

MECCANISMI DI MALATTIA

DISBIOSI INTESTINALE ED INFARTO DEL MIOCARDIO: NUOVI MECCANISMI DI ATEROSCLEROSI

Intestinal dysbiosis and myocardial infarction: new mechanisms of atherosclerosis

**ROBERTO CARNEVALE^{1,2}, VITTORIA CAMMISOTTO³,
CRISTINA NOCELLA⁴, FRANCESCO VIOLI⁴**

¹Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico-Chirurgiche, Sapienza Università di Roma, Latina;

²Mediterranea, Cardiocentro, Napoli;

³Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica Paride Stefanini, Sapienza Università di Roma;

⁴Dipartimento di Scienze Cliniche, Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari,
Sapienza Università di Roma

SUMMARY

The human body is home to trillions of microorganisms that form an interactive ecosystem inside and outside the body. Most of the microbiota that colonizes the human body is found in the gastrointestinal tract, especially in the colon. The intestinal microbiota plays an important role in maintaining nutrition and the immune system, which in turn influences the susceptibility of the host and the response to certain pathological conditions. The imbalance in the intestinal microbiota, also known as intestinal dysbiosis, is associated with several pathological conditions including gastrointestinal disorders, asthma, allergies, central nervous system disorders, tumors and cardiovascular diseases. Cardiovascular disease is a major cause of death worldwide. Atherosclerosis is the key pathophysiological mechanism underlying the development of cardiovascular diseases and the intestinal microbiome influences all the risk factors that are components of atherosclerosis, both directly and indirectly, thus playing an important role, albeit little understood, in cardiovascular diseases. In this review, we outline the role of the intestinal microbiota in cardiovascular diseases and in particular in the atherosclerotic process and we address potential therapeutic interventions to modulate a possible dysbiosis.

Key words: *Intestinal microbiota, Atherosclerosis, Cardiovascular pathology, Intestinal dysbiosis.*

Indirizzo per la corrispondenza

Roberto Carnevale, PhD
Dipartimento di Scienze e Biotecnologie
Medico-Chirurgiche, Sapienza Università
di Roma, Latina
E-mail: roberto.carnevale@uniroma1.it

Introduzione

Antoine Van Leeuwenhoek, il padre della microbiologia, è stato il primo a confrontare la composizione del microbioma orale e del microbioma fecale grazie all'utilizzo dei primi microscopi artigianali, oltre 300

Elenco degli argomenti trattati

- Microbiota intestinale
- Meccanismi di aterosclerosi
- Metaboliti derivanti dal microbiota intestinale ed aterosclerosi
- Terapia per contrastare eventuale disbiosi/metaboliti del microbiota

anni fa. Le sue osservazioni hanno evidenziato le profonde differenze che ci sono tra i microbi all'interno del corpo, e che tali differenze possono avere un impatto sulla salute e sulle malattie. Oggi abbiamo nuovi strumenti per evidenziare queste differenze grazie alla moderna tecnologia di sequenziamento che permette di identificare non solo i taxa specifici, ma anche la composizione funzionale del nostro microbioma. Sebbene la nostra relazione con i microbi sia sempre stata riconosciuta, solo di recente stiamo cominciando ad apprezzare l'interdipendenza simbiotica soprattutto rispetto alle perturbazioni ambientali come la dieta, le tossine e persino i farmaci, nonché le malattie derivanti dal loro squilibrio. In questa rassegna, metteremo in evidenza i recenti progressi fatti nella comprensione del contributo del microbiota nella progressione della malattia aterosclerotica.

Microbiota intestinale

I primi studi che dimostrarono che gli agenti patogeni potessero contribuire all'aterosclerosi provengono da lavori effettuati oltre un secolo fa, sui conigli esposti ad agenti patogeni e che mostravano un aumentata lesione aterosclerotica. Questi risultati sono stati supportati da vari studi epidemiologici che hanno evidenziato l'associazione tra alcuni agenti patogeni come la *Chlamydia pneumoniae* o l'*Helico-*

bacter pylori e sviluppo dell'aterosclerosi (1). Successivi studi meccanicistici hanno evidenziato che, ad esempio, la *Chlamydia pneumoniae* è in grado di promuovere la formazione di cellule schiumose, il reclutamento dei leucociti e la progressione della lesione aterosclerotica, tutti processi tipici della patogenesi dell'aterosclerosi (2). Altri studi sono stati condotti su modelli animali trattati mediante gavage orale o infusione endovenosa di batteri quali *Porphyromonas gingivalis*. In questi animali si è osservata la presenza all'interno della placca aterosclerotica dei batteri che contribuivano all'aumento della lesione (3).

Più recentemente, i ricercatori stanno definendo il possibile ruolo di batteri provenienti da altri distretti dell'organismo come, ad esempio, dal microbiota intestinale.

Il microbiota intestinale è indispensabile per regolare il sistema immunitario dell'intestino e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi intestinale, ed è anche un mediatore chiave nel mantenimento delle funzioni metaboliche nei tessuti periferici tra cui fegato e pancreas.

Il microbiota intestinale è costituito da una serie di batteri che abitano nel tratto gastrointestinale producendo un ecosistema diversificato di circa 10^{14} microrganismi (Figura 1). La maggior parte del microbiota intestinale è composta da cinque phyla, ovvero *bacteroidetes*, *firmicutes*, *actinobacteria*, *proteobacteria* e *cerrucomicrobia*; i bacteroidetes e firmicutes rappresentano come abbondanza relativa più del 90% (4). L'omeostasi del microbiota intestinale è fondamentale per il mantenimento della salute umana e una disbiosi può contribuire allo sviluppo di varie malattie tra cui le malattie cardiovascolari, le malattie legate al fegato come la NAFLD e anche alcuni tipi di cancro.

È interessante notare che recenti studi hanno suggerito come la disbiosi intestina-

le possa contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi (5). Infatti, mediante l'analisi del genoma intestinale in pazienti con o senza aterosclerosi sintomatica, gli scienziati hanno scoperto che i pazienti con aterosclerosi avevano una differenza, sia nel tipo sia nella quantità di batteri intestinali rispetto ai controlli sani. Inoltre, è stato dimostrato che *Akkermansia muciniphila*, un batterio presente nel tubo digerente umano per il 3-5% della flora intestinale, esercita effetti protettivi contro l'aterosclerosi (6) e che i pazienti obesi hanno una percentuale di questo batterio minore rispetto ai soggetti sani. Questi dati, quindi, sembrano dimostrare che il microbiota intestinale possa giocare un ruolo importante nella progressione del processo aterosclerotico mediante la modulazione dell'infiammazione e la produzione di metaboliti microbici.

