

MINERVA

GASTROENTEROLOGICA
E DIETOLOGICA

VOL. 62 · SUPPL. I · No. 2 · JUNE 2016

**EFFICACIA DI UN NUTRACEUTICO AD AZIONE PROBIOTICA
E PREBIOTICA ASSOCIATO A DIETA CONTROLLATA
E IDROCOLONTERAPIA NEL TRATTAMENTO
DEL DISMICROBISMO INTESTINALE SINTOMATICO**

Carmen LAURINO, Beniamino PALMIERI, Anna ESPOSITO, Andrea MALAGOLI,
Lucia PALMIERI, Maria VADALÀ



E D I Z I O N I · M I N E R V A · M E D I C A

ORIGINAL ARTICLE

Efficacia di un nutraceutico ad azione probiotica e prebiotica associato a dieta controllata e idrocolonterapia nel trattamento del dismicrobismo intestinale sintomatico

Carmen LAURINO^{1,2*}, Beniamino PALMIERI^{1,2}, Anna ESPOSITO²,
Andrea MALAGOLI³, Lucia PALMIERI^{2,4}, Maria VADALÀ^{1,2}

¹Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia; ²Network del Secondo Parere, Modena, Italia; ³Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia; ⁴Divisione di Nefrologia e Dialisi A.O.U. Modena, Modena, Italia

*Corresponding author: Carmen Laurino, Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Largo del Pozzo 71, 41124, Modena (MO), Italia. E-mail: carmen.laurino@hotmail.it

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF A PROBIOTIC AND PREBIOTIC NUTRACEUTICAL ASSOCIATED WITH CONTROLLED DIET AND HYDROCOLON THERAPY IN THE TREATMENT OF SYMPTOMATIC INTESTINAL DISMICROBISM

BACKGROUND: Probiotics are usually administered for the treatment of gastrointestinal and immune diseases, such as chronic inflammatory bowel diseases (IBD), intestinal bowel syndrome (IBS), and vaginal infections. This anecdotal spontaneous observational clinical study investigates the efficacy of a probiotic formulation composed by *L. rhamnosus* (LRH11), *L. acidophilus* (LA5) and *B. lactis* (BB12) enriched with short-chain fructose-oligosaccharides (FOS), in association with an individually tailored balanced diet and hydro-colon therapy, for the treatment of Crohn's Disease, IBS, diverticulitis, psoriasis and psoriatic arthritis.

METHODS: Forty-five patients were enrolled at the second opinion Network, in Modena, Italy. Patients were administered 2 capsules/day for 3 months of the galenic formulation (1 capsule in the morning before having breakfast and 1 capsule in the evening before going to bed), and to follow a proper diet during the probiotic intake. Before starting the treatment and at the end of the study the concentration of faecal calprotectin (index of gut inflammation) was tested in order to assess intestinal inflammation by a quantitative rapid test points of care (POC) system and urinary indican and skatole concentration (for gut disbiosis), by colorimetric and liquid chromatography method, respectively. Furthermore, 7 patients affected by recent severe constipation and pain were submitted to one session of hydro colon-therapy to clean the gut, before starting the treatment. **RESULTS:** after three months of treatment, urinary indican and faecal calprotectin values significantly decreased ($P=0.005$ and $P=0.00$ respectively), and clinical symptoms (evaluated by Scott-Huskisson scale) improved.

CONCLUSIONS: the association of our probiotic/prebiotic formulation with a balanced diet and hydro-colon therapy, when required, was effective to improve inflammation and disbiosis in patients affected by Crohn's Disease, IBS, diverticulitis, psoriasis and psoriatic arthritis, without side effects.

(Cite this article as: Laurino C, Palmieri B, Esposito A, Malagoli A, Palmieri L, Vadalà M. Efficacia di un nutraceutico ad azione probiotica e prebiotica associato a dieta controllata e idrocolonterapia nel trattamento del dismicrobismo intestinale sintomatico. Minerva Gastroenterol Dietol 2016;62(Suppl. 1 to No. 2):1-19)

Key words: Disbiosis - Probiotics - Intestines - Psoriasis - Dietary supplements.

Il termine "probiotici" è stato introdotto per la prima volta nel 1965 da Lilly *et al.*; contrariamente agli antibiotici, i probiotici erano

definiti fattori derivati da microbi che stimolano la crescita di altri organismi. Nel 1989, Roy Fuller accentuò il requisito utilità clinica

dei probiotici somministrati all'ospite. Trattasi dunque di microrganismi vitali, soprattutto batteri e lieviti ad assunzione orale e con effetti benefici sulla salute^{1,2}. Essi possono essere assunti naturalmente con prodotti a base di latte, oppure sotto forma incapsulata, senza prescrizione medica ed hanno, generalmente, il ruolo di riequilibrare il microbiota autoctono.

Attualmente i disturbi funzionali dell'apparato digerente, interessano più del 20% della popolazione mondiale, con rilevanti implicazioni a livello socio-economico e sanitario³. Peraltro molti studi suffragano il concetto secondo cui il microbiota intestinale è attivamente coinvolto nella patofisiologia di malattie funzionali dell'intestino, onde il recente ricorso al loro uso.

Ricerche recenti e non, confermano la efficacia dei probiotici su una varietà di disturbi gastrointestinali ed extraintestinali, incluse malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI),⁴ la sindrome del colon irritabile (SCI),⁵ le infezioni vaginali⁶ e immunodisergie che includono anche l'apparato intestinale⁶. Alcuni probiotici sono stati studiati anche in relazione possibili benefici in corso di eczema atopico⁷, artrite reumatoide⁸ e cirrosi epatica⁹. In generale la maggiore evidenza di efficacia clinica dei probiotici è legata al riequilibrio dell'ecoflora intestinale (agiscono incrementando il numero di batteri anaerobi benefici e riducendo la popolazione di microrganismi patogeni potenziali), e alla stimolazione della funzione immunitaria sia solubile che cellulosa-mediata.

Beneficio sintomatico quasi immediato con la loro assunzione si osserva su uno dei sintomi più squisitamente patognomonico di acuto squilibrio flogogeno quali-quantitativo della flora batterica, la diarrea, specie quella causata dagli antibiotici, e antimicotici o in corso di disbiosi dovuta all'uso di questi farmaci^{10,11}. È noto, inoltre, che i probiotici riducono il rischio del cancro del colon nei modelli animali, probabilmente perché inibiscono l'attività di alcuni enzimi batterici che possono incrementare il livello di pro-cancerogeni, dato clinicamente al momento non ancora suffragato¹². Quanto all'utilizzo dei probiotici in ambito di patologia enterocolica, le coliti a multiforme

eziologia, (incluse quella ulcerosa e Morbo di Crohn), e la SCI, rappresentano un importante obiettivo terapeutico, specie in relazione a trattamenti reintegrativi a lungo termine per mantenere una condizione clinica di regressione.

Nella nostra casistica abbiamo aggiunto anche la psoriasi e l'artrite psoriasica, per la sua intima correlazione tra espressione clinica e squilibri nutrizionali e dell'ecoflora dei pazienti affetti. Quanto alle indagini di laboratorio utili a una dimostrazione di efficacia terapeutica dei probiotici, abbiamo ritenuto utile adottare i seguenti metodi:

Test di Disbiosi intestinale

La disbiosi intestinale è un'alterazione qualitativa e/o quantitativa della flora batterica intestinale e delle sue attività metaboliche¹³. Le analisi del DNA batterico hanno consentito di eseguire una precisa caratterizzazione delle oltre 500 differenti specie batteriche presenti lungo tutto il tratto gastrointestinale, con un contenuto luminale complessivo di cellule microbiche circa 10 volte superiore al numero delle cellule somatiche¹⁴ la loro concentrazione e la precisazione dei rapporti numerici e sinergici esistenti tra loro¹⁵. L'ecosistema microbico dell'intestino di ogni singolo individuo adulto subisce un primo imprinting¹³ e si mantiene relativamente stabile nel tempo in funzione dei parametri dell'habitat endoluminale. La concentrazione della flora batterica cresce lungo tutto il tratto gastrointestinale in modo esponenziale in senso oro-fecale. Nello stomaco e nel primo tratto dell'intestino tenue si osserva una bassa concentrazione di batteri pari a 10^1 - 10^4 per grammo di contenuto, e aumenta poi successivamente a valori di 10^{11} - 10^{12} microrganismi/g a livello del colon. In modo particolare, il microbiota del digiuno appare dominato da specie batteriche appartenenti al genere *Streptococcus* ma, solo a livello ileocecale, è presente una significativa popolazione di batteri¹⁶. L'analisi dei geni effettuata su campioni del tratto gastrointestinale umano, ha evidenziato la presenza a livello dell'intestino tenue, di sequenze appartenenti al sottogruppo *Bacillus* del phylum *Firmicutes*, in modo

particolare *Streptococcaceae*. È stata, inoltre, riscontrata la presenza di membri appartenenti al phylum *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Lachnospiraceae*¹⁷. L'intestino crasso rappresenta il sito del tratto gastrointestinale con il più alto numero di batteri e la maggiore diversità microbica. Si tratta soprattutto di anaerobi stretti di cui il 54-75% Gram⁺. A livello intestinale possiamo distinguere in generale specie batteriche nocive (*Pseudomonas Aeruginosa*, *Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*), batteri ad azione protettiva che possono divenire nocivi in particolari condizioni (*E. Coli*, *Enterococchi*, *Streptococchi*, *Bacteroidi*) e batteri a permanente azione protettiva appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Bifidobacterium*¹⁸. Nonostante il complesso ecosistema microbico sia relativamente stabile nel corso della vita adulta, modificazioni correlate all'età, al tipo di alimentazione, all'assunzione di farmaci e ad altri numerosi fattori, comportano inevitabilmente variazioni qualitative e/o quantitative della sua composizione determinando la comparsa di una condizione di disbiosi intestinale. Aumentano di conseguenza le attività metaboliche microbiche in senso proteolitico e/o saccarolitico con induzione fenomeni fermentativi e/o putrefattivi¹⁹, e lo sviluppo di gas intestinali, in forma di meteorismo, flatulenza, alterazioni di opposto segno del transito associati a coliche addominali¹⁸.

Il Disbiosi Test è un presidio di laboratorio che consente, mediante metodica colorimetrica e cromatografica liquida, di dosare sulle urine due indicatori di disbiosi intestinale: l'indolo e lo scatolo. Questi due indicatori sono metaboliti dell'aminoacido Triptofano e consentono di verificare l'eventuale presenza di fenomeni fermentativi e/o putrefattivi a livello intestinale²⁰. L'aminoacido Triptofano normalmente assunto con la dieta subisce, ad opera di alcune specie batteriche intestinali, un processo di metabolizzazione che comporta, dal punto di vista biochimico, la perdita di una catena laterale con produzione di un metabolita che prende il nome di indolo⁹. L'indolo così prodotto viene assorbito a livello della mucosa intestinale e attraverso il circolo entero-epatico viene convogliato a livello epatico dove subisce un

processo enzimatico di detossicazione bifasica. In fase 1, infatti, l'indolo subisce una reazione di conversione in 3-idrossi-indolo o indosile o indicano. Successivamente, in fase 2, il 3-idrossi-indolo viene coniugato con il potassio-solfato oppure con l'acido glucuronico ed immesso, sotto tali forme, in circolo per essere poi escreto dai reni con le urine. La concentrazione di indicano nelle urine riflette la presenza di fenomeni putrefattivi a carico delle proteine e dei composti azotati¹⁸. Un'elevata concentrazione di indicano nelle urine dovuta ad un aumento dei fenomeni putrefattivi a opera di alcune specie batteriche (*Proteus*, *Klebsiella*), comporta una riduzione dell'acidità urinaria e fecale con un conseguente viraggio, quindi, del pH uro-fecale verso valori alcalini (pH>7.5). Falsi negativi possono registrarsi in presenza nelle urine di formalina, metamina, azulfidina o pigmenti biliari. Di contro, si possono registrare falsi positivi in presenza di iodio, acido salicilico, blu di metilene. La flora batterica intestinale svolge attivamente funzione metabolica non solamente nei confronti dei composti proteici ma possiede un'elevata capacità fermentante. Tutti i carboidrati, infatti, che raggiungono l'intestino crasso sono sottoposti a fermentazione a opera di una singola specie batterica o dall'azione di più specie a seconda della composizione delle unità monometriche, del grado di polimerizzazione e ramificazione e della loro solubilità. Un'alterazione della flora batterica intestinale caratterizzata da sovra crescita delle specie fermentanti determina un'alterata digestione di zuccheri e grassi con conseguente viraggio del pH uro-fecale verso valori acidi (pH<6.8) e produzione di scatolo per impedita coniugazione del 3-idrossi-indolo.

