

Ο ρόλος της μοριακής ανάλυσης στην διάγνωση και τη
θεραπεία του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου

Μαρία-Ελένη Κελέση

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Λαγουμιντζής

Επίκουρος Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Διαμάντης Σίδερης

Καθηγητής

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Ο ρόλος της μοριακής ανάλυσης στην διάγνωση και τη
θεραπεία του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου

Μαρία-Ελένη Κελέση

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Λαγουμιντζής

Επίκουρος Καθηγητής

Πανεπιστήμιο Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Διαμάντης Σίδερης

Καθηγητής

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

«Στον Δημήτρη μου, στον Κρίς μου και στον Κίτσο μου»

Περίληψη

Το Σύνδρομο του Ευερέθιστου εντέρου, (Irritable bowel Syndrome-IBS) είναι μία γαστρεντερική λειτουργική διαταραχή, που επηρεάζει μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού. Η συγκεκριμένη αιτία εμφάνισης του παραμένει άγνωστη και βασικό χαρακτηριστικό του IBS, είναι η πολυπλοκότητα του. Το γεγονός, πως σήμερα η διάγνωση του γίνεται απορρίπτοντας αρχικά άλλες γαστρεντερικές παθήσεις αλλά και με γνώμονα συγκεκριμένα συμπτώματα και την συχνότητα τους, οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης βιοδεικτών του IBS. Είδη γίνεται προσπάθεια εύρεσης αιματολογικών βιοδεικτών, βιοδεικτών κοπράνων, επιγενετικών τροποποιήσεων, γενετικών δεικτών και αποτυπωμάτων του μικροβιώματος που θα δηλώνουν την παρουσία της ασθένειας. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να αναδείξει την σημαντικότητα των βιοδεικτών αλλά και των σύγχρονων μοριακών μεθόδων (π.χ. PCR, NGS) στην διάγνωση και/ή την αντιμετώπιση του IBS. Οι σύγχρονες μοριακές μέθοδοι αποτελούν πυλώνα για την ανίχνευση διαφορετικών μοριακών και γενετικών προτύπων ανάμεσα σε ασθενείς με IBS και υγιείς, και ο στόχος είναι να καθιερωθούν ως διαγνωστικά εργαλεία.

Λέξεις Κλειδιά: Σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, βιοδείκτες, μοριακές τεχνικές, μικροβίωμα

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a gastrointestinal functional disorder that affects a large percentage of the population. The specific cause of its onset remains unknown, and a key feature of IBS is its complexity. The fact that currently, its diagnosis is made by initially rejecting other gastrointestinal conditions but also by considering specific symptoms and their frequency leads to the conclusion that there is an urgent need to develop biomarkers of IBS. Efforts are being made to find hematological biomarkers, fecal biomarkers, epigenetic modifications, genetic markers, and microbiome fingerprints to indicate the presence of the disease. This thesis highlights the importance of biomarkers and modern molecular methods (e.g., PCR, NGS) in managing IBS. Modern molecular methods are a pillar for detecting different molecular and genetic patterns between IBS patients and healthy individuals, and the future goal is to establish them as diagnostic tools.

Keywords: Irritable bowel syndrome, biomarkers, molecular techniques, microbiome

Περιεχόμενα

Abstract	vi
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xii
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Το Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου - Irritable Bowel Syndrome- IBS.....	1
1.2. Κλινικά χαρακτηριστικά, ψυχολογία και επιπολασμός του IBS.....	3
1.2.1 Επιπολασμός του IBS.....	3
1.2.2. Παθοφυσιολογικός μηχανισμός.....	4
1.2.3. Ανοσοποιητικό σύστημα.....	6
1.2.4. Νευροανοσολογικές αλληλεπιδράσεις.....	6
1.2.5. Μικροβίωμα.....	7
1.2.6. Μικροβίωμα στο IBS.....	8
1.2.7. Βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό έντερο.....	11
Επίδραση του μικροβιώματος στη φυσιολογία του εντέρου, στον εγκέφαλο και την συμπεριφορά.....	12
Παράγοντες που σχετίζονται με το IBS και το μικροβίωμα.....	13
1.3. Κοινά χαρακτηριστικά του IBS με άλλες νοσηρότητες αλλά και διαφορές με το IBD και την κοιλιοκάκη: συμπτώματα και βιοδείκτες.....	15
2. Διάγνωση του IBS και Θεραπευτικές Παρεμβάσεις	18
2.1 Διαγνωστικά κριτήρια	18
2.2. Κλινικά χαρακτηριστικά του IBS.....	19
2.3. Φυσική εξέταση, εργαστηριακές εξετάσεις και δείκτες συναγερμού για IBS.....	21
2.4 Θεραπεία και διαχείριση ασθενών με IBS	23
Διατροφή.....	24
Φαρμακευτική αγωγή	25
Θεραπείες IBS βασισμένες στο μικροβίωμα	28
3. Η σημαντικότητα της εύρεσης γενετικών δεικτών και βιοδεικτών για την διάγνωση και την θεραπεία του IBS.....	30
3.1. Βιοδείκτες.....	31
3.1.1. IBS: Βιοδείκτες του αίματος.....	31
3.1.2. IBS: Βιοδείκτες κοπράνων (Fecal Biomarkers)	33
3.2. IBS: Επιγενετική και μη κωδικά μόρια RNA.....	34
3.2.1 IBS: microRNAs	35
3.2.3 Επιγενετικές τροποποιήσεις στους ασθενείς με IBS: Πιθανοί μελλοντικοί γενετικοί δείκτες;.....	37
3.3. Γενετικοί δείκτες	39

Σκοπός	41
4. Η συμβολή των μοριακών μεθόδων στην εύρεση γενετικών δεικτών και βιοδεικτών	42
4.1. Βασικές αρχές της Μοριακής ανάλυσης.....	42
4.2 Βασικές αρχές της μεθόδου: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Polymerase Chain Reaction (PCR).....	44
4.2.1. Primers (εκκινητές).....	46
4.3. Ο πιο διαδεδομένος τύπος PCR: Real Time Quantitate PCR- Βασικές αρχές.....	47
4.4. Next Generation Sequencing (NGS) - Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς	49
4.4.1. Οι βασικές αρχές του NGS.....	50
4.5. Gene Chip Human Array	51
4.6. Phylogenetic Microarray Analysis	53
4.7. Βασικές αρχές του 16s RNA sequencing	55
4.8. Άλλες τεχνικές για τη Διάγνωση του IBS: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	56
4.8. Εφαρμογή των Μοριακών Μεθόδων στην Διάγνωση.....	57
5. Εφαρμογές των μοριακών μεθόδων στην Κλινική Πρακτική: Μελέτες στην παθοφυσιολογία του IBS.....	60
5.1. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνικών βιοδεικτών ασθενών με IBS.....	60
5.2. Μεθοδολογίες ανίχνευσης διαφορών στο μικροβίωμα ασθενών με IBS.....	68
5.2.1.Μοριακή ανάλυση του μικροβιώματος σε δείγματα κοπράνων ασθενών με IBS και διαφορές σε σύγκριση με υγιείς	69
5.2.2. 16S RNA sequencing για τον προσδιορισμό του μικροβιώματος ασθενών με IBS.....	74
5.3. Μεθοδολογίες ανίχνευσης επιγενετικών διαφορών σε ασθενείς με IBS	81
Συζήτηση	84
Σύγκριση των μοριακών τεχνικών-Ποιες θα ήταν οι επικρατέστερες για την χρήση τους ως εργαλεία ανίχνευσης βιοδεικτών;	86
Βιβλιογραφία.....	90

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Υποτύποι IBS σύμφωνα με τα κριτήρια της Ρώμης III.	2
Εικόνα 2: Τι είναι το IBS.	3
Εικόνα 3: Επιπολασμός του IBS σε πληθυσμιακές μελέτες σε όλο τον κόσμο	4
Εικόνα 4: Η παθοφυσιολογία του IBS.....	5
Εικόνα 5: Οι διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του IBS.....	9
Εικόνα 6: Κριτήρια της Ρώμης IV για τη διάγνωση του IBS τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά.	19
Εικόνα 7: Συννοσηρότητες που σχετίζονται με το IBS.	21
Εικόνα 8: Διαγνωστικός αλγόριθμος για ασθενείς με IBS. Αυτό το διάγραμμα δίνει μια σηματική της διαδοχικής προσέγγισης της διάγνωσης του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (IBS) (Nakov et al., 2022).	23
Εικόνα 9: Συγκεκριμένα microRNA, ο ρυθμός έκφρασής τους και η σύνδεσή τους με συγκεκριμένους τύπους IBS.	37
Εικόνα 10: Διαφορικά μεθυλιωμένα γονίδια που συνδέονται με την παθοφυσιολογία του IBS	39
Εικόνα 11: Διάγραμμα Μανχάταν που δείχνει την κατανομή των SNPs που σχετίζονται με το IBS σε όλο το γονιδίωμα.	40
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της PCR.	46
Εικόνα 13: Σύστημα αυτόματης PCR.....	47
Εικόνα 14: Τυπικό διάγραμμα ενίσχυσης: Φθορισμός σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων PCR.	48
Εικόνα 15: Βασικές αρχές και στάδια του NGS.	51
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας MicroArray.	53
Εικόνα 17: Διαφορετικοί τύποι ELISA.	57
Εικόνα 18: Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων ορού των IL-6, IL-8 και TNF-α σε ασθενείς με IBS και υγιείς μάρτυρες.	61
Εικόνα 19: Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων ορού των IL-6, IL-8 και TNF- σε ασθενείς με IBS- D και υγιείς μάρτυρες.....	61
Εικόνα 20: Σύγκριση των IL-6, IL-8 και TNF- μεταξύ των υποτύπων IBS.....	62
Εικόνα 21: Επίπεδα Zonulin, I-FABP και DAO στον ορό σε ασθενείς με D-IBS και CD και οι υγιείς (HC).....	63
Εικόνα 22: Συγκεντρώσεις IL-6, IL-8, LPS και TLR-4 στο πλάσμα. A) IL-6, B) IL-8, C) LPS = Lipopolysaccharide D) TLR-4.....	64
Εικόνα 23: Τα επίπεδα IL-6, IL-8 και TNF-α στο πλάσμα σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε ασθενείς με IBS-D, κατηγοριοποιημένους σε ως έχοντες φυσιολογική ή αυξημένη s-IP (+ ή -).	65
Εικόνα 24: Τα επίπεδα του LPS και του TLR-4 στο πλάσμα σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε ασθενείς με IBS-D, κατηγοριοποιημένους ως με φυσιολογικό ή αυξημένο s-IP.....	65
Εικόνα 25: Δείκτες ασθένειας. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της λεπτίνης, της αδιπονεκτίνης, του BDNF και της νευροτενσίνης σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε άτομα με IBS-D που κατηγοριοποιήθηκαν ως έχοντες φυσιολογική ή αυξημένη s-IP. (Russo et al., 2018).	66
Εικόνα 26: Το τελικό πάνελ βιοδεικτών 8 διαφορετικών στοιχείων.	67
Εικόνα 27: Box plot που αναπαριστά τη συνολική βαθμολογία που λαμβάνεται για το πάνελ βιοδεικτών για το IBS και το ομάδα HC. (Mujagic et al., 2016).	68
Εικόνα 28: Ταξινομικές διαφορές του μικροβιώματος των κοπράνων μεταξύ ασθενών με IBS- D και HC.....	69
Εικόνα 29: Διάγραμμα ανάλυσης της σύνθεσης του μικροβιόκοσμου των 108 αναλυθέντων δειγμάτων κοπράνων ως συνάρτηση της κατάστασης υγείας των ατόμων (υγιείς έναντι IBS).	71

Εικόνα 30: Ομαδοποίηση των φυλογενετικών προφίλ HITChip των 108 δειγμάτων κοπράνων..	71
Εικόνα 31: Ανάλυση της σύνθεσης του μικροβιώματος των ομάδων ελέγχου και του IBS...	75
Εικόνα 32: PCoA της σύνθεσης του μικροβιώματος που δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των κλινικών υποτύπων του IBS.....	76
Εικόνα 33: Τυπική δομή primer από τα πειράματα των.....	79
Εικόνα 34: Δενδρόγραμμα δειγμάτων IBS και υγιών κοπράνων (H) από συγκρίσεις ανά ζεύγη των προφίλ DGGE από την περιοχή V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA..	79
Εικόνα 35: Δενδρόγραμμα των δειγμάτων κοπράνων και βιοψίας IBS από συγκρίσεις ζευγών των προφίλ DGGE από την περιοχή V6-V8 του 16S rRNA..	79
Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση των παρατηρούμενων διαφοροποιήσεων στο μικροβίωμα ασθενών με IBD, IBS και HC.....	81

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μεταβολές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος σε διαφορετικούς υποτύπους του IBS.	10
Πίνακας 2: Μεταβολές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος σε διαφορετικούς υποτύπους του IBS.	11
Πίνακας 3: Βιοδείκτες για την διάγνωση και την διαχείριση του IBS.	36
Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των (Malinen et al., 2005) για την Qpcr.	72
Πίνακας 5: Δοκιμασίες qPCR που εφαρμόστηκε στην μελέτη των.	73

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

CD: *Crohn's disease,*

UC: *Ulcerative colitis,*

5-HT: *5-Hydroxytryptamine receptor*

CRP: *C-reactive protein,*

CgA: *Chromogranin A*

TCA: *Tricyclic antidepressant,*

TNF: *Tumor Necrosis Factor,*

TRP: *Transient Receptor Potential Channel*

VOMs: *Volatile Organic Metabolites*

IBD: *Inflammatory Bowel Disease*

IBS: *Irritable bowel syndrome,*

ASCA: *Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies,*

ANCA: *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies,*

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor,*

CGRP: *Calcitonin Gene-Related Peptide,*

DSM-5: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*

GDNF: *Glial cell line-derived neurotrophic factor,*

IBS-C: *IBS Constipation,*

IBS-D: *IBS Diarrhea*

IBS-M or IBS-A: *IBS- Mixed,*

IBS-PI: *IBS Post Infection*

IBS-U: *IBS Unsubtyped,*

IL- 1B: *Interleukin 1 beta,*

PAR-1 or PAR-2: *Proteinase-activated receptor 1 or 2*

SCFAs: *Short-chain fatty acid,*

SSRI: *Selective serotonin reuptake inhibitor,*

TIMP: *TIMP metalloproteinase inhibitor,*

miRNAs: *micro-RNA,*

FODMAP: *fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols,*

CBFA2T2: *CBFA2/RUNX1 partner transcriptional co-repressor 2,*

CCDC147: *coiled-coil domain containing 147,*

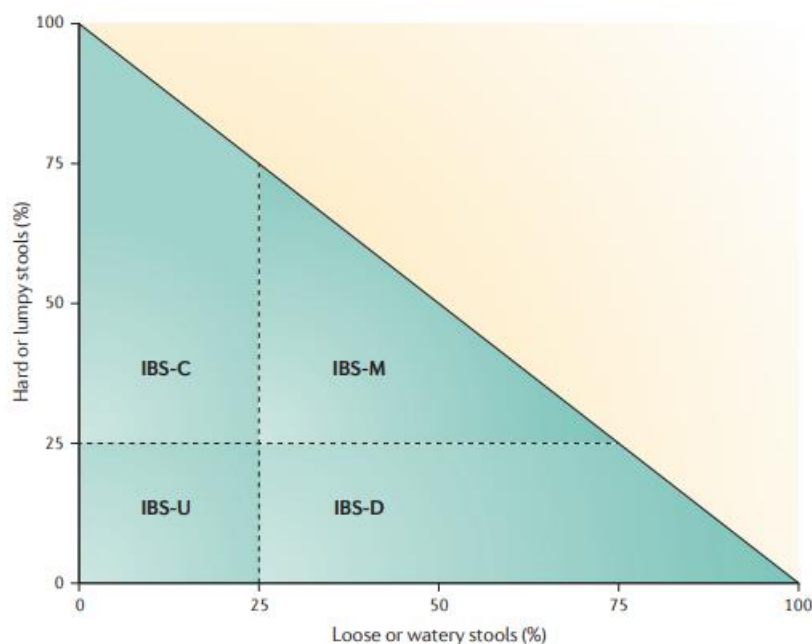
⁷⁵SeHCAT: *⁷⁵Selenium-HomoCholic Acid Taurine*

1. Εισαγωγή

1.1. Το Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου - Irritable Bowel Syndrome- IBS

Το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου (Irritable Bowel Syndrome - IBS) ή Σπαστική εντεροκολίτιδα, είναι μια κοινή γαστρεντερική πάθηση που ορίζεται από μια ομάδα συμπτωμάτων που συνήθως συνυπάρχουν. Ο κοιλιακός πόνος, το φούσκωμα και οι αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου, όπως διάρροια, δυσκοιλιότητα ή εναλλαγή μεταξύ των δύο, είναι μερικά από αυτά τα συμπτώματα. Κάθε άτομο βιώνει τα συμπτώματα με διαφορετικό τρόπο, τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς τον συνδυασμό τους (Khan & Chang, 2010). Το IBS είναι μια λειτουργική γαστρεντερική διαταραχή που παρατηρείται συχνά στη γαστρεντερολογική πρακτική. Όπως υποδηλώνει ο όρος "λειτουργικό", το IBS είναι μια ασαφής διαταραχή, χωρίς ομοιόμορφο βιοχημικό ή ανατομικό παθοφυσιολογικό προφίλ.










Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων ποικίλλει μεταξύ των ατόμων και κυμαίνεται από ήπια έως εξουθενωτικά. Το IBS σχετίζεται επίσης συνήθως με σωματικές συννοσηρότητες όπως σύνδρομο πόνου, υπερδραστήρια ουροδόχο κύστη και ημικρανία, καθώς και με ψυχιατρικές καταστάσεις, όπως κατάθλιψη και άγχος, αλλά και χαρακτηριστικά σπλαχνικής ευαισθησίας. Με υψηλό πληθυσμιακό επιπολασμό περίπου 11%, το IBS επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής, συγκριτικά με χρόνια νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η ηπατίτιδα. Η διάγνωση βασίζεται στα συμπτώματα και το IBS ταξινομείται σε υποτύπους: με κυρίαρχη τη δυσκοιλιότητα (IBS-C), με κυρίαρχη τη διάρροια (IBS-D), μεικτό (IBS-M) και μη υποτυπώδες (IBS-U) (**βλ. Εικόνα 1**). Είναι σημαντικό να αποκλείονται άλλες ασθένειες που μπορεί να προκαλέσουν παρόμοια συμπτώματα, όπως η λειτουργική δυσπεψία και η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και τα ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα Εντέρου ([Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases (IBD)]). Αν και πολλοί ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν αυτόματη ύφεση, δεν υπάρχει θεραπεία για το IBS και η θεραπεία επικεντρώνεται κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων (Khan & Chang, 2010).



Εικόνα 1: Υποτύποι IBS σύμφωνα με τα κριτήρια της Ρώμης III. Ένα διδιάστατο γράφημα των τεσσάρων πιθανών υποτύπων του IBS σύμφωνα με τη μορφή των κοπράνων σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, και το ποσοστό του χρόνου που πρέπει να είναι παρούσα αυτή η μορφή για να πληρούνται τα κριτήρια για το IBS με δυσκοιλιότητα (IBS-C), το IBS με διάρροια (IBS-D), το μικτού τύπου IBS (IBS-M) και μη υποτυπώδες IBS (IBS-U) (Enck et al., 2016).

Το IBS, περιλαμβάνει μια πληθώρα λειτουργικών μεταβολών, όπως η μεταβολή της σπλαχνικής ευαισθησίας, οι αλλαγές στην εγκεφαλική λειτουργία, οι δυσλειτουργίες στην κινητικότητα και την έκκριση του εντέρου και μια σειρά από σωματικές και ψυχιατρικές συννοσηρότητες. Η νόσος σχετίζεται με διάφορες γαστρεντερικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, της ανισορροπίας του μικροβιώματος, της διαταραγμένης λειτουργίας του φραγμού του βλεννογόνου, των μεταβολών στην έκφραση και την απελευθέρωση ανοσολογικών μεσολαβητών και των ποικίλων προφίλ γονιδιακής έκφρασης (**βλ. Εικόνα 2**). Παρά τις συσχετίσεις αυτές, η καθιέρωση άμεσης σύνδεσης μεταξύ συγκεκριμένων παθολογιών και συμπτωμάτων IBS παραμένει σε θεωρητικό επίπεδο. Τα ευρήματα σχετικά με τη συμβολή αυτών των παθολογικών παραγόντων στο IBS είναι αντιφατικά και η αιτιολογία της νόσου δεν συσχετίζεται πάντα με τα εντερικά συμπτώματα, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη διακριτών υποπληθυσμών IBS που χαρακτηρίζονται από τη μοναδική παθοφυσιολογία τους. Αυτή η ετερογένεια επεκτείνεται στη διάγνωση και τη θεραπεία του IBS, όπου οι ιατρικές θεραπείες, οι

διατροφικές παρεμβάσεις και η ψυχοθεραπεία, παρουσιάζουν μεταβλητή αποτελεσματικότητα σε διαφορετικές υποομάδες ασθενών. Οι πρόσφατες ερευνητικές εξελίξεις έχουν βελτιώσει την κατανόηση του επιπολασμού του IBS, των επιπτώσεών του στην ποιότητα ζωής και των πιθανών ρόλων της φλεγμονής, της γενετικής, του εντερικού μικροβιόκοσμου και του άξονα εγκεφάλου-εντέρου στην παθογένειά του (Daniela Jodorkovsky, 2023; Enck et al., 2016; Pimentel et al., 2010).

CAUSES	SYMPTOMS	TREATMENT
 STRESS, ANXIETY, OR DEPRESSION	 CONSTIPATION AND/OR DIARRHEA	 AVOID TRIGGER FOODS
 CHANGE IN THE GUT'S MICROBIOTA	 ABDOMINAL PAIN	 REGULAR EXERCISE
 GENETICS	 GAS AND/OR BLOATING	 MEDICATION

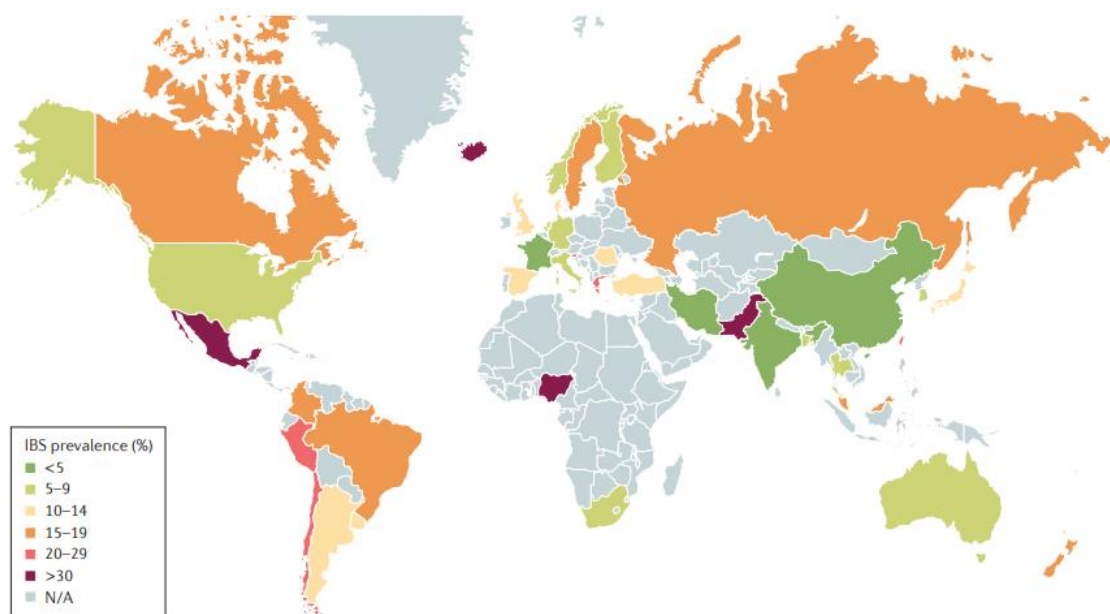
Εικόνα 2: Τι είναι το IBS (Daniela Jodorkovsky, 2023).

1.2. Κλινικά χαρακτηριστικά, ψυχολογία και επιπολασμός του IBS

1.2.1 Επιπολασμός του IBS

Ο παγκόσμιος επιπολασμός του IBS ποικίλλει ευρέως, με μελέτες να δείχνουν ποσοστά μεταξύ 1,1% και 45% σε διάφορες χώρες, και έναν συνολικό παγκόσμιο επιπολασμό 11,2% σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία (Lovell & Ford, 2012). Ο επιπολασμός στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Κίνα κυμαίνεται μεταξύ 5-10% (Enck et al., 2016). Παρά τις περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά επίπτωσης, ορισμένες μακροχρόνιες έρευνες στις ΗΠΑ υποδεικνύουν ένα ετήσιο ποσοστό νέων περιπτώσεων της τάξης του 1-2% (Gwee, 2005). Ακόμα, το IBS επηρεάζει ένα σημαντικό ποσοστό του δυτικού πληθυσμού, με εκτιμήσεις για τον επιπολασμό να κυμαίνονται από 3% έως 22% (Van den Houste et al., 2018).

Ωστόσο, τα δεδομένα είναι ελάχιστα για πολλές αφρικανικές και ασιατικές χώρες, ενδεχομένως λόγω δυσκολιών στη διάκριση μεταξύ λοιμώδους διάρροιας και IBS ή λόγω μικρότερης εστίασης στις λειτουργικές διαταραχές, μετά τον αποκλεισμό οξέων λοιμώξεων. Η πολυπλοκότητα του επιπολασμού των υποτύπων του IBS αναδεικνύεται από τη σημαντική επικάλυψη και τη μεταβλητότητα των συμπτωμάτων μεταξύ των υποτύπων, με περίπου το ένα τρίτο των περιπτώσεων σε περιοχές με ~10% συνολικό επιπολασμό να αποδίδεται σε IBS-C (που επικρατεί η δυσκοιλιότητα) και IBS-D (που επικρατεί η διάρροια) αντίστοιχα (Halder et al., 2007). Ο επιπολασμός ποικίλλει ανάλογα με τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται, όπως τα κριτήρια της Ρώμης III και της Ρώμης IV (βλ. **Εικόνα 3**). Ακόμα φαίνεται πως το IBS εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (Oka et al., 2020).

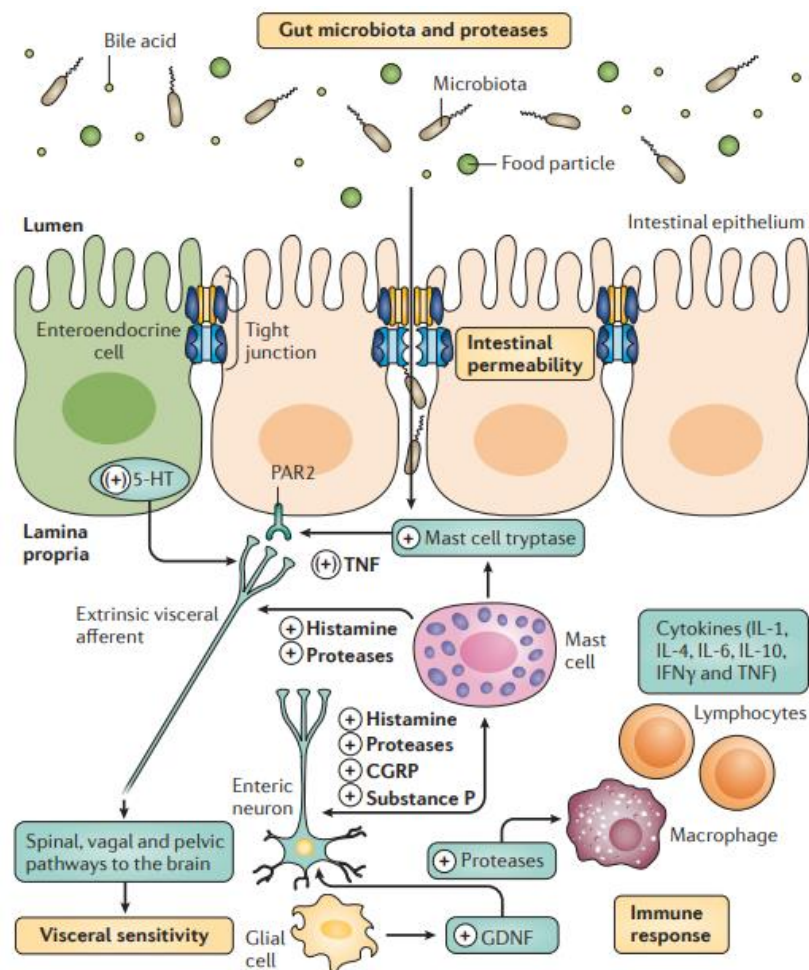


Εικόνα 3: Επιπολασμός του IBS σε πληθυσμιακές μελέτες σε όλο τον κόσμο. Τα συγκεντρωτικά δεδομένα επιπολασμού ανά χώρα είναι χρωματικά κωδικοποιημένα (Van den Houte et al., 2018).

1.2.2. Παθοφυσιολογικός μηχανισμός

Η αιτία του IBS παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, αλλά υπάρχει αυξανόμενη κατανόηση των πιθανών μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από τη δυσλειτουργία του εντέρου, τη σπλαχνική αίσθηση και τη δημιουργία συμπτωμάτων. Τα στοιχεία υποδεικνύουν μη φυσιολογικές αποκρίσεις στον επιθηλιακό φραγμό (Bischoff et al., 2014; T Piche et al., 2009), τροποποιήσεις στο μικροβίωμα (Mark Pimentel & Anthony

Lembo, 2020), τα αντιγόνα των τροφίμων και τα χολικά οξέα. Βασικοί ρυθμιστές της αισθητικοκινητικής λειτουργίας, όπως ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, το ανοσοποιητικό σύστημα, ο άξονας εγκεφάλου-εντέρου και το εντερικό νευρικό σύστημα φαίνεται να μην αποκρίνονται φυσιολογικά (βλ. **Εικόνα 4**). Τα στοιχεία αυτά θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως πιθανοί βιοδείκτες για το IBS (Nakov et al., 2022). Επιπλέον, ψυχολογικοί παράγοντες όπως η κατάθλιψη και το άγχος, καθώς και ψυχοκοινωνικοί στρεσογόνοι παράγοντες που επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας και της σπλαχνικής ευαισθησίας, φαίνεται να συμβάλλουν στην πάθηση, υποδεικνύοντας μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικών και ψυχολογικών πτυχών στην παθογένεια του IBS (Nakov et al., 2022).



Εικόνα 4: Η παθοφυσιολογία του IBS.

Εικόνα 4: Η παθοφυσιολογία του IBS, ενώ η πλήρης αιτιολογία του δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως. Οι βασικοί παράγοντες που συμβάλλουν περιλαμβάνουν τη σύνθεση του εντερικού

μικροβιόκοσμον, την εντερική διαπερατότητα, την αντιδραστικότητα των ανοσοκυττάρων και την ευαισθησία του εντερικού νευρικού συστήματος, καθώς και τις περίπλοκες αλληλεπιδράσεις εντός του άξονα εγκεφάλου-εντέρου, που περιλαμβάνει τις νωτιαίες, κολπικές και πνευλικές οδούς. Διάφοροι μεσολαβητές παίζουν ρόλο στην παθολογία του IBS, με ορισμένους να προάγουν την ενεργοποίηση και άλλους την αναστολή των κυττάρων-στόχων. Αξιοσημείωτοι μεσολαβητές περιλαμβάνουν την 5-υδροξυτρυπταμίνη (σεροτονίνη), το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP), τον νευροτροφικό παράγοντα που προέρχεται από γλοιακά κύτταρα (GDNF), τις ιντερλευκίνες, τον ενεργοποιημένο από πρωτεΐνωση υποδοχέα 2 (PAR2) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Οι διακρίσεις μεταξύ των δράσεων που έχουν διαπιστωθεί σε ζωικά μοντέλα (σημειώνονται σε παρένθεση) και των επιδράσεων που έχουν καταδειχθεί σε μελέτες σε ανθρώπους αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα των υποκείμενων μηχανισμών του IBS και τη συνεχιζόμενη προσπάθεια για την πλήρη κατανόηση αυτής της κατάστασης (Nakov et al., 2022).

Παρακάτω αναλύονται εκτενέστερα ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και του μικροβιώματος στην παθοφυσιολογία του IBS, καθώς από την ανάλυση αυτών μπορούν να προκύψουν μελλοντικά ισχυροί βιοδείκτες.

1.2.3. Ανοσοποιητικό σύστημα

Η εμπλοκή του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου υποστηρίζεται από κλινικές παρατηρήσεις, συμπεριλαμβανομένης της ισχυρής σύνδεσης μεταξύ μεταλοιμώξεων και ανάπτυξης IBS, καθώς και της παρουσίας συμπτωμάτων που μοιάζουν με IBS σε ασθενείς με IBD σε ύφεση (Thabane et al., 2007). Ποσοτικές μελέτες ανοσοϊστοχημείας έχουν αποκαλύψει αυξημένη διήθηση Τ κυττάρων και μαστοκυττάρων στο έντερο ορισμένων ασθενών με IBS. Ταυτόχρονα, τυχαιοποιημένες μελέτες για τον αντιφλεγμονώδη παράγοντα μεσαλαζίνη ανέδειξαν βελτιώσεις στα συμπτώματα των ασθενών με μεταλοιμώδες IBD (Barbara et al., 2014; Thabane et al., 2007). Παρόλο που δεν παρουσιάζουν όλοι οι ασθενείς με IBS αυξημένο αριθμό ανοσοκυττάρων του βλεννογόνου, υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία για αυξημένη ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων. Τα μαστοκύτταρα, ειδικότερα, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανοσολογική ενεργοποίηση, με υψηλότερα επίπεδα μαστοκυττάρων και των διαμεσολαβητών τους, όπως πρωτεάσες και ισταμίνη (Barbara et al., 2004). Παρακάτω (**Κεφάλαιο Βιοδείκτες αίματος**), γίνεται αναφορά για την προσπάθεια μοριακής ανίχνευσης μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος που είναι προτεινόμενα για χρήση ως βιοδείκτες.

1.2.4. Νευροανοσολογικές αλληλεπιδράσεις

Έχουν έρθει στην επιφάνεια σημαντικές γνώσεις σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο οι μεσολαβητές του βλεννογόνου (mucosal mediators) επηρεάζουν τη φυσιολογία του εντέρου και την αισθητηριακή αντίληψη. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεσολαβητές από

ασθενείς με IBS προκαλούν ισχυρότερη ενεργοποίηση των οδών πόνου σε πειραματικά μοντέλα από ό,τι εκείνοι από τους μάρτυρες, αναδεικνύοντας το ρόλο των μαστοκυττάρων και των εντεροενδοκρινικών κυττάρων σε αυτή την ενισχυμένη νευρική σηματοδότηση (Cenac et al., 2007; Dothel et al., 2015). Αυτό αποδεικνύεται από τις επιδράσεις της ισταμίνης που παράγεται από τα μαστοκύτταρα και της σεροτονίνης (5-HT) που παράγεται από τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα, μαζί με τις πρωτεάσες, στο εντερικό νευρικό σύστημα. Ειδικότερα, τόσο οι πρωτεάσες σερίνης όσο και οι πρωτεάσες κυστεΐνης, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από παγκρεατικές ή βακτηριακές πηγές, βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με IBS και έχουν συνδεθεί με την υπερευαισθησία του παχέος εντέρου και τη διαταραγμένη διαπερατότητα του επιθηλίου (Barbara et al., 2007). Η χρόνια έκθεση σε αυτούς τους μεσολαβητές μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνιες μεταβολές στους νευρώνες της νωδότητας, γεγονός που υποδηλώνει μια επίμονη επίδραση στις αισθητικές οδούς. Επιπλέον, έχει υπογραμμιστεί ο ρόλος των υποδοχέων διαύλων παροδικών δυναμικού (TRP) στην αισθητηριακή υπεραλγησία, με τον ιστό του παχέος εντέρου από ασθενείς με IBS να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ορισμένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που ενεργοποιούν τους διαύλους TRP και προκαλούν σπλαχνική υπερευαισθησία. Ο μηχανισμός αυτός υποστηρίζεται περαιτέρω από τα ευρήματα ότι το υπερκείμενο από μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με IBS μπορούν να προκαλέσουν μηχανική υπερευαισθησία των σπλαχνικών προσαγωγών (Buhner et al., 2009). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί δομικές αλλαγές στο εντερικό νευρικό σύστημα και στις αισθητικές ίνες σε ασθενείς με IBD, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρόνια απελευθέρωση παραγόντων που επηρεάζουν τη νευρική λειτουργία μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ανατομικές αλλαγές (Nakov et al., 2022).

