

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE



Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute

“Vincenzo Tiberio”

Settore Scientifico Disciplinare MED/07

Microbiologia e Microbiologia Clinica

Dottorato in Scienze per la Salute

XXVIII Ciclo

Anno 2014/2015

Potenzialità immunomodulanti di *Akkermansia muciniphila* in modelli animali di inflammatory bowel disease (IBD)

COORDINATORE DOTTORATO

CHIAR.MO PROFESSORE

GUIDO MARIA GRASSO

RELATORE

CHIAR.MO PROFESSORE

ROBERTO DI MARCO

CANDIDATA

VALENTINA RUSSO

INDICE

MICROBIOTA INTESTINALE.....	3
Ageing (variazione della composizione microbica intestinale nella vita).....	6
Variazioni quali-quantitative nei diversi segmenti del tubo digerente.....	7
FUNZIONI DEL MICROBIOTA.....	9
Regolazione microbica dell'omeostasi immunitaria intestinale.....	11
Ruolo dell'immunità innata nel mantenimento dell'omeostasi.....	13
COMMENSALI ANAEROBI.....	16
<i>AKKERMANSIA MUCINIPHILA</i>	19
Possibile associazione tra <i>Akkermansia muciniphila</i> ed alcune patologie immuno- infiammatorie.....	22
DISBIOSI.....	23
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD).....	24
Immunologia delle IBD.....	26
Morbo di Crohn.....	29
Colite ulcerosa.....	31
SCOPO DELLA TESI.....	34
MATERIALI E METODI.....	37
Ceppi microbici utilizzati e modalità di coltivazione.....	37
Prove fermentative.....	37
Prove enzimatiche.....	38
Antibiogramma.....	39
Primo modello animale: ratti Wistar.....	40
Trattamento con <i>Akkermansia muciniphila</i>	41
Induzione della colite sperimentale con DSS.....	42
Misurazione della lunghezza e del peso del colon.....	42
Analisi genetica delle feci.....	42

Saggio dei livelli sierici dell'interleuchina-6.....	44
Secondo modello animale: topi CD1	44
Misurazione della lunghezza e del peso del colon.....	45
Analisi dell'attività mieloperossidasi.....	45
Estrazione dell'RNA	46
Preparazione del cDNA (RT-PCR).....	48
Analisi delle citochine pro-infiammatorie.	50
Estrazione diretta del DNA da prelievi di muco intestinale	52
Individuazione del DNA genomico di <i>A. muciniphila</i> nell'uomo.....	53
Analisi statistica	54
RISULTATI	55
Prove delle attività fermentative	55
Prove delle attività enzimatiche	56
Antibiogramma	57
Stato clinico dei ratti Wistar.....	59
Misurazione del colon.....	60
Analisi genetica delle feci	61
Livelli sierici di interleuchina-6.....	62
Stato clinico dei Topi CD1.....	62
Attività mieloperossidasi.....	64
Misurazione del colon.....	65
Livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie	66
Individuazione del DNA di <i>A. muciniphila</i> nei liquidi di lavaggio	67
CONCLUSIONI.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	70

INTRODUZIONE

MICROBIOTA INTESTINALE

L'intestino è l'organo più esteso e più importante del nostro organismo in quanto svolge la fondamentale funzione di trasformazione e metabolizzazione dei vari alimenti, secerne una grande quantità e varietà di ormoni volti a influenzare la fisiologia del nostro organismo ed è in grado di pilotare gran parte delle attività vitali del corpo umano grazie alla sua vasta microflora intestinale autoctona (microbiota).

Negli ultimi decenni, la crescente mole di ricerche e di lavori clinici effettuati hanno ampliato le conoscenze sulle funzioni dell'intestino allargando, in particolar modo, l'attenzione alla microflora intestinale, le cui dimensioni ed attività ne fanno un vero e proprio organo metabolicamente attivo, molto importante per la salute del nostro organismo.

Un rivalutato e sempre più considerato dalla recente bibliografia medica è il concetto di "ecosistema intestinale": con esso si intende l'insieme delle funzioni e delle interazioni tra la barriera mucosale, il sistema immunitario locale e la microflora intestinale.

Il microbiota intestinale rappresenta il più complesso ecosistema presente in natura ed è costituito da 10^{13} – 10^{14} cellule per contenuto intestinale e come numero supera di 10 volte le cellule dell'organismo umano (*Savege 1977*).

Alcuni considerano il microbiota intestinale un vero e proprio "organo" microbico umano, il cui corredo genetico è rappresentato dall'insieme dei geni presenti nel genoma umano e nel genoma del microbiota intestinale (microbioma) (*Gill et al. 2006*).

Questo complesso sistema consiste in diverse comunità, le quali sono dominate da batteri, ma che comprendono anche archea, eucarioti (come per esempio funghi e protozoi) e virus. Con un incremento del numero degli studi di

metagenomica intrapresi negli ultimi anni, il microbiota intestinale viene spesso caratterizzato sulla base del suo contenuto genetico. Proprio alcuni studi di metagenomica hanno dimostrato la predominanza di geni batterici nel microbiota (99%) rispetto a geni appartenenti ad eucarioti, archea e virus (*Qin et al. 2010*).

Il numero delle specie batteriche all'interno del microbiota intestinale umano è stato spesso stimato in un range che spazia da 500 a più di 1000 specie (*Claesson et al. 2009*). A causa della loro natura anaerobica, la maggior parte dei ceppi batterici dell'intestino sono difficili da coltivare con le tecniche standard di laboratorio. Tuttavia i progressi delle tecniche di biologia molecolare, inclusi il sequenziamento dell'rRNA 16S e la metagenomica, sono stati cruciali nell'identificazione della bio-diversità del microbiota intestinale (*Qin et al. 2010*). Molte delle specie batteriche che colonizzano l'intestino umano appartengono ai phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, mentre le specie dei phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* esistono in numero meno elevato (*Eckburg et al. 2005*).

Considerato che la dieta dell'ospite, le abitudini culturali e lo status socio-economico certamente influenzano e diversificano la composizione del microbiota, si può oggi notare una rilevante variazione quali-quantitativa della microflora intestinale tra le persone.

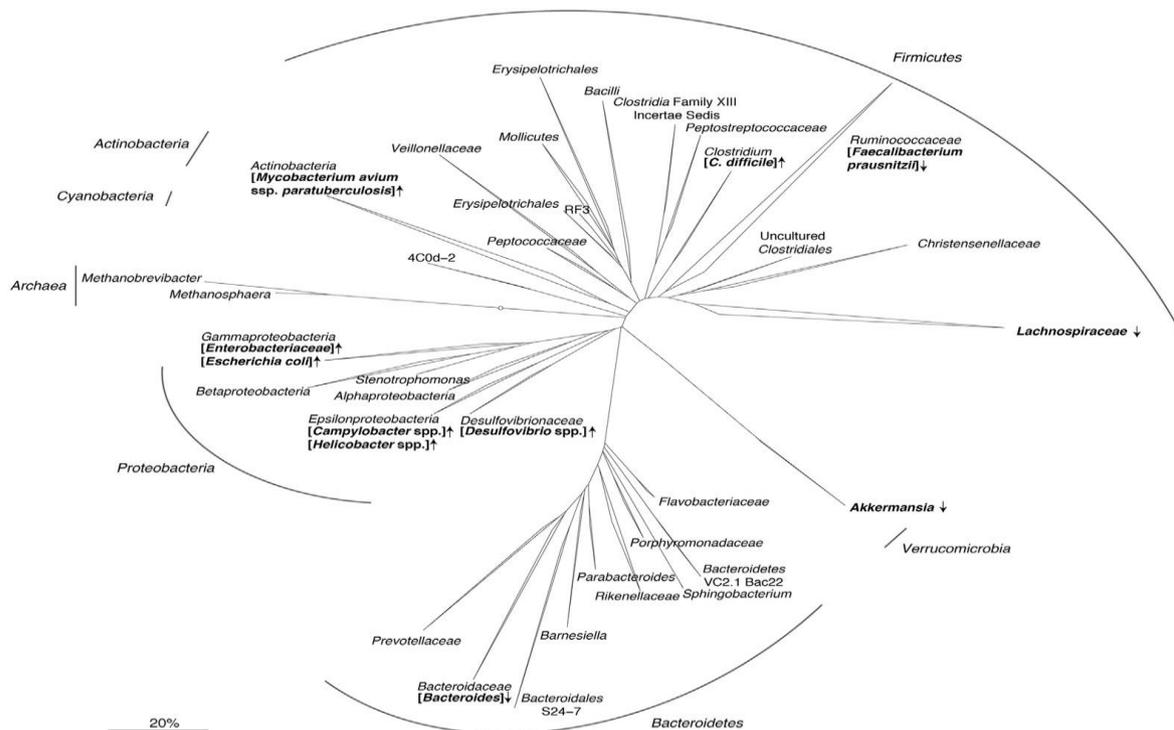


Fig. 1: Albero filogenetico dei regni *Bacteria* e *Archea* costruito sulla base di geni della subunità 16S dell'RNA ribosomiale identificati nel microbiota dell'intestino umano (Barry et al. 2013)

La complessità delle interazioni che si vengono a creare all'interno dell'intestino e la molteplicità delle specie microbiche presenti in natura, rendono unico il microbiota di ogni singolo individuo, al punto di renderlo quasi paragonabile ad una impronta digitale.

La popolazione microbica, costituita da membri autoctoni o "residenti" ed altri alloctoni, derivanti cioè dall'ingestione di cibo ed acqua con la dieta o da altre componenti esterne, rendono questo ecosistema estremamente dinamico. La composizione del microbiota, però, può variare nel corso degli anni a seguito di trattamento antibiotico, modificazioni della dieta o diarrea acuta.

La relazione che si instaura tra ospite e microbo è stata spesso definita come commensale, ossia solo uno dei due partner trae beneficio da questa interazione, mentre è più veritiero definire questo rapporto di tipo simbiotico o mutualistico, ossia entrambi i partner traggono beneficio dal rapporto instaurato. La dieta sembra essere un fondamentale fattore di influenza sulla

composizione della microflora intestinale, anche se i diversi studi condotti non sono riusciti ancora a stabilire una correlazione certa a causa dell'ampia variazione riscontrata da persona a persona (*Maier et al 2015*).

Ageing (variazione della composizione microbica intestinale nella vita)

Il microbiota intestinale umano si sviluppa subito dopo la nascita, quando l'intestino del neonato, ancora sterile, viene colonizzato da microrganismi di origine materna e ambientale.

La composizione e lo sviluppo del microbiota intestinale del neonato dipendono da molti fattori, quali tipologia del parto (naturale o parto cesareo), allattamento (al seno o artificiale), eventuali trattamenti terapeutici (antibiotici), livello di igiene e patrimonio genetico individuale (*Fanaro et al. 2003*).

La flora di bambini nati con taglio cesareo è caratterizzata dalla mancanza (o minore frequenza) di batteri anaerobi. Tra gli aerobi si riscontrano lattobacilli, streptococchi, stafilococchi e coliformi. Microrganismi microaerofili, anaerobi facoltativi, che formano spore, come *Clostridium*, colonizzano generalmente il parto cesareo. Invece, coloro nati con parto naturale o eutocico presentano una flora intestinale ricca di anaerobi stretti, soprattutto durante la prima settimana di vita, come lattobacilli, batteroidi, eubatteri, pepto-streptococchi, bifidobatteri e clostridi (*Hallstrom et al. 2004*).

Poiché il latte materno contiene quantità di batteri non patogeni, il microbiota intestinale dei neonati allattati al seno comprende soprattutto *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* e *Staphilococcus* (*Stark et al. 1982*). Per questo, i neonati allattati al seno presentano minor frequenza di infezioni intestinali rispetto ai neonati allattati artificialmente, nei quali sono presenti diversi microrganismi quali bifidobatteri, batteroidi, fusobatteri e cocchi (*Favier et al. 2002*).

Al termine del primo anno di vita, il microbiota intestinale dei bambini appare in genere caratterizzato da una prevalenza di *Bacteroides* e *Firmicutes*, dalla presenza di *Verrucomicrobia* e da una scarsità di *Proteobacteria* o batteri aerobi Gram-negativi.

Recenti studi hanno dimostrato che il microbiota intestinale umano varia in funzione dell'età (Mariat et al. 2009). A differenza del microbiota intestinale adulto, la microflora neonatale risulta più variabile in composizione e meno stabile nel tempo. In linea generale si può affermare che bifidobatteri, *Escherichia coli* e *Streptococcus spp.* sono i microrganismi maggiormente presenti in età neonatale, mentre i lattobacilli sono presenti in quantità minori. Nella fase adolescenziale, negli adulti e negli anziani si assiste ad una stabilizzazione della composizione microbica intestinale, che vede ancora presenti bifidobatteri, lattobacilli e, in misura ridotta rispetto all'età neonatale, *Escherichia coli* e streptococchi. Si assiste contemporaneamente alla comparsa di altri generi, quali *Eubacterium*, *Bacteroidaceae* e *Peptococcaceae*, che aumentano con il progredire dell'età, mentre *Clostridium perfringens*, presente in basse quantità in età adolescenziale ed adulta, tende ad aumentare nella composizione della microflora intestinale dell'anziano (Hopkins e Macfarlane, 2002).

Variazioni quali-quantitative nei diversi segmenti del tubo digerente.

La composizione e la densità dei batteri cambia lungo il tratto gastro-intestinale degli individui sani.

A livello di quantità, il numero di batteri cresce da 10^3 a 10^5 batteri per millilitro nel contenuto luminale dello stomaco e del duodeno fino ad arrivare a 10^9 e

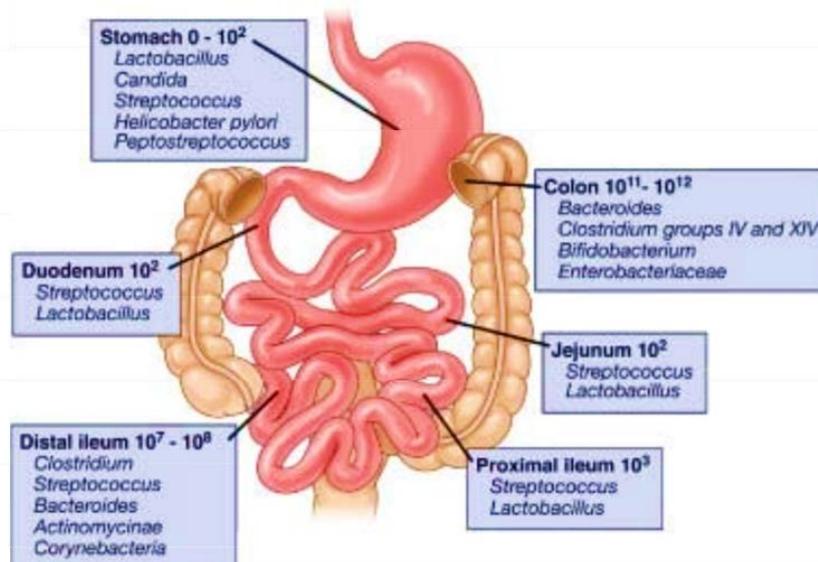


Fig. 2: Composizione e concentrazioni delle specie microbiche facenti parte del microbiota nel tratto gastro-intestinale

10^{12} per millilitro nell'ileo e nel colon rispettivamente (Artis et al. 2008; Wells et al. 2010).

Parlando invece in termini qualitativi, la diversità batterica aumenta dalla sede prossimale a quella distale del tratto gastro-intestinale. Lo stomaco è spesso colonizzato da specie di *Helicobacter* e meno da *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Rothia*, il quale è un genere all'interno della famiglia *Actinomycetaceae* (Hollister et al. 2014; Georg et al. 1967).

I generi *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e i membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* sono i maggiori costituenti del microbiota nell'intestino tenue (Brown et al. 2013).

A livello del colon la composizione del microbiota è molto diversa e quest'ultimo viene di solito considerato un'entità omogenea, che mostra, però, considerevoli variazioni tra gli individui.

In aggiunta alle differenze nella composizione del microbiota tra le parti prossimali e distali del tratto gastro-intestinale, composizioni microbiche distinte esistono nel lumen e nella mucosa (Eckburg et al. 2005; Zoetendal et al. 2002). Però occorre precisare che le conoscenze riguardo al microbiota

associato alla mucosa restano limitate perché richiedono metodi invasivi per il campionamento. (*Ouwerkerk et al. 2013*).

Le analisi delle comunità microbiche dei differenti siti mucosali del colon (cieco, colon ascendente, colon trasversale, colon discendente, colon sigmoidale e retto) suggeriscono un pattern variegato ed eterogeneo nella distribuzione dei batteri mucosali lungo il corso del colon, che potrebbe indicare l'esistenza di nicchie microanatomiche (*Eckburg et al. 2005*).

In generale, il microbiota mucosa-associato comprende un'alta abbondanza di *Firmicutes* rispetto ai *Bacteroidetes* (*Hong et al. 2011*).

Sebbene alcuni batteri degradanti la mucina aumentino di numero durante l'infiammazione, il che suggerisce un loro contributo nella patogenesi della malattia, essi sono anche parte del microbiota mucosa-associato nell'uomo sano (*Png et al. 2010*). Le specie descritte come specializzate nel degradare la mucina includono commensali predominanti come *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Akkermansia muciniphila*, entrambi associati ad effetti protettivi *in vivo* ed *in vitro* (*Martens et al. 2008; Derrien et al. 2004; Kelly et al. 2004; Everard et al. 2013*).

FUNZIONI DEL MICROBIOTA

La diversità microbica nel tratto gastro-intestinale umano è il risultato di una co-evoluzione tra le comunità microbiche e i loro ospiti (*Chow et al. 2010*).

Differenti aspetti della salute umana dipendono largamente dai benefici simbiotici della relazione ospite-microbo, inclusi la risposta ai nutrienti e l'immunità (*Maier et al 2015*).

Il microbiota intestinale agisce come un vero e proprio “organo metabolico” che interagisce con l’ospite umano e svolge molte funzioni essenziali per mantenere l’uomo in buona salute (*Tremaroli et al. 2012*).

Grazie alle funzioni metaboliche svolte dal microbiota intestinale, l’ospite è in grado di utilizzare molte fonti energetiche, come quelle derivanti dalla rottura di complessi non digeribili di carboidrati e proteine introdotti con la dieta. Inoltre, i batteri intestinali sono in grado di influenzare l’assorbimento di ioni, sono coinvolti nella conversione di componenti polifenolici, sintetizzano vitamine (per esempio vitamine K e B12), acido folico, amminoacidi e acidi grassi a catena corta (SCFAs) come acetato, butirrato e propionato (*Russel et al. 2013*). Il butirrato, in particolare, riveste una funzione centrale come principale fonte di energia per i colonociti. In più, il butirrato esercita proprietà anti-infiammatorie. Per esempio, è in grado di ridurre l’espressione delle citochine pro-infiammatorie in campioni biopsici di colon e in cellule mononucleari della lamina propria isolate da pazienti affetti da morbo di Crohn (*Segain et al. 2000; Celasco et al. 2014*).

Un’ulteriore funzione dei membri del microbiota riguarda la prevenzione della colonizzazione della mucosa da parte dei patogeni. Questo effetto è spesso chiamato “resistenza alla colonizzazione” ed è ottenuto attraverso diversi meccanismi come la competizione per i nutrienti ed i siti di legame oppure attraverso la produzione di batteriocine (*Van der Waaij et al. 1971; Chung et al. 2012*).