Calprotectina fecale

La calprotectina è una proteina appartenente alla famiglia delle S100 ed è presente in grande quantità nei granulociti neutrofili, dove rappresenta il 5% delle proteine totali e il 60% di quelle citoplasmatiche. In minore quantità, la calprotectina è stata riscontrata anche nei monociti e nei macrofagi attivati²¹. Si tratta di una proteina con attività batteriostatica e mi-

costatica paragonabile a quella degli antibiotici: per questo l'abbondanza di calprotectina nei granulociti neutrofili e la sua attività antimicrobica ne suggeriscono un ruolo rilevante nelle funzioni difensive dell'organismo²². La calprotectina può essere riscontrata in diversi materiali biologici umani, tra cui siero, saliva, liquido cerebrospinale e urine. È tuttavia il dosaggio della calprotectina presente nelle feci a offrire i maggiori vantaggi nella valutazione del grado di infiammazione dell'intestino: la calprotectina infatti è una proteina estremamente stabile nelle feci, dove rimane inalterata anche per più di 7 giorni²¹. Nello specifico, in presenza di processi infiammatori, la calprotectina viene rilasciata a seguito della granulazione dei granulociti neutrofili e quindi può essere nelle feci²³. Nei pazienti affetti da MICI, il livello di calprotectina è infatti generalmente molto elevato, mentre nei soggetti affetti da SCI, il livello di calprotectina è invece decisamente inferiore a quello riscontrato nei pazienti con malattia attiva, talvolta superiore al limite di riferimento ma, in ogni caso, sempre superiore a quello riscontrato nei soggetti sani²³. In generale, la determinazione della calprotectina fecale può essere utile per monitorare l'attività infiammatoria intestinale, può essere considerata come valido indicatore di ricorrenza della patologia, nel follow-up terapeutico e per escludere MII in soggetti con diarrea cronica o dolore addominale cronico sconosciuto.

Il dosaggio della calprotectina fecale evidenzia e quantifica lo stato infiammatorio intestinale, e il Disbiosi Test rileva la presenza nelle urine dei due metaboliti del triptofano, indicano e scatolo, che permettono di verificare l'eventuale presenza di fenomeni fermentativi e/o putrefattivi a livello intestinale: un elevato livello di indicano urinario è indice di disbiosi intestinale a livello dell'intestino tenue, mentre alti livelli di scatolo indicano una disbiosi intestinale a livello dell'intestino crasso.

Questo studio aperto aneddótico spontaneo osservazionale valuta l'efficacia di un probiotico costituito da *L. rhamnosus* (LRH11), *L. acidophilus* (LA5) e *B. lactis* (BB12) arricchito

to da FOS a catena breve in capsule gastroprotette, associato a dieta controllata e in alcuni casi idrocolonterapia nel trattamento della infiammazione e della disbiosi intestinale, in pazienti affetti da SCI, Morbo di Crohn, diverticolite, psoriasi ed artrite psoriasica.

Lactobacillus sp. sono microorganismi in grado di colonizzare la mucosa intestinale umana, producono molecole inibitorie, come acidi organici, perossido di idrogeno e batteriocine in grado di svolgere proprietà antimicrobiche²⁴. Tra questi, il *L. rhamnosus* viene frequentemente utilizzato per il trattamento di diarrea²⁵, SCI²⁶, MICI²⁷, dermatiti atopiche²⁸, artrite²⁹, nella prevenzione delle infezioni del tratto gastrointestinale e dell'apparato respiratorio³⁰, e come immunomodulatore³¹. Il *L. acidophilus* viene impiegato nel trattamento dei sintomi associati a SCI³², MICI³³, diverticolite³⁴ ed intolleranza al lattosio³⁵, nella prevenzione delle infezioni del tratto gastrointestinale e urogenitale³⁶, nel trattamento dell'artrite³⁷ e come immunomodulante³⁸. Anche i *Bifidobacterium sp.* sono ampiamente rappresentati nell'intestino umano, e vengono utilizzati come probiotici. Il *B. subsp. lactis* è da tempo utilizzato nella prevenzione della diarrea associata a trattamento antibiotico³⁹, nella prevenzione delle infezioni del tratto gastrointestinale e dell'apparato respiratorio⁴⁰, e delle allergie⁴¹, come immunomodulatore⁴², nell'attenuazione della sintomatologia della SCI⁴³, diverticolite, MICI⁴⁴, e nel trattamento di dermatiti atopiche⁴⁵.

Frutto oligosaccaridi a catena breve

I frutto oligosaccaridi (FOS) a catena breve sono chimicamente carboidrati indigeribili costituiti da fruttosio e glucosio, costituenti una porzione significativa delle fibra contenuta in frutta e ortaggi. Essi sono considerati "prebiotici", ossia composti che favoriscono l'attecchimento e la crescita di *lactobacillus sp.* e *bifidobacterium sp.*, potenziandone la loro efficacia clinica. Nello specifico, sono in grado di regolare la flora batterica intestinale⁴⁶ e attenuare i sintomi legati a disbiosi e SCI⁴⁷.

Materiali e metodi

Pazienti

Quarantacinque pazienti sono stati arruolati attraverso il Network del Secondo Parere, Modena, Italia, afferente alla Cattedra Universitaria di uno di noi. Il Network del Secondo Parere è essenzialmente un servizio consultivo a indirizzo "clinical problem solving" per casi clinici complessi, non risolti adeguatamente, oppure non sufficientemente soddisfatti sotto il profilo della diagnosi e/o della terapia prescritta. Nel caso delle patologie funzionali dell'intestino e delle disfunzioni immunitarie, come in molte malattie a decorso cronico, la casistica è alquanto consistente, poiché, generalmente, dopo ripetuti trattamenti non chirurgici e talora anche cruenti, i pazienti vanno alla ricerca ripetitiva e talora ossessiva (battezzata "Web Babele Syndrome, o "Sindrome di Babele del Web")^{48, 49} di nuovi principi attivi, in un turnover intensivo che attinge a siti web spesso autoreferenziali, con i più diversi approcci convenzionali e non.

I pazienti, di entrambi i sessi (30 donne e 15 uomini), avevano una età compresa tra 22 ed 83 anni, aventi ricevuto una diagnosi di SCI, Morbo di Crohn, diverticolite, psoriasi, ed artrite psoriasica, in seguito a visita specialistica. La quasi totalità di costoro aveva in corso mediamente da 4-6 mesi assunzione orale di cure per sintomi da "colon irritabile" quali dolori, diarrea, costipazione, crampi addominali. Tra questi, integratori a base di fibre (metilcellulosa, agar, crusca, glucomannani, derivati dello psillio) o lassativi per curare la costipazione (lattulosio e lattitolo), procinetici (levosulpiride) favorenti un aumento della motilità peristaltica intestinale per facilitare la progressione delle feci; farmaci per il controllo della diarrea, soprattutto la loperamide (Imodium[®], Dissenten[®]), composti ad attività adsorbenti (carbone attivo, caolino, diosmectite). Inoltre, principi attivi antispastici, tra cui antimuscarinici (dicycloverine, scopolamina, atropina) e rilassanti della muscolatura liscia (alverine, mebeverine e olio di menta piperita).

I pazienti affetti da Morbo di Crohn avevano

in passato assunto aminosalicilati, cortisonici ed immunosoppressori (azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina A, metotrexate), senza però aver fatto ricorso ad intervento chirurgico di resezione ed Infliximab, o altro modulatori biologici.

L'unico paziente affetto da diverticolite aveva utilizzato in precedenza una terapia a base di fibre insolubili e solubili, mesalazina ad antidolorifici, ma senza aver fatto ricorso ad intervento chirurgico.

I soggetti psoriasici erano ricorsi a trattamenti topici con creme, unguenti, impacchi, pomate o gel specifici, da applicare direttamente sulla zona interessata dalle lesioni cutanee, tra cui unguenti a base di corticosteroidi, farmaci per uso topico a base di vitamina D3 o analoghi chimici (calcipotriolo, Daivonex[®] e Psorcutan[®]), farmaci sistemici (metotrexato e idrossiurea), e avevano anche fatto alcuni cicli di fototerapia.

I soggetti con artrite psoriasica, avevano in passato fatto uso di antiinfiammatori non steroidei, salazopirina, metotressato, ciclosporina leflunomide, e terapia fisica di riabilitazione, ma non sono mai ricorsi a Infliximab.

I criteri di esclusione coinvolgevano farmaci in grado influenzare la motilità e la sensibilità gastrointestinale appartenenti al genere antidepressivi, oppioidi e narcotici), eventuali terapie antibiotiche assunte fino a 2 mesi precedenti la data di arruolamento, terapie croniche a lungo termine con analgesici o farmaci antiinfiammatori non steroidei.

Ovviamente l'integrità degli apparati cardiovascolo-respiratorio-renale ed epato-bilio-pancreatico erano requisiti basilari per la immissione al trial. I farmaci anti-dislipemici (con esclusione dei Fibrati), antiipertensivi erano ammessi a continuazione durante lo svolgimento.

Disegno dello studio

È stata condotta una valutazione retrospettiva aperta, multicentrica, aneddotta, con protocollo di indagine spontaneo, osservazionale, della durata complessiva di sei mesi. Prima di iniziare il trattamento con il probiotico, dopo

un wash out di una settimana dai farmaci precedenti a tropismo intestinale, è stata effettuata la misurazione della calprotectina fecale e il Disbiosi Test, per definire i valori basali di infiammazione intestinale e disbiosi intestinale, rispettivamente, anche in relazione alla efficacia dei trattamenti precedenti.