1.2.5. Μικροβίωμα

Το μικροβίωμα του εντέρου, είναι ένα πολύπλοκο οικοσύστημα μέσα στο παχύ έντερο, περιλαμβάνει περίπου 10^{12} βακτηριακά κύτταρα ανά γραμμάριο περιεχομένου του παχέος εντέρου, ενώ τα υγιή άτομα φιλοξενούν περίπου 195 βακτηριακά στελέχη από 101 είδη (Faith et al., 2013). Με κυρίαρχες τις φυλές των *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* και *Bacteroidetes*, η υγιής μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου χαρακτηρίζεται από την ποικιλομορφία και τη σταθερότητά της (Faith et al., 2013). Ωστόσο, οι καταστάσεις ασθενειών ή η γήρανση συχνά συνδέονται με μειωμένη ποικιλομορφία. Αυτός ο μικροβιόκοσμος συμμετέχει σε μια αμοιβαία σχέση με τον

ξενιστή, βοηθώντας στην εξαγωγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών από τη τροφή και προσφέροντας προστασία από παθογόνα. Είναι σημαντικό ότι παράγει μεταβολίτες και χημικές ουσίες όπως λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένου του βουτυρικού οξέος που είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα του επιθηλίου του παχέος εντέρου, και ουσίες όπως η τρυπτοφάνη και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, που αλληλεπιδρούν με το νευρικό σύστημα του ξενιστή (Barrett et al., 2013). Επιπλέον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι απαραίτητος για την ωρίμανση και τη συνεχή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του βλεννογόνου του ξενιστή, διατηρώντας μια κατάσταση "φυσιολογικής" φλεγμονής σε ένα υγιές έντερο. Αυτή η ισορροπία, μπορεί να διαταραχθεί από το στρες, την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ή τις φυσιολογικές αλλαγές, οδηγώντας σε δυσβίωση - μια μεταβολή στη μικροβιακή σύνθεση ή δραστηριότητα που μπορεί να επηρεάσει την υγεία (Collins, 2014).

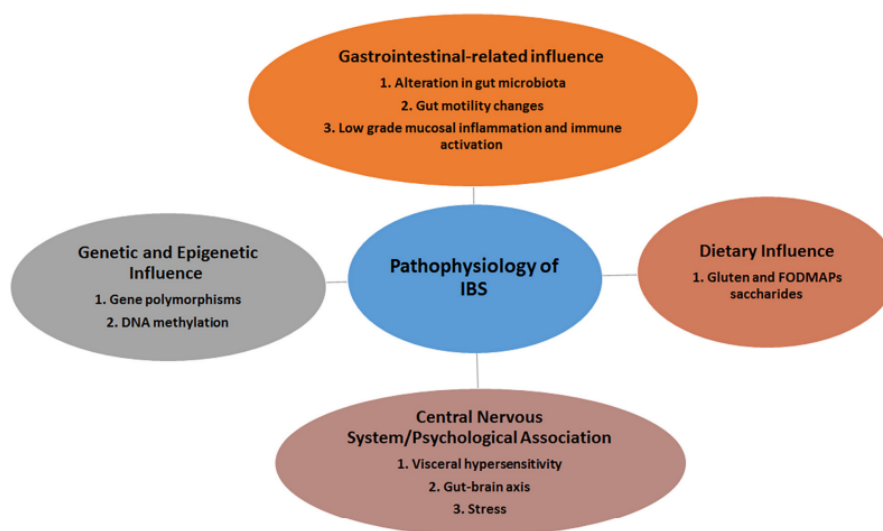
1.2.6. Μικροβίωμα στο IBS

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών καταδεικνύει ότι η ποικιλομορφία, η σταθερότητα και η μεταβολική δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβάλλονται στους περισσότερους ασθενείς με IBS σε σύγκριση με τα υγιή άτομα (**βλ. Εικόνα 5**). Αν και όλες οι μελέτες περιγράφουν μετατοπίσεις στη σχετική αφθονία ορισμένων βακτηρίων, μέχρι σήμερα, δεν έχει εντοπιστεί καμία μικροβιακή υπογραφή που να διακρίνει με βεβαιότητα τα άτομα με IBS από εκείνα που είναι υγιείς. Παρόλο που, έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία αναλυτικών προσεγγίσεων διαφορετικής εμβέλειας και ευαισθησίας οι μέθοδοι αποτύπωσης των παραπάνω παραγόντων δεν είναι συγκρίσιμες, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα (Collins, 2014).

Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες καταδεικνύουν σταθερά ότι το IBS σχετίζεται με μείωση της βακτηριακής ποικιλομορφίας και αύξηση της αστάθειας στο μικροβίωμα του εντέρου. Ειδικότερα, μελέτες έχουν εντοπίσει υψηλότερη σχετική αφθονία των *Firmicutes*, συγκεκριμένα στα *Ruminococcaceae spp.* και στην ομάδα *Clostridium* cluster XIVa (Salonen et al., 2010). Αυτή η ανισορροπία συνδέεται επίσης με την αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας του παχέος εντέρου, η οποία μπορεί να επηρεάσει τις αντιδράσεις σπλαχνικού πόνου και τα προβλήματα κινητικότητας που χαρακτηρίζουν το IBS. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα οργανικών οξέων έχουν συσχετιστεί με αυξημένη σοβαρότητα συμπτωμάτων σε πάσχοντες από IBS. Τα μεθανογόνα βακτήρια, ιδίως το *Methanobrevibacter smithii*, διαδραματίζουν

καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του περιβάλλοντος του εντέρου απομακρύνοντας την περίσσεια υδρογόνου μέσω της παραγωγής μεθανίου (βλ. *Πίνακα 1*). Είναι χαρακτηριστικό ότι έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα επίπεδα αυτού του μεθανογόνου σε ασθενείς με IBS που κυριαρχεί η δυσκοιλιότητα (Collins, 2014).

Άλλες, μελέτες σχετικά με το μικροβίωμα στο IBS έχουν αποκαλύψει σταθερά ευρήματα, όπως μειωμένα *Bacteroides* σε ασθενείς με IBS σε σύγκριση με υγιή άτομα, αν και τα αποτελέσματα ποικίλλουν όσον αφορά τα επίπεδα των *Actinobacteria* και *Bifidobacterium*. Επιπλέον, οι μικροβιακές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένων ειδών *Bacteroides* και *Prevotella*, έχουν συσχετιστεί με τα συμπτώματα του IBS και πιστεύεται ότι επηρεάζουν τα επίπεδα κυτταροκινών και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο αποικισμός του βλεννογόνου με *Brachyspira* είναι πιο συχνός σε ασθενείς με IBS-D, προσφέροντας έναν πιθανό δείκτη για αυτόν τον υπότυπο (βλ. *Πίνακα 2*). Ωστόσο, δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί ένας οριστικός μικροβιακός βιοδείκτης για το IBS, περιορίζοντας την κλινική χρησιμότητα των μικροβιακών αναλύσεων κοπράνων για τη διάγνωση ή την παρακολούθηση της πάθησης (Chong et al., 2019).



Εικόνα 5: Οι διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του IBS (Nakov et al., 2022).

Πίνακας 1: Μεταβολές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος σε διαφορετικούς υποτύπους του IBS (Chong et al., 2019).

IBS subtypes	Microbiota diversity (Family/Phylum/Genus/Species)	Alteration in microbiota (compared with healthy subjects)
IBS-A	<i>Faecalibacterium</i>	Decreased
	<i>Dorea</i>	Increased
	<i>C. symbiosum</i>	Decreased
	<i>Prevotella oralis</i>	Decreased
	<i>Ruminococcus torques</i> (<i>R. torques</i> 93% phylotype)	Increased
	<i>B. intestinalis</i> -like phylotype	Highest
	<i>R. torques</i> 93 %	Decreased
	<i>C. coccleatum</i> 88%	Increased
	<i>B. catenulatum</i>	Decreased
	<i>Veillonella</i>	Increased
	<i>Faecalibacterium</i> spp.	Increased
	Erysipelotrichaceae	Decreased
	<i>Clostridiales</i>	Increased
	<i>Bacteroides</i>	Increased
	<i>Prevotella</i>	Decreased

Πίνακας 2: Μεταβολές στην ποικιλομορφία του μικροβιώματος σε διαφορετικούς υποτύπους του IBS (Chong et al., 2019).

IBS subtypes	Microbiota diversity (Family/Phylum/Genus/Species)	Alteration in microbiota (compared with healthy subjects)
IBS-C	<i>Veillonella</i> spp.	Increased
	<i>Lactobacilli</i> spp.	Increased
	<i>R. bromii</i> -like phylotype	Increased
	<i>B. catenulatum</i>	Decreased
	<i>Methanobrevibacter</i>	Decreased
	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Increased
	Unknown Ruminococcaceae, unknown	Increased
	Christensenellaceae, <i>Akkermansia</i> , and	Increased
	<i>Methanobrevibacter</i>	Increased
	<i>Clostridiales</i>	Increased
	<i>Bacteroides</i>	Decreased
	<i>Prevotella</i>	Decreased
IBS-D	<i>Lactobacillus</i> spp.	Decreased
	<i>Clostridium symbiosum</i> -like	Decreased
	<i>Proteobacteria</i>	Increased
	<i>Firmicutes</i> (<i>Lachnospiraceae</i>)	Increased
	<i>Actinobacteria</i>	Decreased
	<i>Bacteroidetes</i>	Decreased
	<i>B. catenulatum</i>	Decreased
	<i>C. thermosuccinogenes</i>	85% phylotype increased
	<i>R. torques</i>	94% phylotype increased
	<i>Collinsella aerofaciens</i>	Decreased
	<i>B. intestinalis</i> -like phylotype	Decreased
	<i>Lactobacillus</i> spp.	Increased
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Increased
	<i>Fecalibacterium</i> (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	Decreased
	<i>Bifidobacteria</i>	Decreased
	Ruminococcaceae, unknown <i>Clostridiales</i> , Erysipelotrichaceae, <i>Methanobacteriaceae</i>	Decreased
	<i>Clostridiales</i>	Increased
	<i>Bacteroides</i>	Increased
	<i>Prevotella</i>	Decreased
	<i>Lachnospira</i>	Decreased

1.2.7. Βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό έντερο

Η υπερανάπτυξη των βακτηρίων του λεπτού εντέρου (Small Intestinal Bacterial overgrowth - SIBO) έχει συσχετιστεί με το IBS, ιδίως λόγω της μη φυσιολογικής κινητικότητας του πεπτικού συστήματος που παρατηρείται σε ορισμένους ασθενείς. Αυτή η ανώμαλη κινητικότητα μπορεί να ευνοήσει την υπερανάπτυξη των κοινών βακτηρίων στο λεπτό έντερο (Pimentel et al., 2014). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με IBS παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα υδρογόνου στην αναπνοή μετά την

κατάποση λακτουλόζης, ενώ η θεραπεία με αντιβιοτικά μπορεί να ομαλοποιήσει αυτά τα προφίλ και να ανακουφίσει τα συμπτώματα, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή της SIBO στην εκδήλωση των συμπτωμάτων (Pimentel et al., 2002). Περαιτέρω έρευνες συνέδεσαν την συγκέντρωση υδρογόνου της αναπνοής με τη μειωμένη συχνότητα μετακίνησης των κινητικών συμπλεγμάτων στο λεπτό έντερο, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Ενώ μελέτες που βασίζονται σε καλλιέργειες επιβεβαίωσαν αυξημένο αριθμό αναερόβιων βακτηρίων σε ασθενείς με διάρροια (IBS-D), οι συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού των βακτηρίων, των κινητικών μοτίβων και των συμπτωμάτων παραμένουν αδιευκρίνιστες (Posserud et al., 2007). Κατά συνέπεια, ο ακριβής ρόλος της SIBO στο IBS εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο συζήτησης (Collins, 2014).

Επίδραση του μικροβιώματος στη φυσιολογία του εντέρου, στον εγκέφαλο και την συμπεριφορά

Ο αντίκτυπος του εντερικού μικροβιώματος στη φυσιολογία του εντέρου αναδείχθηκε αρχικά μέσω μελετών που συνέκριναν συμβατικά ζώα με αντίστοιχα ζώα χωρίς μικρόβια (germ free), αποκαλύπτοντας διαφορές στην έκφραση γονιδίων κινητικότητας και νευρικής λειτουργίας. Σε πειράματα όπου το μικροβίωμα σε υγιή, ώριμα ποντίκια διαταράχθηκε μέσω αντιβιοτικών, οδήγησε σε δυσβίωση. Η διαταραχή αυτή είχε ως αποτέλεσμα αλλαγές στην κινητικότητα του εντέρου και αυξημένες αντιδράσεις σπλαχνικού πόνου, υποδεικνύοντας το ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτές τις φυσιολογικές αλλαγές (Husebye et al., 2001). Συγκεκριμένα, αυτές οι μεταβολές που προκλήθηκαν από τη δυσβίωση συνδέθηκαν με τη σηματοδότηση υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας 4 τύπου Toll, και συνοδεύτηκαν από ήπια φλεγμονή, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δυσβίωση μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και σε χαμηλού βαθμού φλεγμονή, γεγονός που παραλληλίζει τις παρατηρήσεις σε ορισμένους ασθενείς με IBS (Anitha et al., 2002). Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από κλινικές ενδείξεις ότι η χαμηλού βαθμού φλεγμονή ή η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να κρύβεται πίσω από τη δυσλειτουργία του εντέρου στο IBS (Ohman & Simren, 2010). Ακόμα, ορισμένα βακτήρια, όπως τα *Lachnospiraceae* και το *Clostridium* cluster XIVa, που βρίσκονται σε αφθονία σε ασθενείς με IBS, παρουσιάζουν προφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω των πρωτεϊνών flagellin, συμβάλλοντας ενδεχομένως στη χαμηλού βαθμού φλεγμονή του βλεννογόνου της πάθησης (Ford & Talley, 2011).

Επιπρόσθετα, έρευνες που χρησιμοποιούν στρατηγικές παρόμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, έχουν δείξει ότι το μικροβίωμα επηρεάζει σημαντικά τον εγκέφαλο και τη συμπεριφορά σε ποντίκια. Ποντίκια χωρίς μικροβίωμα παρουσιάζουν διαφορετικές συμπεριφορές σε σύγκριση με τα συμβατικά ποντίκια, οι οποίες θα μπορούσαν να εξομαλυνθούν από τον αποικισμό με βακτήρια κατά την πρώιμη ζωή. Η δυσβίωση που προκλήθηκε μέσω διατροφικών αλλαγών ή της χρήσης αντιμικροβιακών που απορροφώνται ελάχιστα, οδήγησε σε μεταβολές στη χημεία του εγκεφάλου και επηρέασε τη μάθηση, τη μνήμη (Li et al., 2011) και τη συναισθηματική συμπεριφορά των ποντικών (Neufeld et al., 2011). Επιπλέον, συγκεκριμένοι φαινότυποι συμπεριφοράς μπορούσαν να μεταφερθούν μεταξύ στελεχών ποντικών μέσω του εντερικού μικροβιόκοσμου, υποδεικνύοντας μια βαθιά επίδραση της εντερικής δυσβίωσης όχι μόνο στη λειτουργία του εντέρου αλλά και στη συμπεριφορά (Collins et al., 2013). Αυτό υποδηλώνει ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να παίζει ρόλο τόσο στα εντερικά όσο και στα συμπεριφορικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένων των συμπεριφορών που μοιάζουν με άγχος και παρατηρούνται σε ασθενείς με IBS. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την επικύρωση της επίδρασης του εντερικού μικροβιόκοσμου στη λειτουργία του εγκεφάλου και τη συμπεριφορά στον άνθρωπο.

Παράγοντες που σχετίζονται με το IBS και το μικροβίωμα

Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι οι εντερικές λοιμώξεις με παθογόνα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν προσωρινή διαταραχή του εντερικού μικροβιόκοσμου, η οποία επηρεάζεται σημαντικά από τη φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή στο παθογόνο. Η διαταραχή αυτή συνδέεται με τον κίνδυνο IBS μετά από οξεία γαστρεντερίτιδα κάτι που πλέον έχει εδραιωθεί. Οι βασικοί παράγοντες κινδύνου για IBS-PI περιλαμβάνουν γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με την αναγνώριση βακτηρίων, την παραγωγή κυτοκινών αλλά και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού. Επιπλέον, η αυξημένη εντερική διαπερατότητα και η αποτυχία μείωσης της φλεγμονώδους απόκρισης μετά τη λοίμωξη, υποδηλώνει ότι σε περιπτώσεις βακτηριακής αναγνώρισης ή ανεπαρκούς ρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης, η δυσβίωση μπορεί να επιμένει λόγω της συνεχιζόμενης φλεγμονής (Collins, 2014).

Από την άλλη πλευρά, το συναισθηματικό στρες αποτελεί αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου τόσο για την εμφάνιση όσο και για την επιδείνωση του IBS, με νέες γνώσεις σχετικά με τη σχετική νευροπαθολογία. Το στρες επηρεάζει τις αισθητικοκινητικές λειτουργίες του εντέρου και την ανοσολογική απόκριση και αποδεδειγμένα μεταβάλλει

τη μικροβιακή σύνθεση του εντέρου. Πειραματικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν τον αποχωρισμό της μητέρας από την πρώιμη ζωή ή κοινωνικούς στρεσογόνους παράγοντες, έχουν δείξει ότι το ψυχολογικό στρες μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στο μικροβίωμα ποντικών. Μελέτες σε ανθρώπους, όπως μία που παρατηρούσε φοιτητές κατά τη διάρκεια εξεταστικών περιόδων, έχουν παρατηρήσει μείωση των καλλιεργημένων βακτηρίων στα κόπρανα. Αυτές οι αλλαγές θα μπορούσαν να προέρχονται από τροποποιήσεις που προκαλούνται από το στρες στη φυσιολογία του εντέρου ή από την επίδραση των ορμονών του στρες, όπως η νοραδρεναλίνη, στη σηματοδότηση και την ανάπτυξη των βακτηρίων, υποδεικνύοντας πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του στρες, του εντερικού μικροβιόκοσμου και της ανάπτυξης του IBS (Collins, 2014).

Επιπλέον, έχει καταδειχθεί ότι τόσο η προγεννητική όσο και η ενήλικη έκθεση σε αντιβιοτικά μπορεί να μεταβάλει σημαντικά τη μικροβιακή σύνθεση του εντέρου, επηρεάζοντας την ανοσολογική ανταπόκριση, τη λειτουργία του εντέρου (συμπεριλαμβανομένης της αντίληψης του πόνου και της κινητικότητας του παχέος εντέρου), την εγκεφαλική λειτουργία, τη συμπεριφορά και την εντερική διαπερατότητα. Ενώ η βραχυπρόθεσμη χρήση αντιβιοτικών σε υγιή ποντίκια δείχνει αναστρέψιμες αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο, μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι οι μεταβολές στη μικροβιακή σύνθεση και τη γονιδιακή έκφραση μπορεί να επιμένουν έως και δύο χρόνια μετά τη διακοπή των αντιβιοτικών. Αυτή η παρατεταμένη επίδραση υποδηλώνει μια πιθανή σχέση μεταξύ της έκθεσης σε αντιβιοτικά και του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης IBS τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα για τη διερεύνηση αυτής της σχέσης (Collins, 2014).

Τέλος, η διατροφή, ιδίως η κατανάλωση λιπών και υδατανθράκων που απορροφώνται ελλιπώς, συνδέεται στενά με την εμφάνιση και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων του IBS. Μελέτες έχουν δείξει ταχείες αλλαγές στη σύνθεση του μικροβιώματος εντός 24 ωρών από την έναρξη μιας δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες. Οι μακροχρόνιες δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορούν να μετατοπίσουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο προς βακτήρια ανεκτικά στη χολή και μακριά από εκείνα που μεταβολίζουν τους φυτικούς πολυσακχαρίτες, μειώνοντας ενδεχομένως τα όρια πόνου και συμβάλλοντας στα συμπτώματα του IBS. Επιπλέον, δίαιτες πλούσιες σε κορεσμένα λίπη μπορούν να

ευνοήσουν την ανάπτυξη βακτηρίων που συνδέονται με χαμηλού βαθμού φλεγμονή, κάτι που αφορά ένα υποσύνολο ασθενών με IBS με προδιάθεση για φλεγμονή (Collins, 2014).

1.3. Κοινά χαρακτηριστικά του IBS με άλλες νοσηρότητες αλλά και διαφορές με το IBD και την κοιλιοκάκη: συμπτώματα και βιοδείκτες

Οι υπότυποι του IBS παρουσιάζουν σημαντική αλληλοεπικάλυψη με άλλες λειτουργικές γαστρεντερικές διαταραχές όπως η λειτουργική δυσπεψία, η καούρα, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και η ναυτία, καθώς και με προβλήματα του κατώτερου γαστρεντερικού όπως η διάρροια, η ακράτεια, και η δυσκοιλιότητα. Παρατηρείται επικάλυψη του IBS με IBD, όπως την νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα κατά τις φάσεις ύφεσης των ασθενειών, αν και αυτό δεν είναι καθολικά αποδεκτό (Müller et al., 2005). Επιπλέον, το IBS σχετίζεται με διάφορα μη γαστρεντερικά λειτουργικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο χρόνιου πυελικού πόνου, η αιδοιοδυνία, η υπερδραστήρια ουροδόχος κύστη και άλλα, παρουσιάζοντας σημαντική επικάλυψη σε πληθυσμιακές μελέτες που υποδηλώνουν κοινή παθολογία (Janssens et al., 2015). Τέλος, όπως προαναφέρθηκε υπάρχει υψηλός επιπολασμός ψυχιατρικών συννοσηροτήτων, όπως το άγχος και η κατάθλιψη, μεταξύ αυτών των καταστάσεων, γεγονός που οδηγεί στη συλλογική κατηγοριοποίησή τους στο DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) ως "διαταραχή σωματικών συμπτωμάτων" (Barsky, 2016). Η κατηγοριοποίηση αυτή έχει επηρεάσει την κλινική διαχείριση, τονίζοντας ότι, πριν από το DSM-5, οι ασθενείς με IBD συχνά δεν λάμβαναν επαρκή προσοχή στα γαστρεντερικά τους συμπτώματα στο πλαίσιο της ψυχιατρικής ή ψυχοσωματικής περίθαλψης (Enck et al., 2016).

Πέρα από τις κοινά χαρακτηριστικά, το IBS, το IBD και η κοιλιοκάκη, παρουσιάζουν ξεχωριστά γαστρεντερικά συμπτώματα. Όπως προαναφέρθηκε το IBS χαρακτηρίζεται από χρόνια κοιλιακό πόνο, δυσφορία, φούσκωμα και αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου χωρίς εμφανή φυσικά αίτια ή ορατή βλάβη στο πεπτικό σύστημα. Το IBD (νόσος του Crohn ελκώδης κολίτιδα), εκδηλώνεται με σοβαρά συμπτώματα όπως κοιλιακό άλγος, έντονη διάρροια, αιματηρά κόπρανα, απώλεια βάρους και κόπωση, με ορατή φλεγμονή και βλάβη στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η νόσος του Crohn μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ η ελκώδης κολίτιδα επηρεάζει κυρίως το παχύ έντερο και το ορθό. Τα συμπτώματα της Κοιλιοκάκης -που

προκαλούνται από την πρόσληψη γλουτένης- περιλαμβάνουν διάρροια, φούσκωμα, αέρια και, σε σοβαρές περιπτώσεις, αναιμία και οστεοπόρωση, με τη διαιτητική αποφυγή της γλουτένης να βελτιώνει αισθητά την υγεία. Οι βασικοί διαφοροποιητικοί παράγοντες μεταξύ αυτών των καταστάσεων περιλαμβάνουν τη διαιτητική ανταπόκριση (π.χ. δίαιτα χωρίς γλουτένη στην κοιλιοκάκη), την παρουσία φλεγμονής και βλάβης του εντέρου (ορατή στο IBD και την κοιλιοκάκη, αλλά όχι στο IBS), και συγκεκριμένα συμπτώματα όπως αίμα στα κόπρανα (συχνότερα στο IBD). Η ακριβής διάγνωση εξαρτάται από ολοκληρωμένες ιατρικές αξιολογήσεις, συμπεριλαμβανομένων διαγνωστικών εξετάσεων ειδικά για κάθε πάθηση, ώστε να διασφαλιστεί η κατάλληλη θεραπεία (Nakov et al., 2022).

Όσον αφορά τους βιοδείκτες, τα αντισώματα κατά έναντι της μαννάνης του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) είναι σημαντικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας, ιδίως στα αρχικά στάδια της νόσου (Müller et al., 2005). Τα επίπεδα ASCA είναι συνήθως υψηλότερα σε ασθενείς με CD σε σύγκριση με εκείνους με ελκώδη κολίτιδα (UC), γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για τη διάκριση μεταξύ αυτών των μορφών φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD) και του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (IBS). Τα αντιουδετεροφιλικά κυτταροπλασματικά αντισώματα (ANCA) και οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) είναι επίσης σημαντικά για τη διαφοροποίηση του IBS από το IBD. Τα ANCAs, τα οποία στοχεύουν αντιγόνα στο κυτταρόπλασμα των ουδετερόφιλων, ανευρίσκονται στο 50-80% των ασθενών με UC, υποδεικνύοντας τη χρησιμότητά τους στη διάκρισή της από άλλες γαστρεντερικές διαταραχές (Meijer et al., 2007). Οι TIMPs ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών της μήτρας πολλών ιστών και εμπλέκονται στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού. Η διαταραχή της δραστηριότητας των TIMP μπορεί να συμβάλει στην αποδόμηση των ιστών και στην υπερβολική ανοσολογική απόκριση, οι οποίες παρατηρούνται στα IBD λόγω της χρόνιας φλεγμονής. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των TIMP-1 και TIMP-4 στον ορό υποδεικνύουν το IBD (Nakov et al., 2022) (Kapsoritakis et al., 2008).

Ακόμα, αρκετές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων πρωτεασών, εκφράζονται διαφορετικά στο IBS, στην UC και σε υγιή άτομα. Ειδικότερα, πρωτεάσες όπως η χυμοθρυψίνη C και η ελαστάση 3^a, βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση

στο IBS (Nakov et al., 2022). Η μελέτη των (Buhner et al., 2018) διαπίστωσε ότι ένας συνδυασμός της καθεψίνης L, της ελαστάσης 3α και της υπομονάδας 4 του πρωτεασώματος άλφα, θα μπορούσε να διαφοροποιήσει το IBS από τα υγιή άτομα με ακρίβεια 98%, προτείνοντας τις πρωτεάσες που σηματοδοτούν τη νευρωνική PAR1 ως δυνητικούς βιοδείκτες του IBS. Επιπλέον, σε έρευνα που συμμετείχαν 2.681 άτομα φάνηκε ότι τα αντισώματα anti-CdtB και anti-vinculin είχαν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία για το IBS-D, επιβεβαιώνοντας την αύξησή τους σε ασθενείς με IBS-D σε σύγκριση με άτομα χωρίς IBS, υπογραμμίζοντας έτσι τη δυνατότητά τους ως διαγνωστικών δεικτών για το IBS-D (Pimentel et al., 2015a).

Τέλος η μελέτη των (Mohammad et al., 2019) που περιελάμβανε 70 ασθενείς με IBS διαπίστωσε ότι το 7,1% βρέθηκε θετικό για IgA και IgG κατά της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (anti-tTG), η οποία είναι ο κύριος δείκτης για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης. Μεταξύ αυτών, τρεις ασθενείς είχαν IBS που κυριαρχούσε η διάρροια (IBS-D) και δύο ασθενείς είχαν IBS που κυριαρχούσε η δυσκοιλιότητα (IBS-C), ενώ κανένα από τους ασθενείς με μικτές συνήθειες του εντέρου (IBS-M) δεν βρέθηκε θετικός. Η μελέτη υποδηλώνει ότι ιδίως στους ασθενείς με IBS-D, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο του αποκλεισμού της κοιλιοκάκης ως πιθανής διάγνωσης.

2. Διάγνωση του IBS και Θεραπευτικές Παρεμβάσεις

Η διάγνωση του IBS εξαρτάται κυρίως από συγκεκριμένα διαγνωστικά κριτήρια που πληρούν οι ασθενείς, σε συνδυασμό με εργαστηριακά αποτελέσματα από ένα περιορισμένο σύνολο πρόσθετων εξετάσεων για τον αποκλεισμό άλλων παθήσεων. Παρά την προτίμηση ορισμένων κλινικών γιατρών για εξαντλητικό αποκλεισμό άλλων νόσων, η επικρατούσα κατευθυντήρια γραμμή δίνει έμφαση στη διαγνωστική προσέγγιση με βάση τα συμπτώματα, λόγω της απουσίας έγκυρου βιοδείκτη για IBD. Η έκταση των απαιτούμενων εξετάσεων ποικίλλει ανάλογα με την κλινική κατάσταση και το προφίλ των συμπτωμάτων κάθε ασθενούς, περιλαμβάνοντας γενικά λίγες μόνο εργαστηριακές εξετάσεις και αποφεύγοντας επεμβατικές διαδικασίες. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει αποτελεσματικός έλεγχος για τον κίνδυνο εμφάνισης του IBS ή αποτελεσματικές στρατηγικές για την πρόληψή του, γεγονός που αντανακλά την πολύπλοκη παθοφυσιολογία της νόσου (Enck et al., 2016; Pimentel et al., 2010).

2.1 Διαγνωστικά κριτήρια

Λόγω της φτωχής ευαισθησίας και ειδικότητας των μεμονωμένων κλινικών συμπτωμάτων στη διάγνωση του IBS, έχουν αναπτυχθεί διαγνωστικά κριτήρια που ενσωματώνουν ένα συνδυασμό συμπτωμάτων, όπως το σύστημα DSM στην ψυχιατρική. Τα κριτήρια Manning, τα οποία εισήχθησαν το 1978, προσπάθησαν αρχικά να διαφοροποιήσουν το IBS από άλλες οργανικές γαστρεντερικές παθήσεις συνδυάζοντας τα συχνότερα συμπτώματα των ασθενών με IBS. Η προσέγγιση αυτή εξελίχθηκε στα κριτήρια ROME (ROME FOUNDATION, 2021), με τρεις εκδόσεις σε διάστημα 15 ετών, με αποκορύφωμα τα κριτήρια Ρώμης III που δημοσιεύθηκαν το 2006, και τις τροποποιήσεις αυτών των κριτηρίων που εξελίχθηκαν σε κριτήρια της Ρώμης IV (βλ. **Εικόνα 7**). Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν την προσθήκη παραμέτρων, όπως της διάρκειας των συμπτωμάτων και την επιρρέπεια στην εμφάνιση στομαχικών ενοχλήσεων. Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια, πρέπει να υπάρχει πόνος ή δυσφορία στο στομάχι για τουλάχιστον 12 εβδομάδες κατά το προηγούμενο έτος. Οι εβδομάδες αυτές δεν χρειάζεται να είναι διαδοχικές και τα συμπτώματα πρέπει να είναι παρόντα για τουλάχιστον μία από τις επτά ημέρες κατά τη διάρκεια κάθε εβδομάδας (Camilleri, 2021; Chey et al., 2015). Ωστόσο, η επικάλυψη αυτών των διαγνωστικών κριτηρίων με εκείνα ορισμένων οργανικών γαστρεντερικών νόσων περιπλέκει τη διάκριση μεταξύ του IBS και άλλων καταστάσεων, υποδεικνύοντας τους περιορισμούς

στην ευαισθησία και την ειδικότητα αυτών των διαγνωστικών κριτηρίων. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των κριτηρίων της Ρώμης κυμαίνονται από 69-96% και 72-85% αντίστοιχα, αν και ο καθορισμός ενός χρυσού προτύπου για τη διάγνωση του IBS παραμένει πρόκληση (Sood et al., 2014).

Diagnosis of irritable bowel syndrome according to Rome IV criteria for adults and children

Adults

Recurrent abdominal pain with onset at least six months prior to diagnosis, associated with two or more of the following, at least one day per week in the last three months:

- Related to defecation
- Associated with a change in frequency of stool
- Associated with a change in form (appearance) of stool

Children

Abdominal pain at least four days per month, for at least two months before diagnosis with one or more of the following:

- Related to defecation
- Associated with a change in frequency of stool
- Associated with a change in form (appearance) of stool

Εικόνα 6: Κριτήρια της Ρώμης IV για τη διάγνωση του IBS τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά (ROME FOUNDATION, 2021).

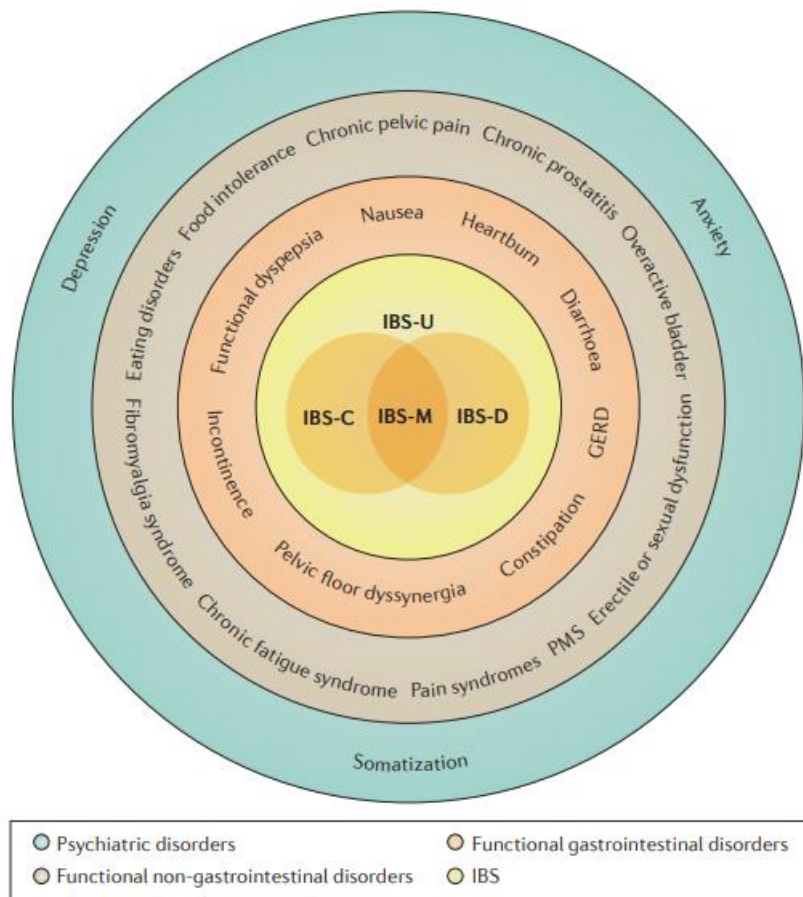
2.2. Κλινικά χαρακτηριστικά του IBS

Κλινικά, το πιο κοινό σύμπτωμα του IBS είναι ο κοιλιακός πόνος, συχνά γνωστός ως κράμπες, ο οποίος συνήθως βελτιώνεται μετά την κένωση του εντέρου. Άλλα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν διάρροια, δυσκοιλιότητα ή συνδυασμό των δύο, καθώς και φούσκωμα αλλά και αέρια. Η ασθένεια χωρίζεται σε διακριτές κατηγορίες κυρίως με βάση τα συμπτώματα. Μπορεί να εμφανισθεί υπό τη μορφή διάρροιας ή δυσκοιλιότητας, ή με εναλλαγή αυτών (Μικτού τύπου) (κατατασσόμενες οι περιπτώσεις ως IBS-D, IBS-C ή IBS-M αντίστοιχα). Επίσης το IBS δύναται να παρουσιασθεί έπειτα από μία λοίμωξη (μετα-λοιμώδες, IBS-PI) ή μετά από μία στρεσογόνο κατάσταση (Castro et al., 2014).

Πέρα από τα πρωτογενή διαγνωστικά κριτήρια, διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά μπορούν να υποστηρίξουν τη διάγνωση, αν και δεν είναι πάντα απαραίτητα. Μια

πρόσφατη μελέτη υπογραμμίζει ότι οι διακυμάνσεις στη συνοχή και τη συχνότητα των κοπράνων, μαζί με ένα απρόβλεπτο πρότυπο εντέρου, είναι χρήσιμες για τη διαφοροποίηση του IBS-D από οργανικές γαστρεντερικές παθήσεις (Pimentel et al., 2010). Συμπτώματα όπως η μη φυσιολογική συχνότητα κοπράνων, το υπερβολικό σφίξιμο, η επείγουσα ανάγκη, το αίσθημα ατελούς εκκένωσης και η βλέννα με τις κινήσεις του εντέρου, θεωρούνται μη ειδικά για την διάγνωση. Η μεταγευματική επιδείνωση των συμπτωμάτων, κοινή στο IBS, παρατηρείται και σε άλλες γαστρεντερικές παθήσεις (Bohn et al., 2013). Επιπλέον, η συνύπαρξη άλλων λειτουργικών γαστρεντερικών διαταραχών (π.χ. λειτουργική δυσπεψία), πολυάριθμων λειτουργικών μη γαστρεντερικών συμπτωμάτων (π.χ. χρόνια κόπωση, ινομυαλγία, ουρο-γυναικολογικά συμπτώματα), μυϊκού και αρθρικού πόνου, διαταραχών του ύπνου και ψυχολογικών συννοσηροτήτων όπως το άγχος και η κατάθλιψη, είναι συχνές σε ασθενείς με IBS και υποστηρίζουν τη διάγνωσή του (Ford et al., 2010) (**βλ. Εικόνα 8**). Από ψυχολογικής άποψης, οι ασθενείς με IBS που βιώνουν συχνά άγχος και κατάθλιψη, μπορεί να επιδεινώσουν τα συμπτώματά τους. Αυτά τα ψυχολογικά χαρακτηριστικά είναι συχνότερα μεταξύ των ατόμων που αναζητούν ιατρική φροντίδα για το IBS, γεγονός που σημαίνει ότι η ψυχική υγεία αποτελεί σημαντική πτυχή στη διαχείριση της πάθησης (Woolthuis et al., 2004).