A supporto del ruolo del microbiota intestinale nella malattia aterosclerotica, è stata la scoperta che le placche aterosclerotiche contengono DNA batterico e che i taxa batterici osservati nelle placche aterosclerotiche erano presenti anche nell'intestino degli stessi individui. Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che le comunità microbiche, in questi siti, possano essere una fonte di batteri nella placca e che possano interferire sulla stabilità della placca e sullo sviluppo della malattia cardiovascolare. Il sequenziamento metagenomico del microbiota delle feci ha rivelato, inoltre, che la composizione microbica è alterata nei pazienti con placche instabili rispetto a quelle stabili. In particolare, la placca instabile è associata a livelli fecali ridotti del genere *Roseburium*, un batterio in grado di produrre peptidoglicani, molecole pro-infiammatorie e una ridotta capacità di produrre molecole antinfiammatorie (5). Il microbioma intestinale dei pazienti aterosclerotici può quindi favorire l'infiam-

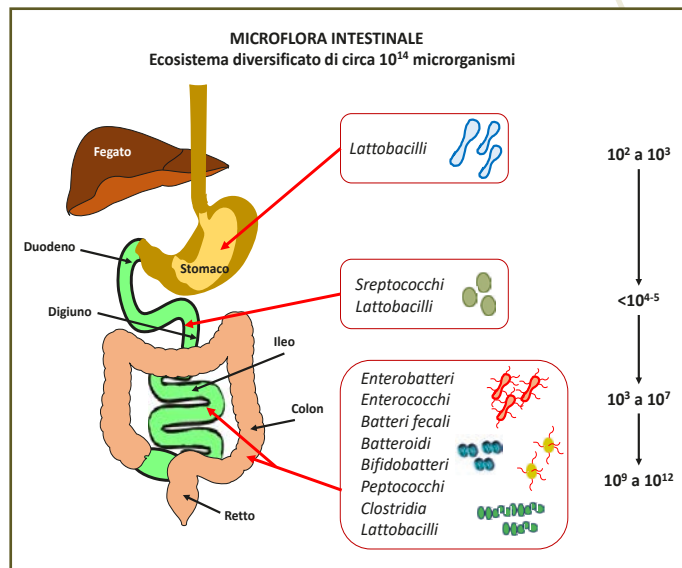


Figura 1 - Biodiversità del microbiota intestinale, caratterizzato da una comunità microbica di circa 10^{14} microrganismi, che colonizza il tratto gastrointestinale dell'ospite, specialmente nella porzione distale, cioè nel colon.

mazione producendo più molecole pro-infiammatorie.

Nei ratti è stato riportato un legame meccanicistico tra il microbiota intestinale e la gravità dell'infarto del miocardio. È stato dimostrato, infatti sui modelli di roditori, che la somministrazione di *Lactobacillus plantarum* si associa ad una significativa riduzione delle dimensioni dell'infarto e al miglioramento della funzione ventricolare sinistra dopo infarto del miocardio. Un altro studio su modello animale ha mostrato che la somministrazione del *Lactobacillus rhamnosus* ha attenuato l'ipertrofia ventricolare sinistra e l'insufficienza cardiaca dopo infarto miocardico sperimentale. Questi studi dimostrano, quindi, una stretta correlazione tra i componenti del microbiota intestinale e l'infarto del miocardio.

Nonostante sia ormai evidente un'associazione tra il microbiota e l'aterosclerosi, non è chiaro come i batteri che risiedono a

livello intestinale possano contribuire alla progressione della malattia. In particolare, ancora non è del tutto chiarito se sono i batteri per se a contribuire al processo aterosclerotico oppure sono i prodotti da essi derivanti. Infatti, è stato dimostrato che topi privi di specifici batteri intestinali sviluppano più placche aterosclerotiche rispetto ai topi di controllo, suggerendo un effetto protettivo dei batteri commensali. Però, oltre all'invasione diretta, il microbiota può generare risposte mediante altri prodotti di loro derivazione che possono generare una risposta immunitaria forte e contribuire così allo sviluppo dell'aterosclerosi.

Come difesa di prima linea dell'ospite contro i patogeni, la risposta immunitaria innata si basa su una famiglia di recettori come i recettori Toll-like (TLR) e i recettori simili a domini di oligomerizzazione (NOD-like) legati al nucleotide. Tra questi, i TLR sono recettori dell'immunità innata con un ruolo chiave nel combattere alcuni prodotti derivanti dai batteri intestinali quali i lipopolisaccaridi. È stato dimostrato, infatti, che la carenza di TLR2 o TLR4 riduce l'accumulo di lipidi a livello aortico e previene aumenti della IL-1 α e della proteina chemiotattica dei monociti. Inoltre, la mancanza del TLR4 o della sua proteina adattatrice Myd88 riduce la progressione della placca aterosclerotica nei topi ApoE^{-/-}.

Meccanismi di atero-trombosi

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica che coinvolge numerosi processi immunologici, e rappresenta la causa più frequentemente associata alla manifestazione di sindromi coronariche acute (ACS) che comprendono la malattia coronarica instabile (angina instabile) e infarto miocardico acuto (AMI) che a sua volta comprende STEMI e NSTEMI o morte cardiaca improvvisa (SCD).

Il danno all'endotelio vascolare e lo sviluppo di lesioni infiammatorie nella parete del vaso determinano la formazione di coaguli di sangue che portano o al tromboembolismo, che si evolve da placche aterosclerotiche, o alla chiusura del lume dell'arteria nel sito di rottura della placca infiammata, provocando cioè occlusione del vaso trombotico.

L'aterotrombosi si verifica nel corso dell'aterosclerosi; infatti studi pato-fisiologici hanno dimostrato che la causa più comune della formazione di un coagulo di sangue è la rottura del cappuccio fibroso, che separa il contenuto della placca dal sangue. Partendo da queste considerazioni fisiopatologiche, i fattori che determinano la vulnerabilità delle placche e la sua rottura o la sua erosione superficiale, nonché i fattori che determinano la probabilità di trombosi, sono determinanti chiave della capacità di prevenire le manifestazioni letali determinate dall'aterosclerosi.

