



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
Α΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

*Επιδημιολογική, κλινική, γενετική μελέτη ασθενών με
Φλεγμονώδη Πάθηση των Εντέρων και λειτουργική
ανίχνευση ενδοκυττάρων μηχανισμών της νόσου σε
πειραματικά πρότυπα.*

ΦΙΛΗΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΙΑΤΡΟΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Φίλη Γρηγορίου: 23-11-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 567^α/29-11-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας

Μέλη

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Φριλίγγος Ευστάθιος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-12-2005

«Επιδημιολογική, κλινική, γενετική μελέτη ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις των εντέρων και λειτουργική ανίχνευση ενδοκυττάρων μηχανισμών της νόσου σε πειραματικά πρότυπα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 664^α/23-6-2009

1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής – Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Φριλίγγος Ευστάθιος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Χριστοδούλου Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μπαλταγιάννης Γεράσιμος Λέκτορας Γαστρεντερολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-6-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Ευχαριστίες

Οι ερευνητικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήχθησαν κυρίως στο γαστρεντερολογικό εργαστήριο της Ά Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων την διεύθυνση του οποίου έχει ο διευθυντής της Παθολογικής Κλινικής, Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας και επιβλέπων την διδακτορική διατριβή Ε. Β. Τσιάνος.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, τόσο γιατί με συμπεριέλαβε στην ερευνητική του ομάδα δίνοντας μου έτσι την δυνατότητα να εκπονήσω την διατριβή μου σε ένα ενδιαφέρον ερευνητικό πεδίο, όσο και για την καθοδήγησή και τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης η επίβλεψη του από άποψη συμβουλευτική και από άποψη αλληλεπίδρασης μέσω ανταλλαγής επιστημονικών απόψεων, μου επέτρεψε να αφομοιώσω με ευκολία, όλο το θεωρητικό υπόβαθρο για την παρούσα διατριβή, καθώς και να εξάγω βάσιμα συμπεράσματα κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θερμές ευχαριστίες για τη συμβολή τους θα ήθελα επίσης να εκφράσω στους Καθηγητή κ. Θ. Φώτση και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ε. Φριλίγγο που συμπληρώνουν την τριμελή μου επιτροπή, καθώς και στους κυρίους Δ. Χριστοδούλου, Γ. Μπαλταγιάννη, Δ. Γαλάρη και Ι. Γεωργίου που συμπληρώνουν την επταμελή μου επιτροπή. Επίσης στις υπεύθυνες του Γαστρεντερολογικού εργαστηρίου Γιούλα Γεωργίτση και Κλεοπάτρα Γκαραλέα για την ουσιαστική βοήθειά τους και στη Ζωή Τσιάνου για τη βοήθειά της στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες ακόμη στο Δρ. Δ. Κοντογιάννη από το Ερευνητικό Κέντρο «Αλ. Φλέμινγκ», υπεύθυνο του εργαστηρίου μετα-μεταγραφικού ελέγχου του

οποίου η βοήθεια ήταν σημαντική κατά τη διάρκεια της 7μηνης παραμονής μου στο εργαστήριό του και διεξαγωγής των εκεί πειραμάτων. Ακόμη στο διευθυντή του ινστιτούτου Γ. Κόλλια όπως επίσης και στα μέλη των ερευνητικών τους ομάδων, Μ. Δημητρίου, Ν. Σγαντζή, Μ. Ρούλη, Μ. Αποστολάκη, Ο. Παπαδάκη, Β. Κατσάνου και Σ. Μιλάτο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Βιολογίας της Ιατρικής Αθηνών Μαρία Γαζούλη για τη βοήθειά της στην επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας, τις νοσηλεύτριες Άννα Πέτρου και Αλεξάνδρα Κιούλου για τη βοήθεια που προσέφεραν στις αιμοληψίες από τους ασθενείς, καθώς και όλους τους γιατρούς της ΒΔ Ελλάδας (Ηπατο-Γαστρεντερολογική μονάδα, Περιφερειακά νοσοκομεία και ιδιώτες) (ξεχωριστές ευχαριστίες στο Λέκτορα Κ. Κατσάνο και τον ειδικευόμενο Χ. Ζώη για την παραχώρηση στοιχείων από το 2006 έως το 2009) που συνεισέφεραν στη διεκπεραίωση της διατριβής αλλά και τους ασθενείς τόσο για την προθυμία με την οποία συνεργαστήκαν, όσο και την κατανόηση που έδειξαν.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Πάθηση των Εντέρων (ΙΦΠΕ) διακρίνεται σε Ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ) και νόσο του Crohn (NC) οι οποίες είναι φλεγμονώδεις νόσοι του γαστρεντερικού σωλήνα αγνώστου αιτιολογίας. Αποτελούν χρόνιες καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από περιόδους ύφεσης και υποτροπής. Ενώ η αιτιοπαθογένεια της νόσου παραμένει άγνωστη, πλήθος στοιχείων καταδεικνύουν ότι είναι πιθανό να προκαλείται από ένα συνδυασμό τόσο περιβαλλοντικών όσο και γενετικών παραγόντων. Αντικείμενο αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι η επιδημιολογική, κλινική και γενετική μελέτη της νόσου στη ΒΔ Ελλάδα με σκοπό την εξαγωγή των ανάλογων συμπερασμάτων, καθώς και η συσχέτιση της νόσου με πειραματικά πρότυπα.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	11
Τι είναι η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Πάθηση του Εντέρου;	12
Ιστορική θεώρηση	12
1.1 Κλινικές και παθολογικές εκδηλώσεις των ΙΦΠΕ	13
Νόσος του Crohn	13
Ελκώδης κολίτιδα	16
Πρόσφατα θεραπευτικά δεδομένα	18
1.2 Επιδημιολογία	20
Ηλικία και φύλο	20
Γεωγραφική κατανομή	20
Παθογένεση των ΙΦΠΕ : Γονίδια v Περιβάλλον	20
Επιδημιολογικά στοιχεία για κληρονομικότητα στις ΙΦΠΕ	22
Μελέτες εθνοτήτων	22
Οικογενειακές μελέτες	23
Οικογενείς και σποραδικές περιπτώσεις ΙΦΠΕ	25
1.3 Γενετική ανάλυση και ταυτοποίηση γονιδίων της ΙΦΠΕ	28
1.4 Ανοσολογικοί μηχανισμοί στο έντερο και παθοφυσιολογία της νόσου	33
Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας	33
Βακτηριακοί υποδοχείς	35
Μονοπάτια μεταγωγής ενδοκυττάρων σημάτων στην έμφυτη ανοσία	37
Φυσιολογικός ρόλος του γονιδίου CARD15	40
Συνέργεια με άλλους υποδοχείς	43
Νέα γονίδια	43
1.5 Ανάπτυξη συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας ώστε να μελετηθεί ο ρόλος γονιδίων στη ΙΦΠΕ	45
Το <i>tnfΔARE/+</i> πειραματικό πρότυπο εντεροπάθειας τύπου Crohn	46
Μελέτη της επίδρασης κυτοκινών, TNF και αναστολέων της PI3K στη διαπερατότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου σε <i>in vitro</i> σύστημα	48
Πειραματικό μοντέλο	52
1.6 Σκοπός της διατριβής	55
2. Υλικά και Μεθοδολογία	56
2.1 Υλικό της μελέτης	57
Εισαγωγή	57
Περιοχή μελέτης	57
2.2 Μεθοδολογία	60
Απομόνωση DNA	61
Γονιδιακή ταυτοποίηση	65
L1007SinsC	65

R702W	66
G908R	67
Απομόνωση επιθηλιακών κυττάρων	68
2.3 Στατιστική ανάλυση	72
3. Αποτελέσματα	73
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	86
Περίληψη στα Ελληνικά	93
Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract)	96
Βιβλιογραφία	98

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Τι είναι η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Πάθηση του Εντέρου;

Ιστορική θεώρηση

Πολλές φορές έχουν αναφερθεί σε ιατρικά συγγράμματα των περασμένων αιώνων περιπτώσεις ασθενών με χρόνια αιματηρή διάρροια. Παρ' όλα αυτά, η πρώτη περιγραφή Ελκώδους Κολίτιδος ως διακριτή νοσολογική οντότητα προέρχεται από τον Sir Samuel Wilks γιατρό του Guys Hospital στο Λονδίνο. Όπως έχει συζητηθεί, η περιγραφή του στο "The morbid appearance of the colon of Miss Bankes" (Wilks 1859), στην ουσία αντιστοιχεί σε μία περίπτωση νόσου του Crohn. Ο ίδιος σε σύγγραμμά του 16 χρόνια αργότερα (Wilks 1875) περιγράφοντας μια κατάσταση αρκετά διαφορετική από τη λοιμώδη δυσεντερία, χρησιμοποίησε το νεολογισμό "Ελκώδης Κολίτιδα". Αρκετές αναφορές παρόμοιων περιστατικών ακολούθησαν μέχρι το 1930 όταν ο Sir Arthur Hurst περιέγραψε όλες τις κλινικές εκδηλώσεις της ελκώδους κολίτιδας, όπως τις γνωρίζουμε και σήμερα (Hurst 1935). Όσο αφορά τη νόσο του Crohn, έχει πάρει το όνομά της από την περιγραφή οχτώ περιπτώσεων τοπικής ειλειτίδας από τους Crohn, Ginzburg και Oppenheimer (Crohn 1932). Η αλήθεια είναι πως μια παρόμοια περιγραφή κοκκιωματώδους φλεγμονής μη φυματιώδους αιτιολογίας είχε δοθεί νωρίτερα και από τον Dalzeil (Dalzeil 1913). Μεταγενέστερα άρχισε να γίνεται αποδεκτή η παρουσία παρόμοιων κοκκιωματωδών φλεγμονών και στο κόλον αφού η νόσος του Crohn, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα, μπορεί να προσβάλλει κάθε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμα μέχρι τον πρωκτό.

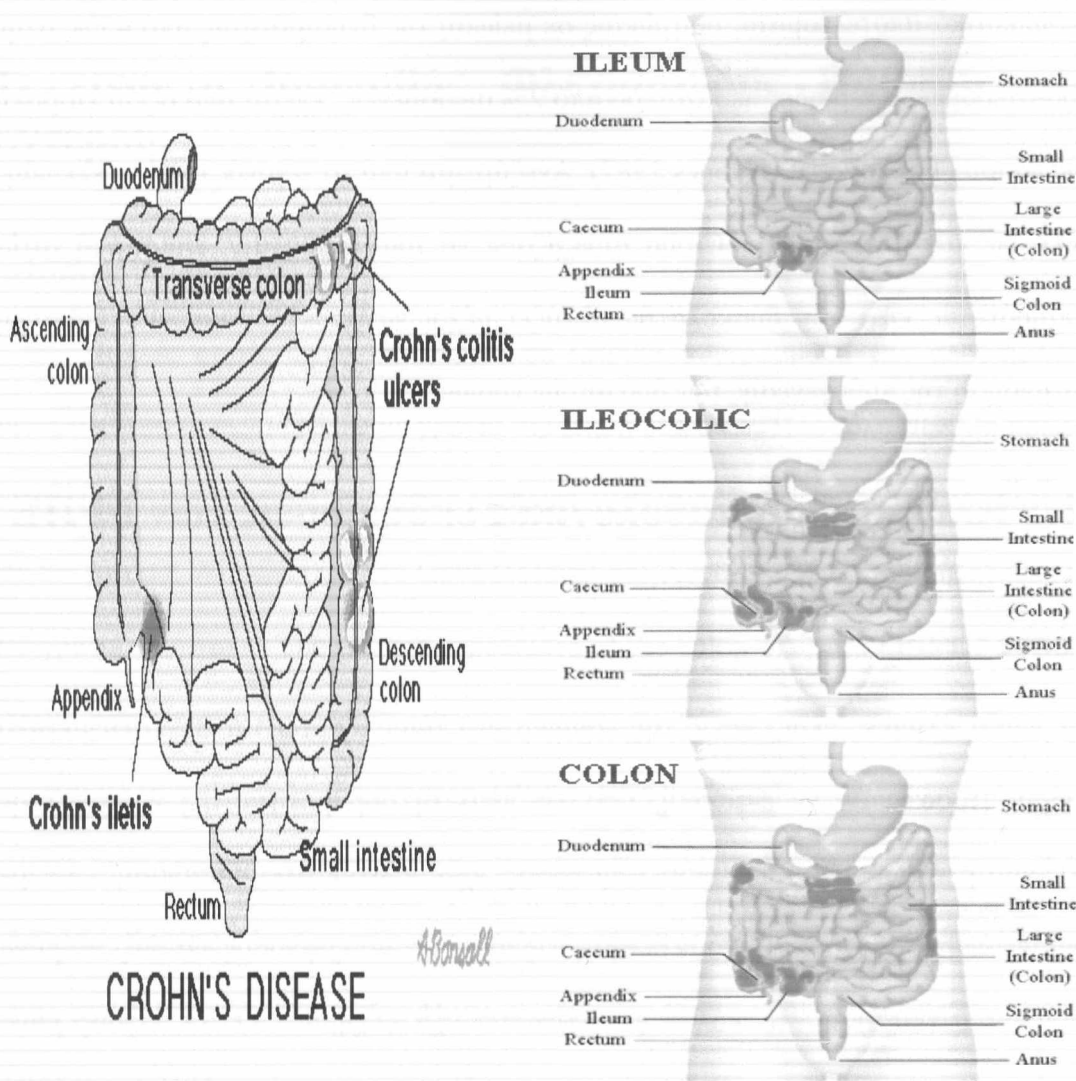
Από τα μέσα της δεκαετίας του 1950 (Truelove 1955) τόσο οι σύγχρονες χειρουργικές τεχνικές όσο και η χρήση των κορτικοστεροειδών επέφεραν σημαντικά

θεραπευτικά αποτελέσματα, οδηγώντας σε μείωση της θνησιμότητας από 45%, στην προ-στεροειδών περίοδο, σε λιγότερο από 2% σε ασθενείς έπειτα από οξεία εισβολή της νόσου (Truelove 1974, Jones 1987). Ανεξάρτητα από το γεγονός αυτό, η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn συνεχίζουν να αποτελούν μια σημαντική αιτία νοσηρότητας κάτι που δύσκολα θα αλλάξει μέχρι να αποκτήσουμε μια βαθύτερη κατανόηση της παθογένεσης των δύο αυτών νόσων.

1.1 Κλινικές και παθολογικές εκδηλώσεις των ΙΦΠΕ

Νόσος Crohn

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου του Crohn εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό τόσο από την εντόπιση, όσο και από τη σοβαρότητα της νόσου. Στην πλειονότητα των ασθενών (45%) η νόσος έχει ειλεο-κολική εντόπιση ενώ με σημαντικά ποσοστά ακολουθούν οι ασθενείς στους οποίους η νόσος εντοπίζεται μόνο στον ειλεό (30%) ή στο κόλον (25%) αντίστοιχα (Σχήμα 1.1). Σε λίγους μόνο ασθενείς εκδηλώνεται με περιπρωκτικές μόνο αλλοιώσεις. Εξαιρετικά σπάνιες είναι οι περιπτώσεις ασθενών με μοναδική εντόπιση της νόσου στο στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι ή το δωδεκαδάκτυλο. Τα κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν κοιλιακό πόνο (ιδιαίτερα στην κατώτερη δεξιά κοιλιακή χώρα) (77%), αιμορραγία (22%), ραγάδες του δακτυλίου (16%) και διάρροια (23%). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα συμπτώματα σχετίζονται με το προσβεβλημένο τμήμα του εντέρου, ενώ συχνές είναι και οι εξωεντερικές εκδηλώσεις όπως αρθραλγία (16%), οζώδες ερύθημα (2%), επισκληρίτιδα και ραγοειδίτιδα (10%), απώλεια βάρους (54%), πυρετός (35%) και αναιμία (27%).



Σχήμα 1.1 Θέσεις εντόπισης της νόσου του Crohn

Μακροσκοπικά, η νόσος του Crohn φαίνεται να έχει τμηματική εντόπιση με μεσοδιαστήματα εντέρου απρόσβλητα από τη νόσο. Το έντερο συχνά περιβάλλεται περιφερειακά από λίπος και γίνεται παχύτερο λόγω της συνακόλουθης ίνωσης και του οιδήματος, κάτι που σταδιακά οδηγεί σε στένωση και απόφραξη. Ιστολογικά, η φλεγμονή αποτελείται από πλασματοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα που εκκρίνουν μια σειρά φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF, ΙΦΝ- γ , ΙΛ-6, ΙΛ-12, ΙΛ-17, ΙΛ-22, ΙΛ-23 και ΤΛ1Α) (Xavier RJ et al 2007, Saruta M et al 2007, Bamias G et al 2003, Kanai T et al 2009), διηθώντας το βλεννογόνο και δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο ρωγμές στο εντερικό επιθήλιο και οδηγώντας έτσι συχνά στο σχηματισμό

συριγγίων με παρακείμενα όργανα όπως η ουροδόχος κύστη και ο κόλπος. Τα κορτικοστεροειδή που είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα στη θεραπεία της νόσου του Crohn αφενός μεν είναι αρκετά αποτελεσματικά, αφετέρου δε έχουν μακροπρόθεσμες παρενέργειες όπως η οστεοπόρωση. Σε ασθενείς που έχουν αναπτύξει ανοχή στα στεροειδή ή εξάρτηση από αυτά προτιμάται να θεραπεύονται με ανοσοκατασταλικά όπως η Αζαθειοπρίνη, η 6-Μερκαπτοπουρίνη και η Μεθοτρεξάτη. Ασθενείς με ήπια νόσο, μπορούν να θεραπεύονται με 5-αμινοσαλικυλικό οξύ χορηγούμενο έτσι (slow release preparation) ώστε να αποτρέπεται την άμεση απορρόφηση του φαρμάκου διανέμοντάς το στον περιφερικό ειλεό ή στο κόλον.

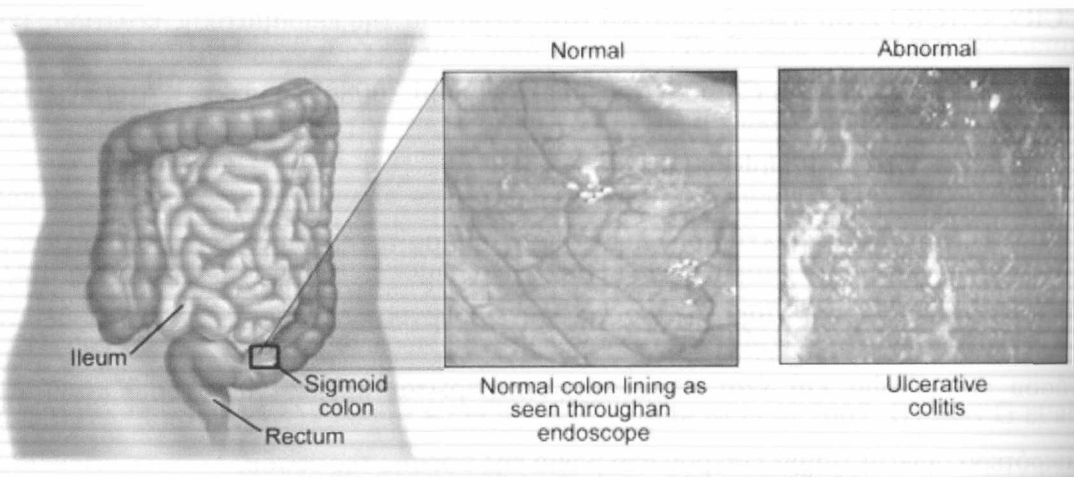
Μια σχετικά πρόσφατη καινοτομία στην αντιμετώπιση της νόσου ιδιαίτερα των ιδιαίτερα ανθεκτικών μορφών και αυτών με δύσκολα συρίγγια είναι η χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των κυτταροκινών που αναφέρθηκαν παραπάνω (π.χ. infliximab, adalimumab και centrolizumab pegol ως αντι-TNF παράγοντες) (Papadakis KA et al, 2000). Επίσης η ανάπτυξη φαρμάκων που παρεμποδίζουν τους μηχανισμούς εξαγγελίωσης των ανοσοκυττάρων στο διάμεσο εντερικό ιστό όπως οι αναστολείς ιντεγκρινών $\alpha 4\beta 7$, ICAM-1 και χημειουποδοχέων CCR9, CXCR3 είναι αποτελεσματικά στην θεραπεία της πειραματικής κολίτιδας και πειραματικής νόσου του Crohn. (Apostolaki M et al 2008, Papadakis KA et al 2004, Papadakis KA 2004, Podolsky DK 2005).

Η χειρουργική εκτίμηση είναι συχνά απαραίτητη, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αποφρακτικής νόσου. Παρ' όλα αυτά, η χειρουργική επέμβαση δε θεραπεύει τη νόσου του Crohn και έτσι όταν αυτή επιχειρείται πρέπει να "θυσιάζεται" το μικρότερο δυνατό τμήμα εντέρου στο βωμό της ύφεσης της νόσου.

Ελκώδης κολίτιδα

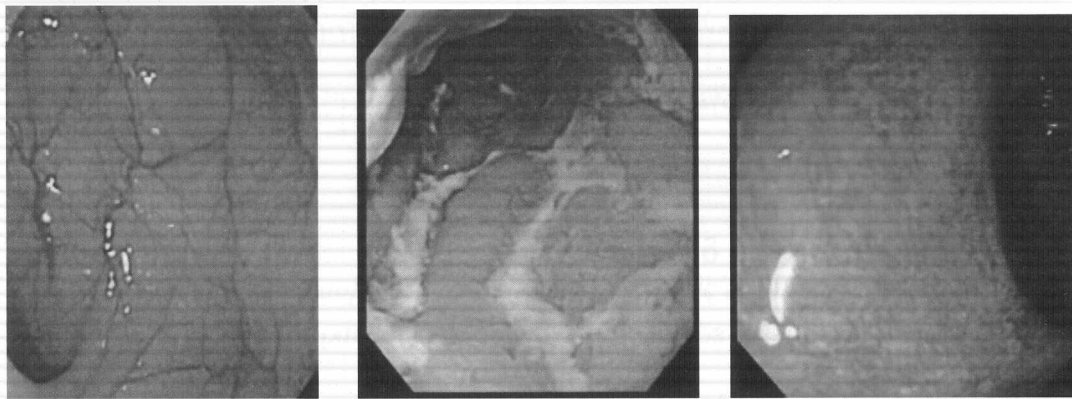
Η ελκώδης κολίτιδα προσβάλλει πάντα τον πρωκτό καθώς και μια μεγάλη ποικιλία από τα υπόλοιπα τμήματα του κόλον. Στο 30% των ασθενών, η νόσος εντοπίζεται μόνο στον πρωκτό ή στην ορθοσιγμοειδική περιοχή. Το 20% παρουσιάζεται με πανκολίτιδα, ενώ στο εναπομένον 50% υπάρχει μεγάλη ποικιλία όσο αφορά την εντόπιση της νόσου στο κόλον. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αιμορραγία από το ορθό (80%), διάρροια (52%), κοιλιακό άλγος (47%) και σπανιότερα ραγάδες του δακτυλίου (4%). Ως εξωεντερικές εκδηλώσεις, αναφέρονται πυρετός, αναιμία, αρθραλγίες, απώλεια βάρους, επιπεφυκίτιδα, ιριδοκυκλίτιδα, οζώδες ερύθημα, σκληρυντική χολαγγειίτιδα, λιπώδες ήπαρ, ιερολαγονίτιδα, γαγγραινώδες τυόδεσμα και πνευμονική ίνωση.

Κατά την άμεση επισκόπηση με άκαμπτο σιγμοειδοσκόπιο, ο πρωκτικός βλεννογόνος χάνει το φυσιολογικό αγγειακό πρότυπο και γίνεται κοκκιώδης και υπεραίμικος (Εικόνα 1.1). Σε πιο σοβαρή κολίτιδα ο βλεννογόνος παρουσιάζεται εύθρυπτος αιμορραγώντας κατά την επαφή, ενώ σε πολύ σοβαρή νόσο πολύ συχνές είναι οι ξαφνικές, μεγάλες και πολλές σε αριθμό αιμορραγικές κενώσεις.



Εικόνα 1.1. Μακροσκοπική ιστολογική εικόνα ελκώδους κολίτιδας

Ιστολογικά εντοπίζεται διάχυτη διήθηση του βλεννογόνου και παρουσία κυττάρων χρόνιας φλεγμονής καθώς και μια μείωση του αριθμού των καλυκοειδών κυττάρων με παράλληλα διαταραχή της δομής στις κρύπτες με τα αδενικά κύτταρα (Σχήμα 1.2). Η φλεγμονή είναι συνεχής, ενώ σε περίπτωση ενεργής οξείας φλεγμονής η διήθηση από ουδετερόφιλα και πολυμορφοπύρηνα, μπορεί να οδηγήσει στην αποστηματοποίηση των κρυπών. Τα λεμφοκύτταρα αυτά εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως ΙΛ-4, ΙΛ-5, ΙΛ-13 και παράγοντα νέκρωσης των όγκων. (Xavier RJ et al 2007).

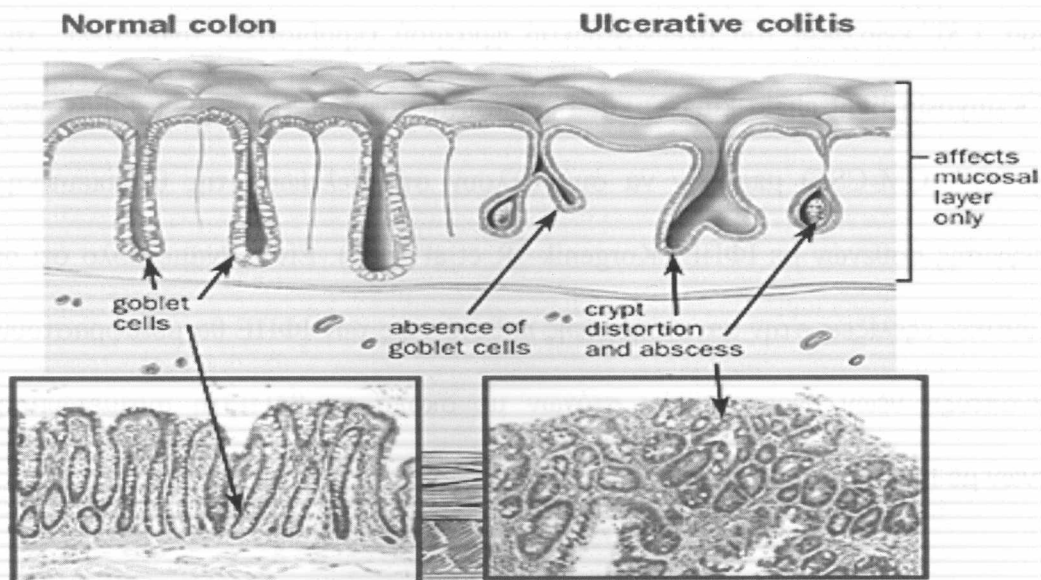


A. Φυσιολογικό

B. Νόσος Crohn

Γ. Ελκώδης κολίτιδα

Μακροσκοπική ιστολογική σύγκριση των δύο νόσων με το φυσιολογικό (ενδοσκοπικές εικόνες.)

