

Probiotici e terapia convenzionale: nuove frontiere nella gestione delle manifestazioni articolari delle malattie infiammatorie intestinali (IBD)

Giovanni Tomasello^{1,5*}, Vincenzo Davide Palumbo^{1,5*}, Angelo Miceli^{7*}, Emanuele Sinagra^{2,3,5}, Antonio Bruno^{1,5}, Alida Abruzzo³, Francesco Cappello^{5,10}, Angelo Maria Patti^{5,9}, Rosaria Maria Giglio^{5,9}, Provvidenza Damiani^{4,5}, Riccardo Tomasello⁷, Marcello Noto⁶, Vincenza Maria Arculeo⁷, Maurizio Filippo Accardo⁸, Attilio Ignazio Lo Monte¹

¹DICHIRONS Department, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy; ²Fondazione Istituto S. Raffaele- G. Giglio, Gastroenterology and Endoscopy Unit, Cefalù, Italy; ³Phd Course in Surgical Biotechnology and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy; ⁴AOUP Paolo Giaccone, Unit of Geriatrics, Faculty of Medicine, University of Palermo, Palermo; ⁵Euro-Mediterranean Institute of Science and Technology (IEMEST), Palermo, Italy; ⁶AOUP Paolo Giaccone; ⁷School of Medicine and Surgery, University of Palermo, Italy; ⁸KORE University Enna, Italy; ⁹Department of Internal medicine and Specialities, University of Palermo, Italy; ¹⁰Department of Experimental Biomedicine and Clinical Neuroscience, Section of Human Anatomy, University of Palermo

«PROBIOTICS AND CONVENTIONAL THERAPY: NEW FRONTIER IN THERAPEUTIC APPROACH IN ARTICULAR MANIFESTATIONS OF IBD»

Summary. This work reports a clinical trial performed at Palermo University Hospital “Paolo Giaccone”. From January 2004 to December 2011, 79 patients were enrolled (40 men and 39 women). All patients suffered from Inflammatory Bowel Disease (IBD) and were subjected to orthopedic consultation at the Institute of Orthopaedics, University Hospital of Palermo, for arthropathy secondary to IBD. The patients were divided into two groups (A and B) and dealt with different therapies for the resolution of the inflammatory picture of the colonic mucosa and the treatment of the extraintestinal articular manifestations. Group A was treated with drug therapy: Diclofenac (75 mg im/day for 10 days) and Mesalazine (800 mg gastro-resistant tablets, one tablet twice a day in mild forms, and one tablet three times per day in moderate forms). In group B, in addition to the previous treatment protocol, two probiotic mixtures were added in a time of two weeks: in the first week, twice a day, one capsule containing a mixture of *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces boulardii* was administered, with the main purpose to mitigate the intestinal inflammation; in the second week, twice a day too, one capsule containing a mixture of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus acidophilus* was administered, with the aim to promote the restoration of a normal intestinal microenvironment. The attenuation of intestinal inflammation, improved by the presence of probiotics, could have important effects on the articular manifestations, resulting in a significant improvement of the arthropathy. All patients were evaluated with the Harvey-Bradshaw Index. Both Crohn Disease and Ulcerative Colitis diagnosis was made with clinical, laboratory, endoscopic and instrumental tests; the degree of disease activity was evaluated using the criteria of Truelove and Witts. The WOMAC-Score (Western Ontario McMaster) was used in our study to investigate the degree of articular involvement of the patients. The data were statistically evaluated and these are shown that the B group of patients treated with conventional therapy + probiotic mixture had a better resolution of the clinical and of this post-treatment parameters: WOMAC score, ESR, CRP and white blood cells; and also the B group of patients have a better response to standard therapy compared with patients who did not receive the probiotic with a remarkable statistic significance ($p \leq 0.0001$).

Key words: IBD, Intestinal Bowel Diseases, microbiota, gut microflora, probiotics, extraintestinal manifestations of IBD, articular manifestation due to IBD

*G. Tomasello, VD Palumbo and A. Miceli Shared the first authorship

Riassunto. Il presente lavoro riporta un trial clinico eseguito presso il Policlinico Universitario “Paolo Giaccone” di Palermo. Sono stati arruolati 79 pazienti (40 uomini e 39 donne) per un periodo che va da gennaio 2004 a dicembre 2011. Tutti i pazienti erano affetti da Inflammatory Bowel Disease (IBD) e sono stati sottoposti a visita ambulatoriale presso l'Istituto di ortopedia del policlinico di Palermo per artropatia secondaria a IBD. I pazienti sono stati divisi in due gruppi (A e B) e trattati con terapie differenti per la risoluzione del quadro clinico infiammatorio della mucosa colica e delle manifestazioni articolari extraintestinali. Al primo gruppo (A) è stata somministrata terapia farmacologica con Diclofenac (75 mg im/die in unica somministrazione per 10 giorni) e mesalazina (compresse gastroresistenti da 800 mg, una compressa due volte al giorno nelle forme lievi, ed una compressa tre volte a giorno nelle forme moderate). Al secondo gruppo (B) oltre al precedente protocollo terapeutico sono state aggiunte due miscele probiotiche in un intervallo di tempo di due settimane: la prima settimana si sono somministrate una capsula la mattina ed una capsula la sera contenenti una miscela di *Enterococcus faecium* e *Saccaromices boluward*, con lo scopo principale di attenuare la flogosi intestinale; mentre la seconda settimana si sono somministrate una capsula la mattina ed una capsula la sera contenenti una miscela di *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus acidophilus*, con lo scopo di favorire il ripristino di un normale microambiente intestinale. L'attenuazione della flogosi locale, migliorata dalla presenza dei probiotici, avrà importanti seguiti sul quadro colico ed articolare, comportando un rilevante miglioramento dell'artropatia. Tutti i pazienti sono stati valutati con dell'Harvey-Bradshaw Index. Sia per la Malattia di Crohn (CD) che per la Rettocolite Ulcerosa (UC), la diagnosi è stata effettuata con valutazioni cliniche, laboratoristiche, endoscopiche e strumentali; il grado di attività della malattia è stato valutato attraverso i criteri di Truelove e Witts. Il WOMAC-Score (Western Ontario McMaster) è stato usato nel nostro studio per indagare il grado di coinvolgimento articolare dei pazienti. I dati sono stati valutati statisticamente e si è evidenziato che il gruppo B dei pazienti trattati con terapia convenzionale + miscela probiotica ha avuto una migliore risoluzione del quadro clinico e nel post trattamento dei parametri: WOMAC score, VES, PCR e leucociti; e inoltre i pazienti del gruppo B presentano una risposta migliore alla terapia standard rispetto ai soggetti che non hanno beneficiato del probiotico con una significatività notevole ($p \leq 0.0001$).

