



drn Bulletin

SCIENTIFIC RESEARCH AND VETERINARY INFORMATION

**I ceppi probiotici termodistrutti (tindalizzati) del Linkskin®
(DRN, Nextmune Italia) stimolano un profilo di citochine
antiallergiche nelle cellule del sangue periferico canino**

Carlos Fernandez Losano

Nextmune Spagna, Madrid, Spagna

Thierry Olivry

Nextmune AB, Stoccolma, Svezia

 nextmune Italy



I ceppi probiotici termodistrutti (tindalizzati) del Linkskin® (DRN, Nextmune Italia) stimolano un profilo di citochine antiallergiche nelle cellule del sangue periferico canino

Carlos Fernandez Losano

Nextmune Spagna, Madrid, Spagna

Thierry Olivry

Nextmune AB, Stoccolma, Svezia

Premessa:

L'effetto dei probiotici (cioè, dei batteri vivi) e dei postbiotici (cioè, dei batteri inattivati) sul sistema immunitario è eterogeneo tra i generi, le specie o i ceppi batterici [1-3].

Affinché i probiotici vivi e termodistrutti (tindalizzati) abbiano un effetto clinico benefico nei cani allergici, dovrebbero avere il seguente profilo immunostimolante:

- ▶ stimolazione delle risposte immunitarie Th1 e Treg
- ▶ assenza di stimolazione della risposta immunitaria Th2.

Le proprietà di cui sopra, combinate tra loro, dovrebbero avere l'effetto antiallergico desiderato.

Obiettivi:

In questo studio abbiamo voluto determinare la risposta citochinica dopo l'incubazione di cellule mononucleari del sangue periferico canino (PBMC) con i due ceppi probiotici termodistrutti (tindalizzati) contenuti in Linkskin® (DRN, Nextmune Italia).

Metodi:

Animali

Il sangue in EDTA è stato raccolto da cinque cani sani, senza storia di allergia o segni digestivi. I campioni sono stati raccolti al momento della vaccinazione o della sterilizzazione di routine in cani che non avevano ricevuto farmaci immunomodulanti (ad esempio, ciclosporina, oclacitinib o glucocorticoidi orali o iniettabili) nel mese precedente.

Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico

Le cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) sono state isolate mediante separazione a

gradiente di densità utilizzando Histopaque 1077 Hybri-Max (Sigma-Aldrich/Merck Life Sciences, Madrid, Spagna).

In primo luogo, 5 ml di sangue in EDTA sono stati diluiti e miscelati 1:1 in soluzione fisiologica allo 0,9% prima dell'aggiunta di 3 ml di Histopaque 1077.

Questa miscela è stata centrifugata per 30 minuti a 2000 rpm senza interruzioni.

Lo strato di PBMC è stato prelevato e sottoposto a tre cicli successivi di lavaggio con soluzione fisiologica.

Dopo l'ultima centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e le PBMC sono state risospese in 5 ml di terreno Gibco AIM-V (Fisher Scientific Spagna, Madrid, Spagna).

La vitalità cellulare è stata verificata mescolando 20 µL di sospensione di PBMC con 20 µL di blu di Trypan (Fisher Scientific) e contando le cellule vive su un conta cellule automatico TC20 (Bio-Rad, Barcellona, Spagna); sono stati conservati solo i campioni con oltre il 70% di cellule vitali per la stimolazione con allergeni alimentari.

Infine, la sospensione di PBMC è stata impostata ad 1 milione di cellule/ml nel terreno AIM-V.

Stimolazione batterica

Le PBMC sono state frazionate e collocate in pozzetti differenti in modo che le cellule potessero essere poste in coltura con i due diversi ceppi probiotici uccisi a caldo, ossia tindalizzati, (*Lactobacillus rhamnosus* SGL01 e *Lactobacillus reuteri*, SGL06), mentre un pozzetto è stato utilizzato come controllo senza batteri.

Il rapporto di stimolazione PBMC: batteri era 1:5 (ad esempio, 2 x 10⁵ PBMC e 1x10⁶ batteri).

Le cellule sono state coltivate in co-cultura per 3 giorni con il supernatante raccolto prima e dopo 12, 24, 48 e 72 ore.

Misurazione delle citochine

Per ogni agente batterico stimolante e per ogni punto temporale, i livelli di citochine sono stati determinati mediante ELISA (Bio-Techne R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) convalidato per la misurazione di IFN-gamma, IL-4, IL-10 e IL-12 canini.

Dopo aver ottenuto le concentrazioni di citochine nel surnatante, abbiamo calcolato gli indici di stimolazione (SI) dei livelli di citochine dopo la co-cultura con ciascuno dei due ceppi probiotici rispetto a quelli coltivati con soluzione salina allo stesso punto temporale.

Analisi statistiche

I livelli di citochine sono stati confrontati mediante ANOVA a misurazione ripetuta

con test post hoc, confrontando ogni punto temporale con quello senza stimolazione.

Risultati:

L'incubazione delle PBMC canine con entrambi i ceppi di probiotici tindalizzati ha portato ad un aumento significativo (ANOVA a misure ripetute, $P < 0,001$) dei livelli di citochine rilasciate nei surnatanti, a partire già da 12 ore dopo l'inizio dell'incubazione e continuando per tutte le 72 ore di co-cultura (**vedi figura 1**).

Entrambi i ceppi di *Lactobacillus Rhamnosus* e *Reuteri* hanno determinato una stimolazione simile della produzione di citochine, più elevata per IL-12 (circa 2.000-2.500 pg/ml a 72 ore) e IL-10 (1.500-2.000) rispetto all'interferone-gamma (500-700); più bassa per IL-4 (circa 200). Infatti, dopo 72 ore di coltura, il rapporto IL-12:IL-4 era superiore a 8, indicando un forte effetto anti-Th2.