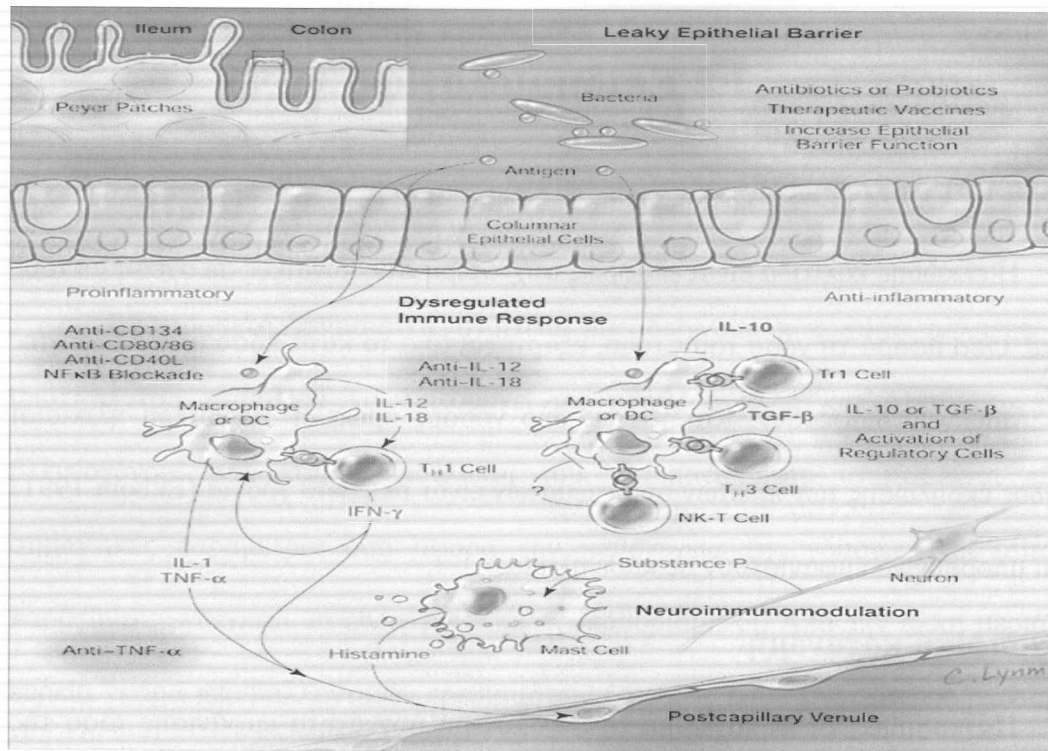


Σχήμα 1.2. Μικροσκοπική ιστολογική εικόνα ελκώδους κολίτιδας.

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της ελκώδους κολίτιδας γίνεται με από του στόματος ή τοπική χορήγηση αμινο-σαλικυλικών, αζαθειοπρίνη και τοπική ή συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών. Η ολική κολεκτομή είναι η εγγείρηση εκλογής στις περιπτώσεις κεραυνοβόλου νόσου μη ανταποκρινόμενης σε φαρμακευτική θεραπεία, τοξικού megacolon, χρόνιας επίμονης νόσου ή στις περιπτώσεις ασθενών που έχουν αναπτύξει δυσπλασίες ή καρκίνο. Η ΕΦ θεραπεία με κυκλοσπορίνη είχε ως αποτέλεσμα την ύφεση σε ένα ποσοστό των ασθενών με οξεία κολίτιδα, μη ανταποκρινόμενη στη παρεντερική χορήγηση κορτικοστεροειδών, αποφεύγοντας έτσι το χειρουργείο.

Πρόσφατα θεραπευτικά δεδομένα

Πρόσφατα δεδομένα εστιάζουν στον ρόλο της μικροβιακής χλωρίδας, της εντερικής διαπερατότητας και της έμφυτης ανοσίας στην παθογένεια των ΙΦΠΕ (Apostolaki M et al 2008, McGuckin MA et al 2009, Sheikh S et al 2008, Yamamoto-Furusho et al 2007, Duchmann R 2006). Ανάπτυξη φαρμάκων που βοηθούν στην αποκατάσταση της ισορροπίας της μικροβιακής χλωρίδας (προβιοτικά, πρεβιοτικά) (Σχήμα 1.3), ενίσχυση του βλεννογονικού φραγμού (προβιοτικά, αναστολείς της MLCK-myosin light chain kinase) και της έμφυτης ανοσίας (αυξητικοί παράγοντες όπως EGF, GM-CSF) μπορούν να συμβάλλουν στη βελτίωση της θεραπευτικής προσέγγισης ασθενών με ΙΦΠΕ (Korgenik JR et al 2005). Είναι αναμφίβολο ότι οι μελλοντικές εξελίξεις στην κατανόηση της παθογένειας των ΙΦΠΕ θα μεταφραστούν σε ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων με σκοπό τη βέλτιστη αντιμετώπιση ασθενών με ΙΦΠΕ.



Σχήμα 1.3. Επίδραση προβιοτικών στην ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης

1.2 Επιδημιολογία

Ηλικία και φύλο

Η ελκώδης κολίτιδα είναι ελαφρώς συχνότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Όσο αφορά τη νόσο του Crohn, εξαρτάται από το κατά πόσο οι ανεξάρτητες σειρές ασθενών διαφέρουν. Και για τις δύο νόσους όμως, η συχνότερη ηλικιακή περίοδος εκδήλωσης των πρώτων συμπτωμάτων είναι τα 20-40 χρόνια (Ekbohm 1991) αν και μπορούν να εμφανιστούν σε κάθε ηλικία.

Γεωγραφική κατανομή

Παγκοσμίως, οι περιοχές με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τόσο της νόσου του Crohn όσο και της ελκώδους κολίτιδας είναι οι βιομηχανικές χώρες της ΒΔ Ευρώπης και οι ΗΠΑ. Σημαντικές επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η συχνότητα των νόσων, είναι μεγαλύτερη στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης σε σχέση με αυτές της Νότιας Ευρώπης (Shivananda 1996). Η συχνότητα της νόσου στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι μικρή αν και λίγες αναλυτικές μελέτες έχουν διεκπεραιωθεί ενώ πρέπει να συνυπολογίσουμε την παρουσία ενδημικών ασθενειών στις περιοχές αυτές που καθιστούν την εξακρίβωση των νόσων ακόμη δυσκολότερη. Η συχνότητα στην Ιαπωνία δείχνει να προσεγγίζει το 1/10 της συχνότητας των νόσων στη Δύση.

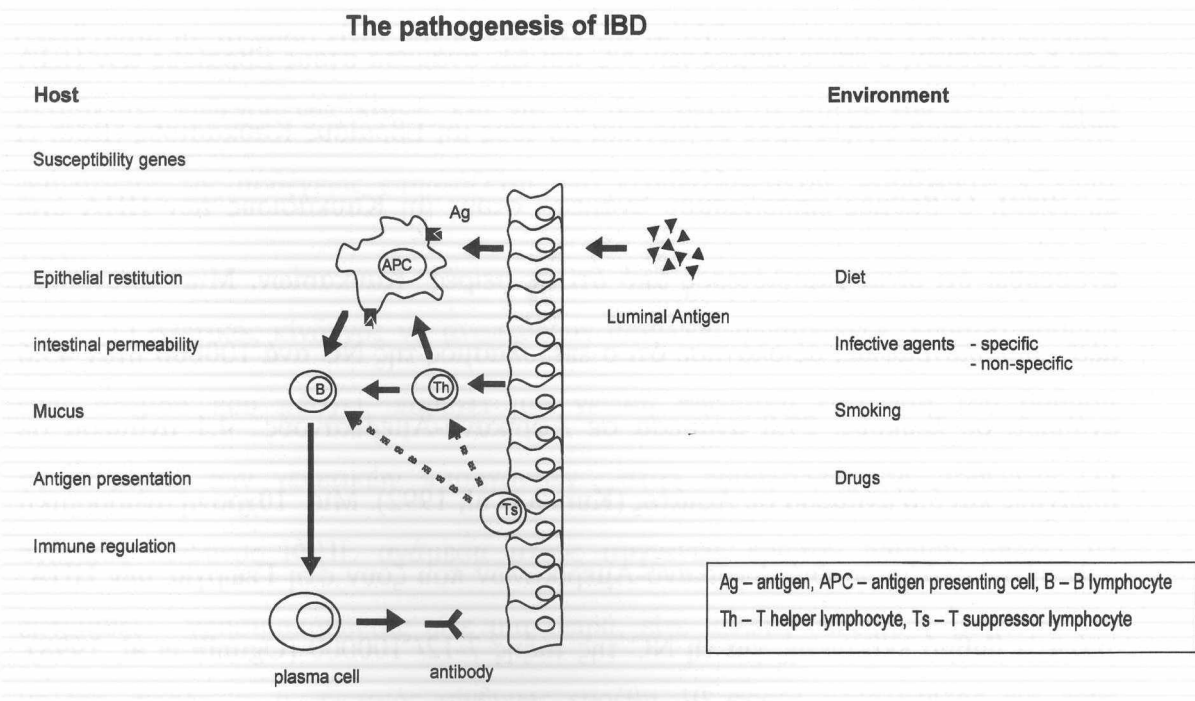
Παθογένεση των ΙΦΠΕ : Γονίδια ν Περιβάλλον

Πολλά στοιχεία που προκύπτουν από πρόσφατες εθνικές και οικογενείς μελέτες αλλά και από μελέτες διδύμων, καταδεικνύουν ότι η ευπάθεια στις ΙΦΠΕ είναι κληρονομήσιμη. Πάντως, οι γενετικοί παράγοντες δεν είναι εξολοκλήρου υπεύθυνοι για την εμφάνιση ΙΦΠΕ, καθώς η νόσος είναι πιθανότερο να εμφανιστεί σε γενετικά προδιαθετειμένα άτομα στα οποία ένας ή περισσότεροι γενετικοί παράγοντες

συνεπικουρούν προς αυτή την κατεύθυνση. Σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να αποκρυπτογραφηθεί η χρονολογική σειρά των συμβάντων της ανοσολογικής απόκρισης που λαμβάνει χώρα κατά τις παθοφυσιολογικές διεργασίες των ΙΦΠΕ.

Επιπρόσθετα, σημαντικά στοιχεία μας δείχνουν πως τόσο αλλαγές στην ιδιότητα του επιθηλίου να λειτουργεί ως φραγμός αλλά και στην άμυνα του βλεννογόνου, όσο και η επούλωση του τραυματισμένου ιστού, είναι εξίσου σημαντικές παράμετροι όσο αφορά την παθογένεια της νόσου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες ενδέχεται να είναι γενετικά προκαθορισμένοι. Από την άλλη μεριά, μια ευρεία γκάμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (κυρίως παθογόνοι μικροοργανισμοί) φαίνεται να ενέχονται στην “πυροδότηση” της χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας. Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που φαίνεται να ενέχονται στην εμφάνιση της νόσου, είναι η διατροφή, το κάπνισμα καθώς και φάρμακα (Σχήμα

Σχήμα 2: Προτεινόμενη παθογένεση της ΙΦΠΕ



Επιδημιολογικά στοιχεία για κληρονομικότητα στις ΙΦΠΕ

Μελέτες εθνοτήτων

Σημαντικές διαφορές έχουν διαπιστωθεί ανάμεσα σε διάφορες φυλετικές και εθνικές ομάδες. Η νόσος είναι περισσότερο συχνή στη λευκή φυλή, ενώ χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης έχουν παρατηρηθεί σε ιθαγενείς και νέγρους της Αμερικής, Λατινοαμερικάνους και Ασιάτες. Επιπλέον, πιθανά εξαιτίας διαφοροποίησης των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν τη μικροβιακή χλωρίδα του αυλού του εντέρου, ΙΦΠΕ έχει παρατηρηθεί συχνότερα σε περιοχές με υψηλότερο βιοτικό επίπεδο και πιο αποτελεσματικά μέτρα δημόσιας υγείας (Kirsners's IBD R B Sartor and WJ Sandborn. Saunders 2004). Επιδημιολογικές μελέτες καταδεικνύουν αύξηση της επίπτωσης της ΝΚ κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών σε όλες σχεδόν τις δυτικές χώρες. Σε κάποια μέρη (Σουηδία, ΗΠΑ) η επίπτωση σταθεροποιήθηκε (6/ 100000) (Loftus et al, 1999) ενώ σε άλλα συνεχίζει να αυξάνει (Thomas et al, 1995-Munkholm et al, 1992). Αντίθετα, η επίπτωση της ΕΚ στις δυτικές χώρες φαίνεται να έχει σταθεροποιηθεί (Langholz et al, 1991). Μεταξύ των Καυκάσιων, ο επιπολασμός των ΝΚ και ΕΚ ανάμεσα στους Εβραίους των ΗΠΑ είναι σημαντικά υψηλότερος συγκριτικά με τους μη Εβραίους Καυκάσιους (Roth et al, 1989). Ο βαθμός επιπολασμού ανάμεσα στους μη Καυκάσιους των ΗΠΑ έχει αναφερθεί ότι είναι χαμηλότερος από ότι σε σειρές Καυκάσιων. Μία αποτίμηση μέσω αλληλογραφίας, αξιολόγησε ότι ο επιπολασμός της ΝΚ ανά 100000 ήταν 43,6 ανάμεσα σε λευκούς, 29,8 ανάμεσα σε Αφρικανο-Αμερικανούς, 4,1 ανάμεσα σε Ισπανούς και 5,6 ανάμεσα σε Ασιάτες (Kurata et al, 1992). Μια 10χρονη αναδρομική μελέτη σχετικά με παιδιά Αφρικανο-Αμερικάνων που ζουν στη Γεωργία των ΗΠΑ, ανέφερε βαθμό επίπτωσης για τη ΝΚ της τάξης 7-12/ 100000 (Ogunbi et al, 1998). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα μεγέθη της επίπτωσης και του επιπολασμού

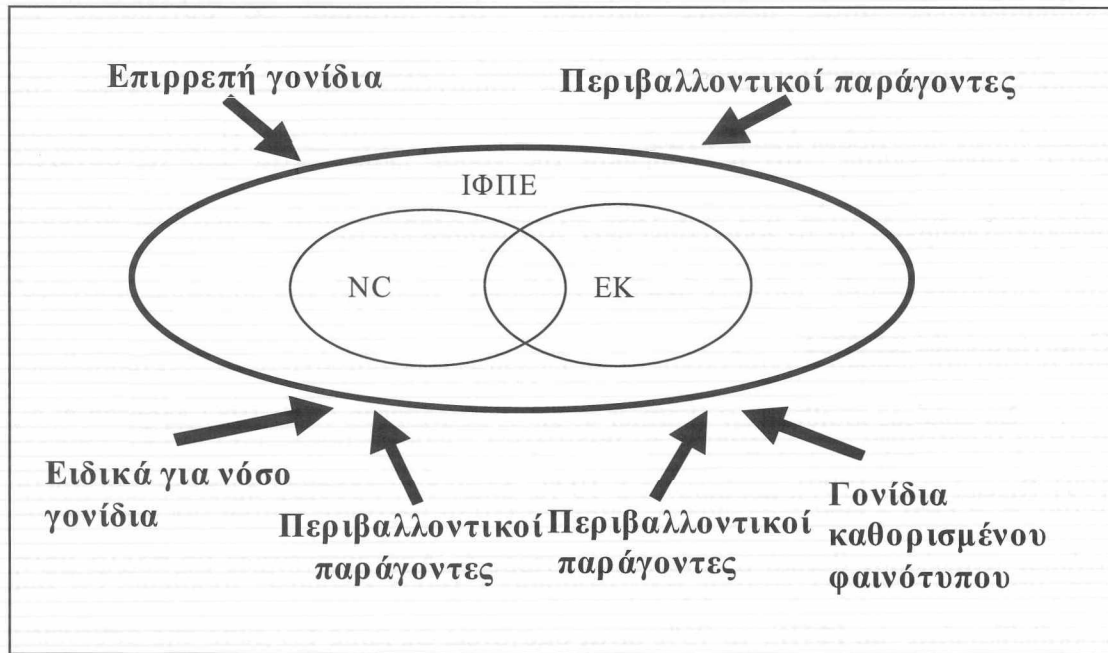
ανάμεσα στους Αφρικανο-Αμερικανούς είναι υψηλότερα από ότι αναφέρθηκε προηγουμένως και οι συγγραφείς εικάζουν ότι ίσως αυξάνονται. Από τις επιδημιολογικές αυτές μελέτες φαίνεται ότι γενετικοί σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες συμβάλλουν σημαντικά στην αιτιοπαθογένεια της ΙΦΠΕ καθώς επίσης ότι η εκδήλωση της νόσου επηρεάζεται από τις συνεχώς διαφοροποιούμενες με το χρόνο συνθήκες του περιβάλλοντος.

Οικογενειακές μελέτες

Σε μελέτες πληθυσμών (Farmer et al, 1980-Monsen et al, 1987-Monsen et al, 1991-Russel et al, 1997), περίπου το 5-10 % όλων των προσβεβλημένων από ΙΦΠΕ ατόμων αναφέρουν θετικό οικογενειακό ιστορικό. Από οικογένειες με πολλά μέλη προσβεβλημένα με ΙΦΠΕ, το 75% είναι ομογενείς ως προς τον τύπο της ασθένειας (Cho J.H. et al 2008) (είτε όλα τα άτομα της προσβεβλημένης οικογένειας έχουν NC, είτε όλα έχουν EK) με το υπόλοιπο 25% να είναι "μεικτό" (έχοντας ένα μέρος με NC και ένα άλλο με EK) (Binder et al, 1998). Αυτά τα δεδομένα είναι συμβατά με ένα μοντέλο παθογένεσης της πάθησης όπου κάποιες γενετικές μεταβλητές που σχετίζονται με τη νόσο είναι μοναδικές είτε για τη NC είτε για την EK, και κάποιες μεταβλητές ενδεχομένως κοινές και για τις δύο, όπου σε αυτήν την περίπτωση ο φαινότυπος της ασθένειας επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Σχήμα 1.4).

Ο σχετικός κίνδυνος να αναπτύξουν ασθένεια οι συγγενείς πρώτου βαθμού ενός ατόμου που πάσχει, παρέχει μια γενική ποσοτική εκτίμηση του βαθμού συνεισφοράς των γενετικών παραγόντων στην παθογένεση της ασθένειας. Ο σχετικός κίνδυνος ΙΦΠΕ ανάμεσα στους συγγενείς πρώτου βαθμού μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας είτε μια σειρά, είτε μελέτη δείκτου – μάρτυρα. Σε μελέτη σειράς , ο σχετικός κίνδυνος ευρέθη 10 φορές μεγαλύτερος για τους

συγγενείς ασθενών με ΕΚ και 14 φορές μεγαλύτερος για συγγενείς ασθενών με ΝC (Orholm et al, 1991).



Σχήμα 1.4. Γενετικό μοντέλο ΙΦΠΕ.

Παρόμοιες εκτιμήσεις σχετικού κινδύνου (14-15 φορές αυξημένος κίνδυνος) έχουν αναφερθεί για συγγενείς πρώτου βαθμού σε μελέτες δείκτου-μάρτυρα (Peeters et al, 1996-Satsangi et al, 1994). Άλλες επιδημιολογικές προσεγγίσεις παρέχουν σύμφωνες εκτιμήσεις (10-15 φορές αύξηση) του σχετικού κινδύνου για ΙΦΠΕ ανάμεσα σε πρώτου βαθμού συγγενείς ενός προσβεβλημένου προγόνου.

Η συμμετοχή των γενετικών παραγόντων στην ΙΦΠΕ υποστηρίζεται κυρίως από μελέτες διδύμων (Subhani et al, 1998-Thompson et al, 1996-Tysk et al, 1988). Αν οι γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην παθογένεια μιας ασθένειας, τότε ο βαθμός προσβολής θα ήταν σημαντικά υψηλότερος ανάμεσα στα μονοζυγωτικά από ότι στα διζυγωτικά δίδυμα. Αντίθετα, περιβαλλοντικές επιδράσεις θα προέβλεπαν ίσους βαθμούς συμφωνίας ανάμεσα στα μόνο και διζυγωτικά δίδυμα. Η συμφωνία μονοζυγωτικού διδύμου για ΝC αναφέρεται ως 42-58%, ενώ για διζυγωτικά δίδυμα είναι σημαντικά διαφορετική (<5%). Οι συμφωνίες για τα μονοζυγωτικά και

διζυγωτικά δίδυμα όσο αφορά την ΕΚ εκτείνονται μεταξύ 6-17% και 0-5% αντιστοίχως. Το ότι η συμφωνία για τα μονοζυγωτικά έχει γενικά αναφερθεί ότι είναι μεγαλύτερη για τη ΝC από ότι για την ΕΚ δείχνει πιθανά ότι στη ΝC η γενετική διαταραχή συμβάλλει περισσότερο στην εκδήλωση της νόσου ενώ πιθανά η ΕΚ να έχει μεγαλύτερη περιβαλλοντική εξάρτηση. Το γεγονός όμως ότι η συμφωνία της ασθένειας είναι σημαντικά λιγότερη από 100% ανάμεσα στα μονοζυγωτικά δίδυμα υπογραμμίζει τη σημασία των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στην παθογένεση τόσο της ΝC όσο και της ΕΚ (Kirsners's IBD R B Sartor and WJ Sandborn. Saunders 2004). Ακόμη, ο επιπολασμός των ΙΦΠΕ ανάμεσα σε απογόνους ζευγαριών που και οι δύο είναι προσβεβλημένοι από ΙΦΠΕ είναι εξαιρετικά υψηλός και έχει αναφερθεί ότι είναι μεταξύ 10-36% (Peeters et al, 1996-Laharie et al, 2001-Bennett et al, 1991) αντιπροσωπεύοντας (με εξαίρεση τον κίνδυνο μονοζυγωτικών διδύμων) τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης ΙΦΠΕ. Πρόσφατη μελέτη από τη Β. Γαλλία και Βέλγιο, αναφέρει σε ηλικία 28 ετών επιπολασμό ΙΦΠΕ 33% σε απόγονους, γονέων προσβεβλημένων από ΙΦΠΕ.(Laharie et al, 2001). Αυτά τα δεδομένα είναι σύμφωνα με ένα μοντέλο ΙΦΠΕ που συμπεριλαμβάνει ένα σύνθετο συνδυασμό τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων .

Οικογενείς και σποραδικές περιπτώσεις ΙΦΠΕ

Αν και η μειοψηφία των ασθενών με ΙΦΠΕ έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό οι γενετικές μελέτες (ειδικά γενετικής διασύνδεσης) επικεντρώνονται σε " οικογενείς " περιπτώσεις . Αυτό προκαλεί το ερώτημα αν γενετικές μεταβλητές που ενοχοποιούνται σε οικογενείς περιπτώσεις ΙΦΠΕ έχουν τον ίδιο παθογενετικό ρόλο στις σποραδικές περιπτώσεις (Peeters et al, 2000).

Το πιο σταθερό εύρημα στις κλινικές μελέτες είναι η μικρότερη ηλικία εμφάνισης στις περιπτώσεις ΙΦΠΕ με οικογενειακό ιστορικό συγκριτικά με τις

σποραδικές (οικογενή NC 22 χρονών/ 27 στις σποραδική NC και οικογενή EK23.3/28.6 σποραδική EK) (Gauer-Rousseau et al, 1996- Polito et al, 1996- Yang et al, 1993) . Το εύρημα της μικρότερης ηλικίας εμφάνισης νόσου σε οικογενείς παρέχει κάποια ορθολογική βάση στις γενετικές μελέτες για τη διαστρωμάτωση των δεδομένων βασισμένη στην ηλικία της διάγνωσης. Για παράδειγμα στην γενετική ανάλυση της ΙΦΠΕ δύο από τις χρωμοσωμικές περιοχές (χρωμοσώματα 16 και 5) που παρέχουν ενδείξεις για γενετική σχέση με την πάθηση βρέθηκαν με διαστρωμάτωση βασισμένη στη μικρότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου.(Πίνακας 1.1) (Brant et al, 1998- Rioux et al, 2000).

- *5-10% των ασθενών με ΙΦΠΕ έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό.*
- *Για συγγενείς 1^ο βαθμού προγόνου με ΙΦΠΕ ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει περίπου 15 φορές.*
- *Η συνταύτιση για μονοζυγωτικά δίδυμα είναι 42-58%(NC) και 6-17%(EK) συγκριτικά με λιγότερο από 5%(NC και EK) για τα διζυγωτικά δίδυμα.*
- *Ο επιπολασμός για ΙΦΠΕ είναι 10-36% αν και οι δύο γονείς είναι προσβεβλημένοι.*
- *Οικογενειακές περιπτώσεις εμφανίζονται κατά μέσο όρο, 5 χρόνια νωρίτερα (22-23 σε σχέση με 27-28) από ότι σε 'σποραδικές' περιπτώσεις.*

Πίνακας 1.1. Γενετικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της ΙΦΠΕ.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα στη σύγκριση οικογενών και σποραδικών περιπτώσεων ΙΦΠΕ είναι η σχετική επικράτηση των περιπτώσεων γυναικών. Στην οικογενή NC ο λόγος γυναίκες/άντρες ήταν μεταξύ 1,23 και 1,68/1 (Peeters et al, 2000), οριακά αυξημένος σε σχέση με τις σποραδικές περιπτώσεις, ακόμα και αν συνυπολογιστεί η ελαφρά επικράτηση των γυναικών που ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις NC. Σε αντίθεση με τη NC, μεταξύ του συνόλου των περιπτώσεων EK

παρατηρείται μια ελαφρά επικράτηση των ανδρών ασθενών. Παρολαυτά ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στις οικογενείς περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί για την ΕΚ επικράτηση των γυναικών με αναλογία γυναικών / ανδρών της τάξης 1,3-1,5/1 καταγεγραμμένη από δύο τουλάχιστον διαφορετικές σειρές (Monsen et al, 1987-Lee et al, 1996). Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αυτών των ευρημάτων δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, αλλά ίσως παρέχουν μια σημαντική ένδειξη για μελλοντικές γενετικές μελέτες. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση του οικογενειακού ιστορικού ως προς την εντόπιση της νόσου και την κλινική πορεία. Στην περίπτωση της ΕΚ δεν έχει παρατηρηθεί συσχέτιση (Lee et al, 1996). Αντίθετα, για την ΝΚ έχει βρεθεί μια πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό και την εντόπιση της ασθένειας, υποδηλώνοντας ότι οι διαφορετικές εντοπίσεις που παρατηρούνται στη ΝΚ ίσως αντανακλούν γενετικώς διακριτά υποσύνολα. Τέλος με τα σημερινά δεδομένα δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι το οικογενειακό ιστορικό σχετίζεται με πιο βαριά κλινική πορεία, κάτι το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα κατά την παροχή συμβουλών σε οικογένειες με ιστορικό ΙΦΠΕ.

1.3 Γενετική ανάλυση για την ταυτοποίηση γονιδίων της ΙΦΠΕ

Για τις γενετικές μελέτες της ΙΦΠΕ χρησιμοποιούνται δύο , συμπληρωματικές μέθοδοι, η γενετική σύνδεση (genetic linkage) και οι μελέτες συσχέτισης (association Studies) (Lander et al, 1994).

Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης ταξινομούν οικογένειες με περισσότερα από ένα προσβεβλημένα μέλη ώστε να φανεί η φυλογενετική σύνδεση περιοχών του γονιδιώματος με τη νόσο (Hirschhorn et al. 2005). Η γενετική σύνδεση τυπικά ενοχοποιεί ευρείες περιοχές γονιδιώματος, δυνητικά σχετιζόμενων γονιδίων. Όταν η σύνδεση ταυτοποιηθεί με ευρείες διερευνήσεις του γονιδιώματος, απαιτείται η χρήση μελετών γενετικού συσχετισμού προκειμένου να ταυτοποιήθουν συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο. Η μέθοδος της γενετικής συσχέτισης διερευνά για διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε αλληλουχίες, αλληλόμορφων ασθενών συγκριτικά με μάρτυρες (ομάδα ελέγχου) (Kirsners's IBD R B Sartor and WJ Sandborn. Saunders 2004). Η ανάλυση των απλοτύπων του ανθρώπινου γονιδιώματος και η δημιουργία της HarMap βάσης δεδομένων η οποία περιέχει παραπάνω από 1.000.000 SNPs [The International HarMap Consortium. 2005] οδήγησε στην ανάπτυξη των Γονιδιωματικών Μελετών Γενετικής Συσχέτισης (Genome-wide Association Studies, GWA) [Hirschhorn et al. 2005, McCarthy et al. 2008], μεθοδολογία με την οποία εντοπίστηκε συσχέτιση της νόσου του Crohn, της ελκώδους κολίτιδας ή και των δύο μορφών ΙΦΠΕ, με πολυμορφισμούς σε σημαντικό αριθμό γονιδίων (Budarf et al. 2009) (Πίνακας 1.2).

