



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Τοξικολογία

**«ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ  
*rs7222094* ΤΗΣ *MAP3K14* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ  
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΥΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ  
ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ αντί-TNF $\alpha$  ΘΕΡΑΠΕΙΑ»**

«Pharmacogenetic association study of *MAP3K14* (*rs7222094*)  
polymorphism in IBD patients under biological treatment with anti-  
TNF $\alpha$  therapies»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΜΑΚΡΙΔΟΥ ΕΥΤΥΧΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

**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

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Τοξικολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το πειραματικό κομμάτι της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Πατρών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας, του τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του τμήματος Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Αρχικά ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ιωάννη Βασιλόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Γενετικής του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, επιβλέπων καθηγητή σε αυτή την εργασία, καθώς και τον κ. Ιωάννη Βιζιριανάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Φαρμακολογίας και Φαρμακογονιδιωματικής του τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Στη συνεργασία μας ήταν πάντα πρόθυμοι να με συμβουλέψουν και με καθοδηγήσουν, καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Φανή Χατζοπούλου, Διδάκτορα του τμήματος Ιατρικής στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε στο πειραματικό κομμάτι της γονοτύπησης και τον κ. Χρήστο Παπαγιαννόπουλο, υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος Φαρμακευτικής, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την βοήθειά του στην κατανόηση διαφόρων εννοιών και μεθόδων.

Τέλος να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συμμετοχή του στη εξεταστική επιτροπή.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>II. ABSTRACT</b> .....	7
<b>III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου.....	9
1.2 Επιδημιολογία.....	10
1.3 Αιτιοπαθογένεια.....	12
1.3.1 Ανοσολογικοί παράγοντες.....	12
1.3.2 Γενετικοί παράγοντες.....	13
1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	15
1.4 Φαρμακευτική θεραπεία και απόκριση.....	16
1.4.1 Αντί-TNFα θεραπεία στις ΙΦΝΕ.....	17
1.4.1.1 Infliximab.....	17
1.4.1.2 Adalimumab.....	18
1.4.1.3 Απόκριση στη αντί-TNFα θεραπεία και παρενέργειες.....	18
1.4.2 Ο ρόλος της Φαρμακογενετικής στην επιλογή φαρμακευτικής θεραπείας.....	19
1.5 Αναδυόμενοι ρόλοι της εναλλακτικής σηματοδότησης του NfkB στη διαμόρφωση της παθοβιολογίας των ΙΦΝΕ.....	20
1.5.1 Ο ρόλος της κινάσης MAP3K14 στην εναλλακτική οδό σηματοδότησης του NfkB.....	20
1.5.2 Πολυμορφισμός <i>rs7222094</i> της MAP3K14 κινάσης.....	20
<b>IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. Σκοπός.....	23
2. Υλικά και μέθοδοι.....	24
2.1 Συλλογή Στοιχείων Των Ασθενών.....	24
2.2 Λήψη Αίματος.....	24
2.3 Απομόνωση DNA.....	24
2.4 Προσδιορισμός της καθαρότητας και συγκέντρωσης του DNA.....	25
2.5 Real-Time PCR - Μέθοδος TaqMan.....	26
2.6 Στατιστική επεξεργασία.....	28

3. Αποτελέσματα.....	28
3.1 Αποτελέσματα της Real Time PCR.....	28
3.2 Γονοτύπηση.....	30
4. Στατιστική Ανάλυση.....	31
5. Συζήτηση.....	32
Βιβλιογραφία.....	34

## I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ), συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Crohn (NC) και της ελκώδους κολίτιδας (ΕΚ), είναι αποτέλεσμα χρόνιας απορρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης του γαστρεντερικού σωλήνα. Παρόλο που η αιτία της παθογένειας της νόσου είναι ακόμα άγνωστη, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι γενετικοί παράγοντες, περιβαλλοντικοί παράγοντες και η μικροχλωρίδα του εντέρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την εξέλιξή τους.

Την τελευταία δεκαετία έχει υπάρξει τεράστια πρόοδος στη θεραπεία των ΙΝΦΕ με βιολογικούς παράγοντες. Πρόκειται για μονοκλωνικά αντισώματα, που δεσμεύουν τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), ο οποίος αποτελεί βασική κυτταροκίνη των ανοσοαποκρίσεων. Τα μονοκλωνικά αντισωμάτων adalimumab (ADA) και infliximab (IFX), έναντι του TNF-α (αντί-TNFα θεραπεία), έχουν βοηθήσει σημαντικά στην ύφεση των νόσων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΙΦΝΕ. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική μεταβλητότητα, τόσο μεταξύ της κλινικής απόκρισης, όσο και της τοξικότητας αυτών των παραγόντων. Διάφορες έρευνες που διεξήχθησαν τα τελευταία χρόνια, προσπάθησαν να συσχετίσουν τις γονιδιακές παραλλαγές των ασθενών με ΙΦΝΕ με την κλινική απόκριση. Ο απώτερος στόχος είναι η ανάπτυξη νέων γενετικών δεικτών που θα μπορούν να προβλέψουν την ατομική απόκριση στη θεραπεία.

Στη παρούσα φαρμακογενετική μελέτη γίνεται έλεγχος της συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs7222094* του γονιδίου της MAP3K14/NIK κινάσης, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, με την απόκριση στην βιολογική θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα infliximab και adalimumab.

Η MAP3K14/NIK κινάση επιλέχθηκε γιατί αποτελεί κεντρικό ένζυμο στο εναλλακτικό μονοπάτι σηματοδότησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NfκB, ο οποίος αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της φλεγμονώδους απόκρισης. Ο πυρηνικός παράγοντας NfκB ενεργοποιείται μέσω δύο οδών σηματοδότησης, της κανονικής οδού και της εναλλακτικής οδού, οι οποίες διαφέρουν τόσο ως προς τα μόρια σηματοδότησης όσο και ως προς τις βιολογικές τους λειτουργίες. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν σημαντικούς ρόλους της εναλλακτικής οδού στη ρύθμιση διαφόρων ανοσολογικών αποκρίσεων που μπορούν να προσφέρουν νέες ευκαιρίες για θεραπευτικές στρατηγικές. Στην μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη για τις ΙΦΝΕ, που έγινε το 2014, φάνηκε ότι διάφοροι βασικοί λειτουργικοί πολυμορφισμοί, δηλαδή πολυμορφισμών που επηρεάζουν την ακεραιότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος, που συμμετέχουν τόσο στο κανονικό όσο και στο εναλλακτικό μονοπάτι σηματοδότησης του NfκB, φαίνεται να σχετίζονται με την απόκριση στην αντί-TNFα θεραπεία.

Στα πλαίσια της εργασίας, μελετήθηκαν 48 ασθενείς με ΙΦΝΕ από την Ελλάδα και συγκεκριμένα από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το «Βενιζέλιο-Πανάνειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά. Η εύρεση του γονότυπου των ασθενών πραγματοποιήθηκε σε DNA, που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών, μέσω Real-Time PCR (μέθοδος TaqMan). Η απόκριση των ασθενών στη θεραπεία αξιολογήθηκε βάσει της μεταβολής του δείκτη βαρύτητας CDAI, σε διάρκεια 24 μηνών. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για  $p \leq 0.05$ .

Η ανάλυση συσχέτισης για τον πολυμορφισμό της MAP3K14 δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόκριση στην θεραπεία με adalimumab (ADA) και infliximab (IFX). Ωστόσο παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της συχνότητας του κοινού αλληλομόρφου C (0.70) στους ασθενείς που δεν αποκρίνονται στη θεραπεία με ADA, σε σχέση με τους ασθενείς που αποκρίνονται στη θεραπεία (0.44). Δεδομένου ότι το  $p=0.180$ , το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

## II. ABSTRACT

Idiopathic inflammatory bowel diseases (IBDs), including Crohn's disease (NC) and ulcerative colitis (UC), are the result of chronic deregulation of the gastrointestinal tract inflammatory response. Although the cause of the pathogenicity of the disease is still unknown, there is strong evidence that genetic, environmental factors and small intestinal microflora play an important role in its occurrence and progression.

In the last decade there has been tremendous progress in the treatment of IBDs with biological agents. These are monoclonal antibodies that bind to the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), which is a key cytokine of immune responses. Monoclonal antibodies adalimumab (ADA) and infliximab (IFX), against TNF- $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$  treatment), have significantly helped relieve disease and improve the quality of life of IBD patients. However, significant variability is observed between both the clinical response and the toxicity of these agents. Several studies conducted in recent years have attempted to correlate the gene variants of IBD patients with clinical response. The ultimate goal is to develop new genetic markers that could predict individual response to treatment.

The present pharmacogenetic study examines the association of the *rs7222094* polymorphism of the MAP3K14/NIK kinase gene in IBD patients with response to biological treatment with infliximab and adalimumab monoclonal antibodies.

MAP3K14/NIK kinase was chosen because it is a central enzyme in the non-canonical signaling pathway of the nuclear transcription factor Nf $\kappa$ B, which is a central regulator of the inflammatory response. The Nf $\kappa$ B nuclear factor is activated by two signaling pathways, the canonical pathway and the non-canonical pathway, which differ in both their signaling molecules and their biological functions. Recent studies have revealed important roles of the non-canonical pathway in regulating various immune responses that may offer new opportunities for therapeutic strategies. In the larger pharmacogenetic study for IBDs, conducted in 2014, it was found that several key functional polymorphisms, namely polymorphisms that affect the integrity of the protein product, which participate in both, the canonical and the non-canonical Nf $\kappa$ B signaling pathway, appear to be related to the response to anti-TNF $\alpha$  treatment.

In the context of this study, 48 patients with IFNE from Greece and specifically from the University Hospitals of Larissa, Athens and Crete were studied. Patients' genotypes were identified in DNA, isolated from the patients' peripheral blood, using Real-Time PCR (TaqMan method). Patients' response to treatment was assessed based on the change in the CDAl severity index over a 24-month period. Statistical analysis was performed for  $p \leq 0.05$ .

Correlation analysis for MAP3K14 polymorphism showed no statistically significant correlation with adalimumab (ADA) and infliximab (IFX) treatment response. However, there was a tendency to increase the frequency of common C allele (0.70) in patients not responding to ADA therapy compared to patients responding to treatment (0.44). Given  $p=0.180$ , the result is not statistically significant, probably due to the small number of samples.

---

# III ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



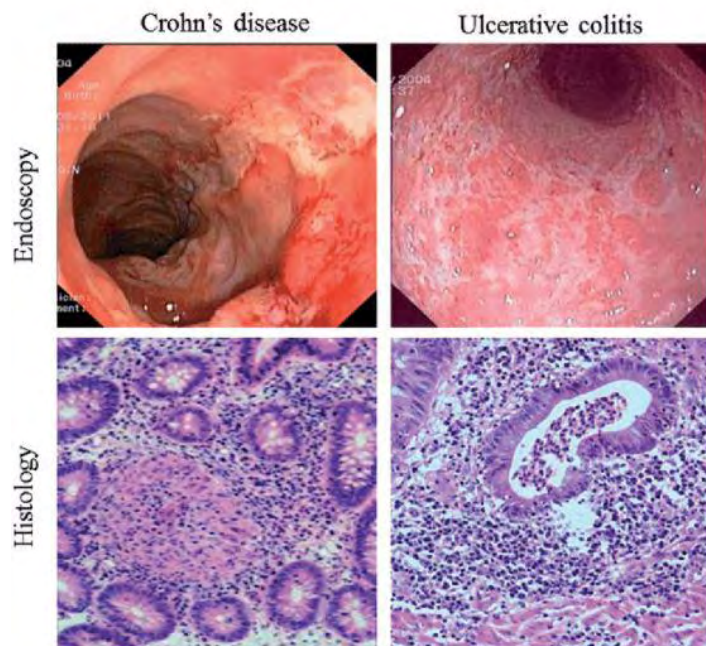
## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ), με κύριες μορφές την νόσο του Crohn (NC) και την ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ), αποτελούν μια κατηγορία πολυπαραγοντικών νόσων με άγνωστη αιτιολογία εμφάνισης. Η επίπτωση αυτής της κατηγορίας γαστρεντερολογικών νοσημάτων φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά παγκοσμίως με την πάροδο των ετών, κυρίως όμως σε χώρες με Δυτικό τρόπο ζωής (Molodecky NA *et al*, 2012 )

Οι ΙΦΝΕ ανήκουν στις αυτοάνοσες νόσους και χαρακτηρίζονται από χρόνια, υποτροπιάζουσα φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα, η οποία μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε τμήμα της γαστρεντερικής οδού (Podolsky, 1991).

Η παρουσίαση των ΙΦΝΕ μπορεί να ποικίλει ως προς τα κλινικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένης της θέσης και της σοβαρότητας της νόσου, της ηλικίας στη διάγνωση και της παρουσίας εξωεντερικών εκδηλώσεων από το δέρμα, τις αρθρώσεις, το ήπαρ ή τους οφθαλμούς (Young Ah Lee *et al*, 2016). Οι ΙΦΝΕ εκδηλώνονται με μια ποικιλία συμπτωμάτων, όπως χρόνια ή υποτροπιάζουσα διάρροια, συχνά με πρόσμιξη αίματος, κοιλιακό άλγος, πυρετό και αναιμία. Σε ορισμένους ασθενείς, στην αρχή της πορείας της νόσου και πριν εκδηλωθούν διακριτά χαρακτηριστικά, μπορεί η μία νόσος να μιμείται την άλλη (Ning Zhou *et al*, 2011 ). Οι διαφορές που διακρίνουν την NC από την ΕΚ αφορούν κυρίως τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των βλαβών που προκαλούν (Εικόνα 1), καθώς και διαφορές στην απόκριση στις θεραπείες (Cisca Wijmenga, 2005 ) (M de Bruyn *et al*, 2016 ).