Parole chiave: IBD, MICI, malattie infiammatorie croniche dell'intestino, microbiota, microflora intestinale, probiotici, manifestazioni extraintestinali delle IBD, manifestazioni articolari delle IBD

Introduction

Col termine di IBD che deriva dalla sigla inglese (Inflammatory Bowel Diseases), si intendono, un gruppo di malattie infiammatorie intestinali che comprendono la Rettocolite Ulcerosa (RCU), il morbo di Lesniowski-Crohn (CD) comunemente chiamato morbo di Crohn, ed una colite che presenta delle caratteristiche borderline tra Crohn e RCU, denominata Colite Microscopica Indeterminata.

Queste patologie si manifestano più frequentemente nei paesi a maggior sviluppo economico e più raramente nei paesi in via di sviluppo, verosimilmente, a causa dei fattori ambientali e delle abitudini alimentari (1).

Pur non essendo ancora individuato, l'agente causale sembra molto probabile, che il primum movens della malattia è da ricercare in un'inappropriata reazione del sistema immunitario nei confronti dei microorganismi intestinali che si palesa in soggetti geneticamente predisposti (2, 3) (sono note numerose alterazioni di specifici loci genetici coinvolti nello sviluppo delle IBD e tra i geni coinvolti, i principali sono i geni NOD2/CARD15, ATG16L1 e IRGM24-26). I fattori favorenti parrebbero essere svariati, anche se non sempre comuni tra le due patologie, ad esempio il fumo che nella RCU è un fattore protettivo nella CD è un fattore favorente lo sviluppo della stessa (4). Tra gli altri fattori di rischio ricordiamo la dieta, l'eccessivo consumo di antibiotici, lo stress, l'appendicectomia

(anche qui il discorso è controverso perché fattore di rischio per la CD e fattore protettivo per la RCU) e l'uso/abuso di contraccettivi orali, probabilmente per l'effetto stimolante degli estrogeni sul sistema immunitario e per il loro potenziale trombogeno (5-9).

Tra tutti risulta chiara, comunque, una condizione di alterazione a carico del microambiente intestinale (disbiosi); esistono delle differenze significative in tra la flora microbica intestinale dei soggetti sani e dei soggetti malati o comunque a rischio di sviluppare IBD, tra i vari microorganismi che sono probabilmente coinvolti nello sviluppo delle IBD ricordiamo il *Mycobacterium Avium Paratuberculosis* (MAP) e ad alcuni ceppi di *Escherichia coli*. Bull TJ et al. hanno dimostrato con la presenza del MAP nel 92% dei pazienti con CD e nel 26% dei controlli attraverso l'analisi dei campioni biotici (10). Tuttavia, nonostante altri studi in tale direzione confermino la presenza del MAP in campioni biotici di soggetti con IBD e con una frequenza superiore rispetto ai controlli sani, non possiamo essere certi del ruolo del MAP come agente trigger piuttosto che di una presente come risultato di una semplice sovracrescita ascrivibile alla malattia intestinale stessa. Entrambe le entità nosografiche sono caratterizzate da un decorso cronico ricorrente che tipico delle manifestazioni primitive intestinali e possono manifestarsi con una clinica piuttosto eterogenea e talvolta aspecifica con i sintomi che sono legati sia all'estensione sia alla localizzazione e alla gravità delle lesioni.

Il quadro clinico può manifestarsi con ematochezia/rettorragia, diarrea ematica, tenesmo rettale, dolore addominale e a questi si possono associare una serie di sintomi sistemici legati all'infiammazione intestinale come l'anorexia, nausea, vomito, calo ponderale e anemizzazione.

Altra caratteristica comune è la tendenza alla comparsa di manifestazioni extraintestinali, con coinvolgimento di diversi distretti corporei, di cui l'artrite sicuramente rappresenta un momento molto importante perché è tra le manifestazioni più frequenti e debilitanti.

Ricordiamo che le manifestazioni extraintestinali, tutt'altro che rare, tendono a presentarsi con un'incidenza compresa tra il 20% e il 40% e sono classificabili in tre gruppi: (1) il primo gruppo comprende manife-

stazioni infiammatorie cutanee (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), oculari (uveite, sclerite, episclerite), e articolari (artrite); (2) il secondo gruppo comprende le manifestazioni secondarie alle complicanze o all'estensione diretta della patologia intestinale; (3) il terzo gruppo comprende le epatopatie e l'amiloidosi, le complicanze a carico dei sistemi vascolare, nervoso, cardiaco e polmonare.

L'artrite è la manifestazione extraintestinale più comune, con una frequenza di circa il 30% e influenza significativamente la qualità di vita e la morbilità dei soggetti che ne sono colpiti. Altre manifestazioni muscoloscheletriche includono l'entesite e la dattilite, inoltre, il 40-50% dei soggetti affetti da IBD presenta osteopenia e fino al 30% dei pazienti può andare incontro ad osteoporosi. L'artrite associata alle IBD è classificata nel gruppo delle spondiloartropatie sieronegative (SpA) come la spondilite anchilosante, l'artrite psoriasica, l'artrite reattiva, e le spondiloartriti indifferenziate: tutte queste entità nosografiche sono caratterizzate da un coinvolgimento articolare infiammatorio che può essere assiale o periferico e classicamente dalla negatività sierologica per il fattore reumatoide, inoltre, condividono una predisposizione genetica comune, come è evidente dall'elevata frequenza all'interno di gruppi familiari di pazienti affetti e da evidenze genetiche di associazione con l'HLA-B27.

Si tratta di una condizione clinica molto importante, seppur spesso poco considerata, giacché spesso si dà maggior rilievo alla malattia primitiva, tuttavia bisogna considerare che i dati epidemiologici più recenti riportano una prevalenza di quasi quattro milioni di persone al mondo sono affetti da IBD, con una prevalenza in Europa variabile tra 505/100.000 soggetti per la Rettocolite Ulcerosa e 322/100.000 soggetti per la malattia di Crohn; mentre nel Nord America 249/100.000 persone per la RCU e 319/100.000 persone per la Malattia di Crohn (1); anche se non bisogna essere pienamente convinti della veridicità dei dati e tenere conto che probabilmente stiamo sottostimando il problema.