Χρωμόσωμα	Γονίδια	Συσχέτιση με NC	Συσχέτιση με ΕΚ
17p31	IL23R	NAI	NAI
2q37	ATG16L1	NAI	OXI
3p21	Πολλαπλά (και το MST1)	NAI	NAI
5p13	Περιοχή μεταξύ γονιδίων PTGER4	NAI	OXI
5q31	Πολλαπλά (και το SLC22A5)	NAI	?
5q33	Πολλαπλά (και το IRGM)	NAI	OXI
5q33	IL12B (p40)	NAI	NAI
10q21	ZNF365	NAI	?
10q24	NKX2-3	NAI	NAI
16q12	NOD2	NAI	OXI
17q21	Πολλαπλά (και το STAT3)	NAI	NAI
18p11	PTPN2	NAI	OXI

Πίνακας 1.2. Συσχέτιση γενετικών τόπων με τις ΙΦΠΕ. ATG16L1, autophagy related 16-like protein 1; IL12B, interleukin-12β; IL23R, interleukin-23 receptor; IRGM, immunity-related GTPase family M; NKX2-3, NK2 transcription factor related, locus 3; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain protein 2; PTGER4, prostaglandin receptor, EP4; PTPN2, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2; SLC22A5, solute carrier family 22, member 5; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; ZNF365, zinc-finger protein 365. (Από Cho, 2008)

Οι τακτικές γενετικής διασύνδεσης αρχικά αναπτύχθηκαν για μονογονιδιακές διαταραχές, όπου η έκταση της τοπικής ετερογένειας (π.χ. διαφορετικά υποσύνολα γονιδίων συμβάλλουν σε διαφορετικά σύνολα ασθενών) είναι σχετικά περιορισμένη. Η εφαρμογή μεθόδων γενετικής διασύνδεσης σε σύνθετες πολυγονιδιακές διαταραχές

όπως η ΙΦΠΕ, υπήρξε πιο προκλητική. Τα πρώτα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το 1996 από τους Hugot και συν (Hugot et al, 1996), οι οποίοι χρησιμοποιώντας πολυμορφικούς «μικροδορυφόρους» δείκτες, χαρτογράφησαν περιοχή ευαισθησίας για NC στο χρωμόσωμα 16 που ονομάστηκε IBD1. Η δεύτερη ευρωπαϊκή μελέτη που ακολούθησε έδειξε τόσο για τη NC όσο και για ΕΚ περιοχές με στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε περιοχή του χρωμοσώματος 12 που ονομάστηκε IBD2 και συσχετίσεις στο 3 και 7 που δεν έφθαναν όμως σε στατιστικά σημαντικό όριο (Satsangi et al, 1996). Στη διετία 1996-98 προέκυψαν επτά συνολικά μελέτες, εκ των οποίων οι τρεις τελευταίες περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό οικογενειών από πολλά κέντρα της Ευρώπης και Αμερικής (Ohmen et al, 1996-Mirza et al, 1998-Duerr et al 1998-Cho et al, 1998- Curran et al, 1998- Brant et al, 1998- Rioux et al, 1998). Υποψήφιοι γενετικοί τόποι ανιχνεύτηκαν σχεδόν σε κάθε χρωμόσωμα, αλλά 7 από αυτούς που ήταν στατιστικά σημαντικοί και επαληθεύθηκαν σε ανεξάρτητες μελέτες χαρακτηρίστηκαν IBD 1-7 και συνδέθηκαν περισσότερο με την νόσο. (Πίνακας 1.3)

Ασθένεια	Περιοχή Σύνδεσης	Συσχέτιση
NC	IBD1, chr16cen	NOD2/CARD15
EK, NC	IBD2, chr12q	Καμία Αναφορά
EK, NC	IBD3, chr6p	Περιοχή MHC, TNF
NC	IBD4, chr14q	Καμία Αναφορά
NC	IBD5, chr5q	Κυτταροκίνη 5q
NC	IBD6, chr4	Καμία Αναφορά
EK, NC	IBD7, chr1p	Καμία Αναφορά

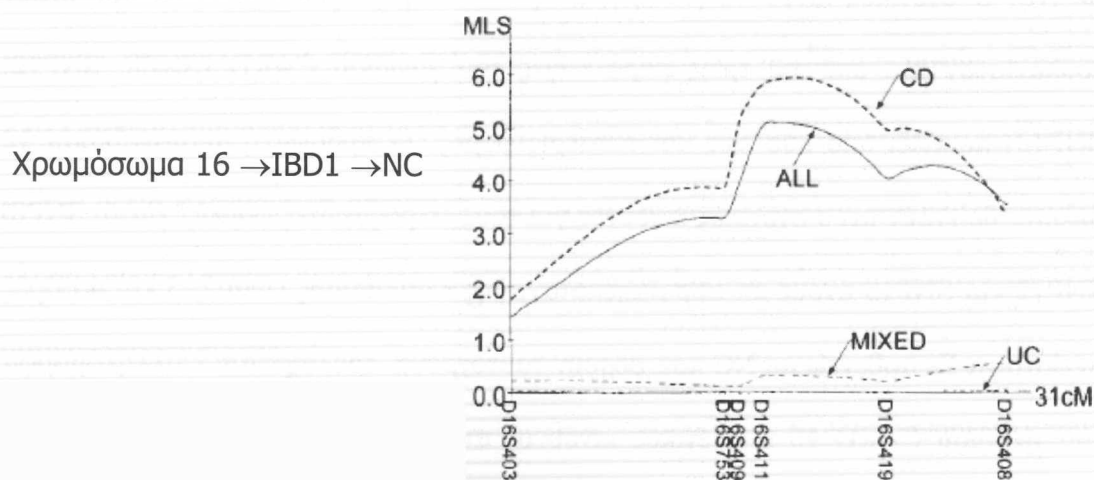
Πίνακας 1.3. Μελέτες συστηματικής χαρτογράφησης γενετικού υλικού σε ΙΦΠΕ

Η χαρτογράφηση των ευπαθών χρωμοσωμικών τόπων μέσω της μεθόδου τόσο της ανάλυσης όσο και της συσχέτισης, αυξάνει την πιθανότητα για τον προσδιορισμό γονιδίων. Αυτή η συνδυαστική προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2001 επιτυχώς, ταυτοποιώντας έτσι το πρώτο γονίδιο για NC στο χρωμόσωμα 16

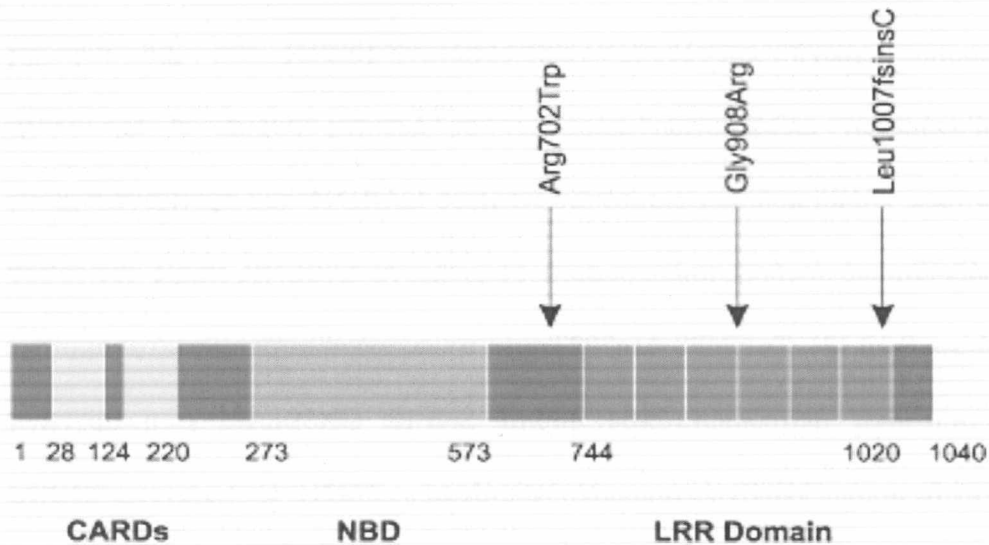
(Γράφημα 1.1) , στο χρωμοσωμικό τόπο που αντιστοιχεί στην IBD1 περιοχή, το NOD2/ CARD 15 (Hugot et al, 2001).

Το γονίδιο CARD15 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία περιέχει δύο CARDs, μία κεντρική περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD) και μία περιοχή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών πλούσιων σε λευκίνη (Ogura et al, 2000). Υπάρχουν τρεις κύριοι πολυμορφισμοί του γονιδίου CARD15 που σχετίζονται με τη NC: εκφράζονται ως μονήρης πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων (SNP, single nucleotide polymorphism 8,12,13). Το SNP8 Arg702Trp (η τρυπτοφάνη αντικαθίσταται από την αργινίνη σημειακή μετάλλαξη 2104C>T), το SNP12 Gly908Arg (η αργινίνη αντικαθίσταται από γλυκίνη, σημειακή μετάλλαξη 2722G>C) και το SNP13 Leu1007fsinsC (μετάλλαξη η οποία αποκόπτει το τελικό 3% της πρωτεΐνης, προσθήκη 3020insC) (Hugot et al, 2001) (Σχήμα 1.5).

Γράφημα 1.1 Περιοχή σύνδεσης στο χρωμόσωμα 16



Εικόνα 1.5 *NOD2/CARD15* γονίδιο και κύριες μεταλλάξεις συσχετιζόμενες με NC



Αντιθέτως, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στο *CARD15* και την Ελκώδη κολίτιδα. Τα δεδομένα αυτά ισχύουν για λευκούς Καυκάσιους αλλά δεν ισχύουν σε Ασιάτες μια και δεν παρατηρήθηκε καμία παραλλαγή σε σειρές Ασιατών με NC. Ο σχετικός κίνδυνος για εμφάνιση NC σε φορείς του γονιδίου που έχουν τουλάχιστον μία από τις τρεις παραλλαγές του γονιδίου *CARD* (SNP8, SNP12, SNP13) ποικίλει από δύο έως και τέσσερις φορές. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 42 μελέτες δείχνουν ότι ο σχετικός κίνδυνος για τους ετεροζυγώτες φορείς για το SNP8, SNP12 και SNP13 στους μη Εβραϊκής καταγωγής Καυκάσιους είναι 2, 3 και 4 φορές αντίστοιχα. Σε ασθενείς με NC που φέρουν ταυτόχρονα τουλάχιστον 2 αλληλόμορφα του γονιδίου *CARD 15* ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει 17 φορές. Στην ίδια μελέτη εδείχθη, ότι η παρουσία μιας από τις τρεις μεταλλάξεις αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο για εμφάνιση στενωτικής μορφής της νόσου 2 φορές, τον κίνδυνο συμμετοχής του λεπτού εντέρου 2,5 φορές, ενώ ο κίνδυνος για οικογενή εμφάνιση της νόσου αυξάνει μόνο κατά 4,5 φορές. (Economou et al, 2004)

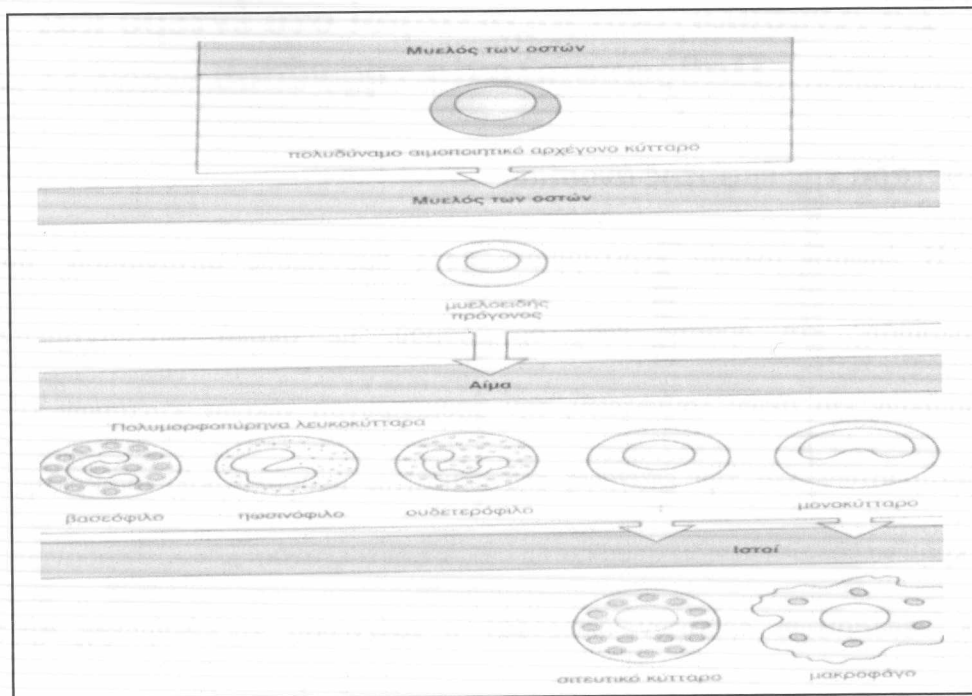
1.4 Ανοσολογικοί μηχανισμοί στο έντερο και Παθοφυσιολογία της νόσου

Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας

Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει τους αμυντικούς μηχανισμούς άμεσης ενεργοποίησης και δράσης ενός οργανισμού, με σκοπό την αντιμετώπιση βακτηριακών και ιικών λοιμώξεων, την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων και την ανάπλαση ιστών, και την επαγωγή της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης. Πιο συγκεκριμένα οι αμυντικοί μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας περιλαμβάνουν ένα πλήθος κυτταρικών δράσεων όπως (α) η ανίχνευση της λοίμωξης (β) η φαγοκυττάρωση, (γ) η χημειόταξη (δ) η κυτταρική τοξικότητα, (ε) η ενεργοποίηση ή η ρύθμιση της φλεγμονής μέσα από την παραγωγή κυτταροκινών, χημειοτακτικών παραγόντων, και φλεγμονωδών πεπτιδίων και (στ) η αντιγονοπαρουσίαση και η υποστήριξη της επίκτητης αντίδρασης (Βιβλίο, «Κλινική Ανοσοβιολογία» Μουτσόπουλος).

Οι πιο αντιπροσωπευτική κατηγορία κυττάρων της έμφυτης ανοσίας είναι τα κύτταρα της μυελώδους σειράς που προέρχονται από τον μυελό των οστών (Σχήμα 1.6) και περιλαμβάνουν κυρίως τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα που σχετίζονται με την οξεία φλεγμονώδη απάντηση, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα που επιτελούν ένα πλήθος ανοσολογικών διεργασιών καθώς και τα δενδριτικά κύτταρα («επαγγελματίες αντιγονοπαρουσιαστές»).

Επιπρόσθετα οι έμφυτες ανοσολογικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν (α) τους ανατομικούς φραγμούς ειδικών επιθηλιακών κυττάρων όπως στην περίπτωση των αναπνευστικών, γαστροεντερικών και ουρογενετικών φραγμών και (β) ειδικούς υποπληθυσμούς άλλων κυττάρων όπως τα NK κύτταρα, τα ενδοεπιθηλιακά T-λεμφοκύτταρα και τα B-1 λεμφοκύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας.



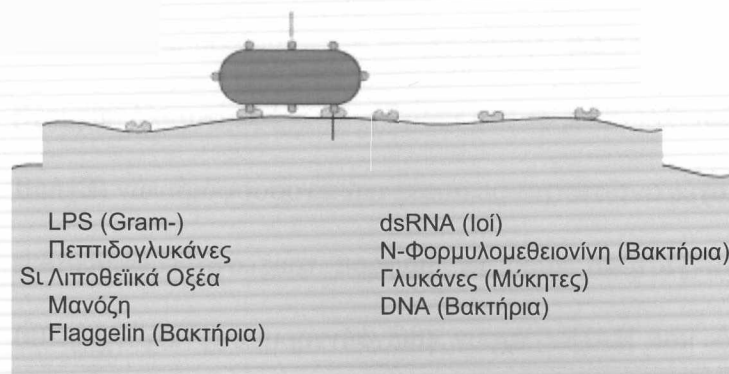
Εικόνα 1.6. Μέρος του μονοπατιού της μυελοποίησης

Πέραν των μονοκυτταρων/μακροφάγων η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει και άλλους ιστοειδικούς τύπους όπως κύτταρα Kupffer στο ήπαρ, μεσαγγειακά μακροφάγα στον νεφρό, τα μικρογλοιακά στο ΚΝΣ, τα υμενοκύτταρα τύπου II στις αρθρώσεις, τα κυψελιδικά μακροφάγα στον πνεύμονα και μυελοϊδή ιστοκύτταρα στον εντερικό βλεννογόνο. Τα μακροφάγα έχουν την ιδιότητα να εξασφαλίζουν έμφυτη κυτταρική ανοσία στους ιστούς και να ξεκινούν τις αμυντικές αποκρίσεις του οργανισμού. Επίσης ωριμάζουν συνεχώς από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και εγκαταλείπουν την κυκλοφορία για να μεταναστεύσουν στους ιστούς σε όλο το σώμα (Βιβλίο, «Κλινική Ανοσοβιολογία» Μουτσόπουλος). Όταν τα παθογόνα διαπερνούν έναν επιθηλιακό φραγμό αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα στους υποεπιθηλιακούς συνδετικούς ιστούς, με συνέπεια την έκκριση φλεγμονωδών (π.χ. ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες 1, 6, 8 και 12, παράγοντας νέκρωσης όγκων-TNF) και ανοσο-ρυθμιστικών κυτταροκινών (π.χ. ιντερλευκίνη 10).

Οι κυττοκίνες αποτελούν πολυδύναμα μόρια που επάγουν πλήθος κυτταρικών αντιδράσεων όπως ενεργοποίηση, στρες, πολλαπλασιασμό και απόπτωση. Ως εκτούτου, η βιοσύνθεση τους αποτελεί τη βάση της έμφυτης απόκρισης. Η άρρυθμη παραγωγή κυτταροκινών έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη πολλών φλεγμονωδών νοσημάτων στον άνθρωπο όπως η Σηπτική Καταπληξία, η Ρευματοειδείς Αρθρίτιδα, η Φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου και η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (Ziegler-Heitbrock, 1995)

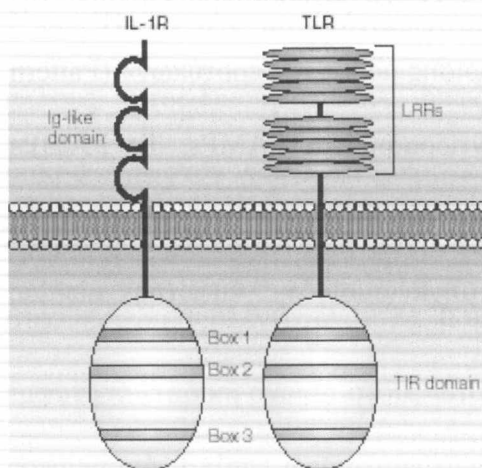
Βακτηριακοί Υποδοχείς

Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες «δομές», που έχουν διατηρηθεί σε ποικίλους μικροοργανισμούς. Οι δομές αυτές καλούνται «παθογόνο-σχετιζόμενα μοριακά πρότυπα» (Pathogen-Associated molecular patterns-PAMPs) (Σχήμα 1.7). Τα περισσότερα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας εκφράζουν «υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων» (Pattern recognition receptors-PRRs) για την άμεση αντίδραση στα PAMPs. Τα PAMPs μπορούν επίσης να αναγνωριστούν και από διαλυτούς PRRs για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Στο σύνολο τους, οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας αναγνωρίζουν περίπου 10^3 PAMPs.



Εικόνα 1.7 Παραδείγματα «παθογόνο-σχετιζόμενων μοριακών προτύπων»

Η πιο χαρακτηριστική οικογένεια υποδοχέων τύπου PRR είναι η οικογένεια των υποδοχέων Toll like (TLRs), οι οποίοι αναγνωρίζουν μικροβιακά συστατικά παρόντα σε πολλούς μικροοργανισμούς. Ενεργοποίηση διαφορετικών TLRs επάγει διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα στόχους, με ικανότητα ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης αλλά και της ειδικής ανοσίας. Το πρώτο μέλος της οικογένειας των TLR ανακαλύφθηκε το 1998 με την ταυτοποίηση του TLR4 ως υποδοχέα για βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS) (Medzhitov et al., 1997). Η πιο πρόσφατη ταυτοποίηση προσδέτη (ligand) για κάποιον TLR, είναι του ιϊκού μονόκλωνου RNA, ο οποίος μπορεί να ανιχνευθεί από τον TLR7 ανθρώπου ή ποντικού και τον TLR8 του ανθρώπου. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 13 TLRs (Akira & Takeda, 2004).



Οι TLRs είναι τύπου 1 διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και με βάση την ομοιότητα τους στην κυτταροπλασματική περιοχή, ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια που περιλαμβάνει τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης 1 (IL-1Rs). Οι TLRs στην εξωκυτταρική περιοχή, έχουν μοτίβα

Εικόνα 1.6. Στοιχεία της δομής των TLR

επαναλαμβανόμενων αμινοξέων λεύκινης (LRR motifs). Η εξωκυτταρική περιοχή των IL-1Rs περιλαμβάνει περιοχές αντίστοιχες με αυτές των ανοσοσφαιρινών (Σχήμα 1.8) (Akira & Takeda, 2004). Ωστόσο παρά τη διάφορα τους στα εξωκυττάρια τμήματα, τόσο οι TLRs όσο και IL-1Rs έχουν μια συντηρημένη περιοχή 200 αμινοξέων στο ενδοκυττάριο τμήμα τους, η οποία είναι γνωστή ως περιοχή TIR.

Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου σήματος. Η ειδικότητα του σήματος καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ειδικών μορίων «προσαρμοστών» (adaptors) με τις περιοχές TIR που οδηγεί την ενεργοποίηση ποικίλων ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Akira & Takeda, 2004).

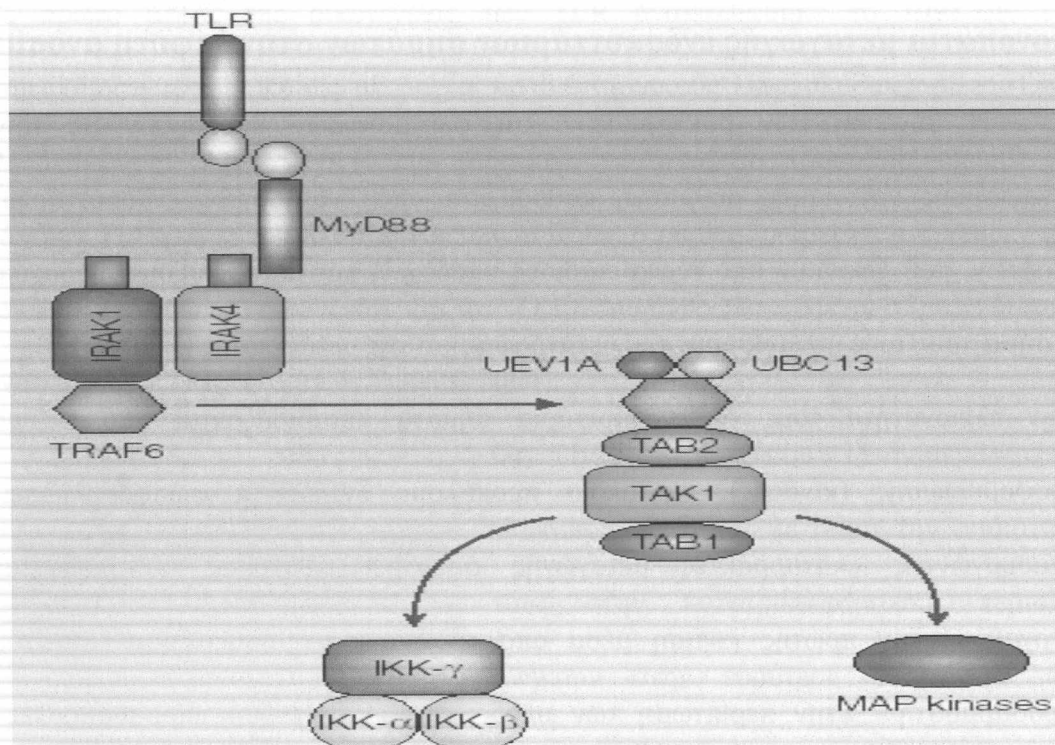
Μονοπάτια μεταγωγής ενδοκυττάριων σημάτων στην έμφυτη ανοσία

Η σύνδεση των βακτηριακών και φλεγμονωδών υποδοχέων με τους μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης, καθορίζεται από ένα πλήθος ενδοκυττάριων σημάτων, που ξεκινούν από εξωκυττάριους υποδοχείς και μεταβιβάζουν διαδοχικά το σήμα προς τους μηχανισμούς της μεταγραφής και της μετάφρασης (Εικόνα 1.5).

Στην πλειονότητα τους τα ενδοκυττάρια σήματα μεταβιβάζονται από ένζυμα φωσφορυλιώσης (κινάσες), τα οποία προκαλούν διαδοχικές φωσφορυλιώσεις δημιουργώντας «καταρράκτες μεταγωγής σήματος». Συνήθως ο υποδοχέας ενεργοποιεί την πρώτη κινάση μέσα από τη διαμεσολάβηση του αντιστοίχου «προσαρμοστή». Στην περίπτωση των υποδοχέων TLR τέτοιοι «προσαρμοστές» περιλαμβάνουν το MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), το TIRAP (TIR-associated protein), το TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β) και το TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (Akira & Takeda, 2004).

Αυτοί οι «προσαρμοστές» ενεργοποιούν με τη σειρά τους κινάσες όπως οι IL-1 Receptor Associated Kinases (IRAKs) οι οποίες αποτελούνται από 4 μέλη (IRAK1, IRAK4 με δράση κινασών σερίνης-θρεονίνης και οι IRAK2, IRAK-M οι οποίες αποτελούν ανενεργές μορφές, με αρνητική δράση). Οι IRAKs εκτός της αλληλεπίδρασης με τον MyD88, εμπεριέχουν και αλληλουχίες αναγνώρισης ενός δεύτερου προσαρμοστή, του μορίου TRAF6. Το TRAF6 με τη σειρά του ενεργοποιεί

το σύνολο των κινασών MAPK/SAPK (mitogen or stress activated protein kinases) οι οποίες ανάλογα με τον σειρά της ενεργοποίησης τους χωρίζονται στις οικογένειες των MAP3K, MAP2K, MAPK και MAPKAP. Για παράδειγμα μια MAP-3K που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των μακροφάγων από τον υποδοχέα TLR-4, είναι η κινάση TAK-1.



Σχήμα 1.9 Μονοπάτι ενεργοποίησης μέσω TLR4-Myd88

Η TAK-1 αλληλεπιδρά με έναν τρίτο προσαρμοστή τον TAB2, προκειμένου να γίνεται εφικτή η αλληλεπίδραση με τον TRAF6. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές σταθεροποιούνται από ένα τέταρτο προσαγωγέα τον TAB1 και κατά συνέπεια η TAK1 ενεργοποιεί απευθείας τις MAPK/SAPKs, όπως η MKK3 και η MKK6 (MAP-2K). Αυτές με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις MAP-Κινάσες, ERK (extra cellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases) και p38/SAPKs. Μέσω λοιπόν των τριών αυτών MAP-Κινασών φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται τελικά οι τελευταίες ή καταληκτικές κινάσες MAPKAPs του

καταρράκτη. Οι κινάσες αυτές καταλήγουν στην ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης κάποιων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF- κ B, αλλά και κάποιων μετα-μεταγραφικών παραγόντων, όπως των Elavlls, hnRNPs, TTPs, TIAs και Nefs. Οι τελευταίοι αυτοί παράγοντες δρουν μέσω της ιδιότητάς τους να προσδένονται σε αλληλουχίες DNA ή RNA επάγοντας μεταγραφική αλλά και μετα-μεταγραφική ρύθμιση αντίστοιχα (Σχήμα 1.9).