L'eziologia dell'aterosclerosi è multifattoriale e il trigger può essere o sistemico o determinato da fattori locali che inducono il deterioramento della funzione vascolare. L'ipercolesterolemia, e soprattutto elevate concentrazioni plasmatiche di lipoproteine a bassa densità (LDL), rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza prematura dell'aterosclerosi e della cardiopatia ischemica (7). Nelle regioni della parete vascolare che sono predisposte a lesioni aterosclerotiche, con aumento della permeabilità, l'ipercolesterolemia è associata ad un aumento della transitosi delle LDL attraverso l'endotelio vascolare. Questo porta ad un accumulo di LDL nello spazio subendoteliale, dove l'interazione con proteine che stimolano la loro modificazione come aggregazione, glicosilazione, proteolisi enzimatica e ossidazione, ne aumenta l'aterogenicità e la ritenzione nell'intima vascolare.

Una caratteristica importante durante lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche è l'infiltrazione di monociti circolanti nello spazio intravascolare. Le particelle di LDL, in particolare le forme modificate, aumentano l'espressione e la secrezione di composti chemiotattici solubili come ad esempio la proteina chemioattrattante i monociti-1 (MCP-1) e l'interleuchina (IL) 8 e favoriscono l'espressione di molecole di adesione come integrine e selectine che, esposte sulla superficie delle cellule endoteliali attivate, favoriscono il reclutamento, l'adesione e la tras migrazione dei leucociti (monociti e cellule T). I monociti infiltrati si differenziano in macrofagi ed esprimono recettori scavenger come CD36 e LOX-1, grazie ai quali internalizzano molte delle molecole di colesterolo e gli esteri di colesterolo contenuti nelle particelle di LDL modificate. L'internalizzazione del colesterolo porta alla formazione di cellule schiumose, un elemento cellulare caratteristico delle lesioni aterosclerotiche. A loro volta, le cellule schiumose secernono citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e metalloproteinasi (MMPs) e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che mantengono lo stimolo chemiotattico per i leucociti, aumentano l'espressione dei recettori scavenger, e regolano l'accumulo di cellule muscolari lisce (SMC) nell'intima. Le SMC svolgono un ruolo chiave sia nella fase di inizio che nelle fasi di progressione e complicazione delle lesioni aterosclerotiche. Le SMC sono caratterizzate dalla loro elevata plasticità con un fenotipo contrattile non proliferativo, tipico delle arterie sane. Sotto gli effetti degli stimoli aterogenici, le SMC si trasformano in cellule attivamente proliferative, migrano attratte da agenti chemiotattici e hanno una maggiore sintesi di matrice extracellulare (8).

Infine, le modificazioni ossidative a carico delle LDL influenzano la funzione del-

le piastrine. Il legame tra particelle di LDL ossidate e recettori specifici come CD36, SR-B1 e LOX-1 espressi sulla membrana piastrinica induce l'attivazione, i cambiamenti morfologici e l'aggregazione piastrinica, contribuendo così alla formazione di trombi, in particolare dopo la rottura della placca.

Le piastrine, inoltre, contribuiscono all'attivazione endoteliale e modulano le risposte infiammatorie, favorendo così l'insorgenza e la formazione di lesioni aterosclerotiche e le loro successive complicanze trombotiche (9).

Metaboliti derivanti da microbi intestinali e aterosclerosi

L'epitelio intestinale è la prima barriera che protegge l'ospite dall'invasione di agenti patogeni e dei loro prodotti. Dato il suo ruolo fondamentale nella prevenzione della traslocazione del contenuto intestinale, principalmente dei componenti batterici, l'integrità della barriera intestinale è essenziale per mantenere la salute dell'ospite. Se la barriera epiteliale intestinale è compromessa, l'invasione di prodotti associati ai patogeni determina una risposta immunitaria che provoca un'inflammazone sistemica e specifica del tessuto. Il microbiota intestinale, quindi, può influenzare i processi fisiologici e metabolici dell'ospite attraverso metaboliti bioattivi che possono influenzare gli organi distali direttamente o indirettamente (*Figura 2*). Infatti, il microbiota intestinale interagisce con l'ospite attraverso una serie di vie, tra cui la via della trimetilammina (TMA)/trimetilammina N-ossido (TMAO), la via degli acidi grassi a catena corta (SCFA), la via dell'acido biliare primario e secondario (BA) e i peptidoglicani. Alcune di queste molecole possono interagire funzionalmente con altri ormoni endocrini, tra cui greli-

na, leptina, peptide 1 simile al glucagone (GLP-1) e peptide YY (PYY). A queste molecole si può aggiungere anche il lipopolisaccaride (LPS) che è un prodotto della parete batterica e può innescare numerosi processi di segnalazione cellulare. Sono stati identificati numerosi recettori in grado di riconoscere questi prodotti derivanti dai batteri intestinali. Tra questi, i recettori Toll-like (TLR) che sono in grado di legare le LPS e i recettori simili al dominio di oligomerizzazione nucleotidica NOD (NLR) in grado di legare i peptidoglicani (10).

TMAO e aterosclerosi

La fosfatidilcolina derivante dalla dieta o la L-carnitina vengono metabolizzate nell'intestino dal microbiota intestinale in trimetilammina (TMA). La TMA è un precursore della trimetilammina-N-ossido (TMAO), che è trasportato nel fegato e ossidato dalla flavina monoossigenasi 3 (FMO3), un membro della famiglia degli enzimi epatici FMO, che porta alla produzione di TMAO. Studi di neutralizzazione di FMO3 nei topi, attraverso un oligonucleotide antisense, hanno mostrato una riduzione dei livelli circolanti di TMAO e un'attenuazione dell'aterosclerosi attraverso l'attivazione del trasporto inverso di colesterolo nei macrofagi.

Per esplorare i potenziali meccanismi con cui il TMAO potrebbe promuovere l'aterosclerosi, studi in cui è stata somministrata colina nella dieta di topi ApoE^{-/-} hanno rivelato livelli elevati di CD36 e SR-A1 nei macrofagi nei topi trattati rispetto ai normali controlli. Tuttavia, nei macrofagi dei topi trattati con colina non è stato osservato alcun impatto significativo del TMAO sulla formazione delle cellule schiumose. Questi dati suggeriscono che il TMAO può accelerare lo sviluppo dell'aterosclerosi inducendo la disfunzione delle cellule endoteliali e aumentando l'adesione

dei monociti all'endotelio. Anche se numerosi dati dimostrano che il TMAO può contribuire allo sviluppo del processo aterosclerotico, ci sono altrettanti studi che mostrano una non associazione. Infatti, in uno studio di coorte non sono emerse evidenze di associazioni significative tra l'assunzione di colina e il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari. Inoltre, in uno studio in cui L-carnitina è stata somministrata ai topi ApoE^{-/-}, nonostante un aumento significativo dei livelli circolanti di TMAO, questi livelli non si associavano in maniera diretta con la dimensione della lesione aortica. Infine, numerosi studi condotti su larga scala da diversi paesi hanno dimostrato che l'assunzione di colina e betaina nella dieta non era associata alla patogenesi della CVD. Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per confermare l'esatto ruolo del TMAO nell'aterosclerosi e quindi poter considerare i batteri o enzimi produttori di TMAO come potenziale terapeutico (11) (*Figura 2*).