Quindi sulla base delle nostre considerazioni l'artropatia come manifestazione extraintestinale delle IBD è più comune di quanto si pensi, si stima una prevalenza complessiva del 17-39%, anche se, in realtà i dati presentati potrebbero essere imprecisi a causa della

sottostima della prevalenza delle IBD e della difficoltà di obiettivazione clinica dell'artropatia dovute alla sua natura transitoria e alla responsività agli steroidi usati per la malattia intestinale. La presenza di una malattia attiva o di una storia familiare di IBD e di altre condizioni cliniche IBD-associate (pioderma gangrenoso ed eritema nodoso) rappresentano dei fattori di rischio per lo sviluppo dell'artropatia.

L'artropatia può presentarsi sotto forma di un'artrite assiale e di un'artrite periferica, quest'ultima molto più comune nelle IBD con un'incidenza stimata tra il 5% e il 20%.

Sono note due forme di artropatia periferica: il tipo 1 (pauciarticolare, con coinvolgimento di meno di 5 articolazioni, soprattutto grandi articolazioni e con una durata dell'attacco acuto solitamente inferiore a 10 settimane) e il tipo 2 (poliarticolare, con coinvolgimento di più di 5 articolazioni, soprattutto piccole articolazioni e con una durata che può estendersi a mesi o anni); l'artrite pauciarticolare sembra essere strettamente collegata alle riacutizzazioni della malattia intestinale, mentre lo stesso non si può dire per la forma poliarticolare (11).

L'artropatia assiale, meno frequente (3%-5%) tipicamente caratterizzata da rigidità mattutina e lombalgia, può presentarsi sotto forma di spondilite e di sacroileite (12). La sacroileite spesso è asintomatica e solitamente non tende a progredire verso la spondilite tranne che nelle forme bilaterali o nei soggetti che presentano altre manifestazioni extraintestinali (pioderma gangrenoso, eritema nodoso, uveite, episclerite...). La spondilite, che risulta più frequentemente HLA-B27 positiva, caratterizza un quadro più grave della sacroileite con una tendenza progressiva all'erosione e al danneggiamento dei corpi vertebrali fino all'anchilosi, che si configura radiologicamente con l'aspetto tipico a canna di bamboo.

L'analisi dei meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo dell'artropatia e delle altre manifestazioni extraintestinali delle IBD è fondamentale per cercare di sviluppare un trattamento efficace e migliorare la qualità di vita di questi pazienti.

Le spondiloartropatie sono malattie a genesi multifattoriale che si sviluppano in soggetti geneticamente predisposti come conseguenza di fattori ambientali che fungono da agenti trigger, tuttavia ancora oggi i

reali meccanismi molecolari e cellulari che stanno alla base dello sviluppo della flogosi articolare, secondaria all'enteropatia non sono stati pienamente compresi. Sono stati chiamati in causa condizioni come: alterazione nei meccanismi di citotossicità anticorpo-mediateda, reazioni di ipersensibilità ad immunocomplessi di derivazione intestinale ed anche fenomeni di cross reattività dei peptidi intestinali (batterici/alimentari) in soggetti geneticamente suscettibili. Tuttavia a oggi le due principali teorie supportate ipotizzano un ruolo fondamentale della condizione di disbiosi intestinale (reperto comune in corso di IBD e probabilmente coinvolto nella patogenesi della stessa enteropatia) che si associa a un alterato funzionamento biochimico-molecolare e della capacità di migrazione e homing dei linfociti intestinali, tale che gli stessi sono capaci di raggiungere le articolazioni favorite dall'espressione deregolata delle molecole di adesione nell'endotelio attivato; l'insieme di queste alterazioni può essere riassunto parafrasando una locuzione medica con la frase asse elettivo intestino-articolazioni che bene descrive la stretta relazione esistente tra i due sistemi.

La ricerca dei meccanismi fisiopatologici responsabili ha contribuito a disegnare numerosi esperimenti di laboratorio, in uno di questi si è potuto dimostrare che l'iniezione sperimentale intraperitoneale di polimeri purificati di complessi peptidoglicano-polisaccaride (PG-PS) estratti da batteri commensali, favorisce la comparsa di una forma di artrite periferica in ratti geneticamente suscettibili, e che la riattivazione dell'artrite stessa è indotta dalla somministrazione di polimeri omologhi o eterologhi al PG-PS come l'LPS. Inoltre in studi sperimentali su cavie da laboratorio, si è visto che la flogosi intestinale e le sue complicanze extraintestinali, possono essere ridotte dalla somministrazione sistemica di mutanolisina, un enzima con la sola funzione di degradare il complesso PG-PS. Tutto ciò accentua ancora di più l'interesse nei confronti della condizione di disbiosi intestinale e pone basi sempre più solide nel considerare l'importanza della microflora intestinale nel garantire la corretta omeostasi di un'apparto come quello intestinale, che comunque rappresenta una porta aperta verso l'ingresso di potenziali agenti patogeni nel nostro organismo, con conseguenze su sistemi e apparati anche molto lontani sia embriologicamente sia funzionalmente dall'intestino.

A sostegno delle nostre ipotesi patogenetiche altri studi rilevano il mancato sviluppo sia dell'artrite sia dell'infiammazione intestinale in ratti transgenici per l'HLA-B27, ma cresciuti in condizioni germ-free (13); ed è interessante notare come nello stesso modello sperimentale lo sviluppo dell'artrite sia una conseguenza alla colite.

Date le evidenze scientifiche sulla relazione tra disbiosi e IBD/artrite in soggetti geneticamente suscettibili sorge spontaneo chiedersi, tuttavia, il motivo per il quale alcuni pazienti pur presentando una colonizzazione intestinale da parte di microrganismi potenzialmente nocivi non sviluppano un coinvolgimento infiammatorio locale e sistemico (articolare). Qui entrano in gioco una serie di fattori che nei soggetti normali, cioè senza alcuna condizione favorente (genetica), favoriscono lo sviluppo di una normale tolleranza ai batteri intestinali, sia attraverso una risposta infiammatoria efficiente e controllata sia per effetto della funzione di barriera mucosale che impedisce la retrodiffusione dei microrganismi negli strati sottostanti dell'epitelio di rivestimento, sia per effetto della soppressione della risposta immunitaria mucosale che è mediata da una serie di citochine antiinfiammatorie come IL-4, IL-10 e da neuropeptidi inibitori e corticosteroidi endogeni. Questo delicato equilibrio tra componenti batteriche e meccanismi di protezione dell'ospite può essere alterato in presenza di difetti genetici e da agenti che aumentano la permeabilità della mucosa o che riducono la produzione di molecole immunosoppressive alterando la composizione della microflora intestinale e permettendo così la cronicizzazione dell'infiammazione. Comprendiamo che queste considerazioni fisiopatologiche possono palesare importanti implicazioni terapeutiche sulle possibili strategie da impiegare per attenuare la stimolazione antigenica cronica, per ripristinare la produzione di molecole immunosoppressive endogene, bloccando l'attività delle molecole proinfiammatorie e per accelerare la guarigione della mucosa; tutti questi momenti terapeutici dovrebbero essere ricercati assieme, in modo da permettere il ristabilirsi dell'omeostasi mucosale e attenuare la flogosi locale e sistemica e quindi l'infiammazione articolare stessa.

