



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΤΙΣ ΑΛΛΕΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΠΑΙΔΙΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΚΩΣΤΑΡΑ

**ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ,
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΤΙΣ ΑΛΛΕΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΠΑΙΔΙΩΝ**

ΜΑΡΙΑ ΚΩΣΤΑΡΑ

**ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ,
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κωσταρά Μαρίας: 30-03-2017

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 798α/06-06-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Τσαμπούρη Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδοαλλεργιολογία

Μέλη:

Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Βλάχος Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Παιδοκαρδιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-07-2017

«Διερεύνηση της επίδρασης των γενετικών παραγόντων στις αλλεργίες των παιδιών»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1001α/29-03-2022

1. Τσαμπούρη Σοφία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδοαλλεργιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Βλάχος Αντώνιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδοκαρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Σιώμου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Ράλλης Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Νεογνολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σγουρού Αργυρώ, Επίκουρη Καθηγήτρια της Σχολής Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου (ΕΑΠ)
7. Κασίμος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής με έμφαση στη Νεογνολογία του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 09-05-2022

Ιωάννινα 27-05-2022

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

«Μόνο τα παιδιά ξέρουν αυτό που ψάχνουν»

από τον Μικρό Πρίγκιπα
Αντουάν ντε Σαιντ-Εξυπερύ, 1943

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, το Εργαστήριο Υγείας του Παιδιού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Εργαστήριο Βιολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής, κ. Σοφία Τσαμπούρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής/Παιδοαλλεργιολογίας για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα αυτό. Η καθοδήγηση, η υποστήριξη και η ακούραστη παρουσία της όλα αυτά τα χρόνια, ήταν ανεκτίμητες. Κατά την άφογη συνεργασία μας αποτέλεσε για μένα πρότυπο εργατικότητας, επιμονής και αισιοδοξίας. Η καθοριστική της συμβολή έκανε την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής εφικτή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και κ. Αντώνιο Βλάχο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παιδοκαρδιολογίας για τις καίριες παρεμβάσεις και τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Καταρχάς τον κ. Δημήτριο Ράλλη, Επίκουρο Καθηγητή Νεογνολογίας, για την ουσιαστική βοήθεια, τη συνεχή ενθάρρυνση και καθοδήγηση, την κ. Αργυρώ Σγουρού, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας, για την επιστημονική της συμβολή και την άριστη συνεργασία, την κ. Αικατερίνη Σιώμου, Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία, για τις πολύτιμες συμβουλές και τον κ. Δημήτριο Κασίμο, Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής, για τις σημαντικές παρατηρήσεις.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πολύτιμη ήταν η συνεισφορά του προσωπικού των εργαστηρίων. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Βασίλειο Χολέβα, μέλος ΕΔΙΠ, την κ. Αφροδίτη Παπαγιάννη, μέλος ΕΤΕΠ, από το Εργαστήριο Υγείας του Παιδιού, την Αλεξάνδρα Τσούμπου, Βιολόγο και τη Βασιλική Χονδρού, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο Εργαστήριο Βιολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου για την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χαράλαμπο Ματσούκα, μέλος ΕΤΕΠ, Γραμματέα του Τομέα Υγείας του Παιδιού, για τη βοήθεια που προσέφερε όποτε του ζητήθηκε και τη γραμματειακή υποστήριξη.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και όλους/ες όσους/ες με βοήθησαν, ο καθένας/η καθεμία με τον δικό του/ το δικό της τρόπο για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες με αλφαβητική σειρά.....	17
A.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1.Βιταμίνη D.....	21
1.1 Φωτοβιολογία της Βιταμίνης D.....	21
1.2 Μεταβολισμός της Βιταμίνης D.....	22
1.3 Απορρόφηση της Βιταμίνης D.....	23
1.4 Αποθήκευση της βιταμίνης D.....	24
1.5 Έκκριση της Βιταμίνης D	25
1.6 Υπερβολική Πρόσληψη της Βιταμίνης D	25
1.7 Λειτουργίες της βιταμίνης D	26
1.7.1 Ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου	26
1.7.2 Βιταμίνη D2 και D3.....	27
1.7.3 Σκελετικές διαταραχές	28
1.7.4 Άλλες δράσεις της βιταμίνης D	29
1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση της Βιταμίνης D στο δέρμα	30
1.9 Πηγες της Βιταμίνης D	32
2. Βιταμίνη D κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής.....	35
2.1 Βρεφική ηλικία	35
2.2 Παιδική ηλικία.....	35
2.3 Εγκυμοσύνη και Γαλουχία	36
2.4 Ενήλικες.....	36
2.5 Vitamin D Binding protein (VDBP).....	37
2.5.1 Λειτουργίες της VDBP.....	38
2.6 Vitamin D Receptor-VDR	39
2.7 Βιταμίνη D, ανοσοποιητικό σύστημα και τροφική αλλεργία	42
3. Τροφική αλλεργία.....	47
3.1 Ορισμός	47
3.1.1 Είδη Τροφικής αλλεργίας.....	47
3.1.1.1 IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία	47
3.1.1.2 Μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία	47

3.1.1.3 Μικτή IgE- και μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία.....	48
3.1.1.4 Δυσανεξία στην τροφή.....	48
3.2 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου	50
3.3 Γενετική της τροφικής αλλεργίας.....	52
3.4 Παθοφυσιολογία της IgE τροφικής αλλεργίας.....	53
3.5 Απόκτηση Ανοχής	55
3.6 Χαρακτηριστικά των τροφικών αλλεργιογόνων	56
3.6.1 Τροφικά αλλεργιογόνα.....	57
3.6.1.1 Αγελαδινό γάλα και αυγό	57
3.6.1.2 Κρέας	58
3.6.1.3 Ψάρι.....	59
3.6.1.4 Σιτάρι.....	59
3.6.1.5 Ξηροί καρποί	60
3.7 Κλινικές Εκδηλώσεις της Τροφικής Αλλεργίας.....	61
3.8 Διάγνωση	62
3.8.1 Ιστορικό και κλινική εξέταση.....	62
3.8.2 Δερματικά Τεστ δια νυγμού (SPTs –Skin Prick Tests).....	62
3.8.3 Ειδικά αντισώματα IgE –specific IgEs.....	63
3.8.4 Χρήση ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων (μοριακή διάγνωση)	64
3.8.5 Δοκιμασία ενεργοποίησης βασεόφιλων	65
3.8.6 Δοκιμασία ενεργοποίησης μαστοκυττάρων.....	65
3.8.7 Δίαιτα Αποκλεισμού.....	66
3.8.8 Τροφική Πρόκληση.....	66
3.8.9 Άλλες δοκιμασίες	67
3.9 Αντιμετώπιση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας.....	67
3.9.1 Αποφυγή των υπεύθυνων τροφών.....	67
3.9.2 Η από του στόματος ανοσοθεραπεία.....	68
3.9.3 Ενδοδερμική Ανοσοθεραπεία.....	69
3.9.4 Υπογλώσσια ανοσοθεραπεία.....	69
4. Φυσική Πορεία.....	71
4.1 Πρόληψη	71
4.2 Επιγενετική	72
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	75
5. Σκοπός της μελέτης	77
5.1 Υλικά και Μέθοδοι	77
5.1.1 Πληθυσμός της Μελέτης.....	77

5.1.2 Εργαστηριακές Εξετάσεις	78
5.1.3 Περιγραφή των μεθόδων	78
5.1.3.1 Μέτρηση της 25(OH)D	78
5.1.3.2 Μέτρηση της VDBP	79
5.1.3.3 Δερματικά τεστ δια νυγμού	79
5.1.3.4 Προσδιορισμός ειδικών IgE αντισωμάτων στον ορό των ασθενών	80
5.1.3.5 Απομόνωση ολικού DNA	81
5.1.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	82
5.1.3.7 Πέψη των προϊόντων της PCR	85
5.2 Επιγενετική-Μέθοδοι	87
5.2.1 Επιλογή των μελετούμενων CpGs/SNPs	87
5.2.2 Απομόνωση του DNA και ανεύρεση των SNP με τη μέθοδο του pyrosequencing	90
5.2.3 Μετατροπή διθειώδους νατρίου και ανάλυση με τη μέθοδο του pyrosequencing	92
5.3 Στατιστική ανάλυση	94
6. Αποτελέσματα	97
6.1 Μέρος Α	97
6.1.1 Σύγκριση ασθενών με τροφική αλλεργία έναντι μαρτύρων	97
6.1.2 Σύγκριση παιδιών με ανεπάρκεια Βιταμίνης D έναντι παιδιών με επάρκεια Βιταμίνης D	105
6.1.3 Σύγκριση παιδιών με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας	111
6.1.4 Σύγκριση αρρένων έναντι θηλέων παιδιών	118
6.2 Μέρος Β	125
6.2.1 Σύγκριση ασθενών με τροφική αλλεργία έναντι μαρτύρων	125
6.2.2 Σύγκριση παιδιών με ανεπάρκεια Βιταμίνης D έναντι παιδιών με επάρκεια Βιταμίνης D	127
6.2.3 Σύγκριση παιδιών με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας	129
6.2.4 Σύγκριση αρρένων έναντι θηλέων παιδιών	131
6.3 Μέρος Γ Μελέτη της ανισορροπίας σύνδεσης-ανασυνδυασμού	135
6.4 Μέρος Δ	137
6.4.1 Η υπερμεθυλίωση του FOXP3 και η επέκταση της μεθυλίωσης του HLA-G μεταξύ των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου υποδεικνύει την πιθανή απόκτηση ανοχής που προωθείται από τα Treg HLA-G+/FOXP3-	137
6.4.1.1 Το προφίλ της μεθυλίωσης της περιοχής TSDR του γονιδίου FOXP3	137
6.4.1.2 Το προφίλ της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου HLA-G	139

6.4.2 Η ετερογένεια στο προφίλ της μεθυλίωσης κατά μήκος των γενετικών τόπων υποδεικνύει έμφυτες διαφορές τόσο στο γενετικό όσο και στο επιγενετικό υπόβαθρο.....	139
6.4.2.1 Επιγενετικές τροποποιήσεις που αποδίδονται σε γενετικούς πολυμορφισμούς και στο κάπνισμα των γονέων.....	139
6.4.2.2 Το προφίλ της μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 του γονιδίου HLA-DRB1 και η συνύπαρξη γενετικών παραλλαγών αναδεικνύονται ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας.....	142
6.4.2.3 Οι αλλαγές στο προφίλ της μεθυλίωσης πιθανώς να απορρυθμίζουν την ικανότητα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων.....	143
7. Συζήτηση.....	145
Βιταμίνη D και τροφική αλλεργία.....	145
Τροφική αλλεργία και παράγοντες που την επηρεάζουν.....	147
Επιγενετική.....	149
Συμπεράσματα.....	153
Περίληψη.....	155
Summary.....	157
Βιβλιογραφικές αναφορές.....	159

Συντομογραφίες με αλφαβητική σειρά

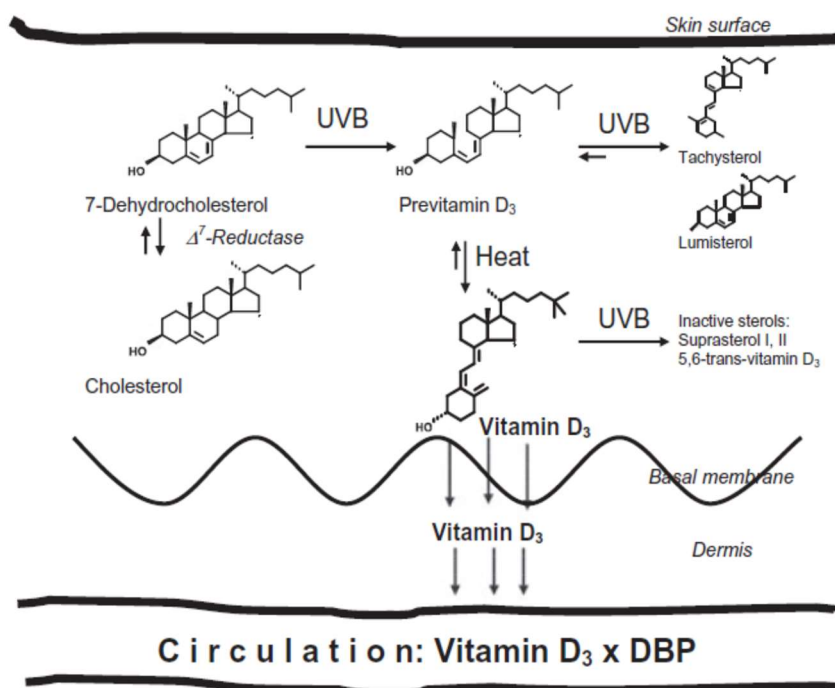
- 25(OH)D: 25-OH-Βιταμίνη D
- DBPCFC: Double Blind Placebo Controlled Food Challenge
- DMRs: Differentially methylated regions
- EAACI: European Academy of Allergy and Clinical Immunology
- FGF23: Fibroblast Growth Factor 23
- FOXP3: Forkhead Box P3
- FPIES: Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome
- FPIP: Food protein-induced proctocolitis
- GWAS: Genome Wide Association Study
- HLA: Human Leucocyte Antigen
- LD: Linkage Disequilibrium
- MHC: Major histocompatibility complex
- PAF: Platelet Activated Factor
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
- SPINK5: Serine protease inhibitor Kazal-type 5
- SNP: Single Nucleotide Polymorphisms
- SPT: Skin Prick Test
- STAT6: Signal Transducer And Activator Of Transcription
- Tregs: T regulatory cells
- TSDR: Treg, Demethylated Region
- VEGF: Vascular endothelial growth factor
- VDBP: Vitamin D binding Protein

A.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Βιταμίνη D

1.1 Φωτοβιολογία της Βιταμίνης D

Η βιταμίνη D η οποία ταυτοποιήθηκε ως βιταμίνη στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, θεωρείται σήμερα μία προ-ορμόνη. Είναι γνωστή επίσης και ως καλσιφερόλη και αποτελείται από μία ομάδα λιποδιαλυτών στερολών. Οι δύο κύριες μορφές της είναι η βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη). Η βιταμίνη D χαρακτηρίζεται επίσης και ως η βιταμίνη του ήλιου, “sunshine Vitamin” καθώς όταν το ανθρώπινο δέρμα εκτίθεται στο ηλιακό φως, η υπεριώδης ακτινοβολία με μήκος κύματος από 290-315nm, προκαλεί τη φωτόλυση της 7-δευδροχοληστερόλης (η οποία αποτελεί την προβιταμίνη D3, το πρόδρομο μόριο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της χοληστερόλης) στην πρεβιταμίνη D3 (1, 2) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1:Φωτοβιολογία της βιταμίνης D3 στο ανθρώπινο δέρμα,
Πηγή:Lehman et al. Vitamin D metabolism 2010

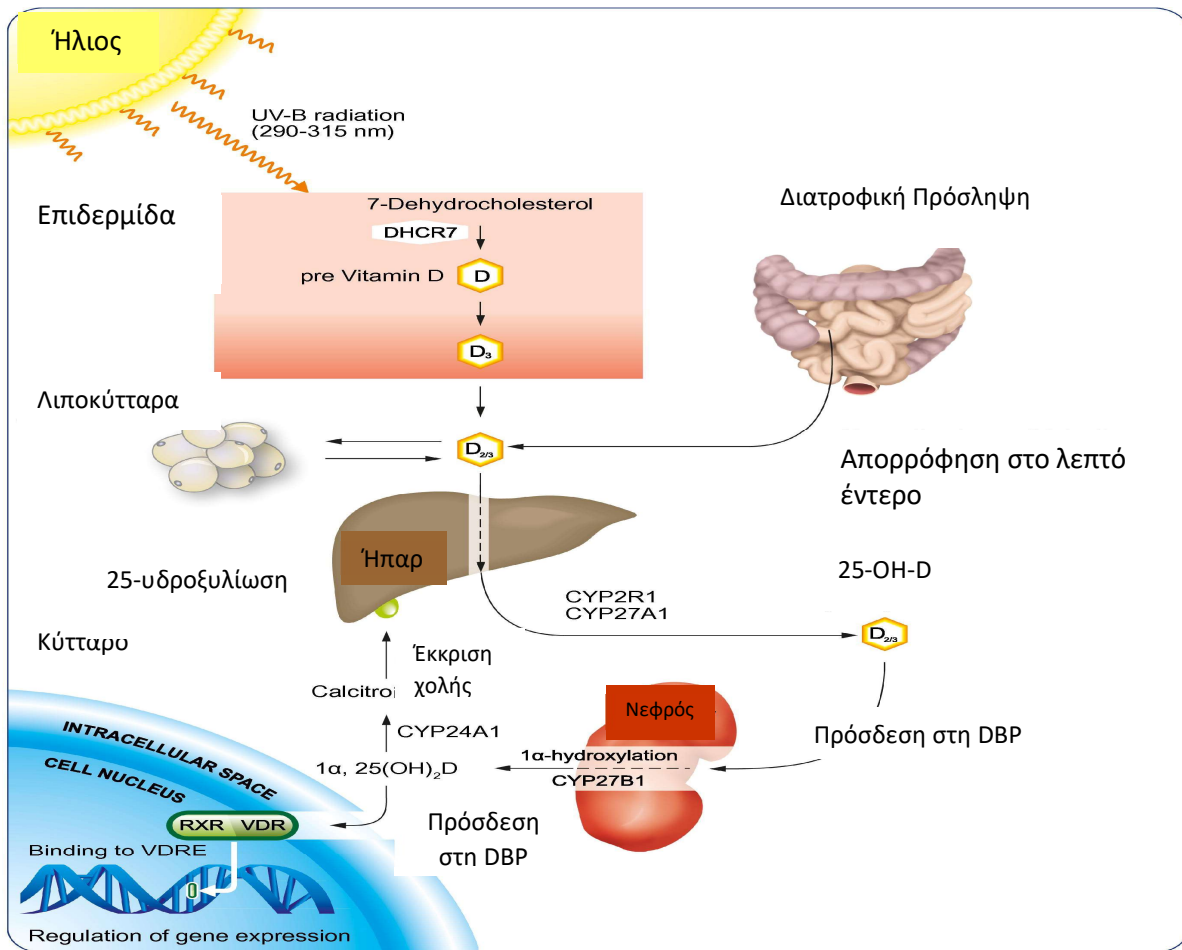
Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων του δέρματος. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μετατροπή του θερμοδυναμικά ασταθούς cis ισομερούς της προβιταμίνης D3, μέσω της αναδιάταξης των διπλών δεσμών σε βιταμίνη D3 (3). Περίπου 50% της πρεβιταμίνης D3 μετατρέπεται σε βιταμίνη D3 σε περίπου 2 ώρες. Καθώς η βιταμίνη D3 σχηματίζεται στη μεμβράνη, η ευέλικτη δομή της εξέρχεται από την πλασματική μεμβράνη στον εξωκυττάριο χώρο. Εκεί δεσμεύεται από την Vitamin D binding protein (VDBP) στην κυκλοφορία και εισέρχεται στα τριχοειδή του δέρματος.

1.2 Μεταβολισμός της Βιταμίνης D

Οι δύο μορφές της Βιταμίνης D (η βιταμίνη D₃ και η βιταμίνη D₂), είναι βιολογικά ανενεργές. Καθώς η Βιταμίνη D εισέρχεται στην κυκλοφορία συνδεδεμένη με τη VDBP, υποβάλλεται σε μια σειρά μεταβολικών αντιδράσεων αρχικά στο ήπαρ και στη συνέχεια στους νεφρούς προκειμένου να σχηματιστεί ο ενεργός μεταβολίτης της η 1,25-OH βιταμίνη D (4, 5).

Στο ήπαρ η βιταμίνη D μετατρέπεται σε 25-OH βιταμίνη D, καλσιδιόλη, 25(OH)D μέσω του ενζύμου CYP2R1 του μικροσωμιακού κυτοχρώματος P450 ή/και του ενζύμου CYP27A1 του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος P450 (6, 7). Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν και άλλα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που δρουν ως οξειδάσες όπως το CYP2C11, CYP3A4, CYP2D25 και το CYP2J3. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν δραστηριότητα 25-υδροξυλάσης της βιταμίνης D (8). Στη συνέχεια η 25(OH)D, εισέρχεται γρήγορα στην κυκλοφορία, όπου ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 15 ημέρες (9). Τα φυσιολογικά επίπεδα της 25(OH)D στην κυκλοφορία κυμαίνονται από 25-200 nmol/L.

Έπειτα η 25(OH)D, συνδεδεμένη με τη VDBP μεταφέρεται στους νεφρούς όπου υδροξυλιώνεται από το CYP27B1 στη θέση C1α και μετατρέπεται στην βιολογικά ενεργή μορφή, την 1α,25-OH βιταμίνη D (καλσιτριόλη) (Εικόνα 2). Η υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του νεφρού (10-12). Η σύνθεση της 1,25-OH βιταμίνης D, ρυθμίζεται από αρκετούς παράγοντες, με τους σημαντικότερους να περιλαμβάνουν την παραθορμόνη, το φώσφορο, το ασβέστιο, την καλσιτονίνη και τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (fibroblast growth factor 23 (FGF23)). Η καλσιτριόλη έχει βιολογικές δράσεις στους νεφρούς αλλά μεταφέρεται επίσης με τη VDBP σε όργανα στόχους του υποδοχέα της Βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR), όπως τα οστά, το έντερο και οι παραθυρεοειδείς αδένες όπου δρα με γενωμικό και μη γενωμικό τρόπο.



Εικόνα 2: Μεταβολισμός της Βιταμίνης D, Πηγή: Kitson D et al. D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease, J Hepatol, 2012 Oct;57(4):897-909

Η ρύθμιση της γενωμικής έκφρασης από την καλσιτριόλη διαμεσολαβείται από τον VDR και συμβαίνει μέσα σε κάποιες ώρες. Αντίθετα οι μη γενωμικές δράσεις της καλσιτριόλης διαμεσολαβούνται από έναν ειδικό προσδέτη στη μεμβράνη του VDR και συμβαίνουν μέσα σε λεπτά ή δευτερόλεπτα. Οι μη γενωμικές δράσεις της αφορούν την αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου, τη διέγερση της μεταφοράς του ασβεστίου και του φωσφόρου από το έντερο, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και την αύξηση του κυκλικού GMP. Τα επίπεδα της καλσιτριόλης στον ορό κυμαίνονται από 75-200 pmol/L και ο χρόνος ημίσειας ζωής της στις 10-24 ώρες (13).

1.3 Απορρόφηση της Βιταμίνης D

Εξαιτίας της λιποδιαλυτής μορφής της, η βιταμίνη D (τόσο η D₂ όσο και η D₃) απορροφάται στο λεπτό έντερο μαζί με τα λίπη που προσλαμβάνονται από τη διατροφή (14). Η αποτελεσματική απορρόφηση της βιταμίνης D εξαρτάται από την παρουσία λιπών στον αυλό του εντέρου τα οποία διεγείρουν την έκκριση των χολικών οξέων και της παγκρεατικής

λιπάσης (15). Στη συνέχεια τα χολικά οξέα ξεκινούν τη διαλυτοποίηση των λιπών, η παγκρεατική λιπάση υδρολύει τα τριγλυκερίδια σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα χολικά οξέα ενισχύουν το σχηματισμό μικκυλίων τα οποία περιέχουν λιπίδια και διαχέονται στα κύτταρα του εντέρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ραδιοσημασμένη βιταμίνη D₃ εντοπίζεται μόνο στο λεμφικό ιστό και στα κλάσματα των χυλομικρών στο πλάσμα, έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα άτομα με παγκρεατική ανεπάρκεια ή με διαταραχή στην απελευθέρωση των χολικών οξέων παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη απορρόφηση της βιταμίνης D (16-18). Παράλληλα και άλλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η βιταμίνη D απορροφάται αποτελεσματικότερα όταν καταναλώνεται μαζί με τρόφιμα που περιέχουν λίπος (15) (19, 20). Ωστόσο το βέλτιστο ποσό λίπους που απαιτείται για την καλύτερη απορρόφηση της βιταμίνης D δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί.

Μέσα στο εντερικό τοίχωμα η βιταμίνη D, η χοληστερόλη τα τριγλυκερίδια, οι λιποπρωτεΐνες καθώς και άλλα λίπη «συσκευάζονται» σε χυλομικρά. Τα λιπίδια που περιέχονται στα χυλομικρά μεταβολίζονται στους περιφερικούς ιστούς, πιο συγκεκριμένα στο λιπώδη ιστό και στους σκελετικούς μύες οι οποίοι εκφράζουν τη λιποπρωτεϊνική λιπάση σε μεγάλη ποσότητα. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων που περιέχονται στα χυλομικρά, ένα κλάσμα της βιταμίνης D μπορεί να καταναλωθεί από αυτούς τους ιστούς. Η κατανάλωση από το λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες ευθύνεται για τη γρήγορη μεταγευματική μείωση της βιταμίνης D στο πλάσμα και πιθανά να εξηγεί πως η παχυσαρκία σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα 25(OH)D (9).

1.4 Αποθήκευση της βιταμίνης D

Ο Rosenstreich και οι συν. (21) πρώτοι ταυτοποίησαν το λιπώδη ιστό ως την πρωταρχική θέση συσσώρευσης της βιταμίνης D σε πειράματα σε επίμυες στα οποία χορήγησαν ραδιοσημασμένη βιταμίνη D. Στη συνέχεια μέτρησαν στους ιστούς τη ραδιενέργεια κατά τη διάρκεια της πλήρωσης της βιταμίνης D και αφού ακολούθησε μία περίοδος στέρησης φάνηκε ότι ο λιπώδης ιστός αποκτούσε τη μεγαλύτερη ποσότητα ραδιενέργειας και είχε το μικρότερο ρυθμό απελευθέρωσης. Σε επόμενες μελέτες φάνηκε ότι υπήρχε μεγαλύτερη πρόσληψη και κάθαρση της βιταμίνης D από τον λιπώδη ιστό σε παχύσαρκους ενήλικες συγκριτικά με όσους είχαν φυσιολογικό βάρος (22). Παρόμοια σε μελέτες που αφορούσαν παχύσαρκους ενήλικες έγινε φανερό ότι η βιταμίνη D αποθηκευόταν στο λιπώδη ιστό και δεν απελευθερώνονταν όταν αυτό ήταν απαραίτητο (23). Τελικά το 2008 ο Blum και οι συν. (24) βρήκαν ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμίνης D 700 IU ανα ημέρα για κάθε 15 kg πάνω από το φυσιολογικό βάρος σε ηλικιωμένα άτομα οδηγούσε σε τιμές βιταμίνης D κατά 10 nmol/L χαμηλότερης μετά από ένα έτος λήψης συμπληρωμάτων. Οι ερευνητές υπολόγισαν ότι προκειμένου τα άτομα με δείκτη μάζας σώματος πάνω από το φυσιολογικό να

παρουσιάσουν παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της 25(OH)D με τα άτομα που έχουν φυσιολογικό βάρος θα έπρεπε να γίνει αύξηση της δόσης των συμπληρωμάτων κατά 17% (για τη δόση των 700 IU ανα ημέρα) για αύξηση του βάρους σώματος κατά 10 kg πάνω από το φυσιολογικό στον πληθυσμό της μελέτης. Το συμπέρασμα αυτών των μελετών είναι ότι η βιταμίνη D που αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό δεν είναι άμεσα διαθέσιμη και οι υπέρβαροι ενήλικες μπορεί να χρειάζονται μεγαλύτερες από τις συνήθεις δόσεις των συμπληρωμάτων της βιταμίνης D προκειμένου να αποκτήσουν παρόμοια επίπεδα με τους συνομήλικους με φυσιολογικό βάρος. Ενισχύοντας την υπόθεση ότι η βιταμίνη D αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό μελέτες που είχαν ως αντικείμενο τη μείωση του βάρους έδειξαν ότι τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό αυξάνονται όταν οι παχύσαρκοι χάνουν βάρος (25-27).

1.5 Έκκριση της Βιταμίνης D

Όπως περιεγράφηκε οι μεταβολίτες της βιταμίνης D εκκρίνονται μέσω της χολής στα κόπρανα και μία πολύ μικρή ποσότητα μέσω των ούρων. Αυτό οφείλεται εν μέρει στη νεφρική επαναρόφηση των μεταβολιτών της βιταμίνης D που είναι προσδεμένοι στη VDBP και αυτό μεσολαβείται από το σύστημα του υποδοχέα της συμπλέγματος μεγκαλίνης/κουμπιλίνης (cubilin–megalin) (6).

1.6 Υπερβολική Πρόσληψη της Βιταμίνης D

Η υπερβολική πρόσληψη της βιταμίνης D η οποία δεν σχετίζεται με την έκθεση στον ήλιο, μπορεί να οδηγήσει σε μία κατάσταση η οποία ονομάζεται «υπερβιταμίνωση» ή τοξικότητα από τη βιταμίνη D. Οι πρώτες αναφορές για υπερβιταμίνωση από τη βιταμίνη D, χρονολογούνται μεταξύ του 1928-1932 και συνέχισαν κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα. Η υπερβιταμίνωση από τη βιταμίνη D οδηγεί σε υπερασβεστιαμία και τελικά σε αποσιτιάνωση των μαλακών μορίων η οποία έχει ως επακόλουθο την καταστροφή της νεφρικής και καρδιαγγειακής λειτουργίας (28). Στην περίπτωση των επίμυων που είχαν υποστεί υπερβιταμίνωση, κατά τη νεκροψία φάνηκε εκτεταμένη αποσιτιάνωση οργάνων και ιστών. Η μορφή της βιταμίνης D που εμπλέκεται στην υπερβιταμίνωση είναι η 25(OH)D (29). Στην πραγματικότητα έχει φανεί σε μελέτες στις οποίες χορηγούνται συμπληρώματα σε επίμυες στους οποίους δεν εκφράζεται το CYP27B1, το οποίο δεν έχει τη δυνατότητα να συνθέσει την καλσιτριόλη, τα αυξημένα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην έκφραση της βιταμίνης D ακόμη και στην απουσία της καλσιτριόλης (30).

1.7 Λειτουργίες της βιταμίνης D

1.7.1 Ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου

Η κύρια λειτουργία της βιταμίνης D στην ορμονική της μορφή (της καλσιτριόλης ή της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D) είναι η αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου και του φωσφόρου στο πλάσμα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ασβέστωση των οστών (31). Επιπλέον η αύξηση του ασβεστίου στο πλάσμα στα φυσιολογικά επίπεδα απαιτείται για τη λειτουργία των νευρομυϊκών συνάψεων, την αγγειοδιαστολή και για την έκκριση των ορμονών.

Η καλσιτριόλη λειτουργεί ως μέρος του ενδοκρινικού συστήματος, χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς: στο έντερο, στα οστά και στους νεφρούς με στόχο να αυξήσει τα επίπεδα του ασβεστίου. Ο πρώτος μηχανισμός, ο οποίος δεν απαιτεί την παραθορμόνη (PTH) αποτελεί τον καθιερωμένο ρόλο της καλσιτριόλης που αφορά τη διέγερση της απορρόφησης του ασβεστίου κατά μήκος όλου του εντέρου παρόλο που η μεγαλύτερη δραστικότητα της εντοπίζεται στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα. Είναι ξεκάθαρο ότι η καλσιτριόλη διεγείρει άμεσα την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου ανεξάρτητα. Αναφορικά με τον δεύτερο μηχανισμό, η καλσιτριόλη διαδραματίζει έναν απαραίτητο ρόλο στην κινητοποίηση του ασβεστίου από τα οστά, μια διαδικασία η οποία απαιτεί την παρουσία της παραθορμόνης (32, 33). Επάγει τη σύνθεση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών προκειμένου να βοηθήσει στην μετακίνηση του ασβεστίου από τα οστά. Πιο συγκεκριμένα η καλσιτριόλη διευκολύνει το σχηματισμό των οστεοκλαστών μέσω της ενεργοποίησης της έκκρισης μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται προσδέτης του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (receptor activator for nuclear factor κ B (RANK) ligand), η οποία στη συνέχεια είναι υπεύθυνη για την οστεοκλαστογένεση και την επαναρρόφηση από το οστό. Στον τρίτο μηχανισμό η καλσιτριόλη μαζί με την παραθορμόνη διεγείρουν την επαναρρόφηση του ασβεστίου από το άπρω εσπειραμένο σωληνάριο, εξασφαλίζοντας την κατακράτηση του ασβεστίου από τους νεφρούς όταν αυτή είναι απαραίτητη (34, 35). Συνοψίζοντας η καλσιτριόλη δρα στο έντερο, στα οστά και στους νεφρούς αυξάνοντας τα επίπεδα του ασβεστίου στο πλάσμα. Καθώς τα επίπεδα του ασβεστίου αυξάνονται η έκκριση της παραθορμόνης μειώνεται. Αν τα επίπεδα του ασβεστίου αυξηθούν πάρα πολύ, τα παραθυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδή εκκρίνουν καλσιτονίνη η οποία αναστέλλει την επαναρρόφηση του ασβεστίου από τα οστά και βοηθά στη διατήρηση των επιπέδων του ασβεστίου στα φυσιολογικά επίπεδα. Παράλληλα η καλσιτριόλη μέσω του υποδοχέα της, του VDR καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από τον παραθυρεοειδή, παρέχοντας σημαντική επανατροφοδότηση η οποία ενισχύει άμεσα τη δράση των αυξημένων επιπέδων του ασβεστίου (36, 37). Όσον αφορά το φώσφορο ο μηχανισμός μέσω του οποίου η βιταμίνη D ρυθμίζει τα επίπεδα του δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι η έλλειψη του φωσφόρου πυροδοτεί

το ένζυμο CYP27B1 για να παραχθεί περισσότερη καλσιτριόλη η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την απορρόφηση του φωσφόρου στο λεπτό έντερο. Επιπλέον η καλσιτριόλη μπορεί να επάγει την έκκριση του FGF23 από τα οστεοκύτταρα του οστού γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση φωσφόρου από τους νεφρούς όπως και επανατροφοδότηση του μεταβολισμού της βιταμίνης D (38).

1.7.2 Βιταμίνη D2 και D3

Η βιταμίνη D2 και η βιταμίνη D3, διαφέρουν μόνο στη διαμόρφωση της πλάγιας αλυσίδας τους. Οι φυσιολογικές αποκρίσεις και στις δύο μορφές της βιταμίνης D περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου και τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Ποιοτικά οι βιταμίνες D2 και D3 παρουσιάζουν ταυτόσημες βιολογικές απαντήσεις (μέσω της γονιδιακής έκφρασης) οι οποίες διαμεσολαβούνται από τον VDR (39, 40). Για πολλές δεκαετίες θεωρούνταν ότι οι δύο μορφές είναι ουσιαστικά ισοδύναμες στους ανθρώπους (41). Οι μελέτες που ασχολούνται με τις διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου υποστηρίζουν (42, 43) ή αντιτίθενται (44) στη μεταβολική διάκριση της βιταμίνης D2 έναντι της D3. Μέρος της αντίθεσης αυτών των μελετών (42-44) οφείλεται σίγουρα στις διαφορές που παρουσιάζουν στο μέγεθος και στη συχνότητα των δόσεων (οι οποίες κυμαίνονται από 1000 IU καθημερινά μέχρι 50000 IU σε μία μόνο δόση). Οι διαφορές που περιγράφονται αφορούν τη διαφορά στις παραμέτρους της φαρμακοκινητικής μεταξύ των δύο μορφών, της βιταμίνης D2 και της βιταμίνης D3.

Αυτή η αντιπαράθεση διεξάγεται παράλληλα με την πρόταση ότι η βιταμίνη D2 είναι λιγότερο τοξική από τη βιταμίνη D3. Πειραματικά δεδομένα από μελέτες (45,) (46), (47) σε διάφορα είδη θηλαστικών ζώων από τρωκτικά μέχρι πρωτεύοντα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η βιταμίνη D2 είναι λιγότερο τοξική από τη βιταμίνη D3 χωρίς όμως να υπάρχουν δεδομένα σε ανθρώπους. Ωστόσο οι μελέτες αυτές φαίνεται να υποδεικνύουν ότι σε αρκετά είδη θηλαστικών οι ενώσεις της βιταμίνης D2 μπορεί να παρουσιάζουν κάποιες διαφορές στη φαρμακοκινητική που εκδηλώνονται ως χαμηλότερη τοξικότητα συγκριτικά με τις υψηλές δόσεις.

Επιπρόσθετα υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι τα περισσότερα μονοπάτια που ενέχονται στο μεταβολισμό και των δύο βιταμινών D2 και D3 είναι πανομοιότυπα (39). Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών της D3 στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και στις αρχές του 1970 ακολουθήθηκε από την ταυτοποίηση των αντίστοιχων της D2, οι οποίοι ήταν η 25(OH)D2, η 1α,25(OH)2D2, και η 24,25(OH)2D2 (48-50).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά στην πλάγια αλυσίδα της βιταμίνης D2 δεν αποκλείουν τα βήματα της 25 ή της 1^α-υδροξυλίωσης στην ενεργοποίηση του μορίου της ή στο πρώτο βήμα της απενεργοποίησης, που αφορά την 24-υδροξυλίωση.

Άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι τα βήματα για τη μεταγωγή του σήματος στη βιταμίνη D φαίνεται να μην διαφέρουν αισθητά μεταξύ των δύο ανάλογών της, τουλάχιστον σε μοριακό επίπεδο (όπως για παράδειγμα στη σύνδεση με τη VDBP) (51, 52) ή στην πρόσδεση στον VDR (52-54). Συνολικά μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα συστήματα μεταγωγής σήματος έχουν σχεδιαστεί για να απαντούν αντίστοιχα καλά στη βιταμίνη D3 αλλά και σε φυσιολογικές δόσεις της βιταμίνης D2.

Σε αυτή τη φάση δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τα διαφορετικά αποτελέσματα των δύο μορφών της βιταμίνης D. Όμως φαίνεται σε χαμηλές δόσεις η βιταμίνη D2 και η βιταμίνη D3 να είναι αντίστοιχες, σε υψηλότερες όμως δόσεις φαίνεται η βιταμίνη D2 να είναι λιγότερο αποτελεσματική από την D3. Οι διαφορές στην τοξικότητα για τους ανθρώπους όπως κρίνεται από τη δόση που προκαλεί υπερβιταμίνωση D είναι ασαφείς, αλλά σύμφωνα με τα δεδομένα από πειράματα σε ζώα η βιταμίνη D2 φαίνεται να είναι λιγότερο τοξική από τη βιταμίνη D3.

1.7.3 Σκελετικές διαταραχές

Η έλλειψη της βιταμίνης D οδηγεί σε ανεπαρκή μετάλλωση του σκελετού. Συχνά αναφέρεται ως ραχίτιδα στα παιδιά και ως οστεοπενία/οστεομαλακία στους ενήλικες. Η έλλειψη της βιταμίνης D χαρακτηρίζεται από παρέκκλιση στη μετάλλωση του οστού. Στα παιδιά η έλλειψη της οδηγεί σε ραχίτιδα στην οποία ο χόνδρος αδυνατεί να ωριμάσει και να γίνει σωστά η μετάλλωση. Η ραχίτιδα χαρακτηρίζεται από διεύρυνση στο τέλος των μακρών οστών, ραχιτιδικό «κομβολόγιο», παραμορφώσεις στο σκελετό οι οποίες περιλαμβάνουν την κраниόφθιση και τις παραμορφώσεις των κάτω άκρων («bowed legs & knocked knees»). Στους ενήλικες η έλλειψη της βιταμίνης D οδηγεί σε οστεομαλακία στην οποία η νέα εναποτιθέμενη οστική κοιλότητα αδυνατεί να μεταλλωθεί επαρκώς και υπάρχουν διευρυμένα οστεοειδή. Η ραχίτιδα τύπου I που οφείλεται στη βιταμίνη D (VDDR I) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια η οποία οδηγεί σε παθολογικά χαμηλά επίπεδα καλσιτριόλης αλλά σε φυσιολογικά επίπεδα 25(OH)D. Η μετάλλαξη στη VDDR I επηρεάζει το ένζυμο της 1α-υδροξυλάσης και οδηγεί σε ελαττωματική απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο έχοντας ως επακόλουθο την εμφάνιση της ραχίτιδας (55). Η VDDR I εκδηλώνεται στον πρώτο χρόνο της ζωής και αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση καλσιτριόλης. Συνήθως δεν είναι απαραίτητη η χορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου και φωσφόρου. Η δεύτερη διαταραχή αφορά τη ραχίτιδα που οφείλεται στη βιταμίνη D (VDDR II), η οποία οδηγεί σε υπασβεστιαϊμία, τέτανο, σπασμούς, αλωπεκία και ραχίτιδα. Κληρονομείται επίσης με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και προκύπτει από μία μετάλλαξη στο γονίδιο του *Vdr*. Μπορεί να εμφανιστεί στο δεύτερο χρόνο της ζωής και μπορεί να μην αναγνωρισθεί μέχρι την παιδική ηλικία.

1.7.4 Άλλες δράσεις της βιταμίνης D

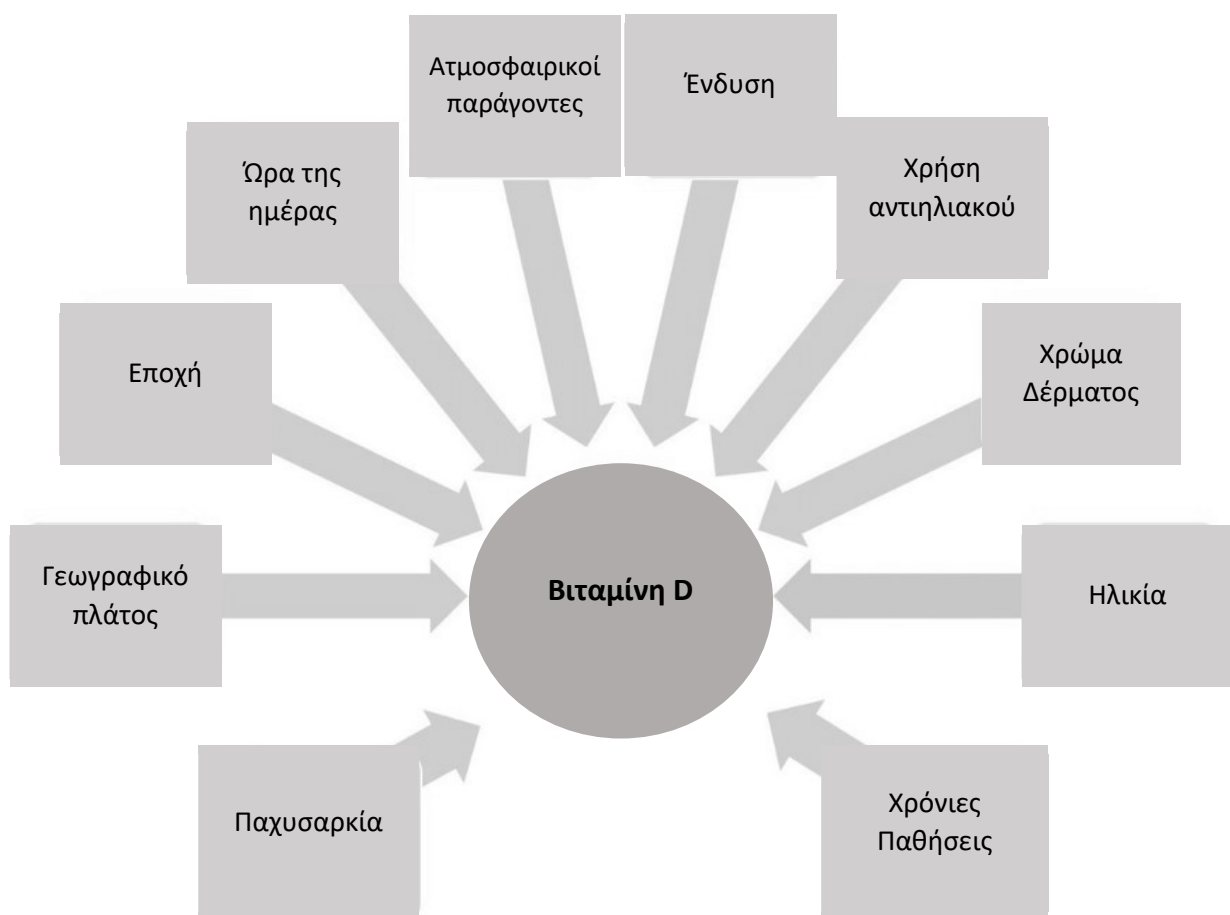
Είναι αξιοσημείωτο ότι ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) βρίσκεται στον πυρήνα πολλών ιστών που δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου. Για παράδειγμα, ο VDR έχει περιγραφεί να βρίσκεται στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας, στα ενεργοποιημένα T κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, στα μακροφάγα, στα μονοκύτταρα και στα κυτταροτόξικα T κύτταρα. Οι μελέτες gene array σε πολλά κύτταρα και ιστούς δείχνουν ότι η καλσιτριόλη ρυθμίζει πολλά γονίδια, περίπου 5% του ανθρώπινου γονιδιώματος (56). Ωστόσο το πώς λειτουργεί η καλσιτριόλη σε αυτούς τους ιστούς και οι φυσιολογικές συνέπειες της δράσης της δεν είναι ακριβώς ξεκάθαρες. Παρόμοια η σημασία της αυτοκρινούς και της παρακρινούς σύνθεσης της καλσιτριόλης χωρίς συνθήκες ασθένειας δεν είναι ξεκάθαρη. Το γονίδιο της 1α-υδροξυλάσης (CYP27B1) έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται σε πολλούς ιστούς εκτός των νεφρών (57). Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι νεφροί αποτελούν το κύριο μέρος παραγωγής της καλσιτριόλης γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σημαντική μείωση στα επίπεδα της καλσιτριόλης σε περιπτώσεις νεφρεκτομής ή χρόνιας νεφρικής νόσου (58). Ωστόσο υπάρχουν και άλλα σημεία εκτός των νεφρών στα οποία γίνεται η 1α-υδροξυλίωση, έχουν ενδοκρινή δράση και ενέχονται κατά κύριο λόγο στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης. Τα σημεία αυτά αφορούν, το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα και αδένες όπως ο μαστός και ο προστάτης (59). Σε επίμυες στους οποίους δεν υπάρχει το γονίδιο του Vdr (Vdr-null), η καλσιτριόλη και ο VDR διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του θηλασμού, όπου παρατηρείται αύξηση της παραγωγής του γάλακτος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά καθυστερημένη επαναφορά του μαζικού αδένος μετά το θηλασμό (60). Η εξωνεφρική λειτουργία του CYP27B1 μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (38) ή να μειωθεί στην περίπτωση της καρκινικής αύξησης των κυττάρων (61). Επιπλέον η εξωνεφρική παραγωγή καλσιτριόλης απαντάται σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις όπως η σαρκοειδωση, το λέμφωμα και η φυματίωση οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με υπερασβεστιαμία (62). Αν η σαρκοειδωση δεν αντιμετωπιστεί με φαρμακευτική αγωγή τότε η καλσιτριόλη που παράγεται εξωνεφρικά μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία με αποτέλεσμα υπερχαλσιουρία και τελικά υπερχαλσιαιμία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η καλσιτριόλη παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα ο οποίος δεν έχει ακόμη πλήρως περιγραφεί. Η εξωγενής χορήγηση καλσιτριόλης μπορεί να καταστείλει τα αυτοάνοσα νοσήματα αλλά προκαλώντας ως ανεπιθύμητη ενέργεια την υπερχαλσιαιμία (63). Έχει φανεί ότι η τοπική μετατροπή της 25(OH)D σε καλσιτριόλη στα μονοκύτταρα ή στα μακροφάγα οδηγεί σε αύξηση της κυτταρικής ανοσίας μέσω της παραγωγής καθελιδίνης, ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου το οποίο έχει τη δυνατότητα να εξουδετερώνει τα βακτήρια όπως το μυκοβακτήριο της φυματίωσης (64). Σε μία πρόσφατη μελέτη (65) φάνηκε ότι οι ασθενείς που υπόκεινται σε νεφρική κάθαρση και λαμβάνουν υψηλές δόσεις βιταμίνης D3 αναπτύσσουν έναν πληθυσμό κυττάρων του ανοσοποιητικού με αυξημένη έκφραση των CYP27B1, VDR, και της καθελιδίνης, παρόλο που ο ρόλος αυτών των κυττάρων είναι άγνωστος in vivo. Παραδόξως η καλσιτριόλη έχει αντίθετη επίδραση στην

ειδική ανοσία (που αφορά τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα). Η καλσιτριόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των Τ βοηθητικών κυττάρων και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα Β κύτταρα. Αντίθετα προάγει τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκατασταλτικών Τ κυττάρων και τη συγκέντρωσή τους σε σημεία που φλεγμαίνουν (66). Ο ρόλος της βιταμίνης D στην καρκινογένεση εξερίχθηκε αρχικά από μελέτες *in vitro* οι οποίες έγιναν πιο εύκολα προσβάσιμες για την αξιολόγηση των μηχανισμών δράσης της βιταμίνης D καθώς και των μεταβολιτών της (67). Η καλσιτριόλη είχε φανεί να αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (68), να αποκαθιστά ή να ενισχύει τα προ-αποπτωτικά φαινόμενα στα κύτταρα αυτά μέσω πολλαπλών μονοπατιών συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bax και η μ -calpain (69, 70). Παράλληλα η βιταμίνη D ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω αλλαγών σε ειδικά μόρια όπως οι κινάσες και η καταστολή των πρωτο-ογκογονιδίων όπως το myc (71, 72). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις για τον αντιαγγειογενετικό ρόλο της βιταμίνης D. Η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) από τα καρκινικά κύτταρα καταστέλλεται μέσω της βιταμίνης D, γεγονός που έχει παρατηρηθεί σε μελέτες *in vivo* (73, 74). Επιπλέον ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος της βιταμίνης D επιδρά και στη βιολογία του καρκίνου μέσω της ικανότητας της να παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα καταστέλλοντας προ-φλεγμονώδη μονοπάτια όπως αυτό της κυκλοξυγενάσης 2 (75).

1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση της Βιταμίνης D στο δέρμα

Οτιδήποτε επηρεάζει τον αριθμό των φωτονίων της ηλιακής UVB ακτινοβολίας, τα οποία διαπερνούν το δέρμα ή αλλάζει το ποσοστό της 7-δευδροχοληστερόλης στο δέρμα, επηρεάζει τη σύνθεση της βιταμίνης D₃ στο δέρμα (Εικόνα 3). Το ποσοστό της 7-δευδροχοληστερόλης στην επιδερμίδα είναι σχετικά σταθερό μέχρι κάποια ηλικία από την οποία και έπειτα αρχίζει να μειώνεται (76, 77). Η μελανίνη εξερίχθηκε ως ένα αποτελεσματικό φυσικό αντιηλιακό. Επειδή απορροφά αποτελεσματικά τα φωτόνια της UVB ακτινοβολίας, οι άνθρωποι με αυξημένη μελανίνη στο δέρμα χρειάζονται μεγαλύτερη έκθεση στον ήλιο για να συνθέσουν το ίδιο ποσό βιταμίνης D₃ συγκριτικά με τους ανθρώπους με πιο ανοιχτόχρωμο τύπο δέρματος (78). Τα αντιηλιακά λειτουργούν απορροφώντας τη UVB και μερικά και τη UVA ακτινοβολία (321-400nm) πριν εισέλθει στο δέρμα. Με αυτόν τον τρόπο δεν εντυπωσιάζει το γεγονός ότι ένα αντιηλιακό με δείκτη προστασίας από τον ήλιο (SPF) 8 να μειώνει την ικανότητα του δέρματος να παράγει βιταμίνη D₃ κατά 95%, ενώ ένα σωστά χρησιμοποιούμενο αντιηλιακό με SPF 15 να μειώνει αντίστοιχα την παραγωγή της D₃ κατά 98% (79). Η ώρα της ημέρας, η εποχή αλλά και το γεωγραφικό πλάτος επηρεάζουν δραματικά τη σύνθεση της βιταμίνης D₃ στο δέρμα (80, 81). Ο λόγος για αυτό είναι ότι παρόλο που ο ήλιος είναι πιο κοντά στη γη το χειμώνα, οι ακτίνες του εισέρχονται σε μια πιο κάθετη γωνία (zenith angle) και περισσότερα φωτόνια UVB απορροφώνται αποτελεσματικά από τη στιβάδα του όζοντος

καθώς η πιο κάθετη γωνία τα οδηγεί να περάσουν σε μεγαλύτερη απόσταση μέσα από τη στιβάδα του όζοντος. Σε γεωγραφικό πλάτος πάνω από 37° από το Νοέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο παρατηρείται μεγάλη μείωση (80-100%) στον αριθμό των φωτονίων που φθάνουν στην επιφάνεια της γης. Έτσι παράγεται πολύ μικρή ποσότητα έως καθόλου βιταμίνη D3 κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ωστόσο σε γεωγραφικό πλάτος μικρότερο των 37° και πιο κοντά στον ισημερινό, συντίθεται μεγαλύτερη ποσότητα βιταμίνης D κατά τη διάρκεια του έτους (1, 80). Η βιταμίνη D3 είναι λιποδιαλυτή και αποθηκεύεται στο σωματικό λίπος. Οποιοδήποτε πλεόνασμα βιταμίνης D3 παράγεται κατά την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να αποθηκευτεί στο σωματικό λίπος και να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια του χειμώνα όπου παράγεται στο δέρμα ελάχιστη βιταμίνη D3. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν σε παχύσαρκους και μη παχύσαρκους χορηγήθηκαν 50000 IU από του στόματος ή όταν εκτέθηκαν σε τεχνητή ηλιακή ακτινοβολία για την ίδια χρονική περίοδο, οι παχύσαρκοι παρουσίασαν αύξηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης D στην κυκλοφορία λιγότερο από 50% συγκριτικά με τους μη παχύσαρκους (23).



