



Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης,
Αγροδιατροφής και
Διαχείρισης Φυσικών Πόρων
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ -1 ΚΑΙ -9 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ
ΕΝΤΕΡΟΥ

ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων Επίκουρος Καθηγητής:
Νικόλαος Αφράτης



Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης,
Αγροδιατροφής και
Διαχείρισης Φυσικών Πόρων

Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ -1 ΚΑΙ -9 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ
ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΦΡΑΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΕΡΠΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΝΑΥΣΙΚΑ

ΨΑΧΝΑ, 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις Η.Π.Α, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) είναι η τρίτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ στην Ελλάδα αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου, με αύξηση κατά 12% την περίοδο 2011 με 2019. Αυξανόμενη ιατρική σημασία έχουν αποκτήσει τα προβιοτικά λόγω της ευεργετικής τους επίδρασης στον ανθρώπινο οργανισμό που συνδέεται με την πρόληψη και τη θεραπεία πολλών χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και εξέλιξη του CRC διαδραματίζει η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τον εξωκυττάριο χώρο (ECM). Τα ένζυμα που αποικοδομούν τον ECM, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αναδιαμόρφωση του ECM. Στον CRC, η έκφραση και των MMPs συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο της νόσου και την κακή της πρόγνωση.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε το προβιοτικό *Lactobacillus acidophilus*, με σκοπό να ανιχνευθεί η επίδραση του στην έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών-1 (MMP-1) και -9 (MMP-9) σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά, καλλιεργήθηκαν οι δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι Caco-2 και HT-29, παρουσία του θρεπτικού μέσου του προβιοτικού *L. acidophilus*. Στην συνέχεια, έγινε απομόνωση του ολικού RNA των καρκινικών κυττάρων, σύνθεση cDNA και τέλος πραγματοποιήθηκε real-time PCR ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της *MMP-1* και *MMP-9*. Στην καρκινική σειρά Caco2 παρατηρήθηκε υπερέκφραση και των δύο MMPs, ενώ στην HT29, η υπερέκφραση περιορίστηκε μόνο στην MMP-1, καθώς η MMP-9 δεν διαφοροποιήθηκε. Γεγονός που μας δείχνει ότι η παρουσία του προβιοτικού *L. acidophilus* μπορεί να έχει αρνητική εξέλιξη στην πορεία της νόσου αν χορηγηθεί μόνο του σε ασθενείς με CRC.

SUMMARY

In the U.S.A, colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer death in both men and women, while in Greece it is the second leading cause of death, with a 12% increase between 2011 and 2019. Probiotics have gained increasing medical importance due to the beneficial effect on the human body associated with preventing and supporting the treatment of many chronic diseases, including cancer, without side effects. An important role in the creation and evolution of CRC is played by the interaction of cancer cells with the extracellular matrix (ECM). The proteins that degrades the ECM, such as metalloproteinases (MMPs), play a critical role in cell proliferation, migration and remodeling of the ECM. In CRC, the expression of both MMPs is associated with advanced disease stage and poor prognosis.

In this study, the probiotic *Lactobacillus acidophilus* was studied to detect its effect on the gene expression of the metalloproteinases *MMP-1* and *MMP-9* in Caco-2 and HT-29 colon cancer cells. For this purpose, initially, two cancer cell lines were cultured, as well as the probiotic *L. acidophilus*. Afterwards, the total RNA of the cancer cells was isolated, cDNA was synthesized, and finally real-time PCR was performed to study the gene expression levels. In the Caco2 cancer line, overexpression of both MMPs was observed, while in HT29, overexpression was limited to MMP-1 only, as MMP-9 did not differentiate. This suggests that the presence of the probiotic *L. acidophilus* may have a negative progression in the course of the disease if administered alone to patients with CRC.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	3
Summary	4
Πίνακας περιεχομένων	5
Πίνακας συντομογραφιών	6
Κατάλογος πινάκων	8
Κατάλογος σχημάτων	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ	10
1.1 Ιστορική Αναδρομή	10
1.2 Ορισμός	11
1.3 Μέλη του μικροβιώματος	12
1.4 Μικροβίωμα του εντέρου	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ	14
2.1 Εισαγωγικά για Προβιοτικά	14
2.2 Επιδράσεις προβιοτικών	15
2.3 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	16
3.1 Εισαγωγή	16
3.2 Ογκογόνοι μικροοργανισμοί	17
3.3 Η σημαντικότητα των μικροοργανισμών στον καρκίνο	17
3.4 Συμβολή του μικροβιώματος στη θεραπεία	18
3.5 Καρκίνος του εντέρου	20
3.6 Προοπτικές για το μικροβίωμα του καρκίνου	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ	22
4.1 Εισαγωγή/ Ορισμός	22
4.2 Σύσταση του ECM	22
4.3 Οργάνωση του ECM στο επιθήλιο, στους υποκείμενους συνδετικούς ιστούς και στα οστά	24
4.4 Γενετικές ασθένειες που σχετίζονται με το ECM	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΕΣ	26
5.1 Πρωτεολυτικά Ένζυμα του ECM	26
5.2 Ορισμός και Είδη	26
5.3 Δομικά Χαρακτηριστικά	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	30
6.1 Καλλιέργεια Καρκινικών Σειρών	30
6.2 Καλλιέργεια <i>Lactobacillus acidophilus</i> και Παραγωγή του Condition Media	30
6.3 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυττάρων	30
6.4 Απομόνωση RNA και Σύνθεση cDNA	31
6.5 Real-time PCR	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<i>ΣΥΝΤΜΗΣΗ</i>	<i>ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ</i>	<i>ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ</i>
CAC	Coronary artery calcium	Κολίτιδα
CDT	Carbohydrate deficient transferrin	Κυτταροτοξική διαστατική τοξίνη
CRC	Colorectal cancer	Καρκίνος παχέος εντέρου
DDR	DNA-Damage Response	Κυτταρικό δίκτυο απόκρισης βλάβης DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EBV	Epstein-Barr virus	Ιός Έπσταϊν Μπαρ
ECM	Extracellular matrix	Εξωκυττάριος χώρος
EDS	Ehlers-Danlos syndrome	Σύνδρομο Ehlers-Danlos
FAO-WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
GAG	Glycosaminoglycan	Γλυκοζαμινογλυκάνες
GFR	Glomerular filtration rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
HBV	Hepatitis B virus	Ηπατίτιδα Β
HCV	Hepatitis C virus	Ηπατίτιδα C
HPV	Human Papilloma virus	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων
IARC	International Association for Cancer Registries	Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο
IBD	Inflammatory Bowel Disease	Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου
LAB	Lactic acid bacteria	Βακτήρια Γαλακτικού Οξέος
LOX	Lysyl oxidase	Λυσυλ-οξειδάση
LTBP	Latent transforming growth factor	Λανθάνον μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας
MMP	Matrix metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάση
OCN	Osteocalcin	Οστεοκαλσίνη
OPN	Osteopontin	Οστεοποντίνη
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
SCC	Squamous cell carcinoma	Σποραδικός καρκίνος παχέος εντέρου
SCFAs	Short-chain fatty acids	Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλυσίδας
SLRP	Small leucine-rich proteoglycans	Μικρή πλούσια σε λευκίνη πρωτεογλυκάνη

SPARC	Secreted protein, acidic and rich in cysteine	Όξινη και πλούσια σε κυστεΐνη εκκρινόμενη πρωτεΐνη
TGFβ	Transforming growth factor-beta	Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases	Ίστικοί αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών
TSP	Thrombospondin	Θρομβοσπονδίνη

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ MMPs ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥΣ.....	27
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ MMPs ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ, ΤΗ ΣΕΙΡΙΑΚΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ	28
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: FORWARD ΚΑΙ REVERSE ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ REAL-TIME PCR.....	31

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ.....	13
ΣΧΗΜΑ 2: ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	20
ΣΧΗΜΑ 3: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ECM ΣΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΣΤΑ	25
ΣΧΗΜΑ 4: ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ MMPs	29
ΣΧΗΜΑ 5: ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	30
ΣΧΗΜΑ 6: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MMP1 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ CACO2	32
ΣΧΗΜΑ 7: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MMP1 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HT29	33
ΣΧΗΜΑ 8: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MMP9 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ CACO2	34
ΣΧΗΜΑ 9: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MMP9 ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HT29.....	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η γνώση του μικροβιώματος έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον τις τελευταίες δύο δεκαετίες, όχι μόνο στην επιστημονική κοινότητα αλλά και στο ευρύ κοινό, ιδίως ως τομέας ανάπτυξης νέων θεραπειών.

Μόνο την τελευταία δεκαετία, περισσότερα από 1,7 δισεκατομμύρια δολάρια έχουν δαπανηθεί για την έρευνα του ανθρώπινου μικροβιώματος, καθιστώντας το μικροβίωμα έναν ακμάζοντα κλάδο της ιατρικής έρευνας και όχι έναν αναδυόμενο τομέα (7).

Πέρα από την ανθρώπινη υγεία, η έρευνα του μικροβιώματος παρέχει τη βάση για εφαρμογές σε έναν ευρύτερο τομέα. Οι πρόοδοι στην περιβαλλοντική μικροβιομηχανική θα αντικαταστήσουν στο μέλλον τα τοξικά χημικά στη γεωργία, την κηπουρική και την υδατοκαλλιέργεια, θα προωθήσουν μια πιο βιώσιμη χρήση των περιβαλλοντικών πόρων και θα βελτιώσουν την επεξεργασία των τροφίμων (37). Τα γεωργικά προϊόντα που βασίζονται στο μικροβίωμα αποτελούν έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς της γεωργικής επιστήμης, με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 15-18%, και εκτιμάται ότι θα ξεπεράσουν τα 10 δισεκατομμύρια δολάρια έως το 2025. Η έρευνα του μικροβιώματος μπορεί επίσης να δώσει λύσεις για το πώς οι άνθρωποι και άλλες μορφές ζωής στον πλανήτη μπορούν να συμβάλουν στην επίλυση του ευρύτερου προβλήματος της κλιματικής αλλαγής που προκαλείται από τον άνθρωπο (8).

Ιστορικά, ο τομέας της έρευνας του μικροβιώματος προέκυψε από τη μελέτη του περιβαλλοντικού μικροβιώματος (μικροβιακή οικολογία) και αποτελεί μια διεπιστημονική πλατφόρμα. Αυτός ο νέος τομέας παρείχε νέες και σημαντικές έννοιες για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-μικροβιώματος, όπως η θεωρία του ολοβιώματος και η έννοια των μεταοργανισμών. Επιπλέον, αρχές όπως η συν-εξέλιξη, η συν-επιλογή και οι αντιδράσεις στο στρες εντός του μικροβιώματος υπερβαίνουν κατά πολύ το πεδίο εφαρμογής αυτών των παραδοσιακών εννοιών (7).

Για να κατανοήσουμε πώς η έρευνα του μικροβιώματος αναδείχθηκε ως ένας κλάδος στο κέντρο της σύγχρονης ζωής, είναι σημαντικό να εξετάσουμε σημαντικές ιστορικές εξελίξεις. Ο τομέας της έρευνας του μικροβιώματος ξεκίνησε τον 7ο αιώνα, προερχόμενος από τη μικροβιολογία. Οι πρόοδοι στην έρευνα συχνά προκύπτουν από την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και εργαλείων. Είναι ενδιαφέρον ότι πολλές τεχνολογικές ανακαλύψεις έχουν ενισχύσει τη μικροβιολογική έρευνα, οδηγώντας σε αλλαγές στην κατανόηση της υγείας και της ασθένειας. Οι μολυσματικές ασθένειες επηρέαζαν τους ανθρώπινους πληθυσμούς σε μεγάλο μέρος της ιστορίας, οπότε η ιατρική μικροβιολογία αποτέλεσε από νωρίς αντικείμενο έρευνας και ενδιαφέροντος για το κοινό. Η μικροβιολογία των τροφίμων αποτελεί επίσης εδώ

και πολύ καιρό έναν τομέα εμπειρικής εφαρμογής. Η ανάπτυξη του πρώτου μικροσκοπίου επέτρεψε την ανακάλυψη νέων και άγνωστων κόσμων και οδήγησε στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Η πρόσβαση σε έναν προηγούμενος αθέατο κόσμο άνοιξε τα μάτια και τα μυαλά των ερευνητών του 70ού αιώνα. Ο Antonie van Leeuwenhoek ανέλυσε διάφορα είδη βακτηρίων, μυκήτων και πρωτόζωων, κυρίως από δείγματα νερού, λάσπης και οδοντικής πλάκας, και τα ονόμασε πανίδα. Αργότερα ανακάλυψε τα βιοϋμένια, την πρώτη απόδειξη ότι οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν σε μια πολύπλοκη κοινότητα. Η εξήγηση του Ρομπέρτο Κοχ για την προέλευση των ασθενειών του ανθρώπου και των ζώων ως αποτέλεσμα μικροβιακής μόλυνσης και η εισαγωγή της έννοιας της παθογένειας αποτέλεσαν σημαντικούς σταθμούς για τη μικροβιολογία. Οι ανακαλύψεις αυτές έστρεψαν την προσοχή των ερευνητών και του κοινού στο ρόλο των μικροοργανισμών ως αιτία εμφάνισης ασθενειών που πρέπει να εξαλειφθούν. Ωστόσο, η εκτεταμένη έρευνα κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα αποκάλυψε ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό μικροοργανισμών συνδέεται με ασθένειες και παθογένειες. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του οικοσυστήματος και αλληλεπιδρούν ευεργετικά με άλλους μικροοργανισμούς καθώς και με μακροοργανισμούς. Στα τέλη του 19ου αιώνα, η μικροβιακή οικολογία ξεκίνησε με το πρωτοποριακό έργο των Martinus W. Beijerinck και Sergei N. Winogradsky. Η περιβαλλοντική μικροβιολογία οδήγησε σε μια νέα αλλαγή επειδή οι μικροοργανισμοί ήταν πανταχού παρόντες στο φυσικό περιβάλλον, συνδέονταν με τους ξενιστές τους και αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι είχαν ευεργετικές επιδράσεις. Στη συνέχεια, η ιδέα ότι οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε μεμονωμένα κύτταρα άρχισε να αλλάζει και έγινε ολοένα και πιο σαφές ότι οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε πολύπλοκα σύνολα και ότι η αλληλεπίδραση και η επικοινωνία μεταξύ των ειδών είναι σημαντικές για τη δυναμική του πληθυσμού και τη λειτουργική δραστηριότητα. Η ανακάλυψη του DNA και η ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχισης, PCR και κλωνοποίησης κατέστησαν δυνατή τη διερεύνηση μικροβιακών κοινοτήτων με τη χρήση προσεγγίσεων που βασίζονται σε DNA και RNA χωρίς καλλιέργειες (7).