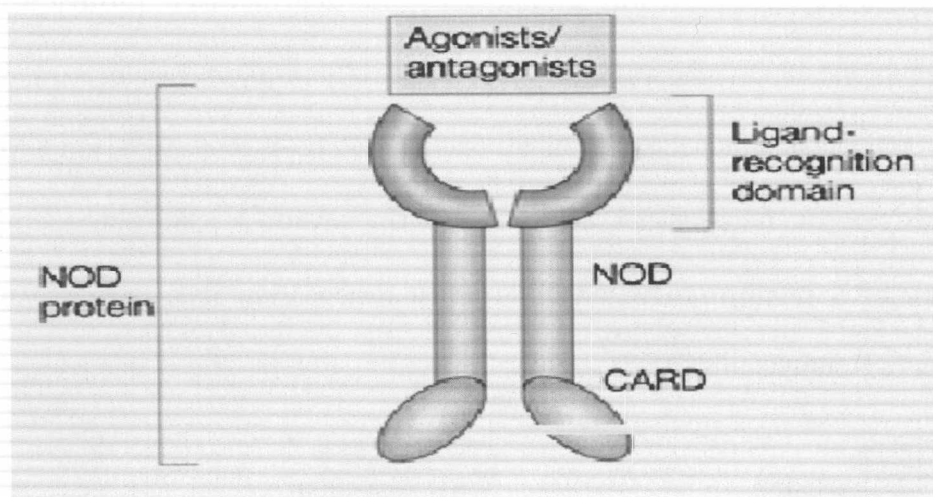
Η πολυπλοκότητα των ενδοκυτταρικών μονοπατιών αντιστοιχεί στην ποικιλία των δράσεων τους σε ιστοειδικό επίπεδο και προς τα μονοπάτια βιοσύνθεσης κυτταροκινών. Για παράδειγμα στο πλαίσιο των μετα-μεταγραφικών μηχανισμών γονιδιακής ρύθμισης σε κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, ο μετα-μεταγραφικός έλεγχος των mRNAs που κωδικοποιούν κυτταροκίνες όπως TNF, IL-1, IL-6, IL-8, και GM-CSF καθορίζονται σε διαφορετικά επίπεδα από την κινάση p38 (μετάφραση, σταθερότητα), ERK (πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά) και JNK (καταστολή) (Alexoroulou & Kontoyiannis, 2005).

Κατηγορία	Παράδειγμα				
Υποδοχείς	Toll-Rs, NODs/CARDs, TNFRs				
Προσαγωγείς	TRAFs	MyD88	IRAKs		
MAP-3 κινάσες	MEKK	TAK1	ASK1	MLK	Tpl2
MAP-2 κινάσες	MKK7	MKK4	MEK1,2	MKK3	MKK6
MAP κινάσες	IKK	JNKs	ERK1,2	p38s	
Καταληκτικές κινάσες	I κ B	Msk1	p90	Hsp's MAPKAPs	
RBPs	TFs-NF κ B	Elavls, hnRNPs, TTPs, TIAs, Nefs			
Μηχανισμοί Γονιδιακής Έκφρασης	Μεταγραφή	Πυρηνική εξαγωγή και μεταφορά στο κυτταρόπλασμα Σταθεροποίηση, Μεταφραστική Ενεργοποίηση			

Πίνακας 1.3. «Καταρράκτες» ενδοκυττάρων σημάτων στη φλεγμονή.

Φυσιολογικός ρόλος του γονιδίου CARD15

Το προϊόν του γονιδίου CARD15 είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη με ανοσολογική λειτουργία λόγω της ιδιότητάς της να αναγνωρίζει συγκεκριμένες δομές (Chamaillard M et al , 2003). Ανήκει στην κατηγορία των βακτηριακών υποδοχέων NODs/CARDs. Οι υποδοχείς Nod (Nucleotide binding Oligomerization Domain) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια υποδοχέων CATERPILLER (CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of LLRs) (Harton et al., 2002) (Σχήμα 1.10).



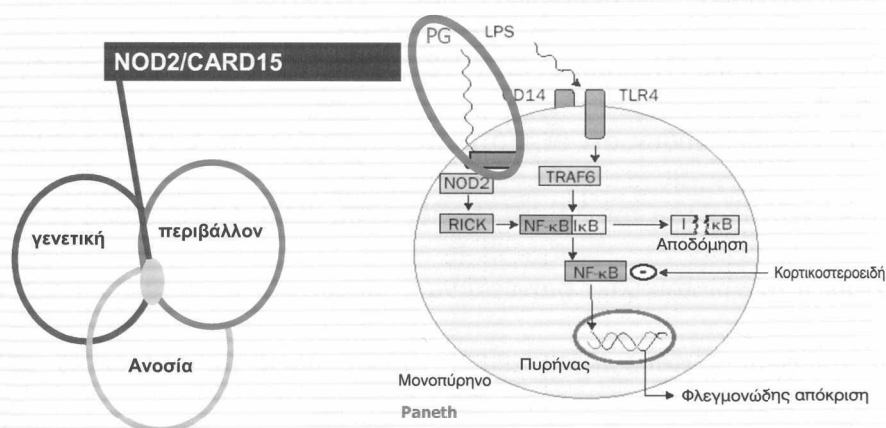
Σχήμα 1.10 Η δομή των NOD

Οι NOD1/CARD4 (Caspase activating and recruitment domain) αναγνωρίζουν δομές πεπτιδογλυκάνης (GlcNAc-MurNAc) από Gram- αρνητικά βακτήρια, ενώ οι NOD2/ CARD15 αναγνωρίζουν μουραμιλο-διπεπτίδιο (Muremyl Dipeptide, MDP), συστατικό των βακτηριακών τοιχωμάτων, και ενεργοποιώντας το μονοπάτι του NFκB (Nuclear Factor kappa B) καθώς και εκείνα των MAP κινασών (Mitogen-activated protein kinases) (Kanneganti et al. 2007) (MurNAc-L-Ala-D-isoGln), αντιλαμβάνοντας έτσι την προσβολή από τον ξένο παράγοντα και ενεργοποιώντας την ανοσολογική απάντηση. (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003). Με τον τρόπο αυτό, φαίνεται να μπορεί να αναγνωρίζει τις ενδοκυτταρικές πεπτιδογλυκάνες

τόσο από gram (-) όσο και από gram(+) βακτήρια μέσω της εντόπισης ενός μουραμιλο-διπεπτιδίου, που αποτελεί βασικό μοτίβο και ανευρίσκεται σε όλες τις πεπτιδογλυκάνες (Girardin et al, 2003- Inohara et al, 2003). Η πλούσια σε λευκίνη περιοχή είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των πεπτιδογλυκανών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρόσδεση του μουράμιλο-διπεπτιδίου στο CARD15 οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-kB (Chamaillard et al, 2003- Girardin et al, 2003-Inohara et al, 2003). Το γεγονός αυτό θεωρείται σχετικό με την παθογένεση των ΙΦΠΕ, δεδομένου ότι ο NF-kB είναι ένα ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μόριο κλειδί σε μία ποικιλία φλεγμονωδών αντιδράσεων και εμφανίζεται αυξημένος στους προσβεβλημένους ιστούς (Neurath et al, 1998). Κατά ειρωνικό τρόπο, πρόσφατες in vitro ενδείξεις καταδεικνύουν ότι οι πιο κοινές ποικιλίες του CARD15 ουσιαστικά επιτείνουν την ενεργοποίηση του NF-kB (Bonen et al, 2003- Chamaillard et al, 2003). Με άλλα λόγια, αυτές οι ποικιλίες φαίνεται να αντιστοιχούν σε μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε απώλεια λειτουργικότητας. Ο τρόπος όμως με τον οποίο αυτές οι παρατηρήσεις μπορούν να συνδυασθούν με την χαρακτηριστική αύξηση του NF-kB που παρατηρείται σε ασθενείς με ΙΦΠΕ παραμένει ασαφής. Ίσως οι ποικιλίες του CARD15 να συμβάλλουν στην επιρρέπεια προς τις ΙΦΠΕ λόγω της αδυναμίας τους να ενεργοποιούν κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο NF-kB ως απάντηση σε βακτηριακά προϊόντα. Μία τέτοια ελαττωματική απόκριση στα βακτηριακά συστατικά θα μπορούσε να προκαλέσει μία δευτερογενή διάχυτη ενεργοποίηση του NF-kB μέσω ανεξάρτητων του CARD15 μηχανισμών (Inohara et al, 2002). Εναλλακτική εξήγηση προτείνει μία μελέτη, η οποία έδειξε ότι σε σειρά CARD15-αρνητικών ενδοεπιθηλιακών κυττάρων προσβεβλημένων με NC σχετιζόμενες μεταλλάξεις πλαισίου (Hisamatsu et al, 2003), υπήρξε ελλιπής εξάλειψη ενδοκυτταρικών παθογόνων (στην προκειμένη περίπτωση *Salmonella Typhimurium*).

Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι το CARD15 μπορεί επίσης να διαδραματίζει ρόλο στην εντόπιση και εξάλειψη των ενδοκυττάρων παθογόνων που εισβάλλουν στα ενδοεπιθηλιακά κύτταρα. Περαιτέρω στοιχεία για το πώς οι ποικιλίες του CARD15 συμβάλλουν στην επιρρέπεια προς τις ΙΦΠΕ, παρέχονται από τα μοντέλα έκφρασης της πρωτεΐνης CARD15: Αρχικά πιστευόταν ότι περιορίζεται στα μυελομονοκύτταρα και στους δενδρίτες (Ogura et al 2001, Gutierrez et al 2002)

Βιολογικός ρόλος NOD2/CARD15



. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Hisametsu et al 2003, Rosenstiel et al 2003) και στα κύτταρα Paneth (Lalaetal 2003, Ogura et al 2003). Η ανακάλυψη ότι το CARD15 εκφράζεται στα κύτταρα Paneth είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, καθώς αυτά τα κύτταρα ήταν για πολύ καιρό γνωστό ότι παίζουν έναν αντιμικροβιακό ρόλο στο έντερο, εκκρίνοντας ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως λυσοζύμη, φωσφολιπάση A2 και α- και β-ντιφενσίνες (Ayabe et al, 2000). Επιπλέον, τα κύτταρα Paneth παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στον τελικό ειλέο, ο οποίος αποτελεί την πιο κοινή θέση εντόπισης φλεγμονής στη NC. Οι μεταλλάξεις του CARD15 έχουν κατά συρροή

συσχετισθεί με την εμπλοκή του ειλεού στη NC. Κατά αυτόν τον τρόπο, αν και δεν έχουμε ακόμα σαφείς ενδείξεις ότι τα κύτταρα Paneth που περικλείουν ελαττωματική πρωτεΐνη CARD15 ενοχοποιούνται για την παθογένεση της NC, περιστασιακά ευρήματα το καταδεικνύουν ισχυρά.

Συνέργεια με άλλους υποδοχείς

Πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι η δράση των υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων συνδυάζεται και με τη δράση των φλεγμονωδών υποδοχέων των κυτταροκινών όπως π.χ. των υποδοχέων του TNF (TNF Receptors) ή της IL-1 (IL-1 Receptors). Η συνδυαστική τους ενεργοποίηση ενδέχεται να ενισχύει ή να καταστέλλει το εύρος της φλεγμονώδους απόκρισης. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών υποδοχέων είναι η επιλεκτική και η διαδοχική ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σημάτων που έχουν ως τελικό αποδέκτη την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φλεγμονωδών μορίων δράσης. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν τη λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηριακών υποδοχέων που σχετίζονται με την εμφάνιση ΙΦΝΕ (Torok HP et al 2009).

Νέα γονίδια

Την ανακάλυψη της συσχέτισης του γονιδιακού τύπου NOD2/CARD15 με την ΙΦΠΕ έχουν ακολουθήσει άλλοι τα τελευταία χρόνια και άλλες αποκαλύπτοντας νέα γονίδια (ATG16L1, IRGM, IL-23, R381Q, T300A κ.α.) (Palomino-Morales RJ et al 2009, Roberts RL et al 2007 κ.α.) που επίσης παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με τη νόσο. Στον πίνακα 1.4 παρουσιάζονται μεγάλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματα σε σχέση με τους γονιδιακούς τύπους που μελετήθηκαν.

Population and Study	Sample size* (Cases–Controls)	SNPs analysed	Associations observed		
			Chr	Locn (Mb)*	Genes or loci
Japanese ¹³	94–752	72K	9	116	TNFSF15
N. American (European) ^{14,15}	946–977	304K (Illumina HumanHap300)	1	67	IL23R
			2	233	ATG16L1
			4	41	PHOX2B
			10	64	None
			16	83	FAM92B
			22	35	NCF4
German ¹⁶	735–368	7K (nsSNPs)	2	233	ATG16L1
Belgian/French ¹⁷	547–928	302K (Illumina HumanHap300)	1	67	IL23R
			5	40	Gene desert
British ^{19,20}	1748–2938	469K (Affymetrix 500K)	1	67	IL23R
			2	233	ATG16L1
			3	49	Many
			5	40	Gene desert
			5	150	IRGM
			10	64	None
			10	101	NKX2-3
			18	12	PTPN2
German ¹⁸	393–399	92K (Affymetrix 100K)	5	40	Gene desert
			11	20	NELL1
Quebec ²¹	382 trios	164K (Perlegen)	1	67	IL23R
			3	49	Many
			17	23	
			17	56	

*Sample numbers that were genotyped successfully. *The physical location of associated SNPs on the chromosome. Chr, Chromosome.

Πίνακας 1.4 Μελέτες γονιδιακών τόπων

1.5 Ανάπτυξη συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας ώστε να μελετηθεί ο ρόλος γονιδίων στην ΙΦΠΕ

Το έντερο λειτουργεί ως ένας εκλεκτικός φραγμός εμποδίζοντας τη συστηματική μόλυνση από μικρόβια ή μικροβιακά προϊόντα που προέρχονται από τον αυλό του. Σε αρρώστους της ασθένειας του Crohn (NC) έχει παρατηρηθεί αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου η οποία εξαρτάται από τη δριμύτητα της ασθένειας (Miki et al., 1998). Σημαντικά αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου έχει επίσης παρατηρηθεί σε ένα βαρυσήμαντο υποσύνολο πρώτου βαθμού συγγενών αρρώστων ΙΦΠΕ (Teachon et al., 1992). Αυτή η διαφοροποίηση της λειτουργίας του εντέρου προηγείται της επανενεργοποίησης της ανενεργούς ασθένειας του Crohn, αποτελώντας ένα πρώιμο συμβάν στην παθογένεση της ΙΦΠΕ και πιθανά έναν προγνωστικό δείκτη για την πορεία της ασθένειας (D’Inca et al., 1999). Παρόλο που δεν έχουν διευκρινιστεί καλά οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την εντερική παρακυτταρική διαπερατότητα, οι ενδοκυτταρικοί στεγανοί σύνδεσμοι (ΣΣ) αποτελούν πρωταρχικούς καθοριστικούς παράγοντες της διαπερατότητας του εντέρου. Αυτές οι δομές είναι πολύ δυναμικές και ικανές στο να ανταποκρίνονται σε έναν αριθμό φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών ερεθισμάτων. Στην πλειοψηφία των ασθενών ΙΦΠΕ, τα επίπεδα TNF-α και INF-γ στην εντερική μεμβράνη είναι ανεβασμένα και οι δύο παράγοντες έχει βρεθεί ότι αυξάνουν την διαπερατότητα σε καλλιέργεια μονόστιβων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Marano et al., 1998). Η δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού όταν η μεμβράνη είναι μολυσμένη πρόσφατα συσχετίστηκε με ανωμαλίες του δικτύου του κυτταροσκελετού (DeMeo et al., 2002, Meddings, 2000; Suenart et al., 2002). Τα μόρια κλειδιά που προάγουν την συναρμολόγηση των συνδέσμων προσκόλλησης και

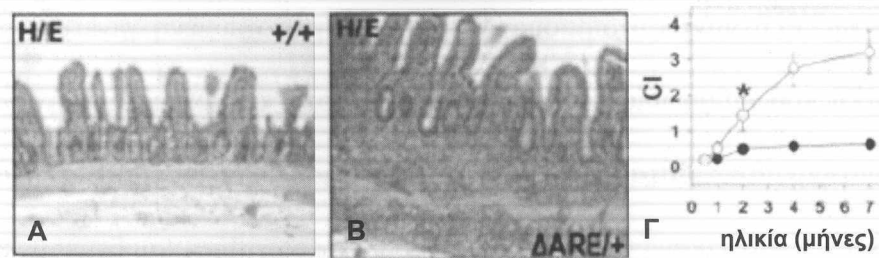
ρυθμίζουν την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού είναι τα φωσφοϊνοσιτίδια (Takenawa and Itoh, 2001). Για το σκοπό αυτό θα γίνει προσπάθεια απομόνωσης εντερικών επιθηλιακών κυττάρων από το $tnf^{\Delta ARE/+}$ πειραματικό πρότυπο και εν συνεχεία ανάπτυξη συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας ώστε να μελετηθεί ο ρόλος γονιδίων που σχετίζονται με τις ΙΦΠΕ

Το $tnf^{\Delta ARE/+}$ πειραματικό πρότυπο φλεγμονώδους εντεροπάθειας τύπου Crohn.

Η επιτυχία των αντι-TNF θεραπειών σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Crohn έδειξε με σαφήνεια την εμπλοκή του TNF στην παθογένεια παρά το γεγονός ότι η μηχανιστική βάση της επίδρασης αυτών των θεραπειών στις παθολογικές διεργασίες παραμένει άγνωστη. Η πειραματική απόδειξη για τον παθογενετικό ρόλο του TNF στη νόσο του Crohn δώθηκε με τη δημιουργία των $tnf^{\Delta ARE/+}$ ποντικών, από τους Δ.Κοντογιάννη, Γ.Κόλλια και συνεργάτες, ποντικοί οι οποίοι υπερπαράγουν TNF και αναπτύσσουν αυθόρμητα φλεγμονώδη παθολογία στον ειλέο παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στον άνθρωπο [Kontoyiannis et al. 1999].

Η αρχή στην οποία βασίστηκε η δημιουργία των $tnf^{\Delta ARE/+}$ ποντικών είναι ότι η έκφραση του tnf γονιδίου ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από την παρουσία στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (*3' Un-Translated Region, 3'-UTR*) του tnf μεταγραφήματος *cis*-ρυθμιστικών αλληλουχιών που ονομάζονται “Ρυθμιστικά Στοιχεία πλούσια σε AU” (*AU-rich 3' cis-Regulatory Elements, AREs*). Τα στοιχεία αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία πενταμερών AUUUA, εντοπίζονται στη 3'-UTR μεταγραφημάτων κυτοκινών, ογκογονιδίων, αυξητικών παραγόντων και μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμίζουν τη σταθερότητα των μεταγραφημάτων ή και τη μεταφρασή τους

Οι $tnf^{ARE/+}$ ποντικοί δημιουργήθηκαν με τη στοχευμένη γενετική εξάλειψη στην 3'-UTR του tnf γονιδίου ενός τμήματος 69 bp το οποίο περιλαμβάνει τα TNF AREs και την αντικατάστασή του με μια neo κασέττα περιστοιχισμένη από δύο θέσεις loxP. Η στόχευση έγινε σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα και στη συνέχεια, σε γονιμοποιημένα ωάρια, η neo κασέττα αφαιρέθηκε μέσω γενετικού ανασυνδυασμού με τη δράση της Cre ανασυνδυάσης και γεννήθηκαν $tnf^{ARE/+}$ ποντικοί [Kontoyiannis et al. 1999]. Στους $tnf^{ARE/+}$ ποντικούς, η απουσία των AREs οδηγεί σε απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου της έκφρασης του tnf γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν χρόνια υπερπαραγωγή TNF η οποία ανιχνεύεται στον ορό του αίματος [Kontoyiannis et al. 1999]. Η χρόνια υπερπαραγωγή TNF οδηγεί στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής εξειδικευμένα στον τελικό ειλέο και στην ανάπτυξη φλεγμονώδους αρθρίτιδας. Στους $tnf^{ARE/+}$ ποντικούς η παθολογία στον τελικό ειλέο εμφανίζεται σε ηλικία μεταξύ 4 και 8 εβδομάδων και φτάνει σε πλήρη ανάπτυξη μετά την ηλικία των 4 μηνών [Εικ. 1.11 Γ] [Kontoyiannis et al. 2002]. Τα βασικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την πεπλάτυνση των λαχνών και την ανάπτυξη φλεγμονής στο βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο [Εικ. 1.11 A-B]. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που συγκεντρώνονται στο βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο είναι πολυμορφοπύρηνα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα τα οποία σχηματίζουν λεμφικές συγκεντρώσεις κυττάρων ή και κοκκιώματα. Η φλεγμονή μπορεί να εξελιχθεί σε διατοίχωματική [Εικ. 1.11B] διαπερνώντας σε πολλά σημεία του ιστού, με ακανόνιστο και όχι συνεχές πρότυπο, τη μυϊκή στιβάδα του εντέρου [Kontoyiannis et al. 2002].

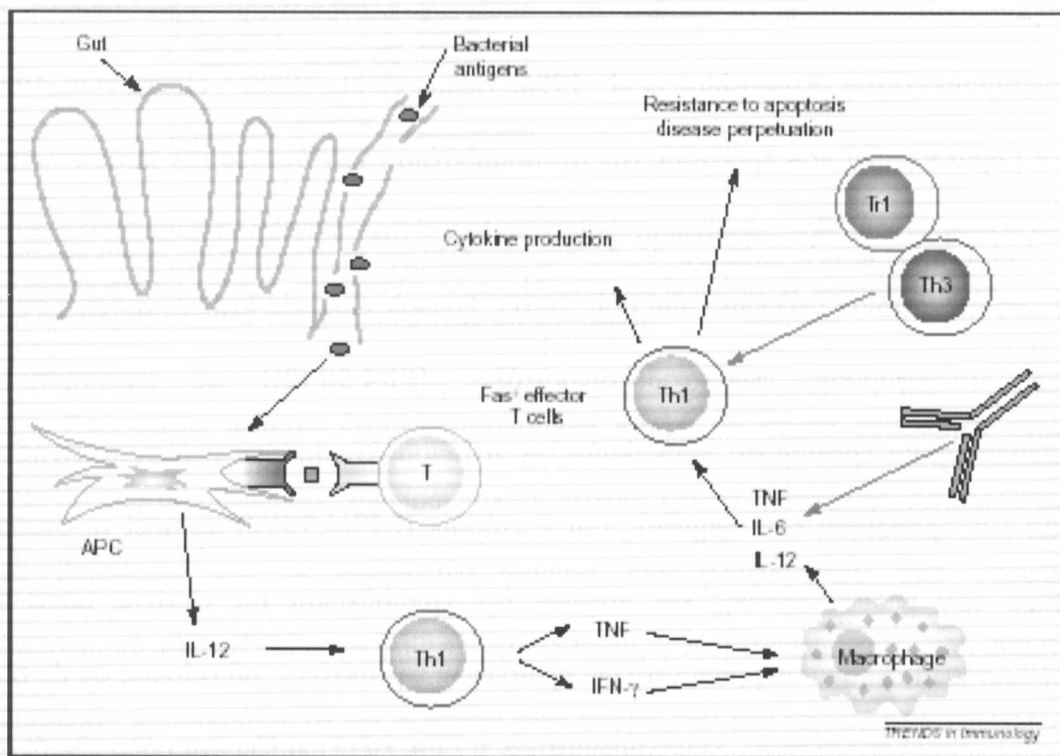


Εικόνα 1.11 Ιστοπαθολογία των $tnf^{\Delta ARE/+}$ ποντικών: **A-B**: Τομές ειλεού ποντικών ηλικίας 3 μηνών και χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης **A**. Ποντικός φυσικού τύπου **B**. Ποντικός $tnf^{\Delta ARE/+}$ Διακρίνεται η πεπλάτωση των λαχνών και η διατοιχωματική φλεγμονή **Γ**. Δείκτης Χρόνιας Ιστοπαθολογίας (CI) ποντικών $tnf^{\Delta ARE/+}$ (άσπρο) και φυσικού τύπου (μαύρο). [Από Kontoyiannis et al. 2002]

Μελέτη της επίδρασης κυτοκινών, TNFα και αναστολέων της PI3K στη διαπερατότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου σε *in vitro* σύστημα.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο εντερικός βλεννογόνος του ανθρώπου διηθείται από ένα μεγάλο αριθμό μονοπύρηνων κυττάρων. Αυτό αποτελεί μια αντανάκλαση του γεγονότος ότι το ανθρώπινο έντερο υπόκειται σε ένα συνεχή και μαζικό ερεθισμό από αντιγόνα του αυλού του. Αυτή η "φυσιολογική" φλεγμονώδης κατάσταση αποτελεί ένα αυστηρά ελεγχόμενο φαινόμενο, καθώς αρκετά επιθηλιακά κύτταρα αλληλεπιδρούν προκειμένου να διατηρήσουν την κατάλληλη τοπική ανοσολογική απόκριση. Αλλαγές στον τύπο, τον αριθμό και/ή τη λειτουργία των κυττάρων αυτών, συμπεριλαμβανομένου της απελευθέρωσης διαλυτών διαμεσολαβητών, έχουν συνδεθεί με ανάπτυξη νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας (Blumberg et al., 1999; Podolsky, 1991a; Podolsky, 1991b). Στοιχεία επίσης καταδεικνύουν πως ο τύπος της εντερικής φλεγμονώδους απόκρισης, διαφέρει ανάμεσα στις δύο νόσους κάτι που ίσως οφείλεται στην ενεργοποίηση διαφορετικών μηχανισμών της ανοσολογικής απόκρισης. Η Th1 ανοσολογική απόκριση με παράγωγή υψηλών επιπέδων IL-12 και IFN-gamma είναι αυτή που επικρατεί στο βλεννογόνο στη νόσο

του Crohn, ενώ στην ελκώδη κολίτιδα η χυμική ανοσία φαίνεται να είναι αυτή που επικρατεί (Neurath et al., 2002). Παρά το γεγονός αυτό, και στις δύο νόσους εμφανίζονται κοινά φλεγμονώδη γεγονότα, χαρακτηριζόμενα από υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών high, ελευθέρων ριζών αυξητικών παραγόντων (Monteleone et al., 2002). Επιπρόσθετα, η αντίσταση των T-κυττάρων έναντι της απόπτωσης, οδηγεί στη συσσώρευσή τους και την χρονιότητα της φλεγμονώδους διαδικασίας του βλεννογόνου (Neurath et al., 2001) (Σχήμα 1.12).



Εικόνα 1.12. Η αντίσταση των T-κυττάρων ενάντια στην απόπτωση αποτελεί έναν εν δυνάμει σημαντικό παράγοντα όσο αφορά την παθογένεση των ΙΦΠΕ. Στη νόσο αυτή, βακτηριακά αντιγόνα του εντερικού σωλήνα φαίνεται να επάγουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και τη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων μέσω της IL-12. Διαμεσολαβητικά μόρια από τα Th1 κύτταρα όπως ο TNF και η IFN- γ μπορούν να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα προκειμένου να απελευθερώσουν TNF, IL-6 and IL-12, επηρεάζοντας την αντίσταση των T-cell έναντι της απόπτωσης.