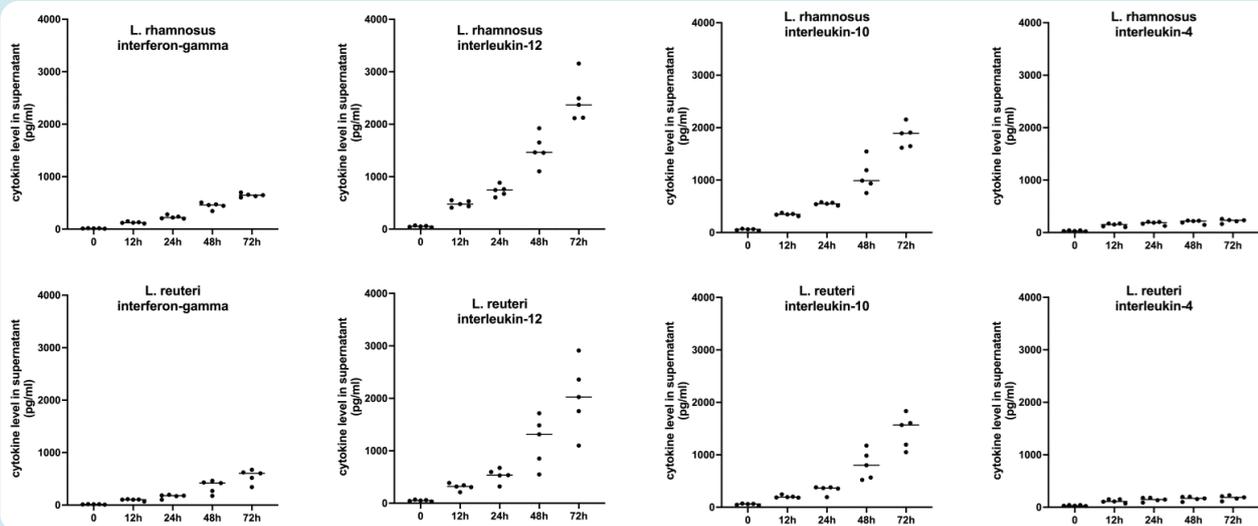


Figura 1

Abbiamo quindi confrontato gli indici di stimolazione (SI) del rilascio di citochine dopo la stimolazione con probiotici rispetto a quella senza probiotici.

Come si può vedere di seguito, i due ceppi di *Lactobacillus* hanno stimolato in modo marcato l'IL-12, l'interferone-gamma e l'IL-10, rispetto all'IL-4. Mentre la quantità di IL-4 è aumentata leggermente nel tempo dopo la stimolazione con il probiotico, lo ha fatto anche senza stimolazione, con il rapporto SI che è rimasto costante e inferiore a 5.

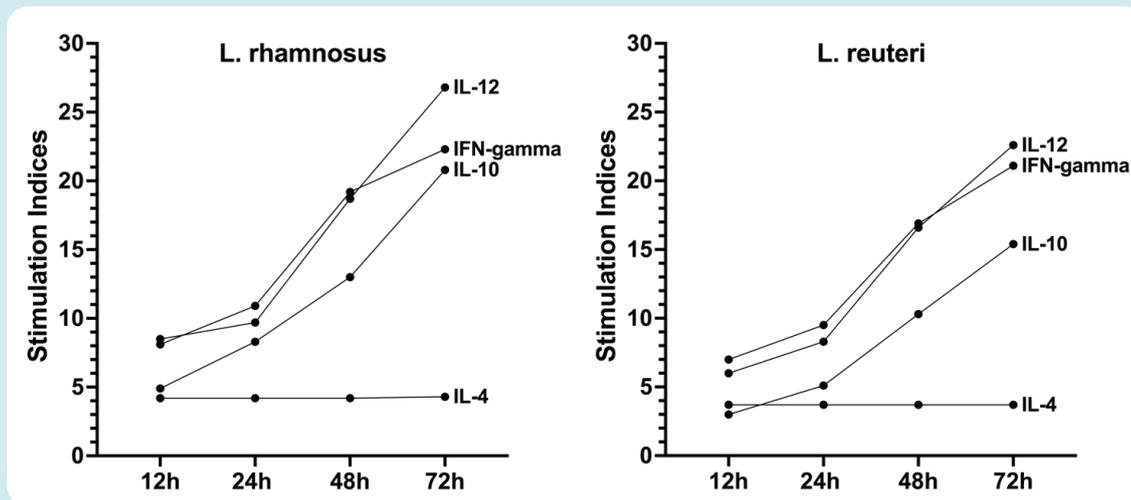


Figura 2

Conclusioni:

I due ceppi di *Lactobacillus* inclusi in Linkskin, anche se tinalizzati (termodistrutti), stimolano i linfociti canini ad avere un profilo immunitario anti-allergico, cioè una stimolazione delle citochine Th1 (IL-12, interferone-gamma) e Treg (IL-10) rispetto alla citochina Th2 (IL-4).

Questi ceppi possiedono quindi il profilo ideale per essere utilizzati come coadiuvanti nella terapia multimodale delle malattie allergiche del cane.

Bibliografia

1. Neau, E.; Delannoy, J.; Marion, C.; Cottart, C.; Labellie, C.; Holowacz, S.; Butel, M.; Kapel, N.; Waligora-Dupriet, A. Three novel candidate probiotic strains with prophylactic properties in a murine model of cow's milk allergy. *Appl Environ Microbiol* 2016, 82, 1722-1733.
2. Azad, M.A.K.; Sarker, M.; Wan, D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *Biomed Res Int* 2018, 2018, 8063647.
3. Steiner, N.C.; Lorentz, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* species in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2021, 182, 807-818.