1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ

Οι περισσότεροι υπάρχοντες ορισμοί αδυνατούν να συλλάβουν αυτή την πολυπλοκότητα και ορίζουν τον όρο μικροβίωμα ώστε να περιλαμβάνει μόνο το γονιδίωμα του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, η εκδοτική πλατφόρμα Merriam Webster προτείνει δύο διαφορετικούς ορισμούς για το μικροβίωμα: Ο ένας για το μεταγονιδίωμα, ο άλλος για τη μικροβιακή κοινότητα, αλλά και πάλι αποτυγχάνει να συλλάβει τον ξενιστή και το περιβάλλον όχι ως ανεξάρτητες οντότητες αλλά ως αναπόσπαστα οικολογικά συστατικά του μικροβιώματος.

Μια μικροβιακή κοινότητα ορίζεται κατ' επέκταση ως μια συλλογή μικροοργανισμών που ζουν μαζί. Πιο συγκεκριμένα όμως, μια μικροβιακή κοινότητα ορίζεται ως μια συλλογή πολλαπλών ειδών (μικροβιακών) οργανισμών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα συνεχές περιβάλλον (7). Το 1988, οι Whipps et al. μελετώντας την οικολογία των μικροοργανισμών του ριζοστρώματος έδωσαν τον πρώτο ορισμό του όρου μικροβίωμα. Ορισαν το "μικροβίωμα" ως συνδυασμό των λέξεων "micro" και "biome" και αναφέρθηκαν σε μια "χαρακτηριστική μικροβιακή κοινότητα" σε ένα "αρκετά καλά καθορισμένο βίοτοπο με διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες" ως "πεδίο δραστηριότητας". Αυτός ο ορισμός μιας μικροβιακής

κοινότητας με σαφώς καθορισμένα χαρακτηριστικά και λειτουργίες και η αλληλεπίδρασή της με το περιβάλλον της για τη διαμόρφωση μιας συγκεκριμένης οικολογικής θέσης αποτελεί σημαντική πρόοδο στον ορισμό των μικροβιακών κοινοτήτων. Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί άλλοι ορισμοί του μικροβιώματος που έχουν δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια. Ο πιο αναφερόμενος ορισμός, από τον Lederberg, ορίζει το μικροβίωμα σε οικολογικό πλαίσιο ως την κοινότητα ομοειδών, συμβιωτικών και παθογόνων μικροοργανισμών σε θέσεις του σώματος και σε άλλα περιβάλλοντα. Οι Marchesi και Ravel ορίζουν το μικροβίωμα ως την κοινότητα ομοειδών, συμβιωτικών και παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα δεδομένο περιβάλλον και εστιάζουν σε γονιδιωματικά και μικροβιακά (και ιικά) πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και πρωτεώματα υπό γενικές βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες. Αυτοί οι ορισμοί σημαίνουν ότι οι γενικές έννοιες της μακροοικολογίας μπορούν εύκολα να εφαρμοστούν στις αλληλεπιδράσεις μικροβίων-μικροβίων και μικροβίων-ξενιστών. Ωστόσο, δεν είναι απολύτως σαφές σε ποιο βαθμό αυτές οι έννοιες που αναπτύχθηκαν για τους μακροευκαρυώτες μπορούν να εφαρμοστούν όχι μόνο στους μικροευκαρυώτες, αλλά και στους προκαρυώτες με διαφορετικό τρόπο ζωής όσον αφορά τον λήθαργο, τη φαινοτυπική παραλλαγή και την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (39).

1.3 ΜΕΛΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ

Ο μικροβιόκοσμος περιλαμβάνει όλα τα ζώντα μέλη του μικροβιώματος. Τα βακτήρια, τα αρχαία, οι μύκητες, τα φύκη και οι μικροοργανισμοί πρέπει να θεωρούνται μέλη του μικροβιώματος (34). Οι περισσότεροι ερευνητές του μικροβιώματος συμφωνούν στον ορισμό ότι το μικροβίωμα είναι μια ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών που καταλαμβάνει ένα αρκετά καλά καθορισμένο βιότοπο με διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες. Η συμπερίληψη των φάγων, των ιών, των πλασμιδίων και των κινητών γενετικών στοιχείων είναι μία από τις πιο αμφιλεγόμενες πτυχές του ορισμού του μικροβιώματος. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές δεν έχουν δώσει σαφή απάντηση στο ερώτημα αν οι ιοί και οι φάγοι πρέπει να αποτελούν μέρος του μικροβιώματος. Δεν υπάρχει επίσης σαφής συναίνεση σχετικά με το αν το εξωκυττάριο DNA από νεκρά κύτταρα (το λεγόμενο "relic DNA") ανήκει στο μικροβίωμα. Το relic DNA μπορεί να αντιπροσωπεύει έως και το 40% της αλληλουχίας του DNA στο έδαφος, ενώ σε μια ολοκληρωμένη ανάλυση οικοτόπων κατά μέσο όρο αντιστοιχούσε στο 33% του συνολικού βακτηριακού DNA και σε ορισμένα δείγματα έφτανε έως και το 80%. Είναι ενδιαφέρον ότι, παρά την πανταχού παρουσία και την αφθονία του, το relic DNA είχε μικρή επίδραση στις εκτιμήσεις της ταξινομικής και φυλογενετικής ποικιλότητας. Όσον αφορά τη χρήση συγκεκριμένης ορολογίας, η σαφής διάκριση μεταξύ μικροβιώματος και μικροχλωρίδας αποφεύγει τις διαφωνίες σχετικά με τα μέλη του μικροβιώματος. Η μικροχλωρίδα ορίζεται γενικά ως η κοινότητα των ζωντανών μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα καθορισμένο περιβάλλον. Οι φάγοι, οι ιοί, τα πλασμίδια, τα πρίονια, οι ιοί και το ελεύθερο DNA δεν θεωρούνται γενικά ζωντανοί μικροοργανισμοί και, επομένως, δεν αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας. Επομένως, όλα τα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως οι φάγοι, οι ιοί, τα "υπολείμματα" και το εξωκυτταρικό DNA θα πρέπει να περιλαμβάνονται στον όρο μικροβίωμα, αλλά δεν αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας (7).

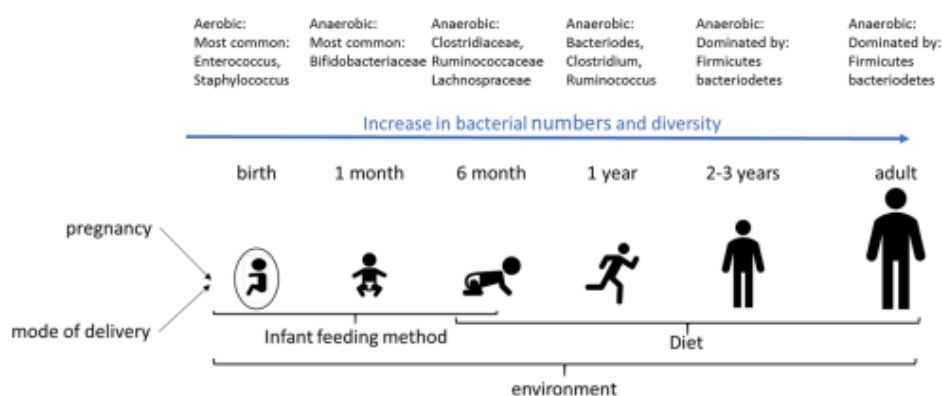
1.4 ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπινου εντέρου αποτελείται από τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς που σχηματίζουν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα. Ορισμένοι ερευνητές εκτιμούν ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο έντερο είναι δεκαπλάσιος του συνολικού αριθμού των ανθρώπινων σωματικών κυττάρων, αλλά οι πρόσφατες εκτιμήσεις είναι συγκρίσιμες και υπολογίζουν ότι ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων στο ανθρώπινο σώμα είναι περίπου $3,8 \times 10^{13}$ (15).

Ανωμαλίες στον εντερικό μικροβίωμα έχουν αναφερθεί σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του IBD (ΣΕΕ, Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου), και εξωγενείς παράγοντες όπως τα αντιβιοτικά πιστεύεται ότι προκαλούν επίσης διαταραχές στον εντερικό μικροβίωμα (35).

Το μικροβίωμα του ανθρώπινου εντέρου περιλαμβάνει βακτήρια που είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή και βακτήρια που είναι παθογόνα. Ένας σημαντικός ρόλος των ωφέλιμων βακτηρίων είναι η μεταβολική παραγωγή SCFAs (Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλυσίδας) μέσω της διασταυρούμενης διατροφής.

Η ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος κατά την περιγεννητική περίοδο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία κύησης, ο τρόπος τοκετού, το μητρικό μικροβίωμα, η διατροφή του βρέφους, και τέλος, γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Μικροβιακή ποικιλομορφία υπάρχει ήδη κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του βρέφους. Κατά τη γέννηση, το μικροβίωμα είναι αερόβιο και ποικιλόμορφο και τα πιο κοινά βακτήρια είναι εκούσια αναερόβια και μέλη του γένους *Enterobacteriaceae*. Μετά από λίγες ημέρες, το περιβάλλον του εντέρου γίνεται αναερόβιο και βακτήρια όπως το *Bifidobacterium* πολλαπλασιάζονται. Με την εισαγωγή στερεών τροφών από την ηλικία των 6 μηνών, αρχίζει να διαμορφώνεται μια πιο ώριμη μικροβιακή χλωρίδα, στην οποία κυριαρχούν εκπρόσωποι των γενών *Firmicutes* και *Bacteroidetes* (βλ. Σχήμα 1) (35).



Σχήμα 1: Η ανάπτυξη του βρεφικού μικροβιώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του προτύπου σίτισης του μωρού, της διατροφής και του περιβάλλοντος. Ο τρόπος τοκετού (κολπική ή καισαρική τομή) επηρεάζει επίσης το μικροβίωμα κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής. Έχει επίσης αποδειχθεί η μεταφορά βακτηρίων από τη μητέρα στο έμβρυο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εγκυμοσύνη μπορεί να είναι σημαντική για το σχηματισμό αποικιών του εντέρου του εμβρύου ή του βρέφους (35).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΓΙΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

Η ιστορία των προβιοτικών στην επιστήμη χρονολογείται από τις αρχές του 20ού αιώνα, όταν ο Ρώσος μικροβιολόγος Ilya Metchnikov (1845-1916) δημοσίευσε τη μελέτη του "Η εξάρτηση των εντερικών μικροβίων από τα τρόφιμα καθιστά δυνατή την υιοθέτηση μέτρων για την τροποποίηση της χλωρίδας στο σώμα μας και την αντικατάσταση επιβλαβών μικροβίων με χρήσιμα μικρόβια" (23).

Ωστόσο, ο όρος "προβιοτικά" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε αυτό το πλαίσιο το 1974 και εξελίχθηκε εννοιολογικά στον σημερινό αποδεκτό ορισμό από τον FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), στο οποίο τα προβιοτικά χαρακτηρίζονται ως "ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν όφελος για την υγεία στον ξενιστή".

Σήμερα, τα προβιοτικά αποτελούν μια αναπτυσσόμενη βιομηχανία πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων και ένα από τα πιο διαδεδομένα συμπληρώματα διατροφής στον κόσμο. Τρόφιμα όπως το γιαούρτι, το τυρί, το παγωτό, τα σνακ και οι μπάρες διατροφής, τα δημητριακά πρωινού και τα βρεφικά γάλατα, καθώς και τα καλλυντικά περιέχουν προβιοτικά. Μπορούν να διατεθούν στο εμπόριο ως λυοφιλοποιημένα δισκία. Η κατανάλωση προβιοτικών προωθείται ευρέως από τους γιατρούς, ιδίως τους γαστρεντερολόγους (40).

Ωστόσο, παρά τη μακροχρόνια χρήση προβιοτικών στελεχών για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας, οι ερευνητές συνεχίζουν να αναπτύσσουν νέα προβιοτικά στελέχη. Σήμερα, τα περισσότερα προβιοτικά προϊόντα αναπτύσσονται με *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* και όπως *Lactobacillus* και *Streptococcus* (4).

Οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τα προβιοτικά είδη στη βιοϊατρική έρευνα έχουν επικεντρωθεί στην ομάδα των *Lactobacillus*. Σε μελέτες του εντερικού μικροβιόκοσμου, οι γαλακτοβακίλλοι έχουν αναφερθεί ως το σημαντικότερο προβιοτικό της ομάδας των γαλακτοβακίλλων. Οι αλλαγές στη σύνθεση, την ποικιλομορφία και τη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου από προβιοτικά είδη έχουν μελετηθεί με τη χρήση εργαλείων και τεχνικών όπως στοχευμένες μέθοδοι που εξαρτώνται από την καλλιέργεια και μεταγονιδιωματική αλληλούχιση. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ προβιοτικών ειδών και αλλαγών στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου (4).

Τα είδη *Lactobacillus* είναι Gram θετικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που ζυμώνουν υδατάνθρακες για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και έχουν υψηλή οικονομική αξία για βιοτεχνολογικές, διατροφικές και θεραπευτικές εφαρμογές. Στον άνθρωπο, οι *Lactobacillus spp.* βρίσκονται στο γαστρεντερικό σύστημα, στον κόλπο, στη στοματική κοιλότητα, στην αναπνευστική οδό και στο δέρμα. Αντιπροσωπεύουν το 6% και το 95% του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού στον εντερικό σωλήνα και στον κόλπο, αντίστοιχα (12).

2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Οι επιδράσεις των προβιοτικών στον άνθρωπο έχουν μελετηθεί εκτενώς εδώ και δεκαετίες τόσο από τους επιστήμονες όσο και από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων.

Οι περισσότερες εκθέσεις βασίζονται σε εμπειρικά κλινικά δεδομένα με διαφορετικές μεθόδους συλλογής, κλινικά καταληκτικά σημεία και αναλυτική αυστηρότητα, αλλά πολλές εκθέσεις χρησιμοποιούν αυτοαναφερόμενες ποιοτικές παραμέτρους "ευημερίας", όπως η συναισθηματική ή κοινωνική λειτουργικότητα.