**Εικόνα 1:** Ενδοσκοπικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Crohn (NC) και της ελκώδους κολίτιδας (ΕΚ): Η NC χαρακτηρίζεται ενδοσκοπικά από γραμμικές και συσσωρευμένες εξελκώσεις και από ανομοιογενείς φλεγμονές, ενώ ιστολογικά μπορεί να εμφανιστεί διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων και παρουσία κοκκιώματος. Στην ΕΚ, παρατηρείται ερύθημα, απώλεια αιμοφόρων αγγείων, ευθρυπτότητα και διάβρωση, ενώ η ιστολογική φλεγμονή χαρακτηρίζεται επίσης από διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων, απώλεια κυψελιδικών κυττάρων και ενδοαυλικά αποστήματα. (M de Bruyn *et al*, 2016 )

Ως προς τον εντοπισμό τους, η ΕΚ προσβάλλει την εσωτερική επιφάνεια του παχέος εντέρου (κόλον και ορθό), ενώ η ΝC είναι δυνατό να προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα του πεπτικού σωλήνα από το στόμα μέχρι και τον πρωκτό, με μη συνεχή τρόπο. Η φλεγμονή στη ΝC περιλαμβάνει όλο το πάχος του τοιχώματος του εντέρου, ενώ στην ΕΚ η φλεγμονή εντοπίζεται στο βλεννογόνο του εντέρου (C Abraham, 2009).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα στην κατανόηση της παθογένειας των ΙΦΝΕ. Είναι σαφές πλέον ότι εμπλέκονται σε αυτές γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες, που έχουν ως αποτέλεσμα υπέρμετρη ανοσολογική απόκριση μετά από έκθεση σε άγνωστο αντιγονικό ερέθισμα. Η συμβολή του καθενός και η ακριβής ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν σε κλινικά εμφανή ΙΦΝΕ, παραμένει αντικείμενο έντονης έρευνας (D McGOVERN *et al*, 2001) (Ayokunle T Abegunde *et al*, 2016 ) (Seung Hoon Lee *et al*, 2018).

Η θνησιμότητας των νόσων είναι χαμηλή, όμως επειδή αποτελεί μια χρόνια ασθένεια και ιδίως όταν εμφανίζεται στην πρώιμη ενηλικίωση έχει σημαντική επίπτωση στην ποιότητα ζωής του ασθενή. Η εξελικτική πορεία των ΙΦΝΕ χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις, που επηρεάζουν πολλές πτυχές τις ζωής του ασθενή όπως την εκπαίδευση, την εργασιακή ικανότητα, τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις (Tiffany H Taft, 2016). Ακόμη όσο μικρότερη είναι η ηλικία εμφάνισης των νόσων τόσο πιο επιθετική είναι η μορφή τους. Κατ' επέκταση οι ΙΦΝΕ επιφέρουν σημαντική επιβάρυνση στο σύστημα υγείας. Μια διεθνής έρευνα στις ΗΠΑ έδειξε ότι το μέσο κόστος ανά έτος για κάθε ασθενή με ΝC και ΕΚ είναι 8,265\$ και 5,066\$ αντίστοιχα (Malekzadeh MM *et al*, 2016)

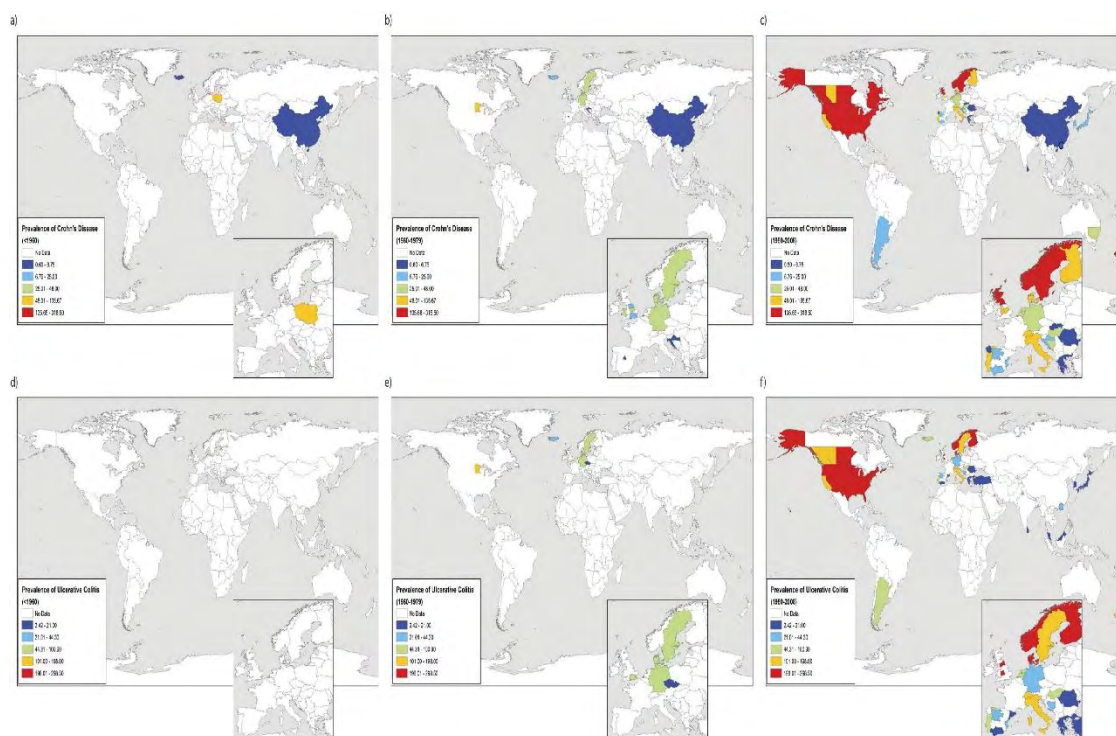
## 1.2 Επιδημιολογία

Παραδοσιακά, οι ΙΦΝΕ εμφανίζονται πιο συχνά στις ανεπτυγμένες βιομηχανικές χώρες, γεγονός που επισημαίνει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αύξηση της συχνότητας εμφάνισης τους (Loftus EV Jr, 2002). Η επίδραση των ΙΦΝΕ αυξήθηκε σημαντικά κατά την διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα και η επίπτωση τους ποικίλλει σημαντικά ανά περιοχή (Εικόνα 2). Η υψηλότερη ετήσια συχνότητα εμφάνισης της ΕΚ ήταν 24,3 ανά 100.000 άτομα/έτος στην Ευρώπη, 6,3 ανά 100.000 άτομα/έτος στην Ασία και τη Μέση Ανατολή και 19,2 ανά 100.000 άτομα/έτος στη Βόρεια Αμερική. Ενώ η υψηλότερη ετήσια συχνότητα εμφάνισης της ΝC ήταν 12,7 ανά 100.000 άτομα/έτος στην Ευρώπη, 5,0 ανά 100.000 άτομα/έτος στην Ασία και τη Μέση Ανατολή και 20,2 ανά 100.000 άτομα/έτος στη Βόρεια Αμερική (Molodecky NA *et al*, 2012).

Επιδημιολογικές μελέτες στην Ελλάδα έχουν δείξει ότι η ετήσια συχνότητα εμφάνισης της ΕΚ το 1994, ήταν 12 φορές μεγαλύτερη από την συχνότητα εμφάνισης της ΝC. Επίσης την περίοδο 1992-1997 οι ασθενείς με ΙΦΝΕ διπλασιάστηκαν σε σχέση με την προηγούμενη δεκαετία (Tsianos E.V. *et al*, 1994) (Tsianos E.V. *et al*, 2005).

Μέχρι πρόσφατα, υπήρχαν λίγες μόνο πληροφορίες σχετικά με την επιδημιολογία των ΙΦΝΕ, που προέρχονται κυρίως από αναδρομικές μελέτες για τις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης (Siew Ng C. *et al*, 2013). Στις περιοχές που παραδοσιακά περιεγράφηκαν ως έχουσες την υψηλότερη επικράτηση, ανήκαν η Βόρεια και Δυτική Ευρώπη και η Βόρεια Αμερική, ενώ τα μικρότερα ποσοστά επικράτησης αναφέρθηκαν στην Ανατολική Ευρώπη, τη Νότια Αμερική και την Ασία (Loftus E.V. Jr., 2004). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν μια μεταβολή στον επιπολασμό των ΙΦΝΕ, με συνεχή αύξηση της επίπτωσης σε περιοχές που είχαν αναφερθεί προηγουμένως ως χαμηλής συχνότητας. Η πρώτη νόσος που εμφανίστηκε ήταν η ΕΚ και στη συνέχεια, μετά από κάποια έτη, η ΝC (Thia K.T. *et al*, 2008), (Peter Laszlo Lakatos *et al*, 2011 ).

Οι διαφορές στη γεωγραφική κατανομή και οι αλλαγές που συμβαίνουν με την πάροδο του χρόνου, σε μια δεδομένη περιοχή, μπορεί να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για την αιτιοπαθογένεια της νόσου. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης των ΙΦΝΕ ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών των χωρών και των πληθυσμών. Αυτές οι διακυμάνσεις ενδεχομένως να αντανακλούν διαφορές που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, καθώς η επίπτωση φαίνεται να είναι υψηλότερη στις αστικές παρά στις αγροτικές περιοχές. Το δίλημμα που υφίσταται όμως είναι εάν πρόκειται για μια πραγματική αύξηση της επίπτωσης σ αυτές τις χώρες ή εάν αυτή η αύξηση οφείλεται, εν μέρει, στις βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης ή στην καλύτερη ενημέρωση και ευαισθητοποίηση σε σχέση με την ασθένεια των ΙΝΦΕ (Thia K.T. et al, 2008).



**Εικόνα 2:** Ο 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 a) 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, e) 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).

Η συχνότητα εμφάνισης των ΙΦΝΕ, σε σχέση με το φύλο, φαίνεται να ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και την νόσο. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη οι γυναίκες είχαν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης της ΝΚ κατά τη διάρκεια της παιδικής τους ηλικίας και μέχρι το ηλικιακό εύρος 10-14 ετών, αλλά είχαν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης μετά από αυτό και ιδιαίτερα για τις ηλικιακές ομάδες 25-29 ετών και άνω των 35 ετών. Αντίθετα η επίπτωση της ΕΚ δεν διέφερε σημαντικά για τις γυναίκες έναντι των αντρών μέχρι την ηλικία των 45 ετών. Ωστόσο σε μεγαλύτερες ηλικίες, οι άνδρες παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της ΕΚ από τις γυναίκες (Shah S.C. et al, 2018).

Όσο αφορά την συχνότητα εμφάνισης των ΙΦΝΕ σε σχέση μόνο με την ηλικία, η NC φαίνεται να προσβάλλει συχνότερα εφήβους και νέους ενήλικες. Οι περισσότεροι ασθενείς βρίσκονται στη 2<sup>η</sup> με 3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής τους όταν διαγιγνώσκονται με NC. Τα τελευταία χρόνια κάποιες ευρωπαϊκές μελέτες κοορτής δείχνουν να υπάρχει μια αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου και στην 8<sup>η</sup> δεκαετία. Αντίθετα, στην ΕΚ η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει τη νόσο στην 3<sup>η</sup> με 4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής τους, ενώ φαίνεται να παρουσιάζεται επίσης μια αύξηση της εμφάνισης της νόσου στην 7<sup>η</sup> με 8<sup>η</sup> δεκαετία. Ωστόσο η αύξηση που παρατηρείται στους ηλικιωμένους, πιθανά να οφείλεται στη μεγαλύτερη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη και στην καλύτερη ιατρική διάγνωση (Ananthakrishnan A.N., 2015).

Οι φυλετικές και εθνοτικές παραλλαγές των φαινοτύπων των ΙΝΦΕ χαρακτηρίζονται ελάχιστα στη βιβλιογραφία, καθώς οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες βασίζονται σε λευκούς πληθυσμούς και περιορίζονται από το μικρό μέγεθος του δείγματος, την περιορισμένη παρακολούθηση και την κοινωνικοοικονομική ετερογένεια. Ο Εβραϊκός πληθυσμός φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ, με τα ποσοστά επίπτωσης να είναι πολλαπλάσια σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό σε ολόκληρο τον κόσμο. Επιπλέον, οι ΙΝΦΕ φαίνεται να εμφανίζονται συχνότερα στους Ασκεναζίτες σε σχέση με τους Σεφαραδίτες Εβραίους, της Μέσης Ανατολής, όμως η τάση αυτή αντιστρέφεται για αντίστοιχους Εβραϊκούς πληθυσμούς στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Βόρεια Ευρώπη, υποδηλώνοντας την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Roth M.P. *et al*, 1989) (Yan B, 2008). Επιπλέον αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει μια υψηλή επικράτηση μετάλλαξεων στο γονίδιο NOD2/CARD15 στους Ασκεναζίτες σε σχέση με άλλους εβραϊκούς πληθυσμούς (Karban A. *et al*, 2004). Το γονίδιο NOD2 (γνωστό αλλιώς ως πρωτεΐνη περιοχής πρόσληψης κασπάσης 15/CARD15) ταυτοποιήθηκε το 1996 ως το πρώτο γονίδιο που φάνηκε να σχετίζεται με την NC, μέσω μελέτης συσχέτισης γονιδιώματος (GWAS) (Hugot J.P. *et al*, 1996), ενώ από το 2001 και μετά έχουν δημοσιευθεί πολλά άρθρα που το αναγνωρίζουν ως γονίδιο ευαισθησίας για την NC (Cho J.H. *et al*, 2003). Τα τρία κύρια αλληλόμορφα του NOD2 /CARD15, που συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης NC σε λευκούς πληθυσμούς, είναι τα *Gly908Arg*, *Arg702Trp* και *Leu1007fs* (Cho J.H., 2003). Επίσης η συχνότητα εμφάνισης του αλληλόμορφου *Gly908Arg* ήταν υψηλότερη στον Εβραϊκό πληθυσμό, ενώ του *Arg702Trp* ήταν υψηλότερη στον μη Εβραίο πληθυσμό (Bonnen D.K. and Cho J.H., 2003). Αντίθετα οι Αφροαμερικανοί έχουν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του NOD2, ενώ παράλληλα εμφανίζουν χαμηλότερη επίπτωση των ΙΝΦΕ. Ο πιο κοινός πολυμορφισμός, στους Αφροαμερικάνους, όταν υπάρχει, είναι ο *Leu1007fs* (Dassopoulos Themistocles *et al*, 2010).