Εικόνα 3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση της βιταμίνης D, Πηγή: Theoretical and Practical Update in Pediatric Endocrinology and Diabetes, April 2014

1.9 Πηγες της Βιταμίνης D

Πολύ λίγες τροφές περιέχουν βιταμίνη D (Πίνακας 1). Τα λιπαρά ψάρια όπως ο σολομός, το σκουμπρί και οι σαρδέλες αποτελούν καλές πηγές της βιταμίνης D3 όπως επίσης και τα μανιτάρια. Παρόλο που οι κρόκοι των αυγών έχει αναφερθεί πως περιέχουν βιταμίνη D, οι ποσότητες ποικίλουν (συνήθως όχι παραπάνω από 50 IU ανα κρόκο) και η ποσότητα της χοληστερόλης στους κρόκους των αυγών τους τα καθιστά μια φτωχή πηγή βιταμίνης D. Το μωρουνέλαιο θεωρείται για περίπου τρεις αιώνες πολύ σημαντικό για την υγεία των οστών και αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμίνης D3. Λίγα είναι τα τρόφιμα τα οποία είναι ενισχυμένα με βιταμίνη D. Τα τρόφιμα που έχουν ενισχυθεί με βιταμίνη D συμπεριλαμβάνουν το γάλα, το χυμό πορτοκάλι και άλλους χυμούς, κάποια δημητριακά και το ψωμί (82). Παραπάνω από 90% της βιταμίνης D που απαιτείται για τους περισσότερους ανθρώπους προκύπτει από τη συνηθισμένη έκθεση στον ήλιο καθώς το δέρμα έχει μεγάλη δυνατότητα να παράγει βιταμίνη D (1, 80, 83). Μελέτες έχουν δείξει ότι η άμεση έκθεση του 20% της επιφάνειας του σώματος στην ηλιακή ακτινοβολία ή σε τεχνητό φως είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιταμίνης D3 και της 25(OH)D τόσο σε νέους όσο και σε μεγαλύτερης ηλικίας ενήλικες (84, 85).

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα της Βιταμίνης D στα τρόφιμα, Πηγή: Θεραπευτικές οδηγίες χορήγησης της βιταμίνης D στον Ελληνικό πληθυσμό

Τροφή	VITAMIN D (IU)
Γάλα αγελάδας	3-40/L
Εμπλουτισμένο γάλα	400/L
Εμπλουτισμένος χυμός πορτοκάλι/γάλα σόγιας, ρυζόγαλο	400/L
Βούτυρο	35/100 gr
Εμπλουτισμένη μαργαρίνη	60/κουταλιά σούπας
Γιαούρτι (κανονικό, χαμηλά λιπαρά, άλιπο)	89/100 gr
Τυρί cheddar	12/100gr
Τυρί παρμεζάνα	28/100gr
Τυρί ελβετικό	44/100gr
Εμπλουτισμένα δημητριακά	40/μερίδα
Εμπλουτισμένο τοφού (1/5 κύβου)	120
Μανιτάρια shiitake φρέσκα	100/100gr
Μανιτάρια αποξηραμένα	1660/100gr
Κρόκος αυγού	20-25
Γαρίδες	152/100gr
Μοσχαρίσιο συκώτι	15-50/100gr
Τόνος, σαρδέλα, σολωμός, σκουμπρί	224-332/100gr
Κονσερβοποιημένος σολωμός με οστό σε λάδι	624/100gr
Σολωμός μαγειρεμένος	345-360/100gr
Σκουμπρί Ατλαντικού	360/100gr
Ρέγγα Ατλαντικού	1628/100gr
Ρέγγα καπνιστή	120/100gr
Ρέγγα μαρινάτη	680/100gr
Βακαλάος	44/100gr
Μουρουνέλαιο	175/gr, 1360/κουταλιά σούπας

2. Βιταμίνη D κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής

2.1 Βρεφική ηλικία

Η ανάπτυξη του σκελετού στη βρεφική ηλικία απαιτεί επαρκή κατανάλωση βιταμίνης D όπως και ασβεστίου. Η ανεπαρκής πρόληψη βιταμίνης D σε περιόδους αύξησης οδηγεί σε ανάπτυξη ραχίτιδας ή σε σπασμούς εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων ασβεστίου στο αίμα. Κατά τη διάγνωση, τα βρέφη με ραχίτιδα παρουσιάζουν πολύ χαμηλή συγκέντρωση 25(OH)D, λιγότερο από 25 nmol/L (86, 87) και τα περισσότερα δεν έχουν λάβει συμπλήρωμα με βιταμίνη D (88, 89). Η έλλειψη βιταμίνης D φαίνεται επίσης να αυξάνει τον κίνδυνο για άλλες νόσους όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I αργότερα στην παιδική ηλικία (90, 91). Ο πιο αποδεκτός τρόπος για το χτίσιμο μιας υγιούς αποθήκης με βιταμίνη D στα βρέφη είναι μέσω της χορήγησης συμπληρώματος βιταμίνης D. Σύμφωνα με τυχαίοποιημένες κλινικές δοκιμές 5-10 μικρογραμμάρια σε καθημερινή βάση (91, 92) φαίνεται να επαρκούν ώστε η συγκέντρωση της 25(OH)D στο ορό να είναι (91, 93, 94) 50 nmol/L στα βρέφη από τη γέννηση μέχρι το πρώτο έτος.

Οι συστάσεις για την πρόσληψη της βιταμίνης D στη βρεφική ηλικία είναι διαθέσιμες από διάφορους οργανισμούς σε παγκόσμια κλίμακα και προτείνουν τη χορήγηση 5-10 μικρογραμμάτων σε καθημερινή βάση (88, 95, 96). Μερικοί οργανισμοί προτείνουν 25-30 μικρογραμμάρια σε καθημερινή βάση ως συμπληρώματα σε αποκλειστικά θηλάζοντα βρέφη (97). Τα συμπληρώματα προτείνεται να ξεκινούν τον πρώτο μήνα ζωής και να συνεχίζονται ως ότου η βιταμίνη D να μπορεί να αποκτηθεί από άλλες τροφές. Σε κάποιες χώρες η εισαγωγή εναλλακτικού είδους γάλακτος όπως το γάλα φόρμουλα με ενισχυτές καθώς και τα δημητριακά μπορούν να παρέχουν μία πρόσθετη πηγή βιταμίνης D. Αν ένα βρέφος διαγνωσθεί με ραχίτιδα υπάρχουν ομοφωνίες/συστάσεις οι οποίες έχουν δημοσιευθεί πρόσφατα και πρέπει να ακολουθηθούν για την αντιμετώπιση της έλλειψης βιταμίνης D (86).

2.2 Παιδική ηλικία

Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας παρατηρείται ταχεία αύξηση και αποκτάται περίπου το 50% της ενήλικου σκελετικής μάζας. Η έναρξη της εφηβείας σηματοδοτεί την αύξηση του μεταβολισμού των επιπέδων της 25(OH)D σε καλσιτριόλη (98) έχοντας ως επακόλουθο την αυξημένη απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, τη μειωμένη έκκριση ασβεστίου από το ουροποιητικό και τη μεγαλύτερη εναπόθεση ασβεστίου στα οστά (99). Οι πληροφορίες σχετικά με τη σχέση ανάμεσα στα επίπεδα της 25(OH)D και της βέλτιστης εντερικής απορρόφησης ασβεστίου ή του κινδύνου για κάταγμα ή ραχίτιδας στα παιδιά είναι ελλιπείς ωστόσο η μελέτη του Abrams και συν. (100) έδειξε ότι υπάρχει μία έμμεση σχέση ανάμεσα στα χαμηλά επίπεδα 25(OH)D στον ορό και στην αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου σε νέους εφήβους. Παρόλο που οι συστηματικές ανασκοπήσεις (101, 102), δεν περιγράφουν

ειδικά την οστική μάζα σε αυτή την ηλικιακή ομάδα σε συσχέτιση με τη διατροφική πρόσληψη βιταμίνης D, προτείνουν ότι υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ της 25(OH)D στον ορό και της οστικής πυκνότητας των εφήβων. Σε μία μελέτη στην οποία συσχετίστηκε η πρόσληψη βιταμίνης D σε εφήβους και των δύο φύλων ηλικίας μεταξύ 13-16 ετών βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη βιταμίνης D και στην οστική πυκνότητα από την εφηβεία στην ενήλικη ζωή για τα αγόρια αλλά όχι για τα κορίτσια που συμμετείχαν στη μελέτη (103).

2.3 Εγκυμοσύνη και Γαλουχία

Ο ρόλος της βιταμίνης D στην εγκυμοσύνη και στην ανάπτυξη του εμβρύου χρήζει ιδιαίτερης προσοχής. Ωστόσο, ο ρόλος της βιταμίνης D δεν είναι ξεκάθαρος και υπάρχουν λίγα δεδομένα που εξετάζουν την επίδραση της στην εγκυμοσύνη και στη γαλουχία. Οι μελέτες σε ζώα δεν διευκρινίζουν αν η βιταμίνη D έχει κάποια συγκεκριμένη επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου και ειδικότερα στο σχηματισμό και τη μετάλλωση του σκελετού του εμβρύου. Τα επίπεδα της καλσιτριόλης αυξάνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ωστόσο φαίνεται άλλοι παράγοντες εκτός της βιταμίνης D να πυροδοτούν την απορρόφηση του ασβεστίου. Το ασβέστιο φαίνεται να μετακινείται από τη μητέρα στο έμβρυο χωρίς να χρειάζεται καλσιτριόλη. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) οι έγκυες πρέπει να ακολουθούν ισορροπημένη διατροφή και οφείλουν να γνωρίζουν ότι η ηλικιακή ακτινοβολία αφορά την κύρια πηγή της βιταμίνης D. Ωστόσο οι έγκυες με υποψία για έλλειψη βιταμίνης D πρέπει να λαμβάνουν συμπλήρωμα βιταμίνης D σε δοσολογία 200 IU ανα ημέρα (5μg) (104). Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται και έγκυες που έχουν μειωμένη έκθεση στην ηλικιακή ακτινοβολία.

Αναφορικά με τη διατροφική αξία της βιταμίνης D φαίνεται πως δεν επηρεάζει τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας ούτε αυτή της αποκατάστασης της που συμβαίνει μετά τη γαλουχία.

2.4 Ενήλικες

Οι νέοι ενήλικες χρειάζονται επαρκή διατροφή υποστήριξη για τη διατήρηση της υγείας των οστών. Το οστό υποβάλλεται συνέχεια αναδιαμόρφωση και η διατήρηση της οστικής πυκνότητας μειώνει τον κίνδυνο σκελετικών διαταραχών οι οποίες κυμαίνονται από την οστεοπενία στα οστεοπορωτικά κατάγματα αργότερα στη ζωή. Οι μεγαλύτεροι ενήλικες, ειδικά αυτοί που χαρακτηρίζονται ως ευάλωτοι μπορεί να έχουν φτωχή πρόσληψη βιταμίνης D και έκθεσης στον ήλιο με αποτέλεσμα δευτεροπαθή υπερπαθυρεοειδισμό οδηγώντας σε αυξημένα οστεοπορωτικά κατάγματα. Όπως περιγράφηκε παραπάνω δεν είναι ξεκάθαρο αν η απορρόφηση του ασβεστίου μειώνεται με την ηλικία. Στις γυναίκες η απώλεια οστού συμβαίνει ως αποτέλεσμα της μείωσης των οιστρογόνων που ακολουθούν την εμμηνόπαυση.

Με το πέρας της ηλικίας τόσο οι άντρες όσο και οι γυναίκες βιώνουν απώλεια οστού η οποία σχετίζεται με την ηλικία (105).

2.5 Vitamin D Binding protein (VDBP)

Η VDBP είναι μία α 2-σφαιρίνη με μοριακό βάρος 52-59 kDa (106, 107). Το ανθρώπινο γονίδιο της VDBP εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q12–q13). Έχει έκταση 35 kb DNA και περιέχει 13 εξόνια και 12 ιντρόνια (106) (108, 109). Έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιοχές πρόσδεσης στην αλληλουχία της DBP, μία περιοχή πρόσδεσης της βιταμίνης D μεταξύ των καταλοίπων 35 και 49 και μία περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης μεταξύ των καταλοίπων 373 και 403. Στον υγιή πληθυσμό η συγκέντρωση της VDBP στο πλάσμα κυμαίνεται από 300–600 $\mu\text{g/ml}$. Η σύνθεση της στο ήπαρ εξαρτάται από τα οιστρογόνα και αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τη θεραπεία με οιστρογόνα (110, 111). Αντίθετα με την 25OHD που έχει χρόνο ημίσειας ζωής 12 ημέρες η VDBP έχει 2.5 ημέρες (112, 113) και ο ρυθμός παραγωγής της είναι 10 mg/kg ανά ημέρα (107). Η VDBP ή το σύμπλεγμα VDBP-25OHD απομακρύνεται από το πλάσμα μέσα από πληθώρα ιστών όπως οι νεφροί, το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά, οι πνεύμονες, το έντερο και τα οστά. Πολλές είναι οι πρωτεάσες που ρυθμίζουν την κατακρήμνιση της VDBP, γεγονός που εξηγεί το μειωμένο μέγεθος των κλασμάτων της VDBP στο πλάσμα και την νεφρική απέκκριση τμημάτων μικρού μοριακού βάρους (112). Οι παθήσεις του ήπατος, το νεφρωσικό σύνδρομο και ο υποοπισμός χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση της VDBP λόγω του μειωμένου ρυθμού σύνθεσης ή της αυξημένης απώλειας πρωτεϊνών (113). Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος η συγκέντρωση της VDBP παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και δεν παρατηρούνται αλλαγές στις διαφορετικές εποχές του έτους (114).

Το γονίδιο της VDBP είναι μέλος ενός πολυγονιδιακού συμπλόκου το οποίο περιλαμβάνει την αλβουμίνη, την α -φετοπρωτεΐνη και την α -αλβουμίνη/αφαμίνη. Τα τέσσερα γονίδια εκφράζονται στο ήπαρ με αλληλεπικαλυπτόμενα εξελικτικά προφίλ. Με τη χρήση διαφορετικών ηλεκτροφορητικών μεθόδων έχει φανεί σημαντική ποικιλομορφία της VDBP τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πρωτεύοντα θηλαστικά. Εκτός από τα 3 πολύ γνωστά αλληλόμορφα (Gc1F, Gc1S και Gc2), περισσότερα από 120 σπάνια αλληλόμορφα έχουν ταυτοποιηθεί καθιστώντας τον γενετικό τόπο της VDBP έναν από τους πιο πολυμορφικούς που γνωρίζουμε. Η πρωταρχική δομή των Gc1F και Gc1S είναι ταυτόσημη με εξαίρεση τη θέση 416 όπου το ασπαρτικό οξύ αντικαθίσταται από το γλουταμικό οξύ. Τα Gc1F και Gc2 διαφέρουν σε ένα μόνο αμινοξύ όπου υπάρχει θρεονίνη αντί για λυσίνη. Η βασική σύνθεση των Gc1S και Gc2 χαρακτηρίζεται από δύο διαφορετικές υποκαταστάσεις σε αμινοξέα (στις θέσεις 416 και 420) οι οποίες εξηγούν τις διαφορές που παρουσιάζουν στα ισοηλεκτρικά τους σημεία (115, 116).

Όπως προαναφέρθηκε το γονίδιο της VDBP στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό. Παράλληλα παρουσιάζει και γεωγραφική κατανομή των τριών αλληλομόρφων της VDBP και έναν μεγάλο αριθμό μοναδικών φυλετικών παραλλαγών. Οι πληθυσμοί με ανοιχτό χρώμα δέρματος έχουν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα του Gc1F-αλληλομόρφου και υψηλότερη συχνότητα (50-60%) του Gc1S-αλληλομόρφου. Το Gc1F-αλληλόμορφο είναι ιδιαίτερα συχνό στους Αφροαμερικάνους και στους Αφρικανούς. Η συχνότητα των Gc1F-Gc1S-αλληλομόρφων παρουσιάζουν τυπική γεωγραφική κατανομή από την ανατολική Ασία, στην Ευρώπη και από την Ευρώπη στη μέση Ανατολή και την Αφρική. Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των πληθυσμών αυτών είναι η μικρότερη επικράτηση του Gc2-αλληλομόρφου συγκριτικά με το Gc1-αλληλόμορφο. Αντίθετα με τους υπόλοιπους πληθυσμούς οι Καυκάσιοι παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα του Gc2-αλληλομόρφου. Η παρατηρούμενη ποικιλομορφία στις συχνότητες των Gc-αλληλομόρφων σε διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές είναι πιθανό να σχετίζεται με τη χρώση του δέρματος και την ένταση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. Οι πιο σκουρόχρωμοι τύποι δέρματος χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο ποσοστό διαπερατότητας στη UV ακτινοβολία και υψηλότερη ευαισθησία στην εμφάνιση ραχίτιδας. Η υψηλότερη συχνότητα του Gc1F σε ανθρώπους με σκούρο τύπο δέρματος μπορεί να εξηγηθεί από τη μεγαλύτερη συγγένεια και την πιο αποτελεσματική μεταφορά των μεταβολιτών της Βιταμίνης D (117).

2.5.1 Λειτουργίες της VDBP

Η κύρια λειτουργία της VDBP είναι η διαλυτοποίηση και η μεταφορά της βιταμίνης D και των μεταβολιτών της (118). Κάθε μεταβολίτης της βιταμίνης D έχει τη δική του σταθερά συγγένειας. Η καλσιδιόλη προσδένεται στη VDBP σε ποσοστό 88% με υψηλή συγγένεια ($K_a=5 \times 10^{-8}$ M), ενώ η καλσιτριόλη, ο πιο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D προσδένεται με μικρότερη συγγένεια ($K_a=4 \times 10^{-7}$ M) (118). Αντίθετα με άλλες υδρόφοβες πρωτεΐνες στο ανθρώπινο πλάσμα, η VDBP έχει υψηλή συγκέντρωση συγκριτικά με τον κύριο προσδέτη της την καλσιτριόλη [0.32–0.46 g/L ή $5.52\text{--}7.93 \times 10^{-6}$ M] και λιγότερο από 5% των θέσεων πρόσδεσης της είναι κατειλημμένες από τους μεταβολίτες της βιταμίνης D (113). Η μεγάλη μοριακή περίσσεια της VDBP πιθανώς να κατέχει σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι της τοξικότητας από τη βιταμίνη D. Παράλληλα μπορεί να λειτουργήσει ως buffer για την αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ενεργών μεταβολιτών της βιταμίνης D ή ως δεξαμενή καλσιτριόλης (113, 118). Υπό φυσιολογικές συνθήκες σχεδόν όλοι οι μεταβολίτες της βιταμίνης D που βρίσκονται στην κυκλοφορία είναι προσδεμένοι στην VDBP γεγονός που επηρεάζει σημαντικά τη φαρμακοκινητική της βιταμίνης D. Αξίζει να σημειωθεί πως μόνο 12-15% της βιταμίνης D συνδέεται με την αλβουμίνη, ενώ οι μεταβολίτες της που είναι προσδεμένοι στη VDBP παρουσιάζουν περιορισμένη πρόσβαση στα κύτταρα στόχους και είναι λιγότερο ευάλωτοι στον ηπατικό μεταβολισμό και στην επακόλουθη απέκκριση μέσω της χολής. Το

γεγονός αυτό παρατείνει το χρόνο ημίσειας ζωής τους στην κυκλοφορία. Πολλές μελέτες έχουν δείξει τη μεγάλη πρόσβαση των ελεύθερων μορφών της βιταμίνης D στα κύτταρα στόχους επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη βιολογική απάντηση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (119) (120, 121). Επιπλέον δεν έχει βρεθεί σε ανθρώπους απόλυτη έλλειψη της VDBP προτείνοντας πως μία ή περισσότερες λειτουργίες της είναι απαραίτητες για την ανθρώπινη βιωσιμότητα. Σε υγιείς γυναίκες η συγκέντρωση της καλσιτριόλης και της VDBP στο πλάσμα συσχετίζονται θετικά (114). Η εγκυμοσύνη και η θεραπεία με τα οιστρογόνα αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα της VDBP στο πλάσμα αυξάνοντας παράλληλα και τα επίπεδα της 1,25(OH)₂-βιταμίνης D₃. Ωστόσο το κλάσμα της 1,25(OH)₂-βιταμίνης D₃ το οποίο είναι βιολογικά ενεργό παραμένει ανέπαφο (122).

Στη μελέτη του Lauridsen και συν. αναφέρεται ότι ο φαινότυπος της VDBP καθορίζει τη μέση συγκέντρωση στο πλάσμα τόσο της καλσιδιόλης όσο και της καλσιτριόλης. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών της βιταμίνης D μειώνεται ως εξής: είναι υψηλότερη στο Gc-1 φαινότυπο, ενδιάμεση στο Gc1-2 και χαμηλότερη στο Gc2-2. Η συγκέντρωση της VDBP στο πλάσμα ακολουθεί το ίδιο πρότυπο. Οι ερευνητές προτείνουν ότι η χαμηλότερη συγκέντρωση της VDBP και της 25(OH)-βιταμίνης D₃ στον Gc2 φαινότυπο σχετίζεται με ταχύτερο μεταβολισμό του Gc2 συγκριτικά με τον Gc1. Η συγκέντρωση της 1,25(OH)₂-βιταμίνης D₃ σχετίζεται με τη συγκέντρωση της VDBP ενώ κάθε φαινότυπος της VDBP έχει συγκεκριμένο ποσοστό 25(OH)-βιταμίνης D₃ (123) (124).

Η συγκέντρωση της VDBP ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο, το οποίο χαρακτηρίζεται από μείωση της συγκέντρωσης της το πρωί και ταχεία αύξηση κατά τη διάρκεια της ημέρας μέχρι να φθάσει σε ένα πλάτο. Ο ρυθμός που ακολουθεί η VDBP κατά τη διάρκεια της ημέρας σχετίζεται με το ρυθμό της 1,25(OH)₂-βιταμίνης D₃ και με τη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα (125).

Πολλές σκελετικές διαταραχές όπως (η πρωτοπαθής οστεοπόρωση, ο πρωτοπαθής και ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, και η οστεομαλακία) συνοδεύονται από φυσιολογικές τιμές VDBP (126). Αντίθετα με τη βιταμίνη A, η οποία διευκολύνει την απέκκριση από το ήπαρ της πρωτεΐνης που προσδένεται στη ρετινόλη οι μεταβολίτες της βιταμίνης D δεν ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της VDBP στο πλάσμα (113).

2.6 Vitamin D Receptor-VDR

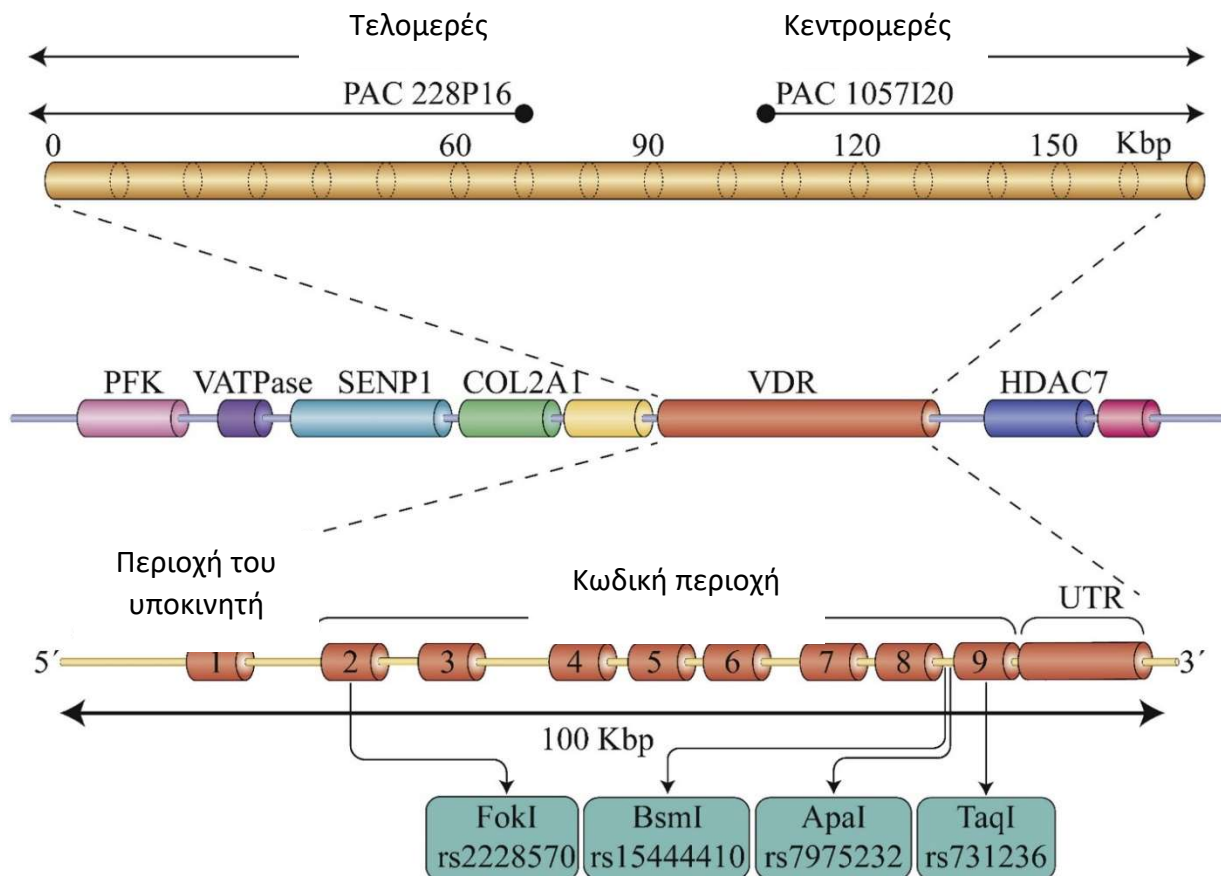
Το γονίδιο του VDR, το οποίο έγινε γνωστό το 1997 από τους Miyamoto και συν. (127), εδράζεται στο χρωμόσωμα 12, στη θέση 12q12-q14 και αποτελείται από 9 εξόνια (Εικόνα 4). Το μη κωδικοποιούμενο 5' - άκρο του γονιδίου αποτελείται από τα εξόνια 1A, 1B, και 1C. Πριν το εξόνιο 1A εντοπίζεται ο υποκινητής του γονιδίου, μία περιοχή πλούσια σε GC. Το γονίδιο του VDR και η περιοχή του υποκινητή του εμφανίζουν μήκος, περίπου 80kb και είναι ιδιαίτερα

πλούσιοι σε πολυμορφισμούς. Υπολογίζονται 100 πολυμορφισμοί σε όλο το μήκος του γονιδίου του VDR, οι οποίοι είναι SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLPs, restriction fragment length polymorphisms) ονομάζονται οι SNPs όταν απαλείφουν ή προσθέτουν με τυχαίο τρόπο θέσεις αναγνώρισης για ενδονουκλεάσες περιορισμού. Κάποιοι από τους πολυμορφισμούς αυτούς φαίνεται να έχουν λειτουργικό αποτέλεσμα και κάποιοι άλλοι να συνδέονται με την εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων όπως το άσθμα. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το ότι οι πολυμορφισμοί δείκτες είναι συχνά σε γενετική σύνδεση (LD, linkage disequilibrium,) με λειτουργικούς πολυμορφισμούς (128). Γενετική σύνδεση (linkage), δύο ή περισσότερων γονιδίων του DNA, ονομάζεται η τάση τους να συγκληρονομούνται με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι αναμένεται από την τυχαία κατανομή των γονιδίων. Τα συνδεδεμένα γονίδια ή οι δείκτες DNA συγκληρονομούνται επειδή βρίσκονται πολύ κοντά κατά μήκος ενός χρωμοσώματος. Ανισορροπία σύνδεσης (LD, linkage disequilibrium) καλείται η συσχέτιση μεταξύ των αλληλίων διαφόρων πολυμορφισμών μέσα σε ένα πληθυσμό (129). Η μικρή συχνότητα ανασυνδυασμού κατά τη διάρκεια του χρόνου, σε μια συγκεκριμένη περιοχή ενός γονιδίου, οδηγεί στη συχνή συνύπαρξη συγκεκριμένων αλληλίων. Πολλές φορές, η εύρεση ενός αλληλίου μπορεί να προβλέψει την ύπαρξη ενός άλλου που είναι σε σύνδεση με αυτό. Σε περιπτώσεις στις οποίες υπάρχει υψηλό επίπεδο σύνδεσης LD, συγκεκριμένα αλληλία δημιουργούν ομάδες οι οποίες ονομάζονται απλότυποι (129).

Στην αρχή του εξονίου 2, στην περιοχή που αντιστοιχεί στο σημείο έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου του VDR βρίσκεται ένας λειτουργικός SNP πολυμορφισμός. Ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίστηκε μέσω της ενδονουκλεάσης περιορισμού Fok I και για το λόγο αυτό πήρε και το όνομα της. Δύο σημεία έναρξης της μετάφρασης (ATG) προκύπτουν από την εναλλαγή θυμίνης-κυτοσίνης (ACG αντί για ATG) στο πρώτο στη σειρά πιθανό σημείο και δύο πιθανά αλληλία (F και f) προκύπτουν από τον πολυμορφισμό αυτό. Το αλληλίο F (ACG) κωδικοποιεί μια μικρότερη σε μήκος και πιο δραστική πρωτεΐνη VDR συγκριτικά με το αλληλίο f (ATG) το οποίο κωδικοποιεί μία μεγαλύτερη σε μήκος και λιγότερο λειτουργική πρωτεΐνη (130). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει την ιδιαιτερότητα ότι δεν είναι σε σύνδεση με κανένα άλλο πολυμορφισμό κατά μήκος του γονιδίου του VDR. Επιπλέον, η περιοχή γενετικής σύνδεσης (LD) γύρω από το δείκτη αυτό είναι πολύ μικρή. Συνεπώς, είναι μικρή και η πιθανότητα οι συσχετίσεις με ασθένειες που αποδίδονται σε αυτό τον πολυμορφισμό να αποδοθούν σε κάποιον άλλο που είναι σε σύνδεση μαζί του. Πρόκειται επομένως για έναν λειτουργικό πολυμορφισμό, ο οποίος σχετίζεται με την ικανότητα της παραγομένης πρωτεΐνης του VDR να ενισχύει ή να καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (130). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι πολυμορφισμοί στις μελέτες συσχέτισης, είναι αυτοί οι οποίοι βρίσκονται κοντά στο 3' άκρο (3' UTR: 3' Untranslated Region) του γονιδίου του VDR και συγκεκριμένα στο εσώνιο 8 (BsmI, ApaI) και το εξόνιο 9 (TaqI). Οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν έχουν γνωστή

λειτουργία και καθορίζονται από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BsmI, TaqI, ApaI. Οι πιο γνωστοί από αυτούς προκύπτουν από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BsmI, TaqI και ApaI και τα αλληλία τους είναι αντίστοιχα τα Bb, Tt, και Aa. Οι τρεις αυτοί δείκτες του DNA συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους σε απλότυπους, οι πιο συχνοί από τους οποίους είναι οι baT, BAa και bAT στην καυκάσια φυλή (130). Δεν είναι λειτουργικοί, αλλά φαίνεται ότι είναι σε σύνδεση με λειτουργικούς πολυμορφισμούς οι οποίοι εκτείνονται μέσα στην 3'UTR περιοχή του γονιδίου. Είναι γνωστό, ότι η περιοχή 3'UTR των γονιδίων είναι ρυθμιστική και συσχετίζεται με την έκφραση τους στα διάφορα κύτταρα, κυρίως μέσω της ρύθμισης της σταθερότητας του παραγόμενου mRNA σε αυτά.

Το γονίδιο του VDR λοιπόν θεωρείται ένα πλειοτροπικό γονίδιο το οποίο συνδέεται με πολλά αυτοάνοσα, φλεγμονώδη αλλά και αλλεργικά νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα σε μία μετα-ανάλυση φάνηκε ότι οι πολυμορφισμοί TaqI, BsmI και FokI ενισχύουν την ανάπτυξη του άσθματος. Ο FokI μάλιστα αλληλοεπιδρά με την ηλικία και το φύλο τροποποιώντας τον κίνδυνο για το άσθμα, ο οποίος επηρεάζεται και από τα επίπεδα της 25(OH)D (131). Παράλληλα σε μία άλλη μελέτη που περιλάμβανε ασθενείς με άσθμα και μάρτυρες, φάνηκε ότι το αλληλίο F και ο γονότυπος FF του πολυμορφισμού FokI ασκούν προστατευτικό ρόλο στους ασθενείς με άσθμα (132). Επίσης όταν μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί αυτοί στα παιδιά με άσθμα φάνηκε να υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της 25(OH)D και στο αλληλίο C του FokI. Τα παιδιά με άσθμα που έφεραν το αλληλίο αυτό χρειαζόταν θεραπεία για τον έλεγχο του άσθματος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (133). Το φαινόμενο αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από μία μελέτη που έγινε στη χώρα μας σε ασθματικά παιδιά, στην οποία φάνηκε ότι ο γονότυπος aa του πολυμορφισμού ApaI είχε θετική συσχέτιση με τον έλεγχο του άσθματος και τους λιγότερους περιορισμούς στις καθημερινές δραστηριότητες στα παιδιά με άσθμα (134). Σε μία αντίστοιχη μελέτη που έγινε στην Κύπρο σε ασθματικά παιδιά φάνηκε να σχετίζεται ο γονότυπος tt του πολυμορφισμού TaqI με την εκδήλωση του άσθματος στα παιδιά αυτά.



Εικόνα 4 Δομή του γονιδίου του VDR το οποίο περιέχει 9 εξόνια και πολλούς πολυμορφισμούς SNPs όπως ο ApaI, ο BsmI, ο FokI και ο TaqI. Πηγή: Mohammadi A et al. *Vitamin D receptor ApaI, BsmI, FokI, and TaqI gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in an Iranian population: A systematic review and meta-analysis*, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, December 2020

Ο πολυμορφισμός αυτός ενίσχυε την ανάπτυξη του άσθματος στα παιδιά κυρίως όταν τα επίπεδα της βιταμίνης D ήταν φυσιολογικά (135). Όπως φαίνεται οι τέσσερις αυτοί πολυμορφισμοί του VDR TaqI, BsmI, FokI και ApaI έχουν μελετηθεί αρκετά σχετικά με το άσθμα και λιγότερο σχετικά με την τροφική αλλεργία. Σε μία μελέτη στην Κίνα που περιλάμβανε παιδιά με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με τον πολυμορφισμό FokI (136). Ωστόσο, δεν έχει γίνει κάποια άλλη μελέτη που να ερευνά τη συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς του VDR και τα παιδιά με τροφική αλλεργία.

2.7 Βιταμίνη D, ανοσοποιητικό σύστημα και τροφική αλλεργία

Πέρα από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η βιταμίνη D στην ομοιοστασία του ασβεστίου και της φυσιολογίας των οστών, ο μεταβολισμός της και συγκεκριμένα η μετατροπή της 25(OH)D στην 1,25(OH)₂D έχει επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα, στα T κύτταρα, στα B κύτταρα και στις λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων οι οποίες είναι σημαντικές τόσο για τη

φυσική όσο και για την επίκτητη ανοσία (137, 138). Με αυτόν τον τρόπο η έλλειψη της βιταμίνης D επιδρά α) στην ανάπτυξη λοιμώξεων αλλά και β) στην εμφάνιση τροφικής αλλεργίας όπως θα εξηγήσουμε αναλυτικά παρακάτω.

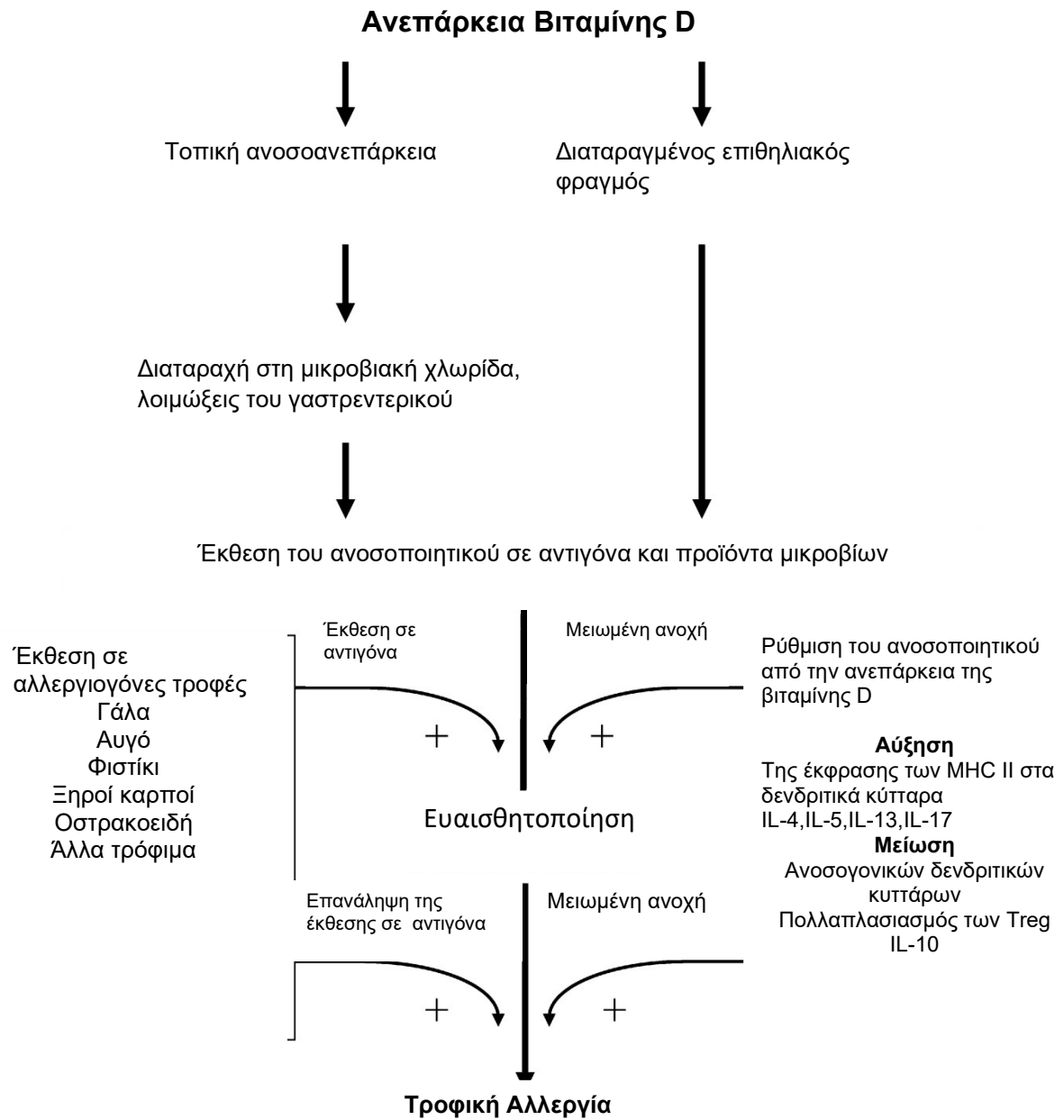
Η έλλειψη της βιταμίνης D χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή 25(OH)D η οποία είναι απαραίτητη για τη μετατροπή σε 1,25(OH)₂D και οδηγεί σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως η οστεοπενία και η ευπάθεια για λοιμώξεις (139). Επίσης οι μεταβολίτες της βιταμίνης D συνεισφέρουν στην άμυνα ενάντια στη διαταραχή του επιθηλίου διεγείροντας την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως η καθελιδίνη (140). Η 1,25(OH)₂D επηρεάζει την ενσωμάτωση του μικροβιώματος του ξενιστή μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των μορίων που αναγνωρίζουν τα μικρόβια όπως το NOD2, το CD14, και ο Toll-like receptor 2 (141). Δεδομένα από άλλες μελέτες περιγράφουν πιθανούς μηχανισμούς μέσα από τους οποίους η έλλειψη βιταμίνης D μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη λειτουργία του εντερικού φραγμού σε συνδυασμό με την ευπάθεια για λοιμώξεις (Εικόνα 5). Πειραματικά έχει φανεί ότι η 1,25(OH)₂D έχει προστατευτικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου και στην απόκριση σε πιθανή βλάβη (142). Η διαταραχή της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού επηρεάζει και την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας. Για παράδειγμα το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο tacrolimus σχετίζεται με τη διαταραχή του εντερικού φραγμού και με αυξημένο κίνδυνο για τροφική αλλεργία. Είναι πιθανό η έλλειψη της βιταμίνης D να δρα συνεργικά με τις λοιμώξεις στη διαταραχή της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού με αποτέλεσμα να αυξάνουν την έκθεση του ανοσοποιητικού στα τροφικά αλλεργιογόνα και να συνεισφέρουν στην ευαισθητοποίηση και στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας. Έχει παρατηρηθεί ότι η εντερική διαπερατότητα και η παρουσία τροφικών αλλεργιογόνων στην κυκλοφορία αυξάνονται κατά τη διάρκεια μιας οξείας γαστρεντερίτιδας (143). Μέσα από τη διαταραχή του εντερικού φραγμού τα προϊόντα των μικροβίων μπορεί να προάγουν τη φλεγμονή και την ευαισθητοποίηση στα τροφικά αλλεργιογόνα.

Αυτό συμβαίνει καθώς η βιταμίνη D, περιορίζει την απάντηση των Th1/Th2 κυττάρων μέσω της μείωσης της παραγωγής των κυτταροκινών από τα T κύτταρα, και ειδικότερα από τα Th2 κύτταρα που ενισχύουν την ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας. Επιπλέον τα πειράματα με ανθρώπινα B κύτταρα έχουν δείξει ότι η 1,25(OH)₂D μπορεί άμεσα να καταστείλει την παραγωγή της IgE και να διεγείρει την παραγωγή της IL-10 (144, 145). Έχει παρατηρηθεί ότι όταν στα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα προστίθεται η 1,25(OH)₂D αυτά έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τα CD4⁺ T κύτταρα σε T ρυθμιστικά κύτταρα που παράγουν IL-10 και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Παράλληλα, η 1,25(OH)₂D προάγει μηχανισμούς απαραίτητους για την απόκτηση ανοσολογικής ανοχής (146). Πιο συγκεκριμένα καταστέλλει τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στην αλλεργία και συμβάλλει στην ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού. Ανάμεσα στις λειτουργίες της βιταμίνης D που συνεισφέρουν στην ανοχή είναι η επαγωγή των δενδριτικών κυττάρων, η

ανάπτυξη των CD4⁺, CD25⁺ Foxp3 (Treg) T ρυθμιστικών κυττάρων, η ενεργοποίηση των T κυττάρων και η ανάπτυξη αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10 (147, 148).

Μία μελέτη από το εθνικό ινστιτούτο υγείας και διατροφής απέδειξε ότι τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της ολικής IgE. Ο Rochat και οι συν. (149) συνέδεσαν τα επίπεδα της βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με μηχανισμούς ανοχής καθώς παρατήρησαν ότι η πρόσληψη συμπληρώματος βιταμίνης D3 από τις μητέρες σχετίζεται με έκφραση γονιδίων που επάγουν την ανοχή στο αίμα του ομφάλιου λώρου.

Συμπερασματικά, η έλλειψη βιταμίνης D σε συνδυασμό με τη διαταραχή της ανοχής του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνουν την ευπάθεια για λοιμώξεις και αλλάζουν τη μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα οι λοιμώξεις του γαστρεντερικού να επιτρέπουν την διαταραχή του φραγμού και την επακόλουθη είσοδο σε αυτόν μικροβιακών αντιγόνων και άλλων παθογόνων. Στη συνέχεια οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργικά και προωθούν την αλλεργική απόκριση στα τροφικά αλλεργιογόνα η οποία εκδηλώνεται ως τροφική αλλεργία στους ασθενείς με το γενετικό υπόβαθρο.



Εικόνα 5 Πιθανό μοντέλο για την παθογένεση της τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία. Η έλλειψη βιταμίνης D συνεισφέρει σε λοιμώξεις του ΓΕΣ και διαταραχή της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, Πηγή: Vassallo M.F et al, Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children, J Allergy Clin Immunol, 2010

3. Τροφική αλλεργία

3.1 Ορισμός

Τροφική αλλεργία ονομάζεται η ανοσιακά μεσολαβούμενη ανεπιθύμητη αντίδραση που εμφανίζεται μετά την έκθεση σε συστατικά τροφών (κυρίως πρωτεΐνες) που φυσιολογικά δεν εγείρουν τέτοια απάντηση και είναι καλά ανεκτές από το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού (150).

Τα τροφικά αντιγόνα αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ξένο αντιγονικό φορτίο που καλείται να αντιμετωπίσει το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Στη συντριπτική πλειονότητα των ατόμων αναπτύσσεται ανοχή. Όταν αποτύχει να αναπτυχθεί ανοχή, το ανοσοποιητικό αποκρίνεται με αντίδραση υπερευαισθησίας, η οποία μπορεί να είναι IgE-μεσολαβούμενη, μη-IgE-μεσολαβούμενη ή μικτή.

3.1.1 Είδη Τροφικής αλλεργίας

3.1.1.1 IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία

Οι IgE-μεσολαβούμενες αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από οξεία έναρξη των συμπτωμάτων μέσα σε δύο ώρες από τη βρώση ή την έκθεση στην υπεύθυνη τροφή (Πίνακας 2). Η αλλεργική ευαισθητοποίηση επιτυγχάνεται όταν τα ειδικά IgE (sIgE) αντισώματα, που παράγονται μετά από διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων σε απάντηση ενός αντιγονικού ερεθίσματος, συνδέονται μέσω ειδικών υποδοχέων με τα μαστοκύτταρα (σιτευτικά) και τα βασεόφιλα, και κατά δεύτερο λόγο με τα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα και αιμοπετάλια (φάση ευαισθητοποίησης). Κατά την επανέκθεση του ατόμου στο υπεύθυνο αντιγόνο, τα sIgE αντισώματα της επιφάνειας των μαστοκυττάρων και των βασεοφίλων γεφυρώνονται από το ειδικό αντιγόνο και ενεργοποιείται σειρά αλληλοδιαδόχων αντιδράσεων που οδηγούν στην αποκοκκίωση και απελευθέρωση των προσχηματισμένων χημικών μεσολαβητών, όπως ισταμίνης και σεροτονίνης και την παραγωγή των νεοσχηματιζόμενων μεσολαβητών, όπως προσταγλανδινών και λευκοτριενών (φάση ενεργοποίησης). Το αποτέλεσμα της δράσης όλων των προαναφερθέντων μεσολαβητών είναι η πρόκληση βλάβης στους ιστούς διαφόρων οργάνων (εκτελεστική φάση) (Εικόνα 6) (151).

3.1.1.2 Μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία

Υπάρχουν τρεις κύριες κλινικές οντότητες μη IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας. Αυτές είναι το σύνδρομο της εντεροκολίτιδας που επάγεται από τις πρωτεΐνες της τροφής (Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome, FPIES), το σύνδρομο της πρωκτοκολίτιδας που επάγεται από τις πρωτεΐνες της τροφής (Food Protein-Induced Proctocolitis, FPIP) καθώς και οι εντεροπάθειες που επάγονται από τις πρωτεΐνες της τροφής.

Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις καταστάσεις δεν είναι πλήρως κατανοητοί όμως φαίνεται σημαντική η εμπλοκή του TNFα. Μία πρόσφατη μελέτη βρήκε επίσης μία πιθανή σύνδεση με τα Th2 κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στην IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία. Στην περίπτωση αυτή παρόλο που δεν παράγονται IgE αντισώματα, τα T κύτταρα φαίνεται να έχουν μία τάση προς μία Th2 απάντηση. Παράλληλα τα υψηλά επίπεδα της IL-13 και του TNFα μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή του επιθηλίου του εντερικού βλεννογόνου και στη διήθηση αυτού με ηωσινόφιλα (152). Επίσης στην κατηγορία αυτή, αξίζει να αναφερθεί και το σύνδρομο Heiner, που αποτελεί σπάνια πνευμονική νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από πνευμονική αιμορραγία με συνέπεια την πνευμονική αιμοσιδήρωση. Προκαλείται από αντίδραση υπερευαισθησίας στην πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος. Συνήθως αφορά στα βρέφη και μπορεί να συνοδεύεται από χρόνιες πνευμονικές διηθήσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μη IgE μεσολαβούμενες αντιδράσεις (με εξαίρεση το σύνδρομο Heiner) απαντώνται σχεδόν πάντα στην παιδική ηλικία και σπάνια στην ενήλικη ζωή (153).

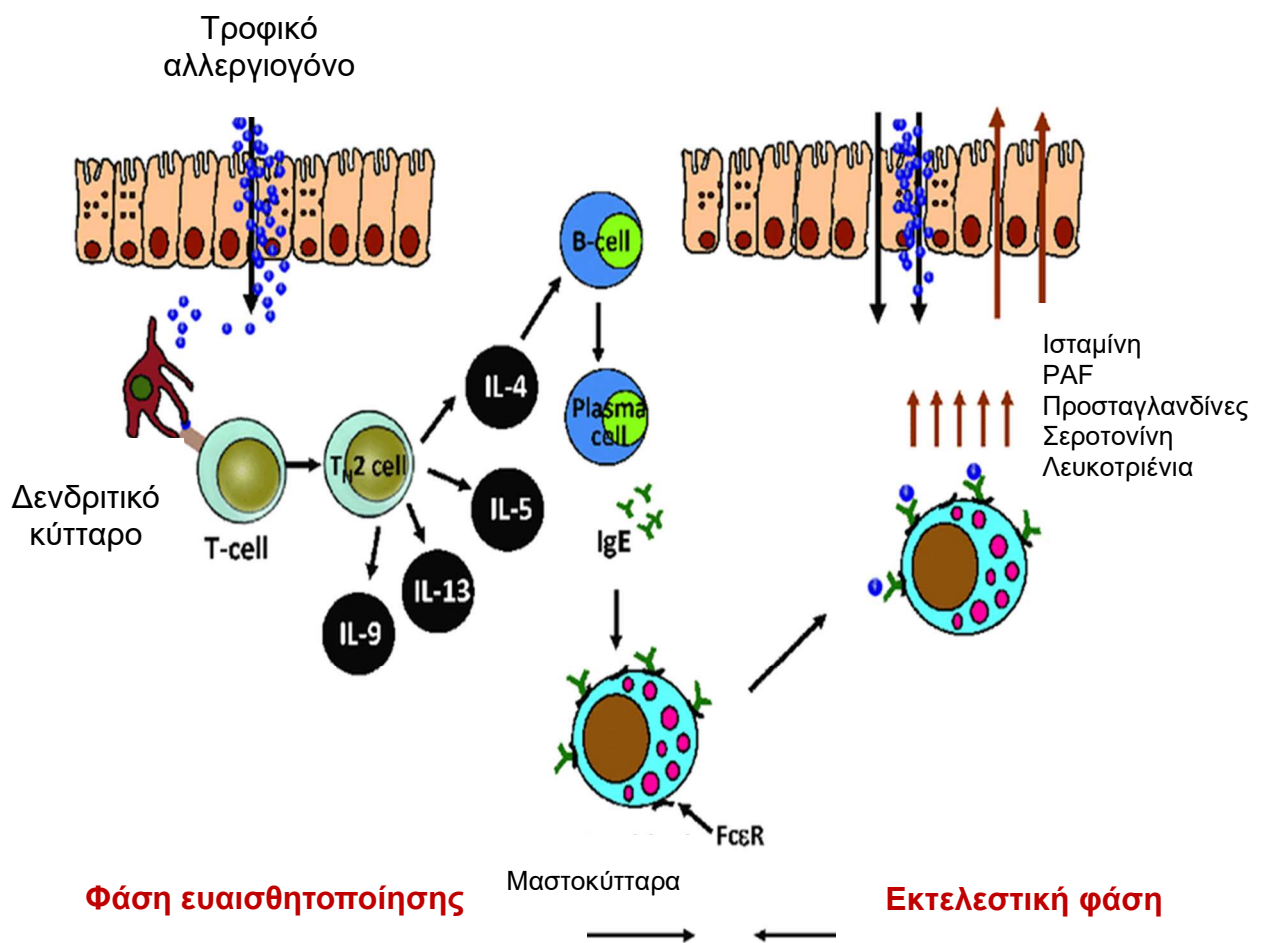
3.1.1.3 Μικτή IgE- και μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία

Οι καταστάσεις οι οποίες σχετίζονται με την τροφική αλλεργία και περιλαμβάνουν τόσο IgE όσο και μη IgE μηχανισμό περιλαμβάνουν: την αλλεργία στο αγελαδινό γάλα, την ηωσινοφιλική οισοφαγίτιδα, την ηωσινοφιλική γαστρεντερίτιδα αλλά και την ατοπική δερματίτιδα. Στις φλεγμονώδεις διαταραχές που είναι πλούσιες σε ηωσινόφιλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η τροφική αλλεργία ενέχεται στην παθογένεση τους παρόλο που η υπεύθυνη τροφή δεν σχετίζεται σημαντικά με την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Αντίθετα στην ατοπική δερματίτιδα, η οποία είναι μία χρόνια φλεγμονώδης δερματική νόσος που χαρακτηρίζεται από έντονο κνησμό και υποτροπιάζουσες εκζεματικές αλλοιώσεις του δέρματος, σε ένα από τα τρία παιδιά με μέτρια έως και σοβαρή νόσο συνυπάρχει τροφική αλλεργία, με πιο συχνά αίτια το αυγό και το γάλα (154).