Ορισμένες μετα-αναλύσεις έχουν δείξει μια σωρευτική ευεργετική επίδραση των από του στόματος χορηγούμενων προβιοτικών στην πρόληψη της λοίμωξης από *C. difficile* και της σχετικής νοσηρότητας, ιδίως όταν χορηγούνται μαζί με αντιβιοτικά. (40)

2.3 LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Ο *L. acidophilus* είναι ένα μη σπορογόνο Gram θετικό ραβδοειδές βακτήριο του γένους *Lactobacillus* της οικογένειας *Lactobacillaceae*. Τα περισσότερα στελέχη του *L. acidophilus* είναι μικροαερόβια βακτήρια και αναπτύσσονται καλύτερα σε αναερόβια περιβάλλοντα. Ο *L. acidophilus* έχει μικρή αντοχή στην θερμότητα, βέλτιστο pH 5,5-6,0 και βέλτιστη θερμοκρασία επώασης συνήθως μεταξύ 35-38°C, και δεν αναπτύσσεται κάτω από τους 20°C. Τα διάφορα στελέχη έχουν επίσης ελαφρώς διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης (2).

Ο *L. acidophilus* είναι ηωσινόφιλο και ανθεκτικός στο οξύ και τη χολή. Μπορεί να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί σε περιβάλλον όπου άλλα LAB (lactic acid bacteria) δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Μπορεί επίσης να εκτελέσει ομοτυπική ζύμωση με γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη και σακχαρόζη και να παράγει DL-γαλακτικό οξύ με ζύμωση (17).

Ο *L. acidophilus* είναι ένα είδος ευεργετικής μικροβιακής χλωρίδας και έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλές εξαιρετικές προβιοτικές ιδιότητες που μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις βασικές προβιοτικές ιδιότητες του *L. acidophilus* που έχουν αποδειχθεί *in vitro*, συμπεριλαμβανομένης της ανοχής σε χαμηλό pH, της ανοχής στη χολή, της σύνδεσης με κύτταρα του ανθρώπινου παχέος εντέρου σε κυτταροκαλλιέργεια, της παραγωγής αντιβιοτικών, της δραστηριότητας λακτάσης και της σταθερότητας του προϊόντος. Η δεύτερη κατηγορία καλύπτει τις γενικές προβιοτικές επιδράσεις που παρατηρήθηκαν σε διατροφικές δοκιμές σε επίπεδο ζώων, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, της μείωσης της χοληστερόλης του ορού του ξενιστή, της βελτίωσης του μεταβολισμού της λακτόζης του ξενιστή και της πρόληψης ή της θεραπείας των λοιμώξεων (17).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ανθρώπινο μικροβίωμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία και την ασθένεια του ανθρώπου. Το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελείται από διάφορους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, αρχαίων, πρωτόζωων και ιών, που ζουν στην επιφάνεια του επιθηλιακού φραγμού του σώματός μας και φαίνεται να συνδέεται στενά με την ανάπτυξη και την εμφάνιση διαφόρων καρκίνων στον επιθηλιακό φραγμό και στους στείρους ιστούς (30).

Το ανθρώπινο σώμα φιλοξενεί περίπου τρία τρισεκατομμύρια βακτήρια που ρυθμίζουν μια ολοκληρωμένη αλληλεπίδραση φυσιολογικών διεργασιών και ευαισθησίας σε ασθένειες. Αν και υπάρχουν τόσα βακτήρια στο σώμα όσα και τα ανθρώπινα κύτταρα, η γενετική ποικιλομορφία των βακτηρίων, η οποία είναι 100 φορές μεγαλύτερη, κωδικοποιεί εξαιρετικούς μηχανισμούς και μεταβολικές ικανότητες που επηρεάζουν όχι μόνο τη δική τους μικροβιακή θέση, αλλά και τη λειτουργία των ιστών και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Το ανθρώπινο μικροβίωμα περιλαμβάνει βακτήρια καθώς και ευκαρυώτες, πρωτόζωα και ιούς. Σε γενικές γραμμές, σε μια υγιή κατάσταση, ο ξενιστής και το μικροβίωμά του συνυπάρχουν ως μετα-οργανισμός που παρέχει ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά μικροπεριβάλλον και όχι ως υποβοηθητικό της πέψης και του μεταβολισμού (11).

Η συνολική ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου θεωρείται ότι χαρακτηρίζεται από μια σειρά διακριτών αλλά συμπληρωματικών και συχνά επικαλυπτόμενων χαρακτηριστικών. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται αποτελεσματικά και αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα διατηρώντας τον πολλαπλασιασμό, αποφεύγοντας την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, ενεργοποιώντας μονοπάτια εισβολής και μετάστασης, πραγματοποιώντας αναπαραγωγική ανοσία και προκαλώντας αγγειογένεση. Ενώ αυτές οι διαδικασίες έχουν μελετηθεί εκτενώς εδώ και δεκαετίες, ο δυναμικός αντίκτυπος του μικροβιώματος στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και την ανταπόκριση στη θεραπεία του καρκίνου ήταν άγνωστος μέχρι πρόσφατα (11).

Ο καρκίνος αποτελεί μείζονα απειλή για την υγεία, καθώς είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια πολυπαραγοντική ασθένεια. Αν και έχει δοθεί έμφαση στα γενετικά αίτια, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων, το γενικό μικροβίωμα έχει αναδειχθεί ως σημαντικός ρυθμιστής της καρκινογένεσης, της ανοσολογικής απόκρισης και της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας (21).

Η συνολική συμβολή των επιμέρους μικροβιακών παθογόνων στην ανάπτυξη του καρκίνου εκτιμάται σε περίπου 15-20%. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου επηρεάζονται όχι μόνο από μεμονωμένα παθογόνα αλλά και από συνολικές αλλαγές στο μικροβίωμα (γνωστές ως δυσβίωση). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μικροβιώματος και του ξενιστή κατά την ανάπτυξη του καρκίνου είναι πολύπλοκες. Μελέτες

σε ποντίκια χωρίς μικρόβια και με αντιβιοτικά που διαταράσσουν το εντερικό μικροβίωμα έχουν καταδείξει τον ρόλο του μικροβιώματος στην προώθηση διαφόρων τύπων καρκίνου (33). Από την άλλη πλευρά, έχουν επίσης αναφερθεί αντικαρκινικές επιδράσεις του μικροβιώματος- συγκεκριμένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με διάφορες βακτηριακές τοξίνες και παθογόνα παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη του όγκου ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα (5). Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την ανάγκη για νέου τύπου παρεμβάσεις που προωθούν την επέκταση του ωφέλιμου μικροβιόκοσμου έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών στο μικροβίωμα (21).

3.2 ΟΓΚΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η κατανόηση της κατανομής των μικροοργανισμών στο σώμα είναι σημαντική για την κατανόηση της σχέσης τους με τον καρκίνο. Υπάρχουν περίπου 4×10^{13} μικροβιακά κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα, που αντιπροσωπεύουν περίπου 3×10^3 είδη: ~97% αυτών των κυττάρων είναι βακτήρια του παχέος εντέρου και 2-3% είναι μη παχέος εντέρου (π.χ. εγγύς έντερο, δέρμα, πνεύμονες), ~0,1-1% αρχαίοι και ευκαρυωτικοί οργανισμοί (συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων). Ο αριθμός και η ποικιλομορφία των ιών και των φάγων που μολύνουν τον άνθρωπο μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερος. Στον εντερικό σωλήνα των θηλαστικών, το μεγαλύτερο ανοσοποιητικό όργανο του σώματος, οι περισσότερες από τις γνωστές μικροβιακές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις πιστεύεται ότι οφείλονται στην υψηλή πυκνότητα του *E. coli*, αλλά συγκεκριμένα όργανα μπορεί να ασκούν τις δικές τους κυρίαρχες επιδράσεις (30).

Από τα περίπου 1012 είδη μικροοργανισμών που υπάρχουν στον πλανήτη, μόνο 11 έχουν ταξινομηθεί ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο ή «oncomicrobes» (= «ογκομικρόβια»), από το International Association for Cancer Registries (IACR), όπως, ο Human Papilloma virus (HPV), ο Epstein-Barr virus (EBV), η ηπατίτιδα Β και C (HBV/HCV) και το *H. pylori*. Αυτά τα oncomicrobes ευθύνονται για περίπου 2,2 εκατομμύρια περιπτώσεις ετησίως (περίπου 13% των περιπτώσεων καρκίνου παγκοσμίως) και η επιδημιολογία τους, οι μοριακοί μηχανισμοί και οι κλινικές μελέτες τους έχουν επανεξεταστεί εκτενώς. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές πειραματικές ενδείξεις ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί προκαλούν καρκίνο μέσω μεταλλαξιγένεσης με τη μεσολάβηση γονοτοξινών. Ειδικότερα, η κολιμπακτίνη (αλκυλιωτικός παράγοντας του DNA), η κυτταροτοξίνη (κυτταροτοξική διαστατική τοξίνη (CDT- άμεση δράση στο DNA)) και η τοξίνη *Bacteroides fragilis* (Bft- γεννήτρια δραστικών ειδών οξυγόνου) έχουν βρεθεί σε καρκίνους του παχέος εντέρου, της κεφαλής και του τραχήλου και του ουροποιητικού συστήματος όπου παρατηρείται μετάλλαξη (30).

3.3 Η ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ο ρόλος των μικροοργανισμών στην εμφάνιση, τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου είναι αμφιλεγόμενος εδώ και αιώνες. Πρόσφατες μελέτες έχουν διατυπώσει ισχυρισμούς ότι τα βακτήρια, οι ιοί και οι μύκητες είναι κοινά στον καρκίνο, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου και μπορούν να «χειραγωγηθούν» για τη θεραπεία των μεταστάσεων. Ωστόσο, παρά τα ευρήματα αυτά, ο αριθμός των μικροοργανισμών που είναι γνωστό ότι προκαλούν άμεσα καρκινογένεση είναι μικρός. Η

κριτική αξιολόγηση και πλαισίωση αυτών των παραγόντων υπό το πρίσμα της σύγχρονης βιολογίας του καρκίνου αποτελεί σημαντικό καθήκον (30).

Αρκετοί παράγοντες του τρόπου ζωής που σχετίζονται με τον κίνδυνο καρκίνου έχει αποδειχθεί ότι δρουν μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με το μικροβίωμα. Η δυτική διατροφή, ιδίως η κατανάλωση επεξεργασμένου κρέατος, έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου και το μικροβίωμα έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητο για τη διαμεσολάβηση ορισμένων καρκινογόνων επιδράσεων. Εκτός από τη διατροφή, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ορισμένους τύπους καρκίνου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι προκαλούμενες από την παχυσαρκία μεταβολές στο εντερικό μικροβίωμα έχουν ως αποτέλεσμα έναν εκκριτικό φαινότυπο ηπατικών αστεροειδών κυττάρων στο ήπαρ που εκκρίνουν φλεγμονώδεις και καρκινικούς παράγοντες. Τέλος, έχει προταθεί ότι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η ασπιρίνη, συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μέσω της μεταβολής της μικροβιακής κοινότητας (21).

3.4 ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η διερεύνηση του αντίκτυπου του μικροβιώματος στη θεραπεία του καρκίνου είναι μία από τις πιο συναρπαστικές και μετασχηματιστικές πτυχές της έρευνας για τον καρκίνο και το μικροβίωμα και θα μπορούσε να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση των αποφάσεων για τη θεραπεία του. Η θεραπεία μπορεί να παρέχεται μέσω χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας και ανοσοθεραπείας.

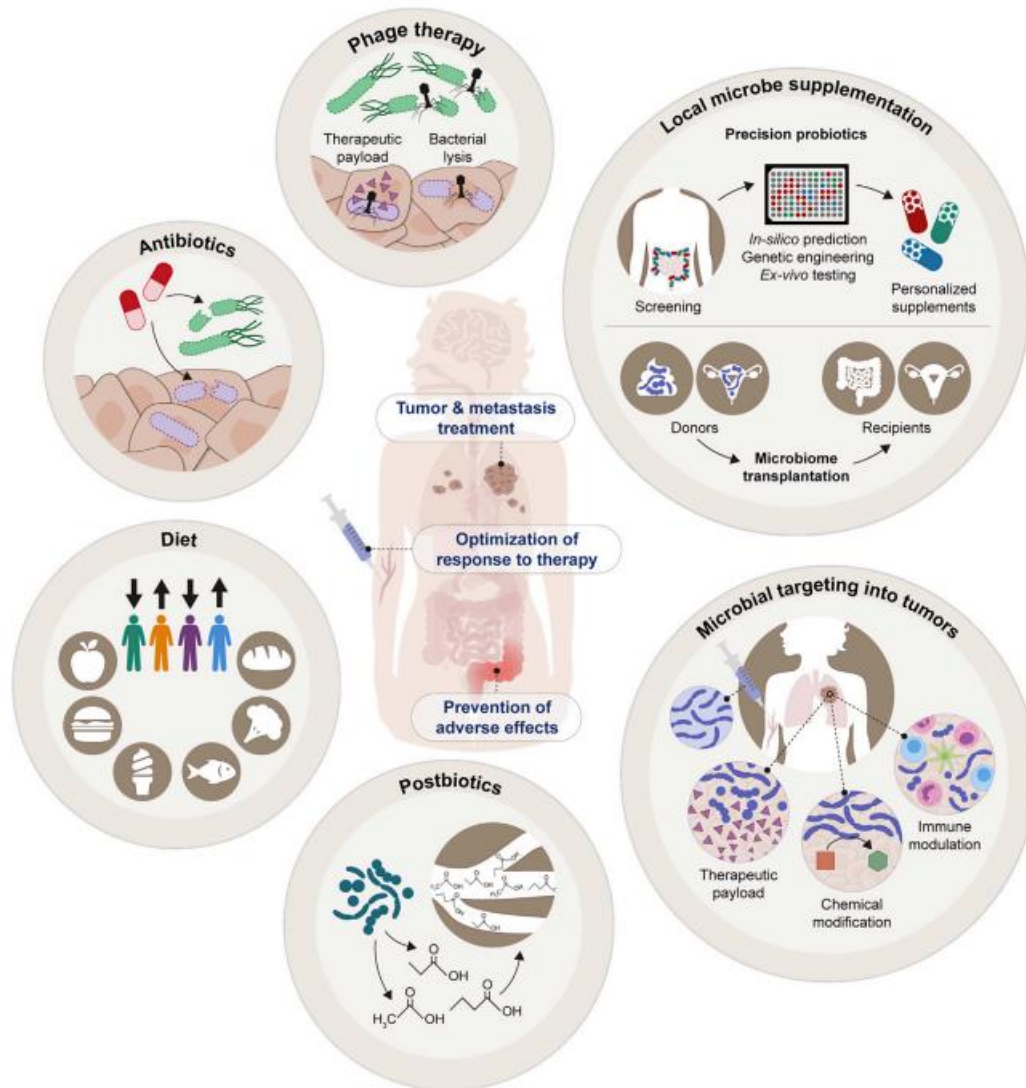
Η χημειοθεραπεία είναι η χρήση μιας χημικής ουσίας (π.χ. φαρμακευτική ένωση, κοκτέιλ φαρμάκων) για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Σε πολλές περιπτώσεις, λόγω της τοξικής φύσης της χημικής ουσίας που χρησιμοποιείται και της μη ειδικής κατανομής της χημικής ουσίας σε όλο το σώμα, οι παρενέργειες της χημειοθεραπείας περιλαμβάνουν συμπτώματα όπως η βλεννογονίτιδα του στόματος και η τριχόπτωση (και τα δύο είναι ενδεικτικά του κυτταρικού θανάτου που επηρεάζει ταχέως διαιρούμενα κύτταρα) (19).