Στα παιδιά, το IBS αναγνωρίζεται ως μια κοινή λειτουργική γαστρεντερική διαταραχή. Ο επιπολασμός της στα παιδιά, επίσης ποικίλλει παγκοσμίως. Η διάγνωση στα παιδιά, όπως και στους ενήλικες, βασίζεται σε συγκεκριμένα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων του κοιλιακού πόνου και των αλλαγών στις συνήθειες του εντέρου. Η πάθηση επηρεάζει σημαντικά την καθημερινή ζωή (Devanarayana et al., 2014; Devanarayana & Rajindrajith, 2018).



Εικόνα 7: Συννοσηρότητες που σχετίζονται με το IBS (Nakov et al., 2022).

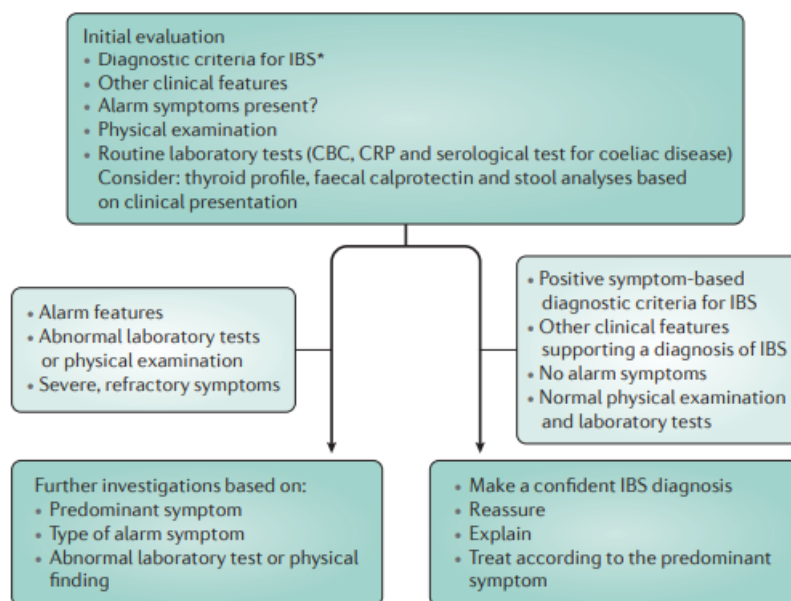
2.3. Φυσική εξέταση, εργαστηριακές εξετάσεις και δείκτες συναγερμού για IBS

Οι φυσικές εξετάσεις διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αξιολόγηση ασθενών με πιθανή διάγνωση για IBS, καθώς χρησιμεύουν τόσο για να καθησυχάσουν όσο και για να βοηθήσουν στον αποκλεισμό άλλων οργανικών αιτιών. Παρόλο που οι συνήθεις κοιλιακές εξετάσεις σπάνια οδηγούν σε συγκεκριμένη διάγνωση λόγω της ευαισθησίας του γαστρεντερικού σε διάφορα νοσήματα, η έλλειψη αντικειμενικών ευρημάτων συχνά υποστηρίζει τη διάγνωση του IBS, δηλαδή γίνεται διάγνωση εξ αποκλεισμού άλλων γαστρεντερικών παθήσεων. (Kruis et al., 1984). Επιπλέον, οι ψηφιακές εξετάσεις του ορθού είναι ζωτικής σημασίας για τον εντοπισμό ασθενών με δυσκολία στην αφόδευση, σημαντική για όσους πάσχουν από δυσκοιλιότητα, και για τον αποκλεισμό του καρκίνου του ορθού, ενώ οι περιπρωκτικές εξετάσεις βοηθούν στον αποκλεισμό συριγγίων και άλλων πρωκτικών παθολογιών (Soh et al., 2015).

Ο καθορισμός των καταλληλότερων εργαστηριακών εξετάσεων για τη διάγνωση του IBS παραμένει πρόκληση, καθώς η βιβλιογραφία δεν παρέχει σαφείς οδηγίες. Οι ορολογικές εξετάσεις για την κοιλιοκάκη μπορεί να εμφανίζουν ανωμαλίες σε συμπτώματα συμβατά με το IBS συχνότερα από ό,τι στον γενικό πληθυσμό, αν και αυτό δεν επιβεβαιώνεται. Πρόσφατες ανασκοπήσεις δείχνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ή της καλπροτεκτίνης των κοπράνων μπορούν να αποκλείσουν αποτελεσματικά το IBD σε ασθενείς με συμπτώματα IBS. Έτσι, η διενέργεια μιας γενικής αίματος, η μέτρηση της CRP, το θυρεοειδικό προφίλ (εάν υπάρχει υποψία θυρεοειδικής νόσου), η ορολογική εξέταση για κοιλιοκάκη (σε μη IBS-C) και η καλπροτεκτίνη κοπράνων (εάν υπάρχει υποψία φλεγμονής), είναι τα απαραίτητα βήματα που ακολουθούνται με σκοπό την ορθή διάγνωση (Menees et al., 2015). Επιπλέον, η ανάλυση κοπράνων για γαστρεντερικές λοιμώξεις εξετάζεται σε περιπτώσεις επίμονης διάρροιας, ιδίως σε περιοχές επιρρεπείς σε τέτοιες λοιμώξεις. Παρά την απουσία επικυρωμένου διαγνωστικού βιοδείκτη για το IBS, η τρέχουσα έρευνα υποδεικνύει πιθανή μελλοντική χρησιμότητα ορισμένων βιοδεικτών ή αναλύσεων (Pimentel et al., 2015b).

Σε ασθενείς με συμπτώματα ενδεικτικά του IBS και φυσιολογικές εργαστηριακές εξετάσεις ρουτίνας, χωρίς χαρακτηριστικά που προαναγγέλλουν IBS, περαιτέρω επεμβατικές εξετάσεις είναι συνήθως περιττές και δεν βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η κολονοσκόπηση συνιστάται όταν υπάρχουν χαρακτηριστικά συμπτώματα, υποψία φλεγμονώδους κατάστασης που υποδεικνύεται από αυξημένα επίπεδα CRP ή καλπροτεκτίνης κοπράνων, ή για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του παχέος εντέρου (Rex et al., 2009). Η υδαρής διάρροια ως πρωταρχικό σύμπτωμα μπορεί να δικαιολογεί κολονοσκόπηση για τον αποκλεισμό της μικροσκοπικής κολίτιδας, ιδίως σε γυναίκες άνω των 50 ετών. Η διάρροια που προκαλείται από χολικά οξέα και η δυσασπορρόφηση υδατανθράκων αποτελούν σημαντικές διαφορικές διαγνώσεις για τα συμπτώματα του IBS, με ειδικές εξετάσεις όπως η ⁷⁵SeHCAT ή τα επίπεδα C4 στον ορό για την πρώτη, και εξετάσεις αναπνοής υδρογόνου για τη δεύτερη- ωστόσο, λόγω της μη ευρείας διαθεσιμότητας αυτών των εξετάσεων χρησιμοποιούνται συνήθως δοκιμές διαιτητικού αποκλεισμού ή θεραπευτικές δοκιμές με παράγοντες δέσμευσης χολικών οξέων (Vijayvargiya et al., 2013). Η υποψία κοιλιοκάκης απαιτεί ενδοσκόπηση του ανώτερου γαστρεντερικού με βιοψίες. Ο ρόλος της βακτηριακής υπερανάπτυξης του λεπτού εντέρου στο IBS είναι

ακόμη αβέβαιος, περιορίζοντας τη σύσταση για κλινικές εξετάσεις ρουτίνας (Nakov et al., 2022) (βλ. **Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Διαγνωστικός αλγόριθμος για ασθενείς με IBS. Αυτό το διάγραμμα δίνει μια σχηματική της διαδοχικής προσέγγισης της διάγνωσης του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου (IBS) (Nakov et al., 2022).

2.4 Θεραπεία και διαχείριση ασθενών με IBS

Από τους ασθενείς που εμφανίζουν συμπτώματα IBS, περίπου οι μισοί αναζητούν ιατρική βοήθεια, κυρίως λόγω της σοβαρότητας των συμπτωμάτων, και του φόβου για σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος. Οι αρχικές διαβουλεύσεις γίνονται συνήθως με γιατρούς πρωτοβάθμιας περίθαλψης, αλλά μπορεί να χρειαστεί εξειδικευμένη φροντίδα για να αποκλειστούν καταστάσεις που μιμούνται το IBS μέσω διαγνωστικών διαδικασιών όπως η ενδοσκόπηση (Ringstrom et al., 2007). Μόλις διαγνωστεί θετικά το IBS, η διαχείριση μπορεί να προχωρήσει αποτελεσματικά στο πλαίσιο της πρωτοβάθμιας περίθαλψης με χαμηλό κόστος (Flik et al., 2015). Η διαχείριση του IBS περιλαμβάνει μια ολιστική προσέγγιση που περιλαμβάνει την οικοδόμηση μιας ισχυρής σχέσης μεταξύ ασθενούς και παρόχου, την εκπαίδευση, την καθησύχαση, τις διαιτητικές τροποποιήσεις, τη φαρμακοθεραπεία και τις συμπεριφορικές και ψυχολογικές παρεμβάσεις. Δεδομένου ότι ένα σημαντικό μέρος των ασθενών με IBS αναφέρει πρόσθετα σωματικά και ψυχολογικά συμπτώματα, μια στρατηγική

κλιμακωτής φροντίδας που ενσωματώνει γνωστική και διαπροσωπική θεραπεία αποδεικνύεται ευεργετική. Η θεραπεία προσαρμόζεται με βάση τα κυρίαρχα συμπτώματα, χρησιμοποιώντας αντισπασμωδικά, αντιδιαρροϊκά, καθαρτικά, διατροφική καθοδήγηση και ψυχοθεραπεία σε όλους τους υποτύπους του IBS (Nakov et al., 2022).

Διατροφή

Διάφορες τροφές επιδεινώνουν σημαντικά τα συμπτώματα πολλών ατόμων με IBS, επηρεάζοντας την ποιότητα ζωής τους, τόσο λόγω των μεταγευματικών συμπτωμάτων όσο και λόγω του προληπτικού άγχους (Hayes et al., 2014). Ιστορικά αναγνωρισμένα από την κλινική επιστήμη, τα συμπτώματα που πηγάζουν από την διατροφή είναι πλέον κατανοητό ότι προέρχονται κυρίως από τροφική δυσανεξία - μια φυσιολογική αντίδραση που δεν εμπλέκει το ανοσοποιητικό σύστημα - και όχι από κλασικές τροφικές αλλεργίες με τη μεσολάβηση IgE. Ωστόσο, μελέτες υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με IBS μπορεί να παρουσιάζουν ανεπαίσθητες ανοσολογικές αντιδράσεις σε ορισμένα συστατικά της τροφής, οι οποίες περιορίζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της τροφής, των προϊόντων πέψης και του εντερικού μικροβιώματος, που παράγουν ουσίες όπως τα αποσυζευγμένα χολικά άλατα και τα αέρια, θα μπορούσαν επίσης να προκαλέσουν συμπτώματα (Bohn, et al., 2013). Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς συχνά κατηγορούν συγκεκριμένα τρόφιμα για την πρόκληση συμπτωμάτων, οι τυφλές μελέτες με τρόφιμα δείχνουν ακρίβεια μόνο 11-27% σε αυτές τις ταυτοποιήσεις (Ford et al., 2014), με τα προβληματικά στοιχεία να περιλαμβάνουν συνήθως το σιτάρι, τα φρούτα και τα λαχανικά. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει το αυξανόμενο ενδιαφέρον για δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε FODMAP (fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols - ζυμώσιμοι ολιγοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, μονοσακχαρίτες και πολυόλες) μεταξύ των πασχόντων από IBS (Halmos et al., 2015).

Οι φυτικές ίνες και τα συμπληρώματα με βάση τις φυτικές ίνες, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαχείριση του IBS, ιδίως για τη χρόνια δυσκοιλιότητα και το IBS-C, αυξάνοντας τη συχνότητα των κοπράνων. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους είναι μεταβλητή- οι διαλυτές ίνες όπως το ψύλλιο και η ισπαθούλα είναι ευεργετικές, ενώ οι αδιάλυτες ίνες όπως το πίτουρο μπορεί να μην είναι αποτελεσματικές και μπορεί να επιδεινώσουν τα συμπτώματα για ορισμένους ασθενείς. Η δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε FODMAP έχει κερδίσει την προσοχή για τις δυνατότητές της να

ανακουφίσει τα συμπτώματα του IBS, αν και δεν έχει δείξει υπεροχή έναντι των συμβατικών διατροφικών συμβουλών και θα μπορούσε να επηρεάσει ευεργετικά το μικροβίωμα του εντέρου, όπως τα *Bifidobacteria*. Η απομάκρυνση συγκεκριμένων FODMAPs, όπως η λακτόζη, η φρουκτόζη ή η σορβιτόλη, μπορεί να ωφελήσει ορισμένα άτομα, αλλά η πρόβλεψη του ποιος θα ανταποκριθεί είναι δύσκολη (Wilder-Smith et al., 2013). Η συζήτηση σχετικά με τη μη κοιλιακή ευαισθησία στη γλουτένη και το ρόλο της στο IBS συνεχίζεται, με μικτά αποτελέσματα από κλινικές δοκιμές σχετικά με την επίδραση της γλουτένης (Böhn et al., 2015). Επιπλέον, πολλοί ασθενείς με IBS στρέφονται σε συμπληρώματα διατροφής και εναλλακτικές θεραπείες όπως τα προβιοτικά, τα οποία μόλις πρόσφατα άρχισαν να μελετώνται αυστηρά, με νεότερα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τα προβιοτικά μπορεί να προσφέρουν κάποια ανακούφιση στα συμπτώματα του IBS. Ωστόσο, η έρευνα υψηλής ποιότητας και η καθοδήγηση σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα παραμένουν περιορισμένες (Mazurak et al., 2013).

Φαρμακευτική αγωγή

Οι τρέχουσες θεραπείες για το IBS επικεντρώνονται στην τροποποίηση των προβληματικών συνηθειών του εντέρου και του σπλαχνικού πόνου, με ένα αναδυόμενο ενδιαφέρον για τον χειρισμό του μικροβιώματος. Τα αντισπασμωδικά φάρμακα, όπως το βρωμιούχο ωτιλόνιο και η υοσκίνη, προσφέρουν ανακούφιση από τον πόνο που μεσολαβείται από τους σπασμούς των λείων μυών και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά όταν δεν συνοδεύονται από δυσκοιλιότητα (Ford et al., 2008). Το έλαιο μέντας, μέσω των ιδιοτήτων χαλάρωσης των λείων μυών του, έχει επίσης δείξει οφέλη. Τα αντικαταθλιπτικά συμπεριλαμβανομένων των TCAs και SSRIs, αν και χρησιμοποιούνται εκτός επισήμανσης, συνιστώνται για πόνο που δεν ανταποκρίνεται σε άλλες θεραπείες, με την αναλγητική τους δράση να αποδίδεται τόσο σε περιφερικούς όσο και σε κεντρικούς μηχανισμούς (National Institute of Health and Care Excellence, 2008). Για το IBD που κυριαρχεί η δυσκοιλιότητα, προτιμώνται τα απλά καθαρτικά, ενώ παράγοντες όπως η λινακλοτίδη και η λουμπιπροστόνη, που αυξάνουν το ενδοαυλικό υγρό και διεγείρουν την έκκριση υγρών αντίστοιχα, χρησιμοποιούνται ως θεραπείες δεύτερης γραμμής προσφέροντας τόσο καθαρτική όσο και αναλγητική δράση (Castro et al., 2013). Επιπλέον, οι αγωνιστές των υποδοχέων 5-HT₄, όπως η προυκαλοπρίδη, έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στην ενίσχυση της κινητικότητας

του εντέρου και στη βελτίωση της κανονικότητας της κίνησης του εντέρου (Tack et al., 2009).

Η «χειραγώγηση» του μικροβιώματος του εντέρου έχει γίνει κεντρικό σημείο στη θεραπεία του IBS, με αντιβιοτικά όπως η ριφαξιμίνη, αλλά και τα προβιοτικά να διερευνώνται για τα πιθανά οφέλη τους. Η ριφαξιμίνη έχει δείξει ότι μειώνει τα συμπτώματα του IBS, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί -είτε μέσω της μεταβολής του εντερικού μικροβιώματος είτε μέσω της επίδρασης στην τοπική μικροφλεγμονή- δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Ενώ έχει εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες, η ριφαξιμίνη αναμένει έγκριση στην Ευρώπη (Pimentel et al., 2011). Τα προβιοτικά, παρά το γεγονός ότι υπόσχονται μείωση του πόνου και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων, αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις λόγω απουσίας μεγάλου αριθμού μελετών. Ο αντίκτυπος των προβιοτικών μπορεί να περιλαμβάνει άμεση διαμόρφωση του μικροβιώματος ή έμμεσες επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου (Mazurak et al., 2013). Επιπλέον, φυτικά συμπληρώματα όπως το *iberogast*, ένα μείγμα εννέα φυτικών εκχυλισμάτων, έχουν δείξει ότι βελτιώνουν τον κοιλιακό πόνο και την ποιότητα ζωής σε ασθενείς με IBS, γεγονός που υποδηλώνει έναν σύνθετο μηχανισμό δράσης που περιλαμβάνει νευροδιαβιβαστές και υποδοχείς στο έντερο. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα και οι μηχανισμοί των φυτικών θεραπειών απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση μέσω μεγαλύτερων, καλά σχεδιασμένων τυχαιοποιημένων δοκιμών προσαρμοσμένων στους υποτύπους του IBS (Madisch et al., 2004).

Ακόμα, ο τομέας της γενετικής μηχανικής των βακτηρίων και της εξατομικευμένης τροποποίησης του μικροβιώματος εξελίσσεται ραγδαία, προσφέροντας πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές για γαστρεντερικές διαταραχές όπως η νόσος του Crohn και ενδεχομένως το IBS. Ένα πρωτοποριακό παράδειγμα είναι μια δοκιμή φάσης I, όπου ο διαγονιδιακός *Lactococcus lactis*, τροποποιημένος ώστε να εκφράζει ανθρώπινη ιντερλευκίνη-10, φαίνεται να βελτίωσε την κλινική εικόνα και τη συμπτωματολογία των ασθενών με νόσο του Crohn. Ωστόσο, οι ανησυχίες για την ασφάλεια όσον αφορά τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς παραμένουν ένα σημαντικό εμπόδιο. Οι κίνδυνοι μόλυνσης του περιβάλλοντος και οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων αποτελούν μείζονα ζητήματα. Η χρήση της προσαρμοσμένης τροποποίησης του μικροβιώματος ως θεραπευτικής τεχνικής απαιτεί καλύτερη γνώση των πολύπλοκων συνδέσεων μεταξύ της ανθρώπινης και της μικροβιακής γενετικής,

λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα μικροβιακά χαρακτηριστικά όσο και το γενετικό και επιγενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (Bruno et al., 2018).

Το βιοψυχοκοινωνικό μοντέλο του IBS αναγνωρίζει την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ βιολογικών και ψυχοκοινωνικών παραγόντων, τονίζοντας πώς τα κοιλιακά συμπτώματα μπορούν να επιδεινώσουν ψυχολογικές καταστάσεις όπως το άγχος και η κατάθλιψη, και το αντίστροφο (Fond et al., 2014). Οι θεραπευτικές στρατηγικές για το IBS εξελίσσονται για να αντιμετωπίσουν αυτές τις πολύπλευρες αλληλεπιδράσεις, τονίζοντας τη σημασία μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης που περιλαμβάνει τη διαχείριση των τροποποιημένων εντερικών λειτουργιών, την τροποποίηση της σηματοδότησης μεταξύ εγκεφάλου και εντέρου και τη μείωση της ψυχολογικής δυσφορίας μέσω της εκπαίδευσης των ασθενών και των στοχευμένων θεραπειών. Η αναγνώριση του ρόλου του στρες και της σπλαχνικής ευαισθησίας στο IBS υπογραμμίζει την ανάγκη για εξατομικευμένα θεραπευτικά σχέδια. Ο βαθύς αντίκτυπος του IBS στη συναισθηματική ευημερία των ασθενών, που συχνά οδηγεί σε αισθήματα ντροπής και παρεξήγησης από τους άλλους, υπογραμμίζει την αξία μιας θετικής σχέσης γιατρού-ασθενούς. Οι διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές συνιστούν μια κλιμακωτή προσέγγιση της θεραπείας, προτείνοντας γνωσιακή-συμπεριφορική θεραπεία, υπνοθεραπεία και άλλες ψυχολογικές θεραπείες για ασθενείς με ανθεκτικό IBS, υπογραμμίζοντας τη στροφή προς την ενσωμάτωση ψυχολογικών θεραπειών παράλληλα με τις παραδοσιακές φαρμακολογικές θεραπείες (Nakov et al., 2022). Οι ψυχολογικές και συμπεριφορικές θεραπείες έχουν δείξει σημαντική αποτελεσματικότητα, ξεπερνώντας πολλές φαρμακευτικές θεραπείες. Μετα-αναλύσεις που καλύπτουν 45 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες με 3.325 ασθενείς σε όλους τους υποτύπους του IBS καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπειών στη μείωση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής (Ford et al., 2014). Η γνωσιακή-συμπεριφορική θεραπεία, προσφέρει μέτριες έως μεγάλες βελτιώσεις στα συμπτώματα και την ποιότητα ζωής, αν και δεν είναι καθολικά διαθέσιμη σε περιβάλλοντα πρωτοβάθμιας περίθαλψης. Ωστόσο, υπάρχει μια γενική έλλειψη διαφοροποίησης μεταξύ των υποτύπων IBS σε αυτές τις μελέτες, παραβλέποντας ενδεχομένως συγκεκριμένα οφέλη ή μειονεκτήματα των θεραπειών στις διάφορες μορφές IBS (Nakov et al., 2022).

Θεραπείες IBS βασισμένες στο μικροβίωμα

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει τα προβιοτικά ως ζωντανούς μικροοργανισμούς που παρέχουν οφέλη για την υγεία όταν λαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες, αν και οι έρευνες δείχνουν ότι ακόμη και μη ζωντανά συστατικά, όπως οι πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος, μπορούν να είναι ευεργετικά. Συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις έχουν δείξει σταθερά μια θετική επίδραση των προβιοτικών στο IBS. Αυτό εγείρει ερωτήματα σχετικά με το ρόλο των προβιοτικών στην αλλαγή του εντερικού μικροβιόκοσμου έναντι του άμεσου οφέλους για τον ξενιστή μέσω μηχανισμών όπως η βελτίωση της εντερικής διαπερατότητας, η διαμόρφωση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής ή η επίδραση στο μεταβολισμό του ξενιστή. Παρά το γεγονός ότι τα προβιοτικά είναι απίθανο να μεταβάλλουν ουσιαστικά την ποσοτική σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου λόγω της παροδικής φύσης της παρουσίας τους, έχουν σημειωθεί ευεργετικές επιπτώσεις, όπως η μείωση των συμπτωμάτων IBS και η μεταβολή της μικροβιακής σύνθεσης του εντέρου. Ωστόσο, ο βαθμός στον οποίο τα προβιοτικά επηρεάζουν το συνολικό μικροβιόκοσμο του εντέρου παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερευνήτος (Collins, 2014).

Τα πρε-βιοτικά (preBiotics), που ορίζονται ως άπεπτα συστατικά τροφίμων που διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη ή τη δραστηριότητα των ωφέλιμων μικροβίων του εντέρου, έχουν επίσης συγκεντρώσει το ενδιαφέρον. Οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης και οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες βρίσκονται ιδιαίτερα στο επίκεντρο, καθώς προάγουν την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων και των μπιφιδοβακτηρίων. Οι έρευνες δείχνουν ότι η ανταπόκριση στα prebiotics στο IBS εξαρτάται από τη δόση- οι χαμηλότερες δόσεις (περίπου 5g ημερησίως) μπορούν να βελτιώσουν τα συμπτώματα, ενώ οι υψηλότερες δόσεις μπορεί να τα επιδεινώσουν λόγω της συσσώρευσης προϊόντων ζύμωσης και αερίων. Η μέτρια πρόσληψή τους μπορεί να οδηγήσει σε αξιοσημείωτη βελτίωση των συμπτωμάτων του IBS, με αυξημένη αφθονία ωφέλιμων βακτηρίων όπως το *Bifidobacterium* spp. να παρατηρείται στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία (Collins, 2014).

Τέλος η χρήση αντιβιοτικών, όπως της ριφαξιμίνης, που απορροφάται δύσκολα ανέδειξε μια μέτρια αλλά σημαντική θετική επίδραση στα συμπτώματα του IBS, προκαλώντας συζήτηση σχετικά με τον τρόπο δράσης της. Η βελτίωση που παρατηρήθηκε σε πολλούς ασθενείς, η οποία αποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα

υδρογόνου ή μεθανίου στην αναπνοή, υποδηλώνει ότι η ριφαξιμίνη μπορεί να διορθώσει τη βακτηριακή υπερανάπτυξη του λεπτού εντέρου, μια κατάσταση που θεωρείται ότι υπάρχει σε μια μειοψηφία των πασχόντων (Menees et al., 2012). Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία που δείχνουν σημαντικές αλλαγές στο μικροβίωμα του παχέος εντέρου των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία με ριφαξιμίνη, ενώ δεν υπάρχουν αρκετά ερευνητικά δεδομένα από την αλληλούχιση του γονιδιώματος του μικροβιώματος και την ταυτοποίησή του σε αυτό τον τομέα (Collins, 2014).

3. Η σημαντικότητα της εύρεσης γενετικών δεικτών και βιοδεικτών για την διάγνωση και την θεραπεία του IBS

Η διαλεύκανση της πολύπλοκης φύσης του IBS είναι εγγενώς δύσκολη, δεδομένης της πολλαπλής και ετερογενούς παρουσίας του, η οποία διαφέρει μεταξύ των ασθενών. Η διαφορική διάγνωση είναι τόσο εκτεταμένη που μπορεί να χρειαστούν χρόνια για να τεθεί η σωστή διάγνωση.

Οι κλινικοί γιατροί θα πρέπει να αποκλείσουν τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, την κοιλιοκάκη, τη μικροσκοπική κολίτιδα, τη δυσανεξία στη λακτόζη ή/και στην φρουκτόζη, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, γαστρεντερικές λοιμώξεις, την αμυλοείδωση τρανσθυρετίνης, και τα συμπτώματα του υπερπαραθυρεοειδισμού, του υποθυρεοειδισμού και των νευροενδοκρινικών όγκων (Nakon et al., 2022). Όπως προαναφέρθηκε, η διάγνωση του IBS μέχρι στιγμής γίνεται με γνώμονα τα κριτήρια ROME IV. Ωστόσο, η εξαντλητική διερεύνηση για τον αποκλεισμό κάθε οργανικής παθολογίας εξακολουθεί να γίνεται σε πολλούς ασθενείς με IBS. Μερικοί ασθενείς με IBS εμφανίζουν μη ειδικά και επικαλυπτόμενα συμπτώματα που δεν μπορούν να συσχετιστούν με μια συγκεκριμένη διάγνωση.

Σύμφωνα με αυτό, οι βιοδείκτες που είναι ειδικοί για το IBS θα μπορούσαν να προσδίδουν μεγάλο όφελος στο οπλοστάσιο του κλινικού ιατρού για τη διάγνωσή του (Kim et al., 2017). Ο προσδιορισμός γενετικών δεικτών και βιοδεικτών για το IBS είναι κρίσιμος για την απλοποίηση αυτής της πολυπλοκότητας, καθώς παρέχει έναν τρόπο βελτίωσης της διαγνωστικής ακρίβειας και κατανόησης των διαφόρων υποτύπων της πάθησης (Sood et al., 2014). Οι πολύπλοκες διακρίσεις στον τρόπο εμφάνισης του IBS μεταξύ ανδρών, γυναικών και παιδιών υπογραμμίζουν την ανάγκη για εξατομικευμένη διάγνωση και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι γενετικοί δείκτες είναι εξαιρετικά εργαλεία για την αναγνώριση και τη θεραπεία αυτών των αποκλίσεων, επιτρέποντας προσαρμοσμένες θεραπείες με βάση τις διαφορές ηλικίας και φύλου (Nakon et al., 2022).

3.1. Βιοδείκτες

Ένας βιοδείκτης μπορεί να περιγραφεί απλά ως ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό, που μετράται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθολογικών καταστάσεων ή αποκρίσεων σε μια έκθεση ή παρέμβαση. Οι βιοδείκτες μπορούν να προέρχονται από μοριακά, ιστολογικά, ακτινογραφικά ή φυσιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου. Επιπλέον, έχουν οριστεί διάφορες υποκατηγορίες βιοδεικτών ανάλογα με τις εφαρμογές τους. Ειδικότερα, ένας βιοδείκτης μπορεί να πληροί πολλαπλά κριτήρια για διαφορετικές χρήσεις (Califf, 2018). Στην περίπτωση του IBS, ενώ οι ορισμοί για τους βιοδείκτες μπορεί να επικαλύπτονται, έχουν επίσης εμφανή διακριτικά χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν συγκεκριμένες χρήσεις. Για παράδειγμα, διαγνωστικοί βιοδείκτες, βιοδείκτες παρακολούθησης, φαρμακοδυναμικοί βιοδείκτες απόκρισης, προγνωστικοί βιοδείκτες, και άλλοι, μπορούν να εφαρμοστούν για το IBS. Πράγματι, υπάρχουν διάφοροι τύποι βιοδεικτών για το IBS με στόχο τη βελτίωση της διάγνωσης, τη διαφοροποίηση από άλλες οργανικές ασθένειες και την διάκριση μεταξύ των υποτύπων του IBS. Ορισμένοι βιοδείκτες σχετίζονται με έναν πιθανό παθοφυσιολογικό μηχανισμό του IBS και άλλοι χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των ασθενών με IBS από τους μη ασθενείς με IBS (Kim et al., 2017).

Ωστόσο, ένας ιδανικός βιοδείκτης θα πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, απλή χρήση, αναπαραγωγιμότητα, χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των διαφορετικών ασθενών και προσιτός και αποδεκτός από τον ασθενή. Ωστόσο, οι γνώσεις μας σχετικά με την αποτελεσματική χρήση τους είναι ακόμη ελλιπείς (Califf, 2018).

3.1.1. IBS: Βιοδείκτες του αίματος

Η έρευνα σε ομάδες βιοδεικτών που βρίσκονται στον όρο του αίματος προσφέρει πολλά υποσχόμενες διαγνωστικές δυνατότητες για το IBS. Οι Lembo et al., 2009 διεξήγαγαν μια καίρια μελέτη που διερεύνησε έναν πίνακα 10 βιοδεικτών αίματος, συμπεριλαμβανομένων της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), του σχετιζόμενου με την ανάπτυξη ογκογονιδίου-α και του νευροτροφικού παράγοντα BDNF. Ακόμα, διάφοροι παράγοντες, που σχετίζονται με φλεγμονή και τραυματισμό ιστών, όπως οι ANCA, ASCA IgA, anti-CBir1 (για το IBD), και tTG (για κοιλιοκάκη), βρέθηκαν σε διαφορετική ποσότητα, σε σχέση με τους υγιείς ενώ δείκτες όπως TWEAK, GRO-α,

BDNF, IL-1β, TIMP-1, και NGAL ανιχνεύθηκαν επίσης διαφοροποιημένοι. Ο εν λόγω πίνακας (βλ. Πίνακα 3) κατέδειξε θετική προγνωστική αξία στο 81% των περιπτώσεων, και συνολική ακρίβεια 70% στη διαφοροποίηση του IBS από τις άλλες γαστρεντερικές διαταραχές. Βιοδείκτες όπως η IL-1β, που εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις νόσους, και ο BDNF, που συνδέεται με καταστάσεις χρόνιου πόνου, διερευνήθηκαν για το ρόλο τους στο IBS, υποδεικνύοντας σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων BDNF και κοιλιακού πόνου σε ασθενείς.

Επεκτείνοντας περαιτέρω αυτή την προσέγγιση, μια άλλη μελέτη συμπεριέλαβε έναν συνδυασμό 34 δεικτών του ορού και δεικτών γονιδιακής έκφρασης μαζί με ψυχολογικές μετρήσεις για να ενισχύσει τη διαγνωστική ακρίβεια. Η ισταμίνη, η τρυπτάση, η σεροτονίνη και η ουσία P φαίνονται να διαφοροποιούνται ποσοτικά σε ασθενείς με IBS, αλλά και γονίδια όπως τα CBFA2T2, CCDC147, και ZNF326. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας, με αξιοσημείωτη την διάκριση μεταξύ των υποτύπων του IBS, ιδίως μεταξύ του IBS-C (που κυριαρχεί η δυσκοιλιότητα) και του IBS-D (Jones et al., 2014).

Ακόμα, έρευνες υποστηρίζουν πως η ενίσχυση της διαγνωστικής του IBS μπορεί να προέλθει από χαρακτηρισμό των κυτταροκινών των ασθενών. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως διάφορες κυτταροκίνες αλλά και αυξητικοί παράγοντες εκφράζονται διαφορετικά σε ασθενείς με IBS και χωρίς IBS. Πέρα από αυτό, ένας χαρακτηρισμός αυτής της έκφρασης θα μπορούσε να βοηθήσει όχι μόνο στην διάγνωση του IBS αυτού καθ' αυτού, αλλά και στον προσδιορισμό του συγκεκριμένου τύπου IBS. Οι Bashashati et al., 2014 έδειξαν πως υπάρχει μια ανισορροπία των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α και των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-10 στο IBS. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών με IBS με βάση το προφίλ των κυτταροκινών μπορεί να αποτελέσει ευκαιρία για εξατομικευμένη θεραπεία αυτής της πάθησης. Μέρος του προηγούμενου ευρήματος υποστηρίζεται και από τους Scully et al., 2010 που σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες φαίνεται πως παρόλο που το IBS χαρακτηρίζεται από ένα προφλεγμονώδες προφίλ που χαρακτηρίζεται από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6 και IL-8, οι ασθενείς με IBS με ορισμένες εξωεντερικές συννοσηρές καταστάσεις διακρίνονται από πρόσθετες αυξήσεις της IL-1β και του TNF-α. Σε άλλη μελέτη οι Berg et al., 2020, διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα στο βλεννογόνο, των προφλεγμονωδών Th1 κυτταροκινών IFN-γ, IL-1β, IL-2, της Th17 κυτταροκίνης IL-

17, των Th2 σχετιζόμενων με αλλεργίες κυτταροκινών IL-5, TNF-α και IL-9, των αυξητικών παραγόντων FGF και GM-CSF, σε σύγκριση με τα άτομα χωρίς συμπτώματα IBS.

3.1.2. IBS: Βιοδείκτες κοπράνων (Fecal Biomarkers)

Οι βιοδείκτες κοπράνων έχουν γίνει από τους σημαντικότερους βιοδείκτες των γαστρεντερικών παθήσεων καθώς αποκλείουν τις επεμβατικές εξετάσεις. Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι η αναγνώριση του IBD και, ως εκ τούτου, ο αποκλεισμός του IBS. Η καλπροτεκτίνη κοπράνων, είναι μια μικρή πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο και ψευδάργυρο και βρίσκεται σε αφθονία στα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα καθώς και στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μικρή συγκέντρωση καλπροτεκτίνης αποκλείει το IBD, γλιτώνοντας έτσι τα περισσότερα άτομα με IBS από την ανάγκη διενέργειας επεμβατικής εξέτασης, όπως η κολονοσκόπηση (Montalto et al., 2013).

Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη με 196 ασθενείς με IBS και 160 υγιείς μάρτυρες χωρίς γαστρεντερικά συμπτώματα, έδειξε ότι μια ομάδα 8 βιοδεικτών [IL-1β, IL-6, IL-12p70, TNF-α, χρωμογρανίνη A (CgA) στα κόπρανα, ανθρώπινη β-δεφενσίνη-2, καπροϊκό και FC] είχαν ευαισθησία 88,1% και ειδικότητα 86,5% στη διάκριση των ατόμων με IBS από τους υγιείς ανθρώπους (Mujagic et al., 2016).

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acids-SCFAs) των κοπράνων, που παράγονται από τη μικροβιακή ζύμωση μη πεπτόμενων υδατανθράκων στο παχύ έντερο, χρησιμεύουν ως υποσχόμενοι βιοδείκτες για διάφορες καταστάσεις λόγω της συμμετοχής τους στη ρύθμιση της φλεγμονής, του κορεσμού, και της καρκινογένεσης (Natarajan & Pluznick, 2014). Τα επίπεδα SCFA σε άτομα με IBS σε σχέση με τα υγιή είναι ανεβασμένα και αυτό αναδεικνύει την διαγνωστική χρησιμότητα των SCFAs και ειδικότερα του βουτυρικού και του προπιονικού οξέος για το IBS (Farup et al., 2016; Tana et al., 2010).