Calprotectina fecale

La misurazione delle concentrazioni di calprotectina fecale è stata effettuata mediante test rapido point of care (POC) quantitativo (Quantum Blue® Calprotectin quantitative lateral flow assay, Bühlmann Laboratories) per definire lo stadio iniziale di infiammazione intestinale⁵⁰. Una aliquota di campione fecale è stata prelevata con il tappo di campionamento (Calex® Cap), riempiendo accuratamente le scanalature, e riponendolo successivamente nel corpo del dispositivo contenente il diluente. Il dispositivo è stato poi vortexato, e il campione lasciato sedimentare per 10 minuti. Per i campioni fecali liquidi, invece, sono stati prelevati direttamente 10 µl ed inseriti nel corpo del dispositivo, vortexati, e lasciati a sedimentare 10 minuti. Al termine del periodo di sedimentazione sono stati prelevati 60 µl di campione diluito ed inseriti nel pozzetto circolare del dispositivo test. Il dispositivo test è rimasto a incubare a temperatura ambiente per 12 minuti, e successivamente è stata effettuata la lettura quantitativa della calprotectina fecale con il Quantum Blue® lettore, inserendo il dispositivo test nella slitta del lettore. Il range di lettura della calprotectina fecale era compreso tra 30-1000 µg/g, ed i risultati sono stati interpretati come segue: valori di calprotectina fecale <50 µg/g = assenza di infiammazione intestinale; valori compresi tra 50-200 µg/g = infiammazione intestinale lieve/moderata; valori >200 µg/g = infiammazione intestinale severa.

Disbiosi Test

Il Disbiosi Test è stato effettuato mediante metodica colorimetrica (indicano) e cromatografica liquida (scatolo) presso il laboratorio di analisi accreditato Synlab, Brescia, Italia, in

grado di determinare le concentrazioni di indicano e scatolo urinario, e quindi permettere di evidenziare disbiosi dell'intestino tenue e dell'intestino crasso, rispettivamente. La metodica, è in grado di rilevare valori di indicano da 0 a superiori a 40 mg/L, ed i risultati sono stati interpretati come segue: valori <10 mg/L = assenza di disbiosi dell'intestino tenue; valori tra 10-20 mg/L = disbiosi lieve dell'intestino tenue; valori tra 20-40 mg/L = disbiosi moderata dell'intestino tenue; valori >40 mg/L = disbiosi grave dell'intestino tenue. Lo scatolo ha valori da 0 a oltre 40 µg/L, e i risultati sono stati interpretati come segue: valori <10 µg/L = assenza di disbiosi dell'intestino crasso; valori tra 10-20 µg/L = disbiosi lieve dell'intestino crasso; valori tra 20-40 µg/L = disbiosi moderata dell'intestino crasso; valori >40 µg/L = disbiosi grave dell'intestino crasso.

Le stesse analisi sono state effettuate alla fine del periodo di trattamento.

Trattamento con il probiotico

I pazienti sono stati istruiti ad assumere 2 capsule al giorno (una capsula la mattina, prima di fare colazione, ed una capsula la sera, prima di andare a dormire) per tre mesi, della formulazione probiotica commissionata su prescrizione magistrale dalla ditta AVD Reform, Noceto, Italia, la cui composizione è descritta in Tabella I. È stato possibile valutare in modo omogeneo l'effetto della posologia somministrata sulla base di una formulazione standard in capsule gastroresistenti. Durante i tre mesi di trattamento i pazienti sono stati visitati una volta al mese, per evidenziare la eventuale comparsa di effetti avversi. La nostra osservazione

TABELLA I. — *Composizione e dosaggio giornaliero della formulazione probiotica.*

Ingredienti	Dose giornaliera (2 capsule)
Lactobacillus rhamnosus LRH11	
Lactobacillus acidophilus LA5	Non meno di 2x10 ⁹ UFC
Bifidobacterium lactis BB12	
FOS	65 mg
Antiagglomeranti: amido di mais, calcio carbonato, biossido di silicio, magnesio stearato	
Involucro esterno: capsula vegetale	
Note: privo di glutine e lattosio	

è stata condotta in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. Inoltre, tutti i soggetti al momento della selezione hanno letto e accettato un consenso informato relativo all'assunzione orale dell'integratore, ed alla opportunità di controlli di follow-up per valutare il reale outcome e la reale compliance all'assunzione della cura.

Trattamento con idrocolonerapia (acuta ipodisbiosi)

L'idrocolonerapia è utilizzata nei disturbi funzionali e peristaltici del colon intestinale, e nella preparazione intestinale sia pre-operatoria che per diagnostica contrastografiche ed endoscopiche⁵¹. Essa a differenza dei modesti volumi degli enteroclistmi classici introduce nel lume a bassa pressione perfusiva fino a 40 litri di acqua, opportunamente termostata, e filtrata. È una procedura altamente igienica con controllo del materiale escreto in tempo reale senza soiling fecale nel follow-up, per lo più utile a togliere concrezioni e incrostazioni di parete ma anche responsabile di una ipodisbiosi, da diluizione, che va immediatamente corretta con somministrazione di probiotici.

Per 7 pazienti con connotazioni di stitichezza recente e dischezia si è ricorsi a questa metodica integrativa terapeutica monitorando l'infiammazione intestinale prima e dopo l'idrocoloterapia e la azione correttiva integrativa del prodotto base di probiotici.

La tecnica operativa può essere descritta come segue: il paziente, indossando un camice monouso, viene adagiato sul lettino prima su fianco sinistro per introdurre la cannula e poi in posizione supina. Previa lubrificazione dell'area anale si introduce delicatamente la cannula monouso per irrigazione che presenta un bulbo del diametro di 1,5 cm, raccordato all'apparecchio tramite tubi di PVC trasparenti, che consentono di sorvegliare il movimento dei fluidi in entrata e in uscita. Lo strumento utilizzato (Colon Hydromat II, HAB Herrmann, Elsenfeld, Germany) presenta un sistema per controllare la pressione e la temperatura dell'acqua che viene iniettata a circa 37° C. Inoltre dispone di un

manometro per i valori pressori intraluminari. L'evacuazione del liquido di lavaggio avviene sia per la pressione idrostatica-volume- indotta, sia per gravità, decombendo il paziente ad un'altezza leggermente superiore a quella dell'apparecchio. Gli è richiesto di caratterizzare sede e qualità di eventuali dolori, onde identificare il segmento colico raggiunto con l'irrigazione.

Sintomatologia

I benefici del trattamento sono stati valutati prima e dopo tre mesi di trattamento, in seguito ai benefici sui sintomi misurati anamnesticamente prima e dopo con scala di Scott-Huskisson, da parte del paziente, e da parte del medico, in base a valutazione obiettiva con visita del paziente (addome meteorico o timpanico in fase post-prandiale, dolorabilità alla palpazione superficiale o profonda nei diversi segmenti colici, borborigmi all'auscultazione, disturbi emorroidari connessi all'evacuazione, prurito anorettale per i disturbi intestinali) e dei risultati delle analisi effettuate.

La valutazione dell'efficacia del trattamento è stata valutata come segue: a) scarsa=0; b) lieve=1; c) buona= 3; d) ottima= 4; e) eccellente= 5.

Sono stati valutati i seguenti sintomi:

— colon irritabile: dolore e aerofagia addominale, dischezia, nausea, stipsi alternata a dissenteria, flatulenza, distensione addominale, sensazione di disagio generale associata ad incompleto svuotamento intestinale, mucorra;

— morbo di Crohn: dolore soprattutto a livello del quadrante addominale inferiore destro, aerofagia, diarrea, febbre, mancanza di appetito, stanchezza generale;

— diverticolite: dolore soprattutto a livello del quadrante addominale inferiore sinistro, spasmi colici, nausea, dissenteria;

— psoriasi: presenza di chiazze e placche eritematose ricoperte da squame sulla superficie cutanea, stress emotivo;

— artrite psoriasica: rigidità, dolore e gonfiore a livello delle articolazioni, riduzione dell'ampiezza dei movimenti articolari, tendiniti e borsiti.

TABELLA II. — *Alimenti sconsigliati e consigliati da non introdurre e da introdurre, rispettivamente nella dieta durante il periodo dello studio.*

Alimenti sconsigliati	Alimenti consigliati
– Peperoncino, pepe, chiodi di garofano, senape, cannella, paprika e, in generale, alimenti piccanti e speziati	– Pane integrale
– Carne di maiale e suoi derivati (limitare la carne in generale)	– Pasta integrale
– Cioccolato	– Riso integrale
– Uva e derivati (aceto, vino)	– Cereali integrali
– Latticini	– Legumi
– Pomodori e Melanzane	– Bere 1,5 litri di acqua al giorno
– Farina bianca	– Sostituire il più possibile la carne con il pesce
– Zuccheri raffinati	– Pesce e olio di pesce (es. salmone al naturale, sardine, acciughe)

Trattamento con dieta

Ai pazienti è stato suggerito di seguire per tutta la durata dello studio una dieta controllata⁽⁵²⁾, riassunta nelle tabelle Tabelle II, III.

Analisi statistica

Per testare la significatività statistica sono stati usati: per le variabili continue, il Rank Sum Test di Kruskal-Wallis per dati appaiati; mentre per le tabelle di frequenza il test χ^2 di Pearson. L'analisi statistica è stata eseguita usando il software R. La significatività statistica è stata impostata per un valore di $P \leq 0,05$.

Risultati

La valutazione della concentrazione di indicano, scatolo e calprotectina sono state misu-

rate prima di iniziare il trattamento e dopo 3 mesi di terapia con la formulazione proposta in un totale di 45 soggetti, di cui 30 soggetti di sesso femminile (67%) e 15 soggetti di sesso maschile (33%). L'età media dei soggetti arruolati era di 52 anni. I pazienti, erano suddivisi nelle seguenti categorie: SCI (N.=34; 76%), Morbo di Crohn (N.=2; 4%), diverticolite (N.=1; 2%), psoriasi (N.=6; 13%), e artrite psoriasica (N.=2; 4%) (Figura 1).

Calprotectina fecale

Ventisei soggetti (58%) avevano valori iniziali di calprotectina fecale $< 50 \mu\text{g/g}$ (assenza di infiammazione intestinale), 11 soggetti (24%) avevano valori iniziali di calprotectina fecale tra 50 e 200 $\mu\text{g/g}$ (infiammazione intestinale lieve/moderata), e 8 soggetti (18%) avevano valori iniziali di calprotectina fecale $> 200 \mu\text{g/g}$ (infiammazione intestinale severa).

Dopo tre mesi di trattamento 34 soggetti (76%) avevano valori di calprotectina fecale $< 50 \mu\text{g/g}$ (assenza di infiammazione intestinale), 8 soggetti (18%) avevano valori di calprotectina fecale tra 50 e 200 $\mu\text{g/g}$ (infiammazione intestinale lieve/moderata), e 3 soggetti (7%) avevano valori di calprotectina fecale $> 200 \mu\text{g/g}$ (infiammazione intestinale severa) (Figura 2).