Η ακτινοβολία είναι παρόμοια με τη χημειοθεραπεία στο ότι ο στόχος είναι να σκοτώσει τα ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα, ενώ παράλληλα να απαλλάξει τα πιο αργά διαιρούμενα κύτταρα. Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στις φυσιολογικές διαδικασίες επιδιόρθωσης των κυττάρων του οργανισμού για να βελτιώσουν το κατεστραμμένο DNA στα μη καρκινικά κύτταρα, ενώ τα καρκινικά κύτταρα με μη φυσιολογικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης συνεχίζουν να διαιρούνται, οδηγώντας στο θάνατό τους με τη μεσολάβηση του σημείου ελέγχου. Η ακτινοβολία διαφέρει από τη χημειοθεραπεία στο ότι ο ενεργός παράγοντας είναι η ραδιενέργεια που βλάπτει το DNA (38).

Η εξαίρεση της ομάδας είναι η ανοσοθεραπεία, όπου ο στόχος είναι να ωθηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα να εντοπίσει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα και να επιτεθεί σε αυτά. Για πολλούς, αυτό φαίνεται σαν μια πιο ήπια προσέγγιση, αλλά η υπερδιέγερση ή η υπερβολική εξασθένιση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να έχει πολύ διαφορετικές

επιπτώσεις σε ολόκληρο τον πληθυσμό των ασθενών. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει μία τέλεια λύση και η προσέγγιση κάθε ασθενούς πρέπει να είναι εξατομικευμένη (41).

Παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλοι εναλλακτικοί τρόποι θεραπείας, οι οποίοι συνοψίζονται στο Σχήμα 2. Οι διατροφικές παρεμβάσεις βάσει δεδομένων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άτομα και σε διάφορους τύπους καρκίνου για να προκαλέσουν αναπαραγωγίμες, σταδιακές αλλαγές στο μικροβίωμα του καρκίνου. Τα προβιοτικά ακριβείας αποτελούνται από κοινόχρηστα βακτήρια του εντέρου των οποίων η λειτουργία έχει καθοριστεί από *ex vivo* και *in silico* γραμμές πρόβλεψης, επιτρέποντας καλύτερο σχηματισμό αποικιών και αποτελεσματικότητα του ξενιστή. Οι μεταμοσχεύσεις μικροβιώματος ολόκληρης κοινότητας, όπως οι μεταμοσχεύσεις μικροβιώματος κοπράνων και κοιλιακού μικροβιώματος, μπορούν να επιτρέψουν την αντικατάσταση του μικροβιώματος ενός ασθενούς με μια σύνθεση μικροβιώματος κατά του καρκίνου. Μόλις γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί των μικροβιακών παραγόντων που επηρεάζουν τον καρκίνο και τη θεραπεία του, θα είναι δυνατή η ανάπτυξη "μεταβιοτικών" θεραπειών που θα αποτελούνται από μια σαφώς καθορισμένη συλλογή βιοδραστικών μορίων και όχι από τους μικροοργανισμούς που τα παράγουν. Η στοχευμένη εξάλειψη των μικροοργανισμών που προάγουν τον καρκίνο μπορεί σε λίγες περιπτώσεις να επιτευχθεί με αντιβιοτικά. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι ο συνδυασμός βακτηριοφάγων που στοχεύουν κοινά ή ενδοκρινικά βακτήρια με ελάχιστες επιπτώσεις στο περιβάλλον μικροβιακό οικοσύστημα. Εναλλακτικά, η γεινίαση των βακτηριοφάγων με τα ενδοκρινή βακτήρια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση και απελευθέρωση θεραπευτικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ομοίως, η συστηματική χορήγηση βακτηρίων που προσελκύουν τον όγκο μπορεί να προκαλέσει τοπικές ανοσολογικές αποκρίσεις και προστατευτική ανοσία ειδικά για τον όγκο ή να επιτρέψει την τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού ή της τοπικής απελευθέρωσης θεραπευτικών ωφέλιμων φορτίων (11).



Σχήμα 2: Σύνθεση του μικροβιώματος στη θεραπεία του καρκίνου: Παραδείγματα πιθανών τρόπων για την επίτευξη ορθολογικής χειραγώγησης του μικροβιώματος που συμβάλλει στη θεραπεία του καρκίνου (11).

3.5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το εντερικό μικροβίωμα αποτελείται από διάφορα είδη, όπως βακτήρια, αρχαία, μύκητες, πρωτόζωα και ιούς. Στο έντερο κυριαρχούν τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Το εντερικό μικροβίωμα παίζει ρόλο στη φυσιολογία του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένης της διατροφής, του μεταβολισμού και της ανοσίας. Ανωμαλίες στο εντερικό μικροβίωμα έχουν συσχετιστεί με διάφορες ανθρώπινες ασθένειες. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλέκεται στη φλεγμονή και στη βιοσύνθεση χημικών καρκινογόνων ουσιών, όπως οι ενώσεις N-νιτρωδών, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Υπολογίζεται ότι το 70% του ανθρώπινου μικροβιώματος βρίσκεται στο παχύ έντερο. Η διατροφή και οι συνήθειες του τρόπου ζωής παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση του μικροβιώματος του εντέρου. Τα άτομα που εκτίθενται σε αντιβιοτικά στην παιδική ηλικία μπορεί να αναπτύξουν αδενώματα του παχέος εντέρου σε μεγαλύτερη ηλικία. Οι ανωμαλίες του εντερικού μικροβιώματος σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC).

Το εντερικό μικροβίωμα εμπλέκεται στη μεταβολική μετατροπή διατροφικών συστατικών σε μεταβολίτες όγκου και μεταβολίτες καταστολής όγκου, η οποία θεωρείται ότι επηρεάζει την ανάπτυξη του CRC. Ο CRC ταξινομείται σε καρκίνο του παχέος εντέρου που σχετίζεται με κολίτιδα (CAC) και σε σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (SCC). Τα άτομα με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου εξελίσσονται σε CAC. Το μικροβίωμα του εντέρου μπορεί να συμβάλλει στην έναρξη και την ανάπτυξη του CRC (9).

3.6 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Η έρευνα για το μικροβίωμα τα τελευταία 15 χρόνια μας παρέχει ενδιαφέροντα, αν και ακόμη αμφιλεγόμενα, στοιχεία σχετικά με τη σχέση μεταξύ μικροβίων και καρκίνου. Ενώ ένας μικρός αριθμός μικροοργανισμών προκαλεί άμεσα καρκίνο, πολλοί άλλοι φαίνεται να είναι συνένοχοι και, ίσως παραδόξως, ορισμένοι υποστηρίζουν την αντικαρκινική ανοσία του ξενιστή. Αυτή η πολυπλοκότητα μπορεί να αντανακλά συν-εξελικτικές δυναμικές μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, του κοινού μικροβιώματος και των καρκινογόνων διαδικασιών που μόλις αρχίζουν να γίνονται κατανοητές (30).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΧΩΡΟΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο εξωκυττάριος χώρος (ECM) είναι ένα μη κυτταρικό, τρισδιάστατο δίκτυο μακρομορίων που αποτελείται από κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες/γλυκοζαμινογλυκάνες, ελαστίνη, ινωδονεκτίνη, λαμινίνη και ορισμένες άλλες γλυκοπρωτεΐνες. Τα συστατικά του ECM συνδέονται μεταξύ τους όπως οι υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης και σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο κυττάρων που απαντάται σε όλους τους ιστούς και τα όργανα. Οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας μεταφέρουν σήματα από το ECM στο κύτταρο και ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιβίωση, η ανάπτυξη, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ομοιόσταση. Ο ECM είναι ένα εξαιρετικά δυναμικό δομικό δίκτυο και η αποικοδόμησή του υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες διαμεσολαβείται από διάφορα ένζυμα. Ο ECM βοηθά τα κύτταρα να προσκολλώνται και να επικοινωνούν με τα κοντινά κύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, την κυτταρική μετακίνηση και άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Ο ECM συμμετέχει επίσης στην αποκατάσταση των κατεστραμμένων ιστών. Μη φυσιολογικές αλλαγές του ECM μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ορισμένων ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Ο ECM των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο πολλαπλασιάζονται και εξαπλώνονται (22).

Ο ECM διαδραματίζει διάφορους ρόλους, όπως η παροχή στους ιστούς της δομικής ακεραιότητας και των μηχανικών ιδιοτήτων που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία των ιστών, ή η ρύθμιση του κυτταρικού φαινότυπου και της λειτουργίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Η μοριακή σύνθεση και η δομή του ECM ποικίλλει από ιστό σε ιστό και είναι ιδιαίτερα μεταβλητή κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής επιδιόρθωσης των ιστών καθώς και κατά τη διάρκεια διαφόρων διεργασιών ασθενειών. Πράγματι, η μη φυσιολογική αναδιαμόρφωση του ECM που συμβαίνει σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να οδηγήσει σε εξέλιξη της νόσου μέσω της ρύθμισης των αλληλεπιδράσεων κυττάρων-μητρικής ουσίας. Η σημασία των μορίων της μήτρας στη φυσιολογική λειτουργία των ιστών υπογραμμίζεται επίσης από τις μεταλλάξεις γονιδίων της μήτρας που προκαλούν γενετικές διαταραχές με ποικίλους κλινικούς φαινότυπους (42).

4.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ECM

Ο ECM περιέχει περισσότερες από 300 διαφορετικές πρωτεΐνες. Τα κύρια συστατικά είναι το κολλαγόνο, οι πρωτεογλυκάνες, η ελαστίνη και οι κυτταροδεσμευτικές γλυκοπρωτεΐνες, καθμία από τις οποίες έχει διαφορετικές φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες. Το κολλαγόνο αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν δομή τριπλής έλικας. Στα σπονδυλωτά, 46 αλυσίδες κολλαγόνου συναρμολογούνται για να σχηματίσουν 28 τύπους κολλαγόνων, οι οποίοι ταξινομούνται ως κολλαγόνα που σχηματίζουν ίνες (π.χ. τύποι I, II και III), κολλαγόνα που σχηματίζουν δίκτυα (π.χ. κολλαγόνο βασικής μεμβράνης τύπου IV), κολλαγόνα που συνδέονται με ινίδια με διακοπτόμενες τριπλές έλικες (ή FACITs) (π.χ. τύποι IX και XII) και άλλα (π.χ. τύπος VI). Τα κολλαγόνα που σχηματίζουν ινίδια περιέχουν

γειτονικές περιοχές που σχηματίζουν τριπλή έλικα και περιβάλλονται από αμινοτελικές και καρβοξυτελικές μη κολλαγονικές περιοχές. Αυτές οι μη κολλαγονικές περιοχές απομακρύνονται με πρωτεόλυση και σχηματίζουν τριπλές έλικες που προσκολλώνται πλευρικά στα ινίδια. Οι μη ινώδεις υπερμοριακές δομές, όπως το δίκτυο κολλαγόνου IV της βασικής μεμβράνης και τα νημάτια σφαιριδίων, αποτελούνται από μη ινώδες κολλαγόνο. Τα FACIT δεν συναρμολογούνται από μόνα τους σε ινίδια αλλά συνδέεται με ινίδια κολλαγόνου. Ορισμένα κατάλοιπα προλίνης στο κολλαγόνο υδροξυλιώνονται από την 4-υδροξυλάση προλυλίου και 3-υδροξυλάση προλυλίου. Ορισμένα κατάλοιπα λυσίνης υδροξυλιώνονται επίσης από την λυσυλ-υδροξυλάση. Τα ινώδη προκολλαγόνα εκκρίνονται εξωκυτταρικά μετά την επεξεργασία και τα προπεπτίδια απομακρύνονται. Το προκύπτον κολλαγόνο συναρμολογείται σε ινίδια μέσω ομοιοπολικών διασταυρούμενων δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των καταλοίπων λυσίνης δύο αλυσίδων κολλαγόνου με μια διαδικασία που καταλύεται από το εξωκυτταρικό ένζυμο λυσυλ-οξειδάση (LOX). Η ραχοκοκαλιά του κολλαγόνου καθορίζει τη δομή, το σχήμα και την οργάνωση των ιστών.

