مقایسه تاثیر میکروبیوتای مدفوع نوزاد بر بقای زیستی سلولهای سرطانی روده و سلولهای بنیادی سوماتیکی نامحدود

سارا مودتی[۱*]، جواد حامدی[۲]، بهمن زینلی[۳]

تاریخ دریافت ۹۳/۱۲/۱۹
تاریخ تصویب ۹٤/۱۲/۱۱

چکیده

میکروبیوتای نوزاد تغذیه کننده از شیر مادرعمدتا شامل دو جنس Bifidobacterium, Lactobacillus است. زایمان طبیعی در مقایسه با سزارین در استقرار باکتری های مفید و تکوین مناسب سیستم ایمنی و دستگاه گوارش نوزاد نقش به سزایی دارد. هدف از این مطالعه مقایسه ی تاثیر میکروبیوتای مدفوع نوزاد چهار ماهه متولد شده با زایمان طبیعی تغذیه کننده از شیر مادر بدون سابقه مصرف آنتی بیوتیک و بیماری های گوارشی بر بقای زیستی دو نوع سلول متفاوت از نظر ماهیت رشد شامل سلولهای سرطانی روده (Caco-2) و سلولهای بنیادی سوماتیکی نامحدود (USSC) می باشد. استخراج میکروبیوتای

۱* دانش آموخته کارشناسی زیست شناسی علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه تهران (نویسنده مسئول Mavaddati.sara@gmail.com)
۲ دانشیار، پردیس علوم،دانشکده زیست شناسی، بخش فناوری های زیستی، دانشگاه تهران
۳ استادیار، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش فناوری های زیستی، دانشگاه تهران

مدفوعی با حلال اتیل استات انجام شد. پس از حذف حلال، حاصل استخراج در حجم کمی از DMSO حل شد. اثرغلظت های ۲/۵ و ۵ میکروگرم/ میلی لیتر از میکروبیوتا بر سلول هاپس از ۷۲ ساعت انکوباسیونبا آزمون MTT سنجیده شد. نتایج نشان داد که بقای زیستی USSC ها با افزایش دوز افزایش یافت. در حالیکه در همین شرایط ، کاهش بقای زیستی سلول های Caco-۲ مشاهده شد

واژه های کلیدی: بقای زیستی، سلول‌های بنیادی سوماتیکی نامحدود (USSC)، میکروبیوتا، Caco-2

مقدمه

سلولهای میکروبی بدن یک فرد بالغ ده برابربیشترازسلولهای انسانی است. در هر میلی لیتر محتوای لومن دستگاه گوارش انسان تقریبا $۱۰^{۱۱}$-$۱۰^{۱۲}$ میکروب وجود دارد. این اکوسیستم میکروبی عملکردهای زیاد و مهمی برای میزبان انسانی خود دارد. حفاظت دربرابرعوامل بیماریزا، پردازش موادغذایی، تحریک رگزایی وتنظیم ذخیره چربی تنها بخشی از آن ها است (Bäckhed et al., (2004). Hooper, Midtvedt, & Gordon, (2002). Ley et al., (2005). Ley et al. (2006). MacDonald & Gordon, (2005). Stappenbeck et al., (2002). Xu & Gordon, (2003). گسترش مطالعات به کشف عملکردها و روابط جدید کمک می کنند. بررسی موش های بدون میکروب[1] به طور ویژه نقش میکروبیوتا را در تکوین طبیعی دستگاه گوارش نشان داده است Bäckhed et al., (2004). Xu & Gordon, (2003). علاوه براین، به نظر می رسد بیماریهای متعددی از جمله سرطان معده (Parsonnet et al., (1991، لنفوم بافت لنفاوی مرتبط با مخاط Lecuit et al., (2004)، بیماری های التهابی روده Ott et al., (2004). Seksik et al., (2003) و انتروکولیتنکروزان de la Cochetière et al., (2004). Fell, (2005) دربزرگسالان و شیرخواران با میکروبهای دستگاه گوارش در ارتباط باشند. ترکیب میکروبی دستگاه گوارش بزرگسالان با استفاده ازهر دو روش کشت و مستقل ازکشت- روشهای مبتنی برتوالی زیر واحدهای کوچک DNA ریبوزومی (rDNA)- موردمطالعه قرار گرفته است Vaughan et al., (2000). میکروبیوتای دستگاه گوارش نوزاد از نظر محتوا متغیر است و ثبات کمی در طول زمان دارد. در سال اول زندگی، دستگاه گوارش نوزاد به سرعت با میکروب ها

