



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ TLR4
(RS5030728) ΚΑΙ Η ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΝΤΙ-TNF α ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΥΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Pharmacogenetic association study of TLR4 (rs5030728) polymorphism in IBD patients
under biological treatment with anti- TNF α therapies

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΡΙΚΚΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ - ΝΕΚΤΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Βασιλόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Τμήμα Βιολογίας

Πανεπιστήμιο Πάτρας

Ιωάννης Βιζιριανάκης

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής Τμήμα
Φαρμακευτικής

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Στάγκος Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
I ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΑΥΤΟΑΝΟΣΟ ΝΟΣΗΜΑ.....	9
1.2 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ(ΙΦΝΕ).....	9
1.3 ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN.....	11
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	13
1.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	16
1.5.1 ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ.....	17
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	18
1.6.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	19
1.6.2 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ.....	20
ADALIMUMAB.....	21
INFLIXIMAB.....	21
ANTI-TNF α	22
ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ANTI-TNF α : ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΣ.....	23
1.7 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	23
1.7.1 NF- κ B.....	25
TLR4.....	28
II ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
2.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	32
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	32
ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	32
2.2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA.....	32
2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA.....	33
2.2.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ.....	34
2.2.5 ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	34
2.3 REAL- TIME PCR.....	35

2.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΑQΜΑΝ.....	36
2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	37
2.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
2.5.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	38
2.5.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ.....	38
2.6 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ.....	40
2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΝΤΙ- TNF α	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Crohn αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση ασθένεια που ανήκει στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσους του Εντέρου (ΙΦΝΕ). Η εμφάνιση της νόσου οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως πολυμορφισμοί στο γονίδιο NOD2/CARD15 και το εντερικό μικροβίωμα αντίστοιχα. Χαρακτηρίζεται από συνεχείς εξάρσεις και υφέσεις καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου, επηρεάζοντας όλο το γαστρεντερικό σωλήνα του ασθενούς.

Δεδομένης της σοβαρότητας των συμπτωμάτων της νόσου, πολλαπλές θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί με σκοπό τη μείωση των συμπτωμάτων της, με βασικότερες τις anti-TNFα θεραπείες, οι οποίες στοχεύουν στη δέσμευση της προφλεγμονώδης κυτταροκίνης TNFα. Παρά τη μεγάλη αποτελεσματικότητα των θεραπειών αυτών, ένα ποσοστό κοντά στο 30% φαίνεται να μην έχει ανταπόκριση στη θεραπεία και μάλιστα, σε μερικές περιπτώσεις, να εμφανίζει και σοβαρές παρενέργειες. Η φαρμακογενετική, ως έννοια, εξετάζει τις παραλλαγές της αλληλουχίας του DNA σε σχέση με τη φαρμακευτική απόκριση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η μελέτη του πολυμορφισμού rs5030728 στο γονίδιο TLR4 σε ασθενείς με νόσο του Crohn που έλαβαν φαρμακευτική αγωγή με βιολογικούς παράγοντες anti-TNFα.

Συγκεντρώθηκαν 48 δείγματα με Crohn από 3 διαφορετικά ελληνικά νοσοκομεία που έλαβαν είτε Infliximab είτε Adalimumab. Η ποσοτικοποίηση της ανταπόκρισης των ασθενών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κλινικού δείκτη CDAI. Η γονοτύπηση του rs5030728 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές συχνότητες μεταξύ ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων στη θεραπεία. Οι μελέτες των υποομάδων ασθενών, ανάλογα με τον διαφορετικό παράγοντα που έλαβαν, δεν έδειξε επίσης καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.

Παρά το γεγονός πως σε καμία από τις 3 υποομάδες που αναλύθηκαν δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, το μικρό δείγμα πληθυσμού που συμμετείχε στην παρούσα μελέτη αναδεικνύει την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης της συμμετοχής του rs5030728 στην ανταπόκριση στη θεραπεία με anti-TNFα σε ασθενείς με Crohn.

ABSTRACT

Crohn's Disease is a chronic autoimmune disease belonging to the Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases (IBD). The disease's onset lies due to a combination of genetic and environmental factors, such as polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene and the intestinal microbiome respectively. Crohn's disease is characterized by continuous outbreaks and remissions throughout an individual's life, affecting their entire gastrointestinal tract.

Given the severity of the symptoms of the disease, multiple therapeutic approaches have been implemented to reduce its symptoms, most notably anti-TNF α therapies, which aim to block the proinflammatory cytokine TNF α . Despite the effectiveness of these treatments, a percentage close to 30% does not seem to respond and even, in some cases, show serious side effects. Pharmacogenetics, as a research field, examines variants of the DNA sequence in relation to the drug response.

The aim of the present dissertation was to study the rs5030728 polymorphism mapped in the TLR4 gene in patients with Crohn's disease who were treated with biological anti-TNF α agents.

48 Crohn's disease samples were collected from 3 different Greek hospitals, that received either Infliximab either Adalimumab. Patient response was quantified using the CDAI clinical index. Genotyping of rs5030728 was performed by the polymerase chain reaction (PCR).

The results of the present study did not show statistically significant different frequencies between responders and non-responders. Subgroups based on the different biological factor did not also show any statistically significant difference.

Despite there was no statistically significant association in any of the 3 subgroups analyzed, the small sample size in the present study highlights the need to further investigate the involvement of rs5030728 in the response to anti-TNF α therapy in Crohn's disease.

ABS

Ι ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΥΤΟΑΝΟΣΟ ΝΟΣΗΜΑ

Η αυτοάνοση ασθένεια εμφανίζεται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στα μόρια ως αποτέλεσμα της διάσπασης της ανοσολογικής ανοχής στα αυτοαντιδραστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολλές αυτοάνοσες διαταραχές έχουν συνδεθεί έντονα με γενετικούς, μολυσματικούς και / ή περιβαλλοντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες. Περιλαμβάνει πολλαπλές διαταραχές και συμπτώματα που κυμαίνονται από ειδικά για όργανα έως συστηματικά, αυτοάνοσα νοσήματα περιλαμβάνουν σακχαρώδη διαβήτη που εξαρτάται από την ινσουλίνη, ρευματοειδή αρθρίτιδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, σκληρόδερμα, θυρεοειδίτιδα και σκλήρυνση κατά πλάκας. Υπάρχουν επίσης επιπτώσεις της αυτοάνοσης παθολογίας σε κοινά προβλήματα υγείας όπως η αρτηριοσκλήρωση, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η σχιζοφρένεια και ορισμένοι τύποι υπογονιμότητας. Σε μεγάλο βαθμό άγνωστης αιτιολογίας, οι αυτοάνοσες διαταραχές επηρεάζουν περίπου το 3% των πληθυσμών της Βόρειας Αμερικής και της Ευρώπης,> 75% αυτών που επηρεάζονται είναι γυναίκες. Αυτή η συζήτηση παρέχει μια σύντομη εισαγωγή στο ανοσοποιητικό σύστημα και τη διατήρηση της ανοχής, μια επισκόπηση επιλεγμένων αυτοάνοσων ασθενειών και πιθανών μηχανισμών ανοσοαντιδραστικότητας και μια ανασκόπηση πειραματικών αυτοάνοσων μοντέλων.(D A Smithand D R Germolec . 1999.)

Οι αυτοάνοσες αντιδράσεις αντανακλούν μια ανισορροπία μεταξύ των τελεστών και των ρυθμιστικών ανοσολογικών αποκρίσεων, που συνήθως αναπτύσσονται στα στάδια έναρξης και πολλαπλασιασμού και συχνά εμφανίζουν φάσεις ανάλυσης (που υποδεικνύονται από κλινικές υποχωρήσεις) και παροξύνσεις (που υποδεικνύονται από συμπτωματικές εξάρσεις). Ο θεμελιώδης υποκείμενος μηχανισμός αυτοανοσίας είναι η ελαττωματική αποβολή ή/και ο έλεγχος των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Μελέτες σε ανθρώπους και πειραματικά μοντέλα ζώων αποκαλύπτουν τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην αυτοανοσία. Ένας κύριος στόχος της έρευνας σε αυτόν τον τομέα είναι να αξιοποιηθεί αυτή η γνώση για να κατανοηθεί καλύτερα η παθογένεια των αυτοάνοσων ασθενειών και να αναπτυχθούν στρατηγικές για την αποκατάσταση της φυσιολογικής ισορροπίας μεταξύ αποτελεσματικών και ρυθμιστικών ανοσολογικών αποκρίσεων.(Michael D. Rosenblum, Kelly A. Remedios, and Abul K. Abbas.2015)

Έχουν υπάρξει σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση της ανθρώπινης αυτοάνοσης που οδήγησαν σε βελτιώσεις στην ταξινόμηση και τη διάγνωση και, το πιο σημαντικό, στην ερευνητική πρόοδο σε νέες θεραπείες. Η σημασία της αυτοανοσίας και οι μηχανισμοί που οδηγούν σε κλινικές ασθένειες αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά πριν από περίπου 50 χρόνια μετά από τις πρωτοποριακές μελέτες του Macfarlane Burnett και την υπόθεση του βραβευμένου με Νόμπελ για τον «απαγορευμένο κλώνο». Τέτοιες πρωτοποριακές προσπάθειες οδήγησαν σε καλύτερη κατανόηση όχι μόνο της αυτοάνοσης, αλλά και της ανάπτυξης των λεμφοειδών κυττάρων, της θυμικής εκπαίδευσης, της απόπτωσης και της διαγραφής των αυτοαντιδραστικών κυττάρων.

Σύγχρονες θεωρίες υποδηλώνουν ότι η ανάπτυξη μιας αυτοάνοσης νόσου απαιτεί γενετική προδιάθεση και περιβαλλοντικούς παράγοντες που πυροδοτούν τις ανοσολογικές οδούς που οδηγούν, τελικά, στην καταστροφή των ιστών. Παρά την εκτεταμένη έρευνα, δεν υπάρχουν γενετικά εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά για να προβλέψουν τον κίνδυνο αυτοάνοσων νοσημάτων. Πράγματι, η αντιστοιχία αυτοάνοσων νοσημάτων σε πανομοιότυπα δίδυμα είναι 12-67%, υπογραμμίζοντας όχι μόνο τον ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων, αλλά και τη δυναμική σημασία των στοχαστικών ή επιγενετικών φαινομένων. Από την άλλη πλευρά, η ταυτοποίηση των κυτοκινών και των χημειοκινών, και των συγγενών τους υποδοχέων, οδήγησε σε νέες θεραπείες που εμποδίζουν τις παθολογικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο όργανο στόχο και έχουν βελτιώσει σημαντικά το θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, ιδιαίτερα ρευματοειδή αρθρίτιδα. Περαιτέρω προόδους που περιλαμβάνουν τη χρήση πλατφορμών πολλαπλής για τη διάγνωση και τον προσδιορισμό νέων θεραπευτικών παραγόντων θα πρέπει να οδηγήσουν σε σημαντικές ανακαλύψεις μέσα στην επόμενη δεκαετία. (Wang, Fu-Sheng Wang, M. Eric Gershwin. 2015.)

Οι αυτοάνοσες ασθένειες ποικίλλουν ευρέως σε διαφορετικούς πληθυσμούς εμφανίζοντας τόσο γεωγραφικές όσο και χρονικές παραλλαγές. Η νόσος του Crohn δεν περιγράφηκε μέχρι το 1932 (Crohn et al., 1932). Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι επίσης σχετικά νέα και λιγότερο συχνή από άλλες μορφές αρθρίτιδας που εκδηλώνονται σε σκελετικά υπολείμματα του Παλαιού Κόσμου (Woods and Rothschild, 1988). Η επίπτωση της νόσου του Crohn αυξάνεται σε αρκετές γεωγραφικές περιοχές. Στο κεντρικό Ισραήλ, η επίπτωση αυξήθηκε από 0,33/100.000 το 1970 σε 3.1/100.000 το 1979 (Fireman et al., 1989). Σε παρόμοιες περιόδους, οι αυξήσεις έχουν καταγραφεί στην Αλμπέρτα του Καναδά (Pinchbeck et al., 1988) και στη βόρεια Ευρώπη (Binder, 1988), υποδηλώνοντας μια ξενοβιοτική ή μολυσματική περιβαλλοντική συμβολή. Οι τάσεις και οι γεωγραφικές παραλλαγές είναι χρήσιμες, αν είναι δύσκολες, στη διευκρίνιση της επιδημιολογίας και της αιτιολογίας των αυτοάνοσων νοσημάτων. (National Research Council (US) Subcommittee on Immunotoxicology.1992).

1.2 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ(ΙΦΝΕ)

Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου αποτέλεσαν μεγάλο ενδιαφέρον για γενιές γαστρεντερολόγων. Αν και οι κλινικές περιγραφές της διάρροιας με ή χωρίς αίμα χρονολογούνται χιλιάδες χρόνια πίσω, σαφείς διακρίσεις μεταξύ εντερίτιδας και ελκώδους κολίτιδας ήταν δυνατές μόνο τον 19ο αιώνα. Εκείνη την εποχή, δημοσιεύθηκαν πολλές αναφορές περιπτώσεων, εκ των υστέρων, για την κλασική περιφερειακή εντερίτιδα. Ο όρος "ελκώδης κολίτιδα" χρονολογείται από το 1888. Η εισαγωγή του ηλεκτρικού σιγμοειδοσκοπίου αμέσως μετά κατέστησε δυνατή τη σωστή διάγνωση της ελκώδους κολίτιδας και τη διάκριση από μολυσματική δυσεντερία, μεμβρανώδη βλεννώδη ή καταρροϊκή κολίτιδα και νευρική διάρροια. Το 1870 – 1880 οι γιατροί στο Νοσοκομείο Mount Sinai υιοθέτησαν αυτή τη διαγνωστική προσέγγιση ενώ ασχολήθηκαν με ιδιαίτερα για ασθενείς με ειλεοκεφαλική νόσο που μοιάζει με φυματίωση χωρίς βακίλους του φυματίου. Τα άρθρα γράφτηκαν από τον Weiner το 1914, τον Moschowitz και τον Wilensky το

1923 και το 1927 και τους Goldfarb και Suissman το 1931. Στις 13 Μαΐου 1932, ο Δρ Crohn παρουσίασε ένα έγγραφο με τίτλο "Terminal Ileitis" στην Αμερικανική Ιατρική Ένωση. Αυτό δημοσιεύτηκε αργότερα εκείνο το έτος με τον τίτλο "Regional Ileitis: A Pathologic and Chronic Entity", υπό την συγγραφή των Crohn, Ginzburg και Oppenheimer.(The Mount Sinai Journal of Medicine, 01 May 2000.)

Το γονίδιο *CARD15* έχει συσχετιστεί με την ΙΦΝΕ, αλλά λόγω των πολυμορφικών χαρακτηριστικών του δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί ποιο μέρος της γαστρεντερικής οδού θα επηρεαστεί. Ο ρόλος των γονιδίων στην ελκώδη κολίτιδα δεν είναι τόσο ισχυρός όσο στον Crohn. (StatPearlsPublishing, 2021).

Η νόσος του Crohn είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD εν συντομογραφία στα αγγλικά), που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Crohn, Ginsberg και Oppenheimer το 1932. Συνήθως παρουσιάζεται ως διαπλαστική κοκκιωματώδης φλεγμονή που επηρεάζει το γαστρεντερικό σωλήνα, συχνότερα τον ειλεό, το κόλον ή και τα δύο. Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στη Βόρεια Αμερική, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη βόρεια Ευρώπη. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν χρόνια διάρροια, που συχνά συνοδεύεται από κοιλιακό άλγος, απώλεια βάρους και αίμα ή βλέννα στα κόπρανα. Οι εξω -εντερικές εκδηλώσεις της IBD εμφανίζονται γενικά στο 25 έως 40%. Οι φλεγμονώδεις εκδηλώσεις μπορούν επίσης να εμφανιστούν έξω από το γαστρεντερικό σωλήνα στο δέρμα, τα μάτια, το συκώτι και τις αρθρώσεις. Η νόσος του Crohn διαγιγνώσκεται κλινικά με βάση κλινικά σημεία και συμπτώματα, απεικόνιση, συμπεριλαμβανομένης της ενδοσκοπικής με βιοψία και πληροφορίες ιστού εκτός από εργαστηριακά αποτελέσματα.(StatPearlsPublishing, 2021).

Οι εντερικές επιπλοκές της νόσου του Crohn περιλαμβάνουν απόφραξη και διάτρηση του λεπτού εντέρου ή του παχέος εντέρου, αποστήματα, συρίγγια, εντερική αιμορραγία και στένωση. Οι στενώσεις είναι στενωμένα τμήματα του εντέρου που συνήθως οδηγούν σε απόφραξη του εντέρου και μπορεί να είναι εξουθενωτικά σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Η στένωση είναι μια χειρουργική επέμβαση που ανακουφίζει από τη στένωση του εντέρου λόγω του σχηματισμού ουλώδους ιστού που συσσωρεύεται συνήθως στο εντερικό τοίχωμα από επανειλημμένη φλεγμονή και επούλωση. Είναι μια ασφαλής και αποτελεσματική διαδικασία που θα διατηρήσει το μήκος του εντέρου και θα αποτρέψει τις μεταβολικές επιπλοκές που σχετίζονται με το σύνδρομο του βραχέος εντέρου σε ασθενείς με συμπτωματική απόφραξη. (StatPearlsPublishing, 2021)

Μέχρι σήμερα, η αιτία του ΙΦΝΕ παραμένει ένα μυστήριο. Πολλές αιτίες έχουν ενοχοποιηθεί, αλλά καμία δεν είναι καθολικά παρούσα σε όλους τους ασθενείς. Το ένα σταθερό χαρακτηριστικό της νόσου Crohn είναι ότι έχει ισχυρή σχέση με τον καπνό. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι το κάπνισμα προστατεύει από την ελκώδη κολίτιδα. Ο ρόλος της διατροφής παραμένει συζητήσιμος.