Οι πρωτεογλυκάνες είναι πλευρικές αλυσίδες γλυκοζαμινογλυκανών (GAG) που συνδέονται με βασικές πρωτεΐνες- οι GAG είναι γραμμικοί ανιονικοί πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες- οι GAG περιλαμβάνουν το υαλουρονικό οξύ, τη θειική κερατάνη, τη θειική χονδροϊτίνη/δερματάνη και τη θειική ηπαρίνη (συμπεριλαμβανομένης της ηπαρίνης). Υπάρχουν τέσσερις ομάδες GAG. Όλες είναι θειικά άλατα εκτός από το υαλουρονικό οξύ. Χάρη στις υψηλά φορτισμένες αλυσίδες GAG τους, οι πρωτεογλυκάνες αποθηκεύουν το νερό και τα δισθενή κατιόντα και παρέχουν λειτουργίες πλήρωσης κενών και λίπανσης. Οι εκκρινόμενες πρωτεογλυκάνες περιλαμβάνουν μεγάλες πρωτεογλυκάνες, όπως η αγκρεκάνη και η βερσικάνη, μικρές πρωτεογλυκάνες πλούσιες σε λευκίνη, όπως η ντεκορίνη και η λουμικάνη, και πρωτεογλυκάνες της βασικής μεμβράνης, όπως η περλεκάνη. Οι συνδεκάνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεογλυκάνες. Η μοριακή ποικιλομορφία των πρωτεογλυκανών παρέχει μια δομική βάση για πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, οι αγκρεκάνες του χόνδρου παράγουν ελαστικότητα και υψηλή εμβιομηχανική αντοχή στην καταπόνηση. Η ντεκορίνη και η λουμικάνη εμπλέκονται στη ρύθμιση του σχηματισμού ινών κολλαγόνου. Οι πρωτεογλυκάνες αλληλεπιδρούν επίσης με αυξητικούς παράγοντες και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες όπως η κυτταρική σηματοδότηση και η αγγειογένεση. Η οικογένεια των λαμινών περιέχει περίπου 20 γλυκοπρωτεΐνες που συναντώνται σε μια διασυνδεδεμένη οργάνωση, συνυφασμένες με το δίκτυο κολλαγόνου τύπου IV της βασικής μεμβράνης. Οι λαμινίνες είναι ετεροτριμερή (400-800 kDa) που αποτελούνται από τρεις αλυσίδες (α, β και γ), ενώ στα σπονδυλωτά έχουν ταυτοποιηθεί πέντε αλυσίδες (α, 3 β και γ). Πολλές λαμινίνες αυτοοργανώνονται σε δίκτυα και παραμένουν στενά συνδεδεμένες με τα κύτταρα αλληλεπιδρώντας με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Η λαμινίνη είναι απαραίτητη για την πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και την οργανογένεση. Η ινονεκτίνη είναι σημαντική για την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση και λειτουργεί ως "βιολογική κόλλα". Το μονομερές της ινονεκτίνης (περίπου 250 kDa) αποτελείται από τρεις υπομονάδες τριών διαφορετικών επαναλήψεων, I, II και III. Η ινονεκτίνη εκκρίνεται ως διμερές που συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς και διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για άλλα διμερή ινονεκτίνης, κολλαγόνο, ηπαρίνη και υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Η ελαστίνη παρέχει

ελαστικότητα σε ιστούς που τεντώνονται και συστέλλονται επανειλημμένα, όπως τα αιμοφόρα αγγεία και οι πνεύμονες. Στα θηλαστικά κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο και εκκρίνεται ως μονομερές τροποελαστίνης 60-70 kDa. Η τροποελαστίνη συνδέεται με μικροϊνίδια μέσω ινιδίων για να σχηματίσει ελαστικές ίνες. Όλες οι τροποελαστίνες έχουν μια χαρακτηριστική διάταξη περιοχών με εναλλασσόμενες υδρόφοβες αλληλουχίες και μοτίβα διασύνδεσης που περιέχουν λυσίνη. Οι πρωτεΐνες των μικροϊνιδίων, η φιβριλλίνη και η γλυκοπρωτεΐνη-1 που σχετίζεται με τα μικροϊνίδια αλληλεπιδρούν άμεσα με την ελαστίνη και είναι σημαντικές για την πυρήνωση και τη συναρμολόγησή της. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ελαστικών ινών, και κρίσιμο για τη σωστή λειτουργία τους, είναι η εκτεταμένη διασταύρωση της τροποελαστίνης με τη μεσολάβηση της LOX οξειδώνοντας επιλεκτικά τα κατάλοιπα λυσίνης των πεπτιδικών δεσμών σε αλλυσίνη. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και απεικόνισης έχουν δείξει ότι η τροποελαστίνη σχηματίζει μικρά σφαιρικά συσσωματώματα στην επιφάνεια των κυττάρων (μικροσυγκρότηση). Η διασύνδεση προκαλεί την απώλεια του θετικού φορτίου του μορίου και η τροποελαστίνη απελευθερώνεται από το κύτταρο, βοηθώντας τη σφαιρική σύντηξη παρουσία μικροϊνιδίων (μακροσυναρμολόγηση) (25).

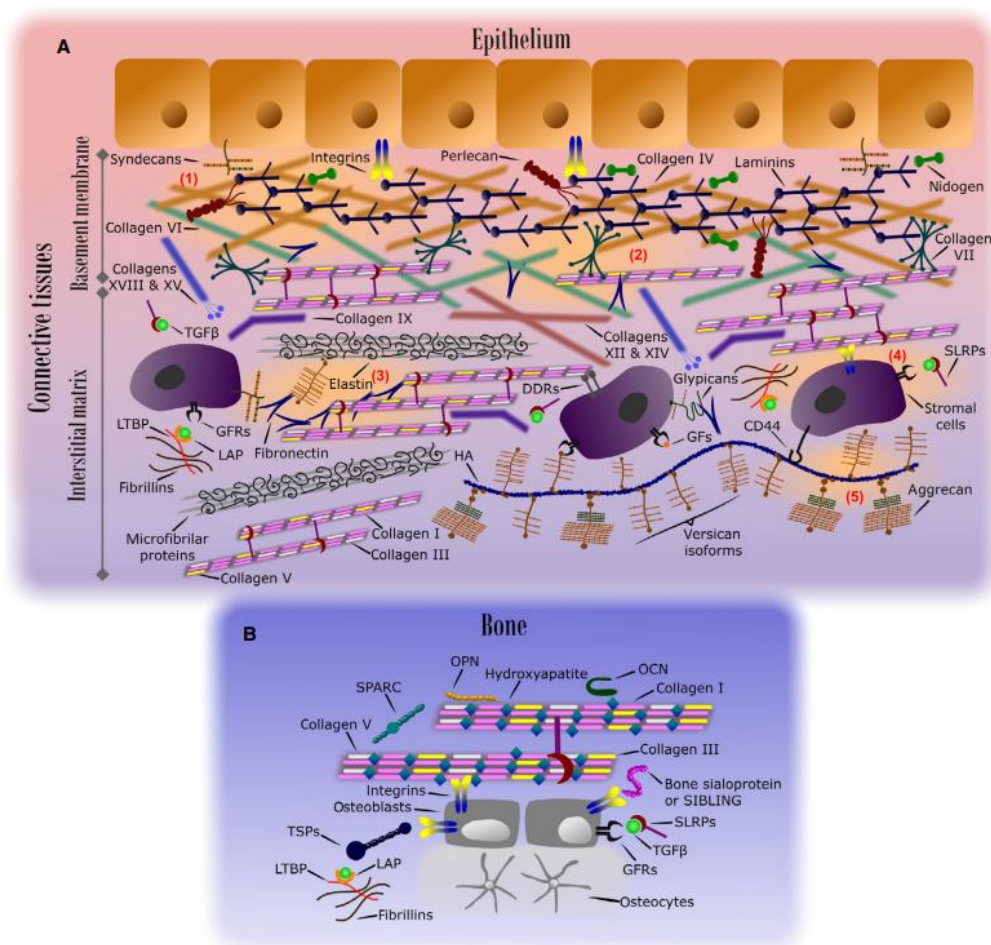
4.3 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ECM ΣΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ, ΣΤΟΥΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΣΤΑ

Στο Σχήμα 3 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης του ECM στο επιθήλιο και στον υποκείμενο συνδετικό ιστό (A) και στα οστά (B).

(A)(1) Η βασική μεμβράνη είναι μια μοναδική περικυτταρική μήτρα, που ορίζεται ως ένα αμάλγαμα δύο δικτύων: του ικριώματος των αυτοσυνδεόμενων ελασμάτων και του πολυμερούς δικτύου κολλαγόνου τύπου IV. Η περλεκάνη και τα νιδογόνα γεφυρώνουν περαιτέρω αυτά τα δίκτυα. Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται με τη βασική μεμβράνη μέσω ημιδεσμοσωμάτων, όπου οι λαμινίνες συνδέονται με τις ιντεγκρίνες. (2) Η βασική μεμβράνη αγκυρώνεται στη διάμεση μήτρα μέσω ποικίλων τύπων κολλαγόνου, συμπεριλαμβανομένων των κολλαγόνων τύπου VI και VII. Το πρώτο αλληλεπιδρά με το κολλαγόνο τύπου IV και την περλεκάνη, ενώ το δεύτερο με το κολλαγόνο τύπου IV, τις λαμινίνες και τα ινίδια κολλαγόνου τύπου I. (3) Ο κύριος τύπος κολλαγόνου στη διάμεση μήτρα είναι τα ετεροτυπικά ινίδια των κολλαγόνων τύπου I, III και V. Τα SLRP και η ινονεκτίνη συμμετέχουν στη συναρμολόγηση κολλαγόνου και στην ινωδογένεση. Πολλά άλλα συστατικά συμβάλλουν στην οργάνωση της διάμεσης μήτρας, συμπεριλαμβανομένης της ελαστίνης, των πρωτεογλυκανών και του υαλουρονικού οξέος. (4) Οι υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας στρωματικών κυττάρων όπως οι ιντεγκρίνες, οι DDR, οι συνδεκάνες, οι γλυκανάνες και οι υποδοχείς αυξητικού παράγοντα (GFR) αλληλεπιδρούν με συστατικά ECM και αυξητικούς παράγοντες (GF). Η βιοδιαθεσιμότητα και η δέσμευση των αυξητικών παραγόντων όπως ο TGFb, ρυθμίζεται από SLRPs και τα LAP και LTBP. (5) Το υαλουρονικό οξύ σχηματίζει μεγάλα αδρανή υλικά με υαλεκτάνες, συμβάλλοντας στην ακαμψία του ECM. Αλληλεπιδρά επίσης με υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, όπως το CD44.

B) Ο ECM των οστών περιέχει ετεροτυπικά ινίδια κολλαγόνου τύπου I, τα οποία χρησιμεύουν ως κέντρο πυρήνωσης για τον υδροξυαπατίτη. Η αποικοδόμηση των οστών διευκολύνεται από διάφορα συστατικά του ECM, συμπεριλαμβανομένων των SIBLING, OCN, OPN και SLRP.

Επιπλέον, οι SLRPs καθώς και τα SPARC και θρομβοσπονδίνη TSP είναι κρίσιμοι τελεστές για την ινωδογένεση κολλαγόνου και τη βιοδιαθεσιμότητα και σηματοδότηση του TGFβ (42).



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης της ECM στο επιθήλιο και στους υποκείμενους συνδετικούς ιστούς (A) και στα οστά (B) (42).

4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ECM

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια του ECM ή μόρια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και τη σηματοδότηση του ECM προκαλούν μια ποικιλία κληρονομικών ασθενειών. Η ατελής οστεογένεση (OI) είναι μια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται κυρίως από ευθραυστότητα των οστών, αλλά μπορεί επίσης να σχετίζεται με σκελετικές, οδοντικές, δερματικές και μαλακές ανωμαλίες και υπερέκταση των αρθρώσεων. Η κλινική σοβαρότητα κυμαίνεται από περιγεννητική θνησιμότητα (OI τύπου II), σοβαρή (OI τύπου III), μέτρια (OI τύπου IV) και ήπια (OI τύπου I).

Μια άλλη κληρονομική διαταραχή του συνδετικού ιστού είναι το EDS (σύνδρομο Ehlers-Danlos), το οποίο σχετίζεται με ανωμαλία στη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I και χαρακτηρίζεται από δέσμες ινών κολλαγόνου μεταβλητού μεγέθους, όχι πολύ πυκνές και σε ακανόνιστο μοτίβο (42).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ

5.1 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΈΝΖΥΜΑ ΤΟΥ ECM

Στην πρωτεόλυση και ανασύσταση του ECM εμπλέκονται διάφοροι τύποι ενζύμων. Οι MMPs (matrix metalloproteinases) είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών που εξαρτάται από το ασβέστιο και περιέχουν ψευδάργυρο. Έχουν την δυνατότητα να στοχεύουν διάφορα μόρια, συμπεριλαμβανομένων συστατικών της μήτρας, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, μορίων προσκόλλησης και μορίων σηματοδότησης. Ταξινομούνται ανάλογα με το υπόστρωμα που υδρολύουν σε έξι ομάδες: κολλαγενάσες, στρομελυσίνες, ζελατινάσες, ματρυλυσίνες, μεμβρανοδεσμευμένες MMPs (MT-MMPs) και άλλες MMPs. Η δραστηριότητα των MMPs ενεργοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με τους TIMPs (ιστικοί αναστολείς των MMPs) και άλλες πρωτεάσες. Οι MMPs συμμετέχουν στη φυσιολογική αναδιαμόρφωση των ιστών και εμπλέκονται στην οργανογένεση και την επούλωση των τραυμάτων καθώς και στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος και η ίνωση. Άλλες σημαντικές πρωτεάσες που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της μήτρας είναι οι πρωτεάσες σερίνης, ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA) και ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστού (tPA), οι οποίες μετατρέπουν το πλασμινογόνο σε ενεργή πλασμίνη. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση στη στόχευση πολλών συστατικών της μήτρας και μορίων σηματοδότησης και ενεργοποιούν αρκετές MMPs. Οι καθεψίνες κυστεΐνης βρίσκονται στο ενδολυσσωματικό διαμέρισμα του κυττάρου, αλλά λειτουργούν επίσης στον ECM, ρυθμίζοντας προς τα κάτω πολυάριθμα μόρια μήτρας και προσκόλλησης και ενεργοποιώντας την pro-uPA. Ορισμένες καθεψίνες εκκρίνονται στον ECM και μπορούν να λειτουργήσουν υπό ασθενώς όξινες συνθήκες, οι οποίες είναι κοινές σε ασθένειες όπως ο καρκίνος και η οστεοαρθρίτιδα (42).

5.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες (MMPs) είναι μια οικογένεια ενζύμων που περιέχουν ψευδάργυρο και εξαρτώνται από το ασβέστιο και αποδομούν τον εξωκυττάριο χώρο (ECM) και τη μεμβράνη του υποδόριου ιστού, περιορίζοντας έτσι την λειτουργία τους στην αναδιαμόρφωση και τη συντήρηση των ιστών (27).

