

Влияние *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 на симптомы, микробиоту кишечника, короткоцепочечные жирные кислоты и активацию иммунитета у пациентов с синдромом раздраженного кишечника: поисковое рандомизированное клиническое исследование

United European Gastroenterology
Journal 2018, Vol. 6(4) 604-613
© Автор(-ы) 2017 год
Перепечатки и разрешения:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
Цифровой идентификатор объекта
(DOI): 10.1177/2050640617736478
journals.sagepub.com/liom e/ueg
<Логотип: SAGE>

Cesare Cremon¹, Simone Guglielmetti², Giorgio Gargari², Valentina Taverniti², Anna Maria Castellazzi³, Chiara Valsecchi³, Carlotta Tagliacarne³, Walter Fiore⁴, Massimo Bellini⁵, Lorenzo Bertani⁵, Dario Gambaccini⁵, Michele Cicala⁶, Bastianello Germana⁷, Maurizio Vecchi⁸, Isabella Pagano¹, Maria Raffaella Barbaro¹, Lara Bellacosa¹, Vincenzo Stanghellini¹, Giovanni Barbara¹

Аннотация

Предпосылки. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что взаимодействие кишечной микробиоты с хозяином может являться фактором патофизиологии и влиять на симптомы синдрома раздраженного кишечника (IBS).

Цель. Цель настоящей статьи заключается в представлении результатов оценки влияния *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 на клинические факторы и микробиоту кишечника у пациентов с IBS.

Методы. Мы провели многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое перекрестное поисковое 18-недельное исследование по оценке

¹ Кафедра медицинских и хирургических наук, Центр прикладных биомедицинских исследований, Университет Болоньи, Болонья, Италия

² Кафедра пищевых, экологических и нутрициологических наук, Отдел пищевой микробиологии и биологических процессов, Миланский университет, Милан, Италия

³ Кафедра клинической диагностики хирургических заболеваний и педиатрические науки, Павийский университет, Павия, Италия

⁴ «Софар С.п.А.», Треццано-Роза, Италия

⁵ Отделение гастроэнтерологии, кафедра гастроэнтерологии, Университет Пизы, Пиза, Италия

⁶ Гастроэнтерологическое отделение, Римский биомедицинский университет, Рим, Италия

⁷ Гастроэнтерологическое отделение, больница имени С. Мартино, Беллуно, Италия

⁸ Отделение гастроэнтерологии эндоскопии органов пищеварения, Поликлиника Сан-Донатато IRCCS, Сан-Донатато-Миланезе, Италия

Автор, которому следует направлять корреспонденцию:

Giovanni Barbara, кафедра медицинских и хирургических наук, больница Св. Урсулы Мальпиги, строение №5, Виа Массаренти, 9, I-40138, Болонья, Италия.
Адрес электронной почты: giovanni.barbara@unibo.it

влияния *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 на симптомы, состав микробиоты кишечника, а также концентрацию короткоцепочечных жирных кислот (SCFA), иммуноглобулина А и цитокинов в фекалиях у пациентов с IBS. Состав микрофлоры кишечника определялся методом секвенирования 16S рРНК.

Результаты. В целом, в пяти клинических центрах Италии в исследование были включены сорок пациентов с IBS. Лечение пробиотиком *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 не привело к значимому улучшению симптомов IBS, включая первичные показатели эффективности, которыми являлись боль/дискомфорт в животе наибольшей степени тяжести и степень уменьшения симптомов IBS. Интересно отметить, что пробиотик *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 индуцировал значимое уменьшение количества бактерий рода *Ruminococcus* с доминированием таксонов, связанных с *Ruminococcus bromii* и *Ruminococcus callidus*, значимое увеличение концентрации ацетата и бутирата SCFA, а также значимое уменьшение концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-15.

Выводы. Результаты настоящего поискового исследования указывают на то, что пробиотик *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 способен модулировать структуру/функцию микробиоты кишечника и снижать иммунную активацию у пациентов с IBS. В связи с тем, что статистически значимое влияние на симптомы IBS не обнаружено, необходимы дальнейшие исследования для определения роли данного пробиотика в лечении IBS. Настоящее исследование зарегистрировано в реестре ClinicalTrials.gov под номером NCT02371A99.

Ключевые слова

Синдром раздраженного кишечника, питательные вещества, пробиотики, микробиота

Получена: 5 июня 2017 года; принята: 16 сентября 2017 года

Краткое резюме

- Пробиотики как класс оказывают небольшое, но значимое лечебное действие на симптомы синдрома раздраженного кишечника (IBS), при этом оптимальная стратегия использования пробиотиков при IBS и механизм их терапевтического действия у человека практически неизвестны.
- Пробиотик *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 индуцирует значимое уменьшение количества бактерий рода *Ruminococcus*, а также значимое увеличение концентрации ацетата и бутирата короткоцепочечных жирных кислот и значимое уменьшение концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-15 в фекалиях у пациентов с IBS.
- Мы идентифицировали возможные биологические механизмы лечебного действия данного пробиотика у пациентов с IBS.

Введение

Синдром раздраженного кишечника (IBS) характеризуется болью в животе и изменениями функции кишечника. IBS является одним из наиболее распространенных желудочно-кишечных заболеваний, от которого страдают 11,2% населения в Соединенных Штатах Америки и Европе¹. Недавно у значительной части пациентов с IBS с помощью усовершенствованных методов микроскопического исследования и молекулярного анализа выявлены изменения в составе факторов просвета кишечника, эпителиального барьера, а также функции иммунной, эндокринной и нервной системы.²

Несколько линий доказательств указывают на участие микробиоты кишечника в патогенезе IBS. Проспективные исследования показали, что от 3 до 36% кишечных инфекций, нарушающих экосистему кишечника, приводят развитию новых случаев так называемого постинфекционного IBS.^{2,3} В ряде исследований сообщается об изменениях в составе и стабильности микробиоты кишечника у пациентов с IBS на протяжении периода наблюдения.⁴⁻⁶ Несмотря на то, что эти данные не позволяют нам определить, является ли патологическая микробиота причиной или следствием IBS, улучшение симптомов, описанное в исследованиях пробиотиков^{7,8} и не всасывающихся антибиотиков⁹, свидетельствует о влиянии взаимодействия кишечных бактерий с хозяином на патофизиологию и симптомы этого распространенного заболевания. Тем не менее, текущие данные являются неоднородными по причине отсутствия контроля питания, одновременного использования антибиотиков, различных подтипов опорожнения кишечника и кишечного транзита.