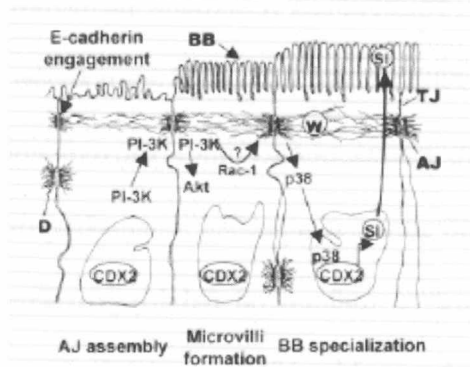
Η διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου ρυθμίζεται φυσιολογικά από διάφορους παράγοντες όπως η ενδοκυττάρια συγκέντρωση cAMP (Duffey et al., 1981), αλλαγές της ωσμωτικής συγκέντρωσης στον εντερικό βλεννογόνο (Maxton et

al., 1987), ινσουλίνη και αυξητικοί παράγοντες (McRoberts et al., 1990) και ενεργοποιητές της πρωτεϊνικής κινάσης C (Stenson et al., 1993). Είναι γνωστό ότι διάφορες ουσίες του εντερικού αυλού (ιόντα, μόρια, κύτταρα) μπορούν να διαπεράσουν τα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιώντας είτε διακυττάριο (transcellular) είτε παρακυττάριο (paracellular) οδό (Anderson et. al., 1995).

Ακόμη, έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία ότι η ρύθμιση των συνδέσεων των επιθηλιακών κυττάρων στην άνω ελεύθερη επιφάνεια γίνεται μέσω ενεργοποίησης τυροσινικών κινασών οι οποίες στη συνέχεια επάγουν την ανακατανομή του κυτταροσκελετού (Rosenshine et al., 1996, Takata et. al., 1988; Volberg et.al.,1992). Τα μόρια κλειδιά που προάγουν την συναρμολόγηση των συνδέσμων προσκόλλησης και ρυθμίζουν την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού είναι τα φωσφοϊνοσιτίδια (Takenawa and Itoh, 2001). Τοπικές αλλαγές στην συγκέντρωση της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης [PI(4,5)P(2)] ως απάντηση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα προκαλούν την αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης και μια διαφοροποίηση του σχήματος του κυττάρου. Η PI(4,5)P(2) αφαιρεί το σταθερό άκρο των ινιδίων ακτίνης και αυξάνει την εμπυρήνωση της ακτίνης μέσω της ρύθμισης μίας ποικιλίας ρυθμιστικών πρωτεϊνών της ακτίνης, οδηγώντας σε de novo πολυμερισμό της ακτίνης. Συμπληρωματικά, η PI(4,5)P(2) παίζει ένα ρόλο κλειδί στις διαμεμβρανικές λειτουργίες (Caroni, 2001; Takenawa and Itoh, 2001). Με το να ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και trafficking της μεμβράνης ,τα φωσφοϊνοσιτίδια επηρεάζουν μία ποικιλία βασικών λειτουργιών του κυττάρου όπως αύξηση, πολικότητα, κίνηση και δημιουργία αντιγράφων (Takenawa και Itoh, 2001).

Η τοπική συγκέντρωση των φωσφοϊνοσιτιδίων σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές περιοχές ρυθμίζεται από την κινάση 3 των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI3Ks,

p85/p110 ετεροδιμερείς λιπιδικές κινάσες). Αυτά τα ένζυμα προκαλούν σήματα δευτέρου αγγελιοφόρου στην κατεύθυνση των κινασών τυροσίνης, τοιουτοτρόπως ελέγχοντας τον μεταβολισμό του κυττάρου, την αύξηση τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την κίνηση και την επιβίωση (Panayotou et al., 1992). (Σχήμα 3)



Σχήμα. 3. Προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης των επιθηλιακών κυττάρων. Σε αυτό το μοντέλο η E-cadherin επάγει την ενεργοποίηση της PI3K κάτι που πιθανό να αυξάνει το ποσό της F-actin στην παρακοντάρια περιοχή. TJ, tight junctions; AJ, adherens junctions; D, desmosomes; BB, brush border; W, terminal web of actin; SI, sucrase-isomaltase.

Πρόσφατες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει πολλά υποψήφια ευαίσθητα στην ΙΠΦΕ γονίδια σε διάφορους χρωμοσωμικούς τόπους (βλέπε εισαγωγή). Ανάμεσα σε αυτά βρίσκεται και το ανθρώπινο γονίδιο PI3K-p110δ στον υπό υποψία χρωμοσωμικό τόπο IBD7 περιοχή 1p36 (Cho et al., 2000) (Okkenhaug et al., 2002). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι ποντίκια που εκφράζουν μία καταλυτικά ανενεργό μορφή του PI3K-p110δ (p110D910A) φάνηκε να αναπτύσσουν μία ελαφρά μορφή ΙΦΠΕ, η οποία είναι ατελής και κυρίως περιορίζεται στις περιοχές του τυφλού και του ορθού του παχέος εντέρου. Αυτές οι κακώσεις χαρακτηρίζονται από υπερπλασία της μεμβράνης, κρύπτες με αποστήματα και διεισδύσεις αναμειγμένων λευκοκυττάρων, συνδεόμενες με αναγεννητικές αλλαγές του αδενικού επιθηλίου (Okkenhaug et al., 2002). Συμπληρωματικά, αυτά τα ποντίκια επιδεικνύουν ασύζευκτο υποδοχέα αντιγόνου ο οποίος στέλνει σήματα σε κύτταρα Β και Τ (Clayton et al., 2002). Η εκλεκτική εξασθένηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού

συστήματος ποντικών με έλλειψη του PI3K-p110δ μπορεί επίσης να υποδεικνύει ότι ένας συγκεκριμένος αναστολέας του PI3K-p110δ εμποδίζει δραστικά τα διαμεσολαβητικά κύτταρα της ανοσίας Β και Τα στους ασθενείς με ΙΠΦΕ (Clayton et al., 2002).

Ένα άλλο μοντέλο γονιδιακά σημασμένων ποντικών με ελαττωματικά Τ κύτταρα μπορεί επίσης να αναπτύξει ΙΦΠΕ: αυτό πιθανά αντανακλά ένα σημαντικό ρόλο για τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα όσον αφορά τη διατήρηση της ανθεκτικότητας της εντερικής χλωρίδας με το να συνθέτουν αντιφλεγμονώδεις κυττοκίνες όπως η IL-10 και με το να μετατρέπουν τον παράγοντα αύξησης β (Maloy και Powrie, 2001). Συνδυασμένες ενδείξεις από τις παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι διακριτά μονοπάτια της ενεργοποίησης της ανοσίας μπορεί να συσχετίζονται με διακριτές φλεγμονώδεις απαντήσεις σε τύπους της ΙΠΦΕ. Για παράδειγμα έχει προταθεί ότι στην ασθένεια του Crohn (ΑΚ) κυριαρχεί μία TH1 απόκριση με υψηλό επίπεδο IL-12 και παραγωγή IFN γ , ενώ στην ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ), φαίνεται να κυριαρχεί η χυμική ανοσία (Neurath et al., 2002).

Πειραματικό μοντέλο

1. Απομόνωση εντερικών επιθηλιακών κυττάρων από *tnf^{ARE/+}* ποντικούς (πειραματικό πρότυπο κολίτιδας) και εγκαθίδρυση μεθοδολογίας μελέτης των κυττάρων (primary cells) .
2. Ανάπτυξη των κυττάρων σε μονοστοιβάδες σε πολυανθρακικό φίλτρο προκειμένου να αποκτήσουν πολικότητα ανάλογη με του εντερικού επιθηλίου in vivo όπως συμβαίνει και με τα Caco-2 κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινο κολικό καρκίνωμα που έχουν εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της εντερικής διαπερατότητας σε θρεπτικά και φαρμακευτικά μόρια (Fogh et al., 1977).

3. Μελέτη της επίδραση κυτοκινών που απελευθερώνονται από λεμφοκύτταρα στην κυτταρική διαπερατότητα πολωμένων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων προερχόμενων από $tnf^{ARE/+}$ ποντικούς. Επιπρόσθετα ο ρόλος των αναστολέων των PI3Κινασών θα ελεγχθεί στο σύστημα αυτό.

4. Η δοκιμασία των αναστολέων της PI3K-p110δ (LY204002) θα ελεγχθεί αναφορικά με δύο κυτοκίνες, τον TNFα και την IL-8. Αμφότερες θεωρούνται σημαντικές όσο αφορά τη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου. Αρχικά, θα γίνει μια ανάλυση της κινητικής των αλλαγών της διαπερατότητας από τις κυτοκίνες, ώστε να γίνει γνωστό το χρονικό διάστημα μετά το οποίο η αλλαγή της διαπερατότητας είναι μέγιστη. Κατόπιν θα λάβει χώρα δοκιμασία των αναστολέων όπου αυτοί θα προστίθενται στις καλλιέργειες 30 min πριν από τη χορήγηση των κυτοκινών. Η διαπερατότητα θα μετράται στο χρονικό διάστημα όπου η ανταπόκριση μετά τη χορήγηση κυτοκινών να είναι μέγιστη (κινητική ανάλυση). Διαδοχικές αραιώσεις των αναστολέων θα χρησιμοποιηθούν και οι ημιμέγιστες τιμές αναστολεις θα υπολογιστούν για σύγκριση της ανασταλτικής δραστηριότητας.

5. Επώαση του φίλτρου με λεμφοκύτταρα που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με ΙΦΠΕ χρησιμοποιώντας Ficoll-hyraque βαθμό πυκνότητας και θα χαρακτηριστεί περαιτέρω με κυτομετρική ανάλυση της ροής. Μετά την επώαση, η διεπιθηλιακή ηλεκτρική αντίσταση θα μετρηθεί, Η κινητική της διάβασης πολλών ουσιών οι οποίες προστίθενται σε μία από τις δύο πλευρές της μεμβράνης μπορεί να μελετηθεί επακριβώς. Κάποιες ουσίες περνούν διαμέσου των κυττάρων μέσω διακύττωσης και άλλες μέσω παρακυτταρικής μεταφοράς η οποία ρυθμίζεται από τους στεγανούς συνδέσμους (Contreras et al., 2002). Η διαπερατότητα των πολωμένων κυττάρων μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (ΔΗΑ) ως εξής:

Αρχικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φίλτρο μέχρι να αποκτήσουν πλήρη πόλωση. Η πόλωση των κυττάρων μετράται με ειδικά μικροηλεκτρόδια όπως φαίνεται στην εικόνα 4-1. Όταν η τιμή της αντίστασης του επιθηλίου φτάσει περίπου τα $1000 \Omega/\text{cm}^2$ προστίθενται στα κύτταρα πολλές ουσίες και οι αλλαγές στη ΔΗΑ είναι καθοριστικές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η TNFα έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη ΔΗΑ με το να αυξάνει την παρακυτταρική μεταφορά (Marano et al., 1993). Επαναλαμβανόμενα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκάλυψαν ότι η TNFα επηρεάζει τη δομή των στεγανών συνδέσμων (Contreras et al., 2002).

Η διαπερότητα των πολωμένων μπορεί να προσδιορισθεί με μέτρηση της διεπιθηλιακής αντίστασης (TER), ως εξής:

Αρχικά, τα κύτταρα αυξάνονται πάνω στο πολυανθρακικό φίλτρο μέχρι να αποκτήσουν πλήρη πόλωση. Αυτή μετράται με ειδικά μικροηλεκτρόδια. Εφαρμόζεται AC ρεύμα τετραγωνικού κύματος +/- 20 μA στα 12.5 Hz με ηλεκτρόδιο αργύρου και μετράται η έκπτωση δυναμικού με ηλεκτρόδιο αργύρου/χλωριούχου αργύρου στο θρεπτικό υλικό στους 37°C (όργανο EVOM, World Precision Instruments). Όταν η τιμή της αντίστασης υπερβεί τα $1000 \Omega/\text{cm}^2$ για τα Caco-2 κύτταρα προστίθεται η προς μελέτη ουσία. Από τη πτώση ή αύξηση της τιμής εξάγονται συμπεράσματα για την δραστηριότητα της ουσίας στη ρύθμιση της διαπερατότητας. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο TNFα έχει βρεθεί να επηρεάζει την επιθηλιακή διαπερατότητα μειώνοντας την TER και αυξάνοντας την παρακυτταρική μεταφορά (Marano et al., 1993). Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι ο TNFα αλλάζει τη δομή των σφικτών διασυνδέσεων (Contreras et al., 2002)

1.5 Σκοπός της διατριβής

1. Καταγραφή όλων των περιστατικών ΙΦΠΕ της ΒΔ Ελλάδας (1981-2009)
2. Ταξινόμηση των ασθενών με βάση κλινικά, ιστολογικά και ενδοσκοπικά κριτήρια σε υποομάδες
3. Επιδημιολογική μελέτη
4. Γενετική συσχέτιση με το γονιδιακό τόπο NOD2/CARD15
5. Εγκαθίδρυση μεθοδολογίας για μελέτη επιθηλιακών κυττάρων από πειραματικά πρότυπα νόσου του Crohn (*tnf^{AARE/+}*)
6. Εξαγωγή συμπερασμάτων σε σχέση με το προφίλ της νόσου στην υπό μελέτη περιοχή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Υλικό της μελέτης

Εισαγωγή

Η μελέτη μας διεξήχθη σε δύο χρονικές περιόδους. Η μία μέχρι τις αρχές του 2006 οπότε και περιελήφθησαν 447 ασθενείς στους οποίους έγινε πλήρης κλινική, γενετική και επιδημιολογική καταγραφή, ενώ η δεύτερη μέχρι τους πρώτους μήνες του 2009 οπότε και συμπληρώθηκαν ακόμη 463 ασθενείς χωρίς όμως να γίνει γενετική καταγραφή. Όλοι οι ασθενείς προσήλθαν στην Α' Παθολογική Κλινική και στο Εξωτερικό Ιατρείο ΙΦΠΕ της Ηπατο-Γαστρεντερολογικής Μονάδας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Το σύνολο τους αποτελούνταν τόσο από ασθενείς που ανήκαν στην ήδη υπάρχουσα ομάδα παρακολούθησης, όσο και από ασθενείς που διαγνώστηκαν για πρώτη φορά στην Κλινική μας.

Πιο συγκεκριμένα, συμπεριλήφθηκαν ασθενείς από τους Νομούς Ιωαννίνων, Άρτας, Πρέβεζας και Θεσπρωτίας, καθώς και από τα νησιά της Κέρκυρας και της Λευκάδας. Λεπτομέρειες σχετικές με δημογραφικά χαρακτηριστικά, προστέθηκαν με βάση ταχυδρομημένο ερωτηματολόγιο που συμπληρώθηκε από όλους τους ασθενείς. Παράμετροι όπως το φύλο, η ηλικία, το διάστημα παρακολούθησης, το οικογενειακό ιστορικό, η εντόπιση και η έκταση των βλαβών μελετήθηκαν αναλυτικά.

Περιοχή μελέτης

Η περιοχή στην οποία έλαβε χώρα η μελέτη, ήταν η Βορειοδυτική Ελλάδα με πληθυσμό που ανέρχεται στους 506,142 σύμφωνα με την Εθνική απογραφή του 2001 περιλαμβάνοντας τους νομούς Νομούς Ιωαννίνων, Άρτας, Πρέβεζας και Θεσπρωτίας, καθώς και από τα νησιά της Κέρκυρας και της Λευκάδας. Οι κάτοικοι

των πόλεων αποτελούν το 40% περίπου του συνολικού πληθυσμού και κατοικούν κατά κύριο λόγο στην πρωτεύουσα του κάθε νομού.

Ταυτοποίηση περιστατικών και διαγνωστικά κριτήρια

Η καταγραφή των περιστατικών έλαβε χώρα στα πλαίσια μιας συστηματικής προσπάθειας καταγραφής των περιστατικών ΙΦΠΕ από την Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και μεταξύ του Ιανουαρίου του 1983 και του Μαΐου του 2009. Το σύστημα υγείας στη συγκεκριμένη περιοχή, περιλαμβάνει τόσο το Εθνικό Σύστημα Υγείας όσο και τον ιδιωτικό τομέα. Το σύνολο των Γαστρεντερολόγων της περιοχής είναι μέλη της Ομάδας Γαστρεντερολόγων της Βορειοδυτικής Ελλάδας και είχαν ενημερωθεί για το σκοπό και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωσή της μέσω συναντήσεων και ενημερωτικών e-mail. Η καταγραφή των περιστατικών από το σύστημα έγινε μέσω των ακόλουθων πηγών: **(i)** Εσωτερικοί και εξωτερικοί ασθενείς, αναφερόμενοι στην Ηπατο-Γαστρεντερολογική μονάδα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων; **(ii)** εξωτερικοί ασθενείς αναφερόμενοι στις γαστρεντερολογικές κλινικές των νοσοκομείων του κάθε νομού και **(iii)** ασθενείς αναφερόμενοι στους ιδιώτες γαστρεντερολόγους της περιοχής. Η διάγνωση της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας, βασίστηκε στα τυπικά κλινικά, ακτινολογικά, ενδοσκοπικά και ιστολογικά κριτήρια ενώ όσο αφορά στη διάγνωση της αδιευκρίνιστης κολίτιδας αυτή τέθηκε μόνο όταν η διάκριση μεταξύ νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας δεν ήταν εφικτή. Η νόσος του Crohn ταξινομήθηκε σύμφωνα με το Vienna System (Gasche et al 2000) και η ελκώδης κολίτιδα σύμφωνα με το L-J (Lennard-Jones, 1989). Η περιπρωκτική νόσος καθορίστηκε από την παρουσία αποστημάτων, συριγγίων ή ελκών όχι όμως και από την παρουσία δερματικών tags. Για την τελική διάγνωση των νόσου του Crohn, ελκώδους κολίτιδας και ελκώδους πρωκτίτιδας. Ως

διάρκεια του follow-up καθορίστηκε το διάστημα μεταξύ της διάγνωσης και της τελευταίας αναφερόμενης περίπτωσης. Λεπτομέρειες όσο αφορά επιπλέον δημογραφικά χαρακτηριστικά, συμπληρώθηκαν είτε κατόπιν συνεντεύξεως με τους ασθενείς, είτε κατόπιν αποστολής και συμπλήρωσης από τους ίδιους, ειδικά διαμορφωμένων ερωτηματολογίων. Κατά τη διάρκεια του 2005 και των αρχών του 2006 έγινε η λήψη και η αποθήκευση του αίματος από τους 447 πρώτους ασθενείς προκειμένου να πραγματοποιηθεί η γενετική μελέτη. Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα control , επιλέχθηκαν τυχαία από υγιείς δότες (100 άτομα) που προέρχονταν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και από το νοσοκομείο της Κέρκυρας. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν όλοι οι ασθενείς των οποίων η διάγνωση ετέθη για πρώτη φορά κατά την περίοδο 1983-2005, ενώ αξιολόγηση της κατάστασής τους έγινε τουλάχιστον δύο φορές κατά το χρονικό αυτό διάστημα. Τέλος, το ερευνητικό πρωτόκολλο είναι σε απόλυτη συμφωνία με τις κατευθυντήριες γραμμές της διακήρυξης του Ελσίνκι περί ηθικής

2.2 Μεθοδολογία

Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο Ανοσολογικό εργαστήριο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο τμήμα Ιατρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο εργαστήριο μετα-μεταγραφικού ελέγχου του Ε.Κ.Ε.Β.Ε “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”.

Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Φυγόκεντροι	EPPENDORF
Συσκευές ηλεκτροφόρησης	BIORAD
Επωαστικοί κλίβανοι κυτταροκαλλιέργειας (CO ₂)	NAPCO
UV transillumination. Gel documentation system.	GDS 8000-UVP-UK
Θερμικός κυκλοποιητής	BIORAD
Water bath	
Φωτόμετρο πλακών 96 φρεατίων	MRX. DYNATECH
Μικροσκόπια	NIKON
Semi-dry blotter	BIORAD
Phosphoimager STORM860	Molecular Dynamics
Vortex mixer	Molecular Dynamics

Ειδικά πλαστικά υλικά

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Τρυβλία Petri	CORNING
Κωνικοί σωλήνες	FALCON/B&D
Πλάκες 96 φρεατίων	CORNING
Πιπέτες	CORNING
Microcentrifuge tubes 1,5-2 ml	CORNING
Ειδικά ακρορύγχια	EPPENDORF

Απομόνωση DNA

Αντιδραστήρια

Απομόνωση DNA

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Buffer FG1 (Lysis buffer)	Invitrogen
Buffer FG2 (Denaturation buffer)	Invitrogen
Buffer FG3 (Hydration buffer)	Invitrogen
QIAGEN Protease	Invitrogen
100% Isopropanol	Bioanalytica
70% Ethanol	Bioanalytica

Διαδικασία

Χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της απομόνωσης το Flexigene DNA Kit 250 της Qiagen. Από όλους τους ασθενείς είχαν ληφθεί γενικές αίματος και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -30°C.

Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από 4-14 ml ακέραιου αίματος (whole blood)

Παρατηρήσεις :

- Οι όγκοι των buffer που δίνονται στο πρωτόκολλο, είναι κατάλληλοι για απομόνωση DNA από δείγματα ακέραιου αίματος των 10 ml. Το πρωτόκολλο μπορεί να προσαρμοστεί για δείγματα αίματος 4-14 ml με αυξομείωση των όγκων αναλογικά με τον όγκο δείγματος που χρησιμοποιείται.
- Όλα τα βήματα φυγοκέντρησης έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, χρησιμοποιώντας κωνικούς σωλήνες.
- Για τα περισσότερα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης για 1-3 ml λόγω μικρής ποσότητας, με ανάλογη προσαρμογή των χρησιμοποιούμενων κατά τη πειραματική διαδικασία όγκων.

Ενέργειες πριν την έναρξη του πειράματος :

- Εναιωρήσαμε την υδρόφιλο QIAGEN πρωτεάση σε 1,4 ml του buffer ενυδάτωσης FG3. Η διαλυμένη πρωτεάση QIAGEN πρέπει να αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Το παγωμένο αίμα θα πρέπει να ξεπάγωσε γρήγορα σε υδατόλουτρο στους 37°C με ήπια ανάδευση και να αποθηκεύτηκε σε πάγο πριν ξεκινήσει η διαδικασία.
- Υπολογίστηκε ο συνολικός όγκο αίματος που θα χρησιμοποιηθεί. Για κάθε 4 ml αίματος, ανακατέψαμε μαζί 2 ml buffer FG2 (αποσύνθεσης) και 20 μL ανασυγκροτημένης πρωτεάσης QIAGEN. Το buffer FG2/ QIAGEN πρωτεάση, ετοιμάστηκε όχι παραπάνω από μία ώρα πριν τη χρήση.
- Προετοιμάσαμε το υδατόλουτρο στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα στάδια 5 και 13.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Μεταφέραμε με πιπέτα 25 ml buffer FG1 σε σωλήνα φυγοκέντρησης 50 ml. Προσθέσαμε 10 ml αίματος και ανακατέψαμε μέσω ανάδευσης 5 φορές.
2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min σε 2000Xg.
3. Εν συνεχεία, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και αφήσαμε το σωλήνα αναποδογυρισμένο σε ένα καθαρό κομμάτι απορροφητικού χαρτιού για 2 min, φροντίζοντας ότι το ίζημα θα παραμείνει στο σωλήνα.

Σημείωση : Σε σπάνιες περιπτώσεις το ίζημα ίσως είναι ρευστό, για αυτό χύνουμε αργά. Αναποδογυρίζοντας το σωλήνα σε απορροφητικό χαρτί,

ελαχιστοποιούμε την πιθανότητα να "τρέξει" προς τα πίσω από το στεφάνι και τα πλευρά του σωλήνα επάνω στο ίζημα.

4. Προσθέσαμε 5 ml buffer FG2/ QIAGEN, κλείσαμε το σωλήνα και κάναμε vortex μέχρι το ίζημα να ομογενοποιηθεί τελείως. Ελέγχθει ξανά ο σωλήνας για να διαπιστώσουμε αν η ομογενοποίηση ήταν πλήρης.
5. Αναδεύσαμε τα σωλήνα 3 φορές, τον τοποθετήσαμε σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 min επώαση (το δείγμα άλλαξε χρώμα από κόκκινο σε πράσινο της ελιάς, υποδεικνύοντας την αποδιάταξη των πρωτεϊνών).
6. Προστέθηκαν 5 ml ισοπροπανόλης (100%) και ανακατέψαμε καλά μέσω ανάδευσης μέχρι η καθίζηση του DNA να γίνει ορατή με τη μορφή νημάτων ή άμορφης μάζας (*Η ακριβής ανάμειξη με ισοπροπανόλη ήταν σημαντική για την καθίζηση του DNA και θα ελέγχθηκε μέσω παρατήρησης. Για δείγματα με πολύ χαμηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων ,στα οποία το DNA ίσως να μην είναι ορατό, αναδεύουμε το σωλήνα για 20 φορές τουλάχιστον*).
7. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 min σε 2000Xg.

Σημείωση : *Στα ιζήματα που ήταν πολύ ρευστά, παρατείνουμε τη φυγοκέντρηση ή χρησιμοποιήσαμε πιο δυνατή.*

8. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αμέσως αναποδογυρίσαμε το σωλήνα σε ένα καθαρό κομμάτι απορροφητικού χαρτιού, προσέχοντας να μη μείνει ίζημα στο σωλήνα (Στις σπάνιες περιπτώσεις που το ίζημα ήταν ρευστό, έγινε αργά η απομάκρυνση του υπερκειμένου. Σε δείγματα που τα λευκά αιμοσφαίρια ήταν αρκετά, το DNA ήταν ορατό σαν ένα μικρό άσπρο ίζημα).

9. Προστέθηκαν 5 ml αιθανόλη (70%) και έγινε vortex για 5 sec.

10. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 min σε 2000Xg.

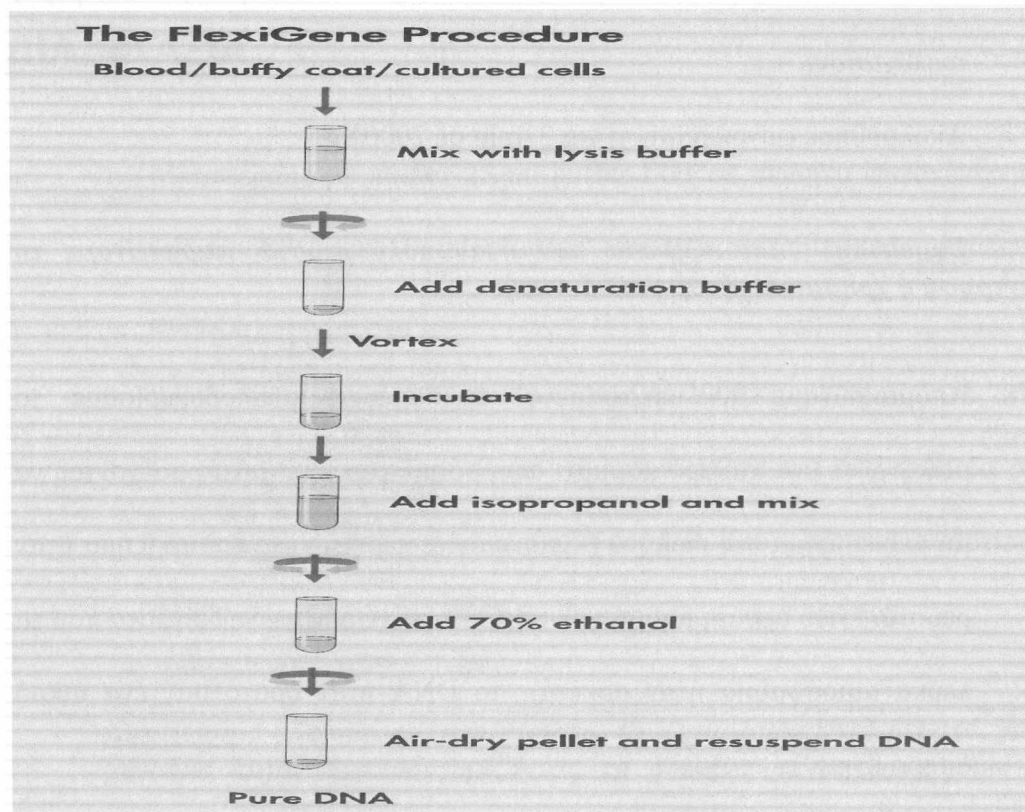
Σημείωση : Στα ίζηματα που ήταν πολύ ρευστά, παρατάθηκε η φυγοκέντρηση ή χρησιμοποιήθηκε πιο δυνατή.