Υπάρχουν 28 διαφορετικοί τύποι MMPs στα σπονδυλωτά και τουλάχιστον 23 εκφράζονται στους ανθρώπινους ιστούς. Σύμφωνα με την βιοπληροφορική ανάλυση, οι MMPs μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε τύπους όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (28).

Ωστόσο, οι MMPs μπορούν επίσης να διαχωριστούν ανάλογα με την ειδικότητα υποστρώματος, τη σειριακή ομοιότητα και την οργάνωση των περιοχών όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 (29).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση MMPs με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση τους.

<p>MMPs που δεν ρυθμίζονται από τη φουρίνη</p>	<p>MMP-1 MMP-3 MMP-7 MMP-8 MMP-10 MMP-12 MMP-13 MMP-20 MMP-27</p>
<p>MMPs με τρεις προσθήκες στην καταλυτική περιοχή που μοιάζουν με ιωδονεκτίνη</p>	<p>MMP-2 MMP-9</p>
<p>MMPs που προσδέονται στην πλασματική μεμβράνη μέσω ενός C-τελικού μορίου glycosylphosphatidylinositol (GPI)</p>	<p>MMP-11 MMP-17 MMP-25</p>
<p>MMPs με διαμεμβρανικές περιοχές</p>	<p>MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24</p>
<p>Όλες οι υπόλοιπες MMPs</p>	<p>MMP-19 MMP-21 MMP-23 MMP-26 MMP-28</p>

Πίνακας 2: Διαχωρισμός MMPs με βάση την ειδικότητα του υποστρώματος, τη σειριακή ομοιότητα και την οργάνωση των περιοχών

Collagenases MMP-1 MMP-8 MMP-13	Gelatinases MMP-2 MMP-9	Stromelysins MMP-3 MMP-10 MMP-11	Matrilysin MMP-7 MMP-26
Metalloelastase MMP-12	Enamelysin MMP-20	Membrane-type MMPs MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	Άλλες MMPs MMP-19 MMP-21 MMP-23A MMP-23B MMP-27 MMP-28

Οι κολλαγενάσες διασπούν διάφορες πρωτεΐνες του ECM και άλλες διαλυτές πρωτεΐνες, αλλά ο σημαντικότερος ρόλος αυτών των τύπων MMPs είναι η διάσπαση του ινώδους κολλαγόνου των τύπων I, II, III, IV και XI σε δύο θραύσματα, που αποτελούνται κατά $\frac{1}{4}$ από το C-τελικό άκρο και κατά $\frac{3}{4}$ από το N-τελικό άκρο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Πρώτον, οι MMP ξεδιπλώνουν την τριπλή έλικα του κολλαγόνου και στη συνέχεια υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς. Η περιοχή αιμοπεξίνης απαιτείται για τη διάσπαση του εγγενούς ινώδους κολλαγόνου, ενώ η καταλυτική περιοχή μπορεί να διασπάσει υποστρώματα μη κολλαγόνου. Οι ζελατινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αποικοδόμησης και αναδιαμόρφωσης της ECM, του σχηματισμού οστών και της επούλωσης πληγών (29).

Οι ζελατινάσες διασπούν ζελατίνες, κολλαγόνα τύπου IV, V, VIII, VIII, X, XI, XIV, ελαστίνη, βασικές πρωτεΐνες των πρωτεογλυκανών, ινοσυνδετίνη, λαμινίνη, φμπριλλίνη-1, TNF- α και IL-1b πρόδρομο των ζελατινών, του κολλαγόνου και της λαμινίνης. Η MMP-2 είναι πρωτίστως ζελατινάση αλλά μπορεί επίσης να δράσει ως κολλαγενάση, αν και ασθενώς. Πρώτα επάγει την ασθενή διάμεση αποικοδόμηση του κολλαγόνου που μοιάζει με κολλαγόνο και στη συνέχεια χρησιμοποιεί περιοχές που μοιάζουν με ινωδονεκτίνη για να προωθήσει την αποικοδόμηση της ζελατίνης. Η MMP-9 δρα τόσο ως κολλαγενάση όσο και ως ζελατινάση. Οι ζελατινάσες εμπλέκονται σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες όπως η εμβρυϊκή ανάπτυξη και εξέλιξη, η αγγειογένεση, οι αγγειακές παθήσεις, οι φλεγμονώδεις και λοιμώδεις παθήσεις, οι εκφυλιστικές παθήσεις του εγκεφάλου και η εξέλιξη των όγκων. Η μετάσταση των όγκων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την απελευθέρωση των καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευση μέσω των αιμοφόρων αγγείων, την εισβολή στο κυκλοφορικό και το λεμφικό σύστημα, την προσκόλληση στα ενδοθηλιακά αγγεία και την εξωτερική εισβολή στους ιστούς. Η δραστηριότητα των ζελατινάσων είναι καθοριστική για τη διαφυγή των μεταστατικών κυττάρων και την εισβολή τους στη μεταστατική εστία. Έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα των ζελατινασών σε κακοήγη νοσήματα όπως ο καρκίνος του μαστού, του ουρογεννητικού συστήματος, του εγκεφάλου, του πνεύμονα, του δέρματος και του παχέος εντέρου (29).

Οι στρομελυσίνες έχουν την ίδια αλληλουχία τομέων με τις κολλαγενάσες, αλλά δεν διασπούν το διάμεσο κολλαγόνο. Οι MMP-3 και -10 είναι στενά συγγενείς ως προς τη δομή και την

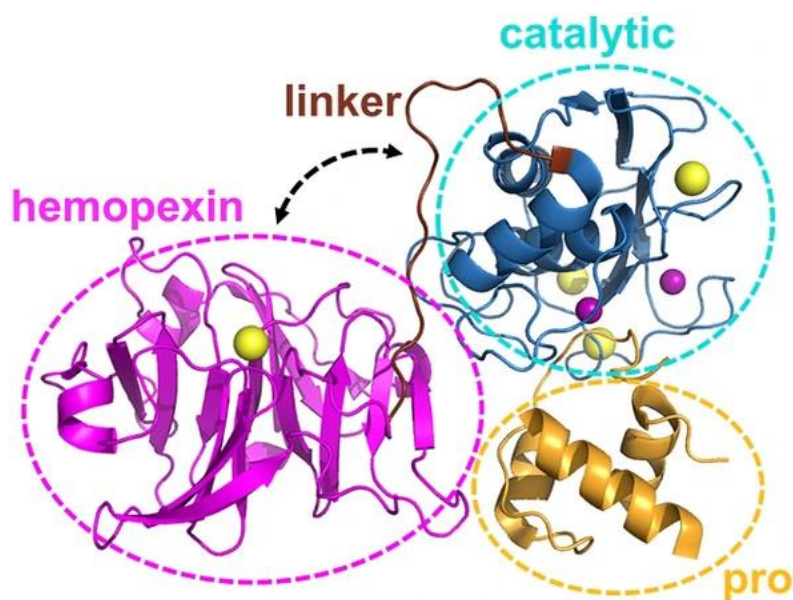
ειδικότητα υποστρώματος, ενώ η MMP-11 είναι απομακρυσμένα συγγενής, η ενδοκυττάρια ενεργοποίηση της MMP-1 μεσολαβείται από 10 αμινοξυ που εντοπίζονται μεταξύ της προ- και καταλυτικής περιοχής του ένθετου, το οποίο αναγνωρίζεται από τη πρωτεϊνάση φουρίνη (29).

Βασικό χαρακτηριστικό της ματριλυσίνης είναι η απουσία της περιοχής αιμοπεξίνης που υπάρχει σε άλλες MMPs. Αυτή η ομάδα MMPs χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων με ένα κατάλοιπο θρεονίνης δίπλα στη θέση δέσμευσης Zn^{2+} (29).

Οι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεΐνες διαθέτουν μια περιοχή αναγνώρισης της προπρωτεϊνικής κονβερτάσης, παρόμοια με τη φουρίνη, στο C-τελικό άκρο της προ-δομής τους, η οποία επιτρέπει την ενεργοποίηση του προ-ενζύμου με την πρωτεολυτική αφαίρεση της εν λόγω περιοχής. Έτσι, ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικά και το ενεργό ένζυμο εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Η ομάδα αυτή υποδιαιρείται σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I (MMP-14, -15, -16, -24) και σε πρωτεΐνες που «κατοικούν» σε glycosylphosphatidylinositol (GPI) (MMP-17, -25). Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I έχουν μια μακρά κυτταροπλασματική ουρά περίπου 20 αμινοξέων μετά την διαμεμβρανική περιοχή (29).

5.3 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Γενικότερα, οι περισσότερες MMPs έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Όλες οι MMPs περιλαμβάνουν ένα σηματοδοτικό N-τελικό πεπτίδιο μεταβλητού μήκους, μια προ-περιοχή (περίπου 80aa) η οποία διατηρεί την MMP σε ανενεργή κατάσταση και απομακρύνεται κατά την πρωτεολυτική ενεργοποίηση του ενζύμου, έναν σύνδεσμο μεταβλητού μήκους (14-69aa) που συνδέει την καταλυτική περιοχή και την περιοχή που μοιάζει με την αιμοπεξίνη (περίπου 210aa), η οποία χαρακτηρίζεται από τέσσερις β-propeller. Μια γενική μορφή της πλειοψηφίας των MMPs είναι αυτή στο *Σχήμα 4*.



Σχήμα 4: Βασική δομή MMPs. Η περιοχή αιμοπεξίνης συνδέεται με την καταλυτική περιοχή μέσω ενός εύκαμπτου συνδέσμου. Όταν η προπεριοχή διασπάται, η MMP ενεργοποιείται και αρχίζει να καταλύει τη διαδικασία. Οι κίτρινες και μοβ σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις ακτίνες van der Waals των ατόμων ασβεστίου και ψευδαργύρου, αντίστοιχα. Οι περιοχές της προ-περιοχής, της καταλυτικής περιοχής, του συνδέσμου και της αιμοπεξίνης ορίζονται κατά προσέγγιση από τις περιοχές καταλοίπων D32-Q99, F100-Y260, G261-C278 και D279-C466, αντίστοιχα (28).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, οι Caco-2 και HT-29. Τα καρκινικά κύτταρα Caco-2 είναι επιθηλιακού τύπου που έχουν απομονωθεί από λευκό άντρα, 72 χρόνων με αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Η καρκινική σειρά HT-29 είναι κύτταρα με επιθηλιακή μορφολογία που απομονώθηκε το 1964 από πρωτοπαθή όγκο που ελήφθη από 44χρονη λευκή γυναίκα ασθενή με αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.

Τα κύτταρα Caco-2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο EMEM, ενώ τα κύτταρα HT-29 σε θρεπτικό μέσο McCoy's 5A. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37 °C σε συνθήκες 5% (v/v) CO₂ και 95% αέρα παρουσία υγρασίας.

6.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ CONDITION MEDIA

Το θρεπτικό μέσο του *Lactobacillus acidophilus* (*Lactobacillus acidophilus* Conditioned Media, LA-CM) παρασκευάστηκε κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες εμβολιάζοντας με *Lactobacillus acidophilus* 100 ml MRS broth και επωάζοντας για 24 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 10.000 × g και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Η βιομάζα επαναιωρήθηκε σε 50 ml DMEM και επωάστηκε για επιπλέον 24 ώρες στους 37°C. Το υπερκείμενο θρεπτικό καλλιέργειας (LA-CM) παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) και διηθήθηκε μέσω φίλτρων με διάμετρο 0,22µm. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

6.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Σε τριβλία των 60cm² έγινε η καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων Caco2, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5. Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε πληρότητα 70-80% έγινε προσθήκη του θρεπτικού υλικού CM-LA. Τέλος, έγινε επώαση των καρκινικών κυττάρων για 24 ώρες στους 37°C.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και στην δεύτερη καρκινική σειρά, HT-29.



Σχήμα 5: Διαδικασία ανακαλλιέργειας κυττάρων.

6.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Στα καρκινικά κύτταρα Caco-2 και HT-29 του παχέος εντέρου μετά την καλλιέργεια τους με το LA-CM απομονώθηκε το ολικό RNA χρησιμοποιώντας το NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το απομονωμένο RNA ποσοτικοποιήθηκε με NanoDrop μετρώντας της απορρόφησής του στα 260 nm και έλεγχος του λόγου A_{260}/A_{280} για ανεπιθύμητες προσμίξεις.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήθηκε και για την καρκινική σειρά HT-29.

Στη συνέχεια, συντέθηκε το cDNA από 1 µg ολικού RNA μέσω του PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis kit, Takara Bio χρησιμοποιώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

6.5 REAL-TIME PCR

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μέσω της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR ή ποσοτική PCR ή real-time PCR). Στην τεχνική της real-time PCR χρησιμοποιείται μιας φθορίζουσας χρωστικής που ενσωματώνεται με στο νεοσυντιθέμενο DNA κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης του γονιδίου που είναι υπό μελέτη. Τα επίπεδα του εκπεμπόμενου φθορισμού ανιχνεύονται από τη συσκευή της real-time PCR και ποσοτικοποιούν σε πραγματικό χρόνο τα επίπεδα του δίκλωνου DNA του γονιδίου στόχου.

Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε μίγμα 20 µL που αποτελούνταν από 10 µL KAPA SYBR FAST Master Mix (2×) Universal (KAPABIOSYSTEMS), ζεύγος εκκινητών (0,2 µM ο καθένας), cDNA και νερό. Η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ενδογενούς ελέγχου

Οι αλληλουχίες των πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR σε πραγματικό χρόνο και για τις MMPs αλλά και για την GAPDH παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

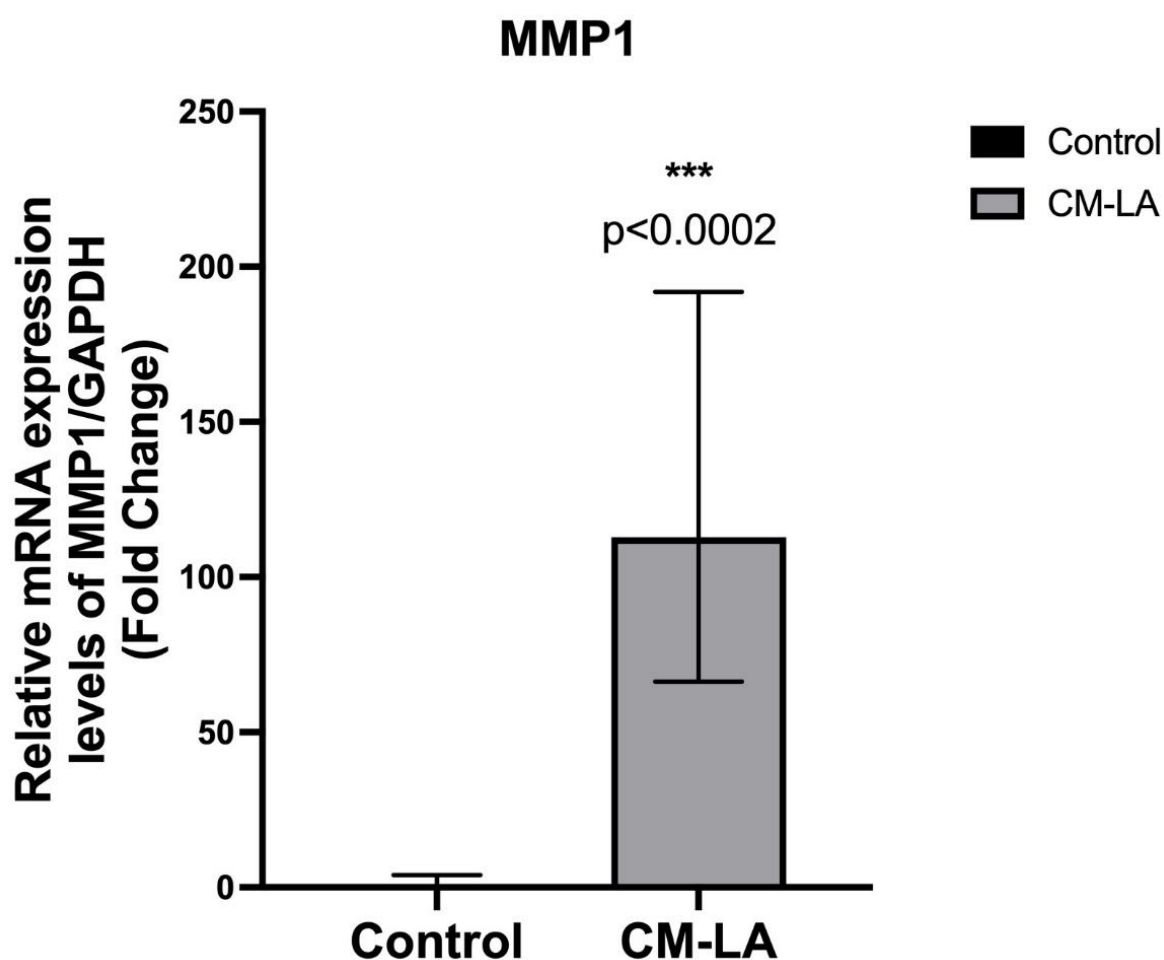
Πίνακας 3: Αλληλουχίες των πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών για την πραγματοποίηση της real-time PCR

Γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής	Tm
<i>MMP-1</i>	CCTCGCTGGGAGCAAAC	TTGGCAAATCTGGCGTGTA	56
<i>MMP-9</i>	TTCCAGTACCGAGAGAAAGCCTAT	GGTCACGTAGCCCACTTGGT	61
<i>GAPDH</i>	AGGCTGTTGTCATACTTCTCAT	GGAGTCCACTGGCGTCTT	57

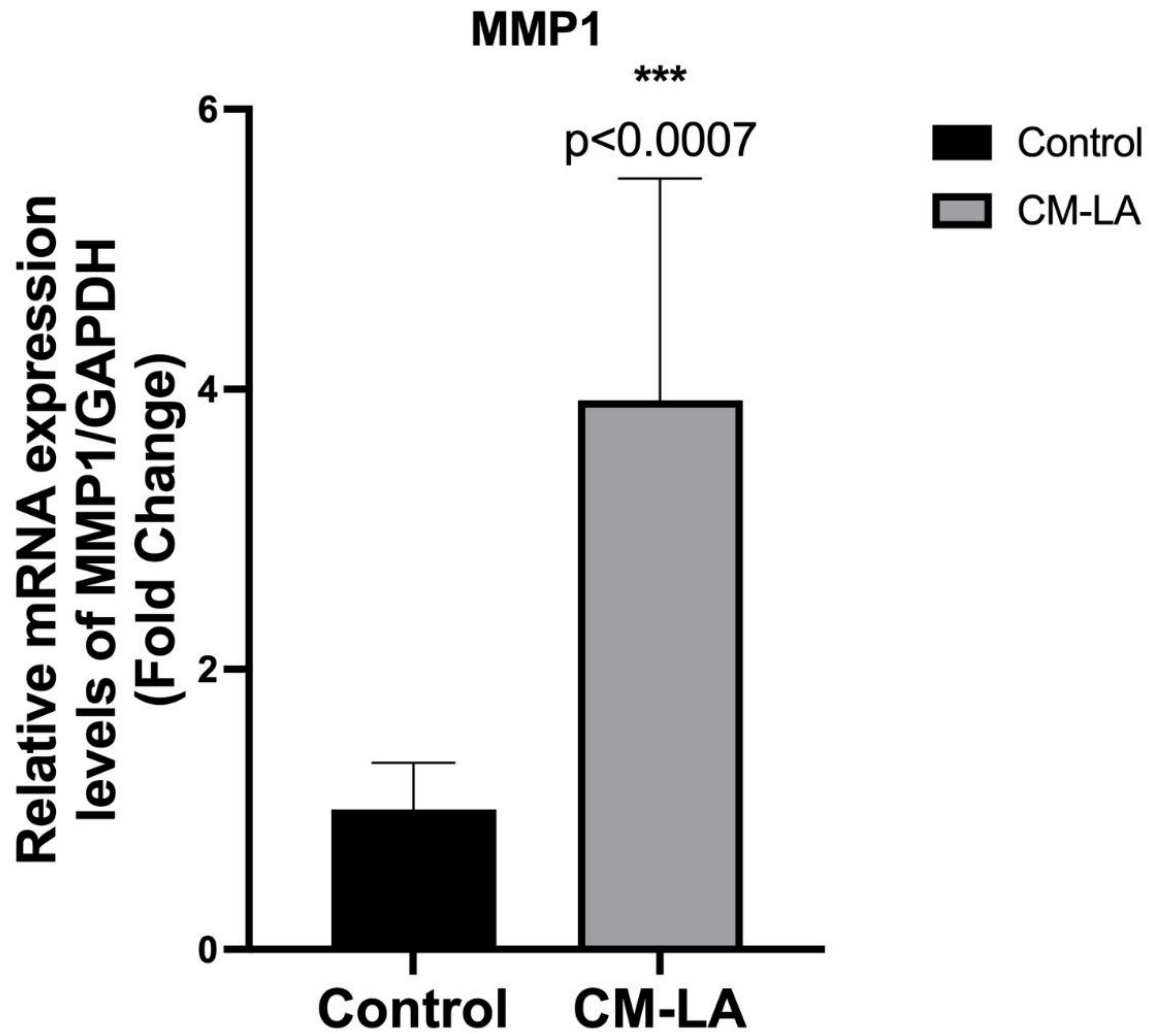
Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήσαμε με Real-Time PCR τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων των μεταλλοπρωτεϊνών προκειμένου να δούμε τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζεται η έκφραση τους στις καρκινικές σειρές Caco2 και HT-29 παρουσία του υπερκείμενου μέσου καλλιέργειας από το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus acidophilus*. Αρχικά μελετήσαμε την γονιδιακή έκφραση της MMP-1 στην καρκινική σειρά Caco2 παρουσία του CM-LA όπου παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κατά 112 φορές σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (Σχήμα 6). Αξιοσημείωτη αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της MMP-1 παρουσιάστηκε και στην καρκινική κυτταρική σειρά HT-29 κατά 3.9 φορές (Σχήμα 7).

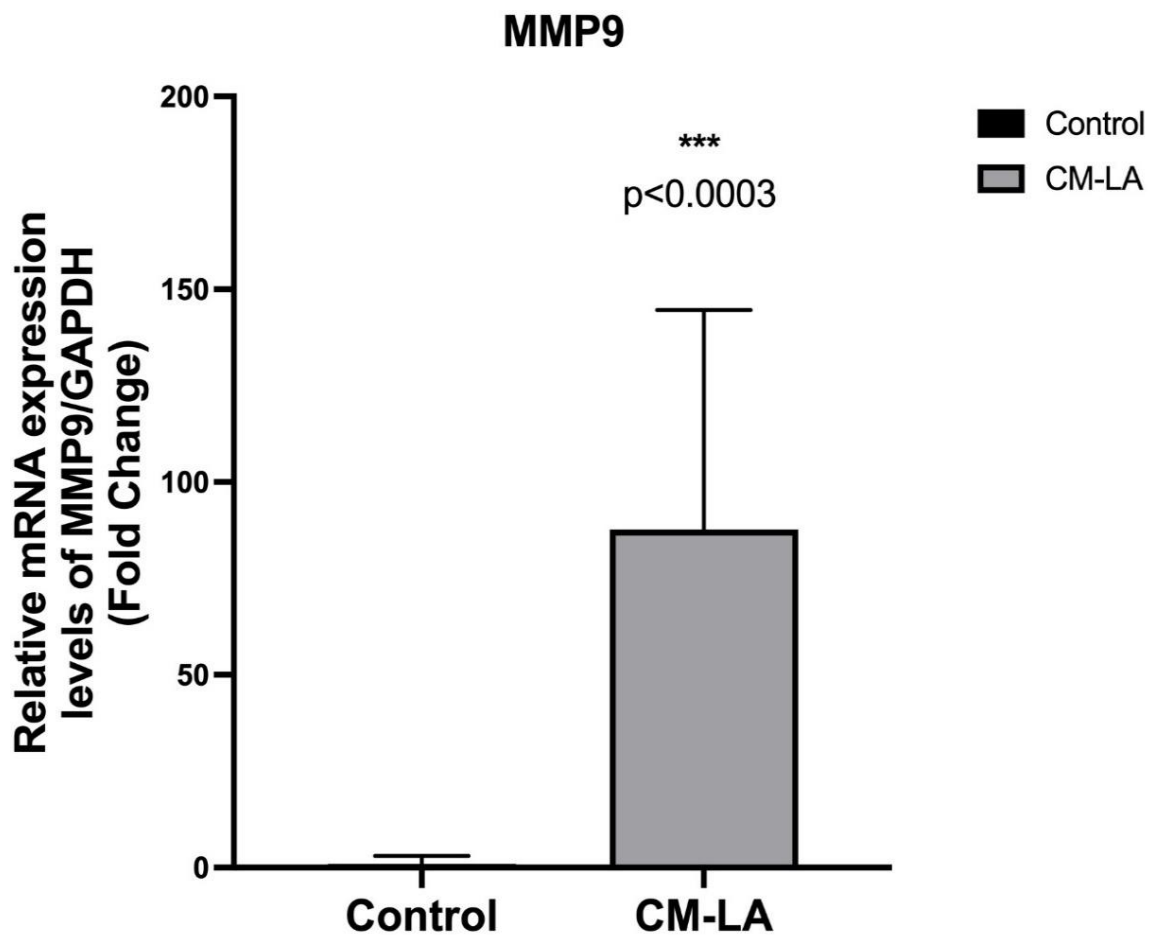


Σχήμα 6: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP1 στην καρκινική κυτταρική σειρά Caco2 μετά από επίωση με CM-LA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. από τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

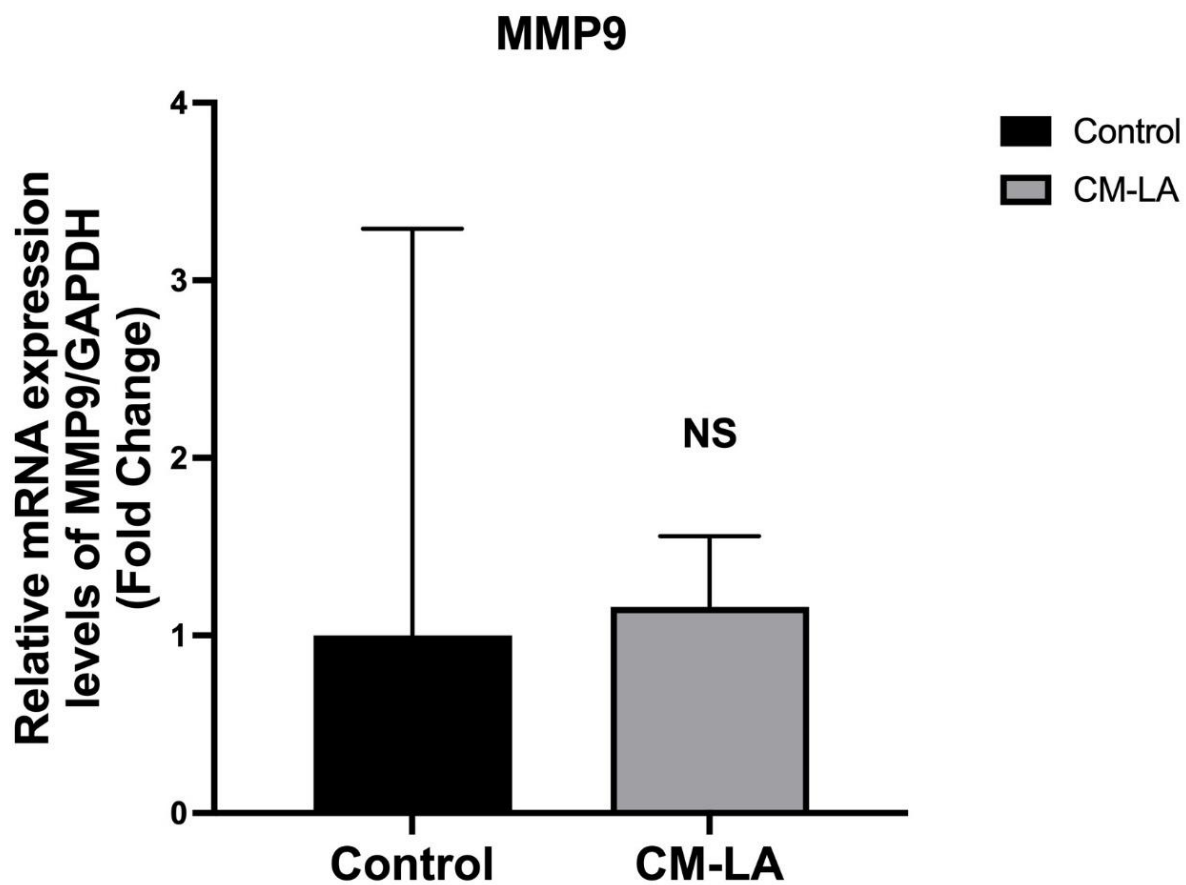


Σχήμα 7: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP1 στην καρκινική κυτταρική σειρά HT29 μετά από επώαση με CM-LA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. από τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Έπειτα στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP-9 στην οποία παρουσιάστηκε αύξηση κατά 87 φορές στη καρκινική σειρά Caco2, σε αντίθεση με την καρκινική σειρά HT-29 στην οποία η αύξηση δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 8 & 9).