I microrganismi appartenenti al microbiota contribuiscono anche a preservare l’integrità dell’intestino, mantenendo integre le “cell junctions”, promuovendo il riparo dell’epitelio ferito e giocando un ruolo nella regolazione del turn-over degli enterociti (*Savage et al. 1981*).

In aggiunta, la colonizzazione del tratto gastro-intestinale da parte dei batteri è necessaria per il normale sviluppo post-natale dello stesso. Questo è stato dimostrato in esperimenti che hanno utilizzato animali germ-free, i quali sono

stati fatti crescere in isolamento per prevenire la colonizzazione del tratto gastro-intestinale e delle altre superfici del corpo da parte di microrganismi presenti nell'ambiente (*Macpherson et al. 2004; Smith et al. 2007*). Gli studi hanno dimostrato che lo sviluppo del tratto gastro-intestinale è compromesso in questi animali (*Gordon et al. 1961; Savage et al. 1981; Alam et al. 1994; Alam et al. 1995*).

Tra l'altro, il microbiota autoctono regola l'angiogenesi intestinale, come dimostra l'arresto della formazione della rete dei capillari in topi adulti germ-free (*Stappenbeck et al. 2002*).

Regolazione microbica dell'omeostasi immunitaria intestinale

La funzione più importante rivestita dai batteri commensali è rappresentata dalla loro interazione con il sistema immunitario. La colonizzazione batterica è fondamentale nello sviluppo e nella funzione del sistema immunitario e contribuisce a mantenere l'omeostasi nel tratto gastro-intestinale.

L'importanza cruciale del microbiota nel tratto gastro-intestinale nello sviluppo della mucosa e del sistema immunitario sistemico è ampiamente apprezzato grazie a studi eseguiti su animali germ-free (*Sekirov et al. 2010*).

L'assenza di microrganismi negli animali germ-free è stata associata con un ridotto sviluppo del sistema immunitario rispetto agli animali convenzionali. Per esempio, i topi germ-free hanno piccole placche di Peyer, aggregati linfoidi presenti nell'intestino (*Hooper et al. 2014*). In più, i topi germ-free hanno un ridotto numero di cellule T CD4⁺ e di immunoglobuline A prodotte dalle cellule B nella lamina propria rispetto agli animali con microbiota normale (*Helgeland et al. 1996; Macpherson et al. 2001*).

Le differenze tra gli animali germ-free e quelli convenzionali non si limitano solo al sistema immunitario. Gli animali germ-free mostrano anche uno

sviluppo compromesso delle strutture sistemiche linfatiche con una riduzione delle cellule B e T nella milza e nei linfonodi periferici (*Bauer et al. 1963*).

Il microbiota è essenziale per lo sviluppo delle funzioni del sistema immunitario, interessando sia l'immunità innata che quella adattativa e promuovendo l'immunità regolatoria sulla superficie dell'intestino.

Esistono diversi adattamenti regolatori per mantenere la relazione simbiotica tra gli uomini e il loro microbiota intestinale (*Cahenzli et al. 2013*). In un intestino sano, questi adattamenti prevengono un'attivazione costante del sistema immunitario da parte dei batteri commensali e degli antigeni del cibo, ma allo stesso tempo consentono di difendersi contro i patogeni.

La popolazione di cellule immunitarie e le loro rispettive funzioni variano molto tra la parte superiore e quella inferiore del tratto gastro-intestinale, come riportato recentemente (*Mowat et al. 2014*). La risposta immunitaria all'interno dell'intestino tenue si concentra sulla difesa contro i patogeni e la tolleranza verso gli antigeni alimentari.

All'interno del colon, considerato il vasto incremento della densità microbica, la risposta immunitaria è, invece, focalizzata verso la prevenzione della risposta infiammatoria contro il microbiota commensale.

Lo strato più spesso di muco nel colon, comparato con quello dell'intestino tenue, fornisce una barriera fisica per prevenire l'entrata dei batteri nell'epitelio. In più, il grande numero di immunoglobuline A prodotte dalle plasmacellule e l'interleuchina-10 (IL-10) prodotta dai macrofagi e dalle cellule T nel colon, dimostrano l'importanza della funzione immunitaria regolatoria all'interno di questa parte del tratto gastro-intestinale (*Mowat et al. 2014*).

Ruolo dell'immunità innata nel mantenimento dell'omeostasi

I batteri nel lumen intestinale sono riconosciuti dalle cellule epiteliali intestinali (IEC) e dalle cellule dell'immunità attraverso l'espressione di pattern di recettori di riconoscimento (PRRs). Questi recettori riconoscono strutture comuni sulla superficie dei microbi, cioè pattern molecolari microbo-associati (PAMPs o MAMPs), che sono strutture presenti sia sui patogeni che sui microbi commensali (*Wells et al. 2010*).

I PRRs comprendono diverse famiglie di recettori, anche se quelle meglio rappresentate sono i TLRs e i NOD-like receptors. Alcuni dei 13 TLRs trovati ad oggi nei topi e negli umani sono localizzati nelle membrane cellulari, altri nelle membrane endosomiali, per riconoscere MAMPs extracellulari e endocellulari rispettivamente (*Wells et al. 2011*).

I TLR2, 4, 5 e 9 riconoscono le strutture comuni dei batteri e dei funghi, mentre i TLR3, 7 e 8 sono principalmente coinvolti nell'individuazione dei virus. Un esempio rilevante di MAMP è il lipopolisaccaride (LPS), che rappresenta una parte importante della parete cellulare dei batteri Gram-negativi (*Raetz et al. 2002*), come i *Proteobacteria*, che stimola il TLR4. Altri esempi sono il peptidoglicano, che si trova nella parete dei batteri Gram-positivi, e la flagellina, che viene prodotta ovviamente dai batteri provvisti di flagello, che portano alla stimolazione rispettivamente del TLR2 (*Ozinsky et al. 2000*) e del TLR5 (*Feuillet et al. 2006*).

La stimolazione del TLR innesca a valle una cascata di segnali che porta all'attivazione di fattori di trascrizione che inducono il rilascio di citochine pro-infiammatorie e chemochine, risultando nell'induzione di una risposta immunitaria infiammatoria contro i patogeni (*Wells et al. 2010*).

Visto che il segnale TLR è critico nella difesa innata contro i patogeni, la costante attivazione del sistema immunitario del tratto gastro-intestinale per il riconoscimento del microbiota residente sarebbe patologico. Per questo motivo,

l'ospite deve essere in grado di distinguere tra i commensali e i patogeni e bilanciare immunità e tolleranza (*Maier et al 2015*).

Questo in parte è realizzato attraverso la regolazione dell'espressione e la distribuzione dei PRRs nel tratto gastro-intestinale (*Wells et al. 2010; Wells et al. 2011*). Per esempio, le IEC esprimono bassi livelli di TLR2 e TLR4 in condizioni di salute, riflettendo uno dei meccanismi alla base della bassa risposta immunitaria verso i batteri commensali (*Abreu et al. 2001; Melmed et al. 2003*).

Le differenze nell'espressione di PRRs tra la superficie apicale e quella basolaterale delle IEC rappresentano un altro modo per distinguere i batteri patogeni dai commensali (*Gewirtz et al. 2001*).

Nonostante questi meccanismi per ridurre il segnale del TLR nell'intestino sano, sta diventando sempre più evidente che un livello basale del segnale del TLR, indotto dal microbiota luminale, contribuisce all'omeostasi (*Rakoff-Nahoum et al. 2004; Lee et al. 2006*).

Recenti studi hanno, quindi, dimostrato un più complesso ruolo per le IEC rispetto alla semplice formazione di una barriera fisica tra il lumen e il tessuto sottostante, perché le cellule epiteliali intestinali mantengono l'omeostasi immunitaria attraverso la percezione dell'ambiente microbico circostante tramite l'espressione dei PRRs e la successiva regolazione delle funzioni delle cellule che presentano l'antigene e dei linfociti (*Wells et al. 2011; Artis et al. 2008*).

La funzione delle IEC è fortemente influenzata dai batteri commensali, i quali sono in grado di modulare attivamente il segnale di queste cellule (*Artis et al. 2008*). Questa modulazione fornisce un meccanismo per i batteri commensali per essere riconosciuti dalle IEC senza attivare una risposta immunitaria pro-infiammatoria e quindi permettendo la co-esistenza degli uomini e del loro microbiota intestinale (*Wells et al. 2010*).

Alcuni batteri commensali sono in grado di inibire direttamente l'attivazione di Nf-kB PRR-mediata (Kelly et al. 2004; Neish et al. 2000). In condizioni stazionarie, questo fattore di trascrizione è legato al suo inibitore IκB, il quale previene la sua traslocazione nucleare. La classica attivazione di Nf-kB, seguendo la stimolazione del recettore, è ottenuta attraverso la fosforilazione, l'ubiquitinazione e la degradazione proteasomale di IκB, risultando nella traslocazione di Nf-kB all'interno del nucleo, dove attiva la trascrizione di citochine infiammatorie e chemochine (Tripathi et al. 2006).

Esperimenti con ceppi non virulenti di *Salmonella* hanno mostrato che questi batteri commensali inibiscono il pathway di ubiquitinazione e successiva degradazione di IκB, quindi prevengono l'attivazione di Nf-kB e mantengono una bassa risposta epiteliale nei confronti del microbiota luminale (Neish et al. 2000).

Anche i metaboliti derivanti dai batteri commensali sono conosciuti come modulatori della risposta immunitaria innata, fornendo un altro meccanismo per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria intestinale e della tolleranza. Un esempio è dato dal butirrato, una corta catena di acido grasso e uno dei principali prodotti finali della fermentazione delle fibre alimentari da parte dei batteri intestinali, che rappresenta la maggiore fonte di energia per le IEC, ma può esercitare direttamente effetti immunomodulatori e anti-infiammatori (Hamer et al. 2008). Il butirrato inibisce l'attività dell'istone deacetilasi e così sopprime l'attività proteasomica attraverso la riduzione dei livelli di espressione di alcune subunità del proteasoma. Questo risulta nell'inibizione della degradazione proteasomale di IκB e conseguentemente limita l'attivazione di Nf-kB (Place et al. 2005).

Inoltre, il riconoscimento dei batteri commensali da parte delle IEC scatena la produzione di diverse molecole immunoregolatorie, per esempio la lipoproteina timica stromale (TSLP) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) (Rimoldi et al. 2005; Zeuthen et al. 2008). Questi segnali, uno alla

volta, promuovono lo sviluppo delle cellule immunitarie mucosali con proprietà tolerogeniche. Questo cross-talk tra batteri commensali, IEC e cellule immunitarie è importante per il mantenimento dell'omeostasi e il contenimento dell'infiammazione incontrollata nel tratto gastro-intestinale (*Peterson et al. 2014*).

COMMENSALI ANAEROBI

Il ruolo centrale della colonizzazione microbica nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria è ben conosciuto, ciò nonostante, sono ancora limitate le conoscenze riguardo i contributi che derivano dalle specie batteriche anaerobie obbligate. Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti immunomodulatori dei commensali e dei lattobacilli probiotici (*Wells et al. 2011; Van Baarlen et al. 2013*) che caratterizzano la parte superiore del tratto gastro-intestinale, a danno degli studi su altri batteri, specialmente quelli anaerobi obbligati che predominano il colon, la parte del tratto gastro-intestinale con la più alta densità batterica. Oltre il 99% delle specie batteriche residenti nell'intestino crasso sono batteri anaerobi obbligati, quindi la maggior parte degli effetti del microbiota resta sconosciuta (*Eckburg et al. 2005*).

Le difficoltà tecniche sono state un fattore limitante nel ricercare le interazioni ospite-microbo. I batteri ossigeno-tolleranti come i lactobacilli possono essere coltivati insieme alle cellule umane per consentire lo studio del meccanismo d'azione alla base degli effetti di questi batteri. Invece, i batteri anaerobi obbligati non possono sopravvivere in presenza di ossigeno e quindi è impossibile coltivare questi batteri insieme alle cellule intestinali in sistemi convenzionali. Di conseguenza, è poco conosciuto il meccanismo di azione dietro gli effetti dei commensali anaerobi obbligati, il che significa che gli

effetti della maggior parte del microbiota intestinale resta sconosciuto (*Maier et al. 2015*).

L'uso di tecniche high-throughput (tecniche ad alto rendimento) e di tecniche di sequenziamento di nuova generazione ha rapidamente aumentato le conoscenze sul microbiota intestinale e sul suo significato in individui sani e malati (*Neef et al. 2013*). In aggiunta, diversi studi hanno mostrato che la disbiosi è associata a patologie che comprendono le infiammazioni croniche dell'intestino e che proprio in queste patologie si verifica un decremento nell'abbondanza di alcune specie batteriche (*Frank et al. 2007; Manichanh et al. 2006; Mondot et al. 2011; De Palma et al. 2010*). È stato quindi ipotizzato, basandosi su risultati di studi *in vivo* e *in vitro*, che queste specie batteriche hanno un effetto positivo sulla salute umana. Prese insieme, queste informazioni potrebbero condurre verso lo sviluppo di un nuovo concetto di probiotico, che riguarda, al momento, principalmente batteri acido lattici, includendo una selezione di ceppi di nuova generazione partendo dai batteri endogeni (*Neef et al. 2013*).

Alcuni batteri commensali anaerobi obbligati che potrebbero esercitare effetti benefici sulla salute umana, attraverso meccanismi immunomodulatori sono: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* e *Akkermansia muciniphila*.

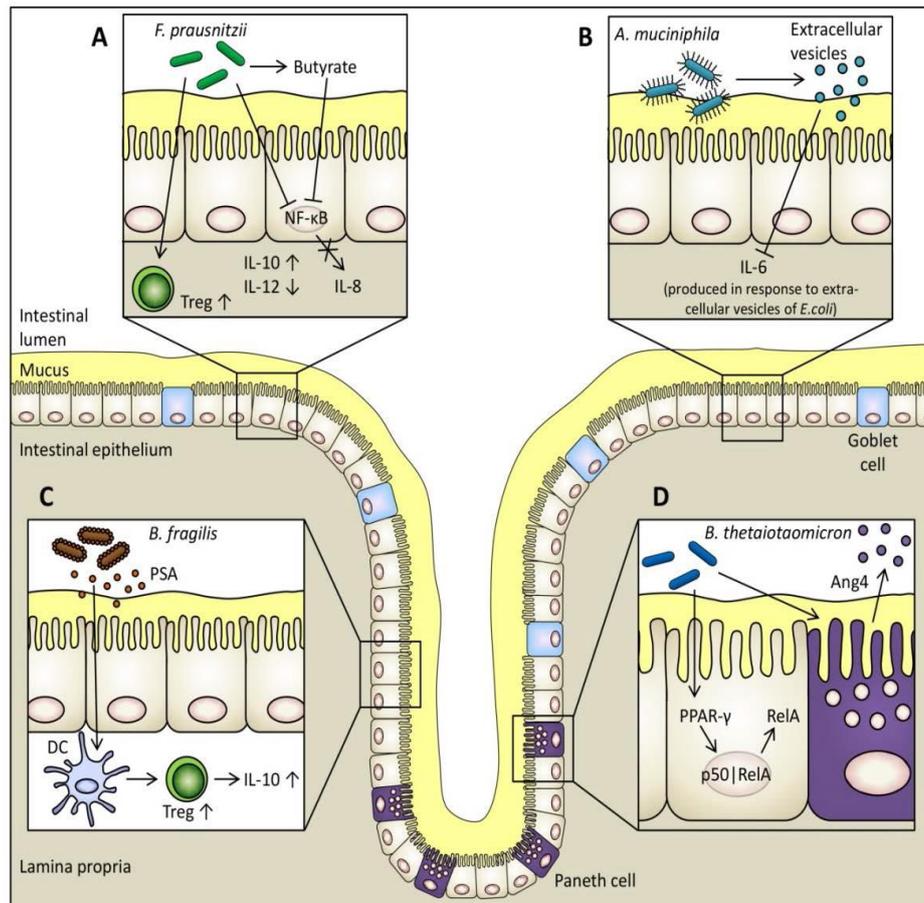


Fig. 3: Meccanismi immunomodulatori di quattro batteri commensali anaerobici obbligati: **A.** Il surnatante di *F. prausnitzii* blocca l'attivazione del fattore di trascrizione Nf-κB, il quale inibisce la produzione della citochina IL-8 pro-infiammatoria da parte delle cellule epiteliali intestinali (Sokol et al. 2008). *F. prausnitzii* è uno dei maggiori produttori di butirato nell'intestino crasso (Place et al. 2005). Inoltre, *F. prausnitzii* aumenta la differenziazione delle cellule T regolatorie (Treg) (Qiu et al. 2013) e la produzione dell'interleuchina 10 anti-infiammatoria da parte delle cellule mononucleari del sangue e diminuisce la produzione dell'interleuchina 12 pro-infiammatoria (Sokol et al. 2008; Qiu et al. 2013). **B.** Le vescicole extra-cellulari prodotte da *A. muciniphila* bloccano la produzione dell'interleuchina 6 da parte delle cellule epiteliali del colon in risposta alle vescicole extra-cellulari prodotte da *E. coli* (Kang et al. 2013). **C.** Una molecola superficiale di *B. fragilis*, il polisaccaride A (PSA), esercita funzioni immunomodulatorie all'interno del tratto gastro-intestinale. Il PSA è riconosciuto dalle cellule dendritiche, le quali inducono un incremento della produzione delle cellule T regolatorie e dell'interleuchina 10 anti-infiammatoria (Mazmanian et al. 2008; Shen et al. 2012). **D.** *B. thetaiotaomicron* causa l'esportazione nucleare della subunità di Nf-κB, trascrizionalmente attiva, chiamata RelA nelle cellule epiteliali intestinali, la quale attenua l'espressione delle citochine pro-infiammatorie (Kelly et al. 2004).

AKKERMANSIA MUCINIPHILA

Come detto in precedenza il tratto gastro-intestinale umano contiene una complessa comunità di microrganismi con importanti funzioni volte alla promozione della salute.

Recentemente è stata documentata la presenza costante di un nuovo batterio, appartenente al genere *Verrucomicrobia*, isolata nel tratto intestinale; il genere contiene una sola specie (Euzeby et al. 1997), *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al. 2004)

Akkermansia muciniphila è un batterio isolato originariamente da un campione fecale umano ed è stato scoperto dal microbiologo olandese, Antoon Akkermans, professore dell'Università di Wageningen e pioniere nello studio dell'ecologia molecolare delle comunità batteriche (Euzeby et al. 1997).

Il suo nome deriva, oltre che dal suo scopritore, anche dalle caratteristiche proprie del germe; dal latino “mucinum” che significa mucina e “philus” che in greco indica amante, quindi letteralmente “amante della mucina”.