11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήσαμε το σωλήνα ανάποδα σε ένα καθαρό κομμάτι απορροφητικού χαρτιού για τουλάχιστον 5 min, προσέχοντας να μείνει το ίζημα μέσα στο σωλήνα.

12. Αφήσαμε να ξεραθεί με αέρα το ίζημα του DNA μέχρι όλο τα υγρό να εξατμιστεί (τουλάχιστον για 5 min). Αποφύγαμε να υπερξεράνουμε το ίζημα του DNA γιατί τότε θα ήταν δύσκολο να διαλυθεί.

13. Προσθέσαμε 1 ml buffer FG3 και έγινε vortex για 5 sec σε χαμηλή ταχύτητα. Το DNA θα διαλύθηκε με επώαση σε υδατόλουτρο για 1 ώρα (στους 65 °C).

Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα tubes (2ml) στους -30°C.



Γονιδιακή ταυτοποίηση

Αντιδραστήρια

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
MgSO ₄	Invitrogen
dNTPs	NEB
Primers (F&R)	Invitrogen
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
10 x TBE	108g Tris base 55g Boric acid 40ml 0.5 M EDTA pH 8.3, Invitrogen
Αγαρόζη	Invitrogen
PCR buffer	Invitrogen
ddH ₂ O (RNAase free)	Invitrogen
Βρωμιούχο αιθίδιο	Invitrogen

Το MasterMix για τη διαδικασία της PCR, είχε την ακόλουθη σύσταση:

- MMX: - 5μL/ δείγμα, buffer
 - 2 μL/ δείγμα, MgCl₂
 - 1 μL/ δείγμα, dNTPs
 - 3-5 μL/ δείγμα, DNA
 - 0,2 μL, Taq polym.
 - 0.25 μL από τον καθένα για κάθε δείγμα (από πυκνό stock)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

L1007fsinsC

Η μετάλλαξη εισαγωγής κυτοσίνης ανιχνεύθηκε γονοτυπικά μέσω L1007fsinsCWTF, 5'-CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3',. Κατά τη διαδικασία, έγινε επιμήκυνση συγκεκριμένων τμημάτων αλληλίων του υπό έλεγχο γονιδίου με τη χρήση ενός ζεύγους ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (allele-specific forward primers)

(L1007fsinsCWTF, 5'-CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3', για το "αγρίου" τύπου αλληλίο και L1007fsinsCMUTF, 5'CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3', για το μεταλλαγμένο αλληλίο) σε συνδυασμό με ένα κοινό εκκινητή (5'-TCTTCA ACCCACATCCCCTT-3') σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR. Η διαδικασία της PCR ήταν η ακόλουθη: Αρχική αποδιάταξη της δομής διπλής έλικας στους 95°C. Εν συνεχεία 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 45 sec, σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA με μείωση της θερμοκρασίας για 40 sec στους 65°C και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Ο κύκλος ολοκληρώθηκε με επώαση για 10 min στους 72°C.

R702W

Η μετάλλαξη έλλειψης R702W, ανιχνεύθηκε γονοτυπικά μέσω αντίδρασης PCR σε συγκεκριμένα για τη μετάλλαξη αλληλίο μέσω ζεύγους συγκεκριμένων για τα αλληλίο εκκινητών (allele-specific forward primers) (R702WWTF, 5'-ATCTGAGA AGGCCCTGCTCC-3', , για το "αγρίου" τύπου αλληλίο και R702WMUTF, 5'-ATCTGAGAAGGCCCTGCTCT-3', για το μεταλλαγμένο αλληλίο) σε συνδυασμό με τον κοινό εκκινητή R702RW, 5'-CCCACACTTAGCCTTGATG-3' σε δύο ξεχωριστές PCR αντιδράσεις. Η διαδικασία της PCR ήταν η ακόλουθη: Αρχική αποδιάταξη της δομής διπλής έλικας στους 95°C. Εν συνεχεία 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 45 sec, σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA με μείωση της θερμοκρασίας για 40 sec στους 53°C και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Ο κύκλος ολοκληρώθηκε με επώαση για 10 min στους 72°C.

G908R

Η μετάλλαξη έλλειψης G908R δημιουργεί μια θέση περιορισμού *HhaI* και ανιχνεύθηκε γονοτυπικά με ειδική PCR (PCR-Restriction fragment length polymorphism method) (5'-CCCAGCTCCTCCCTCTTC-3' και 5'-AAGTCTGTAATGTAAAGCCAC-3') αφού είχε προηγηθεί επώαση με το ένζυμο για όλο το βράδυ στους 37°C. Η παρουσία του 'αγρίου τύπου' αλληλίου οδηγεί σε μια ανέπαφη μπάντα μεγέθους 380 bp, ενώ το προφίλ της G908R παραλλαγής, χαρακτηρίζεται από δύο μπάντες των 138 bp και 242 bp. Η διαδικασία της PCR ήταν η ακόλουθη: Αρχική αποδιάταξη της δομής διπλής έλικας στους 95°C. Εν συνεχεία 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 45 sec, σύνδεσης των εκκινητών με το πρότυπο DNA με μείωση της θερμοκρασίας για 40 sec στους 53°C και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Ο κύκλος ολοκληρώθηκε με επώαση για 10 min στους 72°C.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Ακολούθησε διαχωρισμός των προϊόντων σε πήκτη αγαρόζης. Βάλαμε 2 gr σε 100 ml TBE 1X και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει διαυγές ενώ παράλληλα προστέθηκαν και 2-3 σταγόνες βρωμιούχο αιθίδιο μέχρι να γίνει διαυγές. Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα στα 120V, ενώ χρησιμοποιήθηκαν γύρω στα 20μl (+ 2,5μl χρωστικής) από κάθε προϊόν της αντίδρασης PCR. Τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως και συγκρίθηκαν ποσοτικά με πρότυπο μάρτυρα (3μl) (100 bp ladder) που έτρεχε στην πρώτη στήλη κάθε πηκτής.

Απομόνωση επιθηλιακών κυττάρων

Αντιδραστήρια

Ειδικά πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας.

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Τρυβλία Petri	CORNING
Κωνικοί σωλήνες	FALCON/B&D
Πλάκες 96 φρεατίων	CORNING
Πιπέτες	CORNING
Ειδικά ακρορύγχια	EPENDORF

Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

<i>Περιγραφή</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Επωαστικοί κλίβανοι κυτταροκαλλιέργειας (CO ₂)	NAPCO
Φυγόκεντροι	EPENDORF

Γενικά αντιδραστήρια.

10x PBS	80g NaCl 2g KCl 11.5g Na ₂ HPO ₄ 2g KH ₂ PO ₄ Αναμίχθηκαν NaCl με KCl και Na ₂ HPO ₄ με KH ₂ PO ₄
0.5M EDTA pH 8.0	186.1g EDTA σε 800ml dH ₂ O. Ρυθμίστηκε το pH στο 8.0 με NaOH

Διαλύματα

1) HBSS –Hepes, 2% FBS, 0,5mM EDTA, 1mM DTT *500 ml*

- Stock EDTA 50mM : 5ml
- DTT : 72,5mg (διαλύουμε σε 5-6ml HBSS και περνάμε δια μέσου 0,2μm φίλτρου με σύριγγα)
- Hepes : 10ml
- FBS : 10ml
- Penicillin/Streptomycin
- Προθέρμανση στους **37°C**
- 10-15ml /επώαση /δείγμα
- HBSS χωρίς Mg²⁺/Ca²⁺

2) Percoll 25%, 40% /PBS

- Stock Percoll 1X → διαλύουμε με 10X PBS. Percoll σε RT
- Για 6ml /layer /sample :
-

	<u>Percoll 1X/ PBS 1X</u>	<u>1X PBS</u>
25%	1,5ml	4,5ml
40%	2,4ml	3,6ml

Θρεπτικό μέσο για την κυτταροκαλλιέργεια (medium)

<i>Περιγραφή</i>	<i>Stock</i>	<i>Ποσότητα</i>
DMEM	10X	20ml
2% FBS	100%	4ml
Glutamine 2 mM	200 mM	2ml
100 U/ml penic. 100 U/ml strept.	500U/ml 500U/ml	4ml
0,2% D-Glucose	20%	1,5 ml
5 µg/ml insulin	10 mg/ml	100 µL
Dextra-methasone	1mM	10 µL
60 nM Selenium	0,000578M	10 µL
5 µg/ml Transferrin	50 mg/ml	20 µL
5X10 ⁻⁸ Triiodothyronine	20 µg/ml	336,7 µL
10 ng/ml EGF		40 µL
20mM Hepes	1M	4ml

Διαδικασία

Παρατηρήσεις :

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία τα οποία επιστρώθηκαν με κολλαγενάση ποντικού (*rat-collagen coated plates*) σε θρεπτικό μέσο

επιθηλιακών κυττάρων (ECM-DMEM). Τα πειραματόζωα της $tnf^{ARE/+}$ έπρεπε να είναι ηλικίας 8-10 εβδομάδων όταν και αναπτύσσουν την παθολογία Crohn στον ειλεό.

1. Βάζουμε 6ml medium και 600μL rat-collagenase και τοποθετούμε από 1 ml σε 6 plates. Το αφήνουμε όλο το βράδυ στους 4°C.
2. Την επόμενη μέρα αφαιρούμε το medium και αφήσουμε τα plates για 3-4 ώρες στους 37°C τα ξαναβάζουμε στους 37°C.
3. Ετοιμάζουμε το διάλυμα Percoll.
4. Αφού αφαιρέσουμε τον ειλεό από τον ποντικό, τοποθετούμε το τμήμα του εντέρου σε plate με PBS1X.
5. Με συγκεκριμένους χειρισμούς γυρίζουμε το έντερο ανάποδα σε μια λεπτή γυάλινη ράβδο και το βάζουμε σε 10 ml HBSS/FBS και κουνάμε προκειμένου να αποκολληθούν τα ασθενώς κολλημένα επιθηλιακά κύτταρα.
6. Κόβουμε το έντερο σε μικρά κομματάκια 0,5cm τοποθετούμε σε 10 ml HBSS 2% FBS – HEPES-EDTA –DTT (Τα έχουμε ήδη προθερμάνει, εκτός του HEPES) και τα αφήνουμε να αναδεύονται για 45 min στους 37 °C.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1400rpm) για 10min στους 18°C. Το υπερκείμενο φιλτράρεται (βαμβακερή γάζα) και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση (1500rpm) για 5min.
8. Ακολούθως το υπερκείμενο αναρροφάται, και διαλύουμε το ίζημα με 5ml διαλύματος percoll 25-40% (discontinuous Percoll gradient). Ακολουθεί φυγοκέντρηση (600g) για 10min στους 18°C.

9. Συλλέγουμε τα κύτταρα (η δεύτερη από επάνω διακριτή στοιβάδα) και ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις (3) με 10 ml PBS 1X μετά από κάθε μία από τις οποίες ακολουθεί φυγοκέντρηση (1500rpm-5min) και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
10. Μετά την τελευταία «πλύση» προστίθεται medium και τοποθετούνται τα κύτταρα στα plates (επώαση στους 37 °C). (Denning TL et al 2000, Macartney KK et al 2000)

Σημείωση 1: Τις πρώτες 2 ημέρες δεν κουνάμε τα κύτταρα καθόλου. Μετά κάθε 2 ημέρες αναρροφάμε το μισό medium και αντικαθίσταται με φρέσκο ενώ παρατηρούμε μικροσκοπικά την πορεία της κυτταροκαλλιέργειας

Σημείωση 2: Για τον προσδιορισμό του ποσοστού των επιθηλιακών κυττάρων στον πληθυσμό πραγματοποιείται χρώση για το δείκτη επιθηλιακών κυττάρων E-καδερίνη και ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Περίπου 10^6 κύτταρα επωάζονται για 20-25 min με 1μl μονοκλωνικό αντίσωμα anti-mouse E-cadherin FITC (BD) σε διάλυμα 10% ορού ποντικού, 0,01% αζίδιο του νατρίου (NaN_3). Μετά πλένονται δύο φορές με PBS, 0,01% NaN_3 και αναλύονται σε μηχανήμα Κυτταρομετρίας Ροής (BD FACS CANTO). Ο πληθυσμός είναι θετικός για E-cadherin σε ποσοστό ~90%.

2.3. Στατιστική ανάλυση

Ως δείκτης επίπτωσης, υπολογίστηκε ο αριθμός των περιστατικών ανά 10^5 κατοίκους, και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την κανονική κατανομή. Τα πληθυσμιακά δεδομένα στηρίχτηκαν στη βάση δεδομένων της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας (Εθνικές απογραφές 1981, 1991, και 2001). Η βαρύτητα των χρονικών τάσεων του δείκτη επίπτωσης, ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας το χ^2 –trends in proportion test. Η συχνότητα και η ευπάθεια των NOD2/ CARD15 παραλλαγών μεταξύ των CD και ΕΚ ασθενών, καθώς και της ομάδας control τέθηκε υπό σύγκριση με το chi-square test. Οι αναλογίες των πιθανοτήτων (OR) υπολογίστηκαν με το αντίστοιχο chi-squared (χ^2) test κατανομής και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI95%). Το Fisher exact test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των διαφορών μεταξύ των συχνοτήτων των αλληλίων τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου. Οι τιμές P ήταν στατιστικά σημαντικές και θεωρήθηκαν κάτω του 0.01. Η όλη διαδικασία βοηθήθηκε από το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad InStat (έκδοση 3.00; GraphPad Software

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

Από την περίοδο 1981 έως και 2008 που σταματάει η επιδημιολογική μελέτη, έχουν καταγραφεί 910 περιπτώσεις ασθενών με ΙΦΠΕ. Από τους ασθενείς αυτούς 154 (16,9%) διαγνώστηκαν με νόσο του Crohn, 654 με ελκώδη κολίτιδα (71,8%) και 102 με αδιευκρίνιστη κολίτιδα (11,2%). Η πλειονότητα των ασθενών προήλθε από τις περιοχές των Ιωαννίνων και της Κέρκυρας, απαριθμώντας το 66% των συνολικών περιπτώσεων (Πίνακας 3.1)

ΝΟΜΟΣ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (%)
Ιωαννίνων	373 (41)
Κέρκυρας	228 (25)
Άρτας	91 (10)
Πρέβεζας	80 (8,8)
Θεσπρωτίας	60 (6,6)
Λευκάδας	15 (1,6)

Πίνακας 3.1 Κατανομή ΙΦΠΕ στη ΒΔ Ελλάδα ανά Νομό

Όσο αφορά τη NC, 62 (40,3%) ασθενείς είχαν εντόπιση στο τελικό τμήμα του ειλεού, 55 (35,7%) είχαν ειλεο-κολική εντόπιση και σε 37 (24%) η νόσος περιοριζότανε μόνο στο κόλον. Από τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, 112 (17,2%) παρουσίαζαν ολική κολίτιδα, 102 (15,5%) πρωκτίτιδα και 440 (67,3%) είχαν εντοπισμένη κολίτιδα στο αριστερό κόλον 9 (Πίνακας 3.2)

ΤΜΗΜΑ ΕΝΤΕΡΟΥ	ΕΚ	NC
	Ασθενείς(%)	Ασθενείς(%)
ΟΛΙΚΗ ΚΟΛ.	112 (17,2)	37 (24)
ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΚΟΛ.	440 (67,3)	-
ΠΡΩΚΤΙΤΙΔΑ	102 (15,5)	-
ΕΙΛΕΟΚΟΛΙΤΙΔΑ	-	55 (35,7)
ΤΕΛΙΚΗ ΕΙΛ.	-	62 (40,3)

Πίνακας 3.2 Κατανομή νόσου σε ασθενείς με ΙΦΠΕ στη ΒΑ Ελλάδα

Η αναλογία ΕΚ/NC είναι 4,2/1, ενώ η αναλογία ανδρών/γυναικών είναι 1,6/1. Οι ηλικίες από 40-60 έτη εμφανίζουν τον υψηλότερο επιπολασμό της νόσου ενώ καταγράφηκαν 11 θάνατοι (1,2%) και 7 περιπτώσεις ολικής κολεκτομής.

Όσο αφορά την περίοδο που διήρκεσε η γενετική-επιδημιολογική μελέτη μελέτη, 447 περιπτώσεις ΙΦΠΕ καταγράφηκαν στην υπό μελέτη περιοχή. Από τους ασθενείς αυτούς, 105 διεγνώσθησαν με νόσο του Crohn (23.5%), 325 με ελκώδη κολίτιδα (72.7%) και 17 με αδιευκρίνιστη κολίτιδα (3.8%). Η πλειονότητα των ασθενών προήλθε από τις περιοχές των Ιωαννίνων και της Κέρκυρας, απαριθμώντας το 92% των συνολικών περιπτώσεων νόσου του Crohn και το 78% των συνολικών περιπτώσεων ελκώδους κολίτιδας. Τα κύρια δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών . νόσο του Crohn και ελκώδη κολίτιδα, παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.

Οικογενειακό ιστορικό ΙΦΠΕ είχαν 11 από τους ασθενείς. Όσο αφορά τη NC, 35 (33,3%) ασθενείς είχαν εντόπιση στο τελικό τμήμα του ειλεού, 28 (26,7%) είχαν ειλεο-κολική εντόπιση και σε 42 (40%) η νόσος περιοριζόταν μόνο στο κόλον. Επιπλέον, στενωτική νόσος καταγράφηκε σε 23 (21,9%), παρουσία συριγγίων σε 25 (23,8%) και περιπρωκτική νόσος σε 26 (24,8%) ασθενείς με νόσο του Crohn. Από τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, 71 (21,8%) παρουσίαζαν πανκολίτιδα, 99 (30,5%) πρωκτίτιδα και 155 (47,7%) είχαν εντοπισμένη κολίτιδα στο αριστερό κόλον. Η μέση ετήσια επίπτωση κρουσμάτων για NC και EK ήταν 0.9 και $2.9/10^5$ κατοίκους, αντίστοιχα. Οι δείκτες επίπτωσης (age-adjusted) ήταν $0.9/10^5$ (95% CI 0.1-1.7) και 2.7 (95% CI 1.7-4.1) αντιστοίχως. Ο μέσος ετήσιος δείκτης επίπτωσης (age-adjusted) για την αδιευκρίνιστη κολίτιδα ήταν $0.2/10^5$ (95% CI 0.1-0.4).

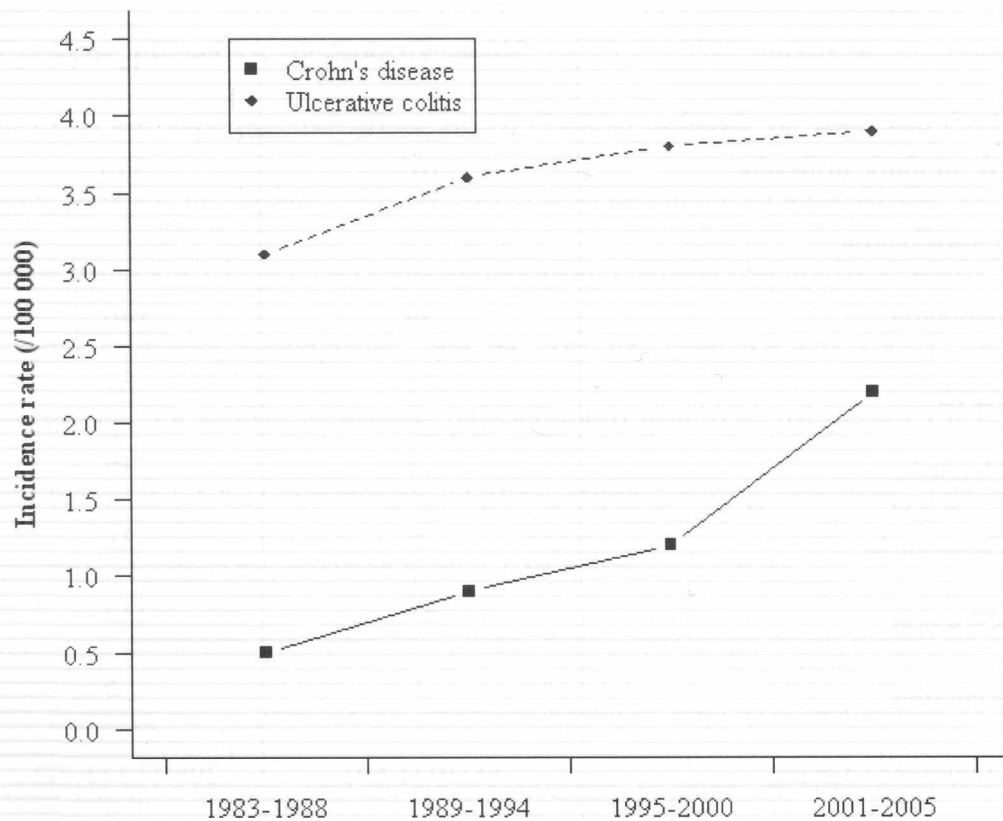
Η επίπτωση της νόσου του Crohn. ήταν μεγαλύτερη στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες ενώ η μεγαλύτερη επίπτωση βρέθηκε στην ηλικιακή ομάδα 18-44 ετών τόσο για τους άνδρες, όσο και για τις γυναίκες. Η επίπτωση ήταν υψηλότερη στους άνδρες και στην ελκώδη κολίτιδα, ενώ εδώ η ηλικιακή ομάδα με την υψηλότερη επίπτωση ήταν τα 45-64 χρόνια και για τα δύο φύλλα.

Πίνακας 3.3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των διαγνωσθέντων με ΙΦΠΕ ασθενών κατά τη χρονική περίοδο 1983-2005, στη ΒΔ Ελλάδα

	Νόσος Crohn	Ελκώδης κολίτις
Συνολικός αριθμός ασθενών	105	325
Περιοχή προέλευσης		
• Ιωάννινα	59	140
• Άρτα	5	10
• Πρέβεζα	2	36
• Θεσπρωτία	5	21
• Κέρκυρα	33	113
• Λευκάδα	1	5
Άντρες: Γυναίκες (Λόγος)	66:39 (1.69)	208:117 (1.77)
Ηλικία διάγνωσης (yrs) (mean ±SD)	33.2 (12.9) [18-70]	45.7 (16.1) [18-93]
[range]	33.4 (12.9)	47.3 (15.1)
Άντρες (μέση ηλικία σε έτη ±SD)	33.1 (13.2)	42.9(17.3)
Γυναίκες (μέση ηλικία σε έτη ±SD)		
Follow up(μήνες) (mean ±SD) [range]	92.9 (72.3) [4-264]	119.6 (73.8) [5-276]

Υπήρξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στην επίπτωση της NC ($p < 0.01$) ,κατά τη διάρκεια της υπό μελέτης περιόδου, ενώ η επίπτωση της ελκώδους κολίτιδας

αυξήθηκε ελάχιστα και όχι κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο (Γράφ.3.2)



Γράφημα 3.2. Τάσεις της σταθεροποιημένης επίπτωσης των NC και EK

Ως συνέπεια αυτού, ο λόγος της NC προς την EK πρακτικά διπλασιάστηκε ξεπερνώντας το 1 στο νομό Ιωαννίνων, τον πολυπληθέστερο νομό και κέντρο της μελέτης, κατά το έτος 2002 ενώ παρέμεινε πάνω από ένα και τα επόμενα χρόνια. (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4. Εξέλιξη των γενετικών, δημογραφικών και κλινικών συσχετίσεων της NC κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης.

Περίοδος	Έστω μία CARD15 μετάλλαξη	A:Γ λόγος	Μέση ηλικία	NC:EK λόγος, αθροιστικά	NC:EK λόγος, περιοχή Ιωαννίνων	NC:EK λόγος, Κέρκυρα	Περ/κή νόσος
Pre- 1994	46.1%	1.4	30.4	0.23	0.26	0.2	13.8%
1995-99	61.9%	3.4	35.4	0.32	0.46	0.3	27.2%
2000-05	46.9%	1.55	33.1	0.61	>1	0.5	31.3%
Σύνολο	51%	1.83	32.8	0.36	0.38	0.32	25.5%

Όταν δημογραφικές και κλινικές παράμετροι αξιολογήθηκαν σε συσχέτιση με την αύξηση της επίπτωσης της νόσου του Crohn , σε ηλικία, φύλλο και γεωγραφική κατανομή των ασθενών δεν εμφανίστηκε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή . Δεν παρατηρήθηκαν επίσης αλλαγές στα ποσοστά των ασθενών με τελική ειλειπίδα ή εντόπιση στο κόλον και στενωτική ή συριγγοποιό νόσο μεταξύ της προ-1995 περιόδου και των περιόδων 1995-1999 και 2000-2005. Μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ασθενών με περιπρωκτική νόσο παρατηρήθηκε στις δύο τελευταίες περιόδους σε σύγκριση με την προ-1995 περίοδο (Πίνακας 3.4). Η σχέση της νόσου του Crohn με τις τρεις μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο CARD15 γονίδιο, δείχνονται στον Πίνακα 3.5. ενώ δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε οποιαδήποτε μετάλλαξη κατά τη διάρκεια της περιόδου που μελετήθηκε (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.3 .Συχνότητες των αλληλίων των παραλλαγών του CARD15

Δείγματα		Γονότυπος			Συχνότητα Μεταλλαγμένου Αλληλίου (%)	p ; OR [CI _{95%}]
		-/-	-/+	+/+		
R702W	NC	85	8	3	7.29	0.015 *; 3.85 [1.24-11.93]
	EK	171	9	0	2.5	0.78; 1.26 [0.38-4.13]
	Control	96	4	0	2	
G908R	NC	83	13	0	6.77	0.70; 0.83 [0.39-1.78]
	EK	156	24	0	6.66	0.61; 0.82 [0.42-1.58]
	Control	84	16	0	8	
Leu1007fs incC	NC	52	36	8	27.08	<0.0001 *; 7.06 [3.46- 14.37]
	EK	166	9	5	5.27	1; 1.06 [0.48-2.32]
	Control	90	10	0	5	

-/-, ομόζυγο *wild-type*, +/- ετερόζυγο, +/+ ομόζυγο μεταλλαγμένο .