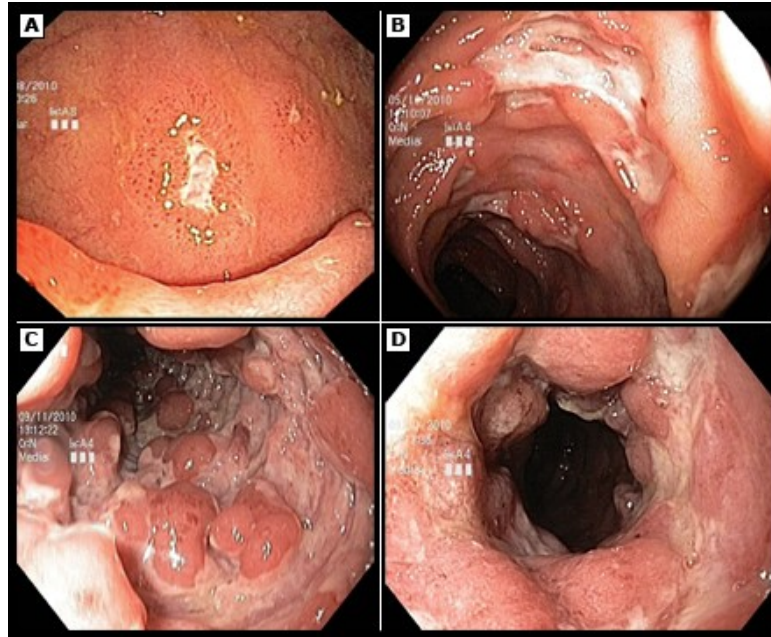
1.3 ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN

Η νόσος του Crohn (NK) και η ελκώδης κολίτιδα (ΕΚ) είναι δύο καταστάσεις που συνήθως αναφέρονται ως φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ). Είναι ανοσολογικά μεσολαβούμενες φλεγμονώδεις ασθένειες του γαστρεντερικού σωλήνα. Στη νόσο του Crohn, η φλεγμονή εκτείνεται σε όλο το πάχος του τοιχώματος του εντέρου από τον βλεννογόνο στον ορό. Η ασθένεια ακολουθεί μια υποτροπιάζουσα και διαλείπουσα πορεία. Με πολλαπλές υποτροπές, η νόσος του Crohn μπορεί να εξελιχθεί από αρχικά ήπιες έως μέτριες φλεγμονώδεις καταστάσεις σε σοβαρή διεισδυτική (συρίγγιση) ή νόσο στένωσης. Αυτή η δραστηριότητα εξετάζει την αιτιολογία, την παρουσίαση, την αξιολόγηση και τη διαχείριση της νόσου του Crohn (StatPearlsPublishing, 2021).

Μια χρόνια διαθωριακή φλεγμονή που μπορεί να περιλαμβάνει οποιοδήποτε μέρος του πεπτικού σωλήνα από το στόμα του πρωκτού, που βρίσκεται κυρίως στον ειλεό, το τυφλό και το παχύ έντερο. Στη νόσο του Crohn η φλεγμονή, που εκτείνεται μέσω του εντερικού τοιχώματος από το βλεννογόνο του ορού, είναι χαρακτηριστικά ασύμμετρη και τμηματική. Επιθηλιοειδή κοκκιώματα μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένους ασθενείς (StatPearlsPublishing, 2021).

Η νόσος του Crohn μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα. Περίπου το 30% των ασθενών έχουν προσβολή του λεπτού εντέρου και ειδικά τον τελικό ειλεό, ένα άλλο 20% έχουν μόνο προσβολή του παχέος εντέρου και περίπου το 50% έχουν προσβολή τόσο του παχέος εντέρου όσο και του λεπτού εντέρου. Δεν υπάρχει ιάσιμη θεραπεία και οι περισσότεροι ασθενείς βιώνουν κρίσεις ύφεσης και υποτροπιάζουν σε απρόβλεπτες στιγμές. Αυτή η ασθένεια οδηγεί σε μειωμένο βιοτικό επίπεδο των ασθενών. (StatPearlsPublishing, 2021). Ωστόσο, αν και η χειρουργική επέμβαση βελτιώνει την κλινική κατάσταση, η υποτροπή είναι συχνή στις περισσότερες περιπτώσεις. Μετά την εκτομή του εξαιρετικά εμπλεκόμενου ιστού, το 73%–93% των ασθενών εμφανίζουν υποτροπιάζουσες ενδοσκοπικές βλάβες εντός 1 έτους και το 34%–68% θα παρουσιάσουν συμπτωματική υποτροπή εντός 3 ετών που μπορεί να απαιτούν τουλάχιστον μία ή περισσότερες λειτουργίες.

Η ιατρική θεραπεία παρέχει γενικά μόνο προσωρινή ανακούφιση και οι περισσότεροι ασθενείς τελικά χρειάζονται μία ή περισσότερες επεμβάσεις. Πράγματι, έως και το 74% των ασθενών απαιτούν τελικά χειρουργική επέμβαση λόγω αντοχής σε ιατρική θεραπεία ή επιπλοκών όπως στένωση ή διάτρηση. Ο κίνδυνος επανεπέμβασης, που αξιολογήθηκε σε αναδρομικές χειρουργικές μελέτες, κυμαίνεται από 18% έως 38% στα 5 χρόνια, 36% έως 57% στα 10 χρόνια και 48% έως 71% στα 20 χρόνια. (SalesDJ, 1983· FarmerRG, 1985).



Εικόνα 1 Ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά της νόσου Crohn: Το χαρακτηριστικό της νόσου Crohn είναι η παρουσία εξελκώσεων. Τα ενδοσκοπικά ευρήματα στη νόσο του Crohn περιλαμβάνουν: αφθώδη έλκη, τα οποία είναι οι πρώτες βλάβες που παρατηρούνται στη νόσο του Crohn (A) μεγάλα έλκη τα οποία είναι τυπικά για τη τμηματική κατανομή της νόσου Crohn (B) εμφάνιση «πλακόστρωτου» που χαρακτηρίζεται από οζώδη πάχυνση, με γραμμικά ή ελικοειδή έλκη (C) Και στενώσεις λόγω ίνωσης (D) (PeppercornMAKS, 2019.)

Λόγω του υψηλού κινδύνου επανειλημμένων εκτομών του εντέρου, έχουν προταθεί νέες τεχνικές «διάσωσης του εντέρου» (BorleyNR, 1997· SacharDB, 1990· MichelassiF, 1991).

Τα μακροπρόθεσμα κλινικά και χειρουργικά ποσοστά υποτροπής μετά από αυτές τις τεχνικές είναι συγκρίσιμα με εκείνα που παρατηρήθηκαν μετά από συμβατική χειρουργική επέμβαση εκτομής.

Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί αρκετές δοκιμές για την καθιέρωση αποτελεσματικής προφυλακτικής μετεγχειρητικής θεραπείας. Ωστόσο, όλα αυτά έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η μακροχρόνια θεραπεία με μεσαλαμίνη παίζει μόνο έναν μικρό ρόλο στη μείωση του κινδύνου μετεγχειρητικής συμπτωματικής υποτροπής, με όφελος που παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με ελιτίτιδα και ασθενείς με παρατεταμένη διάρκεια της νόσου.

Τα αντιβιοτικά νιτροϊμιδαζόλης έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά στη μείωση της σοβαρότητας τόσο των ενδοσκοπικών όσο και των κλινικών ποσοστών υποτροπής η βουδεσονίδη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το μετεγχειρητικό ποσοστό ενδοσκοπικής υποτροπής κατά 50% σε 1 έτος για φλεγμονώδες αλλά όχι ινοστενωτικό NK (CottoneM, 2000) αλλά οι κλινικές υποτροπές ήταν τόσο συχνές όσο σε ασθενείς που λάμβαναν εικονικό φάρμακο.

Η αζαθειοπρίνη (AZA) και η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικές στη διατήρηση ιατρικής επαγόμενης ύφεσης και μπορεί ακόμη και να θεραπεύσει σοβαρή υποτροπιάζουσα μετεγχειρητική νόσο (D'HaensG., 1999).

Αυτά τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα θεωρούνται πλέον οι πιο ελπιδοφόρες προφυλακτικές μετεγχειρητικές επιλογές, αλλά μόνο μερικά προκαταρκτικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί

μέχρι στιγμής και η αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων σε ασθενείς με Ψ που υποβάλλονται σε συντηρητική χειρουργική επέμβαση μένει να αξιολογηθεί.

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η επιδημιολογία αφορά τη μελέτη της δημογραφικής κατανομής των καθοριστικών παραγόντων και γεγονότων που σχετίζονται με την κατάσταση της υγείας στους πληθυσμούς. Η γενετική επιδημιολογία συνδέεται με την παραδοσιακή επιδημιολογία αφού επικεντρώνεται στους οικογενειακούς καθοριστικούς παράγοντες της νόσου, κυρίως στη γενετική, και στην κοινή έκβασή τους με το περιβάλλον. Το τελευταίο λαμβάνει υπόψη την υποκείμενη βιολογία για τη δράση των γονιδίων και τα πρότυπα γενετικής κληρονομικότητας.

Επί του παρόντος, η έλλειψη σαφών διαγνωστικών εργαλείων και καθορισμένων κριτηρίων ασθένειας αφήνει τους ασθενείς σε γραφειοκρατικό κενό και εκτοξεύονται στο σύστημα σε αναζήτηση μιας πλήρους και ακριβούς διάγνωσης, ώστε να μπορούν να λάβουν την κατάλληλη θεραπεία. Οι κλινικές παθολογίες μας βάζουν σε πειρασμό να οραματιστούμε την ασθένεια είτε ως ανεξάρτητη οντότητα είτε ως ένα ποικίλο σύνολο χαρακτηριστικών που διέπονται από κοινούς φυσιοπαθολογικούς μηχανισμούς που προκαλούνται από περιβαλλοντικές επιθέσεις καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Οι AD δεν αποτελούν εξαίρεση σε αυτήν την υπόθεση δεδομένου ότι αντιπροσωπεύουν μια ποικίλη συλλογή ασθενειών ως προς το δημογραφικό τους προφίλ και τις πρωτογενείς κλινικές εκδηλώσεις τους (Roden DM. 2011). Το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) εκτιμά ότι έως και 23,5 εκατομμύρια Αμερικανοί πάσχουν από AD με περισσότερες από 80 γνωστές μορφές νόσου και τουλάχιστον 40 ακόμη με αυτοάνοση βάση. Αυτό θέτει τα AD μεταξύ των δέκα κορυφαίων αιτιών θανάτου στους Αμερικανούς. Το κοινό στοιχείο μεταξύ των AD είναι η βλάβη στους ιστούς και τα όργανα που προκύπτουν από την απώλεια ανοχής και, στις περισσότερες περιπτώσεις, ανισορροπία φύλου (Mariani SM.2004). Η έρευνα επικεντρώνεται γενικά σε μία μόνο ασθένεια, αν και οι αυτοάνοσοι φαινότυποι θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν πλειοτροπικά αποτελέσματα γονιδίων μη ειδικών ασθενειών που διέπουν παρόμοιους ανοσογενετικούς μηχανισμούς (Vyse TJ, Todd JA. 1996). Παρόλο που είναι προφανές ότι πολλαπλές περιπτώσεις ενός μόνο συμπλέγματος ασθενειών εντός οικογενειών (Anaya JM, Corena R, Castiblanco J, Rojas-Villarraga A, Shoenfeld Y. 2007), αυτό που είναι πιο εντυπωσιακό είναι τα άτομα σε αυτές τις οικογένειες που πάσχουν από πολλαπλές AD (Anaya JM, Gomez L, Castiblanco J. 2006).

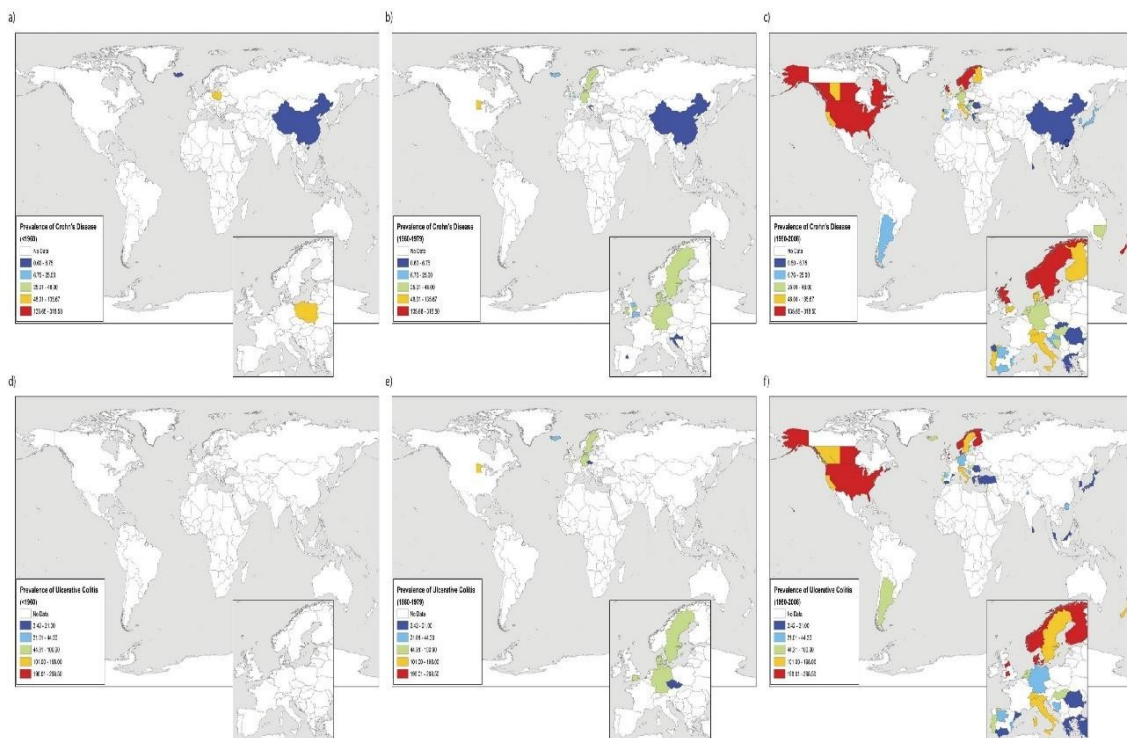
Η επιδημιολογία αυτοάνοσων διαταραχών ποικίλλει ανάλογα με τις ατομικές συνθήκες. Συλλογικά, ο επιπολασμός των AD στο γενικό πληθυσμό είναι τουλάχιστον 5%, και αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες πρόωρης θνησιμότητας σε νεαρές και μεσήλικες γυναίκες (Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM1997.). Οι AD μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους διαταραχών: συστηματικές (δηλαδή, η απώλεια ανοσολογικής ανοχής κατευθύνεται σε συστηματικά αντιγόνα και εκδηλώσεις ασθενειών μπορεί να εμφανιστούν σε ποικίλες διαφορετικές θέσεις του σώματος) και ειδικά για όργανα (δηλαδή, κυρίως ή αποκλειστικά στοιχεία ειδικά για τον ιστό).

Παρόλο που τα AD περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών εκδηλώσεων και σοβαρότητας, η παθογένειά τους θεωρείται πολυπαραγοντική και πολλά από τα χαρακτηριστικά τους υποδηλώνουν ότι έχουν κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες. Αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά της νόσου, σε συνδυασμό με επιδημιολογικά στοιχεία που καταδεικνύουν την ομαδοποίηση πολλαπλών AD σε άτομα και οικογένειες, εμπλέκουν έντονα κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων κοινών γενετικών τόπων. Οι λόγοι για τις ποικίλες εκδηλώσεις που παρουσιάζονται από διαφορετικές AD παραμένουν ασαφείς, αλλά η πρόσφατη πρόοδος στην αποσαφήνιση των τόπων γενετικής ευαισθησίας για αυτήν την ομάδα διαταραχών υπόσχεται να ρίξει φως σε αυτό το σημαντικό ζήτημα (Voight BF, Cotsaras C. 2012). Τα περισσότερα AD είναι, ωστόσο, πολυπαραγοντικής φύσης με ευαισθησία που ελέγχεται από πολλαπλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Διαφορετικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορετικές αλληλικές δομές ανάλογα με τη φυσική και επιδημιολογική ιστορία του πληθυσμού (Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. 2005). Επιπλέον, οι επιδράσεις του γονότυπου στον φαινότυπο σε κάθε δεδομένο πληθυσμό μπορεί να εξαρτώνται από το περιβάλλον και τη διάρκεια έκθεσης σε μια απροσδιόριστη αιτιολογική προσβολή. Κατά συνέπεια, υπάρχει ανάγκη διερεύνησης γενετικών συσχετίσεων σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ της κλινικής αίσθησης της οικογενειακής ομαδοποίησης (εκτεταμένες οικογένειες που τυχάνει να έχουν πολλαπλές περιπτώσεις ασθένειας ή συνδρόμου ενδιαφέροντος) και της επιδημιολογικής αίσθησης οικογενειακής συσσώρευσης (υπάρχει, κατά μέσο όρο, μεγαλύτερη συχνότητα ασθένειας συγγενείς ατόμων με τη νόσο παρά σε συγγενείς ατόμων χωρίς τη νόσο). Οι απλές αναλύσεις της οικογενειακής συγκέντρωσης αντιμετωπίζουν την οικογένεια όπως κάθε άλλη μονάδα ομαδοποίησης. Για την αντιμετώπιση του αν υπάρχει φαινοτυπική συσσώρευση εντός οικογενειών, δεν γίνεται προσπάθεια να προσδιοριστεί η αιτία οποιασδήποτε συνάθροισης (Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. 2005). Παρ' όλα αυτά, η παρατήρηση και η απεικόνιση της οικογενειακής αυτοάνοσης και το περίγραμμα του πολλαπλού αυτοάνοσου συνδρόμου (MAS) έχει αφήσει στην άκρη την περιβαλλοντική συσσώρευση και έχει δώσει μεγαλύτερη αξία στο κοινό/σπάνιο γενετικό συστατικό για ποικίλους αυτοάνοσους φαινοτύπους με γενικά κοινό υπόβαθρο (Mariani SM.2004).

Η νόσος του Crohn (CD) παρατηρείται συχνότερα στον δυτικό ανεπτυγμένο κόσμο στη Βόρεια Αμερική, τη βόρεια Ευρώπη και τη Νέα Ζηλανδία. Η επίπτωσή του έχει διμερή κατανομή με την έναρξη να συμβαίνει συχνότερα μεταξύ ηλικιών 15 έως 30 ετών και 40 έως 60 ετών. Είναι πιο εμφανές σε αστικές παρά αγροτικές περιοχές. Υπάρχει υψηλή συχνότητα στους Βορειοευρωπαίους και στην εβραϊκή καταγωγή (επίπτωση 3.2/1000) σε αντίθεση με μια σημαντική σπάνια επικράτηση σε Ασιάτες, Αφρικανούς και Νοτιοαμερικανούς. (Trends in the epidemiology of inflammatory bowel disease among Jewish Israeli adolescents: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019 Mar) Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει σημαντική αύξηση της συχνότητας σε ταχέως βιομηχανικές περιοχές της Ασίας, Αφρική και Αυστραλασία. (Past and Future Burden of Inflammatory Bowel Diseases Based on Modeling of Population-Based Data. *Gastroenterology.* 2019)



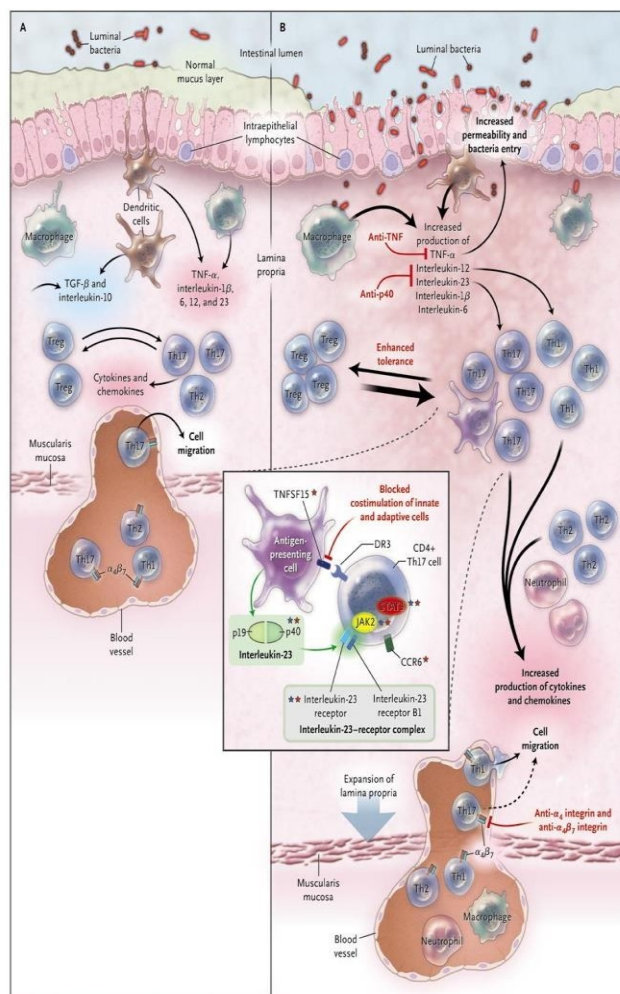
Εικόνα 20 παγκόσμιος χάρτης επιπολασμού των ιδιοπαθών νόσων του εντέρου από το 1960 μέχρι και σήμερα: Παγκόσμιος επιπολασμός της νόσου του Crohn σε χώρες που υπέβαλαν στοιχεία πριν από το α)1960, b)από το 1960 έως το 1979 και c)μετά το 1980.