Пробиотики определяются как «живые микроорганизмы, которые при введении в достаточных количествах улучшают здоровье хозяина».¹⁰ Систематические обзоры литературы и метаанализы показывают, что пробиотики как класс оказывают небольшое, но значимое терапевтическое действие на симптомы IBS.^{7,8} Тем не менее, качество исследований по оценке результатов использования пробиотиков для лечения IBS и объемы их выборок остаются недостаточными. Большое разнообразие видов, штаммов и доз пробиотиков, которые оценивались в клинических исследованиях, затрудняет задачу предоставления обобщаемых рекомендаций относительно оптимальной стратегии лечения пробиотиками IBS.¹¹ По всем перечисленным причинам сомнительно, что метаанализы действительно применимы к исследованиям пробиотиков. Понимание механизма лечебного действия пробиотиков у человека ограничено, так как оно в основном оценивалось в доклинических исследованиях или в небольшом количестве клинических исследований.^{10,11} В одном клиническом исследовании¹² было показано, что пробиотики обладают мощными противовоспалительными свойствами. В частности, у пациентов с IBS *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* 35624 оказывал нормализующее действие на отношение интерлейкинов (IL) 10/IL12, которое является показательным, но не валидированным маркером провоспалительного иммунного ответа Т-хелперов (Th) типа 1.¹² В недавнем исследовании здоровых добровольцев¹³ пробиотик *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 значимо модулировал количество бактерий *Clostridiales* и концентрацию бутирата в фекалиях, что потенциально является благоприятным для здоровья хозяина. Кроме того, вводившийся ректально пробиотик *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 модулировал состав микробиоты у пациентов с хроническим воспалением кишечника, частично модифицируя экспрессию Toll-подобных рецепторов.^{14,15}

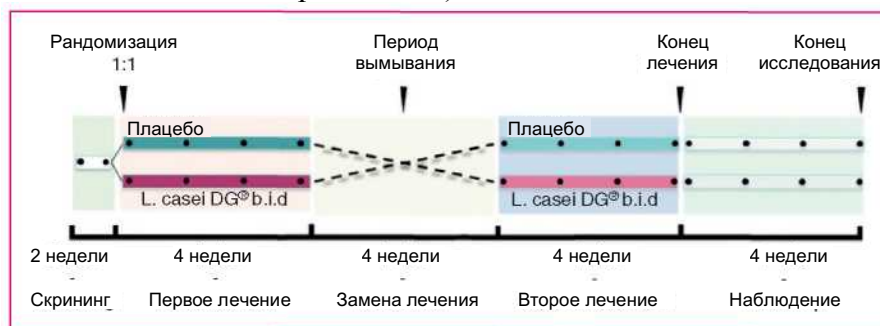
На основании описанных результатов мы разработали рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое перекрестное поисковое исследование для определения эффективности, безопасности и механизма действия пробиотика *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 у пациентов с IBS.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено многоцентровое рандомизированное двойное слепое перекрестное плацебо-контролируемое поисковое исследование для оценки влияния пробиотика *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG[®], (LCDG), Энтеролактис[®] плюс, «Софар С.п.А.», Треццано-Роза, Милан, Италия, штамм депонирован в Институте Пастера в Париже под номером 11572) на симптомы, состав фекальной микробиоты, а также концентрацию короткоцепочечных жирных кислот (SCFA), иммуноглобулина (Ig) А и

цитокинов в фекалиях, у пациентов с IBS. Лекарственная форма пробиотика представляла собой желатиновые капсулы, в каждой из которых содержалось не менее чем 24 миллиарда жизнеспособных клеток бактерий штамма LCDG. Капсулы плацебо и пробиотика, идентичные по цвету, внешнему виду содержимого и вкусу, были упакованы в алюминиевые флаконы с влагопоглощающим элементом, закрытые пластмассовым колпачком. После завершения двухнедельного вводного периода приемлемые пациенты рандомизировались для приема LCDG два раза в день в течение четырех недель или внешне идентичного препарата без бактерий (плацебо) с последующим вымыванием в течение четырех недель, после чего начинался прием альтернативного препарата (два раза в день в течение четырех недель).



b.i.d. = два раза в день

Рисунок 1. Дизайн исследования. После двухнедельного вводного периода пациенты рандомизировались (1:1) для приема *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 или плацебо два раза в день в течение четырех недель. После этого проводился четырехнедельный период вымывания до перехода на прием альтернативного препарата (два раза в день в течение четырех недель). Через 14 недель начинался период наблюдения, который продолжался четыре недели. Общая продолжительность исследования составляла 18 недель. Образцы фекалий получались во время визитов 2 и 3 (первый период), визитов 4 и 5 (второй период) и в конце периода наблюдения.

Через 14 недель начиналось наблюдение пациентов в течение четырех недель (Рисунок 1). Визиты исследования проводились каждые четыре недели в течение периода лечения и наблюдения. График рандомизации определялся компьютерной системой, которая генерировала случайные коды. Назначенная последовательность интервенции не раскрывалась до завершения исследования. Пациенты, исследователи и персонал спонсора не имели доступа к кодам рандомизации. Все участники клинически обследовались по установленной форме и дополнительно фенотипировались с помощью валидированных опросников, как описано ниже. Во всех случаях образцы фекалий получались в начале и в конце первого (визиты 2 и 3) и второго (визиты 4 и 5) периода лечения, а затем в конце периода наблюдения.