Acidi biliari e aterosclerosi

Gli acidi biliari (AB) sono un altro gruppo di metaboliti derivati dal microbiota intestinale coinvolti in varie malattie metaboliche, che vengono immagazzinati nella cistifellea e rilasciati nell'intestino per facilitare l'assorbimento dei lipidi alimentari e delle vitamine liposolubili. Gli AB primari sono sintetizzati dal colesterolo nel fegato e comprendono principalmente acido colico (CA) e acido chenodesossicolico (CDCA). Gli AB primari sono di solito metabolizzati in AB secondari tra cui acido desossicolico (DCA) e acido litocolico (LCA), acido iodesossicolico e acido ursodesossicolico attraverso enzimi derivati dal microbiota intestinale. È noto, infatti, che topi privi di germi presentano livelli elevati di AB primari e assenza di AB secondari nel sistema enteroepatico. Pertanto, esiste una relazione

bidirezionale tra il microbiota intestinale e il metabolismo degli AB. Recentemente il metabolismo degli AB mediato dal microbiota intestinale nelle patologie cardiovascolari è stato molto studiato. Tuttavia, ad oggi, il ruolo degli AB nello sviluppo delle patologie cardiovascolari non è ancora del tutto compreso. È stato osservato che gli AB possono promuovere lo sviluppo dell'aterosclerosi principalmente attraverso i propri recettori. Sono stati identificati numerosi recettori per gli AB come il recettore X farnesoide (FXR), una serie di recettori accoppiati a proteine G e il recettore X della gravidanza (PXR). FXR è un recettore nucleare che regola il metabolismo dei lipidi e del glucosio. Topi ApoE^{-/-} con deficit di FXR alimentati con una dieta grassa mostravano un profilo lipidico peggiorato e un

aumento delle lesioni aterosclerotiche rispetto ai controlli ApoE^{-/-}. Per quanto riguarda il recettore accoppiato con la proteina G, noto anche come TGR5, è un altro importante recettore degli AB. Ricerche recenti hanno indicato che l'attivazione di TGR5 può inibire la formazione di aterosclerosi, un effetto associato a una riduzione dell'infiammazione dei macrofagi e del carico lipidico. Inoltre, l'attivazione di TGR5 contribuisce anche a un maggiore dispendio energetico e a un migliore controllo glicemico. Infine, il recettore X della gravidanza (PXR) è un altro tipo di recettore dell'ormone nucleare che regola l'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi, trasporto e metabolismo degli AB, e può anche essere attivato da AB secondari come LCA. La delezione di PXR attenua lo

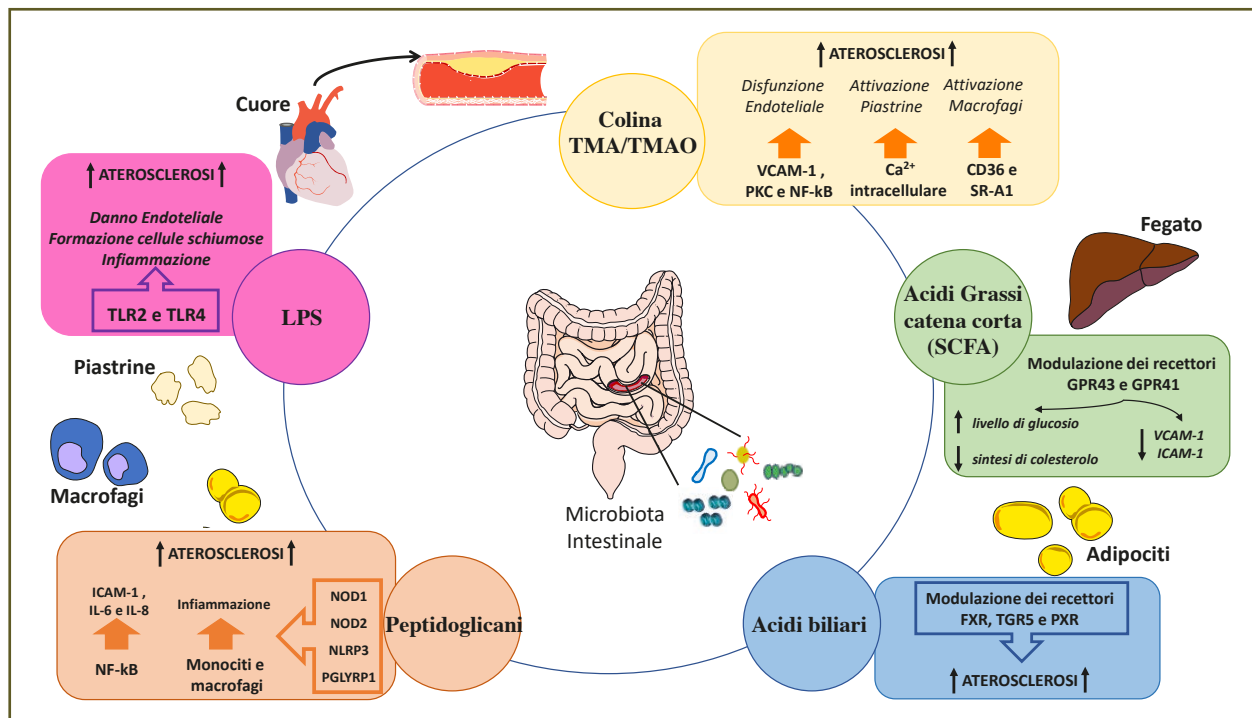


Figura 2 - Microbiota intestinale e possibili segnalazioni molecolari coinvolte nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi. Il microbiota intestinale può influenzare i processi fisiologici e metabolici dell'ospite attraverso metaboliti bioattivi quali trimetilammina-N-ossido (TMAO), acidi grassi a catena corta (SCFA), acidi biliari (AB), peptidoglicani e il lipopolisaccaride (LPS).

sviluppo di aterosclerosi in topi doppi knockout per PXR e ApoE, che possono essere associati alla riduzione dell'espressione di CD36 e dell'assorbimento dei lipidi nei macrofagi. In conclusione, gli AB primari e secondari possono contribuire allo sviluppo dell'aterosclerosi attraverso la modulazione dei propri recettori quali FXR, TGR5 e PXR (*Figura 2*).