Οι χρωμογρανίνες, πρωτεΐνες που βρίσκονται σε εκκριτικά κύτταρα του εντερικού, ενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος, θεωρούνται δυνητικοί δείκτες για τη δραστηριότητα του νευροενδοκρινικού συστήματος του εντέρου. Τα αυξημένα επίπεδα της χρωμογρανίνης A (CgA) και της σεκρετογρανίνης (Sg) III στα κόπρανα ασθενών με IBD σε σύγκριση με υγιείς υποδηλώνουν τη συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των χρωμογρανινών στο IBS και οι λόγοι για τα ποικίλα

επίπεδά τους στους ασθενείς παραμένουν ασαφείς (Öhman et al., 2012). Τέλος, οι πτητικοί οργανικοί μεταβολίτες (Volatile Organic Metabolites - VOMs) είναι το κλειδί για τη διάκριση των γαστρεντερικών διαταραχών λόγω του μοναδικού προφίλ τους σε όλες τις ασθένειες. Μια μελέτη που περιλάμβανε ασθενείς με IBS-D, νόσο του Crohn, ελκώδη κολίτιδα και υγιείς μάρτυρες εντόπισε 240 VOMs. Συγκεκριμένοι VOMs, όπως οι εστέρες των SCFA, συνδέθηκαν με το IBS-D, ενώ οι αλδεϋδες ήταν πιο άφθονες στην IBD. Ένα μοντέλο 11 VOM διαφοροποίησε αποτελεσματικά το IBS-D από το CD και το UC με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς και από τους υγιείς ελέγχους, αναδεικνύοντας τις δυνατότητες των VOMs στη μη επεμβατική διάγνωση και διαφοροποίηση των γαστρεντερικών διαταραχών (Ahmed et al., 2013).

3.2. IBS: Επιγενετική και μη κωδικά μόρια RNA

Στη βιολογία, η επιγενετική είναι η μελέτη των κληρονομικών αλλαγών του φαινοτύπου που δεν εμπεριέχουν τροποποιήσεις στην αλληλουχία του DNA. Το συνθετικό "επί" στην επιγενετική σημαίνει κάτι το οποίο είναι "πάνω από" ή "εκτός" της παραδοσιακής γενετικής κληρονομικότητας. Πέρα από αυτό, παρακάτω, τα μη κωδικά μόρια RNA (non-coding RNAs) θα θεωρηθούν ως παράγοντες επιγενετικής τροποποίησης.

Τα νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούνται από οκταμερή ιστονών με DNA τυλιγμένο γύρω τους, έχουν καθοριστική σημασία για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Η ακετυλίωση των ιστονών, που διευκολύνεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs), χαλαρώνει τη χρωματίνη, βοηθώντας τη μεταγραφή των γονιδίων, ενώ οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) συμπυκνώνουν τη χρωματίνη, αναστέλλοντας την. Οι ιστόνες μπορούν επίσης να υποστούν διάφορες τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση και φωσφορυλίωση, επηρεάζοντας τη μεταγραφή. Παρομοίως, η μεθυλίωση του DNA, ιδίως στα δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης, η οποία ρυθμίζεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNMTs), μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή. Αυτές οι επιγενετικές αλλαγές είναι καθοριστικής σημασίας για τον δυναμικό έλεγχο της γονιδιακής δραστηριότητας.

Περίπου το 90% του RNA ενός κυττάρου, το οποίο δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνες, εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών βιολογικών διεργασιών και ασθενειών. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs) και στα microRNAs (miRNAs), ιδίως σε σχέση με τα γαστρεντερικά προβλήματα. Αυτές οι αλληλουχίες RNA που ονομάζονται miRNAs προσδένονται σε συγκεκριμένα mRNAs και είτε τα μπλοκάρουν είτε τα αποδομούν, και έτσι ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων. Οι μακρύτερες αλληλουχίες που ονομάζονται lncRNAs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με miRNAs και μπορεί να ελέγχουν την έκφραση γονιδίων μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τα μη κωδικοποιημένα RNAs μπορούν επίσης να δρουν εκτός κυττάρων όταν σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες ή περιέχονται σε εξωκυτταρικά κυστίδια (Dothel et al., 2023).

3.2.1 IBS: microRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση βασικών βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού, καθιστώντας τη δυσλειτουργία τους δυνητική αιτία για ασθένειες όπως οι γαστρεντερικές διαταραχές (Park, 2016). Το miRNA-24, ειδικότερα, έχει εντοπιστεί ότι σε ασθενείς με IBS, τροποποιεί τα συμπτώματα επηρεάζοντας τον μεταφορέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης. Η ανακάλυψη αυτή όχι μόνο αναδεικνύει τη σημασία των miRNAs για την κατανόηση της παθογένειας του IBS, αλλά ανοίγει επίσης δρόμους για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών και τη χρήση συγκεκριμένων miRNAs ως βιοδεικτών για τον εντοπισμό υποομάδων ασθενών με IBS (Liao et al., 2016). Ακόμα το miRNA-29 επηρεάζει τη διαπερατότητα της εντερικής μεμβράνης μέσω της ρύθμισης της γλουταμινικής-αμμωνιακής λιγάσης. Έτσι, το miRNA-29 θα μπορούσε να προσδιορίσει ένα υποσύνολο ασθενών με IBS με αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης που μπορεί επίσης να ωφεληθούν από τη θεραπεία με γλουταμίνη. Άλλα μόρια που θα μπορούσαν να είναι βιοδείκτες είναι το miRNA-199 και το miRNA-510 (Zhou et al., 2015).

Πίνακας 3: Βιοδείκτες για την διάγνωση και την διαχείριση του IBS (Nakov et al., 2022).

Type	Biomarkers	Control group	Sensitivity, %	Specificity, %	PLR	NLR	AUC
Blood biomarkers	A panel of 10 biomarkers (IL-1 β , GRO- α , BDNF, ASCA IgA, anti-CBir1, tTG, TWEAK, ANCA, TIMP-1, and NGAL) [9]	Non-IBS	50.0	88.0	4.17	0.57	0.76
	A panel of 34 serologic (including histamine, tryptase, serotonin, and substance P), gene expression markers, and psychological measurements [14]	HC	81.0	64.0	2.25	0.30	0.81
	Proteases (cathepsin L, elastase 3a, and proteasome alpha subunit-4) [21]	HC	>75.0	>85.0	5.00	0.29	0.98
	Anti-CdtB antibodies [22]	Non-IBS	43.7	91.6	5.20	0.61	0.81
	Anti-vinculin antibodies [22]	Non-IBS	32.6	83.8	2.01	0.80	0.62
Immune activation biomarkers	Inflammatory cytokines – IL-6 and its receptor, IL-8, and IL-1 β , TNF- α	n/a					
Fecal biomarkers	Calprotectin [34]	IBD	93.0	94.0	15.50	0.07	nr
	Fecal SCFA [38]	HC	92.0	72.0	3.29	0.11	0.89
	Secretogranin II [39]	HC	80.0	79.0	3.81	0.25	0.86
	A panel of 8 biomarkers (IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α , CgA, HBD2, caproate, and calprotectin) [35]	HC	88.1	86.5	6.53	0.14	0.89
	Volatile organic metabolites [42]	HC	90.0	80.0	4.50	0.13	0.94
Microbiome	No specific microbial biomarker	n/a					
MicroRNA biomarkers	miRNA-199, miRNA-150, and miRNA-342-3p	n/a					

Τα microRNAs (miRNAs), τα οποία λειτουργούν ως ρυθμιστές στη διεπιφάνεια ξενιστή-μικροβίου, είναι ένα άλλο βασικό συστατικό της αλληλεπίδρασης ξενιστή-μικροβιώματος (βλ. **Εικόνα 9**). Τα εξωσώματα από εντερικά επιθηλιακά κύτταρα που φέρουν συγκεκριμένες αλληλουχίες miRNA έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν δραματικά τη σύνθεση του μικροβιώματος του εντέρου. Οι διαφοροποιήσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο και η χημικά επαγόμενη φλεγμονή είναι δύο περιπτώσεις όπου έχουν παρατηρηθεί τροποποιήσεις στο προφίλ των miRNA. Η δυνατότητα των miRNAs ως βιοδεικτών για διαταραχές που σχετίζονται με το μικροβιόκοσμο αναδεικνύεται από τα διαφοροποιήσιμα μοτίβα των miRNAs μεταξύ ποντικών χωρίς μικρόβια και ποντικών με συμβατικό μικροβιόκοσμο, καθώς και από την αρνητική σχέση μεταξύ ορισμένων miRNAs και του αριθμού των βακτηρίων σε ασθενείς με IBS. Επιπλέον, μέσω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι ιοί και οι μύκητες, τα miRNAs μπορούν επίσης να διαμορφώνουν τη γονιδιακή έκφραση και την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή (Lu et al., 2023).

Όσον αφορά τα ncRNA, πολλά miRNA έχουν αναγνωριστεί ως εμπλεκόμενα στην παθοφυσιολογία του IBS. Μεταξύ αυτών, η οικογένεια miR-19 που εμπλέκεται τόσο στη σπλαχνική υπερευαισθησία όσο και στην αυξημένη εντερική διαπερατότητα θα μπορούσε να αποτελέσει βασικό βιοδείκτη στη διάγνωση και τη θεραπεία του IBS, ιδίως για τους ασθενείς με IBS-D. Ωστόσο, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για την επιβεβαίωση του ρόλου αυτής της οικογένειας miRNA και τον εντοπισμό ενζύμων και μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην πολυπλοκότητα του IBS (Lu et al., 2023).

Άλλη μελέτη δείχνει πως οι εκφράσεις των hsa-miR-641, hsa-miR-1843, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-219a-5p και hsa-miR-19b-1-5p, στους εντερικούς ιστούς των ασθενών με IBS-D ήταν σημαντικά διαφορετικές. Επιπλέον, θα μπορούσαν να ρυθμίσουν μια ποικιλία μορίων και μονοπατιών σηματοδότησης, τα οποία εμπλέκονται στον πολύπλευρο και πολυεπίπεδο μηχανισμό της σπλαχνικής υπερευαισθησίας του IBS-D (Lu et al., 2023).

Τέλος στην μεγάλη ανασκόπηση των Dothel et al., 2023 παρουσιάζονται οι πιο σύγχρονες μελέτες που αφορούν τις επιγενετικές τροποποιήσεις και τα microRNA που συνδέονται με το IBS. Καθοριστικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν στις περισσότερες μελέτες τα miR-16, miR-24, και miR-29 (βλ. *Εικόνα 10*).

miRNA [ref]	miRNA expression (↓ or ↑) in IBS vs HC	Target gene or pathway (identified in human samples and/or cells) [#]	Observed correlation with GI function	Clinical condition and samples analysed (n); (human, cells, and animal model)
Human studies				
miR16 [112]	↓	5HT-4	Motility and stool form	IBS-D (n 14) & HC (n 17); Jejunum biopsies
miR-16a [19]	↓	CLDN2	Increased IP	IBS-D (n 43) & HC (n 23); Proximal jejunum biopsies (Watson capsule)
miR-24 [114]	↑	SERT	Increased VHS	IBS (n 10) & HC (n 10); intestinal mucosa biopsies
miR-29a [74]	↑	GLUL	Increased IP	IBS-D (n 19) & HC (n 10); duodenum and colon biopsies and blood microvesicles

Εικόνα 9: Συγκεκριμένα microRNA, ο ρυθμός έκφρασής τους και η σύνδεσή τους με συγκεκριμένους τύπους IBS (Dothel et al., 2023).

3.2.3 Επιγενετικές τροποποιήσεις στους ασθενείς με IBS: Πιθανοί μελλοντικοί γενετικοί δείκτες;

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στο εντερικό μικροβίωμα του ασθενή. Πολυάριθμες διεργασίες συμβάλλουν σε αυτή την περίπλοκη ισορροπία, μία από τις οποίες είναι η διάσπαση των ζυμώσιμων, oligo-, δι-, μονοσακχαριτών και πολυολών (FODMAPs) από τα βακτήρια του αυλού του εντέρου.

Αυτά τα βακτήρια είναι σημαντικοί προμηθευτές SCFAs, όπως βουτυρικό, προπιονικό και οξικό. Οι λειτουργίες των SCFAs, ιδίως του βουτυρικού, στην εντερική φλεγμονή, την ακεραιότητα του φραγμού, την κινητικότητα και τον έλεγχο του άξονα έντερο-εγκέφαλος είναι καλά κατανοητές. Η έρευνα έχει δείξει ότι τα SCFAs, και συγκεκριμένα το βουτυρικό, παίζουν ρόλο σε πολλαπλές πτυχές της παθοφυσιολογίας του IBS, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων όπως η ανοσολογική ενεργοποίηση, η εντερική κινητικότητα και η σπλαχνική ευαισθησία (Lu et al., 2023).

Πολλά γονίδια επηρεάζονται από το βουτυρικό, το οποίο είναι γνωστό για τις ανασταλτικές του επιδράσεις στην αποακετυλάση των ιστονών. Πολλές διεργασίες επηρεάζονται από αυτή την επιγενετική τροποποίηση, μία από τις οποίες είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων (AHR), ο οποίος έχει συνδεθεί με την εντερική κινητικότητα και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον ότι έχει αποδειχθεί ότι ο AHR επηρεάζει την κινητική λειτουργία του παχέος εντέρου, η οποία έχει συνέπειες για τον περισταλτισμό του παχέος εντέρου. Οι επιδράσεις του βουτυρικού επεκτείνονται και σε άλλους τομείς, όπως η μεταφορά ασβεστίου και άλατος από το έντερο, και η συγκέντρωσή του μπορεί να επηρεαστεί από τα προβιοτικά, τα αντιβιοτικά αλλά και τη διατροφή (Lu et al., 2023).

Τέλος, στην μελέτη των Mahurkar et al., 2016 η ανάλυση μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα που συνέκρινε ασθενείς με IBS με υγιείς μάρτυρες, αποκάλυψε 133 διαφορεικά μεθυλιωμένες θέσεις (DMPs) που παρουσίαζαν τουλάχιστον 10% μέση διαφορά και επίπεδα σημαντικότητας κάτω από 0,05. Τα σχετιζόμενα γονίδια αυτών των DMPs συνδέονται με βιολογικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης, ο οποίος παίζει ρόλο στη διαχείριση του οξειδωτικού στρες, και η δραστηριότητα των νευροπεπτιδικών ορμονών. Η επικύρωση μέσω τεχνικών αλληλούχισης επιβεβαίωσε τη διαφορετική μεθυλίωση σε συγκεκριμένα γονίδια: (GSTM5) και πρωτεΐνη που προάγει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης (TPPP) (**βλ. Εικόνα 10**). Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε μεταβολές μεθυλίωσης σε δύο υποκινητές εντός του γονιδίου GSTM5.

Methylated Genes	Expression (↓ or ↑)	Regulation &/or observed function	Biomarkers analysed	Clinical condition and samples analysed (n); (human, cells and animal model); biological sources
Human studies				
<i>SSPO, GSTM1, GSTM5, TPPP</i>	↑	Association of <i>SSPO</i> methylation with high HADs and PSS scores	HAD and PSS scores	IBS-D (n 10), IBS-C (n 8), IBS-M (n 9), HC (n 23); whole blood (PBMCs)
<i>ADCYAP1</i>	↓			
<i>AKAP12; PRKAR1B</i>	↑			

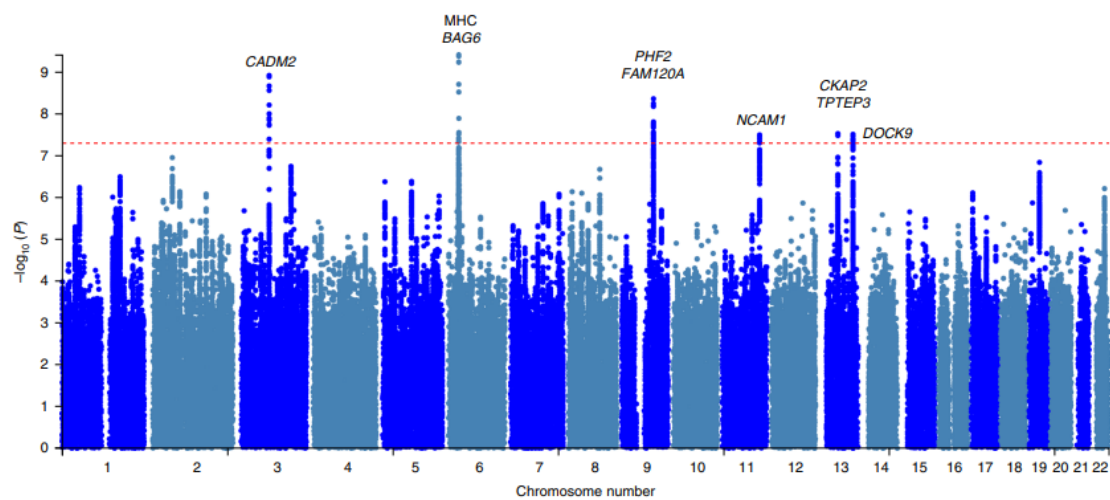
Εικόνα 10: Διαφορικά μεθυλιωμένα γονίδια που συνδέονται με την παθοφυσιολογία του IBS (Mahurkar et al., 2016).

3.3. Γενετικοί δείκτες

Η έρευνα σχετικά με τις γενετικές βάσεις του IBS δεν είναι τόσο προηγμένη όσο είναι για καταστάσεις όπως το IBD, ωστόσο μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν αποκαλύψει αξιοσημείωτες γενετικές συσχετίσεις. Ειδικότερα, έχουν εντοπιστεί παραλλαγές που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9, συγκεκριμένα στον τόπο 9q31.2. Αυτές οι παραλλαγές σχετίζονται με τη λειτουργία διαφόρων διαύλων ιόντων και την αυτόνομη δυσλειτουργία. Επιπλέον, έχουν συνδεθεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο της σακχαράσης-ισομαλάσης. Είναι αξιοσημείωτο ότι περίπου το 2% των ασθενών με IBS εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *SCN5A*, οι οποίες επηρεάζουν το μηχανικά ευαίσθητο κανάλι ιόντων νατρίου *NaV1.5*. Αυτή η αλλοίωση επηρεάζει τη λειτουργικότητα των λείων μυών και τη μηχανική ευαισθησία τους. Επιπλέον, μελέτες διδύμων αποκαλύπτουν υψηλότερο ποσοστό συμφωνίας για τη διάγνωση του IBS σε μονοζυγωτικούς διδύμους σε σύγκριση με διζυγωτικούς διδύμους. Ωστόσο, η ύπαρξη ενός γονέα που πάσχει από IBS υπογραμμίζει την επιρροή των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η μαθημένη συμπεριφορά της ασθένειας, υποδηλώνοντας ότι παίζουν πιο κρίσιμο ρόλο από τις γενετικές προδιαθέσεις στην ανάπτυξη του IBS (Ford et al., 2020).

Ακόμα, στην μεγάλη μελέτη των Eijsbouts et al., 2021 έγινε μελέτη του γονιδιώματος 53400 ασθενών με IBS και αναδείχθηκε πως το IBS μοιράζεται κοινά γενετικά μονοπάτια με αυτά της αγχώδους διαταραχής. Η έρευνα εντόπισε με επιτυχία έξι γενετικούς τόπους για το IBS, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων όπως τα *NCAM1*, *CADM2*, *PHF2/FAM120A*, *DOCK9*, *CKAP2/TPTE2P3* και *BAG6* (βλ. **Εικόνα 11**). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τέσσερα πρώτα γονίδια συνδέονται με διαταραχές της διάθεσης και του άγχους και εκφράζονται στο νευρικό σύστημα, γεγονός που

υποδηλώνει μια γενετική επικάλυψη με ψυχολογικούς παράγοντες. Πράγματι, η μελέτη διαπίστωσε μια ισχυρή συσχέτιση σε επίπεδο γονιδιώματος μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης IBS και ψυχολογικών καταστάσεων όπως το άγχος, ο νευρωτισμός και η κατάθλιψη, με γενετική συσχέτιση (r_g) μεγαλύτερη από 0,5.



Εικόνα 11: Διάγραμμα Μανχάταν που δείχνει την κατανομή των SNPs που σχετίζονται με το IBS σε όλο το γονιδίωμα. Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει το όριο σημαντικότητας σε όλο το γονιδίωμα σε $P=5 \times 10^{-8}$ (Eijsbouts et al., 2021).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη της σημαντικότητας των μοριακών βιοδεικτών στην διάγνωση και την θεραπεία του IBS, καθώς και η συμβολή των μοριακών μεθόδων για την εύρεση βιοδεικτών στο IBS. Δεδομένης της πολυπλοκότητας του IBS, το οποίο χαρακτηρίζεται από ποικίλα συμπτώματα, υποκείμενους μηχανισμούς και ατομικές εμπειρίες ασθενών, ο εντοπισμός αποτελεσματικών στρατηγικών διάγνωσης και διαχείρισης αποτελεί σημαντική πρόκληση. Στο πλαίσιο αυτό, η διερεύνηση και ο προσδιορισμός των βιοδεικτών αποτελούν φάρο ελπίδας. Οι βιοδείκτες στο IBS προαναγγέλλουν ένα μετασχηματιστικό δυναμικό, προσφέροντας μια πιο διαφοροποιημένη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του και μια συγκεκριμένη βάση για την προσαρμογή εξατομικευμένων στρατηγικών θεραπείας. Δεν υπόσχονται μόνο να αποκαλύψουν τα περίπλοκα μοριακά και γενετικά θεμέλια του συνδρόμου, αλλά στοχεύουν επίσης στη βελτίωση της διαγνωστικής ακρίβειας, στην πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης και ενδεχομένως στην αποκάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων.

4. Η συμβολή των μοριακών μεθόδων στην εύρεση γενετικών δεικτών και βιοδεικτών

Προηγμένες μοριακές τεχνικές όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπουν την ακριβή και ενδεδειγμένη εξέταση των γενετικών πληροφοριών, συμβάλλοντας στην ανακάλυψη νέων βιοδεικτών σε πολλές ασθένειες. Μέσω της ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA, οι γενετικές παραλλαγές και μεταλλάξεις που συνδέονται με ασθένειες μπορούν να μελετηθούν διεξοδικά, αποκαλύπτοντας βιοδείκτες για τη διάγνωση ή την πρόγνωση. Επιπρόσθετα, η αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων ή στοχευμένων τμημάτων, αποκαλύπτει μια ποικιλία γονιδιωματικών αλλαγών, όπως παρεμβολές, διαγραφές, αναδιατάξεις και πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου. Αυτά τα εκτεταμένα και ολοκληρωμένα γενετικά δεδομένα διευκολύνουν τον εντοπισμό νέων βιοδεικτών, προσφέροντας λεπτομερείς γνώσεις σχετικά με τις υποκείμενες αιτίες διαφόρων ασθενειών. Μαζί, αυτές οι τεχνολογίες αλλά και πολλές άλλες, όπως θα δούμε παρακάτω, επιτρέπουν στους ερευνητές να διερευνήσουν το γενετικό τοπίο των ασθενειών πιο ολοκληρωμένα από ποτέ, οδηγώντας στην ανακάλυψη βιοδεικτών που μπορούν να βελτιώσουν την ανίχνευση ασθενειών, να προσαρμόσουν τις θεραπείες στο ατομικό γενετικό προφίλ και να βελτιώσουν τα αποτελέσματα των ασθενών.

4.1. Βασικές αρχές της Μοριακής ανάλυσης

Η μοριακή ανάλυση καλύπτει ένα ευρύ φάσμα προσεγγίσεων και εννοιών που αποσκοπούν στην κατανόηση των μοριακών «συστατικών» και λειτουργιών των βιολογικών συστημάτων. Οι αρχές αυτές μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε πολυάριθμους σημαντικούς τομείς. Πρώτα απ' όλα, η μοριακή βιολογία βασίζεται στην εξέταση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Η αλληλούχιση του DNA, η ανάλυση προφίλ RNA και η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της δομής, της λειτουργίας και της έκφρασης αυτών των σημαντικών μορίων. Η κατανόηση των ρόλων και των διασυνδέσεων τους είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση των βιολογικών διεργασιών και των μηχανισμών ασθενειών (Howe, 2018).

Μια άλλη σημαντική αρχή είναι η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Μικρά τμήματα DNA ή RNA μπορούν να ενισχυθούν με τεχνικές όπως η PCR. Αυτό είναι απαραίτητο για την ανίχνευση μορίων χαμηλής ποσότητας, την αναγνώριση γενετικών μεταλλάξεων και τη διερεύνηση προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε διάφορες βιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το IBS.

Σημαντικό ρόλο έχουν και οι μέθοδοι υβριδισμού, όπως η ELISA (παρόλο που δεν θεωρείται κλασική μέθοδος υβριδισμού αλλά ανοσοενζυμική ή ανοσοβιοχημική μέθοδος προσδιορισμού αντιγόνου ή αντισώματος). Αυτές οι μέθοδοι συνεπάγονται τη μεταφορά DNA, RNA ή πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη και τη χρήση επισημασμένων ανιχνευτών που δεσμεύονται σε μόρια-στόχους για ανίχνευση και ημι-ποσοτικοποίηση. Τέτοιες προσεγγίσεις είναι κρίσιμες για την ανίχνευση ορισμένων αλληλουχιών ή πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Η πρόοδος στον τομέα της βιολογίας που ασχολείται με το γονιδίωμα και τη μεταγραφωματική (transcriptomics) έχει μεταμορφώσει τη μοριακή βιολογία. Η γονιδιωματική αναλύει ολόκληρο το γονιδίωμα ενός οργανισμού, ενώ κατά την μεταγραφωματική ανάλυση εξετάζεται ολόκληρο το σύνολο των παραγόμενων μεταγράφων RNA. Οι τεχνικές υψηλής απόδοσης, όπως η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), παρέχουν ολοκληρωμένες γνώσεις σχετικά με τη γενετική πληροφορία και τη γονιδιακή έκφραση. Η πρωτεομική και η μεταβολομική παίζουν εξίσου ζωτικό ρόλο στη μοριακή ανάλυση. Η πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεϊνών για τη διερεύνηση της έκφρασης, της δομής και της λειτουργίας τους. Η μεταβολομική, από την άλλη πλευρά, μελετά τις μεταβολικές διεργασίες και τους μεταβολίτες που εμπλέκονται (Howe, 2018).

Η βιοπληροφορική είναι μια σημαντική πτυχή της μοριακής ανάλυσης, καθώς χρησιμοποιεί υπολογιστικά εργαλεία για την οργάνωση και την αξιολόγηση τεράστιων όγκων δεδομένων που παράγονται από ποικίλες έρευνες μοριακής βιολογίας. Αυτό περιλαμβάνει τη χρήση αλγορίθμων και λογισμικού για την εύρεση γονιδιακών λειτουργιών, ρυθμιστικών στοιχείων και δομικών μοτίβων, γενετικών δεικτών και βιοδεικτών μεταξύ άλλων.

Τέλος, οι αναλυτικές τεχνικές πραγματικού χρόνου (Real- Time), όπως η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR ή qPCR), επιτρέπουν τη συνεχή παρακολούθηση

και ποσοτικοποίηση (quantitation) της παραγωγής DNA και RNA, προσφέροντας ζωτικής σημασίας πληροφορίες για την έκφραση και τη ρύθμιση των γονιδίων Howe, 2018).

Οι τεχνικές αυτές αποτελούν τα θεμέλια της μοριακής ανάλυσης, επιτρέποντας στους ερευνητές να εξετάζουν πολύπλοκα βιολογικά συστήματα σε μοριακό επίπεδο και ανοίγοντας το δρόμο για ουσιαστικές προόδους στη γενετική, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία.

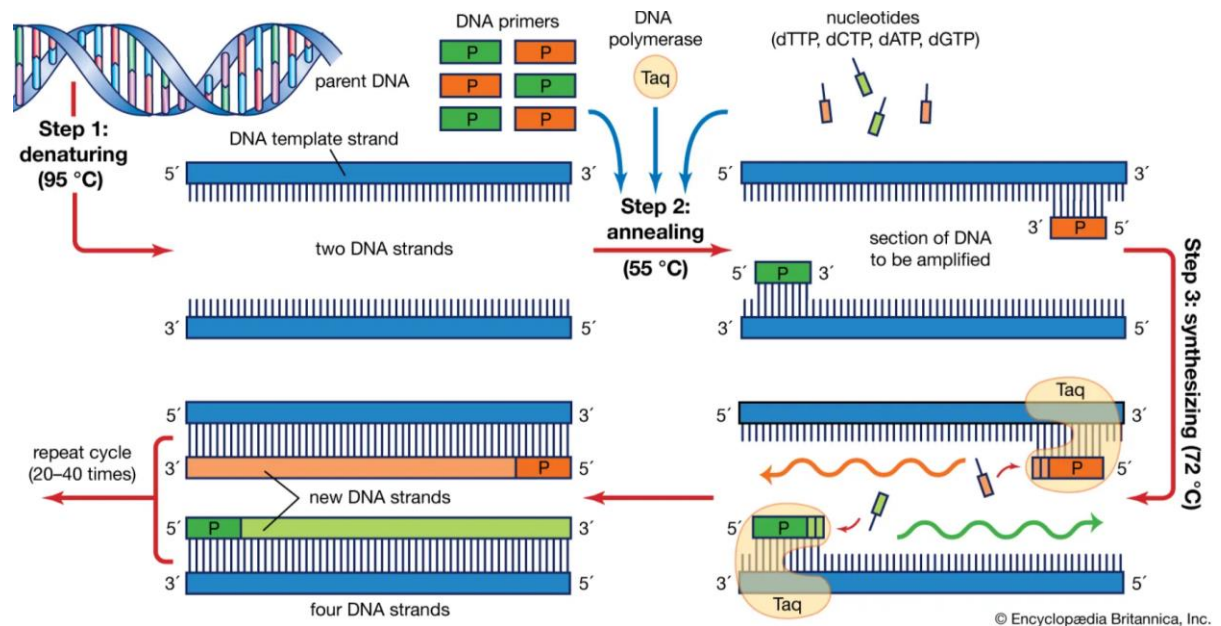
4.2 Βασικές αρχές της μεθόδου: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια επαναστατική εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983, και επιτρέπει την παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA από ένα μικρό αρχικό δείγμα. Η PCR έχει πολυάριθμες χρήσεις στη βιολογία και την ιατρική, καθιστώντας την πολύτιμο εργαλείο της σύγχρονης επιστήμης. Στην ιατρική διάγνωση, η PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι ιοί και τα βακτήρια. Στη γενετική, βοηθά στην αλληλούχιση και την κλωνοποίηση γονιδίων, καθώς και στον εντοπισμό γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες. Μέσο αυτής μπορούμε να ανιχνεύσουμε γονίδια και να ποσοτικοποιήσουμε την έκφραση αυτών, τα οποία συνδέονται με διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως το IBS, και να προβούμε σε διάγνωση και θεραπεία. Επιπλέον, η PCR χρησιμοποιείται στην έρευνα για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας. Η ικανότητά της να ενισχύει γρήγορα και αξιόπιστα συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA έχει επηρεάσει βαθιά τη βιολογική έρευνα και την ιατρική διάγνωση (Kolmodin & Williams, 1997).

Η PCR χρησιμοποιεί εκκινητές για την ενίσχυση ορισμένων αλληλουχιών DNA. Το πρότυπο DNA περιέχει την αλληλουχία-στόχο, η οποία μπορεί να έχει μήκος χιλιάδων νουκλεοτιδίων. Η DNA πολυμεράση είναι θερμοσταθερή και χρησιμοποιεί περίσσεια ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και τέσσερα τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) για να αντιγράψει εκατομμύρια αντίγραφα της

αλληλουχίας-στόχου σε μια ρυθμιστική αντίδραση. Η μέθοδος PCR αποσκοπεί στην ενίσχυση του πρότυπου DNA, αν και μπορεί επίσης να ξεκινήσει με RNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής (Kolmodin & Williams, 1997).

Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Κάθε κύκλος PCR αποτελείται από τρία βασικά βήματα: μετουσίωση του δίκλωνου προτύπου DNA (όπως γίνεται το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας κατά την φυσιολογική- αντιγραφή στο εσωτερικό ενός κυττάρου) σε υψηλές θερμοκρασίες (92-96°C), υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) σε κάθε μονόκλωνο πρότυπο DNA και ενζυμική επέκταση αυτών των εκκινητών στους 72°C για τη δημιουργία νέων αλυσίδων DNA, από την DNA πολυμεράση (ενδεικτικά κάποιες πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται: Taq, Phusion, Q5 κτλ.) (βλ. *Εικόνα 12*). Τόσο το αρχικό πρότυπο όσο και οι νέες παραγόμενες αλυσίδες DNA χρησιμεύουν ως υποστρώματα σε επόμενους κύκλους, με αποτέλεσμα τη εκθετική ενίσχυση του DNA-στόχου (Kolmodin & Williams, 1997). Αυτό επιτρέπει μεγάλη ενίσχυση (έως και 10^5 έως 10^9) από μια μικρή αρχική ποσότητα DNA. Η διαδικασία ρυθμίζεται με τη χρήση μεταβλητών όπως η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m), η περιεκτικότητα σε αλάτι και η παρουσία ιόντων μαγνησίου, τα οποία δρουν ως συμπαραγόντας του ενζύμου της πολυμεράσης (Kolmodin & Williams, 1997). Ουσιαστικά η PCR είναι μία εργαστηριακή (*in vitro*) μέθοδος που προσομοιάζει με την φυσιολογική αντιγραφή του γενετικού υλικού εντός των κυττάρων.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της PCR. Εικονίζονται τα σημαντικότερα βήματα. Βήμα 1) Με χρήση υψηλών θερμοκρασιών πραγματοποιείται η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA. 2) Με μείωση της θερμοκρασία επιτρέπεται η υβριδοποίηση των εκκινητών (primer) με τα μονόκλωνα μόρια DNA. Η χρήση ειδικών εκκινητών επιτρέπουν την επιλεκτική αντιγραφή μόνο του γονιδίου ενδιαφέροντος. 3) Μόλις επέλθει η κατάλληλη θερμοκρασία (Η θερμοκρασία, δηλαδή που επιτρέπει στο ένζυμο να γίνει δραστικό) η DNA πολυμεράση προσθέτει διαδοχικά νουκλεοτίδια αντιγράφοντας τα μονόκλωνα μόρια DNA. Μόλις πραγματοποιηθεί η αντιγραφή επανέρχμαστε σε νέο κύκλο αντιγραφής (Photo from Encyclopaedia Britannica/ Title Polymerase chain reaction) (Kolmodin & Williams, 1997).

4.2.1. Primers (εκκινητές)

Οι primers είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα (20-30 βάσεις), τα οποία σχεδιάζονται στο εργαστήριο και παράγονται από εξειδικευμένες εταιρίες και έχουν στόχο το γονίδιο ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα για μία αντίδραση PCR, χρειάζονται δύο primers, ο Forward (F/W) και ο Reverse (R/V). Οι χρήση δύο διαφορετικών primer είναι αναγκαία καθώς και η αντιγραφή φυσιολογικά πραγματοποιείται προς δύο αντίθετες κατευθύνσεις. Συνήθως ο F/W primer συνδέεται στο 3' άκρο της μη κωδικής αλυσίδας ενώ ο R/V στο 3' άκρο της κωδικής (βλ. **Εικόνα 12, Βήμα 2**). Οι primers σχεδιάζονται προσεκτικά να συνδέονται μόνο σε αλληλουχίες που υπάρχουν στο γονίδιο ενδιαφέροντος.



***Εικόνα 13:** Σύστημα αυτόματης PCR. Στην φωτογραφία βλέπουμε τα ανοιγμένα καπάκια του μηχανήματος κάτω από τα οποία υπάρχουν οι βάσεις για την εναπόθεση των δειγμάτων. Οι βάσεις του μηχανήματος θερμαίνονται και ψύχονται δημιουργώντας τους θερμικούς κύκλους. Με την χρήση της οθόνης αφής γίνεται χειρισμός σημαντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία των αντιδράσεων, ο χρόνος, και ο αριθμός κύκλων πολλαπλασιασμού (LabCare.com).*

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της συμβατικής (απλής) PCR γίνεται με την ηλεκτροφόρηση του γενετικού υλικού σε gel αгарόζης (συγκεκριμένης συγκέντρωσης). Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης είναι ζώνες που αντιπροσωπεύουν την ύπαρξη του γονιδίου ενδιαφέροντος ή την απουσία του.

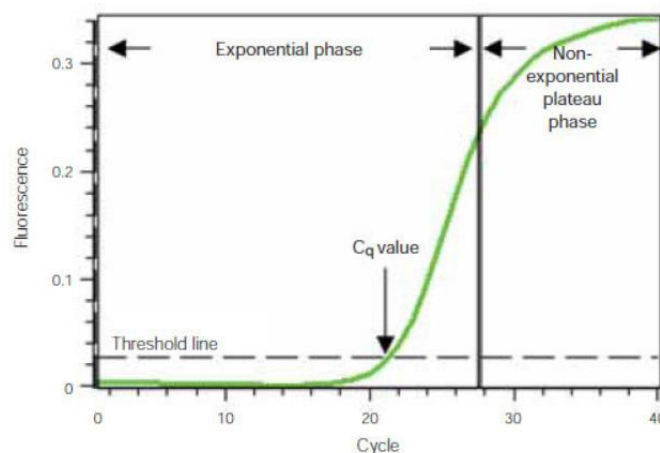
4.3. Ο πιο διαδεδομένος τύπος PCR: Real Time Quantitate PCR-Βασικές αρχές

Η qRT-PCR, είναι μια προηγμένη εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία. Η τεχνική αυτή ενισχύει και ποσοτικοποιεί ταυτόχρονα ένα στοχευμένο μόριο DNA (π.χ. το γονίδιο ενδιαφέροντος), καθιστώντας την πιο εξελιγμένη εκδοχή της τυπικής PCR. Είναι ιδιαίτερα γνωστή για την ακρίβειά της και την ικανότητά της να παρέχει ανάλυση δεδομένων σε πραγματικό χρόνο (Rin, 2011).