Протокол был разработан координационным центром. Данные собирались исследователями и контролировались спонсором под надзором контрактной исследовательской организации «OPIS». Анализ данных исследования проводился персоналом компании «OPIS» совместно с координационным центром. План статистического анализа (SAP) был выпущен и утвержден спонсором до блокировки базы данных и раскрытия последовательности лечения. Протокол утверждался независимым комитетом по этике в каждом центре (в частности, он был утвержден комитетом по этике госпиталя Св. Урсулы Мальпиги в Болонье 7 октября 2014 года, № утверждения 145/2014/O/Sper). Исследование проводилось в соответствии с положениями Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие. Все авторы имеют доступ к данным исследования, а также проверили и утвердили окончательный вариант рукописи. Настоящее исследование было зарегистрировано в общественном реестре (ClinicalTrial.gov, № NCT02371499)

Пациенты

Приемлемые пациенты с клиническими симптомами, отвечающими Римским критериям III IBS,¹⁶ независимо от типа опорожнения кишечника, зачислялись в пяти центрах Италии (критерии включения/исключения описаны в дополнительных материалах, опубликованных в Интернете).

Оценки исследования

Данные регистрировались в электронной индивидуальной регистрационной карте (ЭИРК). Пациенты ежедневно записывали все симптомы в бумажном дневнике пациента. Образ жизни и пищевые привычки пациентов контролировались во время исследования и являлись одинаковыми на протяжении всех периодов наблюдения. Соблюдение предложенного образа жизни и рекомендаций по питанию еженедельно проверялось и отмечалось в дневнике пациента. Во время каждого визита регистрировались использование сопутствующих препаратов и нежелательные явления.

Первичными параметрами эффективности являлись: (1) боль/дискомфорт в животе наибольшей степени тяжести за последние 24 часа (ответ определялся как уменьшение на $\geq 30\%$ средней боли и/или дискомфорта в животе наибольшей степени тяжести в течение недели по сравнению со средним показателем вводного периода в течение не меньше чем двух из четырех недель периода лечения), которые измерялись ежедневно с помощью 11-балльной числовой шкалы (NRS); (2) степень уменьшения симптомов IBS за последние семь дней по сравнению с исходной точкой (ответ определялся «полное прекращение симптомов» или «значительное уменьшение симптомов» в течение не меньше чем двух из четырех недель периода лечения), которая измерялась еженедельно с помощью семибалльной сбалансированной порядковой шкалы; (3) частота стула в течение суток и консистенция фекалий, которая оценивалась ежедневно с помощью Бристольской шкалы формы кала (BSSF); (4) состав кишечной микробиоты, а также концентрация SCFA, иммуноглобулина A (IgA) и цитокинов в фекалиях, которые определялись каждые четыре недели в течение периодов лечения и в конце периода наблюдения.

Вторичными показателями эффективности являлись: (1) общая удовлетворенность лечением в конце обоих периодов лечения, которая определялась с помощью 10-балльной визуальной аналоговой шкалы (ВАШ); (2) показатель госпитальной шкалы тревоги и депрессии (HADS);¹⁷ (3) показатель качества жизни, измеренный с помощью валидированной 12-компонентной краткой формы оценки состояния здоровья (SF-12),¹⁸ и (4) использование препаратов неотложной помощи.

Определение состава микробиома в образцах фекалий

Структура фекальной микробиоты анализировалась так, как описано в литературе^{13,19,20} (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете).

Измерение концентрации SCFA в фекалиях

Концентрация SCFA в образцах фекалий измерялась так, как описано ранее¹⁹ (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете).

Измерение концентрации в фекалиях IgA и цитокинов

Концентрация в фекалиях IgA и цитокинов (включая интерлейкин (IL) 6, IL8, IL10, IL12, IL15, интерферон (IFN)- γ , фактор некроза опухоли (TNF)- α и трансформирующий фактор роста (TGF)- β) измерялась методом иммуноферментного анализа (ИФА), как описано ранее²¹ (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете).

Статистический анализ

Так как настоящее исследование являлось поисковым, необходимый объем выборки не вычислялся. Руководствуясь критериями осуществимости и ранее опубликованными исследованиями,²² в настоящее исследование были зачислены сорок пациентов. Тем не менее, если объем выборки в группе каждой последовательности, составляет 20 пациентов (общий объем выборки составляет 40 пациентов), статистическая мощность перекрестной схемы лечения 2×2 составляет 80% для обнаружения различий между видами лечения, предполагая среднюю величину эффекта и используя *t*-критерий для сравнения двух групп (перекрестный дисперсионный анализ (ANOVA)) с двусторонним уровнем значимости 0,05.²³

Непрерывные данные обобщались путем вычисления среднего значения, стандартного отклонения (SD), медианы, первого и третьего квартиля, а также минимального и максимального значения. Категориальные данные обобщались путем вычисления абсолютной и относительной частоты или составления таблиц сопряженности признаков. Пациенты включались в каждый анализ при наличии необходимых данных. Если не указано иное, использовался метод распространенности, поэтому потерянные данные не подставлялись.

В популяцию полного анализа (FAS) включались все рандомизированные пациенты. В популяцию безопасности включались все рандомизированные пациенты, которые получили не менее чем одну дозу исследуемого препарата, и с не менее чем одной оценкой безопасности после исходной точки. В популяцию пациентов, начавших лечение (ITT), включались все рандомизированные пациенты, которые получили не менее чем одну дозу исследуемого препарата, и с не менее чем одной оценкой эффективности, полученной во время каждого перекрестного периода. В популяцию анализа по протоколу (PP) включались все рандомизированные пациенты, которые завершили исследование без каких-либо значимых отклонений от протокола. Для первичных анализов эффективности использовались данные из популяции ITT, а популяция PP использовалась в качестве источника вспомогательных данных.

Путем анализа бинарных переменных эффективности с помощью критерия Прескотта определялся прямой эффект лечения после проверки на отсутствие зависимости результата лечения от периода с помощью критерия, предложенного Армитажем и Хиллсом.²⁴ В том случае, если имела место влияние периода на результаты лечения, для определения эффекта лечения проводился анализ данных только первого периода с помощью критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера. Кроме того, первичные переменные анализировались с помощью модели обобщенных оценочных уравнений для многократных измерений (т.е. пациента в последовательности) с учетом последовательности, периода и лечения в качестве фиксированных эффектов. Для анализа непрерывных переменных эффективности применялась модель смешанных эффектов для многократных измерений после подтверждения отсутствия эффекта переноса.