3.1.1.4 Δυσανεξία στην τροφή

Η δυσανεξία στις διάφορες τροφές αφορά ανεπιθύμητες αντιδράσεις οι οποίες δεν περιλαμβάνουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Περιγράφονται πιο συχνά από την τροφική αλλεργία και κάποιες από αυτές αφορούν μία οργανική παθοφυσιολογική διαδικασία όπως η δυσανεξία στη λακτόζη και στη φρουκτόζη. Άλλες τροφές που μπορεί να προκαλέσουν αντίστοιχες αντιδράσεις αφορούν την καφεΐνη στα αφεψήματα και την τυραμίνη. Τα συμπτώματα στις περιπτώσεις της δυσανεξίας μέχρι πολλές ώρες μετά την κατανάλωση του φαγητού και μπορεί να έχουν διάρκεια από μερικές ώρες μέχρι μερικές μέρες. Η ταυτοποίηση των υπεύθυνων τροφών μπορεί να είναι δύσκολη καθώς ένας ασθενής μπορεί να επηρεάζεται

από αρκετές ομάδες τροφίμων. Τα προσθετικά των τροφίμων όπως το γλουταμικό νάτριο και οι ενώσεις του θείου μπορούν επίσης να προκαλέσουν αντίστοιχες αντιδράσεις. Τα συμπτώματα που προκύπτουν από τη δυσανεξία στην τροφή είναι αντίστοιχα με αυτά της τροφικής αλλεργίας απλά εκδηλώνονται καθυστερημένα και ο ορολογικός έλεγχος με τα ειδικά IgE είναι αρνητικός (154, 155). Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν τις γαστρεντερικές διαταραχές, την κεφαλαλγία, την κόπωση αλλά και προβλήματα από το μυοσκελετικό σύστημα. Αυτά τα συμπτώματα βρίσκονται στο φάσμα των συχνών ανεξήγητων ιατρικών καταστάσεων που συνυπάρχουν με την ινομυαλγία και το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου.



Εικόνα 6 Μηχανισμός IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας (Τροποποιημένο από: Lee JB. Immune Net 2016) Lee JB. Regulation of IgE-Mediated Food Allergy by IL-9 Producing Mucosal Mast Cells and Type 2 Innate Lymphoid Cells. Immune Netw. 2016 Aug;16(4):211-8

Πίνακας 2 Συμπτώματα τροφικής αλλεργίας ανάλογα με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό.

Πηγή: Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: a practice parameter update-2014. J Allergy Clin Immunol 2014.

Σύστημα	Καρδιαγγειακό	Δέρμα	Αναπνευστικό	Γαστρεντερικό
IgE μεσολαβούμενες αντιδράσεις	αναφυλαξία	κνίδωση	Ρινική συμφόρηση	Ναυτία
	υπόταση	αγγειοοίδημα	ρινόρροια	Έμετοι
	αρρυθμία	ερυθρότητα	βράγχος φωνής	Κολικοειδές κοιλιακό άλγος
	υπνηλία	κνησμός	Λαρυγγικό οίδημα	
	συγκοπή		σιγμός	
			βήχας	
			Σφίξιμο στο στήθος	
			Δύσπνοια	
Μη-IgE μεσολαβούμενες αντιδράσεις		Επιδείνωση ατοπικής Δερματίτιδας	Βρογχόσπασμος	
			Ρινική συμφόρηση	Απώλεια όρεξης
			ρινόρροια	Ναυτία
			Βήχας	Έμετοι
			αιμόπτυση	Κοιλιακό άλγος
				Γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση
Μικτές: IgE και μη-IgE μεσολαβούμενες αντιδράσεις		Επιδείνωση ατοπικής Δερματίτιδας		Αιματοχεσία
				Βλεννοαιματηρές κενώσεις
				Έμετος - παλινδρόμηση
				Κοιλιακό άλγος
				Οπισθοστερνικό καύσος

3.2 Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου

Οι τροφικές αλλεργίες επηρεάζουν το 10% των παιδιών σε πολλές χώρες του κόσμου και αυξάνονται συνεχώς τις τελευταίες δεκαετίες (156). Η επίπτωση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας είναι υψηλότερη στη βρεφική και στην πρώιμη νηπιακή ηλικία, με τα υψηλότερα ποσοστά να αφορούν την αλλεργία στο αυγό και στο αγελαδινό γάλα οι οποίες συνήθως υποχωρούν αργότερα στην όψιμη παιδική ηλικία. Αντίθετα, η αλλεργία στο φιστίκι και στους ξηρούς καρπούς, η οποία επίσης εμφανίζεται στη βρεφική ηλικία είναι λιγότερο πιθανό να υποχωρήσει και είναι αυτή που κυριαρχεί αργότερα στην παιδική ηλικία (157). Η επίπτωση της τροφικής αλλεργίας μεταξύ των χωρών φαίνεται να διαφέρει παρόλο που τα δεδομένα από κάποιες χώρες είναι ελλιπή (158, 159). Δεδομένα από πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην επίπτωση της τροφικής αλλεργίας ακόμη και

μεταξύ των ίδιων χωρών, με κάποιες από τις διαφορές να αφορούν τις αστικές και τις αγροτικές περιοχές, στις οποίες η επίπτωση είναι χαμηλότερη(160).

Οι παράγοντες που ενέχονται στην αύξηση της επίπτωσης είναι αρκετοί και με διαφορετική προέλευση. Ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας θεωρείται η ατοπική δερματίτιδα, που εμφανίζεται στη βρεφική ηλικία (160, 161). Το εύρημα αυτό έχει επιβεβαιωθεί από πληθυσμιακές μελέτες καθώς και από δεδομένα από αλλεργιολογικές κλινικές για πολλά χρόνια. Ωστόσο ο μηχανισμός αυτής της συσχέτισης δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Μία βασική υπόθεση αφορά την καταστροφή του δερματικού φραγμού που προκύπτει από την ατοπική δερματίτιδα η οποία στη συνέχεια επιτρέπει την απορρόφηση των τροφικών αλλεργιογόνων από το δέρμα οδηγώντας σε ευαισθητοποίηση στο συγκεκριμένο τρόφιμο ή σε τροφική αλλεργία (162).

Επίσης, οι μελέτες έχουν δείξει να υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα στην τροφική αλλεργία και στη γεωγραφική θέση ενός πληθυσμού. Πιο συγκεκριμένα, η αλλεργία στο βασιλικό πολτό εμφανίζεται συχνότερα στο Χονγκ-Κονγκ (163), η αλλεργία στη μουστάρδα στη Γαλλία (164), ενώ η επίπτωση της αλλεργίας στο φιστίκι ήταν 10 φορές μεγαλύτερη σε παιδιά με εβραϊκή καταγωγή που διέμεναν στο Ηνωμένο Βασίλειο συγκριτικά με παιδιά που έμεναν στο Ισραήλ (165). Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε περιβαλλοντικές αλλαγές που αφορούν την έκθεση στο αλλεργιογόνο ή τη διαφορετική προετοιμασία του. Θα μπορούσαν όμως να οφείλονται και σε γενετικές διαφορές σε πληθυσμούς με διαφορετική καταγωγή.

Εκτός από τη γεωγραφική κατανομή λοιπόν στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και το οικογενειακό ιστορικό ατοπίας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα όπου το ένα εκ των δύο παιδιών έχει 64% πιθανότητα να αναπτύξει αλλεργία στο φιστίκι εάν πάσχει το άλλο (166). Παράλληλα σε άλλες μελέτες έχει φανεί να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην τροφική αλλεργία και στο φύλο, κυρίως την αλλεργία στο φιστίκι και στους ξηρούς καρπούς. Αξίζει να σημειωθεί πως στη μελέτη των Sicherer και συν. ο λόγος αρρένων προς θήλεων παιδιών με αλλεργία στο φιστίκι ήταν 5, ενώ στους ενήλικες ο ίδιος λόγος ήταν λιγότερο από 1 (167). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και στη μελέτη του Emmett και συν. όπου σε πάνω από 16.000 παιδιά η επίπτωση της αλλεργίας στο φιστίκι ήταν σημαντικά υψηλότερη στα άρρενα παιδιά κάτω των 4 ετών συγκριτικά με τα θήλεα (168).

Επιπρόσθετα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της τροφικής αλλεργίας διαδραματίζει το γενετικό υπόβαθρο και συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι, οι οποίοι θα συζητηθούν αναλυτικά σε επόμενη ενότητα. Αναφορικά με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η βιταμίνη D είναι ένας από τους οποίους φαίνεται να την επηρεάζει σημαντικά. Η υπόθεση της βιταμίνης D υποστηρίζει ότι η ανεπάρκεια της που οφείλεται κυρίως σε μειωμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και στον περισσότερο χρόνο που ξοδεύουμε σε εσωτερικούς χώρους, ευθύνεται

για την αύξηση του άσθματος και των αλλεργιών. Ειδικότερα έχει φανεί σε μελέτες ότι η εποχή γέννησης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας, καθώς τα βρέφη που γεννιούνται το χειμώνα βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση τροφικής αλλεργίας (169). Επίσης η λήψη συμπληρώματος διατροφής από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για ευαισθητοποίηση σε κάποιο τροφικό αλλεργιογόνο (170).

3.3 Γενετική της τροφικής αλλεργίας

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας διαδραματίζουν οι γενετικοί παράγοντες όπως το οικογενειακό ιστορικό αλλά και συγκεκριμένα γονίδια. Σε μία μελέτη 622 οικογενειών στο Ηνωμένο Βασίλειο με ιστορικό αλλεργίας στο φιστίκι στο φάνηκε ότι η επίπτωση της αλλεργίας αυξανόταν στις επόμενες γενεές. Πιο συγκεκριμένα ένα παιδί είχε 5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για την ανάπτυξη αλλεργίας στο φιστίκι εάν είχε έναν αδερφό με την αλλεργία αυτή (171). Παράλληλα σε μία άλλη μελέτη οι συγγραφείς έδειξαν ότι η συχνότητα της αλλεργίας στο φιστίκι είναι σημαντικά υψηλότερη σε συγγενείς με αλλεργία στο φιστίκι από ότι στον γενικό πληθυσμό (7% vs 0.5%) (172).

Επιπλέον, ο Sicherer και οι συν. (166) παρατήρησαν ότι το ποσοστό εμφάνισης της αλλεργίας στο φιστίκι ήταν 64.3% σε μονοζυγωτικά δίδυμα έναντι 6.8% σε διζυγωτικά δίδυμα. Παράλληλα ο Howel και οι συν. σε μία άλλη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο (173) βρήκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συχνότητες των γονοτύπων HLA Class II HLA-DRB1, HLA-DQB1 και HLA-DPB1 σε ασθενείς με αλλεργία στο φιστίκι συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επίσης το αλληλόμορφο HLA-DRB1*07 φάνηκε να σχετίζεται σημαντικά με την αλλεργία στο μήλο (174). Ο Hand και οι συν. παρατήρησαν ότι η συχνότητα του HLA-B*07 και του HLA-DRB1*11 ήταν αυξημένη στους ασθενείς με αλλεργία στο φιστίκι συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (175).

Παράλληλα με τα γονίδια του HLA οι μεταλλάξεις του γονιδίου της φιλαγκρίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αλλεργίας στο φιστίκι ή ευαισθητοποίηση σε αυτό, σύμφωνα με μία μελέτη που περιλάμβανε πληθυσμό τόσο από την Ευρώπη όσο και από τον Καναδά. Η φιλαγκρίνη είναι μία πρωτεΐνη η οποία συνεισφέρει στη διατήρηση της ακεραιότητας του δερματικού φραγμού και οι μεταλλάξεις της σχετίζονται με την εμφάνιση ατοπικής δερματίτιδας (176).

Ένα άλλο γονίδιο που σχετίζεται με την τροφική αλλεργία είναι το CD14 το οποίο είναι ο υποδοχέας για τους λιποπολυσακχαρίτες. Σε μία μελέτη που αποτελούνταν από 175 ασθενείς με άσθμα και 77 ασθενείς με τροφική αλλεργία, διάφορων ηλικιών ο πολυμορφισμός C-159T στον υποκινητή του γονιδίου CD14 βρέθηκε να σχετίζεται με μη ατοπικό άσθμα και με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας (177). Ωστόσο μία άλλη μελέτη ανέφερε πως δεν βρέθηκε

κάποια συσχέτιση ανάμεσα σε δύο πολυμορφισμούς (C-159T and C-550T) του υποδοχέα του CD14 και της τροφικής αλλεργίας (178).

Το STAT6 (Signal transducer and activator of transcription) αποτελεί ένα κεντρικό μόριο στο μονοπάτι της μεταγωγής του σήματος το οποίο ρυθμίζεται από τις Ιντερλευκίνες 4 και 13 (IL-4,IL-13) στην αλλαγή των ισοτύπων της IgE κατά την παραγωγή των Th2 κυτταροκινών (179). Ο Amoli και οι συν. ανέφεραν ότι το αλληλίο G στον πολυμορφισμό G2964A του γονιδίου STAT6 εμφανιζόταν συχνότερα σε ασθενείς αλλεργικούς στο φιστίκι συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον φάνηκε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετιζόταν με τη σοβαρότητα της αλλεργίας στο φιστίκι (180). Ωστόσο η συσχέτιση αυτή δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί από τον Negro και συν. σε μία μελέτη με 220 παιδιά από την Ιαπωνία με τροφική αλλεργία (181).

Το SPINK5 (Serine protease inhibitor Kazal-type 5) αποτελεί μία πρωτεΐνη αναστολέα των πρωτεασών. Εκφράζεται στο θύμο αδένες και η λάθος έκφρασή του προκαλεί ανώμαλη ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων και οδηγεί σε Th2 αποκρίσεις όπως τα αυξημένα επίπεδα της IgE και η ηωσινοφιλία (182). Μία πρόσφατη μελέτη σε παιδιά με ατοπική δερματίτιδα στην Ιαπωνία έδειξε ότι οι ασθενείς με τον γονότυπο 1258AA ή 1258AG παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερη επίπτωση τροφικής αλλεργίας (183).

Η IL-13 αποτελεί μία ανοσορρυθμιστική κυτταροκίνη η οποία παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα Th2 κύτταρα. Οι πολυμορφισμοί της IL-13 έχουν συνδεθεί με το άσθμα σε πολλές μελέτες (184). Σε μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη στη Γερμανία που συμπεριλάμβανε παιδιά φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός C-1055T της IL-13 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ευαισθητοποίηση σε διάφορες τροφές (185).

Η IL-10 ρυθμίζει την έκφραση των Th1 κυτταροκινών, των αντιγόνων του MHC τάξης II και των μακροφάγων. Δύο SNPs σε αυτό το γονίδιο, το A-1082G και το C-627A, βρίσκονται στα φερόμενα σημεία σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα και συνδέονται με την παραγωγή αυτής της κυτταροκίνης (186). Ο Negro και οι συν. δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό C-627A της IL-10 και στη σοβαρότητα της τροφικής αλλεργίας σε 220 αλλεργικά παιδιά με καταγωγή από την Ιαπωνία (181). Πρόσφατα σε μία άλλη μελέτη που αφορούσε ατοπικά παιδιά οι συγγραφείς δεν παρατήρησαν σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό C-627A της IL-10 και στην επίπτωση της τροφικής αλλεργίας. Όμως ανέφεραν ότι τα παιδιά που έφεραν τον πολυμορφισμό IL-10 -1082AA είχαν 2.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν τροφική αλλεργία (187).

3.4 Παθοφυσιολογία της IgE τροφικής αλλεργίας

Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανοχής στα αντιγόνα. Η IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία προκύπτει ως αποτέλεσμα της

απώλειας της ακεραιότητας των στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία επάγουν την ανοχή και αποτρέπουν τα αβλαβή τροφικά αντιγόνα να αναγνωριστούν ως παθογόνα. Πιο συγκεκριμένα η ανοχή στην τροφή ορίζεται ως το πέρασμα του τροφικού αντιγόνου μέσα από τον επιθηλιακό φραγμό. Η φλεγμονή ή η καταστροφή του επιθηλιακού φραγμού μπορεί να επιτρέψει στα αντιγόνα να διαπεράσουν τον εντερικό φραγμό μαζί με άλλα παθογόνα. Όταν το επιθήλιο καταστρέφεται προάγεται η παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-25, η IL-33 και η TSLP (188). Οι μεσολαβητές αυτοί δρουν στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα και προάγουν τη δημιουργία του αλλεργικού Th2 φαινοτύπου. Στη συνέχεια τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα προάγουν την αλλεργία καθώς μεταναστεύουν στους λεμφαδένες όπου και παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα αρχέγονα T κύτταρα (189). Πιο συγκεκριμένα τα μόρια MHC των δενδριτικών κυττάρων παρουσιάζουν τα αντιγονικά πεπτίδια της τροφής στα αρχέγονα T κύτταρα και μέσα από την αλληλεπίδραση του OX40L στα δενδριτικά κύτταρα και του OX40 στα αρχέγονα T κύτταρα προκύπτει η μετατροπή των αρχέγονων T κυττάρων στα Th2 κύτταρα προωθώντας την ανάπτυξη της αλλεργικής αντίδρασης. Τα Th2 κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να μεταναστεύσουν έξω από τους λεμφαδένες στο χόριο του βλεννογόνου και να εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-5 και η IL-13, οι οποίες προωθούν περαιτέρω τη διαφοροποίηση των προφλεγμονωδών εκτελεστικών κυττάρων όπως τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα. Η IL-4 η οποία παράγεται από τα Th2 κύτταρα προάγει τη μετατροπή των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα για την παραγωγή IgE ανοσοσφαιρινών προκειμένου να εδραιωθεί η ευαισθητοποίηση και η αλλεργική αντίδραση στην τροφή. Επιπρόσθετα τα αρχέγονα T κύτταρα έχει φανεί να διαφοροποιούνται και σε Th9 κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της αλλεργικής αντίδρασης εκκρίνοντας IL-9 η οποία προάγει τη συσσώρευση των μαστοκυττάρων στους ιστούς (190), τα οποία μαζί με τα βασεόφιλα που βρίσκονται στην κυκλοφορία κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αλλεργίας. Όταν υπάρχουν στην κυκλοφορία η IL-10 και ο TGF- β , τα B κύτταρα μπορούν να παράγουν ανοσοσφαιρίνες IgA οι οποίες είναι σημαντικές για τη διατήρηση της ανοχής. Τα αυξημένα αντισώματα της IgA που στοχεύουν εναντίον της τροφής σχετίζονται με την απευαισθητοποίηση στους ασθενείς βρίσκονται σε από του στόματος ανοσοθεραπεία. Ο ακριβής μηχανισμός για την απόκτηση ανοχής μέσω της IgA δεν είναι γνωστός αλλά φαίνεται να εξαρτάται από το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (191). Επιπλέον η ανοχή προκύπτει από την έλλειψη ειδικών IgE αντισωμάτων εναντίον της τροφής. Στην περίπτωση αυτή τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα δεν μπορούν να αποκοκκιωθούν. Όταν παράγεται όμως η IL-4, τα B κύτταρα μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν ειδικά αντισώματα IgE εναντίον της τροφής προωθώντας την ευαισθητοποίηση και την αλλεργία. Τα αντισώματα αυτά στη συνέχεια προσδένονται στους υποδοχείς Fc ϵ R1 στα μαστοκύτταρα και στα βασεόφιλα τα οποία αποκοκκιώνονται και απελευθερώνουν στην κυκλοφορία μεσολαβητές

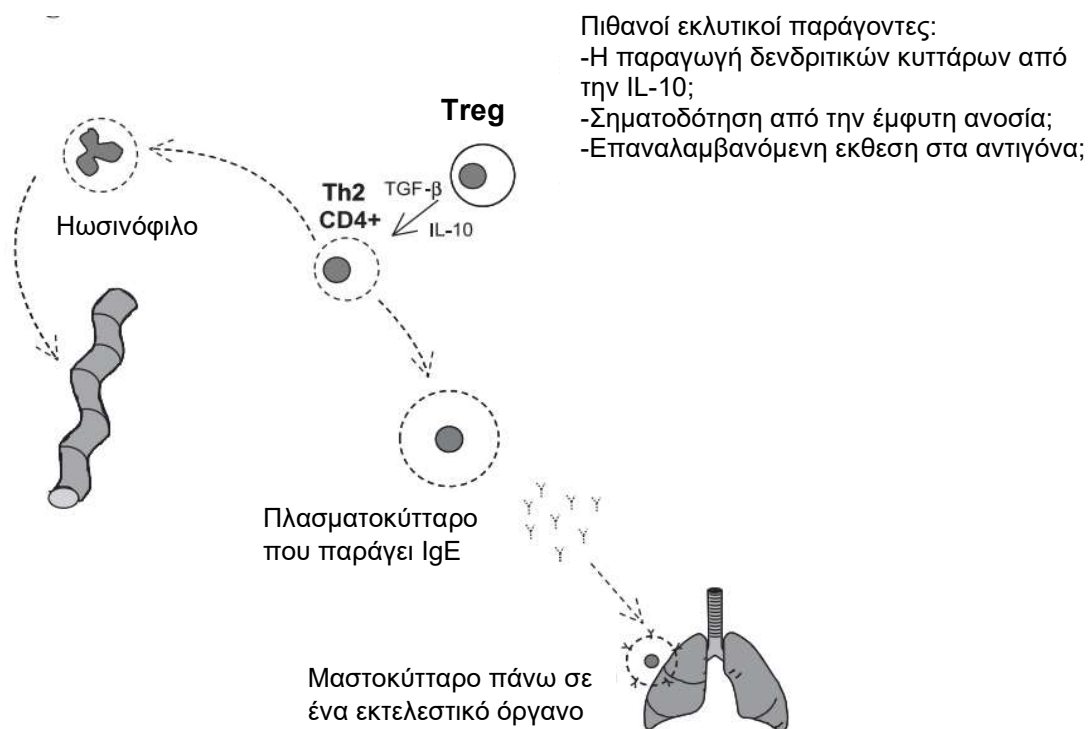
όπως η ισταμίνη, η τρυπτάση, ο παράγοντας PAF, (Platelet Activating Factor), οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια (192). Η ισταμίνη αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της αναφυλαξίας. Με την απελευθέρωσή της από τα ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα ή τα βασεόφιλα, η έναρξη της δράσης της είναι πολύ γρήγορη. Στην αναφυλαξία δρα στους H1 και στους H2 υποδοχείς και η διέγερση τους οδηγεί σε αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, αυξημένο καρδιακό ρυθμό και συσταλτικότητα.

Συνοψίζοντας, τα πέντε συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, το επιθήλιο, τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, τα T κύτταρα, τα B κύτταρα και τα εκτελεστικά κύτταρα (τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα) μπορούν είτε να ενισχύσουν την απόκτηση ανοχής απέναντι στα αντιγόνα της τροφής είτε να οδηγήσουν σε αλλεργικές αντιδράσεις. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επιδράσουν στο ανοσοποιητικό σύστημα.

3.5 Απόκτηση Ανοχής

Είναι γνωστό ότι η φυσική πορεία της τροφικής αλλεργίας εξαρτάται από την τροφή στην οποία ο ασθενής είναι αλλεργικός. Προοπτικές και αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα παιδιά με τροφική αλλεργία στο γάλα φαίνεται να ξεπερνούν την αλλεργία τους κατά την παιδική ηλικία (193), κάτι που συμβαίνει και με την αλλεργία στο αυγό (194). Ωστόσο η φυσική πορεία άλλων αλλεργιογόνων όπως το φιστίκι είναι διαφορετική, καθώς μόνο ένα 15-20% των ασθενών θα ξεπεράσουν την κλινική αντίδραση στην τροφή (195). Παράλληλα η φυσική πορεία της τροφικής αλλεργίας εξαρτάται και από προγνωστικούς παράγοντες όπως ο αρχικός τίτλος της ειδικής IgE. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση των τίτλων της ειδικής IgE συνοδεύεται από την απόκτηση ανοχής στα παιδιά. Παρόλο που ο μηχανισμός αυτός δεν είναι πλήρως κατανοητός, πιθανολογείται ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην απόκτηση ανοχής (Εικόνα 6). Μελέτες σε επίμυες έχουν δείξει πως όταν αυτοί έχουν αποκτήσει ανοχή στην τροφή έχουν υψηλότερα επίπεδα IL-10 και TGF- β που απελευθερώνονται από τα T κύτταρα συγκριτικά με αυτά των αλλεργικών επίμυων. Οι μελέτες σε ανθρώπους επιβεβαιώνουν τον πολύ σημαντικό ρόλο των T ρυθμιστικών κυττάρων στην απόκτηση ανοχής καθώς τα παιδιά που έχουν ξεπεράσει την τροφική αλλεργία έχουν αυξημένο αριθμό CD4+CD25+ T ρυθμιστικών κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο (196). Η ενίσχυση λοιπόν της παραγωγής της IL-10 σε περιβάλλοντα όπως το έντερο φαίνεται να αποτελεί μία επιλογή για την πρόληψη ή ακόμα και τη θεραπεία της τροφικής αλλεργίας. Σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η τροφική αλλεργία μπορεί να προληφθεί είτε με τη χορήγηση του *Lactococcus lactis* ο οποίος θα μπορούσε να παράγει IL-10 είτε με τη χορήγηση *Salmonella typhimurium* η οποία επίσης θα παρήγαγε IL-10 στο έντερο (197). Οι παραπάνω

μελέτες δείχνουν το σημαντικό ρόλο των T ρυθμιστικών κυττάρων στην απόκτηση ανοχής. Επιπλέον η ευαισθητοποίηση σε συγκεκριμένους επιτόπους παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκτηση ανοχής καθώς οι ασθενείς με τροφική αλλεργία συχνά είναι ευαισθητοποιημένοι στην καζεΐνη και οι ασθενείς με αλλεργία στο αυγό έχουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο επιτόπων που στοχεύουν τα IgE αντισώματα. Ωστόσο είναι ακόμη ασαφές το γιατί συγκεκριμένοι επίτοποι προδιαθέτουν σε πιο μακροχρόνια φυσική πορεία της νόσου (198). Συνοψίζοντας, είναι γνωστό ότι τα περισσότερα συμπτώματα της τροφικής αλλεργίας που εκδηλώνονται στην παιδική ηλικία προέρχονται από την αρχική αναγνώριση των αντιγόνων στο βλεννογόνο του εντέρου. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τα T κύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην απόκτηση ανοχής ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη στους μηχανισμούς αυτούς.



Εικόνα 7 Πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απόκτηση ανοχής στην τροφή. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα εκκρίνουν IL-10 και TGF-β οι οποίοι μπορεί να καταστείλουν την αρχική απόκριση του ανοσοποιητικού με την έκκριση IL-5 και τις αντιδράσεις που μεσολαβούνται από την IgE. Πηγή: Eigenmann PA *Mechanisms of food allergy*, *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 5–11

3.6 Χαρακτηριστικά των τροφικών αλλεργιογόνων

Παρόλο που θεωρητικά κάθε πρωτεΐνη της τροφής μπορεί να έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ευαισθητοποίηση στο ανοσοποιητικό σύστημα, περισσότερο από 90% των IgE μεσολαβούμενων τροφικών αλλεργιών στα παιδιά προκαλούνται από οκτώ τροφές: το

αγελαδινό γάλα, το αυγό, το φιστίκι, τους ξηρούς καρπούς, το σιτάρι, το ψάρι και τα οστρακοειδή. Ουσιαστικά τα τροφικά αλλεργιογόνα είναι γλυκοπρωτεΐνες με αντοχή στο μαγείρεμα και στην πέψη. Ένας μεγάλος αριθμός τροφικών αλλεργιογόνων έχει πλέον ταυτοποιηθεί όπως για παράδειγμα η β-λακταλβουμίνη στο αγελαδινό γάλα, η ονομουcoid (Gal d 1) στο αυγό και το *Arachis hypogaea 1* (Ara h 1) στο φιστίκι. Σε κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες, έχουν ταυτοποιηθεί συγκεκριμένοι επίτοποι, που αλληλεπιδρούν είτε με τα ειδικά για την τροφή IgE αντισώματα είτε με τους υποδοχείς των T κυττάρων. Η δομή των επιτόπων αυτών φαίνεται να έχει προγνωστικό ρόλο στην τροφική αλλεργία. Πιο συγκεκριμένα οι γραμμικοί επίτοποι σχετίζονται με αλλεργίες που υποχωρούν δύσκολα ενώ οι διαμορφωτικοί (τρισιδιάστατοι) επίτοποι σχετίζονται με παροδικές αλλεργίες (199). Αυτό συμβαίνει καθώς οι διαμορφωτικοί επίτοποι χάνουν τη δυνατότητα τους να προσδένονται στα αντισώματα IgE είτε λόγω μετουσίωσης από αυξημένη θερμοκρασία ή από τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, είτε λόγω πέψης (200).

3.6.1 Τροφικά αλλεργιογόνα

3.6.1.1 Αγελαδινό γάλα και αυγό

Η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα και στο αυγό επηρεάζουν τα πιο μικρά παιδιά και δεν είναι πάντα εύκολο να αναγνωριστούν καθώς πολλά από τα συμπτώματα μιμούνται κοινά συμπτώματα στα βρέφη όπως η ατοπική δερματίτιδα και ο έμετος. Αποτελούν τις πιο συχνές τροφικές αλλεργίες στην βρεφική – πρώιμη νηπιακή ηλικία και η επίπτωσή τους είναι 2,5% για το γάλα και 1,3% για το αυγό στην ηλικία του ενός έτους (201). Η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα είναι λίγο πιο σύνθετη καθώς μπορεί να είναι IgE μεσολαβούμενη, μη IgE μεσολαβούμενη και μικτή (202). Τα συμπτώματα στην IgE μεσολαβούμενη εκδηλώνονται μέχρι δύο ώρες από την κατανάλωση της τροφής και περιλαμβάνουν εμετό, κνίδωση, αγγειοίδημα και/ή συμπτώματα από το αναπνευστικό. Η διάγνωση γίνεται με τα δερματικά τεστ δια νυγμού ή τα ειδικά IgE στον ορό του αίματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερο όφελος για τη διάγνωση από την ανάλυση των ειδικών πρωτεϊνών του γάλακτος απέναντι στο ολικό γάλα (203). Ωστόσο τα ειδικά IgE για την πρωτεΐνη του αυγού Gal d 1 (ονομουcoid) φαίνεται να μπορούν να διακρίνουν τα ευαισθητοποιημένα παιδιά με κλινικά συμπτώματα από εκείνα που ανέχονται το αυγό σε ψημένη μορφή (204). Η πρόγνωση για την αλλεργία στο γάλα είναι καλή καθώς στο 57% των περιπτώσεων υποχωρεί μέχρι τα δύο έτη στην Ευρώπη (EuroPrevall, Europe, population-based, prospective) (205). Το αντίστοιχο ποσοστό για την αλλεργία στο αυγό είναι 47% σύμφωνα με μία μελέτη στην Αυστραλία. Επίσης οι τιμές των ειδικών IgE είναι διαγνωστικές για τη διάρκεια της αλλεργίας. Χαμηλές τιμές (<2 kU_A/L) οδηγούν σε γρήγορη υποχώρηση ενώ υψηλές τιμές levels (>50 kU_A/L) συνήθως οδηγούν σε επίμονη αλλεργία στο αυγό και στο γάλα μέχρι την εφηβική ηλικία χωρίς αυτό ωστόσο να έχει μελετηθεί εκτενώς

(201). Αναφορικά με τη θεραπεία αρχικά προτείνεται αποφυγή του γάλακτος και του αυγού αντίστοιχα. Το γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία μπορεί να γίνει καλά ανεκτό και μπορεί να βοηθήσει στην ανοχή στο μη μαγειρεμένο γάλα. Για το αυγό, έχει φανεί ότι πολλά παιδιά μπορούν να το ανεχθούν σε ψημένη μορφή (κέικ, μπισκότα) πριν το ανεχθούν ωμό. Η κατανάλωση ψημένου αυγού μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη της ανοχής στο λιγότερο μαγειρεμένο αυγό (206).

3.6.1.2 Κρέας

Το κρέας από οποιοδήποτε θηλαστικό μπορεί να προκαλέσει αλλεργία και σχετίζεται με τουλάχιστον τρεις διαφορετικές αλλεργίες, κυρίως την αλλεργία στο μοσχάρι, το σύνδρομο χοιρινού-γάτας και το σύνδρομο alpha-gal. Η αλλεργία στο κρέας των θηλαστικών θεωρείται σπάνια, ωστόσο τα τελευταία χρόνια οι αριθμοί φαίνεται να αυξάνονται κυρίως λόγω της αυξημένης αναγνώρισης των συμπτωμάτων και της διάγνωσης. Η αλλεργία στο βοδινό κρέας είναι κυρίως IgE μεσολαβούμενη με άμεσες αλλεργικές αντιδράσεις κυρίως στα μικρά παιδιά με ατοπία αλλά σπάνια συμβαίνει και στους ενήλικες (207). Περίπου 1% των παιδιών μπορεί να παρουσιάσει αλλεργία στο κρέας (208). Το πιο καλά χαρακτηρισμένο αλλεργιογόνο στο βοδινό είναι η bovine serum albumin Bos d 6 αλλά και η Bos d 7 (209). Η πρωτεΐνη Bos d 6 βρίσκεται στο μυϊκό ιστό και στο γάλα το οποίο εξηγεί γιατί αρκετοί ασθενείς που έχουν αλλεργία στο βοδινό αντιδρούν επίσης και όταν καταναλώνουν γάλα. Από την άλλη πλευρά, μόνο το 20% των παιδιών με αλλεργία στο γάλα έχουν αναφέρει αλλεργία στο κρέας. Η διάγνωση της αλλεργίας στο κρέας μπορεί να επιβεβαιωθεί μετά τη λήψη του ιατρικού ιστορικού και την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι του βοδινού και της Bos d 6. Τα αλλεργικά συμπτώματα αναπτύσσονται μεταξύ δύο με τριών ωρών από την κατανάλωση και μπορεί να είναι ήπια με σοβαρά. Τα περισσότερα παιδιά ξεπερνούν την αλλεργία στο κρέας γύρω στην ηλικία των 6 ετών (210).

Το σύνδρομο γάτας-χοιρινού μπορεί να επηρεάσει τους ασθενείς που είναι αλλεργικοί στη γάτα οι οποίοι αναπτύσσουν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης της γάτας Fel d 2 (211). Οι περισσότεροι ασθενείς με σύνδρομο γάτας-χοιρινού έχουν ή είχαν γάτες ως κατοικίδια και η ευαισθητοποίηση γίνεται μέσω του αναπνευστικού συστήματος. Τα αλλεργικά συμπτώματα συνήθως ξεκινούν μέσα σε μία ώρα μετά την κατανάλωση χοιρινού και μπορεί να είναι από ήπια μέχρι σοβαρά. Το καλά μαγειρεμένο χοιρινό είναι πιο εύκολο να γίνει ανεκτό και σχετίζεται με το γεγονός ότι η αλβουμίνη του χοιρινού είναι θερμοευαίσθητη (212).

Το σύνδρομο alpha-gal χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη έναρξη των συμπτωμάτων (μετά από 2-24 ώρες) και οι αλλεργικές αντιδράσεις στο κρέας των θηλαστικών συμβαίνουν τυπικά τη νύχτα πολλές ώρες μετά την κατανάλωση κρέατος. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι ήπια όπως κνίδωση, κοιλιακό άλγος και γαστρεντερολογικά συμπτώματα αλλά μπορεί να είναι και σοβαρά όπως η αναφυλαξία (207). Το σύνδρομο alpha-gal αναπτύσσεται

κυρίως στην ενήλικη ζωή αλλά μπορεί να συμβεί και στα παιδιά. Η αλλεργία οφείλεται στα αντισώματα έναντι στην γαλακτόζη-άλφα-1, 3-γαλακτόζη (alpha-gal) έναν υδατάνθρακα (212) που βρίσκεται στα γλυκολιπίδια και στις γλυκοπρωτεΐνες στα θηλαστικά αλλά λείπει από τους ανθρώπους και τα ανώτερα θηλαστικά (213). Η alpha-gal είναι παρούσα στους μύες, στα ερυθροκύτταρα και στον παρεγχυματικό ιστό και οι αλλεργικές αντιδράσεις μπορεί να συμβούν μετά την έκθεση σε μια ποικιλία προϊόντων των θηλαστικών (όπως το κρέας, το γάλα, η ζελατίνη και τα προϊόντα του αίματος). Η IgE ευαισθητοποίηση συμβαίνει μέσα από τα τσιμπήματα των κροτώνων οι οποίοι μεταφέρουν τα μόρια της alpha-gal στην κυκλοφορία. Τα άτομα που έχουν το σύνδρομο alpha-gal τυπικά δεν αναπτύσσουν συμπτώματα κάθε φορά που καταναλώνουν κρέας από θηλαστικό οπότε η διάγνωση μπορεί να είναι δύσκολη. Αντιδράσεις μπορούν επίσης να παρατηρηθούν μετά την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και ζελατίνης αλλά είναι συνήθως ηπιότερες από αυτές που πυροδοτούνται από το κρέας των θηλαστικών. Η alpha-gal είναι σταθερή στη θερμότητα και μπορεί να εκδηλωθούν αντιδράσεις και μετά την κατανάλωση καλά μαγειρεμένου κρέατος (214).

3.6.1.3 Ψάρι

Η επίπτωση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας στο ψάρι υπολογίζεται στο 1% (0-8% ανάλογα με τις συνήθειες των πληθυσμών να τρώνε ψάρι) και η ευαισθητοποίηση ξεκινά συνήθως κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και επιμένει μέχρι την ενήλικη ζωή. Οι κλινικές εκδηλώσεις ποικίλουν από ήπιες μέχρι σοβαρές και επίσης έχουν περιγραφεί και θάνατοι. Οι πιο συχνές αλλεργικές αντιδράσεις αφορούν τον εμετό και τη διάρροια. Το κυριότερο αλλεργιογόνο στο ψάρι είναι η παρβαλβουμίνη η οποία είναι το κυριότερο αλλεργιογόνο σε διάφορα είδη ψαριών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ανθεκτική στη θέρμανση και στο μαγείρεμα. Η αλλεργία που εμφανίζεται λόγω της έκθεσης στα αλλεργιογόνα του ψαριού μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα από το αναπνευστικό και σε κνίδωση (215). Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ διαφόρων ειδών ψαριών είναι συχνή και μπορεί να αφορά τον μπακαλιάρo, τον κυπρίνο, τη ρέγγα, το σκουμπρί, το σολομό και τον τόνο. Γι' αυτό το λόγο οι περισσότεροι αλλεργικοί στο ψάρι αποφεύγουν όλα τα είδη ψαριών. Ωστόσο δεν παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις ανάμεσα στα ψάρια και στα οστρακοειδή.

3.6.1.4 Σιτάρι

Η αλλεργία στο σιτάρι στην παιδική ηλικία είναι σε κάποιες χώρες η 3η πιο κοινή αλλεργία μετά την αλλεργία στο γάλα και στο αυγό και η επίπτωσή της είναι περίπου κάτω από 1% (216, 217). Τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν από ήπια με κνίδωση και συμπτώματα από το γαστρεντερικό μέχρι σοβαρά όπως η αναφυλαξία. Το σιτάρι περιέχει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (περίπου 1500) οι οποίες μπορεί να διακριθούν σε υδατοδιαλυτές

(αλβουμίνες και σφαιρίνες) και σε μη υδατοδιαλυτές (γλιανδίνες και γλουτένη). Η IgE ευαισθητοποίηση στο σιτάρι είναι πολύ πιο συχνή από την αλλεργία στο σιτάρι λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης με τη γύρη (218). Όταν υποψιαζόμαστε αλλεργία στο σιτάρι ο έλεγχος για ειδικά IgE στις γλιανδίνες είναι καλύτερος προγνωστικός παράγοντας από τα ειδικά IgE για το ίδιο το σιτάρι (219). Τα περισσότερα παιδιά ξεπερνούν την αλλεργία στο σιτάρι αλλά σε εκείνα που παραμένει μέχρι την εφηβεία ή την ενήλικη ζωή συχνά είναι σοβαρή και μπορεί να οδηγήσει σε αναφυλαξία. Τα επίπεδα των ειδικών IgE κατά τον πρώτο χρόνο ζωής φαίνεται να μπορούν να προβλέψουν τη διάρκεια της αλλεργίας. Τα χαμηλά επίπεδα (<2 kUA/L) οδηγούν σε γρήγορη υποχώρηση ενώ τα υψηλά επίπεδα οδηγούν συχνότερα σε επίμονη αλλεργία (201).

3.6.1.5 Ξηροί καρποί

Το φιστίκι και οι ξηροί καρποί είναι οι πιο συχνές αιτίες των σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων που οφείλονται στην τροφή και τα φιστίκια αποτελούν την κυριότερη αιτία της αναφυλαξίας που προκαλείται από την τροφή. Η αλλεργία στο φιστίκι επηρεάζει περίπου το 1-4,5% του πληθυσμού στο δυτικό κόσμο (220). Τόσο η αλλεργία στο φιστίκι όσο και στους ξηρούς καρπούς ξεκινούν νωρίς στη ζωή και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σπάνια ξεπερνιούνται. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις μελέτες που αφορούν την πρώιμη κατανάλωση φιστικιού η οποία μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη αλλεργίας στο φιστίκι (165, 221). Αυτό έχει ως συνέπεια οι οδηγίες για την πρώιμη εισαγωγή του φιστικιού στη διατροφή των βρεφών να έχουν ανανεωθεί σε πολλές χώρες προτείνοντας την εισαγωγή του πριν την ηλικία τους ενός έτους. Παράλληλα αξίζει να σημειωθεί ότι αν ένα παιδί έχει αλλεργία στο φιστίκι ή στους ξηρούς καρπούς ο κίνδυνος να έχει και ένας μικρότερος αδερφός ή αδερφή την ίδια αλλεργία είναι αυξημένος (222). Τα φιστίκια είναι όσπρια όπως τα φασόλια και οι φακές και περιέχουν πολλές πρωτεΐνες. Οι πιο σημαντικές αποθηκευτικές πρωτεΐνες για το φιστίκι είναι οι Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, και η Ara h 6, για τους ξηρούς καρπούς είναι οι Cor a 9 and Cor a 14, για το κάσιους και το φιστίκι Αιγίνης η Ana o 3, για το καρύδι και το πεκαν οι Jug r 1 και Jug r 4 και για το σουσάμι η Ses i 1. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι δομικά σταθερές και ανθεκτικές στη θερμότητα και στην πέψη (223, 224). Σε μία μεγάλη σουηδική μελέτη που περιείχε πάνω από 4000 παιδιά, σχεδόν όλοι οι ασθενείς με IgE ευαισθητοποίηση στην πρωτεΐνη Ara h 2 του φιστικιού στην ηλικία των 16 ετών φάνηκε ότι είχαν ήδη ευαισθητοποιηθεί στην πρωτεΐνη αυτή από την ηλικία των 4 ετών. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ακόμη και οι χαμηλές τιμές των ειδικών IgE σε μικρή ηλικία σχετίζονται με αλλεργία στο φιστίκι στην εφηβεία (225). Παρά τη μεγάλη ομοιότητα ανάμεσα στις αποθηκευτικές πρωτεΐνες των φιστικιών, των ξηρών καρπών και των σπόρων οι περισσότεροι ασθενείς (50-60%) με αλλεργία στους ξηρούς καρπούς έχουν αλλεργία σε έναν μόνο καρπό και μπορούν να ανεχτούν τους υπόλοιπους

(226). Ωστόσο υπάρχει στενή βιολογική σχέση μεταξύ κάποιων καρπών η οποία οδηγεί σε ταυτόχρονες αλλεργίες σε συγκεκριμένους συνδυασμούς. Για παράδειγμα σχεδόν όλοι οι ασθενείς με αλλεργία στα κάσιους είναι επίσης αλλεργικοί στο pistachio nut. Το ίδιο ισχύει και για το καρύδι και το πεκάν (227).

3.7 Κλινικές Εκδηλώσεις της Τροφικής Αλλεργίας

Η IgE-μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία, είναι μία αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου I, της οποίας τα συμπτώματα ξεκινούν μέσα σε λίγα λεπτά και εκδηλώνονται μέχρι και δύο ώρες από την έκθεση στην υπεύθυνη τροφή (228). Συνήθως υπάρχουν προσχηματισμένα αντισώματα IgE στην κυκλοφορία, τα οποία όταν το τροφικό αλλεργιογόνο διαπερνά τον εντερικό φραγμό προσδένονται στην υπεύθυνη πρωτεΐνη της τροφής προκαλώντας αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων μέσα σε λίγα λεπτά. Τα τυπικά συμπτώματα αφορούν σχεδόν όλα τα συστήματα, συμπεριλαμβάνοντας το δέρμα, το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό αλλά και το καρδιαγγειακό σύστημα (229).

Τα συμπτώματα από το δέρμα περιλαμβάνουν το ερυθματώδες εξάνθημα, την κνίδωση αλλά και το αγγειοίδημα. Τα ήπια συμπτώματα παρουσιάζονται περιστασιακά ως κνησμός, η επίμονη κνίδωση με ή χωρίς πομφούς. Συμβαίνουν άμεσα μετά την κατανάλωση της υπεύθυνης τροφής και μπορεί να διαρκέσουν ώρες χωρίς θεραπεία. Η σοβαρότητα των δερματικών εκδηλώσεων μιας IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας μπορεί να καθορισθεί από το ποσοστό του δέρματος που συμμετέχει (230).

Τα συμπτώματα από το αναπνευστικό περιλαμβάνουν τόσο το ανώτερο όσο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Τα ήπια συμπτώματα εμφανίζονται ως σποραδικό τρίψιμο της μύτης ενώ τα μέτρια ή βαριά συμπτώματα παρουσιάζονται ως επίμονη καταρροή, ρινική συμφόρηση και απόφραξη των ρουθουνιών. Παράλληλα με τα συμπτώματα από το ανώτερο αναπνευστικό μπορεί να προκληθούν και συμπτώματα από τους οφθαλμούς. Τα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνουν ερυθρότητα ή κνησμό και σε βαριές περιπτώσεις ως οίδημα των βλεφάρων. Οι εκδηλώσεις από το κατώτερο αναπνευστικό περιλαμβάνουν το συριγμό και στις πιο σοβαρές περιπτώσεις εμφανίζεται βρογχόσπασμος ο οποίος μπορεί να ακολουθηθεί από πλήρη απόφραξη του αεραγωγού (231).

Οι εκδηλώσεις από το γαστρεντερικό περιλαμβάνουν υποκειμενικά και αντικειμενικά συμπτώματα. Τα υποκειμενικά συμπτώματα περιλαμβάνουν κνησμό στη στοματική κοιλότητα ή στο φάρυγγα, ναυτία ή κοιλιακό άλγος. Τα αντικειμενικά συμπτώματα περιλαμβάνουν επεισόδια εμέτων και διάρροια. Η έναρξη των εκδηλώσεων από το γαστρεντερικό είναι άμεση και ξεκινά μερικά λεπτά μέχρι και δύο ώρες μετά την έκθεση στην τροφή. Συμπτώματα όπως αιματηρές κενώσεις, δυσκοιλιότητα, απώλεια βάρους και εμετός που εκδηλώνονται τέσσερις

ώρες μετά την έκθεση στο τροφικό αλλεργιογόνο αφορούν μη IgE μεσολαβούμενη αντίδραση (228).

Η εμπλοκή του καρδιαγγειακού συστήματος αποτελεί την πιο σοβαρή εκδήλωση των IgE μεσολαβούμενων τροφικών αντιδράσεων στους ασθενείς. Τα υποκειμενικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ζάλη ή αδυναμία, ενώ τα αντικειμενικά εκδηλώνονται με ταχυκαρδία, υπόταση, αλλαγή στο επίπεδο της συνείδησης, καρδιαγγειακή κατάρρευση, απώλεια της συνείδησης και θάνατο. Τα συμπτώματα αυτά συμβαίνουν μαζί με συμπτώματα από άλλα συστήματα όπως το αναπνευστικό και το δέρμα (228, 229). Η αναφυλαξία αποτελεί μία σοβαρή μορφή IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής αντίδρασης που περιλαμβάνει παραπάνω από δύο συστήματα. Έχει οξεία έναρξη και είναι εν δυνάμει θανατηφόρα.

3.8 Διάγνωση

3.8.1 Ιστορικό και κλινική εξέταση

Μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας είναι η λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού. Κατά τη λήψη του ιστορικού πρέπει να απαντηθούν οι παρακάτω ερωτήσεις: 1) ποια τροφή προκάλεσε την αντίδραση και αν ήταν μαγειρεμένη ή ωμή 2) ποια ήταν η ποσότητα της τροφής που πυροδότησε την αντίδραση 3) ποια ήταν τα συμπτώματα της αντίδρασης 4) ποιος ήταν ο χρόνος που μεσολάβησε από την στιγμή της κατανάλωσης της τροφής μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων 5) ποιοι ήταν οι παράγοντες που μπορεί να συνέβαλαν στην αντίδραση (ιογενής συνδρομή, φάρμακα, άσκηση), 6) ποια θεραπεία χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της αντίδρασης 7) αν το φαινόμενο επαναλήφθηκε μετά από επακόλουθη έκθεση. Παράλληλα είναι πολύ σημαντικό και το ιστορικό του ασθενή αναφορικά με άλλες μορφές ατοπίας όπως η ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα ή η αλλεργική ρινίτιδα. Έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ατοπική δερματίτιδα και στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας ειδικά όταν αυτή εμφανίζεται πριν τους πρώτους τρεις μήνες ζωής (232). Σε μία μελέτη κοορτής με 480 παιδιά με ατοπική δερματίτιδα φάνηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος να αναπτύξουν IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία αυτά με τη βαριά κλινική εικόνα ήταν 5.9 φορές μεγαλύτερος (160). Περαιτέρω πληροφορίες από το ιστορικό θα πρέπει να περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό ατοπίας και τροφικής αλλεργίας. Οι πληροφορίες αυτές θα βοηθήσουν στην αναγνώριση του υπεύθυνου αλλεργιογόνου και θα συνεισφέρουν στη διενέργεια των απαραίτητων δοκιμασιών για τη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας.

3.8.2 Δερματικά Τεστ δια νυγμού (SPTs –Skin Prick Tests)

Τα δερματικά τεστ δια νυγμού ανιχνεύουν την παρουσία IgE ανοσοφαιρινών στην κυκλοφορία που στοχεύουν σε συγκεκριμένα αντιγόνα. Αποτελούν δοκιμασίες που

διενεργούνται *in vivo* και παρέχουν άμεσα το αποτέλεσμα. Εκχυλίσματα τροφών και μάρτυρες όπως η ισταμίνη τοποθετούνται στο δέρμα και στη συνέχεια η περιοχή αυτή του δέρματος υφίσταται έναν νυγμό με έναν σκαρφιστήρα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη της τροφής να διαπερνά την επιφάνεια του δέρματος να προσδένεται στη συνέχεια στα ειδικά αντισώματα IgE που βρίσκονται στα μαστοκύτταρα της επιδερμίδας και να πυροδοτούν την αποκοκκίωση των προσχηματισμένων μεσολαβητών όπως η ισταμίνη. Η ενεργοποίηση των τοπικών μαστοκυττάρων παράγει έναν πομφό στο σημείο που εισήχθη το αλλεργιογόνο στο δέρμα. Η διάμετρος του πομφού μετράται 15 λεπτά μετά το νυγμό και δίνει πληροφορίες για την κλινική αντιδραστικότητα. Όταν ο πομφός έχει διάμετρο >3mm, τότε η δοκιμασία θεωρείται θετική και θέτει την πιθανότητα της κλινικής αντιδραστικότητας (233). Ωστόσο το δερματικό τεστ δια νυγμού αντιπροσωπεύει μόνο την παρουσία ειδικών IgE αντισωμάτων συνδεδεμένα στα μαστοκύτταρα και δεν είναι διαγνωστικό κλινικής αντιδραστικότητας. Η παρουσία ειδικών IgE αντισωμάτων χωρίς κλινική αντιδραστικότητα ονομάζεται ευαισθητοποίηση. Οπότε χρειάζεται προσοχή στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και καλό θα είναι να ελέγχονται μόνο τα ύποπτα τροφικά αλλεργιογόνα αφού οι δερματικές δοκιμασίες έχουν χαμηλή ειδικότητα (234). Ένα θετικό δερματικό τεστ δεν μπορεί να διακρίνει ανάμεσα στην ευαισθητοποίηση και στην IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία, συνεπώς είναι σημαντικό να συνδυάζονται το λεπτομερές ιστορικό με τα αποτελέσματα της δερματικής δοκιμασίας για πιθανό περαιτέρω διαγνωστικό έλεγχο. Παρόλο που το μέγεθος του πομφού δεν σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, η θετική προγνωστική αξία που έχει περιγραφεί για την κλινική αντιδραστικότητα βασίζεται στο μέγεθος του πομφού. Για παράδειγμα μία διάμετρος >8mm για το αγελαδινό γάλα και το φιστίκι, και >7mm για το αβγό ήταν προγνωστικές της αντίδρασης στο 95% αν γινόταν τροφική πρόκληση (235). Τα δερματικά τεστ δια νυγμού έχουν σχετικά υψηλή θετική προγνωστική αξία και μπορεί να φανούν χρήσιμα στον αποκλεισμό της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Ωστόσο η κλινική αντιδραστικότητα συμβαίνει μερικές φορές και στο αρνητικό τεστ δια νυγμού.