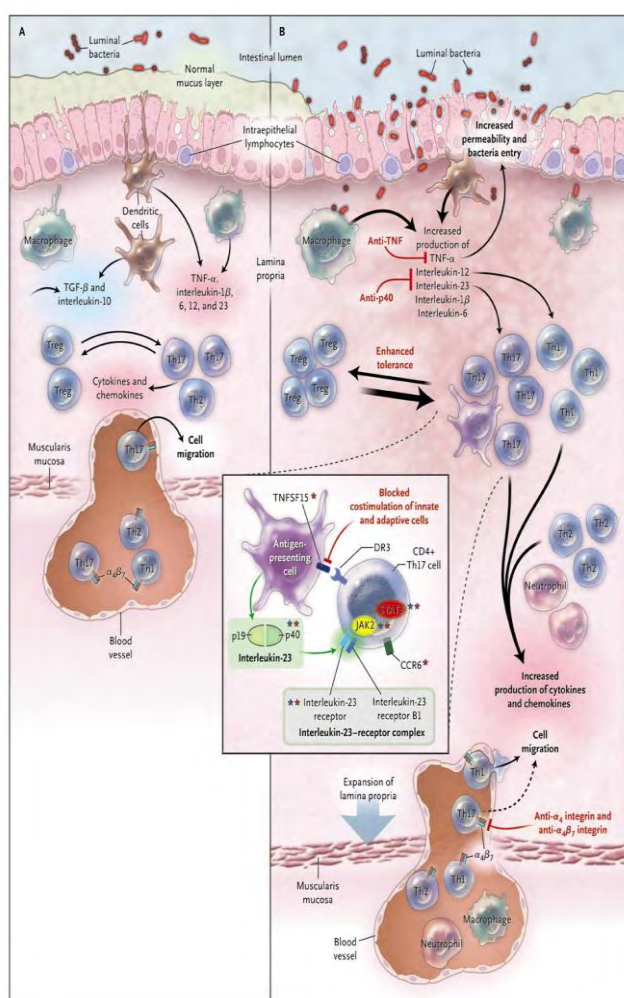
### 1.3 Αιτιοπαθογένεια

#### 1.3.1 Ανοσολογικοί παράγοντες

Στο έντερο των υγιών ατόμων η φλεγμονή προκαλείται ως απόκριση σε πιθανό παθογόνο και μόλις αυτό εξαλειφθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, το έντερο επιστρέφει στην φυσιολογική του κατάσταση με αμυντική φλεγμονώδη απόκριση ή/και αποκτώντας ανοσολογική ανοχή. Σε άτομα με ΙΦΝΕ, ωστόσο, η φλεγμονή δεν μπορεί να ρυθμιστεί και το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου παραμένει χρονίως ενεργοποιημένο και κατ' επέκταση το έντερο χρονίως φλεγμονώδες (Hanauer S.B., 2006).

Και στις δύο μορφές της νόσου, η ελαττωματική απόκριση τόσο του φυσικού (μακροφάγα, ουδετερόφιλα), όσο και του επίκτητου (T και B κύτταρα) ανοσοποιητικού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα μια έντονη στρατολόγηση των ανοσοποιητικών κυττάρων, με παρατεταμένη επιβίωση, κυρίως εξαιτίας της μειωμένης κυτταρικής τους απόπτωσης. Τα κύτταρα αυτά διεισδύουν στον εντερικό υμένα, ενισχύοντας μια συνεχή φλεγμονή και οδηγώντας σε εξασθένηση του εντερικού φραγμού (Duchmann R. *et al*, 1995).

Διάφορες μελέτες για την αιτιοπαθογένεια της NC και της ΕΚ που επικεντρώνονται στην ανοσολογική απόκριση του εντερικού βλεννογόνου και ιδιαίτερα στην απόκριση των Τ λεμφοκυττάρων, έχουν καταλήξει στην άποψη ότι η φλεγμονώδης απάντηση του εντέρου είναι διαφορετική μεταξύ των δύο νόσων. Η ΕΚ συνοδεύεται από αυξημένη διήθηση εντερικών βακτηριδίων, 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 επίπεδα 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 συνεχές κύκλο φλεγμονής (Εικόνα 3). Επιπλέον στη φλεγμονώδη απάντηση στη NC φαίνεται να συμμετέχουν τα Th1 και Th17 βοηθητικά κύτταρα, ενώ στην ΕΚ τα Th2 και Th17. (Clara Abraham *et al*, 2009).



**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).

### 1.3.2 Γενετικοί παράγοντες

Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη σημαντικής γενετικής επιρροής στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ. Ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό παραμένει ο ισχυρότερος αναγνωρίσιμος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη των ΙΦΝΕ και

αναφέρεται σε ποσοστό περίπου 8-12% των ασθενών. Η NC φαίνεται να κληρονομείται συχνότερα σε σχέση με την ΕΚ. Ο κίνδυνος εμφάνισης ΙΦΝΕ στους συγγενείς πρώτου βαθμού ενός προσβεβλημένου ατόμου, αυξάνεται 4 έως 8 φορές. Επιπλέον ο κίνδυνος εμφάνισης νόσου στα παιδιά που γεννιούνται από ζευγάρια που έχουν ΙΦΝΕ είναι σημαντικά υψηλός, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι κληρονομείται ακόμη και ο τύπος της νόσου (Maria Pia Costa Santos *et al*, 2018) (Torres J *et al*, 2016).

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 μονούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Ο εντοπισμός των πολυμορφισμών 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.

Ένα παράδειγμα πολυμορφισμών SNPs, που όπως προαναφέρθηκε, συναντώνται συχνότερα σε ασθενείς με NC, είναι στο γονίδιο NOD2/CARD15. Το NOD2/CARD15 ελέγχει τόσο τις έμφυτες όσο και τις προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις ως μόριο αναγνώρισης παθογόνων. Το NOD2/CARD15 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που δρα ως ενδοκυτταρικός υποδοχέας σε βακτηριακά προϊόντα και μεταδίδει σήματα που οδηγούν στην ενεργοποίηση του παράγοντα NfκB. Στη συνέχεια η ενεργοποίηση του NOD2 προκαλεί αυτοφαγία στα δενδριτικά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα σε ασθενείς με NC και μεταλλάξεις στο NOD2 είναι ανεπαρκή στην επαγωγή αυτοφαγίας (Cooney R. *et al*, 2010). Άλλα δύο γονίδια, που οι SNPs πολυμορφισμοί τους σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ, είναι το IRGM και το ATG16L1, τα οποία συμμετέχουν επίσης σε κυτταρικές διεργασίες του ανοσοποιητικού, επηρεάζοντας την αυτοφαγία και φαγοκυττάρωση των βακτηρίων από τα μακροφάγα. Η μειωμένη δραστηριότητα αυτών των γονιδίων μειώνει την άμυνα του οργανισμού σε ενδοκυτταρικά βακτηρία (Liu J.Z. *et al*, 2015) (Palomino Morales R. J. *et al*, 2009).

Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η κατηγορία των TLR υποδοχέων, που έχει βασικό ρόλο στη διατήρηση της επιθηλιακής ομοιόστασης στο έντερο. Έχει αποδειχθεί ότι τα ποντίκια με έλλειψη σηματοδότησης TLR4 είναι πιο ευαίσθητα στην κολίτιδα, επαγόμενη από θειικό νάτριο δεξτράνης DSS (dextran sulfate sodium), σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου (Franchimont D. *et al*, 2004). Ο TLR4, ο οποίος εκφράζεται στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, συνδέεται με τον λιποπολυσακχαρίτη της κυτταρικής μεμβράνης των αρνητικών κατά gram βακτηρίων και η έκφρασή του αυξάνεται σε άτομα με ΙΦΝΕ. Μεταλλάξεις στους υποδοχείς TLR4, TLR2, TLR1 και TLR6 φάνηκε να σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ (De Jager P.L. *et al*, 2007) (Franchimont D. *et al*, 2004).

Ωστόσο, εκτιμάται ότι μόνο το 8,2% της κληρονομικότητας, για την ΕΚ, και το 13,1% της κληρονομικότητας, για την NC εξηγείται από τους πολυμορφισμούς 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.

### 1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που σχετίζονται με την ΙΦΝΕ ανήκουν το κάπνισμα, η διατροφή, η έκθεση σε περιβαλλοντική μόλυνση, σε χημικά, σε λοιμώξεις, η λήψη φαρμάκων, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και οι ψυχογενείς παράγοντες, όπως το άγχος. Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης και της επίπτωσης των ΙΦΝΕ κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα στις βιομηχανικές χώρες της δύσης, καθώς και στις χώρες που "δυτικοποιείται" ο τρόπος ζωής τους, επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ασθένειας (Loftus E.V. Jr., 2004) (Lakatos, 2006).

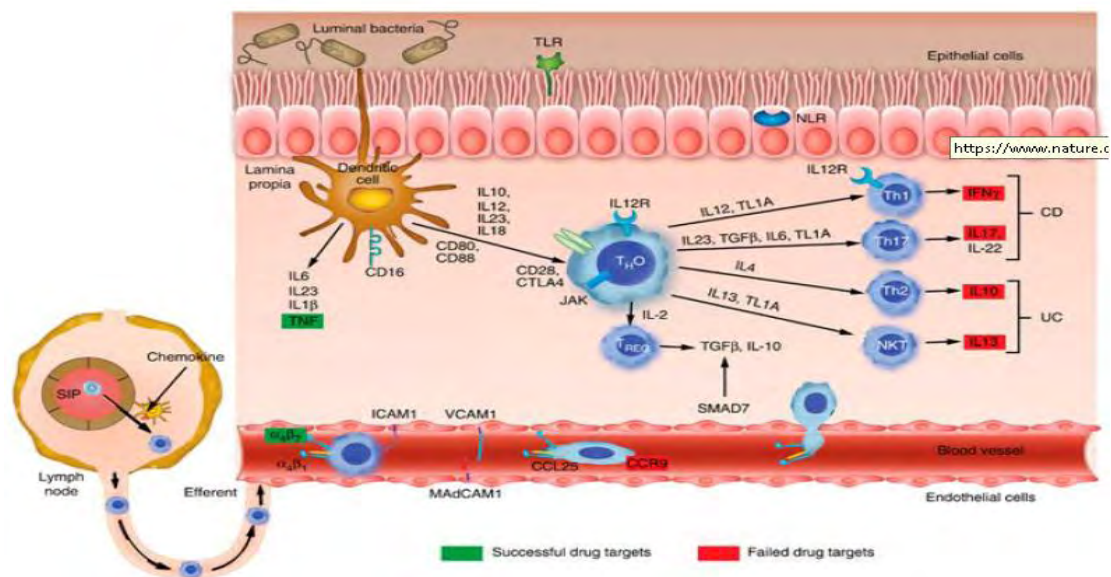
Όπως συμβαίνει και με ασθένειες σαν τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη σκλήρυνση κατά πλάκας και το άσθμα, ο βαθμός υγιεινής, ειδικά κατά την παιδική ηλικία, φαίνεται να παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με την ΙΦΝΕ. Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, που έχουν δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια και προέρχονται κυρίως από τις ανεπτυγμένες χώρες, υπογραμμίζουν την συμβολή των συνθηκών υγιεινής, όπως η έκθεση σε λοιμώξεις, η πρόσβαση σε ζεστό νερό, ο εμβολιασμός και η λήψη αντιβιοτικών κατά την παιδική ηλικία. Ωστόσο η συσχέτιση όλων αυτών των παραγόντων παραμένει ασαφής (Koloski N.A. et al, 2008). Παράλληλα θεωρείται ότι αλλαγές στο μικροβίωμα του εντέρου σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ, καθώς έχει παρατηρηθεί σημαντικά μειωμένη βιοποικιλότητα και αστάθεια στο μικροβίωμα του εντέρου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, συγκριτικά με υγιείς πληθυσμούς. Η "υπόθεση της μικροχλωρίδας", όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, προτείνει ότι οι αλλαγές στο μικροβίωμα του εντέρου λόγω διατροφικών αλλαγών και η χρήση αντιβιοτικών στις δυτικές χώρες έχουν τροποποιήσει τους μικροβιακούς μεσολαβητικούς μηχανισμούς ανοσολογικής ανοχής (Noverr MC, 2005). Συνολικά, αυτές οι υποθέσεις υποδηλώνουν ότι οι περιβαλλοντικές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου και να οδηγήσουν σε ασθένειες. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν ότι η συμβολή των συνθηκών υγιεινής στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ δεν είναι ίδια σε όλους τους πληθυσμούς ανά τον κόσμο και φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με χώρες αυξανόμενης ευημερίας ή μετά από μετανάστευση πληθυσμών από φτωχές σε πιο εύπορες χώρες (Leong RW et al, 2016). Σε μια ενδιαφέρουσα επιδημιολογική μελέτη, που διεξήχθη στην βόρεια Ινδία για τα έτη 2005-2009 και εξέταζε την πιθανή σημασία των συνθηκών υγιεινής στην ανάπτυξη των ΙΦΝΕ, παρατηρήθηκε μια αύξηση στην συχνότητα εμφάνισης της ΕΚ σε σχέση με την αύξηση του βιοτικού επιπέδου (Sood A. et al, 2014).

Ακόμη, σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα των ΙΦΝΕ αποτελεί το κάπνισμα, που ευνοεί την ανάπτυξη της ΝΚ, αλλά φαίνεται να ελαττώνει την πιθανότητα εκδήλωσης της ΕΚ (Calkins BM, 1989). Ο μηχανισμός με τον οποίο το κάπνισμα ασκεί την επίδρασή του στις ΙΦΝΕ δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, στους υποτιθέμενους μηχανισμούς με τους οποίους το κάπνισμα πιθανά ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα στην ΕΚ, μπορεί να περιλαμβάνονται η μείωση της παραγωγής του παράγοντα νέκρωσης όγκου  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) μέσω της δράσης της νικοτίνης στην  $\alpha 7$  υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (nAChR), η αύξηση της παραγωγής της ιντερλευκικής IL-10, η μείωση της έκφρασης της ιντερλευκικής IL-8, η υποαιμάτωση του ορθού του παχέως εντέρου σε απόκριση του μονοξειδίου του άνθρακα, καθώς και η αυξημένη σύνθεση βλεννίνης. Αντίθετα στην ΝΚ, το αυξημένο μονοξείδιο του άνθρακα από τον καπνό τσιγάρου μπορεί να προκαλέσει την εξασθένηση της αγγειοδιαστολής στα χρονίως φλεγμονώδη αγγεία, με αποτέλεσμα την ισχαιμία και τη διαίχιση της εξέλιξης και της ίνωσης. Επιπλέον, πιθανόν να παίζει ρόλο, η μείωση του ολικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού παγίδευσης των ελευθέρων ριζών σε συνδυασμό με ανωμαλίες του μικροαγγειακού συστήματος (Johnson G.J. et al, 2005).