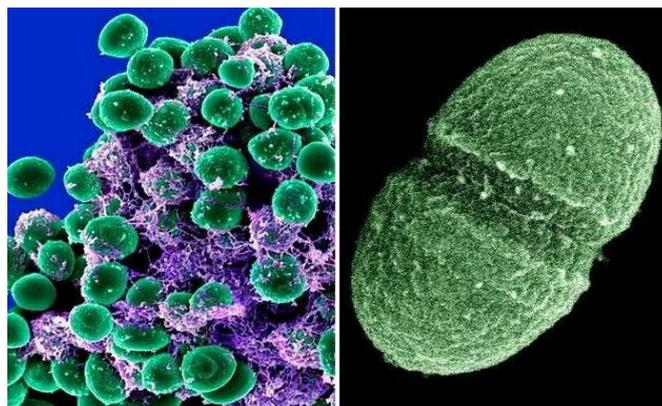


Fig. 4: Dettaglio di *Akkermansia muciniphila* in un'immagine al microscopio elettronico.

Questo batterio è un Gram-negativo, anaerobio stretto, non mobile, asporigeno a forma di cocco o bastoncello con insolita struttura cellulare, con sporgenze simili a verruche cellulari capace di crescere singolarmente o in coppia

(*Derrien et al. 2004*). Recenti studi hanno dimostrato che *A. muciniphila* è ospitato nel tratto intestinale umano fino a comprendere l'1% dei batteri totali dell'intestino. Cresce tra 20° C e 40° C con una temperatura ottimale di 37°C ed il pH ottimale per la crescita è di 6,5. Nessuna crescita è stata documentata invece ad un pH inferiore a 5,5 e superiore a 8. Questo germe è in grado di fermentare glucosio, N-acetilglucosammina e N-acetilgalattosammina. Questo batterio sembra essere un vero simbiote degli esseri umani, rilevabile nella maggior parte dei soggetti in buono stato di salute (*Derrien et al. 2004; Arumugam et al. 2011*). Il tempo di replicazione del ceppo è di circa 1,5 ore in presenza di mucina, che è il substrato per eccellenza che promuove la proliferazione di *A. muciniphila*, per tale motivo l'habitat ottimale è l'intestino (*Derrien et al. 2008*).

Le cellule epiteliali dell'intestino dei mammiferi sono ricoperte da uno strato di muco costituito da mucine che hanno il compito di proteggere la parete intestinale dall'azione abrasiva del cibo, dalla colonizzazione di batteri patogeni e infine costituisce anche un substrato per batteri muco-degradanti tra cui *A. muciniphila*.

Lavori recenti evidenziano la stretta relazione tra la presenza di mucina e un maggior numero di colonie di *A. muciniphila* e viceversa (*Wang et al. 2011*).

Le mucine sono una famiglia di proteine fortemente glicosilate e sono i principali componenti organici dello strato di muco che copre le cellule epiteliali dei vari organi, compreso l'intero tratto gastro-intestinale (*Liévin-Le Moal et al. 2006*). Alcuni microrganismi si possono ritrovare in maggiori quantità perché associati alla presenza delle mucine, in quanto possono interagire con essa e trarne nutrimento, protezione e favorire meccanismi di adesione con conseguente aumento del tempo di permanenza.

I microrganismi mucina-degradanti non sono stati ampiamente caratterizzati come nel caso delle mucine, perché le glicoproteine sono ad alto peso

molecolare quindi difficili da studiare a causa delle loro dimensioni, complessità ed eterogeneità.

Il muco facilita il passaggio del cibo nell'intestino, funge da barriera selettiva, consentendo il passaggio di componenti a basso peso molecolare, come le sostanze nutritive per le cellule epiteliali, ed è inoltre un sistema di difesa che protegge le cellule epiteliali sottostanti da danni meccanici o ingresso di sostanze nocive di natura chimica (farmaci, tossine e metalli pesanti) o di natura biologica (pepsina, acidi organici, batteri patogeni, virus e altri parassiti). Recenti studi bibliografici hanno dimostrato l'importanza del muco come promotore di crescita, di adesione e protezione dei microrganismi presenti a livello intestinale (*Derrien et al. 2007*).

Studi bibliografici dimostrano come *A. muciniphila* è in grado di degradare la mucina e utilizzare muco come fonte di carbonio e azoto (*Derrien et al. 2011; van Passel et al. 2011; Png et al. 2010*). La degradazione della mucina è un processo che avviene normalmente nell'intestino ad opera di diversi batteri. Poiché *A. muciniphila* è in grado di utilizzare la mucina in modo efficiente, potrebbe essere utilizzato come microrganismo di riferimento per condurre studi sulle proprietà dei batteri degradanti la mucina nell'intestino (*Corfield et al. 2001; Porowska et al. 2000*).

Studi recenti hanno anche mostrato che *A. muciniphila* è in grado di sintetizzare circa 20 amminoacidi e diversi cofattori vitaminici; tali proprietà potrebbero essere oggetto di studi futuri per approfondire la caratterizzazione di tale microrganismo (*Derrien et al. 2004*).

Inoltre, al fine di comprendere meglio le interazioni tra i batteri e il muco, sono state effettuate analisi proteomiche con il metodo SignalP (*Bendtsen et al. 2004*) che hanno consentito di determinare la presenza di alcune proteine come glicosil-idrolasi, proteasi, solfatasi e sialidasi, in grado di degradare la mucina. Questa attitudine sembra essere una tendenza generale per il genere *Verrucomicrobia* (*van Passel et al. 2011*).

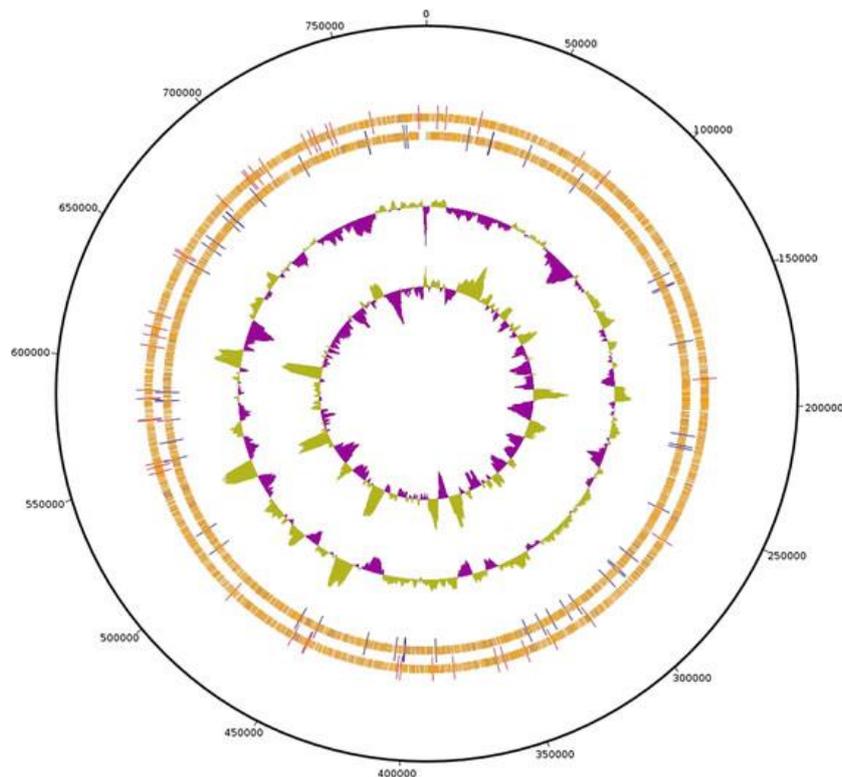


Fig. 5: Genoma circolare di *Akkermansia muciniphila* costruito con il software ACT Artemis (Caputo et al. 2015).

Possibile associazione tra Akkermansia muciniphila ed alcune patologie immuno- infiammatorie

La presenza di *A. muciniphila* nell'uomo può essere associata ad un buon equilibrio della microflora intestinale, essendo in grado di svolgere un'azione benefica nell'organismo ospite. Tali affermazioni vengono avvalorate da studi clinici che evidenziano un rapporto inversamente proporzionale tra la presenza di *A. muciniphila* e stati infiammatori intestinali come appendicite, morbo di Crohn e colite ulcerosa (van Passel et al. 2011).

Rispetto ai soggetti sani quantità molto basse di *Akkermansia muciniphila* sono state ritrovate in pazienti affetti da morbo di Crohn e colite ulcerosa (Png et al. 2010). Questo batterio ha, quindi, il potenziale per essere sviluppato come un eventuale biomarker per un intestino sano.

Sebbene ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo di *A. muciniphila* nello sviluppo della flora microbica intestinale e nello sviluppo/ stimolo del sistema immunitario sistemico e mucosale nella prima infanzia e nella vecchiaia, effetti sistemici immuno-mediati da questo germe sono altresì documentati. Da un lavoro svolto su 19 bambini affetti da dermatite atopica, è stato possibile notare una significativa diminuzione di *A. muciniphila* ed un aumento di enterobacteriaceae, tramite una PCR quantitativa condotta sulle feci dei volontari (Candela et al. 2012).

Inoltre, studi sperimentali su topi NOD (topo diabetico non obeso), che sviluppano spontaneamente diabete mellito di tipo 1, dimostrano che la somministrazione di questo germe fin dalla nascita riduce l'incidenza di diabete nei topi trattati mediante l'innescò di meccanismi di immuno-tolleranza (Buschard et al. 2012).

DISBIOSI

La disbiosi è una condizione che indica un ecosistema microbico dove i batteri non vivono in accordo mutuale, in quanto i batteri cosiddetti “buoni” non controllano quelli “cattivi”.

Questa alterazione della flora batterica intestinale comporta una modifica nella composizione del normale microbiota, il quale perde la funzione di protezione dando il via ad incursioni di patogeni e di conseguenza ad una consistente risposta immunitaria.

E' chiaro che i batteri commensali giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria intestinale e le ultime ricerche effettuate con le nuove metodiche di metagenomica hanno fornito informazioni

riguardanti le differenze nella composizione del microbiota tra individui sani e malati.

Attualmente, la lista delle patologie collegate con una situazione di microbiota intestinale alterato racchiude circa 25 malattie o disordini (*de Vos et al. 2012*) incluse le patologie metaboliche come la celiachia (*De Palma et al. 2010*), l'obesità (*Ley et al. 2005*) e il diabete, le patologie auto-infiammatorie come le malattie infiammatorie intestinali (*Frank et al. 2007; Manichanh et al. 2006; Mondot et al. 2011*), la sindrome del colon irritabile, il cancro colon-rettale (*Sobhani et al. 2011; Scanlan et al. 2008*) fino ad arrivare a disordini autoimmuni come le allergie, l'artrite reumatoride, la sclerosi multipla e potenzialmente anche a patologie come Alzheimer, autismo e Parkinson.

Nonostante ciò, la genesi della disbiosi non è stata ancora chiarita.

Sebbene ci sia una relazione tra il microbiota intestinale e le patologie ad esso correlate, non è chiaro, nella maggior parte dei casi, se l'alterazione del microbiota sia causa oppure effetto della patologia e se la manipolazione del microbiota potrebbe aiutare a prevenire o addirittura trattare la malattia (*Scott et al. 2015*).

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

Un'ipotesi emergente nell'opinione pubblica è che la disbiosi intestinale potrebbe essere coinvolta nella patogenesi delle malattie intestinali infiammatorie (IBD), che comprendono il morbo di Crohn e la colite ulcerosa. Sono condizioni poco frequenti ma non rare: l'incidenza, in Italia, è di 6-8 nuovi casi/anno/100.000 persone per la colite ulcerosa e di 3-4 nuovi casi/anno/100.000 persone per il morbo di Crohn (*Trallori et al. 1996*);

colpiscono entrambi i sessi e si presentano a qualsiasi età, anche se il picco di incidenza è compreso, di solito, tra i 15 ed i 35 anni.

Nelle IBD il ruolo del microbiota è largamente riconosciuto. Numerosi studi mettono in relazione la composizione del microbiota di pazienti affetti da IBD con quella di pazienti sani (*Gerritsen et al. 2011*).

Anche se la patogenesi delle IBD resta tutt'oggi sconosciuta, queste patologie infiammatorie si possono definire multifattoriali, con un più probabile sviluppo della malattia da parte di individui geneticamente suscettibili.

Gli studi riguardanti le IBD si concentrano sui processi alla base dell'infiammazione ricercando l'interazione dei vari sistemi di mediatori infiammatori e la loro importanza nella fase acuta della patologia (*Nielsen et al. 1996*). Queste ricerche indicano un'alterata risposta immunitaria locale. In questa alterazione sono principalmente coinvolte le cellule infiammatorie ed i loro prodotti, le citochine, fisiologicamente deputate ad orchestrare l'equilibrio tra gli stimoli pro- ed antinfiammatori e, quindi, prime responsabili dell'instaurarsi dell'infiammazione cronica.

Quindi, le IBD si possono definire disordini immuno-mediati che originano da una rottura della normale simbiosi tra il sistema immunitario mucosale e il microbiota commensale (*Podolsky et al. 1997; Sartor et al. 1997*). Questo conduce verso lo sviluppo di un'aberrante reazione contro gli antigeni intraluminali, una disregolazione dell'immunità innata ed adattativa e il conseguente danno tissutale (*Cho et al. 2008; Lees et al. 2011*).

I microrganismi in un intestino sano sono fisicamente separati dalla mucosa attraverso uno spesso strato di muco, un complesso viscoso e insolubile di glicoproteine e proteine organizzate in due strati con uno spessore totale che varia da 100 a 800 μm (*Johansson et al. 2011*). L'integrità dello strato di muco è dunque essenziale nella mediazione dell'interazione ospite-microbiota e nella promozione della tolleranza immunologica. Un ridotto strato di muco nel colon è stato correlato con l'incremento della gravità della patologia nei pazienti con

colite ulcerosa, come è dimostrato dall'infiltrazione leucocitaria (*Swidsinski et al. 2007*).

Dunque, diversi fattori potrebbero contribuire alla perdita della tolleranza verso alcuni dei batteri endogeni nei pazienti con IBD, inclusi difetti nelle funzioni della barriera mucosale (*Rakoff-Nahoum et al. 2004*), suscettibilità genetica (*Rioux et al. 2007*), e squilibrio nella composizione del microbiota (*Tamboli et al. 2004*).

Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche, le malattie infiammatorie intestinali rappresentano un gruppo di patologie caratterizzate da infiammazione cronica che interessa il rivestimento interno dell'intestino, accompagnata generalmente da dolori addominali, diarrea e perdita di sangue e da un decorso di remissioni e ricadute cliniche.

Le due forme meglio conosciute sono il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, che presentano molti tratti in comune sebbene, per molti aspetti, mantengano una propria individualità clinica.

Immunologia delle IBD

L'alterazione della peculiare condizione di equilibrio esistente nell'intestino tra la normale flora batterica e il sistema immunitario è alla base della patogenesi delle IBD.

I raffinati meccanismi di controllo che mantengono questa situazione costante e che proteggono l'organismo dalle infezioni patogene risultano modificati in corso di IBD, quindi stimoli specifici possono condurre ad una abnorme attivazione dei sistemi di difesa, innescando una flogosi cronica.

Gli eventi maggiormente coinvolti in questa attivazione possono essere: alterazione della barriera mucosale con aumento della permeabilità e più facile penetrazione di antigeni luminali con conseguente attivazione della risposta immunitaria (*Soderholm et al. 2002*); alterazione nel riconoscimento

dell'antigene e del suo processamento da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) legato probabilmente ad un'esagerata risposta all'attivazione dei PRRs, con rilascio di citochine che favoriscono la differenziazione dei linfociti T verso sottopopolazioni pro-infiammatorie, quali Th1 e Th17, e riduzione delle cellule T regolatorie (*Franchimont et al. 2004*).

Classicamente, l'infiammazione della mucosa caratteristica delle IBD deriva da una cascata di processi iniziati dal riconoscimento di un antigene.

L'immunità innata, rispondendo precocemente, garantisce una prima linea di difesa cellulare e permette il riconoscimento di diverse strutture batteriche (come LPS, peptidoglicano, ecc.) attraverso i recettori di riconoscimento (PRRs) espressi da molte cellule effettrici, quali macrofagi, cellule dendritiche e cellule B. Queste, una volta stimolate, avviano le loro risposte e allo stesso tempo stimolano la risposta adattativa che richiede più tempo per organizzarsi. L'immunità adattativa si esprime, invece, attraverso l'attività delle diverse popolazioni di cellule T: Th1, Th2, Th17 e T regolatorie.

Cruciali per l'origine ed il mantenimento del processo infiammatorio intestinale sono i linfociti T helper (Th) CD4+, in grado di innescare e diffondere la reazione immunitaria mucosale, grazie alla produzione di specifici mediatori solubili, le citochine (*Ivanov et al. 2008*).

Nonostante Th1 e Th2 derivino da un comune progenitore, la cellula naive CD4+, non sono le stesse citochine che stimolano la differenziazione verso le diverse sottopopolazioni: IL12 e IFN γ stimolano verso la differenziazione di Th1, mentre IL4 ed IL5 verso Th2.

I linfociti Th1 e Th2 utilizzano un pattern citochinico diverso e hanno diversi ruoli anche per quanto riguarda il loro compito all'interno dell'organismo: i Th1 controllano i patogeni intracellulari e producono principalmente interferone γ (IFN γ) sotto lo stimolo dell'IL12, mentre i Th2 producono IL4, IL5 ed IL13 e sono coinvolti soprattutto nelle patologie allergiche e nella difesa degli organismi extracellulari (*Mosmann et al. 1986*).

Recentemente sono state identificati nuovi linfociti T helper: i linfociti Th17 e i linfociti T regolatori (Tregs). Quest'ultimi hanno il compito di sopprimere la risposta infiammatoria diretta verso i batteri commensali, ma organizzarne una vigorosa verso i patogeni.

Come i Th1 e i Th2, anche i Th17 originano dal precursore T linfocitario, ma non richiedono per la differenziazione le loro stesse molecole effettrici. Essi infatti si sviluppano sotto lo stimolo del TGF β in presenza delle principali citochine infiammatorie quali IL1 β , IL6 e IL21 (*Manel et al. 2008; Yang et al. 2008*). Anche l'IL23 svolge un ruolo chiave che, però, interviene successivamente ed è essenziale per il mantenimento della differenziazione e probabilmente per la sopravvivenza dei linfociti Th17 (*Korn et al. 2007*).

I linfociti Th17, localizzati principalmente a livello mucosale ed in particolare nella lamina propria intestinale, sono essenziali nella difesa immunitaria nei confronti di microrganismi extracellulari di natura batterica e fungina. Alcuni recenti studi hanno dimostrato un'elevata infiltrazione di linfociti Th17 nella lamina propria di pazienti con IBD (*Fujino et al. 2003*).

Per quel che riguarda la modalità di sviluppo dell'infiammazione, tra le due forme di IBD ci sono alcune differenze nel tipo di risposta cellulare indotta, tanto da spiegare le differenti manifestazioni cliniche in esse riscontrate: nel morbo di Crohn predomina un'iperattivazione dell'immunità cellulo-mediata mucosale, che probabilmente media anche alcune delle sue manifestazioni sistemiche, con una risposta T cellulare prevalentemente di tipo Th1 e produzione aumentata di INF γ e TGF β (*Parronchi et al. 1997*); nella colite ulcerosa sembra, invece, prevalere l'immunità umorale con la deposizione di immunocomplessi e la produzione di autoanticorpi e, per quanto riguarda il pattern citochinico, questo comprende la produzione di citochine Th2 come IL5 e IL10 (*Heller et al. 2005*).

In entrambe le condizioni è sempre presente un denso infiltrato di macrofagi che producono citochine pro-infiammatorie come il TNF α .