Indicano urinario

Diciassette soggetti (38%) avevano valori iniziali di indicano urinario $< 10 \text{mg/L}$ (assenza di disbiosi dell'intestino tenue), 7 soggetti (16%) avevano valori iniziali di indicano uri-

TABELLA III. — *Dieta controllata di 1800-2000 kcal somministrata ai pazienti durante il periodo di trattamento.*

Nutriente	Fabbisogno giornaliero	Alimenti
Carboidrati	50-60% (circa 450 g)	Pane, pasta, riso e cereali integrali,
– Di cui zuccheri semplici	10-12%	legumi
Grassi	20-30% (circa 80 g)	Olio extravergine di oliva,
– Di cui acidi grassi essenziali	2,5% (circa 2 g)	Olio di pesce
– Di cui acidi grassi insaturi	2/3 (circa 55 g)	EPA
– Di cui acidi grassi saturi	1/3 (circa 25 g)	DHA
Proteine	10-15% (circa 70 g)	Pesce, carne, latte, yogurt, uova
Micronutrienti (minerali, vitamine)	3-5 porzioni	Frutta, verdura

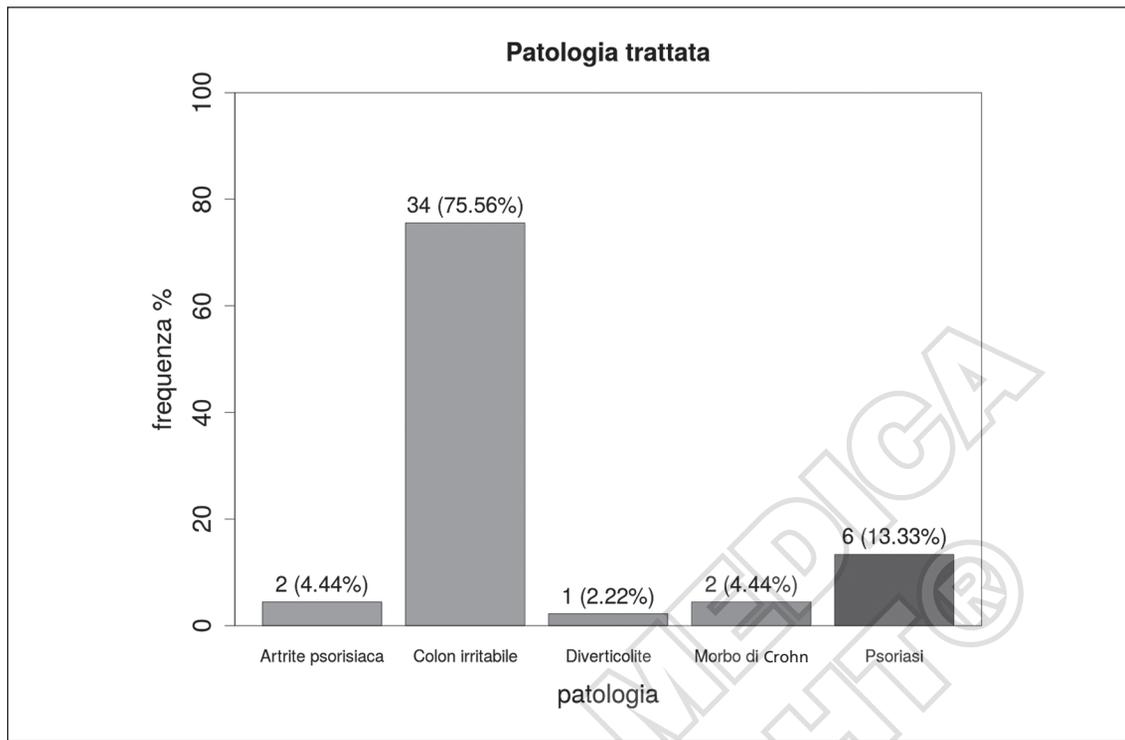


Figura 1. — Composizione del campione di soggetti arruolati (N.= 45).

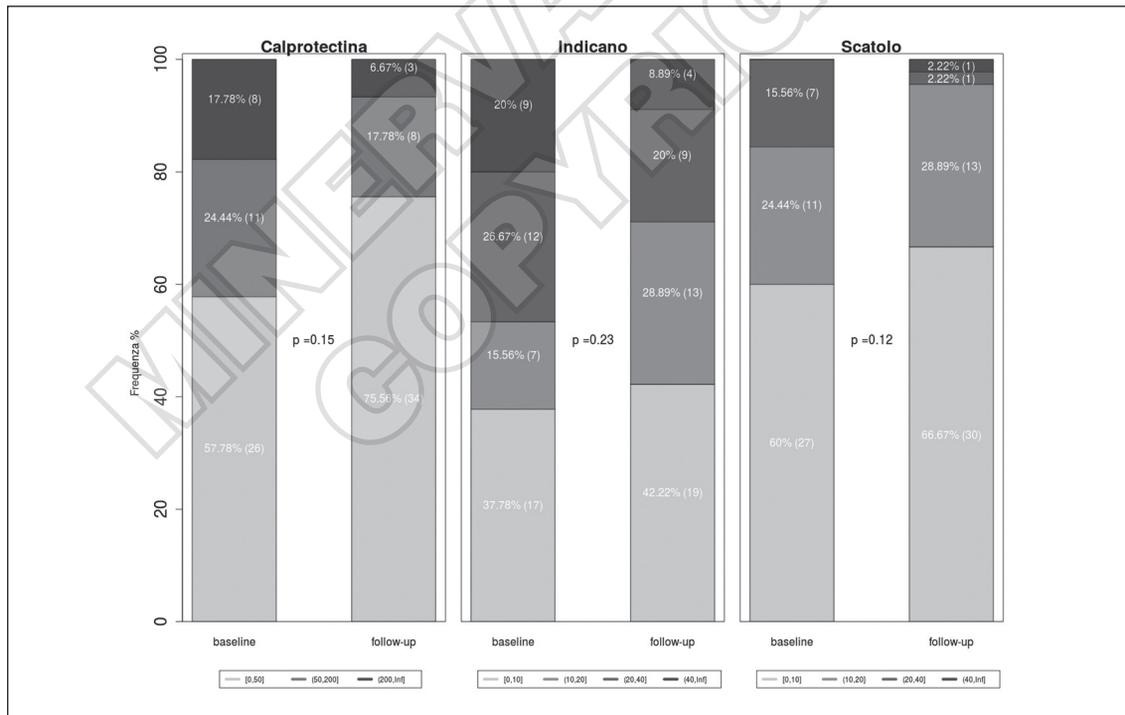


Figura 2. — Grafico sulla frequenza dei valori di calprotectina fecale, indicano urinario e scatolo urinario prima di iniziare il trattamento (baseline) e dopo 3 mesi di trattamento (follow-up) nell'intero gruppo di soggetti arruolati (N.= 45).

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The production of derivative works from the Article is not permitted. The production of reprints for personal or commercial use is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

nario compresi tra 10 e 20 mg/L (disbiosi lieve dell'intestino tenue), 12 soggetti (27%) avevano valori iniziali di indicano urinario compresi tra 20 e 40 mg/L (disbiosi moderata dell'intestino tenue) e 9 soggetti (20%) avevano valori iniziali di indicano urinario >40 mg/L (disbiosi grave dell'intestino tenue).

Dopo tre mesi di trattamento 19 soggetti avevano valori di indicano urinario <10 mg/L (assenza di disbiosi dell'intestino tenue), 13 soggetti (29%) avevano valori di indicano urinario compresi tra 10 e 20 mg/L (disbiosi lieve dell'intestino tenue), 9 soggetti (20%) avevano valori di indicano urinario tra 20 e 40 mg/L (disbiosi moderata dell'intestino tenue), e 4 soggetti (9%) avevano valori di indicano urinario >40 mg/L (disbiosi grave dell'intestino tenue) (Figura 2).

Scatolo urinario

Ventisette soggetti (60%) avevano valori iniziali di scatolo urinario <10 µg/L (assenza

di disbiosi dell'intestino crasso), 11 soggetti (24%) avevano valori iniziali di scatolo urinario compresi tra 10 e 20 µg/L (disbiosi lieve dell'intestino crasso), 7 soggetti (16%) avevano valori iniziali di scatolo urinario compresi tra 20 e 40 µg/L (disbiosi moderata dell'intestino crasso) e nessun soggetto (0%) aveva valori iniziali di scatolo urinario >40 µg/L (disbiosi grave dell'intestino crasso).

Dopo tre mesi di trattamento 30 soggetti (67%) avevano valori di scatolo urinario <10 µg/L (assenza di disbiosi dell'intestino crasso), 13 soggetti (29%) avevano valori di scatolo urinario compresi tra 10 e 20 µg/L (disbiosi lieve dell'intestino crasso), 1 soggetto (2%) aveva valori di scatolo urinario compresi tra 20 e 40 µg/L (disbiosi moderata dell'intestino crasso), ed 1 soggetto (2%) aveva valori di scatolo urinario > 40 µg/L (disbiosi grave dell'intestino crasso) (Figura 2).

Nel gruppo totale di 45 soggetti i valori delle concentrazioni di indicano urinario si sono ridotti significativamente ($P=0,005$) in paralle-

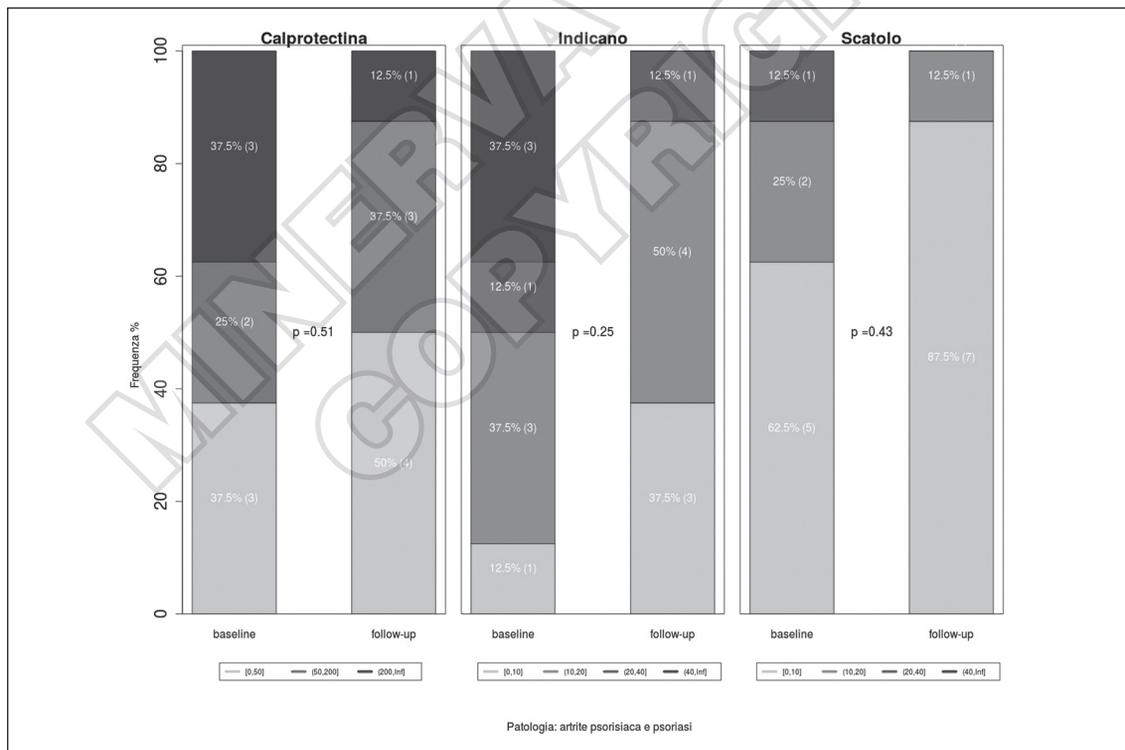


Figura 3. — Grafico sulla frequenza dei valori di calprotectina fecale, indicano urinario e scatolo urinario prima di iniziare il trattamento (baseline) e dopo 3 mesi di trattamento (follow-up) nel gruppo A (soggetti affetti da psoriasi ed artrite psoriasica; N.= 8).