Η διαδικασία της qPCR αρχίζει με την προετοιμασία του δείγματος, όπου το DNA ή το RNA εξάγεται από το δείγμα με την χρήση ειδικών kit (DNA & RNA extraction kits). Στις περιπτώσεις όπου το RNA είναι το αρχικό μόριο, γίνεται αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA με την βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Αυτό το εξαγόμενο γενετικό υλικό αναμιγνύεται στη συνέχεια με τους ειδικούς εκκινητές, την DNA πολυμεράση, dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια) και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (που επιτρέπει στην DNA πολυμεράση να δράσει αποδοτικά). Χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές ή ανιχνευτές που δεσμεύονται στο DNA. Ο φθορισμός που εκπέμπεται αυξάνεται καθώς το DNA ενισχύεται και η αλλαγή αυτή μετράται σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια των κύκλων. Αυτό επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA σε κάθε κύκλο, παρέχοντας τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά δεδομένα. Το διάλυμα με τα παραπάνω συστατικά, θερμαίνεται και ψύχεται επανειλημμένα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας όπως και στην συμβατική PCR. Η ποσότητα του DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια αυτών των κύκλων είναι ευθέως ανάλογη του φθορισμού που παράγεται από τη χρωστική. Οι μετρήσεις φθορισμού σε πραγματικό χρόνο καθίστανται δυνατές από τον σύγχρονο εξοπλισμό qPCR, ο οποίος επιτρέπει τη συνεχή ανάλυση των αντιδράσεων (Rin, 2011).

Η κατανόηση της τιμής Threshold Cycle (Ct) - ο αριθμός κύκλων στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει ένα προκαθορισμένο κατώφλι, υποδεικνύοντας σημαντική ενίσχυση του DNA πάνω από το επίπεδο υποβάθρου - είναι απαραίτητη για την ερμηνεία των δεδομένων qPCR. Η ποσότητα του DNA-στόχου σε ένα δείγμα μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια συγκρίνοντας την τιμή Ct με εκείνες από μια πρότυπη καμπύλη, η οποία δημιουργείται χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις του DNA-στόχου (Rin, 2011).



Εικόνα 14: Τυπικό διάγραμμα ενίσχυσης: Φθορισμός σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων PCR (Rin, 2011).

Η qPCR βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Είναι ζωτικής σημασίας στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, επιτρέποντας στους ερευνητές να μετρήσουν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

Συνοψίζοντας, η qPCR είναι ένα απαραίτητο εργαλείο, παρέχοντας απaráμιλλη εξειδίκευση, ακρίβεια και προσαρμοστικότητα. Η ικανότητά της να προσφέρει ποσοτική ανάλυση του DNA σε πραγματικό χρόνο έχει εδραιώσει τη θέση της ως βασικής μεθόδου στη σύγχρονη μοριακή έρευνα και διάγνωση.

4.4. Next Generation Sequencing (NGS) - Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) έχει σημαντικές δυνατότητες για τη βελτίωση της διάγνωσης και της κατανόησης του IBS. Η ανάλυση NGS του μικροβιώματος του εντέρου μπορεί να αποκαλύψει συγκεκριμένες μικροβιακές ανισορροπίες που σχετίζονται με το IBS, προσφέροντας πληροφορίες για την προέλευση της πάθησης και πιθανές θεραπευτικές επιλογές. Βοηθά επίσης στην ανακάλυψη γενετικών ευαισθησιών, καθώς η NGS μπορεί να ανιχνεύσει γενετικούς δείκτες που μπορεί να προδιαθέτουν τα άτομα για IBS, επιτρέποντας την καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών επιλογών. Επιπλέον, το NGS βοηθά στην ανακάλυψη βιοδεικτών, βρίσκοντας γονίδια ή μονοπάτια που μεταβάλλονται σε ασθενείς με IBS, τα οποία θα μπορούσαν να είναι κρίσιμα για την ακριβή διάγνωση, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Αυτή η πλήρης ανάλυση γονιδίων και μικροβιώματος μπορεί επίσης να επιτρέψει εξατομικευμένες ιατρικές μεθόδους, με φάρμακα προσαρμοσμένα στα ατομικά γενετικά και μικροβιακά προφίλ για βελτιωμένη θεραπεία. Επιπλέον, το NGS επιτρέπει την έρευνα και τις κλινικές δοκιμές, οι οποίες βοηθούν στην ανακάλυψη των υποκείμενων αιτιών και ενδεχομένως νέων θεραπειών για το IBS. Συνολικά, αν και επί του παρόντος δεν αποτελεί συμβατικό διαγνωστικό εργαλείο για το IBS, η χρήση της NGS υπόσχεται ακριβέστερη διάγνωση, εξατομικευμένες θεραπείες και καλύτερη κατανόηση της πάθησης (Casén et al., 2015).

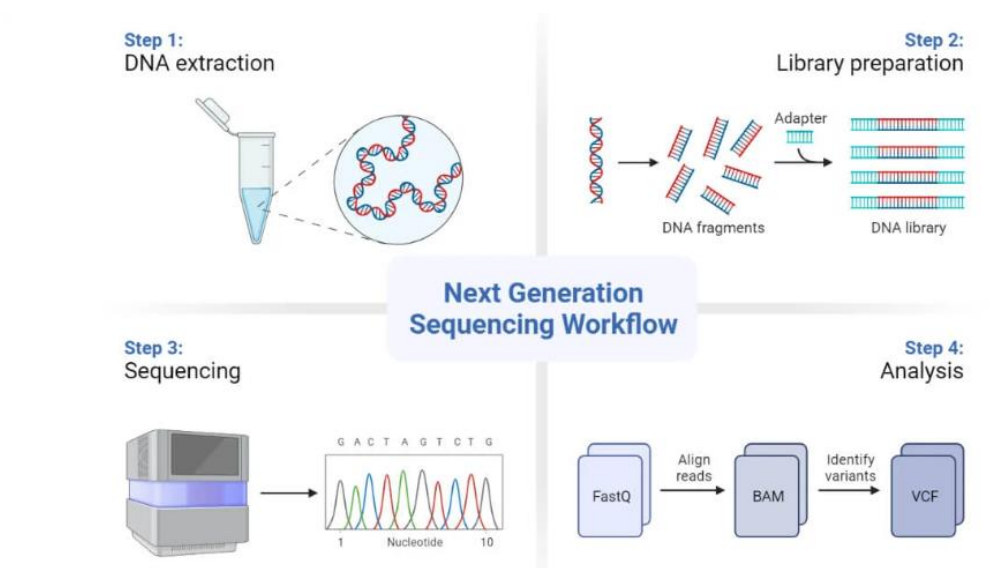
4.4.1. Οι βασικές αρχές του NGS

Η διαδικασία ξεκινά με την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, η οποία περιλαμβάνει τον κατακερματισμό δειγμάτων DNA ή RNA και την προσάρτηση προσαρμογέων σε αυτά, οι οποίοι μπορεί να περιλαμβάνουν μοναδικούς γραμμωτούς κώδικες για την ταυτοποίηση του δείγματος. Ακολουθεί η κλωνική ενίσχυση, η οποία αντιγράφει κάθε θραύσμα DNA πολλές φορές. Ανάλογα με την πλατφόρμα NGS, οι μέθοδοι ενίσχυσης μπορεί να κυμαίνονται από PCR έως bridge amplification (βλ. *Εικόνα 16*) (Aryal, 2022).

Στο στάδιο της αλληλούχισης πραγματοποιείται ο πραγματικός προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Αυτό περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων σε κάθε τμήμα DNA. Σε διάφορες πλατφόρμες NGS χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές μέθοδοι αλληλούχισης, όπως η αλληλούχιση με σύνθεση, η αλληλούχιση με σύνδεση ή η αλληλούχιση με ημιαγωγό ιόντων. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν συχνά νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορισμό για να διευκολύνουν την ανίχνευση κάθε προσθήκης βάσης (Rin, 2011; Aryal, 2022).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της NGS ανάλυσης είναι η δυνατότητα μαζικής παράλληλης επεξεργασίας, που επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων τμημάτων. Αυτός ο παραλληλισμός μειώνει σημαντικά τον χρόνο και το κόστος αλληλούχισης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους αλληλούχισης. Μετά την αλληλούχιση, τα παραγόμενα δεδομένα, απαιτούν εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση. Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει τη συναρμολόγηση αυτών των αναγνώσεων σε μεγαλύτερες αλληλουχίες ή την ευθυγράμμιση τους με ένα γονιδίωμα αναφοράς για διάφορες εφαρμογές όπως η ανίχνευση παραλλαγών (Aryal, 2022).

Η ευελιξία του NGS επιτρέπει τη χρήση του σε ένα ευρύ φάσμα γονιδιωματικών ερευνών, από μικρά έως μεγάλα γονιδιώματα, καθώς και τη στοχευμένη αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος ή μεταγράφηματος (Raza & Ahmad, 2016).



Εικόνα 15: Βασικές αρχές και στάδια του NGS (Aryal, 2022).

4.5. Gene Chip Human Array

Το Gene Chip Human Array, είναι αναπόσπαστο μέρος της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών DNA, και είναι ειδικά σχεδιασμένο για την ολοκληρωμένη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αυτό το εξελιγμένο εργαλείο αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στον τομέα της γενετικής έρευνας και της διάγνωσης, αξιοποιώντας τις αρχές της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών για τη διερεύνηση της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης των γονιδίων στα ανθρώπινα κύτταρα (Jones et al., 2014).

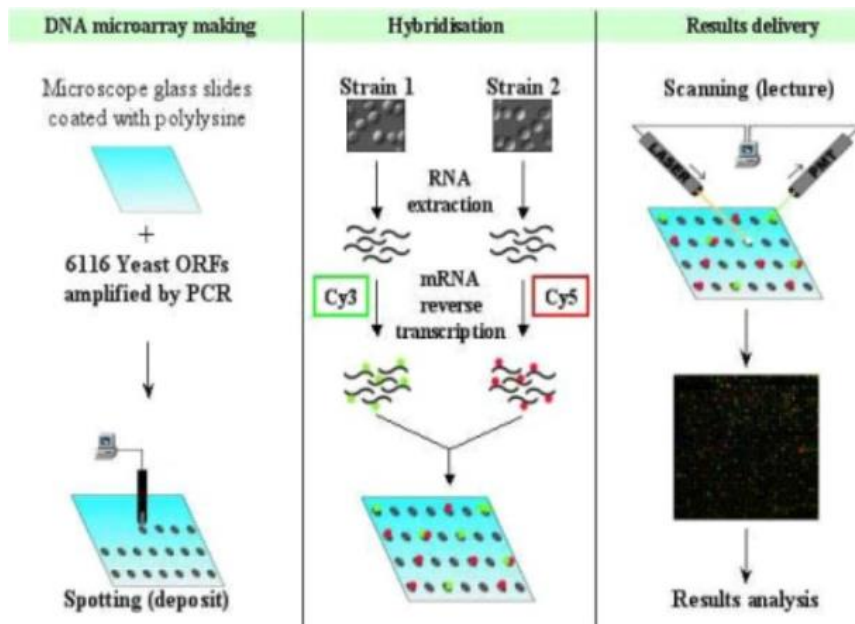
Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην προσκόλληση μικρών τμημάτων DNA, ή ανιχνευτών, σε μια στερεή επιφάνεια, συνήθως πυρίτιο ή γυαλί. Αυτοί οι ανιχνευτές αποτελούνται από μικρές ποσότητες διαφορετικών αλληλουχιών DNA που αντικατοπτρίζουν διαφορετικά ανθρώπινα γονίδια. Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης πολλαπλών γονιδίων ταυτόχρονα είναι ο βασικός σκοπός του Gene Chip Human Array, και αυτό αποτελεί ένα ανεκτίμητο εργαλείο για να υπολογίσει κανείς αν τα γονίδια είναι ενεργά ή ανενεργά σε μια συγκεκριμένη ομάδα κυττάρων - μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για την κατανόηση μιας ποικιλίας βιολογικών καταστάσεων και συνθηκών (Jones et al., 2014).

Η διαδικασία χρήσης ενός Gene Chip Human Array περιλαμβάνει διάφορα βασικά βήματα. Ξεκινά με την εξαγωγή RNA από τα κύτταρα που μελετώνται. Αυτό το RNA

μετατρέπεται στη συνέχεια σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο στη συνέχεια επισημαίνεται με μια φθορίζουσα χρωστική. Το επισημασμένο cDNA εφαρμόζεται στη συνέχεια στο τσιπ, όπου συνδέεται ή υβριδοποιείται με τους συμπληρωματικούς ανιχνευτές DNA που υπάρχουν στο τσιπ. Μετά την υβριδοποίηση, η περίσσεια cDNA ξεπλένεται και το τσιπ σαρώνεται με λέιζερ. Αυτό το λέιζερ ανιχνεύει και μετρά τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται από το δεσμευμένο cDNA. Η ένταση αυτών των σημάτων είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του γονιδίου-στόχου που υπάρχει στο αρχικό δείγμα. Ερμηνεύοντας αυτά τα μοτίβα φθορισμού, οι ερευνητές μπορούν να προσδιορίσουν τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα.

Το Gene Chip Human Array έχει πολλές και σημαντικές χρήσεις. Χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα για την εξέταση γενετικών παραλλαγών, για να μάθουμε περισσότερα για τη λειτουργία των γονιδίων και για να εξετάσουμε τα μοριακά αίτια διαφόρων διαταραχών όπως το IBS. Η συστοιχία βοηθά στον εντοπισμό συγκεκριμένων προφίλ γονιδιακής έκφρασης που συνδέονται με διάφορες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, στην κλινική διάγνωση. Συμβάλλει επίσης σημαντικά στη φαρμακογονιδιοματική, βοηθώντας να διευκρινιστεί πώς οι παραλλαγές στη γενετική σύσταση επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο κάθε άτομο αντιδρά στα φάρμακα (Jones et al., 2014).

Στην έρευνα των M. P. Jones et al., 2014 επιλέχθηκαν 244 άτομα, εκ των οποίων οι 60 είχαν IBS-C, οι 57 είχαν IBS-D και οι 51 ήταν μικτοί, ενώ 76 ήταν υγιείς. Επιλέχθηκαν συνολικά 34 δείκτες με γνώμονα μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του IBS ή με βάση αναλύσεων ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας MicroArray.

4.6. Phylogenetic Microarray Analysis

Η ανάλυση φυλογενετικών μικροσυστοιχιών, που αναφέρεται επίσης ως «προφίλ μικροβιακής κοινότητας», είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την εξέταση της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη μελέτη της πολυπλοκότητας των μικροβιακών πληθυσμών σε δείγματα χωρίς να απαιτείται η καλλιέργεια των εμπλεκόμενων οργανισμών (Tap et al., 2017).

Η εξαγωγή του DNA από το δείγμα είναι το πρώτο βήμα της διαδικασίας. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τη χρήση ενός τσιπ μικροσυστοιχίας, το οποίο αποτελεί βασικό μέρος αυτής της διαδικασίας. Το τσιπ αυτό αποτελείται από διάφορους ανιχνευτές DNA που είναι στερεωμένοι σε μια στερεή επιφάνεια, συνήθως μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Το γονίδιο 16S rRNA είναι ένας καθολικός δείκτης για τα βακτηριακά είδη στις φυλογενετικές αναλύσεις, και αυτοί οι ανιχνευτές είναι προσεκτικά κατασκευασμένοι ώστε να είναι συμπληρωματικοί σε ορισμένα τμήματα του γονιδίου (Tap et al., 2017).

Το τσιπ μικροσυστοιχίας είναι επικαλυμμένο με DNA σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Οι αλυσίδες DNA του δείγματος υβριδοποιούνται με τους αντίστοιχους ανιχνευτές του τσιπ. Μετά τη διαδικασία υβριδισμού, το μη υβριδοποιημένο DNA στο

τσιπ καθαρίζεται και σαρώνεται, συνήθως με σαρωτή λέιζερ. Η ένταση των σημάτων φθορισμού που λαμβάνει ο σαρωτής υποδεικνύει πόση ποσότητα του σχετικού μικροβιακού DNA υπάρχει στο δείγμα. Η ταυτότητα και η σχετική αφθονία των διαφόρων μικροοργανισμών στο δείγμα, καθώς και η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας που υπάρχει, προσδιορίζονται στη συνέχεια με προσεκτική ανάλυση αυτών των δεδομένων. Η φυλογενετική ανάλυση μικροσυστοιχιών έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών. Αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην περιβαλλοντική μικροβιολογία για την ανάλυση εδαφικών, υδάτινων και άλλων περιβαλλοντικών δειγμάτων. Στην έρευνα του ανθρώπινου μικροβιώματος, είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση των ποικίλων μικροβιακών κοινοτήτων στο ανθρώπινο σώμα, ιδίως στο έντερο, για την κατανόηση του ρόλου τους στην υγεία και την ασθένεια. Ένα από τα πολλά πλεονεκτήματα είναι η δυνατότητα υψηλής απόδοσης, η οποία επιτρέπει την εξέταση χιλιάδων μικροοργανισμών ταυτόχρονα. Προσδιορίζει μεγαλύτερη ποικιλία μικροβιακών ειδών, γεγονός που ξεπερνά τα μειονεκτήματα των συμβατικών τεχνικών που βασίζονται σε καλλιέργειες. Προσφέρει επίσης ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη σχετική αφθονία των διαφόρων μικροοργανισμών. Ωστόσο, για την επεξεργασία των δεδομένων απαιτούνται εξειδικευμένα εργαλεία και υψηλού επιπέδου γνώσεις βιοπληροφορικής. Η ευαισθησία της μπορεί να μην είναι πάντα αρκετή για τον εντοπισμό μικροοργανισμών που υπάρχουν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η ακρίβεια και η πληρότητα των βάσεων δεδομένων αναφοράς που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία σχεδιασμού των ανιχνευτών επηρεάζουν την ακρίβεια της ταυτοποίησης των ειδών. Η ανάλυση του μικροβιώματος ενός ασθενούς σε κλινικό περιβάλλον ξεκινά με την απόκτηση σχετικών δειγμάτων. Ανάλογα με το μικροβίωμα που ενδιαφέρει μπορεί να συλλέγονται διαφορετικά είδη δειγμάτων, όπως κόπρανα για την έρευνα του εντερικού μικροβιώματος, στην περίπτωση του IBS. Είναι σημαντικό να γίνεται σωστή συλλογή και να αποθήκευση των δειγμάτων, ιδίως τα δείγματα κοπράνων, τα οποία πρέπει να καταψύχονται αμέσως για την προστασία του μικροβιακού DNA. Η ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών και η συσχέτιση τους με την παθοφυσιολογία του IBS, θα μπορούσε όχι μόνο να συμβάλει στην διάγνωση του IBS, αλλά και στον προσδιορισμό των διαφορετικών τύπων IBS, με αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση (Tap et al., 2017).

4.7. Βασικές αρχές του 16s RNA sequencing

Η αλληλούχιση 16S rRNA είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται στη μοριακή μικροβιολογία για τον εντοπισμό και τη σύγκριση βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα δεδομένο δείγμα (π.χ. δείγμα κοπράνων). Η μέθοδος αυτή επικεντρώνεται στο γονίδιο του ριβοσωμικού RNA (rRNA) 16S, ένα τμήμα του προκαρυωτικού ριβοσώματος. Το γονίδιο 16S rRNA είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων ειδών βακτηρίων, γεγονός που το καθιστά ιδανικό στόχο για μοριακή ταυτοποίηση. Ωστόσο, περιέχει επίσης εννέα υπερμεταβλητές περιοχές που μπορούν να παρέχουν αλληλουχίες “υπογραφής” για συγκεκριμένα είδη, χρήσιμες για την ταυτοποίηση βακτηρίων. Η διαδικασία αρχίζει με την εξαγωγή ολικού DNA από ένα μικροβιακό δείγμα. Στη συνέχεια, τα γονίδια 16S rRNA ενισχύονται επιλεκτικά με τη χρήση PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσδένονται στις συντηρημένες περιοχές που πλαισιώνουν τις υπερμεταβλητές περιοχές. Αυτή η ενίσχυση εξασφαλίζει ότι υπάρχει αρκετό DNA για την αλληλούχιση (Tap et al., 2017).

Μετά την PCR, οι ενισχυμένες αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA υποβάλλονται σε αλληλούχιση. Ιστορικά, χρησιμοποιούνταν η αλληλούχιση κατά Sanger, αλλά οι σύγχρονες τεχνικές χρησιμοποιούν κυρίως τεχνολογίες NGS για τη δυνατότητα υψηλής απόδοσης. Η NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων τμημάτων DNA, συμπεριλαμβανομένου ενός πλήθους αλληλουχιών 16S rRNA από διαφορετικά βακτήρια που υπάρχουν στο δείγμα. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται στη συνέχεια με βάσεις δεδομένων γνωστών αλληλουχιών 16S rRNA για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών. Αυτή η σύγκριση και η ταυτοποίηση διευκολύνεται από εργαλεία βιοπληροφορικής που ευθυγραμμίζουν τις αλληλουχίες του δείγματος με τις αλληλουχίες αναφοράς και εκτελούν φυλογενετική ανάλυση. Η αλληλούχιση του 16S rRNA παρέχει έτσι μια ολοκληρωμένη επισκόπηση της βακτηριακής κοινότητας εντός του δείγματος, συμπεριλαμβανομένης τόσο της ταυτοποίησης όσο και της σχετικής αφθονίας των διαφόρων βακτηριακών ειδών. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της μικροβιακής οικολογίας, της κλινικής διάγνωσης και της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, λόγω της ικανότητάς της να αναλύει γρήγορα και με ακρίβεια πολύπλοκες μικροβιακές κοινότητες (Tana et al., 2010).

4.8. Άλλες τεχνικές για τη Διάγνωση του IBS: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Η ELISA είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη και ευαίσθητη βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών όπως πρωτεΐνες, ορμόνες, πεπτίδια και αντισώματα σε διάφορα βιολογικά δείγματα. Η θεμελιώδης αρχή της ELISA είναι η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος, όπου ένα ένζυμο συνδεδεμένο με ένα αντίσωμα ή αντιγόνο χρησιμεύει ως δείκτης για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Crowther, 2008).

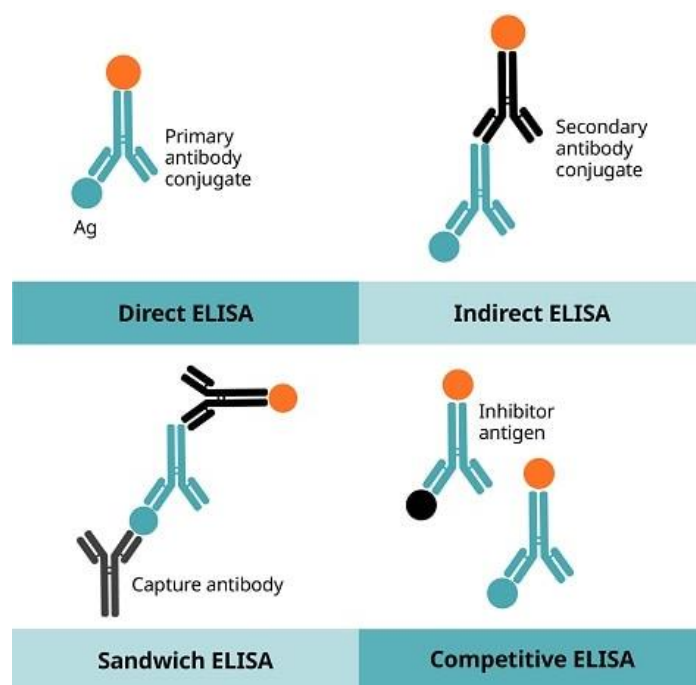
Ανάλογα με τη χημική ουσία που αναλύεται, το πρώτο βήμα σε μια ELISA είναι η επικάλυψη των plate (πηγαδάκια) της μικροπλάκας είτε με ένα αντιγόνο είτε με ένα αντίσωμα. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει το μπλοκάρισμα των κενών θέσεων της πλάκας με πρωτεΐνες όπως η καζεΐνη ή η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) για να σταματήσει η μη ειδική πρόσδεση. Το αντιγόνο-στόχος ή το βιολογικό υλικό που περιέχει αντίσωμα εισάγεται στη συνέχεια στα πηγαδάκια (Crowther, 2008).

Ακολουθεί μια φάση επώασης που επιτρέπει τη σύνδεση του στόχου με το ακινητοποιημένο υλικό στην πλάκα. Μετά την αρχική επώαση, προστίθεται ένα αντίσωμα (που πάνω του υπάρχει συνδεδεμένο ένα ένζυμο), ειδικό για το αντιγόνο ή το αντίσωμα στο δείγμα. Αυτό το αντίσωμα είναι ζωτικής σημασίας, καθώς είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο που δρα σε ένα υπόστρωμα για την παραγωγή ανιχνεύσιμου σήματος. Μια δεύτερη επώαση επιτρέπει στα σημασμένα με ένζυμο αντισώματα να συνδεθούν με τους αντίστοιχους στόχους τους. Στη συνέχεια, η πλάκα πλένεται σχολαστικά για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένων ουσιών.

Η προσθήκη ενός ειδικού ενζυμικού υποστρώματος είναι το τελευταίο βήμα. Η ποσότητα του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα συσχετίζεται άμεσα με την ένταση της χρωματικής αλλαγής που συνήθως προκύπτει από την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Ένα φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση αυτής της αλλαγής χρώματος, αποδίδοντας ποσοτικά ευρήματα.

Η ELISA μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε διάφορους τύπους, καθένας από τους οποίους εξυπηρετεί διαφορετικούς σκοπούς. Η direct ELISA ανιχνεύει αντιγόνα χρησιμοποιώντας πρωτογενή αντισώματα συνδεδεμένα με ένζυμο, ενώ η indirect ELISA χρησιμοποιεί δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο, προσφέροντας αυξημένη ευαισθησία. Η σάντουιτς ELISA, γνωστή για την ειδικότητα και την

ευαισθησία της, συλλαμβάνει το αντιγόνο μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων. Η ανταγωνιστική ELISA περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό μεταξύ του αντιγόνου του δείγματος και ενός άλλου αντιγόνου για τη δέσμευση του αντισώματος (Crowther, 2008).



Εικόνα 17: Διαφορετικοί τύποι ELISA (Crowther, 2008).

Οι εφαρμογές της ELISA είναι πολυάριθμες και περιλαμβάνουν την έρευνα των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και την ανίχνευση βιοδεικτών, τον εντοπισμό αλλεργιογόνων στον τομέα των τροφίμων και τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών και παθογόνων μικροοργανισμών στην ιατρική. Αποτελεί ανεκτίμητο εργαλείο σε πολλά περιβάλλοντα βιολογικής και ιατρικής έρευνας λόγω της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της απλότητας και της ευελιξίας της.

4.8. Εφαρμογή των Μοριακών Μεθόδων στην Διάγνωση

Οι μοριακές μέθοδοι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διάγνωση διαφόρων παθοφυσιολογικών καταστάσεων, μεταβάλλοντας ριζικά την προσέγγισή μας για την ανίχνευση και την κατανόηση των ασθενειών. Στον καρκίνο, η μοριακή διάγνωση μπορεί να εντοπίσει συγκεκριμένες μεταλλάξεις που οδηγούν στην ανάπτυξη του

όγκου, επιτρέποντας τη στοχευμένη θεραπεία προσαρμοσμένη στο γενετικό προφίλ του ατόμου, όπως για παράδειγμα στο καρκίνο του μαστού (EGFR και HER2) (Friedlaender et al., 2021). Στις μολυσματικές ασθένειες, οι μέθοδοι αυτές προσδιορίζουν ταχέως τους αιτιολογικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων, όπως στην περίπτωση του COVID-19, και την ανίχνευση του γενετικού υλικού του μέσο PCR (Islam & Iqbal, 2020). Για τις γενετικές διαταραχές, η μοριακή διάγνωση διευκολύνει την ανίχνευση κληρονομικών παθήσεων, όπως η κυστική ίνωση ή η δρεπανοκυτταρική αναιμία, μέσω του εντοπισμού γενετικών μεταλλάξεων. Επιπλέον, σε χρόνιες ασθένειες όπως ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να αποκαλύψουν γενετικές προδιαθέσεις και βιοδείκτες που προβλέπουν τον κίνδυνο και την εξέλιξη της νόσου.

Στον τομέα της γαστρεντερικής υγείας, η μοριακή διάγνωση έχει προωθήσει σημαντικά την ανίχνευση και τη διαχείριση διαφόρων παθήσεων, καταδεικνύοντας τον βαθύ αντίκτυπο αυτών των τεχνολογιών. Για παράδειγμα, στην κοιλιοκάκη -μια αυτοάνοση διαταραχή που πυροδοτείται από τη γλουτένη σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα- η τυποποίηση HLA (Human Leukocyte Antigen), ιδίως ο προσδιορισμός του γονότυπου HLA-DQ2 και HLA-DQ8 μέσω μεθόδων που βασίζονται στην PCR, έχει γίνει συνήθης πρακτική. Η προσέγγιση αυτή όχι μόνο προσδιορίζει τα άτομα που διατρέχουν κίνδυνο, αλλά βοηθά επίσης στη διαφοροποίηση της κοιλιοκάκης από άλλες γαστρεντερικές διαταραχές, παρέχοντας μια γενετική βάση για την ευαισθησία (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021). Ομοίως, το τοπίο του ελέγχου και της παρακολούθησης του καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC) έχει μεταμορφωθεί από τη μοριακή διάγνωση. Τεχνικές όπως η qPCR και η NGS χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων, αλλαγών γονιδιακής έκφρασης και μοτίβων μεθυλίωσης του DNA σε όγκους του παχέος εντέρου, με βιοδείκτες όπως οι μεταλλάξεις των γονιδίων *KRAS*, *NRAS* και *BRAF* να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης σε στοχευμένες θεραπείες και στον καθορισμό της πρόγνωσης (Biller & Schrag, 2021). Επιπλέον, στην ταυτοποίηση των παθογόνων παραγόντων που ευθύνονται για τις γαστρεντερικές λοιμώξεις, οι τεχνολογίες PCR σε πραγματικό χρόνο και μικροσυστοιχιών παρέχουν ταχεία, ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση βακτηρίων, ιών και παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων των *Helicobacter pylori*, *Norovirus* και *Clostridioides difficile*. Αυτά τα μοριακά διαγνωστικά επιτρέπουν την έγκαιρη και ακριβή ταυτοποίηση των αιτιολογικών παραγόντων, διευκολύνοντας τις κατάλληλες θεραπευτικές αποφάσεις,

τη διαχείριση των κρουσμάτων και τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων, υπογραμμίζοντας τον απαραίτητο ρόλο των μοριακών διαγνωστικών στη σύγχρονη διαχείριση των γαστρεντερικών ασθενειών.

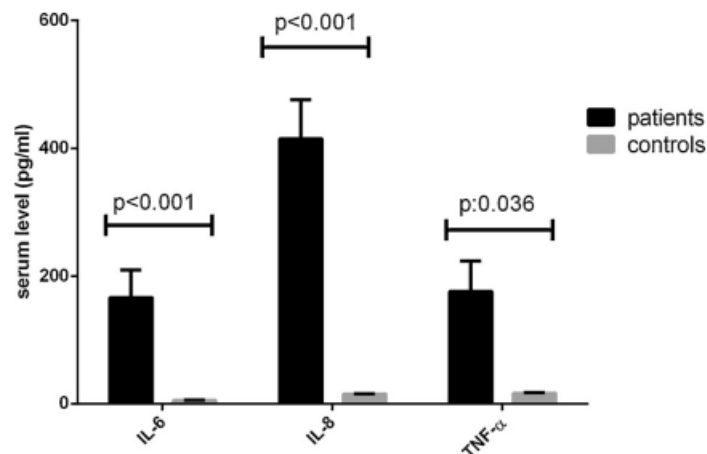
Η μοριακή διαγνωστική, με τη μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητά της, χρησιμοποιεί διάφορες προσεγγίσεις για να βελτιώσει την ιατρική διάγνωση. Η PCR αποτελεί βασικό εργαλείο για την ανίχνευση παθογόνου DNA ή RNA, καθώς και για την ταυτοποίηση μολυσματικών παραγόντων όπως βακτήρια και ιοί. Η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) και η PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ενισχύουν αυτή τη χρησιμότητα με τον ποσοτικό προσδιορισμό του φορτίου παθογόνων και των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης. Η αλληλούχιση του DNA, η οποία καθορίζει την ακριβή σειρά των νουκλεοτιδίων, είναι κρίσιμη για την ανακάλυψη γενετικών αλλαγών που συνδέονται με ασθένειες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως το IBS. Με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών, μπορούν να αναλυθούν χιλιάδες γονίδια ταυτόχρονα, που είναι ανεκτίμητα για την κατανόηση των διαδικασιών της νόσου και της φαρμακογονιδιοματικής. Τέλος, η NGS επιτρέπει ολοκληρωμένες γονιδιοματικές έρευνες, συμπεριλαμβανομένης της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος και στοχευμένων γονιδίων, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με ασθένειες. Συλλογικά, αυτές οι μοριακές προσεγγίσεις παρέχουν βελτιωμένη διαγνωστική ακρίβεια, ταχύτερα ευρήματα και τη δυνατότητα προσαρμογής των σχεδίων θεραπείας, ιδίως στις μολυσματικές ασθένειες, τη γενετική, την ογκολογία και την εξατομικευμένη ιατρική.

5. Εφαρμογές των μοριακών μεθόδων στην Κλινική Πρακτική: Μελέτες στην παθοφυσιολογία του IBS.

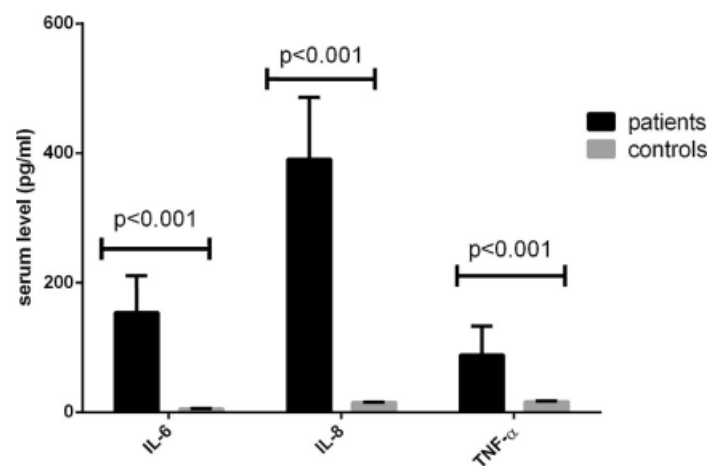
Καθώς το IBS χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα σε πολλές πτυχές του, επικυρωμένες μοριακές μέθοδοι θα αποτελέσουν βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ειδικών, ακριβών και αποτελεσματικών διαγνωστικών τεστ, με σκοπό την διάγνωση του IBS. Παρακάτω παρατίθενται αποτελέσματα πειραματικών μελετών που στόχο έχουν να διακρίνουν μοριακές και γενετικές διαφορές στους ασθενείς με IBS σε σχέση με του υγιείς.

5.1. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνικών βιοδεικτών ασθενών με IBS

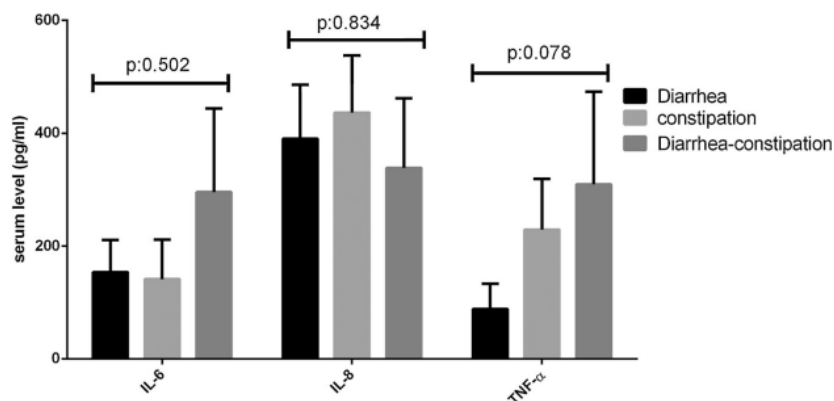
Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αιματολογικών βιοδεικτών η IL-6, η IL-8 και ο TNF-α παρουσιάζουν διαφορές στις συγκεντρώσεις τους σε ασθενείς με IBS σε σύγκριση με τους υγιείς. Η μελέτη των Seyedmirzaee et al. (2016), συμπεριέλαβε 74 ασθενείς με IBS (διαγνωσμένοι με τα κριτήρια της Ρώμης III) και 75 αντίστοιχους υγιείς. Οι ασθενείς με IBS κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω σε IBS-D: 34, IBS-C: 29, και IBS-M: 11. Τα ευρήματα αποκάλυψαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα IL-6, IL-8 και TNF-α στον ορό των ασθενών με IBS σε σχέση με τους μάρτυρες ($P < 0,001$), χωρίς σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα των κυτταροκινών μεταξύ των διαφόρων υποτύπων IBS. Συγκεκριμένα κατά την μεθοδολογία, από κάθε ασθενή (subject), συλλέχθηκαν 5 ml αίματος σε απλά σωληνάρια. Με φυγοκέντρηση ο ορός διαχωρίστηκε και αποθηκευτικέ στους -80°C μέχρι την στιγμή της ανάλυσης. Τα επίπεδα των IL-6, IL-8 και TNF-α μετρήθηκαν με ELISA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του ELISA kit. Το εύρος της ανάλυσης των ELISA kit ήταν 7,8-500 pg/ml για τον TNF-α και την IL-8 και 4,69-300 pg/ml για τη μέτρηση της IL-6 στα δείγματα ορού (βλ. *Εικόνες 19-20-21 για τα bar charts των αποτελεσμάτων*).