Tenendo conto della centralità nei momenti fisiopatologici dei microrganismi enteropatogeni, abbiamo pensato di valutare l'efficacia di nuovi strumenti

terapeutici che sono i probiotici che sappiamo, essere microrganismi vitali, biologicamente attivi e normalmente rappresentati a livello intestinale nel soggetto sano, la cui azione è volta a regolare la microflora intestinale. I probiotici possono manifestare funzioni differenti: le miscele a base di Lattobacilli (in particolar modo il ceppo Rhamnosus), impediscono l'adesione e l'attecchimento delle specie enteropatogene alla mucosa colica, mentre le miscele di Bifidobatteri aumentano le capacità adesive e viscoelastiche del muco colico impedendo la colonizzazione intestinale da parte degli enteropatogeni e inoltre stimolano la sintesi di vitamine del gruppo B e mostrano un'azione antiinfiammatoria e antineoplastica. Tra i Bifidobatteri, il ceppo *Bifidobacterium bifidum*-BGN4, ha anche dimostrato un'azione immunomodulante sui linfociti CD4 (+), mentre studi in vitro, hanno fatto notare una riduzione dell'infiltrato infiammatorio tissutale (14).

In letteratura l'uso dei probiotici, applicato al trattamento complementare delle IBD, si fa risalire a decenni addietro. Famosi sono gli studi condotti da Nissle che fu il primo a valutare l'effetto congiunto dell'acido 5-amino-salicilico (5-ASA) e dell'*E. coli* nel mantenimento della remissione clinica in pazienti affetti da RCU; e recentemente le nuove formazioni sono sempre più utilizzate per il mantenimento dell'eubiosi intestinale e per il trattamento complementare delle IBD. In particolar modo, l'effetto dei probiotici è attribuito all'azione dei Lactobacilli e dei Bifidobatteri, i primi e in particolar modo il ceppo Rhamnosus (15, 21), impediscono l'adesione e l'attecchimento delle specie enteropatogene alla mucosa colica e si dimostrano in vivo in grado di ridurre la produzione dei mediatori bioumorali di flogosi caratteristici delle IBD (IL-1, IL-8, TNF- α) ed il reclutamento leucocitario; i Bifidobatteri, invece, hanno un ruolo importante nel migliorare le capacità adesive e viscoelastiche del muco colico e nell'impedire la colonizzazione intestinale da parte degli enteropatogeni, inoltre stimolano la sintesi di vitamine del gruppo B ed esplicano una azione antiinfiammatoria ed antineoplastica. In vivo il ceppo *Bifidobacterium bifidum*-BGN4 ha dimostrato un'azione immunomodulante sui linfociti CD4 (+) e studi in vitro hanno reso evidente la capacità di favorire la riduzione dell'infiltrato infiammatorio tissutale (14); proprietà che rende il Bifidum-BGN4 molto utile per

la prevenzione e per il controllo delle IBD (16-18, 22, 23). Il trattamento delle forme di IBD di grado lieve e lieve-moderato prevede l'utilizzo di Mesalazina e FANS e nelle fasi di riacutizzazione si utilizza il Prednisone; il grado severo e le forme moderate, che non rispondono alla mesalazina, prevede l'uso di immunosoppressori (Azatioprina) e del farmaco biologico (Infliximab) (24-26); tuttavia si tratta di condizioni severe e di competenza gastroenterologica per le quali la terapia delle manifestazioni extraintestinali come l'artrite passa momentaneamente in secondo piano per l'incremento del rischio di complicanze locali dovute all'estensione della malattia primitiva stessa.

Scopo dello studio

L'analisi della letteratura sull'argomento, riporta di uno studio recente condotto da Yeoh N et al (Dipartimento di Medicina, Dunedin School of Medicine, Università di Otago, Dunedin, New Zealand), che descrive e il ruolo del microbiota nella genesi delle malattie reumatologiche. Tale studio si propone di valutare l'efficacia della manipolazione del microbiota intestinale attraverso i probiotici e/o il trapianto di microbi fecali (FMT) nel trattamento delle malattie reumatologiche, ponendo l'accento sull'importanza della ricerca di nuovi approcci terapeutici e riconoscendo l'importanza delle interazioni tra ospite e microbi intestinali (19).

Questo studio si va ad associare ad altri, molto più numerosi, dati in letteratura che riportano i notevoli benefici clinici ottenuti dalla manipolazione del microbiota intestinale nei soggetti con IBD attraverso i probiotici; considerazioni che pongono l'accento sull'importanza della disbiosi come momento patogenetico principale delle IBD e che sulla base delle considerazioni fisiopatologiche espresse sembra contribuire anche allo sviluppo delle manifestazioni extraintestinali.

Quindi spinti dall'analisi dei risultati di numerosi studi clinici che riportano l'efficacia dell'impiego di miscele probiotiche in associazione alla terapia convenzionale per il trattamento delle IBD non complicate, ne abbiamo ipotizzato l'impiego in soggetti con complicanze articolari secondarie alle IBD.