## 1.4 Φαρμακευτική θεραπεία και απόκριση

Αν και είναι πλέον γνωστό πως ανοσολογικές οδοί εμπλέκονται στην παθογένεια των ΙΦΝΕ, η στόχευση τους με φαρμακευτική θεραπεία δεν δίνει πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα. Οι πρόσφατες αποτυχίες των φαρμάκων, ιδιαίτερα στη βιολογική θεραπεία της ΝC, με αντι-ιντερλευκίνη-17 (αντι-IL17) και της ΕΚ, με αντι-ιντερλευκίνη-13 (αντι-IL13), υπογραμμίζουν τη σημαντική έλλειψη στην κατανόηση του αντίκτυπου της παθολογικής ετερογένειας στη θεραπεία των ΙΦΝΕ (Janine Bilsborough *et al*, 2016).

Η έντονη φλεγμονή είναι το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό που συνδέεται με την παθοβιολογία των ΙΦΝΕ. Ως εκ τούτου τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων των ΙΦΝΕ, περιλαμβάνουν αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ, ανοσοκατασταλτικά, όπως αζαθειοπρίνη, μερκαπτοπουρίνη, μεθοτρεξάτη και βιολογικούς παράγοντες όπως *infliximab*, *adalimumab*, *certolizumab*, *golimumab* και *natalizumab*, *vedolizumab*. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες ενώσεων ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιώντας μια Th2 μεσολαβούμενη απόκριση που επιβραδύνει τη φλεγμονή, που προκαλείται από την απόκριση των Th1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως IL-4, IL-5, IL-6 και IL-10 οι οποίοι αναστέλλουν την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων όπως ο TNF, IL-1β, IL-23 και IL-6 (Εικόνα 4) (Janine Bilsborough *et al*, 2016). Η *per os* χορήγηση τέτοιων ενώσεων έχει αποδειχθεί επιτυχής ενάντια στην εντερική φλεγμονή, αλλά έχει αρκετούς περιορισμούς όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις, λόγω ανεπιθύμητων παρενεργειών.



**Εικόνα 4:** Στόχοι των βιολογικών παραγόντων στις ΙΦΝΕ: Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι ανεπιτυχείς στόχοι, ενώ με πράσινο οι επιτυχείς στόχοι των βιολογικών παραγόντων. Οι τρέχουσες θεραπευτικές μέθοδοι στοχεύουν μοριακές οδούς που εμπλέκονται στις μικροβιακές αποκρίσεις του ξενιστή και στη ενεργοποίηση και ρύθμιση των T βοηθητικών κυττάρων (Janine Bilsborough *et al*, 2016).

Σήμερα έξι βιολογικοί παράγοντες είναι εγκεκριμένοι για τη θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων: τέσσερις αντί-TNFα παράγοντες (*infliximab*, *adalimumab*, *golimumab* και *certolizumab pegol*) και δύο αντι-ιντεγκρινοικοί παράγοντες (*natalizumab* και *vedolizumab*) και αποτελούν την πιο σύγχρονη στρατηγική αντιμετώπισης των ΙΦΝΕ, καθώς και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ψωρίαση). Πρόκειται για μονοκλωνικά ανθρῶπινα ή ανθρωποποιημένα αντισώματα (mAbs) που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της υπερπαραγωγής ενδογενών κυτταροκινών (Εικόνα 4). Για τις ΙΦΝΕ χορηγούνται το *infliximab* και το *adalimumab*. Επίσης χορηγείται και το *certolizumab pegol*, το οποίο έχει άδεια κυκλοφορίας μόνο στην Αμερική (Janine Bilsborough *et al*, 2016).



Το οπλοστάσιο των φαρμακευτικών θεραπειών για τις ΙΦΝΕ γίνεται ολοένα και πιο ισχυρό και ως εκ τούτου η ανάγκη ανάπτυξης νέων βιολογικών δεικτών που θα μπορούν να προβλέψουν την απόκριση στις θεραπείες, θα καταστεί όλο και πιο σημαντική για την ιατρική στο εγγύς μέλλον. Η αύξηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων θεραπειών των ΙΦΝΕ και η ελαχιστοποίηση της τοξικότητας τους παραμένει ο κύριος στόχος της ανάπτυξης στρατηγικών διαχείρισης για τους ασθενείς με ΙΦΝΕ.

#### 1.4.1 Αντί-TNFα θεραπεία στις ΙΦΝΕ

Όταν οι θεραπείες με αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά δεν έχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα, είναι δυνατή η χορήγηση θεραπείας έναντι του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF-α (αντί-TNFα θεραπεία), είτε υποδόρια, είτε ενδοφλέβια. Τα τελευταία 20 χρόνια, η αντί-TNFα θεραπεία έχει καταστεί ένας ακρογωνιαίος λίθος στη διαχείριση χρονίως φλεγμονώδων ασθενειών. Οι αντί-TNFα βιολογικοί παράγοντες είναι μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν μεγάλη ειδικότητα ως προς τον TNF-α και είναι σε θέση να μειώσουν αποτελεσματικά την ποσότητα του στον οργανισμό. Η χορήγηση αντί-TNFα θεραπείας χρησιμοποιείται κυρίως για τη αντιμετώπιση των σοβαρών περιπτώσεων ασθενών με ΙΦΝΕ. Οι αντί-TNFα βιολογικοί παράγοντες που χορηγούνται στην Ευρώπη για τις ΙΦΝΕ είναι το *infliximab* (IFX) και το *adalimumab* (ADA) (Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Συλλόγων Ασθενών με Νόσο Crohn & Ελκώδη Κολίτιδα, 2019).

Ο TNFα είναι μια προφλεγμονώδη κυτταροκίνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή που προκαλείται από τις ΙΦΝΕ. Τα επίπεδα του TNFα αυξάνονται σημαντικά στον οργανισμό σε απόκριση της φλεγμονής στο έντερο. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του TNFα αυξάνονται στο ορό, τα κόπρανα και τον εντερικό βλενογόνο σε ασθενείς με ΙΦΝΕ και ως εκ τούτου αποτελεί στόχο ιατρικής θεραπείας (Thomson AB et al, 2012). Μία αύξηση στον TNFα επάγει την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους μεταγραφικού παράγοντα NfκB που με την σειρά του ενισχύει την κυτταρική επιβίωση και φλεγμονή (Marc Fakhoury et al, 2014).

##### 1.4.1.1 Infliximab

Το *infliximab* (IFX) αντιπροσωπεύει την πρώτη αποτελεσματική βιολογική θεραπεία για που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία των ΙΦΝΕ. Το IFX είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τόσο το διαλυτό, όσο και το δεσμευμένο στην κυτταρική μεμβράνη TNFα. Επίσης έχει την ικανότητα να σταθεροποιεί το συμπλήρωμα και να λύει τα κύτταρα που εκφράζουν τον δεσμευμένο TNFα και να επάγει τη μείωση της απόκρισης των φλεγμονωδών μηχανισμών στο εντερικό βλενογόνο (Samuel O. Adegbola et al, 2018). Αρχικά κατασκευάστηκε ως θεραπεία για την NC, όμως πια έχει εγκριθεί και για την θεραπεία της ΕΚ (Travassos WJ and Cheifetz AS, 2005). Οι συμπληρωματικότητες μεταξύ του μορίου TNFα και της μεταβλητής περιοχής του IFX καθιστούν αυτό το αντίσωμα ένα σημαντικό φάρμακο για την θεραπεία για τις ΙΦΝΕ, αλλά και για άλλες αυτοάνοσες διαταραχές. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί που σχετίζονται με το IFX, καθώς κάποιοι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν φυματίωση αμέσως μετά την έναρξη της θεραπείας, η οποία οφείλεται συχνά στην εξουδετέρωση του TNFα (Keane J et al, 2001). Καθυστερημένες αντιδράσεις υπερευαισθησίας παρατηρούνται, επίσης συχνά, μετά τη χορήγηση του IFX. Το IFX χορηγείται ενδοφλέβια ανά διαστήματα 6-8 εβδομάδων (Marc Fakhoury et al, 2014).

#### 1.4.1.2 Adalimumab

Το *adalimumab* (ADA) αποτελεί ένα εξολοκλήρου ανθρώπινο αντίσωμα, που επίσης σταθεροποιεί το συμπλήρωμα και λύει τα κύτταρα που εκφράζουν τον TNFα (Samuel O. Adegbola *et al*, 2018). Επίσης και το *adalimumab* αρχικά χορηγούνταν μόνο για τους ασθενείς που έπασχαν από την NC αλλά εδώ και λίγα χρόνια έχει εγκριθεί και για την EK (Sandborn W.J. *et al*, 2013). Ασθενείς με NC που λαμβάνουν το ADA εμφανίζουν ύφεση των συμπτωμάτων, επούλωση της βλενογόννου του εντέρου αλλά και ύφεση των συριγγίων. Το ADA επίσης, χορηγείται σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στο IFX ή στην περίπτωση που μετά από χρόνια χορήγησης του IFX παρουσίασαν ανοχή στο φάρμακο. Το ADA εμφανίζει λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς, όπως μυκητιασικές μολύνσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών, μπορεί να προκαλέσει πνευμονικές και εντερικές λοιμώξεις και σε μικρό ποσοστό καρκίνο και φυματίωση (Luisa Guidi *et al*, 2011). Το ADA χορηγείται υποδορίως κάθε δύο εβδομάδες (Marc Fakhoury *et al*, 2014).

#### 1.4.1.3 Απόκριση στη αντί-TNFα θεραπεία και παρενέργειες

Παρά τα θετικά αποτελέσματα των τελευταίων δεκαετιών, έχει διαπιστωθεί ότι με τη θεραπεία με αντί-TNFα, είναι δύσκολο να προβλεφθεί η απόκριση και η δόση, για τον κάθε ασθενή, σε σύγκριση με τις συμβατικές (μη βιολογικές) θεραπείες. Έως και το 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αντί-TNFα παράγοντες (πρωτογενείς μη ανταποκρινόμενοι), ενώ σχεδόν οι μισοί ασθενείς που εμφανίζουν όφελος, θα χάσουν αυτά τα κλινικά οφέλη εντός του πρώτου έτους της θεραπείας (δευτερογενής απώλεια απόκρισης) (Sandborn W.J. *et al*, 2007). Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η θεραπευτική μετάβαση σε διαφορετικό αντί-TNFα παράγοντα, μετά από απώλεια απόκρισης, έχει συνήθως όφελος στον ασθενή (Cohen BL and Sachar DB, 2017) (Billioud V *et al*, 2011). Οι λόγοι για τους οποίους ορισμένοι ασθενείς δεν αποκρίνονται ή χάνουν την απόκριση μετά από μια επιτυχή πορεία της θεραπείας δεν είναι εντελώς σαφείς, αλλά είναι πιθανόν να είναι πολυπαραγοντικοί, καθώς επίσης μπορεί να σχετίζονται με το μεταβολισμό του φαρμάκου ή την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αυτού (Yagur AJ and Rubin DT, 2015).

Αν και αυτά τα φάρμακα θεωρούνται γενικά ασφαλή, οι ανεπιθύμητες παρενέργειες εξακολουθούν να μην είναι σπάνιες και ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν αντενδείξεις. Η μακροχρόνια θεραπευτική χρήση των βιολογικών παραγόντων αντί-TNFα μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα όπως ανάπτυξη δερματικών αλλοιώσεων, ανοσολογικών αντιδράσεων, λοιμώξεων, καρκίνων, προβλήματα στην γονιμότητα και στην εγκυμοσύνη (Cohen BL and Sachar DB, 2017) (Bau M *et al*, 2017). Η ευαισθησία σε λοιμώξεις αποτελεί σημαντική ανησυχία κατά την διάρκεια της θεραπείας με αντί-TNFα παράγοντες, σε συνδυασμό με άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Η θεραπεία με αντί-TNFα παράγοντες σχετίζεται επίσης με την ανάπτυξη ευαισθησίας σε φυματίωση, λόγω του ρόλου του TNFα στο σχηματισμό κοκκιωμάτων. Θεωρείται ότι η καταστολή του TNFα αποτρέπει την επαρκή απομόνωση του *Mycobacterium tuberculosis* γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λανθάνουσας φυματίωσης (Keane J *et al*, 2001). Επίσης η θεραπεία με αντι-TNFα παράγοντες συνδέεται με τάση για ανάπτυξη κακοήθειας. Υπάρχουν δεδομένα που υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ασθενείς με IFX και μη-Hodgkin λεμφώματος (Hansen RA *et al*, 2007) (Pagnini C *et al*, 2015).

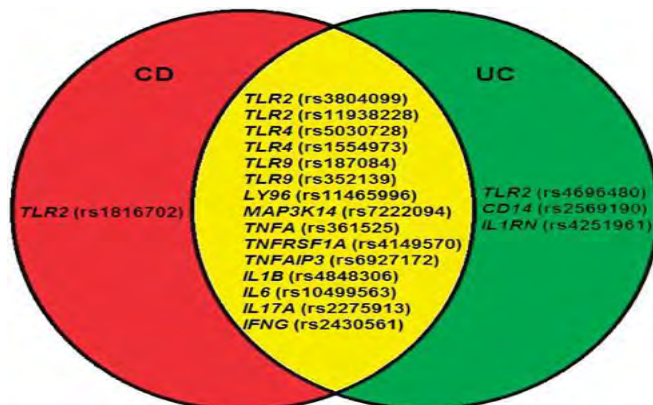
### 1.4.2 Ο ρόλος της Φαρμακογενετικής στην επιλογή φαρμακευτικής θεραπείας

Η Φαρμακογενετική αποτελεί τον επιστημονικό κλάδο που μελετά την συσχέτιση μεταξύ γενετικών παραλλαγών και της μεταβλητότητας στην απόκριση των φαρμάκων, προκειμένου να προσαρμοσθούν τα φάρμακα στο γενετικό υπόβαθρο του κάθε ασθενή και, κατά συνέπεια, να καταστούν πιο αποτελεσματικά και ασφαλή (Kirchheiner J. *et al*, 2005).