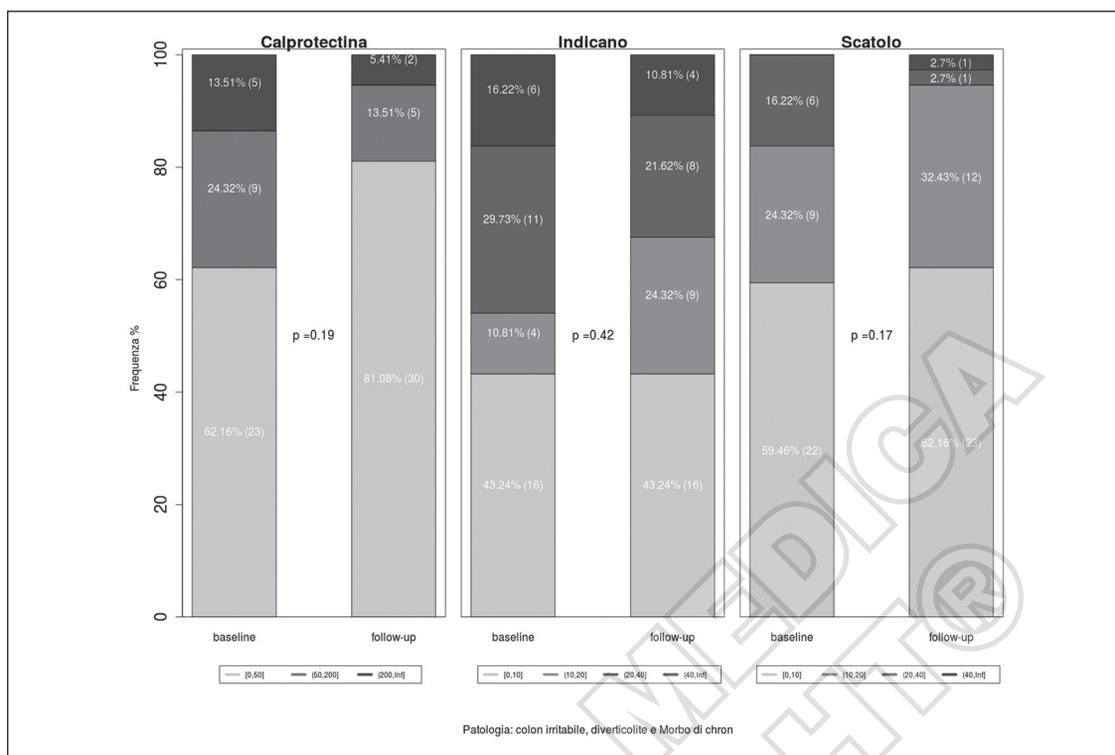


Figura 4. Grafico sulla frequenza dei valori di calprotectina fecale, indicano urinario e scatolo urinario prima di iniziare il trattamento (baseline) e dopo 3 mesi di trattamento (follow-up) nel gruppo B (soggetti affetti da SCI, Morbo di Crohn e diverticolite; N.= 37).

lo ad una riduzione significativa delle concentrazioni di calprotectina fecale ($P=0,00$), senza però osservare una riduzione statisticamente significativa dei valori delle concentrazioni di scatolo urinario ($P=0,299$).

Abbiamo calcolato le tabelle di frequenza dei valori di calprotectina fecale, indicano urinario e scatolo urinario suddividendo il campione totale in due sottogruppi: gruppo A (pazienti affetti da psoriasi e artrite psoriasica; N.=8) e gruppo B (pazienti affetti da SCI, Morbo di Crohn e diverticolite; N.=37) (Figure 3, 4).

Le concentrazioni di calprotectina fecale hanno subito una riduzione significativa in entrambi i gruppi ($P=0,059$ [A] e $P=0,005$ [B]), in parallelo ad una riduzione significativa delle concentrazioni di indicano urinario ($P=0,025$ [A] e $P=0,05$ [B]). Infine, le concentrazioni di scatolo urinario non si sono ridotte in modo statisticamente significativo ($P=0,362$ [A] e $P=0,491$ [B]).

Sintomatologia

I risultati della valutazione del trattamento valutati dal paziente in seguito ai benefici sui sintomi misurati con la scala di Scott-Huskisson e dal medico in seguito a valutazione obiettiva con visita del paziente e dei risultati delle analisi effettuate sono riassunti nelle Figure 5, 6.

Nessun paziente ha riferito efficacia nulla (A), 3 pazienti hanno riferito una scarsa efficacia (B), 9 pazienti hanno riferito un'efficacia moderata (C), 23 pazienti hanno riferito una ottima efficacia con sensazione di benessere digestivo (D), e 2 pazienti hanno riferito una efficacia eccellente benessere digestivo anche cenestesico (E). Il medico ha riportato in un solo caso una efficacia nulla (A), in 7 casi una scarsa efficacia (B), in 5 casi una efficacia lieve (C), in 23 casi una efficacia buona (D) ed in un caso una efficacia eccellente (D).

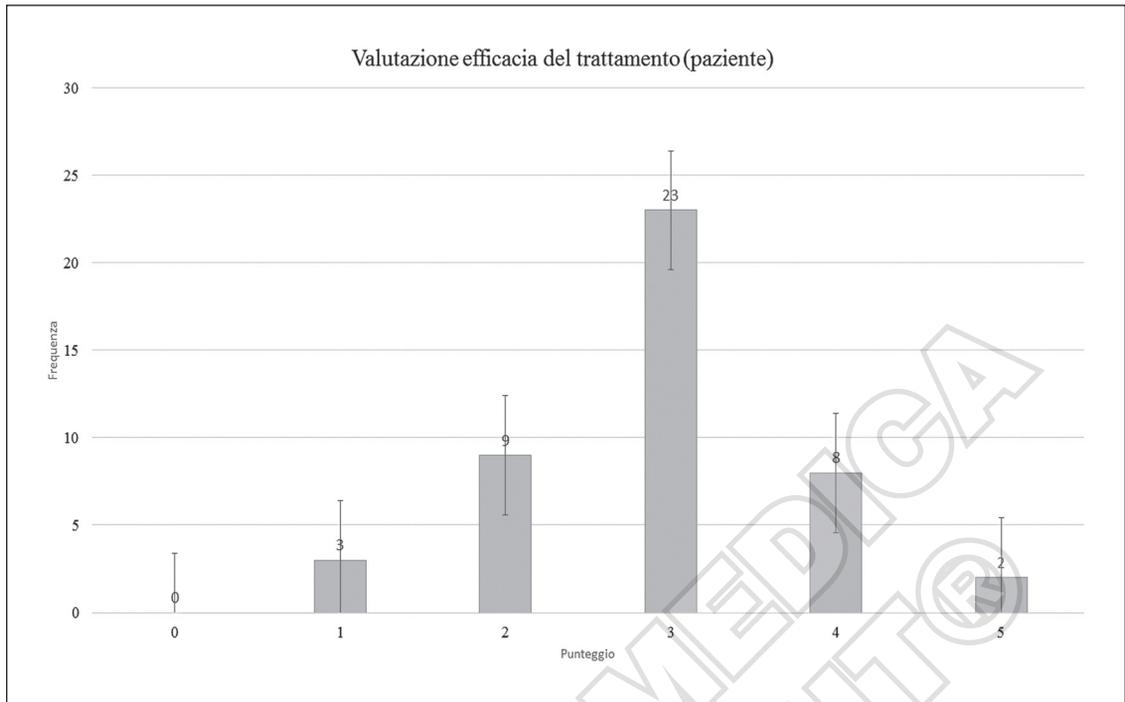


Figura 5. Valutazione dell'efficacia del trattamento riportata dai pazienti dopo 3 mesi (N.= 45).

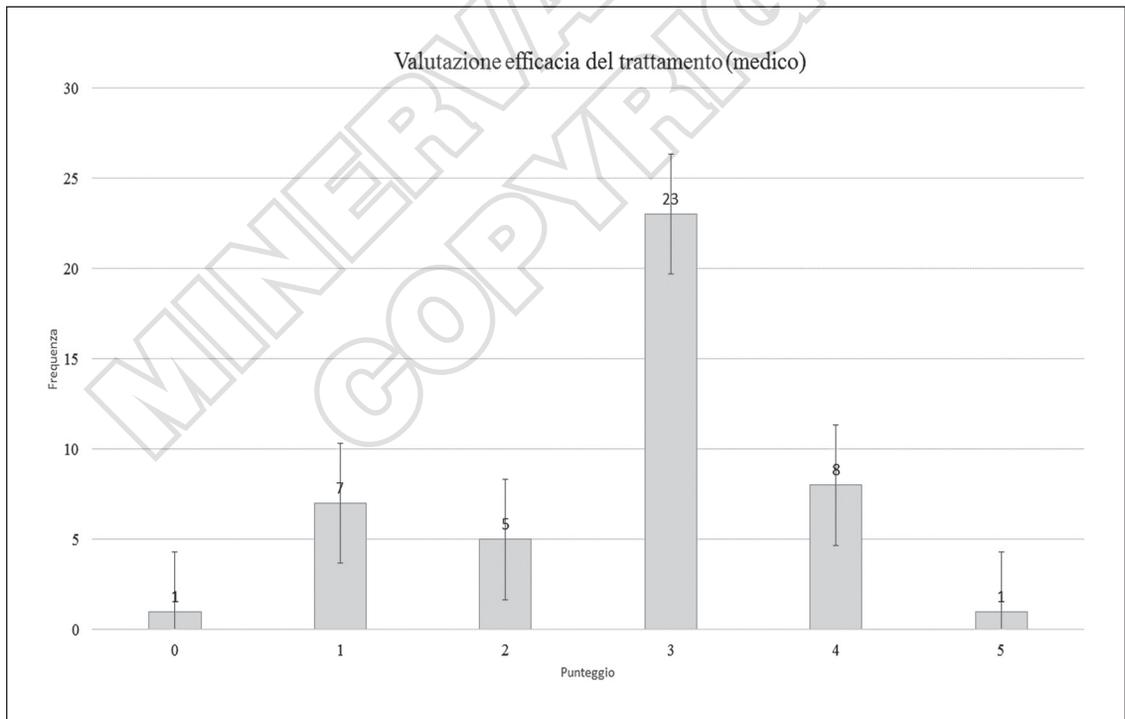


Figura 6. Valutazione dell'efficacia del trattamento riportata dal medico in seguito ad esame obiettivo e risultati delle analisi effettuate dopo 3 mesi.

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The creation of derivative works from the Article is not permitted. The production of reprints for personal or commercial use is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

Discussione

Questo studio ha dimostrato che la formulazione del prodotto da noi ideata come possibile coadiuvante dei sintomi riferibili a patologia enterocolica, a base di *L. rhamnosus* (LRH11), *L. acidophilus* (LA5) e *B. lactis* (BB12) arricchito da FOS* a catena breve, associato a dieta controllata e idrocolonterapia, è stato efficace nell'attenuare l'infiammazione e la disbiosi dell'intestino tenue in pazienti affetti da SCI, Morbo di Crohn, diverticolite, psoriasi ed artrite psoriasica, dopo 3 mesi di trattamento. Nessun effetto avverso è stato riportato durante tutta la durata del trattamento.

La mancanza di significatività delle riduzioni di concentrazione di scatolo urinario ($P=0,299$), e quindi di disbiosi a livello dell'intestino crasso, è da attribuire alla condizione iniziale del campione di soggetti. Infatti, il 60% ($N.=27$) partiva da una condizione di assenza del tenue, e il 24% ($N.=11$) dei soggetti partiva da uno stadio lieve di disbiosi, mentre nessun soggetto aveva disbiosi di elevato grado, e solo il 16% ($N.=7$) aveva una disbiosi di medio grado. Il trattamento con il probiotico ha ridotto ulteriormente lo stato disbiosico, aumentato la percentuale di soggetti senza disbiosi (67%; $N.=39$) e con disbiosi di grado lieve (29%; $N.=13$), riducendo la percentuale di soggetti con disbiosi di grado medio (2%; $N.=1$). Inoltre, la percentuale di pazienti che non partiva da una condizione di disbiosi o da uno stadio infiammatorio intestinale, ma presentava esclusivamente una sintomatologia conclamata, rimaneva come tale migliorando la sintomatologia riferita; invece, i pazienti che mostravano alterazioni a livello dei parametri investigati, ha mostrato un significativo beneficio a livello di questi, oltre che a livello sintomatologico.