Σχήμα 8: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP9 στην καρκινική κυτταρική σειρά *Caco2* μετά από επώαση με CM-LA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. από τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Σχήμα 9: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της MMP9 στην καρκινική κυτταρική σειρά HT29 μετά από επίωση με CM-LA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.E. από τρία ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος πιο κοινός καρκίνος που διαγιγνώσκεται τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες στις Η.Π.Α. Οι εκτιμήσεις της Αμερικανικής Αντικαρκινικής Εταιρείας για τον αριθμό των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου στις Ηνωμένες Πολιτείες για το 2024 αφορά περίπου 106.590 νέες περιπτώσεις (54.210 στους άνδρες και 52.380 στις γυναίκες). Από το 2011 έως το 2019, τα ποσοστά επίπτωσης μειώθηκαν κατά περίπου 1% κάθε χρόνο, αλλά αυτή η πτωτική τάση αφορά κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Σε άτομα ηλικίας κάτω των 55 ετών, τα ποσοστά αυξάνονται κατά 1% έως 2% ετησίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Με την υιοθέτηση του ευρέως διαδεδομένου προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του παχέος εντέρου στις ανεπτυγμένες χώρες, η επίπτωση και η θνησιμότητα του μπορεί να μειωθεί στον πάσχοντα πληθυσμό (1).

Οι MMPs είναι μια οικογένεια πρωτεασών που παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες μορφές καρκίνου (16). Η εξέλιξη του καρκίνου περιλαμβάνει διαφορετικά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης του όγκου, της αγγειογένεσης και της μετάστασης, που εν μέρη ρυθμίζονται και από τις MMPs. Η έκφραση των MMPs στο μικροπεριβάλλον του όγκου εξαρτάται όχι μόνο από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και από τα γειτονικά στρωματικά κύτταρα. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μετέχουν ενεργά καθ' όλη την διάρκεια της εξέλιξης μίας κακοήθειας, καθώς καταλύουν την αποικοδόμηση του ECM επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την διήθηση των κυττάρων και τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Στα αρχικά στάδια της νόσου, οι MMPs έχουν ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης, την αναστολή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως επίσης και την επαγωγή της αγγειογένεσης. Σε προχωρημένο στάδιο της νόσου συσχετίζονται με υψηλή συχνότητα υποτροπών και αρνητική επίδραση στην υγεία του ασθενούς. Η ανάπτυξη του όγκου και η αγγειογένεση εξαρτώνται από την αυξημένη διαθεσιμότητα μορίων σηματοδότησης, όπως αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Οι MMPs μέσω της πρωτεολυτικής τους δράσεις καθιστούν αυτούς τους παράγοντες πιο προσιτούς στα καρκινικά κύτταρα μέσω του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (18). Με αποτέλεσμα, η υψηλή ενεργότητα των MMPs να οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα βιωσιμότητας στους ασθενείς που νοσούν (3). Πολλές μελέτες, όπως αυτή των Liang, Y., *et al.* 2020 (31), δείχνουν ότι η έκφραση διαφορετικών τύπων κολλαγόνων και μεταλλοπρωτεϊνάσων, μεταξύ αυτών και η MMP-1 και η MMP-9, υπερεκφράζονται σε ασθενείς με μετάσταση οδηγώντας στην αναδιαμόρφωσή του ECM και στη κακή πρόγνωση της νόσου (46).

Η έρευνα που πραγματοποιείται σχετικά με τη δράση των προβιοτικών έχει φανερώσει πιθανή αντικαρκινική δράση (44). Τα προβιοτικά διευκολύνουν την ευεργετική δράση των αντικαρκινικών ενώσεων, ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα, βελτιώνοντας τον εντερικό φραγμό, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και προκαλώντας απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα (44). Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) είναι ένα από τα πιο κοινά προβιοτικά και πολλές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση και της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου, αλλά τα δραστικά συστατικά και ο υποκείμενος μηχανισμός δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως (45). Ορισμένα LAB, καθώς και τα θρεπτικά συστατικά που παράγουν, περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων κακοήθων κυττάρων με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση *in vitro* και *in vivo*.

Οι Chen, C., *et al.* (38) έχουν δείξει ότι η χορήγηση *per os* του *L. acidophilus* NCFM μπορεί να περιορίσει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και να προκαλέσει απόπτωση (10). Αντίθετα στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση παρουσία θρεπτικού μέσου από *L. acidophilus* οδήγησε στην υπερέκφραση των MMP-1 και MMP-9 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αναφορικά με την MMP-9, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης μόνο στην κυτταρική σειρά CaCo2 και όχι στην HT-29. Σύμφωνα με την μελέτη των Yang, B., *et al.* (43), η υπερέκφραση της MMP-9 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τον ιστοπαθολογικό βαθμό της νόσου, το στάδιο, το μεταστατικό δυναμικό, τη δυνατότητα υποτροπής και την επιβίωση των ασθενών. Ως εκ τούτου, αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το MMP-9 είναι πιθανό να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου. Με βάση τα πολύ περιορισμένα δεδομένα μας, υποθέτουμε ότι η υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1 και MMP-9 με την παρουσία του LA-CM, μπορεί να μη έχει ευεργετική δράση στην υγεία των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς επίσης και η μελέτη της ενζυμικής τους δραστηριότητας θα βοηθούσε σε μια πιο εμπειριστατωμένη μελέτη που θα οδηγούσε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed, M. (2020). Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Research, 13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.14740/gr1239>
2. Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., ... Klaenhammer, T. R. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102*(11), 3906–3912. doi:10.1073/pnas.0409188102
3. Ambiru, S., Miyazaki, M., Ito, H., Nakagawa, K., Shimizu, H., Nukui, Y., Nozawa, S., Okuno, A., Yoshitomi, H., & Nakajima, N. (1997). A prospective study of prognostic value of type IV collagenase activity in colorectal cancer tissue. *Digestive Diseases and Sciences, 42*(8), 1660–1665. <https://doi.org/10.1023/A:1018801229372>
4. Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International, 2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
5. Bhatt, A. P., Redinbo, M. R., & Bultman, S. J. (2017). The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 67*(4), 326–344. <https://doi.org/10.3322/caac.21398>
6. Bister, V. O., Salmela, M. T., Karjalainen-Lendsberg, M. L., Uria, J., Lohi, J., Puolakkainen, P., Lopez-Otin, C., & Saarialho-Kere, U. (2004). Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Digestive Diseases and Sciences, 49*(4), 653–661. <https://doi.org/10.1023/B:DDAS.0000026314.12474.17>
7. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome, 8*(1). doi:10.1186/s40168-020-00875-
8. Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., ... Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-019-0222-5
9. Chattopadhyay, I., Dhar, R., Pethusamy, K., Seethy, A., Srivastava, T., Sah, R., ... Karmakar, S. (2021). Exploring the Role of Gut Microbiome in Colon Cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 193*(6), 1780–1799. doi:10.1007/s12010-021-03498-9
10. Chen, C. C., Lin, W. C., Kong, M. S., Shi, H. N., Walker, W. A., Lin, C. Y., Huang, C. T., Lin, Y. C., Jung, S. M., & Lin, T. Y. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *British Journal of Nutrition, 107*(11), 1623–1634. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004934>
11. Cullin, N., Azevedo Antunes, C., Straussman, R., Stein-Thoeringer, C. K., & Elinav, E. (2021). Microbiome and cancer. *Cancer Cell, 39*(10), 1317–1341. doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.006
12. Du, T., Lei, A., Zhang, N., & Zhu, C. (2022). The Beneficial Role of Probiotic *Lactobacillus* in Respiratory Diseases. *Frontiers in Immunology, 13*(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.908010>
13. Ellina, M. I., Bouris, P., Aletras, A. J., Theocharis, A. D., Kletsas, D., & Karamanos, N. K. (2014). EGFR and HER2 exert distinct roles on colon cancer cell functional properties and

- expression of matrix macromolecules. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(8), 2651–2661. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.019>
14. E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., Amato, K. R., Clark, A. G., & Knight, R. (2017). The human microbiome in evolution. *BMC Biology*, 15(1). doi:10.1186/s12915-017-0454-7
 15. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH (2020) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(10):577–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2020.156>
 16. Foda, H. D., & Zucker, S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today*, 6(9), 478–482. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01752-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01752-4)
 17. Gao, H., Li, X., Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L., & Li, P. (2022). The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in Different Physiological and Pathological Processes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 1226–1233. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05041>
 18. Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2010). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1), 16–27. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x
 19. Girard, N., Lal, R., Wakelee, H., Riely, G. J., & Loehrer, P. J. (2011). Chemotherapy Definitions and Policies for Thymic Malignancies. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(7), S1749–S1755. doi:10.1097/jto.0b013e31821ea5f7
 20. Gobbetti, M., & Minervini, F. (2014). LACTOBACILLUS | *Lactobacillus casei*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 432–438. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00180-4
 21. González-Sánchez, P., & DeNicola, G. M. (2021). The microbiome(s) and cancer: know thy neighbor(s). *Journal of Pathology*, 254(4), 332–343. doi.org/10.1002/path.5661
 22. Huang, J., Zhang, L., Wan, D., Zhou, L., Zheng, S., Lin, S., & Qiao, Y. (2021). Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). doi:10.1038/s41392-021-00544-0
 23. Jezewska-Frackowiak, J., Seroczynska, K., Banaszczyk, J., Jedrzejczak, G., Zylicz-Stachula, A., & Skowron, P. M. (2018). The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta Biochimica Polonica*, 65(4), 509–519.
 24. Jones, R. M. (2017). The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 99–108. doi:10.1016/b978-0-12-804024-9.00009-4
 25. Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., ... Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.15776
 26. Kumar, H., & Salminen, S. (2016). Probiotics. *Encyclopedia of Food and Health*, 510–515. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00570-5
 27. Kumar, I., Silva, M., Choudhary, D. A., Ali, S. F., Rusak, R., Cotzomi, P., Wiecek, S., Sato, I., Khundoker, R., Donmez, B., Gabriel, S., Bobila, M., Leonida, M. D., & Traba, C. (2023). Small molecular exogenous modulators of active forms of MMPs. *Biochimie*, xxxx.
 28. Kumar, L., Planas-Iglesias, J., Harms, C., Kamboj, S., Wright, D., Klein-Seetharaman, J., & Sarkar, S. K. (2020). Activity-dependent interdomain dynamics of matrix metalloprotease-1 on fibrin. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
 29. Laronha, H., & Caldeira, J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051076>

30. Li, W., Deng, Y., Chu, Q., & Zhang, P. (2019). Gut microbiome and cancer immunotherapy. *Cancer Letters*, 447, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.015>
31. Liang, Y., Lv, Z., Huang, G., Qin, J., Li, H., Nong, F., & Wen, B. (2020). Prognostic significance of abnormal matrix collagen remodeling in colorectal cancer based on histologic and bioinformatics analysis. *Oncology Reports*, 44(4), 1671–1685. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7729>
32. Liu, M., Hu, Y., Zhang, M.-F., Luo, K.-J., Xie, X.-Y., Wen, J., ... Yang, H. (2016). MMP1 promotes tumor growth and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*, 377(1), 97–104. doi:10.1016/j.canlet.2016.04.034
33. Lofgren, J. L., Whary, M. T., Ge, Z., Muthupalani, S., Taylor, N. S., Mobley, M., Potter, A., Varro, A., Eibach, D., Suerbaum, S., Wang, T. C., & Fox, J. G. (2011). Lack of commensal flora in helicobacter pylori-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 140(1), 210-220.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.048>
34. Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1). doi:10.1186/s40168-015-0094-5
35. M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*, 57(S1), 1–14. doi:10.1007/s00394-018-1703-4
36. Nanjundaiah, Y. S., Wright, D. A., Baydoun, A. R., Khaled, Z., Ali, Z., Dean, P., & Sarker, M. H. (2020). Modulation of Macrophage Function by Lactobacillus-Conditioned Medium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00723>
37. Proctor, L. (2019). Priorities for the next 10 years of human microbiome research. *Nature*, 569(7758), 623–625. doi:10.1038/d41586-019-01654-0
38. Schaeue, D., & McBride, W. H. (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), 527–540. doi:10.1038/nrclinonc.2015.120
39. Smithson, J., Kellick, K. A., & Mergenhagen, K. (2017). Nutritional Modulators of Pain in the Aging Population. *Nutritional Modulators of Pain in the Aging Population*, 191–198. doi:10.1016/b978-0-12-805186-3.00016-3
40. Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*. doi:10.1038/s41591-019-0439-x
41. Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109821.
42. Theocharis, A. D., Manou, D., & Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *The FEBS Journal*, 286(15), 2830–2869. doi:10.1111/febs.14818
43. Yang, B., Tang, F., Zhang, B., Zhao, Y., Feng, J., & Rao, Z. (2014). Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), 24. doi:10.1186/1477-7819-12-24
44. Yue, Y., Wang, S., Shi, J., Xie, Q., Li, N., Guan, J., Evivie, S. E., Liu, F., Li, B., & Huo, G. (2022). Effects of Lactobacillus acidophilus KLDS1.0901 on Proliferation and

Apoptosis of Colon Cancer Cells. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.788040>

45. Wang, K., Zheng, J., Yu, J., Wu, Y., Guo, J., Xu, Z., & Sun, X. (2020). Knockdown of MMP-1 inhibits the progression of colorectal cancer by suppressing the PI3K/Akt/c-myc signaling pathway and EMT. *Oncology Reports*, 43(4), 1103–1112.
<https://doi.org/10.3892/or.2020.7490>
46. Zhou, C., Gao, Y., Johnson, N., & Gao, J. (2010). Immunoeexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. *Australian Dental Journal*, 55(4), 385–389.
[doi:10.1111/j.1834-7819.2010.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01258.x)