Morbo di Crohn

La malattia di Crohn è un'affezione cronica granulomatosa che può colpire, con distribuzione segmentaria, qualsiasi sezione dell'apparato gastro-intestinale, dalla bocca all'ano, ma che più comunemente interessa la parte finale dell'intestino tenue (ileite) e tratti variabili del colon (colite) o entrambe le zone (ileo-colite).

La localizzazione delle lesioni, quindi, può essere singola o diffusa con interessamento multiplo sia a livello del tenue che in parte nel tenue ed in parte nel colon, ma in ogni caso la malattia manifesta una caratteristica distribuzione segmentaria, con aree indenni lungo l'intestino ammalato (lesioni a salto) e la presenza di netti margini di demarcazione tra i segmenti colpiti e quelli illesi (*Gerald et al. 2002*).

Un aspetto classico del morbo di Crohn è l'interessamento di tutti gli strati della parete intestinale (mucosa, sottomucosa, muscolatura liscia, sierosa) nelle sezioni coinvolte che risultano, così, inspessite, infiammate, edematose e ulcerate, a differenza di quanto accade invece nella colite ulcerosa, ed inoltre la tendenza a propagarsi attraverso il mesentere fino ai linfonodi mesenterici che risultano comunemente compromessi (*Baumgart et al. 2007*).

A livello microscopico la lesione è di tipo granulomatoso (risposta di tipo Th1), con infiltrazione neutrofila negli strati epiteliali e loro accumulo negli ascessi criptici, aggregati sparsi di macrofagi, presenza di cellule epitelioidee e di cellule giganti, che portano alla formazione di granulomi, senza però mai produrre necrosi caseosa.

Il diffuso processo infiammatorio, che spesso coinvolge ampi tratti dell'intestino, comporta conseguenze funzionali molto importanti: i normali meccanismi di assorbimento vengono infatti alterati, per cui si verifica una perdita di svariate sostanze.

I danni che ciò comporta sono molteplici e relativi al tipo di sostanza interessata: comunemente è compromesso il riassorbimento dei sali biliari, normalmente a carico dell'ileo terminale, la cui perdita causa da un lato un deficit nell'assorbimento dei grassi con comparsa di steatorrea e dall'altro, per il legame che i sali biliari nell'intestino instaurano con gli ioni calcio, una riduzione della loro disponibilità a legarsi con l'acido ossalico per formare ossalato di calcio, con la conseguenza che l'acido ossalico in eccesso può causare iperossaluria con aumentato rischio di formazione di calcoli renali (litiasi renale).

Il mancato assorbimento coinvolge anche varie vitamine e negli stadi più gravi può diventare globale fino a rendere necessaria la nutrizione parenterale (*Valentini et al. 2003*).

L'instaurazione di questi fenomeni è lenta, ma costante e progressiva. La malattia di Crohn tende a presentarsi inizialmente negli adolescenti e nei ventenni, con un alto picco di incidenza tra i cinquanta e i settant'anni, anche se può manifestarsi a qualsiasi età.

L'insorgenza, eccezion fatta per rari casi acuti, è in genere inizialmente subdola, con febbre atipica di origine non spiegabile, a cui segue la comparsa di dolori addominali, soprattutto in fossa iliaca destra (corrispondente alla zona ileocecale) e diarrea.

Con il progredire della malattia e l'aggravarsi dell'infiammazione, è frequente e tipico del Crohn che si formino delle fistole, cioè dei condotti patologici che mettono in comunicazione un'ansa intestinale con quella vicina, o con altri organi, o con la cute o con cavità ascessuali.

Questo processo può dar luogo a gravi complicanze, soprattutto infettive, a causa del versamento di materiale intestinale non sterile in sedi anomale.

La malattia può presentare numerose complicanze, distinte in locali e sistemiche; a livello locale, se il processo infiammatorio evolve verso un quadro fibro stenotico-ostruttivo, si potrà avere un'occlusione intestinale, per

l'edema e la successiva fibrosi che causa un restringimento del lume; se invece evolve con caratteristiche fistolizzanti-penetranti, si formeranno fistole con le conseguente sopra accennate.

A livello sistemico, invece, si potranno avere complicanze nutrizionali o metaboliche per i diffusi fenomeni di malassorbimento dovuti alla compromissione della mucosa. Inoltre, si potranno avere complicanze cutanee, muscolo-scheletriche, oculari e vascolari, quest'ultime dovute principalmente agli immunocomplessi circolanti responsabili di vasculiti, che, quindi, a largo raggio possono colpire vari distretti (*Katz, 2002*).

Globalmente la malattia è caratterizzata da periodi di esacerbazione e remissioni cliniche la cui rispettiva durata è molto variabile da caso a caso.

La malattia comunque è tipicamente cronica e come tale non ha mai una guarigione completa.

In linea di massima la prognosi è meno favorevole rispetto a quella della colite ulcerosa, con una mortalità che si aggira intorno al 5-10% di tutti i casi (*Calkins et al. 1995*).

Colite ulcerosa

La colite ulcerosa è una malattia infiammatoria cronica che colpisce la mucosa di una parte o di tutto il colon, soprattutto il retto, causando ulcerazioni superficiali facilmente sanguinanti.

I fattori che agiscono da innesco per la patologia sono ancora sconosciuti, ma è certo che si sviluppi una reazione immunitaria diretta contro i batteri presenti nell'intestino.

Come detto, la colite ulcerosa è una malattia della mucosa che si localizza soprattutto nelle porzioni distali del colon: il retto non è mai risparmiato e, a seconda della gravità della patologia, possono essere coinvolti prossimalmente segmenti via via più estesi.

Al contrario del Crohn, nella colite ulcerosa l'estensione è continua senza presenza di zone intervallari indenni (*Rhodes et al. 2006*).

Nell'infiammazione di grado lieve la mucosa appare iperemica con granulosità superficiali, mentre aggravandosi, si presenta edematosa, facilmente sanguinante ed ulcerata.

Le lesioni iniziali sono rappresentate da piccoli ascessi che si formano sul fondo delle cripte di Lieberkuhn e presentano, in principio, accumulo di linfociti ed in seguito anche di granulociti, eosinofili, neutrofili e plasmacellule, che vanno a formare aggregati infiammatori al di sotto dell'epitelio, mai però organizzate in strutture granulomatose come, invece, avviene nel Crohn.

Questo processo infiammatorio è per lo più superficiale, interessa gli strati della mucosa e sottomucosa ed alterandone l'irrorazione provoca la formazione di ulcerazioni facilmente sanguinanti che sono distribuite lungo tutto il tratto coinvolto in maniera continua e non segmentaria. Le ulcere sono superficiali, si presentano con margini sfrangiati e solitamente non si spingono oltre la tonaca muscolare. Tra un'ulcera e l'altra, nella malattia di lunga durata, si ha la formazione di polipi infiammatori (pseudopolipi), quale risultato di rigenerazione epiteliale.

Le conseguenze funzionali del processo infiammatorio sono molto importanti: questo, coinvolgendo anche tratti estesi del colon, provoca l'insorgenza di dolori addominali anche molto forti ed altera il normale assorbimento di svariate sostanze, soprattutto dell'acqua, per cui è molto frequente la comparsa di diarrea. Inoltre, a causa dei continui sanguinamenti può aversi una progressiva anemizzazione.

La malattia esordisce tipicamente nel terzo decennio di vita. I sintomi principali sono diarrea, rettorragia (perdita di sangue rosso vivo dall'ano), tenesmo, presenza di muco nelle feci e dolore addominale e la loro gravità è correlata con l'estensione della malattia: nei casi più lievi, in cui è coinvolto solo il retto, non c'è diarrea, ma può aversi emissione di sangue rosso vivo non mescolato

con le feci e tenesmo rettale; quando la malattia si estende invece oltre al retto, compare diarrea a causa dell'alterazione della motilità colica, il sangue diventa commisto alle feci e i dolori addominali diventano più imponenti. La malattia ha un andamento ciclico con alternanza di fasi di quiescenza e riacutizzazione, dove i sintomi soggettivi prevalgono spesso su quelli obiettivi (*Farrel et al. 2002*).

Le complicanze sistemiche sono in parte sovrapponibili a quelle della malattia di Crohn, fatta eccezione per la colangite sclerosante e la cirrosi biliare, quelle locali, invece, sono specifiche della colite ulcerosa e la più frequente tra esse è il sanguinamento con possibile stitico cronico e sviluppo di anemia sideropenica; si può avere perforazione per la fragilità della mucosa, oppure stenosi, quando il processo di riepitelizzazione tra due fasi attive risulta così imponente da causare un eccessivo restringimento del lume per ispessimento della parete. E' anche possibile l'insorgenza di megacolon tossico, soprattutto nelle forme più gravi, quando il processo infiammatorio coinvolge anche plessi nervosi, con successiva paralisi e distensione del colon; infine, è aumentato il rischio di sviluppare carcinoma del colon.

Come detto, la malattia ha un decorso "relapse-remitting". Rari casi insorgono con l'attacco acuto, la cui mortalità è circa del 5%; per la forma cronica, la prognosi è in genere correlata con l'estensione della malattia: meno della metà dei pazienti con pancolite ulcerosa sopravvive a 15 anni dall'esordio (*Campieri et al. 2001*).

SCOPO DELLA TESI

Il funzionamento dell'intestino è in grado di influenzare l'intero metabolismo dell'organismo, per tale motivo è strettamente legato al concetto di salute generale, definito dall'organizzazione mondiale della sanità come “un completo stato di benessere fisico, psichico e sociale, e non solo la semplice assenza di malattia ed infermità”.

Proprio per questo è importante adottare tutti gli interventi e i comportamenti in grado di evitare o ridurre l'insorgenza di una malattia o di un evento sfavorevole a carico dell'apparato gastro-intestinale.

Fondamentale in questo concetto è valorizzare l'importanza della microflora intestinale che garantisce l'integrità della mucosa. Proprio la zona intorno alla mucosa, costituita anche dai microbi residenti, gioca un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria per la sua stretta interazione con l'epitelio e con il sistema immunitario sottostante (*Schippa et al. 2014*).

Il non corretto funzionamento delle strutture dedicate al mantenimento dell'omeostasi e quindi una risposta abnorme del sistema immunitario sembra essere alla base della patogenesi delle IBD, un gruppo di affezioni a carattere flogistico che interessano l'intestino. La flogosi, che deriva dalla stimolazione della risposta innata e poi della risposta adattativa con conseguente richiamo delle citochine pro-infiammatorie, delle plasmacellule, dei linfociti e dei macrofagi, comporta ispessimento dei tessuti e relativa infiammazione e ulcerazione.

Lo scopo del mio lavoro, in questi anni, si è concentrato sul riconoscimento delle potenzialità immuno-modulanti di un batterio scoperto recentemente ed appartenente al genere *Verrucomicrobia*: *Akkermansia muciniphila*. La presenza di *A. muciniphila* nell'uomo viene associata ad un buon equilibrio della microflora intestinale e quindi in grado di svolgere un'azione benefica nell'organismo ospite. Tali affermazioni vengono avvalorate da studi clinici

che evidenziano un rapporto inversamente proporzionale tra la presenza di *A. muciniphila* e stati infiammatori intestinali come appendicite, morbo di Crohn e colite ulcerosa (Van Passel M.W. et al. 2011). Rispetto ai soggetti sani, quantità molto basse di *A. muciniphila* sono state ritrovate in pazienti affetti da morbo di Crohn e colite ulcerosa (Png C.W. et al. 2010), dimostrando quindi di avere il potenziale per essere sviluppato come biomarker per un intestino sano.

Alla luce di questi studi, in prima istanza abbiamo pensato di approfondire le caratteristiche fenotipiche (metabolismo degli zuccheri e attività enzimatica) e di antibiotico resistenza di questo germe, in quanto ancora poco conosciuto.

Inoltre, per avere un migliore riscontro ed una maggiore corrispondenza con il vero comportamento di *A. muciniphila* nell'intestino umano, abbiamo pensato di studiare l'azione del batterio in modelli animali di infiammazione intestinale indotta da Sodio Destrano Solfato (DSS), in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Bio-mediche, Sezione di Patologia ed Oncologia di Catania.

Il modello di infiammazione intestinale indotto dal DSS è stato adottato, negli anni, per studiare i meccanismi alla base dell'infiammazione. Il vantaggio di questo modello è la sua somiglianza con le caratteristiche della colite ulcerosa: danno mucosale, ulcerazione della superficie dell'intestino, produzione di citochine e altri mediatori infiammatori e infiltrazione leucocitaria (Okayasu I. et al. 1990).

Lo scopo dello studio sugli animali è stato proprio quello di verificare il ruolo svolto da *A. muciniphila* in presenza di stati infiammatori intestinali. Abbiamo indagato l'andamento della malattia attraverso tre parametri fondamentali: peso corporeo, peso del colon e DAI (disease activity index). Inoltre, abbiamo valutato i livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie e anche determinato la quantità di RNA messaggero delle citochine nel colon.

A conclusione del nostro lavoro, abbiamo pensato di direzionare la ricerca anche sugli uomini, applicando la cosiddetta medicina traslazionale. Questo

orientamento di ricerca, ancora preliminare, si è incentrato principalmente sulla verifica della presenza di *Akkermansia muciniphila* nell'uomo in relazione al suo stato di salute ed in particolar modo in corso di malattie infiammatorie intestinali. In accordo con l'ambulatorio di Endoscopia digestiva della U.O.C. di Chirurgia Generale e Trapianto di Fegato del Policlinico Universitario di Bari, si è proceduto con l'identificazione del DNA del germe in campioni di liquido di lavaggio derivanti da colonscopia di pazienti affetti da patologie intestinali infiammatorie. La metodica è ancora preliminare ed è stata messa a punto proprio per questo specifico esperimento con l'aspettativa che possa, in futuro, rappresentare un importante procedimento di indagine per individuare target essenziali, come appunto *A. muciniphila*, per la diagnosi o la cura di queste patologie.

MATERIALI E METODI

Ceppi microbici utilizzati e modalità di coltivazione

La ricerca ha previsto l'uso dei seguenti ceppi microbici, coltivati come riportato in seguito: *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell cultures) e *Akkermansia muciniphila* BAA835 (ATCC, American Type Culture Collection)

Il ceppo DSM 22959 è stato riattivato in Brucella Broth (Biolife Italiana), precedentemente sterilizzato in autoclave a 121°C, arricchito con una soluzione di vitamina K 10mg/mL (Sigma-Aldrich, Italia), sterilizzata per filtrazione con filtri da 20 µm, ed emina 5mg/mL (Sigma-Aldrich, Italia) ed incubato a 37°C in condizioni di anaerobiosi.

Il ceppo BAA835 è stato, invece, riattivato in Brain Heart Infusion Broth (Biolife Italiana), precedentemente sterilizzato in autoclave a 121°C, e incubato a 37°C in condizioni di anaerobiosi.

Prove fermentative

Sui ceppi di *Akkermansia muciniphila* è stato valutato il profilo fermentativo secondo *Hammes et al. (1992)*.

Le prove di fermentazione dei carboidrati sono state eseguite utilizzando come terreno base una soluzione di MRS Broth (Biolife Italiana) modificato, ovvero privo di estratto di carne e glucosio, ma addizionato di porpora di bromocresolo (Sigma-Aldrich, Italia), come indicatore, in una quantità di 0,16 g/l.

Il substrato, così preparato, è stato porzionato in tubi da 7 ml e sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti.

A parte, sono state preparate le soluzioni zuccherine al 5% che, dopo pastorizzazione a 100°C per 30 minuti, sono state aggiunte al substrato in quantità tale da ottenere una concentrazione finale del carboidrato dello 0,5%.

I tubi contenenti i vari zuccheri sono stati inoculati con 0,1 ml delle brodoculture di *A. muciniphila* e sono stati incubati a 37°C in anaerobiosi.

I risultati sono stati letti dopo 7 giorni e confermati dopo 15 giorni.

Gli zuccheri adoperati per saggiare la capacità fermentativa dei ceppi sono i seguenti: eritritolo (derivante da substrati zuccherini), D-arabinosio, L-arabinosio, D-ribosio, D-xilosio, L-xilosio, D-adonitolo, metil- β -D-xilopiranoside, D-galattosio, D-glucosio, D-fruttosio, D-mannosio, L-sorbosio, L-ramnosio, dulcitolio, inositolo, D-mannitolo, D-sorbitolo, metil- α -D-mannopiranoside, metil- α -D-glucopiranoside, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, esculina citrato ferrico, D-cellobiosio, D-maltosio, D-lattosio, D-melibiosio, D-saccarosio, D-trealosio, inulina, D-melezitosio, D-raffiniosio, metadone, glicogeno, xilitolo, gentiobiosio, D-turanosio, D-lixosio, D-tagatosio, D-fucosio, L-fucosio, D-arabitolio, L-arabitolio, gluconato di potassio, 2-chetogluconato di potassio, 5-chetogluconato di potassio (Biolife Italiana).

Prove enzimatiche

Il sistema API ZYM (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) è un micro metodo semi-quantitativo per la ricerca di attività enzimatiche sui ceppi batterici.

La galleria API ZYM è costituita di 20 cupole espressamente finalizzate allo studio delle reazioni enzimatiche. I test enzimatici vengono inoculati con sospensioni dense (5-6 McFarland), che reidratano i substrati. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione sono costituite da viraggi di colore che vengono rivelati tramite l'aggiunta di reattivi. Le gallerie si conservano a 2-8°C. Gli enzimi saggiati sono stati: fosfatasi alcalina, esterasi, esterasi lipasi,

lipasi, leucina arilamidasi, valina arilamidasi, cistina arilamidasi, tripsina, α -chimotripsina, fosfatasi acida, naftol-AS-BI-fosfoidrolasi, α -galattosidasi, β -galattosidasi, β -glucuronidasi, α -glucosidasi, β -glucosidasi, N-acetil- β -glucosaminidasi, α -mannosidasi, α -fucosidasi.

Procedimento

È stato assemblato fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione ed è stata distribuita negli alveoli circa 5 ml di acqua distillata o demineralizzata per creare un'atmosfera umida. È stato trascritto sulla linguetta laterale della vaschetta l'identificativo del campione e apposta la galleria nella vaschetta di incubazione. Sono stati distribuiti 65 μ l degli inoculi, preparati precedentemente, in ogni galleria e dopo aver chiuso la vaschetta con il coperchio è stato incubato il tutto per 4 ore-4 ore e mezzo a 37°C (temperatura ottimale). La durata e la temperatura dell'incubazione possono variare a seconda dei campioni da esaminare.

Lettura ed interpretazione

Dopo l'incubazione è stata aggiunta una goccia di reattivo ZYM A ed una goccia di reattivo ZYM B in ogni cupola. L'agente tensioattivo (reattivo ZYM A) facilita la solubilizzazione nel terreno del reattivo ZYM B. Dopo aver fatto sviluppare le colorazioni almeno per 5 minuti è stato possibile effettuare la lettura dei risultati positivi e negativi riportati nella tabella dei risultati.

Antibiogramma

Il terreno utilizzato per l'esperimento è il Mueller Hinton Agar (Biolife Italiana), con pH finale di 7.3 ± 0.2 , sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti e versato in piastre Petri da 100 mm.