Παγκόσμιος επιπολασμός της ελκώδους κολίτιδας για τις χώρες που υπέβαλαν στοιχεία d)πριν από το 1960,ε)από το 1960 έως το 1979,και f)μετά το 1980 .Με σκούρο και ανοιχτό μπλε απεικονίζονται τα ποσοστά επίπτωσης που αντιπροσωπεύουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου,με πράσινο ενδιάμεση συχνότητα, ενώ με κίτρινο και κόκκινο υψηλή συχνότητα (Molodecky NA et al,2012).

1.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η παθοφυσιολογία είναι πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει γενετική προδιάθεση, μολυσματική, ανοσολογική, περιβαλλοντική και διαιτητική. Η χαρακτηριστική διαθωρακική φλεγμονή μπορεί να περιλαμβάνει ολόκληρο το γαστρεντερικό σωλήνα από το στόμα στην περιπρωκτική περιοχή, αν και συχνότερα αφορούν τον τερματικό ειλέο και το δεξί κόλον. Η αρχική βλάβη ξεκινά ως διήθηση γύρω από μια εντερική κρύπτη. Αυτό συνεχίζει να αναπτύσσει εξέλκωση πρώτα στον επιφανειακό βλεννογόνο και περιλαμβάνει βαθύτερα στρώματα. Καθώς η φλεγμονή εξελίσσεται σχηματίζονται κοκκιώματα που δεν δεσμεύονται και περιλαμβάνουν όλα τα στρώματα του εντερικού τοιχώματος. Μπορεί να εξελιχθεί σε κλασικές εμφανίσεις βλεννογόνου με πλακόστρωτα και να παραλείψει βλάβες κατά μήκος των εντερικών περιοχών με φυσιολογικό βλεννογόνο. Καθώς τα συμπτώματα της νόσου του Crohn υποχωρούν, οι ουλές αντικαθιστούν τις φλεγμονώδεις περιοχές των εντέρων (*Journal of Crohn's and Colitis*, December 2018).

Ο σχηματισμός κοκκιωμάτων είναι πολύ συνηθισμένος στη νόσο Crohn αλλά η απουσία τους δεν αποκλείει τη διάγνωση. Η συνεχιζόμενη φλεγμονή και ουλές οδηγούν σε απόφραξη του εντέρου και σχηματισμό στένωσης. Η νόσος του Crohn σχετίζεται επίσης με εντεροειδή, εντεροεντερικά, ενδοδερματικά και ενδοκοιλικά συρίγγια (StatPearlsPublishing, 2021).



Εικόνα 3. Το εντερικό ανοσοποιητικό σύστημα στο υγιές και παθολογικό έντερο: Στο υγιές έντερο (A), κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης, διατηρείται μια ισορροπία μεταξύ των κυττάρων του φυσικού κι επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και των διάφορων αντιφλεγμονώδων (όπως ο TGF-β και η IL10) και προφλεγμονώδων παραγόντων (όπως ο TNF-α, η IL1b/6/12/23 και η IFγ).

Αντίθετα στο παθολογικό έντερο (B) υπάρχει μια συνεχής συσσώρευση και ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων, ενώ παράλληλα αυξάνονται τοπικά τα επίπεδα των προφλεγμονώδων παραγόντων TNF-α, IL1b/6/12/23, των χημειοκινών και των κυτταροκινών. Η αυξημένη παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη πρόσθετων λευκοκυττάρων και κατ' επέκταση ένα συνεχές κύκλο φλεγμονής (Clara Abraham et al, 2009).

Διάφορες μελέτες για την αιτιοπαθογένεια της NC και της EK που επικεντρώνονται στην ανοσολογική απόκριση του εντερικού βλεννογόνου και ιδιαίτερα στην απόκριση των T λεμφοκυττάρων, έχουν καταλήξει στην άποψη ότι η φλεγμονώδης απάντηση του εντέρου είναι διαφορετική μεταξύ των δύο νόσων. Η EK συνοδεύεται από αυξημένη διήθηση εντερικών βακτηρίδιων, την επακόλουθη συσσώρευση ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων και το σχηματισμό κρυπτικών αποστημάτων. Η NC συνοδεύεται κυρίως από αυξημένη διήθηση αντιγόνων και σωματιδίων που προέρχονται από τον εντερικό αυλό, με επακόλουθο τη συσσώρευση μακροφάγων και το σχηματισμό κοκκιωμάτων. Η συνεχής συσσώρευση και ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων στο εντερικό βλεννογόνο αυξάνει τοπικά τα επιπέδα του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNF-α), της ιντερλευκίνης-1β (IL1b), της ιντερφερόνης-γ (IFγ), και τις κυτταροκίνες της οδού της ιντερλευκίνης-23-Th17. Η αυξημένη παραγωγή χημειοκινών και κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη πρόσθετων λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα ένα συνεχή κύκλο φλεγμονής. Επιπλέον στη φλεγμονώδη απάντηση στη NC φαίνεται να συμμετέχουν τα Th1 και Th17 βοηθητικά κύτταρα, ενώ στην EK τα Th2 και Th17 (Clara Abraham et al, 2009).

Τις τελευταίες δεκαετίες σημειώθηκαν σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση της γενετικής συμβολής στην παθογένεια των ΙΦΝΕ. Αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη της τεχνολογίας που επέτρεψε πολλές μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) να εντοπίσουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Ο εντοπισμός των SNPs έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των αιτιών των ΙΦΝΕ που οδηγούν στην διαταραχή του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος. Οι GWAS έχουν εντοπίσει περισσότερα από 200 αλληλόμορφα που σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ. Ωστόσο, εκτιμάται ότι μόνο το 8,2% της κληρονομικότητας, για την EK και το 13,1% της κληρονομικότητας, για την NC εξηγείται από τους SNPs, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι περιβαλλοντικοί και/ή επιγενετικοί παράγοντες (Maria Pia Costa Santos et al, 2018). Τις 2 τελευταίες δεκαετίες προτάθηκε ότι η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και ρύθμιση των ΙΦΝΕ (Petronis A., 2000). Αν και πολλά επιγενετικά γεγονότα φαίνεται να προκαλούν την εμφάνιση παθογένειας, οι γνώσεις μας σχετικά με τη λειτουργική σημασία αυτών των επιγενετικών τροποποιήσεων είναι περιορισμένες. Σήμερα αρκετές δημοσιεύσεις υποδηλώνουν ότι η κατανόηση των επιγενετικών μηχανισμών θα μπορούσαν να βοηθήσουν και στην κατανόηση της παθογένειας των ΙΦΝΕ και, το πιο σημαντικό, στο να παράσχουμε νέες δυνατότητες θεραπείας τους.

1.5.1 ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΖΩΗΣ

Όταν τα συμπτώματα της νόσου του Crohn γίνονται από νωρίς αντιληπτά και λαμβάνεται η κατάλληλη θεραπεία, το προσδόκιμο ζωής (επιβίωσης) δεν διαφέρει από το φυσιολογικό. Ωστόσο, είναι σημαντική η συχνή και συστηματική παρακολούθηση του ασθενούς (KarpetanakisN, ZavosC, etal.,2013).

Η νόσος του Crohn είναι μια συστηματική ασθένεια με πολλές εντερικές και εξωεντερικές επιπλοκές. Ακολουθούν μερικές επιπλοκές που προκαλούνται από τη νόσο του Crohn (StatPearlsPublishing, 2021):

- Σχηματισμός αυστηρότητας
- Συρίγγια και αποστήματα
- Καρκίνωμα του παχέος εντέρου
- Αγκυλωτική σπονδυλίτιδα
- Επισκληρίτιδα, iritis
- Οζώδες ερύθημα, γαγγρενώδες πυόδερμα
- Νεφρικοί λογισμοί
- Χολολιθίαση
- Αναιμία
- Υπερπηκτική κατάσταση
- Οστεοπόρωση

1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Δυστυχώς δεν υπάρχει ιάσιμη θεραπεία για τη νόσο Crohn. Είναι ωστόσο δυνατός ο ικανοποιητικός έλεγχος της νόσου με φαρμακευτικούς κυρίως παράγοντες. Υπάρχει μια ποικιλία φαρμακευτικών ουσιών που βοηθούν στην ανακούφιση των συμπτωμάτων στην οξεία φάση της νόσου καθώς και στη διατήρηση των διαστημάτων ύφεσης της νόσου, δηλαδή των διαστημάτων χωρίς συμπτώματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η φαρμακευτική θεραπεία της νόσου Crohn πρέπει να είναι απόλυτα εξατομικευμένη λόγω του μεγάλου φάσματος των εκδηλώσεων της νόσου στον κάθε ασθενή. Η συντηρητική αντιμετώπιση της νόσου πρέπει πάντα να βασίζεται σε εξειδικευμένους γαστρεντερολόγους.

Η θεραπεία για την πληθώρα των δερματικών εκδηλώσεων της νόσου του Crohn είναι πολυποίκιλη. Κάθε μία από τις εκδηλώσεις που συζητήθηκαν παραπάνω θα συζητηθεί σύντομα παρακάτω. (CordonaJ, 2016).

Ειδικές βλάβες: βλάβες με ιστοπαθολογικά ευρήματα συμβατά με τη νόσο Crohn κατά τη βιοψία

Η δερματική βλάβη εμφανίζεται λόγω άμεσης επέκτασης της νόσου του εντέρου στο δέρμα. Γενικά απαιτείται χειρουργική επέμβαση.

Μεταστατική νόσος του Crohn: Η θεραπεία της μεταστατικής νόσου του Crohn αποδεικνύεται συχνά πολύ δύσκολη. Λίγες θεραπευτικές επιλογές είναι διαθέσιμες με πολύ περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Αναφορές περιπτώσεων έχουν προτείνει τη χρήση ανοσορυθμιστικών, όπως βιολογικά anti-TNF ή τοπικά ή συστηματικά κορτικοστεροειδή (Case for diagnosis. Metastatic Crohn's disease, 2016 Jul-Aug.).

Αντιδραστικές βλάβες: φλεγμονώδεις βλάβες που δεν μοιράζονται τα ίδια ιστοπαθολογικά ευρήματα αλλά πιστεύεται ότι μοιράζονται παρόμοια παθογένεια με τη νόσο του Crohn.

Pyoderma gangrenosum (PG): Οι στόχοι της θεραπείας θα πρέπει να περιλαμβάνουν μείωση της φλεγμονώδους διαδικασίας για την προώθηση της επούλωσης, τη μείωση του πόνου και τον έλεγχο της υποκείμενης IBD (ιδιαίτερα εάν οι βλάβες της PG φαίνονται παράλληλες με την πορεία της νόσου του Crohn). Οι ασθενείς θα πρέπει να εκπαιδεύονται για την καθημερινή φροντίδα των πληγών και η παραπομπή σε κέντρο φροντίδας τραυμάτων μπορεί να είναι χρήσιμη. Γενικά, η συστηματική θεραπεία πρώτης γραμμής για PG είναι τα συστηματικά κορτικοστεροειδή (0,5 έως 2 mg/kg/ημέρα) και μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονη χρήση τοπικής θεραπείας με κορτικοστεροειδή. Εάν το PG αποδειχθεί ανθεκτικό στα κορτικοστεροειδή, θα πρέπει να εξεταστεί η λήψη από του στόματος ή ενδοφλέβια (IV), κυκλοσπορίνης ή anti-TNF. Η χειρουργική επέμβαση και η αποκόλληση θα πρέπει να αποφεύγονται ως θεραπεία για PG λόγω πιθανής παθολογίας. Δυστυχώς, η ύφεση μπορεί να είναι βραχύβια διότι έως και το 25% των ασθενών θα παρουσιάσουν υποτροπιάζουσα νόσο (Cordova J, 2016).

Σύνδρομο Sweet: Η ασθένεια είναι αυτοπεριοριζόμενη και οι περισσότερες βλάβες υποχωρούν πλήρως χωρίς ουλές σε 1 έως 3 μήνες, αλλά η υποτροπή εμφανίζεται σε περίπου το ένα τρίτο των ασθενών. Τα στοματικά κορτικοστεροειδή όπως η πρεδνιζόνη (0,5 έως 1 mg/kg/ημέρα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για 4 έως 6 εβδομάδες και οι βλάβες γενικά βελτιώνονται ή υποχωρούν γρήγορα. Για τοπική νόσο, τοπικά ή ενδοφθάλμια στεροειδή μπορεί να είναι πιο κατάλληλα.

Σχετικές βλάβες: πιθανόν να προκύψουν λόγω κοινών τύπων γονιδίου HLA ή δευτερογενών σε χρόνια φλεγμονώδη απόκριση.

Οζώδες ερύθημα: Η νόσος είναι αυτοπεριοριζόμενη και υποχωρεί χωρίς ουλές. Καθώς η παρουσία οζώδους ερυθήματος τείνει να παραλληλίζει τη δραστηριότητα της εντερικής νόσου, συνιστάται θεραπεία που στοχεύει στην επίτευξη καλύτερου ελέγχου της νόσου Crohn του ασθενούς. Θα πρέπει επίσης να εφαρμοστούν ανύψωση ποδιών, σωλήνας συμπίεσης και έλεγχος πόνου. Σε σοβαρές ή ανθεκτικές περιπτώσεις, θα πρέπει να ξεκινήσουν συστηματικά κορτικοστεροειδή (0,5 έως 1 mg/kg/ημέρα). Anti-TNF παράγοντες μπορεί να απαιτηθούν εάν δεν υπάρχει επαρκής απάντηση στην πρεδνιζόνη.

Στοματικές βλάβες: Στοματικές βλάβες όπως αφθώδη έλκη, βλαστική πυοστοματίτιδα και δραστηριότητα της νόσου της περιοδοντίτιδας συσχετίζονται θετικά με την υποκείμενη δραστηριότητα της εντερικής νόσου. Η διαχείριση πρώτης γραμμής θα πρέπει να στοχεύει στην επίτευξη καλύτερου ελέγχου της νόσου του Crohn με υποστηρικτική φροντίδα με αντισηπτικά και αναλγητικά στοματικά διαλύματα συν ή πλην των τοπικών κορτικοστεροειδών.

1.6.1 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

The treatment for a fistula depends on etiology. Still, in general, an exam under anesthesia is typically indicated to identify the fistulous tract using a lacrimal probe and methylene blue or

hydrogen peroxide. When the fistulous tract is detected if the cause is known to be an abscess or otherwise, there have been excellent results with a fistulotomy on the initial operation, which is shown to reduce the need for additional procedures.

Η νόσος με συρίγγια σε ασθενείς με Crohn είναι μια σοβαρή ασθένεια για θεραπεία, αλλά η έγκαιρη αναγνώριση και διάγνωση είναι κρίσιμης σημασίας για την αποτελεσματική θεραπεία. Αυτοί οι ασθενείς πρέπει να παραπέμπονται σε γαστρεντερολόγο και να λαμβάνουν θεραπεία με αντι-TNF άλφα ως κύρια θεραπεία για τη νόσο του συριγγίου. Μετά από ιατρική θεραπεία, εάν το συρίγγιο επιμένει, τα σετόνια είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κύρια χειρουργική επιλογή σε αυτούς τους ασθενείς με λογικά ποσοστά επούλωσης μετά από θεραπεία με αντι-TNFα. (Lee MJ, Freer C, Adegbola S, Elkady S, Parkes M, Hart A, Fearnhead NS, Lobo AJ, Brown SR. 2018 Sep.) Οι ασθενείς με νόσο του Crohn συχνά διαγιγνώσκονται λανθασμένα και έχουν καθυστερήσεις στη φροντίδα και μπορεί επίσης να εμφανίσουν παρατεταμένες περιόδους αναμονής για να λάβουν τα φάρμακά τους. Έτσι, μια ολοκληρωμένη ομάδα φροντίδας μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική στη διαχείριση αυτών των ασθενών. (Lee MJ, Freer C, Adegbola S, Elkady S, Parkes M, Hart A, Fearnhead NS, Lobo AJ, Brown SR. 2018 Sep.) Το infliximab είναι η κύρια θεραπεία για αυτούς τους ασθενείς. Σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με infliximab, υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα έχουν συσχετιστεί με βελτιωμένα ποσοστά επούλωσης. (Strik AS, Löwenberg M, Buskens CJ, B Gecse K, I Ponsioen C, Bemelman WA, D'Haens GR 2019 Apr.)(Yarur AJ, Kanagala V, Stein DJ, Czul F, Quintero MA, Agrawal D, Patel A, Best K, Fox C, Idstein K, Abreu MT. 2017 Apr) Οι ασθενείς με νόσο του Chron είναι πιθανό να έχουν ταυτόχρονη πρωκτίτιδα, η οποία αποκαλύπτεται με προεγχειρητική απεικόνιση. Μια μελέτη σε 126 ασθενείς με πρωκτικά συρίγγια που υποβλήθηκαν σε προεγχειρητική μαγνητική τομογραφία διαπίστωσε ότι τα ευρήματα MRI της ταυτόχρονης φλεγμονής του ορθού συνδέονται στενότερα με τη νόσο του Crohn. (Oliveira IS, Kilcoyne A, Price MC, Harisinghani M. 2017Apr.)