Все статистические таблицы, диаграммы, списки и анализы составлялись/строились/проводились с помощью программы SAS[®] для Windows, выпуска 9.4 (64-разрядная версия) («SAS Institute Inc.», Кэри, штат Северная Каролина, США). Если не указано иное, во всех статистических анализах использовался двусторонний показатель α 0,05 (см. дополнительные материалы о статистическом анализе данных, касающихся состава кишечного микробиома).

Результаты

Участники исследования

Информация о зачислении в исследование и рандомизации представлена на Рисунке 2. Настоящее исследование проводилось с января до ноября 2015 года. Были рандомизированы сорок два пациента (95,5%) (22 пациента в группу последовательности LCDG-плацебо и 20 пациентов в группу последовательности плацебо-LCDG) и включены в популяцию FAS (все пациенты рандомизированы во время визитов 1 и 2). В общей сложности 40 пациентов (90,9%) явились на визиты 3 и 4 и были включены как в популяцию ITT, так и популяцию безопасности, а 39 пациентов явились на визит 5 и продолжали участие в исследовании в течение периода наблюдения. Основными причинами досрочного прекращения участия в исследовании являлись отзыв информированного согласия, несоблюдение режима лечения и нежелательные явления. Почти все пациенты нормально соблюдали режим лечения (от 80% до 120%). Демографические и исходные характеристики пациентов представлены в Таблице 1.

Влияние лечения на симптомы нарушения пищеварения

Боль/дискомфорт в животе. В целом, учитывая оба периода лечения, доля ответов являлась большей во время лечения LCDG (15/40, 37,5%), чем во время лечения плацебо (12/40, 30%), но данное различие не являлось значимым в модели статистического анализа ($p = 0,336$). По результатам анализа объединенных данных из популяции PP, доля ответов (в целом) являлась одинаковой в обеих группах пациентов (11/32, 34,4%).

Степень уменьшения симптомов IBS. В целом, учитывая оба периода лечения, доля ответов являлась большей во время лечения LCDG (9/40, 22,5%), чем во время лечения плацебо (6/39, 15,4%), но данное различие не являлось значимым в модели статистического анализа ($p = 0,195$). Примерно такие же результаты получены в популяции PP.

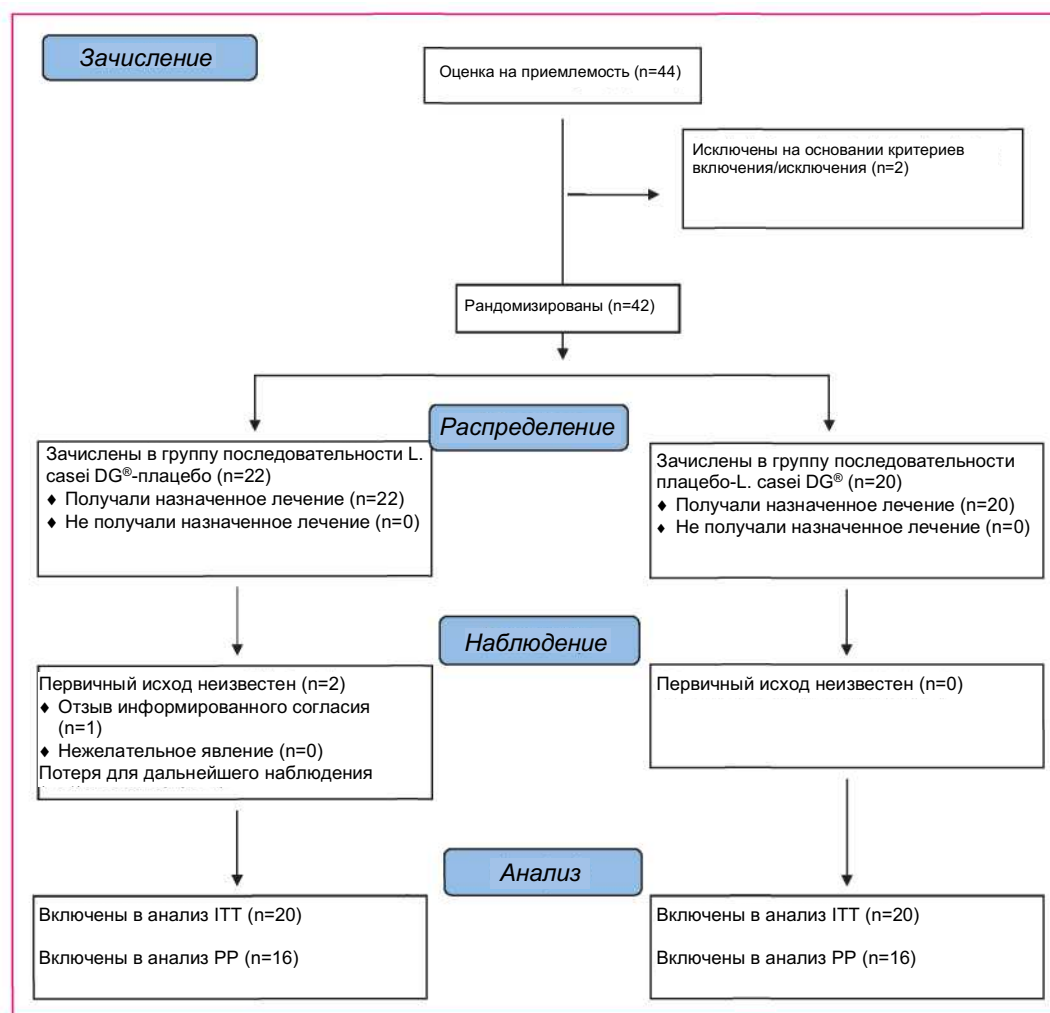


Рисунок 2. Блок-схема зачисления и рандомизации в исследовании пробиотика DG[®] CNCM I-1572. L. casei: *Lactobacillus paracasei*; ITT: популяция пациентов, начавших лечение; PP: популяция анализа по протоколу.