3.8.3 Ειδικά αντισώματα IgE –specific IgEs

Μία άλλη διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση της τροφικής αλλεργίας αποτελεί η μέτρηση των ειδικών για συγκεκριμένες τροφές ή συστατικά των τροφών IgE αντισωμάτων. Η μέτρηση των IgE αντισωμάτων διενεργείται μέσω της σήμανσης των ένζυμων με φθορίζουσα χρωστική. Πιο συγκεκριμένα ο ορός του ασθενή επωάζεται με ένα ειδικό αλλεργιογόνο προσδεμένο στην επιφάνεια και το ειδικό για την τροφή IgE αντίσωμα του ασθενή προσδένεται στο αλλεργιογόνο. Στη συνέχεια το ειδικό για την τροφή IgE αντίσωμα αναγνωρίζεται από ένα

αντι-αντίσωμα IgE σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Η μέτρηση παρέχει πληροφορίες για τα ασύζευκτα ειδικά για την τροφή IgE αντισώματα που παράγονται στην κυκλοφορία.

Τα επίπεδα των ειδικών IgE σχετίζονται με την πιθανότητα μιας κλινικά σημαντικής αντίδρασης στη συγκεκριμένη τροφή αλλά δεν υποδεικνύει τη σοβαρότητα της αντίδρασης. Ο Sampson και οι συν. δημιούργησαν τιμές για τα ειδικά IgE για τα πιο συχνά αλλεργιογόνα, οι οποίες είχαν 95% θετική προγνωστική αξία στη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας. Οι τιμές αυτές βασίστηκαν σε μία μελέτη που περιλάμβανε πάνω από 100 παιδιά στην οποία οι δοκιμασίες συσχετίστηκαν με το gold standard της τροφικής πρόκλησης (236). Τα ειδικά IgE αντισώματα δεν είναι βοηθητικά εάν το ιστορικό δεν υποστηρίζει την IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία καθώς υπάρχει υψηλή πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Συμπερασματικά, η μέτρηση των ειδικών IgE αντισωμάτων δεν μπορεί να αποκλείσει την αλλεργία όταν υπάρχει ιστορικό που την υποστηρίζει καθώς η ευαισθησία είναι χαμηλή. Ένα ποσοστό 10-25% των σημαντικών αντιδράσεων, συμπεριλαμβανόμενης και της αναφυλαξίας μπορεί να χαθεί. Στους ασθενείς με ισχυρό ιστορικό υπέρ της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας και αρνητικά ειδικά IgE πρέπει να διενεργείται τροφική πρόκληση. Παράλληλα με το ρόλο τους στη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας, τα ειδικά IgE αντισώματα μπορούν να φανούν χρήσιμα στο εάν ένα παιδί με αλλεργία στο αυγό ή το γάλα έχει αποκτήσει ανοχή. Αναφορικά με το αυγό μείωση κατά 50% στην τιμή των ειδικών IgE σχετίζεται με πιθανότητα 50% σε ανοχή στην πρόκληση (237). Τα ειδικά IgE πλεονεκτούν έναντι των SPTs στο ότι δεν υπάρχει ο κίνδυνος για αναφυλαξία και ότι μπορούν να διενεργηθούν από μη ειδικούς.

Η ανάπτυξη περισσότερων ειδικών IgEs για ειδικά συστατικά των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα. Για παράδειγμα στην αλλεργία στο γάλα, τα ειδικά IgE για την καζεΐνη είναι πολύ πιο ειδικά συγκριτικά με το ολικό γάλα (238). Ο Hong και οι συν. έχουν περιγράψει τη χρήση των συστατικών στη διάγνωση για να ελέγξουν κατά πόσο η μέτρηση των ειδικών αλλεργιογόνων του φιστικιού βοηθά στην καλύτερη πρόγνωση της αλλεργίας από την ευαισθητοποίηση και αν μπορεί επίσης να προβλέψει αυτούς που βρίσκονται σε κίνδυνο για αναφυλακτική αντίδραση. Διαπίστωσαν λοιπόν ότι τα παιδιά με αλλεργία είχαν σημαντικά υψηλότερους τίτλους στα αλλεργιογόνα του φιστικιού όπως τα Ara h 1, 2 και 3 συγκριτικά με τα ασυμπτωματικά αλλά ευαισθητοποιημένα παιδιά. Το πιο ενδεικτικό ήταν το Ara h2 όπου με cut-off σημείο τα 0.65 ng/mL παρείχε 99.1% ευαισθησία και 98.6% ειδικότητα στην πρόγνωση της αλλεργίας στο φιστίκι (239). Ωστόσο αυτές οι δοκιμασίες δεν μπόρεσαν να ταυτοποιήσουν αυτούς που βρίσκονταν σε κίνδυνο για αναφυλαξία.

3.8.4 Χρήση ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων (μοριακή διάγνωση)

Η διάγνωση της αλλεργίας μέσα από τα συστατικά των τροφών θεωρείται πιο αξιόπιστη καθώς αντί να χρησιμοποιηθεί ολόκληρο το αλλεργιογόνο που περιέχει τόσο

αλλεργιογονικά όσο και μη αλλεργιογονικά συστατικά, μετρά μόνο τα ειδικά IgE για μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη της τροφής. Μία συστηματική ανασκόπηση που σύγκρινε τα δερματικά τεστ με τα ειδικά IgE σε ολόκληρο το φιστίκι και στα συστατικά του έδειξε ότι τα ειδικά IgE για το Ara h 2 είχαν μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια σε σχέση με τις υπόλοιπες δοκιμασίες (240). Παράλληλα μία μετα-ανάλυση με 19 μελέτες έδειξε ότι ενώ τα ειδικά IgE για το Ara h 1, Ara h 2 και το Ara h 3 είχαν υψηλή ειδικότητα στην αλλεργία στο φιστίκι, η ευαισθησία ήταν υψηλότερη στο Ara h 2 (223). Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και από μελέτες στο αμύγδαλο οι οποίες επιβεβαιώνουν τη μεγαλύτερη ακρίβεια της διαγνωστικής που βασίζεται στα συστατικά των αλλεργιογόνων. Τα κυριότερα συστατικά των αλλεργιογόνων για τις πιο συχνές αλλεργίες έχουν απομονωθεί όμως η έρευνα συνεχίζει για την ταυτοποίηση των βέλτιστων σημείων cut-off (241).

3.8.5 Δοκιμασία ενεργοποίησης βασεόφιλων

Άλλες προσεγγίσεις στη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας αφορούν τις δοκιμασίες με κύτταρα οι οποίες παρέχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα τεστ. Το τεστ ενεργοποίησης βασεόφιλων μετρά την έκφραση των δεικτών της ενεργότητας στην επιφάνεια των βασεόφιλων όταν αυτά διεγείρονται από τροφικά αλλεργιογόνα ή μάρτυρες με κυτταρομετρία ροής. Σε μία μελέτη με 104 παιδιά η δοκιμασία ενεργοποίησης των βασεόφιλων έδειξε πολύ μεγαλύτερη ικανότητα στη διάκριση μεταξύ παιδιών που ήταν αλλεργικά και παιδιών που είχαν ξεπεράσει την αλλεργία στο φιστίκι συγκρινόμενη με τα δερματικά τεστ δια νυγμού και τα ειδικά IgE για το φιστίκι αλλά και για το Ara h 2. Παρουσίασε εντυπωσιακή ευαισθησία 98% και ειδικότητα 96% αντίστοιχα (242). Σε μία προοπτική μελέτη με 83 παιδιά με πιθανή αλλεργία στους ξηρούς καρπούς, τα δερματικά τεστ δια νυγμού παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με το τεστ ενεργοποίησης των βασεόφιλων το οποίο παρουσίασε μεγαλύτερη ειδικότητα σε σύγκριση με τα δερματικά τεστ δια νυγμού (243). Ενώ η δοκιμασία ενεργοποίησης των βασεόφιλων φαίνεται ιδιαίτερα υποσχόμενη η κλινική της εφαρμογή είναι περιορισμένη καθώς απαιτεί ζωντανά κύτταρα και περιβάλλον με κυτταρομετρία ροής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διενέργεια της δοκιμασίας αυτής ως δεύτερο βήμα μετά τα δερματικά τεστ δια νυγμού και τα ειδικά IgE για το Ara h 2 μείωσαν την ανάγκη για διενέργεια τροφικής πρόκλησης κατά 97% συγκριτικά με τη διενέργεια μόνο των δερματικών τεστ και των ειδικών IgE (242).

3.8.6 Δοκιμασία ενεργοποίησης μαστοκυττάρων

Η δοκιμασία ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων αποτελεί επίσης μια ενδιαφέρουσα μέθοδο και υπερτερεί έναντι στη δοκιμασία ενεργοποίησης των βασεόφιλων καθώς χρησιμοποιεί αποθηκευμένο πλάσμα αντί για φρέσκο ολικό αίμα. Σε μία αντίστοιχη μελέτη με

αυτή που προαναφέρθηκε για τη δοκιμασία ενεργοποίησης των βασεόφιλων, η δοκιμασία ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων είχε αντίστοιχα αποτελέσματα που αφορούσαν την ειδικότητα ωστόσο είχε χαμηλότερη ευαισθησία. Επίσης η δοκιμασία ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων παρέχει ακριβή αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις εκείνες όπου τα βασεόφιλα δεν αντιδρούν (244). Η χρησιμότητα αυτών των δοκιμασιών έχει δοκιμασθεί και για άλλα κοινά αλλεργιογόνα και είχε αντίστοιχα αποτελέσματα ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Επίσης οι δοκιμασίες αυτές μπορεί να προσφέρουν κλινικά καθώς τα αποτελέσματα σχετίζονται με τη σοβαρότητα της αντίδρασης ενώ τα δερματικά τεστ δια νυγμού και τα ειδικά IgE δεν είναι πάντα διαγνωστικά της σοβαρότητας της αντίδρασης (245, 246).

3.8.7 Δίαιτα Αποκλεισμού

Παρόλο που είναι ζωτικής σημασίας στη διαχείριση της τροφικής αλλεργίας δεν υπάρχει επίσημη οδηγία για τη διάγνωση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας. Ωστόσο στην καθημερινή πράξη η απάντηση σε μία δίαιτα αποκλεισμού δίνει χρήσιμες πληροφορίες όταν δεν διενεργείται τροφική πρόκληση. Οι δίαιτες αποκλεισμού έχουν διαγνωστικό ρόλο στη μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία όπου δεν υπάρχουν ειδικά τεστ. Στις περιπτώσεις αυτές πρέπει να παρέχονται συμβουλές για αυστηρή δίαιτα αποκλεισμού και να επαναληφθεί η πρόκληση κάποιες εβδομάδες μετά.

3.8.8 Τροφική Πρόκληση

Η τροφική πρόκληση παρέχει την οριστική διάγνωση για την IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία και η διπλή τυφλή placebo τροφική πρόκληση (DBPCFC) αποτελεί το gold standard για τη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας σε κλινικές δοκιμές ή τυχαίοποιημένες μελέτες (247). Εκτός από την DBPCFC, οι τροφικές προκλήσεις μπορεί επίσης να είναι ανοιχτές ή μονά τυφλές. Ο ασθενής που υφίσταται την τροφική πρόκληση ξεκινάει καταναλώνοντας μικρές ποσότητες φαγητού, χωρίς να τις βλέπει και οι ποσότητες αυξάνονται κάθε 15-30 λεπτά μέχρι να ολοκληρωθούν όλα τα βήματα της διαδικασίας ή μέχρι να εκδηλωθούν συμπτώματα. Κατά την προετοιμασία για την τροφική πρόκλησή οι ασθενείς διακόπτουν τη φαρμακευτική αγωγή όπως τα αντιισταμινικά ή τα κορτικοστεροειδή τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μελέτης. Παράλληλα συνυπάρχουσες καταστάσεις όπως το άσθμα ή η μη ελεγχόμενη κνίδωση πρέπει να αξιολογούνται πριν τη διενέργεια μιας τροφικής πρόκλησης. Έχουν περιγραφεί 32 περιπτώσεις θανατηφόρας αναφυλαξίας στην τροφή και το μη ελεγχόμενο άσθμα αναγνωρίστηκε ως συν-νοσηρότητα στο 97% αυτών των περιπτώσεων. Πριν τη διενέργεια της τροφικής πρόκλησης είναι σημαντικό οι ασθενείς αυτοί να αξιολογούνται καθώς βρίσκονται σε κίνδυνο για μια θανατηφόρα αντίδραση (248).

3.8.9 Άλλες δοκιμασίες

Η χρήση εναλλακτικών δοκιμασιών όπως οι ειδικές για τα αλλεργιογόνα IgG ή IgG4 δοκιμασίες, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, οι δοκιμασίες απελευθέρωσης μεσολαβητών δεν προτείνονται ως έγκυρα εργαλεία στη διαγνωστική προσέγγιση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας (248).

3.9 Αντιμετώπιση της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας

Το πρώτο βήμα στην αντιμετώπιση της IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής αντίδρασης στην τροφή είναι η αναγνώριση της αναφυλαξίας η οποία είναι δυνητικά θανατηφόρα. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου χρειάζονται άμεση παρέμβαση με τη χορήγηση αδρεναλίνης ενδομυϊκά. Η αδρεναλίνη μπορεί να προκαλέσει αγγειοδιαστολή για τη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης και βρογχοδιαστολή για τη βελτίωση της αναπνοής. Παράλληλα οι ασθενείς με αναφυλαξία χρειάζονται συνεχές monitoring των ζωτικών σημείων ενώ μπορεί να χρειαστούν και ενδοφλέβια ενυδάτωση, παροχή οξυγόνου και καρδιοαναπνευστική αναζωογόνηση (249). Μετά τη χρήση της αδρεναλίνης τα H1-αντιισταμινικά είναι η επόμενη θεραπεία που πρέπει να χρησιμοποιείται στην αναφυλαξία. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά όμως για την αντιμετώπισή της. Με δεδομένο ότι οι αλλεργικές αντιδράσεις μπορεί να προκαλέσουν απελευθέρωση ισταμίνης τα φάρμακα που μπλοκάρουν τους H1 και τους H2 υποδοχείς βελτιώνουν την αγγειακή διαπερατότητα, τη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού (250).

3.9.1 Αποφυγή των υπεύθυνων τροφών

Η αντιμετώπιση 1ης γραμμής μετά τη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας αφορά την αυστηρή αποφυγή της υπεύθυνης τροφής. Ωστόσο αυτή η παρέμβαση ενέχει το ρίσκο της διατροφικής, κοινωνικής και ψυχολογικής επιβάρυνσης (251). Στα βρέφη και στα μικρά παιδιά το αγελαδινό γάλα πρέπει να αντικαθίσταται από εκτενώς υδρολυμένη φόρμουλα η οποία παρέχει τα θρεπτικά συστατικά όπως το ασβέστιο, οι βιταμίνες, το παντοθενικό οξύ, η ριβοφλαβίνη οι πρωτεΐνες και τα απαραίτητα λίπη (252). Τα αυγά και το σιτάρι είναι τα άλλα τρόφιμα των οποίων η υποκατάσταση στη διατροφή των παιδιών συνεπάγεται σημαντική έλλειψη θρεπτικών στοιχείων. Μία επαγγελματική προσέγγιση από έναν διατροφολόγο συνιστάται σε αυτούς τους ασθενείς.

Επίσης είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε αυτούς τους ασθενείς να λαμβάνονται υπόψιν και οι πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των τροφών (πίνακας 3). Οι αντιδράσεις αυτές οφείλονται στους κοινούς επιτόπους. Τέτοιες αντιδράσεις μπορεί να παρατηρηθούν ανάμεσα στο φιστίκι και το σουσάμι ή στο αυγό και στο φιστίκι.

Παράλληλα τόσο οι ασθενείς όσο και οι οικογένειές τους θα πρέπει να εκπαιδευθούν στην αναγνώριση μιας σοβαρής αλλεργικής αντίδρασης και στην αντιμετώπισή της. Η αυτό-ενιούμενη αδρεναλίνη θα πρέπει να χορηγείται άμεσα με την εκδήλωση συστηματικών αντιδράσεων (253, 254).

Πίνακας 3. Διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των τροφικών αλλεργιογόνων.

Πηγή: Charman JA, et al. *Food allergy: a practice parameter*. Ann Allergy Asthma Immunol 2006

Sicherer SH et al. Clinical implications of cross-reactive food allergens, JACI, 2001

Πρωταρχικό αλλεργιογόνο	Διασταυρούμενη αντίδραση
Αγελαδινό γάλα	Κατσικίσιο γάλα 90%, μοσχάρι 10%
Σόγια	Σπάνια με άλλα όσπρια
Φιστίκι	Αρακάς, φακές, φασόλια
Ψάρι	Σημαντικές αντιδράσεις με άλλα είδη ψαριών
Ξηροί καρποί	Σημαντικές αντιδράσεις με άλλους ξηρούς καρπούς
Latex	Ακτινίδιο, Μπανάνα
Οστρακοειδή	Σημαντικές αντιδράσεις με άλλα οστρακοειδή,
Ροδάκινο	Μήλο, αχλάδι, κεράσι, δαμάσκηνο

3.9.2 Η από του στόματος ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία από του στόματος αποτελεί την πιο υποσχόμενη προσέγγιση στη θεραπεία της τροφικής αλλεργίας (255). Αποτελείται από τη χορήγηση από του στόματος του υπεύθυνου αλλεργιογόνου σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή δόση. Μόλις επιτευχθεί η δόση αυτή στη συνέχεια χορηγείται μία δόση συντήρησης για τη διατήρηση της κατάστασης της απευαισθητοποίησης και της ανοχής (256). Παρόλο που οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που διέπουν την ανοσοθεραπεία από του στόματος δεν είναι ξεκάθαροι, ο στόχος της παρέμβασης αυτής είναι η επανεισαγωγή της τροφής στη διατροφή του ασθενούς. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου, ο στόχος της παρέμβασης παραμένει η χορήγηση της τροφής σε χαμηλή δόση προκειμένου να αποφευχθούν σοβαρές αντιδράσεις μετά από πιθανή έκθεση στην τροφή. Η πρώτη περίπτωση ασθενούς που υπεβλήθη σε ανοσοθεραπεία από του στόματος δημοσιεύθηκε το 1908 και αφορούσε ένα παιδί με αλλεργία στο αυγό. Εκτός από την από του στόματος ανοσοθεραπεία στο γάλα τελευταία υπάρχουν δεδομένα και για την ανοσοθεραπεία στο αυγό

καθώς προκαλεί υψηλό ποσοστό αναφυλακτικών αντιδράσεων (257, 258). Λιγότερα είναι τα δεδομένα που αφορούν την από του στόματος ανοσοθεραπεία στο ψάρι και στο σιτάρι (259).

Η ανοσοθεραπεία από του στόματος αντιπροσωπεύει ουσιαστικά μια εξατομικευμένη θεραπεία όποτε η τυποποίηση της σε ένα γενικό πρωτόκολλο αποτελεί μία πρόκληση για τους ερευνητές αλλά και για τους κλινικούς γιατρούς. Κάθε βήμα θα πρέπει να επαναπρογραμματίζεται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ασθενούς (λοιμώξεις, ανεπιθύμητες αντιδράσεις στη θεραπεία, διαταραχές από το γαστρεντερικό σύστημα).

Για την επίτευξη της δόσης στόχου στην από του στόματος ανοσοθεραπεία υπάρχουν δύο φάσεις:

Η φάση της τιτλοποίησης η οποία έχει ως στόχο να πετύχει την τελική δόση μέσα από διαφορετικά σχήματα (με τις δόσεις να αυξάνονται δύο ή τρεις φορές/ εβδομάδα) τα οποία εφαρμόζονται στο νοσοκομείο από εξειδικευμένο προσωπικό. Η διάρκεια αυτής της φάσης διαφέρει και συμπεριλαμβάνει από πολύ γρήγορα πρωτόκολλα (μίας εβδομάδας) μέχρι πολύ αργά πρωτόκολλα (με διάρκεια πάνω από 6 μήνες). Τα πιο εκτεταμένα σε διάρκεια συνήθως διαρκούν 3 με 4 μήνες (260).

Η φάση της συντήρησης η οποία ξεκινά από τη στιγμή που έχει επιτευχθεί η δόση στόχος και ακολουθείται από τη συστηματική λήψη της υπεύθυνης τροφής (261).

3.9.3 Ενδοδερμική Ανοσοθεραπεία

Η ενδοδερμική ανοσοθεραπεία αφορά την τοποθέτηση στο δέρμα ενός αυτοκόλλητου μαζί με το τροφικό αλλεργιογόνο προκειμένου να προάγουν τη συστηματική ανοχή. Το τροφικό αλλεργιογόνο απορροφάται μέσα από το δέρμα. Τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας αυτής στην τροφική αλλεργία στο φιστίκι μετά από 12 μήνες θεραπείας (262).

3.9.4 Υπογλώσσια ανοσοθεραπεία

Η υπογλώσσια ανοσοθεραπεία εξετάζεται επίσης για την αντιμετώπιση της τροφικής αλλεργίας. Οι πρωτεΐνες της τροφής τοποθετούνται κάτω από τη γλώσσα σε σταδιακά αυξανόμενη δόση. Μία τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή που σύγκρινε την υπογλώσσια με την από του στόματος ανοσοθεραπεία αξιολόγησε 21 παιδιά με αλλεργία στο φιστίκι και παρατηρήθηκε αύξηση κατά δέκα φορές στο όριο της τροφικής πρόκλησης σε όλους τους ασθενείς μετά από δώδεκα μήνες που είχαν ολοκληρώσει τη θεραπεία. Το όριο ήταν σημαντικά υψηλότερο στους ασθενείς που βρίσκονταν σε ανοσοθεραπεία από του στόματος. Παρόλο που οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν πιο συχνές στην από του στόματος συγκριτικά με την υπογλώσσια ανοσοθεραπεία, οι δερματικές δοκιμασίες όπως και τα ειδικά IgE είχαν σημαντικές διαφορές (263).

4. Φυσική Πορεία

Οι τροφικές αλλεργίες στις διάφορες τροφές έχουν διαφορετική φυσική πορεία με την αλλεργία στο γάλα και στο αυγό να είναι αυτές που μπορεί να ξεπεραστούν πιο εύκολα (264) ενώ η αλλεργία στο φιστίκι και στους ξηρούς καρπούς να υποχωρούν μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων (10-20%) (265). Τα περισσότερα αλλεργικά παιδιά στο αυγό και στο γάλα ανέχονται τις τροφές αυτές σε ψημένη μορφή και ξεπερνούν την αλλεργία νωρίτερα από εκείνα που δεν τις ανέχονται ούτε σε αυτή τη μορφή (266, 267). Τα παιδιά λοιπόν που ανέχονται το γάλα σε ψημένη μορφή έχουν σε μεγαλύτερη συχνότητα ειδικά για το γάλα Τ ρυθμιστικά κύτταρα (144) προτείνοντας πως η ανοχή είναι μια ενεργή διαδικασία. Παρόμοια ασθενείς που έχουν ξεπεράσει μια μη IgE μεσολαβούμενη αλλεργία στο γάλα έχει παρατηρηθεί πως έχουν αυξημένα Τ ρυθμιστικά κύτταρα ειδικά για το γάλα μετά από μία τροφική πρόκληση στο γάλα (196). Σε μία μελέτη κοόρτης που αφορούσε παιδιά με αλλεργία στο αυγό, φάνηκε ότι το 49% αυτών είχαν ξεπεράσει την αλλεργία τους σε μία μέση ηλικία των 72 μηνών (264). Τα χαμηλά επίπεδα των ειδικών IgE για το αυγό και οι περιορισμένες δερματικές αντιδράσεις (μετά την κατανάλωση αυγού) θεωρούνταν προγνωστικοί παράγοντες της κατάστασης αυτής. Παράλληλα τα χαμηλά επίπεδα της παραγωγής IL-4 από τα Τ κύτταρα θεωρούνταν ένας ακόμη προγνωστικός δείκτης. Παρόμοια αποτελέσματα ισχύουν και για το γάλα με το 53% των παιδιών να ξεπερνούν την αλλεργία σε μία μέση ηλικία των 66 μηνών. Τα επίπεδα των ειδικών IgE για το γάλα είχαν τη μεγαλύτερη προγνωστική αξία αναφορικά με την υποχώρηση της αλλεργίας. Η βιολογία των μακρόβιων πλασματοκυττάρων που παράγουν IgE είναι πολύ λίγο κατανοητή ωστόσο αποτελεί έναν παράγοντα κλειδί στο φαινόμενο της υποχώρησης της αλλεργίας. Ο ρόλος των Th2 κυττάρων, των Τ ρυθμιστικών κυττάρων ή της έκθεσης στα αντιγόνα στη διατήρηση των πλασματοκυττάρων αυτών δεν είναι γνωστός. Η κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που διέπουν τη φυσική πορεία της τροφικής αλλεργίας θα μας παρέχει τις καλύτερες πληροφορίες για τους μηχανισμούς που οδηγούν στην ανοχή. Με αυτό τον τρόπο οι θεραπευτικές προσεγγίσεις θα είναι πιο πετυχημένες στην επίτευξη της πραγματικής ανοχής (268).

4.1 Πρόληψη

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην ταυτοποίηση των παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας, υπάρχουν λίγα που μπορούν να προταθούν για την πρόληψη της αλλεργίας αυτής. Λίγοι από τους γνωστούς παράγοντες που προδιαθέτουν σε τροφική αλλεργία είναι τροποποιήσιμοι. Παράλληλα από τους πιθανά τροποποιήσιμοι παράγοντες οι περισσότεροι δεν έχουν αποδειχθεί κατάλληλοι για την πρόληψη της τροφικής αλλεργίας. Μία συστηματική ανασκόπηση που διενεργήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ακαδημία Αλλεργιολογίας και Κλινικής ανοσολογίας (European Academy of Allergy and Clinical

Immunology, EAACI) ταυτοποίησε 41 τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές με πιθανές στρατηγικές πρόληψης της τροφικής αλλεργίας στη βρεφική και στην παιδική ηλικία (269). Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των μελετών αυτών έδειξε πως μπορεί να υπάρξει μικρή ή καθόλου επίδραση στην πρόληψη της τροφικής αλλεργίας. Το αντικείμενο των μελετών αυτών συμπεριλάμβανε πληθώρα στρατηγικών όπως η αποφυγή των υπεύθυνων τροφών, τα συμπληρώματα βιταμινών (τόσο στη μητέρα όσο και στο βρέφος), τα ω3 λιπαρά, τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά αλλά και η υδρολυμένη φόρμουλα. Ωστόσο οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι οι περισσότερες από τις παρεμβάσεις που εφαρμόστηκαν ήταν πολύ ασαφείς. Επίσης πολλές από αυτές παρουσίαζαν risk of bias λόγω της έλλειψης ισχυρών διαγνωστικών κριτηρίων, δεν ήταν τυχαιοποιημένες και δεν είχαν follow up. Παρόλο που ο κίνδυνος για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας πιθανά να έχει εγκατασταθεί στη γέννηση, δεν υπάρχουν μέχρι τώρα αποτελεσματικές στρατηγικές παρέμβασης που μπορούν να εφαρμοστούν στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η μόνη παρέμβαση που συστήνεται είναι η έγκαιρη εισαγωγή του φιστικιού στη δίαιτα του βρέφους. Η σύσταση αυτή βασίζεται στα δεδομένα μιας μεγάλης τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής η οποία διενεργήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο όπου η επίπτωση της αλλεργίας στο φιστίκι είναι υψηλή. Παράλληλα υπάρχουν δεδομένα από μετα-αναλύσεις τα οποία υποστηρίζουν την έγκαιρη εισαγωγή του αυγού στη διατροφή του βρέφους καθώς μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης αλλεργίας στο αυγό (270).

4.2 Επιγενετική

Η τροφική αλλεργία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί μία σύνθετη νόσο η οποία επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες, επιγενετικές τροποποιήσεις, συνήθειες των γονέων και περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η υγιεινή και η ατμοσφαιρική ρύπανση) ή και από συνδυασμό όλων των παραπάνω (271-273). Μεταξύ των παραγόντων που διαμεσολαβούν στην αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος είναι η επιγενετική αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος του κυττάρου, έναν κρίσιμο μηχανισμό για την προσαρμογή του ανοσοποιητικού στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (274). Πιο συγκεκριμένα η μεθυλίωση του DNA, που αφορά την προσθήκη μιας μεθυλομάδας (-CH₃) στον 5' άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης, θεωρείται μία χημικά σταθερή επιγενετική τροποποίηση η οποία σχετίζεται σημαντικά με μεταγραφική αποσιώπηση και έχει πλήρη η μερική δυναμική να αναστραφεί (275). Τα Tregs διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Η έκφραση του παράγοντα Forkhead box P3 (FOXP3) έχει προταθεί ως ένας ειδικός δείκτης των Tregs, ωστόσο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα CD4+CD25+FOXP3+ T κύτταρα παρουσιάζουν ετεροζυγωτία στο φαινότυπο και στη λειτουργία και περιλαμβάνουν ένα μίγμα υποπληθυσμών των Tregs (276). Τα Tregs που εκφράζονται από τον FOXP3 εμπλέκονται σε προστατευτικά φαινόμενα απέναντι στις

αλλεργίες όπως έχει φανεί από μελέτες σε μικρούς πληθυσμούς, οι οποίοι έχουν εκτεθεί περιστασιακά σε μολυσματικούς παράγοντες, από την πρώιμη παιδική ηλικία (277). Από την άλλη η συνεχής έκθεση στην ατμοσφαιρική ρύπανση όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες έχει συσχετιστεί με υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης στην ειδική περιοχή απομεθυλίωσης του FOXP3, αναστέλλοντας τη γονιδιακή έκφραση. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο εμφανές σε παιδιά που πάσχουν από άσθμα συγκριτικά με τα υγιή παιδιά (278).

Άλλα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, περιλαμβάνουν το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) το οποίο τροποποιεί τις αποκρίσεις της προσαρμοστικής ανοσίας. Τα MHC μόρια τάξης I και II εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και παρουσιάζουν αντιγόνα από τα εσωτερικά και εξωτερικά μέρη του κυττάρου για να διεγείρουν τα CD8+ και τα CD4+ T κύτταρα. Ένα γονίδιο τάξης I, το οποίο ρυθμίζεται επιγενετικά από τη μεθυλίωση αποτελεί το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο G (HLA-G) το οποίο έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός διαμεσολαβητής της ανοσιακής ανοχής στην επικοινωνία μεταξύ εμβρύου και μητέρας μέσω του πλακούντα (279, 280). Σε υγιείς ενήλικες η έκφραση του HLA-G περιορίζεται στο θύμο αδένα και στον κερατοειδή χιτώνα το οφθαλμού, (281) ενώ στο θύμο αδένα παράγονται σε ποσοστό 1-3% HLA-G-positive/FOXP3-negative CD4+ και CD8+ T κύτταρα με ρυθμιστικές ιδιότητες (Tregs) και αυξημένη συχνότητα στα σημεία της φλεγμονής. Αυτά τα Tregs HLA-G +/FOXP3- εκφράζουν την κατασταλτική λειτουργία τους μέσα από διαλυτούς παράγοντες στους οποίους συμπεριλαμβάνονται το HLA-G και η IL-10 (282).

Το σύμπλεγμα του MHC τάξης II περιλαμβάνει τα γονίδια HLA-DP, -DQ, -DR, των οποίων η έκφραση περιορίζεται στα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα μόρια που κωδικοποιούν (α και β αλυσίδες) ενέχονται στις αποκρίσεις της προσαρμοστικής ανοσίας και στη διατήρηση της ανοχής. Πιο συγκεκριμένα, οι β αλυσίδες που κωδικοποιούνται από το HLA-DRB1 και το HLA-DQB1 παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD4+ T λεμφοκύτταρα και διεγείρουν αλλεργικές αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου I. Επίσης μελέτες τύπου Genome-Wide Association studies (GWAS) παρέχουν αποδείξεις ότι οι πολυμορφικές περιοχές των HLA-DR και HLA-DQ υποκρύπτουν σημαντικό γενετικό αλλά και επιγενετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας (283) (284).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής η καταγραφή και η ανάλυση γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι ενέχονται και επιδρούν στις αλλεργίες που εμφανίζουν τα παιδιά. Έγινε προσπάθεια να γίνουν κατανοητοί οι αιτιολογικοί παράγοντες αλλά και οι βιολογικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν την εμφάνιση της τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στη Βιταμίνη D και στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στα παιδιά. Πιο συγκεκριμένα μετρήθηκαν τα επίπεδα της βιταμίνης D σε παιδιά με τροφική αλλεργία αλλά και στην ομάδα ελέγχου. Παράλληλα ελέγχθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών του VDR, Apa1, TaqI, BsmI και FokI με την τροφική αλλεργία. Τέλος, μελετήθηκε το προφίλ της μεθυλίωσης συγκεκριμένων γενετικών τόπων όπως το FOXP3 και το HLA το οποίο μπορεί να προδιαθέτει στην εμφάνιση τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία.

5.1 Υλικά και Μέθοδοι

5.1.1 Πληθυσμός της Μελέτης

Πρόκειται για μία μελέτη ασθενών μαρτύρων η οποία πραγματοποιήθηκε σε διάστημα τριών ετών, από τον Ιούλιο του 2018 μέχρι τον Οκτώβριο του 2021. Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθησαν 90 παιδιά με τροφική αλλεργία, ηλικίας έξι μηνών μέχρι δεκαπέντε ετών τα οποία προσήλθαν διαδοχικά στο Εξωτερικό Παιδοαλλεργιολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η διάγνωση της τροφικής αλλεργίας βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια του EAACI (209): 1) Η ύπαρξη κλινικού ιστορικού IgE μεσολαβούμενης αλλεργικής αντίδρασης η οποία πυροδοτήθηκε από την κατανάλωση μιας συγκεκριμένης τροφής και ακολουθήθηκε από την εκδήλωση συμπτωμάτων από το δέρμα (αγγειοίδημα, κνίδωση), από το αναπνευστικό (συριγμός) ή από το γαστρεντερικό (έμετοι). 2) Θετικά ειδικά IgE ή/και δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού και 3) διενέργεια τροφικής πρόκλησης. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 110 παιδιά αντίστοιχης ηλικίας και φύλου χωρίς ατομικό ιστορικό τροφικής αλλεργίας. Η αιτία προσέλευσης των παιδιών στο Εξωτερικό Παιδιατρικό Ιατρείο αφορούσε εξετατάσεις επανελέγχου. Παιδιά με χρόνια νοσήματα και με μακροχρόνια λήψη κορτιζόνης αποκλείονταν από τη μελέτη. Όλα τα παιδιά προέρχονταν από τη βορειοδυτική Ελλάδα και κυρίως από την Ήπειρο.

Κάθε παιδί αντιστοιχήθηκε σε έναν κωδικό και η καταγραφή των δεδομένων έγινε ανώνυμα. Υπογεγραμμένη γραπτή συναίνεση κηδεμόνα λήφθηκε για όλα τα παιδιά έπειτα από λεπτομερή ενημέρωση των γονέων για το σκοπό και το είδος της μελέτης. Η μελέτη εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (αριθμός πρωτοκόλλου 1290). Κατά την προσέλευση των παιδιών λαμβάνονταν εκτενές ατομικό και οικογενειακό ιστορικό. Αναφορικά με το

οικογενειακό ιστορικό δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ύπαρξη θετικού ιστορικού για τροφική αλλεργία, άσθμα, ατοπική δερματίτιδα και αλλεργική ρινίτιδα. Παράλληλα οι γονείς συμπλήρωσαν ένα δομημένο ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις που αφορούσαν το θηλασμό των παιδιών, το ιστορικό της ατοπίας στην οικογένεια, τη συχνότητα της έκθεσης του παιδιού στον ήλιο καθώς και τις συνήθειες των γονέων αναφορικά με το κάπνισμα.

Επιπλέον έγινε καταγραφή των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών. Το βάρος σώματος μετρήθηκε σε κιλά με ηλεκτρονική ζυγαριά (ή βρεφοζυγό για τα βρέφη). Το ύψος σώματος μετρήθηκε σε όρθια θέση με αναστημόμετρο για τα παιδιά άνω των 4 ετών ενώ για τα μικρότερα παιδιά μετρήθηκε σε ύπτια θέση με μεζούρα. Με βάση το βάρος και το ύψος των παιδιών υπολογίστηκε και ο δείκτης μαζας σώματος (body mass index, BMI) με τον τύπο $BMI = \frac{\text{βάρος σώματος (kg)}}{\text{ύψος σώματος (m}^2\text{)}}$. Για την αξιολόγηση του BMI χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες για την ηλικία και το φύλο από το Ινστιτούτο Υγείας Παιδιού.

5.1.2 Εργαστηριακές Εξετάσεις

Σε κάθε παιδί έγινε λήψη ολικού αίματος για την ανάλυση με γενική αίματος και για την απομόνωση υλικού DNA. Το δείγμα αίματος συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένο φιαλίδιο και ακολούθησε φύλαξη του στους -20°C μέχρι την επεξεργασία του. Το απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR (Polymerase Chain Reaction) των τμημάτων εκείνων του VDR γονιδίου που περιέχουν τους πολυμορφισμούς FokI, BsmI, TaqI και ApaI. Το ενισχυμένο DNA επωάστηκε με τις αντίστοιχες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Ο γονοτυπικός προσδιορισμός έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Παράλληλα από κάθε παιδί έγινε λήψη αίματος σε ειδικά σωληνάρια (BD Vacutainer SST II, Plymouth UK) τόσο για τη μέτρηση στον ορό του αίματος των ειδικών IgE αλλά και της ολικής IgE. Δείγμα ορού στάλθηκε στο εργαστήριο Υγείας του Παιδιού όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα της 25(OH)D βιταμίνης και της VDBP.

5.1.3 Περιγραφή των μεθόδων

5.1.3.1 Μέτρηση της 25(OH)D

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης 25(OH)D στον ορό πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή «ARCHITECT» της Εταιρείας «Abbot» και είναι μια ποσοτική ανοσολογική δοκιμασία χημειοφωταύγειας (CMIA) με βάση τον ανταγωνισμό για τα σημεία σύνδεσης στα μικροσωματίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της βιταμίνης 25(OH)D. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 2,2 ng/ml και οι συντελεστές διακύμανσης εντός του ίδιου προσδιορισμού και μεταξύ προσδιορισμών είναι 2,2% και 3,5% ng/mL, αντίστοιχα, στα επίπεδα των 20 ng/ml. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: αραίωση των δειγμάτων με κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA, μεθανόλη, 8-ανιλίνο-1-ναφθαλινοσουλφονικό οξύ (ANSA) και επιφανειοδραστική ουσία και ανάμειξη με τα

μικροσωματίδια που είναι επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι έναντι της βιταμίνης 25(OH)D. Η βιταμίνη 25(OH)D που υπάρχει στο δείγμα αποδεσμεύεται από την πρωτεΐνη VDBP της βιταμίνης D και προσδένεται στα μονοκλωνικά αντισώματα, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Μετά από επώαση, προστίθεται ένα συζευκτικό διάλυμα που περιέχει ακριδίνιο με επισημασμένη βιταμίνη D το οποίο προσκολλάται στις μη δεσμευμένες θέσεις πρόσδεσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων στα μικροσωματίδια τα επικαλυμμένα με το αντίσωμα. Μετά από περαιτέρω επώαση και έκπλυση για την απομάκρυνση της περίσσειας του μη συνδεδεμένου μορίου ακριδινίου-βιταμίνης D, προστίθενται 1,32% (w/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και 0,35 N υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Στο αλκαλικό περιβάλλον καταλύεται η χημική αντίδραση του συνδεδεμένου στα μικροσωματίδια ακριδινίου-25(OH)D όπου διασπάται ένας δακτύλιος και αποδίδει φως, η ένταση του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα του δείγματος υπό εξέταση σε 25(OH)D. Η προκύπτουσα αντίδραση χημιοφωταύγειας μετράται σε σχετικές μονάδες φωτός (RLUs). Τα αποτελέσματα υπολογίζονται βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης (0, 4, 10, 30, 75, 160 ng/ mL) που σχηματίζεται με την ίδια διαδικασία.

5.1.3.2 Μέτρηση της VDBP

Ο προσδιορισμός της VDBP στον ορό του αίματος των ασθενών πραγματοποιήθηκε μέσω μίας ανοσοενζυμικής διαδικασίας τύπου sandwich. Τα πηγαδάκια στο πιάτο μικροπιλοδότσης επικαλύπτονται με πολυκλωνικά αντι-VDBP αντισώματα. Στο πρώτο στάδιο της επώασης η VDBP σε όλα τα δείγματα προσδένεται στα πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού. Για την αφαίρεση όλων των ασύζευκτων ουσιών ακολουθεί ένα στάδιο ξεπλύματος. Στο δεύτερο στάδιο της επώασης προστίθεται ένα πολυκλωνικό αντι-VDBP αντίσωμα κουνελιού σημασμένο με υπεροξειδάση. Μετά από ένα ακόμα ξέπλυμα για την απομάκρυνση όλων των ασύζευκτων ουσιών η στερεά φάση επωάζεται με το υπόστρωμα, την τετραμεθυλοβενζιδίνη. Στη συνέχεια προστίθεται ένα όξινο διάλυμα και το χρώμα μετατρέπεται σε κίτρινο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της VDBP στο δείγμα. Έπειτα δημιουργείται μία καμπύλη απορρόφησης (450nm)/συγκέντρωση. Για τη μέτρηση της VDBP στον ορό των ασθενών απαιτούνται 200μl από τον ορό των ασθενών.

5.1.3.3 Δερματικά τεστ δια νυγμού

Τα εκχυλίσματα των αλλεργιογόνων χρησιμοποιήθηκαν στη συγκέντρωση των 100IU/mL όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή (Stallergens Laboratories, France). Τα φυσικά εκχυλίσματα αλλεργιογόνων εφαρμόστηκαν στην εσωτερική πλευρά του αντιβράχιου των δύο βραχιόνων. Ο σκαριφισμός του δέρματος στη συνέχεια έγινε άπαξ ανά αλλεργιογόνο με χρήση ειδικής καρφίδας Prick-Lancets (Stallergens Laboratories). Ως θετικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιούνταν διάλυμα ισταμίνης (10 mg/mL). Η ανάγνωση του προκαλούμενου

πομπού και συνοδού ερυθήματος γινόταν μετά πάροδο 15 λεπτών της ώρας και η καταγραφή του γινόταν με τη χρήση κατάλληλου μαρκαδούρου λεπτής γραφής. Οι προκαλούμενες αντιδράσεις καταγράφονταν και μετεφέρονταν προς αρχειθέτηση και μέτρηση με τη βοήθεια κολλητικής ταινίας σε αντίστοιχα αντίγραφα λευκού χαρτιού. Αξιολογήθηκε και καταγράφηκε η μέση διάμετρος του πομπού για κάθε αλλεργιογόνο. Η τελευταία ορίστηκε ως το κλάσμα με αριθμητή το άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου του πομπού και της κάθετης ως προς αυτή, και παρανομαστή το δύο. Μέση διάμετρος $\geq 3\text{mm}$ καταγράφηκε ως θετική ευαισθητοποίηση, ενώ $< 3\text{mm}$ αρνητική.

5.1.3.4 Προσδιορισμός ειδικών IgE αντισωμάτων στον ορό των ασθενών

Ο προσδιορισμός των ειδικών IgE αντισωμάτων στον ορό των ασθενών έγινε με την ανοσοενζυμική δοκιμασία φθορισμού (FEIA) στην οποία χρησιμοποιούνται αλλεργιογόνα τα οποία είναι συζευγμένα σε μία στερεά φάση πολυμερούς κυτταρίνης (ImmunoCAP®). Η μέθοδος αυτή μπορεί να μετρήσει πάνω από 650 αλλεργιογόνα και 105 μοριακά αλλεργιογόνα στον ορό του αίματος ή στο πλάσμα. Βασίζεται στην ανοσοενζυμική μέθοδο φθορισμού τύπου sandwich (ImmunoCAP FEIA) και παρέχει τη δυνατότητα να αξιολογηθεί το αλλεργιολογικό προφίλ των ασθενών όχι μόνο για φυσικά εκχυλίσματα αλλά και σε μοριακό επίπεδο. Τα βήματα είναι τα ακόλουθα:

1. Πρόσδεση της ειδικής IgE στη στερεά φάση.

Ένα καθαρισμένο ή ανασυνδυασμένο αλλεργιογόνο ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε μια εύκαμπτη στερεά φάση, με μεγάλη επιφάνεια, ένα διακλαδισμένο, υδρόφιλο πολυμερές/σφουγγάρι ενεργοποιημένο με CNB κυτταρίνη που περικλείεται σε κάψουλα (ImmunoCAP με 12 μg αλλεργιογόνο), αντιδρά με τη συγκεκριμένη IgE από τον ασθενή σε δείγμα πλάσματος/ορού.

2. Σύζευξη του ειδικού σημασμένου αντι IgE αντισώματος.

Μετά το ξέπλυμα των ασύζευκτων αντισωμάτων ένα αντι-IgE μονοκλωνικό αντίσωμα από επίμυες, σημασμένο με β -γαλακτοσιδάση, προστίθεται προκειμένου να σχηματιστεί το λεγόμενο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος.

3. Φθορισμός.

Μετά το ξέπλυμα των ασύζευκτων αντι-IgE, η 4- μεθυλουμπελλιφερόνη - β γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται ως φθορογόνο υπόστρωμα, το οποίο επώαζεται με το σύμπλεγμα για να παράγει τη φθορίζουσα 4-μεθυλουμπελλιφερόνη. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η μέτρηση του φθορισμού που εκλύεται πραγματοποιείται με έναν μετρητή φθορισμού και υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο φθορισμό και στο IgE αντίσωμα που έχει προσδεθεί στο αλλεργιογόνο μέσα από μία πρότυπη καμπύλη. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προσδιορίστηκαν τα ειδικά IgE αντισώματα για τα ακόλουθα τροφικά

αλλεργιογόνα που θεωρούνται ότι είναι τα πιο κοινά αλλεργιογόνα των τροφών 1) ολικό γάλα και οι κύριες πρωτεΐνες του (α-λακταλβουμίνη, β-λακτοσφαιρίνη, καζεΐνη), 2) αυγό (λευκό), 3) αυγό (κρόκος), 4) μπακαλιάρος, 5) σιτηρά, 6) σόγια, 7) μοσχάρι, 8) ξηροί καρποί. Για τη μέτρηση των ειδικών IgE μέσω της ImmunoCap απαιτούνται μόνο 40μl από τον ορό των ασθενών.

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε KU/L διεθνώς των θετικών τίτλων των ειδικών IgE αντισωμάτων αποδίδεται στον ακόλουθο Πίνακα:

Η κατάταξη των συγκεντρώσεων των ειδικών IgE αντισωμάτων σε τάξεις από 1 έως 6 και η ερμηνεία του αποτελέσματος

1. < 0,35 KU/L Τάξη 0 IgE απουσιάζουν/μη ανιχνεύσιμα
2. 0,35- 0,7 KU/L Τάξη 1 IgE χαμηλή συγκέντρωση
3. 0,7-3,5KU/L Τάξη 2 IgE μέτρια συγκέντρωση
4. 3,5-17,5KU/L Τάξη 3 Μετρίως υψηλή συγκέντρωση
5. 17,5-50KU/L Τάξη 4 Υψηλή συγκέντρωση
6. 50-100KU/L Τάξη 5 Πολύ υψηλή συγκέντρωση
7. >100KU/L Τάξη 6 Πολύ υψηλή συγκέντρωση

5.1.3.5 Απομόνωση ολικού DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από ολικό φρέσκο ή συντηρημένο στην κατάψυξη αίμα, χρησιμοποιήθηκε το kit Genomic DNA purification with Nucleospin (Macherey-Nagel). Εκτός από τα παρεχόμενα από την κατασκευάστρια εταιρία αντιδραστήρια, για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου χρειάστηκαν επίσης ποσότητες αλκοόλης 70% σε νερό. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Μεταφορά 200 μl ολικού αίματος (φρέσκου ή κατάλληλα αποψυγμένου) σε σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1,5 ml και στη συνέχεια προσθήκη 25 μl Proteinase K. Έπειτα προστίθενται 200 μl από το Buffer B3 ενός ισχυρού αποδιατακτικού των πρωτεϊνών και ακολουθεί ανάδευση με vortex για 10-20 δευτερόλεπτα. Μετά την ανάδευση τα δείγματα επωάζονται στους 70°C για 10-15 λεπτά. Το διάλυμα αυτό επιτυγχάνει τη λύση των κυττάρων μέσω της διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης, καθιστώντας τους πυρήνες των κυττάρων προσβάσιμους προς περαιτέρω επεξεργασία.
2. Προσθήκη 210μL αιθανόλης (96-100%) σε κάθε δείγμα και ανάδευση με vortex.
3. Στη συνέχεια κάθε δείγμα μεταφέρεται σε στήλη Nucleospin Blood τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 × g για 1 λεπτό.
4. Έπειτα η στήλη Nucleospin Blood τοποθετείται σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (2 ml) και προστίθενται 500μL από το Buffer BW. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 × g για 1 λεπτό. Το σωληνάριο συλλογής απορρίπτεται. Η στήλη Nucleospin Blood

τοποθετείται σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (2 ml) και αυτή τη φορά προστίθενται 600μL από το Buffer B5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 × g για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο.

5. Η στήλη Nucleospin Blood τοποθετείται ξανά στο σωληνάριο συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 × g για 1 λεπτό.
6. Τελος ακολουθεί η έκλουση του DNA. Πιο συγκεκριμένα η στήλη Nucleospin Blood τοποθετείται σε σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1,5ml και στη συνέχεια προστίθεται 70μL προθερμασμένου buffer BE (70°C). Η έγχυση του buffer πρέπει να γίνει πάνω στη μεμβράνη. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 11.000 × g για 1 λεπτό. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

5.1.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Με την PCR ενισχύονται επιλεγμένα τμήματα του DNA, αφού πολλαπλασιάζονται σε πάρα πολλά αντίγραφα. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος με τη θερμική πλάκα που διαθέτει, εναλλάσσει θερμοκρασίες και στάδια της αντίδρασης για 25-35 φορές. Περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94-95°C) παράγοντας έτσι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για τη DNA πολυμεράση και τους εκκινητές.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA, σε χαμηλή θερμοκρασία (55-65 °C).
3. Επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη νουκλεοτιδίων (dNTPs), με κατεύθυνση 5'→ 3', ανάλογα με τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA, στην ιδανική θερμοκρασία δράσης της εκάστοτε DNA πολυμεράσης.