I benefici del trattamento, valutati a livello soggettivo da ciascun paziente, in seguito a miglioramento della sintomatologia, e valutati dal medico dopo valutazione degli esami effettuati e valutazione obiettiva del paziente hanno confermato l'efficacia del trattamento con la

*ACTICOLON®

formulazione utilizzata, con risultati paragonabili riportati da medico e paziente.

Per la prima volta è stata da noi studiata l'efficacia della combinazione di tre specie batteriche probiotiche (LRH11, LA5 e BB12), la cui efficacia clinica era stata già precedentemente confermata per ciascuna specie utilizzata singolarmente e/o in combinazione con altri ceppi.

Numerosi studi clinici sono stati condotti sulla efficacia del *L. rhamnosus* LGG in malattia immunitarie ed intestinali, mentre non è stata mai condotta alcuna valutazione relativa all'utilizzo del ceppo LRH11. In tale contesto, quindi, tale formulazione si presenta alquanto innovativa, poiché mette a disposizione l'utilizzo di una nuova specie probiotica aggiunta alle specie *L. acidophilus* (LA5) e *B. lactis* (BB12). Infatti, le proprietà immunomodulanti della loro combinazione di tali, già da lungo tempo affermata e validata per il trattamento di patologie funzionali dell'intestino e dei disordini del sistema immunitario.

Asemi Z *et al.*⁵³ in uno studio clinico randomizzato controllato, condotto su 70 donne alla prima gravidanza, mostrarono che il consumo giornaliero di uno yogurt arricchito da LA5 e BB12 (10^7 CFU g^{-1} per ciascuna specie) riduceva significativamente la proteina C reattiva (PCR), un significativo marker infiammatorio, rispetto a donne che consumavano yogurt tradizionale, non arricchito ($P=0,202$). Nova E *et al.*⁵⁴ con le stesse specie probiotiche, effettuarono uno studio randomizzato, contro placebo in doppio cieco su 20 donne e 16 uomini. I pazienti, affetti da disturbi intestinali ed immunitari, hanno assunto 3 cp/die ($2,4 \times 10^9$ CFU) o placebo, per 6 settimane. Alla fine del periodo di studio è stato osservato un significativo miglioramento della dispepsia, flatulenza, gonfiore post-prandiale, stitichezza, diarrea ($P=0,050$).

Dotterud CK *et al.*⁵⁵ hanno confermato che l'assunzione di LA5 (10^5 CFU) e BB12 (10^6 CFU) in donne gravide per tutta la gravidanza fino a 3 mesi dopo il parto, riduce il rischio di sviluppare dermatiti atopiche nei nuovi nati fino a 2 anni di età. Wildt S *et al.*⁵⁶ hanno somministrato i due probiotici, per 12 settimane,

in pazienti affetti da coliti aspecifiche evidenziando un miglioramento della sintomatologia associata (diarrea, consistenza e volume delle feci, dolore e gonfiore addominale) significativa ($P<0,05$) nel gruppo trattato con i probiotici, rispetto al gruppo-placebo.

La flogosi intestinale peraltro è strettamente connessa all'aumento di permeabilità del lume intestinale, geneticamente predisposta, ma anche come espressione peculiare della noxa patogena definita "Leaky Gut Syndrome"⁵⁷. Da qui la importanza di optare per la somministrazione quali-quantitativamente adeguata di lattobacilli allo scopo di contrastare la devastante evenienza dei leaky gut⁵⁸. Le cellule intestinali umane HT-29 e Caco-2 sono state utilizzate in laboratorio per studiare le proprietà adesive dei ceppi probiotici e verificare, in vitro, le loro capacità di modularne la permeabilità, riducendone tra l'altro l'infiammazione, in seguito a stimolazione da parte di citochine pro-infiammatorie⁵⁹.

Tale verifica è in procinto di essere espletata anche con la formulazione da noi utilizzata, la cui efficacia è già comunque evidente dalla pratica clinica.

Suddividendo il campione totale nei due sottogruppi abbiamo confermato all'interno di ciascuno, una riduzione significativa della calprotectina fecale ($P=0,059$ nel gruppo A e $P=0,005$ nel gruppo B). In letteratura, infatti, viene citato un aumento delle concentrazioni della calprotectina in pazienti affetti da psoriasi ed artrite psoriasica. Nello specifico, Madland TM *et al.*⁶⁰ hanno osservato in un gruppo di 40 soggetti, che i pazienti affetti da artrite psoriasica avevano valori di calprotectina fecale significativamente più elevati rispetto alla popolazione sana, di controllo ($P<0,01$), paragonabili ai valori riscontrati solitamente nei soggetti affetti da coliti. Mälkönen T *et al.*⁶¹ hanno rilevato la correlazione tra alcune patologie cutanee di carattere immunitario, tra cui la psoriasi, ed infiammazione intestinale, in un campione di 84 bambini affetti da MICI, di cui 64 erano affetti da Morbo di Crohn. Di questi, il 40,7% aveva anche manifestazioni psoriasiche, e valori medi di calprotectina fecale di 133 $\mu\text{g/g}$, rispetto a pazienti affetti solo

da MICI che non sviluppavano manifestazioni cutanee, i cui valori di calprotectina erano più elevati (589 $\mu\text{g/g}$; $P<0,016$).

Nei disordini immunitari, i linfociti T helper (Th) giocano un ruolo chiave nella regolazione della cascata di citochine pro-infiammatorie. Nello specifico il linfociti Th1 e Th17 producono IL-12, IFN- γ , IL-6 ed IL-17, mediatori di risposte autoimmunitarie, mentre i linfociti Th2 producendo IL-4, IL-5 ed IL-13 regolano l'attivazione dei linfociti B e mastociti, svolgendo un ruolo nelle patologie allergiche. I linfociti Treg sopprimono l'attività dei linfociti Th e sono responsabili del miglioramento della sintomatologia associata alle disfunzioni del sistema immunitario⁵⁹. Sebbene le cause dell'attivazione incontrollata dei linfociti Th sia sconosciuta, è evidente che regolando la composizione e la diversità del microbiota intestinale si riesce a migliorarne i sintomi, agendo sull'attenuazione della produzione di citochine pro-infiammatorie⁶².

La disbiosi intestinale è una perturbazione della flora dell'intestino che può avvenire in seguito a trattamenti antibiotici, disordini alimentari, patologie immunitarie ed infezione da parte di agenti patogeni⁶³, a cui si va ad associare un marcato aumento delle attività fermentative di carboidrati e putrefattive da parte di alcune specie batteriche nocive (*Pseudomonas Aeruginosa*, *Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*), e da parte di batteri ad azione protettiva che possono divenire nocivi in condizioni di alterazione dell'omeostasi intestinale (*E. Coli*, *Enterococchi*, *Streptococchi*, *Betteroidi*)⁶⁴. I prodotti di queste reazioni, sono molecole potenzialmente tossiche, tra cui p-cresolo, fenolo ed indolo, che vanno a contatto con le cellule della mucosa intestinale, compromettendone l'impermeabilità. Inoltre, tali molecole nelle cellule della mucosa intestinale vengono coniugate con altre molecole ivi presenti, determinando la formazione di altri composti circolanti, anch'essi tossici, tra cui il p-cresil solfato, il p-cresil glucuronide, il fenil-solfato, il fenil-glucuronide, l'idossil-solfato e l'idossil-glucuronide⁶³. Queste molecole attivano i linfociti T, i quali stimolati a produrre citochine infiammatorie, determinano l'instau-

rarsi di permeabilità della mucosa intestinale, con conseguente attivazione incontrollata del sistema immunitario⁶⁵⁻⁶⁸. I probiotici, in tale contesto, sono necessari per ripristinare il corretto equilibrio intestinale ed impedire le attività fermentative e putrefattive da parte dei batteri patogeni ed opportunisti, che si verificano quando l'omeostasi intestinale viene a mancare.

I FOS sono tra i principali prebiotici ad essere maggiormente studiati nella specie umana⁶⁹. I FOS a catena breve sono molto simili ai FOS, ma sono costituiti da un minor grado di polimerizzazione, che varia da 1 a 5 oligomeri di fruttosio, e sono stati meno studiati rispetto ai classici FOS⁷⁰. I FOS a catena breve supportano la crescita e la sopravvivenza dei batteri autoctoni del tratto gastrointestinale. Nello specifico i batteri del ceppo *Lactobacillus spp.* possedendo un enzima β -fruttosidasi, sono in grado di idrolizzare i legami glicosidici β -(2-1) presenti nei FOS a catena breve ed utilizzare gli oligomeri di fruttosio come nutrimento⁷¹. In questo modo, i lattobacilli sono in grado di sopravvivere nel tratto gastrointestinale, dove interagendo con le cellule della mucosa intestinale, i linfociti, i macrofagi, e le cellule dendritiche, ne regolano il funzionamento⁷². Inoltre, i FOS in generale sono stati considerati "immunosaccaridi"⁷¹ neologismo che definisce la funzione di controllare direttamente le cellule del sistema immunitario nella specie umana, mediante l'attivazione dei recettori toll-like, espressi sulla superficie delle cellule del sistema immunitario soprattutto il TLR2 ed il TLR4, coinvolti nel riconoscimento di agenti patogeni⁷³.

I FOS a catena breve a livello del colon promuovono l'ossigenazione delle cellule della mucosa, influenzandone le capacità di riassorbire di sodio e acqua⁷⁴. Infatti, I FOS a catena breve sono in grado di aumentare il contenuto di acqua della massa fecale, e stimolare la motilità dell'intestino, probabilmente fornendo energia alle cellule epiteliali del colon oppure inducendo contrazioni fasiche della muscolatura circolare⁷⁵. Essi inoltre hanno attività bifidogena nella specie umana, in concentrazioni tra 2,5 e 10 g/die⁷⁶. Di conseguenza, l'asso-

ciazione di FOS a catena breve ai probiotici, in primo luogo potenzia l'efficacia terapeutica dei probiotici stessi, in secondo luogo nutre la popolazione di lattobacilli e bifidi presenti nel colon, ed infine regola il funzionamento delle cellule della mucosa intestinale e del sistema immunitario verso una condizione di equilibrio.