SCFA ed aterosclerosi

Gli acidi grassi a catena corta (SCFA), come l'acetato, il propionato e il butirato, sono i principali prodotti finali dalla degradazione microbica di carboidrati e proteine nell'intestino. La maggior parte degli SCFA è assorbita dall'intestino e metabolizzata in vari tessuti del corpo, contribuendo ad alcuni importanti processi fisiologici e incidendo in particolare sul fabbisogno energetico giornaliero. Gli SCFA sono importanti per il metabolismo dell'ospite e sono utilizzati come substrati per la produzione di energia, lipogenesi, gluconeogenesi e sintesi del colesterolo. Oltre ad essere substrati metabolici, gli SCFA agiscono come molecole di segnalazione, in particolare attraverso i recettori accoppiati alla proteina G, quali GPR43/FFAR2 e GPR41/FFAR3. L'attivazione di GPR43 sulle cellule L'augmenta la secrezione di peptide-1 simile al glucagone (GLP-1), mentre l'acetato induce, sempre attraverso questo GPR43, un'attività anti-lipolitica e migliora il metabolismo del glucosio e dei lipidi. Per quanto riguarda il recettore GRP41, studi hanno dimostrato che è in grado di regolare il metabolismo attraverso l'interazione con il microbiota intestinale. I topi knockout per il recettore GPR41 sono più magri e pesano meno dei topi wild-type. Inoltre, alcuni studi clinici hanno anche evidenziato effetti benefici degli SCFA sul peso corporeo. In particolare, è stato osservato che l'ingestione di

un precursore del propionato è in grado di aumentare i livelli plasmatici postprandiali di PYY e GLP-1 riducendo così la quantità di calorie assorbite. Al contrario, il trattamento a lungo termine con questo precursore provoca una riduzione dell'aumento di peso.

Infine, è stato osservato che il propionato riduce l'espressione di alcune molecole di adesione delle cellule endoteliali come VCAM-1 e ICAM-1 nelle cellule endoteliali mediante l'inibizione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B). Inoltre il propionato è in grado di ridurre il livello di glucosio nel sangue e inibire la sintesi di colesterolo negli epatociti. In conclusione, questi studi suggeriscono che gli SFCA hanno un impatto favorevole sulla salute umana, regolando/modulando soprattutto il metabolismo lipidico (*Figura 2*).

Peptidoglicani ed aterosclerosi

Il peptidoglicano (PG, chiamato anche mureina) è un componente unico ed essenziale della parete cellulare dei batteri Gram-negativi ma è anche un componente della parete dei batteri Gram-positivi. Il PG è presente abbondantemente nella normale flora intestinale umana e in altre mucose ma in siti anatomici differenti favorisce l'infiammazione attraverso l'attivazione del recettore Toll-like 2 (TLR2). Inoltre, il PG è riconosciuto da altri recettori, tra cui la proteina 1 contenente dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (NOD1), NOD2, la proteina 3 contenente domini NACHT, LRR e PYD (NLRP3) e la proteina 1 di riconoscimento del peptidoglicano (PGLYRP1). L'attivazione di queste cascate di segnalazione innesca una risposta infiammatoria nelle cellule immunitarie e non immunitarie in tutto l'organismo (12).

Usando la metodica del sequenziamento metagenomico, è stato scoperto che i

pazienti con placche aterosclerotiche sintomatiche avevano un arricchimento di geni che codificavano la sintesi di PG rispetto ai controlli in assenza di placche vulnerabili nelle arterie carotidi. Questo dato suggerisce che l'aumento della produzione di PG da parte del metagenoma intestinale può contribuire all'aterosclerosi sintomatica innescando la risposta del sistema immunitario innato e favorendo la funzione dei neutrofili (5).

Conferme del ruolo del PG nell'induzione della reazione infiammatoria e nella progressione del processo aterosclerotico sono derivate anche da esperimenti *in vitro* condotti su diversi tipi cellulari. La stimolazione di cellule umane endoteliali dell'arteria coronaria (CAEC) con il PG induce l'attivazione di NF-kB e l'espressione di mediatori solubili quali ICAM-1, IL-6 e IL-8 (13,14). Inoltre, l'espressione dei mediatori infiammatori è risultata significativamente aumentata nelle cellule di pazienti diabetici, suggerendo che le CAEC in soggetti diabetici adottino un fenotipo iper-infiammatorio e che questo cambiamento fenotipico endoteliale possa predisporre l'arteria coronarica all'aterogenesi (14).

Infine, la stimolazione con il PG favorisce una maggiore attivazione dei monociti, aumentando così la possibilità che questi siano in grado di aderire alle cellule endoteliali attivate che rivestono la parete del vaso nei siti di infiammazione (15) (*Figura 2*).

LPS ed aterosclerosi

I lipopolisaccaridi (LPS), noti anche come endotossine, sono composti strutturali caratteristici della membrana esterna dei batteri Gram-negativi. L'LPS induce infiammazione attraverso l'attivazione del suo recettore, il TLR4, che si esprime su cellule immunitarie come i macrofagi e su molti altri tipi di cellule tra cui epatociti,

adipociti e piastrine. L'epitelio intestinale funge da barriera per prevenire la traslocazione di fattori di origine batterica. Tuttavia, condizioni quali l'aumento di peso, una dieta ricca di grassi (16) e l'aumento dell'esposizione agli acidi grassi (17, 18) interrompono la funzione di barriera intestinale consentendo la traslocazione di LPS (19, 20). Ciò si traduce in livelli moderatamente aumentati di LPS nel sangue che è una condizione definita come endotossinemia metabolica (19). Questo fenomeno si verifica, inoltre, in condizioni quali diabete di tipo II, obesità e ipertensione, situazioni in cui i livelli circolanti di LPS possono risultare elevati e che sono associate allo sviluppo di aterosclerosi. Infatti, è stato dimostrato che l'LPS è in grado di promuovere l'aterosclerosi sia in modelli sperimentali animali che nell'uomo. Ad esempio, conigli ipercolesterolemici trattati con iniezioni endovenose ripetute di endotossina (lipopolisaccaride di *Escherichia coli* da 1,25 a 2,5 µg) hanno mostrato un'aterosclerosi significativamente accelerata, come evidenziato dall'aumentata area della lesione aortica e dal volume della lesione, rispetto agli animali di controllo (21). Topi knockout per il TLR4 o per il MyD88, l'adattatore canonico a valle della segnalazione del TLR4 (22), hanno dimostrato una ridotta aterosclerosi dell'aorta, associata a una riduzione dei livelli circolanti di citochine proinfiammatorie come IL-12 o MCP1, a una riduzione del contenuto lipidico della placca e del numero di macrofagi (23).