1 Germ-free

کلونیزه شده و از حالت سترونی خارج می شود. جمعیت میکروبی نهایی بسیار مشابه روده بزرگسالان است Stark & Lee, (1982). گزارشات متناقضی در خصوص ترکیب میکروبی دستگاه گوارش نوزادان و عوامل شکل گیری آن وجود دارد. مطابق بسیاری از پژوهش ها، میکروبیوتای نوزاد تغذیه کننده از شیر مادر عمدتا شامل دو جنس بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس است Arboleya et al., (2011). همچنین در برخی مطالعات، جنس بیفیدوباکتریوم به عنوان میکروبیوتای غالب دستگاه گوارش نوزادان تغذیه کننده از شیر مادر چندین هفته پس از تولد شناخته شده است(Benno, Sawada, & Mitsuoka, (1984). Favier, Vaughan, De Vos, & Akkermans, (2002). Pend-ers et al., (2006). Stark & Lee, (1982) ، حال آنکه سایر گزارشات نشان می دهند که این جنس تنها در تعدادی از نوزادان وجود دارد و از نظر عددی غالب نیست Hall, Cole, Smith, Fuller, & Rolles, 1990). Hopkins et al. (2005)). همچنین درسایر مطالعات تفاوت خاصی دیده نشده است Lundequist, Nord, & Winberg, (1985). Penders et al., (2005). یکی از نکات قابل بحث در نتایج متفاوت این مطالعات، تاثیر رژیم غذایی درترکیب میکروبی دستگاه گوارش نوزاد است. یافته ها نشان می دهند که میکروبیوتای نوزادان تغذیه کننده از شیرخشک نسبت به نوزادان تغذیه کننده از شیر مادر بیشتر حاوی باکتری های هوازی است و بیفیدوباکتریوم ها فراوانی کمی دارند Balmer & Wharton, (1989). Favier et al., (2002). Hopkins et al., (2005). Yoshioka et al., (1983). یکیازعواملکلیدیشکل دهندهمیکروبیومنوزاد که در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است نوع زایمان است Fanaro et al., (2003). Orrhage & Nord, (1999). Pend-ers et al., (2006). میکروبیوتای نوزادان زایمان طبیعی با نوزادان سزارینی از نظر ترکیب میکروبی و زمان کلونیزاسیون متفاوت است .Bennel & Nord, (1987) Hällström et al., (2004). Penders et al., (2006). عامل قابل توجه دیگر نقش مصرف آنتی بیوتیک در به هم ریختن ترکیب میکروبیوتا است Clemente et al., (2012). به منظوردستیابی به میکروبیوتای دستگاه گوارش یکی از سریع ترین روش ها، استخراج متابولیت ها و یا کوچک مولکول ها از نمونه مدفوعی است Mai et al., (2011). چون بخش عمده آن را میکروبیوتا تشکیل می دهد Bartosch et al., (2004). van Tongeren et al., (2005). مطالعات متعددی میانکنش میان میکروبیوتا و سلول های میزبان انسان را در مقیاس سلولی و نقش آن ها در بیان ژنی تایید می کنند Kaper & Sperandio, (2005). Yang et al., (2013)