Τα βασικά συστατικά της PCR είναι τα ακόλουθα: (1) DNA πολυμεράση, (2) ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, (3) DNA, (4) ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση των αλάτων στις επιθυμητές συνθήκες και (5) νουκλεοτίδια (dNTPs) για τη σύνθεση της νέας συμπληρωματικής με το εκμαγείο αλυσίδας DNA.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ενισχύθηκαν δύο τμήματα του γονιδίου του VDR, που περιλαμβάνουν αντίστοιχα τους πολυμορφισμούς Fok1, Bsm1. Επιπλέον ενισχύθηκε και το τμήμα εκείνο του VDR που περιλαμβάνει τους πολυμορφισμούς Ara1 και Taq1. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (Primers) ειδικά σχεδιασμένοι για την ενίσχυση των συγκεκριμένων αλληλουχιών. Οι ακολουθίες των εκκινητών είναι οι ακόλουθες:

Για τον πολυμορφισμό Fok1:

Fok1F (Forward): 5'- AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT -3'

Fok1R (Reverse): 5'- ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC -3'

Για τον πολυμορφισμό Bsm1:

VDR Bsm1f (Forward): 5'- GGGAGACGTAGCAAAAGG- 3'

VDR Bsm1r (Reverse): 5'- AGAGGTCAAGGGTCACTG -3'

Για τους πολυμορφισμούς Taq1 και Apa1 οι εκκινητές είναι κοινοί και είναι οι:

VDR Taq1f (Forward): 5'- CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG- 3' και

VDR Taq1r (Reverse): 5'- GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA- 3'

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* εκλεκτική ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του FokI είναι:

- Γονιδιωματικό DNA (1 μl)
- DreamTaq Green Buffer 10x [20mM MgCl₂] (2,5μl)
- dNTPs (2,5 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή F (1 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή R (1 μl)
- Dream Taq (0,2 μl)
- ddH₂O (16,8μl)

Ο τελικός όγκος του δείγματος είναι 25μL.

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* εκλεκτική ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του BsmI είναι:

- Γονιδιωματικό DNA (1 μl)
- DreamTaq Green Buffer 10x [20mM MgCl₂] (2,5μl)
- MgCl₂ (1 μl)
- dNTPs (2,5 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή F (1 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή R (1 μl)
- DMSO (1,75μl)
- Dream Taq (0,2μl)
- ddH₂O (14,05 μl)

Ο τελικός όγκος του δείγματος είναι 25μL.

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* εκλεκτική ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος των ApaI/TaqI είναι:

- Γονιδιωματικό DNA (1 μl)
- DreamTaq Green Buffer 10x [20mM MgCl₂] (2,5μl)
- dNTPs (2,5 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή F (1 μl)
- 10 pmoles/μl εκκινητή R (1 μl)

- Dream Taq (0,2μl)
- ddH₂O (16,8 μl)

Ο τελικός όγκος του δείγματος είναι 25μL.

Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα τοποθετούνται στον αυτόματο κυκλοποιητή θερμοκρασίας για την πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλοποιητής θερμοκρασίας τύπου Eppendorf Mastercycler ep Gradient S. Τα προγράμματα που ακολουθήθηκαν για την εκλεκτική ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων είναι:

Για τον FokI:

- Βήμα 1: 95° C για 5 λεπτά
- Βήμα 2: 95° C για 1 λεπτό
- Βήμα 3: 61° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 4: 72° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 5: επανάληψη των βημάτων 2,3&4 29 φορές
- Βήμα 6: 72° C για 7 λεπτά
- Βήμα 7: Συντήρηση δειγμάτων στους 4° C

Για τον BsmI:

- Βήμα 1: 95° C για 2 λεπτά
- Βήμα 2: 95° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 3: 53° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 4: 72° C για 40 δευτερόλεπτα
- Βήμα 5: επανάληψη των βημάτων 2,3,4 29 φορές
- Βήμα 6: 72° C για 5 λεπτά
- Βήμα 7: Συντήρηση δειγμάτων στους 4° C

Για τον Taq/ApaI:

- Βήμα 1: 94° C για 4 λεπτά
- Βήμα 2: 94° C για 45 δευτερόλεπτα
- Βήμα 3: 64° C για 1 λεπτό
- Βήμα 4: 72° C για 2 λεπτά
- Βήμα 5: επανάληψη των βημάτων 2,3 & 4 5 φορές
- Βήμα 6: 94° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 7: 64° C για 30 δευτερόλεπτα
- Βήμα 8: 72° C για 45 δευτερόλεπτα
- Βήμα 9: Επανάληψη των βημάτων 6,7 & 8 25 φορές
- Βήμα 10: 72° C για 7 λεπτά
- Βήμα 11: Συντήρηση δειγμάτων στους 4° C

Τα προϊόντα που προέκυψαν από την εκλεκτική ενίσχυση των παραπάνω αλληλουχιών έχουν μήκος 265 bp και 360 bp αντίστοιχα για τους πολυμορφισμούς FokI και BsmI, ενώ για τους πολυμορφισμούς ApaI και TaqI το προϊόν της ενίσχυσης της PCR το οποίο υποβάλλεται σε πέψη έχει συνολικό μήκος 745 bp. Για την επαλήθευση της επιτυχημένης ενίσχυσης των ανωτέρω τμημάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια παρατήρηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Ο έλεγχος της επιτυχημένης ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας γίνεται με ηλεκτροφόρηση 5 μl από το μείγμα της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης. Για το μήκος των υπό μελέτη αλληλουχιών ενδείκνυται μια συγκέντρωση της τάξης του 2% για όλους τους πολυμορφισμούς. Η παρασκευή της πηκτής περιλαμβάνει την προσθήκη 3 gr αγαρόζης μέσα σε κωνική φιάλη που περιέχει 150ml 1× TBE. Το TBE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από Tris, βορικό οξύ και EDTA. Μετά από 4 περίπου λεπτά θέρμανσης του μίγματος, ακολουθεί ψύξη του και προσθήκη 5 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου. Το συστατικό αυτό προστίθεται λόγω της ιδιότητας του να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία μετά από διέγερση με υπεριώδες φως. Ακολουθεί έκχυση του περιεχομένου της κωνικής φιάλης στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, πάνω στην οποία έχουν τοποθετηθεί χτένες για την δημιουργία θέσεων φόρτωσης στην πηκτή. Μετά από 10' λεπτά, η πηκτή στερεοποιείται και οι χτένες απομακρύνονται. Ακολουθεί τοποθέτηση της πηκτής μέσα στην κοιλότητα της ηλεκτροφορητικής συσκευής, η οποία είναι γεμάτη με 1×TBE. Σε κάθε θέση φόρτωσης τοποθετούνται 5μl διαλύματος από κάθε δείγμα. Δίπλα στα δείγματα φορτώνονται 5 μl 100bp ladder (μάρτυρας μοριακών μεγεθών). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση ρεύματος 100 V, για περίπου 1 ώρα. Στη συνέχεια η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός, όπου ελέγχεται η επιτυχής ή όχι εκλεκτική ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος του DNA.

5.1.3.7 Πέψη των προϊόντων της PCR

Για να προσδιοριστούν οι γονότυποι το προϊόν της ενίσχυσης κάθε δείγματος υποβάλλεται σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Με βάση την αλληλουχία που περιέχει το σημείο πολυμορφισμού επιλέγεται το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που να έχει θέση αναγνώρισης το σημείο του πολυμορφισμού. Η θέση αναγνώρισης παραμένει ανέπαφη στην περίπτωση ύπαρξης του ενός αλληλομόρφου, ενώ η θέση αυτή χάνεται στην περίπτωση ύπαρξης του άλλου και έτσι το ένζυμο, μη αναγνωρίζοντας θέση κοπής, δεν πραγματοποιεί την πέψη.

Για τον πολυμορφισμό στην θέση Fok1, το ένζυμο περιορισμού που επιλέχθηκε είναι το FokI (New England BioLabs Inc) το οποίο αναγνωρίζει τη θέση:

5'...GGATG(N)₉...3'

3'...CCTAC(N)₁₃...5'

Το προϊόν της PCR που υποβάλλεται σε πέψη έχει συνολικό μήκος 265 bp. Η ύπαρξη του αλληλομόρφου f επιτρέπει την δημιουργία της θέσης αναγνώρισης του FokI και συνεπώς το προϊόν πέπτεται σε δυο τμήματα με μήκος 196 και 69 bp. Όταν υπάρχει το αλληλόμορφο F, η θέση αναγνώρισης χάνεται και έτσι το προϊόν της ενίσχυσης παραμένει ανέπαφο παρά την επώαση με το ένζυμο (μήκος 265 bp).

Για τον πολυμορφισμό BsmI, το ένζυμο περιορισμού που επιλέχθηκε είναι το BsmI (New England BioLabs Inc) και αναγνωρίζει τη θέση:

5'...GAATGCN/...3'

3'...CTTAC/GN....5'

Το προϊόν της PCR που υποβάλλεται σε πέψη έχει συνολικό μήκος 360bp. Η ύπαρξη του αλληλομόρφου b επιτρέπει την δημιουργία της θέσης αναγνώρισης του BsmI και συνεπώς το προϊόν πέπτεται σε δυο τμήματα μήκους 217 και 143 bp. Εάν υπάρχει το αλληλόμορφο B, η θέση αναγνώρισης χάνεται και έτσι το προϊόν της ενίσχυσης παραμένει ανέπαφο παρά την επώαση με το ένζυμο (μήκους 360bp). Το προϊόν της ενίσχυσης της PCR, που αντιστοιχεί στους πολυμορφισμούς TaqI και ApaI και υποβάλλεται σε πέψη έχει συνολικό μήκος 745 bp.

Για τον πολυμορφισμό ApaI, το ένζυμο περιορισμού που επιλέχθηκε είναι το ApaI (New England BioLabs Inc) και αναγνωρίζει τη θέση:

5'...GGGCC/C...3'

3'...G/CCGGG....5'

Η ύπαρξη του αλληλομόρφου A σημαίνει ότι δεν υπάρχει το σημείο αναγνώρισης του ApaI και έτσι το προϊόν της ενίσχυσης παραμένει ανέπαφο παρά την επώαση με τα ένζυμα (μήκους 745 bp). Η ύπαρξη του αλληλομόρφου a επιτρέπει την δημιουργία της θέσης αναγνώρισης του ApaI και συνεπώς το προϊόν πέπτεται σε δυο τμήματα μήκους 528 και 217bp.

Για τον πολυμορφισμό TaqI, το ένζυμο περιορισμού που επιλέχθηκε είναι το TaqI (New England BioLabs Inc) και αναγνωρίζει τη θέση:

5'...T/CGA...3'

3'...AGC/T....5'

Το αλληλόμορφο T του TaqI δημιουργεί δυο τμήματα 495 και 250 bp. Το αλληλόμορφο t οδηγεί σε κοπή σε δύο σημεία και κατά συνέπεια δημιουργεί τρία τμήματα μήκους 290, 250 και 205 bp.

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την in vitro πέψη των ενισχυμένων τμημάτων είναι για τον **FokI**:

- PCR product 10μL
- Cut smart buffer 10x 2μL
- FokI 1μL

- dH₂O 7μL
- Στους 37°C για 2 ώρες

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την in vitro πέψη των ενισχυμένων τμημάτων είναι για τον **Bsm1**:

- PCR product 10μL
- Cut smart buffer 10x 2μL
- BsmI 0,5μL
- dH₂O 7,5μL.
- Στους 65°C για 3 ώρες

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την in vitro πέψη των ενισχυμένων τμημάτων είναι για τον **ApaI**:

- PCR product 10μL
- Cut smart buffer 10x 2μL
- ApaI 0,5μL
- dH₂O 7,5μL.
- Στους 25°C για 3 ώρες

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την in vitro πέψη των ενισχυμένων τμημάτων είναι για τον **TaqI**:

- PCR product 10μL
- Cut smart buffer 10x 2μL
- TaqI 0,3μL
- dH₂O 7,7μL
- Στους 65°C overnight

Ο έλεγχος των πέψεων γίνεται με ηλεκτροφόρηση 10 μl από το μείγμα της αντίδρασης σε πηκτική αγαρόζη, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η ενδεδειγμένη συγκέντρωση αγαρόζης είναι 2% για όλους τους πολυμορφισμούς.

5.2 Επιγενετική-Μέθοδοι

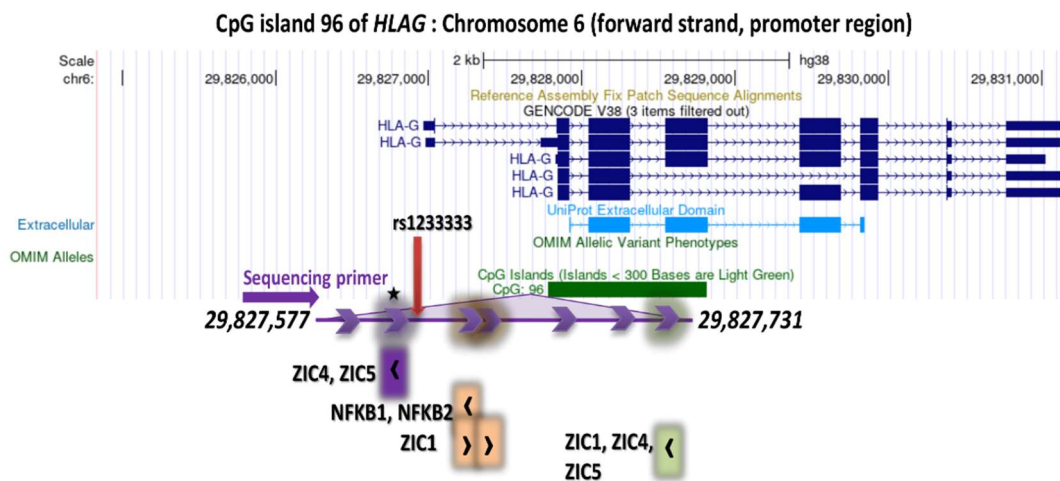
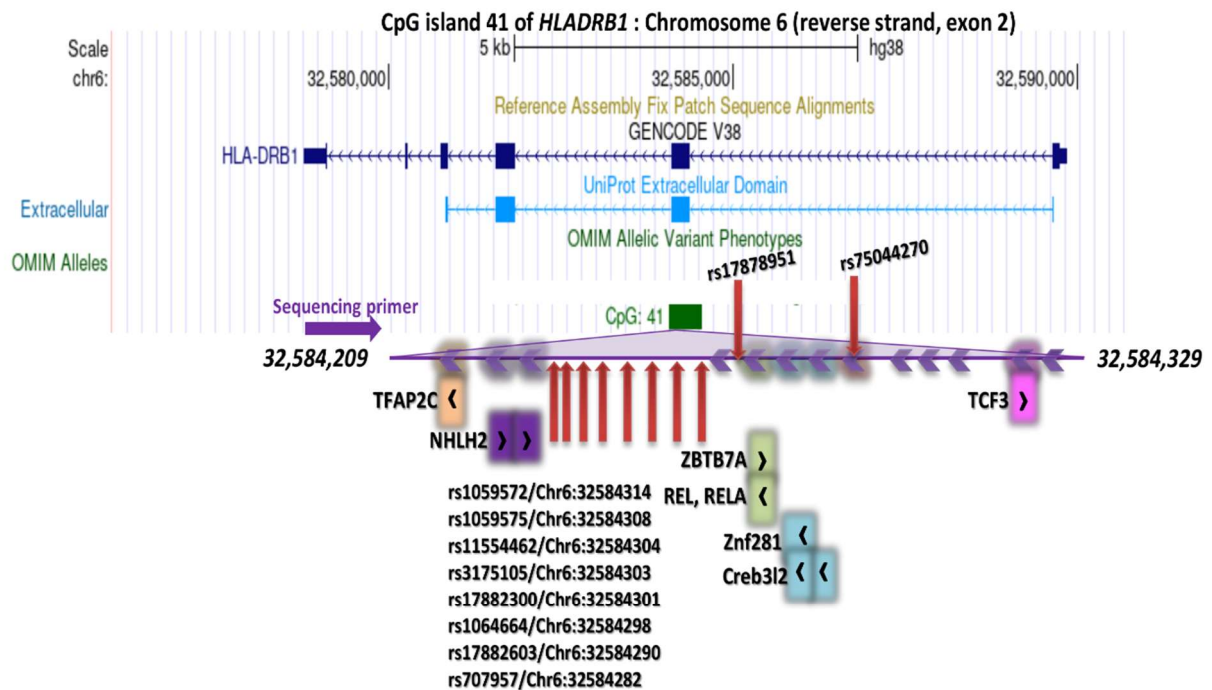
Επιπλέον σε 104 από τα 200 παιδιά του πληθυσμού της μελέτης (44 παιδιά με τροφική αλλεργία και 64 παιδιά στην ομάδα ελέγχου) μελετήθηκε το προφίλ της μεθυλίωσής τους σε συγκεκριμένες περιοχές στους γενετικούς τόπους των FOXP3 και HLA.

5.2.1 Επιλογή των μελετούμενων CpGs/SNPs

Οι θέσεις με υψηλό ποσοστό σε CpG που μελετήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση βιβλιογραφικά κριτήρια όπως η εμπλοκή τους σε αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος στην τροφική αλλεργία σε γενετικό ή επιγενετικό επίπεδο. Νησίδες CpG αλλά και μεμονωμένα δινουκλεοτίδια CG που έχουν ρυθμιστικό ρόλο και βρίσκονται σε διακριτές περιοχές στα υπό

μελέτη γονίδια ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας το UCSC πρόγραμμα περιήγησης του γονιδιώματος (<https://genome.ucsc.edu>). Παράλληλα ταυτοποιήθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί SNPs οι οποίοι βρίσκονται κατά μήκος των γενετικών περιοχών που μελετήθηκαν. Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται οι γενετικοί τόποι των MHC τάξης I και MHC τάξης II, οι θέσεις CpG που μελετήθηκαν κατά μήκος των νησίδων CpG 41 του γονιδίου HLA-DRB1 και CpG 96 του γονιδίου HLA-G αντίστοιχα, καθώς και οι θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων κατά μήκος της υπό μελέτη αλληλουχίας οι οποίες προτείνονται από το προβλεπτικό εργαλείο JASPAR CORE 2020. Στόχος ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο οι θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων επηρεάζονται από την παρουσία SNPs η και από τα επίπεδα μεθυλίωσης των υπο μελέτη περιοχών. Το προφίλ μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 μαζί με κάποια μοναδικά SNPs φαίνεται να ενέχονται στην ανάπτυξη της πολλαπλής σκλήρυνσης. έχει προταθεί ως παράγοντας κινδύνου στις αυτοάνοσες παθήσεις ασκώντας μεγάλη επιρροή στις περιοχές DMRs (Differentially methylated regions). Πιο συγκεκριμένα το προφίλ μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 μαζί με κάποια μοναδικά SNPs φαίνεται να ενέχονται στην ανάπτυξη της πολλαπλής σκλήρυνσης (285). Αντίστοιχα το προφίλ της μεθυλίωσης της ειδικής περιοχής απομεθυλίωσης των Tregs (Treg Specific Demethylated Region, TSDR), μία περιοχή πλούσια σε δινουκλεοτίδια CG, η οποία εδράζεται στη 2^η συντηρημένη μη κωδικοποιούσα αλληλουχία του FOXP3 (μέσα στο ιντρόνιο 1) μελετήθηκε και στις δύο αλυσίδες του DNA (forward και reverse, κωδική και μη κωδική αλυσίδα). Η TSDR ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του FOXP3, η οποία καθορίζεται κατά κύριο λόγο από το προφίλ της μεθυλίωσης των CpGs που εδράζονται στην περιοχή αυτή. Κατά την απομεθυλίωση της TSDR, οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στις θέσεις αναγνώρισης και μαζί με την ανοιχτή διαμόρφωση της χρωματίνης δημιουργείται ένας σταθερός φαινότυπος διαφοροποιημένων TregFOXP3+ ο οποίος προσφέρει ανοχή στα αντιγόνα.

Η περιοχή ανοδικά της νησίδας CpG96 του γονιδίου HLA-G υποβλήθηκε σε ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης με σκοπό να αποκαλυφθεί ο πιθανός ρόλος της στην αλλεργία μέσω της απομεθυλίωσης. Παράλληλα με αυτό τον τρόπο προωθείται και η δημιουργία ενός υποπληθυσμού Treg HLA-G+/FOXP3 αντιγονικών κυττάρων (286).



Εικόνα 8 Χρωμοσωμική θέση των γονιδίων *HLA-DRB1* και του *HLA-G*, των μεταγράφων τους (σκουρό μπλε), των περιοχών των πρωτεϊνικών επιτόπων τους (ανοιχτό μπλε) και των νησίδων CpG (πράσινα πλαίσια) από το GENCODE v.38 (τα εξώνια παρουσιάζονται ως πλαίσια και τα ιντρόνια ως γραμμές, οι γραμμές δείχνουν την κατεύθυνση 5'-3'). Οι γενωμικές περιοχές που αναλύθηκαν με τις νησίδες CpG φαίνονται ως μωβ γραμμές. Τα διαφορετικά χρώμα συσχετίζουν και ταυτοποιούν τα σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζονται από το προφίλ μεθυλίωσης των νησίδων CpG που μελετήθηκαν. Τα SNPs και η θέση τους κατά μήκος των περιοχών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται ως κόκκινες γραμμές. Το SNP rs17878951 εμπλέκεται στη δημιουργία ενός νέου CpG ενώ το SNP rs75044270 εμπλέκεται στη διαγραφή ενός CpG στην περιοχή *HLA-DRB1*. Οι εκκινητές φαίνονται επίσης ως μωβ βέλη.

5.2.2 Απομόνωση του DNA και ανεύρεση των SNP με τη μέθοδο του pyrosequencing

Έγινε επίσης γονοτυπική ανάλυση για τον πολυμορφισμό rs1233333 (G/A), που βρίσκεται εντός της υπο μελέτη περιοχής προκειμένου να βρεθεί η πιθανή επίδρασή του στη μεθυλίωση του DNA κατά μήκος της περιοχής του υποκινητή του HLA-G μεταξύ παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου. Παράλληλα η γονοτύπηση μιας αλληλουχίας 70 bp έδειξε να υπάρχουν αρκετά SNPs στη νησίδα CpG41 (Εικόνα 8) σε μια πληθώρα συνδυασμών ανάμεσα στα παιδιά με τροφική αλλεργία και στην ομάδα ελέγχου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η γονοτύπηση των SNPs στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου HLA-G και της νησίδας CpG41 του γονιδίου HLA-DRB1 έγινε με τη μέθοδο του AQ και SQA Pyrosequencing. Το γενωμικό DNA υπεβλήθη σε ενίσχυση με PCR η οποία ακολουθήθηκε από γονοτύπηση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR και στην αλληλούχηση φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 Σειτ εκκινητών για pyrosequencing

Gene	Region	Assay	Sequence 5'-3'	Primer
FoxP3			TGGGTTAAGTTTGTGTAGGATAGG	Forward
reverse strand	TSDR	CpG	CCCAAACACATATAAAATAACCTAACTCAA	Reverse 5' biotin labeled
			AGGATAGGGTAGTTAGTT	Forward/Pyrosequencing
FoxP3			TGTGGGATGGTTTGTATTTAGTAAAGTAT	Forward
forward strand	TSDR	CpG	CACCCATATCACCCACCT	Reverse 5' biotin labeled
			GGGTTTTGTTGTTATAGT	Forward/Pyrosequencing
HLA-DRB1			AGGATGAGTTTTTGGGTTGTAG	Forward
	CpG41	CpG	CCTACTCCAAAATATCCTTCTAACTATTC	Reverse 5' biotin labeled
			GGAGTGTTATTTTTTAATGGG	Forward/Pyrosequencing
HLA-DQB1			TTTTTGGATGTAGGAAGGTAGAT	Forward
	CpG73	CpG	CCTCCAAAACCTCCTTCTAACTATT	Reverse 5' biotin labeled
			TTAAGGGTATGTGTTATTTTATTAA	Forward/Pyrosequencing
HLA-G			GGGAGGTAGGGAGTTTAGTTTA	Forward
	Immediately upstream CpG96	CpG	CCATAACCACCATCCTTAAC	Reverse 5' biotin labeled
			GGTTAGGGAGAAGTTTTA	Forward/Pyrosequencing
HLA-DRB1			TTCGCCTCAGGAAGACGG	Forward
	CpG41	SQA	CCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCA	Reverse 5' biotin labeled
			CGGAGCGGGTGCGGT	Forward/Pyrosequencing
HLA-G			CAGAACGCTTGGCACAAGAGTAG	Forward
	CpG96	AQ	TGTCACCTAATGGGAGTGAGAACT	Reverse 5' biotin labeled
			CACAGGCGGTGTATG	Forward/Pyrosequencing

5.2.3 Μετατροπή διθειώδους νατρίου και ανάλυση με τη μέθοδο του pyrosequencing

Το προφίλ της μεθυλίωσης των νησίδων CpG κατά μήκος της υπό μελέτη αλληλουχίας αναλύθηκε με τη μέθοδο του pyrosequencing. Η μετατροπή του διθειώδους νατρίου για κάθε δείγμα του DNA έγινε πριν το pyrosequencing για την πλήρη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. Για να πραγματοποιηθεί η μετατροπή αυτή, θα πρέπει το DNA να αποδιαταχθεί και να επικρατούν συνθήκες με υψηλή συγκέντρωση διθειώδους νατρίου, υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH. Η όλη διαδικασία έγινε με βάση το προτυποποιημένο σύστημα EpiTect Bisulfite Kit της εταιρίας Qiagen. Πιο συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. Μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών με διθειώδες νάτριο
2. Πρόσδεση των τροποποιημένων μονόκλωνων αλυσίδων DNA σε στήλη μεμβράνης
3. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα και άλατα
4. Αντίδραση αποσουλφονιλίωσης του DNA που είναι δεσμευμένο στη μεμβράνη της στήλης και στη συνέχεια απομακρύνεται ο παράγοντας που επάγει την αντίδραση
5. Έκλυση του DNA

Οι εκκινητές για την αλληλούχηση, ειδικοί για την ανάλυση της μεθυλίωσης κάθε αλυσίδας του DNA καθώς και όλα τα σετ των εκκινητών σχεδιάστηκαν με το λογισμικό PyroMark Assay Design Software version 2.0 (Qiagen) (Πίνακας 4). Το πρόγραμμα δημιουργεί αυτόματα μια λίστα από διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών. Το κάθε ζευγάρι διαθέτει έναν ευθύ εκκινητή (Forward primer) και έναν ανάστροφο εκκινητή (Reverse primer) για την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου μέσω PCR, συνοδευόμενος από τον εκκινητή αλληλούχησης (Sequencing primer) ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί στη μετέπειτα αντίδραση του Pyrosequencing. Οι εκκινητές σχεδιάζονται με βάση την αλληλουχία του bisulfite converted DNA. Για κάθε ζευγάρι, ταξινομούμενο κατά φθίνουσα σειρά, αναγράφεται η βαθμολογία (score) που έχει λάβει, ανάλογα με τις παραμέτρους που ορίσαμε στο λογισμικό. Επιθυμούμε εκκινητές χωρίς επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια αδενίνης και θυμίνης στο 3'-άκρο τους, ώστε να συμβαίνει καλή υβριδοποίηση. Η αναλογία GC: AT τους να είναι κοντά στο 50% και το μήκος από 18 έως 30 νουκλεοτίδια. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_m) να μην διαφέρει μεταξύ των εκκινητών της PCR παραπάνω από 2-3 °C. Εξετάζουμε πρώτα αυτά με τη μεγαλύτερη βαθμολογία και τις λιγότερες αστοχίες (penalty) όπως η μη ειδική πρόσδεση τους (mispriming), ο σχηματισμός βρόγχων και η συμπληρωματικότητα των 3' άκρων των εκκινητών μεταξύ τους που οδηγεί στη σύνθεση διμερών εκκινητών.

Οι αντιδράσεις του pyrosequencing διενεργήθηκαν με την τεχνολογία PyroMark Q24 MDx (Qiagen). Η περιοχή DNA που μελετάμε, έχει υποστεί προηγουμένως bisulfite conversion και έχει ενισχυθεί με την αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές, ο ένας εκ των οποίων είναι βιοτινυλιωμένος στο 5' άκρο. Ο 5' βιοτινυλιωμένος R εκκινητής, έχει ως σκοπό την επιλογή της μιας αλυσίδας του PCR προϊόντος. Τα βιοτινυλιωμένα άκρα προσδένονται εκλεκτικά σε σφαιρίδια σεφαρόζης τα οποία είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Στην αλυσίδα αυτή θα υβριδοποιηθεί ο sequencing εκκινητής και θα χρησιμοποιηθεί ως αλυσίδα μήτρα για τον νεοσυντιθέμενο κλώνο κατά την αντίδραση του Pyrosequencing. Το Pyrosequencing απαιτεί: bisulfite converted μονόκλωνη αλυσίδα PCR προϊόντος, τέσσερα διαφορετικά ένζυμα (DNA πολυμεράση, ATP-σουλφορυλάση, λουσιφεράση και απυράση), τα υποστρώματα 5' φωσφοθειϊκή αδενοσίνη [adenosine 5' phosphosulfate (APS)] και λουσιφερίνη καθώς και τη μονόκλωνη συνδετική πρωτεΐνη (SSB) για την αποτροπή δευτεροταγών δομών στην αλυσίδα μήτρα. Αρχικά, ο sequencing εκκινητής που έχουμε σχεδιάσει υβριδοποιείται στη 5' βιοτινυλιωμένη μονόκλωνη bisulfite converted αλυσίδα DNA. Ο καταρράκτης των αντιδράσεων ξεκινά με την διανομή νουκλεοτιδίων ένα κάθε φορά, διανομή καθορισμένη μέσω του λογισμικού PyroMark Q24 Software 2.0.8, με βάση την αλληλουχία του bisulfite converted DNA τα επίπεδα μεθυλίωσης της οποίας θέλουμε να μελετήσουμε. Τα νουκλεοτίδια ενσωματώνονται στον νεοσυντιθέμενο κλώνο από την DNA πολυμεράση εφόσον είναι συμπληρωματικά με την αλληλουχία, με κατεύθυνση 5'->3'. Για κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθεται, απελευθερώνεται ένα πυροφωσφορικό (PPi). Έπειτα, τα μόρια PPi που έχουν απελευθερωθεί, μετατρέπονται στοιχειομετρικά σε μόρια ATP, με υπόστρωμα το APS και με τη βοήθεια του ενζύμου ATP-σουλφορυλάση. Το παραγόμενο ATP οδηγεί στην οξειδωση του υποστρώματος λουσιφερίνη μέσω της λουσιφεράσης, σε οξυλουσιφερίνη. Έτσι, παράγεται ορατό φως με μέγιστο μήκος κύματος τα 560nm, σε ποσότητα ανάλογη με τον αριθμό των μορίων ATP που συντίθενται και κατ' επέκταση τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται. Το ορατό αυτό φως, καταγράφεται από μία ενσωματωμένη κάμερα της συσκευής. Μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και μόρια ATP, αποικοδομούνται από το ένζυμο απυράση πριν την προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου. Ο καταρράκτης αυτός των αντιδράσεων επαναλαμβάνεται και το παραγόμενο φως απεικονίζεται ως κορυφή στο πυρόγραμμα (Pyrogram) που προκύπτει στο τέλος της αντίδρασης, με ύψος αντίστοιχο με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που έχουν ενσωματωθεί. Καθώς dNTPs προστίθενται διαδοχικά, ο συμπληρωματικός κλώνος DNA επιμηκύνεται και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται από τις κορυφές σήματος στο πυρόγραμμα που προκύπτει. Δοκιμασίες ελέγχου της αποτελεσματικότητας της μετατροπής διθειώδους νατρίου εφαρμόζοταν σε κάθε κύκλο του pyrosequencing.

5.3 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS Statistics Version 20.0 (IBM, Chicago, Illinois, USA) και το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism 5.40 (GraphPad Software Inc.).

Τα χαρακτηριστικά του δείγματος υπολογίστηκαν και εκφράστηκαν σύμφωνα με τις αρχές της περιγραφικής στατιστικής. Οι ποσοτικές-συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (standard deviation, SD) ή διάμεση τιμή (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) (interquartile range, IQR), ανάλογα εάν η διακύμανση των τιμών τους ακολουθούσε τις αρχές της κανονικής κατανομής. Ο έλεγχος της κανονικότητας των συνεχών-ποσοτικών μεταβλητών διενεργήθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov ή με την δοκιμασία Shapiro-Wilk, αναλόγως. Οι ποιοτικές-κατηγορικές μεταβλητές εκφράστηκαν ως συχνότητα εκφρασμένη σε απόλυτη τιμή (n) και επί τοις εκατό (%).

Κατά το πρώτο μέρος της ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιμέρους χαρακτηριστικών του δείγματος ανάμεσα στις ακόλουθες ομάδες:

- A. Ασθενείς (παιδιά με τροφική αλλεργία) – μάρτυρες
- B. Παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D – παιδιά με επάρκεια βιταμίνης D
- Γ. Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία – παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία
- Δ. Άρρενα – θήλεα

Η σύγκριση των ποσοτικών-συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία student's unpaired t-test ή την μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney. Η σύγκριση των ποιοτικών-κατηγορικών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Pearson chi square (χ^2) μετά από διόρθωση συνεχείας κατά Yates (Yates' continuity corrected chi-square test), ή στην περίπτωση όπου ο αριθμός των αναμενόμενων παρατηρήσεων ήταν μικρότερος από 5 σε περισσότερο του 20% των κελιών των πινάκων συνάφειας, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fisher's exact (Fisher's exact test).

Η συσχέτιση της εκδήλωσης τροφικής αλλεργίας με μεταβλητές ενδιαφέροντος, όπως τα επίπεδα της βιταμίνης D, το φύλο, η διάρκεια του μητρικού θηλασμού, ή το ιστορικό ατοπίας ελέγχθηκε με μεμονωμένη και πολλαπλή λογιστική παλίνδρομη ανάλυση. Για κάθε παράμετρο υπολογίστηκε ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratio) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals) στο 95%. Όλες οι δοκιμασίες ήταν δύο κατευθύνσεων (two-tailed) και το αποδεκτό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το 5% ($p < 0.05$). Επιπλέον, μεμονωμένη και πολλαπλή λογιστική παλίνδρομη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της συσχέτισης της εκδήλωσης ανεπάρκειας βιταμίνης D με τις μεταβλητές φύλο, διάρκεια του μητρικού θηλασμού, έκθεση στον ήλιο, ή το ιστορικό ατοπίας, καθώς επίσης και της συσχέτισης της εκδήλωσης πολλαπλής τροφικής αλλεργίας με τις μεταβλητές επίπεδα της βιταμίνης D, το φύλο, η διάρκεια του μητρικού θηλασμού, ή το ιστορικό ατοπίας.

Στο δεύτερο μέρος της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των πολυμορφισμών Arai, BsmI, FokI και TaqI του υποδοχέα της βιταμίνης D. Η ανάλυση των πολυμορφισμών (γονότυπος, συχνότητα αλληλομόρφων και απλότυπος) εκφράστηκε ως συχνότητα, σε απόλυτη τιμή (n) και επί τοις εκατό (%). Η σύγκριση των συχνοτήτων πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στις προαναφερθέντες ομάδες:

- A. Ασθενείς (παιδιά με τροφική αλλεργία) – μάρτυρες
- B. Παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D – παιδιά με επάρκεια βιταμίνης D
- Γ. Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία – παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία
- Δ. Άρρενα – θήλεα

Η σύγκριση των ποιοτικών-κατηγορικών μεταβλητών (συχνοτήτων) πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Pearson chi square (χ^2), ή την δοκιμασία Fisher's exact, με βάση τις αρχές που προαναφέρθηκαν. Για τη διερεύνηση της επίδρασης του γονοτύπου και του απλοτύπου των πολυμορφισμών Arai, BsmI, FokI και TaqI του υποδοχέα της βιταμίνης D στην εκδήλωση της τροφικής αλλεργίας, της ανεπάρκειας βιταμίνης D, ή της πολλαπλής τροφικής αλλεργίας χρησιμοποιήθηκαν οι λόγοι των πιθανοτήτων (odds ratio), τα διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals) στο 95%, με αποδεκτό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5% ($p < 0.05$).

Συμπληρωματικά με τον υπολογισμό των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος αντιπροσωπευτικότητας δειγμάτων με τη χρήση του θεωρήματος Hardy–Weinberg (διερεύνηση εάν υπάρχουν στις επιμέρους ομάδες στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy–Weinberg).

Το θεώρημα των Hardy–Weinberg αποτελεί έναν από τους βασικούς νόμους της γενετικής και στηρίζεται σε κάποιες παραδοχές για τον τρόπο που αναπαράγεται ένας διπλοειδής οργανισμός προκειμένου να υπολογίσει τις συχνότητες με τις οποίες θα εμφανίζεται ο κάθε γονότυπος σε ένα γενετικό τόπο με δύο αλληλόμορφα. Σύμφωνα με το θεώρημα αυτό, οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό παραμένουν σταθερές κατά τις διάφορες γενιές αν δεν επιδράσουν άλλοι παράγοντες εκτός από την ανακατανομή των γονιδίων κατά τη διαδικασία της γαμετογένεσης. Για την περίπτωση ενός χαρακτηριστικού που καθορίζεται από δύο αλληλόμορφα (A και a), το θεώρημα ορίζει ότι:

1. $p+q = 1$, όπου p η συχνότητα του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου (A) και q η συχνότητα του άλλου (a)
2. $p^2+2pq+q^2 = 1$, όπου p^2 η συχνότητα των AA ατόμων, $2pq$ η συχνότητα των Aa και aA ατόμων και q^2 η συχνότητα των aa ατόμων. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτός ο υπολογισμός της συχνότητας των αλληλόμορφων σε ένα πληθυσμό, αν γνωρίζουμε τη συχνότητα των γονοτύπων, και αντίστροφα.

Στο τρίτο μέρος της ανάλυσης υπολογίσαμε την Ανισορροπία Γενετικής Σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών ApaI, BsmI, FokI και TaqI του υποδοχέα της βιταμίνης D. Ανισορροπία σύνδεσης ονομάζεται η ιδιότητα που έχουν δύο γειτονικά αλληλόμορφα να συγκληρονομούνται πιο συχνά από όσο θα αναμενόταν λόγω της τυχαιότητας. Εξαιτίας λοιπόν της μη τυχαίας συσχέτισης των γειτονικών αλληλόμορφων, η γνώση της γενετικής θέσης ενός αλληλόμορφου A επιτρέπει την πρόβλεψη του αλληλόμορφου μιας γειτονικής γενετικής θέσης B, όταν οι A και B βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στις θέσεις A και B χαρακτηρίζονται ως SNPs επισήμανσης (tag SNPs). Θεωρείται ότι το γονιδίωμα του ανθρώπου αποτελείται από τμήματα ανισορροπίας σύνδεσης απλότυπων που διαχωρίζονται από περιοχές υψηλής πιθανότητας ανασυνδυασμού. Εκτός από τα φαινόμενα ανασυνδυασμού, φαινόμενα γενετικής απόκλισης ή πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης μπορούν επίσης να διαμορφώσουν διαφορετικά πρότυπα απλοτυπικών συμπλόκων.

Το τεστ ANOVA δύο κατευθύνσεων διενεργήθηκε για να αναλυθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ θηλασμού ή καπνίσματος των γονέων και της τροφικής αλλεργίας στα επίπεδα της μεθυλίωσης.

6. Αποτελέσματα

6.1 Μέρος Α

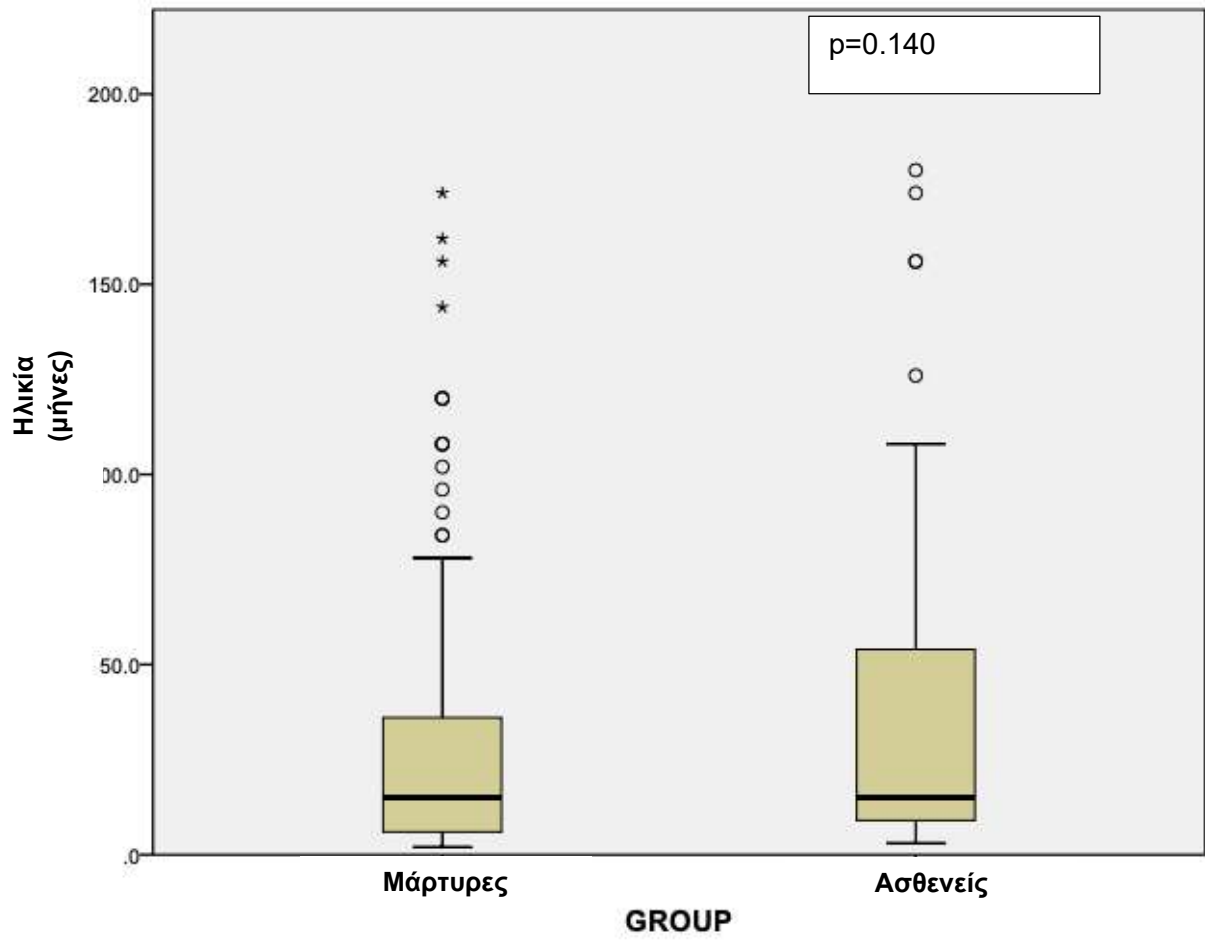
6.1.1 Σύγκριση ασθενών με τροφική αλλεργία έναντι μαρτύρων

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 90 παιδιά με τροφική αλλεργία και 110 παιδιά ως μάρτυρες. Από τη σύγκριση των δημογραφικών χαρακτηριστικών ασθενών μαρτύρων (Πίνακας 5, Εικόνα 9) φάνηκε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους αναφορικά με την ηλικία και τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά. Ωστόσο οι δύο ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκθεση στον ήλιο ($p=0.003$) και στις τιμές της βιταμίνης D ($p=0.012$). Τα παιδιά με τροφική αλλεργία είχαν μικρότερη έκθεση στον ήλιο και παρουσίαζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ανεπάρκεια βιταμίνης D ($p=0.003$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 5, Εικόνα 10). Σχετικά με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά που ελέγχθηκαν από το ιστορικό των παιδιών, φάνηκε ότι το κάπνισμα των γονέων δεν διέφερε ανάμεσα στις δύο ομάδες.

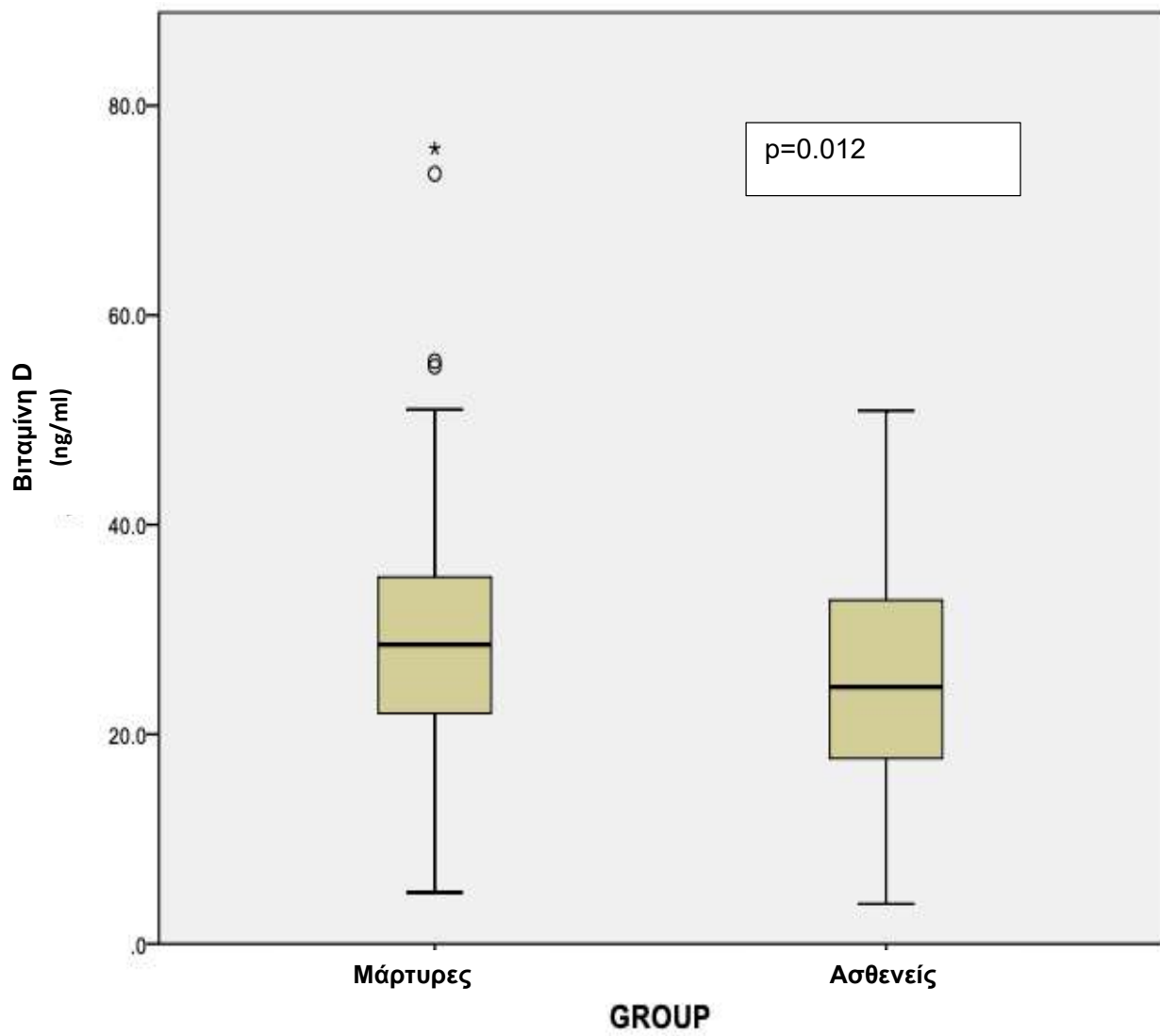
Όμως, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό του μητρικού θηλασμού ($p=0.019$) και στη διάρκεια του ($p=0.001$) όπου τα παιδιά με τροφική αλλεργία είχαν θηλάσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επίσης οι δύο ομάδες διέφεραν και στο οικογενειακό ιστορικό ατοπίας ($p=0.013$) με τα αλλεργικά παιδιά να παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια.

Πίνακας 5. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

	Ασθενείς n (%)	Μάρτυρες n (%)	p-value
	n=90	n=110	
Ηλικία, μήνες	15 (9-54)	15 (6-36)	0.140
Φύλο, άρρεν	54 (60)	58 (53)	0.303
Βάρος, Kg	11 (8.6-16.5)	10.6 (7.6-16)	0.165
Βάρος, ΕΘ			
Ύψος, cm	80.5 (72-102)	80 (67-100)	0.209
Ύψος, ΕΘ			
BMI, Kg/cm2	16.5 (15.1-18.1)	16.5 (15.3-18.3)	0.795
Έκθεση στον ήλιο			0.003
• <10 λεπτά ανά ημέρα	36 (40)	20 (18)	
• 10-15 λεπτά ανά ημέρα	27 (30)	43 (39)	
• >15 λεπτά ανά ημέρα	27 (30)	47 (43)	
Βιταμίνη D	25.5 ± 10.1	29.5 ± 11.7	0.012
Ανεπάρκεια Βιταμίνης D	32 (36)	19 (17)	0.003
VDBP	238 (190-298)	223 (196-274)	0.464
Κάπνισμα			0.842
• Πατέρας	30 (33)	42 (38)	
• Μητέρα	9 (10)	10 (9)	
• Και οι δύο γονείς	4 (4)	3 (3)	
Μητρικός θηλασμός	71 (79)	70 (64)	0.019
Διάρκεια μητρικού θηλασμού, μήνες	5.7 (1-8)	1 (1-7)	0.001
Ιστορικό ατοπίας			0.013
• Πατέρας	13 (14)	16 (15)	
• Μητέρα	18 (20)	12 (11)	
• Και οι δύο γονείς	14 (16)	6 (5)	
Μήνας λήψης δείγματος			1.000
Εποχή λήψης δείγματος			0.806
• Χειμώνας	18 (20)	17 (15)	
• Άνοιξη	26 (29)	30 (27)	
• Καλοκαίρι	18 (20)	25 (23)	
• Φθινόπωρο	28 (31)	38 (35)	



Εικόνα 9. Θηκόγραμμα ηλικίας ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

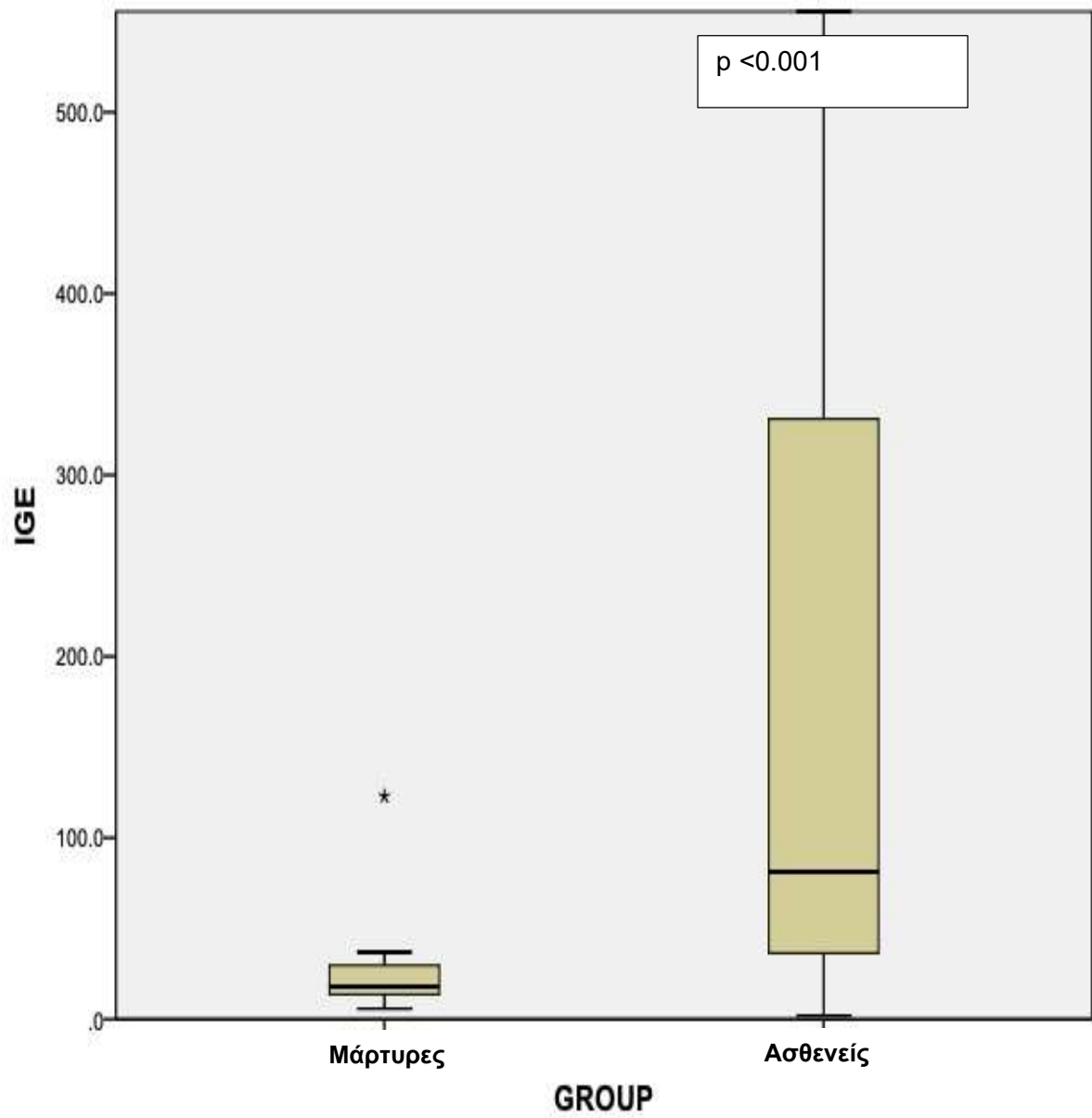


Εικόνα 10. Θηκόγραμμα τιμών Βιταμίνης D ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες

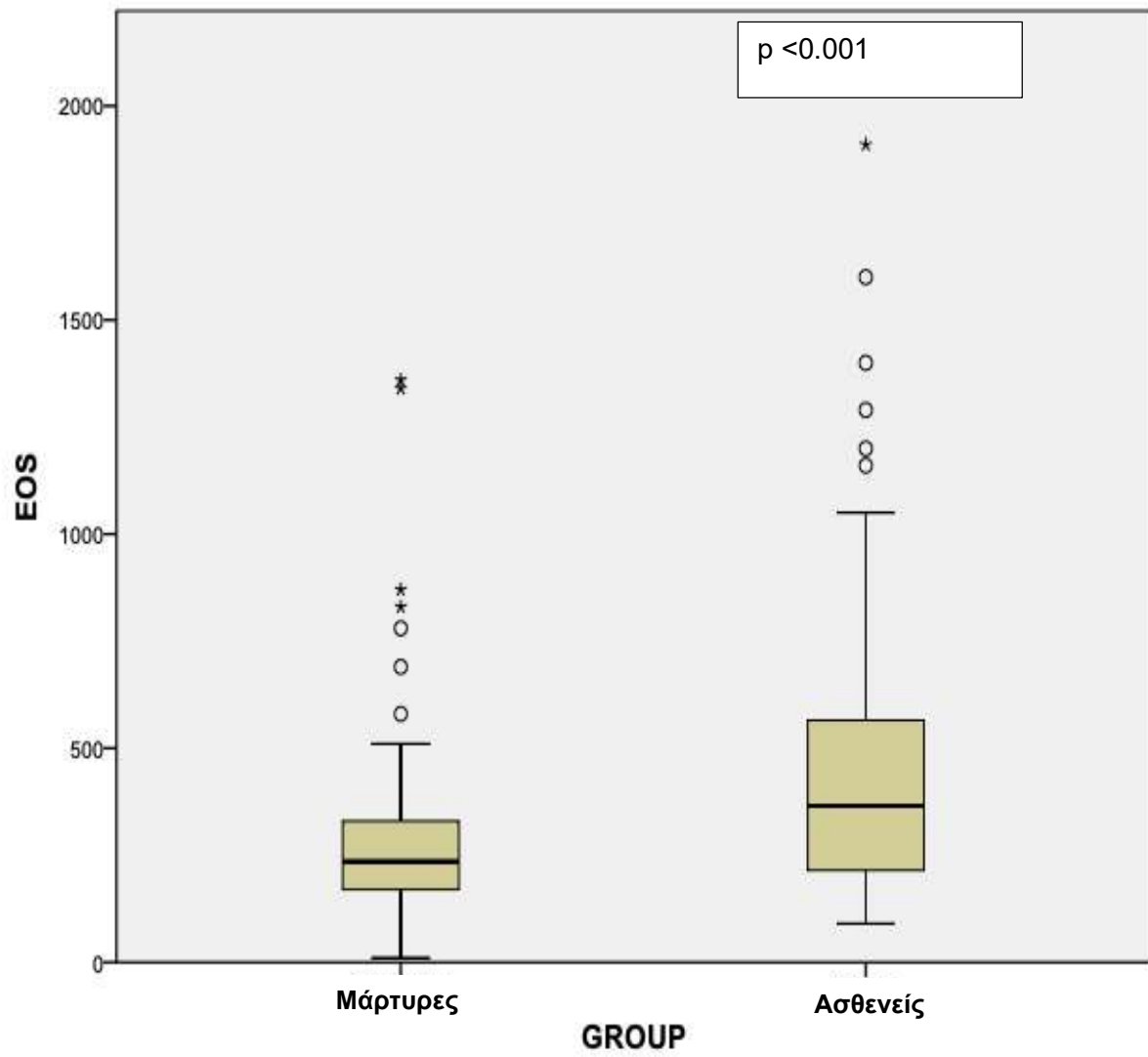
Στη σύγκριση των αλλεργιολογικών χαρακτηριστικών των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου, παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες στα δερματικά τεστ δια νυγμού (spts) ($p < 0.001$), στα RAST ($p < 0.001$), στις τιμές της ολικής IgE ($p < 0.001$), αλλά και στις τιμές των ηωσινόφιλων ($p < 0.001$) (Εικόνες 11 & 12).

