

R U 2 7 6 3 3 1 1 C 2



(19) RU (11) 2 763 311⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 9/14 (2021.08); A61K 9/20 (2021.08); A61K 9/48 (2021.08); A61K 35/747 (2021.08); A61P 37/00 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019121145, 12.01.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.01.2018

Дата регистрации:
28.12.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.01.2017 GB 1700542.2;
19.06.2017 GB 1709731.2

(43) Дата публикации заявки: 12.02.2021 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 28.12.2021 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.08.2019

(86) Заявка РСТ:
EP 2018/050789 (12.01.2018)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/130667 (19.07.2018)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, БОКС-1125

(54) ПРОБИОТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к применению штамма *Lactobacillus* 8700:2 (DSM 13434) для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта, также относится к применению штамма *Lactobacillus Plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта и также относится к

(72) Автор(ы):
АГАРД, Даниэль (SE),
ЛАЗУ АРЕН, Ирина (SE),
ЛАРССОН, Ларс Никлас (SE)

(73) Патентообладатель(и):
ПРОБИ АБ (SE)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007108763 A1, 27.09.2007. Shahram Lavasani et al., A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells / PLOS One, 2010, Vol. 5, N.2, pp.1-10, стр.4 столбец справа строки 26-30. US 2011293644 A1, 01.12.2011. Minyu Song et al., Characterization of (см. прод.)

R U 2 7 6 3 3 1 1 C 2

примениению штамма *Lactobacillus paracasei* 8700:2 (DSM 13434) в сочетании со штаммом *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта. Группа изобретений обеспечивает альтернативные пробиотические штаммы для лечения и/или профилактики аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для лечения и/или профилактики целиакии (CD). 3 н. и 9 з.п. ф-лы, 2 ил., 27 табл.

(56) (продолжение):

selected lactobacillus strains for use as probiotics/ Korean J Food Sci Anim Resour, 2015, Vol.35, N.4, pp.551-556.

R U 2 7 6 3 3 1 1 C 2

R U 2 7 6 3 3 1 1 C 2

R U
2 7 6 3 3 1 1
C 2
1 1 3 3 3 2 7

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU (11)

2 763 311⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 9/14 (2021.08); *A61K 9/20* (2021.08); *A61K 9/48* (2021.08); *A61K 35/747* (2021.08); *A61P 37/00* (2021.08)

(21)(22) Application: 2019121145, 12.01.2018

(24) Effective date for property rights:
12.01.2018

Registration date:
28.12.2021

Priority:

(30) Convention priority:
12.01.2017 GB 1700542.2;
19.06.2017 GB 1709731.2

(43) Application published: 12.02.2021 Bull. № 5

(45) Date of publication: 28.12.2021 Bull. № 1

(85) Commencement of national phase: 12.08.2019

(86) PCT application:
EP 2018/050789 (12.01.2018)

(87) PCT publication:
WO 2018/130667 (19.07.2018)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOKS-1125

(72) Inventor(s):

AGARD, Daniel (SE),
LAZU AREN, Irini (SE),
LARSSON, Lars Niklas (SE)

(73) Proprietor(s):

PROBI AB (SE)

R U
2 7 6 3 3 1 1
C 2

(54) PROBIOTIC COMPOSITIONS AND THEIR APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to the field of medicine, namely to the application of *Lactobacillus* 8700:2 (DSM 13434) strain for the prevention and/or treatment of celiac disease autoimmunity (CDA) or for the prevention and/or treatment of celiac disease (CD) in a subject, it also relates to the application of *Lactobacillus Plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) strain for the prevention and/or treatment of celiac disease autoimmunity (CDA) or for the prevention and/or treatment of celiac disease (CD) in a subject, and it also relates to the application of

Lactobacillus paracasei 8700:2 (DSM 13434) strain in a combination with *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) strain for the prevention and/or treatment of celiac disease autoimmunity (CDA) or for the prevention and/or treatment of celiac disease (CD) in a subject.

EFFECT: group of inventions provides alternative probiotic strains for the treatment and/or prevention of celiac disease autoimmunity (CDA) or for the treatment and/or prevention of celiac disease (CD).

12 cl, 2 dwg, 27 tbl

Данное изобретение относится, по меньшей мере, к одному пробиотическому штамму вида *Lactobacillus* для применения в профилактике и/или лечении у субъекта аутоиммунитета при целиакии (CDA - celiac disease autoimmunity) или целиакии (CD - celiac disease).

5 Данное изобретение также предлагает композиции для таких применений и способов предотвращения и/или лечения CDA и/или CD, включающие введение эффективного количества указанного пробиотического штамма субъекту.

Вступление

10 Целиакия (CD) - это хроническое иммуноопосредованное заболевание, поражающее слизистую оболочку тонкого кишечника. Это вызвано непереносимостью глютена, основного запасного белка, который содержится в пшенице, ржи и ячмене (Schuppan D, et al. *Gastroenterology*. 2009; 137 (6): 1912-33). Классические симптомы и клинические признаки целиакии включают дискомфорт в животе, вздутие живота и диарею, за которыми следуют признаки недоедания (например, потеря веса, анемия и остеопороз).

15 Тем не менее, значительная часть пациентов не имеет симптомов и диагностируется с помощью скрининга (Ludvigsson JF, et al. *Journal of Internal Medicine*. 2011; 269 (6): 560-71). В настоящее время лечение состоит из пожизненной безглютеновой диеты (GFD - gluten free diet).

20 Патофизиология CD не совсем понятна, но предполагается, что она управляетя T-клетками. После переваривания белков глютена в тонкой кишке полученные пептиды глиадина каким-то образом пересекают эпителиальный барьер и презентируются антиген-презентирующими клетками на структурах МНС-П, обеспечивая активацию глиадин-специфических CD4+ T-хелперных (T_H) 1 клеток и CD8+ цитотоксических T (T_C) клеток в собственной пластинке слизистой оболочки. Это приводит к повышению 25 уровня ряда цитокинов, в частности IFN- γ , TNF- α и IL-21, из которых первые два вызывают типичное ремоделирование слизистой оболочки и атрофию ворсин посредством активации миелофибробластов, в то время как последний, вероятно, 30 участвует в поддержании активности CD4+ клеток (Schuppan D, et al., выше). В последнее десятилетие было показано, что прямая стимуляция глиадинами врожденной иммунной системы является еще одним важным фактором развития болезни. На современном уровне техники это объясняется повышением уровня ИЛ-15-сигналинга в дендритных клетках и макрофагах, что вызывает повреждение слизистой оболочки посредством 35 активации интрапитиалиальных лимфоцитов (IEL - intra-epithelial lymphocytes) (Londei M, et al., *Molecular Immunology*. 2005; 42 (8): 913-8).

40 Глобальная распространенность CD приблизительно оценивается в 1%, но сильно варьируется между этническими группами и географическим положением. Швеция входит в число наиболее пострадавших стран с предполагаемой распространенностью 1,5-3% (Ludvigsson JF, et al., Выше). Еще предстоит полностью определить, какие процессы способствуют возникновению этой дисфункциональной реакции на структуры глиадина и почему распространенность заболевания варьируется в разных популяциях. Существует четкий генетический компонент CD, о чем свидетельствует тот факт, что почти все больные целиакией являются носителями гаплотипов DR3-DQ2 и/или DR4-DQ8 (Sollid LM, et al. *The Journal of Experimental Medicine*. 1989; 169 (1): 345-50). Кроме того, было обнаружено, что ряд других менее важных генов влияет на риск заболевания, 45 большинство из которых связано с активацией адаптивного иммунного ответа (Hunt KA, et al., *Nature Genetics*. 2008; 40 (4): 395-402). CD разделяет эти признаки генетического риска с некоторыми другими аутоиммунными расстройствами, наиболее важным из которых является диабет 1 типа (T1D), основные гены предрасположенности, которому

в локусах HLA-DQB1 и HLA-DRB1, а также в нескольких локусах, отличных от HLA, также характерны для CD (Smyth DJ, et al. al., New England Journal of Medicine. 2008; 359 (26): 2767-77). Тем не менее, генетика сама по себе не может объяснить CD, так как заболевание развивается только у небольшого количества людей, несущих эти

5 гаплотипы. Быстро растущая частота заболеваемости, наблюдаемая во многих странах в течение последних десятилетий, также указывает на факторы окружающей среды, способствующие определенному патогенезу. Важными областями исследования являются методы кормления грудных детей, кормление грудным молоком и изменения или 10 нарушения в микробиоте кишечника (De Palma G, et al., Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. Journal of Leukocyte Biology. 2010;87(5):765-78).

Хотя кишечная биопсия ранее считалась золотым стандартом для диагностики CD, было обнаружено несколько серологических маркеров, из которых тканевые

аутоантитела к трансглутаминазе (tTGA) в настоящее время являются наиболее 15 распространенными в клинической практике из-за их высокой диагностической чувствительности и специфичности (van der Windt DA et al. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. Jama. 2010;303(17): 1738-46). Кроме того, пересмотренные рекомендации Европейского общества по детской гастроэнтерологии, гепатологии и питанию (ESPGHAN - European Society for Paediatric 20 Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) 2012 года (Husby S, et al., ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2012; 54 (1): 136-60) предполагают, что значительно повышенные уровни tTGA, если за их определением следуют соответствующие дальнейшие исследования, могут устраниить необходимость в биопсии для подтверждения диагноза. У большинства пациентов с 25 CD уровни tTGA снижаются после введения GFD.

У детей такое снижение также в высокой степени предсказывает гистологическое улучшение слизистой оболочки кишечника (Bannister EG, et al., American Journal of Gastroenterology. 2014; 109 (9): 1478-83), указывая на то, что tTGA может использоваться не только в качестве бинарного диагностического инструмента, но также в качестве

30 маркера активности заболевания и соблюдения диеты. Тем не менее, это ставит вопрос о том, как управлять бессимптомными пациентами, у которых обнаруживается стойко повышенный уровень tTGA, так называемый аутоиммунитет при CD (CDA), или более широко упоминаемый как потенциальный CD, если этому сопутствуют нормальные особенности биопсии кишечника. Эти дети имеют повышенный риск развития CD (Liu 35 E, et al., The New England Journal of Medicine. 2014; 371 (1): 42-9), и в настоящее время нет доступных вариантов лечения для снижения или устранения этого риска, кроме GFD.

Уровень техники

Более ранние исследования показали, что микробиота пациентов с активным CD 40 состоит из большей степени грамотрицательных патогенных микроорганизмов по сравнению со здоровыми контролями и пациентами без симптомов (Nadal I, et al.,

Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. Journal of Medical Microbiology. 2007;56(Pt12): 1669-74). Соответственно, более поздние исследования показали, что такая микробиота усиливает воспалительную реакцию в ответ на глиадины (De Palma G, et al., Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria 45 differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. Journal of Leukocyte Biology. 2010; 87 (5): 765-78) и наоборот, что определенные штаммы Bifidobacterium влияют на ращепление глиадинов и снижают их иммунологический потенциал (Laparra JM, et al., Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by

gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. Journal of Cellular Biochemistry. 2010; 109(4): 801-7).

В некоторых недавно опубликованных исследованиях изучался эффект от введения определенных штаммов *Bifidobacterium* в контексте уже клинически выраженного CD.

5 Olivares et al. (Olivares M, et al., The British Journal of Nutrition. 2014; 112 (1): 30-40) рэндомизировали 36 детей, недавно диагностированных с CD, для лечения с ежедневным потреблением *Bifidobacterium longum* CECT 7347 или плацебо в течение 3 месяцев в дополнение к GFD. Из-за введения GFD пробиотический эффект на иммунологические параметры трудно оценить; исследование не исследовало уровня tTGA, но обнаружило 10 значительное снижение общих уровней зрелых Т-клеток в группе лечения по сравнению с плацебо. Кроме того, они показали, что дети в группе, получавшей пробиотики, добились большего прироста в росте по сравнению с контрольной группой.