In atto, il trattamento in uso nella nostra U.O.C.

di Ortopedia e Traumatologia (Direttore Prof. M. D'Arienzo) del Policlinico di Palermo, prevede per i pazienti con artropatia secondaria alle IBD l'associazione di un FANS (Diclofenac - 75 mg im/die in unica somministrazione per 10 giorni) alla mesalazina (compresse gastroresistenti da 800 mg, una compressa due volte al giorno nelle forme lievi, ed una compressa tre volte a giorno nelle forme moderate). In questo studio considereremo solamente i pazienti con manifestazioni articolari secondarie a IBD con grado di attività lieve o moderato, valutando l'efficacia del trattamento complementare con probiotico rispetto alla terapia standard senza probiotico. Tuttavia sappiamo che il nostro trattamento sperimentale prevede l'uso di due miscele, la prima settimana una miscela a base di *Enterococcus faecium* e *Saccaromices boluward* e seconda settimana una miscela di *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus acidophilus*; in modo tale da ristabilire il corretto microambiente intestinale e attenuare la flogosi locale stessa. Secondo le nostre ipotesi l'attenuazione della flogosi locale avrà importanti seguiti sul quadro articolare, comportando anche un rilevante miglioramento dell'artropatia e prevenendo anche lo sviluppo di altre manifestazioni extraintestinali.

Materiali e metodi

Sono stati reclutati settantanove (79) pazienti in un intervallo temporale compreso tra il Gennaio 2004 e il Dicembre 2011, i soggetti in questione presentavano una diagnosi di IBD e riferivano manifestazioni articolari associate.

I pazienti, quaranta uomini e trentanove donne, hanno partecipato al nostro studio clinico randomizzato eseguito presso la AOUP P. Giaccone di Palermo, con il coinvolgimento della U.O.C. di Ortopedia e Traumatologia (Direttore dal Prof. M. D'Arienzo), Ambulatorio di Ortopedia (coordinatore Prof. A. Sanfilippo), e la U.O. del Programma Attività Trapiantologica Interaziendale, (Direttore Prof. G. Buscemi), Servizio di Endoscopia digestiva dell'apparato digerente (coordinatore Prof. G. Tomasello).

La diagnosi di Malattia di Crohn è stata eseguita in accordo a valutazioni cliniche, laboratoristiche e strumentali. I pazienti con colite lieve, moderata o se-

vera sono stati inquadrati retrospettivamente, nella nostra coorte di settantanove pazienti ospedalizzati con CD, attraverso la valutazione dell'Harvey-Bradshaw Index, preferito al Crohn's Disease Activity Index (CDAI) per ridurre la variabilità inter-osservatoria e per aumentare la compliance rendendo più facile la risposta delle domande ai pazienti. Come per la CD anche per la RCU anche la diagnosi di RCU è stata portata a termine in accordo a valutazioni cliniche, laboratoristiche, endoscopiche e strumentali; il grado di attività della malattia è stato valutato attraverso i criteri di Truelove e Witts. Al momento del ricovero tutti i pazienti sono stati studiati clinicamente e sono stati eseguiti a esami laboratoristici per dosare la VES, la PCR e i leucociti; sono stati inoltre sottoposti a esami strumentali al fine di escludere complicanze acute come il megacolon tossico o la perforazione intestinale. È stata fatta anche una coprocoltura al fine di escludere una parassitosi intestinale e sono stati allertati i chirurghi sollecitandoli se necessario a tenersi pronti a eseguire la colectomia.

Sulla base del grado di attività della malattia intestinale abbiamo raggruppato i pazienti in un nostro Disease Index Score delle IBD, tale per cui al ricovero si presentavano: diciotto pazienti con malattia lieve, trentaquattro con malattia moderata e ventisette con malattia severa.

L'artrite è stata definita come una condizione caratterizzata da una dolenzia articolare associata a rigidità e gonfiore che tipicamente tende a peggiorare con il movimento durante l'esame clinico. Il WOMAC-Score (Western Ontario McMaster) sviluppato presso Western Ontario e McMaster Universities, che consiste nel proporre una serie di questionari usati per valutare, attraverso la considerazione di diversi quesiti

clinici, la condizione di pazienti con osteoartrite del ginocchio; è stato usato nel nostro studio per indagare il grado di coinvolgimento articolare dei pazienti. Il WOMAC misura cinque differenti parametri per il dolore (intervallo di punteggio 0-20), due per la rigidità (range di punteggio di 0-8), e diciassette per l'analisi del grado di limitazione funzionale (intervallo di punteggi 0-68); ed è considerato, a oggi, il più sensibile dei test usati nella valutazione delle OA del ginocchio e dell'anca.

I dati raccolti riportavano che il 49% dei pazienti analizzati presentava un indice di WOMAC ≤ 70 (si tratta dei pazienti con maggior grado di limitazione funzionale e con una sintomatologia articolare più severa), il 32% un indice di WOMAC ≥ 71 e ≤ 75 , mentre soltanto il 19% un WOMAC > 80 (con un coinvolgimento articolare meno spinto).

Riportiamo di sotto i principali valori osservati al momento del ricovero nella coorte di pazienti studiati (Tab. 1).

A questo punto, i settantanove pazienti della nostra coorte sono stati suddivisi random in due gruppi A e B: al gruppo A afferivano trentanove (39) unità e al gruppo B quaranta (40) unità. Per evitare di aggiungere ulteriori bias che avrebbero potuto comportare dei problemi di valutazione dei risultati finali si è scelto, a priori, di non trattare i pazienti in studio con il biologico (infliximab).

Discussione

Suddivisi in due gruppi, i soggetti della nostra coorte sono stati trattati con due modalità differenti al fine di valutare se le considerazioni sopra esposte cir-

Tabella 1. Parametri di laboratorio nella coorte di pazienti affetti da IBD

Età media (anni)	55 anni con una DS ± 13 anni
Sesso (M:F)	40:39
Durata della malattia (mesi)	29,3 \pm 26,9
VES (mm/h)	Soggetti di età pari o superiore a cinquanta anni (valori medi = 41,49 mm/h) Soggetti di età inferiore a cinquanta anni (valori medi = 39,30 mm/h)
peR (mg/dL)	Trentadue soggetti con peR ~ 35 mg/dL Quattordici soggetti con peR compresa tra 30 e 34 mg/dL, Diciotto soggetti con peR compresa tra 20 e 29 mg/dL Quindici soggetti con peR compresa tra 10 e 19 mg/dL.

ca l'efficacia del probiotico, in aggiunta al trattamento standard, risultano valide o meno.

