1839.
20. Edwards FC, Truelove SC. The course and prognosis of ulcerative colitis. *Gut*. 1963;4:299–315.
21. Baron J, Connell A, Lennard-Jones A. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *Br Med J*. 1964;1:189–192.
22. Flore'n CH, Benoni C, Wille'n R. Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1987;22:459–462.
23. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, et al. Gut-associated bacterial microbiota in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006;55:1760–1767.
24. Rivas R, Zurdo-Pinheiro EV, Mateos PF, et al. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J Microbiol Meth*. 2004;56:413–426.
25. Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, et al. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11: 481–487.
26. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003;52:237–242.
27. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, et al. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 2007;62:1223–1236.
28. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: The KOALA Birth Cohort Study. *Gut*. 2007;56: 661–667.

29. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11070–11075.
30. Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, et al. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol*. 2003;47:371–378.
31. Sheil B, Shanahan F, O'Mahony L. Probiotic effects on inflammatory bowel disease. *J Nutr*. 2007;137:819S–824S.
32. Gionchetti P, Rizzello F, Heiwug U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: A double-blind, placebocontrolled trial. *Gastroenterology*. 2003;124:1202–1209.
33. Kruis W, Fri P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 2004;53:1617–1623.
34. Cui H-H, Chen C-L, Wang J-D, et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2004;10:1521–1525.
35. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Gordon JJ, Gibson GR, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:4799–4807.
36. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MF. Characterization of bacterial communities in feces from healthy volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the faecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:3575–3581.
37. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLOS Biol*. 2008;6:e2802383–2400.
38. Morelli L, Garbagna N, Rizzello F, Zonenschain D, Grossi E. In vivo association to human colon of *Lactobacillus paracasei* B21060: Map from biopsies. *Dig Liv Dis*. 2006;38:894–898.
39. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–421.
40. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(Suppl 6):61–71.
41. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: Current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2001; 234:29–40.
42. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1103–1108.
43. Kelly D, Campbell JI, King TP, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol*. 2004;5: 104–112.

44. van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, et al. Differential NFkappaB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:2371–2376.
45. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409–435.
46. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MAK, et al. Strategic compartmentalization of toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol*. 2003;170:3977–3985.
47. Zhang R, Li Y, Beck PL, et al. Toll-like receptor 4 regulates colitis-associated adenocarcinoma development in interleukin-10-deficient (IL-10(-/-)) mice. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1375–1376.
48. Masayuki F, Fukata M, Chen A, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007;133:1869–1881.
49. Cario E, Gerken G, Podolsky D. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004;127:224–238.
50. Seo M, Okada M, Yao T, Okabe N, Maeda K, Oh K. Evaluation of disease activity in patients with moderately active ulcerative colitis: Comparisons between a new activity index and Truelove and Witts' classification. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:1759–1763.