Также Smecuol et al. Journal of Clinical Gastroenterology. 2013; 47 (2): 139-47) лечили 22 взрослых пациента с CD, в то время не получавших GFD, с помощью *Bifidobacterium infantis* или плацебо ежедневно в течение 3 недель и оценивали кишечную проницаемость, иммунологические параметры и изменения симптомов. Участники в группе, получавшей пробиотики, сообщили об улучшении желудочно-кишечных симптомов по сравнению с контрольной группой. Однако, в отличие от *B. longum* CECT 7347, *B. infantis* (NLS) не влиял на маркеры воспаления, микробиоту кишечника и защитные механизмы, 20 связанные с хозяином.

Хотя оба вышеупомянутых исследования с конкретными штаммами *Bifidobacterium* предполагают некоторую полезную роль этих штаммов *Bifidobacterium* при CD, они также подчеркивают необходимость дальнейших исследований.

Таким образом, несмотря на значительные исследования CDA и CD, в настоящее 25 время единственным доступным лечением CD является безглютеновая диета (GFD). Следовательно, существует потребность в композициях и способах для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD).

Заявление об изобретении

Согласно данному изобретению предложен, по меньшей мере, один пробиотический штамм вида *Lactobacillus* для применения у субъекта для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD).

Под «применением для профилактики и/или лечения» мы подразумеваем применение, 35 которое вызывает у субъекта эффект предотвращения, отсрочки, снижения тяжести и/ или устранения одного или нескольких симптомов и/или других маркеров, связанных с CDA или CD.

Пробиотические штаммы *Lactobacillus*

Предпочтительный пробиотический штамм вида *Lactobacillus* выбран из: *L. paracasei*; 40 *L. plantarum*; *L. acidophilus*; *L. rhamnosus*; *L. casei*; *L. reuteri*; *L. brevis*; *L. crispatus*; *L. bulgaricus*; *L. fermentum*; *L. salivarius*; *L. johnsonii*; и *L. lactis*

Предпочтительно, по меньшей мере один пробиотический штамм вида *Lactobacillus* представляет собой *Lactobacillus paracasei* и/или *Lactobacillus plantarum*.

Депонирования штамма *Lactobacillus*

45 Предпочтительные штаммы лактобацилл (*Lactobacilli*) для использования в соответствии с данным изобретением депонированы в соответствии с Будапештским договором Probi AB, Sölvégatan 41, Лунд 22370, Швеция, следующим образом:

Вид	Штамм	Номер доступа	Дата депонирования	Кто депонировал	Депозитарий	
5 10 15 20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HEAL 9	DSM 15312	27/11/2002	Probi	DSMZ
		HEAL 19	DSM 15313	27/11/2002	Probi	DSMZ
		HEAL 99	DSM 15316	27/11/2002	Probi	DSMZ
		299	DSM 6595	02/07/1991	Probi	DSMZ
		299v	DSM 9843	16/03/1995	Probi	DSMZ
		GOS42	DSM 32131	02/09/2015	Probi	DSMZ
25	<i>Lactobacillus paracasei</i>	8700:2	DSM 13434	06/04/2000	Probi	DSMZ
		O2A	DSM 13432	06/04/2000	Probi	DSMZ
30	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	271	DSM 6594	02/07/1991	Probi	DSMZ

Предпочтительно штамм *L. paracasei* выбран из одного или нескольких из *L. paracasei* 8700: 2 (DSM 13434) *L. paracasei* 02: A (DSM 13432).

Предпочтительно, штамм *L. plantarum* выбран из одного или нескольких из *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312); *L. plantarum* HEAL 19 (DSM 15313); *L. plantarum* HEAL 99 (DSM 15316); *L. plantarum* 299v (DSM 9843); и/или *L. plantarum* 299 (DSM 6595).

Преимущественно, данное изобретение обеспечивает комбинацию по меньшей мере одного пробиотического штамма *L. paracasei* и по меньшей мере одного пробиотического штамма *L. plantarum* для применения у субъекта для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечение целиакии (CD).

Наиболее предпочтительно комбинация представляет собой *L. paracasei* 8700:2 (DSM 13434) и *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312).

Указанные композиции могут содержать указанные пробиотический штамм или штаммы *Lactobacilli*, но предпочтительно они состоят из указанных штаммов без другого эффективного количества любых других пробиотических штаммов *Lactobacilli* или других микроорганизмов.

Композиции и составы

40 Пробиотические штаммы по данному изобретению предпочтительно лиофилизированы вымораживанием.

Пробиотические штаммы по данному изобретению могут быть предоставлены вместе с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем в виде твердой или жидкой композиции, которая может представлять собой фармацевтическую композицию в 45 соответствии с вариантом осуществления.

Примеры подходящего жидкого носителя включают воду и другие водные растворители.

Примеры подходящего твердого носителя включают мальтодекстрин, инулин,

картофельный крахмал, кукурузный крахмал или другой растительный крахмал, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) и сахарные спирты.

Композиция может представлять собой сухую ферментированную или неферментированную композицию. В случае сухой неферментированной композиции 5 ферментация происходит в желудочно-кишечном тракте после приема композиции субъектом.

При использовании пробиотический штамм(ы) по данному изобретению может быть смешан с жидким или твердым носителем перед введением субъекту. Например, субъект может смешивать штамм(ы) с носителем, состоящим из воды или какого-либо другого 10 водного растворителя, или напитка перед употреблением. Аналогично, пробиотические штаммы могут быть смешаны с носителем, состоящим из одного или нескольких пищевых продуктов. Предпочтительными продуктами питания являются продукты, не содержащие глютен, такие как ферментированные или неферментированные 15 молочные продукты, такие как йогурты, фруктовые соки; напитки, супы, растительные продукты, такие как соевые продукты, сухие пищевые батончики, детское питание, питание для младенцев, формула для младенцев, заменители грудного молока с 20 рождения.

Молоко для детского питания или питания младенцев является особенно 25 предпочтительным носителем для пробиотика штамма(ов) *Lactobacilli* по данному изобретению. Оно может быть в форме сухого порошка для смешивания с водой перед скармливанием его младенцам в виде готовой к употреблению жидкой формы. Оно обычно сделано из коровьего молока и содержит сывороточный и казеиновый белок.

Пробиотический штамм(ы) по данному изобретению также может быть представлен 25 в композиции вместе с одним или несколькими ингредиентами известных пищевых добавок, например микроэлементами, такими как витамины и минералы.

Классические симптомы и клинические признаки целиакии включают дискомфорт в животе, вздутие живота и диарею, за которыми следуют признаки нарушений питания (например, потеря веса, анемия и остеопороз). Рассмотрение рисков, связанных с 30 нарушениями питания, привело к публикации данных о том, что дети, у которых была впервые диагностирована целиакия, имели дефицит витамина D, цинка и железа (Erdem et al., Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease. Turk J Med Sci. 2015;45(4):833-6 2015). Кроме того, у взрослых с впервые диагностированной 35 целиакией и нелеченых больных CD также наблюдались значения ниже пороговых для витаминов B₆ и B₁₂, витамина D, фолиевой кислоты, цинка, магния и железа.

(Wierdsma et al., Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients. Nutrients. 2013 Sep 30;5(10): 3975-92. doi: 10.3390/nu5103975, Caruso et al., Appropriate nutrient supplementation in celiac disease 2013 Ann Med. 2013 Dec;45(8):522-31. doi: 10.3109/07853890.2013.849383. Review, Schøsler et al., Symptoms and findings in adult-onset celiac disease in a historical Danish patient cohort SCANDINAVIAN JOURNAL OF 40 GASTROENTEROLOGY Vol. 51, ISS. 3,2016).

В большинстве случаев удаление глютена из рациона после того, как человеку был поставлен диагноз CD или CDA, восстанавливает «здоровую» гистологию кишечника и приводит к нормализации витаминного и минерального статуса. Тем не менее, прекращение воспаления слизистой оболочки, путем применения безглютеновой диеты, не всегда достаточно, чтобы 45 противодействовать дефициту минералов (Caruso et al. 2013, выше). Следовательно, прием людьми с диагнозом CD/CDA или с риском развития CD/CDA витаминов и/или минералов может использоваться вместе с пробиотиками *Lactobacilli* согласно данному изобретению. Предпочтительно указанные витамин(ы) и/или минерал(ы) выбирают из

одного или нескольких витаминов: A, B₆, B₁₂, D; и/или минералов: железа, цинка, магния.

Предпочтительно композиции пробиотического штамма(ов) по данному изобретению предоставляются в форме капсулы или таблетки или порошка для перорального введения. Палочковидные пакеты являются популярным типом упаковки с одной 5 порцией/одной дозой, используемые в пищевой промышленности и фармацевтике (см. www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/). Они очень удобны для использования потребителями, и, поскольку они содержат заранее определенное количество 10 пробиотических композиций по данному изобретению, обеспечивают получение правильной дозы для достижения желаемого профилактического и/или терапевтического эффекта в соответствии с данным изобретением.

Предпочтительно при использовании пробиотический штамм(ы) по данному изобретению вводят субъекту в суточном количестве от 1×10^6 до 1×10^{14} 15 колониеобразующих единиц (КОЕ), предпочтительно от 1×10^9 до 1×10^{11} КОЕ и наиболее предпочтительно 1×10^{10} КОЕ. Суточное количество КОЕ предпочтительно вводить в виде одной дозы или порции.

Субъекты для лечения

Предпочтительно субъект является человеком. Преимущественно, субъект-человек - это ребенок. Предпочтительно, ребенок находится в возрасте меньше 18, 17, 16, 15, 20 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 лет или 1 года. Преимущественно композиции по данному изобретению предназначены для введения с рождения и особенно после отнятия, то есть с того момента, когда ребенок перестает полностью питаться грудным молоком.

Идентификация подверженных риску субъектов

Предпочтительно у субъекта отсутствует один или несколько симптомов CD, но существует повышенный риск развития CD.

В идеале субъект идентифицируется как подверженный повышенному риску CD вследствие наличия одного или нескольких серологических, иммунологических и/или генетических факторов риска.

Специалистам в данной области хорошо известны различные методы обнаружения наличия серологических, иммунологических и/или генетических факторов риска; но примеры особенно подходящих способов приведены здесь для удобства.

CDA и/или CD-ассоциированные маркеры

35

40

45

- Серологическое типирование
 - DQ2 положительный
 - DQ8 положительный
- 5 • Генетическое тестирование
 - DQ2.5 _{цис}- гаплотип (DQA1 * 05/DQB1 * 02)
 - DQ2.2 _{цис}- гаплотип (DQA1 * 02: 01/DQB1 * 02: 02)
 - гаплотип DQ2.5 _{транс}, например гаплотип DQ2.2_{цис} (DQA1 * 02: 01/DQB1 * 10 02: 02) с гаплотипом DQ7.5_{цис} (DQA1 * 05: 05/DQB1 * 03: 01)
 - Гаплотип DQ8 _{цис} (DQA1 * 03/DQB1 * 03: 02)
 - аллель DQA1 * 05: 01
 - аллель DQA1 * 05: 05
 - 15 ○ аллель DQB1 * 03: 02

Повышенный риск развития целиакии может быть определен с помощью иммунологического серотипирования и/или генетического анализа. Иммунологическое серотипирование используется для идентификации присутствия маркера серотипа DQ2 и/или маркера серотипа DQ8. Генетический анализ геномной ДНК может быть выполнен с помощью сиквенс-специфичной ПТ ТР с использованием специфичных для последовательности праймеров (ПЦР-СПП) или путем сиквенирования генов. Сиквенс-специфические методы ПЦР, включают: ПЦР с праймерами, специфичными для последовательности (ПЦР-СПП) (Sacchetti L, et al., Rapid Identification of HLA DQA1*0501, DQB1*0201, and DRB1*04 Alleles in Celiac Disease by a PCR-Based Methodology. Clin Chem. 1997 ноябрь; 43 (11): 2204-6.); количественная ПТ ТР в реальном времени (КПЦР) с использованием специфичных для последовательности праймеров и ТаqMan-зондов (Reinton et al., A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1*05, DQB1*02 and DQB1*0302 to aid diagnosis of celiac disease. J Immunol Методы. 2006 окт 20; 316 (1-2): 125-25 32. Epub 2006 Sep 18.); КПЦР со специфичными для последовательности праймерами и анализ кривой плавления (Selleski et al., Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. Arq Gastroenterol. 2015 Apr-Jun;52(2):143-30 6. doi: 10.1590/S0004-28032015000200013.); ПЦР-амплификация с последующей гибридизацией со специфичными для последовательности олигонуклеотидами. Методы сиквенирования генов включают сиквенирование Сэнгера с дидезоксинуклеотидами с концевыми цепями, пиросиквенирование, сиквенирование посредством синтеза (сиквенирование Illumina), сиквенирование путем лигирования (сиквенирование SOLiD), сиквенирование нанопор (MINION), сиквенирование Ion Torrent Semiconductor и сиквенирование в реальном времени с одной молекулой (Pacific Biosciences).