L'esecuzione dell'antibiogramma è stata svolta secondo il metodo per diffusione di Kirby-Bauer e raccomandato dall'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

L'inoculo di *A. muciniphila* DMS 22959 è stato preparato ad una concentrazione corrispondente a 0.5 McFarland.

Si è proceduto come segue:

- il batterio è stato seminato sulla piastra Petri contenente terreno agarizzato;
- i dischetti di antibiotici sono stati depositati sul terreno di coltura utilizzando pinzette sterili;
- le piastre sono state incubate in termostato a 37 °C per 24 ore
- dopo il periodo di incubazione, sono state effettuate le misurazioni della grandezza degli aloni di inibizione.

Con l'ausilio della guida relativa agli antibiotici utilizzati, paragonando gli aloni ottenuti, è stato possibile stabilire il comportamento del batterio in esame rispetto agli antibiotici saggiati.

Gli antibiotici saggiati sono di seguito riportati: amoxicillina, amoxicillina + acido clavulanico, azitromicina, cloramfenicolo, ceftazidima, cefaclor, ceftriaxone, eritromicina, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, levofloxacina, fosfomicina, linezolid, vancomicina, trimetoprim + sulfametoxazolo, nitrofurantoina, rifampicina, tetraciclina, Tobramicina (NEO-SENSITABS, Rosco Diagnostica).

Primo modello animale: ratti Wistar

L'esperimento ha previsto l'utilizzo di ratti maschi Wistar di 10-12 settimane, che sono stati acquistati presso Harlan Laboratories (San Pietro al Natisone, Udine, Italia). Gli animali sono stati tenuti presso lo stabulario del Dipartimento di Scienze Bio-mediche, Sezione di Patologia ed Oncologia di Catania.

In accordo con le condizioni standard di laboratorio, gli animali (esenti da patogeni non specifici) hanno avuto libero accesso al cibo (Harlan Global Diet 2018) e all'acqua e hanno avuto la possibilità di adattarsi all'ambiente prima di iniziare lo studio.

Gli animali sono stati alloggiati all'interno di strutture di policarbonato isolante (Tecniplast, Varese, Italia), con filtro superiore e aria esterna, secondo la legislazione italiana, ed allevati in gruppi di massimo tre ratti.

Le condizioni ambientali, controllate automaticamente, sono state mantenute ad una temperatura di 20 – 24°C, con un'umidità relativa (RH) al 30 – 70%; sono stati effettuati 10/30 ricambi d'aria all'ora e con un ciclo luce/buio naturale.

La protezione degli animali, utilizzati per la sperimentazione, è conforme alla direttiva 86/609/EEC, recepita con il D.L. n° 116 del 27 Gennaio 1992.

Anche le strutture fisiche e le attrezzature per la sistemazione e la cura degli animali sono conformi alle disposizioni della direttiva 86/609 del consiglio EEC.

Trattamento con Akkermansia muciniphila

I ratti sono stati suddivisi in due gruppi (cinque per ogni gruppo): al primo gruppo è stata somministrata solo soluzione fisiologica (veicolo), mentre al secondo è stato somministrato il germe DSM 22959 (5×10^8), diluito in soluzione fisiologica (300µl), per via intracolica tre volte la settimana per quattro settimane.

In aggiunta ai due gruppi di studio, sono stati considerati anche due gruppi di controllo: un gruppo ha ricevuto *A. muciniphila* nelle stesse modalità descritte precedentemente a cui, però, non è stato indotto lo stato infiammatorio; nell'altro, definito Sham, i ratti hanno subito solo il danno meccanico del clistere.

Gli animali sono stati trattati secondo questo regime profilattico per 22 giorni prima dell'induzione della colite sperimentale.

Dopo il trattamento con *A. muciniphila*, nei ratti è stata indotta una colite sperimentale da sodio destrano solfato (DSS).

Induzione della colite sperimentale con DSS

Il sodio destrano solfato, DSS (TdB Consultancy AB, Uppsala, Svezia), composto in grado di distruggere la barriera epiteliale intestinale ed indurre infiammazione intestinale, è stato dissolto in acqua al 5% (peso/volume) e somministrato ad libitum ai ratti per 7 giorni al posto della normale acqua potabile.

Gli animali sono stati pesati due volte la settimana per tutto il periodo di studio, monitorando il loro stato clinico (mobilità, feci molle e/o diarrea).

Misurazione della lunghezza e del peso del colon

Subito dopo l'eutanasia, gli animali sono stati laparotomizzati ed è stato recuperato l'intero intestino. Tutto il colon (dal cieco all'ano) è stato isolato, accuratamente pulito dal mesentere, dai vasi e dai grassi, e disteso su un righello per essere misurato. In seguito, un segmento di 10 cm del colon è stato asportato, pesato dopo il risciacquo del lume con soluzione salina e conservato.

Analisi genetica delle feci

Le feci, raccolte durante il sacrificio e conservate a -80 °C, sono state analizzate per verificare l'effettiva presenza di *A. muciniphila*.

Dalle feci è stato estratto il DNA totale utilizzando il Genomic DNA from tissue kit (Macherey-Nagel) secondo il protocollo fornito.

Il DNA estratto, eluito in 100 µl di tampone di eluizione, è stato utilizzato, previa quantizzazione, come target nelle reazioni successive di Real time PCR. Per mettere in evidenza la presenza di *A. muciniphila* nelle feci sono state effettuate reazioni di Real Time PCR sfruttando i primer AM1 e AM2 (Collado M.C. et al. 2007):

- AM1: CAGCACGTGAAGGTGGGGAC;
- AM2: CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT.

Come gene di controllo (housekeeping) è stato utilizzato il GAPDH (gliceraldeide 3-fosfo-deidrogenasi).

Un esperimento di presenza/assenza consiste in un esperimento end/point, che quindi indica la presenza o l'assenza di una specifica sequenza dell'acido nucleico target in un campione. La quantità del target non viene determinata.

La valutazione della presenza del DNA di *A. muciniphila* è stata effettuata con l'utilizzo del termociclatore Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Milano, Italia), utilizzando la mix Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Monza, Italia), che contiene già tutti i reagenti utili per la mix di reazione ad esclusione, ovviamente, dei primers e del template:

	Volume (µl)	Concentrazione iniziale
Power SYBR Green PCR Master Mix	12.5	2X
Primer forward	0.6	10 uM
Primer reverse	0.6	10 uM
Templato	1	-
Acqua	12.5	-
Totale	25	-

La miscela così preparata è stata sottoposta al seguente programma termico:

- 95°C per 5 minuti
 - 95°C per 15 secondi
 - 50°C per 40 secondi
 - 72°C per 30 secondi
 - 72°C per 5 minuti
- } 40 CICLI

Durante la PCR, il colorante fluorogenico SYBR Green si intercala tra le basi del DNA degli ampliconi, cioè di quei segmenti di DNA amplificati grazie

all'appaiamento dei primer specifici sul DNA target. Quindi, i segnali fluorescenti vengono utilizzati per il rilevamento della presenza o dell'assenza del target in ogni campione.

E' possibile condurre questo esperimento anche con una PCR semi-quantitativa, ma l'utilizzo della Real Time PCR è consigliata in quanto è molto più sensibile.

Saggio dei livelli sierici dell'interleuchina-6

Agli animali sacrificati è stato prelevato anche sangue arterioso per il saggio delle citochine, in particolare per la citochina IL-6, perché, è stato dimostrato che l'interleuchina-6 è un importante fattore di attivazione delle cellule T (*Pasare et al. 2003*).

I prelievi di sangue dei ratti di ciascun gruppo sono stati centrifugati ed il siero è stato congelato a -20°C fino all'uso.

I livelli sierici di IL-6 sono stati determinati mediante test quantitativi ELISA basati su tecnica immunoenzimatica e secondo le indicazioni del kit (Interleukin-6 EIA, Cayman Chemical Company, USA).

Secondo modello animale: topi CDI

Per analizzare meglio altri mediatori della flogosi e verificare le citochine prodotte in situ nel contesto della mucosa del colon in corso di IBD ed in condizioni normali, anche dopo il trattamento con *A. muciniphila*, è stato effettuato un secondo studio sugli animali che ha previsto le stesse modalità del primo. Le uniche differenze, non trascurabili, riguardano il tipo di animale utilizzato e la somministrazione del germe morto. Invece di ratti Wistar, per questo secondo esperimento, sono stati utilizzati topi CD1 (Fig. 6).

La sigla CD (clusters of differentiation) si riferisce agli antigeni di differenziazione dei leucociti umani; CD1 designa i linfociti T6 (popolazione dei timociti corticali) (*Delfino 1995*).



Fig. 6: Esempio di topo CD1.

Misurazione della lunghezza e del peso del colon

Subito dopo l'eutanasia, gli animali sono stati laparotomizzati ed è stato recuperato l'intero intestino. Tutto il colon (dal cieco all'ano) è stato isolato, accuratamente pulito dal mesentere, dai vasi e dai grassi, e disteso su un righello per essere misurato. In seguito, un segmento di 10 cm del colon è stato asportato, pesato dopo il risciacquo del lume con soluzione salina e così conservato: una parte in TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Italia) per ottimizzare la successiva analisi delle citochine, e una parte congelato a -80°C per la determinazione dell'attività mieloperossidasi.

Analisi dell'attività mieloperossidasi

L'attività della MPO è stata definita come la quantità di enzima che è in grado di degradare $1\mu\text{M}$ di perossido/minuto ed è espressa come unità/grammo di tessuto.

L'attività della mieloperossidasi è stata analizzata sui rimanenti 5 cm di colon precedentemente congelato a -80°C . Il colon è stato omogeneizzato in 0.5% di esadeciltrimetilammonio bromuro (HETAB, Sigma-Aldrich, Italia) dissolto in

10mM di Buffer fosfato-citrato (Merck, VWR, Italia) con perborato di sodio (Sigma-Aldrich, Italia) a pH 7.0 per consentire il rilascio dell'enzima MPO dai granuli neutrofili.

I campioni omogenizzati dopo tre cicli di congelamento-scongelo sono stati centrifugati a 3000g a 4°C per 30 minuti.

Il pellet è stato risospeso in 0.5% di HETAB in 10mM di Buffer fosfato-citrato con perborato di sodio e centrifugato ancora a 3000g a 4°C per 30 minuti.

Il surnatante è stato inoculato in piastre da 96 pozzetti (75 µl per pozzetto) con l'aggiunta di 75 µl di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina diidrocloreuro (TMB, Sigma-Aldrich, Italia) dissolto nel Buffer fosfato-citrato contenente perborato di sodio.

Come standard è stato utilizzato l'enzima perossidasi (Sigma-Aldrich, Italia) diluito in 0.5% di HETAB dissolto in 10mM di Buffer fosfato-citrato e acqua. Le diluizioni dello standard sono state preparate in doppio ed ad una concentrazione maggiore di 50 pg/ml.

Il cambio di assorbanza a 620nm e 450nm è stato letto con uno spettrofotometro.

Tutti i reagenti e i campioni sono stati conservati in frigorifero e le soluzioni sono state preparate subito prima del saggio.

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA totale dal colon di topo è stata effettuata tramite TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Italia) seguendo il protocollo indicato dalla casa produttrice.

Brevemente, 50-100 mg di tessuto sono stati omogenizzati in presenza di 1ml di TRI Reagent. I campioni omogenizzati sono stati incubati per 5 minuti a temperatura ambiente e successivamente sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio (Merck Millipore, Italia) in ogni campione. I campioni sono stati

agitati vigorosamente, mantenuti a temperatura ambiente per un paio di minuti, e centrifugati a 12000 g per 15 minuti a 4°C.

Dopo la centrifugazione, la mix si separa in una fase rosa contenente fenolo-cloroformio, una interfase ed una fase incolore (fase acquosa).

L'RNA rimasto nella fase acquosa è stato trasferito in un nuovo tubo e fatto precipitare con l'aggiunta di isopropanolo (Merck Millipore, Italia), 0,5 ml per ogni ml di TRI Reagent utilizzato. I campioni sono stati conservati 5-10 minuti a temperatura ambiente e poi di nuovo centrifugati a 12000 g per 8 minuti.

Il surnatante è stato rimosso e il pellet di RNA è stato lavato con etanolo (Merck Millipore, Italia) al 75%. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione a 7500 g per 5 minuti. E' stato aggiunto almeno 1 ml di etanolo per ciascun ml di TRI Reagent usato nella fase iniziale di omogenazione.

L'etanolo di lavaggio è stato rimosso e l'RNA è stato fatto asciugare all'aria per 5 minuti, per eliminare ogni eventuale traccia di etanolo che potrebbe interferire con le successive reazioni.

L'RNA dopo l'estrazione è stato risospeso in acqua RNAsi-free e conservato a -80°C.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Il NanoDrop sfrutta una tecnologia basata sulla tensione superficiale che viene utilizzata per mantenere sulla colonna il campione liquido durante la misurazione. Il campione viene dispensato direttamente sul basamento di misura. La misurazione viene eseguita attraverso due fibre ottiche in meno di 10 secondi; lo spettro e la relativa analisi vengono visualizzati sullo schermo del PC ed archiviati in esso. Con questo strumento siamo in grado di misurare la quantità dell'RNA estratto e i rapporti delle assorbanze 260/280 (indice di contaminazione con proteine) e 260/230 (indice di contaminazione con carboidrati o altre sostanze organiche) indicatori della purezza dell'RNA. Per potere effettuare tale valutazione sono sufficienti 1.5µl di campione (nanodrop_2000_user_manual.pdf).

L'integrità dell'RNA è stata determinata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

Preparazione del cDNA (RT-PCR)

La sintesi di cDNA tramite RT-PCR è stata effettuata con reagenti Sigma-Aldrich; l'enzima usato è l'M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) in presenza di esanucleotidi random, secondo le istruzioni della casa produttrice.

Brevemente, in una provetta nucleasi-free è stata aggiunta la seguente mix:

Componenti cDNA mix	Volume (μl)
dNTPs (2mM)	5
Random esanucleotidi	1
RNA (circa 1 μ g)	-
Acqua nucleasi-free	-
Totale	10

In quanto la concentrazione dell'RNA deve essere simile per tutti i campioni analizzati (circa 1 μ), si effettua una cosiddetta normalizzazione utilizzando volumi diversi di RNA per i diversi campioni, tenendo presente le letture al NanoDrop.

La mix è stata agitata delicatamente e poi centrifugata per raccogliere tutti i componenti sul fondo della provetta; successivamente è stata incubata a 70°C per 10 minuti.

Al termine dell'incubazione, la miscela è stata posta in ghiaccio e sono stati aggiunti i seguenti componenti:

Componenti cDNA mix	Volume (µl)
Buffer 10X	2
MMLV	1
RNase inhibitor	0.5
Acqua nuclease-free	6.5
Totale	20

La mix, così preparata, è stata incubata prima a temperatura ambiente per 10 minuti e poi a 37°C per 50 minuti. Infine, quando il filamento di cDNA è stato prodotto, la miscela è stata incubata a 90°C per 10 minuti per degradare l'enzima MMLV.

La quantità e la qualità del cDNA ottenuto è stata saggiata tramite una PCR semi-quantitativa, utilizzando i campioni diluiti di 10 volte. I primer utilizzati sono i seguenti: β -actina, come housekeeping e TNF- α (Fermentas, Thermo Scientific).

I componenti della miscela sono i seguenti:

Mix PCR	Volume (µl)
Buffer 10X	5
dNTPs (10mM)	1
Primer Forward (10µM)	1.5
Primer Reverse (10µM)	1.5
cDNA(1:10)	1
DreamTaq	0.5
Acqua	35.7
Totale	50

Dopo aver composto la miscela, facendo attenzione ad inserire come ultimo reagente la DreamTaq e operando in ghiaccio, questa è stata inserita nel termociclatore (Thermo Fisher Scientific, Stati Uniti) con il seguente programma termico:

- 95°C per 2 minuti
 - 95°C per 30 secondi
 - 53°C per 30 secondi
 - 72°C per 45 secondi
 - 72°C per 10 minuti
- } per 35 cicli

Analisi delle citochine pro-infiammatorie.

Per studiare l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie sono stati effettuati degli esperimenti di Real-Time PCR, una tecnica di amplificazione del cDNA di tipo quantitativo, che permette di seguire l'andamento dell'amplificazione in tempo reale grazie all'uso di coloranti fluorescenti, come il SYBR Green, che s'intercalano con il DNA a doppio filamento.

I geni che si è scelto di validare sono i seguenti:

Gene	Forward	Reverse
TNF- α	5'-CCCTCACACTCACATCATCTT-3'	5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
INF- γ	5'-ATGAACGTACACACTGCCATC-3'	5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC-3'
GAPDH	5'-ATGGTAGGAGTGGTGGGAAACT-3'	5'-CAGGTCAGATCCACAACAGACA-3'

Per effettuare la Real-Time PCR è stato usato il termociclatore Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Milano, Italia). I reagenti impiegati per la mix di reazione sono tutti contenuti nella Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Monza, Italia) ad esclusione, ovviamente, dei primer e del template:

	Volume (ul)	Concentrazione iniziale
Power SYBR Green PCR Master Mix	12.5	2X
Primer forward	0.6	10 uM
Primer reverse	0.6	10 uM
Template	1	-
Acqua	12.5	-
Totale	25	-

Il colorante SYBR Green, specifico per il DNA, viene utilizzato in alternativa alla sonde fluorogeniche. Questo, che presenta una sensibilità paragonabile a quella del bromuro di etidio, permette di seguire l'accumulo degli amplificati in Real Time. Inoltre presenta le seguenti caratteristiche: capacità di emettere fluorescenza crescente all'aumentare degli amplificati legati e capacità di non interferire in alcun modo nell'evolversi della reazione PCR.

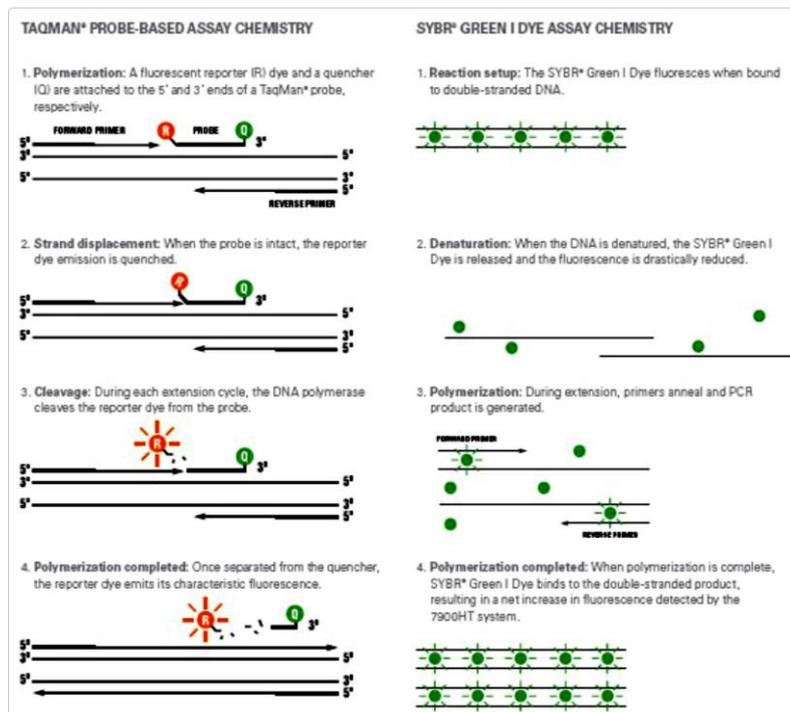


Fig.7: Differenza tra la modalità Taqman e quella SYBR green.