Ασθενείς με διαφορετικούς γενετικούς πολυμορφισμούς μπορεί να αποκρίνονται διαφορετικά στην χορήγηση ενός φαρμάκου. Ο μονός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός ή αλλιώς SNP (Single Nucleotide Polymorphism) αποτελεί την πιο συχνή γενετική παραλλαγή, που προκύπτει από αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου από ένα άλλο σε μία ή περισσότερες θέσεις του γονιδίου.

Φαρμακογενετικές μελέτες έχουν διεξαχθεί για σχεδόν όλες τις κατηγορίες των φαρμάκων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ΙΦΝΕ, αλλά ελάχιστες έχουν οδηγήσει σε σταθερά ευρήματα ή έχουν αναπαραχθεί για χρήση στην κλινική πράξη. Η γενετική εξέταση που έχει εγκριθεί για κλινική πρακτική είναι ο έλεγχος της θειοπουρινική S-μεθυλοτρανσφεράση (Thiopurine S-methyltransferase, TPMT) πριν από την έναρξη της θεραπείας με φάρμακα θειοπουρίνης. Το ένζυμο αυτό συμμετέχει στο μεταβολισμό φαρμάκων της κατηγορίας των θειοπουρινών και συγκεκριμένα τα αδρανοποιεί μέσω μεθυλίωσης. Ορισμένοι ασθενείς, λόγω κληρονομικής ανεπάρκειας του ενζύμου TPMT δεν παρουσιάζουν την ίδια ανοχή στην καθιερωμένη δόση των θειοπουρινικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μυελοτοξικότητα. Η γονοτυπική ανάλυση του ανθρωπίνου TPMT επιτρέπει την ανίχνευση των τριών κυριότερων SNP (238G>C, 460 G>A και 719A>G), που συνδέονται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου TPMT (Lennard Lynne, 2014).

Η μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη που έγινε σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, που ακολούθησαν θεραπεία αντί-TNFα, δημοσιεύθηκε το 2014 στη Δανία, σε ένα μεγάλο σχετικά δείγμα ασθενών (n=738). Οι Bank *et al* εξέτασαν 39 λειτουργικούς πολυμορφισμούς, δηλαδή πολυμορφισμούς που επηρεάζουν την ακεραιότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος, σε 26 γονίδια. Αποδείχθηκε πως υπάρχουν 19 λειτουργικοί πολυμορφισμοί που συμμετέχουν στο κανονικό και εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και συσχετίζονται με την απόκριση των ασθενών στην αντί-TNFα θεραπεία (Εικόνα 5). Αυτοί οι πολυμορφισμοί προκαλούν την συνεχή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και τη δημιουργία των φλεγμονώδων κυτταροκινών IL-10, IL-6 και TNFα (Bank S. *et al*, 2014).



**Εικόνα 5:** Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την απόκριση στην αντί-TNF θεραπεία: Οι Bank *et al* εντόπισαν 19 SNPs λειτουργικούς πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB μέσω των υποδοχέων τύπου Toll (TLR) (TLR2, TLR4, TLR9, LY96 CD14), του CD14, της MAP3K14/NIK, της TNF-a σηματοδότησης (TNFA, TNFRSF1A, TNFR1) και των κυτταροκινών που ρυθμίζονται από το NFκB (IL1B, IL1RN, IL6, IL17A και IFNG) (Bank S. *et al*, 2014).

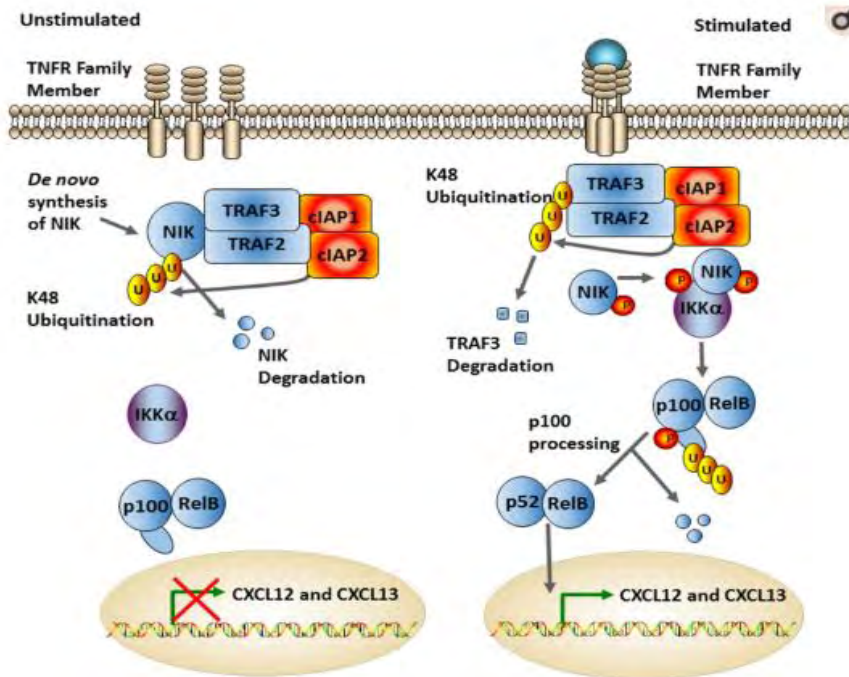
## 1.5 Αναδυόμενοι ρόλοι της εναλλακτικής σηματοδότησης του NfκB στη διαμόρφωση της παθοβιολογίας των ΙΦΝΕ

Οι ΙΦΝΕ, όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται από έντονη ανισορροπία στην ενεργοποίηση προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών οδών σηματοδότησης στο έντερο. Αυτές οι οδοί ελέγχονται από τον NfκB, το οποίο είναι βασικός ρυθμιστής της γονιδιακής μεταγραφής. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του πυρηνικού παράγοντα NfκB ενεργοποιείται από μια κανονική και μια εναλλακτική οδό σηματοδότησης, οι οποίες διαφέρουν τόσο στα μόρια σηματοδότησης όσο και στις βιολογικές λειτουργίες. Σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, η σηματοδότηση του NfκB συχνά απορυθμίζεται με αποτέλεσμα την έντονη φλεγμονή.

Η κανονική οδός σηματοδότησης του NfκB χαρακτηρίζεται καλά στο πλαίσιο των ΙΦΝΕ. Αντιθέτως η εναλλακτική σηματοδότηση του NfκB δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς και υπάρχει σχετική έλλειψη βιβλιογραφίας. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν σημαντικούς ρόλους για την εναλλακτική οδό NfκB στη ρύθμιση των διαφορετικών πτυχών των ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτή η οδός είναι βασική για την παραγωγή συγκεκριμένων χημειοκινών με ποικίλες ανοσολογικές επιδράσεις στο έντερο. Ελαττώματα στην εναλλακτική σηματοδότηση του NfκB σχετίζονται με σοβαρές ανοσολογικές ανεπάρκειες, ενώ η απορυθμισμένη ενεργοποίηση αυτής της οδού συμβάλλει στην παθογένεια διαφόρων αυτοάνοσων και φλεγμονωδών ασθενειών (Shao-Cong Sun, 2017) (Dylan K. McDaniel *et al*, 2016). Για παράδειγμα αρκετοί από τους υποδοχείς που σηματοδοτούν την εναλλακτική οδό NfκB είναι ουσιώδεις για την ανάπτυξη, την ενεργοποίηση και την επιβίωση των κυττάρων B, όπως ο υποδοχέας BR3/BAFF [BAFF-R] και τα CD40 (Coore H.J. *et al*, 2002).

### 1.5.1 Ο ρόλος της κινάσης MAP3K14 στην εναλλακτική οδό σηματοδότησης του NfκB

Στη εναλλακτική οδό σηματοδότησης του NfκB ενεργοποιούνται επιλεκτικά το σύμπλοκο των μεταγραφικών παραγόντων NfκB2, p52 και RELB (επίσης γνωστά ως εναλλακτικά μέλη της οικογένειας NfκB). Η MAP3K14/NIK είναι η κινάση που επάγει την οδό της εναλλακτικής σηματοδότησης του NfκB. Πρόκειται για μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο. Υπό συνθήκες μη διέγερσης, η MAP3K14 αποικοδομείται μέσω της δέσμευσης σ' αυτή ενός συμπλόκου, που αποτελείται από τους παράγοντες TRAF3, TRAF2 και το κυτταρικό αναστολέα απόπτωσης 1 και 2 (cIAP1 / 2), οι οποίοι μαζί εμποδίζουν την ενεργοποίηση της. Μετά την αναγνώριση ενός σηματοδοτικού μορίου της οικογένειας TNF, όπως το CD40, το BAFFR, ο TRAF3 αποικοδομείται και η MAP3K14 ενεργοποιείται. Στη συνέχεια, η MAP3K14 φωσφορυλιώνει τον IKKα. Η ενεργοποίηση του IKKα οδηγεί στη φωσφορυλίωση του παράγοντα p100. Με αυτό τον τρόπο αποβάλλει την ουβικιτίνη του και στη συνέχεια πρωτεασώματα τον διασπούν και τον μετατρέπουν στην ενεργή του μορφή, δηλαδή στον παράγοντα p52. Ο p52 μετατοπίζεται στον πυρήνα μαζί με το μεταγραφικό παράγοντα RelB. Στον πυρήνα, ο NfκB ξεκινά τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων στόχων, όπως οι χημειοκίνες CXCL12 και CXCL13 (Εικόνα 6) (Sun SC, 2012).



**Εικόνα 6:** Η εναλλακτική οδό σηματοδότησης *NfκB* (SUN SC, 2012)

Σε ποντικούς με μετάλλαξη στην MAP3K14 αποκλείεται πλήρως η εναλλακτική οδό σηματοδότηση του *NfκB*. Επίσης τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν μείωση του πληθυσμού των B κυττάρων τους, ενώ παράλληλα στερούνται λεμφαδένες και πλάκες του Peyer (Kanai T. *et al*, 2002). Οι πλάκες του Peyer είναι κρίσιμες για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος στη γαστρεντερική οδό. Για παράδειγμα, δενδριτικά κύτταρα που απομονώνονται από τις πλάκες του Peyer είναι πιο αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση των T κυττάρων σε σύγκριση με δενδριτικά κύτταρα από άλλους ιστούς (Iwasaki A and Kelsall BL, 1999). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η απώλεια της εναλλακτικής σηματοδότησης του *NfκB* σε *knockout* ποντίκια για την MAP3K14, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας συστημικής φλεγμονώδους κατάστασης, μιας διαταραχής που μοιάζει με το υπερεισοφιλικό σύνδρομο (Hypereosinophilic Syndrome, HES) κάτι που υποδεικνύει το βασικό ρόλο της παρουσίας του ενζύμου στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στον οργανισμό (Häcker H. *et al*, 2012).

### 1.5.2 Πολυμορφισμός rs7222094 της MAP3K14 κινάσης

Σε μια έρευνα του 2011 για το σηπτικό σοκ φάνηκε ότι ο CC ομόζυγος γονότυπος του πολυμορφισμός rs7222094 στο γονίδιο της MAP3K14/NIK κινάσης σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της χημειοκίνης CXCL10, η οποία ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα *NfκB* (Simone Thair A. *et al*, 2011). Παράλληλα στην μελέτη των Zarnegar *et al* έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της CXCL10 εξαρτώνται από την MAP3K14/NIK. Συγκεκριμένα η αναστολή της MAP3K14/NIK ρυθμίζει αρνητικά την CXCL10 (Brian Zarnegar *et al*, 2008). Επίσης στη μελέτη των Bank S *et al* ο ετερόζυγος γονότυπος T>C για τον πολυμορφισμός rs7222094 φάνηκε να σχετίζεται με θετική απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με ΙΦΝΕ. Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να σχετίζονται με ένα ανοσολογικό μειονέκτημα των ασθενών με ομόζυγο γονότυπο rs7222094 CC, που ίσως να οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου ότι υπάρχει αυτός ο γονότυπος. Ωστόσο η βιολογική δράση του πολυμορφισμού στον ομόζυγο γονότυπο rs7222094 CC παραμένει ακόμα άγνωστη.

---

# IV ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας είναι η φαρμακογενετική μελέτη του πολυμορφισμού *rs7222094* του γονιδίου της κινάσης MAP3K14, 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 αντί-TNFα θεραπεία με τους βιολογικούς παράγοντες infliximab και adalimumab.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού *rs7222094* πραγματοποιήθηκε με την τυποποιημένη μέθοδο προσδιορισμού γονοτύπου TaqMan® (Life Technologies®, Carlsbad CA) και αποθηκεύτηκε στους 2 με 8°C, όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή.

### 2.1 Συλλογή Στοιχείων Των Ασθενών

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακας 1. Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία με αντί-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).

Πίνακας 1: Κλινικά Χαρακτηριστικά ασθενών

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία (σε έτη), Μ.Ο ± ΤΑ*	43 ± 15.33
Φύλο Α/Θ	29/23
Χρόνος ασθένειας, Μ.Ο ± ΤΑ*	6.54 ± 3.1
Ηλικία εμφάνισης, Μ.Ο ± ΤΑ*	39 ± 11.25
Αρχικό CDAI ΜΟ±ΤΑ	171.14 ± 114.17
CDAI μετά από 24 μήνες, Μ.Ο ± ΤΑ*	48.57 ± 47.82
Αποκριθέντες (ποσοστό)	56%
Μη-αποκριθέντες (ποσοστό)	44%

\*ΤΑ: Τυπική απόκλιση

### 2.2 Λήψη Αίματος

Από κάθε ασθενή έγινε λήψη περιφερικού αίματος που τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια μαζί με αντιπηκτικό K<sub>3</sub>-EDTA και το οποίο φυλάχθηκε στους -20°C. Τα δείγματα προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, το «Βενιζέλιο-Πανάκειο» Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά.