Εικόνα 18: Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων ορού των IL-6, IL-8 και TNF-α σε ασθενείς με IBS και υγιείς μάρτυρες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές που μετρήθηκαν με ανεξάρτητο t-test και τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SD (Seyedmirzaee et al., 2016).



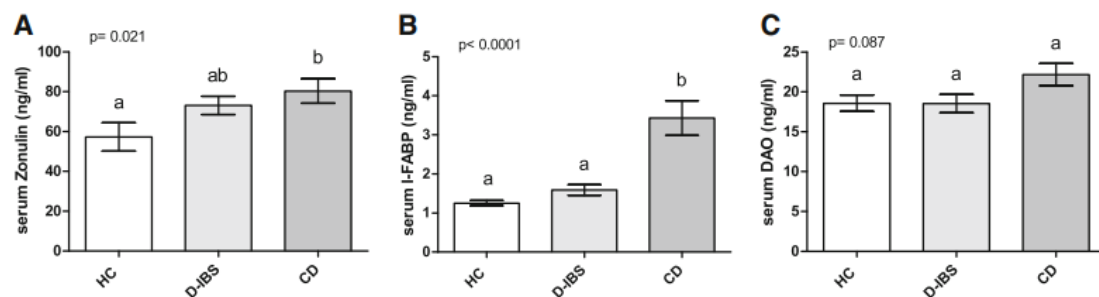
Εικόνα 19: Σύγκριση μεταξύ των επιπέδων ορού των IL-6, IL-8 και TNF- σε ασθενείς με IBS-D και υγιείς μάρτυρες. Στατιστικά σημαντικές διαφορές που μετρήθηκαν με το ανεξάρτητο t-test και οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SD (Seyedmirzaee et al., 2016).



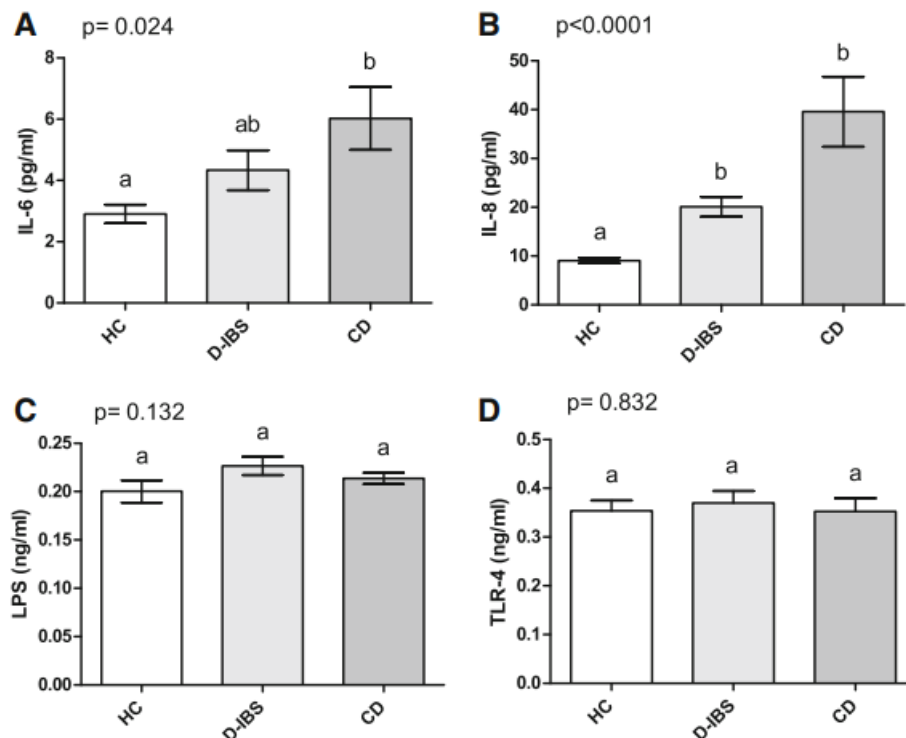
Εικόνα 20: Σύγκριση των IL-6, IL-8 και TNF- μεταξύ των υποτύπων IBS. Στατιστικά σημαντικές διαφορές που μετρήθηκαν με μονόδρομο ANOVA και οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SD (Seyedmirzaee et al., 2016).

Ακόμα, η μελέτη των Linsalata et al. (2018) είχε ως στόχο να διερευνήσει το προφίλ των συμπτωμάτων και τα επίπεδα συγκεκριμένων βιοδεικτών στα ούρα και στην κυκλοφορία που σχετίζονται με τη λειτουργία του γαστρεντερικού φραγμού, συμπεριλαμβανομένων των, I-FABP και DAO, καθώς και των προφλεγμονωδών ιντερλευκινών (IL-6 και IL-8), του LPS και του TLR-4 σε ασθενείς με IBS-D. Αυτά συγκρίθηκαν και μεταξύ ασθενών με CD και υγιείς μάρτυρες, εστιάζοντας στις μεταβολές της διαπερατότητας του λεπτού εντέρου (s-IP) και αξιολογώντας τις διαφορές μεταξύ ασθενών με IBS-D με και χωρίς αυξημένη s-IP. Κατά την μεθοδολογία, αρχικά έγινε συλλογή δειγμάτων περιφερικού φλεβικού αίματος από τους συμμετέχοντες που βρισκόντουσαν σε νηστεία, και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Οι βασικοί βιοδείκτες, συμπεριλαμβανομένων των IgA anti-EMA, anti-tTG, I-FABP, DAO και ζονουλίνη, μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορα kit ELISA και τεχνικές ανοσοφθορισμού (για επικύρωση της ELISA), με αυστηρούς ελέγχους για την ακρίβεια. Επιπλέον, τα επίπεδα IL-6, IL-8, LPS και TLR-4 στο πλάσμα ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση ELISA kit για τη διερεύνηση της φλεγμονής και της λειτουργίας του γαστρεντερικού φραγμού. Κατά τη σύγκριση των ασθενών με D-IBS με την CD και τους υγιείς μάρτυρες, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αναλογία λακτουλόζης/μαννιτόλης (La/Ma), σακχαρόζης στα ούρα (Su) και των επιπέδων της I-FABP μεταξύ των ασθενών με D-IBS και της CD, αλλά όχι με την HC (Healthy Controls) (**βλ. Εικόνα 21**). Ενώ τα επίπεδα της IL-6 ήταν σημαντικά υψηλότερα στην CD σε σύγκριση με την HC, τα επίπεδα της IL-8 ήταν αυξημένα τόσο στους ασθενείς με D-IBS όσο και στην CD σε

σχέση με την HC. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις του TLR-4 δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Οι ασθενείς με D-IBS με τροποποιημένη διαπερατότητα του λεπτού εντέρου (D-IBS+) παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα La, Su, I-FABP και DAO σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν (D-IBS-). Επιπλέον, οι δείκτες φλεγμονής και οι δείκτες βακτηριακής μετατόπισης, συγκεκριμένα η IL-6 και ο LPS, ήταν σημαντικά αυξημένοι στους ασθενείς με D-IBS(+) σε σύγκριση με τους ασθενείς με D-IBS(-) (βλ. **Εικόνα 22**).



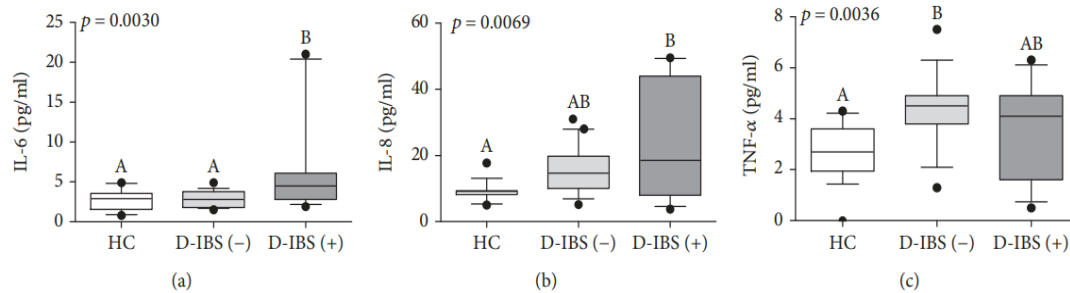
Εικόνα 21: Επίπεδα Zonulin, I-FABP και DAO στον ορό σε ασθενείς με D-IBS και CD και οι υγιείς (HC). Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM και αναλύονται με τη μέθοδο Kruskal-Wallis. με το τεστ πολλαπλής σύγκρισης του Dunn. Οι μεσοί ορι με τον ίδιο δείκτη δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. ($p < 0,05$, δοκιμή Dunn) (Linsalata et al., 2018).



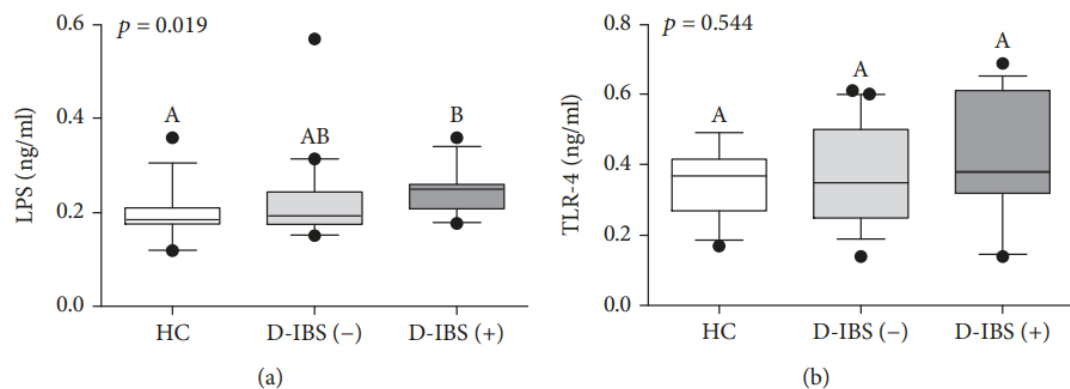
Εικόνα 22: Συγκεντρώσεις IL-6, IL-8, LPS και TLR-4 στο πλάσμα. Α) IL-6, Β) IL-8, Γ) LPS = Lipopolysaccharide Δ) TLR-4. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM και αναλύονται με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis με τη δοκιμασία πολλαπλών συγκρίσεων Dunn. Οι μέσοι όροι που μοιράζονται το ίδιο δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0,05$, δοκιμή Dunn) (Linsalata et al., 2018).

Μία ακόμη, μελέτη που έρχεται και σε συμφωνία με την μελέτη των Linsalata et al., 2018 είναι αυτή των Russo et al., 2018 που διερεύνησε τη σχέση μεταξύ της διαπερατότητας του λεπτού εντέρου (s-IP) και των προφίλ συμπτωμάτων, των κυκλοφορούντων αντιποκινών και των γενετικών παραλλαγών σε ασθενείς με διάρροια που κυριαρχεί στο IBS-D. Οι ασθενείς με IBS-D με φυσιολογική s-IP παρουσίασαν πιο σοβαρά γαστρεντερικά συμπτώματα από εκείνους με τροποποιημένη s-IP, ενώ βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και των δεικτών ανοσολογικής ενεργοποίησης και φλεγμονής. Αυξημένα επίπεδα λιποκινών, IL-6, λεπτίνης και BDNF και μειωμένα επίπεδα νευροτενσίνης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με IBS-D με τροποποιημένη s-IP σε σύγκριση με τους μάρτυρες, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή ενός διαταραγμένου εντερικού φραγμού και εκκρίσεων σπλαχνικού λιπώδους ιστού στην παθογένεια του IBS-D. Οι αναλυτικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με δείγματα περιφερικού φλεβικού αίματος που συλλέχθηκαν από συμμετέχοντες που βρίσκονταν σε κατάσταση νηστείας. Μετά από μια περίοδο πήξης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το DNA εξήχθη από δείγμα

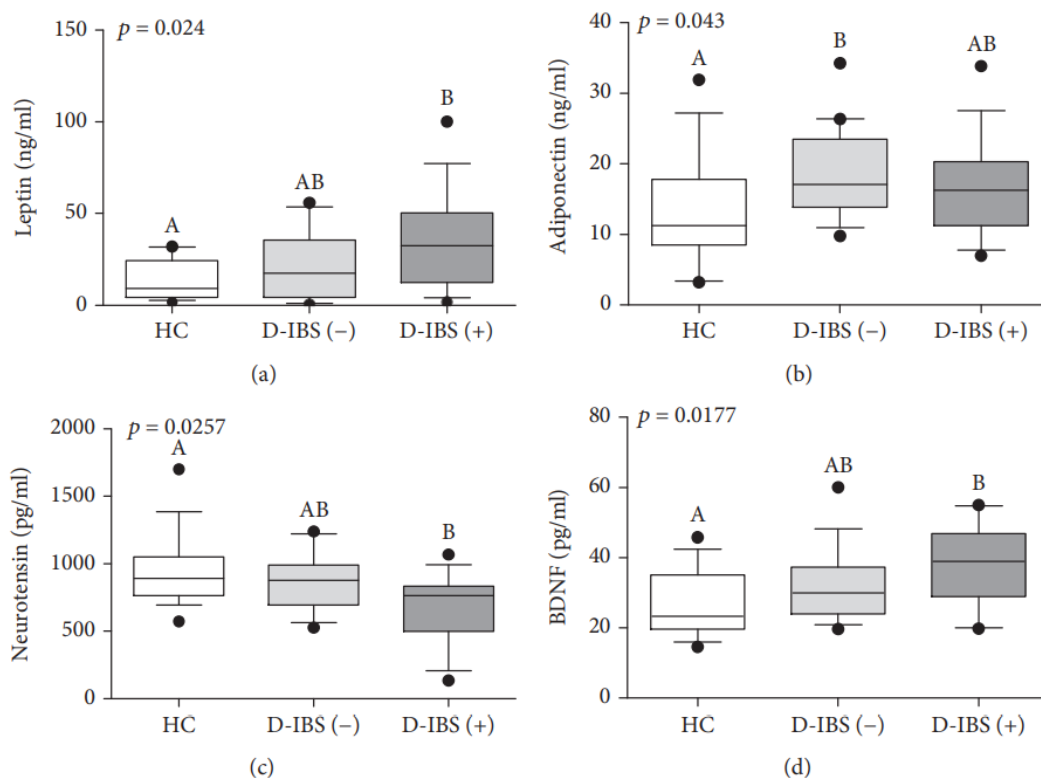
ολικού αίματος. Τα επίπεδα ορού και πλάσματος της λεπτίνης, της αδιπονεκτίνης, της νευροτενσίνης, του BDNF, της IL-6, της IL-8, του TNF- α , του LPS, και ο υποδοχέας TLR-4 ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικών ELISA kit, εξασφαλίζοντας ακρίβεια στη μέτρηση αυτών των κρίσιμων δεικτών που σχετίζονται με την εστίαση της μελέτης στην εντερική διαπερατότητα και τη φλεγμονή (βλ. **Εικόνα 23-24-25**).



Εικόνα 23: Τα επίπεδα IL-6, IL-8 και TNF- α στο πλάσμα σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε ασθενείς με IBS-D, κατηγοριοποιημένους σε ως έχοντες φυσιολογική ή αυξημένη s-IP (+ ή -). Τα δεδομένα αναφέρονται ως πλαίσιο που αντιπροσωπεύουν το 10-90 εκατοστημόριο. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν το τεστ Kruskal-Wallis και το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων του Dunn (Russo et al., 2018).



Εικόνα 24: Τα επίπεδα του LPS και του TLR-4 στο πλάσμα σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε ασθενείς με IBS-D, κατηγοριοποιημένους ως με φυσιολογικό ή αυξημένο s-IP. Τα δεδομένα αναφέρονται ως πλαίσιο που αντιπροσωπεύουν το 10-90 εκατοστημόριο. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν το τεστ Kruskal-Wallis και το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων του Dunn (Russo et al., 2018).



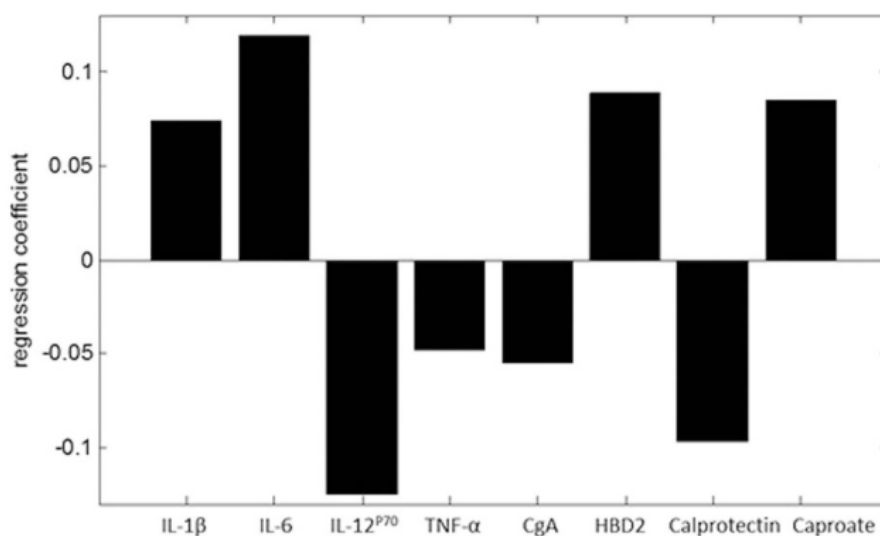
Εικόνα 25: Δείκτες ασθένειας. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της λεπτίνης, της αδιπονεκτίνης, του BDNF και της νευροτενσίνης σε υγιείς μάρτυρες (HC) και σε άτομα με IBS-D που κατηγοριοποιήθηκαν ως έχοντες φυσιολογική ή αυξημένη s-IP. Τα δεδομένα αναφέρονται ως πλαίσιο που αντιπροσωπεύουν το 10-90 εκατοστημόριο. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν το τεστ Kruskal-Wallis και το τεστ πολλαπλών συγκρίσεων του Dunn (Russo et al., 2018).

Τέλος, η μελέτη των Mujagic et al. (2016), εντόπισε με επιτυχία, βιοδείκτες για το IBS, συγκεκριμένα μια ομάδα 8 βιοδεικτών ικανών να διακρίνουν τους ασθενείς με IBS από τους υγιείς με υψηλή ευαισθησία (88,1%) και ειδικότητα (86,5%) (βλ. **Εικόνα 26-27**). Οι βιοδείκτες έδειξαν παρόμοια αποτελεσματικότητα σε διάφορους υποτύπους του IBS και κατέδειξαν συσχέτιση με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων του γαστρεντερικού τόσο σε ασθενείς με IBS όσο και σε μια ομάδα γενικού πληθυσμού, υποδεικνύοντας τις δυνατότητές του για τη διάγνωση του IBS και την αξιολόγηση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων.

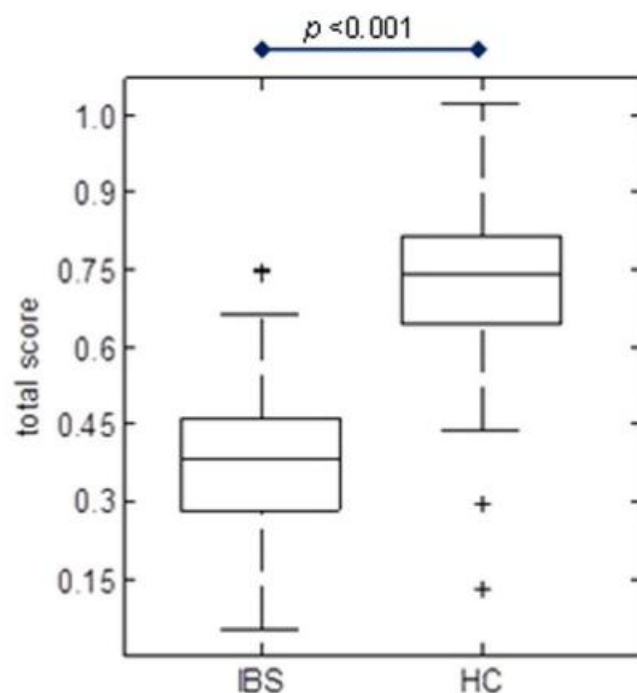
Μια εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα οδήγησε στην επιλογή σαράντα τριών δυνητικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την υγεία του εντέρου, εκ των οποίων δεκαπέντε επιλέχθηκαν με βάση τη συνάφεια τους με τους τομείς της υγείας του εντέρου, τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με IBS και τη δυνατότητα μέτρησης σε δείγματα αίματος ή κοπράνων. Οι επιλεγμένοι δείκτες

περιλάμβαναν κιτρουλίνη πλάσματος για τη λειτουργία των εντεροκυττάρων -μη διεγερμένες κυτταροκίνες πλάσματος (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α) για τη συστηματική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος - καλπροτεκτίνη για την εντερική φλεγμονή- ανθρώπινη β-δεφενσίνη 2 (HBD2) για την άμυνα του ξενιστή έναντι των μικροβίων, SCFAs για τη μεταβολική δραστηριότητα του εντέρου - και χρωμογρανίνη Α (CgA) κοπράνων, ως δείκτης της δραστηριότητας των νευροενδοκρινικών κυττάρων του εντέρου, αναδεικνύοντας μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την κατανόηση της υγείας και της δυσλειτουργίας του εντέρου στο IBS.

Κατά την πειραματική διαδικασία, τα δείγματα κοπράνων και αίματος συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την στιγμή της ανάλυσης. Το φλεβικό αίμα επεξεργάστηκε για να ληφθούν υπερκείμενα πλάσματος και τα δείγματα κοπράνων απομονώθηκαν εντός 24 ωρών από τη συλλογή. Τα επίπεδα της καλπροτεκτίνης και της ανθρώπινης β-δεφενσίνης 2 (HBD2) μετρήθηκαν με τη χρήση ELISA kit, ενώ η χρωμογρανίνη Α (CgA) εκτιμήθηκε μέσω ραδιοανοσολογικής ανάλυσης (RIA). Τα SCFAs στα κόπρανα ποσοτικοποιήθηκαν με GC-MS και οι συγκεντρώσεις κιτρουλίνης στο πλάσμα προσδιορίστηκαν με HPLC με ανίχνευση φθορισμού. Οι κυτταροκίνες του πλάσματος (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 και TNF-α) αναλύθηκαν επίσης με τη χρήση ELISA.



Εικόνα 26: Το τελικό πάνελ βιοδεικτών 8 διαφορετικών στοιχείων. Το μήκος της ράβδου, δηλαδή θετική ή αρνητική παλινδρόμηση επίπεδο συντελεστή, υποδεικνύει τη σχετική σημασία του συγκεκριμένου δείκτη στο πλαίσιο του πίνακα. Θετικοί δείκτες είναι μειωμένοι στους ασθενείς με IBS σε σύγκριση με τους (Healthy Controls) HC, και το αντίστροφο για τους αρνητικούς δείκτες (Mujagic Z et al., 2016).



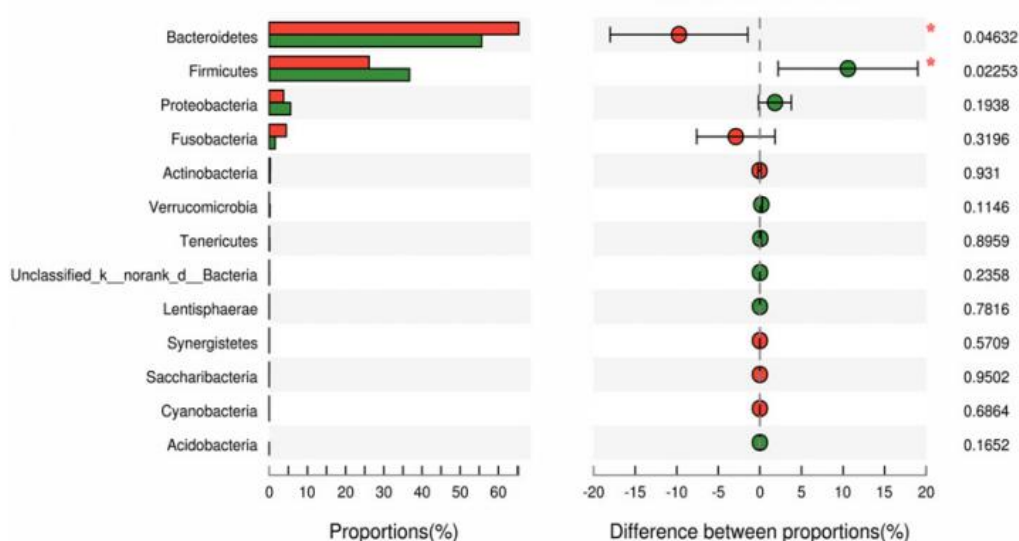
Εικόνα 27: Box plot που αναπαριστά τη συνολική βαθμολογία που λαμβάνεται για το πάνελ βιοδεικτών για το IBS και το ομάδα HC. Η συνολική βαθμολογία προέκυψε από τον πολλαπλασιασμό της πραγματικής συγκέντρωσης των μετρούμενων βιοδεικτών με τον συντελεστή παλινδρόμησης ανά δείκτη. Αντιπροσωπεύει την πιθανότητα να είναι κάποιος IBS ή HC (Mujagic et al., 2016).

5.2. Μεθοδολογίες ανίχνευσης διαφορών στο μικροβίωμα ασθενών με IBS

Έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για τη μελέτη του μικροβιώματος, συμπεριλαμβανομένων την qPCR, την τεχνολογία μικροσυστοιχιών, καθώς και υψηλής απόδοσης τεχνολογίες αλληλούχισης, Phylogenic MicroArray Analysis κ.α. Ειδικότερα, η ταυτοποίηση του 16S rRNA και η αλληλούχιση είναι δύο ισχυρές μέθοδοι για τη διερεύνηση της ποικιλομορφίας του γονιδιώματος και των διαφορικών γονιδιακών έκφρασης των μικροβιακών κοινοτήτων στα ανθρώπινα έντερα και στις στοματικές κοιλότητες. Αυτές οι τεχνολογίες δεν επιτάχυναν μόνο τις μετατρανσκριπτομικές μελέτες του μικροβιώματος, αλλά μαζί με σύνολα μεταγονιδιωματικών δεδομένων, παρέχουν επίσης μια μεγάλη ευκαιρία για τη διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας των μικροβιακών κοινοτήτων. Επιπλέον, οι μέθοδοι αυτές είναι ανεξάρτητες από καλλιέργειες, επιτρέποντας περαιτέρω μελέτες και την ταυτοποίηση μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών στο μικροβίωμα.

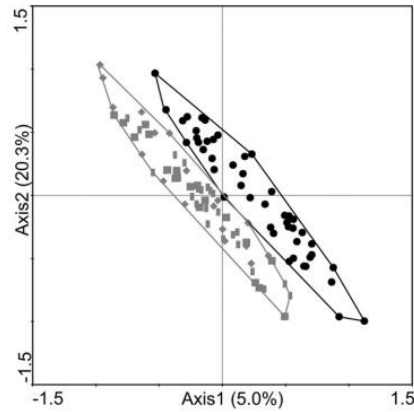
5.2.1.Μοριακή ανάλυση του μικροβιώματος σε δείγματα κοπράνων ασθενών με IBS και διαφορές σε σύγκριση με υγιείς

Στην μελέτη των Zhuang et al. (2018), διερευνήθηκε η διαφορά στο εντερικό μικροβίωμα μεταξύ ασθενών με IBS-D και υγιών ατόμων. Κατά την μεθοδολογία τα δείγματα κοπράνων καταψύχθηκαν στους -80°C και το βακτηριακό γονιδιωματικό DNA εξήχθη από 250 mg κοπράνων χρησιμοποιώντας ένα Fecal DNA Isolation Kit. Η ενίσχυση με PCR στόχευε τις περιοχές 338-806 του γονιδίου 16S rRNA, με δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες συνθήκες και συστατικά για να διασφαλιστεί η ακριβής ενίσχυση. Μετά την PCR, τα προϊόντα απεικονίστηκαν σε πηκτές αγαρόζης 2%, καθαρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν για την κατασκευή βιβλιοθήκης. Επιπρόσθετα, έγινε 16s RNA sequencing στις βιβλιοθήκες παρέχοντας λεπτομερή εικόνα της μικροβιακής σύνθεσης των κοπράνων. Η μελέτη αποκάλυψε ότι το μικροβίωμα των κοπράνων ήταν μειωμένο σε ασθενείς με IBS-D, με σημαντικές αλλαγές στη μικροβιακή σύνθεση, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης των *Firmicutes* και της αύξησης των *Bacteroidetes*. Αυτές οι μεταβολές, ιδίως σε βακτήρια που προκαλούν ζύμωση, όπως τα *Bacteroidales* και τα *Clostridiales*, ενδέχεται να συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία του IBS-D. Θεραπεία με ριφαξιμίνη έδειξε αποτελεσματικότητα στην εξάλειψη της υπερανάπτυξης των βακτηρίων του λεπτού εντέρου (SIBO) και στη βελτίωση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων για έως και 10 εβδομάδες, επηρεάζοντας συγκεκριμένα ορισμένους τύπους βακτηρίων χωρίς να μεταβάλλει ευρέως τη σύνθεση του μικροβιόκοσμου (βλ. **Εικόνα 29**).

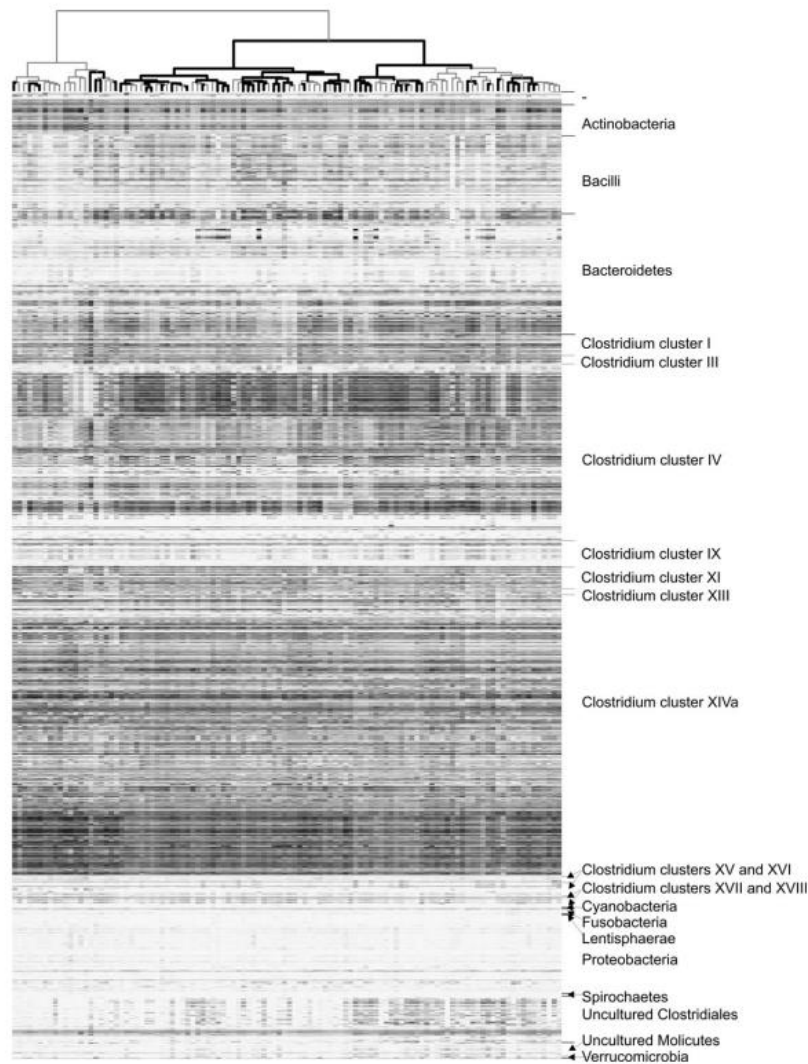


Εικόνα 28: Ταξινομικές διαφορές του μικροβιώματος των κοπράνων μεταξύ ασθενών με IBS-D και HC. Σύγκριση της σχετικής αφθονίας σε επίπεδο φυλών μεταξύ IBS-D ασθενών και HCs (Zhuang et al., 2018).

Η ερευνητική ομάδα των Stojanović et al. (2011), καθόρισε μικροβιακούς πληθυσμούς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των ασθενών με IBS από αυτόν των υγιών ατόμων (βλ. **Εικόνα 30**). Η σύνθεση του μικροβιόκοσμου αξιολογήθηκε μοριακή ανάλυση δειγμάτων κοπράνων από 62 ασθενείς με IBS και 46 υγιή άτομα. Χρησιμοποίησαν μία ολοκληρωμένη και ιδιαίτερα αναπαραγωγίμη φυλογενετική μικροσυστοιχία σε συνδυασμό με qPCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μικροβίωμα των ασθενών με IBS παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από αυτόν των υγιών ατόμων ελέγχου, ιδίως μία διπλάσια αναλογία *Firmicutes* προς *Bacteroidetes*. Η διαφορά αυτή χαρακτηρίζεται από 1,5πλάσια αύξηση των *Dorea*, *Ruminococcus* και *Clostridium spp.* σε συνδυασμό με διπλάσια μείωση των *Bacteroidetes* και κατά 1,5 φορές μείωση των *Bifidobacterium* και *Faecalibacterium spp.* Επιπλέον, όταν υπάρχουν μεθανογόνα σε ασθενείς με IBS, ο αριθμός τους είναι, κατά μέσο όρο, τέσσερις φορές χαμηλότερος σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ της μικροβιακής σύνθεσης και της βαθμολογίας σοβαρότητας των συμπτωμάτων του IBS αναδεικνύει τον πιθανό ρόλο συγκεκριμένων ομάδων *Firmicutes* και *Proteobacteria* στην παθογένεια του IBS, υπογραμμίζοντας την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ του εντερικού μικροβιώματος και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων του IBS. Κατά την μεθοδολογία αναλυτικότερα, το DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το DNA Purification Kit. Οι αναλύσεις της qPCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικού μηχανήματος qPCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τα Archaea και το γένος *Methanobrevibacter*, με γνώμονα το γονιδίο 16S rRNA του στελέχους *Methanobrevibacter smithii*. Το πρωτόκολλο qPCR περιελάμβανε αρχική μετουσίωση ακολουθούμενη από 40 κύκλους πολλαπλασιασμού συγκεκριμένης θερμοκρασίας. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν φυλογενετικές αναλύσεις μικροσυστοιχιών με τη μέθοδο HITChip, η οποία περιλάμβανε την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA, την ενσωμάτωση αλληλουχιών υποκινητή T7, τη μεταγραφή RNA με τροποποιημένα νουκλεοτίδια και την υβριδοποίηση επισημασμένου RNA σε ειδικά κατασκευασμένες μικροσυστοιχίες. Αυτές οι μικροσυστοιχίες, που περιείχαν ανιχνευτές για πολυάριθμες φυλογενετικές ομάδες, υποβλήθηκαν σε υβριδισμό, σάρωση και εξαγωγή δεδομένων, ενώ η κανονικοποίηση και η ανάλυση των δεδομένων εκτελέστηκαν μέσω σεναρίων που βασίζονται στην R σε συνδυασμό με ένα σύστημα διαχείρισης βάσεων δεδομένων.



Εικόνα 29: Διάγραμμα ανάλυσης της σύνθεσης του μικροβιόκοσμου των 108 αναλυθέντων δειγμάτων κοπράνων ως συνάρτηση της κατάστασης υγείας των ατόμων (υγιείς έναντι IBS). Τα δείγματα των υγιών ελέγχων παρουσιάζονται ως μαύροι κύκλοι, ενώ οι ασθενείς με IBS παρουσιάζονται ως γκριζα ορθογώνια (IBS-A, IBS-C, και IBS-D) (Stojanović et al., 2011).



Εικόνα 30: Ομαδοποίηση των φυλογενετικών προφίλ HITChip των 108 δειγμάτων κοπράνων. Τα προφίλ των ασθενών με IBS και των υγιών ατόμων ελέγχου υποδεικνύονται με γκριζα και μαύρα κλαδιά, αντίστοιχα. Το υψηλότερο φυλογενετικό επίπεδο εξειδίκευσης των ανιχνευτών απεικονίζεται στο δεξιό τμήμα του σχήματος (Stojanović et al., 2011).