Таблица 1. Исходные характеристики участников исследования

Характеристики	Плацебо/ <i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-1572 (n = 20)	<i>Lactobacillus paracasei</i> /плацебо CNCM I-1572 (n = 20)
Возраст, лет	44,55 ±12,98	37,35 ±11,25
Женский пол	15 (75%)	11 (55%)
Этническая группа		
Европейская	20 (100%)	20 (100%)
Другая	0 (%)	0 (0%)
Подтип IBS (4)		
IBS-D	6 (30%)	8 (40%)
IBS-C	7 (35%)	5 (25%)
IBS-M	1 (5%)	2 (10%)
IBS-U	6 (30%)	5 (25%)
Показатель боли в животе ^a	2,70 ±1,24	3,28 ±1,95

Указано количество пациентов (%) или среднее значение ± SD.

^aСреднее значение в течение вводного периода.

IBS: синдром раздраженного кишечника; IBS-D: синдром раздраженного кишечника с диареей; IBS-C: синдром раздраженного кишечника с запором; IBS-M: смешанный синдром раздраженного кишечника; IBS-U: неспецифический синдром раздраженного кишечника.

Суточная частота и консистенция стула. Частота стула регистрировалась ежедневно, консистенция стула оценивалась с помощью BSSF. Оба показателя значимо не различались ни в популяции ITT, ни в популяции PP. Лучшие результаты (то есть нормализация функции кишечника) были получены у пациентов с IBS и симптомом диареи (IBS-D), а также смешанным IBS (IBS-M), получавших LCDG (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете), но значимые различия отсутствовали.

Эффект переноса влияния на все симптомы нарушения пищеварения не достиг статистической значимости. Это обозначает, что показатели в начале второго периода являлись статистически равными исходным показателям.

Влияние лечения на микробиоту кишечника

Биологическое разнообразие в пределах одного образца анализировалось путем определения количества видов бактерий и соотношения численности популяций (α -разнообразие) с использованием индексов Chaol, и InvSimpson, а взаимосвязь между образцами (β -разнообразие) определялась с помощью анализа главных координат (PCoA), основанного на взвешенных и невзвешенных показателях расстояния UniFrac. Различия между LCDG и плацебо в модуляции α - и β -разнообразия не являлись статистически значимыми (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете, Рисунки S1 и S2). Далее, мы оценили влияние лечения на модуляцию специфических бактериальных таксонов. Мы обнаружили значимое увеличение количества бактерий рода *Lactobacillus* (правдоподобный эффект пробиотика, введенного внутрь) и *Oscillospira*, а также уменьшение количества бактерий рода *Ruminococcus* (Таблица 2(a)). Кроме того, только лечение LCDG привело к значимому изменению популяции бактериальных таксонов. В частности, мы обнаружили увеличение количества бактерий рода *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и неопознанного рода из семейства *Barnesiellaceae* (Таблица 2 (b)).

В связи с сообщениями о связи IBS с видами из рода *Ruminococcus*,^{25,26} мы дополнительно анализировали данные об этом таксоне. Используя программу для поиска основного локального выравнивания (BLASTn) и алгоритмы глобального выравнивания ClustalW, мы отнесли три наиболее многочисленных последовательности, связанные с родом *Ruminococcus*, которые анализировались повторно, к видам *R. bromii* (67,7% последовательностей рода *Ruminococcus*), *R. bicirculans* (7,7%) и *R. callidus* (4,3%) (Рисунок S3).

Влияние лечения на концентрацию SCFA

Мы обнаружили значимое увеличение концентрации ацетата и бутирата SCFA после лечения LCDG, но не наблюдались значимые различия после лечения плацебо (Таблица 3; Рисунок S4). Медиана концентрации ацетата и, особенно, бутирата являлась большей до начала лечения плацебо, чем до начала лечения пробиотиком. Несмотря на то, что указанное различие не являлось статистически значимым, нельзя исключить перенос лечебного действия пробиотика на концентрацию SCFA (то есть недостаточную продолжительность периода вымывания).

Влияние лечения концентрацию IgA и цитокинов в фекалиях

Средняя концентрация IgA в фекалиях, выраженная в нг/г, уменьшилась во время лечения LCDG (среднее изменение -5,4), но увеличилась во время лечения плацебо (среднее изменение 14,1). Указанное различие являлось близким к статистической значимости ($p = 0,068$) (Таблица S1). Средняя концентрация IL6 в фекалиях, выраженная в мкг/г, уменьшилась во время лечения LCDG (среднее изменение -0,2), но увеличилась во время лечения плацебо (среднее изменение 0,7). Указанное различие являлось близким к статистической значимости ($p = 0,056$) (Таблица S1). Средняя концентрация IL15 в

фекалиях, выраженная в мкг/г, уменьшилась во время лечения LCDG (среднее изменение -173,4), но увеличилась во время лечения плацебо (среднее изменение 35,4). Указанное различие являлось статистически значимым ($p = 0,042$) (Таблица SI). Концентрация других цитокинов в фекалиях статистически значимо не изменилась.

Корреляция между изменениями микробиома, клинических симптомов и показателей иммунитета

Корреляции между биологическими и клиническими показателями представлены в Таблице 4 (см. дополнительный материал, опубликованный в Интернете).

Безопасность

Нежелательные явления, развившиеся во время лечения исследуемым препаратом, перечислены в Таблице 5. Значимое различие между двумя группами исследования в количестве пациентов с не менее чем одним нежелательным явлением, развившимся во время лечения, не зарегистрировано ($p = 0,742$), но один пациент из группы последовательности LCDG-плацебо досрочно прекратил лечение исследуемым препаратом по причине ухудшения боли в животе. В течение периода лечения ни у одного из пациентов не развились нежелательные явления, которые оценены как серьезные, тяжелой степени тяжести или связанные с использованием исследуемого препарата. Все зарегистрированные нежелательные явления оценены как не связанные с использованием исследуемых препаратов.