Πίνακας 6. Αλλεργιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

	Ασθενείς n (%)	Μάρτυρες n (%)	p-value
	n=90	n=110	
SPTs			<0.001
• Μεμονωμένα	59 (66)	-	
• Πολλαπλά	31 (34)	-	
RAST			<0.001
• Μεμονωμένα	58 (64)		
• Πολλαπλά	32 (36)		
RAST category			-
• I	20 (22)	-	
• II	35 (39)	-	
• III	25 (28)	-	
• IV	7 (8)	-	
• V	3 (3)	-	
IgE	81.2 (36.5-330.9)	18 (13.7-29.6)	<0.001
Ηωσινόφιλα	365 (215-565)	235 (170-330)	<0.001



Εικόνα 11. Θηκόγραμμα τιμών IgE ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.



Εικόνα 12. Θηκόγραμμα τιμών Ηωσινόφιλων ανάμεσα σε ασθενείς με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

Στη μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση της τροφικής αλλεργίας με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος αναδείχθηκε αρνητική συσχέτιση της τροφικής αλλεργίας με τα επίπεδα της βιταμίνης D ($p=0.014$), η οποία επιβεβαιώθηκε και στην πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση ($p=0.042$). Παράλληλα αναδείχθηκε θετική συσχέτιση της τροφικής αλλεργίας με τη διάρκεια του μητρικού θηλασμού ($p=0.001$) η οποία επαληθεύτηκε και στην πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση ($p=0.003$). Επίσης το οικογενειακό ιστορικό ατοπίας συσχετίστηκε θετικά με την τροφική αλλεργία τόσο στη μεμονωμένη ($p=0.001$) όσο και στην πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση ($p=0.013$). Αναφορικά με το άρρεν φύλο παρουσιάστηκε αρνητική συσχέτιση με την τροφική αλλεργία στην πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση.

Πίνακας 7. Μεμονωμένη και πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση συσχέτισης της τροφικής αλλεργίας με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος.

Μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Βιταμίνη D	0.014	0.96	0.94-0.99
Φύλο, άρρεν	0.303	0.74	0.42-1.30
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.001	1.14	1.05-1.23
Ιστορικό ατοπίας	0.001	1.57	1.19-2.08

Πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Βιταμίνη D	0.042	0.96	0.93-0.99
Φύλο, άρρεν	0.042	0.49	0.24-0.97
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.003	1.14	1.04-1.24
Ιστορικό ατοπίας	0.013	1.51	1.09-2.09

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

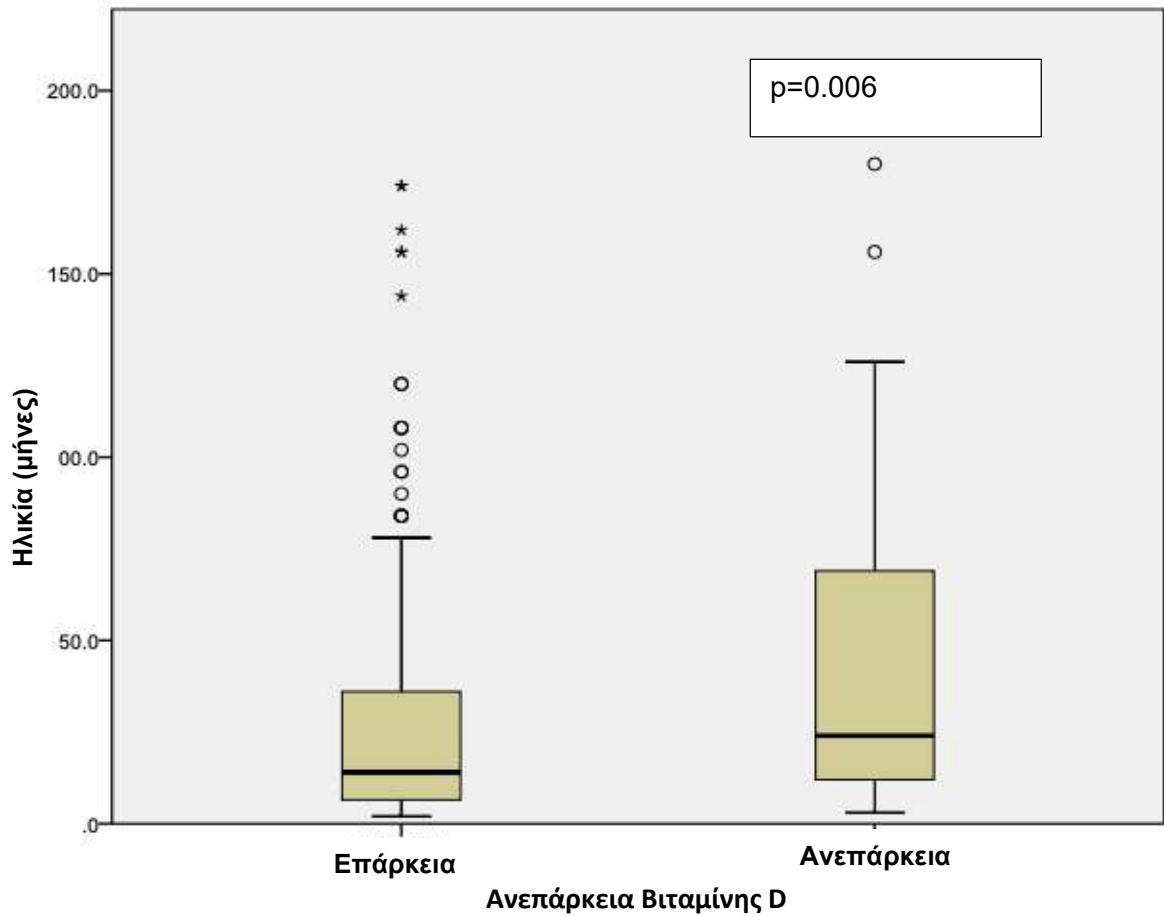
6.1.2 Σύγκριση παιδιών με ανεπάρκεια Βιταμίνης D έναντι παιδιών με επάρκεια Βιταμίνης D

Στη σύγκριση των δημογραφικών στοιχείων ανάμεσα σε παιδιά με επάρκεια και σε παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D που φαίνεται στον Πίνακα 8, οι δύο ομάδες διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους σε χαρακτηριστικά όπως η ηλικία ($p=0.006$), το φύλο ($p=0.075$), το βάρος σώματος ($p=0.002$) και το ύψος ($p=0.005$) (Πίνακας 8, Εικόνα 13).

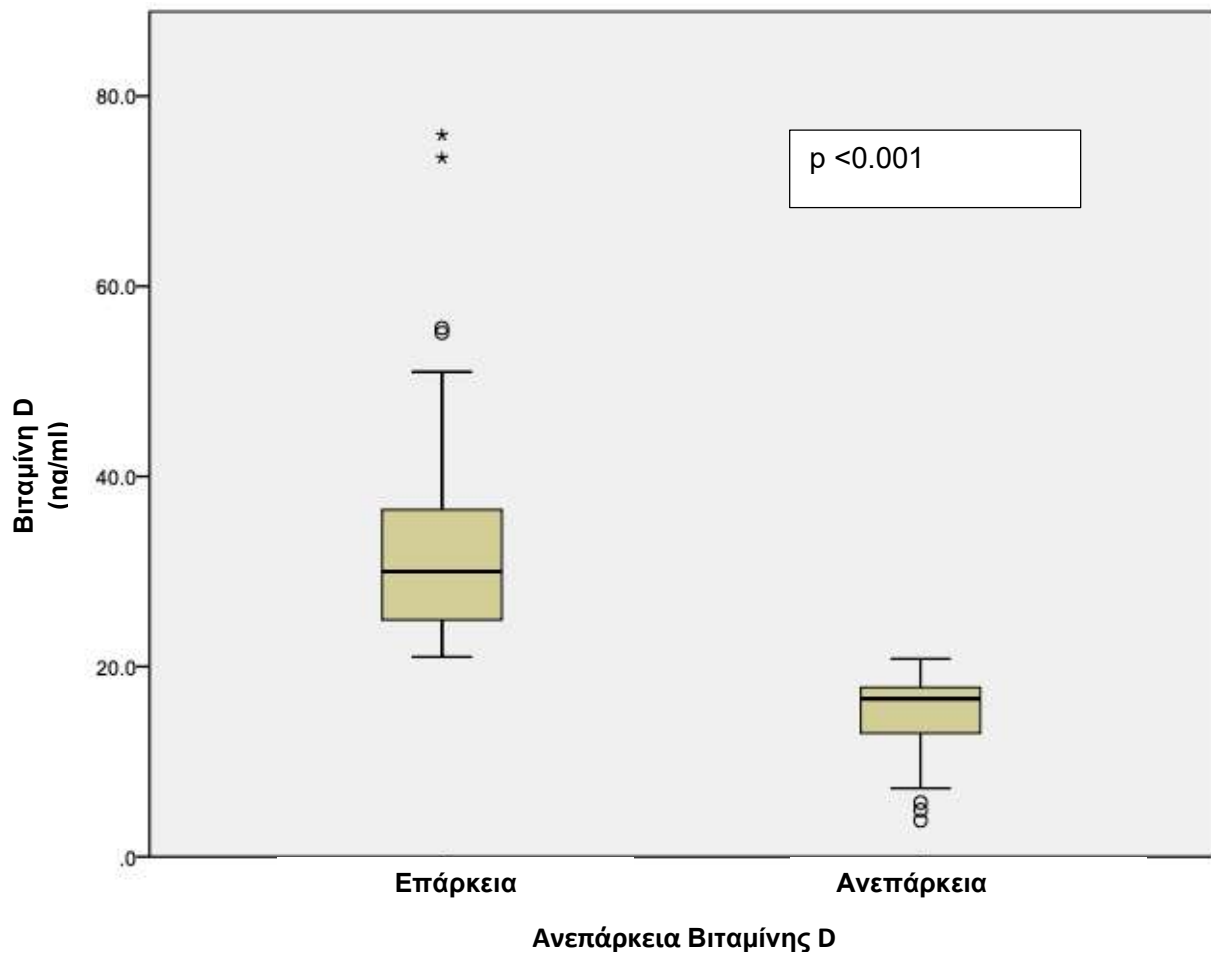
Επιπλέον παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στην έκθεση στον ήλιο ($p=0.011$) καθώς τα παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D είχαν εκτεθεί λιγότερο στην ηλικία ακτινοβολία. Επίσης, τα παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από τα παιδιά με επάρκεια ($p<0.001$) όπως και αναμενόταν. Σημαντικές διαφορές υπήρχαν και στη διάρκεια του μητρικού θηλασμού όπου τα παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D είχαν θηλάσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Πίνακας 8, Εικόνα 14). Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορές σημειώθηκαν επίσης στη δειγματοληψία οι οποίες αφορούσαν το μήνα ($p=0.005$) αλλά και την εποχή λήψης του δείγματος ($p=0.013$).

Πίνακας 8. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D και παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D.

	Παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D n (%)	Παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D n (%)	p-value
	n=51	n=149	
Ηλικία, μήνες	24 (12-69)	14 (6-36)	0.006
Φύλο, άρρεν	23 (45)	89 (60)	0.075
Βάρος, Kg	13 (9.9-20.5)	10 (7.7-15)	0.002
Βάρος, ΕΘ			
Ύψος, cm	88 (74-116.5)	79 (68-98)	0.005
Ύψος, ΕΘ			
BMI, Kg/cm²	16.9 (15.5-18.3)	16.5 (15.1-18.1)	0.415
Έκθεση στον ήλιο			0.011
• <10 λεπτά ανά ημέρα	22 (43)	34 (23)	
• 10-15 λεπτά ανά ημέρα	17 (33)	53 (36)	
• >15 λεπτά ανά ημέρα	12 (24)	62 (42)	
Βιταμίνη D	15.2 ± 4.2	32.1 ± 9.4	<0.001
VDBP	261 (192-312)	231 (193-276)	0.236
Κάπνισμα			0.569
• Πατέρας	19 (37)	53 (36)	
• Μητέρα	7 (14)	12 (8)	
• Και οι δύο γονείς	1 (2)	6 (4)	
Μητρικός θηλασμός	39 (77)	102 (69)	0.294
Διάρκεια μητρικού θηλασμού, μήνες	6 (1-8.5)	4 (1-7)	0.049
Ιστορικό ατοπίας			0.354
• Πατέρας	8 (16)	21 (14)	
• Μητέρα	11 (22)	19 (13)	
• Και οι δύο γονείς	6 (12)	14 (9)	
Μήνας λήψης δείγματος			0.005
Εποχή λήψης δείγματος			0.013
• Χειμώνας	12 (24)	23 (15)	
• Άνοιξη	20 (39)	36 (24)	
• Καλοκαίρι	11 (21)	32 (22)	
• Φθινόπωρο	8 (16)	58 (39)	



Εικόνα 13. Θηκόγραμμα ηλικίας ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D και παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D.

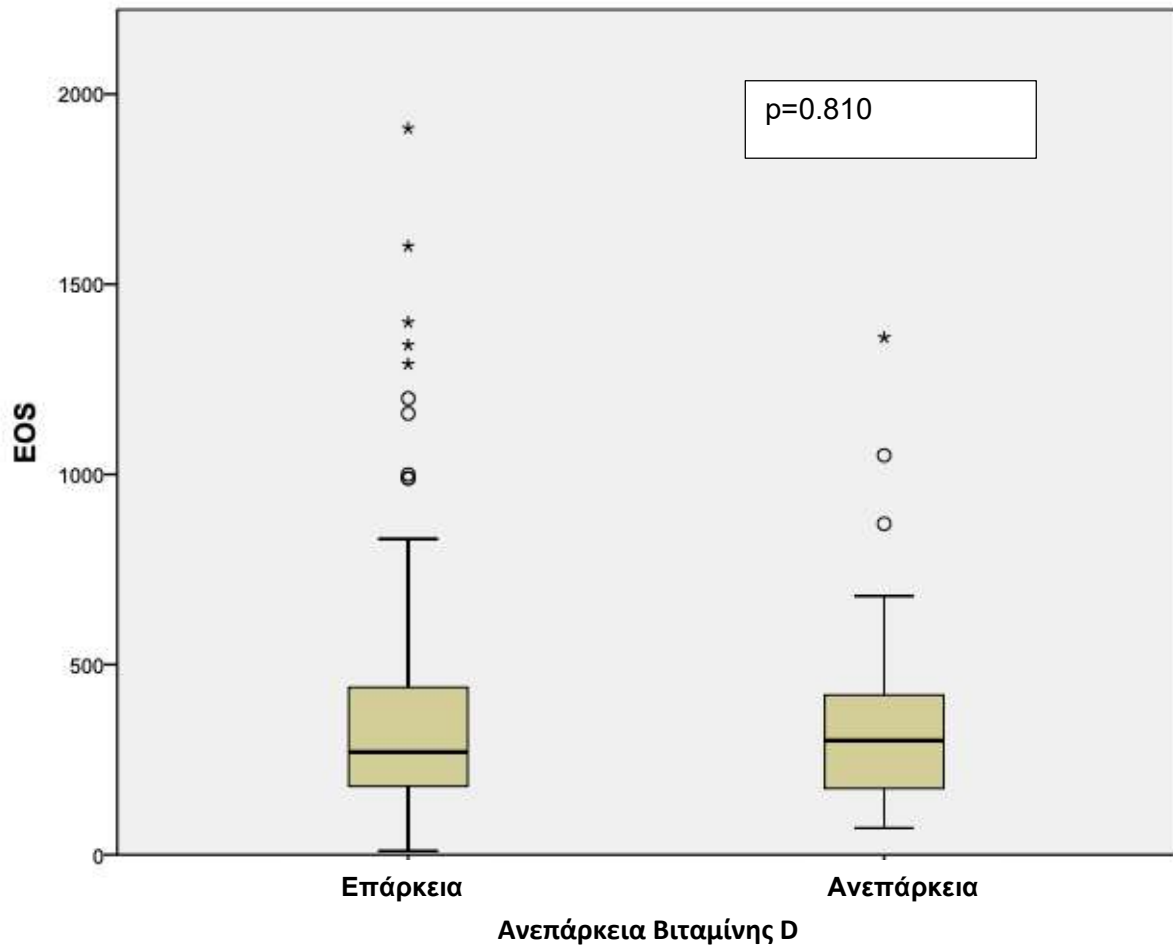


Εικόνα 14. Θηκόγραμμα τιμών Βιταμίνης D ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D και παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D.

Η σύγκριση των αλλεργιολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα παιδιά με επάρκεια και στα παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης παρουσιάζεται στον Πίνακα 9. Στη σύγκριση αυτή παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα δερματικά τεστ δια νυγμού (spts) ($p=0.012$), στα ειδικά IgEs (Rast) ($p=0.013$) καθώς και στις τιμές της ολικής IgE ($p=0.003$). Αντίθετα στις τιμές των ηωσινοφίλων δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (Εικόνα 15).

Πίνακας 9. Αλλεργιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D και παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D.

	Παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D n (%)	Παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D n (%)	p-value
	n=51	n=149	
SPTs			0.012
• Μεμονωμένα	21 (41)	38 (26)	
• Πολλαπλά	11 (22)	20 (13)	
RAST			0.013
• Μεμονωμένα	21 (41)	37 (25)	
• Πολλαπλά	11 (22)	21 (14)	
RAST category			0.504
• I	7 (22)	13 (22)	
• II	10 (31)	25 (43)	
• III	9 (28)	16 (28)	
• IV	4 (13)	3 (5)	
• V	2 (6)	1 (2)	
IgE	158.4 (62.3-486)	39.6 (18-151.7)	0.003
Ηωσινόφιλα	300 (174.5-420)	270 (180-440)	0.810



Εικόνα 15. Θηκόγραμμα τιμών Ηωσινοφίλων ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D και παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D.

Στη μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος υπήρχε αρνητική συσχέτιση με την έκθεση στον ήλιο ($p=0.004$, $OR=0.54$), εύρημα που επαληθεύτηκε και στην πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση. Αναφορικά με το μητρικό θηλασμό, υπήρχε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη διάρκεια του και την τροφική αλλεργία ($p=0.038$, $OR=1.08$), όπως επαληθεύτηκε και από την πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση ($p=0.068$, $OR=1.08$).

Πίνακας 10. Μεμονωμένη και πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση συσχέτισης της ανεπάρκειας της Βιταμίνης D με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος.

Μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Φύλο, άρρεν	0.071	1.80	0.95-3.42
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.038	1.08	1.05-1.17
Έκθεση στον ήλιο	0.004	0.54	0.36-0.82
Ιστορικό ατοπίας	0.123	1.25	0.94-1.68

Πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Φύλο, άρρεν	0.361	1.40	0.67-2.88
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.068	1.08	0.99-1.17
Έκθεση στον ήλιο	0.069	0.65	0.42-1.03
Ιστορικό ατοπίας	0.591	1.09	0.78-1.52

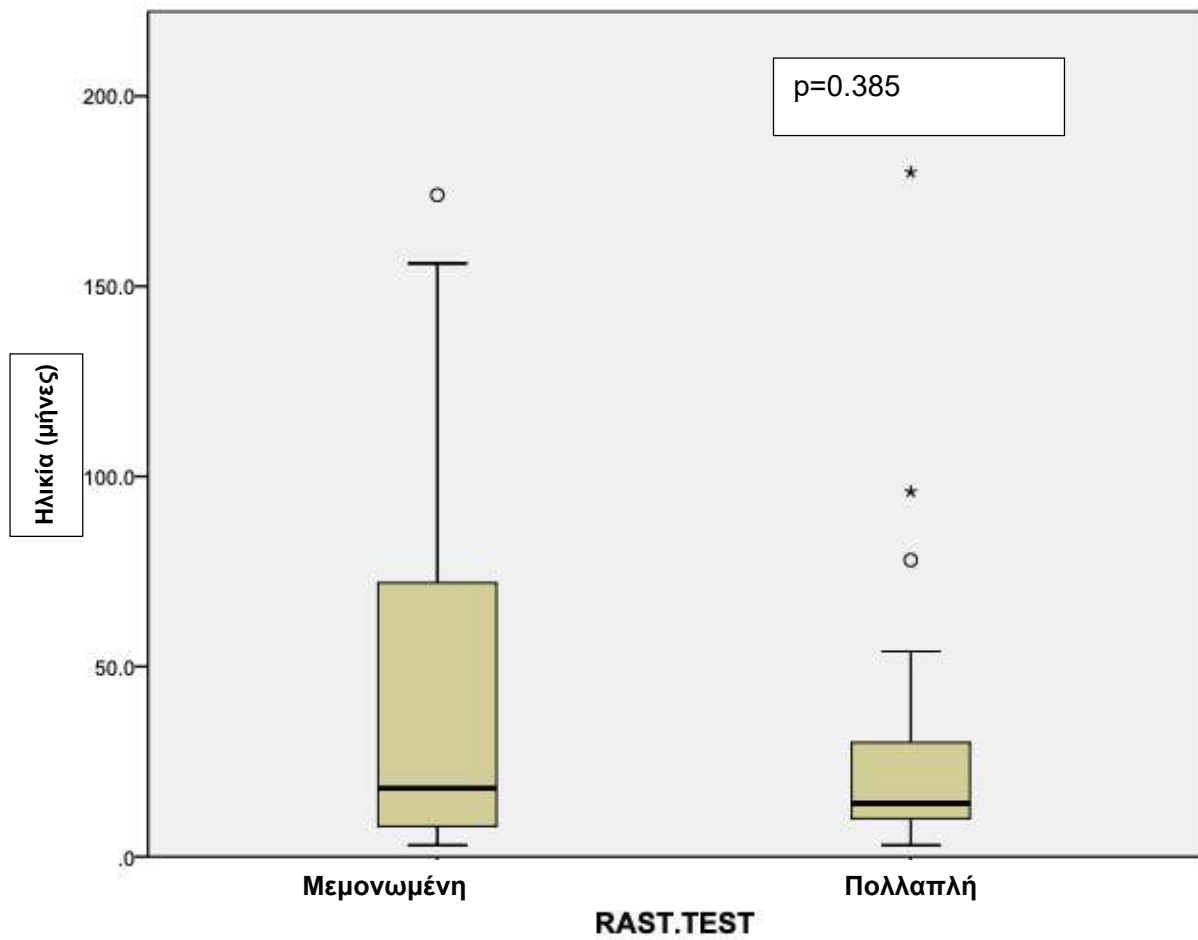
OR: odds ratio, CI: confidence intervals

6.1.3 Σύγκριση παιδιών με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας

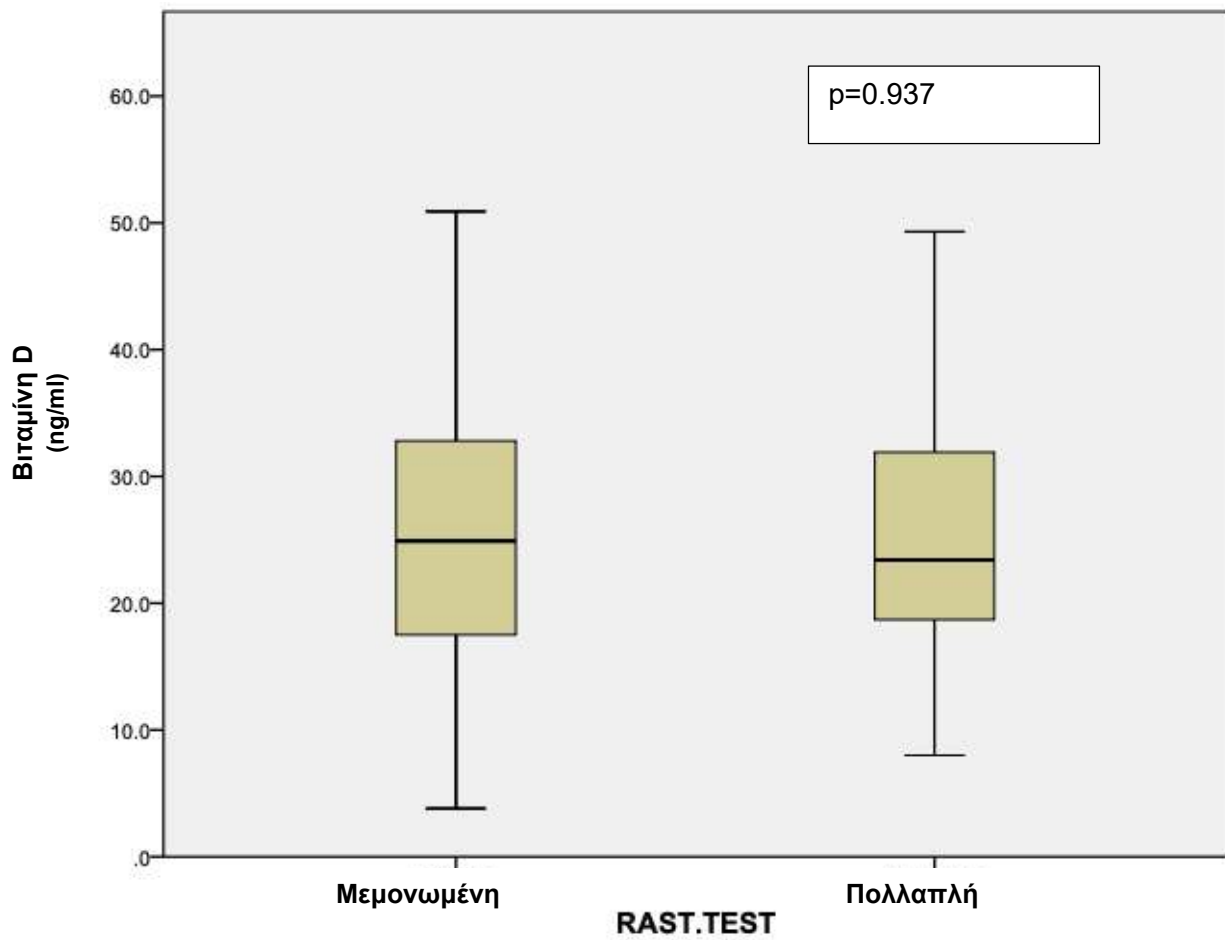
Στη σύγκριση των δημογραφικών χαρακτηριστικών των παιδιών με μεμονωμένη έναντι εκείνων με πολλαπλή τροφική αλλεργία φάνηκε να υπάρχει διαφορά στην έκθεση στον ήλιο, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.073$) (Πίνακας 11). Πιο συγκεκριμένα τα παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία είχαν εκτεθεί λιγότερο στην ηλιακή ακτινοβολία. Αναφορικά με τις υπόλοιπες παραμέτρους δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες όπως φαίνεται και στις Εικόνες 16 & 17.

Πίνακας 11. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

	Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία n (%)	Παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία n (%)	p-value
	n=32	n=58	
Ηλικία, μήνες	14 (10-30)	18 (8-72)	0.385
Φύλο, άρρεν	22 (69)	32 (55)	0.263
Βάρος, Kg	11 (9-13)	11.2 (8.4-21)	0.466
Βάρος, ΕΘ			
Ύψος, cm	80.5 (71.5-95)	81.5 (72-115)	0.489
Ύψος, ΕΘ			
BMI, Kg/cm²	16.1 (14.8-18.1)	16.8 (15.5-18.1)	0.292
Έκθεση στον ήλιο			0.073
• <10 λεπτά ανά ημέρα	12 (37)	24 (42)	
• 10-15 λεπτά ανά ημέρα	14 (44)	13 (22)	
• >15 λεπτά ανά ημέρα	6 (19)	21 (36)	
Βιταμίνη D	25.6 ± 9.8	25.5 ± 10.3	0.937
Ανεπάρκεια Βιταμίνης D	11 (34)	21 (36)	1.000
VDBP	241 (192-270)	238 (180-300)	0.919
Κάπνισμα			0.278
• Πατέρας	10 (31)	20 (35)	
• Μητέρα	5 (16)	4 (7)	
• Και οι δύο γονείς	-	4 (7)	
Μητρικός θηλασμός	27 (84)	44 (76)	0.343
Διάρκεια μητρικού θηλασμού, μήνες	6 (1-8)	5.2 (1-8)	0.858
Ιστορικό ατοπίας			0.523
• Πατέρας	19 (59)	26 (45)	
• Μητέρα	4 (13)	9 (15)	
• Και οι δύο γονείς	6 (19)	12 (21)	
Μήνας γέννησης	3 (9)	11 (19)	
Εποχή γέννησης			
Μήνας λήψης δείγματος			0.435
Εποχή λήψης δείγματος			0.665
• Χειμώνας	7 (22)	11 (19)	
• Άνοιξη	7 (22)	19 (33)	
• Καλοκαίρι	6 (19)	12 (21)	
• Φθινόπωρο	12 (27)	16 (27)	



Εικόνα 16. Θηκόγραμμα ηλικίας ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας

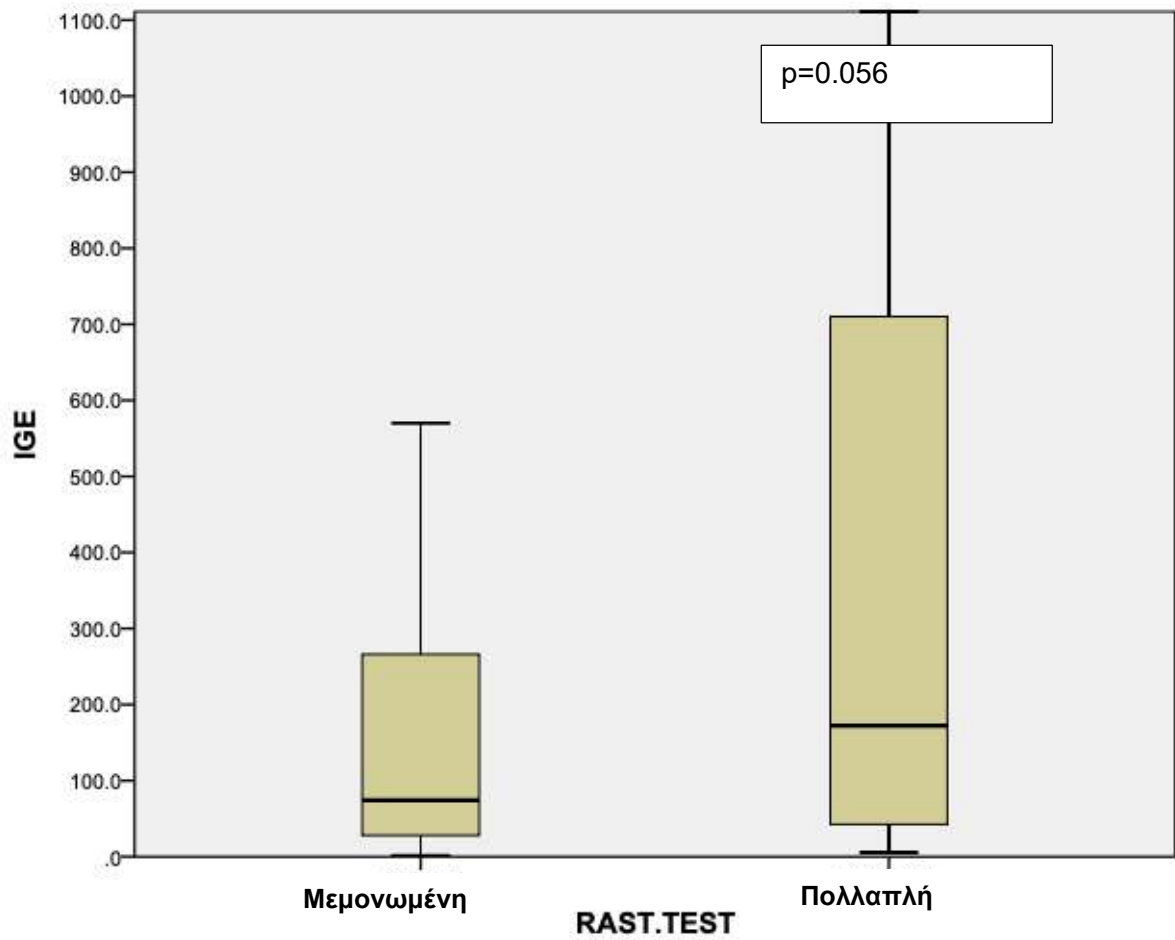


Εικόνα 17. Θηκόγραμμα τιμών Βιταμίνης D ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

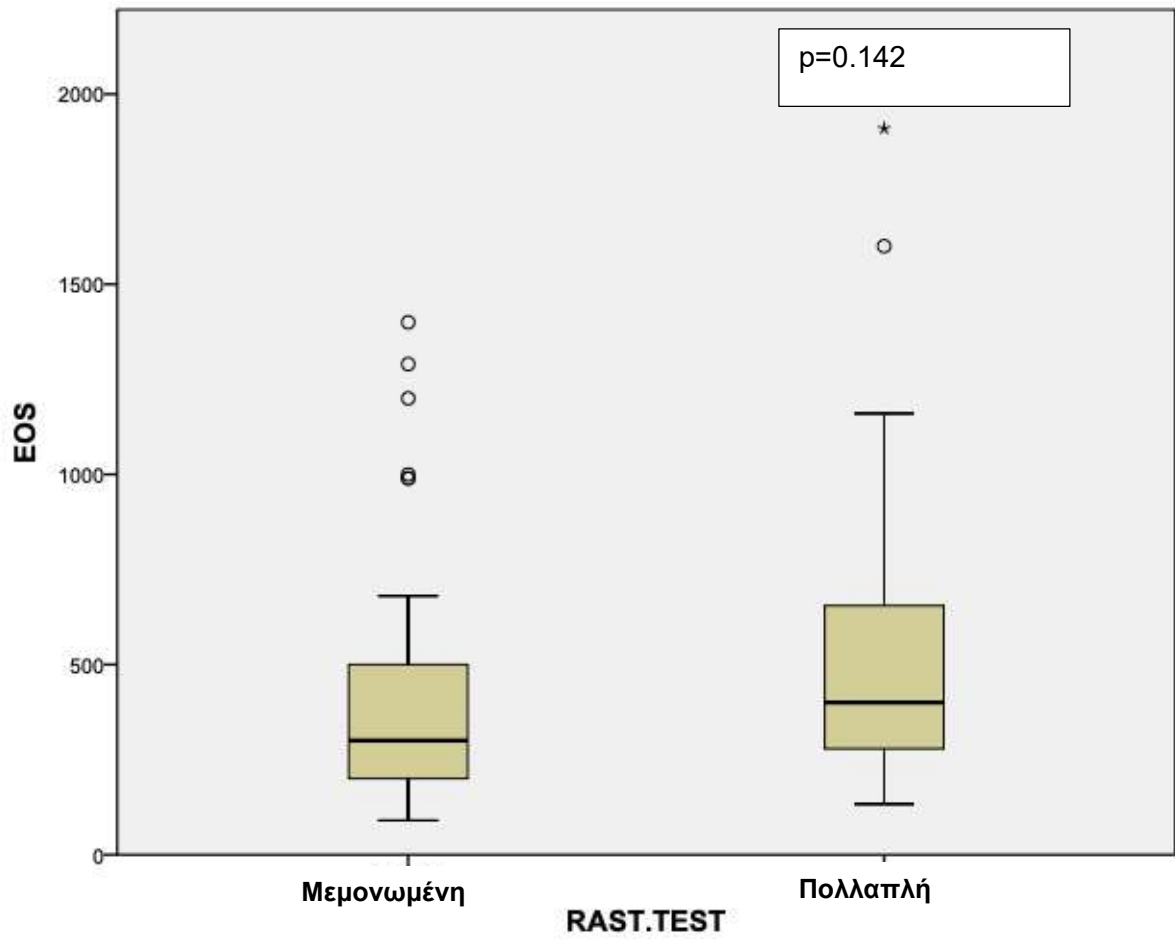
Στη σύγκριση των αλλεργιολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε παιδιά με μεμονωμένη έναντι των παιδιών με πολλαπλή τροφική αλλεργία φάνηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ τους στα δερματικά τεστ δια νυγμού (spts), ($p < 0.001$) και στα ειδικά IgEs (RAST), ($p = 0.040$ (Πίνακας 12). Ωστόσο οι τιμές της ολικής IgE ($p = 0.056$) και των ηωσινόφιλων δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες (Εικόνα 18 & 19) .

Πίνακας 12. Αλλεργιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

	Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία n (%)	Παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία n (%)	p-value
	n=32	n=58	
SPTs			<0.001
• Μεμονωμένα	3 (9)	56 (97)	
• Πολλαπλά	29 (91)	2 (3)	
RAST category			0.040
• I	3 (9)	17 (29)	
• II	12 (38)	23 (40)	
• III	13 (41)	12 (21)	
• IV	4 (12)	3 (5)	
• V	-	3 (5)	
IgE	172 (42.4-710)	74.1 (27.9-266)	0.056
Ηωσινόφιλα	400 (278.5-655)	300 (200-500)	0.142



Εικόνα 18. Θηκόγραμμα τιμών IgE ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας



Εικόνα 19. Θηκόγραμμα τιμών Ηωσινοφίλων ανάμεσα σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

Παράλληλα στη μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση της πολλαπλής τροφικής αλλεργίας με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος όπως η βιταμίνη D, το φύλο, η διάρκεια του μητρικού θηλασμού και το ιστορικό της ατοπίας δεν βρέθηκε να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από την πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση της πολλαπλής τροφικής αλλεργίας με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Μεμονωμένη και πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση συσχέτισης της πολλαπλής τροφικής αλλεργίας με πολλαπλές μεταβλητές ενδιαφέροντος.

Μεμονωμένη παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Βιταμίνη D	0.936	1.00	0.96-1.04
Φύλο, άρρεν	0.211	0.55	0.22-1.38
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.931	0.99	0.90-1.09
Ιστορικό ατοπίας	0.163	0.75	0.50-1.12

Πολλαπλή παλίνδρομη ανάλυση			
	p	OR	95% CI
Βιταμίνη D	0.942	0.99	0.95-1.04
Φύλο, άρρεν	0.228	0.56	0.22-1.42
Διάρκεια μητρικού θηλασμού	0.862	1.01	0.91-1.11
Ιστορικό ατοπίας	0.174	0.75	0.50-1.13

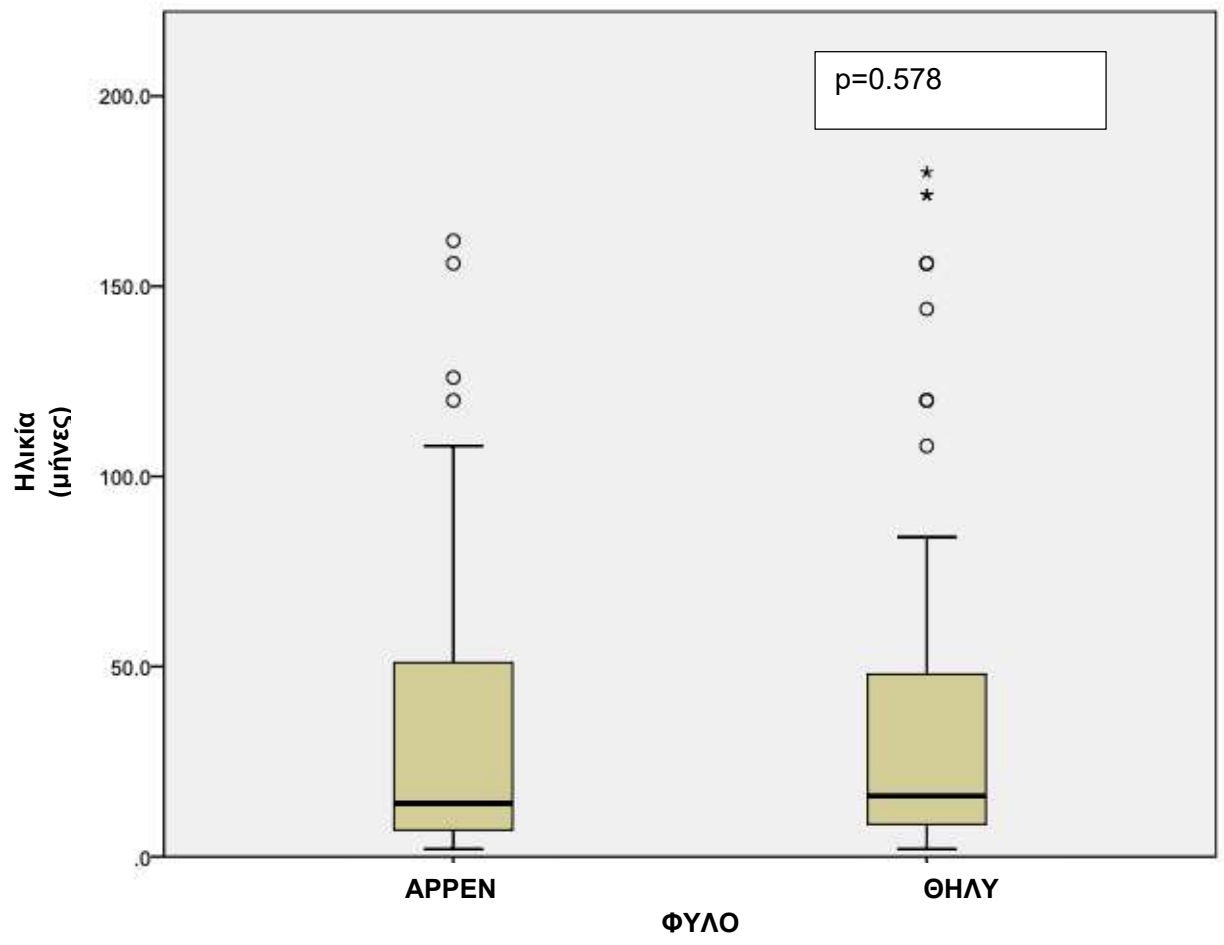
OR: odds ratio, CI: confidence intervals

6.1.4 Σύγκριση αρρένων έναντι θηλέων παιδιών

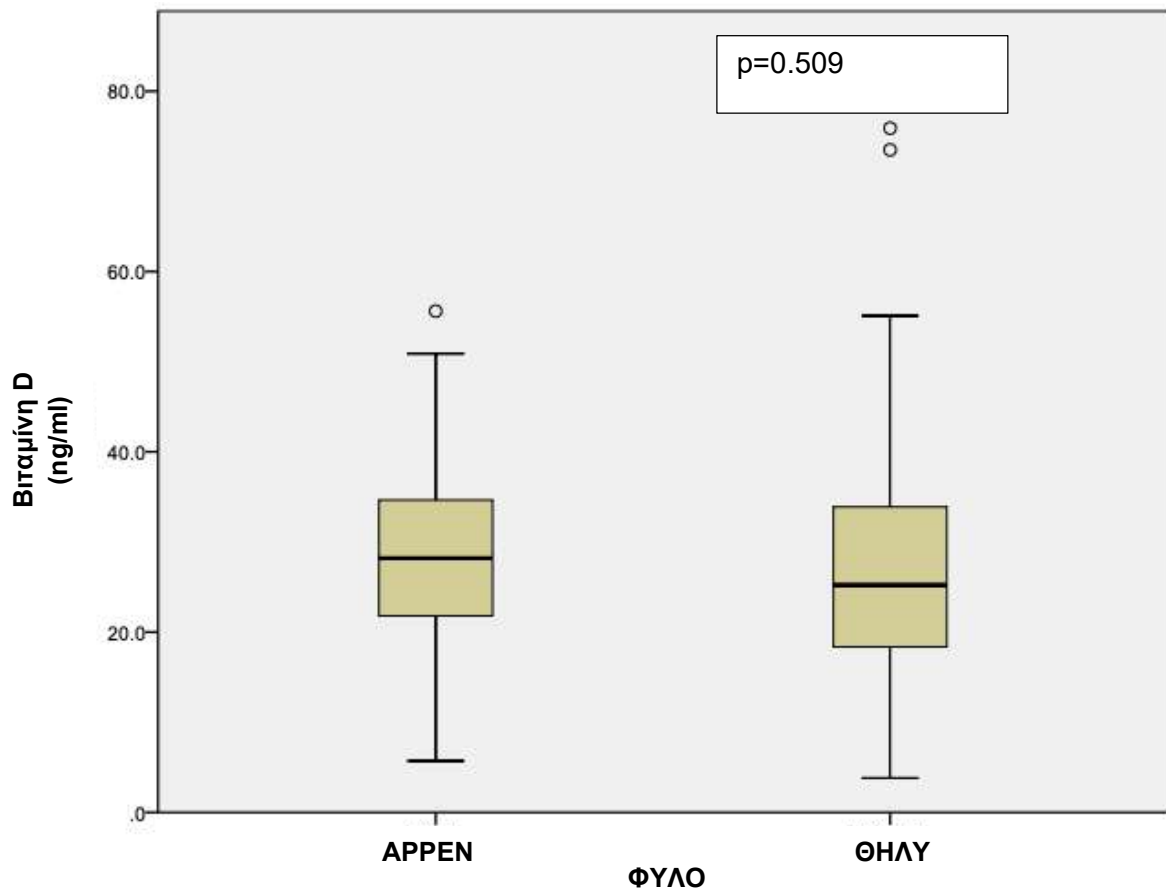
Στη σύγκριση των δημογραφικών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε άρρενα και θήλεα άτομα υπήρχαν διαφορές στην έκθεση στον ήλιο ($p=0.059$) με τα άρρενα άτομα να εκτίθενται περισσότερο. Παράλληλα οι δύο ομάδες διέφεραν μεταξύ τους και στην ανεπάρκεια της βιταμίνης D με τα θήλεα να έχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό ανεπάρκεια βιταμίνης D ($p=0.075$) (Πίνακας 14, Εικόνα 20). Στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά δεν φάνηκε να διαφέρουν μεταξύ τους οι δύο ομάδες (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε άρρενα έναντι θηλέων παιδιών.

	Άρρενα n (%)	Θήλεα n (%)	p-value
	n=112	n=88	
Ηλικία, μήνες	14 (7-51)	16 (8.5-48)	0.578
Βάρος, Kg	10.9 (8-16.9)	11 (8.2-15)	0.818
Βάρος, ΕΘ			
Ύψος, cm	80.5 (68.7-102)	80 (71.5-100)	0.698
Ύψος, ΕΘ			
BMI, Kg/cm ²	16.4 (15.1-18.2)	16.7 (15.2-18.1)	0.556
Τροφική αλλεργία	54 (48)	36 (41)	0.319
Έκθεση στον ήλιο			0.059
• <10 λεπτά ανά ημέρα	24 (21)	32 (36)	
• 10-15 λεπτά ανά ημέρα	44 (39)	26 (30)	
• >15 λεπτά ανά ημέρα	44 (40)	30 (34)	
Βιταμίνη D	28.2 ± 10.1	27.1 ± 12.4	0.509
Ανεπάρκεια Βιταμίνης D	23 (21)	28 (32)	0.075
VDBP	243 (196-285)	222 (182-288)	0.674
Κάπνισμα			0.625
• Πατέρας	39 (35)	33 (38)	
• Μητέρα	13 (12)	6 (7)	
• Και οι δύο γονείς	3 (3)	4 (5)	
Μητρικός θηλασμός	76 (68)	65 (74)	0.435
Διάρκεια μητρικού θηλασμού, μήνες	4 (1-7)	5 (1-8)	0.304
Ιστορικό ατοπίας			0.677
• Πατέρας	15 (13)	14 (16)	
• Μητέρα	17 (15)	13 (15)	
• Και οι δύο γονείς	9 (8)	11 (13)	
Μήνας γέννησης			
Εποχή γέννησης			
Μήνας λήψης δείγματος			0.450
Εποχή λήψης δείγματος			0.875
• Χειμώνας	21 (19)	14 (16)	
• Άνοιξη	29 (26)	27 (31)	
• Καλοκαίρι	24 (21)	19 (22)	
• Φθινόπωρο	38 (34)	28 (32)	



Εικόνα 20. Θηκόγραμμα ηλικίας ανάμεσα σε άρρενα έναντι θηλέων παιδιών.