I soggetti afferenti al gruppo A sono stati trattati con il protocollo convenzionale a base di FANS e Mesalazina; la mesalazina (che abbiamo somministrato in compresse gastroresistenti da 800 mg per due volte al giorno nelle forme lievi e tre volte a giorno nelle forme moderate) è un antinfiammatorio appartenente alla categoria degli acidi aminosalicilici, che per le sue caratteristiche farmacocinetiche, ha un'azione selettiva nei confronti della mucosa intestinale. Assunta per via orale, in compresse gastroresistenti, la mesalazina è in grado di superare indenne l'acidità gastrica ed essere rilasciata al livello ileale, dove manifesta la sua azione terapeutica favorita anche da un ridotto tasso di assorbimento sistemico; la mesalazina tende quindi a concentrarsi a livello intestinale e qui inibisce la produzione di mediatori flogistici come prostaglandine, trombossani e leucotrieni salvaguardando l'integrità della mucosa intestinale. In associazione alla mesalazina, il protocollo standard nei pazienti con artrite applicato nella nostra U.O. prevede l'utilizzo di diclofenac in boli da 75 mg im/die per 10 giorni. I soggetti afferenti al gruppo B sono stati trattati con il protocollo in studio a base di FANS, Mesalazina e probiotico che è stato somministrato con una metodica standardizzata in un intervallo di tempo di due settimane: la prima settimana si sono somministrate una capsula la mattina ed una capsula la sera contenenti una miscela di *Enterococcus faecium* e *Saccaromices boulard* (Enterelle® Bromatec, Italia), con lo scopo principale di attenuare la flogosi intestinale; mentre la seconda settimana si sono somministrate una capsula la mattina ed una capsula la sera contenenti una miscela di *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus acidophilus* (ceppo specifico di Bifido Bifidum BGNG) (Acronelle® Bromatec, Italia), con lo scopo di favorire il ripristino di un normale microambiente intestinale. Entrambi i gruppi beneficiavano dell'aggiunta di un blando cortisonico (sotto forma di compresse da 25 mg) al momento del bisogno.

Sulla base delle nostre ipotesi patogenetiche il probiotico agendo in modo tale da normalizzare il microambiente intestinale, sarà in grado di comportare un beneficio non trascurabile del quadro articolare ed anche del processo infiammatorio locale e sistemico; ciò potrà porre basi solide per considerare la disbiosi

come il fattore scatenante principale responsabile, in soggetti geneticamente suscettibili, oltre che del danno primitivo anche dello sviluppo dell'infiammazione articolare e delle altre manifestazioni extraintestinali delle IBD (eritema nodoso, pioderma gangrenoso, uveite, sclerite, episclerite).

Bisogna tenere conto che il nostro studio riporta comunque il confronto di due popolazioni, una trattata con il trattamento standard e l'altra con l'aggiunta del probiotico alla terapia di base, quindi è importante tenere conto di come nella nostra analisi si è valutato l'effetto di miscele di probiotici e non di agenti mono-ceppo, questo non ci permette di esprimere delle valutazioni comparative dell'efficacia del singolo agente microbico somministrato, né di valutare eventuali interazioni con i farmaci di base.

Di seguito riportiamo i grafici per il confronto dei due tipi di trattamento (Figg. 1, 2).

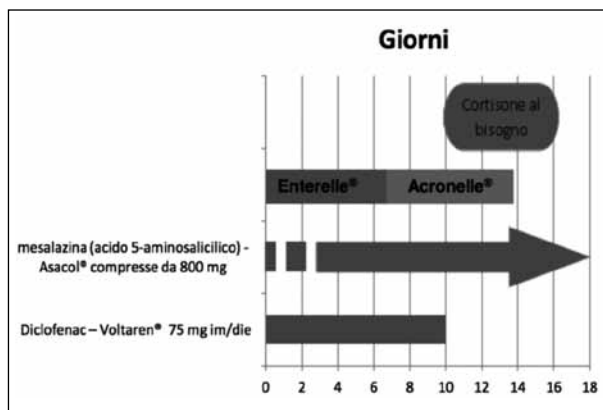


Figura 1. Trattamento Gruppo B

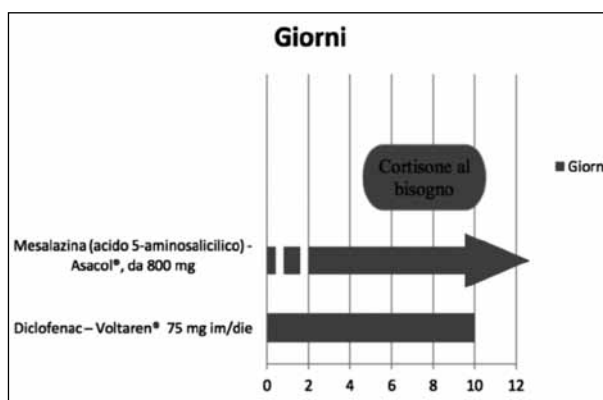


Figura 2. Trattamento Gruppo A

Outcome

Tutti i pazienti responsivi alla terapia medica sono stati seguiti nel nostro ambulatorio con l'obiettivo di monitorare le condizioni cliniche, laboratoristiche e strumentali, i pazienti sono stati, inoltre, seguiti attentamente cercando di riconoscere precocemente una riacutizzazione o eventuali eventi avversi ai farmaci.

Le visite ambulatoriali sono eseguite a distanza di un mese dalla dimissione e poi a intervalli di due mesi, a ogni visita venivano obiettivate e registrate le condizioni generali, l'esame obiettivo e gli indici bioumorali. Tutti i pazienti hanno riportato un follow-up minimo di dodici mesi.

L'obiettivo primario del nostro studio era di valutare l'entità del miglioramento del quadro articolare registrando le condizioni dei pazienti al termine del follow-up (tenendo conto di valutazioni cliniche, laboratoristiche e dell'analisi dei dati del WOMAC score) e confrontandole sia con i dati di partenza dello stesso gruppo che con i risultati finali dei due gruppi in studio.

Risultati

I risultati ottenuti sono stati talvolta superiori alle attese, già a una prima analisi clinica e anche senza una valutazione oggettiva dei dati raccolti, infatti, era evidente il beneficio ottenuto dai pazienti dall'associazione del probiotico al trattamento standard, evidenza che è stata poi comprovata dall'analisi scientifica dai risultati statistici.

L'analisi statistica è stata condotta con Stat-view ed ha riportato sia per il gruppo A, sia per il gruppo B, un miglioramento nel post trattamento dei parametri considerati: WOMAC score (Fig. 3), PCR (Fig. 4), VES (Fig. 5) e leucociti (Fig. 6) con una significatività statistica notevole ($p \leq 0.0001$); tuttavia con un'attenta analisi e incrociando i risultati finali di entrambi i gruppi, si evince come i soggetti trattati con l'aggiunta del probiotico (Gruppo B) presentano una risposta migliore alla terapia standard rispetto ai soggetti che non hanno beneficiato del probiotico.