در مطالعات مرتبط با نقش میکروبیوتا با سرطان نیزدیده شده استکه احتمال ابتلا به انواع بیماری ها نظیر سرطان در مدل موش های بدون میکروب بیشتر است Uronis et al., (2009). سرطان کولونیکی از شایع ترین بیماری های قرن اخیراست که به نظرمی رسد بهم ریختن همین توازن میکروبیوتا در استعداد ابتلا به این بیماری نقش دارد(Gao et al., 2015). سلولهای Caco-2 به دلیل بیان هیدرولازهای خاص روده کوچک و ناقل های غذایی و دارا بودن اتصالات محکم و حاشیه مسواکی مورد توجه مسیرهای دریافت دارو در شرایط آزمایشگاهی هستند. علاوه بر این،جهت بررسی اثرات متابولیکی میکروبیوتا کاندید مناسبی می باشند(Meunier et al., (1995. در این مطالعه هدف بررسی مقایسه ای نقش میکروبیوتای مدفوعی نوزاد چهار ماهه متولد شده با زایمان طبیعی تغذیه کننده از شیر مادر بدون سابقه مصرف آنتی بیوتیک و بیماری های گوارشی بر بقای زیستی دو نوع سلول متفاوت از نظر ماهیت رشد شامل سلول های سرطانی روده Caco-2 و سلولهای بنیادی سوماتیکی نامحدود USSC می باشد. USSC ها سلول های پرتوان با قابلیت چسبندگی بالا هستند که ۴۳/۵۵ درصد ازکل سلولهای بنیادی خون بندناف را تشکیل می دهند. همچنین مارکرهای سطحیIIHLA class و 45CD را بیان نمی کنند و می توانند بدون تغییر ماهیت تا ۲۰ بارپاساژ داده شوند که در این مطالعه به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند Kögler et al. , (2006). Sha-fiee et al., (2011).

مواد و روش ها

استخراج میکروبیوتا ی مدفوع نوزاد:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.نمونه مدفوع از نوزاد چهارماهه متولد شده با زایمان طبیعی تغذیه کننده از شیر مادر بدون سابقه مصرف آنتی بیوتیک و بیماری های گوارشی تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. نمونه با نسبت ۱ به ۲ در اتیل استات (Merck) حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر دور (rpm) ۸۶۰ هم زده شد. سپس، با کاغذ صافی پلت مدفوعی جدا شده، دور ریخته شد و محلول زیری به ظرف جدید منتقل شد. از مخلوط واکنش در فشار و دمای کم با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور، فاز حلال حذف گردید. عصاره آلی حاصل به عنوان میکروبیوتای مدفوع نوزاد در نظر گرفته شد. سپس در مقدار کمی DMSO حل گردید. غلظت های مورد نظر از آن تهیه شد.

- جداسازی سلول های بنیادی سوماتیکی نامحدود خون بند ناف، کشت آنها و کشت سلول های Caco-2:

واحد های خون بند ناف از سازمان انتقال

خون ایران تهیه گردید. اهدا کنندگان خون بند ناف، مادران سالم (براساس پرسشنامه پزشکی فاقد بیماری های زمینه ای، ژنتیکی و براساس آزمایش های سرولوژی عاری ازسیفلیس و بیماری های ویروسی HTLV I/II،CMV،HIV،HCV) با دوره حاملگی کامل بوده اند. خون بند ناف هنگام زایمان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه به منظور حذف گلبول های قرمز هر ۵ میلی لیتر خون کامل با یک میلی لیتر هیدروکسی اتیل استارچ (آلمان- GMBH) مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از رسوب گلبول های قرمز خون، پلاسمای رویی جداسازی شد. سپس با استفاده از شیب غلظت لنفودکس(دیاگنوستیکا) سلول های تک هسته ای خون بند ناف جدا گردید. تعداد 10^6× ۵-۷ سلول در میلی لیتر محیط Dulbeco's Modified Eagle Medium (LG-DMEM) (گیبکو) حاوی ۳۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovin Serum) (گیبکو)،۷-۱۰ مولار دگزامتازون (سیگما) و پنی سیلین/ استرپتومایسین (گیبکو) (ng/ml/100u/ml 100) به مدت دوهفته در فلاسک های T75 (Orange) در انکوباتور 5% CO2 دمای 37°C کشت داده شد. پس از دوهفته سلول های بنیادی سوماتیکی نا محدود چسبیده به کف فلاسک در ۳۰ درصد واحد های خون بند ناف پدیدارگردید. پس از اینکه سلول ها ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند با استفاده از تریپسین EDTA25/0/ درصد (گیبکو) پاساژ دادهشدند .(Kögler et al., 2004)سلول های Caco-2 استخراج شده از نمونه های بالینی سرطان کولون از آزمایشگاه فوق تخصصی بیماری های گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران تهیه گردید. تعداد ۱×۱۰۶ سلول در میلی لیتر محیط کشت Ham's F12-DMEM (گیبکو)حاوی ۱۰ درصد FBS در انکوباتور 5% CO2 دمای C37° به مدت یک هفته کشت داده-شد. پس از اینکه سلول ها ۵۰ درصد کف فلاسک را پر کردند با استفاده از تریپسین EDTA25/0/ درصد (گیبکو) پاساژ داده شدند(Macdonald et al., 1999).

تعیین اثر میکروبیوتای مدفوعی بر بقای سلولی به روش MTT assay:

اثر میکروبیوتای مدفوعی بر بقای سلول های Caco-2 و USSC توسط رنگ آمیزی با ماده MTT تعیین شد. برای انجام این تست، ابتدا سلول های مزبور به ترتیب در محیط کشت DMEM/Ham's F12 و DMEM به طور جداگانه کشت داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر محیط کشت به هر چاهک پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه اضافه و ۲۴ ساعت انکوبه شد، گروه تیمار سلول ها شامل غلظت های ۲/۵ و ۵

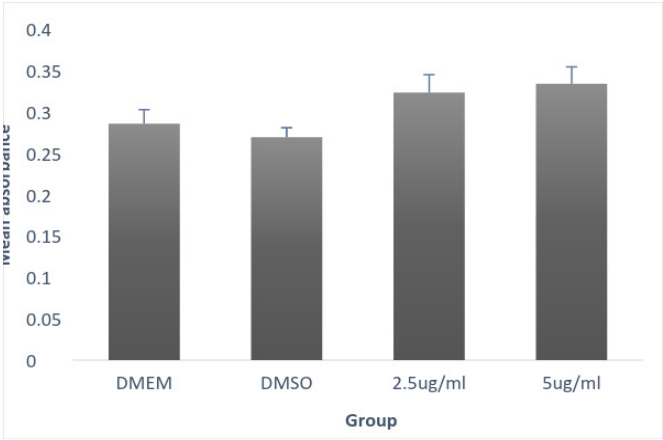
میکروگرم/میلی لیتر از میکروبیوتای مدفوعی بود. به یک گروه DMSO افزوده شد و یک گروه نیز بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک در هر گروه ۱۰۰ میکرولیترر نگ *MTT* (سیگما) اضافه شد. پس از ۸ ساعت انکوباسیون در دمای C° ۷، محتوای هر چاهک دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر *DMSO* به منظور حل کردن بلور های فورمازان تشکیل شده به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها به مدت ۱۵ دقیقه به دور از نور انکوبه شدند. طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