Οι διεθνείς συναινετικές κατευθυντήριες γραμμές του Διεθνούς Οργανισμού για τις Φλεγμονώδεις Παθήσεις του Εντέρου (IOIBD) τονίζουν τη σημασία της αξιολόγησης του ορθού σε αυτούς τους ασθενείς καθώς η νόσος τους μπορεί συχνά να επηρεάσει τον βλεννογόνο του ορθού και την περιοχή του ορθού. Σε μια μελέτη 36 παιδιατρικών και ενηλίκων ασθενών με συριγγιστική νόσο του Crohn, μια αποκοπή 2,5 εκατοστών που παρατηρήθηκε στη μαγνητική τομογραφία προέβλεψε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με infliximab και εκείνους με επιμονή της ασθένειας. (Shenoy-Bhangle A, Nimkin K, Goldner D, Bradley WF, Israel EJ, Gee MS.. 2014 Jan.) Μερικές μελέτες έχουν δείξει αποτελεσματικά ποσοστά επούλωσης περίπου 67-90% της συνδυασμένης θεραπείας σετ με σετ και αντι-TNF άλφα σε ασθενείς με νόσο του Crohn που είχαν αναδρομική φύση. (Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, Johnson DR, MacLean AR, Buie WD. 2003 May.) (Hukkinen M, Pakarinen MP, Piekkala M, Koivusalo A, Rintala R, Kolho KL. 2014 Aug.) Μια μεγάλη μετα-ανάλυση που συγκρίνει την επούλωση του πρωτογενούς σετονίου με το infliximab απέτυχε να προσδιορίσει ποιο ήταν ανώτερο καθώς οι μελέτες διέφεραν στα αποτελέσματα. (de Groof EJ, Sahami S, Lucas C, Ponsioen CY, Bemelman WA, Buskens CJ. 2016 Jul.)

1.6.2 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ

Ως ανοσοκατασταλτικά χρησιμοποιούνται και διάφοροι αντι – TNFα παράγοντες. Για τις ΙΦΝΕ χρησιμοποιούνται κυρίως το Infliximab και το Adalimumab.

ADALIMUMAB

Το Adalimumab είναι ένα πλήρως ανθρώπινο, υψηλής συγγένειας, ανασυνδυασμένο ανοσοσφαιρίνη G (IgG) anti-TNFα μονοκλωνικό αντίσωμα. Είναι ένα μόριο που περιλαμβάνει 1330 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος περίπου 148 kDa (Vena GA, Cassano N. 2007 Jun). Αναστέλλει τη σύνδεση του TNFα (τόσο διαλυτό όσο και συνδεδεμένο με μεμβράνη). Αναστέλλει την αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς TNF της κυτταρικής επιφάνειας p55 (TNFR1) και p75 (TNFR2), ο οποίος με τη σειρά του παρεμβαίνει στις φλεγμονώδεις διεργασίες που οδηγούν την κυτταροκίνη. Είναι πανομοιότυπο σε δομή και λειτουργία με το φυσικό ανθρώπινο IgG1 και έτσι έχει υψηλή εκλεκτικότητα για τον TNF άλφα και έχει χαμηλό ανοσογόνο δυναμικό (Scheinfeld, 2005).

Δεν επηρεάζει ούτε συνδέεται με άλλες κυτταροκίνες όπως η λεμφοτοξίνη ή οι ιντερλευκίνες. Η αποτελεσματικότητά του σε διάφορες αρθρίτιδες οφείλεται στην ισχυρή οστεογόνο δράση του. Ο TNF μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των υποδοχέων συνδέτη NF-κΒ (πυρηνικός παράγοντας καρρα-ενισχυτής ελαφριάς αλυσίδας ενεργοποιημένων Β κυττάρων) (RANKL) σε στρωματικά ή οστεοβλαστικά κύτταρα. Ο αποκλεισμός του TNF εμποδίζει έτσι την επακόλουθη καταστροφή του χόνδρου και των οστών. Ο TNF παίζει επίσης ρόλο στην ωρίμανση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, ο οποίος παραμένει υπό έλεγχο με τον αποκλεισμό του TNF. Οι anti-TNF παράγοντες μειώνουν επίσης τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας ορού 1 και 3 (MMP-1 και MMP-3). Όλοι αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα των αναστολέων του TNF στην αρθρίτιδα (Scheinfeld, 2005).

Παρόλο που οι κατασκευαστές δεν έχουν αναφέρει αντενδείξεις, το adalimumab δεν έχει μελετηθεί επαρκώς σε ασθενείς ηλικίας κάτω των τεσσάρων ετών και βάρους μικρότερου από 15 κιλά. Οι κλινικοί γιατροί πρέπει να αποφεύγουν να το χρησιμοποιούν σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα ως προληπτικό μέτρο (Kingsbury DJ, Bader-Meunier B, Patel G, Arora V, Kalabic J, Kupper H. I. 2014).

Οι γιατροί πρέπει επίσης να αποφεύγουν το adalimumab σε περιπτώσεις υπερευαισθησίας, ασθενείς με υποκείμενες εστίες λοίμωξης, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή ηπατική δυσλειτουργία. (StatPearlsPublishing, 2021).

Η ταυτόχρονη χορήγηση ζωντανών εμβολίων αντενδείκνυται. Επίσης, ο κίνδυνος σοβαρών λοιμώξεων αυξάνεται σημαντικά στη συγχορήγηση abatacept και anakinra. (StatPearlsPublishing, 2021).

INFLIXIMAB

Το Infliximab είναι ένας τύπος βιολογικής θεραπείας/ανοσοθεραπείας που έχει σχεδιαστεί για να τονώσει το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματός μας και να θεραπεύσει ορισμένες ασθένειες. Το infliximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναστέλλει τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-άλφα (TNFα). **Ο TNF-α είναι μια πρωτεΐνη σηματοδότησης που εμπλέκεται στην αντίδραση οξείας φάσης και τη συστηματική φλεγμονή.** Παράγεται από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα CD4+, κύτταρα NK, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα και νευρώνες. Αυτή η αναστολή του TNFα σταματά τον καταρράκτη της φλεγμονώδους αντίδρασης, οδηγώντας σε βελτιωμένες καταστάσεις της νόσου (ψωρίαση, νόσος του Crohn κ.λπ.). Το Infliximab είναι μια χιμαιρική πρωτεΐνη που περιέχει συστατικά ποντικού και ανθρώπου. Σε ενήλικες, έχει αποδειχθεί ότι έχει χρόνο ημίσειας ζωής 7 έως 12 ημέρες (ScottFI, LichtensteinGR.. 2014 Mar.).

Το infliximab **είναι ένα αποτελεσματικό φάρμακο για μια σειρά χρόνιων φλεγμονωδών διαταραχών.** Ωστόσο, οι εργαζόμενοι στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης, συμπεριλαμβανομένου του κλινικού γιατρού και του φαρμακοποιού πρέπει να συνεργαστούν για να διασφαλίσουν ότι ο ασθενής έχει υποβληθεί σε θεραπεία για φυματίωση, ηπατίτιδα Β και καρδιακή κατάσταση που έχει αξιολογηθεί πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου. Η στενή παρακολούθηση του ασθενούς από ειδικευμένα νοσηλεύτρια είναι απαραίτητη, καθώς το φάρμακο έχει ήπιες έως μέτριες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα καλύτερα αποτελέσματα θα επιτευχθούν με μια διεπαγγελματική ομαδική προσέγγιση στη χρήση του infliximab, συμπεριλαμβανομένων κλινικών ιατρών, επαγγελματιών μεσαίου επιπέδου, νοσηλευτών και φαρμακοποιών (StatPearlsPublishing, 2021).

ANTI-TNFα

Οι αναστολείς του TNFα είναι φάρμακα που βοηθούν στη διακοπή της φλεγμονής. Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), η νεανική αρθρίτιδα, η ψωριασική αρθρίτιδα, η ψωρίαση κατά πλάκας, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η ελκώδης κολίτιδα (UC) και η νόσος του Crohn. Ονομάζονται επίσης αναστολείς TNFα, βιολογικές θεραπείες ή αντι-TNFα. Υπάρχουν πολλοί αναστολείς του TNF που έχουν εγκριθεί από τον FDA. (National Rheumatoid Arthritis Society: "Anti-TNFα Treatment in Rheumatoid Arthritis.")

Το infliximab (IFX) είναι ένας βιολογικός παράγοντας που στοχεύει συγκεκριμένα έναν ανοσοδιαμεσολαβητή, παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNFα), που εμπλέκεται σε μια παθολογική διαδικασία. Οι παράγοντες κατά του TNFα απολαμβάνουν τη χρήση ως θεραπευτικούς τρόπους από το 1998. Ωστόσο, η πρώτη τους χρήση στη δερματολογία

χρονολογείται από το 2002 όταν είδαν για πρώτη φορά τη χρήση στη θεραπεία της ψωρίασης. (Cordoro KM, Feldman SR. 2007 Sep.) Η πρώτη θεραπεία κατά του TNF ανακαλύφθηκε από τους Knight et al. με τη μορφή ενός χιμαϊρικού μονοκλωνικού αντισώματος, τώρα γνωστού ως infliximab, που περιλαμβάνει ένα μεταβλητό τμήμα σύντηξης ποντικού ή δέσμευσης αντιγόνου 25-30% και ένα σταθερό τμήμα αντισώματος ανθρώπινου IgG 70-75%. (Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P. 1993 Nov). Η πρώτη δοκιμή του IFX πραγματοποιήθηκε το 1994 σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στους οποίους το IFX είχε ως αποτέλεσμα σημαντική κλινική βελτίωση σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. (Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann . 1998 Sep)

ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ANTI-TNF α : ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Μελέτες εξουδετέρωσης αντισωμάτων εμπλέκουν σημαντικό ρόλο για τον TNF στην παθογένεση της νόσου του Crohn (Sartor RB Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006 Jul.). Αυτά έγιναν αρχικά σε ζωικά μοντέλα, πριν από την πρώτη χορήγηση αντισώματος αντι-TNF- α cA2 (το οποίο αργότερα έγινε infliximab, IFX) σε ασθενή με Crohn, ακολουθούμενη από την πρώτη σειρά περιπτώσεων (Derkx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S Lancet. 1993 Jul.). Τα αποτελέσματα πυροδότησαν πολυκεντρικές μελέτες και οδήγησαν στην έγκριση αντι-TNF παραγόντων στη θεραπεία του CD από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων το 1998. Τα αντισώματα αντι-TNF πιστεύεται ότι έχουν πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης, συμπεριλαμβανομένης της εξουδετέρωσης του TNF- α , αντίστροφα σηματοδότηση, απόπτωση και κυτταροτοξικότητα (M, Hommes 2016) και έχουν προτίμηση και αποτελεσματικότητα για κατανομή σε φλεγμονώδη ιστό (Mitoma H., Horiuchi T., Tsukamoto H., Ueda N. Molecular Aug. 2016.). Είναι σε θέση να εξαντλήσουν την υπερέκφραση του TNF- α , δεσμεύοντας τον διαλυτό και διαμεμβρανικό TNF- α και αναστέλλοντας τη σύνδεση με τους υποδοχείς του, με αποτέλεσμα την απόφραξη προφλεγμονωδών σημάτων ή μορίων που ρυθμίζονται από τον TNF- α . Η αντι-TNF θεραπεία έχει επίσης αποδειχθεί in vitro ότι προκαλεί καταστολή της κυτοκίνης μέσω αντίστροφης σηματοδότησης (Eissner G., Kirchner S., Lindner H., Kolch W., Janosch P., Grell M., Scheurich P., Andreesen R., Holler E. I. 2000.) (Eissner G., Kolch W., Scheurich P. 2004). Αυτό το ενδιαφέρον φαινόμενο συμβαίνει όταν ο πρόδρομος δεσμευμένος στην επιφάνεια του κυττάρου στον TNF συνδέεται με τον αντι-TNF και δρα ως συνδετήρας και ενεργοποιεί την ενεργοποίηση των κυττάρων, την καταστολή της κυτοκίνης ή την απόπτωση του κυττάρου που φέρει τον πρόδρομο που συνδέεται με την κυτταρική επιφάνεια (Eissner G., Kirchner S., Lindner H., Kolch W., Janosch P., Grell M., Scheurich P., Andreesen R., Holler E. I. 2000.) (Eissner G., Kolch W., Scheurich P. 2004. Πιστεύεται ότι αυτό γίνεται μέσω εξάντλησης των κοινών προϊόντων σηματοδότησης κατά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης ενδοτοξίνης/λιποπολυσακχαρίτη (. Berns M., Hommes D.W. 2016). Το Anti-TNF προκαλεί επίσης απόπτωση ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων lamina propria (Ten Hove T., van Montfrans C., Peppelenbosch M.P., van Deventer S.J.H 2002) αντιμετωπίζοντας έναν προτεινόμενο παθολογικό

μηχανισμό σε CD, όπου ο πολλαπλασιασμός των T κυττάρων του βλεννογόνου υπερβαίνει την απόπτωση T κυττάρων (Van Den Brande J.M.H., Koehler T.C., Zelinkova Z., Bennink R.J., Te Velde A.A., Ten Cate F.J.W., Van Deventer S.J.H., Peppelenbosch M.P., Hommes D.W. 2007). Οι θεραπείες κατά του TNF με περιοχή Fc (δηλαδή, infliximab και adalimumab αλλά όχι certolizumab) είναι επίσης σε θέση να προκαλέσουν κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από αντισώματα κυττάρων και κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από συμπλήρωμα (Mitoma H., Horiuchi T., Tsukamoto H., Ueda N. 2018.).

1.7 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η φαρμακογενετική και η φαρμακογονιδιωματική, αμφότερα πολλά υποσχόμενα εργαλεία της μεταφραστικής ιατρικής, μπορούν να ενισχύσουν αυτήν τη διαδικασία. Η γενετική μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στον τρόπο ανταπόκρισης των ασθενών στα φάρμακα. Οι Palmer et al. κατηγοριοποιημένοι τρόποι με τους οποίους οι γενετικές παραλλαγές μπορούν να αλλάξουν τις αποκρίσεις στο φάρμακο με: 1) διακύμανση του μεταβολισμού ενός φαρμάκου μεταξύ ατόμων. 2) διακύμανση μεταξύ των μελών του πληθυσμού σε σχέση με τις παρενέργειες των ναρκωτικών που δεν βασίζονται στη δράση του φαρμάκου · και 3) ανταπόκριση ή έλλειψη ανταπόκρισης από γενετική διακύμανση στον στόχο θεραπείας με φάρμακα (Palmer LJ, Silverman ES, Weiss ST, Drazen JM Am J. 2002 Apr). Τόσο η φαρμακογενετική όσο και η φαρμακογονιδιωματική μπορούν να δώσουν αυτές τις ιδέες: η πρώτη επικεντρώνεται στον αντίκτυπο μιας μεμονωμένης γονιδιακής μετάλλαξης (Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner JPharmacogenomics J. 2008 Feb.) και η δεύτερη στον ταυτόχρονο αντίκτυπο πολλαπλών μεταλλάξεων που μπορεί να καθορίσουν την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα του φαρμάκου (Barton CL. 2007). Συγκεκριμένα, η φαρμακογενετική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση της ικανότητας κάθε μεμονωμένου ασθενούς να μεταβολίζει τη συγκεκριμένη θεραπευτική παρέμβαση, βελτιώνοντας έτσι τις πιθανότητες εξασφάλισης ενός θεραπευτικού επιπέδου πλάσματος του δραστικού αντιδραστηρίου που θα αλληλεπιδρούσε με τον εν λόγω στόχο ή προβλέποντας ένα σοβαρό ιδιότυπη αντίδραση (Palmer LJ, Silverman ES, Weiss ST, Drazen JM Am J. 2002 Apr) (Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A., 2008 Feb.). Με τη σειρά του, η φαρμακογονιδιωματική είναι δυνητικά σημαντική επειδή βοηθά στον προσδιορισμό των ασθενών, είτε από το DNA της γεννητικής τους γραμμής είτε από το DNA του όγκου στην περίπτωση της ογκολογίας, με την οντότητα της ασθένειας-στόχου σε σχέση με μια πιο συνεπή φαρμακοδυναμική απάντηση στη θεραπευτική παρέμβαση (Barton CL. 2007).

Αρκετά παραδείγματα στους τομείς του καρδιαγγειακού, του άσθματος, της ογκολογίας και της οστεοπόρωσης υπογραμμίζουν τις πιθανές βελτιώσεις που επιτυγχάνονται με την εφαρμογή της μεταφραστικής ιατρικής στη διαδικασία λήψης αποφάσεων κατά την ανάπτυξη φαρμάκων. Σε αυτά τα παραδείγματα, ο πληθυσμός -στόχος εμπλουτίζεται με τον εντοπισμό ενός πιο ομοιογενούς πληθυσμού ασθενών, ο οποίος με τη σειρά του διευκόλυνε τη λήψη αποφάσεων

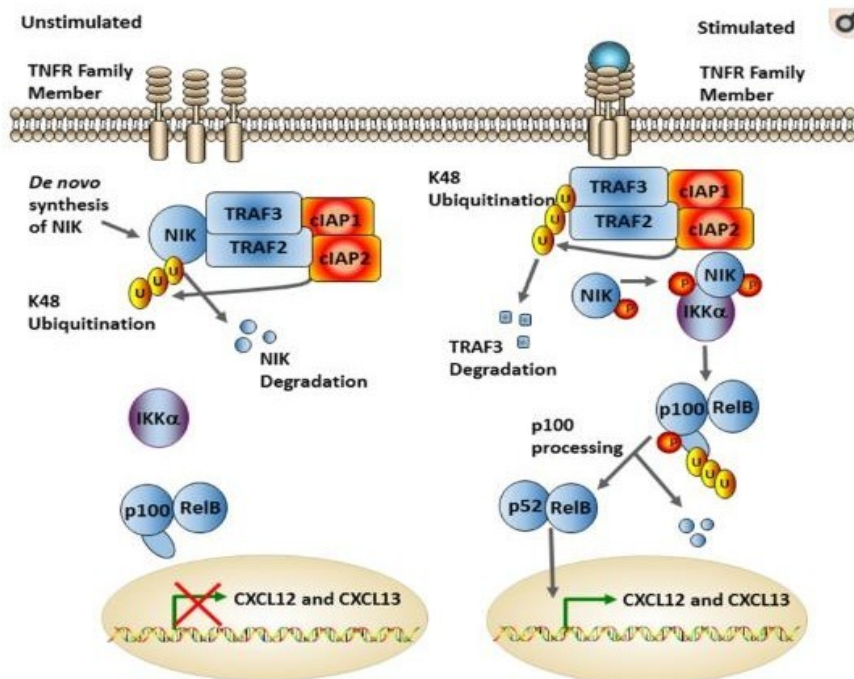
σχετικά με το αν θα προχωρήσει ή όχι σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης με συγκεκριμένα μόρια.