### 2.3 Απομόνωση DNA

Από το ολικό περιφεριακό αίμα των ασθενών εκχυλίστηκε γονιδιωματικό DNA με την παρακάτω μέθοδο:

Αρχικά ξεπαγώνουν τα δείγματα αίματος, γίνεται λήψη 0,5ml και μεταφορά σε erpendorf, προσθήκη 1 ml διαλύματος SSC, ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min. Με προσοχή αφαιρείτε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Ακολουθεί προσθήκη 50 μl SDS 5%, 500 μl 0.2M οξικού νάτριου και 10 μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml), πραγματοποιείται ανάδευση vortex, και επώαση για μία 1h στους 55 °C με συχνή ανάδευση του δείγματος. Το SDS διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA, ενώ η πρωτεϊνάση K διασπά τις πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των νουκλεασών οι οποίες μπορεί να καταστρέψουν το DNA κατά την απομόνωση.



Στην συνέχεια προστίθενται 0.5 ml φαινόλης, 0.5 ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης(24:1) και μετά από έντονη ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm, στους 4 °C.

Μετά την φυγοκέντρηση γίνεται συλλογή της υδατική φάσης και μεταφορά σε νέο eppendorf όπου προστίθενται 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στους 4 °C στις 13000 rpm. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία συλλογής της υπερκείμενης υδατικής φάσης στην οποία προστίθεται 1ml παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους -20° C για 20 min ή ολονύκτια ώστε να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση του DNA.

Η συλλογή του DNA γίνεται με φυγοκέντρηση για 20 min στους -4 °C στις 13000 rpm. Αφού αφαιρεθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται 1ml παγωμένης αιθανόλης 70% και γίνεται φυγοκέντρηση στους 4 °C για 5 min στις 13000 rpm. Αφαιρείτε όλη η ποσότητα αλκοόλης και ακολουθεί ξήρανση του DNA με επώαση στους 37 °C (περίπου 1h). Τέλος γίνεται ηεπαναδιάλυση του DNA με προσθήκη 100μl ddH<sub>2</sub>O και επώαση στους 55 °C για 1h. Το DNA φυλάσσεται στους 4 °C για άμεση χρήση ή στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

#### Διαλύματα:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα SSC 1x** (0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, pH 7)  
Το διάλυμα αυτό προέκυψε από αραιώση διαλύματος 20X
- **Διάλυμα οξικού νατρίου 0.2M** (CH<sub>3</sub>COONa)
- **SDS 5%**
- **Πρωτεΐνωση K** (10mg/ml)
- **Χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη** (24:1 v/v)
- **Διάλυμα φαινόλης**
- **Διάλυμα ισοπροπανόλης**
- **Διάλυμα αιθανόλης 70%**

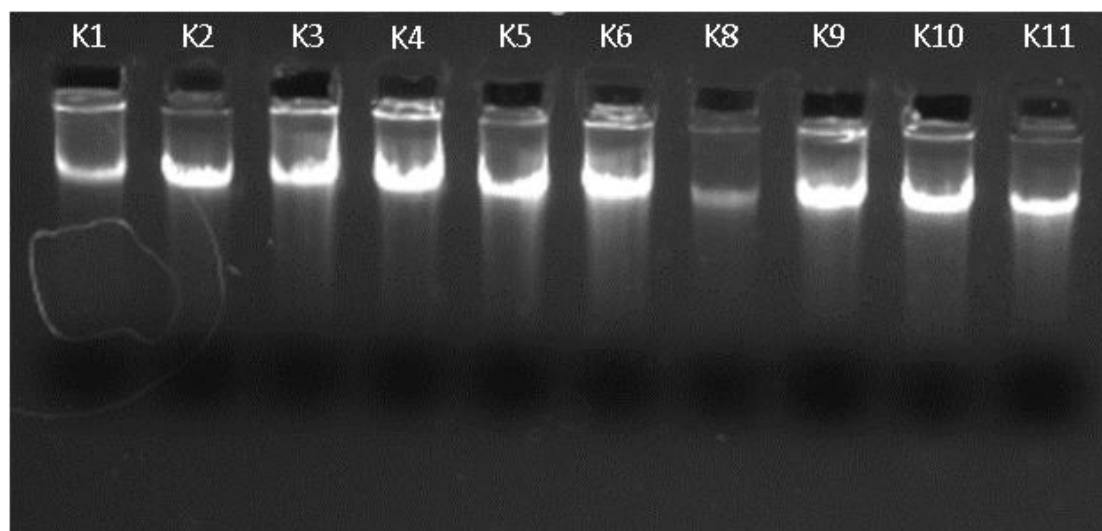
## 2.4 Προσδιορισμός της καθαρότητας και συγκέντρωσης του DNA

Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και συγκέντρωσης του DNA έγινε χρήση του Nanodrop, το οποίο εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία στα 260 nm (OD260) και 280 nm (OD280). Τα 260 nm είναι το μήκος κύματος, όπου παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση οι βάσεις των νουκλεϊκών οξέων και τα 280 nm το μήκος κύματος, που εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση οι πλευρικές ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων. Η συγκέντρωση υπολογιζόταν με βάση τον τύπο:  $C(\text{mg/ml}) = \text{OD} \cdot 50x$  (αραιώση), ενώ η καθαρότητα από το λόγο  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ . Αν ο λόγος ήταν μεταξύ 1,6 και 1,9, η καθαρότητα θεωρούνταν ικανοποιητική. Αν ο λόγος ήταν μικρότερος από 1,6 αντιπροσώπευε την παρουσία πρωτεϊνών, ενώ αν ήταν μεγαλύτερος από 1,9 αντιπροσώπευε την παρουσία RNA. Αφού πρώτα έγινε αραιώση του δείγματος 1/50 (1μl DNA και 49μl ddH<sub>2</sub>O), στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή του Nanodrop από όπου περνάει η υπεριώδης ακτινοβολία και καταλήγει στον φωτοανιχνευτή που μετράει την ακτινοβολία που διαπέρασε το δείγμα. Το DNA απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία οπότε όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο περισσότερη ποσότητα DNA υπάρχει στο δείγμα. Όλες οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων 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-Time PCR.

**Πίνακας 2:** Ενδεικτικές συγκεντρώσεις 10 δειγμάτων DNA και ο λόγος OD260/OD280.

Δείγματα	Συγκέντρωση ng/μl	OD260/OD280
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

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά απομονωμένα δείγματα, στα οποία παρατηρείται η ύπαρξη καλής ποιότητας γενετικού υλικού έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



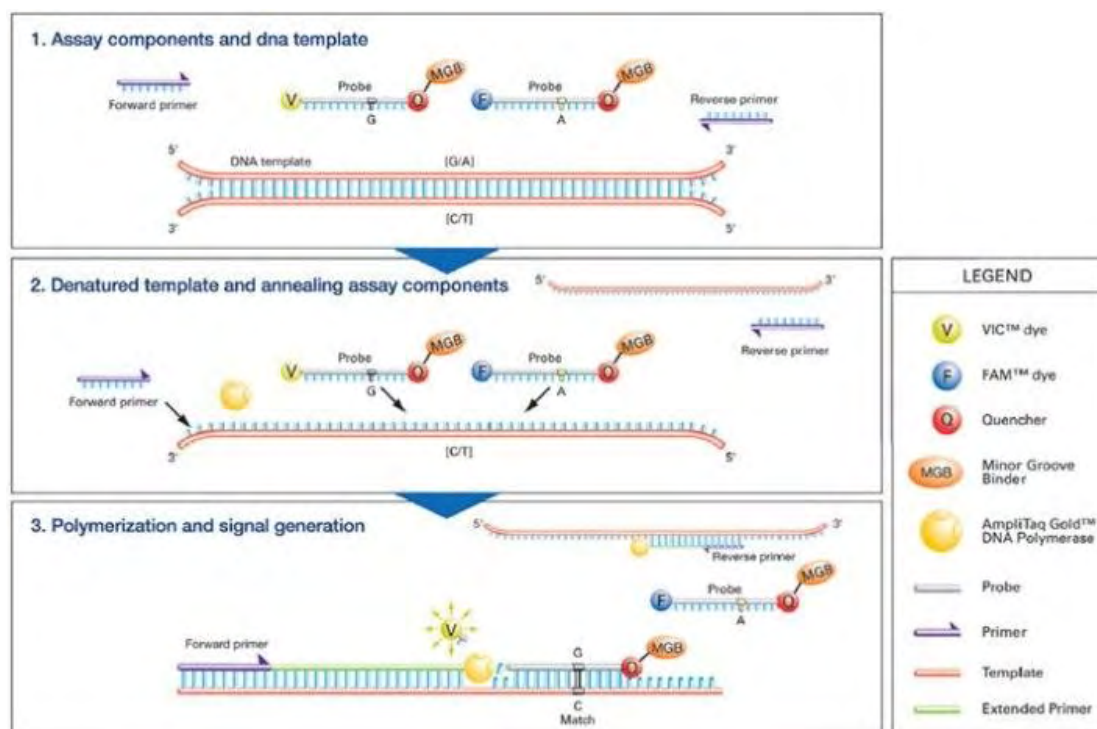
**Εικόνα 7:** Έλεγχος καθαρότητας του γονιδιωματικού DNA μέσω ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

## 2.5 Real-Time PCR - Μέθοδος TaqMan

Το DNA, που απομονώθηκε, ελέγχεται για την παρουσία πολυμορφισμού με την μέθοδο TaqMan.

Η μέθοδος TaqMan είναι μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR), που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Η εφαρμογή της μεθόδου περιλαμβάνει έναν ανιχνευτή υβριδισμού (probe), που φέρει στο άκρο του χρωστική φθορισμού αναφοράς (reporter) και στο άλλο άκρο χρωστική παρεμπόδισης φθορισμού (quencher). Οι χρωστικές φθορισμού που χρησιμοποιούνται είναι η χρωστική FAM ή η χρωστική VIC ως «reporter» (F) και η NFQ ως «quencher» (Q). Η μέθοδος Taqman περιλαμβάνει επίσης τους παράγοντες της κλασσικής PCR (εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου και Taq πολυμεράση) και τα αντίστοιχα στάδια της αποδιάταξης, της σύνδεσης και επιμήκυνσης των

εκκινητών. Όταν ο ανιχνευτής υβριδισμού (probe) δεν έχει υβριδοποιηθεί ακόμα στην συμπληρωματική του αλληλουχία ο παρεμποδιστής (quencher) εμποδίζει την εκπομπή σήματος φθορισμού από την χρωστική φθορισμού (reporter), ενώ όταν συνδέεται με τον έναν από τους δύο εκκινητές της αντίδρασης, υδρολύεται από την πολυμεράση στο στάδιο της επιμήκυνσης, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται σήμα φθορισμού αναφοράς (FAM ή VIC). Σε κάθε κυκλική επανάληψη των σταδίων πολλαπλασιάζεται το σήμα φθορισμού, το οποίο ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με την χρήση ακτινών λείζερ.



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

Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System και το εμπορικό kit TaqMan® Genotyping Master Mix.

Στον Πίνακα φαίνεται η σχέση ανάμεσα στα σήματα φθορισμού και τον γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs7222094 C/T.

**Πίνακας 3:** Συσχέτιση ανάμεσα στα σήματα φθορισμού και τον γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs7222094 C/T

Σήμα φθορισμού	Ένδειξη
VIC® (κόκκινος φθορισμός)	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C (Allele 1)
FAM™ (μπλε φθορισμός)	Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T (Allele 2)
Και οι δύο χρωστικές (κόκκινος και μπλε φθορισμός)	Ετεροζυγωτία (C+T) (Allele 1+Allele 2)

## Αλληλουχία ανιχνευτών:

MAP3K14/NIK rs7222094

Context Sequence: [VIC/FAM] (29b): CACGATGGGCACAG[C/T]CTCCCCTTGCCACA

## 2.6 Στατιστική επεξεργασία

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε αποκριθέντες και μη αποκριθέντες στην θεραπεία για τους αντι-TNF $\alpha$  βιολογικούς παράγοντες infliximab και adalimumab. Βάση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης ομαδοποιήθηκαν και ως ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό rs7222094 C/T.

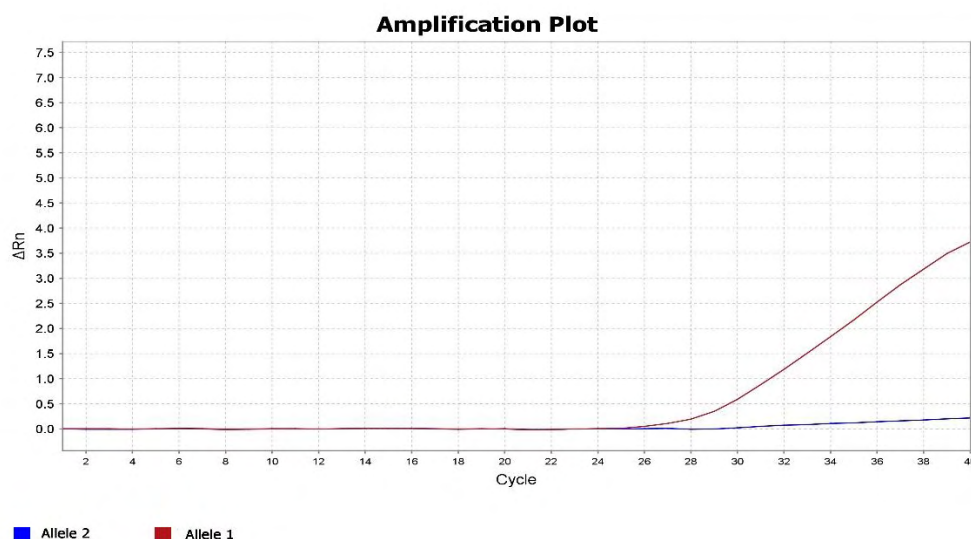
Κατά την στατιστική ανάλυση αρχικά υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του κοινού αλληλομόρφου (C) με το τεστ Cochran-Armitage. Τέλος υπολογίστηκε η επικρατή ή υπολειπόμενη δράση του κοινού αλληλομόρφου (C). Τα p value υπολογίστηκαν με την χρήση πινάκων συνάφειας (TwoByTwo Tables και ThreeByThree Tables). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P \leq 0.05$ .