40 Генетические маркеры, соответствующие серотипам DQ2 или DQ8, включают: гаплотип DQ2,5_{цис} (DQA1 * 05/DQB1 * 02); гаплотип DQ2.2_{цис} (DQA1 * 02: 01/DQB1 * 02: 02); гаплотип DQ2.5_{транс}, например, гаплотип DQ2.2_{цис} (DQA1 * 02: 01/DQB1 * 02: 02) с гаплотипом DQ7.5_{цис} (DQA1 * 05: 05/DQB1 * 03: 01); гаплотип DQ8_{цис} (DQA1 * 03: 02: 02); аллель DQA1 * 05: 01; аллель DQA1 * 05: 05; аллель DQB1 * 03: 02.

45 Иммунологические маркеры CDA и/или CD включают: уровень тканевых антител к трансглутаминазе, в том числе определенный с помощью анализов связывания радиолиганда (Agardh et al., Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). 2004;93(8):1046-51,

Agardh et al., Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA. *Pediatric diabetes*. 2001; 2 (2): 58-65; уровень эндомизиальных антител (EMA) IgA, в том числе при отсутствии дефицита общего сывороточного IgA; уровни дезаминированного глиадинового пептида (DGP IgA и IgG).

Предпочтительно один или несколько факторов риска представляют собой HLA-DQ2 и/или HLA-DQ8.

Предпочтительно одним или несколькими иммунологическими факторами риска являются постоянное наличие тканевой трансглутаминазы (tTGA), то есть положительный тест на tTGA в двух или более последовательных случаях.

Наличие tTG может быть продемонстрировано присутствием аутоантител к tTG, предпочтительно IgA-tTGA и/или IgG-tTGA, как описано в данном документе.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: демонстрирует изменение среднего уровня tTGA-IgA с течением времени в группе лечения штаммами *L. paracasei* + *L. plantarum* по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Фиг. 2: демонстрирует изменение среднего уровня tTGA-IgG с течением времени в группе лечения *L. paracasei* + *L. plantarum* по сравнению с плацебо.

ПРИМЕРЫ

Следующие материалы, способы и примеры воплощают аспекты данного изобретения.

Материалы и способы

Исследование-идентификация в популяции субъектов с повышенным риском развития CD по генетическим, серологическим и иммунологическим факторам риска

Участники были набраны из CiPiS и шведских участников исследования TEDDY.

Протокол исследования TEDDY был подробно описан раньше (исследование "Экологические детерминанты диабета у молодых (TEDDY - The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY)): дизайн исследования". *Pediatric Diabetes*. 2007;8(5):286-98). Коротко, между 2004 и 2010 годами новорожденные в этих центрах были генотипированы по HLA и считались подходящими, если они несут один из следующих генотипов: DR3-DQ2/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR8, DR3-DQ2/DR3-DQ2, DR4-DQ8/DR4b, DR4-DQ8/DR1, DR4-DQ8/DR13, DR4-DQ8/DR9 или DR3-DQ2/DR9. В шведском центре было обследовано в общей сложности 48 440 детей, из которых 3723 были признаны HLA-подходящими. Из них письменное информированное

согласие на участие в исследовании было предоставлено родителями или лицами, осуществляющими основной уход, в общей сложности в 2525 случаях. В рамках протокола TEDDY образцы крови отбираются каждые 6 месяцев, и дети ежегодно проходят скрининг на tTGA, начиная с 2 лет. При обнаружении позитивности tTGA более ранние образцы крови анализируют ретроспективно для определения времени

сероконверсии. Участники, получившие положительный результат в двух последовательных образцах крови, считаются устойчиво положительными по tTGA и включаются в группу CDA. Все окончательные результаты основаны на лабораторном анализе, проведенном в европейской референс-лаборатории в больнице Саутмид, Бристоль, Великобритания. Дальнейшая оценка, касающаяся CD, выходит за рамки протокола TEDDY. В Швеции решение о проведении кишечной биопсии принимается в индивидуальном порядке в зависимости от уровня tTGA, степени выраженности симптомов и признаков нарушения питания.

В исследовании CiPiS дети, родившиеся в Сконе в период между 2000 и 2004 годами,

были подвергнуты скринингу с использованием HLA-генотипирования пуповинной крови и анкеты, касающейся материнских факторов. Дети с DQ2 и/или DQ8 считались подверженными риску HLA. Всего было приглашено 6202 детей из группы риска, а также 7654 детей, у которых не было HLA-риска, в качестве контроля. tTGA-скрининг 5 был проведен в возрасте 3 лет у 1620/6206 (26,1%) членов группы риска HLA и 1815/7654 (23,7%) контрольной группы, и в возрасте 9 лет у 1910/5870 (32,5%) членов с HLA-риском и 2176 из 7072 (30,6%) контролей. В случае положительного результата теста tTGA, участники проходили повторное тестирование как минимум через 3 месяца, чтобы подтвердить постоянность позитивности tTGA, после чего они были направлены в 10 местную педиатрическую клинику для проведения биопсии кишечника.

Участники постоянно приглашались из этих двух когорт в период с марта 2012 года по август 2015 года. Критерии включения были следующими:

- Наличие tTGA в 2 последовательных образцах, <30 Ед./мл с использованием анализа TristGA в Бристоле.

15 • Нет диагноза целиакии.

• Отрицательность по всем связанным с диабетом аутоантителам, по которым проводилось скринирование в протоколе TEDDY

(GADA, IAA, IA-2A, ZnT8A).

• Не участие в исследовании TEDDY по удаленному протоколу.

20 Дети, позитивные по T1D-ассоциированным аутоантителам, были исключены из данного исследования, чтобы минимизировать влияние на естественный анамнез аутоиммунитета островков. Однако следует понимать, что связанные с T1D аутоантитела представляют собой серологический маркер для повышенного риска развития CD и, как таковые, могут быть использованы для идентификации предпочтительных субъектов 25 для профилактического и/или терапевтического лечения в соответствии с применениями и способами данного изобретения.

Дизайн исследования

Дети, соответствующие критериям включения, были приглашены на первую встречу, а затем для них были запланированы последующие посещения примерно через 3 и 6 30 месяцев. Участники были рандомизированы в соотношении 1:1 к группе лечения или контрольной группе. На первой встрече и первом последующем посещении каждой группе был предоставлен порошкообразный состав, содержащий Lactobacilli или плацебо, соответственно, и было дано указание потреблять продукт ежедневно путем приема порошка после растворения в 100 мл холодной жидкости или после смешивание 35 с фруктами/пищей в сочетании с приемом пищи один раз в день в течение общего периода в 6 месяцев, прекратить потребление любых других пищевых продуктов, содержащих пробиотики, и хранить пакетики в холодильнике (2-8°C). Родителей также проинструктировали не добавлять предоставленный порошок в горячие напитки или горячую еду. При каждом посещении отбирали 10 мл венозной крови и образец кала. 40 Распределение по группам лечения или контроля было скрыто от участников, клиницистов и персонала лаборатории.

Анализ на аутоантитела к тканевой трансглутаминазе - Иммунологический фактор риска развития CD

45 Анализы связывания радиолиганда (RBA) использовали для оценки tTGA, как описано ранее ((Agardh D, et al., Pediatric Diabetes. 2001; 2 (2): 58-65) (Agardh D et al., Using radioligand-binding assays to measure tissue transglutaminase autoantibodies in young children. Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). 2004;93(8): 1046-51). Вкратце, тканевую трансглутаминазу человека (tTG) синтезировали путем транскрипции *in vitro* и

трансляции кДНК с использованием системы лизата ретикулоцитов TNT SP6 (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) в присутствии 35S-метионина (Perkin Elmer, Волтом, Массачусетс, США). И IgG-tTGA, и IgA-tTGA были проанализированы. Для анализа IgG-tTGA, 35S-tTT разбавляли и добавляли к сыворотке крови человека и инкубировали в течение ночи при 4°C. Сефарозу с белком A (PAS) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, Калифорния, США) использовали для разделения свободного и связанного с антителом 35S-tTG путем связывания IgG в сыворотке. PAS и иммунопреципитированную 35S-tTG-сыворотку добавляли в 96-луночный фильтровальный планшет MultiScreenHTS DV (Merck Life Science, Дармштадт, Германия) и инкубировали на шейкере для планшетов с последующей промывкой. Добавляли сцинтилляционный коктейль OptiPhase Supermix (Perkin Elmer) и измеряли реакционную способность в MicroBeta Counter TriLux (Perkin Elmer). Анализ IgA-tTGA проводили аналогично, за исключением того, что козью анти-человеческую IgA-агарозу (Merck Life Science) использовали вместо PAS. Уровни TGA выражали в Ед./мл, рассчитанных по стандартным кривым, содержащим приблизительно 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 и 1000 Ед./ мл соответствующих IgA-tTGA и IgG-tTGA. Уровень отсечения для положительных значений IgG-tTG и IgA-tTG был установлен на уровне >4,0 Ед./мл, что представляло собой 99-й процентиль 398 взрослых доноров крови (Agardh D, et al., *Acta paediatrica*. 2004;93(8):1046-51). При подозрении на селективный дефицит IgA участники 20 тестировались на уровни общего IgA в рамках своих первоначальных исследований; однако среди участников не было обнаружено такого состояния.

Подготовка культуры лактобактерий и составление продукта для лечения

Культура лактобактерий была приготовлена Probi AB, Лунд, Швеция. Активный продукт состоял из лиофилизированного *L. paracasei* 8700: 2 (DSM 13434) в сочетании с *L. plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) с мальтодекстрином (Glucidex IT-19, Roquette, France) в виде порошка, содержащего всего 1×10^{10} КОЕ, причем каждый штамм был представлен в одинаковом количестве. Плацебо состояло из порошкообразного мальтодекстрина и дрожжевого пептона (HYP-A, BioSpringer, Франция) для корректировки цвета и вкуса, так что два тестируемых продукта (пробиотик и плацебо) были идентичны по внешнему виду и вкусу. Участники были проинструктированы хранить продукт в холодильнике и потреблять один грамм саше продукта каждое утро. Понятно, что именно общее значение КОЕ *Lactobacillus*, а не концентрация (то есть масса или количество *Lactobacillus* на единицу массы или объем композиции), имеет отношение к эффективности продукта.

35 Анализ с помощью проточной цитометрии

Разделение мононуклеарных клеток (МКПК)

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) из когорт в Примере 1 отделяли от цельной крови центрифугированием в градиенте плотности (1800 G) с использованием гидрофильного полисахарида (пробирка для приготовления клеток BD Vac ® CPT ™, NC FICOLL ™ 4 мл, номер по каталогу 362760 Becton Dickinson, Нью-Джерси, США). Клетки отделяли в течение 2-24 часов после взятия пробы крови. Аспирированный межфазный мононуклеарный слой трижды промывали средой RPMI-1640 с L-глутамином (GIBCO №21875034, Thermo Fisher Scientific, Гетеборг, Швеция). Клетки подсчитывали и дводили в Abbott CELL_DYN Ruby до конечной концентрации 45 $1-4 \times 10^6$ /мл лимфоцитов в RPMI-1640 ie (т.е. объем суспензии МКПК был доведен таким образом, чтобы их концентрация составляла $1-4 \times 10^6$ лимфоцитов на мл).