Η επίδραση της γενετικής στο πώς μεταβολίζονται ορισμένα φάρμακα είναι γνωστή εδώ και χρόνια. Έχουν εντοπιστεί γενετικές παραλλαγές ενζύμων μεταβολισμού φαρμάκων που εξηγούν τις διαφορές μεταξύ των ατόμων στις συγκεντρώσεις του φαρμάκου και τις αντίστοιχες φαρμακοδυναμικές τους επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της ασφάλειας. Οι ασθένειες και τα αναγνωρισμένα ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων έχουν αναθεωρηθεί πρόσφατα διεξοδικά (Palmer LJ, Silverman ES, Weiss ST, Drazen JM Am J. 2002 Apr)(Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A,. 2008 Feb.). και περιλαμβάνουν κοινές διαταραχές και θεραπείες όπως κατάθλιψη [τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs)], καρδιαγγειακές παθήσεις (βήτα αποκλειστές, υποδοχείς αγγειοτασίνης 1) αναστολείς), θρομβοεμβολικές διαταραχές με κουμαρινικά αντιπηκτικά. ασθένεια έλκους με αναστολείς της αντλίας πρωτονίων. κακοήγη νόσο (θειοπουρίνες, 5 φθοροουρακίλη, ιρινοτεκάνη) και φυματίωση (ισονιαζίδη). Ωστόσο, η χρησιμότητα των διαδικασιών γονότυπου δεν έχει αποδειχθεί με συνέπεια σε μελλοντικές κλινικές δοκιμές, αν και ένα πρόσφατο παράδειγμα αξιολόγησης της ασφάλειας της θεραπείας με τον ιό HIV, αβακαβίρη, με τον έλεγχο HLA B*5701, είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτο (Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A,. 2008 Feb.). Ένα παράδειγμα όπου το γονότυπο μπορεί δυνητικά να είναι πολύτιμο στη μεταφραστική έρευνα είναι η μετοπρολόλη και η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (Palmer LJ, Silverman ES, Weiss ST, Drazen JM Am J. 2002 Apr). Τόσο οι συγκεντρώσεις της μετοπρολόλης στο πλάσμα όσο και οι επιδράσεις στον καρδιακό ρυθμό συσχετίζονται σημαντικά με τον μεταβολικό φαινότυπο του κυτοχρώματος P4502D6, με τους υπερμεταβολιστές (UM), που ορίζονται ως ιδιαίτερα γρήγοροι μεταβολιστές της μετοπρολόλης, με σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα από τους εκτεταμένους μεταβολιστές (EM) που ήδη μεταβολίζουν γρήγορα τη μετοπρολόλη. Για ενδείξεις όπως η θεραπεία της υπέρτασης σε ασθενείς χωρίς περαιτέρω καρδιαγγειακή νόσο, η αξία της γονότυπης είναι πιο αμφίβολη επειδή τα OM και τα HM μπορούν να προσδιοριστούν κλινικά με την παρακολούθηση της αρτηριακής πίεσης και του ρυθμού παλμών, αλλά ο γονότυπος μπορεί να είναι ευεργετικός για μακροχρόνια θεραπεία με μετοπρολόλη σε ενδείξεις όπως έμφραγμα ως συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου όπου καμία παρένθετη παράμετρος όπως η αρτηριακή πίεση δεν είναι διαθέσιμη για να προβλέψει μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα.

1.7.1 NF-κB

Ο NF-κB (πυρηνικός παράγοντας kappa ενισχυτής ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων) είναι μια οικογένεια εξαιρετικά διατηρημένων παραγόντων μεταγραφής που ρυθμίζουν πολλές σημαντικές κυτταρικές συμπεριφορές, ιδιαίτερα φλεγμονώδεις αποκρίσεις,

κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση (Barkett M, 1999·Dolcet X et al., 2005). Το NF-κB εμπλέκεται επίσης σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η αρθρίτιδα και το άσθμα.



Εικόνα 4. Ηεναλλακτική οδός σηματοδότησης NF-κB (SUNSC, 2012).

Το NF-κB σχηματίζεται μέσω του ομο- ή ετεροδιμερισμού των μελών της οικογένειας Rel των πρωτεϊνών που δεσμεύουν το DNA. Στα θηλαστικά αυτά περιλαμβάνουν RelA (p65), c-rel, RelB, p105 (ο πρόδρομος του p50) και p100 (ο πρόδρομος του p52). Κάθε μέλος αυτής της οικογένειας περιέχει έναν τομέα ομολογίας Rel (RHD), ο οποίος αποτελείται από μια περιοχή δέσμευσης DNA, μια περιοχή διμερισμού και ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (Baueerle PA, 1994).

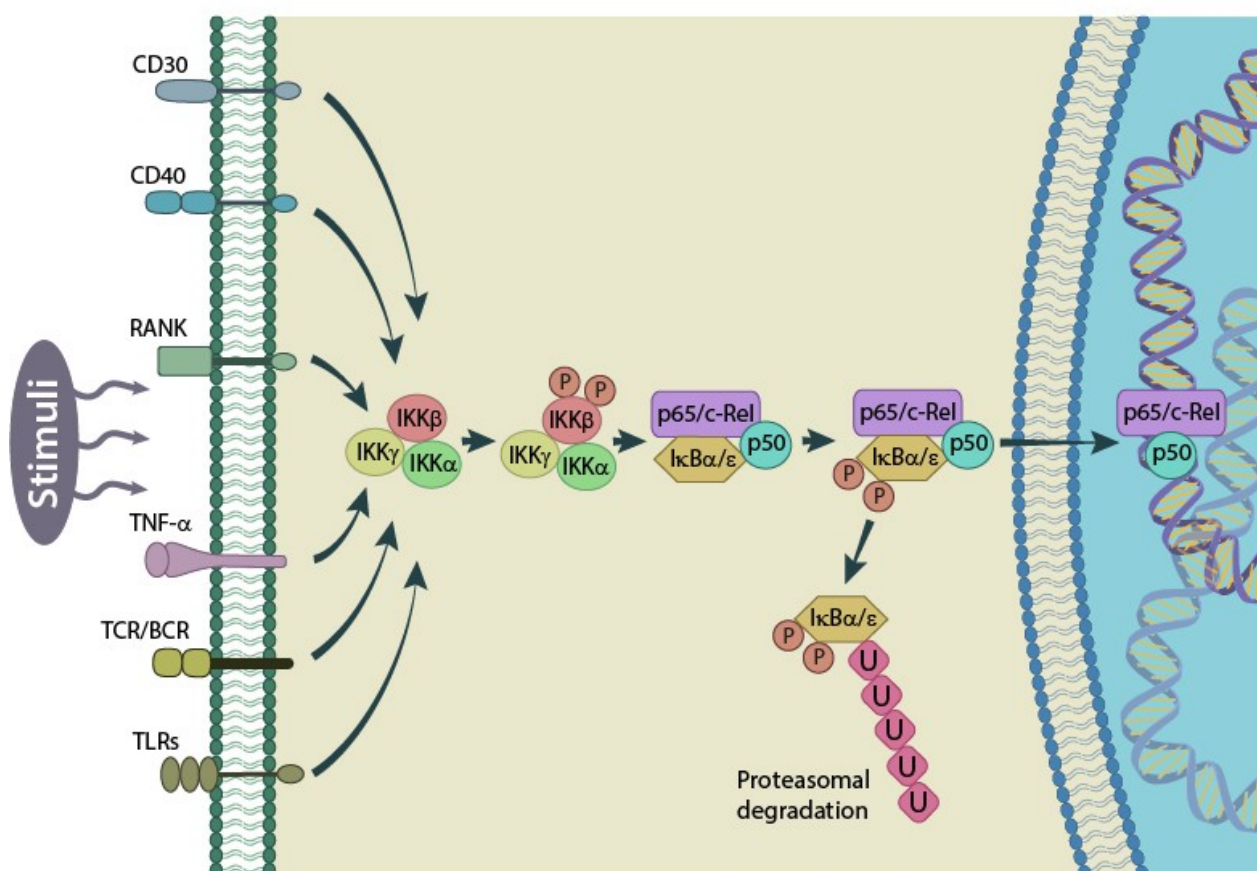
Η δραστηριότητα του NF-κB ρυθμίζεται από οικογένεια πρωτεϊνών γνωστών ως IκBs που περιλαμβάνουν IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε και Bcl-3. Όταν βρίσκονται σε αδρανοποιημένη κατάσταση, τα σύμπλοκα NF-κB εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, σε σύμπλοκο με IκB κινάση-α (IKKα), IκB κινάση-β (IKKβ) και IKKγ/NEMO, μια μη ενζυματική πρωτεΐνη που μπορεί να λειτουργήσει ως σκαλωσιά. Το σύμπλεγμα IKK μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορες κυτοκίνες, φλεγμονώδη μόρια και σήματα στρες (Baueerle PA, 1994·May MJ, 1997· Gilmore TD, 2006).

Στο κανονικό μονοπάτι, το ενεργοποιημένο IKKβ φωσφορυλιώνει το IκB το οποίο στη συνέχεια ουβικιτινοποιείται και χαρακτηρίζεται για αποικοδόμηση από πρωτεάσες. Αυτό απελευθερώνει το NF-κB από το σύμπλεγμα που περιέχει IκB και αποκαλύπτει το σήμα πυρηνικής εντοπισμού (NLS). Ένα σύμπλεγμα NF-κB που αποτελείται από RelA/c-Rel/p50 θα μεταφερθεί στη συνέχεια στον πυρήνα όπου μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (Karin M, and Ben-Neriah Y., 2000). Στο μη κανονικό μονοπάτι, το p100 υποβαθμίζεται σε p52, επιτρέποντας στο σύμπλεγμα RelB/p52 να μετατοπιστεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Xiao G, 2011).

Ανάλογα με τη σύνθεση του NF-κΒ στον πυρήνα, διαφορετικά γονίδια θα μεταγραφούν ενεργά. Αυτή η διακύμανση και η εξειδίκευση στους γονιδιακούς στόχους καθορίζεται περαιτέρω από τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση διαφορετικών υπομονάδων, όπως η φωσφορυλίωση του p65(Hochrainer K, 2012).

Ένα ευρύ φάσμα γονιδίων στοχεύεται από το NF-κΒ, συμπεριλαμβανομένου εκείνου του δικού του αναστολέα IκΒ. Σε αυτή την περίπτωση, το πρόσφατα παραγόμενο IκΒ θα συνδεθεί με το σύμπλεγμα NF-κΒ και θα αυξήσει τον εντοπισμό του στο κυτταρόπλασμα αντιπροσωπεύοντας έτσι έναν αρνητικό βρόχο αυτόματης κανονιστικής ανάδρασης για τη δραστηριότητα NF-κΒ (Sun SC, 1993)

Η κύρια λειτουργία του NF-κΒ είναι στη ρύθμιση της απόπτωσης. Το αν ο μεταγραφικός παράγοντας προκαλεί αντι-αποπτωτική ή προ-αποπτωτική απάντηση, εξαρτάται τόσο από κυτταρικού τύπου όσο και από ερεθίσματα. Ενώ το NF-κΒ αποτρέπει κυρίως την απόπτωση στα Β κύτταρα και προάγει την ενεργοποίηση των Β κυττάρων, η επίδρασή του στα Τ κύτταρα είναι μεταβλητή και εξαρτάται από τον τύπο των ερεθισμάτων.(WuM,1996) Για παράδειγμα, η επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση στα Τ-κύτταρα μπορεί να ανασταλεί από το NF-κΒ, ενώ η απόπτωση που προκαλείται από ιονομυκίνη απαιτεί ενεργοποίηση του NF-κΒ. Επιπλέον, το NF-κΒ εμποδίζει την προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη TNFα, να προκαλέσει απόπτωση ως απάντηση σε φλεγμονή ή ιογενείς λοιμώξεις(BellasREetal.,1997).



Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση του κανονικού μονοπατιού ενεργοποίησης NF-κΒ(Mikenbergli, 2007).

Παρόμοια με τον ρόλο του στη ρύθμιση της απόπτωσης στα λευκά αιμοσφαίρια, το NF-κΒ μπορεί είτε να αποτρέψει την απόπτωση στα ηπατοκύτταρα, ενισχύοντας έτσι την αναγέννηση του ήπατος, είτε να προκαλέσει απόπτωση σε περίπτωση ιογενών λοιμώξεων, όπως μια αδενοϊκή λοίμωξη (KühnelFetal.,2000). Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένοι ιοί όπως ο HIV, ο EBV και η ηπατίτιδα C προκαλούν ενεργοποίηση του NF-κΒ για την πρόληψη της απόπτωσης στα μολυσμένα κύτταρα (Barkett M,1999·DolcetX,2005).

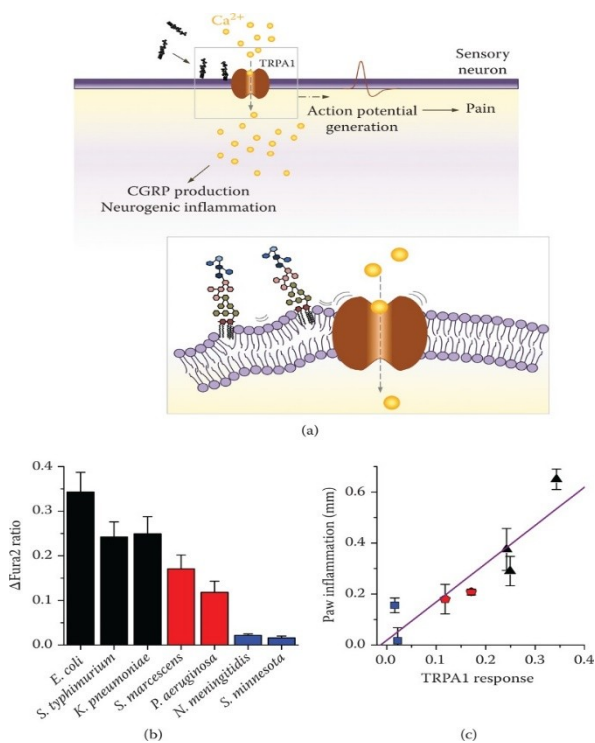
TLR4

Μια πρωταρχική λειτουργία των ανοσοκυττάρων είναι η ανίχνευση μόλυνσης και το κάνουν αυτό μέσω εξειδικευμένων υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων που αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με βλάβες και παθογόνα (DAMP και PAMP). Τα DAMPs είναι παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τον τραυματισμό των ιστών (π.χ., ATP), ενώ τα PAMPs είναι συνήθως συστατικά των παθογόνων που έχουν βασικές λειτουργίες για την επιβίωσή τους. Για παράδειγμα, οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και τα λιποτιχοϊκά οξέα (LTA) είναι βασικά δομικά στοιχεία του τοιχώματος των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων αντίστοιχα. Τα LPS και LTA που απελευθερώνονται κατά τη διαίρεση και οι λύσεις ανιχνεύονται από κύτταρα θηλαστικών μέσω υποδοχέων που μοιάζουν με διόδια (TLR) 4 και 2, οδηγώντας σε ανοσολογικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις που τελικά σκοτώνουν και καθαρίζουν τα βακτήρια (Abbas et al., 2015).

Αξιοσημείωτα, η ικανότητα ανίχνευσης παθογόνων παραγόντων δεν βασίζεται εξ ολοκλήρου στους μηχανισμούς σηματοδότησης των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι ορισμένα βακτηριακά συστατικά μπορούν να ενεργοποιήσουν τους αισθητήριους νευρώνες άμεσα, οδηγώντας σε προστατευτικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, τα N-φορμυλιωμένα πεπτίδια και η τοξίνη α-αιμολυσίνη που σχηματίζει πόρους που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια προκαλούν εισροή Ca^{2+} και δυναμικό δράσης σε νευρώνες ποντικού που δεν πονάνε. Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν σε αίσθηση πόνου και προτάθηκαν για να περιορίσουν τις έμφυτες ανοσολογικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Chiu et al., 2013).

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στο LPS, τα οποία είναι τα πιο σημαντικά μόρια για την αίσθηση των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Neyen and Lemaitre, 2016). Το σύμπλεγμα TLR4 περιγράφεται ως το βασικό κυτταρικό συστατικό για την αναγνώριση του LPS (Park and Lee, 2013). Εκτός από τη φλεγμονή, οι βακτηριακές λοιμώξεις συνοδεύονται από σωματικό ή σπλαχνικό πόνο. Αυτά τα συμπτώματα αποδόθηκαν γενικά στην ενεργοποίηση των νωτιαίων υποδοχέων δευτερογενώς από την ανοσοποιητική ενεργοποίηση (Ren and Dubner, 2010). Ωστόσο, η νευρωνική δραστηριότητα στα κοιλικά γάγγλια αποδείχθηκε ότι συμβαίνει πριν οι διακυτταρικές καταρράκτες σηματοδότησης του ανοσοποιητικού συστήματος είχαν την ευκαιρία να ωριμάσουν (Goehler, L.E. et al. 2005.). Οι ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις παρουσίασαν μια ευαίσθητη στην καψαϊκίνη υποκατηγορία τριδύμων νευροϋποδοχέων που εκφράζουν το TLR4, καθιστώντας τους νευρώνες πιθανό άμεσο στόχο βακτηριακών συστατικών (Lin et al., 2015, Wadachi and Hargreaves, 2006). Η αλληλεπίδραση του LPS με το TLR4 που εκφράζεται σε νευρώνες τριδύμου

αρουραίου βρέθηκε ότι ευαισθητοποιεί το συν-εκφρασμένο TRPV1 στην καψαϊκίνη, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πεπτιδίου που σχετίζεται με το γονίδιο καλσιτονίνης (CGRP) (Diogenes et al., 2011· Ferraz et al., 2011). Ωστόσο, οι νευρώνες του ραχιαίου γαγγλίου (DRG) θα μπορούσαν ακόμη να διεγερθούν απουσία λειτουργικού TLR4 (Ochoa-Cortes, 2010). Παρόλο που το TLR4 εκφράζεται σε αισθητήριους νευρώνες που δεν προκαλούν ευαισθησία, ο ρόλος του **στηδιέγερση** παραμένει ασαφής, καθώς συχνά η ενισχυτική δράση του πόνου εξαρτάται από έναν έμμεσο μηχανισμό που βασίζεται στην ευαισθητοποίηση του TRPV1, αντί της άμεσης ενεργοποίησης των δυνατοτήτων δράσης. Υπό αυτή την έννοια, οι απαντήσεις στην καψαϊκίνη σε αισθητήριους νευρώνες από ποντίκια νοκ -άουτ Tlr4 βρέθηκαν μειωμένες, ενώ η επίδραση του αγωνιστή TRPA1 ισοθειοκυανικού αλλυλίου (AITC) παρέμεινε αμετάβλητη (Min, H. et al. 2014.). Επιπλέον, οι αυξήσεις της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} σε νευρώνες DRG αρουραίου, λίγο μετά την πρόκληση LPS, αποδείχθηκαν απαραίτητες για την επακόλουθη απελευθέρωση CGRP (Hou and Wang, 2001). Επιπλέον, η υπεραλγησία που προκλήθηκε από ενδοπελαγική ένεση LPS μειώθηκε από έναν αναστολέα TRPA1 και σε ποντίκια νοκ -άουτ Trpa1. Αυτή η επίδραση προτάθηκε να σχετίζεται με το υδρόθειο, το οποίο ενεργοποιεί το TRPA1, καθώς εμποδίστηκε εμποδίζοντας την παραγωγή αυτής της ένωσης (Andersson et al., 2012).