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Αποτελέσματα της Real Time PCR

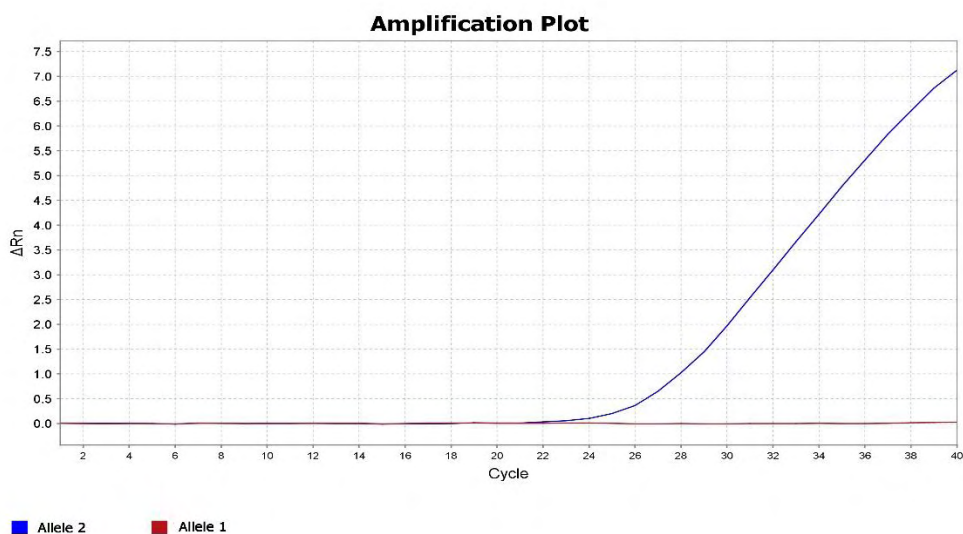
Παρακάτω παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των γονοτύπων του πολυμορφισμού rs7222094 C/T. Σημειώνεται ότι η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στη VIC χρωστική που υποδεικνύει το αλληλόμορφο C, ενώ η μπλέ γραμμή αντιστοιχεί στη FAM χρωστική που αντίστοιχα υποδεικνύει το αλληλόμορφο T.

#### Πολυμορφισμός rs7222094



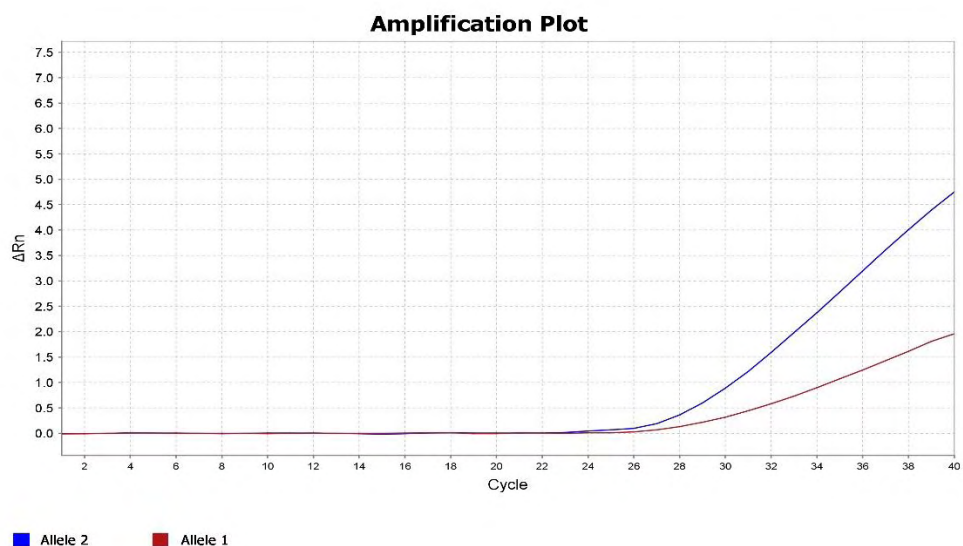
**Εικόνα 9:** Ανάλυση ομοζυγώτη για το αλληλόμορφο C (Allele 1) για τον πολυμορφισμό rs722209

Στην Εικόνα 9 παρατηρούμε υψηλό σήμα φθορισμού μόνο για την χρωστική VIC, που σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος ασθενής είναι ομοζυγώτης ως προς το αλληλόμορφο C (Allele 1).



**Εικόνα 10:** Ανάλυση ομοζυγώτη για το αλληλόμορφο T (Allele 2) για τον πολυμορφισμό rs7222094

Αντίστοιχα στην Εικόνα 10 παρατηρούμε υψηλό σήμα φθορισμού μόνο για την χρωστική FAM, που σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος ασθενής είναι ομοζυγώτης ως προς το αλληλόμορφο T (Allele 2).



**Εικόνα 11:** Ανάλυση ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό rs7222094 (Allele 1+Allele 2)

Αντίθετα στην Εικόνα 11 παρατηρούμε σήμα φθορισμού και για τις δύο χρωστικές που υποδεικνύει ετεροζυγωτία ως προς και τα δύο αλληλόμορφα.

### 3.2 Γονοτύπηση

Οι γονότυποι και ο κωδικός του κάθε ασθενή, με την απόκριση σε κάθε φάρμακο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η ένδειξη R (Responder) αντιστοιχεί σε αποκριθέντες και NR (Non responder) σε μη αποκριθέντες ασθενείς στο φάρμακο. Το K υποδεικνύει ότι το δείγμα προήλθε από το νοσοκομείο της Κρήτης (Βενιζέλιο-Πανάνειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου), το A από το νοσοκομείο της Αθήνας (Τζάνειο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο) και το Λ από το νοσοκομείο της Λάρισας (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας). Η θεραπεία που ακολουθήθηκε αναφέρεται ως Ifx για τον βιολογικό παράγοντα Infliximab και ως Hum ο βιολογικός παράγοντας Adalimumab (εμπορική ονομασία Humira®). Συνολικά βρέθηκε ο γονότυπος σε 44 από τα 48 δείγματα των ασθενών.

**Πίνακας 4:** Οι γονότυποι των ασθενών για τον πολυμορφισμό rs7222094 σε σχέση με την απόκρισή τους στην αντί-TNFα θεραπεία

Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος	Κωδικός ασθενή	Γονότυπος
<b>K1</b> (Ifx-R)	C/T	<b>K14</b> (Hum-R)	C/T	<b>K27</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>Λ2</b> (Ifx-R)	-
<b>K2</b> (Ifx-R)	C/C	<b>K15</b> (Ifx-R)	C/T	<b>K28</b> (Hum-R)	T/T	<b>Λ3</b> (Ifx-R)	-
<b>K3</b> (Ifx-R)	C/T	<b>K16</b> (Ifx-NR)	C/C	<b>K29</b> (Hum-R)	C/C	<b>Λ5</b> (Ifx-NR)	-
<b>K4</b> (Hum-R)	C/T	<b>K17</b> (Ifx-NR)	C/C	<b>K30</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>Λ10</b> (Ifx-R)	C/C
<b>K5</b> (Ifx-R)	C/C	<b>K18</b> (Ifx-NR)	C/C	<b>K31</b> (Ifx-NR; Hum-NR)	C/T	<b>Λ12</b> (Ifx-R)	C/T
<b>K6</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K19</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K32</b> (Ifx-R)	C/C	<b>Λ16</b> (Ifx-R; Hum-NR)	C/C
<b>K8</b> (Ifx-R)	C/C	<b>K20</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K33</b> (Hum-NR)	C/C	<b>Λ17</b> (Ifx-NR)	C/T
<b>K9</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K21</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K35</b> (Hum-R)	T/T	<b>Λ18</b> (Ifx-R)	C/T
<b>K10</b> (Ifx-R)	C/T	<b>K22</b> (Ifx-NR; Hum-NR)	T/T	A15 (Ifx-R)	C/T	<b>Λ19</b> (Ifx-R)	C/T
<b>K11</b> (Ifx-NR)	C/T	<b>K23</b> (Ifx-R)	C/T	A17 (Ifx-R)	C/T	<b>Λ25</b> (Ifx-R)	C/T
<b>K12</b> (Ifx-R)	T/T	<b>K24</b> (Ifx-NR)	C/T	A32 (Hum-R)	T/T	<b>Λ30</b> (Ifx-NR)	T/T
<b>K13</b> (Ifx Hum- NR)	C/C	<b>K25</b> (Ifx-NR; Hum-R)	C/C	<b>Λ1</b> (Ifx-R)	-	<b>Λ31</b> (Hum-R)	C/T

#### 4. Στατιστική Ανάλυση

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε αποκριθέντες και μη αποκριθέντες στην αντί-TNF $\alpha$  θεραπεία, και ομαδοποιήθηκαν βάση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης με την μέθοδο TaqMan σε ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό *rs7222094 C/T* του γονιδίου της κινάσης MAP3K14. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν. Η ανάλυση έγινε και για τα δύο φάρμακα μαζί, αλλά και για το κάθε φάρμακο ξεχωριστά. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P \leq 0.05$ .

**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για όλους τους ασθενείς και για τους δύο αντί-TNF $\alpha$  παράγοντες (Adalimumab & Infliximab).

Πολυμορφισμός	Test (Adalimumab & Infliximab)	Responders	Non Responders	P
MAP3K14 ( <i>rs7222094</i> )	Genotypic [CC/CT/TT]	9/14/4	7/12/3	0.98
	Cochran-Armitage [C/T]	32/22 (0,59)	26/18 (0,59)	0.57
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	23/4	19/3	0.61
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	9/18	7/15	0.57

Σε όλους τους ασθενείς και για τους δύο αντί-TNF $\alpha$  παράγοντες (Adalimumab & Infliximab), για τον πολυμορφισμό *rs7222094 C/T*, παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης (

Πίνακας 3): εκ των αποκριθέντων 9 είναι ομόζυγοι για το C αλληλόμορφο και 4 για το T, ενώ 14 είναι ετερόζυγοι. Στους μη αποκριθέντες 7 είναι ομόζυγοι για το C αλληλόμορφο, 3 για το T αλληλόμορφο και 12 είναι ετερόζυγοι. Επιπλέον, η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε τη συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου C τόσο στους αποκριθέντες όσο και στους μη αποκριθέντες, να είναι ίση 0.59, με το δείκτη στατιστικής σημαντικότητας  $p=0.57$  για  $p \leq 0.05$ . Επομένως η ανάλυση δεν δείχνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λάμβαναν τον βιολογικό παράγοντα Adalimumab.

Πολυμορφισμός	Test (Adalimumab)	Responders	Non Responders	P
MAP3K14 ( <i>rs7222094</i> )	Genotypic [CC/CT/TT]	2/3/3	3/1/1	0.45
	Cochran-Armitage [C/T]	7/9 (0,44)	7/3 (0,7)	0.18
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	5/3	4/1	0.48
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	2/6	3/2	0.24

Αντίστοιχα στον Πίνακα 4 η κατηγοριοποίηση των ασθενών έγινε μόνο για τον βιολογικό παράγοντα Adalimumab. Παρατηρείται πως εκ των αποκριθέντων 2 είναι ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο, 3 ως προς το T αλληλόμορφο και 3 ετερόζυγοι. Σχετικά με τους μη αποκριθέντες 3 είναι ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο, ένας ως προς το T αλληλόμορφο και ένας ετερόζυγος. Η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε ότι η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου C είναι ίση με 0.44 στους αποκριθέντες και 0.70 στους μη αποκριθέντες.

Δεδομένου ότι το  $p=0.18$ , το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό στην παρούσα ανάλυση. Ωστόσο η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του κοινού αλληλομόρφου C στους μη αποκριθέντες, θα μπορούσε πιθανά να υποδεικνύει μια τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs7222094* με την απόκριση στο φάρμακο Adalimumab. Δεδομένου του μικρού δείγματος των ασθενών που ακολούθησαν θεραπεία με το φάρμακο Adalimumab ( $n=13$ ), αυτό θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο και πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα ασθενών.

**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης για τους ασθενείς που λάμβαναν τον βιολογικό παράγοντα *Infliximab*.

Πολυμορφισμός	Test ( <i>Infliximab</i> )	Responders	Non Responders	P
MAP3K14 ( <i>rs7222094</i> )	Genotypic [CC/CT/TT]	6/11/1	4/11/2	0.70
	Cochran-Armitage [C/T]	33/15 (0,69)	19/15 (0,56)	0.16
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	17/1	15/2	0.47
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	6/12	4/13	0.39

Τέλος στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των ασθενών έγινε μόνο για τον βιολογικό παράγοντα *Infliximab*. Παρατηρείται πως εκ των αποκριθέντων 6 είναι ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο, 1 ως προς το T αλληλόμορφο και 11 ετερόζυγοι. Σχετικά με τους μη αποκριθέντες 4 είναι ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο, 2 ως προς το T αλληλόμορφο και 11 ετερόζυγοι. Η ανάλυση Cochran-Armitage έδειξε ότι η συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου C είναι ίση με 0.69 στους αποκριθέντες και 0.56 στους μη αποκριθέντες, με το δείκτη στατιστικής σημαντικότητας  $p=0.16$  για  $p \leq 0.05$ . Επομένως η ανάλυση δεν έχει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

## 5. Συζήτηση

Τις τελευταίες 2 δεκαετίες οι βιολογικοί παράγοντες έναντι του TNF $\alpha$  (αντί-TNF $\alpha$  θεραπεία) έχουν βοηθήσει σημαντικά στην ύφεση των Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου (ΙΦΝΕ). Ωστόσο το 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στη αντί-TNF $\alpha$  θεραπεία, ενώ σχεδόν οι μισοί ασθενείς που εμφανίζουν όφελος στην αρχή της θεραπείας, θα χάσουν αυτά τα κλινικά οφέλη εντός του πρώτου έτους. Ο ρόλος της Φαρμακογενετικής αποδεικνύεται ιδιαίτερα σημαντικός σε αυτές τις περιπτώσεις ασθενών.