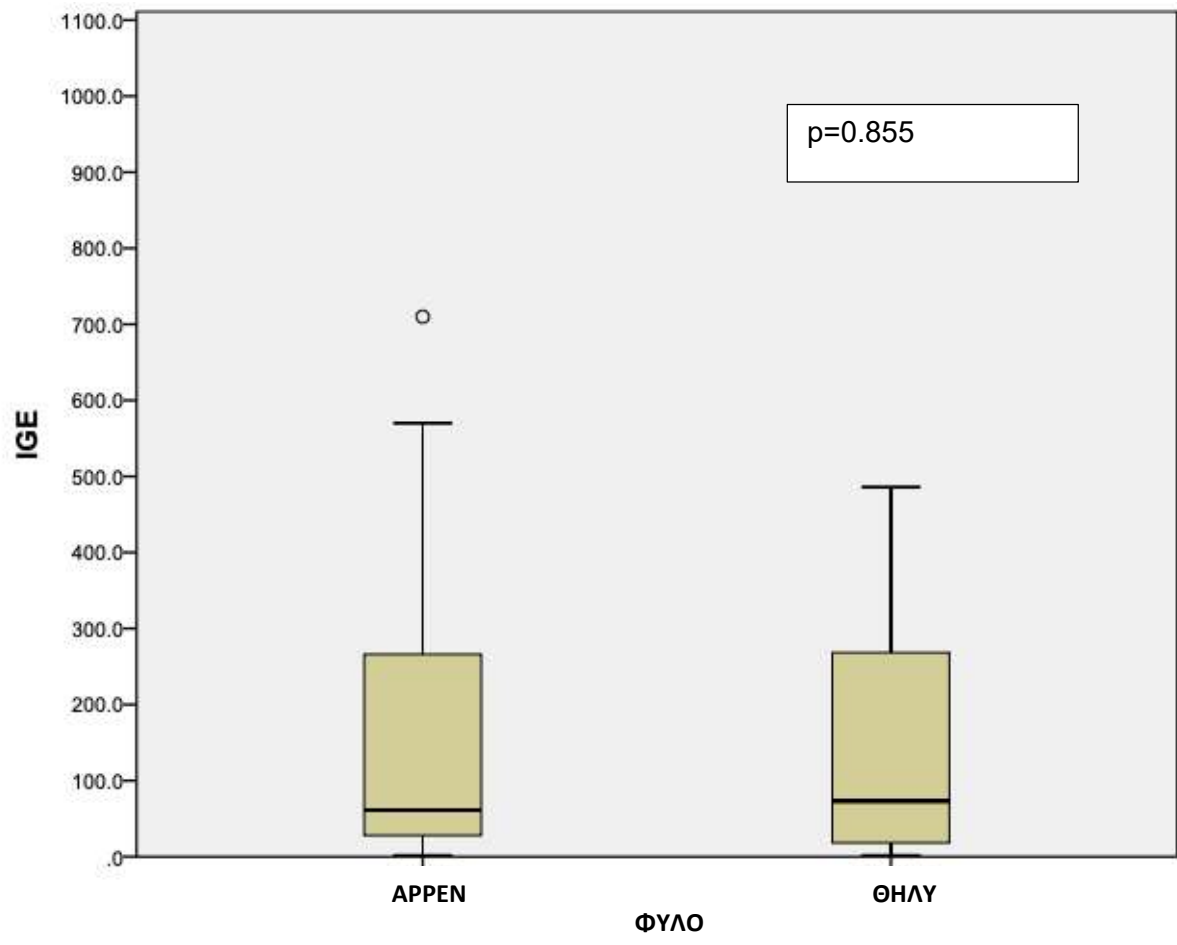


Εικόνα 21. Θηκόγραμμα τιμών Βιταμίνης D ανάμεσα σε άρρενα έναντι θηλέων παιδιών.

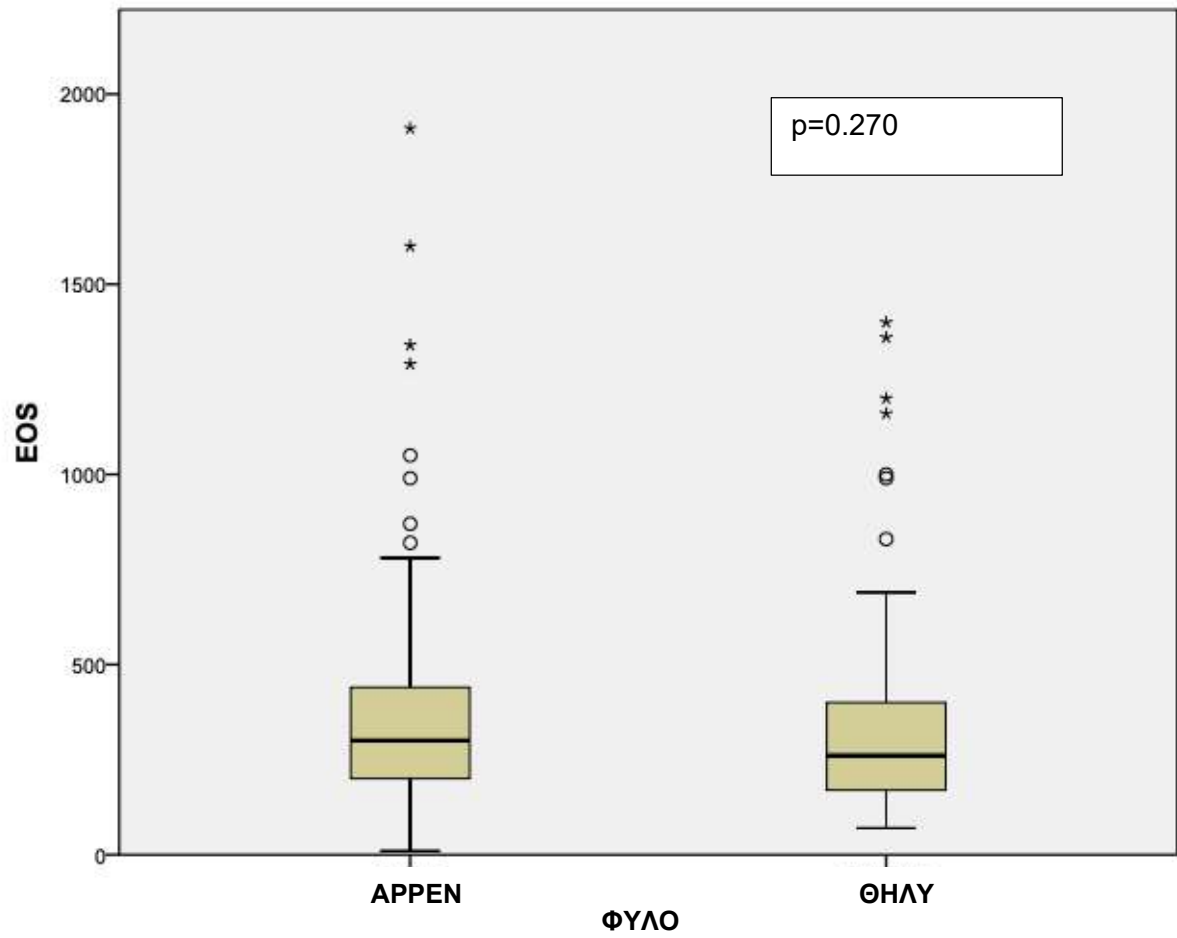
Στη σύγκριση των αλλεργιολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε άρρενα και θήλεα άτομα δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όπως φαίνεται στον Πίνακα 15 και στις Εικόνες 22 & 23.

Πίνακας 15. Αλλεργιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού συγκρινόμενα ανάμεσα σε άρρενα και θήλεα άτομα.

	Άρρενα n (%)	Θήλεα n (%)	p-value
	n=112	n=88	
SPTs			0.336
• Μεμονωμένα	33 (30)	26 (30)	
• Πολλαπλά	21 (19)	10 (11)	
RAST			0.273
• Μεμονωμένα	32 (29)	26 (30)	
• Πολλαπλά	22 (20)	10 (11)	
RAST category			0.603
• I	12 (22)	8 (22)	
• II	19 (35)	16 (44)	
• III	15 (28)	10 (28)	
• IV	5 (9)	2 (6)	
• V	3 (6)	-	
IgE	61.1 (27.9-266)	73.3 (18.3-268.5)	0.855
Ηωσινόφιλα	300 (200-440)	260 (170-400)	0.270



Εικόνα 22. Θηκόγραμμα τιμών IgE ανάμεσα σε άρρενα έναντι θηλέων παιδιών.



Εικόνα 23. Θηκόγραμμα τιμών Ηωσινοφίλων ανάμεσα σε άρρενα έναντι θηλέων παιδιών.

6.2 Μέρος Β

6.2.1 Σύγκριση ασθενών με τροφική αλλεργία έναντι μαρτύρων

Παράλληλα, έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των 4 γονοτύπων των πολυμορφισμών του VDR (TaqI, ApaI, BsmI και FokI) και των αλληλίων τους σε παιδιά με τροφική αλλεργία και στην ομάδα ελέγχου. Από τη σύγκριση αυτή φάνηκε ότι ανάμεσα στους γονοτύπους των 4 πολυμορφισμών του VDR δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και στους μάρτυρες όπως φαίνεται και στον Πίνακα 16. Στη σύγκριση των αλληλίων τους όμως φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.043$) στη συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου A του πολυμορφισμού ApaI. Το αλληλίο αυτό εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Στα υπόλοιπα αλληλία δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Οι συχνότητες των αλληλίων των πολυμορφισμών του VDR βρίσκονταν σε συμφωνία με την ισορροπία HW.

Πίνακας 16. Συχνότητες *VDR* γονοτύπων και αλληλίων σε παιδιά με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

Πολυμορφισμός	Ασθενείς n (%)	Μάρτυρες n (%)	OR (95% CI)	p-value	HWE p-value
ΑραI γονότυπος	n=90	n=110			
AA	38 (42)	38 (35)		0.081 ^a	1.000 (0.156) ^c
Aa	41 (46)	45 (41)			
aa	11 (12)	27 (24)			
ΑραI αλληλίο	n=180	n=220			
A	117 (65)	121 (55)	1.26 (1.01-1.59)	0.043 ^b	
a	63 (35)	99 (45)			
BsmI γονότυπος	n=90	n=110			
BB	16 (18)	23 (21)		0.303 ^a	0.912 (0.189) ^c
Bb	46 (51)	44 (40)			
bb	28 (31)	43 (39)			
BsmI αλληλίο	n=180	n=220			
B	78 (43)	90 (41)	1.05 (0.84-1.31)	0.684 ^b	
b	132 (57)	130 (59)			
FokI γονότυπος	n=90	n=110			
FF	44 (49)	54 (49)		1.000 ^a	0.927 (0.734) ^c
Ff	39 (43)	48 (44)			
ff	7 (8)	8 (7)			
FokI αλληλίο	n=180	n=220			
F	127 (71)	156 (71)	0.99 (0.78-1.25)	1.000 ^b	
f	53 (29)	64 (29)			
TaqI γονότυπος	n=90	n=110			
TT	51 (46)	35 (39)		0.071 ^a	0.380 (0.191) ^c
Tt	41 (37)	47 (52)			
tt	18 (17)	8 (9)			
TaqI αλληλίο	n=180	n=220			
T	117 (65)	143 (65)	1.00 (0.79-1.25)	1.000 ^b	
t	63 (35)	77 (35)			

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

a Ομοζυγωτία του κεφαλαίου αλληλίου έναντι του μικρού αλληλίου, παρόντος είτε σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, π.χ. AA έναντι Aa +aa σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

b Συχνότητα του κεφαλαίου αλληλίου συγκρινόμενη με τη συχνότητα του μικρού αλληλίου, π.χ. A έναντι a σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

c Hardy-Weinberg ισορροπία (υπολογισμοί για ασθενείς, σε παρενθέσεις οι τιμές για τους μάρτυρες).

6.2.2 Σύγκριση παιδιών με ανεπάρκεια Βιταμίνης D έναντι παιδιών με επάρκεια Βιταμίνης D

Η επόμενη σύγκριση αφορούσε τις συχνότητες των 4 γονοτύπων των πολυμορφισμών του VDR (TaqI, ApaI, BsmI και FokI) και των αλληλίων τους σε παιδιά με επάρκεια και σε παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D (Πίνακας 17). Ανάμεσα στους γονοτύπους των 4 πολυμορφισμών του VDR δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα παιδιά με επάρκεια και στα παιδιά με ανεπάρκεια βιταμίνης D. Στη σύγκριση των αλληλίων επίσης δεν φάνηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισής τους ανάμεσα στις δύο ομάδες. Οι συχνότητες των αλληλίων των πολυμορφισμών του VDR βρίσκονταν σε συμφωνία με την ισορροπία HW.

Πίνακας 17. Συχνότητες *VDR* γονοτύπων και αλληλίων ανάμεσα σε παιδιά με ανεπάρκεια Vitamin D και παιδιά με επάρκεια Vitamin D.

Πολυμορφισμός	Παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D n (%)	Παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D n (%)	OR (95% CI)	p-value	HWE p-value
ΑραI γονότυπος	n=51	n=149			
AA	19 (37)	57 (38)		0.452 ^a	0.955 (0.165) ^c
Aa	25 (49)	61 (41)			
aa	7 (14)	31 (21)			
ΑραI αλληλίο	n=102	n=298			
A	63 (62)	175 (59)	1.10 (0.77-1.55)	0.589 ^b	
a	39 (38)	123 (41)			
BsmI γονότυπος	n=51	n=149			
BB	8 (16)	31 (21)		0.257 ^a	0.702 (0.188) ^c
Bb	28 (55)	62 (42)			
bb	15 (29)	56 (37)			
BsmI αλληλίο	n=102	n=298			
B	44 (43)	124 (42)	1.04 (0.74-1.47)	0.787 ^b	
b	58 (57)	174 (58)			
FokI γονότυπος	n=51	n=149			
FF	23 (50)	75 (50)		0.147 ^a	0.824 (0.396) ^c
Ff	21 (41)	66 (44)			
ff	7 (14)	8 (6)			
FokI αλληλίο	n=102	n=298			
F	67 (66)	216 (73)	0.79 (0.56-1.12)	0.193 ^b	
f	35 (34)	82 (28)			
TaqI γονότυπος	n=51	n=149			
TT	21 (41)	65 (44)		0.612 ^a	0.824 (0.628) ^c
Tt	25 (49)	63 (42)			
tt	5 (10)	21 (14)			
TaqI αλληλίο	n=102	n=298			
T	67 (66)	193 (65)	1.03 (0.72-1.47)	0.866 ^b	
t	35 (34)	105 (35)			

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

a Ομοζυγωτία του κεφαλαίου αλληλίου έναντι του μικρού αλληλίου, παρόντος είτε σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, π.χ. AA έναντι Aa +aa σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

b Συχνότητα του κεφαλαίου αλληλίου συγκρινόμενη με τη συχνότητα του μικρού αλληλίου, π.χ. A έναντι a σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

c Hardy-Weinberg ισορροπία (υπολογισμοί για ασθενείς, σε παρενθέσεις οι τιμές για τους μάρτυρες).

6.2.3 Σύγκριση παιδιών με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας

Στη σύγκριση των συχνοτήτων των 4 γονοτύπων των πολυμορφισμών του VDR (Taql, Arai, BsmI και FokI) και των αλληλίων τους σε παιδιά με μεμονωμένη και σε παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας 18). Οι συχνότητες των αλληλίων των πολυμορφισμών του VDR βρίσκονταν σε συμφωνία με την ισορροπία HW.

Πίνακας 18. Συχνότητες VDR γονοτύπων και αλληλίων σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

Πολυμορφισμός	Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία n (%)	Παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία n (%)	OR (95% CI)	p-value	HWE p-value
ApaI γονότυπος	n=32	n=58			
AA	11 (34)	27 (47)		0.530 ^a	1.000 (1.000) ^c
Aa	16 (50)	25 (43)			
aa	5 (16)	6 (10)			
ApaI αλληλίο	n=64	n=116			
A	38 (59)	79 (68)	0.78 (0.53-1.16)	0.257 ^b	
a	26 (41)	37 (32)			
BsmI γονότυπος	n=32	n=58			
BB	2 (6)	14 (24)		0.093 ^a	0.544 (0.946) ^c
Bb	18 (56)	28 (48)			
bb	12 (38)	16 (28)			
BsmI αλληλίο	n=64	n=116			
B	22 (34)	56 (48)	0.68 (0.44-1.04)	0.085 ^b	
b	42 (66)	60 (52)			
FokI γονότυπος	n=32	n=58			
FF	16 (50)	28 (48)		1.000 ^a	0.815 (1.000) ^c
Ff	14 (44)	25 (43)			
ff	2 (6)	5 (9)			
FokI αλληλίο	n=64	n=116			
F	46 (72)	81 (70)	1.06 (0.68-1.65)	0.773 ^b	
f	18 (28)	35 (30)			
TaqI γονότυπος	n=32	n=58			
TT	14 (44)	21 (36)		0.366 ^a	0.360 (0.855) ^c
Tt	17 (53)	30 (52)			
t	1 (3)	7 (12)			
TaqI αλληλίο	n=64	n=116			
T	45 (70)	72 (62)	1.27 (0.82-1.98)	0.328 ^b	
t	19 (30)	44 (38)			

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

a Ομοζυγωτία του κεφαλαίου αλληλίου έναντι του μικρού αλληλίου, παρόντος είτε σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, π.χ. AA έναντι Aa +aa σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

b Συχνότητα του κεφαλαίου αλληλίου συγκρινόμενη με τη συχνότητα του μικρού αλληλίου, π.χ. A έναντι a σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

c Hardy-Weinberg ισορροπία (υπολογισμοί για ασθενείς, σε παρενθέσεις οι τιμές για τους μάρτυρες).

6.2.4 Σύγκριση αρρένων έναντι θηλέων παιδιών

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 19 στη σύγκριση των συχνοτήτων των 4 γονοτύπων των πολυμορφισμών του VDR (Taql, ApaI, BsmI και FokI) και των αλληλίων τους ανάμεσα σε αρρένα και θήλεα άτομα δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις δύο ομάδες. Οι συχνότητες των αλληλίων των πολυμορφισμών του VDR βρίσκονταν σε συμφωνία με την ισορροπία HW.

Πίνακας 19. Συχνότητες VDR γονοτύπων και αλληλίων σε άρρενα και θήλεα παιδιά

Πολυμορφισμός	Άρρενα n (%)	Θήλεα n(%)	OR (95% CI)	p-value	HWE p-value
ΑραI γονότυπος	n=112	n=88			
AA	41 (37)	35 (40)		0.735 ^a	0.851 (0.207) ^c
Aa	51 (45)	35 (40)			
aa	20 (18)	18 (20)			
ΑραI αλληλίο	n=224	n=176			
A	133 (59)	105 (60)	1.01 (0.80-1.26)	1.000 ^b	
a	91 (41)	71 (40)			
BsmI γονότυπος	n=112	n=88			
BB	22 (20)	17 (19)		0.865 ^a	0.710 (0.563) ^c
Bb	52 (46)	38 (43)			
bb	38 (34)	33 (38)			
BsmI αλληλίο	n=224	n=176			
B	96 (43)	72 (41)	0.95 (0.76-1.19)	0.760 ^b	
b	128 (57)	104 (59)			
FokI γονότυπος	n=112	n=88			
FF	52 (46)	46 (52)		0.742 ^a	0.752 (0.975) ^c
Ff	51 (46)	36 (41)			
ff	9 (8)	6 (7)			
FokI αλληλίο	n=224	n=176			
F	155 (69)	128 (73)	1.10 (0.85-1.41)	0.507 ^b	
f	69 (31)	48 (27)			
TaqI γονότυπος	n=112	n=88			
TT	45 (40)	41 (47)		0.639 ^a	0.921 (0.888) ^c
Tt	51 (46)	37 (42)			
t	16 (14)	10 (11)			
TaqI αλληλίο	n=224	n=176			
T	141 (63)	119 (68)	1.12 (0.88-1.42)	0.344 ^b	
t	83 (37)	57 (32)			

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

a Ομοζυγωτία του κεφαλαίου αλληλίου έναντι του μικρού αλληλίου, παρόντος είτε σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία, π.χ. AA έναντι Aa +aa σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

b Συχνότητα του κεφαλαίου αλληλίου συγκρινόμενη με τη συχνότητα του μικρού αλληλίου, π.χ. A έναντι a σε ασθενείς έναντι μαρτύρων.

c Hardy-Weinberg ισορροπία (υπολογισμοί για ασθενείς, σε παρενθέσεις οι τιμές για τους μάρτυρες).

Στη σύγκριση των απλοτυπικών συχνοτήτων σε παιδιά με τροφική αλλεργία και στην ομάδα ελέγχου υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στον απλότυπο A/B/F/T ($p=0.047$), ο οποίος εμφανιζόταν με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες. Αναφορικά με τους υπόλοιπους απλότυπους δεν φάνηκε να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 20. VDR απλοτυπικές συχνότητες σε παιδιά με τροφική αλλεργία και μάρτυρες.

Απλότυπος	Ασθενείς n (%)	Μάρτυρες n (%)	OR (95% CI)	p-value
ApaI/BsmI/FokI/TaqI				
A/B/F/T	50 (56)	45 (41)	0.55 (0.31-0.97)	0.047
A/B/F/t	7 (8)	15 (13)	1.87 (0.72-4.81)	0.188
A/B/f/T	4 (4)	1 (1)	0.19 (0.02-1.79)	0.111
A/B/f/t	1 (1)	3 (3)	2.49 (0.25-24.41)	0.417
A/b/F/T	16 (18)	18 (16)	0.90 (0.43-1.89)	0.791
A/b/f/T	1 (1)	1 (1)	0.81 (0.05-13.23)	0.886
a/B/F/T	-	3 (3)	-	0.114
a/b/F/T	10 (11)	21 (19)	1.88 (0.83-4.29)	0.121
a/b/f/T	1 (1)	3 (3)	2.49 (0.25-24.41)	0.417

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

Στη σύγκριση των συχνοτήτων των απλοτύπων σε παιδιά με παιδιά με ανεπάρκεια και σε παιδιά με επάρκεια βιταμίνης D δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 21. VDR απλοτυπικές συχνότητες σε παιδιά με ανεπάρκεια Vitamin D και παιδιά με επάρκεια Vitamin D.

Απλότυπος	Παιδιά με ανεπάρκεια Βιταμίνης D n (%)	Παιδιά με επάρκεια Βιταμίνης D n (%)	OR (95% CI)	p-value
Apal/BsmI/FokI/TaqI				
A/B/F/T	28 (55)	67 (45)	0.67 (0.35-1.27)	0.220
A/B/F/t	3 (6)	19 (13)	2.33 (0.66-8.25)	0.176
A/B/f/T	3 (6)	2 (1)	0.21 (0.03-1.34)	0.073
A/B/f/t	2 (4)	2 (1)	0.33 (0.04-2.43)	0.256
A/b/F/T	8 (16)	26 (17)	1.13 (0.47-2.69)	0.772
A/b/f/T	-	2 (1)	-	0.406
a/B/F/T	-	3 (2)	-	0.307
a/b/F/T	5 (10)	26 (17)	1.94 (0.70-5.36)	0.193
a/b/f/T	2 (4)	2 (1)	0.33 (0.04-2.43)	0.256

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

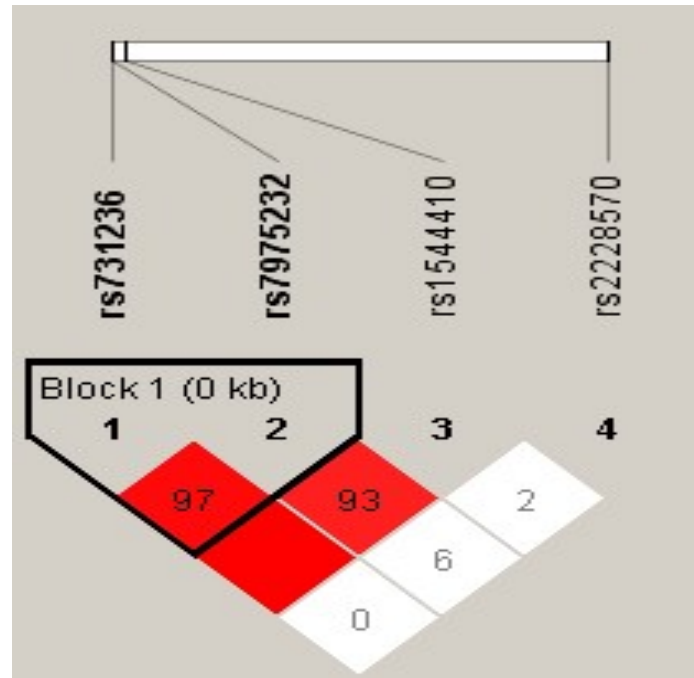
Στη σύγκριση των συχνοτήτων των απλοτύπων σε παιδιά με πολλαπλή και σε παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 22. VDR απλοτυπικές συχνότητες σε παιδιά με πολλαπλή έναντι μεμονωμένης τροφικής αλλεργίας.

Απλότυπος	Παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία n (%)	Παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία n (%)	OR (95% CI)	p-value
Apal/BsmI/FokI/TaqI				
A/B/F/T	17 (53)	33 (57)	1.16 (0.48-2.77)	0.730
A/B/F/t	1 (3)	6 (10)	3.57 (0.41-31.11)	0.221
A/B/f/T	2 (6)	2 (3)	0.53 (0.07-3.99)	0.537
A/B/f/t	-	1 (2)	-	0.455
A/b/F/T	7 (22)	9 (16)	0.65 (0.21-1.96)	0.450
A/b/f/T	-	1 (2)	-	0.455
a/B/F/T	-	-	-	-
a/b/F/T	5 (16)	5 (9)	0.51 (0.13-1.91)	0.311
a/b/f/T	-	1 (2)	-	0.455

OR: odds ratio, CI: confidence intervals

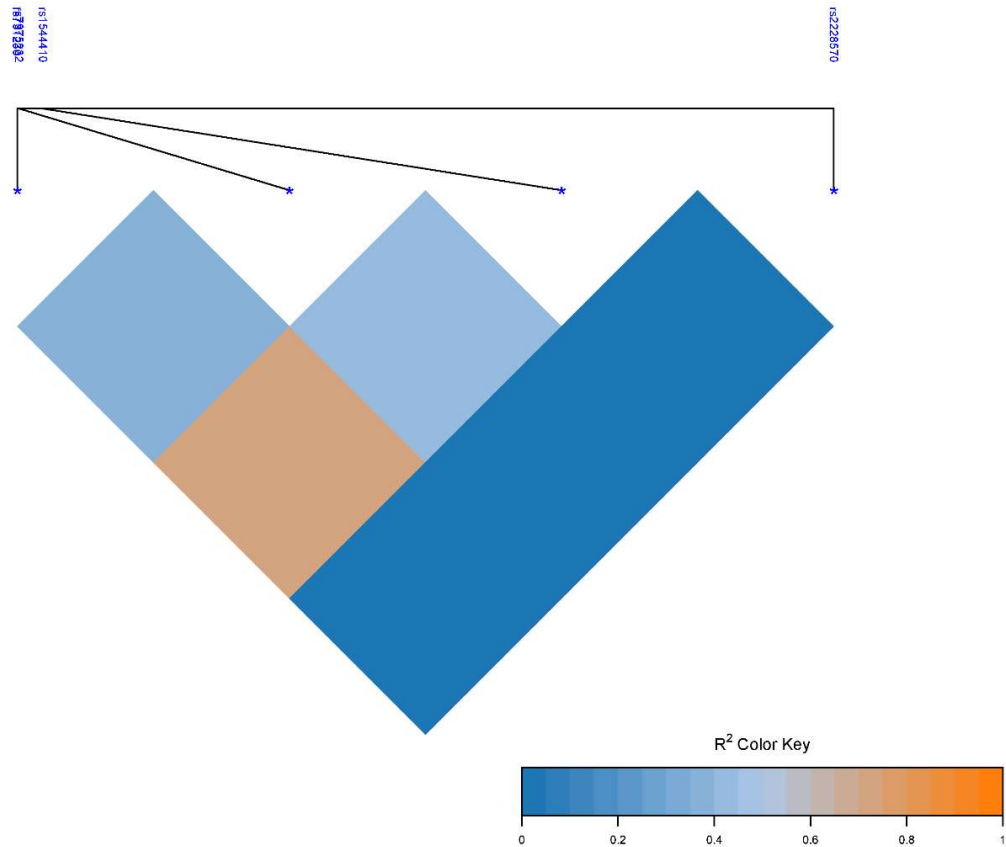
6.3 Μέρος Γ Μελέτη της ανισορροπίας σύνδεσης-ανασυνδυασμού



Εικόνα 24 Linkage disequilibrium (LD) plot των SNPs στη θέση Χρ12q12-q14. Οι κόκκινοι/λευκοί κύβοι απεικονίζουν τις τιμές D' του LD plot. Το SNP rs731236 (TaqI) βρίσκεται σε στενή ανισορροπία σύνδεσης με το rs7975232 (ApaI) και rs1544410 (BsmI) σύμφωνα με τις τιμές D' .

LD heatmap

Physical Length:34.1kb



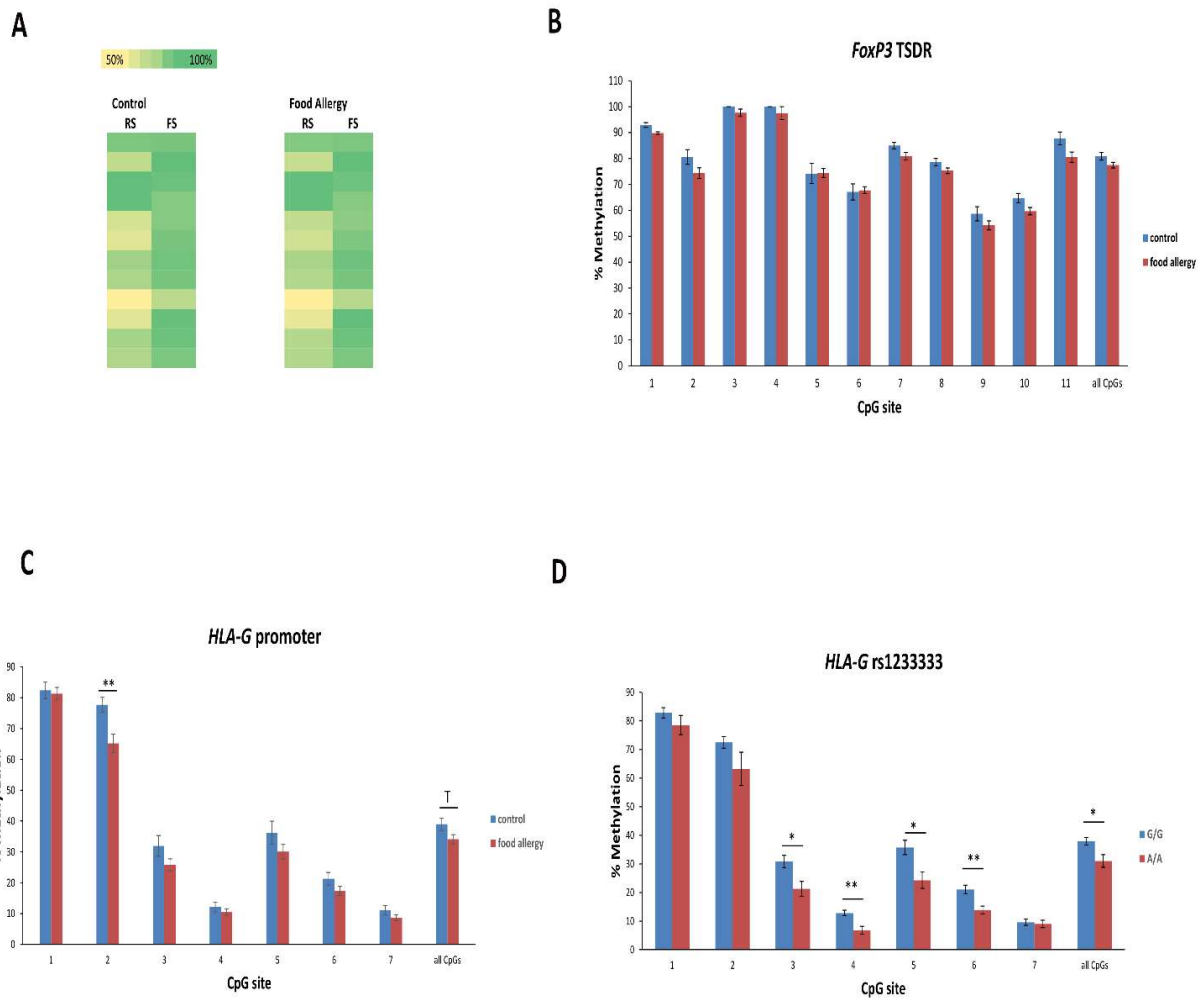
Εικόνα 25 LD heatmap των SNPs στη θέση Χρ12q12-q14. Απεικονίζονται οι τιμές r^2 σύμφωνα με τη διαβάθμιση των χρωμάτων. Επιβεβαιώνεται η στενή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των rs7975232 (ApaI) και rs1544410 (BsmI).

6.4 Μέρος Δ

6.4.1 Η υπερμεθυλίωση του FOXP3 και η επέκταση της μεθυλίωσης του HLA-G μεταξύ των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου υποδεικνύει την πιθανή απόκτηση ανοχής που προωθείται από τα Treg HLA-G+/FOXP3-

6.4.1.1 Το προφίλ της μεθυλίωσης της περιοχής TSDR του γονιδίου FOXP3

Οι θέσεις CpG της περιοχής TSDR του γονιδίου *FOXP3* μελετήθηκαν και στις δύο αλυσίδες του DNA (κωδική και μη κωδική αλυσίδα) και φάνηκε μία ξεκάθαρη απόκλιση στο προφίλ της μεθυλίωσης μεταξύ τους. Μεταξύ των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου, οι θέσεις CpG της περιοχής TSDR του γονιδίου *FOXP3* φάνηκε να έχουν ποσοστό μεθυλίωσης 100% κατά μήκος της μη κωδικής αλυσίδας και ποικίλα ποσοστά απομεθυλίωσης στην κωδική αλυσίδα (Εικόνα 26A) δείχνοντας με αυτό τον τρόπο ότι μόνο το προφίλ μεθυλίωσης της κωδικής αλυσίδας του DNA παίζει ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου. Το γονίδιο *FOXP3* εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα X (Xp11.23) και συνεπώς οι επιγενετικές αποκλίσεις μεταξύ των δύο φύλων μπορεί να προκύψουν από την απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος στα θήλεα άτομα. Για το λόγο αυτό κατά τη διαδικασία της ανάλυσης των δεδομένων της μεθυλίωσης, τα άρρενα και τα θήλεα παιδιά μελετήθηκαν ανεξάρτητα, ωστόσο στο προφίλ της μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στατιστικά μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Οι αναλύσεις που έγιναν στη συνέχεια έδειξαν μικρές διαφοροποιήσεις (Εικόνα 26B) μεταξύ των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου. Επίσης το μέσο ποσοστό της μεθυλίωσης όλων των θέσεων CpG της περιοχής TSDR που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Τα αποτελέσματα συνάδουν με την συντήρηση της μεθυλίωσης της περιοχής TSDR του *FOXP3* με επακόλουθο την αδυναμία παραγωγής Treg^{FOXP3} που προάγουν την ανοχή.



Εικόνα 26: Τα επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής FOXP3 TSDR και του υποκινητή του HLA-G (A) Προφίλ μεθυλίωσης της μη κωδικής (R5) και της κωδικής (F5) αλυσίδας του DNA της περιοχής FOXP3 TSDR ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στους ασθενείς. Στις δύο αλυσίδες του DNA παρατηρήθηκε διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης. (B, C) Ποσοστά μεθυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων CpG στην περιοχή FOXP3 TSDR και στην περιοχή του υποκινητή του HLA-G και από όλες τις θέσεις CpG κατά μήκος κάθε περιοχής. Η θέση CpG 2 του υποκινητή του HLA-G παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (** $p=0.004$). (D) Επίδραση του rs1233333 στα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA στην περιοχή του υποκινητή του HLA-G. Η ομοζυγωτία στον γονότυπο AA παρουσίασε μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης συγκριτικά με την ομοζυγωτία GG. Οι θέσεις CpG κατά μήκος της υπο μελέτη περιοχής έχουν αριθμηθεί με κατεύθυνση 5'-3'.

6.4.1.2 Το προφίλ της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου HLA-G

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των δινουκλεοτιδίων CpG που εδράζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου HLA-G, ανοδικά της νησίδας CpG96 (Εικόνα 8) αποκάλυψε ότι η θέση 2 ήταν σημαντικά απομεθυλωμένη ($p=0.004$) ενώ παράλληλα το σύνολο της περιοχής που μελετήθηκε παρουσίασε μειωμένο ποσοστό μεθυλίωσης στην ομάδα των παιδιών με την τροφική αλλεργία. Το ποσοστό αυτό δείχνει μία τάση για υπομεθυλίωση χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.05$) όταν συγκρίνεται με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 26C). Οι παρατηρήσεις από αυτή τη μελέτη δείχνουν μη σημαντικές διαφορές στο προφίλ της μεθυλίωσης της περιοχής TSDR του γονιδίου FOXP3 μεταξύ των δύο ομάδων παρέχοντας ενδείξεις ότι οι πληθυσμοί των $Treg^{FOXP3+}$ είναι αντίστοιχοι στις δύο ομάδες παιδιών. Τα φυσικά απαντώμενα Tregs, είναι θετικά στην έκφραση FOXP3, διεγείρονται από τον παράγοντα TGF- β , έχουν απομεθυλωμένα CpG στην περιοχή FOXP3 TSDR (287) και τροποποιήσεις ιστονών που γειτνιάζουν με το γονιδιακό τόπο (επιτρεπτικές για μεταγραφή) και αντιπροσωπεύουν το 5-10% των CD4⁺ CD25⁺T κυττάρων.

Τα αποτελέσματα από το προφίλ της μεθυλίωσης των HLA-G και της περιοχής TSDR του FOXP3 προτείνουν ότι κατά την ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας υπάρχει τάση για την παραγωγή κυττάρων $Treg^{FOXP3-/HLA+}$. Τα παιδιά με τροφική αλλεργία που συμμετείχαν στη μελέτη βρισκόνταν σε δίαιτα αποκλεισμού από τα τροφικά αλλεργιογόνα προκαλώντας μία αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου I. Η συλλογή του δείγματος έγινε κατά τη διάρκεια μιας εξελισσόμενης διαδικασίας απευαισθητοποίησης η οποία φαίνεται να προάγει τη δημιουργία του υποπληθυσμού $Treg^{FOXP3-/HLA+}$ ως άμεση απάντηση για να επαναφέρει την ανοχή στο αλλεργιογόνο.

6.4.2 Η ετερογένεια στο προφίλ της μεθυλίωσης κατά μήκος των γενετικών τόπων υποδεικνύει έμφυτες διαφορές τόσο στο γενετικό όσο και στο επιγενετικό υπόβαθρο

6.4.2.1 Επιγενετικές τροποποιήσεις που αποδίδονται σε γενετικούς πολυμορφισμούς και στο κάπνισμα των γονέων

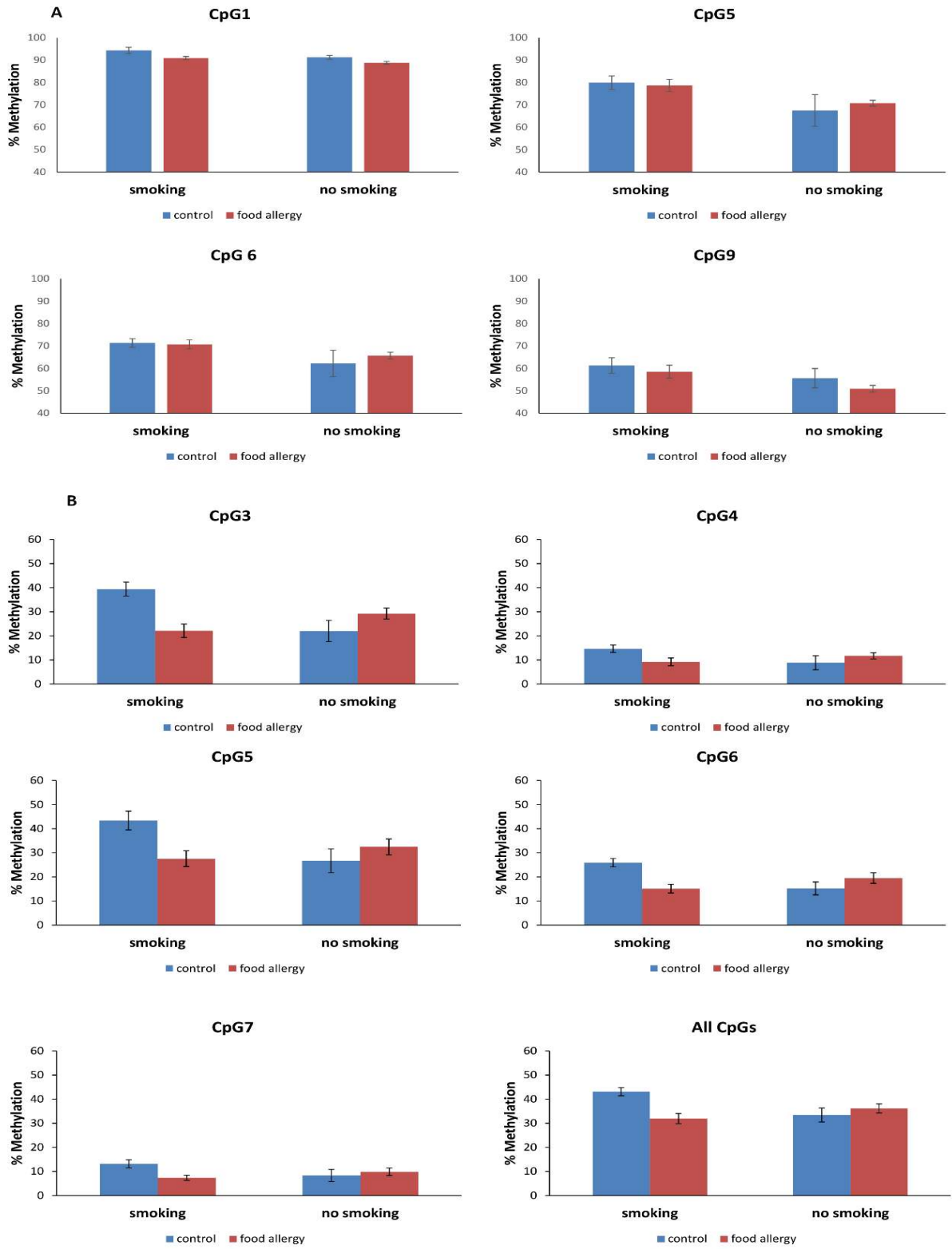
Αναλύσαμε τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο του rs1233333, ο οποίος εδράζεται στην περιοχή του υποκινητή του HLA-G (Εικόνα 8), στη μεθυλίωση του DNA. Η γονοτύπηση των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου έδειξε ομοζυγώτες AA και GG και η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε παρουσίασε μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου rs1233333 (A/A) και των χαμηλότερων επιπέδων μεθυλίωσης στις CpG θέσεις που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή του HLA-G. Πιο συγκεκριμένα οι θέσεις 3,4 5, και 6 όπως και το μέσο επίπεδο μεθυλίωσης όλης της περιοχής που αναλύθηκε φάνηκε να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p=0.014$, $p=0.002$, $p=0.010$, $p=0.004$ και $p=0.010$

αντίστοιχα) μεταξύ των ομόζυγων AA και των GG ατόμων ανεξάρτητα από την ομάδα στην οποία ανήκαν (Εικόνα 26D). Παράλληλα τα παιδιά με τροφική αλλεργία παρουσίαζαν 2,5 φορές μεγαλύτερη συχνότητα στον γονότυπο AA συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας την πιθανή συνεισφορά του γονοτύπου AA τόσο στη μεθυλίωση του DNA όσο και στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας.

Επίσης μελετήθηκαν οι διαφορές στο επίπεδο της μεθυλίωσης στην περιοχή TSDR του FOXP3 και του HLA-G ανάμεσα στις δύο ομάδες με βάση το ιστορικό καπνίσματος των γονέων. Διενεργήθηκε ανάλυση ANOVA δύο κατευθύνσεων προκειμένου να εξεταστεί το αποτέλεσμα της συνύπαρξης του καπνίσματος και της τροφικής αλλεργίας στα επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής FOXP3 TSDR. Ο φαινότυπος του καπνίσματος φάνηκε να σχετίζεται με τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στις θέσεις 1,5,6 και 9 και στις δύο ομάδες ($p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.011$ και $p=0.023$ αντίστοιχα) (Εικόνα 27A). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνει προηγούμενα συμπεράσματα σχετικά με επιγενετικά φαινόμενα έκθεσης-απόκρισης στους απόγονους για κληρονομούμενες περιοχές διαφορικής μεθυλίωσης του γονιδιώματος (DMPs) οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο για την ανάπτυξη αλλεργικών αντιδράσεων.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μία αντίστοιχη ανάλυση ANOVA δύο κατευθύνσεων προκειμένου να εξεταστεί το αποτέλεσμα της συνύπαρξης του καπνίσματος και της τροφικής αλλεργίας στα επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του HLA-G. Η ανάλυση έδειξε ότι τα παιδιά με τροφική αλλεργία των οποίων οι γονείς κάπνιζαν είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης από ότι τα παιδιά στην ομάδα ελέγχου στη θέση 3 ($F=6.28$ $df=1$, 33 $p<0.001$), στη θέση 4 ($F=5.268$, $df=1$, 33 $p=0.028$), στη θέση 5 ($F=7.752$, $df=1$, 33 $p=0.009$), στη θέση 6 ($F=11.888$ $df=1,33$ $p=0.002$), στη θέση 7 ($F=7.773$, $df=1$, 33 $p=0.036$) και σε όλη την περιοχή που εξετάστηκε ($F=9.597$, $df=1$, 33 $p=0.004$) (Εικόνα 27B).

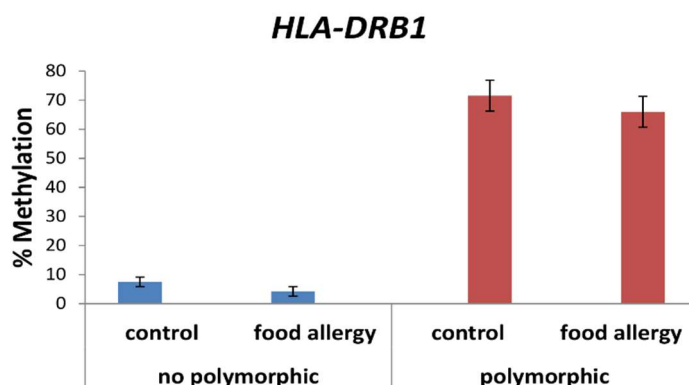
Εικόνα 27: Τα επίπεδα της μεθυλίωσης των παιδιών με τροφική αλλεργία και της ομάδας ελέγχου με και χωρίς ιστορικό καπνίσματος των γονέων (A) Το κάπνισμα των γονέων επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα μεθυλίωσης στις θέσεις CpG 1 ($p=0.004$), CpG 5 ($p=0.004$), CpG 6 ($p=0.011$) και CpG 9 ($p=0.023$) της περιοχής FOXP3 TSDR ανεξάρτητα από την ομάδα στην οποία ανήκαν (B) Το κάπνισμα των γονέων σε συνδυασμό με την τροφική αλλεργία επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις CpG του υποκινητή του HLA-G: CpG 3 ($p<0.001$), CpG 4 ($p=0.028$), CpG 5 ($p=0.009$), CpG 6 ($p=0.002$), CpG 7 ($p=0.036$) και σε όλη την περιοχή που εξετάστηκε ($p=0.004$).



6.4.2.2 Το προφίλ της μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 του γονιδίου HLA-DRB1 και η συνύπαρξη γενετικών παραλλαγών αναδεικνύονται ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας

Στον άνθρωπο τα γονίδια του HLA αποτελούν τμήμα του γενετικού τόπου MHC. Εδράζονται στον μικρό βραχίονα του Χρωμοσώματος 6 (6p21) και ταξινομούνται στις τάξεις I, II και III. Τα *HLA-DRB1* και *HLA-DQB1* ανήκουν στην τάξη II, βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση και μοιράζονται κοινά ρυθμιστικά στοιχεία στην περιοχή των υποκινητών τους και νησίδες CpG στο εξώνιο 2 που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο διότι περιέχουν DNase υπερευαίσθητες θέσεις. Επίσης γενετικοί πολυμορφισμοί στην αλληλουχία των γονιδίων HLA-DRB1 και HLA-DQB1 έχουν συσχετιστεί με την προδιάθεση για ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας (283, 284) αλλά η σύνδεση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και των SNPs αυτών των γενετικών τόπων δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως. Αν και δεν έχουν νησίδες CpG στην περιοχή του υποκινητή, οι νησίδες CpG73 και CpG41 που εντοπίζονται στο εξώνιο 2 κάθε γονιδίου αντίστοιχα φαίνεται να επηρεάζουν τη δομή της αύλακας δέσμησης πεπτιδίου (peptide-binding groove). Επιπλέον, και οι δύο νησίδες CpG περιλαμβάνουν υπερευαίσθητες θέσεις σε DNase, υποδεικνύοντας την παρουσία παραγόντων που δρουν in-trans.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης της νησίδας CpG73 στο εξώνιο 2 του γονιδίου HLA-DQB1, έδειξε ότι υπάρχει υπομεθυλίωση της συγκεκριμένης περιοχής και στις δύο ομάδες, εύρημα που αναδεικνύει την απουσία επιγενετικής δράσης στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας. Αντίθετα το προφίλ της μεθυλίωσης στη νησίδα CpG41 του γονιδίου *HLA-DRB1* έδειξε διαφοροποίηση των προτύπων μεθυλίωσης μεταξύ των ατόμων και των δύο ομάδων και μία ισχυρή συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης με την ύπαρξη πολυμορφισμών στη συγκεκριμένη αλληλουχία. Πραγματοποιήθηκε επίσης αλληλούχηση μιας ιδιαίτερα πολυμορφικής περιοχής 70 bp στη νησίδα CpG41 και στη συνέχεια τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα ποσοστά μεθυλίωσης για την ίδια περιοχή. Από την ανάλυση αυτή φάνηκε ότι 25,6% των παιδιών με τροφική αλλεργία και το 16,9% των παιδιών της ομάδας ελέγχου δεν ήταν πολυμορφικά. Στα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν τόσο στα παιδιά με τροφική αλλεργία όσο και στην ομάδα ελέγχου βρέθηκαν οι ακόλουθοι πολυμορφισμοί: rs1059572 (G/A/C/T), rs1059575 (G/C/T), rs3175105 (T/A/C), rs17882300 (A/C/T), rs17882603 (C/A/T), rs11554462 (A/C/G), rs1064664 (A/C/G), rs707957 (G/A/C/T), rs17878951 (A/G), και rs150747106 (C/G/T) σε διαφορετικούς συνδυασμούς (Εικόνα 8). Η απουσία πολυμορφισμών συνοδευόταν από σχεδόν πλήρη απομεθυλίωση της νησίδας CpG41 (2-7% ανά νησίδα CpG). Το σύνολο των γενετικών και επιγενετικών ρυθμίσεων έδειξε ξεκάθαρα ότι η προδιάθεση για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA και τη συνύπαρξη ποικιλομορφίας σε συγκεκριμένους ανοσοτροποποιητικούς γενετικούς τόπους, ενώ επηρεάζεται και από τη συνήθεια του καπνίσματος των γονέων.



Εικόνα 28: Ποσοστό μεθυλίωσης μιας ιδιαίτερα πολυμορφικής περιοχής 70bp στη θέση CpG41 του *HLA-DRB1*. Η απουσία των SNPs χαρακτηρίζεται από πλήρη απομεθυλίωση (<5%), ενώ η παρουσία τους συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης (>70%).

6.4.2.3 Οι αλλαγές στο προφίλ της μεθυλίωσης πιθανώς να απορρυθμίζουν την ικανότητα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων

Κατά μήκος των αλληλουχιών που περιλαμβάνουν τις υπό μελέτη θέσεις CpG στον υποκινητή του *HLA-G* και της νησίδας CpG41 στο γονίδιο *HLA-DRB1*, βρέθηκαν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων χρησιμοποιώντας το JASPAR CORE την ανοιχτή βάση δεδομένων του 2020 (288). Το JASPAR 2020 αποτελεί μία ανανεωμένη συλλογή που περιέχει όλες τις καθορισμένες θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων για τους ευκαρυώτες. Στην Εικόνα 8 απεικονίζονται τα σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων καταλαμβάνοντας είτε την κωδική είτε τη μη κωδική αλυσίδα του DNA, που περιορίζονται σε θέσεις που περιλαμβάνουν δινουκλεοτίδια CpG. Το προφίλ μεθυλίωσης συγκεκριμένων κυτοσινών σε αυτές τις θέσεις θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητα αναγνώρισής/ή και πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA και για να αποτυπωθούν μόνο οι διαφοροποιήσεις που σχετίζονται με αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA δώσαμε έμφαση στις περιοχές με δινουκλεοτίδια CpG που σημείωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη.