Uno svantaggio, però, potrebbe essere rappresentato dal fatto che il SYBR Green si lega anche a prodotti di amplificazione aspecifici, eventualmente generati durante la reazione (Fajardo et al. 2008).

Quando il numero di copie degli amplificati aumenta durante il processo di PCR, aumenta anche il segnale di fluorescenza fino a quando la reazione raggiunge un plateau.

Il primo ciclo di amplificazione a livello del quale il segnale di fluorescenza, dato dal SYBR Green, supera il segnale base viene definito ciclo soglia (Ct). I livelli di espressione relativi ai geni analizzati vengono effettuati attraverso il

calcolo del ΔCt , previa normalizzazione con i valori Ct del gene housekeeping, nel nostro caso il GAPDH.

Il numero dei cicli necessari affinché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presenti inizialmente.

Rispetto alla PCR tradizionale, è possibile quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione, fase in cui i reagenti non sono ancora esauriti e quindi la variabilità è minima. Al termine della PCR il software genera, anche, le curve di Melting che sono indicative della purezza degli amplificati, mettendo in evidenza la presenza di aspecifici.

Estrazione diretta del DNA da prelievi di muco intestinale

L'estrazione diretta degli acidi nucleici da prelievi di liquido di lavaggio intestinale è stata effettuata seguendo il metodo descritto da *Iacumin et al. (2009)* con alcune modifiche. I prelievi sono stati eseguiti presso l'ambulatorio di Endoscopia digestiva della U.O.C. di Chirurgia Generale e Trapianto di Fegato del Policlinico Universitario di Bari. Nella pratica, 1ml di campione è stato trasferito in un tubo con tappo a vite contenete 0.3 g di biglie di vetro (Sigma-Aldrich, Italia).

Il campione è stato centrifugato a 8000 rpm per 10 minuti a 4°C; il surnatante è stato eliminato con l'uso di un puntale senza allontanare le biglie.

Al pellet sono stati aggiunti 500 μ l di saccarosio al 10% (peso/volume, Fluka, Milano, Italia) e 25 μ l di lisozima (50 mg/ml, Sigma-Aldrich, Italia) e i campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati di nuovo a 8000 rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante è stato eliminato con l'uso di un puntale senza allontanare le biglie. Al pellet sono stati aggiunti 500 μ l di breaking buffer (2% Triton X-100, Sigma-Aldrich, Italia; 1% SDS, Sigma-Aldrich, Italia; 100 mM NaCl, Carlo

Erba Reagents, Italia; 10 mM Tris, Sigma-Aldrich, Italia; 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich, Italia) a pH 8 e 25 µl di proteinasi K (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Italia). I campioni sono stati, successivamente, incubati a 65°C per 1 ora e, dopo l'incubazione, sono stati aggiunti 500 µl di fenolo-cloroformio:alcol-isoamilico (25:24:1, pH 6.7, Merck Millipore, Milano, Italia) ed agitati vigorosamente per 3 volte per 2 minuti, facendo riposare per 1 minuto. I campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Dopo la centrifugazione saranno evidenti tre fasi. Dalla fase acquosa (fase superiore in cui è presente il DNA) sono stati prelevati 300 µl e trasferiti in una provetta pulita.

Ai campioni è stato addizionato 1 ml di etanolo (Merck Millipore, Milano, Italia) assoluto freddo (+4°C) e sono stati così centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C al fine di far precipitare il DNA.

Il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato asciugato sotto cappa.

I campioni sono stati risospesi in 50 µl di tampone TE (Tris-EDTA buffer, Sigma-Aldrich).

Individuazione del DNA genomico di *A. muciniphila* nell'uomo

Per l'identificazione di *Akkermansia muciniphila* nei campioni di liquido di lavaggio intestinale ottenuti in seguito a colonscopia, è stata effettuata prima un'estrazione del materiale genomico totale e successivamente una PCR Real Time end-point, la quale ha essenzialmente lo scopo di individuare la presenza/assenza del target. Per questo motivo sono stati scelti gli stessi specifici primer chiamati AM1 e AM2 (*Collado M.C. et al. 2007*), già utilizzati nella precedente analisi sulle feci.

Anche per quanto riguarda la procedura, è stata allestita la stessa reazione, in accordo con il protocollo fornito dalla ditta, ed è stato seguito lo stesso

programma termico dell'analisi sulle feci, ovviamente con l'unica differenza che il DNA è quello estratto dai campioni di liquido di lavaggio intestinale.

Analisi statistica

Le differenze significative tra i gruppi sperimentali sono state valutate con analisi della varianza ad una via, in cui i confronti di coppie multiple sono stati eseguiti con T-student test. P 0,05 è stato considerato come indice di differenze statistiche significative.

RISULTATI

Prove delle attività fermentative

Entrambi i ceppi di *A. muciniphila* (DSMZ 22959 e BAA835) hanno mostrato le capacità fermentative riportate in tabella 1:

Zucchero saggiato	Risultato	Zucchero saggiato	Risultato
Eritritolo	-	D-celiobiosio	+
D-arabinosio	-	D-maltosio	+
L-arabinosio	-	D-lattosio	+
D-ribosio	-	D-melibiosio	+
D-xilosio,	-	D-saccarosio	+
L-xilosio	-	D-trealosio	+
D-adonitolo,	-	Inulina	+
Metil-βD-xilopiranoside	-	D-melezitosio	+
D-galattosio	+	D-raffiniosio	+
D-glucosio	+	Metadone	+
D-fruttosio	+	Glicogeno	+
D-mannosio	+	Xilitolo	+
L-sorbosio	-	Gentiobiosio	+
L-ramnosio	-	D-turanosio	-
Dulcitolo	-	D-lixosio	-
Inositolo	-	D-tagatosio	-
D-mannitolo	-	D-fucosio	-
D-sorbitolo	-	L-fucosio	-
Metil-αD-Mannopiranoside	-	D-arabitololo	-
metil-αD-glucopiranoside	-	L-arabitololo	-
N-acetilglucosamina	+	Gluconato di potassio	-

Amigdalina	-	2-chetogluconato di potassio	-
Arbutina	+	5-chetogluconato di potassio	-
Esculina citrato ferrico	+		

Tabella 1: Risultati relativi all' attività fermentativa svolta dal ceppo di *A. muciniphila* DSMZ 22959 e BAA835.

Prove delle attività enzimatiche

La tabella 2, di seguito riportata, mostra la capacità del ceppo DSMZ 22959 relativa al saggio di diverse attività enzimatiche.

I risultati ottenuti sono compatibili con le attività metaboliche di *A. muciniphila*, in quanto gli enzimi riportati intervengono nella degradazione della mucina (*Derrien et al. 2007*).

Gli stessi risultati sono stati ottenuti con il ceppo BAA835.

N°	ENZIMA RICERCATO	REAZIONE
1	Controllo	-
2	Fosfatasi alcalina	+
3	Esterasi	-
4	Esterasi lipasi	-
5	Lipasi	-
6	Leucina arilamidasi	+
7	Valina arilamidasi	-
8	Cistina arilamidasi	-
9	Tripsina	-

10	α -chimotripsina	-
11	Fosfatasi acida	+
12	Naftol-AS-BI-fosfoidrolasi	+
13	α -galattosidasi	+
14	β -galattosidasi	+
15	β -glucuronidasi	-
16	α -glucosidasi	-
17	β -glucosidasi	+
18	N-acetil- β -glucosaminidasi	+
19	α -mannosidasi	-
20	α -fucosidasi	+

Tabella 2: Risultati relativi all' attività enzimatica svolta dal ceppo di *A. muciniphila* DSMZ 22959.

Antibiogramma

Di seguito (Tabella 3) sono riportati i risultati relativi alla sensibilità agli antibiotici di *A. muciniphila* DSMZ 22959. Il ceppo risulta sensibile a tutti gli antibiotici saggiati.

ANTIBIOTICO	S	I	R	Risultato
Amoxicillina	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Amoxicillina + Ac. Clavulonico	≥ 20	19-17	≤ 16	S

Azitromicina	≥ 18	17-15	≤ 14	S
Cloramfenicolo	≥ 25	24-21	≤ 20	S
Ceftazidima	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Cefaclor	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Ceftriaxone	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Eritromicina	≥ 26	25-19	≤ 18	S
Ciprofloxacina	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Doxiciclina	≥ 20	19-17	≤ 16	S
Gentamicina	≥ 23	22-20	≤ 19	S
Levofloxacina	≥ 16	15-14	≤ 13	S
Fosfomicina	≥ 16	15-14	≤ 13	S
Linezolid	≥ 23	22-21	≤ 20	S
Vancomicina	≥ 15	14-13	≤ 12	S
Trimetoprim +sulfametoxazolo	≥ 28	27-24	≤ 23	S
Nitrofurantoina	≥ 23	22-20	≤ 19	S
Rifampicina	≥ 26	25-23	≤ 22	S
Tetraciclina	≥ 22	21-19	≤ 18	S
Tobramicina	≥ 23	22-20	≤ 19	S

Tabella 3: Risultati relativi all' antibiogramma condotto sul ceppo di *A. muciniphila* DSMZ 22959.

Stato clinico dei ratti Wistar

Tutti i ratti Wistar sono stati pesati 2 volte alla settimana a partire da 22 giorni prima della somministrazione del DSS, cioè quando è iniziato il trattamento con *A. muciniphila*, e sono stati monitorati durante tutto il periodo dello studio. Per analizzare l'andamento della malattia in entrambi i gruppi sono stati presi in considerazione tre parametri fondamentali: peso corporeo, peso del colon e DAI. DAI è l'acronimo di disease activity index, un indice che combina diversi parametri tra cui: presenza di sangue nelle feci, forma delle feci e perdita di peso (Dieleman et al. 1997)

I risultati (Figura 8) dimostrano che il peso corporeo di tutti i ratti diminuisce drasticamente quando viene indotta la colite, ma in qualche modo *A. muciniphila* è in grado di proteggere gli animali dal forte calo di peso che colpisce quelli non trattati.

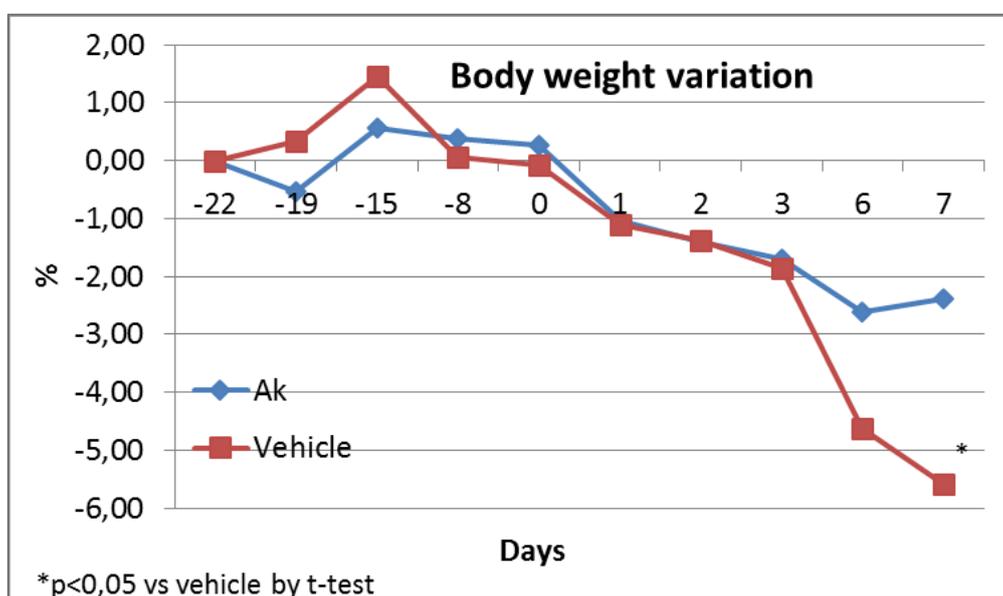


Fig. 8: In entrambi i gruppi il peso corporeo diminuisce, ma si può notare un piccolo miglioramento nei ratti che hanno ricevuto *Akkermansia Muciniphila*.

L'eventuale effetto benefico di *A. muciniphila* viene confermato anche dal DAI (Figura 9) che aumenta di valore appena viene indotta la colite in entrambi

gruppi, ma in quello trattato con il germe l'incremento è inferiore rispetto al gruppo non trattato.

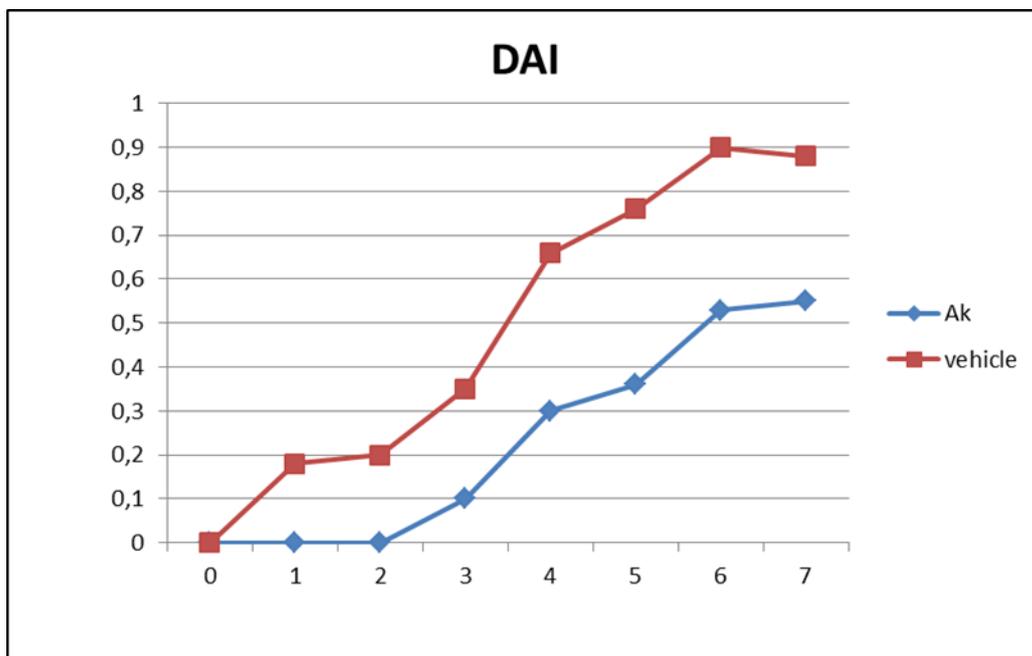


Fig. 9: Il DAI conferma il dato relativo al germe: *Akkermansia* protegge in minima parte dalla colite indotta.

Misurazione del colon

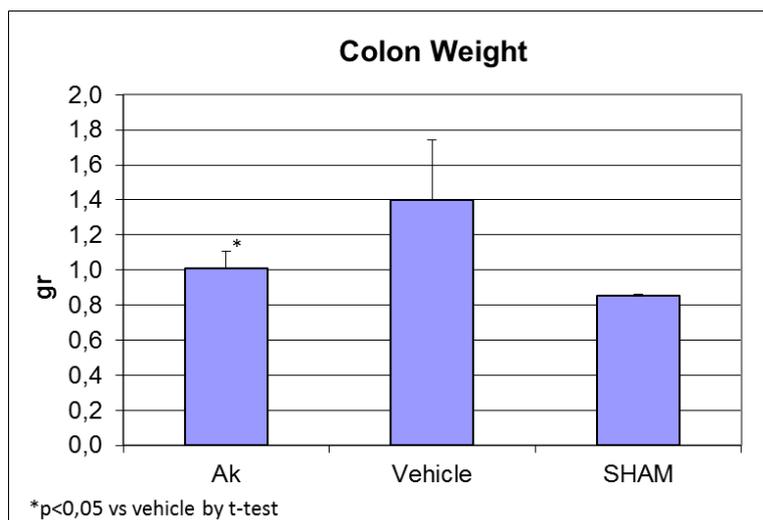


Fig. 10: Il peso del colon è maggiore nei ratti ai quali è stata indotta solo la colite da DSS senza il trattamento con *A. muciniphila*; il gruppo SHAM riguarda animali di controllo.

In tutti i ratti in cui è stata indotta la colite il peso del colon risulta fortemente aumentato, a causa dell'infiammazione provocata dal DSS proprio in questa zona dell'intestino, ma nei ratti trattati con *A. muciniphila* l'aumento del peso del colon risulta meno radicale rispetto a quello degli animali non trattati (Figura 10).

Analisi genetica delle feci

La presenza di *A. muciniphila* è stata rilevata in tutti i campioni di feci dove è stato somministrato, ovviamente in quantità maggiori nei ratti di controllo dove non è stata indotta la colite, perché l'infiammazione del colon comporta una maggiore defecazione e un cambiamento nella consistenza delle feci che spesso risultano acquose (Figura 11).

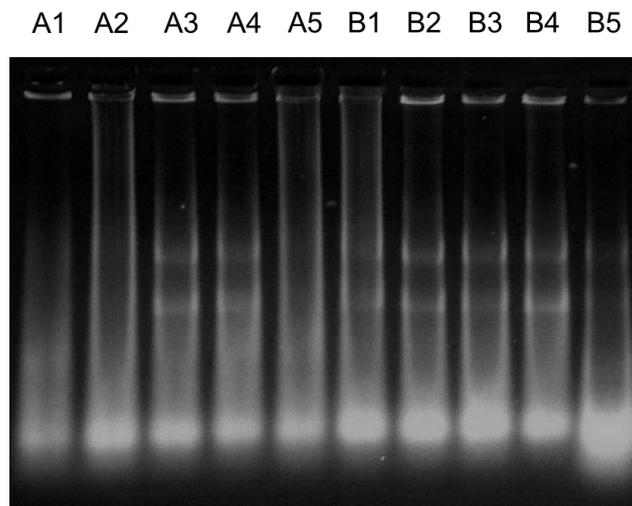


Fig.11: Individuazione del DNA di *A. muciniphila* nei campioni di feci: entrambi i gruppi sono stati trattati con *A. muciniphila*, ma la differenza è che nel gruppo A è stata indotta la colite da DSS, mentre il gruppo B è di controllo.

Livelli sierici di interleuchina-6

I risultati dimostrano che i livelli sierici di IL-6 nel gruppo di ratti a cui è stato somministrato solo DSS sono molto più elevati rispetto a quelli misurati nel sangue dei ratti pre-trattati con *A. muciniphila* (Figura 12).