Πρόσφατες φαρμακογενετικές μελέτες έχουν αξιολογήσει την αξία των γονιδιακών πολυμορφισμών που μπορούν να προβλέψουν την απόκριση στην αντί-TNF $\alpha$  θεραπεία. Στην μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη που έγινε σε ασθενείς με ΙΦΝΕ ( $n=738$ ) το 2014, οι Bank S *et al*, εντόπισαν 19 λειτουργικούς πολυμορφισμούς που συμμετέχουν στο κανονικό και εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF $\kappa$ B και μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς δείκτες πρόβλεψης για την απόκριση στην αντί-TNF $\alpha$  θεραπεία σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.

Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα μιας μεγαλύτερης φαρμακογενετικής μελέτης, όπου συμμετέχουν πολυμορφισμοί γονιδίων του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B. Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής του εναλλακτικού μονοπατιού ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B στην απόκριση των ασθενών με ΙΦΝΕ στην αντί-TNF $\alpha$  και κατ' επέκταση στην εύρεση δεικτών πρόβλεψης.



Η εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs7222094* του γονιδίου της MAP3K14/NIK κινάσης, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, με την απόκριση στην αντί-TNFα θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα infliximab και adalimumab. Η MAP3K14/NIK κινάση επιλέχθηκε γιατί αποτελεί κεντρικό ένζυμο στο εναλλακτικό μονοπάτι σηματοδότησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NfκB και κατέχει βασικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στην μελέτη συμμετείχαν 48 ασθενείς με ΙΦΝΕ. Το 56% 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 *rs7222094*, ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυση 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  $p=0.98$  και  $p=0.70$  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 C ήταν αρκετά αυξημένη (0.70) στους μη αποκριθέντες σε σχέση με τους αποκριθέντες ασθενείς (0.4). Δεδομένου ότι το  $p=0.18$ , το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Ωστόσο αυτή η μείωση στην συχνότητα πιθανά να υποδηλώνει μια τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού *rs7222094* με την απόκριση στο φάρμακο Adalimumab.

Αυτή η τάση θα συμφωνούσε με τα αποτελέσματα της έρευνας των Simone Thair A. *et al*, όπου φάνηκε ότι ο CC ομόζυγος γονότυπος του πολυμορφισμού *rs7222094* στο γονίδιο της MAP3K14/NIK κινάσης σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της χημειοκίνης CXCL10, η οποία έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται αρνητικά κατά την αναστολή της MAP3K14/NIK. Παράλληλα έχει αποδειχθεί από τους Häcker H. *et al* ότι η απώλεια της εναλλακτικής σηματοδότησης του NfκB σε *knockout* ποντίκια για την MAP3K14, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας συστημικής φλεγμονώδους κατάστασης, κάτι που υποδεικνύει το βασικό ρόλο της παρουσίας του ενζύμου στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στον οργανισμό. Επίσης στην μελέτη των Bank S *et al*, ο ετερόζυγος γονότυπος T>C για τον πολυμορφισμό *rs7222094* φάνηκε να σχετίζεται με θετική απόκριση στη αντί-TNFα θεραπεία. Τα παραπάνω αποτελέσματα των μελετών θα μπορούσαν να σχετίζονται με ένα ανοσολογικό μειονέκτημα των ασθενών με τον ομόζυγο γονότυπο *rs7222094* CC, που ίσως να οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου σε αυτούς τους ασθενείς. Κατ' επέκταση η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου πιθανά συμβάλει στην μεγαλύτερη απορρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης των ασθενών και τελικά στην μη απόκριση τους στην αντί-TNFα θεραπεία. Ωστόσο η βιολογική δράση του πολυμορφισμού *rs7222094* CC καθώς και αν αυτός σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου παραμένει ακόμα άγνωστο.

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.

Μελλοντικός στόχος είναι η επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με ΙΦΝΕ και όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτική δειγματοληψία από όλη την Ελλάδα.

## Βιβλιογραφία

- Ananthakrishnan A.N., 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, Apr, pp. 12(4):205-17.
- Ayokunle T. Abegunde et al, 2016 . Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J Gastroenterol.* , 21 Jul , p. 22(27): 6296–6317.
- Bank S. et al, 2014. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J.*, Dec, pp. 14(6):526-34.
- Bau M. et al, 2017 . SAFETY PROFILE OF ANTI-TNF THERAPY IN CROHN'S DISEASE MANAGEMENT: A BRAZILIAN SINGLE-CENTER DIRECT RETROSPECTIVE COMPARISON BETWEEN INFLIXIMAB AND ADALIMUMAB. *Arq Gastroenterol*, Dec, pp. 54(4):328-332.
- Betts J.C. and Nabel G.J., 1996. Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol Cell Biol*, Nov, pp. 16(11):6363-71.
- Billioud V. et al, 2011. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol*, Apr, pp. 106(4):674-84.
- Bonen D.K. and Cho J.H., 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, Feb, pp. 124(2):521-36.
- Brian Zarnegar et al, 2008. Control of canonical NF-κB activation through the NIK–IKK complex pathway. *PNAS*, 4 Mar, pp. 105 (9) 3503-3508.
- C Abraham, C. J., 2009. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, Nov, pp. 361(21):2066-78.
- Calkins B.M, 1989. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, Dec, pp. 34(12):1841-54.
- Cho J.H. et al, 2003. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord*, pp. 3 Suppl 1:S18-22.
- Cisca Wijmenga, 2005 . Expressing the Differences between Crohn Disease and Ulcerative Colitis. *PLoS Med.*, 30 Aug, p. 2(8): e230.
- Clara Abraham et al, 2009. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*, 19 Nov, pp. 361:2066-2078.
- Cohen B.L. and Sachar D.B., 2017. Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease. *BMJ.* , 19 Jun, p. 357:j2505.
- Cooney R. et al, 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, Jan, pp. 16(1):90-7.
- Coope H.J. et al, 2002. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J*, 15 Oct, pp. 21(20):5375-85.
- D. McGOVERN et al, 2001. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut*, Dec, p. 49(6): 752–754.

- Dassopoulos Themistocles et al, 2010. NOD2 mutations and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies are risk factors for Crohn's disease in African Americans. *Am J Gastroenterol*, Feb, p. 105(2): 378–386.
- De Jager P.L. et al, 2007. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*, Jul, pp. 8(5):387-97.
- Duchmann R. et al, 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, Dec, p. 102(3): 448–455.
- Dylan K. McDaniel et al, 2016. Emerging Roles for Non-canonical NF- $\kappa$ B Signaling in the Modulation of Inflammatory Bowel Disease Pathobiology. *Inflamm Bowel Dis*, Sep, p. 22(9): 2265–2279.
- Franchimont D. et al, 2004. 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*, Jul, p. 53(7): 987–992.
- Häcker H. et al, 2012. NIK prevents the development of hypereosinophilic syndrome-like disease in mice independent of IKK $\alpha$  activation. *J Immunol*, 1 May, pp. 188(9):4602-10.
- Hanauer S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*, Jan, pp. 12 Suppl 1:S3-9.
- Hansen R.A. et al, 2007. Serious adverse events with infliximab: analysis of spontaneously reported adverse events. *Clin Gastroenterol Hepatol.* , Jun, pp. 5(6):729-35.
- Hugot J.P. et al, 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 29 Feb, pp. 379(6568):821-3.
- Irving C. Allen et al, 2017. Noncanonical NF- $\kappa$ B signaling is elevated in inflammatory bowel disease patients and may be associated with therapeutic response. *J Immunol*, 1 May, p. 198 (1 Supplement) 197.5.
- Iwasaki A. and Kelsall B.L., 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.*, Jul, pp. 19;190(2):229-39.
- Janine Bilsborough et al, 2016. Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease: Current and Future. *Am J Gastroenterol* , p. Suppl;3:27–37.
- Johnson G.J. et al, 2005. Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 15 Apr, pp. 21(8):921-31.
- Kanai T. et al, 2002. Role of the innate immune system in the development of chronic colitis. *J Gastroenterol*, Nov, pp. 37 Suppl 14:38-42.
- Karban A. et al, 2004. NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, Jun, pp. 99(6):1134-40.
- Keane J. et al, 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 11 Oct , pp. 345(15):1098-104.

- Kirchheiner J. et al, 2005. Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations—ready for clinical practice?. *Nat Rev Drug Discov*, Aug, pp. 4(8):639-47.
- Koloski N.A. et al, 2008. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol.* , 14 Jan, pp. 14(2):165-73.
- Lakatos, P. L., 2006. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down?. *World J Gastroenterol*, 14 Oct , p. 12(38): 6102–6108.
- Lennard Lynne, 2014. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol*, Apr, p. 77(4): 704–714.
- Leong R.W. et al, 2016. Hygiene Hypothesis: Is the Evidence the Same All Over the World?. *Dig Dis*, 16 Mar, pp. 34(1-2):35-42.
- Liu J.Z. et al, 2015. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*, Sep, pp. 47(9):979-986.
- Loftus E.V. Jr, 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, May, pp. 126(6):1504-17.
- Loftus E.V. Jr, 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.*, Mar, pp. 31(1):1-20.
- Luisa Guidi et al, 2011. Update on the management of inflammatory bowel disease: specific role of adalimumab. *Clin Exp Gastroenterol.*; , 15 Jul, p. 4: 163–172.
- M. de Bruyn et al, 2016 . The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, Sep, pp. 51(5):295-358.
- Malekzadeh M.M. et al, 2016. Emerging Epidemic of Inflammatory Bowel Disease in a Middle Income Country: A Nation-wide Study from Iran.. *Arch Iran Med.*, Jan, pp. 19(1):2-15.
- Marc Fakhoury et al, 2014. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*, 23 Jun, p. 7: 113–120.
- Maria Pia Costa Santos et al, 2018. Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*, Jan-Feb, p. 31(1): 14–23.
- Molodecky N.A. et al, 2012 . Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review.. *Gastroenterology*, Jan, pp. 142(1):46-54.e42.
- Ng S.C. et al, 2013 . Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, Apr, pp. 62(4):630-49.
- Ning Zhou et al, 2011 . Inflammatory bowel disease unclassified. *J Zhejiang Univ Sci B*, Apr, p. 12(4): 280–286.
- Noverr M.C., 2005. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, Dec, pp. 35(12):1511-20.
- Ostvik A.E. et al, 2013. Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation. *Inflamm Bowel Dis*, Feb, pp. 19(2):265-74.

- Pagnini C. et al, 2015. Safety considerations when using anti-TNF $\alpha$  therapy to treat Crohn's disease.. *Expert Opin Drug Saf*, Jan, pp. 14(1):31-44.
- Palomino-Morales R.J. et al, 2009. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Nature: Genes Immun*, 3 Jun, pp. 10, 356–364.
- Peter Laszlo Lakatos et al, 2011 . Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis*, Dec, pp. 17(12):2558-65.
- Petronis A., 2000. Epigenetics of inflammatory bowel disease. *Gut*, Aug, pp. 47(2):302-6.
- Podolsky, 1991. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 26 Sep, pp. 325(13):928-37.
- Roth M.P. et al, 1989. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*, Apr, pp. 96(4):1016-20.
- Samuel O. Adegbola et al, 2018. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*, Aug, p. 19(8): 2244.
- Sandborn W.J. et al, 2007. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial.. *Ann Intern Med*, 19 Jun, pp. 146(12):829-38.
- Sandborn W.J. et al, 2013. Adalimumab in the Treatment of Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis: ULTRA 2 Trial Results. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, May, p. 9(5): 317–320.
- Seung Hoon Lee et al, 2018. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*, Jan, p. 16(1): 26–42.
- Shah S.C. et al, 2018. Sex-Based Differences in Incidence of Inflammatory Bowel Diseases-Pooled Analysis of Population-Based Studies From Western Countries. *Gastroenterology*, Oct, pp. 155(4):1079-1089.
- Shao-Cong Sun, 2017. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, Sep, p. 17(9): 545–558.
- Simone A. Thair at el, 2011. A Single Nucleotide Polymorphism in NF- $\kappa$ B Inducing Kinase Is Associated with Mortality in Septic Shock. *J Immunol*, 15 Feb, pp. 186 (4): 2321-8.
- Sood A. et al, 2014. Low hygiene and exposure to infections may be associated with increased risk for ulcerative colitis in a North Indian population. *Ann Gastroenterol*, pp. 27(3):219-223.
- Sun S.C., 2010. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci Signal*, 25 May, p. 3(123):pe18.
- Sun S.C., 2012. The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Immunol Rev*, Mar, pp. 246(1):125-40.
- Thermofisher, by Jeremy Schoales, 2018. *5 Interesting Facts About TaqMan Assays*, s.l.: s.n.
- Thia K.T et al, 2008 . An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol*, Dec, pp. 103(12):3167-82.
- Thomson A.B. et al, 2012 . Use of the tumor necrosis factor-blockers for Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 21 Sep, pp. 18(35):4823-54.

- Tiffany H. Taft, L. K., 2016. A systematic review of disease-related stigmatization in patients living with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol.*, Mar, p. 9: 49–58.
- Torres J. et al, 2016. Preclinical disease and preventive strategies in IBD: perspectives, challenges and opportunities. *Gut*, Jul, pp. 65(7):1061-9.
- Travassos W.J. and Cheifetz A.S., 2005. Infliximab: Use in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol*, Jun, pp. 8(3):187-196.
- Tsianos E.V. et al, 1994 . Incidence of inflammatory bowel disease in north west Greece: rarity of Crohn's disease in an area where ulcerative colitis is common. *Gut*, Mar, pp. 35(3):369-72.
- Tsianos E.V. et al, 2005. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease in different parts of North-West Greece. *Annals of Gastroenterology*, pp. Volume 18, No 4.
- Yan B., 2008. I am Jewish: what is my risk of developing Crohn's disease?. *Inflamm Bowel Dis*, Oct, pp. 14 Suppl 2:S26-7.
- Yarur A.J. and Rubin D.T., 2015 . Therapeutic Drug Monitoring of Anti-tumor Necrosis Factor Agents in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, Jul, pp. 21(7):1709-18.
- Young Ah Lee et al, 2016. Clinical Features and Extraintestinal Manifestations of Crohn Disease in Children. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.*, 28 Dec, p. 19(4): 236–242..
- Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Συλλόγων Ασθενών με Νόσο Crohn & Ελκώδη Κολίτιδα, 2019. *Κατανοώντας τα Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου*, s.l.: s.n.