آنالیز آماری

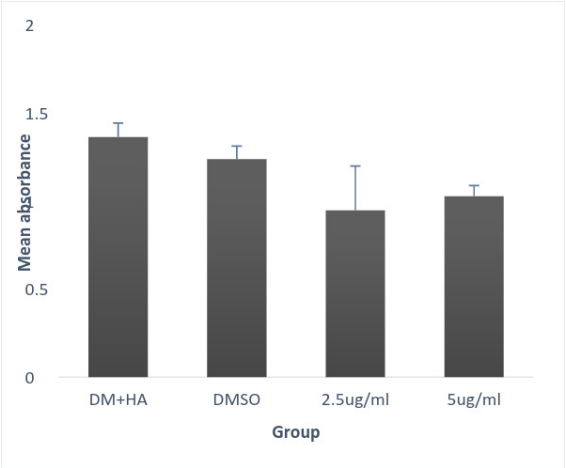
با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۳) ابتدا شرایط نرمال بودن داده ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. سپس با استفاده از آزمون One-Way ANOVAتجزیه و تحلیل صورت گرفت. ۰/۰۵>p معنادار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها نیز با نرم افزار اکسل انجام گرفت.

نتایج

در این پژوهش اثر میکروبیوتای مدفوعی نوزاد چهار ماهه متولد شده با زایمان طبیعی تغذیه کننده از شیر مادر بدون سابقه مصرف آنتی بیوتیک و بیماری های گوارشی بر کشت سلول های Caco-2 و USSC بررسی شد. مطابق شکل ۱ که اثر سمیت میکروبیوتای مدفوعیدر USSC ها را نشان می دهد؛ بقای زیستی این سلول ها با افزایش دوز میکروبیوتااز ۲/۵ به ۵ میکروگرم / میلی لیتر به ترتیب به



شکل۱: اثر میکروبیوتای مدفوعی بر بقای زیستی سلولهایUSSC



شکل۲ :اثر میکروبیوتای مدفوعی بر بقای زیستی سلول های۲-Caco

میزان ۱۹/۹۱درصد و ۲۳/۹۱ درصد افزایش یافت. در حالیکه براساس شکل۲، با همین افزایش دوز به ترتیب ۲۳/۴۳ درصد و ۱۶/۹۵ درصد کاهش بقای زیستی سلول های Caco-2 مشاهده شد. هرچند این کاهش در دوز بالاتر معنادار بود. جدول ۱ میانگین میزان جذب MTT سلول های Caco -2و USSC تیمار شده با غلظت های ۲/۵ و ۵ میکروگرم/ میلی لیتراز میکروبیوتاو گروه کنترلرا نشان می دهد.

بحث

با توجه به اینکه میکروبیوتای نوزاد تغذیه کننده از شیر مادر عمدتا شامل دو جنس *بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس* است Ar-boleya et al., (2011). همچنین، نقش عوامل دیگری چون زایمان طبیعی و سابقه مصرف آنتی بیوتیک در ایجاد همین ترکیب از میکروبیوتادرمطالعات متعددی بیان شده است Clemente et al., (2012). Muel-ler et al., (2015.) Penders et al., (2006). به نظر می رسد میکروبیوتای دستگاه گوارش نوازد چهار ماهه بررسی شده در این مطالعه نیز که سابقه مصرف آنتی بیوتیک نداشته، حاصل زایمان طبیعی بوده و از شیر مادر تغذیه داشته حاصل فعالیت های دو جنس *Bifidobacterium and Lac-tobacillus* باشد. نتایج متفاوت در مقایسه انجام گرفته بر سلول های سالم و سرطانی می تواند تاییدی بر نقش بالقوه میکروبیوتا در مسیرهای مربوط به بقا یا مرگ سلولی باشد. طبق مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸در رابطه با نقش عصاره *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 بر تکثیر سلول های Caco -2 انجام گرفت؛ فعالیت سیستم ایمنی میزبان با افزودن اینعصاره افزایش یافت. همچنیننقش ضد تکثیری آن بر سلول های Caco-2و اثر تعدیل کننده ی آن بر پاسخ زیستی جهت پیشگیری ابتلا به سرطان کولون نیز آشکار شد. (Lee et al.,