Nell'uomo, i biomarcatori d'infiammazione sistemica, come molecole solubili di adesione, e i livelli di endotossina batterica circolante sono significativamente aumentati nei soggetti con infezioni croniche e sono predittivi di un aumentato rischio di aterosclerosi (24). Alcuni studi hanno invece valutato l'impatto delle varianti genetiche del TLR4 che conferiscono differenze

nella risposta infiammatoria provocata dall'LPS e che sono correlate allo sviluppo dell'aterosclerosi. Ad esempio, le mutazioni che nell'uomo interessano il dominio extracellulare del recettore TLR4 sono associate a una riduzione della reattività all'LPS (25). In un secondo studio è stato dimostrato che soggetti portatori di un polimorfismo del TLR4 in grado di attenuare la segnalazione del recettore e diminuire la risposta infiammatoria ai patogeni gram-negativi hanno un minor rischio di aterosclerosi carotidea e uno spessore medio-intimale più piccolo nell'arteria carotide comune (26).

Infine, l'analisi di campioni di arterie carotidiche di pazienti sottoposti a endoarteriectomia ha evidenziato che l'LPS di *Escherichia Coli* si localizza nella placca e che può contribuire al danno aterosclerotico attraverso un meccanismo mediato dal

TLR4 che coinvolge lo stress ossidativo (27). (Figura 2).

Terapia mirata al microbiota

Considerato i numerosi effetti sulla salute umana, il microbiota e i metaboliti correlati sono diventati potenziali obiettivi terapeutici, guadagnando gradualmente molta attenzione (Figura 3).

Gli effetti delle terapie mirate al microbiota, che alterano la composizione della comunità microbica, variano dall'eliminazione di singoli ceppi di una singola specie (ad esempio, con vaccini antibatterici coniugati) alla sostituzione dell'intera comunità con un nuovo microbiota intatto (ad esempio, dal trapianto fecale).

Di seguito sono riportate alcune strategie che agiscono modulando il microbiota e i suoi effetti.

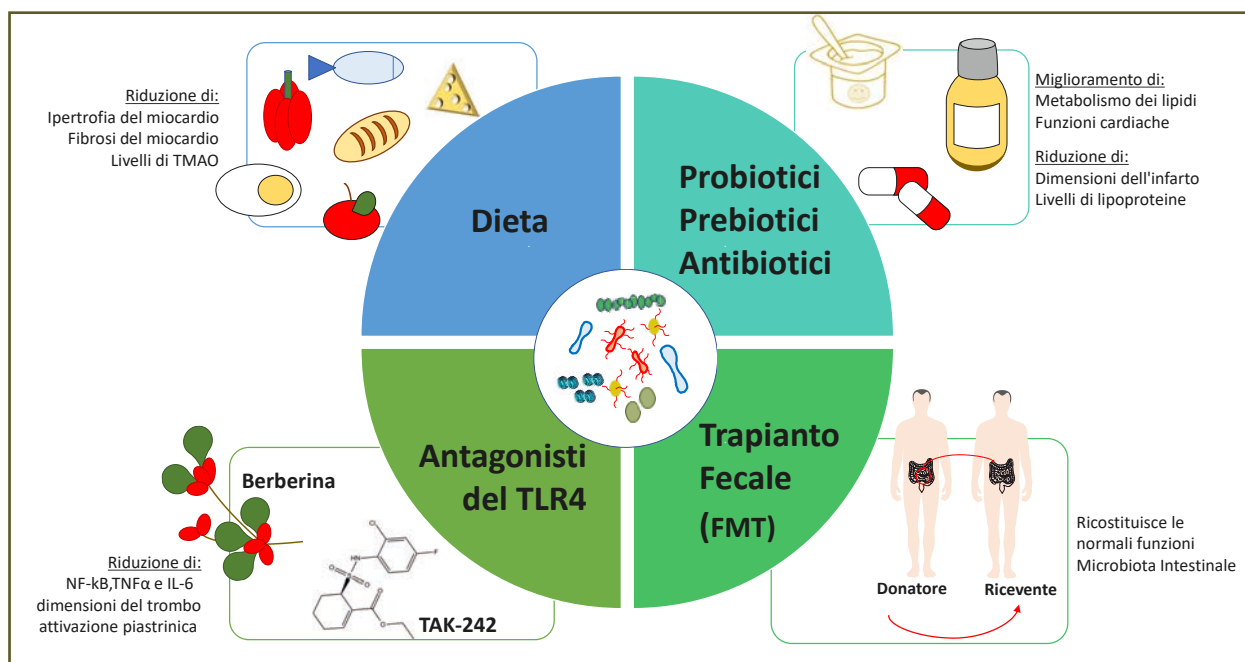


Figura 3 - Attuali strategie terapeutiche capaci di modulare il microbiota e i loro effetti sulle patologie cardiovascolari: intervento dietetico (1), utilizzo di antibiotici, prebiotici e probiotici (2), trapianto fecale (3) e antagonisti del Toll-like receptors 4 (TLR4) (4).

Dieta

La modulazione del microbiota intestinale attraverso l'intervento dietetico è un potente approccio per la prevenzione e la terapia delle patologie cardiovascolari. Ad esempio, nei topi nutriti con una dieta ricca di fibre si osserva un aumento di batteri intestinali che producono acetato, riducendo significativamente l'ipertrofia e la fibrosi del miocardio (28). Nell'uomo, un maggiore consumo di fibre è associato a un minor rischio di malattie coronariche (29). Inoltre, un intervento con la dieta mediterranea riduce i livelli di TMAO, che di conseguenza possono prevenire conseguenze cardiovascolari e scompenso cardiaco (30, 31).

Probiotici, Prebiotici e Antibiotici

I probiotici sono microrganismi vivi somministrati per ristabilire un equilibrio ecologico intestinale. Al contrario, i prebiotici sono entità non microbiche e non digeribili coinvolte nella modulazione della comunità microbica.

Alcune evidenze suggeriscono che tali integratori possono essere avere un effetto cardioprotettivo.

Ad esempio, la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 ha ridotto le dimensioni dell'infarto e ha migliorato le funzioni cardiache (32). In uno studio pilota randomizzato controllato la somministrazione di *Saccharomyces boulardii* ha avuto benefici nei pazienti con scompenso cardiaco come indicato da una migliore frazione di eiezione ventricolare sinistra (33). Altri probiotici comuni includono *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (34).