Una alimentazione controllata, associata al trattamento terapeutico, è sicuramente fondamentale nel miglioramento dei sintomi associati non solo alle patologie intestinali, ma anche a psoriasi ed artrite psoriasica⁵². Il consumo di carboidrati integrali e di legumi vanno a regolare il volume delle feci ed il transito intestinale, mentre il consumo di pesce ed olio di pesce fornisce all'organismo acidi grassi polinsaturi omega 3, tra cui i principali sono l'acido eicosapentaenoico (20:5; EPA) e l'acido docosaesaenoico (22:6; DHA), i quali sono potenti anti-infiammatori in quanto modulano direttamente l'attività dei linfociti Th e dei recettori toll-like, non solo in condizioni di infiammazione a livello della mucosa intestinale, ma anche in molte patologie infiammatorie della cute, tra cui anche la psoriasi⁷⁷. Infatti, gli acidi grassi omega 3 rappresentano dei ligandi per alcuni fattori di trascrizione, tra cui i peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), coinvolti nel metabolismo lipidico, nella sensibilizzazione all'insulina, nella regolazione del sistema immunitario e nell'omeostasi della cute⁷⁸. Nei nostri casi di psoriasi ed artrite psoriasica la supplementazione orale con olio di pesce si è rivelata efficace ad elevati dosaggi (circa 12 g/die) e va protratta per lunghi periodi⁷⁹, fornendo un apporto di EPA e DHA circa di 1100 mg/die e 750 mg/die rispettivamente⁸⁰. Sottolineiamo con ciò la opportunità di affrontare in modo complesso e non troppo semplicistico gli squilibri dell'ecoflora intestinale dando anche adeguata rilevanza alla dieta.

Il lavaggio del colon, inoltre, mediante idro-colonterapia offre la possibilità di eliminare rifiuti tossici accumulati, e depositati sulle pareti dell'intestino ed i gas prodotti dai batteri patogeni ivi residenti. Il beneficio si ripercuote a livello di un più efficace svuotamento del

lume intestinale, e quindi un miglioramento dei sintomi associati alle patologie funzionali dell'intestino, con una conseguente stimolazione più efficiente della peristalsi intestinale che viene espletata dall'azione termica e meccanica dell'acqua somministrata. Inoltre, l'eliminazione di feci ristagnanti e a volte cariche di batteri patogeni e tossine, può offrire un vantaggio in termini di riduzione del rischio di infiammazione e disbiosi intestinale, con benefici che possono ripercuotersi a livello di benessere generale dell'individuo.

Conclusioni

Il nostro studio ha investigato per la prima volta clinicamente, le variazioni delle concentrazioni di calprotectina fecale e i marcatori della disbiosi dell'intestino, indicano e scatolo, in seguito a trattamento terapeutico con questa formulazione probiotica originale, arricchita da FOS a catena breve, associato a dieta controllata ed idrocolonerapia. Inoltre, per la prima volta sono state ricercate le concentrazioni di indicano e scatolo in ambito clinico, indagini che erano state eseguite solamente in vivo su modelli animali, tra cui ruminanti⁸¹, suini⁸² e roditori⁸³. Le metodiche di indagine di scatolo e indicano (cromatografia in fase liquida e metodica colorimetrica, rispettivamente) sono presidi di laboratorio chimico-clinico, pertanto altamente riproducibili e validate. La quantificazione della calprotectina fecale può essere eseguita anch'essa presso un laboratorio di analisi accreditato, ma è possibile anche effettuare la misura con test rapidi POCs, alcuni solo qualitativi, mentre il test Quantum Blue® Calprotectin quantitativo lateral flow assay, Bühlmann Laboratories, da noi utilizzato, permette di avere una quantificazione esatta delle concentrazioni di calprotectina presente nelle feci. La determinazione della disbiosi intestinale, inoltre, effettuata su urine, e la determinazione del grado di infiammazione intestinale attraverso la quantificazione della calprotectina, effettuata sulle feci, sono esami non invasivi, rispetto ad altri esami diagnostici, quali ad esempio la colonoscopia, e le analisi istologiche della mucosa intestinale in seguito a prelievi biotipici.

Il prossimo obiettivo sarà quello di estendere tali risultati su un campione di popolazione più ampio, confrontando i risultati ottenuti tramite un disegno sperimentale con un placebo.

Rimane comunque fino a ora evidente, in base all'anamnesi storica soggetti trattati, come preesistesse e persistesse in atto uno squilibrio della ecoflora microbica, nonostante le cure precedentemente poste in essere, che il nostro composto ha saputo correggere efficacemente.

La formula del prodotto con ceppi lattobacillari di cui si riscoprono continuamente nuove indicazioni benefiche, descritte nel precedente contributo di inquadramento⁸⁴ ci consentirà nella prossima valutazione clinica di inserire ulteriori più ampi parametri di performances cliniche.

Riassunto

OBIETTIVO: L'efficacia clinica dei probiotici è stata riportata per il trattamento dei disturbi gastrointestinali ed extraintestinali, tra cui le infiammatorie croniche intestinali (MICI), la sindrome del colon irritabile (SCI), le infezioni vaginali, e squilibri del sistema immunitario. Lo scopo di questo studio aperto aneddottico spontaneo osservazionale è di valutare l'efficacia di un probiotico costituito da *L. rhamnosus* (LRH11), *L. acidophilus* (LA5) e *B. lactis* (BB12) arricchito da fruttooligosaccaridi (FOS) a catena breve, associato a dieta controllata ed in alcuni casi idrocolonerapia nel trattamento della infiammazione e della disbiosi intestinale, in pazienti affetti da SCI, Morbo di Crohn, diverticolite, psoriasi ed artrite psoriasica.

METODI: 45 pazienti sono stati arruolati attraverso il Network del Secondo Parere, Modena, Italia. I pazienti sono stati istruiti ad assumere 2 capsule/die per tre mesi della formulazione proposta (una capsula la mattina prima di fare colazione ed una capsula la sera prima di andare a dormire), ed hanno seguito una dieta controllata per tutto il periodo dello studio. Prima di iniziare il trattamento e alla fine dello studio sono state misurate le concentrazioni di calprotectina fecale mediante test rapido points of care (POC) quantitativo per la valutazione dell'infiammazione intestinale, e di indicano e di scatolo urinario mediante metodica colorimetrica e cromatografica liquida, rispettivamente, per valutare la disbiosi dell'intestino. Inoltre, alcuni pazienti sono stati trattati con idrocolonerapia prima di iniziare il trattamento.

RISULTATI: Dopo tre mesi di trattamento, i valori delle concentrazioni di indicano urinario e calprotectina fecale hanno subito una riduzione significativa ($P=0,005$ e $P=0,00$ rispettivamente) in parallelo ad un significativo miglioramento della sintomatologia, valutata con scala Scott-Huskison.

CONCLUSIONI: L'associazione della formulazione probiotica e prebiotica a dieta controllata ed idrocolonerapia è risultata essere efficace nell'attenuare l'infiammazione e la disbiosi intestinale in pazienti affetti da SCI, Morbo di Crohn, diverticolite, psoriasi ed artrite psoriasica, in assenza di effetti collaterali.

Bibliografia

1. Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J, Parkin P, Mahant S, Johnston BC. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;12:CD004827.
2. Thomas LV, Suzuki K, Zhao J. Probiotics: a proactive approach to health. A symposium report. *Br J Nutr* 2015;114 Suppl 1:S1-S15.
3. Hungin AP, Paxman L, Koenig K, Dalrymple J, Wicks N, Walmsley J. Prevalence, symptom patterns and management of episodic diarrhoea in the community: a population-based survey in 11 countries. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43:586-95.
4. Ricci A, Tagliacarne SC, Valsecchi C, Boggini T, Cattaneo F, Licari A, *et al.* Probiotics and Inflammatory Bowel Diseases. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29(2 Suppl 1):96-113.
5. Korada SK, Yarla NS, Bishayee A, Aliev G, Aruna Lakshmi K, Arunasree MK, *et al.* Can probiotics cure inflammatory bowel diseases? *Curr Pharm De* 2016;22:904-17.
6. Schwenger EM, Tejani AM, Loewen PS. Probiotics for preventing urinary tract infections in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;12:CD008772.
7. Lin RJ, Qiu LH, Guan RZ, Hu SJ, Liu YY, Wang GJ. Protective effect of probiotics in the treatment of infantile eczema. *Exp Ther Med* 2015;9:1593-6.
8. Kuchmak OB, Klymnyuk SI, Romanyuk LB, Pokryshko OV. [The Use of Probiotics in Patients with Rheumatoid Arthritis]. *Lik Sprava* 2014;12:63-5 [Article in Ukrainian].
9. Usami M, Miyoshi M, Yamashita H. Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015;21:11597-608.
10. Isolauri E, Rautava S, Collado MC, Salminen S. Role of probiotics in reducing the risk of gestational diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2015;17:713-9.
11. Plotnikova EY, Zakharova YV. [Place of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea]. *Ter Arkh* 2015;87:127-31 [Article in Russian].
12. Russo F, Linsalata M, Orlando A. Probiotics against neoplastic transformation of gastric mucosa: effects on cell proliferation and polyamine metabolism. *World J Gastroenterol* 2014;20:13258-72.
13. Linares DM, Ross P, Stanton C. Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. *Bioengineered* 2015;28:1-28.
14. Dubois NE, Gregory KE. Characterizing the Intestinal Microbiome in Infantile Colic: Findings Based on an Integrative Review of the Literature. *Biol Res Nurs* 2015 [Epub ahead of print].
15. Landman C, Quevrain E. [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *Rev Med Interne* 2015 [Epub ahead of print] [Article in French].
16. Shen W, Gaskins HR, McIntosh MK. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J Nutr Biochem* 2014;25:270-80.
17. Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;54:219-31.
18. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.
19. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007;102:1178-86.
20. Guard BC, Barr JW, Reddivari L, Klemashevich C, Jayaraman A, Steiner JM, *et al.* Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PLoS One* 2015;10:e0127259.
21. Holtman GA, Lisman-van Leeuwen Y, Reitsma JB, Berger MY. Noninvasive Tests for Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2016;137:1-11.
22. Abildtrup M, Kingsley GH, Scott DL. Calprotectin as a biomarker for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 2015;42:760-70.
23. Sipponen T. Diagnostics and prognostics of inflammatory bowel disease with fecal neutrophil-derived biomarkers calprotectin and lactoferrin. *Dig Dis* 2013;31:336-44.
24. Beltran S, Munoz-Bergmann CA, Elola-Lopez A, Quintana J, Segovia C, Trombert AN. The expression of heterologous MAM-7 in *Lactobacillus rhamnosus* reduces its intrinsic capacity to inhibit colonization of pathogen *Vibrio parahaemolyticus* in vitro. *Biol Res* 2016;49:2.
25. Szajewska H, Canani RB, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, *et al.* Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:495-506.
26. Rose MA. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces frequency and severity of abdominal pain compared with placebo in children with irritable bowel syndrome. *Evid Based Med* 2011;16:141-2.
27. Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2014;192:1870-7.
28. Wu YJ, Wu WF, Hung CW, Ku MS, Liao PF, Sun HL, *et al.* Evaluation of efficacy and safety of *Lactobacillus rhamnosus* in children aged 4-48 months with atopic dermatitis: An 8-week, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Microbiol Immunol Infect* 2015 [Epub ahead of print].
29. Pineda Mde L, Thompson SF, Summers K, de Leon F, Pope J, Reid G. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 2011;17:CR347-54.
30. de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2008;111:1-66.
31. Sindhu KN, Sowmyanarayanan TV, Paul A, Babji S, Ajjampur SS, Priyadarshini S, *et al.* Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2014;58:1107-15.
32. Begtrup LM, de Muckadell OB, Kjeldsen J, Christensen RD, Jarbol DE. Long-term treatment with probiotics in primary care patients with irritable bowel syndrome--a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2013;48:1127-35.
33. Torres-Maravilla E, Lenoir M, Mayorga-Reyes L, Allain T, Sokol H, Langella P, *et al.* Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015 [Epub ahead of print].
34. Lamiki P, Tsuchiya J, Pathak S, Okura R, Solimene U, Jain S, *et al.* Probiotics in diverticular disease of the colon: an open label study. *J Gastrointest Liver Dis* 2010;19:31-6.
35. Sharma M, Devi M. Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;54:537-52.
36. Murina F, Graziottin A, Vicariotto F, De Seta F. Can *Lactobacillus fermentum* LF10 and *Lactobacillus acidophilus* LA02 in a slow-release vaginal product be useful for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis? A clinical study. *J Clin Gastroenterol* 2014;48 Suppl 1:S102-5.
37. Amdekar S, Singh V, Kumar A, Sharma P, Singh R. *Lactobacillus acidophilus* Protected Organs in Experimental Arthritis by Regulating the Pro-inflammatory Cytokines. *Indian J Clin Biochem* 2014;29:471-8.
38. Wen K, Li G, Bui T, Liu F, Li Y, Kocher J, *et al.* High