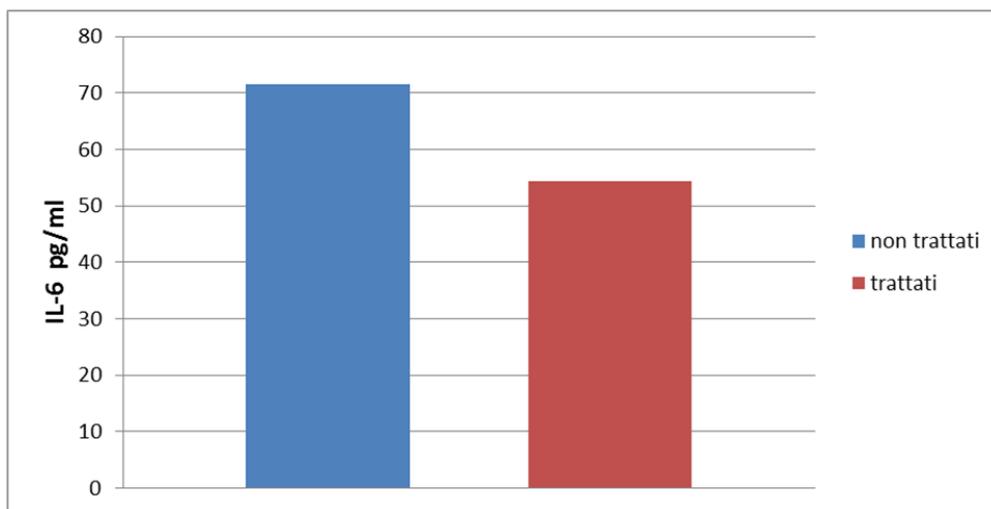


Fig.12: La citochina pro-infiammatoria IL-6 è presente in elevate concentrazioni nel gruppo di ratti non trattati, mentre nel gruppo trattato risulta meno concentrata.

E' stato dimostrato che l'IL-6 secreta dalle cellule dendritiche della milza, dopo la stimolazione del TLR, è un importante fattore di attivazione delle cellule T (Pasare et al. 2003).

Questo promettente dato ci ha indotto a continuare ad indagare sullo studio delle citochine, supponendo che il ruolo benefico svolto da *A. muciniphila* possa proteggere dalle IBD.

Stato clinico dei Topi CD1

Il secondo studio sugli animali ha previsto l'utilizzo di topi CD1, i quali risultano gli animali maggiormente impiegati nei lavori che prevedono l'induzione della colite.

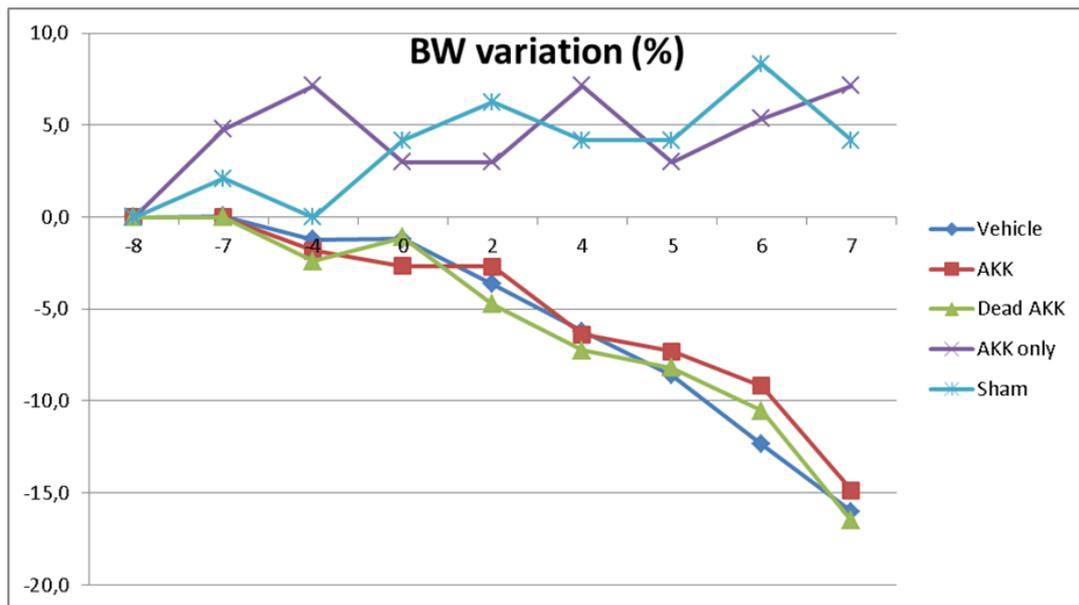


Fig.13: La somministrazione di *A. muciniphila* ucciso non sembra avere effetti positivi sulla perdita di peso successiva all'induzione della colite.

Anche per questo secondo esperimento gli animali sono stati suddivisi in gruppi:

- Trattati con *A. muciniphila* vivo (5×10^8);
- Trattati con *A. muciniphila* ucciso al calore;
- Trattati con veicolo (soluzione fisiologica);
- Controlli non trattati.

In tutti i gruppi, tranne per i controlli, è stata indotta la colite da DSS.

I topi sono stati pesati due volte la settimana a partire dall'inizio del trattamento con *Akkermansia muciniphila* e i risultati (Figura 13) dimostrano che, anche in questo caso, la perdita di peso dei topi pre-trattati con il germe a cui è stata indotta la colite è meno drastica rispetto a quelli non pre-trattati. I topi che hanno ricevuto il germe morto, invece, risultano non beneficiare del trattamento perché presentano una perdita di peso simile ai topi non trattati.

Attività mieloperossidasi

Un'eccellente valutazione dell'infiammazione intestinale è rappresentata dalla quantificazione dell'attività mieloperossidasi nei tessuti infiammati. La mieloperossidasi (MPO) è un enzima rilasciato dai globuli bianchi attivati in grado di modulare la dilatazione dei vasi in quanto consuma l'ossido nitrico, uno dei principali segnali che provoca la dilatazione. L'attività mieloperossidasi, quindi, viene considerata un utile indicatore dell'aumento di filtrato di granulociti neutrofili in risposta ad un processo infiammatorio acuto.

I colon dei topi sottoposti a trattamento con DSS che non hanno ricevuto il germe, così come i colon dei topi che, invece, hanno ricevuto il germe ucciso al calore, presentano una più elevata attività MPO rispetto a quelli in cui è stato effettuato il clistere con *A. muciniphila*.

In quanto l'attività MPO è correlata con la presenza di neutrofili nella lamina propria e nell'epitelio della mucosa intestinale, quindi con l'aumento di infiltrato infiammatorio, *A. muciniphila* risulta essere un componente importante nella protezione dallo stato infiammatorio (Figura 14).

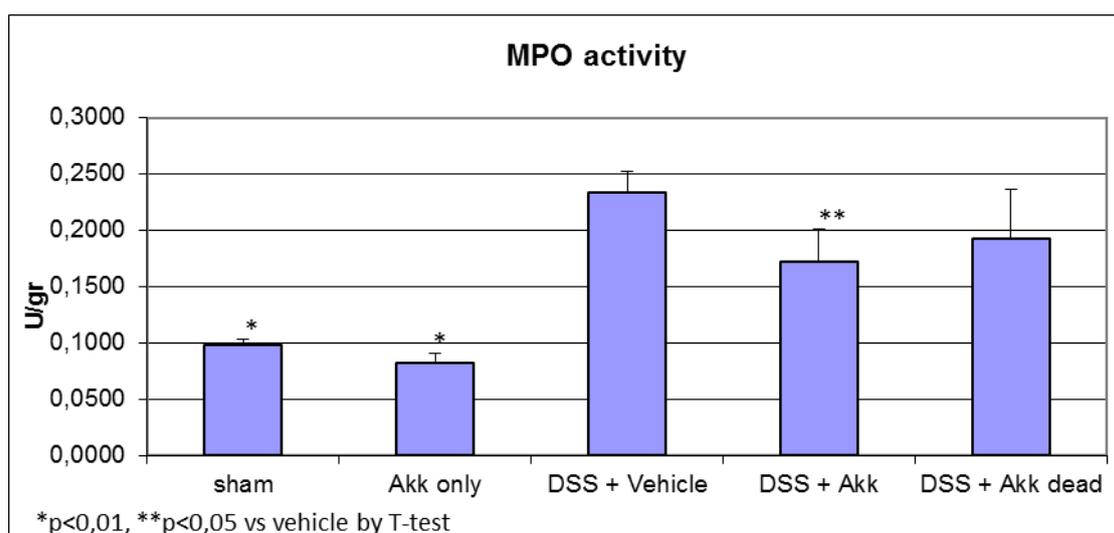


Fig.14: L'attività MPO è minore nei topi pre-trattati con *Akkermansia muciniphila* vivo.

Misurazione del colon

Così come il primo esperimento con i ratti, anche questo secondo esperimento con i topi CD1 conferma che il peso del colon degli animali pre-trattati con *A. muciniphila* è minore rispetto a quelli non trattati: questo indica che il germe potrebbe proteggere dagli effetti infiammatori della colite (Figura 15).

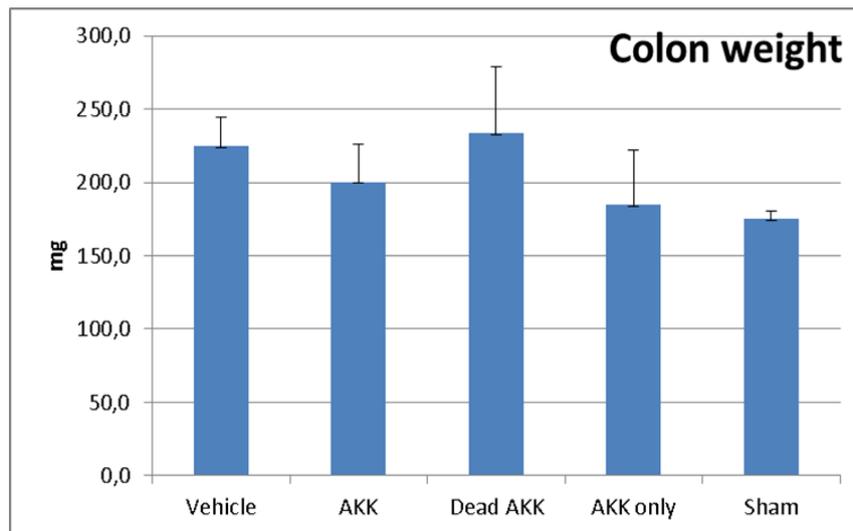


Fig. 15: Peso dei colon dei topi CD1 dei vari gruppi di studio.

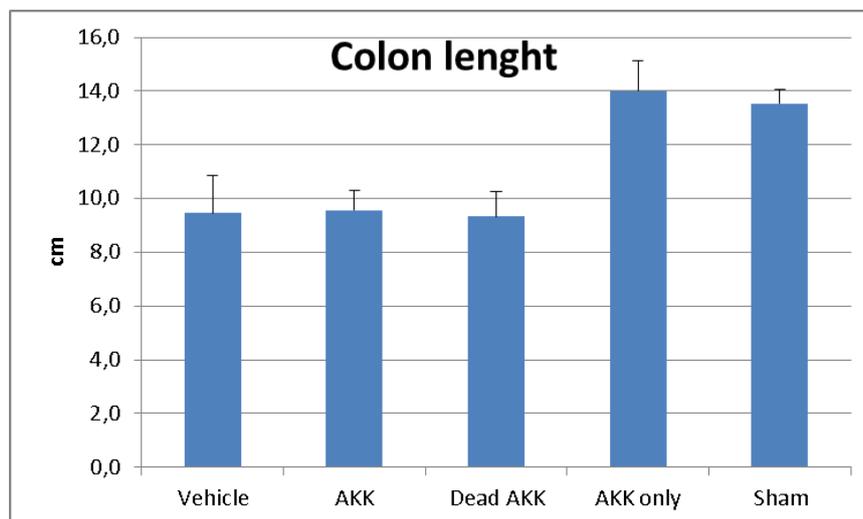


Fig. 16: Lunghezza dei colon dei topi CD1 dei vari gruppi di studio.

Per quanto riguarda la lunghezza dei colon, non ci sono sostanziali differenze tra i topi ai quali è stata indotta la colite trattati con *A. muciniphila* viva e quelli non trattati, ma viene confermata l'ipotesi che *A. muciniphila*, somministrata

morta, non è in grado di recare nessun apporto benefico ai topi CD1 affetti dalla colite (Figura 16).

Livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie

Le citochine sono segnali molecolari della risposta immunitaria responsabili dell'instaurarsi dell'infiammazione. Durante le patologie infiammatorie intestinali, come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, l'espressione delle citochine proinfiammatorie è fortemente aumentata sia perché la loro produzione viene stimolata da altri mediatori, sia perché queste rivestono un importante ruolo nel mantenimento dell'equilibrio tra stimoli pro e anti-infiammatori.

Le citochine che abbiamo scelto di indagare in prima istanza sono TNF- α e INF- γ .

I risultati, che derivano dall'analisi di queste citochine, dimostrano come *Akkermansia muciniphila* possa proteggere dall'infiammazione indotta dalla colite sperimentale (Figura 17). In particolare, solo il germe somministrato vivo è in grado di avere un effetto benefico, mentre quello somministrato morto non mostra nessun risultato positivo.

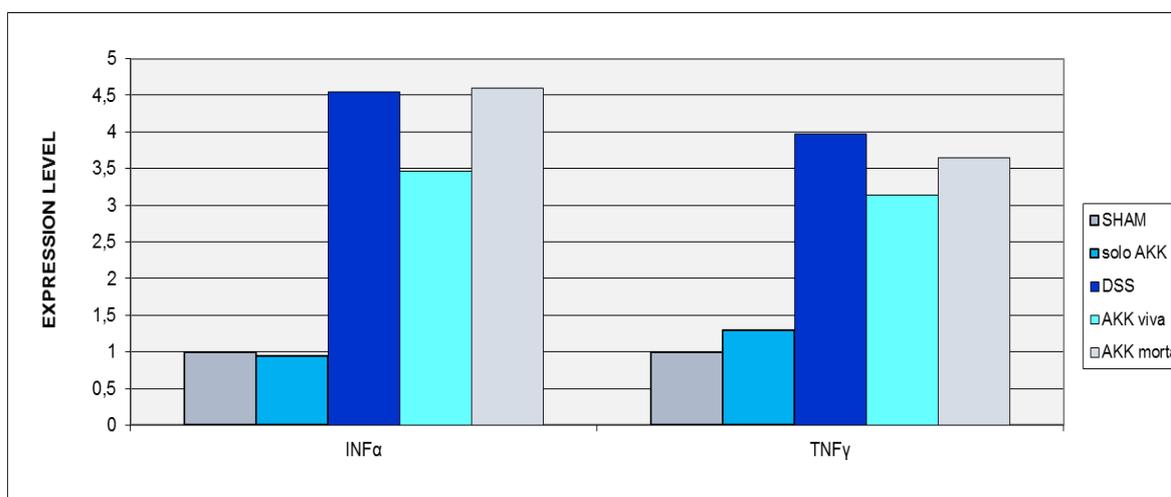


Fig. 17: L'espressione delle citochine pro-infiammatorie diminuisce negli animali pretrattati con *A. muciniphila* viva ai quali viene indotta la colite.

Certamente, l'espressione di altre citochine merita di essere indagata. Occorre però considerare che l'esiguità del campione (1/2 del colon di topo utile per estrazione di RNA e per il dosaggio dell'MPO) consente solo un numero limitato di saggi; parallelamente il costo elevato di un esperimento *in vivo* (animali DSS etc.) non ci ha consentito di raddoppiare il numero di animali.

Individuazione del DNA di *A. muciniphila* nei liquidi di lavaggio

L'analisi molecolare condotta con la tecnica della Real Time PCR ha consentito di rilevare la presenza di *A. muciniphila* in 3 dei 9 campioni di liquido di lavaggio intestinale derivanti dalla colonscopia di pazienti affetti da patologie infiammatorie intestinali.

CONCLUSIONI

Il microbiota intestinale è stato ampiamente studiato in questi ultimi anni, soprattutto in relazione al fatto che esso rappresenta il più complesso ecosistema presente in natura, costituito da 10^{13} – 10^{14} cellule per contenuto intestinale e che come numero supera di 10 volte le cellule dell'organismo umano (*Savege 1977*).

Il microbiota agisce come un vero e proprio “organo metabolico” che interagisce con l'ospite umano e svolge molte funzioni essenziali per mantenere l'uomo in buona salute (*Tremaroli et al. 2012*). Tra queste funzioni quella che riveste un ruolo molto importante è rappresentata dalla sua interazione con il sistema immunitario, in quanto i microrganismi che colonizzano l'intestino sono in grado di contribuire al mantenimento dell'omeostasi immunitaria nel tratto gastro-intestinale.

E' chiaro, quindi, che la salute dell'intestino e di tutto l'organismo possa risentire di un cambio nella composizione del microbiota intestinale commensale, definito disbiosi. Attualmente, sono diverse le patologie collegate con una situazione di microbiota intestinale alterato; esse racchiudono: celiachia, obesità, diabete, malattie infiammatorie intestinali, sindrome del colon irritabile, cancro colon-rettale, etc.

La nostra attenzione si è focalizzata sulle patologie infiammatorie intestinali, chiamate in inglese con l'acronimo IBD (inflammatory bowel disease) che si sviluppano in individui geneticamente suscettibili e che presentano eziologia multifattoriale. In queste patologie lo stato infiammatorio provoca una drastica alterazione della microflora intestinale, la quale apporta un sostanziale beneficio in condizioni normali, non solo a livello locale, ma a tutto l'organismo.

La composizione della microflora del colon cambia profondamente e in relazione con le diverse alterazioni del sistema immunitario. Alcuni studi

dimostrano una relazione tra i molteplici cambiamenti immunologici e le alterazioni del microbiota intestinale in corso di malattie infiammatorie intestinali, IBD, suggerendo un ruolo per la disbiosi del microbiota nella patogenesi della colite e quindi in tutte le malattie infiammatorie intestinali (*Hakansson A. et al. 2014*).

Il nuovo germe *Akkermansia muciniphila*, che abbiamo studiato in questi anni, rappresenta uno di quei batteri responsabili dell'apporto benefico all'intestino e sembra avere un ruolo immunomodulante importante in modelli infiammatori intestinali.

Questo lavoro ha previsto, proprio, la correlazione del germe *A. muciniphila* con i disturbi infiammatori intestinali come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa: i dati dimostrano che il germe, presente nella normale microflora intestinale di individui adulti, è in grado di svolgere un ruolo benefico in corso di IBD. Questo promettente risultato ci permette di auspicare che *A. muciniphila* possa essere sfruttato, in futuro, come un ottimo target terapeutico nella cura delle patologie infiammatorie intestinali.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu M.T., Vora P., Faure E., Thomas L.S., Arnold E.T., Arditi M.; *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide.* J. Immunol. 2001, 167, 1609–1616.
- Alam M., Midtvedt T., Uribe A.; *Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats.* Scand. J. Gastroenterol. 1994, 29, 445–451.
- Artis D.; *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.* Nat. Rev. Immunol. 2008, 8, 411–420.
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Juste C., Kaci G., Knol J., Lakhdari O., Layec S., Le Roux K., Maguin E., Mérieux A.P.; *Enterotypes of the human gut microbiome.* Nature 2011; Vol 473: 174–180
- Bauer H., Horowitz R.E., Levenson S.M., Popper H.; *The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice.* Am. J. Pathol. 1963, 42, 471–483.
- Baumgart D.C., Sandborn W.J.; *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.* The Lancet 2007, 369 (9573):1641–57.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G. and Brunak S.; *Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0.* J. Mol. Biol. 2004 340: 783–795.