Quindi, l'analisi di questa coorte di pazienti con artropatia secondaria a IBD dimostra che il comportamento e il decorso clinico di questo subset di pazienti è strettamente dipendente dall'entità della flogosi intestinale, motivo per cui seguendo il modello fisiopatolo-

gico precedentemente descritto, intervenire sul microbiota intestinale in modo da risolvere la disbiosi può favorire un notevole miglioramento clinico sia dell'ar-

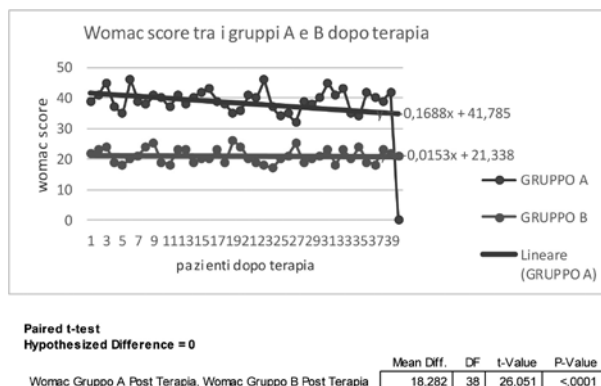


Figura 3. WOMAC score, confronto

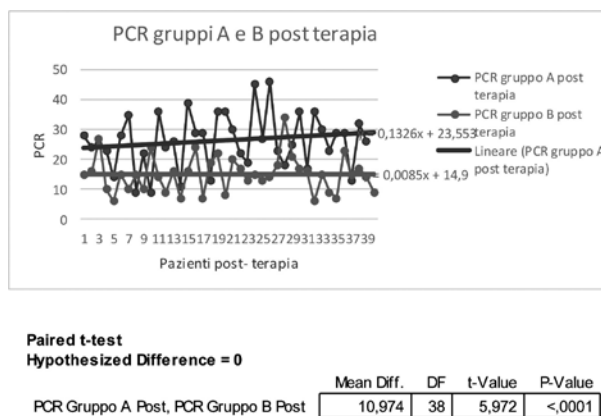


Figura 4. PCR, confronto

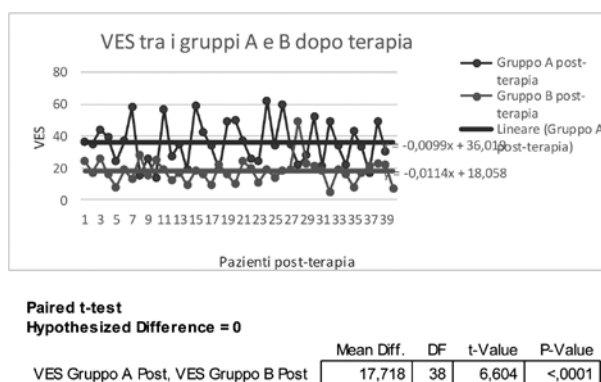


Figura 5. VES, confronto

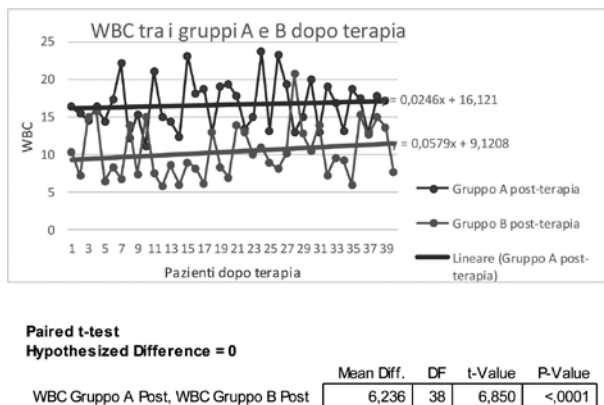


Figura 5. WBC, confronto

trite secondaria alle IBD e delle altre manifestazioni extraintestinali, sia della malattia intestinale stessa.

Di seguito è riportato il confronto statistico tra i due gruppi di studio per quanto riguarda l'analisi del WOMAC-Score, i dati ottenuti permettono di verificare l'outcome primario del nostro studio in quanto, nonostante i pazienti di entrambi i gruppi presentino un miglioramento della severità del quadro articolare, i pazienti del gruppo B (in rosso) mostrano come l'aggiunta del probiotico in terapia migliora di gran lunga la resa del trattamento terapeutico con una significatività notevole ($p \leq 0.0001$).

Inoltre, il confronto statistico degli indici di flogosi analizzati nelle due popolazioni, rafforza di più la nostra ipotesi iniziale circa l'efficacia del probiotico nel ridurre l'infiammazione sistemica oltre che quella primitiva intestinale; tutto ciò sicuramente comporta benefici notevoli per il paziente, sia riducendo il rischio di complicanze acute intestinali ed extraintestinali, sia favorendo un decorso positivo della malattia infiammatoria articolare.

Di seguito riportiamo il confronto dei dati riguardanti gli indici di flogosi nelle due coorti di pazienti post-trattamento.

Conclusione

L'analisi razionale dei risultati ottenuti ci lascia ben sperare e ci spinge a essere ottimisti nonostante una parte di classe medica, ancora scettica, sottovaluta

l'effetto dei probiotici, relegandoli a un ruolo marginale nella pratica terapeutica.

Data la frequenza e l'importanza clinica del coinvolgimento articolare nell'artropatia secondaria alle IBD e valutata la necessità di trovare alternative all'utilizzo dei FANS, il nostro gruppo di studio si è preposto, sulla base delle nuove conoscenze fisiopatologiche, di trattare i pazienti concentrandosi principalmente sul quadro infiammatorio sistemico ed intestinale prima che sulla malattia articolare.

Il coinvolgimento dell'allele HLA-B27 (che lega i peptidi antigenici dei microorganismi intestinali e in seguito espone ai linfociti T CD8 + nella sinovia), l'incremento della permeabilità intestinale e la condizione di disbiosi associata alla malattia primitiva, fanno sì che in questo particolare gruppo di pazienti, i microorganismi potenzialmente nocivi possono condividere epitopi antigeni con l'HLA-B27; questo rappresenta verosimilmente il potenziale trigger responsabile dello sviluppo dell'infiammazione articolare secondaria.