* Στατιστικά σημαντικό

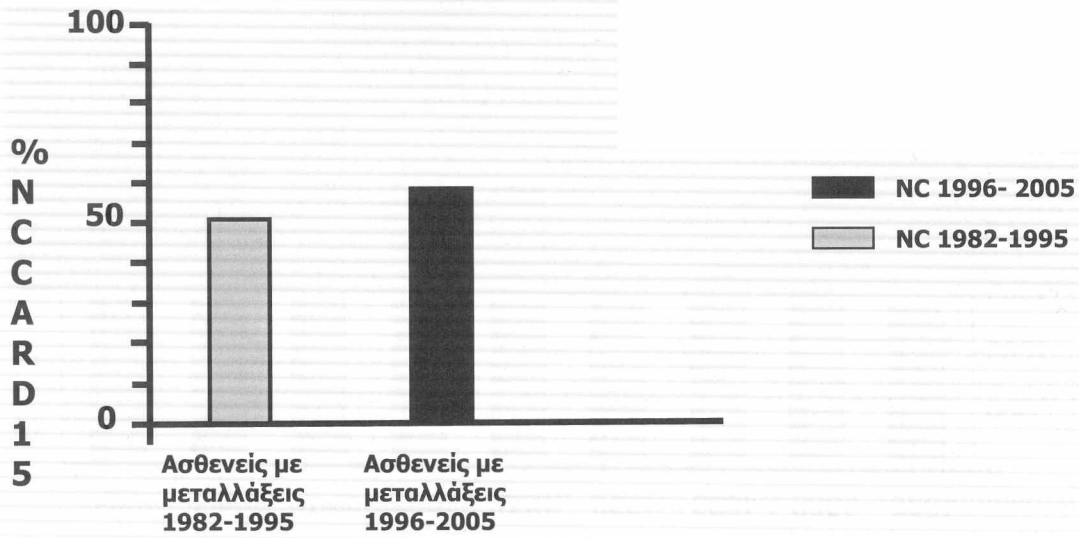
Ο υπολογισμός της συχνότητας του μεταλλαγμένου αλληλίου έγινε ως εξής:

πχ. NC στην 702

Στα (85+85+8+8+3+3) αλλήλια, έχουμε (8+3+3) μεταλλαγμένα

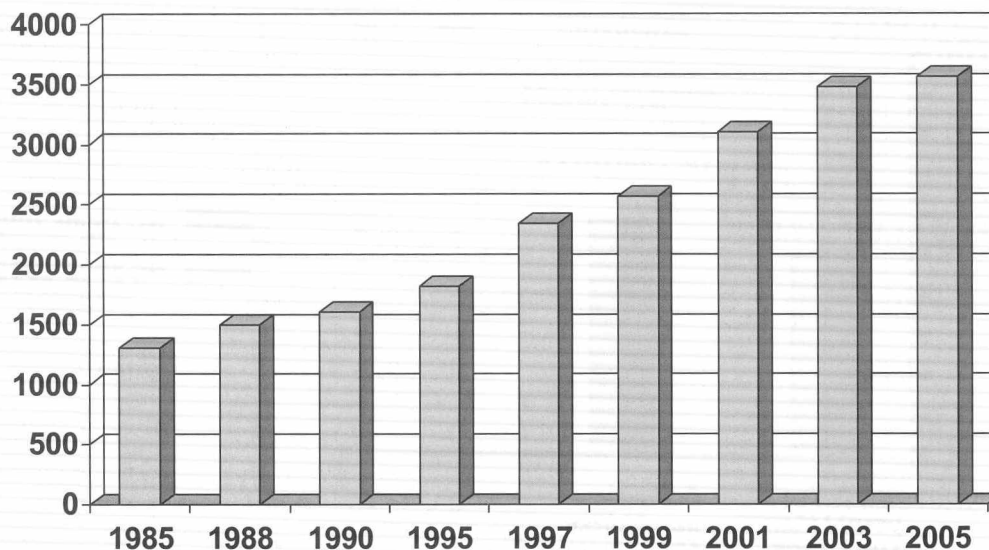
Στα 100 αλλήλια, έχουμε X=?.....7,29

Γράφημα 3.2. Ασθενείς με μεταλλάξεις NOD πριν και μετά το 1995



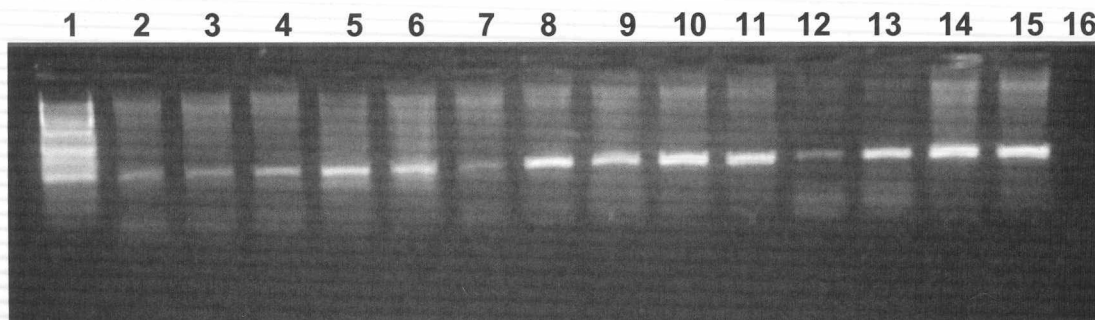
Τέλος, συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της αύξησης στην επίπτωση της νόσου του Crohn και στην αντίστοιχη αύξηση του κατά κεφαλή αδρού εγχώριου προϊόντος κατά την ίδια χρονική περίοδο κάτι που δε συνέβη με την ελκώδη κολίτιδα (3.4&3.5)

Γράφημα 3.4. Αδρό εγχώριο προϊόν (ΒΔ Ελλάδα Euro/άτομο, EUROSTAT)

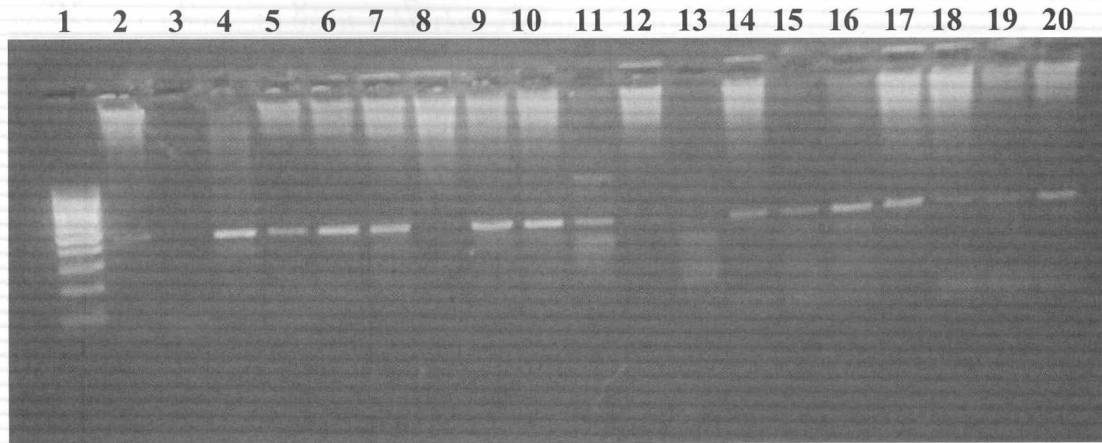


Γονιδιακή ταυτοποίηση

Όσο αφορά τους πολυμορφισμούς R702W και L1007fsinsC σε πρώτη φάση έγινε ο διαχωρισμός του αν είναι μεταλλαγμένα ή όχι (φωτ. 1) ενώ σε δεύτερη φάση, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία μόνο με τους “αγρίου τύπου” εκκινητές προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι ομόζυγα ή ετερόζυγα όσο αφορά το μεταλλαγμένο γονίδιο (φωτ. 2).

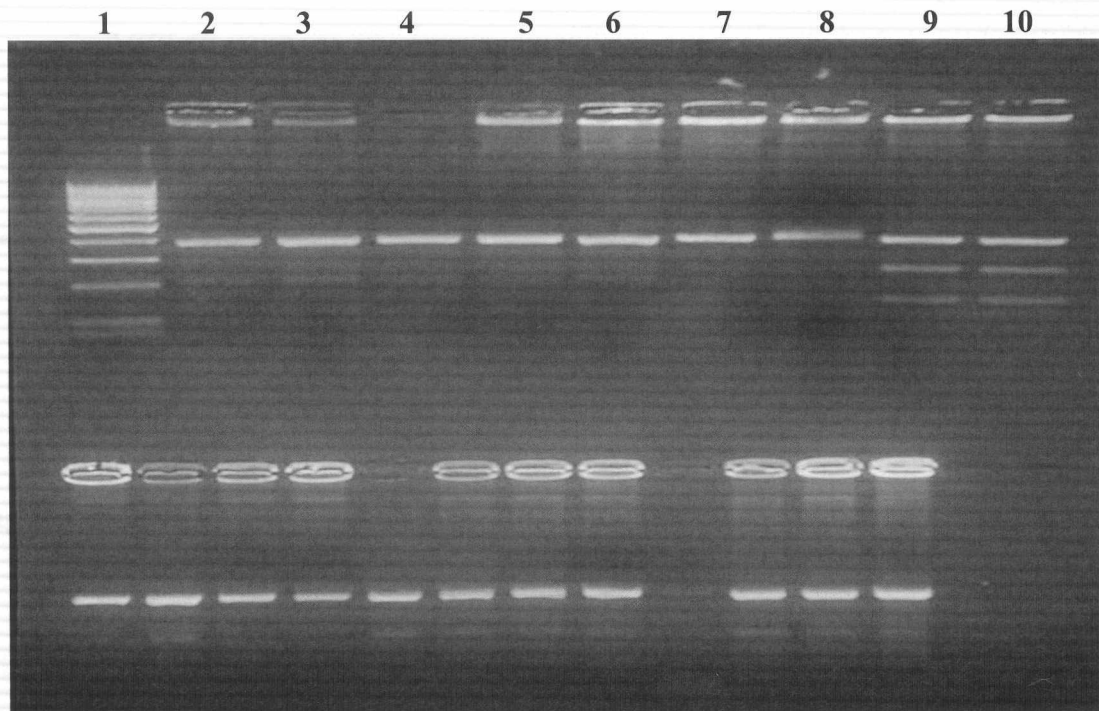


Φωτογραφία 1: Έλεγχος για R702W Ασθενείς Ελκώδους Κολίτιδας. Τα δείγματα με διακριτή μπάντα (5,6,8,9,10,11,13,14,15) είναι τα μεταλλαγμένα. Στη θέση ένα ο μάρτυρας και στη θέση 16 το αρνητικό control.

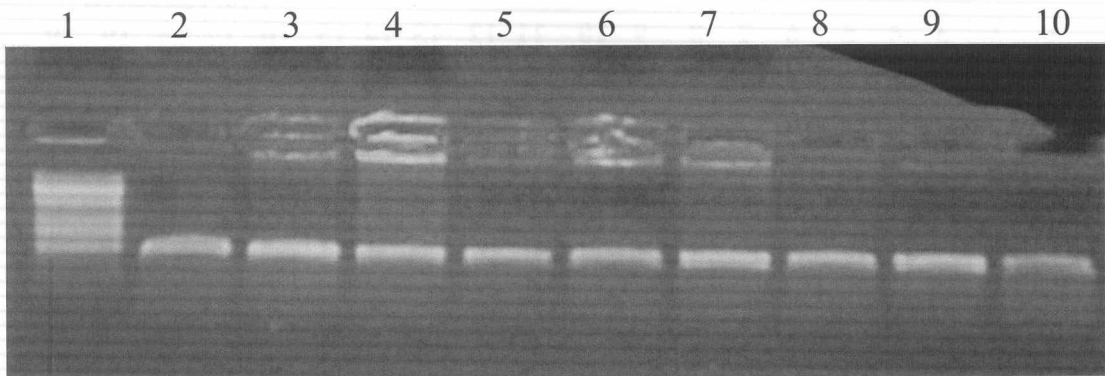


Φωτογραφία 2: Επανελέγχος μεταλλαγμένων δειγμάτων *R702W* για καθορισμό ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας (EK). Ετερόζυγα είναι τα 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 20.

Όσο αφορά τη μετάλλαξη G908R η θέση περιορισμού που δημιουργεί η μετάλλαξη, μας επέτρεψε να καθορίσουμε από την πρώτη κιόλας ηλεκτροφόρηση το κατά πόσο τα δείγματα είναι μεταλλαγμένα ή όχι και ομόζυγα ή ετερόζυγα ή όχι (φωτ. 3,4)

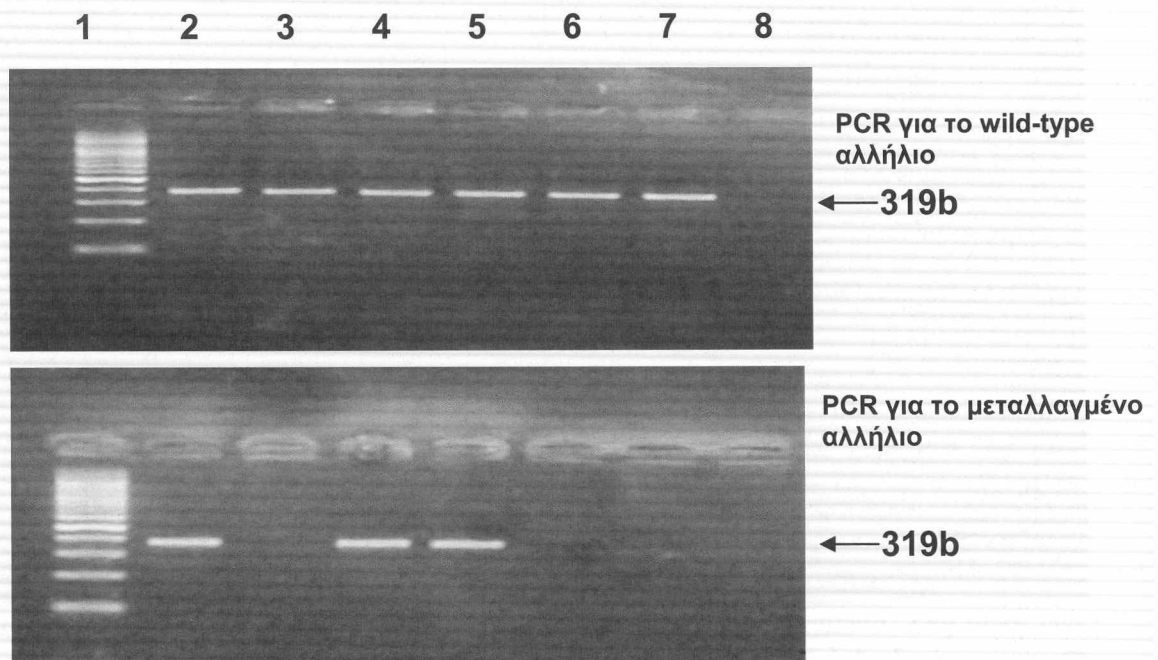


Φωτογραφία 3: Δείγματα ασθενών με NC. Στην επάνω σειρά τα 9 και 10 που είναι ετερόζυγα μεταλλαγμένα. (G908R)

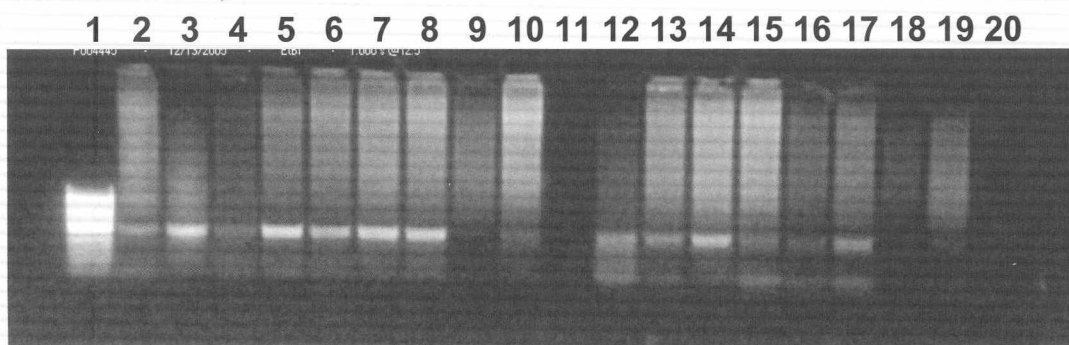


Φωτογραφία 4: Δείγματα ασθενών με ΕΚ. Όλα ομόζυγα *wild type* (G908R). Στη θέση 1 ο μάρτυρας.

Φωτογραφία 5. Ταυτοποίηση της μετάλλαξης Leu1007fsinsC σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της PCR από *wild-type* control και από ασθενείς με νόσο του Crohn. Σειρά 1, 100bp DNA Ladder (Fermentas). Στις σειρές 2, 4, και 5 παρουσιάζονται CD ασθενείς ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη Leu1007fsinsC, ενώ στις σειρές 3, 6, και 7 παρουσιάζονται υγιή άτομα ομόζυγα για τον “άγιο” τύπο (*wild-type*). Στη σειρά 8, είναι το αρνητικό control (δείγμα χωρίς DNA). Η εισαγωγή της κυτοσίνης καταδεικνύεται με το βέλος.



Φωτογραφία 6. Επανάλεγχος μεταλλαγμένων R702W από δείγματα ασθενών με νόσο του Crohn. Στη θέση 1 Marker 100bp. Ο επανάλεγχος έγινε με το αγρίου τύπου (wild type) primer και έτσι τα δείγματα που δεν έχουν διακριτή μπάντα (9, 10, 11, 18, 19) είναι ομόζυγα ως προς τη μεταλλαγή. Τα υπόλοιπα είναι ετερόζυγα. Στη θέση 20 το αρνητικό control.



Απομόνωση επιθηλιακών κυττάρων εντέρου

Κατά τη διάρκεια της 7μηνης παραμονής και διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών στο E.K.E.B.E. "Αλ. Φλέμιγκ", δεν κατέστη δυνατό να εγκαθιδρυθεί η μεθοδολογία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Βορειοδυτική Ελλάδα αποτελείται από την κυρίως χώρα που αντιστοιχεί στην περιφέρεια της Ηπείρου και από τα νησιά της Κέρκυρας και της Λευκάδας. Για λόγους γεωγραφίας αλλά και λόγω του άσχημου οδικού δικτύου και που δυσκόλευε την επικοινωνία με άλλες περιοχές της Ελλάδας, η περιοχή μπορεί να θεωρηθεί κλειστή και κατά συνέπεια ιδανικό περιβάλλον για επιδημιολογικές αναλύσεις συγκεκριμένων ασθενειών. Έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι η ελκώδης κολίτιδα ήταν κοινή οντότητα στην περιοχή, ενώ η νόσος του Crohn ήταν αρκετά σπάνια με το λόγο NC/EK να παίρνει τιμές κατά τη δεκαετία του '80 και την αρχή της δεκαετίας του 90, κοντά στο 0,1 (Tsianos et al, 1994-Tsianos et al, 2003). Προς το παρόν, τα στοιχεία αυτής της επί 27 χρόνια εκπονούμενης μελέτης δείχνουν μια απότομη και παράλληλα εμμένουσα αύξηση στη επίπτωση της νόσου του Crohn από το 2000 στη ΒΔ Ελλάδα, μια αύξηση που από το 2002 ανέστρεψε το λόγο NC/EK στη μεγαλύτερη επαρχία της περιοχής, αυτή των Ιωαννίνων. Τα ευρήματα αυτά, είναι σε συμφωνία με ήδη δημοσιευμένες μελέτες που καταδεικνύουν την αυξητική τάση της νόσου του Crohn (Mate-Jimenez J et al,1994-Trallori et al, 1996, Kyle et al, 1992-Timmer et al, 1999-Lee et al, 1994- Bjornsson et al, 2000-Loftus et al, 1998-Moum et al, 1996&Thomas et al, 1995). Η αυξητική τάση που καταδείχθηκε στις μελέτες αυτές συχνά συσχετίστηκε με την αυξανόμενη ηλικία διάγνωσης ενώ κάλλιστα θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αύξηση του μέσου όρου ζωής και την τεχνολογική πρόοδο στους τομείς της διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου (παγκόσμια αύξηση-Lee et al,1994&Timmer et al,1997- και μεγαλύτερη αναλογία ηλικιωμένων ασθενών-Kyle et al, 1992) (Munkholm et al,1992-Lapidus et al, 1997-Loftus et al, 1998). Κάτι τέτοιο δε συνέβη στη μελέτη μας όπου η πλειοψηφία των ασθενών με NC ήταν νέοι

παρόμοια με άλλες μελέτες (Molinie et al, 2004- Bjornsson et al, 2000) και ο μέσος όρος της ηλικίας των ασθενών δεν έχει αλλάξει σημαντικά με το πέρασμα των χρόνων. Σε περαιτέρω ανάλυση, δε θα μπορούσε να αποδοθεί στη βελτίωση της επιτήρησης των ασθενών ή στη συχνότητα που αυτοί αναφέρουν σχετικά με τη νόσο συμπτώματα καθώς είναι χαρακτηριστικό πως η αύξηση αυτή στην επίπτωση εκφράζεται κατά κύριο λόγο στη περιοχή των Ιωαννίνων που φιλοξενεί το κέντρο μελέτης καθιστώντας εφικτή την μεγαλύτερη δυνατή αναφορά περιστατικών. Επιπλέον μια παρόμοια αύξηση δεν παρατηρήθηκε για την ΕΚ την ίδια περίοδο. Αυτή η συνεχόμενη αύξηση της επίπτωσης καταδεικνύει ότι άγνωστοι παράγοντες, συνεχίζουν να δρουν στην περιοχή της ΒΔ Ελλάδας. Για να εξηγήσουμε αυτή την αύξηση μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα (1983-2005), υποθέσαμε ότι διάφοροι αιτιολογικοί παράγοντες υπάρχουν και εκτιμήσαμε την πιθανότητα μια σταδιακής αλλαγής στην ευπάθεια των γονιδίων που πιθανόν να συνεισφέρει στην αυξητική αυτή τάση.

Παρά τις διαφορές στην εθνικότητα, τη φυλή και τη γεωγραφική κατανομή (Economidou et al, 2004), η γενετική συσχέτιση της NC και του CARD15 είναι προς το παρόν, ευρύτατα επιβεβαιωμένη (Vermeire et al, 2005- Gaya et al, 2006). Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές όσο αφορά τις παραλλαγές του CARD15 κατά τη διάρκεια της μελέτης και στη μελέτη μας κάτι που ίσως μας λέει ότι δεν έχουν υπάρξει αλλαγές όσο αφορά το γενετικό υπόστρωμα της νόσου. Οι αναλογίες των τριών σημειακών μεταλλάξεων του CARD15 είναι ανάλογες με αυτές ανάλογων μελετών της Κεντρικής Ευρώπης και πολύ υψηλότερες από αντίστοιχες της Βόρειας Ευρώπης (Gava et al, 2006). Ακόμη τα αποτελέσματα αυτά είναι διαφορετικά από αυτά των δύο άλλων μελετών που πραγματοποιήθηκαν στην Ελλάδα: Στην πρώτη που έλαβε χώρα στο νησί της Κρήτης, δείχθηκε η σπανιότητα του SNP13

(Roussomoustakaki et al, 2003), μια αντίφαση που είναι πιθανό να αποδίδεται είτε στο γεγονός ότι η Κρήτη είναι μια απομονωμένη γεωγραφικά περιοχή όπου η μετάλλαξη δείχνει να μην επηρεάζει τη νόσο, είτε στο μικρό υπό εξέταση δείγμα της μελέτης. Όσο αφορά τη δεύτερη μελέτη, οι συγκριτικά υψηλές συχνότητες και στα τρία SNPs φαίνεται να οφείλεται στην επιλογή των ασθενών (είχαν νοσηλευτεί κατά διαστήματα, υψηλό ποσοστό ειλεοκολικής εντόπισης) (Gazouli et al, 2004).

Η επίδραση του περιβάλλοντος σε γενετικά ευπαθείς πληθυσμούς είναι μια γενική αποδεκτή (αν και προς το παρών ακαθόριστη) ιδέα.. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μια αυξημένη επίπτωση στη νόσο του Crohn σε εύπορες (Armitage EL et al 2004) και υψηλού εισοδήματος οικογένειες (Blanchard JF et al 2001). Αναφέρεται επίσης, ένας αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης νόσο του Crohn σε ενήλικες που ως νήπια έζησαν σε πολύ καλές συνθήκες οικιακής υγιεινής (Gent AE et al. 1994). Έχει προταθεί ότι η υψηλότερη επίπτωση στα άτομα καλύτερης κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο βαθμό έκθεσής τους σε κοινούς μικροβιακούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και λόγω των καλύτερων συνθηκών οικιακής υγιεινής, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε μια εναλλακτική ανοσολογική απόκριση των γενετικά ευπαθών ατόμων (Montgomery SM et al 1997) .Η παραπάνω πρόταση έχει χαρακτηριστεί ως “Υπόθεση της υγιεινής”. Και άλλες υποθέσεις προτάθηκαν τα επόμενα χρόνια με κεντρικό θέμα την υγιεινή, όπως αυτή του Hugot, που ενοχοποιούσε τα ψυχοτροπικά βακτήρια λόγω της παρουσίας τους στα κατεψυγμένα τρόφιμα intriguing (Hugot JP et al 2003). Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το παθητικό κάπνισμα (Bridger S et al 2002) ή παράμετροι που σχετίζονται με τη διαίτα (Mahmud N et al 2001), παράγοντες συνυφασμένοι με το Δυτικό τρόπο ζωής, επίσης συνεισφέρουν προς αυτή την κατεύθυνση. Ακόμη, όποιο και αν είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης των

περιβαλλοντικών παραγόντων στην επίπτωση της νόσου του Crohn, θα απαιτηθεί ένα χρονικό διάστημα τόσο για την ανάπτυξη παθογένειας, όσο και για και για την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων προκειμένου να τεθεί η διάγνωση της νόσου. Ακόμα και αν τα βακτήρια ή η δίαιτα ενοχοποιούνταν, θα απαιτούνταν ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα μέχρι να γίνουν εμφανείς οι παθογενετικές τους επιπτώσεις και ως εκ τούτου οι αλλαγές της κοινωνικής και οικονομικής κατάστασης θα προηγούνταν των αλλαγών στην επίπτωση της νόσου του Crohn για μια περίοδο 5-10 ετών τουλάχιστον.

Στη Βορειο-Δυτική Ελλάδα, μια μεγάλη αύξηση παρατηρήθηκε κατά τη δεκαετία 1990 στους κοινωνικο-οικονομικούς δείκτες η οποία συνεχίζεται και στον 21^ο αιώνα ενώ το κατά κεφαλήν αδρό εγχώριο προϊόν έχει τουλάχιστον διπλασιαστεί από 1990 έως το 2004. Αυτή η αύξηση σημειώθηκε σε όλους τους νομούς της υπό μελέτη περιοχής (στοιχεία από Εθνική Στατιστική Υπηρεσία), προηγούμενη της αύξησης στην επίπτωση της νόσου του Crohn, το "ξέσπασμα" της οποίας καταγράφηκε το 2000 μια δεκαετία κατά προσέγγιση μετά το παρόμοιο "ξέσπασμα" των κοινωνικο-οικονομικών δεικτών. Κατά συνέπεια, η μελέτη μας είναι η πρώτη που καταδεικνύει πως οι αλλαγές στην κοινωνικο-οικονομική κατάσταση μπορεί να συνδέονται κατά κάποιο τρόπο με την αύξηση στην επίπτωση της νόσου του Crohn και έτσι η ιδέα της λανθάνουσας περιόδου κατά τη διάρκεια της οποίας όλοι οι πιθανοί ενοχοποιητικοί παράγοντες οδηγούν στη νόσο του Crohn διαμέσου της βελτίωσης του κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου, είναι βάσιμη.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης είναι το γεγονός του ότι η αύξηση της επίπτωσης της νόσου του Crohn συνοδεύτηκε από μια στατιστικά σημαντική αύξηση της τάσης για αστικοποίηση. Το εύρημα αυτό ενισχύει τη συσχέτιση μεταξύ κοινωνικο-οικονομικών παραγόντων και νόσου του Crohn, αφού οι αστικοί

πληθυσμοί είναι πιο ευπαθείς στους πιθανούς περιβαλλοντικούς αιτιολογικούς παράγοντες σε συνάρτηση με την οικονομική ευμάρεια (Mahmud N et al 2001, Loftus EV Jr et al 2004).

Η απουσία της οποιασδήποτε σχέσης μεταξύ ΕΚ και αδρού εγχώριου προϊόντος, ίσως μας δίνει να καταλάβουμε ότι αν και η ΕΚ χαρακτηρίζεται από κοινού με τη ΝC ως ΙΦΠΕ, ίσως τελικά να είναι το αποτέλεσμα μιας διαφορετικής παθογενετικής διαδικασίας.