- Brown E.M., Sadarangani M., Finlay B.B.; *The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine*. Nat. Immunol. 2013, 14, 660–667.
- Buschard K., Hansen C.H., Krich L., Nielsen D.S.; *Early life treatment with vancomycin propagates Akkermansia muciniphila and reduces diabetes incidence in the NOD mouse*. Diabetologia 2012; 55(8):2285-94
- Cahenzli J., Balmer M.L., McCoy K.D.; *Microbial-immune cross-talk and regulation of the immune system*. Immunology 2013, 138, 12–22.
- Calkins B.M., Mendeloff A.I.; *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. Epidemiol Rev. 1986, 8:60-91. Review.
- Campieri M., Gionchetti P.; *Bacteria as the cause of ulcerative colitis*. 2001. Gut 48:132–135.
- Candela M., Rampelli S., Turrone S., Severgnini M., Consolandi C., De Bellis G., Masetti R., Ricci G., Pession A., Brigidi P.; *Unbalance of intestinal microbiota in atopic children*. BMC Microbiology 2012; 12:95
- Caputo A., Dubourg G., Croce O., Gupta S., Robert C., Papazian L., Rolain J.M., Raoult D.; *Whole-genome assembly of Akkermansia muciniphila sequenced directly from human stool*. Biology Direct, BioMed Central. 2015
- Celasco G., Moro L., Aiello C., Mangano K., Milasi A., Quattrocchi C., Di Marco R.; *Calcium butyrate: Anti-inflammatory effect on experimental colitis in rats and antitumor properties*. Biomed Rep. 2014, 2(4):559-563.
- Cho J.H.; *The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nat. Rev. Immunol. 2008, 8, 458–466.
- Chow J., Lee S.M., Shen Y., Khosravi A., Mazmanian S.K.; *Host bacterial symbiosis in health and disease*. Adv. Immunol. 2010, 107, 243-274.
- Chung H., Pamp S.J., Hill J.A., Surana N.K., Edelman S.M., Troy E.B., Reading N.C., Villablanca E.J., Wang S., Mora J.R., et al.; *Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota*. Cell 2012, 149, 1578–1593.

- Claesson M.J., O’Sullivan O., Wang Q., Nikkila J., Marchesi J.R., Smidt H., de Vos W.M., Ross R.P., O’Toole P.W.; *Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine*. PLoS One 2009.
- Corfield A.P., Carroll D., Myerscough N, Probert C.S.; *Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease*. Front. Biosci. 2001. 6:D1321–D1327.
- De Palma G., Nadal I., Medina M., Donat E. Ribes-Koninckx C., Calabuig M., Sanz Y.; *Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children*. BMC Microbiol. 2010, 10, 63, doi:10.1186/1471-2180-10-63.
- de Vos W.M., de Vos E.A.; *Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation*. Nutr Rev 2012; 70(Suppl 1): S4556.
- Derrien M., Collado M.C., Ben-Amor K., Salminen S., de Vos W.M.; *The mucin degrader Akkermansia muciniphila is an abundant resident of the human intestinal tract*. Appl Environ Microbiol. 2008 March; 74(5): 1646–1648.
- Derrien M., Van Baarlen P., Hooiveld G., Norin E., Müller M., de Vos W.M.; *Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader Akkermansia muciniphila*. Front Microbiol 2011; 2:166.
- Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos W.M.; *Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004, 54, 1469–1476.
- Derrien M.; *Mucin utilisation and host interactions of the novel intestinal microbe Akkermansia muciniphila*. PhD. Thesis, 2007 Wageningen University.
- Dieleman L.A., Pena A.S., Meuwissen S.G., van Rees E.P.; *Role of animal models for the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol Suppl 1997, 223:99-104.

- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.; *Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science 2005, 308, 1635–1638.
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.; *Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science 2005, 308, 1635–1638.
- Euzéby J. P.; *List of bacterial names with standing in nomenclature available on the internet*. J Syst Bacteriol 1997, 47(2): 590-2
- Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk J.P., Druart C., Bindels L.B., Guiot Y., Derrien M., Muccioli G.G., Delzenne N.M., et al.; *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 9066–9071.
- Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Hernández P.E., García T., Martín R.; *PCR–RFLP authentication of meats from red deer (Cervus elaphus), fallow deer (Dama dama), roe deer (Capreolus capreolus), cattle (Bos taurus), sheep (Ovis aries), and goat (Capra hircus)*. Journal of Agricultural Food Chemistry 2006, 54: 1144–1150.
- Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V.; *Intestinal microflora in early infancy: composition and development*. Acta Paediatr 2003, 92, 48-55.
- Farrell R.J., Peppercorn M.A.; *Ulcerative colitis*. Lancet 2002, 26;359(9303):331-40.
- Favier C.S., Vaughan E.E., de Vos W.M.; *Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates*. Appl Environ Microbiol 2002, 68, 219-226.
- Feuillet V., Medjane S., Mondor I., Demaria O., Pagni P.P., Galán J.E., Flavell R.A., Alexopoulou L.; *Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006; 103: 12487-12492.

- Franchimont D., Vermeire S., El Housni H., Pierik M., Van Steen K., Gustot T., et al.; *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis.* Gut. 2004; 53(7):987-92.
- Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.; *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104, 13780–13785.
- Fujino S., Andoh A., Bamba S., Ogawa A., Hata K., Araki Y., et al.; *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease.* Gut. 2003; 52(1):65-70.
- Georg L.K., Brown J.M.; *Rothia, gen. nov. an aerobic genus of the family Actinomycetaceae.* Int. J. Syst. Bacteriol. 1967, 17, 79–88.
- Gerritsen J., Smidt H., Rijkers G.T., de Vos W.M.; *Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics.* Genes Nutr 2011; 6: 20940.
- Gewirtz A.T., Navas T.A., Lyons S., Godowski P.J., Madara J.L.; *Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.* J. Immunol. 2001, 167, 1882–1885.
- Gordon H.A., Bruckner-Kardoss E.; *Effect of normal microbial flora on intestinal surface area.* Am. J. Physiol. 1961, 201, 175–178.
- Hakansson A., Tormo-Badia N., Baridi A., Xu J., Molin G., Hagslatt M.L., Karlsson C., Jeppsson B., Cilio C.M., Ahrné S.; *Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice.* Clin. Exp. Med., 2014; DOI 10.1007/s10238-013-0270-5.
- Hallstrom M., Eerola E., Vuento R., Janas M., Tammela O.; *Effects of mode of delivery and necrotizing enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004, 23:463-470

- Hammes W.P., Hertel C.; *The Genera Lactobacillus and Carnobacterium*. Prokaryotes 2006, 4:320-403,
- Haverson K., Rehakova Z., Sinkora J., Sver L., Bailey M.; *Immune development in jejunal mucosa after colonization with selected commensal gut bacteria: A study in germ-free pigs*. Vet. Immunol. Immunopathol. 2007, 119, 243–253.
- Helgeland L., Vaage J.T., Rolstad B., Midtvedt T., Brandtzaeg P.; *Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine*. Immunology 1996, 89, 494–501.
- Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., et al.; *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology. 2005; 129(2):550-64.
- Hollister E.B., Gao C., Versalovic J.; *Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health*. Gastroenterology 2014, 146, 1449–1458.
- Hong P.Y., Croix J.A., Greenberg E., Gaskins H.R., Mackie R.I.; *Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity*. PLoS One 2011.
- Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J.; *Interactions between the microbiota and the immune system*. Science 2012, 336, 1268–1273.
- Hopkins M.J., Macfarlane G.T.; *Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection*. J Med Microbiol 2002, 51, 448-454.
- Iacumin L., Cecchini F., Manzano M., Osualdini M., Boscolo D., Orlic S., Comi G.; *Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods*. Food Microbiol. 2009 Apr; 26(2):128-35.

- Ivanov I., Frutos R.L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D., Sartor R., et al. *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine.* Cell Host Microbe. 2008; 4(4):337-49.
- Johansson M.E.V., Larasson J.M.H., Hansson G.C.; *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011; 108(S1):4659-65.
- Kang C.S., Ban M., Choi E.J., Moon H.G., Jeon J.S., Kim D.K., Park S.K., Jeon S.G., Roh T.Y., Myung S.J., et al.; *Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis.* PLoS One 2013.
- Kant R., Zoetendal E.G., Plugge C.M., Derrien M., Malfatti S.A., Chain P.S., Woyke T., Palva A., de Vos W.M., Smidt H; *The Genome of Akkermansia muciniphila, a Dedicated Intestinal Mucin Degradar, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes.* PLoS ONE 2011.
- Katz J.A.; *Advances in the medical therapy of inflammatory bowel disease.* Curr Opin Gastroenterol. 2002 Jul; 18(4):435-40.
- Kelly D., Campbell J.I., King T.P., Grant G., Jansson E.A., Coutts A.G., Pettersson S., Conway S.; *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA.* Nat. Immunol. 2004, 5, 104–112.
- Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jäger A., Strom T., et al; *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.* Nature. 2007; 448(7152):484-7.
- Lee J., Mo J.H., Katakura K., Alkalay I., Rucker A.N., Liu Y.T., Lee H.K., Shen C., Cojocaru G., Shenouda S., et al.; *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells.* Nat. Cell Biol. 2006, 8, 1327–1336.

- Lee Y.K., Mazmanian S.K.; *Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?* Science 2010, 330, 1768–1773.
- Lees C.W., Barrett J.C., Parkes M., Satsangi J.; *New IBD genetics: Common pathways with other diseases.* Gut 2011, 60, 1739–1753.
- Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.; *Obesity alters gut microbial ecology.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 11070–11075.
- Liévin-Le Moal V., Servin A.L.; *The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota.* Clin. Microbiol. 2006; 19:315–337.
- Macfarlane S., Macfarlane G.T.; *Regulation of short-chain fatty acid production.* Proc. Nutr. Soc. 2003, 62, 67–72.
- Macpherson A.J., Harris N.L.; *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system.* Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 478–485.
- Macpherson A.J., Hunziker L., McCoy K., Lamarre A.; *IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms.* Microbes Infect. 2001, 3, 1021–1035.
- Maier E., Anderson R.C., Roy N.C.; *Understanding How Commensal Obligate Anaerobic Bacteria Regulate Immune Functions in the Large Intestine.* Nutrients 2015, 7, 45-73.
- Manel N., Unutmaz D., Littman D.R.; *The differentiation of human T(h)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat.* Nat Immunol. 2008; 9(6):641-9.
- Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., et al.; *Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.* Gut 2006, 55, 205–211.

- Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimarães V.D., Sokol H., Doré J., Corthier G. and Furet J.P.; *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. BMC Microbiology 2009, 9:123
- Martens E.C., Chiang H.C., Gordon J.I.; *Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont*. Cell Host Microbe 2008, 4, 447–457.
- Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L.; *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. Nature 2008, 453, 620–625.
- Melmed G., Thomas L.S., Lee N., Tesfay S.Y., Lukasek K., Michelsen K.S., Zhou Y., Hu B., Arditi M., Abreu M.T., et al.; *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: Implications for host-microbial interactions in the gut*. J. Immunol. 2003, 170, 1406–1415.
- Mondot S., Kang S., Furet J.P., Aguirre de Carcer D., McSweeney C., Morrison M., Marteau P., Dore J., Leclerc M.; *Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota*. Inflamm. Bowel Dis. 2011, 17, 185–192.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L.; *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol. 1986;136(7):2348-57.
- Mowat A.M., Agace W.W.; *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nat. Rev. Immunol. 2014, 14, 667–685.
- Neef A., Sanz Y.; *Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 2013, 16, 679–687.
- Neish A.S., Gewirtz A.T., Zeng H., Young A.N., Hober M.E., Karmali V., Rao A.S., Madara J.L.; *Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination*. Science 2000, 289, 1560–1563.

- Nielsen O.H., Rask-Madsen J.; *Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease*. Scand. J. Gastroenterol. 1996; 31 Suppl. 216:146-59.
- Okayasu I., HataKeymana S., Yamada M. et al; *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990 98:694-702.
- Ouwerkerk J.P., de Vos W.M., Belzer C.; *Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface*. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2013, 27, 25–38.
- Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A.; *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 13766-13771.
- Parronchi P., Romagnani P., Annunziato F., Sampognaro S., Becchio A., Giannarini L., et al.; *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. Am J Pathol. 1997;150 (3):823-32.
- Pasare C., Medzhitov R.; *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science 2003; 299:1033-1036.
- Peterson L.W., Artis D.; *Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat. Rev. Immunol. 2014, 14, 141–153.
- Place R.F., Noonan E.J., Giardina C.; *HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: Down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B α* . Biochem. Pharmacol. 2005, 70, 394–406.
- Png C.W., Linden S.K., Gilshenan K.S., Zoetendal E.G., McSweeney C.S., Sly L.I., McGuckin M.A., Florin T.H.; *Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria*. Am. J. Gastroenterol. 2010, 105, 2420–2428.

- Podolsky D.K.; *Lessons from genetic models of inflammatory bowel disease*. Acta Gastroenterol. Belg. 1997, 60, 163–165.
- Porowska H., Paszkiewicz-Gadek A.; *Human gastrointestinal tract mucins encoded by the MUC gene family*. Postepy Hig Med Dosw 2000; 54(2):183-198
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., et al.; *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature 2010, 464, 59–65.
- Qiu, X.; Zhang, M.; Yang, X.; Hong, N.; Yu, C. *Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis*. J. Crohns Colitis 2013, 7, e558–e568.
- Raetz C.R., Whitfield C.; *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem 2002, 71: 635-700.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R.; *Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell 2004, 118, 229–241.
- Reis B.S., Mucida D.; *The role of the intestinal context in the generation of tolerance and inflammation*. Clin. Dev. Immunol. 2012, 2012, 157948.
- Rhodes J.M., Collins P.; *Lessons for inflammatory bowel disease from rheumatology*. Dig Liver Dis. 2006 Mar; 38(3):157-62.
- Rimoldi M., Chieppa M., Salucci V., Avogadri F., Sonzogni A., Sampietro G.M., Nespoli A., Viale G., Allavena P., Rescigno M., et al.; *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells*. Nat. Immunol. 2005, 6, 507–514.
- Rioux J.D., Xavier R.J., Taylor K.D., Silverberg M.S., Goyette P., Huett A., Green T., Kuballa P., Barmada M.M., Datta L.W., et al.; *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat. Genet. 2007, 39, 596–604.

- Round J.L., Mazmanian S.K.; *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat. Rev. Immunol. 2009, 9, 313–323.
- Russel W.R., Hoyles L., Flint H.J., Dumas M.E.; *Colonic bacterial metabolites and human health*. Curr. Opin. Microbiol. 2013, 16, 246-254.
- Savage D.C., Siegel J.E., Snellen J.E., Whitt D.D.; *Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms*. Appl. Environ. Microbiol. 1981, 42, 996–1001.
- Savage D.C.; *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol 1977, 31, 107-133.
- Savage D.J., Siegel J., Snellen D.W.; *Transit time of epithelial cells in the small intestines of germ-free mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms*. Appl. Environ. Microbiol. 1981, 42, 996–1001.
- Scanlan P.D., Shanahan F., Clune Y., Collins J.K., O’Sullivan G.C., O’Riordan M., Holmes E., Wang Y., Marchesi J.R.; *Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis*. Environ. Microbiol. 2008, 10, 789–798.
- Schippa S., Conte M.P.; *Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health*. Nutrients 2014, 6, 5786-5805.
- Scott K.P., Antoine J.M., Midtvedt T., van Hemert S.; *Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease*. Microbial Ecology in Health and Disease 2015
- Segain J.P., de la Blétière D.R., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottière H.M., Glamiche J.P., et al.; *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn’s disease*. Gut 2000, 47, 397-403.
- Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C., Finlay B.B.; *Gut microbiota in health and disease*. Physiol. Rev. 2010, 90, 859–904.

- Sharma R., Schumacher U., Ronaasen V., Coates M.; *Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets.* Gut 1995, 36, 209–214.
- Shen Y., Giardino Torchia M.L., Lawson G.W., Karp C.L., Ashwell J.D., Mazmanian S.K.; *Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection.* Cell Host Microbe 2012, 12, 509–520.
- Smith K., McCoy K.D., Macpherson A.J.; *Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota.* Semin. Immunol. 2007, 19, 59–69.
- Sobhani I., Tap J., Roudot-Thoraval F., Roperch J.P., Letulle S., Langella P., Corthier G., Tran van Nhieu J., Furet J.P.; *Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients.* PLoS One 2011, 6, e16393.
- Soderholm J.D., Olaison G., Peterson K.H., Franzen L.E., Lindmark T., Wiren M., et al.; *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the noninflamed ileum of Crohn's disease.* Gut. 2002; 50(3):307-13.
- Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., et al.; *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105, 16731–16736.
- Stappenbeck T.S., Hooper L.V., Gordon J.I.; *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 15451–15455.
- Stark P.L. and Lee A.; *The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life.* J. Med. Microbiol. The Pathological Society of Great Britain and Ireland 1982, Vol. 15:189-203
- Swidsinski A., Loening-Baucke V., Theissing F., Engelhardt H., Bengmark S., Koch S. et al.; *Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon.* Gut. 2007, 56(3):343-50.

- Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., Colombel J.F.; *Dysbiosis in inflammatory bowel disease*. Gut 2004, 53, 1–4.
- Tannock G.W.; *Exploring the relationships between intestinal microflora and inflammatory conditions of the human bowel and spine*. Antonie van Leeuwenhoek 2002, Kluwer Academic Publishers, 81: 529–535
- Trallori G., Palli D., Saieva C., Bardazzi G., Bonanomi A., d'Albasio G., et al.; *A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92)*. Scand J Gastroenterol. 1996, 31(9):892-9.
- Tremaroli, V. Bäckhed, F; *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature 2012, 489, 242–249.
- Tripathi P., Aggarwal A.; *NF- κ B transcription factor: A key player in the generation of immune response*. Curr. Sci. 2006, 90, 519–531.
- Valentini G., Guidi L., Costanzo M., Ciarniello M., De Vitis I., Capristo E., Fedeli G.; *An update on the medical treatment of Crohn's disease*. Panminerva Med. 2003, 45(1):15-22.
- Van Baarlen P., Wells J.M., Kleerebezem M.; *Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli*. Trends Immunol. 2013, 34, 208–215.
- Van der Waaij D., Berghuis-de Vries J.M., Lekkerkerk V.; *Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice*. J. Hyg. (Lond.) 1971, 69, 405–411.
- Wang L., Christophersen C.T., Sorich M.J., Gerber J.P., Angley M.T. and Conlon M.A.; *Low Relative Abundances of the Mucolytic Bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp. in Feces of Children with Autism*. Applied and Environmental Microbiology 2011; 77(18):6718.
- Wells J.M., Rossia O., Meijerink M., van Baarlen P.; *Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 108, 4607–4614.

- Wells J.M.; *Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli*. Microb. Cell Fact. 2011.
- Yang L., Anderson D.E., Baecher-Allan C., Hastings W.D., Bettelli E., Oukka M., et al.; *IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells*. Nature. 2008; 454(7202):350-2.
- Zeuthen L.H., Fink L.N., Frokiaer H.; *Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-β*. Immunology 2008, 123, 197–208.
- Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D., de Vos W.M.; *Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces*. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 3401–3407.
- Wells J.M., Loonen L.M., Karczewski J.M.; *The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine*. Int. J. Med. Microbiol. 2010, 300, 41–48.
- Hamer H.M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J., Brummer R.J.; *The role of butyrate on colonic function*. Aliment. Pharmacol. Ther. 2008, 27, 104–119.