L'integrazione con inulina, un prebiotico, ha ridotto significativamente le lesioni aterosclerotiche in topi ApoE^{-/-} (35). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che i probiotici e i prebiotici possono modificare beneficamente il metabolismo dei lipidi (36, 37).

Interventi con antibiotici, ad esempio l'ampicillina, riducono fattori di rischio aterosclerotici, come i livelli di lipoproteine (38). Sebbene diversi risultati suggeriscano che i prebiotici, probiotici e antibiotici siano interventi efficaci nella modulazione della funzione dei microbi colonizzatori associati con malattie cardiovascolari e malattie, ulteriori indagini sono necessarie soprattutto per ridurre i possibili effetti collaterali.

Trapianto di microbiota fecale

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è un possibile intervento terapeutico in grado di modulare gli agenti patogeni intestinali attraverso il trasferimento di batteri funzionali da soggetti sani nel tratto gastrointestinale dei pazienti, ricostituendo di conseguenza le normali funzioni del microbiota intestinale (39).

In uno studio pilota controllato randomizzato in doppio cieco, la composizione del microbiota intestinale nei pazienti con sindrome metabolica è cambiato in modo significativo dopo trapianto di microbiota fecale da donatore vegano. Tuttavia, non ci sono stati cambiamenti nei livelli del metabolita TMAO. Ad oggi, la FMT rimane una terapia promettente per le malattie cardiovascolari, ma necessita di ulteriori studi. Infatti, la limitazione di quest'approccio è che endotossine o agenti infettivi potrebbero comunque essere trasferiti, portando così a nuove complicanze. Pertanto, il potenziale del trapianto fecale per il trattamento delle malattie cardiovascolari richiede ulteriori indagini per ridurre il rischio di effetti avversi e per migliorare l'efficienza della sua applicazione.

Antagonisti del TLR4

Oltre a poter agire direttamente sul microbiota intestinale modificandone la composizione e mitigandone gli effetti negativi, è possibile anche utilizzare un altro approc-

cio che si basa sulla modulazione della risposta infiammatoria legata all'attivazione del TLR4 da parte dell'LPS.

Gli antagonisti del TLR4 possono derivare sia da fonti naturali sia da fonti sintetiche.

Tra i derivati naturali la berberina, un alcaloide isochinolina estratto principalmente da *Rhizoma Coptidis*, può legarsi a MD-2 che è in grado di legare fino a tre molecole di berberina. Inoltre, la berberina blocca anche la trasduzione del segnale del

TLR4 sopprimendo NF- κ B. Un altro derivato naturale è il partenolide, un lattone sesquiterpenico che blocca la segnalazione del TLR4, inibisce il pathway di NF- κ B e inibisce l'espressione del TLR4 dopo stimolazione delle cellule con LPS.

Tra i derivati sintetici, il TAK-242 (Resatorvid) è un derivato del cicloesene. È una piccola molecola con una specifica e selettiva funzione inibitoria della segnalazione del TLR4 (40). Infatti, TAK-242 inibisce la produzione di mediatori infiammatori, indotti da LPS, legandosi al dominio intracellulare del TLR4. Studi preclinici hanno dimostrato una promettente efficacia di TAK-242 in modelli cellulari e animali. Ad esempio, è stato scoperto che TAK-242 riduce citochine infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa) e l'interleuchina-6 (IL-6) in macrofagi di topo stimolati con LPS con valori IC50 di 1,9 e 1,3 nM, rispettivamente. Inoltre, TAK-242 mostra marcati effetti benefici in modelli sperimentali. Infatti, la somministrazione endovenosa di una dose di 0,1 mg/kg o più sopprimeva la produzione di varie citochine (TNF-alfa, IL-6 e IL-1 β) in un modello murino di shock endotossico. Inoltre, proteggeva i topi dalla morte in modo dose-dipendente e tutti i topi sopravvivevano alla dose di 3 mg/kg. Infine, la somministrazione di TAK-242 in un modello sperimentale di trombosi, riduce in maniera significativa le dimensioni del trombo e l'attivazione piastrinica.

Numerose altre prove sono presenti in letteratura a conferma dell'efficacia del TAK-242 in diversi contesti patologici associati all'infiammazione.

Conclusioni

La relazione tra microbiota, ospite e predisposizione all'insorgenza di malattie rappresenta, sicuramente, un abito della ricerca scientifica ampio e non ancora del

Glossario

CD36: Cluster of Differentiation 36. CD36 è una glicoproteina di membrana espressa su piastrine, monociti e cellule endoteliali.

FFAR2/ FFAR3: Free fatty acid receptors 2 and 3. Sono recettori accoppiati a proteine G (GPCR) espressi abbondantemente sulle cellule intestinali e regolano varie funzioni fisiologiche e cellulari.

GLP1: glucagon-like peptide 1. È un ormone peptidico di 30 aminoacidi prodotto nelle cellule L epiteliali endocrine intestinali mediante elaborazione differenziale del pro-glucagone.

LOX1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1. LOX-1 è una proteina di membrana appartenente alla famiglia delle lectine di tipo C.

MMPs: Matrix metalloproteinases. Sono una famiglia di endopeptidasi Ca²⁺ e Zn²⁺ dipendenti che processano vari componenti della matrice extracellulare.

NOD-like receptors (NLR): Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors. Sono recettori per il riconoscimento di pattern molecolari e sono simili ai Toll-Like receptors (TLR).

SRB1: The scavenger receptor, class B type 1. È una proteina multifunzionale che si trova sulla superficie di una varietà di cellule e che svolge principalmente una funzione anti-infiammatoria e anti-aterosclerotica.

TLRs: Toll-like receptors. Sono una classe di recettori che si localizzano sulla superficie cellulare o nei compartimenti intracellulari come reticolo endoplasmatico, endosoma, lisosoma o endolisosoma.

TMA/TMAO: trimethylamine (TMA)/ trimethylamine N-Oxide. La trimetilammina (TMA) è un metabolita derivato dal microbiota intestinale, formatosi dalla scissione enzimatica di nutrienti contenenti una porzione di TMA nella loro struttura chimica.