Протокол иммуноокрашивания

Краткое изложение

После подсчета МКПК окрашивали моноклональными антителами, направленными на поверхностные и внутриклеточные структуры. Моноклональные антитела (Таблица 2) предварительно метили четырьмя флуорохромами, изотиоцианатом флуоресцеина (FITC), фикоэритрином (PE), хлорофиллом белка перидинина (PerCP) и аллофикаридиином (APC). Окрашенные клетки анализировали с использованием прибора FACSCalibur® (BD Biosciences, Калифорния, США) с возможностью анализа четырех цветов, путем пропускания через лазерный луч. FACSCalibur® определяет клеточные популяции и считает клетки по их характерным признакам размера, зернистости и интенсивности флуоресценции. Оптические детекторы усиливают и преобразуют световые сигналы в электрические сигналы данных. Данные были получены и проанализированы в программном обеспечении CellQuestPro® (BD Biosciences).

Таблица 1: Антитела, которые использовались в анализе проточной цитометрии.

	Антитело и флуорохром	Поставщик	№ по каталогу
15	CCR9 APC	R & D Systems, Inc., Абингдон, Великобритания	FAB17991A
20	CD45RO APC	BD Biosciences, Калифорния, США	559865
	CD62L APC	BD Biosciences, Калифорния, США	559772

25

30

35

40

45

	IgG1 изотип APC	BD Biosciences, Калифорния, США	555751
5	CD25 FITC	BD Biosciences, Калифорния, США	555431
10	CD3 FITC	BD Biosciences, Калифорния, США	555332
15	CD38 FITC	BD Biosciences, Калифорния, США	340909
20	CCR4 PE	BD Biosciences, Калифорния, США	551120
25	CD8 PE	BD Biosciences, Калифорния, США	345773
30	CD45RA PE	BD Biosciences, Калифорния, США	555489
35	Интегрин бета7 PE	BD Biosciences, Калифорния, США	555945
40	CD19 PerCP	BD Biosciences, Калифорния, США	345778
	CD4 PerCP	BD Biosciences, Калифорния, США	345770
	CD8 PerCP	BD Biosciences, Калифорния, США	345774
	CD3 FITC/CD16+ CD56 PE	BD Biosciences, Калифорния, США	342403
	IgG2a изотип FITC/IgG1 изотип PE/CD4 PerCP-Cy 5.5	BD Biosciences, Калифорния, США	340965
	IgG человека, изотипический контроль	Fisher Scientific, Гетеборг, Швеция	12000C
	eBioscience TM Набор для окрашивания регуляторных Т-клеток человека (CD4, CD25, FoxP3)	AH diagnostics AB, Солна, Швеция	88-8999-40

Таблица 2: Комбинации антител и концентрации, используемые в анализе проточной цитометрии.

Прямое окрашивание					
Пробирка	Смешанная панель	Метка	Препарат мАТ в 100 мкл	Разбавление	Количество полученных, собранных и гейтированных лимфоцитов
1	Изотипический контроль	FITC/PE/PerCP APC	5 мкл 2,5 мкл	1/20 1/40	3000
2	CD3 CD16+ 56 CD19	FITC PE PerCP	5 мкл 5 мкл 20 мкл	1/20 1/5	10000
3	CD3 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 мкл 0,4 мкл 5 мкл 20 мкл	1/20 1/250 1/20 1/5	10000
4	CD3 CD45RA CD8 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 мкл 0,4 мкл 2,5 мкл 20 мкл	1/20 1/250 1/40 1/5	10000
5	CD3 CD8 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	5 мкл 0,4 мкл 5 мкл 2,5 мкл	1/20 1/250 1/20 1/40	10000
6	CD25 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 мкл 0,4 мкл 5 мкл 20 мкл	1/10 1/250 1/20 1/5	100000

5	7	CD25 CCR4 CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 мкл 2,5 мкл 5 мкл 20 мкл	1/10 1/40 1/20 1/5	50000
10	8	CD25 CCR4 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 мкл 2,5 мкл 5 мкл 2,5 мкл	1/10 1/40 1/20 1/40	50000
15	9	CD45 RA Интегрин β 7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	10 мкл 10 мкл 5 мкл 5 мкл	1/10 1/10 1/20 1/20	50000
20	10	CD3 Интегрин β 7 CD4 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 мкл 10 мкл 5 мкл 5 мкл	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
25	11	CD3 Интегрин β 7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 мкл 10 мкл 5 мкл 5 мкл	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
30	12	CD38 Интегрин β 7 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 мкл 10 мкл 5 мкл 2,5 мкл	1/10 1/10 1/20 1/40	50000
Набор для окрашивания регуляторных Т-клеток человека						
35	13	Пробирка Смешанная панель	Метка	Препарат МАТ в 100 мкл	Разведение	Количество клеток для измерения
40	14	Изотипический контроль IgG2a	PE	20 мкл	1/5	3000
45		CD4/CD25 FoxP3	FITC/APC PE	20 мкл смеси 20 мкл	1/20 & 1/5 1/5	50000

Блокировка

МКПК были разделены на две пробирки: пробирка А для блокирования МКПК в концентрации примерно $2-4 \times 10^6$ лимфоцитов/мл в RPMI; пробирка В с МКПК для

окрашивания без блокирования, разбавленная до примерно $1-2 \times 10^6$ лимфоцитов/мл путем добавления RPMI. МКПК в пробирке А блокировали путем инкубации с нормальным человеческим IgG (разведение 1/34) в течение 15 минут при 2-8°C, с защитой от света.

⁵ Прямое окрашивание (пробирки 1-12)

Смеси антител в соответствии с пробирками 1-12 приведенной выше таблицы готовили в пробирках FACS (BD Falcon, VWR кат. №352052). Блокированные МКПК из пробирки А добавляли в пробирки 9-11, а неблокированные МКПК из пробирки В добавляли в пробирки 1-8 и 12. Пробирки FACS 1-12 осторожно встряхивали и инкубировали в течение 30 минут при 2-8°C в защищенном от света месте. Окрашенные МКПК промывали, добавляя 2 мл холодного забуференного фосфатом солевого раствора (ФСБ, pH 7,4, Gibco кат. №10010-015, Fisher Scientific, Гетеборг, Швеция), осторожно встряхивали, центрифугировали (10 минут, 400 × g) и удаляли супернатант. Окрашенные МКПК фиксировали путем ресуспенсирования в 200 мкл холодного ФСБ-1% раствора формальдегида (3 части ФСБ, pH 7,4, Gibco кат. №10010-015 к 1 части 4% раствора формальдегида, Apoteket кат. №34 24 36) и инкубации при 2-8°C на ночь с защитой от света.

Окрашивание с использованием набора для окрашивания регуляторных Т-клеток человека (пробирки 13-14).

Пробирку FACS 13 (см. Таблицу выше) готовили с использованием 100 мкл неблокированных МКПК из пробирки В. Пробирку FACS 14 (см. Таблицу выше) готовили для окрашивания клеточной поверхности используя 20 мкл коктейля CD4 FITC/CD25 APC и 100 мкл блокированных МКПК из пробирки А, осторожно встряхивали, затем выдерживали в течение 30 минут при 2-8°C в защищенном от света месте. МКПК в пробирках 13 и 14 промывали путем добавления 2 мл холодного ФСБ, осторожно встряхивали, центрифугировали (5 минут, 400xg) и удаляли супернатант. МКПК в пробирках 13 и 14 фиксировали путем ресуспенсирования в 1 мл раствора для фиксации/пермеабилизации (одна часть концентрата для фиксации/пермеабилизации 4X и три части разбавителя для фиксации/пермеабилизации) и инкубировали при 2-8°C в течение ночи, с защитой от света.

Фиксированные МКПК (пробирки 13 и 14) промывали и пермеабилизировали путем центрифугирования (10 минут, 400xg), удаления супернатанта, ресуспенсирования в 2 мл 1X буфера для пермеабилизации (одна часть 10X буфера для пермеабилизации и девять частей дистиллированной воды), осторожного встряхивания, повторением предыдущих четырех шагов и, в конце снова центрифугировали (10 минут, 400xg). Пермеабилизированные МКПК в пробирке 14 блокировали 2 мкл нормальной крысиной сыворотки путем инкубации в течение 15 минут при 2-8°C в защищенном от света месте. Внутриклеточное окрашивание осуществляли путем добавления 20 мкл контрольного PE изотипа IgG2a крысы в пробирку 13 и 20 мкл античеловеческого FoxP3 PE в пробирку 14 с последующей инкубацией в течение 30 минут при 2-8°C в защищенном от света месте. Окрашенные МКПК промывали 2 мл ФСБ, осторожно встряхивали, центрифугировали (10 минут, 400xg) и супернатант удаляли перед ресуспенсированием клеток в 200 мкл ФСБ перед анализом проточной цитометрией.

⁴⁵ Анализ с помощью проточной цитометрии

Beckton Dickinson FACSCalibur® может обнаружить 6 различных параметров одной частицы или клетки в оптической системе. Прибор преобразует интенсивность рассеяния света и флуоресценции в цифровые импульсы. Прямое рассеяние (FSC) обеспечивает меру размера, а боковое рассеяние (SSC) обеспечивает меру цитоплазматической

зернистости. Прибор оснащен четырехцветными флуоресцентными детекторами: синий (488 нм) лазер обнаруживает FL1, FL2 и FL3, а дополнительный красный диодный лазер (635 нм) обнаруживает FL4.

После регулярной очистки системы прибора была проведена проверка калибровки

- 5 с использованием 3-цветных гранул CaliBRITE (BD №340486) и гранул CaliBRITE APC (BD №340487) и программного обеспечения AutoCOMPTM для настройки напряжений фотоэлектронного умножителя (PMT), а также для настройки и оптимизации компенсации флуоресценции детекторов (FL1; FL2, FL3 и FL4). Гранулы CaliBRITE имеют точный размер, маркированы точным количеством флуорохромов, и имитируют
- 10 неокрашенные и окрашенные лейкоциты. Программное обеспечение AutoCOMP™ создает CalibFile. Все моноклональные антитела предварительно титровали с помощью настройки прибора Calib File. Программное обеспечение CellQuest Pro использовалось для функционирования BD FACSCalibur. 3000-10000 полученных, собранных и гейтированных лимфоцитов измеряли для каждой пробирки в соответствии с таблицей
- 15 выше.

Соответствующие изотипу контрольные антитела (изотип IgG2/IgG1/CD4 (FITC, PE и PerCP-Cy 5.5) и изотип IgG1 (APC), BD biosciences, Калифорния, США) были использованы для задания квадранта точечного графика и расчета процента популяций лимфоцитов путем вычитания загрязняющих нелимфоцитов. Лимфоциты были

- 20 идентифицированы и гейтированы на точечном графике, демонстрирующем боковое рассеяние (цитоплазматическая зернистость) и параметр FL1 (положительная интенсивность FITC) CD3+ Т-клеток. Затем на точечной диаграмме FSC и SSC было продемонстрировано многоцветное гейтирование лимфоцитов. Вокруг этих идентифицированных лимфоцитов был обозначен (гейтирована) область. Новые
- 25 точечные графики были отображены из гейтирования лимфоцитов с различными комбинациями двух параметров (FL1, FL2, FL3 и FL4) окрашенных моноклональных антител, представляющих интерес, и затем были идентифицированы характерные подмножества. Квадранты были установлены на двухпараметрических точечных кривых от изотипического контроля, отрицательная популяция. Подмножество дается
- 30 в процентах от популяции квадрантов гейтированных лимфоцитов. Неокрашенные отрицательные клетки в лимфоцитных воротах вычитали. Используемый здесь термин «лейкоциты» означает МКПК (то есть общую популяцию изолированных клеток).

Конкретно, подгруппы Т-клеток, CD4+(Th) или CD8+(Tc) клеток гейтировались из гейтированных лимфоцитов. Из этих ворот наивные клетки были гейтированы как

- 35 CD3+CD4/CD8+CD45RA+CD45RO-, а клетки памяти как CD3+CD4/CD8+CD45RA- CD45RO+. Активированные и дифференцированные эффекторные клетки и клетки памяти были гейтированы как CD3+ CD4/8+ CD62L+, CD4+ CD25+ CD45RA+ CD45RO+, CD4+ CD25+ CCR4+ CD45RO, CD4+ CD25+ CCR4+ CD62L+, CD8+ CD45RA+ CCR9+ β7+, CD3+ CD4+/CD8+ β7+ CCR9+, CD4+ CD38+ β7+ CD62-. В-клетки были определены как
- 40 CD3-CD19+ лимфоциты.