Εικόνα 6 Το TRPA1 ως νευρικός αισθητήρας βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών. (α) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του LPS και του TRPA1 στη μεμβράνη των νευρώνων που προκαλούν πόνο στα θηλαστικά. Εισαγωγή του λιπιδίου Ένα τμήμα LPS μπορεί να προκαλέσει μηχανικές διαταραχές στη μεμβράνη πλάσματος, οι οποίες γίνονται αισθητές από το TRPA1. Η ενεργοποίηση αυτού του καναλιού οδηγεί σε αποπόλωση της μεμβράνης και πυροδότηση δυναμικής δράσης, που έχει ως αποτέλεσμα τον πόνο, και στην απελευθέρωση του CGRP και νευρογενή φλεγμονή. (β) Διακριτές επιδράσεις διαφορετικών μορίων LPS στο TRPA1. Οι μπλε ράβδοι αντιπροσωπεύουν κυλινδρικό ή ελασματοποιημένο LPS, οι κόκκινες ράβδους ημικωνικό LPS και οι μαύρες ράβδους κωνικό LPS. (γ) Συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας διαφορετικών LPS να ενεργοποιούν το TRPA1 και να προκαλούν φλεγμονή των ποδιών στο ποντίκι. Τα μπλε τετράγωνα αντιπροσωπεύουν κυλινδρικό ή ελασματοειδές LPS, τα κόκκινα πεντάγωνα ημι-κωνικά LPS και τα μαύρα τρίγωνα κωνικά LPS. (Meseguer, V. et al., *Nat Commun.*, 5, 3125, 2014)

Τελικά, το κανάλι ιόντων TRPA1 αποκαλύφθηκε ότι δρα ως οξύς παράγοντας LPS σε νευρώνες που δεν πονάνε (Meseguer et al., 2014). Διαπιστώθηκε ότι το *Escherichia coli* LPS ενεργοποιεί ισομορφές TRPA1 ποντικού και ανθρώπου σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης και ότι οι οξείες αποκρίσεις των αισθητήριων νευρώνων ποντικού σε αυτό το LPS μειώνονται σημαντικά με γενετική κατάλυση του *Tgra1* αλλά όχι του *Tlr4*. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι το TRPA1 μεσολαβεί αρκετές οξείες αποκρίσεις στο LPS σε ποντίκια, συμπεριλαμβανομένου του πόνου, της φλεγμονής του οσφυϊκού ποδιού, της απελευθέρωσης του CGRP από τους αεραγωγούς και της διαστολής των μεσεντερικών αρτηριών. Από τη μηχανιστική άποψη, προτάθηκε ότι το TRPA1 είναι ένας άμεσος αισθητήρας του LPS ανιχνεύοντας τις μηχανικές διαταραχές που προκαλούνται από την εισαγωγή του τμήματος λιπιδίου A αυτού του μορίου στην μεμβράνη πλάσματος. Ο βαθμός ενεργοποίησης του TRPA1 και η οξεία φλεγμονή που προκαλείται από το LPS που προέρχεται από διαφορετικά βακτηριακά είδη συσχετίζονται με το επίπεδο συμμετρίας αυτών των μορίων, με τα κωνικά να είναι πιο αποτελεσματικά από τα ημικωνικά και τα κυλινδρικά. Παρόλο που αυτά τα δεδομένα συνάδουν με τις προτεινόμενες μηχανικές αισθητικές ιδιότητες του TRPA1 (Brierley et al., 2011· Kwan et al., 2006· Kwan et al., 2009), απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί που βρίσκονται κάτω από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του LPS, τη διπλή στιβάδα λιπιδίων, και TRPA1. (Alejandro López-Requena, Brett Boonen, Laura Van Gerven, Peter W. Hellings, Yeranddy A. Alpizar, and Karel Talavera. 2017.)

Παρά την πρόοδο αυτή, πρέπει να γίνουν διάφορες σκέψεις. Οι παραλλαγές CARD15 δεν σχετίζονται με UC και υπάρχουν μόνο στο 7% έως 29% των περιπτώσεων CD στις δυτικές χώρες. (BonnenDK, ChoJH. 2003) Αυτό υποδηλώνει ότι άλλα γονίδια παίζουν επίσης ρόλο στην παθογένεση. Οι υποδοχείς διοδίων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I που διατηρούνται εξελικτικά μεταξύ φυτών, αρθρόποδων και θηλαστικών, αν και η λειτουργία τους διαφέρει. -οπως και ο υποδοχέας εμπλέκεται στην αντιμυκητιασική ανταπόκριση. (Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. 1996) Σε θηλαστικά ο υποδοχέας τύπου Toll 4 (TLR4) έχει κρίσιμο ρόλο στην έμφυτη ανοσία επειδή ελέγχει την ανοσοαπόκριση σε μυκητιασικές και gram-θετικές βακτηριακές λοιμώξεις στα θηλαστικά. (Beutler B. 2004.) Σε θηλαστικά ο υποδοχέας τύπου Toll 4 (TLR4) έχει κρίσιμο ρόλο στην έμφυτη ανοσία επειδή ελέγχει την ανοσοαπόκριση σε μυκητιασικές και gram-θετικές βακτηριακές λοιμώξεις στα θηλαστικά. (Beutler B. 2004.) Σε απάντηση στους λιποπολυσακχαρίτες, σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα με CD14 στην επιφάνεια μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων, το οποίο προκαλεί μεταγωγή σήματος οδηγώντας τελικά στη σύνθεση και απελευθέρωση ενός αριθμού προφλεγμονωδών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένων των NF-κΒ και κυτοκινών. (Chow JC, Young DW, Golenbock DT, et al. 1999)(Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. 1998) TLR4 κύτταρα σε ασθενείς με IBD. (Cario E, Podolsky DK. 2000) Οι υποδοχείς τύπου Toll και το CARD15 μοιράζονται ορισμένα χαρακτηριστικά. Τόσο το TLR4 όσο και το CARD15 περιέχουν μια περιοχή πλούσια σε λευκίνη που επιτρέπει την αναγνώριση μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα, μεσολαβώντας έτσι gram-αρνητική βακτηριακή αναγνώριση. Αποτελούν μέρος των οδών σηματοδότησης που ρυθμίζουν το NF-κΒ και εμπλέκονται στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Η κυτταρική επιφάνεια TLR4 μπορεί επομένως να θεωρηθεί ως το λειτουργικό αντίστοιχο της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης υποδοχέα CARD15. (Beutler B. 2004.) Υποθέσαμε ότι

το TLR4 θα μπορούσε να συσχετιστεί με IBD. Δύο ανεξάρτητες ομάδες ανέφεραν πρόσφατα συσχέτιση μεταξύ TLR4 και ευαισθησίας στο IBD.(Franchimont D, Vermeire S, EIHH, et al. 2004)(Török HP, Glas J, Tonenchi L , et al. 2004) Μία ομάδα, από το Βέλγιο, βρήκε συσχέτιση του TLR4 τόσο με CD όσο και με UC, ενώ δεν μπορούσε να προσδιοριστεί καμία σχέση με υποφαινότυπους CD. .(Franchimont D, Vermeire S, EIHH, et al. 2004)Η άλλη ομάδα, από τη Γερμανία, βρήκε μια σχέση με ευαισθησία μόνο για το UC. (Török HP, Glas J, Tonenchi L , et al. 2004)

II ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας είναι η φαρμακογενετική μελέτη του πολυμορφισμού rs5030728 του γονιδίου *TLR4* σε 48 δείγματα ασθενών με ΙΦΝΕ από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το «Βενιζέλιο – Πανάνειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά, και κατά πόσο θα μπορούσε να σχετίζεται η ανίχνευσή του με την απόκριση στην anti-TNFα θεραπεία με τους βιολογικούς παράγοντες infliximab και adalimumab.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 2.5.1. Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία με anti-TNFα βιολογικούς παράγοντες (Infliximab και Adalimumab) διάρκειας τουλάχιστον 24 μηνών. Η απόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τον δείκτη CDAI (Crohn's Disease Activity Index).

ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

Από κάθε ασθενή έγινε λήψη περιφερικού αίματος που τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια μαζί με αντιπηκτικό K3-EDTA και το οποίο φυλάχθηκε στους -20°C. Τα δείγματα προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το «Βενιζέλιο-Πανάνειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά.

2.2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα ακόλουθα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα SSC 1x
Το διάλυμα αυτό προέκυψε από αραιώση διαλύματος 20x (0,15M NaCl, 0,015M sodium citrate, pH 7).
Το SSC είναι ένα διάλυμα λύσης που καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε να ληφθούν οι πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων.
- SDS 5%
Ισοτονικό απορρυπαντικό που διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες και γαλακτωματοποιεί πρωτεΐνες και λιπίδια. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκές δομές λιπιδίων και πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται προστατεύοντας το DNA από νουκλεάσες.
- Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,2M
Το οξικό νάτριο βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA.

- Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)
Συντελεί στην πέψη των πρωτεϊνών.
- Διάλυμα φαινόλης
Οργανικός διαλύτης που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει πρωτεΐνες και λιπίδια από νουκλεϊκά οξέα. Στην φαινόλη οφείλεται και η απόκρυψη των κυττάρων υπολειμμάτων. Η φαινόλη είναι εξισορροπημένη σε $pH > 7$ ώστε το DNA να παραμένει στην υδατική φάση.
- Διάλυμα χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης
Η προσθήκη χλωροφορμίου έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Όπως και η φαινόλη, το χλωροφόρμιο είναι ένας οργανικός, πτητικός παράγοντας που προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και απομάκρυνση της περίσσειας φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες.
- Διάλυμα ισοπροπανόλης και αιθανόλης 70%
Το DNA αρχικά κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και ακολουθεί πλύση με παγωμένη αιθανόλη 70%. Το DNA λόγω της ιονικής του φύσης παραμένει αδιάλυτο ως ίζημα σε αυτούς τους οργανισμούς.

2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

1. Διατήρηση των δειγμάτων αίματος σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ξεπαγώσουν.
2. Λήψη 0,5ml αίματος και μεταφορά σε eppendorf.
3. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικό διαλύματος 1x SSC.
4. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3 min.
5. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκείμενου.
6. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1xSSC.
7. Επανάληψη των βημάτων 4 και 5.
8. Προσθήκη 50μl SDS 5%, 500 μl 0,2M οξικού νατρίου και 10μl πρωτεΐνάσης K(10mg/ml).
9. Ανάδευση με vortex και επώαση στους 55°C για 1h.

10. Προσθήκη 0,5ml διαλύματος φαινόλης και 0,5ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και ανάδευση.
11. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 min στους 4°C.
12. Λήψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης και μεταφορά σε νέο erpendorf.
13. Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης και ανάδευσης.
14. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 min στους 4°C.
15. Λήψη της υπερκείμενης υδατικής φάσης και προσθήκη 1 ml παγωμένης ισοπροπανόλης και ανάδευση.
16. Επώαση για 20 min στους - 20°C.
17. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 20 min στους 4°C.
18. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%.
19. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 min στους 4°C.
20. Αφαίρεση υπερκειμένου και ξήρανση του ιζήματος με επώαση στους 37°C για περίπου 1h.
21. Επαναδιάλυση του DNA σε 100μl ddH₂O και επώαση στους 55 °C για 1h.
22. Αποθήκευση των δειγμάτων DNA στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Πίνακας 1. Ενδεικτικές συγκεντρώσεις 10 δειγμάτων DNA και ο λόγος OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀		
Δείγματα	Συγκέντρωση (ng/μl)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
K1	48.7	1.85
K2	148.6	1.89
K3	122.7	1.87
K4	95.9	1.89
K5	119.7	1.93
K6	101.8	1.89
K8	368.9	1.91
K9	79.3	1.88
K10	140.5	1.89
K11	126.6	1.9

2.2.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Η ποσοτικοποίηση για όλα τα δείγματα DNA έγινε με τη διαδικασία της φωτομέτρησης. Η φωτομέτρηση βασίζεται στην απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων στα 260nm, λόγω της ύπαρξης αρωματικών βάσεων. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του DNA. Με τη φωτομέτρηση γίνεται και έλεγχος της καθαρότητας του DNA που απομονώθηκε. Έγινε μέτρηση της απορρόφησης του δείγματα και στα 280nm (απορροφούν μέγιστα οι πρωτεΐνες). Έπειτα, υπολογίστηκε ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀. Εάν ο λόγος αυτός είναι 1.8-

2.0, τότε το δείγμα αποτελείται από καθαρό DNA. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση το ότι μια μονάδα οπτικής απορρόφησης ($OD_{260nm}=1$), αντιστοιχεί σε 50 μ g/ml δίκλωνου DNA.

Κατά τη διαδικασία, λοιπόν, έγινε αραιώση 1/50 (1 μ l από το προϊόν της απομόνωσης και 49 μ l ddH₂O). Το μείγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα και φωτομετρήθηκε. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του DNA που περιέχει.

2.2.5 ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Βασικής αρχή της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα προς το θετικό πόλο εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται γρηγορότερα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος και μεταναστεύουν πιο μακριά σε σχέση με τα μεγαλύτερα μόρια.

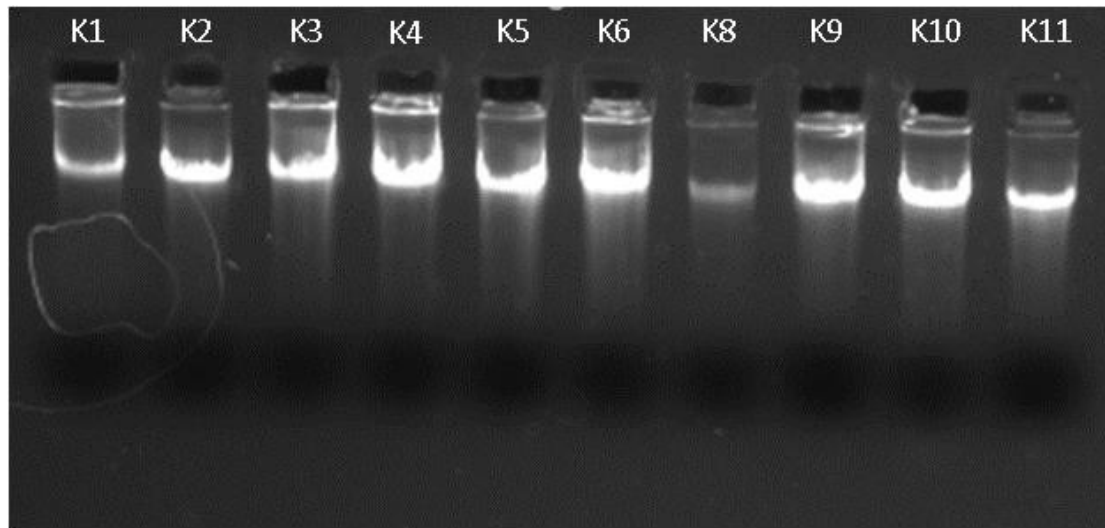
Παρασκευή πηκτώματος

Για τελικό όγκου 50ml, 1% αγαρόζη:

- Ζυγίσθηκε ποσότητα 0,5gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη και έπειτα έγινε προσθήκη 50 ml TAE 1x.
- Ακολούθησε βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 5ml βρωμιούχου αιθιδίου.
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε εκμαγείο με 'χτένα' μέχρι να πήξει.
- Απομακρύνθηκε προσεκτικά η 'χτένα' να δημιουργηθούν πηγαδάκια (θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων).
- Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x ώστε να καλύπτει τα πηγάδια.

Πορεία ηλεκτροφόρησης

- Ανάμειξη 2 μ l χρωστικής (loadingbuffer) με 3 μ l DNA.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια.
- Τοποθέτηση μοριακού μάρτυρα μεγεθών (ladder).
- Ρύθμιση της τάσης του ρεύματος στα 100V.
- Παρατήρηση των ζωνών του DNA στη συσκευή UV.



Εικόνα 7 Έλεγχος καθαρότητας του γονιδιωματικού DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης 1%

2.3 REAL- TIME PCR

Η PCR σε πραγματικό χρόνο έχει γίνει μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ποσοτικοποίησης γονιδίων, επειδή έχει μεγάλο δυναμικό εύρος, διαθέτει τεράστια ευαισθησία, μπορεί να είναι εξαιρετικά συγκεκριμένη για τη σειρά, δεν έχει ελάχιστη έως καθόλου επεξεργασία μετά την ενίσχυση και είναι επιδεκτική αύξησης του δείγματος διακίνησης. Ωστόσο, το βέλτιστο όφελος από αυτά τα πλεονεκτήματα απαιτεί σαφή κατανόηση των πολλών διαθέσιμων επιλογών για την εκτέλεση πειράματος PCR σε πραγματικό χρόνο. Ξεκινώντας με τη θεωρία πίσω από την PCR σε πραγματικό χρόνο, αυτή η ανασκόπηση συζητά τα βασικά συστατικά ενός πειράματος PCR σε πραγματικό χρόνο, συμπεριλαμβανομένης της PCR ενός σταδίου ή δύο σταδίων, απόλυτη έναντι σχετικής ποσοτικοποίησης, μαθηματικά μοντέλα διαθέσιμα για σχετικούς ποσοτικούς υπολογισμούς και υπολογισμούς απόδοσης ενίσχυσης, τύπους κανονικοποίησης ή διόρθωσης δεδομένων και χημικών ανίχνευσης. Επιπλέον, εξετάζονται οι πολλές αιτίες της διακύμανσης καθώς και οι μέθοδοι υπολογισμού της διακύμανσης εντός και μεταξύ της δοκιμασίας. (Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993.)