Обсуждение

LCDG значимо уменьшал количество бактерий рода *Ruminococcus*, а также значимо увеличивал концентрацию бутирата SCFA и значимо уменьшал концентрацию провоспалительного цитокина IL15 в фекалиях. Лечение LCDG приводило к улучшению симптомов IBS, но различия по сравнению с плацебо не достигли статистической значимости. Не смотря на это, мы идентифицировали возможные биологические механизмы лечебного действия данного пробиотика у пациентов с IBS.

В связи с возрастающим количеством данных о роли дисбиоза в патофизиологии IBS,^{2,6} пробиотики оцениваются в качестве потенциального метода лечения этого заболевания. Пробиотики могут уменьшать абдоминальные симптомы и улучшать клиническое состояние у пациентов с IBS.^{7,8} Недавний метаанализ 43-х клинических исследований различных препаратов показал, что пробиотики улучшают общие симптомы IBS, такие как боль и метеоризм.⁸

Таблица 2. Бактериальные таксоны, популяция которых значимо изменялась пробиотиком (*Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572) или плацебо. Показана медиана относительной распространенности до (в исходной точке) и после лечения.

(a)

	Медиана относительной распространенности (%)				
	<i>p</i> -значен ие	<i>L. paracasei</i> CNCM 1-1572		Плацебо	
		Исходна я точка	После лечения	Исходн ая точка	После лечения
Семейство					
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae	0,022	0,01	0,34	0,01	0,02
Род					
p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaceae.g_Ruminococcus	0,042	4,44	3,94	5,25	5,62

p_Firmicutes.c_Clostridia.o_Clostridiales.f_Ruminococcaceae.g_Oscillospira	0,042	0,37	0,42	0,38	0,41
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus	0,011	0,01	0,34	0,01	0,02
(b)					
			Медиана относительной распространенности (%)		
Лечение <i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM 1-1572		<i>p</i> -значение	Исходная точка	После лечения	
Порядок					
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales		0,025	0,56	1,66	
Семейство					
p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Porphyrimonadaceae		<0,001	0,17	0,36	
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae		<0,001	0,01	0,34	
p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Barnesiellaceae		0,022	0,05	0,11	
Род					
p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Porphyrimonadaceae.g_Parabacteroides		0,013	0,17	0,36	
p_Firmicutes.c_Bacilli.o_Lactobacillales.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus		<0,001	0,01	0,34	
p_Bacteroidetes.c_Bacteroidia.o_Bacteroidales.f_Barnesiellaceae.g_неидентифицирован		0,049	0,05	0,11	
Лечение плацебо					
нет					

Значимые различия определены путем анализа многократных измерений с помощью критерия Фридмана (а) и критерия Вилкоксона-Манна-Уитни с коррекцией по методу Бенджамини-Хохберга (b). В анализ включены только таксоны с медианой относительной распространенности >0,1%. Показано происхождение каждого таксона: к: царство; р: тип; с: класс; о: отряд; f: семейство; g: род.

Несмотря на возможность существования нескольких механизмов лечебного действия пробиотиков, является неясным, изменяют ли они абдоминальные симптомы посредством прямой модуляции микробиоты или косвенно через иммунную систему кишечника, или другими путями.^{10,11} В нашем исследовании LCDG статистически не превосходил плацебо ни по одному из оцененных клинических показателей эффективности. Тем не менее, настоящее исследование являлось поисковым, поэтому оно не имело достаточной статистической мощности для оценки клинических конечных точек, предназначенных для идентификации основных механизмов лечебного действия данного пробиотика.

Мы показали, что LCDG значимо уменьшает популяцию *Ruminococcus*. У пациентов с IBS обнаружено увеличение популяции бактерий рода *Ruminococcus*.^{5,25-27} В связи с этим, наблюдавшаяся способность LCDG уменьшать относительную распространенность указанного таксона может считаться благоприятным для лечения IBS.

В частности, большинство последовательностей, связанных с *Ruminococcus* (~ 72%), мы распознали как виды *R. bromii* и *R. callidus*, которые недавно предложены в качестве потенциальных микробных биомаркеров для диагностики IBS (патент WO/2011/043654). Корреляционный анализ подтвердил предполагаемое доминирующее участие бактерий рода *Ruminococcus* в патогенезе IBS. Мы обнаружили, что относительная распространенность *Ruminococcus* отрицательно коррелирует с концентрацией основных SCFA в фекалиях человека (то есть ацетата, бутирата и пропионата), которые играют важную роль в поддержании кишечного гомеостаза.^{28,29} Соответственно, может существовать экологическая связь между значимым уменьшением популяции *Ruminococcus*, который является доминирующим родом микробиоты (медиана общей относительной распространенности ~5%), и увеличением концентрации бутирата и

ацетата после лечения LCDG.

Данные о микробной экологии кишечника, полученные в настоящем исследовании, согласуются с результатами предыдущего интервенционного исследования, в котором продемонстрирована способность LCDG модулировать концентрацию SCFA и популяцию отряда *Clostridiales* у здоровых взрослых добровольцев.¹³ Кроме того, обратная корреляция относительной распространенности рода *Oscillospira* отряда *Clostridiales*, которая модулировалась LCDG, но не плацебо, с частотой и консистенцией кала позволяет предположить, что активное лечение может регулировать физиологию кишечника.