2008). مطابق نتایج بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت، تغییرات چشمگیر میکروبیوتا در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به افراد سالم؛مشاهده شد (Chen et al., (2012. در مطالعه کنونی میکروبیوتای مدفوعی نوزاد نیز منجر به کاهش معنادار بقای سلول های Caco-2 در دوز ۵ میکروگرم/ میلی لیتر شد. می توان اینگونه توجیه نمود که سلول های سرطانی در غلظت های بالاتر میکروبیوتا،کاهش بقای زیستی قابل مشاهده تری را نشان می دهند. همچنین در مطالعات دیگری اشاره شده است که گونه های زنده یا کشت شده Lactoba-cillus و Bifidobacterium و برخی از اجزای سلولی آنها، قادر به تحریک تولید هیدروژن پراکسید، نیتریک اکسید (NO) و سیتوکاین هایی مانند IL-6 و فاکتور نکروز تومور-آلفا(α-(TNF در ماکروفاژها هستندHAN et al., (2005). Miettinen et al. (1996). Park et al., (2007). که می توانایین موارد را جهت بررسی مکانیسم مهار رشد سلول های Caco-2 در مطالعات بعدی مد نظر قرار داد. از طرفی مطالعات نشان می دهند که سلول های بنیادی سوماتیکی نامحدود به دلیل پتانسیل تکثیر، توانایی خودتجدیدی و تمایز بالایی که دارند در اندام زایی جنین San-tourlidis et al., (2011)

، تمایز به استئوبلاستها، کندروسیت ها، آدیپوسیت ها و پیش سازهای سلول های عصبی نقش دارند (Kögler et al., (2004. همچنین قابلیت تمایز به غضروف, سلول های خونی, سلول های عصبی و بافت قلبی در این سلول ها دیده شده استKögler et al., (2006). بر اساس مطالعه ی سال ۲۰۱۱ تحت عنوان "اثرات میکروبیوتای دستگاه گوارش و پروبیوتیک ها و سلامت مادر و جنین" که تایید کننده عبور متابولیت های تولیدی میکروبیوتای مادر از سد جفتی و اثرات قبل از تولد است (۳۶،۳۷)؛ می توان به اهمیت بررسی این سلول ها به منظور کشف عوامل میکروبی دخیل در تکوین جنین اشاره کرد. بقای زیستی USSC ها در این مطالعه با افزایش دوز میکروبیوتا از ۲/۵ به ۵ میکروگرم/ میلی لیتر به ترتیب به میزان ۱۹/۹۱درصد و ۲۳/۹۱ درصد افزایش یافت. در سال ۲۰۱۲ نقش میکروبیوتا بر تراکم استخوانی موش های مورد مطالعه اثبات شد.در این مطالعه پس از تغذیه مدل موش های بدون میکروب با میکروبیوتای طبیعی از موش دهنده, افزایش تراکم استخوانی مشاهده شد(Sjögren et al., (2012. از آنجا که عمدتا USSC ها در شرایط آزمایشگاهی این مطالعه به سمت استئوسیت ها تمایز می یابند، این شواهد بیانگر وجود مکانیسم هایی در ارتباط با افزایش معنادار تکثیر این سلول ها و میکروبیوتای مدفوعی می باشند. با توجه به پاسخ متفاوت بقای سلول های طبیعی و سرطانی در برابر میکروبیوتای

مدفوعی دستگاه گوارش نوزاد می توان نتیجه گرفت که حضور این عوامل شرایط رشد سلول های طبیعی را مساعدتر می کند. حال آنکه منجر به کاهش بقای زیستی سلول های سرطانی می شوند. این شواهد بیانگر اهمیت پایه ای این موضوع برای ادامه بررسی ها در این حوزه است. با استفاده از روش هایمولکولی دقیق تر می توان به مکانیسم های درگیر در مرگ سلولی سلولهای سرطانی پی برد. ازآنجا که این مطالعه نقش مخرب میکروبیوتا در محیط کشت سلول های حساسی چون USSC را تایید نمی کند؛ شاید بتوان از نقش هدایت کننده میکروبیوتا و پروبیوتیک ها در جهت کشت بهتر این سلول ها در محیط In Vi-tro و مشابه کردن این شرایط با محیط In