Из лимфоцитарных ворот гейтировали клетки CD4+ с последующим гейтированием клеток CD25+. Затем эту популяцию исследовали на экспрессию клеток FoxP3+. Из

- 45 CD4+ CD25+ гейта определяли процент с самой высокой экспрессией CD25, CD4+ CD25^{выс}. Затем популяцию CD4+ CD25^{выс} лимфоцитов дополнительно исследовали на экспрессию FoxP3. NK-клетки были гейтированы в гейте лимфоцитов. Из этого гейта NK-клетки были гейтированы как CD3-CD16+/CD56+ клетки.

Область анализа лимфоцитов содержала >70% лимфоцитов. Анализ в пределах системы одного измерения CD3+ Т-клеток показал ковариацию 3%, а анализ между

разными измерениями CD3+ Т-клеток показал ковариацию 5%.

Статистический анализ

Результатом исследования была оценка аутоиммунитета при целиакии, как изменения уровней аутоантител к tTG в сыворотке (один ребенок был исключен из-за

5 недостаточного объема) и изменения периферического иммунного ответа В-клеток, NK-клеток и субпопуляций регуляторных Т-клеток через 6 месяцев. Сравнение между группами бинарных переменных проводилось с помощью точного критерия Фишера. Сравнение между группами по непрерывным и упорядоченным категориальным данным проводится с помощью критерия суммы рангов Уилкоксона, например, критерий суммы 10 рангов Уилкоксона использовался для сравнения уровней tTGA между группой, получавшей пробиотик, и группой плацебо через 0,3 и 6 месяцев. Для сравнения изменений уровней tTGA с течением времени в каждой группе использовался критерий Уилкоксона для непрерывных переменных. Уровни IgA-tTGA и IgG-tTGA были проанализированы как отдельные наборы данных. Аналогично, критерий суммы рангов 15 Уилкоксона был применен для сравнения между группой, получавшей пробиотик, и плацебо, в отношении изменений, измеренных от исходного уровня до 3 и 6 месяцев для параметров, проанализированных с помощью проточной цитометрии. Знаковый ранговый критерий Уилкоксона использовался для измерения различий от исходного уровня через 3 и 6 месяцев в каждой группе. Т-тест был использован для сравнения 20 распределения HLA между группами.

Пропущенные данные не были введены, то есть анализы проводились по наблюдаемым случаям. Чтобы избежать эффекта отсева и ограничить сравнение лечения теми детьми, которые строго придерживались инструкций клинического испытания, были проведены анализ намерения лечения и анализ по протоколу. Все сообщаемые 25 значения p являются двусторонними и не были скорректированы по кратности (то есть номинальны). Значение p<0,05 считалось статистически значимым. Статистический анализ был выполнен в StatXact версии 10.1 (Cytel, Кембридж, Массачусетс, США).

Результаты: лечение штаммами *L. paracasei* и *L. plantarum* снижает уровень аутоантител к tTGA при аутоиммунитете при целиакии (CDA)

30 Всего 118 детей соответствовали критериям включения и были приглашены для участия в исследовании. Из них 90 детей и их опекуны согласились участвовать в исследовании: 1 из исследования CiPiS и остальные 89 из исследования TEDDY. Двенадцать (13%) из них покинули исследование после первого посещения. Один ребенок был исключен из-за недостаточного количества образцов крови для проведения анализа 35 tTGA. В общей сложности 77 (87%) детей были включены в окончательный набор данных; 40 (52%) в группе, получавшей пробиотик, и 37 (48%) в группе плацебо, соответственно. Базовые характеристики этих групп показаны в Таблице 3, а распределение HLA - в таблице 3А. Средняя и медианная продолжительность исследования составила 188 и 190 дней соответственно (Q1: 176,5 дней, Q3: 203 дня, 40 разброс 153-237 дней).

Таблица 3 : Исходные характеристики в начале исследования (первое посещение).

	Лечение n = 40	Плацебо n = 37	p-значение
5	Возраст, годы, среднее	4,85	4,42
	Пол, n		0.284 ¹
	Мальчики	22	0.172 ²
	Девочки	18	
10	Вес, кг, средний	22,0	20,8
	Рост, см, средний	114,0	0.182 ¹
			0.243 ¹

¹ критерий суммы рангов Уилкоксона, двусторонний; ² Точный тест Фишера, 2-х сторонний

Таблица 3А: распределение HLA исследуемой популяции.

HLA-тип	Группа пробиотика	Группа плацебо	p-значение
	n (%)	n (%)	
15	DR3-DQ2/DR4-DQ8	10 (25,0)	16 (42,1)
	DR4-DQ8/DR4-DQ8	10 (25,0)	7 (18,4)
	DR4-DQ8/DR8/DQ4	4 (10,0)	2 (5,2)
20	DR3-DQ2/DR3-DQ2	15 (37,5)	13 (34,2)
	DR4/DR1	1 (2,5)	0 (0,0)

Таблица 4: Уровни тканевого трансглутаминального аутоантитела (tTGA), IgA и IgG. p-значения представляют собой сравнения между лечением и плацебо при каждом посещении.

	Посещение 1	Посещение 2 (около 3 мес.)	Посещение 3 (ок. 6 мес.)
25	tTGA-IgA, среднее (медианное)		
	Лечение	158,60 (4,71)	72,84 (3,07)
	Плацебо	12,96 (4,38)	21,98 (4,93)
30	<i>p</i> -значение	0,8912	0,3013
	tTGA-IgG, среднее (медианное)		
	Лечение	166,98 (1,57)	141,74 (1,64)
	Плацебо	8,00 (1,60)	14,26 (1,56)
35	<i>p</i> -значение ¹	0,8480	0,9373
			0,5428

¹ критерий суммы рангов Уилкоксона, двусторонний

Через 3 месяца уровни tTG-IgG снизились в среднем на $29,4 \pm 513$ Ед./мл в пробиотической группе и увеличились в группе плацебо в среднем на $6,3 \pm 48$ Ед./мл по сравнению с базовыми уровнями ($p=0,046$ и $p=0,034$, соответственно), но значимой разницы в уровнях IgA-tTG между группами не наблюдалось через 3 месяца. Через 6 месяцев уровни снизились как для IgA-tTG (среднее снижение на $107,0 \pm 855$ Ед./мл; $p=0,013$), так и для IgG-tTG (среднее снижение на $84,7 \pm 748$ Ед./мл; $p=0,062$) в пробиотической группе, тогда как обратное было справедливо для группы плацебо, которая показала повышенные уровни как для IgA-tTG (среднее увеличение на $25,0 \pm 161$ SD U/мл; $p=0,043$), так и для IgG-tTG (среднее увеличение на $56,2 \pm 349$ U/мл; $p=0,008$) по сравнению с исходным уровнем.

Результаты: лечение штаммами *L. paracasei* и *L. plantarum* уменьшает долю Т клеток

естественных киллеров, противодействует увеличению доли клеток естественных киллеров и снижает экспрессию CD62L в цитотоксических Т клетках

Анализ с помощью проточной цитометрии использовался для изучения любых изменений в размере и статусе активации популяций белых кровяных клеток в начале исследования и при каждом последующем посещении в обеих исследовательских группах.

Таблица 5 демонстрирует, что процентная доля естественных киллеров Т (NK-T), идентифицированных как клетки CD3+CD56+, снижалась при лечении *Lactobacillus*, и снижение было статистически значимым при втором повторном посещении в группе лечения ($p=0,0297$) между группами лечения и плацебо ($p=0,0079$). Таблица 6

демонстрирует, что процент клеток естественных киллеров (NK), идентифицированных как CD3-CD56+, увеличился статистически значимо после 6-месячного посещения в группе плацебо по сравнению с группой пробиотиков ($p=0,0381$).

В таблице 7 показано количество цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+), уровень которых был увеличен в среднем на 1,74% ($p=0,017$) в группе плацебо только при первом посещении (3 месяца). В таблице 7А продемонстрирована доля гейтированных Тн клеток (CD3+CD4+), которая ко второму посещению (6 месяцев) уменьшилась в среднем на 5,55% ($p=0,039$) в группе плацебо, в то время как никаких существенных изменений не наблюдалось для пробиотической группы.

В дополнение к Таблице 7, экспрессия CD62L на поверхности CD3+CD8+ клеток в Таблицах 8 и 9 показывает статистическую тенденцию к увеличению CD62L^{низк} цитотоксических Т-клеток ($p=0,0815$) и уменьшению CD62L^{выс} цитотоксических Т-клеток ($p=0,0729$) с пробиотическим лечением по сравнению с плацебо при втором посещении. CD62L - молекула клеточной адгезии, L-селектин, участвующая во взаимодействиях лимфоцитов с эндотелиальными клетками, способствующая проникновению во вторичные лимфоидные ткани. Присутствие CD62L на поверхности клеток указывает на наивное состояние (CD62L^{выс}), тогда как, когда клетки уже были активированы, они высвобождают CD62L с их поверхности (CD62L^{низк}). В Таблице 9А также демонстрирует меньшее количество клеток CD3+CD8+CD62L^{низк} (среднее снижение на 0,86%, $p=0,014$) в группе плацебо при втором последующем посещении, тогда как для пробиотической группы значительных изменений не наблюдалось.

В дополнение к Таблице 7А, в Таблице 9 В показана тенденция к уменьшению количества CD3+CD4+CD62L^{низк} клеток в группе плацебо (среднее снижение на 5,55%, $p=0,039$), тогда как для пробиотической группы значительных изменений не наблюдалось.

Таблица 5: NK-Т-клетки CD3+ CD56+ (% NK-Т-клеток от лимфоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	33	39	38	32	31
	Отсутствует	13	7	8	14	15
	Мин	0,10	0,10	0,10	-1,54	-3,67
	Медианное	0,44	0,45	0,44	-0,09	-0,16
	Макс	4,74	3,27	1,60	1,57	1,00
	Среднее	0,77	0,67	0,51	-0,12	-0,29
	CO	0,85	0,62	0,34	0,66	0,81
P-значение		HO	HO	HO	0,2082	0,0297
Плацебо	N	32	34	34	30	30
	Отсутствует	12	10	10	14	14
	Мин	0,12	0,22	0,19	-0,95	-0,94
	Медианное	0,46	0,49	0,58	0,02	0,18
	Макс	1,26	1,30	2,35	0,97	1,72
	Среднее	0,55	0,59	0,69	0,04	0,13
	CO	0,30	0,33	0,40	0,41	0,52
P-значение		HO	HO	HO	0,6815	0,1082
P-значение		0,4590	0,8238	0,0202	0,2316	0,0079

30

35

40

45

Таблица 6: NK-клетки CD3-CD56+ (% NK-клеток от лимфоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	33	39	38	32	31
	Отсутствует	13	7	8	14	15
	Мин	1,11	3,14	1,68	-26,45	-34,27
	Медианное	8,79	7,63	7,07	0,18	-1,61
	Макс	43,71	21,95	15,14	8,62	10,74
	Среднее	10,69	8,33	7,76	-2,01	-2,86
	CO	8,99	4,55	3,50	7,54	9,81
P-значение		HO	HO	HO	0,4559	0,2639
Плацебо	N	32	34	34	30	30
	Отсутствует	12	10	10	14	14
	Мин	2,37	1,99	3,08	-11,55	-6,78
	Медианное	7,18	7,11	7,65	1,80	2,18
	Макс	26,01	27,77	47,42	9,55	21,41
	Среднее	8,33	8,44	10,62	0,66	2,68
	CO	5,52	5,02	8,32	4,29	6,55
P-значение		HO	HO	HO	0,1347	0,0606
P-значение		0,2930	0,8842	0,2172	0,2194	0,0381