Таблица 3. Концентрация короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) в фекалиях до и после лечения. Указаны медианы (\pm стандартное отклонение) до (в исходной точке) и после лечения. Значимые различия выделены жирным шрифтом и определены с помощью критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Лечение <i>L. paracasei</i> CNCM 1-1572	<i>p</i> -значение	Медиана относительной распространенности (ммоль/кг)	
		До	После
Ацетат	0,021	36,63 ($\pm 22,62$)	47,83 ($\pm 26,14$)
Пропионат	0,289	15,18 ($\pm 10,35$)	16,37 ($\pm 11,97$)
Бутират	0,047	5,99 ($\pm 8,30$)	10,52 ($\pm 8,51$)
Изобутират	0,133	1,11 ($\pm 0,98$)	1,55 ($\pm 1,13$)
Изовалерат	0,428	1,14 ($\pm 0,81$)	1,04 ($\pm 1,03$)
Валерат	0,080	1,82 ($\pm 1,43$)	2,45 ($\pm 1,34$)
Лечение плацебо			
Ацетат	0,388	43,06 ($\pm 26,65$)	33,08 ($\pm 26,70$)
Пропионат	0,622	16,73 ($\pm 10,51$)	17,13 ($\pm 8,89$)
Бутират	0,746	10,73 ($\pm 7,68$)	8,47 ($\pm 9,06$)
Изобутират	0,387	1,22 ($\pm 1,22$)	1,64 ($\pm 1,13$)
Изовалерат	0,36	0,95 ($\pm 1,12$)	1,28 ($\pm 1,22$)
Валерат	0,572	2,14 ($\pm 1,92$)	1,9 ($\pm 2,00$)

Мы измеряли концентрацию IL6, IL8, IL12, TNF- α и IFN- γ в фекалиях, которые являются типичными провоспалительными цитокинами Th-1, а также концентрацию регуляторных цитокинов TGF- β и IL10, способных подавлять воспалительные реакции.³⁰ В дополнение к своей хорошо известной провоспалительной роли, IL6 также обладает противовоспалительными свойствами, обусловленными его способностью стимулировать секрецию IgA.^{31,32} Эти данные могут объяснить, почему в нашем исследовании значимое уменьшение концентрации IL6 также сопровождалось уменьшением концентрации IgA в фекалиях после лечения LCDG, но не плацебо. IL15 вырабатывается эпителиальными клетками кишечника, а также способен стимулировать интраэпителиальные лимфоциты и их взаимодействие с энтероцитами.

Таблица 5. Нежелательные явления, развившиеся во время лечения исследуемым препаратом

Виды нежелательных явлений	Плацебо (n = 39)	<i>L. paracasei</i> CNCM 1-1572 (n = 40)
Нежелательные явления		
Головная боль	7 (17,9%)	10 (25,0%)
Инфекция верхних дыхательных путей	5 (12,8%)	4 (10,0%)
Диарея	3 (7,7%)	3 (7,5%)
Боль в животе	2 (5,1%)	3 (7,5%)

Астения	1 (2,6%)	3 (7,5%)
Тошнота	2 (5,1%)	1 (2,5%)
Диспепсия	2 (5,1%)	0 (0%)
Серьезные нежелательные явления	0 (0%)	0 (0%)

Нежелательные явления перечислены в порядке убывания частоты в группе *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572. Включены нежелательные явления, зарегистрированные у $\geq 2\%$ пациентов в любой из групп лечения.

Таблица 4. Анализы корреляции относительной распространенности бактериальных таксонов, модифицированной лечением *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572 (прогностических факторов), с клиническими параметрами, иммунологическими факторами и концентрацией SCFA в фекалиях (зависимыми переменными).

Род	Семейство	Частота стула	Форма кала (BSSF)	Боль в животе	IgA	IFN γ	TGF β	TNF α	Ацетат	Бутират	Пропионат	Лактат	Изобутират	Изовалерат	Валерат
<i>Lactobacillus</i>	Lactobacillaceae											++	+		
<i>Parabacteroides</i>	Porphyromonadaceae				+										
<i>Oscillospira</i>	Ruminococcaceae	++	++				+		++	++	++				
<i>Ruminococcus</i>	Ruminococcaceae					+	++		++	+	++				

BSSF: Бристольская шкала формы кала; IgA: иммуноглобулин A; IFN γ : интерферон гамма; TGF β : трансформирующий фактор роста бета; TNF α : фактор некроза опухоли альфа.

Цвета ячеек в таблице обозначают показатели R ранговой корреляции Спирмена (синий: отрицательные показатели R обозначают обратную корреляцию; красный: положительные показатели R обозначают прямую корреляцию). +: $p < 0,01$, ++: $p < 0,001$ в соответствии с ранговой корреляцией Кендалла.

IL15 играет основную роль в развитии нескольких воспалительных заболеваний, включая целиакию и IBD, влияющих на целостность барьера слизистой оболочки.³³ Значимое уменьшение концентрации IL15, наблюдавшееся в нашем исследовании после лечения LCDG, но не плацебо, позволяет предположить, что настоящий препарат может играть важную роль в восстановлении регуляции кишечника и целостности слизистой оболочки.^{33,34} Роль IL15 в патогенезе IBS должна быть установлена в специальных исследованиях.

Сильной стороной настоящего исследования является то, что мы использовали такие же строгие критерии, дизайн и конечные точки, как и в классических исследованиях фармакологической эффективности. Кроме того, как указано в недавно выпущенном руководстве¹¹, мы ранее продемонстрировали, что исследуемый микроорганизм присутствовал в фекалиях индивидуумов, которым вводился препарат,¹³ а в настоящем исследовании мы выяснили механизмы его лечебного действия у пациентов с IBS. Вместе с тем, мы признаем ограничения настоящего исследования. Мы ясно понимаем недостатки перекрестного дизайна, особенно в исследованиях пациентов с функциональными заболеваниями кишечника, но выбрали данный дизайн, так как он представлялся наиболее применимым в патофизиологических исследованиях, в которых конечные точки измеряются объективно. Кроме того, по причине поискового и механистического характера настоящего исследования объем выборки являлся недостаточным для оценки клинических конечных точек. Мы не показали какие-либо значимые различий между активным лечением и плацебо, но лучшие результаты были получены с помощью LCDG. Означает ли отсутствие значимых различий истинную неэффективность лечения или ошибку 2 рода, следует выяснить в специальных исследованиях. В заключение, ввиду всех

указанных причин, наши результаты требуют осторожности при обобщении и дальнейшего подтверждения.