جدول ۱: میانگین میزان جذب MTTسلولهای ۲-Caco و USSC

گروه ها	میانگین میزان جذب MTT سلولهای USSC در ۶ تکرار	میانگین میزان جذب MTTسلولهای ۲-Caco در ۶ تکرار
DMEM	۰/۲۸۶۴±۰/۰۱۷	---------
DM+HA	----------	۱/۳۶۱±۰/۰۷۹
DMSO	۰/۲۷۰۲±۰/۰۱۱	۱/۲۳۶±۰/۰۷۴
تیمار ۲/۵ µg/ml	۰/۳۲۴±۰/۰۲۲	۰/۹۴۶±۰/۲۵۱
تیمار۵ µg/ml	۰/۳۳۵±۰/۰۲۰	۱/۰۲۶±۰/۰۶

Vivo در مطالعـات بعـدی بهـره جسـت.

منابع

Arboleya, S., Sanchez, B., Fernandez, N., Solis, G., De Los Reyes-Gavilan, C. G., & Gueimonde, M. (2011). Breast-milk lactobacilli and bifidobacteria. Opportunities for the development of infant formulas. Agro Food Industry Hi Tech. 22: 28.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101: 15718-15723.

Balmer, S. E., & Wharton, B. A. (1989). Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. Archives of Disease in Childhood. 64:16721677.

Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & McMurdo, M. E. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Applied and environmental microbiology.70: 3575-3581.

Bennel, R., & Nord, C. E. (1987). Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. Infection.15:332-336.

Benno, Y., Sawada, K., & Mitsuoka, T. (1984). The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. Microbiology and immunology. 28: 975-986.

Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., & Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen And mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. PloS one. 7: e39743.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell. 148: 1258-1270.

de la Cochetière, M. F., Piloquet, H., des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J. P., & Rozé, J. C. (2004). Early intestinal bacterial colonization and necrotizing Enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. Pediatric research. 56: 366-370.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. Acta paediatrica. 92:48-55.

Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in Human neonates. Applied and environmental microbiology. 68: 219-226.

Fell, J. M. E. (2005). Neonatal inflammatory intestinal diseases: necrotizing enterocolitis and allergic colitis. Early human development. 81:117-122.

Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., & Qin, H. (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. Frontiers in microbiology. 6.

Hall, M. A., Cole, C. B., Smith, S. L., Fuller, R., & Rolles, C. J. (1990). Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. Archives of disease in childhood. 65: 185-188.

Hällström, M., Eerola, E., Vuento, R., Janas, M., & Tammela, O. (2004). Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 23: 463-470.

Han, S., Cho, K., Lee, C. K., Song, Y., Park, S. H., Ha, N. J., & Kim, K. (2005). Enhancement of antigen presentation capability of dendritic cells and activation of macrophages by the components of Bifidobacterium pseudocatenulatum SPM1204. Biomolecules and Therapeutics. 13: 174180.

Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annual review of nutrition. 22: 283-307.

Hopkins, M. J., Macfarlane, G. T., Furrie, E., Fite, A., & Macfarlane, S. (2005). Characterisation of intestinal bacteria in Infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. FEMS microbiology ecology. 54: 7-85.

Kaper, J. B., & Sperandio, V. (2005). Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinaltract. Infection and immunity. 73:3197-3209.

Kögler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., & Greschat, S. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. The Journal of experimental medicine. 200: 123-135.

Kögler, G., Sensken, S., & Wernet, P. (2006). Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. Experimental hematology.34:15891595.

Lecuit, M., Abachin, E., Martin, A., Poyart, C., Pochart, P., Suarez, F. Bengoufa, D. (2004). Immunoproliferative small intestinal disease associated with Campylobacter jejuni. New England Journal of Medicine. 350: 239-248.