Ακόμα στην μελέτη των Malinen et al. (2005), συγκρίθηκε το μικροβίωμα 27 ασθενών με IBS, διαγνωσμένα σύμφωνα με τα κριτήρια της Ρώμης II, με 22 υγιή άτομα χωρίς γαστρεντερικά συμπτώματα. Συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων ανά τρίμηνο και αναλύθηκαν με qPCR, οι οποίες στόχευαν σε περίπου 300 βακτηριακά είδη (**βλ. Πίνακα 4 για εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη**).

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των (Malinen et al., 2005) για την Qpcr.

PCR Test for (Amplicon Size, Mg ²⁺ , T _m , Detection*)	Sequence (5' → 3')
<i>Atopobium</i> group (120 bp, 2 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-ACCGCTTTCAGCAGGA-3' R: 5'-ACGCCAATGAATCCGGAT-3'
<i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> (140 bp, 3 mM, 68°C, SYBR)	F: 5'-GGTGTGCGCTTAAGTGCCAT-3' R: 5'-CGGA(C/T)GTAAGGCCGTGC-3'
<i>B. fragilis</i> (176 bp, 3 mM, 58°C, SYBR)	F: 5'-GAAAGCATTAAGTATTCCACCTG-3' R: 5'-CGGTGATTGCTCACTGACA-3'
<i>Bifidobacterium</i> spp. (243 bp, 3 mM, 58°C, SYBR)	F: 5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'
<i>Campylobacter</i> spp. (246 bp, 3 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-GGATGACACTTTTCGGAG-3' R: 5'-AATTCATCTGCCTCTCC-3'
<i>C. coccoides</i> group (429 bp, 4 mM, 55°C, SYBR)	F: 5'-CGGTACCTGACTAAGAAG-3' R: 5'-AGTTT(C/T)ATTCTTGCGAAC-3'
<i>C. difficile</i> (157 bp, 3 mM, 58°C, SYBR)	F: 5'-TTGAGCGATTACTTCGGTAAAGA-3' R: 5'-CCATCCTGTACTGGCTCACCT-3'
<i>C. perfringens</i> group (120 bp, 3 mM, 55°C, SYBR)	F: 5'-ATGCAAGTCGAGCGA(G/T)G-3' R: 5'-TATGCGGTATTAATCT(C/T)CCTTT-3'
<i>Desulfovibrio</i> spp. (191 bp, 4 mM, 58°C, SYBR)	F: 5'-GGTACCTTCAAAGGAAGCAC-3' R: 5'-GGGATTTACCCCTGACTTA-3'
<i>Enterococcus</i> spp. (144 bp, 3 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-CCCTTATTGTAGTTGCCATCATT-3' R: 5'-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT-3'
<i>E. coli</i> subgroup (340 bp, 3 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-GTTAATACCTTTGCTCATTGA-3' R: 5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'
<i>F. prausnitzii</i> (158 bp, 4 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCACT-3' R: 5'-GTCGCAGGATGTCAAGAC-3'
<i>Helicobacter-Flexispira-Wolinella</i> (77 bp, 3 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-TGGAGAGGTAGGTGGAATTCT-3' R: 5'-GTCGCCTTCGCAATGAGTATTC-3'
<i>Lactobacillus</i> spp. (341 bp, 2 mM, 58°C, SYBR)	F: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' R: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'
<i>R. productus-C. coccoides</i> (182 bp, 2 mM, 61°C, SYBR)	F: 5'-GGTGCCAAAGCCATTCGGT-3' R: 5'-GTTACGGGACGGTCAGAG-3'
<i>Veillonella</i> spp. (343 bp, 3 mM, 62°C, SYBR)	F: 5'-A(C/T)CAACCTGCCCTTCAGA-3' R: 5'-CGTCCCGATTAAACAGAGCTT-3'
<i>B. adolescentis</i> (279 bp, 2 mM, 58°C, 5'-nuclease)	F: 5'-CTCCAGTTGGATGCATGTC-3' R: 5'-CGAAGGCTTGCTCCAGT-3'
<i>B. bifidum</i> (278 bp, 2 mM, 60°C, 5'-nuclease)	F: 5'-CCACATGATCGCATGTGATTG-3' R: 5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAA-3'
<i>B. catenulatum</i> group (285 bp, 4 mM, 65°C, 5'-nuclease)	F: 5'-CGGATGCTCCGACTCCT-3' R: 5'-CGAAGGCTTGCTCCCGAT-3'
<i>B. longum</i> group (106 bp, 4 mM, 58°C, 5'-nuclease)	F: 5'-CAGTTGATCGCATGGTCTT-3' R: 5'-TACCCGTCGAAGCCAC-3'
5'-nuclease probe†	5'-FAM-TGGGATGGGGTCGCTCCTATCAG-TAMRA-3'

*Either SYBR Green or 5'-nuclease based detection of fluorescence was used.

†The probe was common to all 5'-nuclease assays.

Σημαντική ατομική διακύμανση παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες. Οι υπότυποι του IBS έδειξαν συγκεκριμένα πρότυπα: οι ασθενείς με IBS-D είχαν χαμηλότερα επίπεδα *Lactobacillus* spp., ενώ εκείνοι με IBS-C είχαν υψηλότερα επίπεδα *Veillonella* spp. Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης στην υποομάδα *Clostridium coccoides* και στην ομάδα *Bifidobacterium catenulatum* μεταξύ των ομάδων IBS και τα HC. Δεν ανιχνεύθηκε σημαντική παρουσία *Helicobacter* spp. ή *Clostridium difficile*, εκτός από μία περίπτωση *Campylobacter jejuni*. Τέτοιες μελέτες, που αναδεικνύουν ποσοτικές διαφορές στο μικροβίωμα των ασθενών με IBS υποδηλώνουν τη δυνατότητα

ανάπτυξης νέων δοκιμασιών qPCR για λεπτομερέστερη μικροβιακή ανάλυση στο IBS με σκοπό την καθιέρωση τους ως διαγνωστικά εργαλεία.

Τέλος, στην μελέτη των Rinttilä et al. (2011), χρησιμοποιήθηκε ένα εξαιρετικά ευαίσθητο πάνελ 12 αναλύσεων qPCR που διερεύνησε την παρουσία εντερικών παθογόνων σε 96 άτομα με IBS και 23 υγιείς μάρτυρες. Ειδικότερα, κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε μια βελτιστοποιημένη δοκιμασία qPCR για την ανάλυση των βακτηριακών παθογόνων που στόχευε συγκεκριμένα βακτηριακά γένη, όπως *Salmonella spp.* και *Aeromonas spp.*, και περιελάμβανε μια ομαδική δοκιμασία για *Bacillus cereus* και συναφή είδη, λόγω των ομοιοτήτων της χρωμοσωμικής αλληλουχίας τους, εντός του γονιδίου 16S rRNA. Οι αναλύσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος ανίχνευσης iCycler iQ Real-Time PCR, με κάθε αντίδραση βελτιστοποιημένη ως προς τις θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινητών. Οι ενισχύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, ενσωματώνοντας το SYBR Green I για την ανίχνευση, και περιλάμβαναν διάφορους ελέγχους για τη διασφάλιση της ακρίβειας.

Πίνακας 5: Δοκιμασίες qPCR που εφαρμόστηκε στην μελέτη των (Rinttilä et al., 2011).

PCR assay (Target gene)	Sequence (5'→ 3')	Amplicon size (bp)	T _a (°C)
<i>Aeromonas spp.</i> (<i>aerA</i>)	F: GAGAAGGTGACCAACAAGAACA R: AACTGACATCGGCCTTGAATC	232	61
<i>Bacillus cereus</i> group (16S rRNA)	F: TCGAAATTGAAAGGCGGC R: GGTGCCAGCTTATTCAAC	288	64
<i>Campylobacter jejuni</i> (<i>hipO</i>)	F: GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT R: GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA	344	58
<i>Clostridium difficile</i> (16S rRNA)	F: TTGAGCGATTACTTCGGTAAAGA R: CCATCCTGTACTGGCTCACCT	157	58
<i>Clostridium perfringens</i> (<i>plc</i>)	F: AAGTTACCTTTGCTGCATAATCCC R: ATAGATACTCCATATCATCCTGCT	283	61
<i>Clostridium perfringens</i> (<i>cpe</i>)	F: GGTTCAATTAATTGAACTGGTG R: AACGCCAATCATATAAATTACAGC	154	58
EHEC/EPEC (<i>eaeA</i>)	F: ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG R: GCCTTCATCATTTGCTTTC	248	65
<i>Helicobacter pylori</i> (16S rRNA)	F: GAAGATAATGACGGTATCTAAC R: ATTCACACCTGACTGACTAT	139	58
<i>Listeria monocytogenes</i> (<i>iap</i>)	F: CTAAGCGGGAATCTCCCTT R: CCATTGTCTGCGCGTTAAT	174	61
<i>Salmonella spp.</i> (<i>invA</i>)	F: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA R: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	281	64
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>nuc</i>)	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC	279	60
<i>Yersinia enterocolitica</i> (<i>ail</i>)	F: GGTCATGGTGATGTTGATTACTATTCA R: CGGCCCCAGTAATCCATAA	90	58

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το 17% των δειγμάτων IBS βρέθηκε θετικό για *Staphylococcus aureus* μέσω μιας δοκιμασίας qPCR με στόχο το γονίδιο της

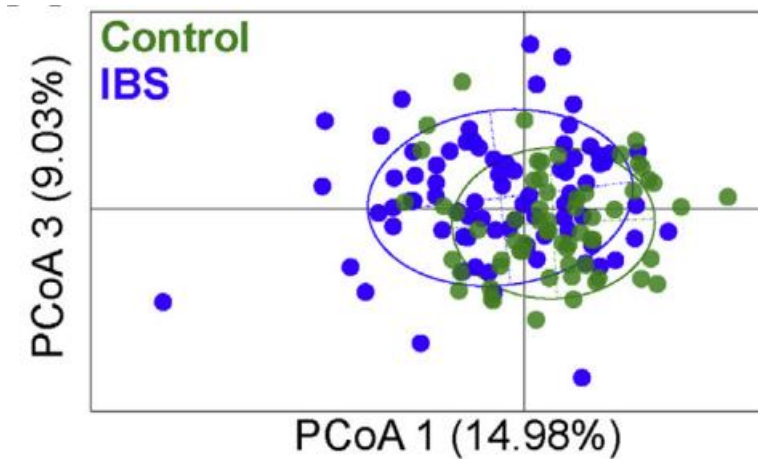
θερμονουκλεάσης, σε αντίθεση με τα υγιή άτομα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την αλληλούχιση των PCR προϊόντων. Το *Clostridium perfringens* ανιχνεύθηκε τόσο στις ομάδες IBS όσο και στις ομάδες ελέγχου σε παρόμοια ποσοστά (13% και 17%, αντίστοιχα) με τη χρήση qPCR με στόχο το γονίδιο της α-τοξίνης. Η μελέτη αυτή αναδεικνύει τον πιθανό ρόλο του *S. aureus* στο IBS, μια σύνδεση που δεν είχε τεκμηριωθεί προηγουμένως, υποδηλώνοντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση της επίδρασής του στα συμπτώματα του IBS και τη δυνατότητα για πάνελ qPCR να ενισχύσουν την ανίχνευση παθογόνων του γαστρεντερικού συστήματος, μειώνοντας ενδεχομένως τον κίνδυνο για IBS-PI.

5.2.2. 16S RNA sequencing για τον προσδιορισμό του μικροβιώματος ασθενών με IBS

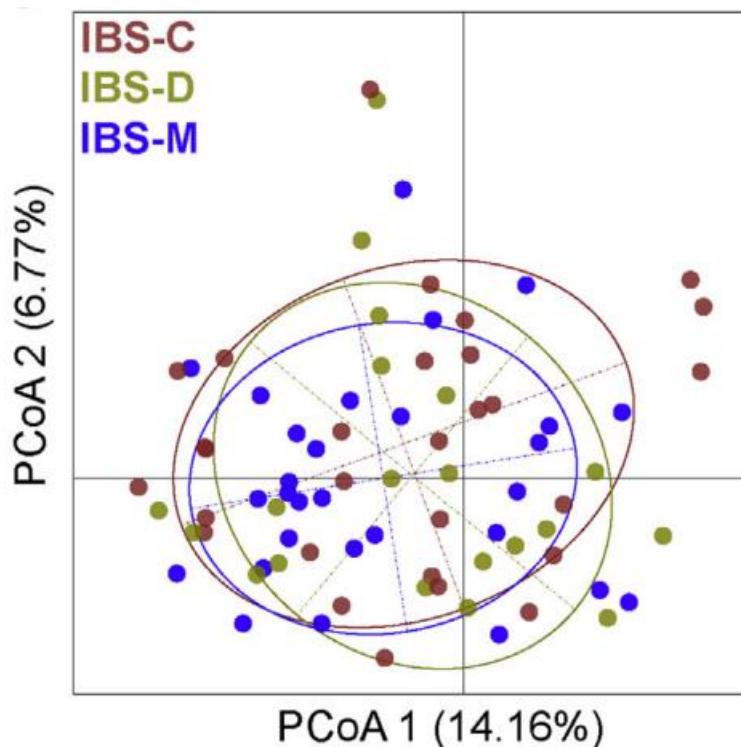
Στην ανασκόπησή τους, οι Singh & Lembo, 2021 αναφέρουν διάφορες ερευνητικές ομάδες που με γνώμονα νέες τεχνολογίες, όπως το RNA sequencing, βρίσκουν νέες σημαντικές διαφορές στο μικροβίωμα των ασθενών με IBS σε σχέση με των υγιών. Μερικές από τις διαφορές είναι πως οι ασθενείς με IBS είχαν υψηλότερο ποσοστό *Veillonellaceae* στα κόπρανα σε σχέση με τους μάρτυρες, οι ασθενείς με IBS-M και IBS-D είχαν χαμηλότερη σχετική αφθονία σε βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ σε σύγκριση με τους υγιείς, ενώ υπήρχαν και ψηλότερες μετρήσεις *Veillonella* και *Lactobacillus* σε άτομα με IBS.

Αναλυτικότερα, οι Jeffery et al. (2020), συνέλεξαν δείγματα κοπράνων και ούρων από 80 ασθενείς με IBS, οι οποίοι διαγνώστηκαν με βάση τα κριτήρια της Ρώμης IV και ήταν ηλικίας 16 έως 70 ετών, και 65 άτομα ελέγχου αντίστοιχα. Ακόμα, συγκέντρωσαν ολοκληρωμένα δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων ανθρωπομετρικών μετρήσεων, ιατρικού ιστορικού και διατροφικών συνηθειών. Τα δείγματα κοπράνων υποβλήθηκαν σε 16S rRNA sequencing για την ανάλυση της μικροβιακής σύνθεσης, ενώ μετρήθηκαν και οι μεταβολίτες των κοπράνων και των ούρων με τεχνικές αέριας χρωματογραφίας και υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας. Για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συνόλων δεδομένων, κατασκευάστηκαν δίκτυα συν-συμπτώσεων με βάση τις σημαντικές συσχετίσεις Spearman. Κατά την πειραματική διαδικασία το γονιδιωματικό DNA εξήχθη από 0,25 g κατεψυγμένων δειγμάτων κοπράνων και αλληλουχίστηκε με τη χρήση του οργάνου MiSeq της Illumina για την αλληλουχία 16S rRNA. Οι ασθενείς με IBS παρουσίασαν διακριτές διασυνδέσεις μεταξύ της διατροφής και του μικροβιώματος των κοπράνων τους σε

σύγκριση με τους μάρτυρες, παράλληλα με αξιοσημείωτες διαφορές στο μεταβολισμό των κοπράνων τους. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη σύνθεση του μικροβιώματος των κοπράνων μεταξύ των διαφόρων υποτύπων συμπτωμάτων IBS. Ωστόσο, τα προφίλ του μικροβιώματος των κοπράνων ήταν ικανά να διακρίνουν τους ασθενείς με IBS από τους υγιείς (βλ. *Εικόνα 31-32*).



Εικόνα 31: Ανάλυση της σύνθεσης του μικροβιώματος των ομάδων ελέγχου και του IBS. PCoA της ποικιλότητας του μικροβιώματος που δείχνει σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και IBS. Η PCoA πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Spearman σε επίπεδο γένους μετά το 16S RNA seq (Jeffery et al., 2020).



Εικόνα 32: PCoA της σύνθεσης του μικροβιώματος που δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των κλινικών υποτύπων του IBS. Η PCoA πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Spearman σε επίπεδο λειτουργικής ταξινομικής μονάδας 16S ($P = 0,976$, IBS-C, $n = 29$ - IBS-D, $n = 20$ - IBS-M, $n = 29$) (Jeffery et al., 2020)

Σε παρόμοια μελέτη, οι Tap et al. (2017), διερεύνησαν το μικροβίωμα των κοπράνων και του βλεννογόνου σε ασθενείς με IBS και τη συσχέτισή τους με τα συμπτώματα, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια της Ρώμης III για τη διάγνωση του IBS. Πρόσθετες μετρήσεις περιλάμβαναν την μέτρηση των επιπέδων εκπνεόμενου H_2 και CH_4 , το χρόνο στοματο-πρωκτικής διέλευσης, τη σοβαρότητα των ψυχολογικών και γαστρεντερικών συμπτωμάτων και τα μεθανογόνα των κοπράνων που ποσοτικοποιήθηκαν μέσω qPCR. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία μηχανικής μάθησης.

Κατά την πειραματική διαδικασία, συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων από 195 άτομα και συντηρήθηκαν σε διάλυμα RNAlater. Οι συμμετέχοντες περιλάμβαναν τόσο ασθενείς με IBS όσο και υγιή άτομα, με τους ασθενείς με IBS να παρέχουν συχνά δύο δείγματα κοπράνων που ελήφθησαν με διαφορά περίπου 26 ημερών. Η έρευνα χωρίστηκε σε δύο μέρη: ένα διερευνητικό σύνολο αποτελούμενο από 149 άτομα (110 με IBS και 39 υγιείς) από τα οποία αναλύθηκαν 232 δείγματα κοπράνων και 59 δείγματα βιοψίας, και ένα σύνολο επικύρωσης 46 ατόμων (29 με IBS και 17 υγιείς) από το οποίο αναλύθηκαν μόνο 46 δείγματα κοπράνων. Η εκχύλιση DNA κοπράνων

περιλάμβανε μηχανική λύση και εκχύλιση φαινόλης/χλωροφορμίου. Δείγματα βιοψίας συλλέχθηκαν από το σιγμοειδές κόλον 59 ατόμων για την εξέταση του μικροβιώματος.

Η μελέτη ανέλυσε τη μικροβιακή σύνθεση ενισχύοντας τις υπερμεταβλητές περιοχές V5-V6 του 16S rRNA με τη χρήση ειδικών εκκινητών, ενώ η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε σε 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX. Η διαδικασία περιλάμβανε ποιοτικό φιλτράρισμα και περικοπή των ακατέργαστων αναγνώσεων, ομαδοποίηση σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και ταξινομική ανάθεση με τη χρήση του εργαλείου LotuS v1.32. Το DNA των κοπράνων αναλύθηκε με τη χρήση qPCR με εκκινητές ειδικούς για την τάξη *Methanobacteriales*, για την ανίχνευση της παρουσίας τους στα δείγματα. Το όριο ανίχνευσης ορίστηκε σε 10^6 αντίγραφα γονιδίων rRNA ανά γραμμάριο υγρού περιεχομένου κοπράνων, με βάση τη χαμηλότερη τιμή που παρατηρήθηκε στην πρότυπη καμπύλη, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της παρουσίας ή της απουσίας κυρίαρχων *Methanobacteriales*.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως, χρησιμοποιώντας την τεχνική μηχανικής μάθησης, οι ερευνητές ανέπτυξαν μια μικροβιακή υπογραφή για το σοβαρό IBS, που περιλαμβάνει 90 βακτηριακές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες. Αυτή η υπογραφή, που επικυρώθηκε σε ξεχωριστό σύνολο, έκανε αποτελεσματική διάκριση μεταξύ σοβαρών συμπτωμάτων IBS, ήπιων/μέτριας έντασης συμπτωμάτων και υγιών ατόμων. Ακόμα, ανέδειξε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας των συμπτωμάτων και του μικροβιακού πλούτου, του εκπνεόμενου μεθανίου, της παρουσίας μεθανογόνων και εντερότυπων πλούσιων σε *Clostridiales* ή *Prevotella*, ανεξάρτητα από τις διατροφικές συνήθειες ή τη χρήση φαρμάκων.

Επιπρόσθετα, μία άλλη προσέγγιση είναι η διαδικασία ανάλυσης του μικροβιώματος σε ασθενείς με τη χρήση ηλεκτροφόρησης μετουσιωτική διαβάθμιση πηκτής (DGGE) του 16S rRNA. Αρχικά, η διαδικασία ξεκινά με τη συλλογή και την προετοιμασία ενός κατάλληλου δείγματος, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από περιττώματα μέχρι επιχρίσματα βλεννογόνου εντέρου, ανάλογα με τους στόχους της μελέτης. Βασικό να αναφερθεί είναι πως για την PCR η το δείγμα κοπράνων ίσως να πρέπει να καλλιεργηθεί ώστε τα βακτήρια να υπάρχουν σε μετρήσιμη ποσότητα (Codling et al., 2010).

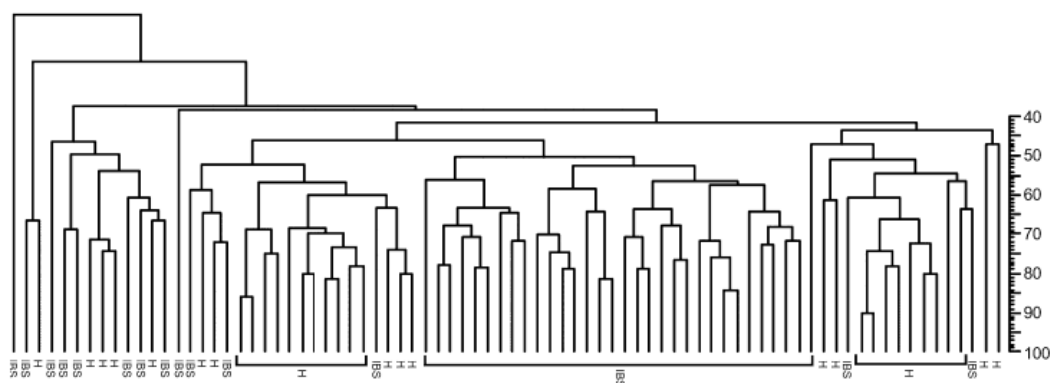
Το δείγμα αυτό υποβάλλεται σε διαδικασία εκχύλισης DNA όπου τα κύτταρα (βακτήρια) λύνονται για την απελευθέρωση του DNA, ακολουθούμενη από βήματα καθαρισμού για την απομόνωση του DNA από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Στη συνέχεια, αυτό το απομονωμένο DNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο σε μια PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν ειδικά στο γονίδιο 16S rRNA - ένα ιδιαίτερα συντηρημένο συστατικό σε όλα τα βακτηριακά είδη, το οποίο όμως περιέχει αρκετή παραλλακτικότητα ώστε να διακρίνεται μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων. Αυτό το βήμα της PCR έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός πλήθους αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA από τον ποικίλο βακτηριακό πληθυσμό που υπάρχει στο δείγμα.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία και η χρήση ενός πηκτώματος με μετουσιωτική διαβάθμιση, το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό της διαδικασίας DGGE. Το πήκτωμα περιέχει βαθμίδωση μετουσιωτικών χημικών ουσιών (συνήθως φορμαμίδιο και ουρία) που αυξάνονται σε συγκέντρωση από πάνω προς τα κάτω, μετουσιώνοντας διαφορετικά τα θραύσματα DNA ανάλογα με την αλληλουχία και την περιεκτικότητά τους σε GC. Όταν τα πολλαπλασιασμένα με PCR προϊόντα του γονιδίου 16S rRNA τοποθετούνται σε αυτό το πήκτωμα και ηλεκτροφορούνται, τα θραύσματα DNA μετακινούνται και μετουσιώνονται σταδιακά. Η μετακίνηση κάθε θραύσματος σταματά, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται διακριτές ζώνες στο πήκτωμα. Οι ζώνες αυτές είναι ορατές μετά από χρώση και αντιπροσωπεύουν τις συμπεριφορές τήξης των θραυσμάτων DNA, οι οποίες αντιστοιχούν σε διακριτά βακτηριακά είδη ή στελέχη (*βλ. Εικόνα 33-34*) (Codling et al., 2010).

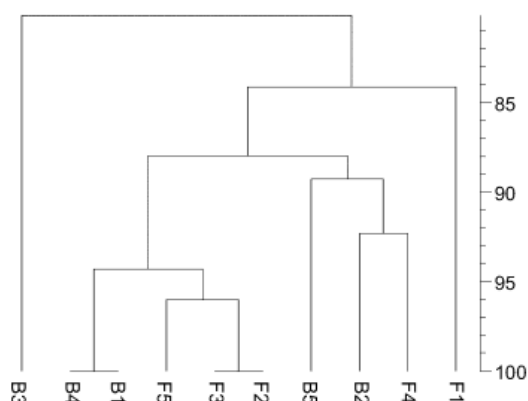
Η κατανόηση της σύνθεσης της βακτηριακής κοινότητας στο δείγμα του ασθενούς είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση μιας σειράς ιατρικών διαταραχών, των επιδράσεων των τροφίμων και των αντιδράσεων στη θεραπεία. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την ανάλυση αυτών των μοτίβων DGGE. Κατά συνέπεια, η DGGE του 16S rRNA είναι ένα αποτελεσματικό και διαφωτιστικό εργαλείο σε κλινικά και επιστημονικά περιβάλλοντα, παρέχοντας μια εμπειριστατωμένη εικόνα της ποικιλίας των μικροβίων και βοηθώντας στην περίπλοκη ερμηνεία της λειτουργίας της μικροβιακής χλωρίδας στην υγεία και την ασθένεια (Codling et al., 2010).

Primer	Primer sequence 5'-3'
27F ^a	AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG
519R	GTA TTA CCG CGG CTG GCT G
968F ^a	AAC GCG AAG AAC CTT AC
1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC

Εικόνα 33: Τυπική δομή primer από τα πειράματα των (Codling et al., 2010).

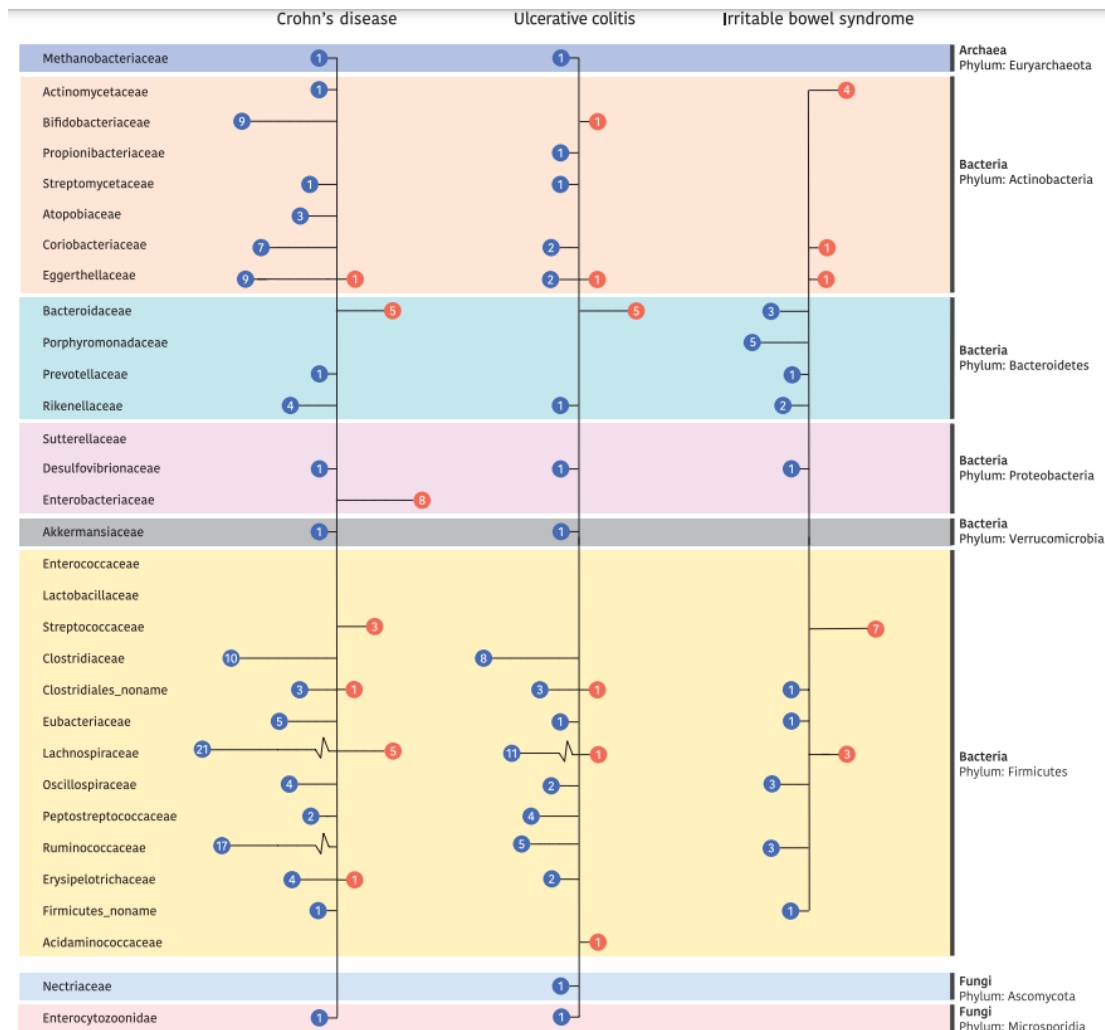


Εικόνα 34: Δενδρόγραμμα δειγμάτων IBS και υγιών κοπράνων (H) από συγκρίσεις ανά ζεύγη των προφίλ DGGE από την περιοχή V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA. Η κλίμακα υποδεικνύει την ομοιότητα (%) (Codling et al., 2010).



Εικόνα 35: Δενδρόγραμμα των δειγμάτων κοπράνων και βιοψίας IBS από συγκρίσεις ζευγών των προφίλ DGGE από την περιοχή V6-V8 του 16S rRNA. Η κλίμακα υποδεικνύει την ομοιότητα (%) (Codling et al., 2010).

Τέλος, οι Vila et al. (2018). σε μια μελέτη-έλεγχου που περιλάμβανε 1792 άτομα, εφαρμόστηκε μεταγονιδιωματική αλληλούχιση shotgun σε δείγματα κοπράνων από ασθενείς με IBD και IBS και συγκρίθηκε με άτομα ελέγχου από το γενικό πληθυσμό. Η σημαντικότητα της έρευνας βασίζεται και στο γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε απλά 16S RNA αλληλούχιση, η οποία δεν είναι τόσο ισχυρή όσο η μέθοδος που ακολουθήθηκε εδώ. Η χρήση δεδομένων μεταγονιδιωματικής αλληλούχισης επέτρεψε την διερεύνηση πολυπλοκότητας του μικροβιώματος του εντέρου με πολύ υψηλή ανάλυση. Παρά τη σημαντική επικάλυψη του εντερικού μικροβιώματος σε όλες τις ομάδες, έγινε με επιτυχία διαφοροποίηση μεταξύ ασθενών με IBD και IBS. Με την ανάλυση των προφίλ σε επίπεδο ειδών και στελεχών μαζί με τους ρυθμούς ανάπτυξης βακτηρίων, τις μεταβολικές λειτουργίες, την αντοχή στα αντιβιοτικά και τους παράγοντες ιογένεσης, εντοπίστηκαν βασικά βακτηριακά είδη που ενδεχομένως έχουν κεντρικό ρόλο στην παθολογία και των δύο γαστρεντερικών ασθενειών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση σε διάφορα είδη του φύλου Ακτινοβακτήρια. μείωση των ειδών των *Bacteroidetes*, και αύξηση των ειδών των *Streptococcaceae* και *Lachnospiraceae*.



Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση των παρατηρούμενων διαφοροποιήσεων στο μικροβίωμα ασθενών με IBD, IBS και HC. Με πορτοκαλί σήμα δηλώνεται η αύξηση (σε σχέση με το control), ενώ με μπλε δηλώνεται η μείωση (της συγκέντρωσης) (Vila et al., 2018).

5.3. Μεθοδολογίες ανίχνευσης επιγενετικών διαφορών σε ασθενείς με IBS

Στο κεφάλαιο 3.2.1 και 3.2.2 παρατέθηκαν κάποια από τα σημαντικότερα microRNA αλλά και επιγενετικές τροποποιήσεις σε γονίδια που συνδέονται με το IBS. Παρόλου που ο στόχος κάθε μελέτης είναι διαφορετικός, αυτές οι μελέτες μοιράζονται πολλά κοινά στις πειραματικές διαδικασίες για την ανίχνευση των διαφορετικών microRNA και των επιγενετικών τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση).

Για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των microRNAs (miRNAs) για την καλύτερη διάγνωση του IBS, η διαδικασία ξεκινά με τη συλλογή κατάλληλων δειγμάτων, όπως

αίμα, κόπρανα ή βιοψίες εντερικού ιστού. Στη συνέχεια, το RNA, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, εξάγεται με τη χρήση εξειδικευμένων kit που έχουν σχεδιαστεί για την απομόνωση των microRNA. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), προσφέρει μια ευαίσθητη προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων miRNAs, ενώ η ανάλυση μικροσυστοιχιών και η NGS επιτρέπουν την ευρύτερη σκιαγράφηση και τον προσδιορισμό τόσο γνωστών όσο και νέων miRNAs. Τα δεδομένα που λαμβάνονται απαιτούν εξελιγμένη βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση για τον εντοπισμό των διαφορικά εκφραζόμενων miRNAs σε ασθενείς με IBS σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Dothel et al., 2023).

Η περαιτέρω επικύρωση αυτών των miRNAs ως πιθανών βιοδεικτών απαιτεί μελέτες αναπαραγωγής και δοκιμές σε ξεχωριστές ομάδες. Τελικά, ο συνδυασμός αυτών των προφίλ miRNA με κλινικές πληροφορίες μπορεί να ρίξει φως στον τρόπο με τον οποίο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και τη θεραπεία του IBS. Η κλινική επικύρωση και η τυποποίηση του πρωτοκόλλου είναι απαραίτητες προτού αυτοί οι βιοδείκτες συμπεριληφθούν στην τακτική κλινική πρακτική (Dothel et al., 2023).

Για την διερεύνηση των επιγενετικών τροποποιήσεων μία ευρέως χρησιμοποιούμενη πειραματική πορεία είναι η εξής: Καταρχάς, γίνεται η απομόνωση των υπό μελέτη κυττάρων, και ο τρόπος απομόνωσης επιλέγεται με γνώμονα τον κυτταρικό τύπο. Στη συνέχεια, το DNA που θα εξαχθεί θα υποβληθεί σε ένα προφίλ μεθυλίωσης με BeadChip [π.χ. Illumina Infinium Human Methylation450 (HM450)], το οποίο αξιολογεί πάνω από 450.000 CpGs σε όλο το γονιδίωμα. Το γονιδιωματικό DNA από κάθε δείγμα θα μετατραπεί σε δισουλφίτη χρησιμοποιώντας το EZ-96 DNA Methylation Kit και στη συνέχεια θα ενισχυθεί και θα κατακερματιστεί, πριν από την υβριδοποίηση στις συστοιχίες BeadChip. Ο σχεδιασμός των συστοιχιών HM450, που ενσωματώνει τις χημικές μεθόδους Infinium I και II, επιτρέπει την ανίχνευση μεθυλίωσης ειδικά, με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε κάθε τόπο CpG να βαθμολογούνται ως τιμές βήτα (που κυμαίνονται από 0 για μη μεθυλίωση έως 1 για πλήρη μεθυλίωση) (Mahurkar et al., 2016). Με βάση σε συγκεκριμένο λογισμικό (π.χ. R) θα γίνει η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτού του πειράματος μπορεί να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση (Mahurkar et al., 2016).

Συζήτηση

Το IBS είναι μία παθολογική κατάσταση -ένα σύνολο κλινικών συμπτωμάτων και φυσικών ευρημάτων- που χαρακτηρίζεται από υψηλή πολυπλοκότητα τόσο στη διάγνωσή του όσο και στην έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Οι περισσότερες έρευνες μέχρι τώρα εστιάζουν στην διάγνωση του συνδρόμου, κυρίως μέσω της αξιολόγησης των συμπτωμάτων και της συχνότητας αυτών. Εξαιτίας της πολυσχιδούς φύσης του συνδρόμου, η επιστημονική κοινότητα, τα τελευταία χρόνια επικεντρώνεται στην διάγνωση του συνδρόμου προσπαθώντας να ταυτοποιήσει συγκεκριμένους βιοδείκτες και μόρια τα οποία κατά το δυνατόν να είναι ειδικά για το IBS και διαφοροδιαγνωστικά για άλλες παρόμοιες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Παρά την έντονη, επικεντρωμένη και με σύγχρονες μοριακές βιοτεχνολογικές ερευνητικές μεθόδους, δεν υπάρχουν ακόμα πολλές μελέτες που να αποδεικνύουν την ύπαρξη ισχυρών δεικτών για την διάγνωση του IBS αλλά και για τον διαχωρισμό των διαφορετικών τύπων IBS, ωστόσο πολλά ερευνητικά δεδομένα φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα και σηματοδοτούν την ανάγκη για περισσότερες ερευνητικές μελέτες που θα τα επιβεβαιώνουν.