Κάτι αξιοσημείωτο στη μελέτη μας, είναι και η βαθμιαία στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των ασθενών με περιπρωκτική προσβολή στο πέρασμα του χρόνου. Είναι επόμενο αφού το εύρημα αυτό δεν έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες στο παρελθόν, να είναι σημαντικό και εύλογα να τίθεται το ερώτημα του κατά πόσο η περιπρωκτική νόσος μπορεί να συνδέεται με διαφορετικούς παράγοντες «πυροδότησης» της φλεγμονής. Όσο αφορά την προσβολή του κόλον, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει πως η αύξηση της επίπτωσης της ΝC που έχει καταγραφεί τα τελευταία χρόνια ίσως να οφείλεται κυρίως στην πρόοδο των μεθόδων ανίχνευσης και λιγότερο στην πραγματική αύξηση της επίπτωσης της νόσου

Θεωρώντας συνολικά τη μελέτη και τις μεθόδους που ακολουθήθηκαν για τη διεκπεραίωσή της, θα μπορούσαμε να πούμε πως ίσως να ήταν πληρέστερη με την προσθήκη κάποιων ασθενών με ΝC που δεν ανταποκρίθηκαν στην πρόσκληση μας, καθώς και ορισμένων άλλων με ήπια ΕΚ που δεν έχουν συμβουλευθεί κάποιον γαστρεντερολόγο αλλά ούτε και έχουν νοσηλευθεί σε κάποιο από τα νοσοκομεία της περιοχής. Πάντως η πολιτική όσο αφορά την παρακολούθηση, διάγνωση και την αντιμετώπιση της νόσου, ήταν κοινή από όλους τους εμπλεκόμενους φορείς κατά το χρονικό διάστημα εκπόνησης της μελέτης. Το γεγονός της αναφοράς και διεκπεραίωσης της μελέτης σε μια πληθυσμιακά μικρή και μέχρι πρόσφατα

γεωγραφικά απομονωμένη περιοχή, ουσιαστικά λειτούργησε ως συγκριτικό πλεονέκτημα οδηγώντας στην αναλυτική και εκτενή μελέτη του πληθυσμού της .

Συμπερασματικά, αυτό που δείξαμε στη μελέτη αυτή είναι μια σημαντική αύξηση στην επίπτωση της νόσου του Crohn σε μια κλειστή γεωγραφική περιοχή όπου πρώτα ήταν σπάνια. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δε συνδέεται με κάποιες αλλαγές στο γενετικό προφίλ της νόσου ή κάποιους άλλους δημογραφικούς παράγοντες. Το κυριότερο μέλημα στο μέλλον ίσως θα ήταν μια σχολαστικότερη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της νόσου με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η έρευνα των παθοφυσιολογικών μηχανισμών αλληλεπίδρασης γονιδίων-περιβάλλοντος θα συμβάλλει στην πληρέστερη κατανόησή της και πιθανά σε θεραπευτικές εφαρμογές, ενώ πιστεύω πως τα ουσιαστικότερα συμπεράσματα θα εξαχθούν από οικογενειακές μελέτες, εστιάζοντας στις διατροφικές συνήθειες και τη μικροβιακή χλωρίδα τη μελών των οικογενειών.

Περίληψη

Η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Πάθηση των Εντέρων (ΙΦΠΕ) αποτελεί μια κοινή αιτία νοσηρότητας του γαστρεντερικού συστήματος στον προηγμένο κόσμο . Διακρίνεται σε Ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ) και νόσο του Crohn (NC). Ο συνδυασμένος επιπολασμός αυτών των δύο παθήσεων προσεγγίζει τους 400 ασθενείς ανά 100.000 πληθυσμού σε ορισμένες περιοχές του κόσμου .Σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό ότι η ΙΦΠΕ είναι το αποτέλεσμα μιας μη οργανωμένης και συνεχούς ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος του βλεννογόνου που καθορίζεται από την φυσιολογική εντερική χλωρίδα. Αυτή η μη οργανωμένη απάντηση μπορεί να διευκολυνθεί (α) από εγγενείς βλάβες στο μηχανισμό φραγμού και άμυνας του εντερικού επιθηλίου και/ή (β) από διαταραχές του ανοσολογικού συστήματος .Η νόσος Crohn μπορεί να συμπεριλάβει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όμως πιο συχνά προσβάλλει την ειλεοτυφλική περιοχή. Η εντερική φλεγμονή είναι διατοιχωματική και κατά τόπους. Μπορεί να περιέχει κοκκιώματα ή να συνδυάζεται με εντερικά ή περιεδρικά συρίγγια. Σε αντίθεση, στην ελκώδη κολίτιδα η φλεγμονή είναι συνεχής και περιορίζεται στη βλεννογόνια στοιβάδα του ορθού ή του λοιπού παχέος εντέρου και δεν παρατηρούνται συρίγγια ή κοκκιώματα. Η ακριβής αιτιολογία της ΙΦΠΕ παραμένει άγνωστη. Πολλές κλινικές και επιδημιολογικές παρατηρήσεις υποστηρίζουν την τρέχουσα άποψη ότι η ΙΦΠΕ είναι μια οικογένεια ετερογενών παθήσεων που οφείλονται σε πολυπλοκότητα κληρονομηθέντων γενετικών παραγόντων Πιο συγκεκριμένα, ισχυρές γενετικές διασυνδέσεις έχουν υποστηριχθεί για την νόσο του Crohn μετά από ανάλυση μη τυχαίας σύνδεσης (linkage analysis) ενώ η συστηματική μελέτη των ανωτέρω γενετικών θέσεων, ιδίως του IBD1 (16p12-

q13), αναδεικνύει έναν αριθμό υποψηφίων γονιδίων το πιο σημαντικό από τα οποία που συνδέεται με τη νόσο είναι το γονίδιο NOD2/CARD15 .

Παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο, το σημερινό επίπεδο γνώσεων για την ΙΦΠΕ δεν επαρκεί για να επιτρέψει «μετάφραση» των δεδομένων από την βασική έρευνα στην κλινική πράξη . Λόγω της απουσίας παθογνωμικών δεικτών, η διάγνωση της ΙΦΠΕ βασίζεται μέχρι σήμερα στο συνδυασμό κλινικών, ακτινολογικών, ενδοσκοπικών και ιστολογικών κριτηρίων. Ωστόσο, ακόμη και με τη συστηματική εφαρμογή συστημάτων ταξινόμησης η διαφορική διάγνωση από την NC και την ΕΚ δεν είναι δυνατή στις περιπτώσεις της «αδιευκρίνιστης κολίτιδας». Επιπλέον, ακόμη και όταν η διαφορική διάγνωση είναι εφικτή, η ηλικία έναρξης, η έκταση της πάθησης, οι εξωεντερικές εκδηλώσεις, η φυσική πορεία της πάθησης και η απόκριση στη θεραπεία μπορεί να προκαθορίζει διακριτές κλινικές υποομάδες ασθενών. Αυτές οι φαινοτυπικές ποικιλομορφίες παραπέμπουν σε διακριτά υποκείμενα γενετικά περιβάλλοντα και/ή αιτιολογικούς παράγοντες της ΙΦΠΕ. Η έκταση της ετερογένειας, συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και κλινικού φαινοτύπου και ταυτοποίηση γενετικών δεικτών για την ΙΦΠΕ είναι σημεία που χρήζουν εντατικής έρευνας .

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε σε σειρά ασθενών με ΙΦΠΕ από την ΒΔ Ελλάδα με στόχο την κλινική και επιδημιολογική ταξινόμησή τους σε βασικούς υποτύπους νόσου καθώς και την ταυτοποίηση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης των ασθενών που συνδέονται με τους υποτύπους αυτούς. Άμεση προτεραιότητα η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και αναζήτηση των πιθανών παραγόντων που διαμορφώνουν το προφίλ της νόσου στην υπό μελέτη περιοχή. Απώτερος στόχος, η συγκεντρωθείσα πληροφορία θα αξιοποιηθεί σε πειράματα σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα της νόσου, ώστε να αναπτυχθούν συστήματα ευχερέστερης ανάλυσης των

πιθανών γονιδίων-στόχων και διερεύνησης νέων δεικτών πρόγνωσης και στρατηγικών θεραπευτικής αντιμετώπισης, στο μοριακό επίπεδο.

Abstract

The chronic inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease and Ulcerative colitis are common causes of gastrointestinal morbidity in the developed countries. Recent population based studies suggest that combined prevalence of these diseases approaches 400 per 100.000. CD (Crohn's disease) is characterized by transmural patchy granulomas inflammation of any part of the gastrointestinal tract, although it is most common in the ileocecal area. UC (Ulcerative colitis), in contrast to CD, is limited to the colon, involves mainly the superficial layers of the bowel (mucosa) is continuous and not associated with granulomas.

Despite extensive research over several decades, the aetiologic agents and the events initiating and sustaining chronic inflammatory responses in the bowel, remain largely unknown. The current most comprehensive hypothesis for IBD is that it presents a heterogeneous group of diseases that have a common final manifestation, which is mucosal inflammation, and that several genetic and environmental factors are implicated in the pathogenesis of the disease. The important role of genetic factors in the cause and the heterogeneity of IBD are strongly supported genetic epidemiologic studies, including consistent ethnic differences, familial aggregation, and increased concordance rate in monozygotic twins.

In particular, the two regions of linkage initially described in 1996 on chromosomes 16 and 12 have been subjected to rigorous reanalysis throughout the world. Genomewide searches have identified susceptibility loci on chromosomes 1, 3, 5, 7, 6, 12, 14, 16 and 19. Three independent groups reported associations between the NOD2/CARD15 gene located on chromosome 16 in IBD 1 locus and susceptibility to Crohn's disease. Two missense and one frameshift which leads to a truncation of the

protein in the leucine rich repeat region were significantly associated with Crohn's disease. Bacterial LPS binds to a leucine-rich repeat region in the NOD2/CARD15 protein leading to activation of NF- κ B but this induction is deficient in mutant NOD2, suggesting a link between an innate immune response to bacterial components and development of disease. A number of other regions have been implicated in many genome searches which have now been reported throughout the world. Thus, despite this considerable progress, current data are not sufficient enough to allow gene testing for inflammatory bowel disease and translation from basic research to clinical application.

In the absence of pathognomic markers for CD and UC, the diagnosis of IBD depends on a combination of clinical, radiographic, endoscopic and histological criteria. However, notwithstanding the application of several classification systems differentiation between CD and UC in approximately 10% of cases of colitis can not be made. Furthermore, even when a differential diagnosis is possible, the age at onset, the extent of the disease, extraintestinal manifestations, the natural course of the disease and the response to treatments may be defined several clinical subgroups of patients. These phenotypic variations suggest several underlying genetic backgrounds and/or several aetiologic factors for IBD.

The major goals of this PhD are to foster the interaction of fundamental and clinical research around the diagnosis, genetics and aetiology of IBD.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. Crohn's The molecular classification of the clinical manifestations of disease. *Gastroenterology*. 2002 Apr; 122(4):1161-2.

Akira S, Takeda K.(2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul; 4(7):499-511.

Alexopoulou L, Kontoyiannis D. (2005).Contribution of microbial-associated molecules in innate mucosal responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jun; 62(12):1349-58. Review.

Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 1):G467-75. Review.

Apostolaki M, Manoloukos M, Roulis M, Wurbel MA, Muller W, Papadakis KA, Kontoyiannis DL, Malissen B, Kollias G: Role of beta7 integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; 134: 2025-2035.

Armitage EL, Aldhous MC, Anderson N, et al. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence. *Gastroenterology*. 2004 Oct; 127(4):1051-7.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*. 2000 Aug;1(2):113-8.

Bamias G, Martin C, Marini M, Hoang S, Mishina M, Ross WG, Sachedina MA, Friel CM, Mize J, Bickston SJ, Pizarro TT, Wei P, Cominelli F: Expression,

localization and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 1-11-2003; 171: 4868-4874

Bennett RA, Rubin PH, Present DH. Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1991 Jun; 100(6):1638-43

Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 1998 Nov-Dec; 16(6):351-5.

Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990– 1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:31–8.

Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, et al. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol* 2001; 154:328–335.

Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*. 1999 Dec; 11(6):648-56. Review. Erratum in: *Curr Opin Immunol* 2000 Apr;12(2):226.

Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003 Jan; 124(1):140-6.

Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology*. 1998 Nov; 115(5):1056-61.

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, et al. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51:21–25.

Budarf M.L., C. Labbe, G. David, and J.D. Rioux. 2009. GWA studies: rewriting the story of IBD. *Trends Genet* 25:137-146.

Caroni P. (2001) New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI (4, 5) P (2) rafts. *Embo J*, **20**, 4332-4336.

Chamailard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, Bui TH, Giovannini M, Zaehring U, Penard-Lacronique V, Sansonetti PJ, Hugot JP, Thomas G. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18; 100(6):3455-60. Epub 2003 Mar 7.

Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*. 2003 Sep; 5(9):581-92.

Cho J.H. 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews* 8:458-466.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23; 95(13):7502-7.

Cho J.H., Nicolae D.L., Ramos R., Fields C.T., Rabenau K., Corradino S., Brant S.R., Espinosa R., LeBeau M., Hanauer S.B., Bodzin J. and Bonen D.K. (2000) Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet*, **9**, 1425-1432.

Colombel JF, Tamboli C, Hugot JP. Clinical genetics of inflammatory bowel diseases : genetic epidemiology, genotype / phenotype correlations and pharmacogenetics. In : Sartor RB, Sasndborn WJ, eds. Inflammatory bowel disease. Philadelphia: Saunders, 2003.

Clayton E., Bardi G., Bell S.E., Chantry D., Downes C.P., Gray A., Humphries L.A., Rawlings D., Reynolds H., Vigorito E. and Turner M. (2002) A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med*, **196**, 753-763.

Contreras R.G., Shoshani L., Flores-Maldonado C., Lazaro A., Monroy A.O., Roldan M.L., Fiorentino R. and Cerejido M. (2002) E-Cadherin and tight junctions between epithelial cells of different animal species. *Pflugers Arch*, **444**, 467-475.

Crohn B, Ginzburg L& Oppenheimer G (1932) "Regional ileitis: a pathologic and clinical entity." *JAMA* 99: 1323-1329

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology*. 1998 Nov; 115(5):1066-71.

D'Inca R., DiLeo V., Corrao G., Martines D., D'Odorico A., Mestriner C., Venturi C. Longo G. Sturniolo G.C. (1999) Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 94, 2956-2960

Dalzeil TK, (1913). "Chronic interstitial enteritis." *BMJ* 2: 1068-1070.

DeMeo M.T., Mutlu E.A., Keshavarzian A. and Tobin M.C. (2002) Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol*, 34 385-396.

Denning TL, Campbell NA, Song F, Garofalo RP, Klimpel GR, Reyes VE, Ernst PB. Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol*. 2000 Feb;12(2):133-9.

Duchmann R: The role of probiotics and antibiotics in regulating mucosal inflammation. *Adv Exp Med Biol* 2006; 579: 219-226,

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet*. 1998 Jul; 63(1):95-100.

Duffey ME, Hainau B, Ho S, Bentzel CJ. Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. *Nature*. 1981 Dec 3;294(5840):451-3.

Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Dec; 99(12):2393-404.

Ekbom A, Helmick C, Zack M& Adami HO (1991). "The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden." *Gastroenterology* 100(2): 350-8

Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol*. 1980 May; 9(2):271-7

Fogh, J., Fogh, J.M. and Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, **59**, 221-226.

Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of

Crohn's disease: Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6:815.

Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006; 367:1271-84.

Gazouli M, Zacharatos P, Mantzaris GJ, Barbatis C, Ikonomopoulos I, Archimandritis AJ, Lukas JC, Papalambros E, Gorgoulis V. Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16:1177-82.

Gent AE, Hellier MD, Grace RH, et al. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-767.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14; 278(11):8869-72. Epub 2003 Jan 13.

Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D. (2003).Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24; 278(43):41702-8.

Gower-Rousseau C, Grandbastien B, Cortot A, Colombel JF. Epidemiology of inflammatory bowel disease: is there a "Belgian-French exception?". *Acta Gastroenterol Belg.* 1996 Jan-Mar; 59(1):2.

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1; 277(44):41701-5. Epub 2002 Aug 22.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001 Jun 16; 357(9272):1902-4.

Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. (2002).Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol*. 2002 Oct 15; 169(8):4088-93

Hirschhorn J.N., and M.J. Daly. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6:95-108.

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 Apr; 124(4):993-1000.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996 Feb 29; 379(6568):821-3.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31; 411(6837):599-603.

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, et al. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003; 362:2012–2015.

Hurst, AF (1935). "Ulcerative colitis." *Guy's Hospital Reports* 85: 317-355

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Feb; 5(1):76-80.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21; 278(8):5509-12. Epub 2003 Jan 4.

Jones H, Grogono J& Hoare A (1987). "Acute colitis in a district general hospital." *BMJ* 294: 683-684

Kanai T, Nemoto Y, Kamada N, Totsuka T, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T: Homeostatic (IL-7) and effector (IL-17) cytokines as distinct but complementary target for an optimal therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 14-5-2009.

Kanneganti T.D., Lamkanfi M, and Nunez G. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27:549-559.

Kirsners's Inflammatory Bowel Diseases. R B Sartor and WJ Sandborn. Saunders 2004.

Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* 1999 Mar;10(3):387-9:

Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, Armaka M, Apostolaki M, Pizarro T, Kotlyarov A, Forster I, Flavell R, Gaestel M, Tschlis P, Cominelli F, Kollias G. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled

tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med*. 2002 Dec 16; 196(12):1563-74.

Korzenik R, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ: Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 26-5-2005; 352: 21: 2193-2201.

Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology*. 1992 Jun; 102(6):1940-8.

Kyle J. Crohn's disease in the north eastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. *Gastroenterology* 1992; 103:392-9.

Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. : *Gastroenterology*. 2001 Mar; 120(4):816-9.

Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003 Jul; 125(1):47-57.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994 Sep 30; 265(5181):2037-48.

Langholz E, Munkholm P, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987.. *Scand J Gastroenterol*. 1991 Dec; 26(12):1247-56.

Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Persson PG, Lofberg R. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut*. 1997; 41:480-6.

Lee FI, Nguyen-van-Tam JS. Prospective study of incidence of Crohn's disease in northwest England: no increase since the late 1970's. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6:27-31.

Lee JC, Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):587-96.

Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24(suppl 170):2-6.

Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*. 1999 Jun; 116(6):1503-4.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004 May; 126(6):1504-17.

Μουτσόπουλος Χ., «Κλινική Ανοσοβιολογία»

Macartney KK, Baumgart DC, Carding SR, Brubaker JO, Offit PA. Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J Virol*. 2000 Jun;74(12):5597-603.

Mahmud N, Weir DG. The urban diet and Crohn's disease: is there a relationship? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:93-95.

Maloy K.J. and Powrie F. (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*, **2**, 816-822.

Marano C.W., Laughlin K.V., Russo L.M., Peralta Soler, A. and Mullin, J.M. (1993) Long-term effects of tumor necrosis factor on LLC-PK1 transepithelial resistance. *J Cell Physiol*, **157**, 519-527.

Marano C.W., Lewis S.A., Garulacan L.A., Soler A.P. and Mullin, J.M. (1998) Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of, a human CACO-2 BBE intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol*, 161, 263-274.

Mate-Jimenez J, Munoz S, Vicent D, Pajares JM. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *J Clin Gastroenterol*. 1994; 18:27-31.

Maxton DG, Cynk EU, Thompson RP Small intestinal response to 'elemental' and 'complete' liquid feeds in the rat: effect of dietary bulk. *Gut*. 1987 Jun;28(6):688-93.

McCarthy M.I., Abecasis G.R., Cardon L.R., Goldstein D.B., Little J., Ioannidis J.P., and J.N. Hirschhorn. 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9:356-369.

McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G: Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 100-113.

McRoberts JA, Aranda R, Riley N, Kang H. Insulin regulates the paracellular permeability of cultured intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest*. 1990 Apr;85(4):1127-34.

Meddings, J. (2000) Barrier dysfunction and Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 915, 333-338

Mirza MM, Lee J, Teare D, Hugot JP, Laurent-Puig P, Colombel JF, Hodgson SV, Thomas G, Easton DF, Lennard-Jones JE, Mathew CG. Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis. *J Med Genet*. 1998 Mar; 35(3):218-21.

Molinie F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL, Cortot A. Opposite evolution in incidence of

Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut*. 2004; 53:843-8.

Monsen U, Brostrom O, Nordenvall B, Sorstad J, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative G. Prevalence of colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1987 Mar; 22(2):214-8.

Monsen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1991 Mar; 26(3):302-6.

Monteleone G, Holloway J, Salvati VM, Pender SL, Fairclough PD, Croft N, MacDonald TT. Activated STAT4 and a functional role for IL-12 in human Peyer's patches. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):300-7.

Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Infant mortality and the incidence of inflammatory bowel disease. *Lancet* 1997; 349:472-473.

Moum B, Vatn MH, Ekbohm A, Aadland E, Fausa O, Lygren I, Sauar J, Schulz T, Stray N. Incidence of Crohn's disease in four counties in southeastern Norway, 1990–93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:355–61.

Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol*. 1992 Jul; 27(7):609-14.

Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Buschenfelde KH. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Nov 17; 859:149-59.

Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.* 2001 Jan;22(1):21-6. Review

Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi A., Mizoguchi E., Mudter J., Galle P.R., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, B.M., Szabo, S.J., Glimcher, L.H. and Blumberg, R.S. (2002) The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*, **195**, 1129-1143.

Ogunbi SO, Ransom JA, Sullivan K, Schoen BT, Gold BD. Georgia Inflammatory bowel disease in African-American children living in. *J Pediatr.* 1998 Jul; 133(1):103-7.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16; 276(7):4812-8. Epub 2000 Nov 21.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31; 411(6837):537, 539.

Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nunez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* 2003 Nov;52(11):1591-7.

Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role

in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 1996 Oct; 5(10):1679-83.

Okkenhaug K., Bilancio A., Farjot G., Priddle H., Sancho S., Peskett E., Pearce W., Meek S.E., Salpekar A., Waterfield M.D., Smith A.J. and Vanhaesebroeck B. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science*, **297**, 1031-1034.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1991 Jan 10; 324(2):84-8.

Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gómez-García M, López-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, Alizadeh BZ, Martín J. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes Immun.* 2009 Jun; 10(4):356-64.

Panayotou G., Bax B., Gout, I., Federwisch M., Wroblowski B., Dhand R., Fry M.J., Blundell T.L., Wollmer A. and Waterfield M.D. (1992) Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes. *Embo J*, **11**, 4261-4272.

Papadakis KA, Targan SR: Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000; 119: 1148-1157.

Papadakis KA, Prehn J, Zhu D, Landers C, Gaiennie J, Fleshner PR, Targan SR: Expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 on lymphocytes from normal and inflammatory bowel disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 778-788.

Papadakis KA: Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4: 83-89.

Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*. P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk 1996 Sep; 111(3):597-603

Peeters M, Cortot A, Vermeire S, Colombel JF. Familial and sporadic inflammatory bowel disease: different entities? *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Nov; 6(4):314-20.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (1) *N Engl J Med*. 1991 Sep 26; 325(13):928-37.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (2) *N Engl J Med*. 1991 Oct 3; 325(14):1008-16.

Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 8-8-2002; 347:417-429

Podolsky DK: Selective adhesion molecule therapy and inflammatory bowel disease-a tale of Janus? *N Engl J Med* 3-11-2005; 353: 195-196.

Polito JM 2nd, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology*. 1996 Sep; 111(3):580-6.

Rioux JD, Daly MJ, Green T, Stone V, Lander ES, Hudson TJ, Steinhart AH, Bull S, Cohen Z, Greenberg G, Griffiths A, McLeod R, Silverberg M, Williams CN, Siminovitch. Absence of linkage between inflammatory bowel disease and selected loci on chromosomes 3, 7, 12, and 16. *Gastroenterology*. 1998 Nov; 115(5):1062-5.

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2000 Jun; 66(6):1863-70.

Roberts RL, Geary RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007 Dec; 102(12):2754-61.

Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay BB. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun*. 1996 Mar;64(3):966-73.

Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 Apr; 124(4):1001-9.

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JJ. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*. 1989 Apr; 96(4):1016-20.

Roussomoustakaki M, Koutroubakis I, Vardas EM, Dimoulios P, Kouroumalis EA, Baritaki S, Koutsoudakis G, Krambovitis E. NOD2 insertion mutation in a Cretan Crohn's disease population. *Gastroenterology*. 2003; 124:272-3.

Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, van Deursen CT, Muris JW, van Wijlick EH, Stockbrugger RW. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1997; 223:88-91.

Saruta M, Yu QT, Avanesyan A, Fleshner PR, Targan SR, Papadakis KA: Phenotype and effector function of CC Chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol* 1-3-2007; 178: 3293-3300.

Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut*. 1994 May; 35(5):696-700

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nature Genet*. 1996 Oct; 14(2):199-202.

Sheiki S, Uno J, Matsuoka K, Plevy S: Abnormal mucosal immune response to altered bacterial flora following restorative proctocolectomy in patients with ulcerative colitis: serologic measures, immunogenetics and clinical correlations. *Clin Immunol* 2008; 127:270-279.

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R et al (1996). "Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between North and South? Results of the European collaborative study of inflammatory bowel disease (EC-IBD)." *Gut* 39 (690-697)

Stenson WF, Easom RA, Riehl TE, Turk J. Regulation of paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers by protein kinase C. *Am J Physiol*. 1993 Nov;265(5 Pt 1):G955-62.

Subhani J MS, Ounder RE, Wakefield AJ. Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42 (Suppl 1): A40

Suenaert P., Bulteel V., Lemmens L., Noman M., Geypens B., Van Assche G., Geboes K., Ceuppens J.L. and Rutgeerts P. (2002) Anti-tumor necrosis factor

treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, **97**, 2000-2004.

Takata T, Nikai H, Ijuhin N, Ito H. Penetration and uptake of colloidal gold-labeled concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. *J Periodontol*. 1988 Dec;59(12):823-9.

Takenawa T. and Itoh T. (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1533, 190-206.

Teahon K., Smethurst P., Levi A.J., Menzies, I.S. and Bjarnason, I..(1992) Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut*, 33, 320-323.

Thomas GA, Millar-Jones D, Rhodes J, Roberts GM, Williams GT, Mayberry JF. Incidence of Crohn's disease in Cardiff over 60 years: 1986-1990 an update. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995 May; 7(5) : 401-5.

Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ*. 1996 Jan 13; 312(7023):95-6.

Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5:79-84.

Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S Epistasis Between Toll-Like Receptor-9 Polymorphisms and Variants in NOD2 and IL23R Modulates Susceptibility to Crohn's Disease. : *Am J Gastroenterol*. 2009 May

Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi AG, d'Albasio G, Galli M, Vannozi G, Milla M, Tarantino O, Renai F, Messori A, Amorosi A, Pacini F, Morettini A . A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol*. 1996; 31:892-9.

Truelove SC, Witts LJ (1955). "Final report on a therapeutic trial". *Br. Med. J.* 2: 1041-1048

Truelove SC& Jewell DP (1974). "Intensive intravenous regimen for severe attacks of ulcerative colitis." *Lancet* (i): 1067-1070

Tsianos EV, Masalas CN, Merkouropoulos M, Dalekos GN, Logan RF. Incidence of inflammatory bowel disease in north west Greece: rarity of Crohn's disease in an area where ulcerative colitis is common. *Gut*. 1994; 35:369-72.

Tsianos EV, Katsanos KH, Christodoulou D, Dimoliatis I, Kogevinas A, Logan RF. Continuing low incidence of Crohn's disease in Northwest Greece. *Dig Liv Dis* 2003; 35:99-103.

Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988 Jul; 29(7):990-6.

Vermeire S, Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun*. 2005; 6:637-45.

Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay I, Gilon C, Levitzki A, Geiger B. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1733-42.

Wilks, S (1859). Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. *Med Times and Gazette*: 264

Wilks, S& Moxon, W (1875). Lectures on Pathological Anatomy. Philadelphia, Lindsay and Blakiston: 408-409

Xavier RJ, Podolsky DK: Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 26-7-2007; 448:427-434.

Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK: Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14-11-2007; 13:5577-5580.

Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993; 34:517-524.

Ziegler-Heitbrock HW, (1995), Molecular mechanisms in tolerance to lipopolysaccharide, *J. Inflammation* 45, 13-26