Lee, D. K., Jang, S., Kim, M. J., Kim, J. H., Chung, M. J., Kim, K. J., & Ha, N. J. (2008). Anti-proliferative effects of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. BMC Cancer. 8: 1-8.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon,J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102:11070-11075.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 444:10221023.

Lundequist, B, Nord, CE, & Winberg, J. (1985). The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants frombirth to eight weeks. Acta Paediatrica. 74: 45-51.

Macdonald, R., Schaffer, B., Kang, I. J., Hong, S., Kim, E., & Park, J. (1999). Growth inhibition and differentiation of the human colon carcinoma cell line, Caco-2, by constitutive expression of insulin like growth factor binding protein-3. Journal of gastroenterology and hepatology. 14:72-78. MacDonald, T. T., & Gordon, J. N. (2005). Bacterial regulation of intestinal immune

responses. Gastroenterology Clinics. 34: 401412.

Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G.,Neu, J. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis.PloS one. 6: e20647.

Meunier, V., Bourrie, M., Berger, Y., & Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. Cell biology and toxicology. 11:187-194.

Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., & Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. Infection and immunity. 64: 5403-5405.

Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. Trends in molecular medicine. 21: 109-117.

Orrhage, K, & Nord, CE. (1999). Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. Acta Paediatrica. 88: 47-57.

Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R.,Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease.Gut. 53:685-693.

Park, S. H., Kim, Y. A., Chung, M. J., Kang, B. Y., & Ha, N. J. (2007). Inhibition of proliferation by anti-microbial peptide isolated form Pediococcus pentosaceus and Lactobacillus spp. in colon cancer cell line (HT-29, SW480 and Caco-2). Environmental Health and Toxicology. 22:65-71.

Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., & Sibley, R. K. (1991). Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. New England Journal of Medicine.325:1127-1131.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I.,Stobberingh, E.E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 118: 511-521.

Penders, J., Vink, C., Driessen, C., London, N., Thijs, C., & Stobberingh, E. E.

(2005). Quantification of Bifidobacterium spp.,Escherichia coli and Clostridium Difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. FEMS microbiology letters. 243:141-147.

Santourlidis, S., Wernet, P., Ghanjati, F., Graffmann, N., Springer, J., Kriegs, C.,Koegler, G. (2011). Unrestricted somatic stem Cells (USSC) fromhuman Umbilical cord blood display uncommitted epigenetic Signatures of the major stem cell pluripotency genes. Stem cell research. 6: 60-69.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P.,Dore, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups inpatients with Crohn's disease of the colon. Gut. 52: 237-242.

Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., & Ghaemi, N. (2011). A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. Biotechnology letters. 33: 1257-1264.

Sjögren, K., Engdahl, C., Henning, P., Lerner, U. H., Tremaroli, V., Lagerquist, M. K.,Ohlsson, C. (2012).The gut microbiota regulates bone mass in mice. Journal of bone and mineral research. 27: 1357-1367.

Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis byindigenous microbes via Paneth cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99: 15451-15455.

Stark, P. L., & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infantsduring the first year of life. Journal of Medical Microbiology. 15: 189-203.

Uronis, J. M., Mühlbauer, M., Herfarth, H. H., Rubinas, T. C., Jones, G. S., & Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. PloS one. 4: e6026.

van Tongeren, S. P., Slaets, J. P., Harmsen, H. J. M., & Welling, G. W. (2005). Fecal microbiota composition and frailty. Applied and environmental Microbiology. 71: 6438-6442.

Vaughan, E. E., Schut, F., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M.,

& Akkermans, A. D. (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. Current issues in intestinal microbiology. 1: 1-12.

Xu, J., & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100: 10452-10459.

Yang, T., Owen, J. L., Lightfoot, Y. L., Kladde, M. P., & Mohamadzadeh, M. (2013). Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectalcancer. Trends in molecular medicine. 19:714-725.

Yoshioka, H., Iseki, K. I., & Fujita, K. (1983). Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics. 72: 317-321.