Οι διαφορές στο μικροβίωμα τόσο στους ανθρώπους που παρουσιάζουν συμπτώματα IBS σε σύγκριση με τους υγιείς, αλλά και οι διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς με την ίδια κλινική εικόνα, η διαφορική έκφραση των κυτταροκινών, των αυξητικών παραγόντων, οι επιγενετικές τροποποιήσεις αλλά και η παρουσία συγκεκριμένων ncRNAs, είναι κάποιοι από τους πιο σημαντικούς υπό μελέτη παράγοντες-βιοδείκτες για την βελτίωση της διάγνωσης και την αντιμετώπισης του IBS. Η ανίχνευση, η ποσοτικοποίηση, η ανάλυση και ο χαρακτηρισμός αυτών των μορίων είναι ζωτικής σημασίας, και αυτό μας δείχνει πως η μοριακή βιολογία και οι σύγχρονες μοριακές τεχνικές, είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την διάγνωση του συνδρόμου του IBS.

Σύγχρονες μοριακές μέθοδοι όπως PCR, η γονιδιακή αλληλούχιση, η ανάλυση των μεθυλιωμένων περιοχών του γενετικού υλικού μέσω DNA methylation Arrays είναι κάποιες από τους μοριακές μεθόδους, που φαίνεται πως θα ενταχθούν στα διαγνωστικά εργαλεία του IBS, ενώ παράλληλα, παλιότερες, αλλά τεχνολογικά βελτιωμένες βιομοριακές τεχνικές όπως η ELISA, φαίνεται ότι μπορεί να συνεισφέρουν εξίσου αποτελεσματικά στην διάγνωσή του.

Βιοδείκτες, όπως τα ANCA, ASCA IgA, anti-CBir1 (for IBD), και tTG, προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για την παθογένεια πολλών αυτοάνοσων και γαστρεντερικών διαταραχών όπως το IBS. Η επιλογή συνολικά 34 δεικτών με γνώμονα μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του IBS ή με βάση αναλύσεων ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος από τους Jones et al., (2014), είναι ένα ισχυρό παράδειγμα ύπαρξης μοριακών δεικτών που μπορούν να κατευθύνουν την αποτελεσματικότερη διάγνωση του IBS, αλλά και την εύρεση του συγκεκριμένου τύπου IBS σε ασθενείς με παρόμοια συμπτωματολογία. Τέτοιες μελέτες, αποτελούν πυλώνα της βασικής έρευνας, και με γνώμονα αυτές, η επιστημονική κοινότητα θα μπορούσε να στοχεύσει στην ανακάλυψη κι άλλων βιοδεικτών, αλλά και στην ενίσχυση της σημαντικότητας των είδη υπαρχόντων, με σκοπό ίσως την δημιουργία διαγνωστικών panel γονιδίων ή βιομορίων, των οποίων βέβαια η ανίχνευση βασίζεται στην χρήση εξελιγμένων μεθόδων και τεχνολογιών της μοριακής βιολογίας.

Η ανάλυση του «προφίλ μικροβιακής κοινότητας» (μικροβιώματος), μέσο προηγμένων μοριακών τεχνικών όπως τα NGS, θα οδηγήσει στην ανάπτυξη περαιτέρω μοριακών βιοδεικτών του IBS. Ο αναπτυσσόμενος τομέας της έρευνας του μικροβιώματος έχει δημιουργήσει νέους δρόμους για τη θεραπεία του IBS, αντιμετωπίζοντας την υποκείμενη αιτία της πάθησης (τον εντερικό ιστό) και όχι μόνο τα συμπτώματά της. Η τρέχουσα αλλά και μελλοντική βασική έρευνα για το IBS φαίνεται να είναι ελπιδοφόρα και πιθανά θα συνεισφέρει σημαντικά στην απόκτηση κλινικής εμπειρίας και γνώσης τόσο στην διάγνωση όσο και στην αντιμετώπιση του IBS, με απώτερο και κύριο στόχο την ανακούφιση από τον πόνο, τη μείωση του κόστους της περίθαλψης και την μείωση των άσκοπων επεμβατικών εξετάσεων.

Στα πλαίσια της έρευνας για το εντερικό μικροβίωμα και την παθοφυσιολογία του IBS, έχουν αναπτυχθεί προσεγγίσεις που επικεντρώνονται στη μελέτη των βακτηριακών μεταβολιτών και των miRNA. Τα miRNA λειτουργούν ως ρυθμιστές στην αλληλεπίδραση ξενιστή-μικροβιώματος, επηρεάζοντας τη σύνθεση και τελικά τη λειτουργία του μικροβιώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα miRNA είναι σημαντικά διαφοροποιημένα σε ασθενείς με IBS, ενδεχομένως ρυθμίζοντας μοριακούς μηχανισμούς σχετικούς με την εντερική διαπερατότητα και την σπλαχνική υπερευαισθησία. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την πιθανότητα χρήσης των

miRNA ως βιοδεικτών για την πιο ακριβή διάγνωση και θεραπεία του IBS, ανοίγοντας νέους δρόμους για την κατανόηση και την αντιμετώπιση της νόσου.

Επιπρόσθετα, πρόσφατες έρευνες, φαίνεται να υποδεικνύουν ότι η βελτίωση της διάγνωσης του IBS μπορεί να επιτευχθεί μέσω του χαρακτηρισμού της έκφρασης κυτταροκινών των ασθενών. Συγκεκριμένες κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν διαφορετική έκφραση στους ασθενείς με IBS σε σύγκριση με υγιή άτομα, με τις προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TNF-α και IL-10, να εμφανίζουν διαφορετική έκφραση. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση το προφίλ των κυτταροκινών μπορεί να οδηγήσει σε εξατομικευμένη θεραπεία και να συμβάλει στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου.

Σύγκριση των μοριακών τεχνικών

Όσον αφορά, την ανίχνευση αιματολογικών βιοδεικτών, πρωτεϊνικών μορίων, κυτταροκινών και άλλων βιομορίων, προς το παρόν φαίνεται πως η τεχνική της ELISA έχει ένα προβάδισμα ως προς τη χρήση της από τις ερευνητικές ομάδες, λόγω της ευαισθησίας της, αλλά και της τυποποίησης της, αφού η διαδικασία βασίζεται σε συγκεκριμένα kit, που μπορούν να χρησιμοποιούνται καθολικά, από όλες τις ερευνητικές ομάδες. Ωστόσο, αν και χρησιμοποιείται ευρέως ως τεχνική για τη διάγνωση πολλών άλλων κλινικών συμπτωμάτων και παθοφυσιολογιών, η ένταξή της στην καθιερωμένη κλινική διάγνωση του IBS είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια, λόγω κυρίως της αδυναμίας ανίχνευσης και τυποποίησης ενός αποκλειστικού και διαφοροδιαγνωστικού βιοδείκτη που να σχετίζεται αποκλειστικά με τη νόσο και την συγκεκριμένη κλινική συμπτωματολογία της.

Όσο αφορά τις πιο σύγχρονες μοριακές μεθόδους, και ειδικότερα σε αυτές που αφορούν την ανάλυση του μικροβιώματος των ασθενών IBS, τρεις διαφορετικές μεθοδολογίες – η qPCR, η αλληλούχιση 16S rRNA και η shotgun αλληλούχιση-παρουσιάζουν η καθεμία μοναδικά πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Η qPCR είναι γνωστή για την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της, ικανή να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες βακτηριακού DNA, καθιστώντας την ιδανική για τη μελέτη της παρουσίας και της αφθονίας συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών ή γονιδίων. Είναι μια σχετικά γρήγορη μέθοδος, που παρέχει ταχεία ανάλυση. Ωστόσο, το πεδίο εφαρμογής της qPCR είναι περιορισμένο, εστιάζοντας μόνο σε συγκεκριμένα γονίδια ή οργανισμούς που προκαθορίζονται από τους εκκινητές που

χρησιμοποιούνται, και συνεπώς δεν μπορεί να παρέχει μια ολιστική εικόνα του μικροβιώματος. Η ακρίβεια της qPCR εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον σχεδιασμό αυτών των εκκινήτων, γεγονός που απαιτεί ακριβή στόχευση για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Από την άλλη πλευρά, η αλληλούχιση 16S rRNA προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση, ικανή να προσδιορίσει ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων σε ένα δείγμα. Αυτή η μέθοδος υπερέχει στην παροχή λεπτομερών πληροφοριών σχετικά με τη μικροβιακή ποικιλομορφία και την ταξινομία, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για συγκριτικές μελέτες μεταξύ διαφορετικών μικροβιακών κοινοτήτων. Παρά το βάθος των πληροφοριών που παρέχει, η αλληλούχιση 16S rRNA είναι πιο χρονοβόρα και ακριβή από την qPCR και απαιτεί εξελιγμένα εργαλεία βιοπληροφορικής για την ανάλυση των δεδομένων, γεγονός που αποτελεί πρόκληση όσον αφορά την κατανομή των πόρων και την απαιτούμενη εμπειρογγνωσύνη. Επίσης, επικεντρώνεται κυρίως σε βακτηριακές κοινότητες, παραλείποντας άλλους τύπους μικροβίων, όπως μύκητες και ιούς. Ακόμα, η shotgun μεταβολομική αλληλούχιση παρόλο που βασίζεται σε παρόμοιες πειραματικές διαδικασίες με την 16s RNA seq, φαίνεται να προσδίδει μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, ενώ ο συνδυασμός της με ανάλυση των αποτελεσμάτων με εργαλεία μηχανικής μάθησης δίνει ακόμα ποιοτικότερα αποτελέσματα.

Συμπεράσματα

Ο ρόλος του εντερικού μικροβιώματος είναι ιδιαίτερα κρίσιμος, με τα μεταβολικά υποπροϊόντα του να επηρεάζουν σημαντικά τη φλεγμονή του εντέρου, την ακεραιότητα του φραγμού και τον άξονα έντερο-εγκέφαλος. Οι τρέχουσες ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με τη συμβολή του μικροβιώματος στην κατανόηση της παθογένειας του IBS είναι σημαντικές και οριοθετούν το δρόμο για παρόμοιες ερευνητικές προσεγγίσεις που θα στοχεύουν στην ολιστική και αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου τόσο σε επίπεδο διάγνωσης όσο και σε επίπεδο αντιμετώπισης των συμπτωμάτων.

Τεχνικές όπως το προφίλ μεθυλίωσης του DNA, η ανάλυση των miRNAs και η ταυτοποίηση συγκεκριμένου προφίλ κυτταροκινών, φαίνεται να συνεισφέρουν στη βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών του IBS. Η δυνατότητα αυτών των μεθόδων να προσδιορίσουν συγκεκριμένους βιοδείκτες αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο βήμα προς την κατεύθυνση της ακριβέστερης διάγνωσης και ταξινόμησης του IBS.

Η ανοσολογική απόκριση στο IBS, δηλαδή η ανισορροπία έκφρασης των προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, υπογραμμίζει το ρόλο της ανοσολογικής δυσλειτουργίας στην ασθένεια. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των κυτταροκινών μπορεί να συμβάλει στη διάκριση των υποτύπων του IBS, καθώς και να ανοίξει το δρόμο για εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις προσαρμοσμένες σε συγκεκριμένα προφίλ ασθενών.

Αυτές οι εξελίξεις έχουν τη δυνατότητα να μετασχηματίσουν τη διάγνωση και τη θεραπεία του IBS, αλλά η ενσωμάτωσή τους στην κλινική πρακτική θα απαιτήσει τυποποίηση, επικύρωση και προσεκτική εξέταση και άλλων παραγόντων που σχετίζονται με την ηθική και την ασφάλεια χρήσης ιατρικών δεδομένων.

Παρά τις πολλά υποσχόμενες προοπτικές που παρέχουν αυτές οι μοριακές τεχνολογίες, κάποια εμπόδια παραμένουν, ιδίως όσον αφορά την τυποποίηση των μεθοδολογιών και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων με θεραπευτικά χρήσιμο τρόπο. Είναι ζωτικής σημασίας να εξισορροπηθούν τα οφέλη αυτών των τεχνικών με τους περιορισμούς και τους κινδύνους τους για την επιτυχή εφαρμογή τους στη διαχείριση του IBS.

Εν κατακλείδι, η χρήση σύγχρονων μοριακών μεθοδολογιών στη μελέτη του IBS αποτελεί σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της νόσου και θα οδηγήσει σε πιο προσαρμοσμένα και επιτυχημένα θεραπευτικά σχήματα.

Βιβλιογραφία

- A. H. Oberndorff-Klein Woolthuis, R.-J. M. Brummer, N. J. de Wit, J. W. M. Muris, & R. W. Stockbrügger. (2004). Irritable Bowel Syndrome in General Practice: An Overview. *Journal of Gastroenterology*.
- A. J. LEMBO, B. NERI, J. TOLLEY, D. BARKEN, S. CARROLL, & H. PAN. (2009). Use of serum biomarkers in a diagnostic test for irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*.
- Ahmed I, Greenwood R, Costello Bde L, Ratcliffe NM, & Probert CS. (2013). An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS One*.
- Alex Friedlaender, Vivek Subbiah, Alessandro Russo, Giuseppe Luigi Banna, Umberto Malapelle, Christian Rolfo, & Alfredo Addeo. (2021). EGFR and HER2 exon 20 insertions in solid tumours: from biology to treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Alexander C Ford, Eamonn M M Quigley, Brian E Lacy, Anthony J Lembo, Yuri A Saito, Lawrence R Schiller, Edy E Soffer, Brennan M R Spiegel, & Paul Moayyedi. (2014). Effect of antidepressants and psychological therapies, including hypnotherapy, in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*.
- Alexander C Ford, Nicholas J Talley, Brennan M R Spiegel, Amy E Foxx-Orenstein, Lawrence Schiller, Eamonn M M Quigley, & Paul Moayyedi. (2008). Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*.
- Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S. V, Gewirtz, A. T., & Srinivasan, S. (2002). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*.
- Barbara, G., Cremon, C., & Stanghellini, V. (2014). Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: similarities and differences. *Curr. Opin. Gastroenterol.*
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G. S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A. M., Grady, E. F., Bunnett, N. W., Collins, S. M., & Corinaldesi, R. (2004). Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 126(3), 693–702.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.055>
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., Bunnett, N. W., Grundy, D., & Corinaldesi, R. (2007). Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 132(1), 26–37.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.039>
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2013). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.*

- Barsky, A. J. (2016). Assessing the new DSM-5 diagnosis of somatic symptom disorder. *Psychosom. Med.*
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. In *BMC Gastroenterology* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- Böhn, L., Störsrud, S., Liljebo, T., Collin, L., Lindfors, P., Törnblom, H., & Simrén, M. (2015). Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome as Well as Traditional Dietary Advice: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 149(6), 1399-1407.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.054>
- Bohn, L., Störsrud, S., & Simrén, M. (2013). Nutrient intake in patients with irritable bowel syndrome compared with the general population. *Neurogastroenterol. Motil.*
- Bohn, L., Störsrud, S., Törnblom, H., Bengtsson, U., & Simrén, M. (2013). Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am. J. Gastroenterol.*
- Bruno K. Rodiño-Janeiro, María Vicario, Carmen Alonso-Cotoner, Roberto Pascua-García, & Javier Santos. (2018). A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Advances in Therapy*.
- Buhner S, Hahne H, Hartwig K, Li Q, Vignali S, & Ostertag D. (2018). Protease signaling through protease activated receptor 1 mediate nerve activation by mucosal supernatants from irritable bowel syndrome but not from ulcerative colitis patients. *PLoS One*.
- Buhner, S., Li, Q., Vignali, S., Barbara, G., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Cremon, C., Zeller, F., Langer, R., Daniel, H., Michel, K., & Schemann, M. (2009). Activation of Human Enteric Neurons by Supernatants of Colonic Biopsy Specimens From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 137(4), 1425–1434. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.005>
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Casén, C., Vebø, H. C., Sekelja, M., Hegge, F. T., Karlsson, M. K., Cierniejewska, E., Dzankovic, S., Frøyland, C., Nestestog, R., Engstrand, L., Munkholm, P., Nielsen, O. H., Rogler, G., Simrén, M., Öhman, L., Vatn, M. H., & Rudi, K. (2015). Deviations in human gut microbiota: A novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(1), 71–83. <https://doi.org/10.1111/apt.13236>
- Castro, J., Harrington, A. M., Hughes, P. A., Martin, C. M., Ge, P., Shea, C. M., Jin, H., Jacobson, S., Hannig, G., Mann, E., Cohen, M. B., Macdougall, J. E., Lavins, B. J., Kurtz, C. B., Silos-Santiago, I., Johnston, J. M., Currie, M. G., Blackshaw, L. A., & Brierley, S. M. (2013). Linaclotide inhibits colonic nociceptors and relieves abdominal pain via guanylate cyclase-C and extracellular cyclic guanosine 3',5'- monophosphate. *Gastroenterology*, 145(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.017>

- Cenac, N., Andrews, C. N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N. W., Sharkey, K. A., Ferraz, J. G. P., Shaffer, E., & Vergnolle, N. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 636–647. <https://doi.org/10.1172/JCI29255>
- Chong, P. P., Chin, V. K., Looi, C. Y., Wong, W. F., Madhavan, P., & Yong, V. C. (2019). The microbiome and irritable bowel syndrome - A review on the pathophysiology, current research and future therapy. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01136>
- Codling, C., O'Mahony, L., Shanahan, F., Quigley, E. M. M., & Marchesi, J. R. (2010). A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(2), 392–397. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0934-x>
- Collins, S. M. (2014a). A role for the gut microbiota in IBS. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 11, Issue 8, pp. 497–505). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.40>
- Collins, S. M. (2014b). A role for the gut microbiota in IBS. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 11, Issue 8, pp. 497–505). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.40>
- Collins, S. M., Kassam, Z., & Bercik, P. (2013). The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: experimental evidence and clinical implications. *Curr. Opin. Microbiol.*
- Daniela Jodorkovsky. (2023). What is IBS? In *Division of Digestive and Liver Diseases*.
- Devanarayana NM, Rajindrajith S, & Benninga MA. (2014). Quality of life and health care consultation in 13 to 18 year olds with abdominal pain predominant functional gastrointestinal diseases. *BMC Gastroenterol.*
- Dothel, G., Barbaro, M. R., Boudin, H., Vasina, V., Cremon, C., Gargano, L., Bellacosa, L., De Giorgio, R., Le Berre-Scul, C., Aubert, P., Neunlist, M., De Ponti, F., Stanghellini, V., & Barbara, G. (2015). Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 148(5), 1002-1011.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.042>
- Dothel, G., Barbaro, M. R., Di Vito, A., Ravegnini, G., Gorini, F., Monesmith, S., Coschina, E., Benuzzi, E., Fuschi, D., Palombo, M., Bonomini, F., Morroni, F., Hrelia, P., Barbara, G., & Angelini, S. (2023). New insights into irritable bowel syndrome pathophysiological mechanisms: contribution of epigenetics. In *Journal of Gastroenterology* (Vol. 58, Issue 7, pp. 605–621). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00535-023-01997-6>
- Eijsbouts, C., Zheng, T., Kennedy, N. A., Bonfiglio, F., Anderson, C. A., Moutsianas, L., Holliday, J., Shi, J., Shringarpure, S., Agee, M., Aslibekyan, S., Auton, A., Bell, R. K., Bryc, K., Clark, S. K., Elson, S. L., Fletez-Brant, K., Fontanillas, P., Furlotte, N. A., ... Parkes, M. (2021). Genome-wide analysis of 53,400 people with irritable bowel syndrome highlights

- shared genetic pathways with mood and anxiety disorders. *Nature Genetics*, 53(11), 1543–1552. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00950-8>
- Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A. D., Fukudo, S., Mayer, E. A., Niesler, B., Quigley, E. M. M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., Schwille-Kiuntke, J., Simren, M., Zipfel, S., & Spiller, R. C. (2016). Irritable bowel syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.14>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141). <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Farup PG, Rudi K, & Hestad K. (2016). Faecal shortchain fatty acids: a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? . *BMC Gastroenterol.* .
- Flik, C. E., Laan, W., Smout, A. J., Weusten, B. L., & de Wit, N. J. (2015). Comparison of medical costs generated by IBS patients in primary and secondary care in the Netherlands. . *BMC Gastroenterol.*
- Fond, G., Loundou, A., Hamdani, N., Boukouaci, W., Dargel, A., Oliveira, J., Roger, M., Tamouza, R., Leboyer, M., & Boyer, L. (2014). Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 264(8), 651–660. <https://doi.org/10.1007/s00406-014-0502-z>
- Ford, A. C., Marwaha, A., Lim, A., & Moayyedi, P. (2010). Systematic review and meta-analysis of the prevalence of irritable bowel syndrome in individuals with dyspepsia. . *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* .
- Ford, A. C., Moayyedi, P., Lacy, B. E., Lembo, A. J., Saito, Y. A., Schiller, L. R., Soffer, E. E., Spiegel, B. M. R., & Quigley, E. M. M. (2014). American college of gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation. *American Journal of Gastroenterology*, 109(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.187>
- Ford, A. C., Sperber, A. D., Corsetti, M., & Camilleri, M. (2020). Irritable bowel syndrome. In *The Lancet* (Vol. 396, Issue 10263, pp. 1675–1688). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31548-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31548-8)
- Ford, A. C., & Talley, N. J. (2011). Mucosal inflammation as a potential etiological factor in irritable bowel syndrome: a systematic review. . *J. Gastroenterol.*
- Giovanni Dothel, Maria Raffaella Barbaro, Aldo Di Vito, Gloria Ravegnini, Francesca Gorini, Sarah Monesmith, Emma Coschina, Eva Benuzzi, Daniele Fuschi, Marta Palombo, Francesca Bonomini, Fabiana Morroni, Patrizia Hrelia, Giovanni Barbara, & Sabrina Angelini. (2023). New insights into irritable bowel syndrome pathophysiological mechanisms: contribution of epigenetics. *Journal of Gastroenterology* .
- Gwee, K. A. (2005). Irritable bowel syndrome in developing countries — a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterol. Motil.*

- Halder, S. L. S., Locke, G. R., Schleck, C. D., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J., & Talley, N. J. (2007). Natural History of Functional Gastrointestinal Disorders: A 12-year Longitudinal Population-Based Study. *Gastroenterology*, 133(3). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.010>
- Halmos, E. P., Power, V. A., Shepherd, S. J., Gibson, P. R., & Muir, J. G. (2015). A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. . *Gastroenterology*.
- Hayes, P. A., Fraher, M., & Quigley, E. M. (2014). Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol. Hepatol* .
- Husebye, E., Hellstrom, P. M., Sundler, F., Chen, J., & Midtvedt, T. (2001). Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*.
- Islam, K. U., & Iqbal, J. (2020). An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.560616>
- Jae Hak Kim, Eugenia Lin, & Mark Pimentel. (2017). Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*.
- Janssens, K. A., Zijlema, W. L., Joustra, M. L., & Rosmalen, J. G. (2015). Mood and anxiety disorders in chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and irritable bowel syndrome: results from the LifeLines Cohort study. . *Psychosom. Med*.
- Jeffery, I. B., Das, A., O'Herlihy, E., Coughlan, S., Cisek, K., Moore, M., Bradley, F., Carty, T., Pradhan, M., Dwibedi, C., Shanahan, F., & O'Toole, P. W. (2020). Differences in Fecal Microbiomes and Metabolomes of People With vs Without Irritable Bowel Syndrome and Bile Acid Malabsorption. *Gastroenterology*, 158(4), 1016-1028.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.301>
- John Greg Howe. (2018). Principles of Molecular Biology. *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*.
- Jones MP, Chey WD, Singh S, Gong H, Shringarpure R, & Hoe N. (2014). A biomarker panel and psychological morbidity differentiates the irritable bowel syndrome from health and provides novel pathophysiological leads. . *Aliment Pharmacol Ther*.
- JR Crowther. (2008). *The ELISA guidebook*.
- K Van den Houte, F Carbone, J Pannemans, M Corsetti, B Fischler, H Piessevaux, & J Tack. (2018). Prevalence and impact of self-reported irritable bowel symptoms in the general population. *Sage Journals Home*.
- Kapsoritakis, A. N., Kapsoritaki, A. I., Davidi, I. P., Lotis, V. D., Manolakis, A. C., Mylonis, P. I., Theodoridou, A. T., Germenis, A. E., & Potamianos, S. P. (2008). Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-8-55>

- Kolmodin, L. A., & Williams, J. F. (1997). PCR Basic Principles and Routine Practice. *PCR Cloning Protocols*.
- Leah H. Biller, & Deborah Schrag. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA*.
- Lebwohl, B., & Rubio-Tapia, A. (2021). Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. In *Gastroenterology* (Vol. 160, Issue 1, pp. 63–75). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>
- Li, W., Dowd, S. E., Scurlock, B., Acosta-Martinez, V., & Lyte, M. (2011). Memory and learning behavior in mice is temporally associated with diet-induced alterations in gut bacteria. *Physiol. Behav.*
- Liao XJ, Mao WM, Wang Q, Yang GG, Wu WJ, & Shao SX. (2016). MicroRNA-24 inhibits serotonin reuptake transporter expression and aggravates irritable bowel syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* .
- Linsalata, M., Riezzo, G., D’Attoma, B., Clemente, C., Orlando, A., & Russo, F. (2018). Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: A case-control study. *BMC Gastroenterology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-018-0888-6>
- Lovell, R., & Ford, A. C. (2012). Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*
- M. P. Jones, W. D. Chey, S. Singh, H. Gong, R. Shringarpure, N. Hoe, E. Chuang, & N. J. Talley. (2014). A biomarker panel and psychological morbidity differentiates the irritable bowel syndrome from health and provides novel pathophysiological leads. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* .
- Madisch, A., Holtmann, G., Plein, K., & Hotz, J. (2004). Treatment of irritable bowel syndrome with herbal preparations: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*
- Mahurkar, S., Polytarchou, C., Iliopoulos, D., Pothoulakis, C., Mayer, E. A., & Chang, L. (2016). Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood mononuclear cells in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 28(3), 410–422.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12741>
- Malinen, E., Rinttilä, T., Kajander, K., Mättö, J., Kassinen, A., Krogus, L., Saarela, M., Korpela, R., & Palva, A. (2005). Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *American Journal of Gastroenterology*, 100(2), 373–382. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.40312.x>
- Mark Pimentel, & Anthony Lembo. (2020). Microbiome and Its Role in Irritable Bowel Syndrome. *Digestive Diseases and Sciences* .
- Mazurak, N., Broelz, E., Storr, M., & Enck, P. (2013). Probiotic therapy in the irritable bowel syndrome — why is the evidence for clinical efficacy still poor and what can be done about it? . *J. Neurogastroeterol. Motil.*

- Meijer, M. J., Mieremet-Ooms, M. A., van Hogezaand, R. A., BHW Lamers, C., Hommes, D. W., Verspaget wwwwjgnetcom, H. W., & Verspaget, H. W. (2007). Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 13(21), 2960–2966. www.wjgnet.com
- Menees, S. B., Maneerattannaporn, M., Kim, H. M., & Chey, W. D. (2012). The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol*.
- Menees, S. B., Powell, C., Kurlander, J., Goel, A., & Chey, W. D. (2015). A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am. J. Gastroenterol*.
- Michael Camilleri. (2021). Diagnosis and Treatment of Irritable Bowel Syndrome A Review. *JAMA*.
- Mohammad BY, Dohouky LA, & Mohammed AA. (2019). Prevalence of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with irritable bowel syndrome in Duhok city. *J Coloproctol*.
- Montalto M, Gallo A, Santoro L, D'Onofrio F, Landolfi R, & Gasbarrini A. (2013). Role of fecal calprotectin in gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.
- Mujagic, Z., Tigchelaar, E. F., Zhernakova, A., Ludwig, T., Ramiro-Garcia, J., Baranska, A., Swertz, M. A., Masclee, A. A. M., Wijmenga, C., Van Schooten, F. J., Smolinska, A., & Jonkers, D. M. A. E. (2016). A novel biomarker panel for irritable bowel syndrome and the application in the general population. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26420>
- Mujagic Z, Tigchelaar EF, Zhernakova A, Ludwig T, Ramiro-Garcia J, & Baranska A. (2016). A novel biomarker panel for irritable bowel syndrome and the application in the general population. *Sci Rep*.
- Müller, S., Styner, M., Seibold-Schmid, B., Flogerzi, B., Konrad, A., Seibold, F., & Mähler, M. (2005). • CLINICAL RESEARCH •. *World J Gastroenterol*, 11(44), 6988–6994. www.wjgnet.com
- Nakov, R., Snegarova, V., Dimitrova-Yurukova, D., & Velikova, T. (2022). Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome: Biological Rationale and Diagnostic Value. In *Digestive Diseases* (Vol. 40, Issue 1, pp. 23–32). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000516027>
- Natarajan N, & Pluznick JL. (2014). From microbe to man: the role of microbial short chain fatty acid metabolites in host cell biology. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- National Institute of Health and Care Excellence. (2008). *Irritable bowel syndrome in adults: diagnosis and management of irritable bowel syndrome in primary care*. NICE [Online], [Http://www.nice.org.uk/Guidance/Cg61/Documents](http://www.nice.org.uk/Guidance/Cg61/Documents).

- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.*
- Nicolas G Rey de Castro, Vivien Miller, Helen R Carruthers, & Peter J Whorwell. (2014). Irritable bowel syndrome: A comparison of subtypes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.*
- Niranga Manjuri Devanarayana, & Shaman Rajindrajith. (2018). Irritable bowel syndrome in children: Current knowledge, challenges and opportunities. *World J Gastroenterol.*
- Ohman, L., & Simren, M. (2010). Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*
- Öhman L, Stridsberg M, Isaksson S, Jerlstad P, & Simrén M. (2012). Altered levels of fecal chromogranins and secretogranins in IBS: relevance for pathophysiology and symptoms? *Am J Gastroenterol.*
- Park HJ. (2016). Dysregulated microRNA expression in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil.*
- Pimentel, M., Chow, E. J., & Lin, H. C. (2014). Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.*
- Pimentel, M., Hwang, L., Melmed, G. Y., Low, K., Vasiliauskas, E., Ippoliti, A., Yang, J., Lezcano, S., Conklin, J. L., & Sahakian, A. (2010). New clinical method for distinguishing D-IBS from other gastrointestinal conditions causing diarrhea: The LA/IBS diagnostic strategy. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(1), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0694-z>
- Pimentel, M., Lembo, A., Chey, W. D., Zakko, S., Ringel, Y., Yu, J., Mareya, S. M., Shaw, A. L., Bortey, E., & Forbes, W. P. (2011). Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation A B S T R A C T. In *n engl j med* (Vol. 364).
- Pimentel, M., Morales, W., Rezaie, A., Marsh, E., Lembo, A., Mirocha, J., Leffler, D. A., Marsh, Z., Weitsman, S., Chua, K. S., Barlow, G. M., Bortey, E., Forbes, W., Yu, A., & Chang, C. (2015a). Development and validation of a biomarker for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in human subjects. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126438>
- Pimentel, M., Morales, W., Rezaie, A., Marsh, E., Lembo, A., Mirocha, J., Leffler, D. A., Marsh, Z., Weitsman, S., Chua, K. S., Barlow, G. M., Bortey, E., Forbes, W., Yu, A., & Chang, C. (2015b). Development and validation of a biomarker for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in human subjects. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126438>
- Pimentel, M., Soffer, E. E., Chow, E. J., Kong, Y., & Lin, H. C. (2002). Lower frequency of MMC is found in IBS subjects with abnormal lactulose breath test, suggesting bacterial overgrowth. *Dig. Dis. Sci. Dig. Dis. Sci.*
- Posserud, I., Stotzer, P. O., Björnsson, E. S., Abrahamsson, H., & Simren, M. (2007). Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut.*

- Priya Oka, Heather Parr, Brigida Barberio, Christopher J Black, Edoardo V Savarino, & Alexander C Ford. (2020). Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*.
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H. G. H. J., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., & De Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>
- Raza, K., & Ahmad, S. (2016). *Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: a review*. <https://www.researchgate.net/publication/304018425>
- Rex, D. K., Johnson, D. A., Anderson, J. C., Schoenfeld, P. S., Burke, C. A., & Inadomi, J. M. (2009). American college of gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2008. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 104, Issue 3, pp. 739–750). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.104>
- Rin, T. (2011a). *Real-Time PCR : A Molecular Approach to Investigate the Role of Intestinal Microbiota in the Pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome*.
- Rin, T. (2011b). *Real-Time PCR : A Molecular Approach to Investigate the Role of Intestinal Microbiota in the Pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome*.
- Ringstrom, G., Abrahamsson, H., Strid, H., & Simren, M. (2007). Why do subjects with irritable bowel syndrome seek health care for their symptoms? *Scand. J. Gastroenterol.*
- Rinttilä, T., Lyra, A., Krogius-Kurikka, L., & Palva, A. (2011). Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects. *Gut Pathogens*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-6>
- ROME FOUNDATION. (2021). *Rome IV Criteria*. ROME FOUNDATION .
- Russo, F., Chimienti, G., Riezzo, G., Linsalata, M., D’Attoma, B., Clemente, C., & Orlando, A. (2018). Adipose tissue-derived biomarkers of intestinal barrier functions for the characterization of diarrhoea-predominant IBS. *Disease Markers*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1827937>
- S. MAHURKAR, C. POLYTARCHOU, D. ILIOPOULOS, C. POTHOUKAKIS, E. A. MAYER, & L. CHANG. (2016). Genome-wide DNA methylation profiling of peripheral blood mononuclear cells in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.*
- Sagar Aryal. (2022). *Next-Generation Sequencing (NGS)- Definition, Types*. Microbe Notes.
- Salonen, A., de Vos, W. M., & Palva, A. (2010). Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology*.
- Sarah Khan, & Lin Chang. (2010). Diagnosis and management of IBS. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.

- Seyedmehdi Seyedmiraee, Mohammad Mahdi Hayatbakhsh, Bizhan Ahmadi, Nadih Baniasadi, Afshin Mohammad Bagheri Rafsanjani, Amin Reza Nikpoor, & Mojgan Mohammadi. (2016). Serum immune biomarkers in irritable bowel syndrome. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*.
- Singh, P., & Lembo, A. (2021). Emerging Role of the Gut Microbiome in Irritable Bowel Syndrome. In *Gastroenterology Clinics of North America* (Vol. 50, Issue 3, pp. 523–545). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.03.003>
- Soh, J. S., & et al. (2015). The Diagnostic Value of a Digital Rectal Examination Compared With High-Resolution Anorectal Manometry in Patients With Chronic Constipation and Fecal Incontinence. *American Journal of Gastroenterology*.
- Sood, R., Law, G. R., & Ford, A. C. (2014). Diagnosis of IBS: symptoms, symptom-based criteria, biomarkers or 'psychomarkers'? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*.
- T Piche, G Barbara, P Aubert, S Bruley des Varannes, R Dainese, J L Nano, C Cremon, V Stanghellini, R De Giorgio, J P Galmiche, & M Neunlist. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Neurogastroenterology*.
- Tack, J., van Outryve, M., Beyens, G., Kerstens, R., & Vandeplasse, L. (2009). Prucalopride (Resolor) in the treatment of severe chronic constipation in patients dissatisfied with laxatives. *Gut*.
- Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, & Fukudo S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. . *Neurogastroenterol Motil*.
- Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., Le Nevé, B., Öhman, L., & Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 152(1), 111-123.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.049>
- Thabane, M., Kottachchi, D. T., & Marshall, J. K. (2007). Systematic review and meta-analysis: the incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.*
- Vich Vila, A., Imhann, F., Collij, V., Jankipersadsing, S. A., Gurry, T., Mujagic, Z., Kurilshikov, A., Jan Bonder, M., Jiang, X., Tigchelaar, E. F., Dekens, J., Peters, V., Voskuil, M. D., Visschedijk, M. C., van Dullemen, H. M., Keszthelyi, D., Swertz, M. A., Franke, L., Alberts, R., ... Weersma, R. K. (2018). Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 10). <http://stm.sciencemag.org/>
- Vijayvargiya, P., Camilleri, M., Shin, A., & Saenger, A. (2013). Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice. . *Clin. Gastroenterol. Hepatol*.
- W Kruis, C Thieme, M Weinzierl, P Schüssler, J Holl, & W Paulus. (1984). A diagnostic score for the irritable bowel syndrome. Its value in the exclusion of organic disease. *Gastroenterology* .

Wilder-Smith, C. H., Materna, A., Wermelinger, C., & Schuler, J. (2013). Fructose and lactose intolerance and malabsorption testing: the relationship with symptoms in functional gastrointestinal disorder. *Aliment. Pharmacol. Ther.*

William D. Chey, Jacob Kurlander, & Shanti Eswaran. (2015). Irritable Bowel Syndrome A Clinical Review. *JAMA*.

Zhou Q, Costinean S, Croce CM, Brasier AR, Merwat S, & Larson SA. (2015). MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability. . *Gastroenterology*.

Zhuang, X., Tian, Z., Li, L., Zeng, Z., Chen, M., & Xiong, L. (2018). Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01600>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.