30

35

40

45

Таблица 7: CD3+ CD8+ (% цитотоксических Т-клеток от CD3+ лимфоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	19,23	20,42	24,06	-9,73	-4,15
	Медианное	33,62	33,22	34,56	0,93	1,14
	Макс	42,13	45,21	44,05	13,63	15,40
	Среднее	32,51	33,50	34,08	1,24	2,10
<i>Плацебо</i>	CO	6,22	6,04	5,67	4,47	4,94
	P-значение	HO	HO	HO	0,1122	0,0732
<i>Плацебо</i>	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	17,62	17,33	17,47	-4,17	-14,04
	Медианное	32,39	33,08	31,86	1,12	0,31
	Макс	47,94	50,53	47,49	9,93	16,86
	Среднее	32,10	33,53	33,15	1,74	1,01
<i>Плацебо</i>	CO	7,70	8,53	7,37	3,36	6,35
	P-значение	HO	HO	HO	0,0171	0,6295
P-значение		0,6181	0,9679	0,4206	0,4643	0,4136

30

35

40

45

Таблица 7А: CD3+ CD4+ (% Т-хелперов клеток от CD3+ лейкоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	2,13	1,21	4,73	-30,81	-38,10
	Медианное	14,95	13,71	11,75	-1,34	-3,01
	Макс	48,34	31,08	29,82	19,02	17,09
	Среднее	17,04	13,84	14,63	-2,47	-3,44
	CO	9,78	7,36	6,79	12,40	12,63
P-значение		HO	HO	HO	0,3176	0,2286
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	1,06	6,40	0,93	-32,01	-31,93
	Медианное	14,04	13,30	13,35	0,04	-4,07
	Макс	50,33	35,42	29,26	11,53	14,57
	Среднее	19,01	15,61	14,20	-4,43	-5,55
	CO	12,82	8,00	7,13	11,98	12,61
P-значение		HO	HO	HO	0,2508	0,0386
P-значение		0,8244	0,4243	0,8073	0,8649	0,6679

30

35

40

45

Таблица 8: CD3+ CD8+ CD62L^{низ} (% CD62L^{низ} из CD3+CD8+ клеток или цитотоксических Т-клеток с низкой экспрессией CD62L в виде % от лимфоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	12,93	11,02	12,99	-30,81	-22,56
	Медианное	30,01	25,78	28,38	0,12	2,86
	Макс	61,80	70,98	90,33	43,51	60,32
	Среднее	32,53	32,12	33,72	0,89	3,66
	CO	13,05	15,49	18,31	17,39	16,52
P-значение		HO	HO	HO	1,0000	0,3495
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	8,59	10,38	13,17	-25,80	-21,86
	Медианное	33,01	28,55	25,92	-2,69	-3,39
	Макс	55,58	63,70	68,32	55,02	34,12
	Среднее	32,15	31,07	28,73	-0,63	-3,25
	CO	10,91	14,24	13,44	15,51	14,66
P-значение		HO	HO	HO	0,5619	0,1622
P-значение		1,0000	0,7983	0,3736	0,7692	0,0815

Таблица 9: CD3+ CD8+ CD62L^{выс} (% CD62L^{выс} от CD3+ CD8+ клеток или % цитотоксических Т-клеток с высокой экспрессией CD62L)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	38,20	28,91	7,83	-43,45	-61,92
	Медианное	69,75	73,68	71,19	-0,19	-2,72
	Макс	87,07	88,73	86,80	31,37	22,56
	Среднее	67,25	67,68	65,74	-0,87	-4,07
	CO	13,13	15,42	18,30	17,46	16,37
P-значение		HO	HO	HO	1,0000	0,2867

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	44,42	35,40	31,27	-56,01	-34,20
	Медианное	66,93	71,24	73,51	3,18	3,26
	Макс	91,41	89,62	86,56	25,80	21,86
	Среднее	67,62	68,63	71,03	0,56	3,24
	CO	10,91	14,31	13,40	15,51	14,65
P-значение		HO	HO	HO	0,4846	0,1689
P-значение		0,9554	0,8206	0,3001	0,7212	0,0729

Таблица 9А: CD3+ CD8+ CD62L^{низ} (% CD62L^{низ} от CD3+ CD8+ клеток или цитотоксических Т-клеток с низкой экспрессией CD62L в виде % от лейкоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	0,62	0,14	0,57	-3,63	-5,08
	Медианное	2,53	2,11	2,43	-0,37	-0,10
	Макс	10,30	14,95	7,67	12,94	4,87
	Среднее	2,91	2,54	2,75	0,01	-0,01
	CO	2,05	2,37	1,61	2,84	1,93
P-значение		HO	HO	HO	0,2917	0,7922
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	0,20	0,63	0,23	-5,70	-4,99
	Медианное	2,70	2,26	2,02	-0,31	-0,85
	Макс	8,68	7,48	7,66	4,58	4,78
	Среднее	2,98	2,62	2,24	-0,45	-0,86
	CO	2,03	1,58	1,56	1,89	2,09
P-значение		HO	HO	HO	0,2087	0,0143
P-значение		0,7241	0,5793	0,1456	0,8460	0,0879

Таблица 9В: CD3+ CD4+ CD62L^{низ} (% CD62L^{низ} от CD3+ CD4+ клеток или Т-хелперов с низкой экспрессией CD62L в виде % от лейкоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	0,35	0,31	0,63	-5,97	-5,16
	Медианное	2,42	1,74	1,85	-0,47	-0,67
	Макс	7,69	17,53	10,62	15,99	5,43
	Среднее	2,83	2,45	2,59	-0,30	-0,18
	СО	1,80	2,92	2,05	3,64	2,44
	Р-значение	НО	НО	НО	0,1446	0,3330

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	0,27	0,61	0,13	-4,93	-6,83
	Медианное	2,56	2,19	2,06	-0,23	-0,83
	Макс	10,62	5,69	6,82	3,67	2,86
	Среднее	3,25	2,41	2,31	-0,86	-0,91
	СО	2,20	1,38	1,54	1,98	2,15
	Р-значение	НО	НО	НО	0,0702	0,0506
Р-значение		0,4414	0,2857	0,6680	0,8336	0,4559

Результаты - лечение штаммами *L. paracasei* и *L. plantarum* предотвращает увеличение активации Т-хелперных клеток (CD4+ CD25+ клеток) и увеличение количества CD4+ CD25+ FoxP3+ клеток

Дальнейший анализ с помощью проточной цитометрии был сфокусирован на Т-хелперных клетках, идентифицированных как CD3+ CD4+, при этом субпопуляции CD4+ Т-хелперных клеток отличались между двумя группами исследования.

Таблица 10 демонстрирует, что популяция наивных клеток T_H (CD4+ CD45RA+ CD45RO-) при втором последующем визите (6 месяцев) уменьшилась в среднем на 4,73% (p=0,002) в группе плацебо. Таблица 10 также демонстрирует, что обработка *Lactobacillus* предотвратила это уменьшение доли клеток с наивным Т-клеточным маркером CD45RA+ /RO- по сравнению с плацебо (p=0,0532 для V1–V0; p=0,0217 для V2–V0). С другой стороны, таблица 11 демонстрирует, что популяция T_H клеток памяти (CD4+CD45RA- CD45RO+), увеличилась в среднем на 3,07% (p=0,003) в группе плацебо при втором контролльном визите (6 месяцев). Таблица 11 также демонстрирует, что лечение

Lactobacillus предотвращало это увеличение доли клеток с маркером Т-клеток памяти CD45RA-/RO+ по сравнению с плацебо (p=0,0650 для V1–V0; p=0,0198 для V2–V0).

Таблица 10А демонстрирует, что популяция наивных клеток T_C (CD8+ CD45RA+ CD45RO-) при втором последующем визите (6 месяцев) уменьшилась в среднем на 2,17%

($p=0,030$) в группе плацебо, в то время как не наблюдалось значительные изменения для пробиотической группы.

Лечение *Lactobacillus* также предотвращало увеличение в процента Т-хелперных клеток памяти (CD45RO+), по сравнению с плацебо (Таблицы 12-15), и предотвращало 5 увеличение процента Т_H клеток памяти экспрессирующих CCR4 (CD4+ CD45RO+ CCR4+) (среднее увеличение в группе плацебо 7,63%, $p=0,003$; сравнительное значение $p=0,0110$; Таблица 15А).

Лечение *Lactobacillus* предотвращает уменьшение количества CD4+ CD38+ CD62L- 10 Т-хелперных клеток, экспрессирующих эктофермент CD38 и гликопротеиновую молекулу клеточной адгезии, но не L-селектин (CD62L), с сохранением этой тенденции при втором последующем посещении (Таблица 16, $p=0,0753$). Лечение также предотвращает уменьшение CD4+ CCR9+ β 7+ Т-хелперов, наблюдаемое при втором 15 последующем посещении (Таблица 17, $p=0,0382$). Экспрессия β 7 (от рецептора кишечного хоуминга (направленности) α 4 β 7) на поверхности Т-клеток рассматривается как характерная для клеток имеющих направленность на кишечник.

В таблице 18 продемонстрировано, что лечение *Lactobacillus* предотвращало 20 увеличение доли активированных Т-хелперных клеток при втором повторном посещении, когда активация идентифицировалась CD25, а именно альфа-цепью рецептора интерлейкина-2. Таблица 18А демонстрирует, что процент наивных CD4+CD25+CD45RA+ клеток уменьшился в среднем на 5,72% ($p=0,0179$) в группе плацебо при втором 25 последующем посещении (6 месяцев), тогда как никаких существенных изменений не наблюдалось для пробиотической группы.

Таблица 19 далее демонстрирует, что лечение *Lactobacillus* на время второго 30 последующего визита предотвратила увеличение доли регуляторных Т клеток, идентифицированных как клетки CD4+ с высоким уровнем позитивности CD25 (CD25^{выс}).

В Таблице 20 показана тенденция к увеличению процента клеток CD4+ CD25+ FoxP3+ в группе плацебо ко второму контрольному визиту (среднее увеличение на 0,32%, $p=0,0521$) и значительный общий эффект от пробиотической терапии, по сравнению с 35 плацебо ($p=0,0275$).

Таблица 10: CD4+ CD45RA+ RO- (% CD45RA+ CD45RO- клеток CD3+ CD4+ или наивных Т-хелперов в виде % от лимфоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	38,93	48,45	49,57	-16,37	-14,55
	Медианное	68,60	66,79	65,01	1,78	-0,59
	Макс	80,51	83,83	78,37	26,60	17,89
	Среднее	65,25	66,88	65,68	1,75	-0,08
	СО	9,63	8,00	7,95	8,17	6,92
Р-значение		НО	НО	НО	0,3105	0,7457
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
5	Мин	42,72	46,64	47,24	-19,50	-28,78
	Медианное	71,52	68,41	68,87	-1,72	-4,03
	Макс	85,28	82,13	82,39	12,27	19,53
	Среднее	69,70	67,91	65,87	-2,79	-4,73
	CO	9,62	9,12	9,00	7,67	8,80
10	P-значение	HO	HO	HO	0,0692	0,0017
	P-значение	0,0420	0,4672	0,7901	0,0532	0,0217

Таблица 10А: CD8+ CD45RA+ RO- (% CD45RA+ CD45RO- клеток CD3+ CD8+ или наивных цитотоксических Т-клеток в виде % от лейкоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
15	<i>Lactobacilli</i> N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	0,85	0,52	1,96	-9,82	-9,82
	Медианное	5,23	5,39	5,79	-0,12	-0,26
	Макс	14,25	17,78	15,00	10,20	7,09
	Среднее	6,29	6,06	6,16	0,10	-0,58
	CO	3,61	3,62	3,07	5,13	4,34
20	P-значение	HO	HO	HO	0,9655	0,4016
	<i>Плацебо</i> N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	0,94	2,03	0,59	-20,68	-20,47
	Медианное	5,57	4,67	4,70	-1,24	-1,71
	Макс	23,89	15,68	14,23	6,07	9,28
	Среднее	7,27	5,94	5,44	-1,88	-2,17
25	CO	5,07	3,64	3,35	4,99	5,38
	P-значение	HO	HO	HO	0,0731	0,0308
30	P-значение	0,6745	0,7197	0,2647	0,2156	0,1951

40

45

Таблица 11: CD4+ CD45RA-RO+ (% CD45RA-CD45RO+ клеток CD3+ CD4+ или % Т-хелперных клеток памяти)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	5,36	1,96	9,45	-15,41	-10,50
	Медианное	18,46	17,46	18,40	-0,25	0,05
	Макс	43,39	27,98	35,53	5,00	9,07
	Среднее	19,61	17,00	18,72	-1,95	-0,34
	CO	8,58	5,71	6,20	6,05	5,42
	P-значение	HO	HO	HO	0,2336	0,8513