Tuttavia secondo diversi autori, possono essere individuate numerose associazioni genetiche con gli alleli del sistema HLA, come è dimostrabile dalla variazione dell'incidenza dell'artrite al variare dell'allele HLA espresso: questo molto probabilmente sta a sottendere la presenza di meccanismi patogenetici più complessi e probabilmente una predisposizione poligenica, ma indubbiamente la disbiosi ha un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'artropatia.

Quindi considerando le nostre ipotesi e analizzando i risultati ottenuti, possiamo asserire che in pazienti con artropatia IBD-correlata l'aggiunta del probiotico, modifica significativamente l'outcome degli stessi regolarizzando la flogosi intestinale e migliorando il quadro articolare.

I risultati del nostro studio sono sovrapponibili ai dati estrapolati da uno studio di Karimi O. e Peña A.S. (20), tuttavia si è cercato di andare oltre, provando a risolvere alcune questioni irrisolte nello studio precedente (20) relative all'efficacia alla posologia e alla durata del trattamento delle formulazioni multi-ceppo da noi usate.

Risulta chiaro altresì, che sarebbe utile anche valutare l'efficacia del trattamento con singoli ceppi di probiotico in modo da comprendere più finemente i

meccanismi d'azione degli stessi e la loro reale attività terapeutica; ad oggi non esistono ancora studi in letteratura che vanno in tale direzione, fatto salvo di uno studio recente condotto però su soggetti con sindrome dell'intestino irritabile (IBS).

Le valutazioni raccolte ci portano, quindi, a suggerire ai colleghi medici di intervenire con un trattamento complesso in cui ai farmaci standard (mesalazina, cortisone, biologico e FANS) vengono aggiunti i probiotici a prescindere dal grado di attività della malattia intestinale e dall'entità del coinvolgimento articolare; probabilmente ciò comporterebbe un beneficio per il paziente sia nei confronti della malattia primitiva, sia per le complicanze intestinali ed extraintestinali (acute e croniche), con un impatto anche da un punto di vista di spesa sanitaria non indifferente.

La letteratura ci informa che il dismicrobismo intestinale è anche chiamato in causa in una moltitudine di malattie che non hanno, almeno apparentemente, a che fare con le IBD.

Oltre che nelle IBD e nelle sue complicanze la disbiosi è chiamata in causa in malattie autoimmuni, reumatologiche ed endocrine. Si sta sviluppando quindi una convinzione crescente che intervenire nel mantenimento della stabilità eubiotica intestinale, con la somministrazione di specifiche miscele, rappresenta un nuovo strumento terapeutico finalizzato al trattamento e magari alla prevenzione di una moltitudine di patologie intestinali e sistemiche.

Nuovi studi in questa direzione paiono auspicabili, sia per l'enorme interesse sia suscitano sia soprattutto per le promettenti prospettive terapeutiche offerte oltre che in campo ortopedico anche in campo internistico.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. M.F. Accardo per la preziosa collaborazione prestata in riferimento alla elaborazione statistica dei pazienti.

Bibliografia

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54.
2. Farmer RG, Michener WM (1980) Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 9:271-277.
3. Yang H, McElree C (1993) Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: difference between Jews and non-Jews. *Gut* 34:517-524.
4. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1989;34:1841-1854.
5. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1995;37:668-673.
6. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:2925-2931.
7. Wild GE, Drozdowski L, Tartaglia C, Clandinin MT, Thomson AB. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease--from the molecular to the integrative to the clinical. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1-7.
8. Hildebrand H, Malmborg P, Askling J, Ekblom A, Montgomery SM. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:961-966.
9. Soderholm JD, Yang P-C, Ceponis P, et al. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002;123:1099-1108.
10. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2915-2923.
11. Marineață A, Rezuș E, Mihai C, Prelipcean CC. Extra intestinal manifestations and complications in inflammatory bowel disease. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2014;118:279-88.
12. Rath H C, Herfarth H H, Ikeda J S, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human O2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996; 98: 945-53.
13. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun.* 2001;69:2277-2285.
14. Kim N, Kunisawa J, Kweon Mn et al., Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevent CD4(+) CD45Rb (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin J Immunol* 2007 April; 123(1):30-9.
15. Ouwehand A.C, Salminen S, Roberts Pj, et al., Disease-Dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 July; 10(4):643-646.

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M,

16. Mach T, Clinical Usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. *Journal of Physiology* 2006, 57; Suppl 9:23-33.
17. Schwartz M, Cohen R, Optimizing conventional therapy for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2008 Dec;10(6):585-90.
18. Rioux Kp, Fedorak RN, Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40:260-63.
19. Nigel Yeoh, Jeremy P. Burton, Praema Suppiah, Gregor Reid, Simon Stebbings The Role of the Microbiome in Rheumatic Diseases. *Current Rheumatology Reports* February 2013, 15:314.
20. Karimi O, Peña AS. Probiotics in arthralgia and spondyloarthropathies in patients with inflammatory bowel disease. Prospective randomized trials are necessary. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:570-4.
21. Sinagra E, Tomasello G, Raimondo D, et al. Nutrition, malnutrition and dietary interventions in inflammatory bowel disease. *Progr Nutr* 2014; 16 (2): 79-89
22. Bellavia M, Rappa F, Lo Bello M, et al. Lactobacillus casei and bifidobacterium lactis supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014 Apr-Jun;28(2):251-61.
23. Tralongo P, Tomasello G, Sinagra E, et al. The role of butyric acid as a protective agent against inflammatory bowel disease. *Euromediterranean Biomedical Journal* 2014; 9(4), 24-35
24. Sinagra E, Tomasello G, Cappello F, et al. Probiotics, prebiotics and symbiotics in inflammatory bowel diseases: state-of-the-art and new insights. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2013 Oct-Dec;27(4):919-33.
25. Bellavia M, Tomasello G, Romeo M, et al. Gut microbiota imbalance and chaperoning system malfunction are central to ulcerative colitis pathogenesis and can be counteracted with specifically designed probiotics: a working hypothesis. *Med Microbiol Immunol.* 2013 Dec;202(6):393-406. doi: 10.1007/s00430-013-0305-2. Epub 2013 Jul 18. Review.
26. Tomasello G, Bellavia M, Damiano G, Gioviale MC, Lo Monte AI. Possible relation between gut microflora composition and oncogenic risk: is stimulation of inflammation the one ring of connection? *Reviews in Medical Microbiology* 2012; 23: 52-57.

Correspondence:

Prof. Giovanni Tomasello,
DICHIRONS Department, Faculty of Medicine
University of Palermo, Italy
Phone +39 091 6553703
E-mail: giovanni.tomasello@unipa.it