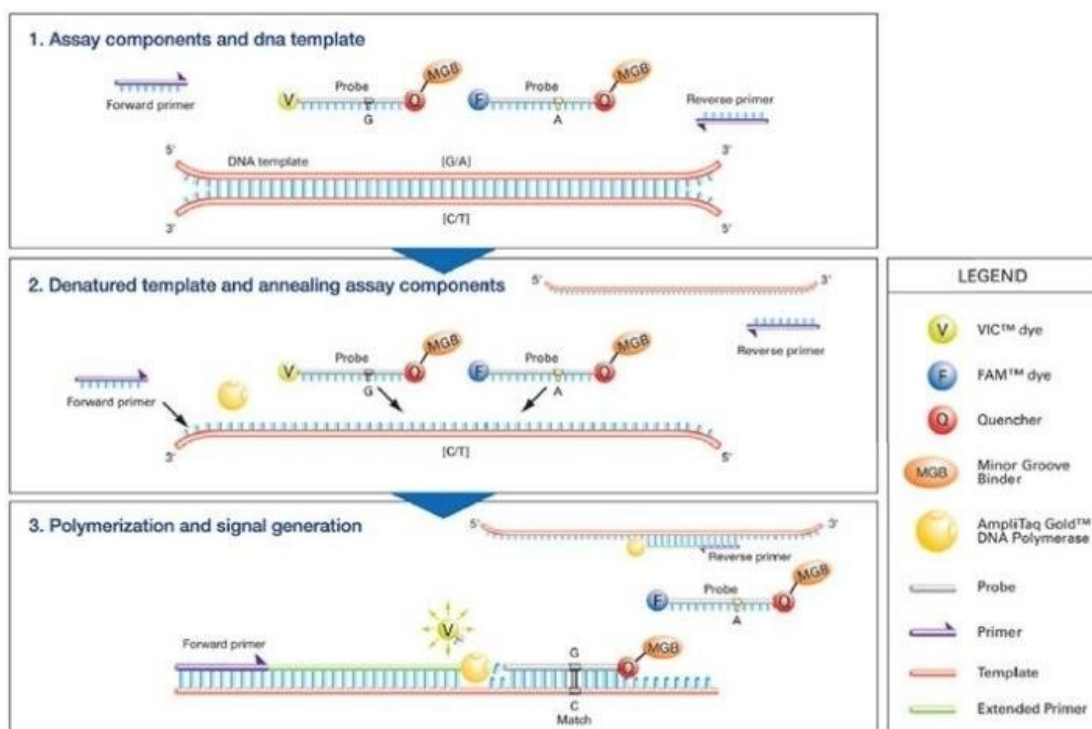
Η έλευση της PCR σε πραγματικό χρόνο και της αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (πραγματικού χρόνου RT-PCR) άλλαξε δραματικά το πεδίο μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης. Η PCR πραγματικού χρόνου είναι η τεχνική συλλογής δεδομένων σε όλη τη διαδικασία PCR όπως συμβαίνει, συνδυάζοντας έτσι την ενίσχυση και την ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία διαφορετικών χημικών φθορισμού που συσχετίζουν τη συγκέντρωση προϊόντος PCR με την ένταση φθορισμού (Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993.). Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο (ή τον κύκλο PCR) όπου εντοπίζεται για πρώτη φορά η ενίσχυση στόχος. Αυτή η τιμή αναφέρεται συνήθως ως κατώφλι κύκλου (Ct), ο χρόνος κατά τον οποίο η ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη από τον φθορισμό υποβάθρου. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του στόχου DNA στο αρχικό υλικό, τόσο πιο γρήγορα θα εμφανιστεί μια σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, αποδίδοντας χαμηλότερο Ct (Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. 1996.).

Υπάρχουν πολλά οφέλη από τη χρήση PCR σε πραγματικό χρόνο έναντι άλλων μεθόδων για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Μπορεί να παράγει ποσοτικά δεδομένα με ακριβές δυναμικό εύρος 7 έως 8 τάξεων μεγέθους log (Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer. 1998) και δεν απαιτεί χειρισμό μετά την ενίσχυση. Οι δοκιμασίες PCR σε πραγματικό χρόνο είναι 10.000 έως

100.000 φορές πιο ευαίσθητες από τις δοκιμασίες προστασίας RNase (Wang, T. and M.J. Brown. 1999.), 1000 φορές πιο ευαίσθητες από τον υβριδισμό στίγματος κηλίδων (Malinen, E., A. Kassinen, T. Rinttila, and A. Palva. 2003.) και μπορούν ακόμη και να ανιχνεύσουν ένα μόνο αντίγραφο μιας συγκεκριμένης μεταγραφής (Palmer, S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, H. Bazmi, J.M. Mican, M. Polis, R.L. Dewar, and A. Planta. 2003.). Επιπλέον, οι δοκιμασίες PCR σε πραγματικό χρόνο μπορούν να ανιχνεύσουν αξιόπιστα τις διαφορές γονιδιακής έκφρασης έως και 23% μεταξύ των δειγμάτων (Gentle, A., F. Anastasopoulos, and N.A. Mc-Brien. 2001.) και να έχουν χαμηλότερους συντελεστές διακύμανσης

2.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΑQΜΑΝ

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ανιχνευτές υβριδισμού (probes) συμπληρωματικού ως προς την αλληλουχία-στόχο. Ανιχνευτές φέρουν χρωστική φθορισμού αναφοράς (reporter) στο 5' άκρο τους και χρωστική παρεμπόδισης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο τους. Οι χρωστικές φθορισμού αναφοράς που χρησιμοποιούνται είναι οι FAM και VIC. Στη μέθοδο Taqman περιλαμβάνονται επίσης οι παράγοντες της κλασσικής PCR (εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου, και Taq πολυμεράση).



Εικόνα 8: Αρχή της μεθόδου TaqMan (Thermofisher, by Jeremy Schoales, 2018)

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών, υβριδοποιούνται και οι ανιχνευτές. Έπειτα, κατά το στάδιο της επιμήκυνσης, οι υβριδοποιημένοι ανιχνευτές υδρολύονται από τη δράση νουκλεάσης της πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του καταστολέα από τη χρωστική και την εκπομπή σήματος

φθορισμού αναφοράς (FAM ή VIC). Σε κάθε επανάληψη των σταδίων το σήμα πολλαπλασιάζεται, καθώς αυξάνεται ποσοτικά το προϊόν της αντίδρασης.

Πίνακας 2. Σχέση ανάμεσα στα σήματα φθορισμού και γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs5030728	
Σημαντική αύξηση	Ένδειξη
VIC® φθορίζουσα χρωστική μόνο	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G
FAM™ φθορίζουσα χρωστική μόνο	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A
Σήματα φθορισμού και για τις δύο χρωστικές	Ετεροζυγωτία (Αλληλόμορφο A+G)

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΗΧΝΕΥΤΩΝ

Πειραματική διαδικασία

Υπολογίζουμε τον αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν και τις ποσότητες των συστατικών που χρειάζονται για όλα τα πηγαδάκια του plate. Στη συνέχεια, ετοιμάζουμε για τον κάθε πολυμορφισμό το mix. Αυτό περιλαμβάνει το TaqMan Genotyping Master Mix, το TaqMan Genotyping Assay Mix και H₂O. Το TaqMan Genotyping Master Mix περιέχει MgCl₂, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) καθώς επίσης και Taq πολυμεράση. Στο TaqMan Genotyping Assay Mix περιέχονται οι ειδικοί εκκινητές (forward/reverse) και οι δυο TaqMan ανιχνευτές (ένας σημασμένος με VIC και ένας ακόμα σημασμένος με FAM). Οι ποσότητες από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ποσότητες από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση PCR.	
H ₂ O	8,5 μl
TaqMan Genot. Master Mix	10 μl
Assay mix	0,5 μl
DNA	1 μl
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20μl

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά δισκία 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 19μl από το mix και 1μl δείγματος DNA. Όταν ετοιμαστεί το plate, επικαλύπτεται με διαφανή μεμβράνη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του plate για 1 περίπου λεπτό, ώστε να κατακαθίσει τυχόν δείγμα που έχει μείνει στα τοιχώματα. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιούνται 40 κύκλους ενίσχυσης. Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν φαίνονται στον πίνακα 4 που ακολουθεί.

Πίνακας 4. Συνθήκες της αντίδρασης PCR.			
Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασίας	Διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Ενεργοποίηση της AmpliTaqGoldDNAPolymerase	95	10min	0
Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητλων/ανιχνευτών στο TM	95	15min	40
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	60	1min	40

2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες στην anti-TNFα θεραπεία που ακολούθησαν βάσει της μεταβολής του δείκτη βαρύτητας της ενεργότητας του δείκτη της νόσου του Crohn. Παράλληλα, με βάση τα αποτελέσματα της γονοτύπησης ομαδοποιήθηκαν και ως ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες για τους δύο πολυμορφισμούς. Υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλομόρφου για τον κάθε πολυμορφισμό και πραγματοποιήθηκαν test που δείχνουν την επικρατή ή υπολειπόμενη δράση των αλληλομόρφων. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με την εφαρμογή του αμφίπλευρου ακριβή ελέγχου του Fisher (two-tailed Fisher's exact test). Ο έλεγχος αυτός προτιμάται σε μικρού μεγέθους πληθυσμιακά δείγματα, καθώς μας δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού της τιμής p με ακρίβεια και όχι κατά προσέγγιση. Η τιμή p-value < 0.05 καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

2.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.5.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 48 ασθενείς με ΙΦΝΕ που έλαβα θεραπεία με anti-TNFα παράγοντες. Οι anti-TNFα παράγοντες που χορηγήθηκαν στους ασθενείς είναι Infliximab και το Adalimumab. Η ανταπόκριση στη θεραπεία βασίστηκε στο δείκτη CDAI. Έγινε γονοτύπηση των ασθενών για τον πολυμορφισμό rs5030728 του γονιδίου *TLR4*. Στον ακόλουθο πίνακα φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που πήραν μέρος στην μελέτη.

ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	ΤΙΜΗ
Ηλικία Μ.Ο.± ΤΑ*	43±15,33
Φύλο Α/Θ	20/28
Χρόνος ασθένειας Μ.Ο.± ΤΑ*	6,54±3,1
Ηλικίας εμφάνισης Μ.Ο.± ΤΑ*	39±11,25
Αρχικό CDAI Μ.Ο.± ΤΑ*	171,14±114,17
CDAI μετά από 24 μήνες Μ.Ο.± ΤΑ*	48,57±47,82
Ανταποκριθέντες	56%
Μη ανταποκριθέντες	44%
*ΤΑ: ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	

2.5.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ

Ο ποσοτικός έλεγχος και ο έλεγχος καθαρότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα .

Δείγματα	Συγκέντρωση	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
K1	48,7	1,85
K2	148,6	1,89
K3	122,7	1,87
K4	95,9	1,89
K5	119,7	1,93
K6	101,8	1,89
K8	368,9	1,91
K9	79,3	1,88
K10	140,5	1,89
K11	126,6	1,9
K12	30	1,97
K13	82	1,94
K14	77,6	1,96
K15	104,6	1,95
K16	94,2	1,93
K17	98,2	1,9
K18	110,2	1,87
K19	34	2,04
K20	217,3	1,93
K21	93,8	1,91
K22	195,9	1,85
K23	83,3	1,75
K24	154	1,91
K25	50,9	1,89
K27	177,5	1,87
K28	84,9	1,89
K29	31,9	1,97
K30	118,2	1,88
K31	126	1,82
K32	172,5	1,88
K33	168	1,78
K35	194,4	1,9
A15	205,6	1,83
A17	53,7	1,81
A32	220	1,83
Λ1	79,4	1,99
Λ2	38,1	1,93
Λ3	38,7	1,91
Λ5	87,6	1,88
Λ10	88,6	1,95
Λ12	43,8	1,97
Λ16	84,5	1,88
Λ17	55,6	1,9
Λ18	81,1	1,88
Λ19	61,2	1,9
Λ25	75,6	1,93
Λ30	60	1,87
Λ31	109,1	1,78

Στον πίνακα φαίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων DNA.

Παρατηρούμε ότι όλες οι συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες από 10ng/μl. Αυτό είναι αρκετά σημαντικό καθώς η συγκέντρωση 10ng/μl είναι η ελάχιστη που απαιτείται για να επιτευχθεί σωστά η ενίσχυση του DNA μέσω Real-TimePCR. Στον ίδιο πίνακα φαίνεται παράλληλα και ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀.

Παρατηρούμε ότι ο λόγος των δυο

απορροφήσεων είναι για όλα τα δείγματα 1,8-2,0. Επομένως, τα δείγματα αποτελούν από καθαρό DNA.

2.6 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΓΟΝΟΤΥΠ ΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΓΟΝΟΤΥΠ ΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΓΟΝΟΤΥΠ ΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ	ΓΟΝΟΤΥΠ ΟΣ
K1(Ifx-R)	G/G	K14(Hum-R)	A/G	K27(Ifx-NR)	A/G	L2(Ifx-R)	G/G
K2(Ifx-R)	A/G	K15(Ifx-R)	G/G	K28(Hum-R)	A/A	L3(Ifx-R)	A/G
K3(Ifx-R)	A/G	K16(Ifx-NR)	G/G	K29(Hum-R)	G/G	L5(Ifx-NR)	G/G
K4(Hum-R)	G/G	K17(Ifx-NR)	G/G	K30(Ifx-NR)	G/G	L10(Ifx-R)	A/G
K5(Ifx-R)	G/G	K18(Ifx-NR)	A/A	K31 (Ifx-NR; Hum-NR)	G/G	L12(Ifx-R)	A/G
K6(Ifx-NR)	G/G	K19(Ifx-NR)	G/G	K32(Ifx-R)	G/G	L16 (Ifx-R; Hum-NR)	A/G
K8(Ifx-R)	G/G	K20(Ifx-NR)	A/G	K33(Hum-NR)	G/G	L17(Ifx-NR)	G/G
K9(Ifx-NR)	G/G	K21(Ifx-NR)	A/G	K35(Hum-R)	G/G	L18(Ifx-R)	G/G
K10(Ifx-R)	G/G	K22 (Ifx-NR; Hum-NR)	A/G	A15(Ifx-R)	A/G	L19(Ifx-R)	A/A
K11(Ifx-NR)	G/G	K23(Ifx-R)	G/G	A17(Ifx-R)	G/G	L25(Ifx-R)	A/G
K12(Ifx-R)	G/G	K24(Ifx-NR)	G/G	A32(Hum-R)	A/G	L30(Ifx-NR)	G/G
K13 (Ifx-R; Hum-NR)	A/G	K25 (Ifx-NR; Hum-R)	G/G	L1(Ifx-R)	A/G	L31(Hum- R)	A/G

2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΝΤΙ-TNF α

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν (5-7). Η ανάλυση έγινε και για τα δυο φάρμακα μαζί στους ασθενείς κατηγοριοποιημένους σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες αλλά και για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για όλους τους ασθενείς και για τους δυο anti-TNF α παράγοντες (Infliximab&Adalimumab).

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες ς	ΜηΑνταποκριθέντες	P
TLR4 rs5030728 (G>A)	Genotypic(GG/GA/AA)	14/11/2	14/6/1	0.585
	Cochran-Armitage (G/A)	39/15 (0.81)	34/8 (0.71)	0.322
	Επικρατές[(GG+GA)/AA]	25/2	20/1	0.709
	Υπολειπόμενο[GG/	14/13	14/7	0.304

	(GA+AA)			
--	---------	--	--	--

Στον πίνακα 5 οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες όσον αφορά και τους δυο anti-TNFαπαράγοντες (Adalimumab&Infliximab).

Ειδικότερα, για τον πολυμορφισμό rs5030728 του γονιδίου *TLR4* παρατηρούμε τα εξής:

- Οι 14 από τους ανταποκριθέντες είναι ομόζυγοι ως προς το Γαλληλόμορφο και οι 2 ως προς το Α ενώ οι 11 είναι ετερόζυγοι.
- Στους μη ανταποκριθέντες 14 είναι ομόζυγοι ως προς το G και 1 ως προς το Α.
- Η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε τη συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G στους αποκριθέντες και στους μη αποκριθέντες να έχουν δείκτη στατιστικής σημαντικότητας $p=0.322$ για $p \leq 0.05$. Επομένως η ανάλυση δεν δείχνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λαμβάνουν τον βιολογικό παράγοντα Infliximab				
Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες	ΜηΑνταποκριθέντες	P
<i>TLR4</i> rs5030728(G>A)	Genotypic(GG/GA/AA)	11/8/1	13/3/1	0.331
	Cochran-Armitage(G/A)	30/10 (0.63)	29/5 (0.60)	0.277
	Επικρατές[(GG+AG)/AA]	19/1	16/1	0.905
	Υπολειπόμενο[GG/ (AG+AA)]	11/9	13/4	0.178

Στον πίνακα 6 οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε ανταποκριθέντες και μην ανταποκριθέντες όσον αφορά τον παράγοντα Infliximab.

Ειδικότερα, για τον πολυμορφισμό rs5030728 του γονιδίου *TLR4* παρατηρούμε τα εξής:

- Μόνο 1 από τους ανταποκριθέντες είναι ομόζυγοι ως προς το Α αλληλόμορφο και 11 ως προς το Γενώ οι 11 είναι ετερόζυγοι.
- Στους μη ανταποκριθέντες είναι ομόζυγος ως προς το Α πάλι μόνο 1 και 13 ως προς το G.
- Η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε τη συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G στους αποκριθέντες και στους μη αποκριθέντες να έχουν δείκτη στατιστικής σημαντικότητας $p=0.277$ για $p \leq 0.05$. Επομένως η ανάλυση δεν δείχνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα
- Οι δυο συχνότητες δε διαφέρουν σχεδόν καθόλου μεταξύ τους.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λαμβάνουν τον βιολογικό παράγοντα Adalimumab.

Γονίδιο, Πολυμορφισμός	Test	Ανταποκριθέντες ς	ΜηΑνταποκριθέντες	P
<i>TLR4</i> rs5030728 (G>A)	Genotypic (GG/GA/AA)	3/3/1	1/3/0	0.528
	Cochran-Armitage (G/A)	9/5 (0.19)	5/3 (0.10)	0.933
	Επικρατές[(GG+GA)/AA]	6/1	4/0	0.256
	Υπολειπόμενο[GG/ (GA+AA)]	3/4	1/3	0.558

Στον πίνακα 7 παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των ασθενών που έγινε μόνο για το Adalimumab.

Ειδικότερα παρατηρούμε για τον πολυμορφισμό rs5030728 του γονιδίου *TLR4* παρατηρούμε τα εξής:

- Εκ των ανταποκριθέντων 3 είναι ομόζυγοι ως προς το G αλληλόμορφο, 1 ως προς το A αλληλόμορφο, ενώ υπάρχουν 3 ετερόζυγοι.
- Οι μη ανταποκριθέντες ως προς το αλληλόμορφο G είναι 1 ενώ δεν υπάρχει κανένας ως προς αλληλόμορφο A, παρόλα αυτά υπάρχουν 3 ετερόζυγοι.
- Η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε τη συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου G στους αποκριθέντες και στους μη αποκριθέντες να έχουν δείκτη στατιστικής σημαντικότητας $p=0.933$ για $p \leq 0.05$. Επομένως η ανάλυση δεν δείχνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα
- Οι δυο συχνότητες δε διαφέρουν σχεδόν καθόλου μεταξύ τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη εργασία είναι ένα κομμάτι μιας μεγαλύτερης φαρμακογενετικής μελέτες όπου συμμετέχουν πολυμορφισμοί γονιδίων του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κΒ. Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NF-κΒ στην απόκριση των ασθενών με ΙΦΝΕ στην αντί-TNFα και κατ' επέκταση στην εύρεση δεικτών πρόβλεψης.