- dose and low dose *Lactobacillus acidophilus* exerted differential immune modulating effects on T cell immune responses induced by an oral human rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine* 2012;30:1198-207.
39. Fox MJ, Ahuja KD, Robertson IK, Ball MJ, Eri RD. Can probiotic yogurt prevent diarrhoea in children on antibiotics? A double-blind, randomised, placebo-controlled study. *BMJ Open* 2015;5:e006474.
 40. Pregliasco F, Anselmi G, Fonte L, Giussani F, Schieppati S, Soletti L. A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 3 Pt 2:S224-33.
 41. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, *et al.* Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(2 Pt 2):e386-93.
 42. Lewis MC, Patel DV, Fowler J, Duncker S, Zuercher AW, Mercenier A, *et al.* Dietary supplementation with *Bifidobacterium lactis* NCC2818 from weaning reduces local immunoglobulin production in lymphoid-associated tissues but increases systemic antibodies in healthy neonates. *Br J Nutr* 2013;110:1243-52.
 43. Agrawal A, Houghton LA, Morris J, Reilly B, Guyonnet D, Goupil Feuillerat N, *et al.* Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:104-14.
 44. Toumi R, Abdelouhab K, Rafa H, Soufli I, Raissi-Kerboua D, Djeraba Z, *et al.* Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabioticum on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013;35:403-9.
 45. Gore C, Custovic A, Tannock GW, Munro K, Kerry G, Johnson K, *et al.* Treatment and secondary prevention effects of the probiotics *Lactobacillus paracasei* or *Bifidobacterium lactis* on early infant eczema: randomized controlled trial with follow-up until age 3 years. *Clin Exp Allergy* 2012;42:112-22.
 46. Clavel T, Fallani M, Lepage P, Levenez F, Mathey J, Rochet V, *et al.* Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *J Nutr* 2005;135:2786-92.
 47. Colecchia A, Vestito A, La Rocca A, Pasqui F, Nikiforaki A, Festi D. Effect of a symbiotic preparation on the clinical manifestations of irritable bowel syndrome, constipation-variant. Results of an open, uncontrolled multicenter study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006;52:349-58.
 48. Palmieri B, Iannitti T, Capone S, Fisetto G, Arisi E. [Second opinion clinic: is the Web Babel Syndrome treatable?]. *Clin Ter* 2011;162:575-83 [Article in Italian].
 49. Palmieri B, Iannitti T. The Web Babel syndrome. *Patient Educ Couns* 2011;85:331-3.
 50. Coorevits L, Baert FJ, Vanpoucke HJ. Faecal calprotectin: comparative study of the Quantum Blue rapid test and an established ELISA method. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:825-31.
 51. Hammer B. [Current developments in the diagnosis and therapy of Crohn disease and ulcerative colitis]. *Schweiz Med Wochenschr* 1994;124:452-60 [Article in German].
 52. Brown AC, Hairfield M, Richards DG, McMillin DL, Mein EA, Nelson CD. Medical nutrition therapy as a potential complementary treatment for psoriasis--five case reports. *Altern Med Rev* 2004;9:297-307.
 53. Asemi Z, Zajayeri S, Najafi M, Samimi M, Mofid V, Shidfar F, *et al.* Effects of daily consumption of probiotic yogurt on inflammatory factors in pregnant women: a randomized controlled trial. *Pak J Biol Sci* 2011;14:476-82.
 54. Nova E, Viadel B, Warnberg J, Carreres JE, Marcos A. Beneficial effects of a synbiotic supplement on self-perceived gastrointestinal well-being and immunoinflammatory status of healthy adults. *J Med Food* 2011;14:79-85.
 55. Dotterud CK, Storro O, Johnsen R, Oien T. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol* 2010;163:616-23.
 56. Wildt S, Munck LK, Vinter-Jensen L, Hanse BF, Nordgaard-Lassen I, Christensen S, *et al.* Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:395-401.
 57. Muraca M, Putignani L, Fierabracci A, Teti A, Perilongo G. Gut microbiota-derived outer membrane vesicles: under-recognized major players in health and disease? *Discov Med* 2015;19:343-8.
 58. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4145-51.
 59. Kang HJ, Im SH. Probiotics as an Immune Modulator. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2015;61 Suppl:S103-5.
 60. Madland TM, Bjorkkjaer T, Brunborg LA, Froyland L, Berstad A, Brun JG. Subjective improvement in patients with psoriatic arthritis after short-term oral treatment with seal oil. A pilot study with double blind comparison to soy oil. *J Rheumatol* 2006;33:307-10.
 61. Malkonen T, Wikstrom A, Heiskanen K, Merras-Salmio L, Mustonen H, Sipponen T, *et al.* Skin reactions during anti-TNFalpha therapy for pediatric inflammatory bowel disease: a 2-year prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1309-15.
 62. Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv Exp Med Biol* 2008;606:423-54.
 63. Stecher B, Maier L, Hardt WD. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:277-84.
 64. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:729-34.
 65. Charney DI, Walton DF, Cheung AK. Atherosclerosis in Crohn renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2:876-82.
 66. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:592-6.
 67. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF-kappaB and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2003;63:1671-80.
 68. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, *et al.* The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004;65:442-51.
 69. Guerreiro I, Serra CR, Enes P, Couto A, Salvador A, Costas B, *et al.* Effect of short chain fructooligosaccharides (scFOS) on immunological status and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared at two temperatures. *Fish Shellfish Immunol* 2015;49:122-31.
 70. Bornet FR, Brouns F, Tashiro Y, Duvillier V. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Dig Liver Dis* 2002;34 Suppl 2:S111-20.
 71. Song SK, Beck BR, Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, *et al.* Probiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol* 2014;40:40-8.
 72. Kengang TS, Kapila S, Shanmugam VP, Kapila R.

- Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *J Appl Microbiol* 2014;117:303-19.
73. Vogt L, Ramasamy U, Meyer D, Pullens G, Venema K, Faas MM, *et al.* Immune modulation by different types of beta2->1-fructans is toll-like receptor dependent. *PLoS One* 2013;8:e68367.
 74. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;216:132-48.
 75. Scholtens PA, Goossens DA, Staiano A. Stool characteristics of infants receiving short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides: a review. *World J Gastroenterol* 2014;20:13446-52.
 76. Paineau D, Respondek F, Menet V, Sauvage R, Bornet F, Wagner A. Effects of short-chain fructooligosaccharides on faecal bifidobacteria and specific immune response in formula-fed term infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2014;60:167-75.
 77. Barrea L, Macchia PE, Tarantino G, Di Somma C, Pane E, Balato N, *et al.* Nutrition: a key environmental dietary factor in clinical severity and cardio-metabolic risk in psoriatic male patients evaluated by 7-day food-frequency questionnaire. *J Transl Med* 2015;13:303.
 78. McCusker MM, Grant-Kels JM. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids. *Clin Dermatol* 2010;28:440-51.
 79. Mayser P, Mrowietz U, Arenberger P, Bartak P, Buchvald J, Christophers E, *et al.* Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with Crohnic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:539-47.
 80. Lassus A, Dahlgren AL, Halpern MJ, Santalahti J, Happonen HP. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated ethyl ester lipids (Angiosan) in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *J Int Med Res* 1990;18:68-73.
 81. Spiehs MJ, Varel VH. Nutrient excretion and odorant production in manure from cattle fed corn wet distillers grains with solubles. *J Anim Sci* 2009;87:2977-84.
 82. Rideout TC, Fan MZ, Cant JP, Wagner-Riddle C, Stonehouse P. Excretion of major odor-causing and acidifying compounds in response to dietary supplementation of chicory inulin in growing pigs. *J Anim Sci* 2004;82:1678-84.
 83. Smith DJ, Skiles GL, Appleton ML, Carlson JR, Yost GS. Identification of goat and mouse urinary metabolites of the pneumotoxin, 3-methylindole. *Xenobiotica* 1993;23:1025-44.
 84. Palmieri BL, C. Vadalà, M. Palmieri, L. Razionale per l'utilizzo di un nutraceutico con formulazione probiotica originale. *Minerva Med* 2015;106:7.
 85. Vora R, Finnamore HE, Crook K, Baillie C, Whittle E, Krishnamurthy B, *et al.* Clinical Experience of Use of High-Dose Intravenous Methylprednisolone in Children With Acute Moderate to Severe Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015 [Epub ahead of print].
 86. Moloney RD, Johnson AC, O'Mahony SM, Dinan TG, Greenwood-Van Meerveld B, *et al.* Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci Ther* 2016;22:102-17.
 87. Cashman MD, Sonu Dhillon DK, Puli SR. Irritable Bowel Syndrome: A Clinical Review. *Curr Rheumatol Rev* 2016;12:13-26.
 88. Kumagai H, Yokoyama K, Imagawa T, Yamagata T. Functional dyspepsia & irritable bowel syndrome in teenagers: An internet survey. *Pediatr Int* 2015 [Epub ahead of print].
 89. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol* 2015;6:551.
 90. Iranzo P, Alsina-Gibert M. Immunobullous disease and ulcerative colitis: the need of an accurate diagnosis. *Br J Dermatol* 2016 [Epub ahead of print].
 91. Kuwaki K, Mitsuyama K, Kaida H, Takedatsu H, Yoshioka S, Yamasaki H, *et al.* A longitudinal study of FDG-PET in Crohn disease patients receiving granulocyte/monocyte apheresis therapy. *Cytotherapy* 2016;18:291-9.
 92. Scholmerich J. [Extraintestinal symptoms in Crohnic inflammatory bowel diseases]. *Dtsch Med Wochenschr* 1989;114:911-3 [Article in German].
 93. Lembcke B, Kruis W. [Diverticular disease - clinical patterns and treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* 2015;140:1353-9 [Article in German].
 94. Coates LC, Kavanaugh A, Mease PJ, Soriano ER, Laura Acosta Felquer M, Armstrong AW, *et al.* Group for research and assessment of psoriasis and psoriatic arthritis: Treatment recommendations for psoriatic arthritis 2015. *Arthritis Rheumatol* 2016 [Epub ahead of print].
 95. Henriksen SM, Nybing JD, Bouert R, Havsteen I, Christensen AF, Jensen K, *et al.* A computer-based method for precise detection and calculation of affected skin areas. *Clin Physiol Funct Imaging* 2015 [Epub ahead of print].
 96. Weckbach S, Schewe S, Michaely HJ, Steffinger D, Reiser MF, Glaser C. Whole-body MR imaging in psoriatic arthritis: additional value for therapeutic decision making. *Eur J Radiol* 2011;77:149-55.
 97. Eskesen D, Jespersen L, Michelsen B, Whorwell PJ, Muller-Lissner S, Morberg CM. Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12(R), on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Br J Nutr* 2015;114:1638-46.