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
Плацебо	N	31	32	34	27	29
	Отсутствует	13	12	10	17	15
	Мин	0,84	0,28	0,31	-6,51	-5,91
	Медианное	14,89	14,47	17,85	0,23	3,82
	Макс	30,44	40,92	30,94	17,82	11,81
	Среднее	15,69	16,37	17,76	1,53	3,07
	CO	6,03	7,51	7,24	5,21	4,82
	P-значение	HO	HO	HO	0,2220	0,0032
	P-значение	0,0749	0,4463	0,6040	0,0650	0,0198

30

35

40

45

Таблица 12: CD4+ CD25+ CD45RO+ (% CD45RO+ клеток CD3+ CD4+ CD25+ или % Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих CD25)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	4,30	20,03	29,09	-54,63	-34,75
	Медианное	49,80	48,33	49,82	0,54	4,67
	Макс	79,94	81,02	75,62	38,33	22,71
	Среднее	50,68	49,47	50,48	0,51	0,94
	СО	17,76	14,48	11,69	15,44	12,57
Р-значение		HO	HO	HO	0,5814	0,4161
Плацебо	N	32	33	33	29	29
	Отсутствует	12	11	11	15	15
	Мин	1,36	4,51	21,47	-25,54	-26,73
	Медианное	44,76	42,96	48,32	2,13	12,56
	Макс	66,91	76,11	79,29	45,63	60,72
	Среднее	41,87	44,75	52,11	3,18	11,75
	СО	15,19	15,84	15,63	14,01	17,00
Р-значение		HO	HO	HO	0,2770	0,0006
Р-значение		0,0536	0,2195	0,7440	0,7690	0,0027

Таблица 13: CD4+ CD25+ CCR4+ CD45RO+ (% CD45RO+ клеток от CD4+ CD25+ CCR4+ клеток) (% Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих как CD25, так и CCR4)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	0,00	50,16	48,73	-16,72	-30,75
	Медианное	70,63	74,93	72,53	3,15	2,40
	Макс	91,41	91,89	92,78	64,64	20,14
	Среднее	69,16	73,65	72,40	4,13	1,96
	СО	16,42	9,60	11,23	14,97	11,94
Р-значение		HO	HO	HO	0,1406	0,2367

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	32	33	33	29	29
	Отсутствует	12	11	11	15	15
	Мин	7,09	47,80	42,75	-23,37	-10,71
	Медианное	68,36	72,43	75,77	2,30	6,65
	Макс	91,72	87,69	97,06	53,46	57,05
	Среднее	67,18	71,72	75,98	4,06	9,38
	CO	15,39	9,70	11,15	12,95	13,82
	P-значение	HO	HO	HO	0,0760	0,0007
	P-значение	0,4407	0,4513	0,1512	0,9181	0,0825

Таблица 14: CD4+ CD25^{выс}CD45RO+ (% CD45RO+ клеток от CD4+ CD25^{выс} клеток или % клеток памяти от Т-хелперных клеток с высокой экспрессией CD25)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	3,80	21,34	25,97	-53,86	-39,60
	Медианное	45,89	48,07	46,22	-0,95	-0,41
	Макс	82,58	84,63	71,63	39,87	30,38
	Среднее	48,43	46,67	47,65	-0,12	-0,29
	CO	18,10	15,41	12,85	15,80	15,81
	P-значение	HO	HO	HO	0,7905	0,8872
Плацебо	N	32	32	33	28	29
	Отсутствует	12	12	11	16	15
	Мин	1,82	14,37	19,27	-35,46	-41,68
	Медианное	41,13	40,76	44,30	0,45	7,78
	Макс	73,40	77,40	93,43	44,43	63,66
	Среднее	41,22	42,91	49,31	1,53	9,35
	CO	17,19	16,16	18,32	16,54	21,65
	P-значение	HO	HO	HO	0,6456	0,0121
	P-значение	0,1316	0,2188	0,9315	0,7891	0,0456

Таблица 15: CD4+ CD25^{выс} CCR4+ CD45RO+ (% CD45RO+ клеток от CD4+ CD25^{выс}CCR4+ или % Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих CCR4 и высокие уровни CD25)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	0,00	52,12	55,22	-19,05	-20,84
	Медианное	75,68	79,65	78,81	0,47	3,97
	Макс	97,30	92,41	95,63	70,53	28,18
	Среднее	73,10	77,16	77,04	3,32	1,84
	СО	17,86	9,84	10,22	16,78	11,65
	Р-значение	HO	HO	HO	0,5136	0,3259

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	32	32	33	28	29
	Отсутствует	12	12	11	16	15
	Мин	9,93	45,90	34,09	-21,33	-22,60
	Медианное	73,76	77,93	82,87	3,82	7,88
	Макс	94,87	89,46	98,37	64,49	66,47
	Среднее	71,24	75,47	81,30	4,20	10,67
	СО	17,52	10,28	12,33	16,12	17,87
	Р-значение	HO	HO	HO	0,2183	0,0011
Р-значение		0,6383	0,5311	0,0492	0,9790	0,0452

30

35

40

45

Таблица 15А: CD4+ CCR4+ CD45RO+ (% Т-хелперных клеток памяти, экспрессирующих CDR4 на их поверхности)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	1,71	44,95	38,12	-33,51	-27,79
	Медианное	65,03	70,17	66,43	1,27	0,50
	Макс	90,03	90,63	86,20	64,29	17,88
	Среднее	64,95	68,80	66,81	2,74	-0,32
	CO	15,29	9,60	10,60	15,27	10,20
P-значение		HO	HO	HO	0,1461	1,0000
Плацебо	N	32	33	34	29	30
	Отсутствует	12	11	10	15	14
	Мин	6,23	39,83	40,82	-19,87	-23,38
	Медианное	65,73	68,45	69,99	3,22	5,86
	Макс	84,23	90,04	90,64	33,60	41,56
	Среднее	62,97	67,78	70,12	4,63	7,63
	CO	15,11	10,42	11,82	12,77	13,92
P-значение		HO	HO	HO	0,0920	0,0026
P-значение		0,7338	0,7553	0,1900	0,5179	0,0110

Таблица 16: CD4+ CD62L^{низ} CD38+ (% CD62L^{низ} от CD38+ CD4+ или % Т-хелперов, экспрессирующих CD38 и низкие уровни CD62L)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	30	39	38	29	28
	Отсутствует	16	7	8	17	18
	Мин	1,30	1,42	0,94	-8,68	-6,11
	Медианное	3,90	3,86	3,57	-0,15	0,64
	Макс	10,53	20,90	23,76	7,98	19,44
	Среднее	4,89	5,32	5,58	0,17	1,03
	CO	3,03	4,01	4,45	3,87	5,00
P-значение		HO	HO	HO	0,6740	0,5670

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	31	32	33	27	28
	Отсутствует	13	12	11	17	16
	Мин	1,08	1,03	1,33	-10,31	-12,08
	Медианное	5,23	3,41	3,97	-1,11	-1,32
	Макс	15,50	20,62	20,32	14,44	17,54
	Среднее	6,52	5,50	5,31	-0,89	-1,29
	CO	4,12	4,88	3,90	5,04	5,50
P-значение		HO	HO	HO	0,1111	0,0735
P-значение		0,1292	0,4923	0,9202	0,1856	0,0753

Таблица 17: CD4+ CCR9+ β7+ (% CD4+ клеток, положительных по CCR9 и интегрину β7)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Lactobacilli	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	0,72	0,41	0,52	-4,42	-2,67
	Медианное	1,34	1,26	1,46	-0,13	0,21
	Макс	5,96	5,62	5,40	1,40	4,32
	Среднее	1,68	1,44	1,71	-0,41	0,06
	CO	1,11	0,88	0,94	1,12	1,25
P-значение		HO	HO	HO	0,0703	0,6227
Плацебо	N	32	31	34	27	30
	Отсутствует	12	13	10	17	14
	Мин	0,60	0,59	0,37	-7,10	-5,40
	Медианное	1,65	1,61	1,42	-0,03	-0,33
	Макс	8,71	2,68	3,31	1,24	1,79
	Среднее	2,07	1,62	1,61	-0,46	-0,57
	CO	1,62	0,63	0,74	1,75	1,36
P-значение		HO	HO	HO	0,5342	0,0237
P-значение		0,2378	0,0848	0,7900	0,4932	0,0382

Таблица 18: CD4+ CD25+ (% CD25+ CD3+ CD4+ клеток или % Т-хелперов, положительных по CD25)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	4,78	5,25	5,54	-8,36	-6,83
	Медианное	8,82	9,85	8,83	0,13	-0,10
	Макс	19,55	15,51	19,82	7,03	8,12
	Среднее	9,80	9,84	9,57	0,16	-0,12
	CO	3,65	2,21	2,99	3,44	4,21
	Р-значение	HO	HO	HO	0,7151	0,8078
Плацебо	N	32	33	33	29	29

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
	Отсутствует	12	11	11	15	15
	Мин	3,03	4,53	4,70	-5,89	-6,79
	Медианное	9,15	9,89	9,88	1,15	1,37
	Макс	20,66	15,39	18,29	5,76	12,74
	Среднее	9,76	10,02	10,60	0,66	1,60
	CO	3,76	2,69	3,83	3,06	3,74
	Р-значение	HO	HO	HO	0,1828	0,0121
	Р-значение	0,9628	0,9217	0,3423	0,4124	0,0971

30

35

40

45

Таблица 18А: CD4+ CD25+ общее количество CD45RA+ (% наивных CD4+ клеток, экспрессирующих CD25 на их поверхности)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	3,05	11,46	10,09	-23,80	-21,93
	Медианное	28,76	35,65	30,19	0,78	-0,80
	Макс	57,29	56,58	59,50	32,86	18,99
	Среднее	31,03	33,89	31,67	1,48	-1,18
	СО	14,08	11,63	11,48	11,96	9,86
Р-значение		HO	HO	HO	0,6554	0,5221
Плацебо	N	32	33	33	29	29
	Отсутствует	12	11	11	15	15
	Мин	19,96	15,04	12,36	-33,69	-32,45
	Медианное	39,71	35,61	35,89	-3,86	-3,76
	Макс	72,86	65,34	73,61	19,31	10,99
	Среднее	38,69	37,03	33,75	-3,38	-5,72
	СО	12,72	14,35	13,59	11,28	11,09
Р-значение		HO	HO	HO	0,1373	0,0179
Р-значение		0,0316	0,4770	0,6121	0,1244	0,1930

Таблица 19: CD4+ CD25^{выс} (% CD4+ клеток, высоко позитивных по CD25, которые рассматривались как Т-регуляторные клетки).