Στην μελέτη συμμετείχαν 48 ασθενείς με ΙΦΝΕ(ΙΒS). Το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (ΙΒS) είναι μια χρόνια και εξουθενωτική λειτουργική γαστρεντερική διαταραχή που επηρεάζει το 9% -23% του πληθυσμού σε όλο τον κόσμο. Το ποσοστό των ασθενών που αναζητούν υγειονομική

περίθαλψη που σχετίζεται με το IBS προσεγγίζει το 12% στις πρακτικές πρωτοβάθμιας περίθαλψης και είναι μακράν η μεγαλύτερη υποομάδα που παρατηρείται σε γαστρεντερολογικές κλινικές. Έχει τεκμηριωθεί καλά ότι αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν χαμηλότερη ποιότητα ζωής και χρησιμοποιούν το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης σε μεγαλύτερο βαθμό από τους ασθενείς χωρίς αυτή τη διάγνωση.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs5030728* του γονιδίου TLR4, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, με την απόκριση στην αντί-TNFα θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα infliximab και adalimumab.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα 4 που μοιάζει με διόδια (TLR4) έχει προταθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στις οδούς φλεγμονώδους σηματοδότησης της εντερικής οδού. Η αναστολή του TLR4 έχει θεωρηθεί ως ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη θεραπεία της φλεγμονής του εντέρου. Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που εξετάζουν τις δυνατότητες ανταγωνισμού του TLR4 ως θεραπευτική προσέγγιση για εντερική φλεγμονή.

Οδός σηματοδότησης που μοιάζει με παθογόνο μοριακό μοτίβο δέκτη 4 σε εντεροκύτταρο. LPS λιποπολυσακχαρίτης, TLR Toll-like υποδοχέας, πρωτεΐνη προσαρμογέα που περιέχει τομέα TIRAP TIR, μόριο προσαρμογέα σχετιζόμενο με TRAM TRIF, πρωτεΐνη πρωτεύουσας απόκρισης MyD88 Myeloid πρωτεΐνη που προκαλεί ιντερφερόνη-β, κινάση 1 που δεσμεύει TBK1 TANK, NF-κΒ Πυρηνικός παράγοντας-κappaB, IRF3 Ρυθμιστικός παράγοντας μεταγραφής ιντερφερόνης 3.

Το 77% αυτών ανταποκρίθηκε θετικά στην αντί-TNFα θεραπεία. Η απόκριση των ασθενών αξιολογήθηκε βάση της μεταβολής του δείκτη βαρύτητας CDAI. Αφού έγινε γονοτύπηση των ασθενών για τον πολυμορφισμό *rs5030728*, ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ασθενών που κατηγοριοποιήθηκαν, τόσο για τους δύο βιολογικούς παράγοντες (infliximab, adalimumab), όσο και για τους ασθενείς που λάμβαναν τον παράγοντα infliximab δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα με το $p=0.585$ και $p=0.331$ αντίστοιχα, ενώ ο δείκτης στατιστικής σημαντικότητας ήταν ορισμένος στο $p \leq 0.05$. Όταν όμως έγινε κατηγοριοποίηση για τους ασθενείς που λάμβαναν τον παράγοντα adalimumab, βρέθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλομόρφου G ήταν σχεδόν στο ίδιο επίπεδο (0.19) στους μη αποκριθέντες σε σχέση με τους αποκριθέντες ασθενείς (0.1). Δεδομένου ότι το $p=0.528$, το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Ωστόσο αυτή η μείωση στην συχνότητα πιθανά να υποδηλώνει μια τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs5030728* με την απόκριση στο φάρμακο Adalimumab.

Η συσχέτιση του ομόζυγου γονότυπου GG και του TLR4 έχει ξανά εμφανιστή βάση Naresh K Meena et al 2013, όπου στον γονότυπο GG η έκφραση ιντερφερόνης-γ ($P = 0,014$) μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τον γονότυπο AA. Η πρώιμη εμπειρία της fontolizumab, εξανθρωπισμένου αντισώματος γ-ιντερφερόνης γ, σε ενεργό νόσο του Crohn έδειξε ότι το

φάρμακο προκάλεσε σημαντική μείωση των βαθμολογιών ενδοσκοπικής σοβαρότητας και CRP και ήταν εύλογα καλά ανεκτό. (S Ghosh, R Chaudhary, M Carpani, and R Playford,2006)

Το μικρό δείγμα των ασθενών αποτέλεσε μειονέκτημα στη στατιστική ανάλυση. Περαιτέρω ανάλυση σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα ασθενών πιθανά να δείξει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alexander Tsertsvadze , Tara Gurung , Rachel Court , Aileen Clarke , Paul Sutcliffe, Health Technol Assess..Clinical effectiveness and cost-effectiveness of elemental nutrition for the maintenance of remission in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis 2015 Mar;19(26):1-138.doi: 10.3310/hta19260

Anaya JM, Corena R, Castiblanco J, Rojas-Villarraga A, Shoenfeld Y. The kaleidoscope of autoimmunity: multiple autoimmune syndromes and familial autoimmunity. Expert Review of Clinical Immunology. 2007;3:623–35.

Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors.Bogota (Colombia) Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet].: El Rosario University Press; 2013 Jul 18.

Andersson, D.A., C. Gentry, and S. Bevan. 2012. TRPA1 has a key role in the somatic nociceptive actions of hydrogen sulfide. PLOS ONE, 7: e46917.

Baeuerle PA, and Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu. Rev. Immunol. 1994; 12:141-79.

Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. Am J Gastroenterol. 2000;95(12):3452–7.

Barkett M, and Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 1999; 18(49):6910-24.

Barton CL. Translational medicine in biopharmaceutical R&D: Enabling R&D optimization and early detection of potential failures. Business Insights Ltd. 2007

Bellas RE, FitzGerald MJ, Fausto N, and Sonenshein GE. Inhibition of NF-kappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. Am. J. Pathol. 1997; 151(4):891-6.

Berns M, Hommes DW Anti-TNF- α therapies for the treatment of Crohn's disease: the past, present and future. Expert Opin Investig Drugs. 2016; 25(2):129-43.

Berns M., Hommes D.W. Anti-TNF- α therapies for the treatment of Crohn's disease: The past, present and future. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2016;25:129–143.

Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*.2004; 40:845–859.

Biologic Markers in Immunotoxicology National Research Council (US) Subcommittee on Immunotoxicology.Washington (DC): National Academies Press (US); 1992.ISBN-10: 0-309-04389-1

BonenDK, ChoJH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*.2003; 124:521–536.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005;366:941–51.

Cario E, PodolskyDK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*.2000; 68:7010–7017.

Case for diagnosis. Metastatic Crohn's disease*João Renato Vianna Gontijo,1 Franciele Antonieta Bianchi Leidenz,1 and Maria Silvia Laborne Alves de Sousa1,*An Bras Dermatol*. 2016 Jul-Aug; 91(4): 531–533.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*.1999; 274:10689–10692.

Cordoro KM, Feldman SR. TNF-alpha inhibitors in dermatology. *Skin Therapy Lett*. 2007 Sep;12(7):4-6.

Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer. 1932. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *J. Am. Med. Assoc*. 99:1323--1329.

Crohn's disease: management.NICE Guideline, No. 129.NICE Guideline Updates Team (UK).London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2019 May.

D A Smith , D R Germolec Introduction to immunology and autoimmunity, *Environ Health Perspect* . 1999 Oct;107 Suppl 5(Suppl 5):661-5.

Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12(30):4807–12.

de Groof EJ, Sahami S, Lucas C, Ponsioen CY, Bemelman WA, Buskens CJ. Treatment of perianal fistula in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis comparing seton drainage and anti-tumour necrosis factor treatment. *Colorectal Dis*. 2016 Jul;18(7):667-75.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, and Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005; 446(5):475-82.

Eissner G., Kirchner S., Lindner H., Kolch W., Janosch P., Grell M., Scheurich P., Andreesen R., Holler E. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in

human monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 2000;164:6193–6198. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6193.

Eissner G., Kolch W., Scheurich P. Ligands working as receptors: Reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:353–366. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.011.

Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, Powell JJ, Thompson RP, Pouchard NA. Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm Res.* 1998;47(11):440–5. doi: 10.1007/s000110050358

Fireman, Z., A. Grossman, P. Lilos, Y. Eshchar, E. Theodor, and T. Gilat. 1989. Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970–1980. *Am. J. Gastroenterol.* 84:255–258

Franchimont D, Vermeire S, ElHH, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.*2004; 53:987–992.

Gan HT, Chen YQ, Ouyang Q. Sulfasalazine inhibits activation of nuclear factor-kappaB in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(7):1016–24. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03862.x

Gentle, A., F. Anastasopoulos, and N.A. Mc-Brien. 2001. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 31:502–508.

Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25(51):6680-4.

Goehler, L.E. et al. 2005. Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun*, 19: 334–344.

Hayden MS, and Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132(3):344-62.

Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986–994.

Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Aadland E, Schulz T, Vatn MH, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a five-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(5):602–10. doi: 10.1080/00365520601076124

Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026–1030.

Hochrainer K, Racchumi G, and Anrather J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF- κ B and RNA polymerase II promoter recruitment. *J. Biol. Chem.* 2012; 288(1):285-93. 23100252]

Hukkinen M, Pakarinen MP, Piekkala M, Koivusalo A, Rintala R, Kolho KL. Treatment of complex perianal fistulas with seton and infliximab in adolescents with Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2014 Aug;8(8):756-62.

Human autoimmune diseases: a comprehensive update Lifeng Wang, Fu-Sheng Wang, M. Eric Gershwin, First published: 25 July 2015

Inflammatory Bowel Disease Christopher McDowell; Umer Farooq; Muhammad Haseeb. Last Update: July 1, 2021.

Introduction to immunology and autoimmunity. D A Smith and D R Germolec Published: 1 October 1999

Ishihara S, Yasuda M, Harada I, Mizutani T, Kawabata K, and Haga H. Substrate stiffness regulates temporary NF- κ B activation via actomyosin contractions. *Exp. Cell Res*. 2013; 319(19):2916-27.

Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clinical immunology and immunopathology*. 1997;84:223-43.

Karin M, and Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol*. 2000; 18:621-63.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, and Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol. Cell* 1998; 1(4):543-51.

Kingsbury DJ, Bader-Meunier B, Patel G, Arora V, Kalabic J, Kupper H. Safety, effectiveness, and pharmacokinetics of adalimumab in children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis aged 2 to 4 years. *Clin Rheumatol*. 2014;33(10):1433-41.

Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*. 1993 Nov;30(16):1443-53.

Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, and Kubicka S. NF κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(9):6421-7.

Lee EJ, Kim TO, Song GA, Lee JH, Kim HW, Jee SR, et al. Clinical features of Crohn's disease in Korean patients residing in Busan and Gyeongnam. *Intest Res*. 2016;14(1):30-6. doi: 10.5217/ir.2016.14.1.30

Lee MJ, Freer C, Adegbola S, Elkady S, Parkes M, Hart A, Fearnhead NS, Lobo AJ, Brown SR. Patients with perianal Crohn's fistulas experience delays in accessing anti-TNF therapy due to slow

recognition, diagnosis and integration of specialist services: lessons learned from three referral centres. *Colorectal Dis.* 2018 Sep;20(9):797-803.

Lemaitre B , Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.*1996; 86:973–983.

Lifeng Wang , Fu-Sheng Wang , M Eric Gershwin Human autoimmune diseases: a comprehensive update , *J Intern Med* . 2015 Oct;278(4):369-95. Epub 2015 Jul 25.

Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, and Scheinman RI. NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* 1999; 6(6):570-82

Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998 Sep;41(9):1552-63

Malinen, E., A. Kassinen, T. Rinttila, and A. Palva. 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149:269–277

Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, Hay P, Nolan D, Hughes S, Hughes A, Ryan S, Fitch N, Thorborn D, Benbow A, PREDICT-1 Study Team. *N Engl J Med.* 2008 Feb 7; 358(6):568-79.

Mariani SM. Genes and autoimmune diseases - a complex inheritance. *MedGenMed.* 2004;6:18

May MJ, and Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* 1997; 8(2):63-73.

Mechanisms of human autoimmunity Michael D. Rosenblum, Kelly A. Remedios, and Abul K. Abbas Published April 20, 2015

Michael D. Rosenblum, Kelly A. Remedios, and Abul K. Abbas, Mechanisms of human autoimmunity *J Clin Invest.* 2015 Jun 1; 125(6): 2228–2233. Published online 2015 Jun 1.

Microbial Ecology in States of Health and Disease: Workshop Summary. Forum on Microbial Health; Board on Global Health; Institute of Medicine. Washington (DC): National Academies Press (US); 2014 Feb 18.

Min, H. et al. 2014. TLR4 enhances histamine-mediated pruritus by potentiating TRPV1 activity. *Mol Brain*, 7: 59.

Mitoma H., Horiuchi T., Tsukamoto H., Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents—Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine*. 2018;101:56–63. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.014.

Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *Journal of human genetics*. 2005;50:264–6.

Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24:954–962.

Mucosal Improvement in Patients With Moderate to Severe Postoperative Endoscopic Recurrence of Crohn's Disease and Azathioprine Metabolite Levels Sieglinde Angelberger, MD, Elke Schaeffeler, PhD, Alexander Teml, MD, Wolfgang Petritsch, MD, Olga Shonova, MD, Milan Lukas, MD, Simon Bar-Meir, MD, Karin Dilger, MD, Roland Greinwald, PhD, Ralph Mueller, PhD. *Inflammatory Bowel Diseases*, Volume 19, Issue 3, 1 March 2013, Pages 590–598

Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res*. 2016;14(2):127–38.

Naresh K Meena , Ravi Verma, Nirmal Verma, Vineet Ahuja, Jaishree Paul , TLR4 D299G polymorphism modulates cytokine expression in ulcerative colitis , *J Clin Gastroenterol* . 2013 Oct;47(9):773-80.

National Research Council (US) Subcommittee on Immunotoxicology. 1992

Neurobiology of TRP Channels. Emir TLR, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017

Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. *Intest Res*. 2016;14(2):111–9.

Oliveira IS, Kilcoyne A, Price MC, Harisinghani M. MRI features of perianal fistulas: is there a difference between Crohn's and non-Crohn's patients? *Abdom Radiol (NY)*. 2017 Apr;42(4):1162-1168.

Palmer, S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, H. Bazmi, J.M. Mican, M. Polis, R.L. Dewar, and A. Planta. 2003. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 41:4531–4536.

Past and Future Burden of Inflammatory Bowel Diseases Based on Modeling of Population-Based Data. *Gastroenterology*. 2019

Pharmacogenetics of asthma. Palmer LJ, Silverman ES, Weiss ST, Drazen JM *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Apr 1; 165(7):861-6.

Pinchbeck, B.R., J. Kirdeikis, and A.B. Thomson. 1988. Inflammatory bowel disease in northern Alberta. An epidemiological study. *J. Clin. Gastroenterol.* 10:505--515.

Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene . Science.1998; 282:2085–2088.

Review Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Sartor RB Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006 Jul; 3(7):390-407.

Roden DM. Personalized medicine and the genotype-phenotype dilemma. Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing. 2011;31:17–23

Roles of Neuronal TRP Channels in Neuroimmune Interactions.Alejandro López-Requena, Brett Boonen, Laura Van Gerven, Peter W. Hellings, Yeranddy A. Alpizar, and Karel Talavera.Emir TLR, editor.Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017.

S Ghosh, R Chaudhary, M Carpani, and R Playford. Interfering with interferons in inflammatory bowel disease, Gut. 2006 Aug; 55(8): 1071–1073.

Scheinfeld N. Adalimumab: a review of side effects. Expert Opin Drug Saf. 2005 Jul;4(4):637-41.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. Gut. 1998;42(4):477–84.

Shenoy-Bhangle A, Nimkin K, Goldner D, Bradley WF, Israel EJ, Gee MS. MRI predictors of treatment response for perianal fistulizing Crohn disease in children and young adults. Pediatr Radiol. 2014 Jan;44(1):23-9.

Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14(3):390–400.

Strik AS, Löwenberg M, Buskens CJ, B Gecse K, I Ponsioen C, Bemelman WA, D'Haens GR. Higher anti-TNF serum levels are associated with perianal fistula closure in Crohn's disease patients. Scand J Gastroenterol. 2019 Apr;54(4):453-458.

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, and Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science 1993; 259(5103):1912-5.

Ten Hove T., van Montfrans C., Peppelenbosch M.P., van Deventer S.J.H. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. Gut. 2002;50:206–211.

The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes.Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner JPharmacogenomics J. 2008 Feb; 8(1):4-15.

The Mount Sinai Journal of Medicine, New York, 01 May 2000, 67(3):174-189

Thomas Greuter, Alberto Piller, Nicolas Fournier, Ekaterina Safroneeva, Alex Straumann, Luc Biedermann, Sébastien Godat, Andreas Nydegger, Michael Scharl, Gerhard Rogler, Stephan R Vavricka, Alain M Schoepfer, Upper Gastrointestinal Tract Involvement in Crohn's Disease: Frequency, Risk Factors, and Disease Course,Swiss IBD Cohort Study Group Journal of Crohn's and

Colitis, Volume 12, Issue 12, December 2018, Pages 1399–1409,
<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy121>Published:25 August 2018

Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, Johnson DR, MacLean AR, Buie WD. Combined seton placement, infliximab infusion, and maintenance immunosuppressives improve healing rate in fistulizing anorectal Crohn's disease: a single center experience. *Dis Colon Rectum*. 2003 May;46(5):577-83.

Török HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol*. 2004; 112 :85–91.

Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. Derkx B, Taminau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S *Lancet*. 1993 Jul 17; 342(8864):173-4.

Van Den Brande J.M.H., Koehler T.C., Zelinkova Z., Bennink R.J., Te Velde A.A., Ten Cate F.J.W., Van Deventer S.J.H., Peppelenbosch M.P., Hommes D.W. Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2007;56:509–517.

Vena GA, Cassano N. Drug focus: adalimumab in the treatment of moderate to severe psoriasis. *Biologics*. 2007 Jun;1(2):93-103

Voight BF, Cotsapas C. Human genetics offers an emerging picture of common pathways and mechanisms in autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2012;24:552–7.

Vora P, Shih DQ, McGovern DP, Targan SR. Current concepts on the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Front Biosci*. 2012;4:1451–77.

Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*. 1996;85:311–8.

Wang, T. and M.J. Brown. 1999. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem*. 269:198–201.

Woods, R.J. and B.M. Rothschild. 1988. Population analysis of symmetrical erosive arthritis in Ohio Woodland Indians (1200 years ago). *J. Rheumatol*. 15:1258-1263.

Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsur M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, and Sonenshein GE. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J*. 1996; 15(17):4682-90.

Xiao G, Harhaj EW, and Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* 2001; 7(2):401-9.

Yarur AJ, Kanagala V, Stein DJ, Czul F, Quintero MA, Agrawal D, Patel A, Best K, Fox C, Idstein K, Abreu MT. Higher infliximab trough levels are associated with perianal fistula healing in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Apr;45(7):933-940.

Zanotti C, Martinez-Puente C, Pascual I, Pascual M, Herreros D, García-Olmo D. An assessment of the incidence of fistula-in-ano in four countries of the European Union. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Dec;22(12):1459-62.

Zhang C, Liu LW, Sun WJ, Qin SH, Qin LZ, Wang X. Expressions of E-cadherin, p120ctn, beta-catenin and NF-kappaB in ulcerative colitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015;35(3):368-73.