Questionario di auto-apprendimento

- | | |
|--|--|
| <p>1) Qual è il recettore a cui si lega l'LPS</p> <ul style="list-style-type: none"> a. CD36 b. TLR4 c. FXR d. PXR <p>2) Quale tra questi non è un metabolita/ componente del microbiota intestinale</p> <ul style="list-style-type: none"> a. TMAO b. Peptidoglicani c. LPS d. Grelina <p>3) Il TAK-242 è</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Un derivato sintetico che inibisce il TLR4 b. Un derivato naturale che inibisce il TLR4 c. Un peptide che inibisce il CD36 d. Un inibitore degli acidi biliari | <p>4) La flavina monoossigenasi 3 ossida</p> <ul style="list-style-type: none"> a. La trimetilammina b. La fosfatidilcolina c. L-carnitina d. Propionato <p>5) Quale tra le seguenti opzioni non è un trattamento per modulare la disbiosi</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Dieta b. Probiotici c. Antibiotici d. Antinfiammatori |
|--|--|

Risposte corrette:
1B, 2D, 3A, 4A, 5D

tutto esplorato soprattutto nella patologia aterosclerotica. Pertanto, la sfida scientifica, che sicuramente potrà aprire in un futuro prossimo nuovi scenari, è quella di caratterizzare ulteriormente il microbiota e i suoi derivati, studiandone il loro impatto

sulla fisiologia dell'ospite. Nuovi interventi terapeutici mirati a contrastare questo fenomeno possono, quindi, contribuire a migliorare il decorso e la progressione della patologia aterosclerotica in pazienti affetti da malattie cardiovascolari.

RIASSUNTO

Il corpo umano ospita trilioni di microrganismi che formano un ecosistema interattivo all'interno e all'esterno dell'organismo. La maggior parte del microbiota che colonizza il corpo umano si trova nel tratto gastrointestinale, specialmente nel colon. Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nel mantenimento della nutrizione e del sistema immunitario, che a sua volta influenza la suscettibilità dell'ospite e la risposta a determinate condizioni patologiche. Lo squilibrio nel microbiota intestinale, noto anche come disbiosi intestinale, è associato a diverse condizioni patologiche tra cui disturbi gastrointestinali, asma, allergie, disturbi del sistema nervoso centrale, tumori e malattie cardiovascolari. Le malattie cardiovascolari sono una delle principali cause di morte in tutto il mondo. L'aterosclerosi è il meccanismo fisiopatologico chiave alla base dello sviluppo delle malattie cardiovascolari e il microbioma intestinale influenza tutti i fattori di rischio componenti dell'aterosclerosi, sia direttamente che indirettamente, svolgendo così un ruolo importante, sebbene poco compreso, nelle malattie cardiovascolari. In questa rassegna, delineiamo il ruolo del microbiota intestinale nelle malattie cardiovascolari ed in particolar modo nel processo aterosclerotico e affrontiamo i potenziali interventi terapeutici per modulare una eventuale disbiosi.

Parole chiave: *Microbiota intestinale, Aterosclerosi, Patologia cardiovascolare, Disbiosi intestinale.*

Bibliografia

- Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59: 143-151.
- Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of Macrophage Foam Cell Formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1998; 177: 725-729.
- Calandrini C, Ribeiro A, Gonnelli A, et al. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis.* 2014; 20: e128-134.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464: 59-65.
- Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012; 3: 1245.
- Hayashi C, Madrigal AG, Liu X, et al. Pathogen-Mediated Inflammatory Atherosclerosis Is Mediated in Part via Toll-Like Receptor 2-Induced Inflammatory Responses. *J Innate Immun.* 2010; 2: 334-343.
- Yusuf S, Reddy S, Ôunpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation.* 2001; 104: 2746-2753.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Rev Española Cardiol.* 2009; 62: 1161-1178.
- Daub K, Seizer P, Stellos K, et al. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 146-156.
- Ma J, Li H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1082.
- Li DY, Tang WHW. Gut Microbiota and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017; 19: 1-12.
- Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18: 243-254.
- Xie Y, Li Y, Cai X, Wang X, Li J. Interleukin-37 suppresses ICAM-1 expression in parallel with NF-κB down-regulation following TLR2 activation of human coronary artery endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2016; 38: 26-30.
- Li J, Jin C, Cleveland JC, et al. Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type 1 diabetic coronary artery endothelial cells: The effect of insulin. *Cardiovasc Diabetol.* 2010; 9.
- Nijhuis MMO, Pasterkamp G, Sluis NI, et al. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *J Vasc Res.* 2007; 44: 214-22.
- Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 1286-1292.
- Velasquez OR, Henninger K, Fowler M, et al. Oleic acid-induced mucosal injury in developing piglet intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 1993; 264.
- Levels JHM, Abraham PR, Van den Ende A, Van Deventer SJH. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun.* 2001; 69: 2821-2828.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007; 56: 1761-1772.
- Pirlich M, Norman K, Lochs H, Bauditz J. Role of intestinal function in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006; 9: 603-606.
- Lehr HA, Sagban TA, Ihling C, et al. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation.* 2001; 104: 914-920.
- Deguine J, Barton GM. MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014; 6.
- Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10679-10684.
- Kiechl S, Egger G, Mayr M, et al. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: Prospective results from a large population study. *Circulation.* 2001; 103: 1064-1070.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187-191.
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med.* 2002; 347: 185-192.
- Carnevale R, Nocella C, Petrozza V, et al. Localization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* into human atherosclerotic plaque. *Sci Rep.* 2018; 8.
- Marques FZ, Nelson E, Chu PY, et al. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation.* 2017; 135: 964-977.
- Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CEL, et al. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2013; 347.

30. Papadaki A, Martínez-González MÁ, Alonso-Gómez A, et al. Mediterranean diet and risk of heart failure: results from the PREDIMED randomized controlled trial. *Eur J Heart Fail.* 2017; 19: 1179-1185.
31. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med.* 2018; 378.
32. Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ Hear Fail.* 2014; 7: 491-499.
33. Costanza AC, Moscovitch SD, Faria Neto HCC, Mesquita ET. Probiotic therapy with *Saccharomyces boulardii* for heart failure patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Int J Cardiol.* 2015; 179: 348-350.
34. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 2017; 9.
35. Jin M, Qian Z, Yin J, et al. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.* 2019; 23: 2343-2350.
36. Korcz E, Kerényi Z, Varga L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food Funct.* 2018; 9: 3057-3068.
37. Lew LC, Choi SB, Khoo BY, Sreenivasan S, Ong KL, Liong MT. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol via phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMG-CoA reductase. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2018; 38: 350-361.
38. Rune I, Rolin B, Larsen C, et al. Modulating the gut microbiota improves glucose tolerance, lipoprotein profile and atherosclerotic plaque development in ApoE-deficient mice. *PLoS One.* 2016; 11.
39. Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, et al. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 7186-7202.
40. Kawamoto T, Ii M, Kitazaki T, et al. TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol.* 2008; 584: 40-48.