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	32	39	38	31	30
	Отсутствует	14	7	8	15	16
	Мин	1,83	2,12	2,22	-4,60	-4,14
	Медианное	3,93	4,52	4,30	0,52	0,08
	Макс	9,31	7,11	8,58	3,91	3,23
	Среднее	4,17	4,36	4,22	0,29	0,04
	СО	1,62	1,10	1,33	1,66	1,98
Р-значение		HO	HO	HO	0,2260	0,8670

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
Плацебо	N	32	33	33	29	29
	Отсутствует	12	11	11	15	15
	Мин	1,25	2,03	1,56	-3,54	-3,35
	Медианное	4,04	4,38	4,63	0,38	1,06
	Макс	8,99	7,52	8,26	3,64	5,39
	Среднее	4,21	4,49	4,76	0,47	0,90
	CO	1,63	1,37	1,71	1,54	1,82
P-значение		HO	HO	HO	0,0846	0,0081
P-значение		0,8493	0,8332	0,1720	0,7831	0,1026

Таблица 20: CD4+ CD25+ Foxp3+ (Т-регуляторные клетки как % от лейкоцитов)

Группа	Статистика	V0	V1	V2	V1–V0	V2–V0
<i>Lactobacilli</i>	N	31	39	38	30	29
	Отсутствует	15	7	8	16	17
	Мин	0,22	0,18	0,17	-1,78	-2,11
	Медианное	1,62	1,74	1,50	0,04	-0,15
	Макс	3,58	2,88	3,22	2,10	1,30
	Среднее	1,55	1,67	1,45	0,11	-0,20
	CO	0,79	0,66	0,64	0,86	0,87
P-значение		HO	HO	HO	0,4995	0,3276
Плацебо	N	29	33	34	26	27
	Отсутствует	15	11	10	18	17
	Мин	0,29	0,83	0,08	-0,84	-1,71
	Медианное	1,57	1,78	1,83	0,14	0,31
	Макс	2,75	3,43	3,78	1,32	2,32
	Среднее	1,54	1,74	1,82	0,19	0,32
	CO	0,64	0,54	0,85	0,64	0,91
P-значение		HO	HO	HO	0,1711	0,0521
P-значение		0,8515	0,9351	0,0326	0,6866	0,0275

Обсуждение

Основным открытием, имеющим важность в этом исследовании было наличие задержки повышения уровня аутоантител к tTG при использовании штаммов *Lactobacillus* у детей с сохраняющимся аутоиммунитетом при целиакии на нормальной диете (рис. 1 и 2). Это дает убедительные доказательства демпфирующего эффекта пробиотических добавок на ранний активный аутоиммунитет при целиакии, что никогда ранее не

наблюдалось. Было продемонстрировано, что только безглютеновая диета эффективно снижает уровни аутоантител к tTG с течением времени (Agardh D, et al., *Acta paediatrica*. 2004;93(8): 1046-51). Влияние *Lactobacillus* на аутоиммунитет при целиакии было

5 дополнительно подтверждено последовательными изменениями периферического иммунного ответа, вовлеченного в регуляцию Т-клеток, что наблюдалось только у детей в группе плацебо. Интересно, что различия в большинстве подмножеств лимфоцитов, обнаруженных в группе плацебо, были аналогичны тем, которые обнаруживаются у пациентов с активной целиакией.

Увеличение количества CD4+ CD25+ Foxp3+ Т-клеток в группе плацебо, которое

10 оставалось неизменным в группе лечения, можно объяснить эффектами подавления двух штаммов *Lactobacillus* на активированные клетки CD4+. Наблюдаемое уменьшение количества CD3+ CD4+ клеток в группе плацебо можно считать вторичным по отношению к компартментализации чувствительных к глютену лимфоцитов в слизистой оболочке кишечника. Кроме того, количество наивных клеток T_H, экспрессирующих

15 CD45RA, было снижено, и в то же время процент эффекторных T_H клеток и T_H клеток памяти, экспрессирующих CD45RO был выше в группе плацебо, что ранее наблюдалось у пациентов с целиакией, не подвергавшейся лечению, и объясняется более высоким процентным содержанием циркулирующих CD45+ $\alpha\beta$ TcR+ и $\gamma\delta$ TcR+ лимфоцитов, активированных глютеном (Kerttula TO, et al., *Clin Exp Immunol*. 1998;111(3): 536-40).

20 Это объяснение дополнительно подтверждается обнаружением повышенного процента клеток CD45RO+, также экспрессирующих CCR4, в группе плацебо, что предполагает рециркуляцию приморщенных регуляторных Т-клеток. CCR4 является важным хемокиновым рецептором для привлечения Т-клеток в очаг воспаления, и он высоко экспрессируется на дифференцированных регуляторных Т-клетках (Iellem A, et al., *Eur*

25 *J. Immunol*. 2003; 33 (6): 1488-96). Увеличение количества CD4+ CD25^{выс}CD45RO+ CCR4+ клеток и CD4+ CD25+ Foxp3+ клеток в группе плацебо указывает на попытку загасить продолжающееся воспаление кишечника и иммунный ответ на пищевые глютеновые антигены, как описано ранее (Frisullo G, et al., *Human Immunol*. 2009;70(6):430-5; Tiittanen M, et al., *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):498-507).

30 Третьим открытием, имеющим особое значение, были периферические изменения в NK-клетках с течением времени в группе плацебо с продолжающимся аутоиммунитетом при целиакии, который не наблюдался у детей, получавших пробиотики. Было обнаружено, что популяция NK-и NK-T-клеток снижается как в ткани, так и на

35 периферии при активной целиакии (Dunne MR, et al., *PLoS ONE*. 2013;8(10):e76008). Это согласуется с результатами нашего исследования, где мы обнаружили, что количество NK-клеток увеличилось в группе с пробиотиками, но не в группе с плацебо. Это также подтверждает важность NK-клеток при целиакии и то, что пробиотическая добавка может оказывать прямое или косвенное стимулирующее действие на NK-клетки, отраженное как уменьшенный аутоиммунный ответ на периферии.

40 Выводы

Подводя итог, сравнивая иммунные профили между группами, мы смогли выявить отчетливый подавляющий эффект на аутоиммунитет при целиакии, отраженный как снижение уровней аутоантител к tTG. Это наблюдение было дополнительно подкреплено 45 постоянными изменениями на периферии в пропорции Т-лимфоцитов, участвующих в аутоиммунной регуляции, и NK-клеток, что особенно наблюдалось у детей с продолжающимся аутоиммунитетом при целиакии, которые получали плацебо. Это новое открытие предлагает потенциальную новую область терапевтического

вмешательства с помощью пробиотических бактерий при аутоиммунном заболевании человека.

Мы выбрали для изучения иммунологические изменения, связанные с патологией CD без влияния GFD. Лечение GFD вызывает быстрое изменение некоторых

иммунологических маркеров, таких как tTGA, у пациентов с CD. (Midhagen G, et al., Journal of Internal Medicine. 2004;256(6):519-24) и (Agardh D, et al., Clinical and Experimental Immunology. 2006; 144(1):67-75). Следовательно, мы использовали низкий предел отсечения <30 Ед./мл для участия в исследовании, в соответствии с текущими диагностическими рекомендациями, утверждающими, что значительно повышенные уровни tTGA могут быть достаточным доказательством для постановки диагноза CD без биопсии кишечника (Husby S, et al., Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2012; 54 (1): 136-60). Поэтому ожидалось, что большинство наших участников вошли в исследование с низкими начальными уровнями tTGA в качестве раннего признака продолжающегося аутоиммунитета и это являлось неотъемлемым компонентом нашей популяции.

В то время как уровни IgA-tTGA и IgG-tTGA являются действительными диагностическими тестами на CD, текущие клинические рекомендации рекомендуют использование IgA-tTGA у детей с нормальными уровнями общего IgA из-за более высокой специфичности и клинической значимости (Husby S, et al., выше).

В этом исследовании изменения уровней IgA-tTGA в группе, получавшей пробиотические *Lactobacilli*, были снижены более значительно, чем в группе плацебо. Действительно, это было отражено у двух детей, получавших *Lactobacilli*, которые прогрессировали до высоких уровней от пригласительного посещения до визита 0, что значительно снижало их уровни IgA-tTGA через 3 и 6 месяцев, что указывает на то, что пробиотики могли оказывать влияние на некоторых детей с аутоиммунитетом при CD (данные не продемонстрированы).

Иллюстративные пробиотические *Lactobacilli*, используемые в этом клиническом исследовании, *Lactobacillus plantarum* HEAL9 и *Lactobacillus paracasei* 8700: 2, показали супрессирующее влияние на аутоиммунитет при CD у детей на глютенсодержащей диете.

Это указывало на то, что штаммы *Lactobacillus* могут предотвращать и/или задерживать аутоиммунитет при CD у лиц с «риском HLA», что предполагает возможное профилактическое применение пробиотических *Lactobacilli* при CD.

Насколько нам известно, это первое исследование с лечением, которое оценило и показало, что пробиотические виды *Lactobacilli* могут задерживать или предотвращать развитие продолжающегося аутоиммунитета при CD у детей с генетическим риском развития CD. Это указывает на то, что пробиотические штаммы *Lactobacillus* по данному изобретению можно использовать для задержки и/или предотвращения перехода от CDA к CD.

40 (57) Формула изобретения

1. Применение штамма *Lactobacillus* 8700:2 (DSM 13434) для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта.

2. Применение штамма *Lactobacillus Plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) для профилактики и/или лечения аутоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта.

3. Применение штамма *Lactobacillus paracasei* 8700:2 (DSM 13434) в сочетании со штаммом *Lactobacillus plantarum* HEAL 9 (DSM 15312) для профилактики и/или лечения

автоиммунитета при целиакии (CDA) или для профилактики и/или лечения целиакии (CD) у субъекта.

4. Применение по любому из пп. 1-3, в котором один или оба штамма вводят в количестве от 1×10^6 до 1×10^{12} колониеобразующих единиц (КОЕ) в день.

5. Применение по п. 4, в котором один или оба штамма вводят в количестве от 1×10^{10} колониеобразующих единиц (КОЕ) в день.

6. Применение по любому из пп. 1-5, в котором один или оба штамма представлены в композиции, содержащей подходящий наполнитель или носитель.

10 7. Применение по п. 6, в котором носитель представляет собой пищевой продукт и/или питательный микроэлемент.

8. Применение по п. 6 или 7, в котором композиция представлена в виде капсулы, таблетки или порошка для перорального введения.

15 9. Применение по любому из пп. 1-8, в котором один или оба штамма или композиция представлены в форме препарата, лиофилизированного вымораживанием.

10. Применение по любому из пп. 1-9, в котором субъект является человеком, который идентифицируется как имеющий повышенный риск CD по наличию одного или нескольких серологических, иммунологических и/или генетических факторов риска.

20 11. Применение по п. 10, в котором генетический фактор риска представляет собой HLA-DQ2 и/или HLA-DQ8.

12. Применение по п. 10 или 11, в котором фактор риска представляет собой постоянную позитивность ткани по трансглутаминазе (tTGA).

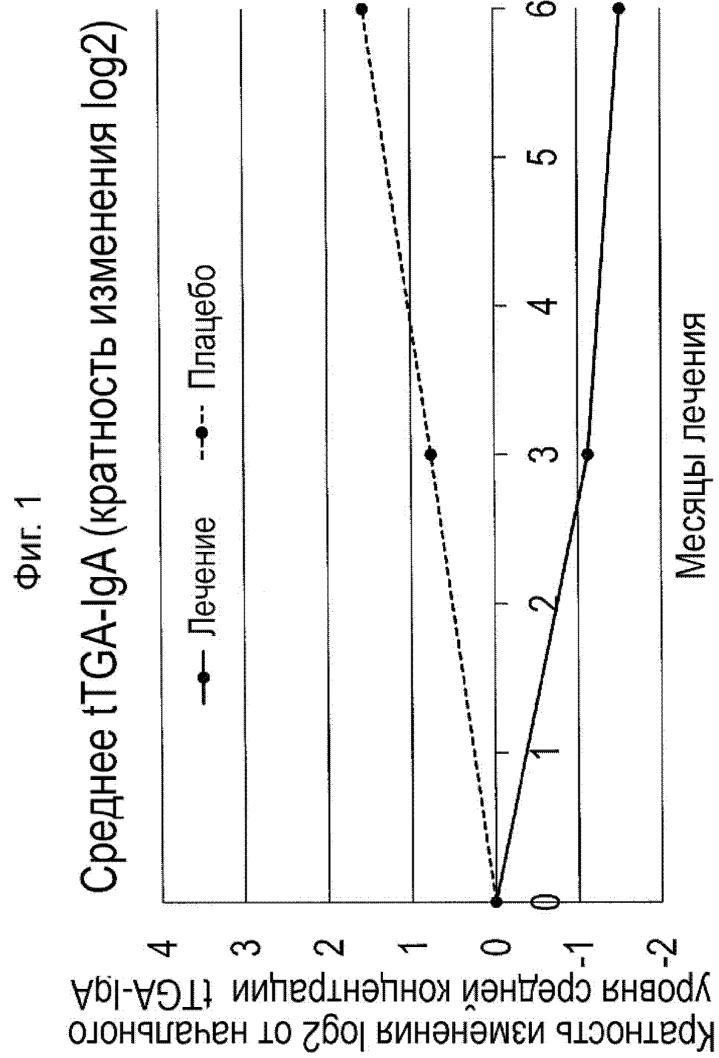
25

30

35

40

45



Фиг. 2