Таким образом, несмотря на то, что причинно-следственная связь не доказана и сообщается только о наблюдавшихся ассоциациях, мы показали, что LCDG улучшает симптомы IBS, хотя и не статистически значимо, путем модуляции кишечной микробиоты, ее метаболических путей и провоспалительных цитокинов. В связи с тем, что статистически значимое влияние на симптомы IBS не обнаружено, необходимы дальнейшие исследования для определения роли LCDG в лечении IBS.

Выражение признательности

Все авторы утвердили окончательный вариант статьи и список авторов. Авторы выражают признательность Laura Patrucco, Gabriella Bartesaghi и Ruggero Rossi из компании «Софар С.п.А.» и Aldo Poli из компании «OPIS» за постоянную поддержку на всех этапах исследования, а также за помощь в подготовке рукописи. Мы выражаем признательность доктору Claudio Gardana за техническую помощь. Мы хотели бы поблагодарить Paul Kretzmer, доктора философии (PhD), управляющего директора компании «San Francisco Edit», Милл-Валли, Калифорния, США, за редактирование рукописи. Стоимость редактирования была возмещена компанией «Софар С.п.А.», Треццано-Роза, Милан, Италия.

Гарант статьи: профессор Giovanni Barbara

Авторский вклад: Giovanni Barbara, Vincenzo Stanghellini и Cesare Cremon составили план исследования, разработали протокол, участвовали в написании рукописи, а также в проведении скрининга и периодических визитов пациентов. Simone Guglielmetti участвовала в написании текста об анализе микробной экосистемы кишечника (IME). Simone Guglielmetti, Giorgio Gargari и Valentina Tavemiti проводили анализы IME, биоинформационный и статистический анализ данных IME, а также подготовку фекальных вод. Anna Maria Castellazzi, Chiara Valsecchi и Carlotta Tagliacame участвовали в разработке экспериментов, написании рукописи, а также измеряли концентрацию IgA и цитокинов. Walter Fiore участвовал в написании протокола и рукописи. Massimo Bellini, Lorenzo Bertani, Dario Gambaccini, Michele Cicala, Bastianello Germana, Maurizio Vecchi, Isabella Pagano, Maria Raffaella Barbara и Lara Bellacosa принимали участие в разработке экспериментов, а также в проведении скрининга и периодических визитов пациентов.

Заявление о конфликте интересов

Конфликт интересов не заявлен.

Утверждение комитетом по этике

Протокол утвержден независимым комитетом по этике в каждом центре (в частности, утвержден комитетом по этике госпиталя Св. Урсулы Мальпиги в Болонье 7 октября 2014 года, № утверждения 145/2014/O/Sper). Исследование проводилось в соответствии с положениями Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики.

Финансирование

Настоящее исследование финансировалось компанией «Софар С.п.А.» Треццано-Роза, Милан, Италия. Финансирующая организация не участвовала в разработке исследования, а также сборе, анализе, интерпретации данных и написании отчета.

Информированное согласие

Все пациенты предоставили письменное информированное согласие.

Список литературы

1. Lacy BE, Mearin F, Chang L, et al. Bowel disorders. *Gastroenterology* 2016; 150: 1393-1407.
2. Barbara G, Feinle-Bisset C, Ghoshal UC, et al. The intestinal microenvironment and functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2016; 150: 1305-1318.
3. Spiller R and Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 136: 1979-1988.
4. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in faecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011; 141: 1792-1801.

5. Jalanka-Tuovinen J, Salojarvi J, Salonen A, et al. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2014; 63: 1737-1745.
6. Simren M, Barbara G, Flint HJ, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. *Gut* 2013; 62: 159-176.
7. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review. *Gut* 2010; 59: 325-332.
8. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, et al. Efficacy of pre- biotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 1547-1561.
9. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, et al. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011; 364: 22-32.
10. Hill C, Guamer F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-514.
11. Irvine EJ, Tack J, Crowell MD, et al. Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2016; 150: 1469-1480.
12. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; 128: 541-551.
13. Ferrario C, Taverniti Y, Milani C, et al. Modulation of faecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with Lactobacillus paracasei DG varies among healthy adults. *J Nutr* 2014; 144: 1787-1796.
14. 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.
15. 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.
16. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491.
17. Zigmond AS and Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983; 67: 361-370.
18. Ware J Jr, Kosinski M and Keller SD. A 12-Item Short- Form Health Survey: Construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 1996; 34: 220-233.
19. Gargari G, Taverniti V, Balzaretto S, et al. Consumption of a Bifidobacterium bifidum strain for 4 weeks modulates dominant intestinal bacterial taxa and faecal butyrate in healthy adults. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 5850-5859.
20. Duranti S, Gaiani F, Mancabelli L, et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: Bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol Ecol* 2016; 92: pii: fiw191.
21. Avanzini MA, Plebani A, Monafò V, et al. A comparison of secretory antibodies in breast-fed and formula-fed infants over the first six months of life. *Acta Paediatr* 1992; 81: 296-301.
22. Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, et al. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2014; 146: 67-75.e5.
23. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1988.
24. Armitage P and Hills M. The two-period crossover trial. *Statistician* 1982; 31: 119-131.
25. Taverniti V and Guglielmetti S. Methodological issues in the study of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 8821-8836.
26. Rajilic-Stojanovic M, Jonkers DM, Salonen A, et al. Intestinal microbiota and diet in IBS: Causes, consequences, or epiphenomena? *Am J Gastroenterol* 2015; 110: 278-287.
27. Rigsbee L, Agans R, Shankar V, et al. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1740-1751.
28. Correa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology* 2016; 5: e73.
29. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol* 2016; 7: 185.
30. Abraham C and Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-2078.
31. Fagarasan S and Honjo T. Intestinal IgA synthesis: Regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 63-72.
32. Goodrich ME and McGee DW. Preferential enhancement of B cell IgA secretion by intestinal epithelial cell- derived cytokines and interleukin-2. *Immunol Invest* 1999; 28: 67-75.
33. van Heel DA. Interleukin 15: Its role in intestinal inflammation. *Gut* 2006; 55: 444—445.
34. Pagliari D, Cianci R, Frosali S, et al. The role of IL15 in gastrointestinal diseases: A bridge between innate and

adaptive immune response. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24: 455-166.