Η ανάλυση ανέδειξε κυρίως μεταγραφικούς παράγοντες, με δομή δακτυλίου ψευδαργύρου (ZIC1, ZIC4, ZIC5, ZBTB7A, ZNF281), υπομονάδες του παράγοντα NFκB (REL, RELA, και υπομονάδες των p100 και p105) και μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας έλικα-βρόχου-έλικας (NHLH2, TCF3), που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν απαραίτητες βιολογικές διαδικασίες.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που αναγνωρίζουν τον υποκινητή του HLA-G περιλαμβάνουν περιλαμβάνουν πρωτεΐνες με δακτύλιο ψευδαργύρου όπως οι ZIC1, ZIC4 και η ZIC5 μεταξύ των οποίων η ZIC5, που αποτελεί γνωστό καταστολέα της μεταγραφής και αναγνωρίζει τη θέση 2 με μεγαλύτερο ποσοστό απομεθυλίωσης και με στατιστικά σημαντική διαφορά στα παιδιά με τροφική αλλεργία (Εικόνα 8). Η θεωρητική προσέγγιση είναι ότι η απομεθυλίωση του υποκινητή προκαλεί την αποδέσμευση του καταστολέα της μεταγραφής και ενισχύει την έκφραση του HLA-G και την παραγωγή TregHLA-G+/FOXP3-, δίνοντας μια δυναμική για πρόκληση ανοχής και διεγείροντας τη φυσική διαδικασία της απευαισθητοποίησης στην ομάδα των παιδιών με την τροφική αλλεργία. Αντίστοιχη έρευνα έχει δείξει ότι η απομεθυλίωση του HLA-G συμβαίνει σε διάφορες μορφές όγκων και ο βαθμός έκφρασης της σχετίζεται με την ανοχή του ανοσοποιητικού στην κακοήθεια.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες, ZBTB7A και ZNF281 με μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου καθώς και οι υπομονάδες του NFκB, REL και RELB είναι ανάμεσα στους μεταγραφικούς παράγοντες με θέσεις αναγνώρισης κατά μήκος της νησίδας CpG41 του γονιδίου HLA-DRB1 (Εικόνα 8). Πιο συγκεκριμένα οι μεταγραφικοί παράγοντες με το μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου είναι γνωστοί καταστολείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε CG και παράλληλα συνεργάζονται με το νουκλεόσωμα και την αναδιοργάνωση των ιστονών (289). Παράλληλα η συνύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών έχει καθοριστικό ρόλο στη μεθυλίωση του DNA. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν έναν ρυθμιστικό ρόλο για αυτή την περιοχή του γονιδίου που εδράζεται στο γονίδιο HLA-DRB1. Πιθανοί ρόλοι της δέσμευσης των μεταγραφικών παραγόντων είναι η δράση ενισχυτή, μονωτή και τροποποίησης του νουκλεοσώματος.

7. Συζήτηση

Βιταμίνη D και τροφική αλλεργία

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η συσχέτιση ανάμεσα στους παράγοντες που επιδρούν στα παιδιά και εμφανίζουν τροφική αλλεργία. Όπως γνωρίζουμε η τροφική αλλεργία αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο και οι παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της είναι περιβαλλοντικοί, γενετικοί και επιγενετικοί. Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες εξετάστηκε η βιταμίνη D και μετρήθηκαν τα επίπεδα της στον ορό του αίματος των παιδιών. Τα επίπεδα της βιταμίνης D καθορίζονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς παράγοντες συγκαταλέγονται η πρωτεΐνη μεταφορέας της, η VDBP αλλά και η αλληλεπίδραση της με το ανοσοποιητικό σύστημα. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται ή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, το χρώμα του δέρματος, το γεωγραφικό πλάτος αλλά και η διατροφή. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όλους αυτούς τους παράγοντες προσπαθήσαμε να βρούμε την επίδραση τους στη διαμόρφωση των επιπέδων της βιταμίνης D, η οποία φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής λοιπόν, έδειξαν ότι η IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D. Πιο συγκεκριμένα τα παιδιά με τροφική αλλεργία παρουσίαζαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ανεπάρκεια βιταμίνης D συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα τα παιδιά αυτά φάνηκε ότι είχαν εκτεθεί λιγότερο στην ηλιακή ακτινοβολία, εύρημα που μπορεί να σχετίζεται με τα χαμηλότερα επίπεδα Βιταμίνης D. Ένα εύρημα που αξίζει επίσης να σημειωθεί είναι ότι το ιστορικό ατοπίας φάνηκε να σχετίζεται σημαντικά με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία, ενισχύοντας το ρόλο του γενετικού υποβάθρου στην ανάπτυξη της. Επίσης τα παιδιά αυτά είχαν θηλάσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τον πιθανό προστατευτικό ρόλο του θηλασμού απέναντι στις αλλεργίες.

Αναφορικά με τους πολυμορφισμούς του VDR που μελετήθηκαν, τον BsmI, τον TaqI, τον ApaI και τον FokI δεν φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες πληθυσμού. Ωστόσο στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλίων τους φάνηκε ότι το αλληλίο A του πολυμορφισμού ApaI εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά με τροφική αλλεργία. Παράλληλα φάνηκε ότι ο απλότυπος A/B/F/T εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά με τροφική αλλεργία συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

Συνεπώς η συσχέτιση αυτή ανάμεσα στα επίπεδα της βιταμίνης D και στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας εξηγείται από το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η βιταμίνη αυτή ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος (290). Πιο συγκεκριμένα, αυτό συμβαίνει μέσω του περιορισμού των δράσεων των Th1/Th2 κυττάρων και της μείωσης της παραγωγής των κυτταροκινών από τα T κύτταρα (291),(292). Είναι γνωστό ότι τα T κύτταρα είναι υπεύθυνα

για την αλλεργική απάντηση και πιο συγκεκριμένα τα Th2 κύτταρα ενισχύουν την εμφάνιση της τροφικής αλλεργίας (293). Επιπλέον η 1,25(OH)₂D προωθεί μηχανισμούς απαραίτητους για την κυτταρική ανοχή (138). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της καταστολής των αλλεργικών αποκρίσεων και τη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου (142). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι στην ανεπάρκεια της βιταμίνης D τα Tregs είναι μειωμένα. Τα Tregs είναι κύτταρα τα οποία έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας καθώς προωθούν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10 και επάγουν την ανοχή (294).

Τα αποτελέσματα μας αναφορικά με την συσχέτιση της τροφικής αλλεργίας και της ανεπάρκειας της βιταμίνης D φαίνεται να είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών. Σε μία μεγάλη μελέτη που διενεργήθηκε στην Αυστραλία και συμπεριλάμβανε βρέφη ηλικίας 12 -18 μηνών, φάνηκε ότι τα βρέφη με ανεπάρκεια ή έλλειψη βιταμίνης D ήταν πιο πιθανό να αναπτύξουν τροφική αλλεργία συγκριτικά με τα βρέφη που είχαν επάρκεια βιταμίνης D. Επιπρόσθετα η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι τιμές της βιταμίνης D επηρεάζονται από την χώρα καταγωγής των γονέων και μάλιστα η παράμετρος αυτή επηρεάζεται από διάφορους γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ιδιοσυστατικούς παράγοντες όπως το χρώμα της επιδερμίδας (295). Στην παρούσα μελέτη η χώρα καταγωγής των γονέων δεν ελέγχθηκε ως παράμετρος που επιδρούσε στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας καθώς το σύνολο του πληθυσμού μας ήταν Καυκάσιοι.

Ο ρόλος της γενετικής στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας και η σχέση της με τη βιταμίνη D επιβεβαιώθηκαν από μία άλλη μελέτη που διενεργήθηκε στην Αυστραλία, η οποία έδειξε ότι βρέφη ηλικίας 1-2 ετών με επιβεβαιωμένη τροφική αλλεργία είχαν παρόμοιους πολυμορφισμούς της VDBP οι οποίοι σχετιζόνταν με χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D συγκριτικά με τους ασθενείς (296). Σε συμφωνία λοιπόν με τα δικά μας ευρήματα, τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών προτείνουν ότι τα βρέφη με χαμηλές τιμές βιταμίνης D στην ηλικία των 12 μηνών ήταν πιο πιθανό να έχουν πολλαπλή τροφική αλλεργία σε σύγκριση με εκείνα τα βρέφη που είχαν φυσιολογικές τιμές βιταμίνης D (295).

Επιπλέον η μεγάλη μελέτη NHANES η οποία έλαβε χώρα στις ΗΠΑ και συμπεριλάμβανε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα παιδιών πρότεινε μία συσχέτιση μεταξύ της έλλειψης βιταμίνης D, των υψηλών τιμών των ειδικών IgE και της αλλεργικής ευαισθητοποίησης σε πολλά τροφικά αλλεργιογόνα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη μελέτη αυτή βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών τιμών της βιταμίνης D και της αλλεργίας στο φιστίκι, όχι όμως μεταξύ της αλλεργίας στο αυγό και στο γάλα (297). Η συσχέτιση αυτή ανάμεσα στις χαμηλές τιμές βιταμίνης D και στις υψηλές τιμές IgE επιβεβαιώθηκαν και από μία μελέτη σε παιδιά ηλικίας 2 ετών με ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια (298). Παράλληλα, σε μία άλλη μελέτη στην οποία συμπεριλαμβάνονταν βρέφη με ατοπική δερματίτιδα και μόνο-ή πολυευαισθητοποίηση σε διάφορα τροφικά αλλεργιογόνα, φάνηκε ότι εκείνα που

παρουσίαζαν τον υψηλότερο βαθμό ευαισθητοποίησης (με τις υψηλότερες τιμές IgE) είχαν και τις χαμηλότερες τιμές βιταμίνης D. Το εύρημα αυτό προτείνει ότι η έλλειψη βιταμίνης D αυξάνει το κίνδυνο για ευαισθητοποίηση στην τροφή αλλά και για την ανάπτυξη ατοπικής δερματίτιδας (299). Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύονται και από μία μεταγενέστερη μελέτη η οποία συμπεριλάμβανε βρέφη ηλικίας μέχρι 2 ετών τα οποία είχαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι τα βρέφη με την τροφική αλλεργία είχαν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D και υψηλότερα ποσοστά έλλειψης συγκριτικά με τα υγιή βρέφη. Μάλιστα τα βρέφη που παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές βιταμίνης D ήταν εκείνα που είχαν θηλάσει αποκλειστικά (300).

Εκτός από τις μελέτες που υποστηρίζουν τα αποτελέσματά μας υπάρχουν και μελέτες που δεν υποστηρίζουν τη συσχέτιση ανάμεσα στην έλλειψη της βιταμίνης D και στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στα παιδιά. Πιο συγκεκριμένα, μια πρόσφατη μελέτη από τον Ergun και συν. που έλεγξε τα επίπεδα της βιταμίνης D σε βρέφη με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα και σε υγιή βρέφη δεν βρήκε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Το αποτέλεσμα αυτό όμως σύμφωνα με τους συγγραφείς θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι στην ομάδα της τροφικής αλλεργίας συμπεριλαμβάνονταν βρέφη με IgE αλλά και με μη IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία (301). Παράλληλα σε μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση που μελέτησε την ίδια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης D και της τροφικής αλλεργίας δεν βρήκε κάποια διαφορά ανάμεσα στα αλλεργικά και τα μη αλλεργικά παιδιά. Αξίζει όμως να επισημανθεί ότι μεταξύ των μελετών που συμπεριελήφθησαν στην ανασκόπηση υπήρχε σημαντική ετερογένεια στον ορισμό των ιδανικών επιπέδων της βιταμίνης D τα οποία θα ήταν ικανά να επηρεάσουν την ανοσολογική απάντηση (302).

Τροφική αλλεργία και παράγοντες που την επηρεάζουν

Στην παρούσα μελέτη εκτός από τα επίπεδα της βιταμίνης D εξετάστηκαν και αρκετοί παράγοντες που σχετίζονται με την τροφική αλλεργία όπως το οικογενειακό ιστορικό ατοπίας, ο θηλασμός, το κάπνισμα των γονέων, τα επίπεδα της VDBP, το φύλο και η έκθεση στον ήλιο. Από τους παράγοντες αυτούς βρέθηκε να υπάρχει σημαντική συσχέτιση με το ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της γενετικής προδιάθεσης στην εμφάνιση της τροφικής αλλεργίας. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες σε διδύμους, οι οποίες δείχνουν ότι η γενετική προδιάθεση για τις αλλεργικές παθήσεις υπολογίζεται σε 50%, με την κληρονομικότητα να ποικίλει από 36–79%(303). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας βρίσκονται σε συμφωνία και με τα ευρήματα μιας πρόσφατης μελέτης που διενεργήθηκε στη Γαλλία και αφορούσε 1674 βρέφη με πιθανή ή επιβεβαιωμένη αλλεργία στο αγελαδινό γάλα. Πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των βρεφών αυτών (88% των βρεφών με επιβεβαιωμένη αλλεργία στο αγελαδινό γάλα) είχαν θετικό ιστορικό ατοπίας σε συγγενείς πρώτου βαθμού (304). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τα παιδιά με αλλεργία στο φιστίκι

(171, 305). Επιπρόσθετα, μελέτες σε οικογένειες διδύμων υποστηρίζουν τα υψηλά ποσοστά κληρονομικότητας της τροφικής αλλεργίας έχοντας ένα ή περισσότερα μέλη να πάσχουν από αυτή (166, 171, 306).

Αναφορικά με το μητρικό θηλασμό τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη έδειξαν ότι τα παιδιά με τροφική αλλεργία είχαν θηλάσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Ο αμφιλεγόμενος λοιπόν αυτός ρόλος απέναντι στη δράση του μητρικού θηλασμού και στην προστασία από την τροφική αλλεργία, ενισχύεται από τα δεδομένα μιας πρόσφατης αναδρομικής μελέτης η οποία έλαβε χώρα στην Ιαπωνία και περιλάμβανε 46.000 παιδιά. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο μητρικός θηλασμός ιδιαίτερα με πρωτόγαλα, ασκούσε προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας μόνο σε παιδιά υψηλού κινδύνου που είχαν έκζεμα, ενώ η παρατεταμένη διάρκεια του μητρικού θηλασμού αύξανε τον κίνδυνο για εμφάνιση τροφικής αλλεργίας (307). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει έναν ουδέτερο ρόλο, χωρίς προστατευτική αλλά και ούτε και αρνητική επίδραση του μητρικού θηλασμού στην τροφική αλλεργία (308, 309).

Παράλληλα στην παρούσα μελέτη φάνηκε να υπάρχει μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στα θήλαα παιδιά και στην εμφάνιση τροφικής αλλεργίας. Το εύρημα αυτό δεν βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα άλλων μελετών τα οποία δείχνουν η εμφάνιση τροφικής αλλεργίας να συμβαίνει συχνότερα στα άρρενα παιδιά. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Sicherer και συν. ο λόγος άρρενων προς θήλεων παιδιών με αλλεργία στο φιστίκι ήταν 5, ενώ στους ενήλικες ο ίδιος λόγος ήταν λιγότερο από 1 (167). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και στη μελέτη του Emmett και συν. όπου σε πάνω από 16.000 παιδιά η επίπτωση της αλλεργίας στο φιστίκι ήταν σημαντικά υψηλότερη στα άρρενα παιδιά κάτω των 4 ετών συγκριτικά με τα θήλαα (168). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι τα παιδιά με πολλαπλή τροφική αλλεργία δεν παρουσίαζαν διαφορές στα επίπεδα της βιταμίνης D συγκριτικά με τα παιδιά με μεμονωμένη τροφική αλλεργία. Ωστόσο τα παιδιά με την πολλαπλή τροφική αλλεργία εμφάνιζαν σημαντικότερη αλλεργία σύμφωνα με τιμές των ειδικών IgE.

Σχετικά με την άλλη παράμετρο που εξετάστηκε, τον VDR και τους πολυμορφισμούς του, Araf, BsmI, Taq και FokI φάνηκε μόνο το A αλληλίο του πολυμορφισμού Araf να εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά με τροφική αλλεργία. Παράλληλα ο απλότυπος A/B/F/T εμφανιζόταν με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά με τροφική αλλεργία συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο οι πολυμορφισμοί αυτοί φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη ατοπικής δερματίτιδας όσο και στην ανάπτυξη άσθματος. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που έγινε στην Τουρκία σε πληθυσμό ενηλίκων με ατοπική δερματίτιδα αλλά και υγιείς φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός BsmI αυξάνει ιδιαίτερα τον κίνδυνο για εμφάνιση ατοπικής δερματίτιδας (310). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από μία πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση στην οποία φαίνεται πως όχι μόνο ο πολυμορφισμός BsmI αλλά και ο TaqI ενέχονται στην ανάπτυξη της ατοπικής δερματίτιδας (311). Επιπλέον και ο

πολυμορφισμός FokI φάνηκε να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ατοπικής δερματίτιδας σύμφωνα με μία μελέτη που διενεργήθηκε στην Κίνα σε πληθυσμό παιδιών με πιο έντονη την εμφάνιση σε βρέφη κάτω των 8 μηνών με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα και με την ύπαρξη κατοικίδιου στο σπίτι (312). Εκτός βέβαια από την ατοπική δερματίτιδα οι πολυμορφισμοί αυτοί φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στην εμφάνιση άσθματος. Αυτό επιβεβαιώνεται από μία μελέτη στην Κύπρο σε παιδιά με άσθμα αλλά και υγιή παιδιά στην οποία φάνηκε μία συσχέτιση με τον minor γονότυπο του TaqI πολυμορφισμού και του άσθματος (135). Επιπλέον στη μετα-ανάλυση που περιγράφηκε προηγουμένως, φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση στην ανάπτυξη άσθματος με τους πολυμορφισμούς BsmI και TaqI, με τον πρώτο να αφορά τους Καυκάσιους και τον δεύτερο τους Ασιάτες (311). Ωστόσο, ο BsmI φαίνεται να παρέχει προστατευτικό χαρακτήρα στα παιδιά με άσθμα και ο FokI να ενισχύει τις συχνές υποτροπές της νόσου σύμφωνα με μία μελέτη που διενεργήθηκε σε παιδιά με άσθμα στην Αυστραλία (313). Όπως φαίνεται από όλες τις παραπάνω μελέτες οι πολυμορφισμοί του VDR φαίνεται να ενέχονται στην ανάπτυξη τόσο ατοπικής δερματίτιδας όσο και άσθματος, συμμετέχοντας στον ατοπικό καταρράκτη. Αναφορικά με την τροφική αλλεργία έχει διενεργηθεί μόνο μία μελέτη η οποία συμπεριελάμβανε παιδιά με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα. Στη μελέτη αυτή έγινε αλληλούχηση μόνο για τον πολυμορφισμό FokI χωρίς ωστόσο να βρεθεί συσχέτιση με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας(136). Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για συσχέτιση των πολυμορφισμών του VDR, BsmI, TaqI, ApaI και FokI με την εμφάνιση τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία. Με βάση τα αποτελέσματα μας φαίνεται πως υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα τον πολυμορφισμό ApaI και τα παιδιά με τροφική αλλεργία. Όμως για πιο ασφαλή συμπεράσματα απαιτούνται μεγαλύτερες και περισσότερες μελέτες.

Επιγενετική

Η μεθυλίωση του DNA κατά μήκος συγκεκριμένων γενετικών τόπων και κυρίως ανοσοτροποποιητικών αναδεικνύεται ως ιδιαίτερα σημαντική επιγενετική ρύθμιση για την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας. Παράλληλα η μεθυλίωση θα μπορούσε να ανιχνεύσει επιγενετικά προφίλ με κίνδυνο για ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας και να προβλέψει αποκρίσεις στη θεραπεία ή την έναρξη της φυσικής διαδικασίας απευαισθητοποίησης από αλλεργιογόνα.

Η μεθυλίωση του DNA ουσιαστικά θεωρείται ως ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στο γενετικό υπόβαθρο και στην επίδραση του περιβάλλοντος. Η μελέτη των Petrus και συν. το 2016 ασχολήθηκε με τη μεθυλίωση σε δέκα γνωστούς γενετικούς τόπους (GAST, EIF4E2, HTR2A, ZNF281, DHX58, κλπ) και έδειξε διαφορετικά προφίλ μεθυλίωσης ανάμεσα στα παιδιά με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα (IgE ή μη IgE μεσολαβούμενη) και στην ομάδα ελέγχου. Οι διαφορές αυτές στη μεθυλίωση φάνηκε να εξαρτώνται από το φύλο και έπαψαν

να υπάρχουν μετά την απόκτηση ανοχής στο γάλα (314), επιβεβαιώνοντας την πλαστικότητα των επιγενετικών φαινομένων. Τα αποτελέσματα αυτά ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλες μελέτες επιγενετικής που ασχολήθηκαν με την αλλεργία στο αγελαδινό γάλα (315, 316), οπότε οι διαφορές αυτές μπορεί να αποδοθούν στο είδος των κυττάρων που μελετήθηκαν. Τα κύτταρα αυτά θα μπορούσαν να είναι μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος ή υποομάδες κυττάρων και επίσης τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεάστηκαν και από το είδος της αλλεργίας στο αγελαδινό γάλα, IgE ή μη IgE μεσολαβούμενη. Άλλες μελέτες έχουν υπογραμμίσει τη μεθυλίωση του DNA σε δώδεκα γενετικούς τόπους ανάμεσα σε παιδιά με αλλεργία στο φιστίκι και σε μη αλλεργικά παιδιά. Η διαφορά αυτή στη μεθυλίωση αποδόθηκε στη διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων σε Th1 ή Th2 εκτελεστικά κύτταρα, την άμεση ανοσία και άλλα κυτταρικά μονοπάτια. Ανάμεσα σε αυτά τα μονοπάτια, η μεθυλίωση του DNA στα γονίδια BDNF και CXCL12 παρουσίασε την πιο σημαντική διαγνωστική εξειδίκευση συγκρινόμενη με τα ειδικά IgE για το φιστίκι για τη διάκριση της αλλεργίας (317).

Τα πειράματα που διενεργήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ανίχνευσαν τα προφίλ μεθυλίωσης στην περιοχή TSDR του γονιδίου FOXP3 (στην ευθεία και στην ανάστροφη έλικα) και στη νησίδα CpG73 του γονιδίου HLA-DQB1 τόσο σε ασθενείς με τροφική αλλεργία όσο και στην ομάδα ελέγχου. Η περιοχή TSDR του γονιδίου FOXP3 παρουσίασε υπερμεθυλίωση ενώ του γονιδίου HLA-DQB1 υπομεθυλίωση (Εικόνες 26A,26B). Στο πλαίσιο αυτό τα αποτελέσματα του HLA-DQB1 δεν συζητώνται περαιτέρω. Αντίστοιχα αποτελέσματα από τις νησίδες CpG στον υποκινητή του HLA-G και της νησίδας CpG41 του γονιδίου HLA-DRB1 στα παιδιά με τροφική αλλεργία παρουσίασαν αποκλίσεις από την ομάδα ελέγχου (Εικόνες 26A,26C). Το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία SNPs στην ίδια γενετική περιοχή. Επίσης ο πολυμορφισμός rs1233333 που εδράζεται στον υποκινητή της περιοχής του HLA-G φαίνεται να παρέχει μία προστατευτική επίδραση στη μεθυλίωση του DNA.

Αντίστοιχες μελέτες, έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του FOXP3 σχετίζεται με μειωμένη λειτουργία των Tregs και ανάπτυξη αλλεργίας (318) καθώς τα παιδιά με άσθμα και IgE μεσολαβούμενη τροφική αλλεργία παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του mRNA συγκριτικά με τα υγιή παιδιά (319). Πολλές επιπλέον μελέτες έχουν διενεργηθεί για να συσχετίσουν τα χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης του FOXP3 με τη μεταγραφική δραστηριότητα του και την ανοχή στην αλλεργία. Η απόκτηση ανοχής στα παιδιά με IgE μεσολαβούμενη αλλεργία στο αγελαδινό γάλα φαίνεται να ενέχει επιγενετικές ρυθμίσεις του γονιδίου FOXP3 (314) και επίσης προτείνεται και ως βιοδείκτης για την απόκτηση ανοχής (320). Τα αποτελέσματα από τη δική μας μελέτη έδειξαν μη σημαντικές διαφορές στην περιοχή του TSDR του γονιδίου FOXP3 ανάμεσα στα 64 παιδιά με τροφική αλλεργία και στα 44 παιδιά της ομάδας ελέγχου (άρρενα και θήλεα). Ωστόσο τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης στην περιοχή TSDR του γονιδίου FOXP3 στις νησίδες 1,5 6 και 9 τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στα

παιδιά με τροφική αλλεργία ($p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.011$ και $p=0.023$ αντίστοιχα) αποδόθηκε στο κάπνισμα των γονέων (Εικόνα 27A) επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα από άλλες παιδιατρικές διαταραχές που προκύπτουν από το επιβαρυσμένο επιγενετικό υπόβαθρο των γονέων (321). Ανάλογα αποτελέσματα φάνηκαν από αναλύσεις μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου HLA-G (Εικόνα 26B).

Το προφίλ της μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 που βρίσκεται στο εξώνιο 2 του HLA-DRB1 και των νησίδων CpG που βρίσκονται την περιοχή του υποκινητή του HLA-G υποδεικνύουν την πιθανή φύση τους για την προδιάθεση στην τροφική αλλεργία. Το γονίδιο του HLA-DRB1 έχει συσχετιστεί σημαντικά με την πολλαπλή σκλήρυνση, μία πολυπαραγοντική φλεγμονώδη νόσος του ΚΝΣ. Η νόσος αυτή σχετίζεται κυρίως με το αλληλίο DRB1*15:01, σε πληθυσμούς Ευρωπαϊκής καταγωγής (322). Επιπλέον η ρευματοειδής αρθρίτιδα μία ακόμη φλεγμονώδης νόσος με χαρακτηριστικά αυτοανοσίας σχετίζεται επίσης με συγκεκριμένα αλληλίου του HLA-DRB1: DRB1*04:01; DRB1*04:04; DRB1*04:05; DRB1*04:08; DRB1*10:01; DRB1*01:01 και DRB1*01:02 και συγκεκριμένους γενετικούς πολυμορφισμούς στη θέση 40 όπου προσδένονται πεπτίδια (323). Πρόσφατα δεδομένα από μία ευρεία γενετική μελέτη σε έναν πληθυσμό της Αυστραλίας, η οποία προσπαθούσε να αποκωδικοποιήσει τη σχέση ανάμεσα στο γενετικό υπόβαθρο της αλλεργίας στο φιστίκι και του γονιδίου HLA-DRB1, βρέθηκε μία ποικιλόμορφη θέση αμινοξέος στη θέση 71 στην αύλακα όπου προσδένονται τα πεπτίδια (324). Στην παρούσα μελέτη, το προφίλ της μεθυλίωσης και τα SNPs που βρίσκονται στη νησίδα CpG 41 υπογραμμίζουν τη δυνατότητα τους να επιδράσουν στην ανάπτυξη της IgE μεσολαβούμενης τροφικής αλλεργίας. Ωστόσο κανένα από τα SNPs που ανιχνεύθηκαν στην περιοχή αυτή (rs1059572, rs1059575, rs3175105, rs17882300, rs17882603, rs11554462, rs1064664, rs707957, rs17878951, και rs150747106) (Εικόνα 8) δεν συσχετίστηκε σημαντικά με το προφίλ της μεθυλίωσης στην ίδια γενετική περιοχή. Παρόλα αυτά φάνηκε ότι το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης των κυτοσινών της περιοχής συνδυάζεται και με κάποιο από τα παραπάνω SNPs ενώ ελάχιστα επίπεδα μεθυλίωσης των κυτοσινών ανιχνεύονται μόνο στην απουσία των SNPs (Εικόνα 8) τόσο στα παιδιά με τροφική αλλεργία όσο και στην ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι τα σημαντικά SNPs τα οποία θα διαφοροποιούσαν τα παιδιά με τροφική αλλεργία από την ομάδα ελέγχου βρίσκονται πιθανώς στον ευρύτερο γενετικό τόπο, εκτός της περιοχής που μελετήθηκε και προφανώς χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να έχουμε επιβεβαίωση. για την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε γενετικούς παράγοντες και επιγενετικές ρυθμίσεις.

Η προσπάθεια για την ανίχνευση πιθανών αλλαγών που προκαλούνται στα σημεία πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων από τη διαφοροποιημένο προφίλ μεθυλίωσης της νησίδας CpG41 αποκάλυψε μία ποικιλία σημαντικών παραγόντων οι οποίοι έχουν προβλέψιμες θέσεις αναγνώρισης όπως οι ακόλουθοι: ο ZBTB7A και ο ZNF281 (πρωτεΐνες με δακτύλιο ψευδαργύρου), η REL και η RELA υπομονάδες του NFκB και ο NHLH2 (πρωτεΐνη

έλικας-βρόχου-έλικας) (Εικόνα 8). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες μέσα στην αλληλουχία του εξωνίου 2 πιθανώς συνεργάζονται με στοιχεία του υποκινητή δρώντας καθοδικά ως ενισχυτές (πιθανώς υπομονάδες του NFκΒ) και/ή ενισχύουν τη δράση μονωτών, οδηγώντας σε μεθυλίωση της ευρύτερης περιοχής και/ή αναστολή των τροποίσεων των ιστονών. Για την πλήρη αποσαφήνιση της συνεισφοράς στη διαμόρφωση της χρωματίνης και στη μεταγραφική ρύθμιση απαιτείται μία πιο πλήρης μελέτη.

Η πιθανή εμπλοκή της μεθυλίωσης/απομεθυλίωσης των δινουκλεοτιδίων CpG στον υποκινητή του *HLA-G* και του εξωνίου 2 του *HLA-DRB1*, καθώς και των γενετικών πολυμορφισμών στην ίδια γενετική περιοχή που αναδεικνύονται για πρώτη φορά σε αλλεργικά φαινόμενα. Τα επίπεδα της μεθυλίωσης των νησίδων CpG κατά μήκος του υποκινητή του *HLA-G* ήταν σημαντικά μειωμένα στη θέση 2 και παρουσίασαν συνολικά μια τάση υπομεθυλίωσης (Εικόνα 26C) μεταξύ των παιδιών με τροφική αλλεργία. Η υπομεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του *HLA-G* έχει φανεί να επάγει διαφοροποίηση ενός υποπληθυσμού των CD4+T κυττάρων σε Treg *HLA-G*+/*FOXP3*- με πιθανές *in vitro* ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες παρόμοιες με εκείνες που έχουν τα Treg που παράγονται από το θύμο αδέν (286). Κατά αυτόν τον τρόπο θεωρούμε πως η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά την εκδήλωση της τροφικής αλλεργίας και πυροδοτεί μια εναρκτήρια προσπάθεια απευαισθητοποίησης και ανοχής προς το αλλεργιογόνο.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν γενετικοί, περιβαλλοντικοί αλλά και επιγενετικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στην ανάπτυξη της τροφικής αλλεργίας. Ανάμεσα σε αυτούς ήταν η βιταμίνη D, η οποία πέρα από τον πολύ σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό, έχει και ρυθμιστικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Μέσω αυτού του ρόλου της πιθανώς συνδέεται και με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στα παιδιά, ιδίως όταν τα επίπεδα της στον ορό του αίματος είναι χαμηλά ή πολύ χαμηλά με αποτέλεσμα να προκύπτει έλλειψη της. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στα παιδιά φάνηκε να διαδραματίζουν και οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της του VDR, όπως οι TaqI, BsmI, ApaI και FokI, οι οποίοι μελετώνται για πρώτη φορά σε σχέση με τον ρόλο τους αυτό. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το αλληλίο A του πολυμορφισμού ApaI εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά με τροφική αλλεργία. Το εύρημα αυτό αναδεικνύει και το γενετικό υπόβαθρο το οποίο επηρεάζει την ανάπτυξη της νόσου αυτής. Η συμμετοχή των γενετικών παραγόντων επιβεβαιώνεται και από το ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια, το οποίο φάνηκε να χαρακτηρίζει τα περισσότερα αλλεργικά παιδιά της μελέτης. Τέλος, στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι εκτός από τους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες στην εμφάνιση της τροφικής αλλεργίας εμπλέκονται και επιγενετικοί παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, η μεθυλίωση σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων HLA-G και HLA-DRB1 φάνηκε να επιδρά στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα στη διάγνωση της τροφικής αλλεργίας καθώς προσθέτουν νέα δεδομένα σχετικά με τους αιτιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνισή της, ενώ γνωρίζοντάς τους μπορεί να ενισχυθεί και η πρόληψη της πολυπαραγοντικής αυτής διαταραχής.

Περίληψη

Εισαγωγή: Η επίπτωση της τροφικής αλλεργίας τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ιδιαίτερα στις δυτικές κοινωνίες. Υπολογίζεται ότι το 6-8% των παιδιών σε παγκόσμιο επίπεδο πάσχουν από κάποιο είδος τροφικής αλλεργίας. Παρά την αύξηση αυτή δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως τα αίτια που οδηγούν στην εμφάνισή της. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι στην παρουσίαση της τροφικής αλλεργίας ενέχονται γενετικοί, περιβαλλοντικοί αλλά και επιγενετικοί παράγοντες. Ανάμεσα σε αυτούς περιλαμβάνεται η Βιταμίνη D, η έλλειψη της οποίας έχει συσχετιστεί τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας. Παράλληλα οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της VDR (Apol, BsmI, TaqI, FokI) ενέχονται στην ανάπτυξη τόσο του άσθματος όσο και της ατοπικής δερματίτιδας. Επίσης γενετικοί τόποι όπως το *HLA* και το *FOXP3* έχει φανεί ότι περιλαμβάνουν περιοχές οι οποίες όταν υποστούν επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση επιδρούν στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας.

Σκοπός: Η διερεύνηση των παραγόντων γενετικών, περιβαλλοντικών και επιγενετικών που επιδρούν στην ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας στα παιδιά. Πιο συγκεκριμένα μετρήθηκαν τα επίπεδα της βιταμίνης D σε παιδιά με τροφική αλλεργία αλλά και στην ομάδα ελέγχου. Παράλληλα ελέγχθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών του VDR, Apol, TaqI, BsmI και FokI με την τροφική αλλεργία. Τέλος, μελετήθηκε το προφίλ της μεθυλίωσης συγκεκριμένων γενετικών τόπων όπως το *FOXP3* και το *HLA* το οποίο μπορεί να προδιαθέτει στην εμφάνιση τροφικής αλλεργίας στην παιδική ηλικία.

Υλικά και Μέθοδοι: Πρόκειται για μια μελέτη ασθενών μαρτύρων η οποία περιλαμβάνει 200 παιδιά, ηλικίας έξι μηνών με 15 ετών, 90 εκ των οποίων με διαπιστωμένη τροφική αλλεργία και 110 υγιή παιδιά, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Η τροφική αλλεργία διαγνώσθηκε με τα δερματικά τεστ δια νυγμού, την μέτρηση της ειδικής αλλά και της ολικής IgE στον ορό του αίματος και την τροφική πρόκληση. Παράλληλα σε όλα τα παιδιά έγινε μέτρηση της 25(OH)D. Επίσης για τον προσδιορισμό των πολυμορφισμών του VDR έγινε απομόνωση DNA από ολικό αίμα. Σε 104 από τα 200 παιδιά της μελέτης έγινε pyrosequencing για τον προσδιορισμό του προφίλ της μεθυλίωσης στα *HLA*, *FOXP3*. Επιπλέον σε όλα τα παιδιά της μελέτης ελήφθη πλήρες ιστορικό και συμπληρώθηκε από τους γονείς ερωτηματολόγιο με στοιχεία που αφορούσαν τις συνήθειες αλλά και το ιστορικό της οικογένειας.

Αποτελέσματα: Οι δύο ομάδες δεν διέφεραν μεταξύ τους στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά ούτε και στην ηλικία. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις τιμές της Βιταμίνης D, όπου τα παιδιά με τροφική αλλεργία παρουσίαζαν μεγαλύτερο ποσοστό ανεπάρκειας βιταμίνης D ($p=0.003$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα τα παιδιά με τροφική αλλεργία είχαν σημαντικά χαμηλότερη έκθεση στον ήλιο ($p=0.003$) συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Διαφορά επίσης παρατηρήθηκε στο ποσοστό ($p=0.019$) και στη διάρκεια ($p=0.001$) του μητρικού θηλασμού όπου τα παιδιά με τροφική αλλεργία είχαν θηλάσει για μεγαλύτερο χρονικό

διάστημα. Επίσης οι δύο ομάδες διέφεραν και στο οικογενειακό ιστορικό ατοπίας ($p=0.013$) με τα αλλεργικά παιδιά να παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια. Αναφορικά με τους πολυμορφισμούς του VDR δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις συχνότητες των 4 γονοτύπων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ωστόσο φάνηκε ότι το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού Arai εμφανιζόταν συχνότερα στα παιδιά με τροφική αλλεργία συγκριτικά με τα υγιή παιδιά ($p=0.043$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον απλότυπο A/B/F/T ($p=0.047$), ο οποίος εμφανιζόταν με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες. Το προφίλ της μεθυλίωσης κατά μήκος της περιοχής FOXP3 TSDR και της νησίδας CpG73 του HLA-DQB1 είχε ομοιόμορφη κατανομή ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ενώ η περιοχή του υποκινητή του HLA-G παρουσίασε μία τάση υπομεθυλίωσης με κάποιες από τις θέσεις CG να είναι σημαντικά υπομεθυλιωμένες στους ασθενείς με τροφική αλλεργία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πολυμορφισμός rs1233333 παρουσίαζε έναν προστατευτικό ρόλο απέναντι στη μεθυλίωση του DNA.

Συμπέρασμα: Τα παιδιά με τροφική αλλεργία παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης D συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Παράλληλα τα παιδιά αυτά θηλάζουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επίσης τα αλλεργικά παιδιά έχουν ιστορικό ατοπίας στην οικογένεια γεγονός που προδιαθέτει στην ανάπτυξη αλλεργικής νόσου. Αναφορικά με τους πολυμορφισμούς του VDR φάνηκε ότι τα παιδιά με τροφική αλλεργία εμφανίζουν συχνότερα το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού Arai, εύρημα που υποστηρίζει τη γενετική προδιάθεση της νόσου αυτής. Επιπρόσθετα το διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους όπως το HLA-G επιβεβαιώνουν την συνύπαρξη επιγενετικών ρυθμίσεων στην εμφάνιση τροφικής αλλεργίας. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που μελέτησε τους 4 πολυμορφισμούς του VDR σε παιδιά με τροφική αλλεργία. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν τον πολυπαραγοντικό χαρακτήρα εμφάνισης της νόσου αυτής και μπορεί να χρησιμεύσουν τόσο ως βιοδείκτες όσο και ως προγνωστικοί παράγοντες στην καθ' ημέρα κλινική πράξη.

Summary

Introduction: The incidence of food allergy has increased recently, particularly in western societies. It is estimated that 6-8% of children worldwide suffer from some type of food allergy. Despite this increase, the causes leading to its occurrence have not been fully elucidated. Studies have shown that not only genetic, but also environmental and epigenetic factors are involved in food allergy appearance. Vitamin D deficiency has been associated with the development of food allergy. At the same time, VDR receptor polymorphisms (ApaI, BsmI, TaqI, FokI) are involved in the development of both asthma and atopic dermatitis. Genetic loci such as HLA and FOXP3 have also been shown to include regions that, when epigenetically modified, contribute to the appearance of food allergy.

Aim: To investigate the genetic, environmental and epigenetic factors that influence the development of food allergy in children. More specifically, the levels of vitamin D were measured in food allergic children and in the control group. The association of VDR polymorphisms ApaI, TaqI, BsmI and FokI with food allergy was also tested. Finally, the methylation status of specific genetic loci such as FOXP3 and HLA, which may predispose to the occurrence of food allergy in childhood, it was studied.

Materials and Methods: This is a case-control study that included 200 children, aged 6 months to 15 years, 90 of whom were food allergic and 110 healthy children age and sex matched. Food allergy was diagnosed by skin prick tests, measurement of specific and total IgE and an oral food challenge. At the same time, 25(OH)D levels were measured. DNA isolation from whole blood was also performed to determine VDR polymorphisms. In 104 of the 200 children, pyrosequencing was performed to determine the methylation status of HLA and FOXP3. In addition, a complete childrens' history and a structured questionnaire was completed by the parents with data regarding the family history.

Results: The two groups did not differ in weight, height or age. Significant differences were observed in Vitamin D values, where children with food allergy had a higher rate of vitamin D deficiency ($p = 0.003$) compared to the control group. At the same time, food allergic children had significantly lower sun exposure ($p = 0.003$) compared to controls. Differences were also noticed in the percentage ($p = 0.019$) and the duration ($p = 0.001$) of breastfeeding. Food allergic children appear to have received breastfeeding for a longer time period than controls. The two groups differed also in the family history of atopy ($p = 0.013$). Allergic children had a higher percentage of family history of atopy compared to healthy children. Regarding VDR polymorphisms, no differences in the frequencies of the 4 genotypes were observed between the two groups. However, the A allele of the ApaI polymorphism was more frequent in food allergic children than in the control group ($p = 0.043$). In addition, a significant difference was observed in the A / B / F / T haplotype ($p = 0.047$), which occurred more frequently in patients

than in controls. The methylation profile along the FOXP3 TSDR region and the CpG73 of HLA-DQB1 had a uniform distribution between the two groups. However the HLA-G promoter region showed a tendency to hypomethylation with some of the CG sites being significantly hypomethylated in food allergic children. It is worth noting that the rs1233333 polymorphism had a protective role against DNA methylation.

Conclusion: Children with food allergies have significantly lower vitamin D levels compared to controls. At the same time, these children are breastfed for a longer time period. Food allergic children have more frequent a family history of atopy, which predisposes them to the development of allergic disease. Regarding VDR polymorphisms, it has been shown that children with food allergy are more likely to inherit the A allele of the Apal polymorphism, a finding that supports the genetic predisposition of this disease. In addition, different methylation profiles in specific genetic loci such as HLA-G confirm the coexistence of epigenetic regulation in the occurrence of food allergy. This study is the first to study the 4 polymorphisms of VDR in children with food allergies. The above findings confirm the multifactorial nature of the disease and can serve as both biomarkers and prognostic factors in clinical practice.

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *The American journal of clinical nutrition*. 1994;60(4):619-30.
2. MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science (New York, NY)*. 1982;216(4549):1001-3.
3. Holick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D3 in the skin of poikilothermic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(8):3124-6.
4. Kumar R. Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Physiological reviews*. 1984;64(2):478-504.
5. Dueland S, Pedersen JI, Helgerud P, Drevon CA. Transport of vitamin D3 from rat intestine. Evidence for transfer of vitamin D3 from chylomicrons to alpha-globulins. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(1):146-50.
6. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D3. *Biochemistry*. 1968;7(10):3317-22.
7. Ponchon G, DeLuca HF. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. *The Journal of clinical investigation*. 1969;48(7):1273-9.
8. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(12):664-73.
9. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):582s-6s.
10. Lawson DE, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature*. 1971;230(5291):228-30.
11. Norman AW, Myrtle JF, Midgett RJ, Nowicki HG, Williams V, Popják G. 1,25-dihydroxycholecalciferol: identification of the proposed active form of vitamin D3 in the intestine. *Science (New York, NY)*. 1971;173(3991):51-4.
12. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Suda T, Cousins RJ. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry*. 1971;10(14):2799-804.
13. Levine BS, Singer FR, Bryce GF, Mallon JP, Miller ON, Coburn JW. Pharmacokinetics and biologic effects of calcitriol in normal humans. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1985;105(2):239-46.
14. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(6):2552-5.
15. Weber F. Absorption mechanisms for fat-soluble vitamins and the effect of other food constituents. *Progress in clinical and biological research*. 1981;77:119-35.
16. Thompson GR, Lewis B, Booth CC. Absorption of vitamin D3-3H in control subjects and patients with intestinal malabsorption. *The Journal of clinical investigation*. 1966;45(1):94-102.
17. Blomstrand R, Forsgren L. Intestinal absorption and esterification of vitamin D3-1,2-3H in man. *Acta chemica Scandinavica*. 1967;21(6):1662-3.
18. Compston JE, Merrett AL, Hammett FG, Magill P. Comparison of the appearance of radiolabelled vitamin D3 and 25-hydroxy-vitamin D3 in the chylomicron fraction of plasma after oral administration in man. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1981;60(2):241-3.
19. Johnson JL, Mistry VV, Vukovich MD, Hogie-Lorenzen T, Hollis BW, Specker BL. Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. *Journal of dairy science*. 2005;88(7):2295-301.

20. Mulligan GB, Licata A. Taking vitamin D with the largest meal improves absorption and results in higher serum levels of 25-hydroxyvitamin D. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(4):928-30.
21. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1971;50(3):679-87.
22. Liel Y, Edwards J, Shary J, Spicer KM, Gordon L, Bell NH. The effects of race and body habitus on bone mineral density of the radius, hip, and spine in premenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1988;66(6):1247-50.
23. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(3):690-3.
24. Blum M, Dallal GE, Dawson-Hughes B. Body size and serum 25 hydroxy vitamin D response to oral supplements in healthy older adults. *Journal of the American College of Nutrition*. 2008;27(2):274-9.
25. Riedt CS, Cifuentes M, Stahl T, Chowdhury HA, Schlussek Y, Shapses SA. Overweight postmenopausal women lose bone with moderate weight reduction and 1 g/day calcium intake. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(3):455-63.
26. Tzotzas T, Papadopoulou FG, Tziomalos K, Karras S, Gastaris K, Perros P, et al. Rising serum 25-hydroxy-vitamin D levels after weight loss in obese women correlate with improvement in insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(9):4251-7.
27. Zittermann A, Frisch S, Berthold HK, Götting C, Kuhn J, Kleesiek K, et al. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;89(5):1321-7.
28. DeLuca HF. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Federation proceedings*. 1974;33(11):2211-9.
29. Vieth R. The mechanisms of vitamin D toxicity. *Bone and mineral*. 1990;11(3):267-72.
30. Fleet JC, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith KB, McCreedy R, et al. Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice. *The Journal of nutrition*. 2008;138(6):1114-20.
31. DeLuca HF. The transformation of a vitamin into a hormone: the vitamin D story. *Harvey lectures*. 1979;75:333-79.
32. Garabedian M, Holick MF, DeLuca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1673-6.
33. Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006;92(1):4-8.
34. Sutton RA, Wong NL, Dirks JH. Effects of parathyroid hormone on sodium and calcium transport in the dog nephron. *Clinical science and molecular medicine*. 1976;51(4):345-51.
35. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(2):507-13.
36. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ. Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74(6):2136-43.
37. Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM. Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1986;78(5):1296-301.
38. Liu N, Nguyen L, Chun RF, Lagishetty V, Ren S, Wu S, et al. Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation. *Endocrinology*. 2008;149(10):4799-808.
39. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological reviews*. 1998;78(4):1193-231.

40. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2001;2(2):203-16.
41. Christiansen C, Rodbro P, Munck O. Actions of vitamins D2 and D3 and 25-OHD3 in anticonvulsant osteomalacia. *British medical journal*. 1975;2(5967):363-5.
42. Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *The American journal of clinical nutrition*. 1998;68(4):854-8.
43. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(11):5387-91.
44. Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(5):1548-54.
45. Roborgh JR, de MT. The hypercalcemic activity of dihydrotachysterol-2 and dihydrotachysterol-3 and of the vitamins D2 and D3 after intravenous injection of the aqueous preparations. 2. Comparative experiments on rats. *Biochemical pharmacology*. 1960;3:277-82.
46. Hunt RD, Garcia FG, Walsh RJ. A comparison of the toxicity of ergocalciferol and cholecalciferol in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *The Journal of nutrition*. 1972;102(8):975-86.
47. Sjöden G, Smith C, Lindgren U, DeLuca HF. 1 alpha-Hydroxyvitamin D2 is less toxic than 1 alpha-hydroxyvitamin D3 in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1985;178(3):432-6.
48. Jones G, Schnoes HK, DeLuca HF. Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D2. *Biochemistry*. 1975;14(6):1250-6.
49. Jones G, Rosenthal A, Segev D, Mazur Y, Frolow F, Halfon Y, et al. Isolation and identification of 24,25-dihydroxyvitamin D2 using the perfused rat kidney. *Biochemistry*. 1979;18(6):1094-11.
50. Suda T, DeLuca HF, Schnoes HK, Blunt JW. The isolation and identification of 25-hydroxyergocalciferol. *Biochemistry*. 1969;8(9):3515-20.
51. Hay AW, Watson G. The binding of 25-hydroxycholecalciferol and 25-hydroxyergocalciferol to receptor proteins in a New World and an Old World primate. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. 1977;56(2):131-4.
52. Jones G, Byrnes B, Palma F, Segev D, Mazur Y. Displacement potency of vitamin D2 analogs in competitive protein-binding assays for 25-hydroxyvitamin D3, 24,25-dihydroxyvitamin D3, and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1980;50(4):773-5.
53. Jones G, Schnoes HK, Levan L, DeLuca HF. Isolation and identification of 24-hydroxyvitamin D2 and 24,25-dihydroxyvitamin D2. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1980;202(2):450-7.
54. Reinhardt TA, Ramberg CF, Horst RL. Comparison of receptor binding, biological activity, and in vivo tracer kinetics for 1,25-dihydroxyvitamin D3, 1,25-dihydroxyvitamin D2, and its 24 epimer. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1989;273(1):64-71.
55. Fraser D, Kooh SW, Kind HP, Holick MF, Tanaka Y, DeLuca HF. Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D. *The New England journal of medicine*. 1973;289(16):817-22.
56. Zella LA, Shevde NK, Hollis BW, Cooke NE, Pike JW. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology*. 2008;149(7):3656-67.
57. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lamas DA, Sansom DM, Liu P, et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103(3-5):316-21.

58. Martinez ME, Del Campo MT, Sánchez-Cabezudo MJ, Balaguer G, Rodriguez-Carmona A, Selgas R. Effect of oral calcidiol treatment on its serum levels and peritoneal losses. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 1995;15(1):65-70.
59. Diesing D, Cordes T, Fischer D, Diedrich K, Friedrich M. Vitamin D--metabolism in the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer research*. 2006;26(4a):2755-9.
60. Zinser GM, Welsh J. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2004;18(9):2208-23.
61. Bises G, Kállay E, Weiland T, Wrba F, Wenzl E, Bonner E, et al. 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2004;52(7):985-9.
62. Adams JS, Modlin RL, Diz MM, Barnes PF. Potentiation of the macrophage 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylation reaction by human tuberculous pleural effusion fluid. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1989;69(2):457-60.
63. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(14):2579-85.
64. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (New York, NY)*. 2006;311(5768):1770-3.
65. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(2):353-61.
66. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(1):145-53.
67. Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(4):797-808.
68. Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC. 1,25 dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC genomics*. 2010;11:26.
69. Jiang F, Bao J, Li P, Nicosia SV, Bai W. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the down-regulation of telomerase. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(51):53213-21.
70. Kumagai T, Shih LY, Hughes SV, Desmond JC, O'Kelly J, Hewison M, et al. 19-Nor-1,25(OH)2D2 (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia. *Cancer research*. 2005;65(6):2488-97.
71. Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W. p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(24):25260-7.
72. Sundaram S, Chaudhry M, Reardon D, Gupta M, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog EB 1089 enhances the antiproliferative and apoptotic effects of adriamycin in MCF-7 breast tumor cells. *Breast cancer research and treatment*. 2000;63(1):1-10.
73. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation research*. 2000;87(3):214-20.
74. Bao BY, Yao J, Lee YF. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2006;27(9):1883-93.

75. Moreno J, Krishnan AV, Swami S, Nonn L, Peehl DM, Feldman D. Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. *Cancer research*. 2005;65(17):7917-25.
76. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76(4):1536-8.
77. Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet (London, England)*. 1989;2(8671):1104-5.
78. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet (London, England)*. 1982;1(8263):74-6.
79. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1987;64(6):1165-8.
80. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):296-307.
81. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1988;67(2):373-8.
82. Tangpricha V, Koutkia P, Rieke SM, Chen TC, Perez AA, Holick MF. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;77(6):1478-83.
83. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):362-71.
84. Tangpricha V, Turner A, Spina C, Decastro S, Chen TC, Holick MF. Tanning is associated with optimal vitamin D status (serum 25-hydroxyvitamin D concentration) and higher bone mineral density. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6):1645-9.
85. Chuck A, Todd J, Diffey B. Subliminal ultraviolet-B irradiation for the prevention of vitamin D deficiency in the elderly: a feasibility study. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2001;17(4):168-71.
86. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(2):394-415.
87. Pettifor JM. Screening for nutritional rickets in a community. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016;164:139-44.
88. Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*. 2008;122(5):1142-52.
89. Ward LM, Gaboury I, Ladhani M, Zlotkin S. Vitamin D-deficiency rickets among children in Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2007;177(2):161-6.
90. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia*. 1999;42(1):51-4.
91. Atas E, Karademir F, Ersen A, Meral C, Aydinöz S, Suleymanoglu S, et al. Comparison between daily supplementation doses of 200 versus 400 IU of vitamin D in infants. *European journal of pediatrics*. 2013;172(8):1039-42.
92. Siafarikas A, Piazena H, Feister U, Bulsara MK, Meffert H, Hesse V. Randomised controlled trial analysing supplementation with 250 versus 500 units of vitamin D3, sun exposure and surrounding factors in breastfed infants. *Archives of disease in childhood*. 2011;96(1):91-5.
93. Ziegler EE, Nelson SE, Jeter JM. Vitamin D supplementation of breastfed infants: a randomized dose-response trial. *Pediatric research*. 2014;76(2):177-83.

94. Holmlund-Suila E, Viljakainen H, Hytinantti T, Lamberg-Allardt C, Andersson S, Mäkitie O. High-dose vitamin d intervention in infants--effects on vitamin d status, calcium homeostasis, and bone strength. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(11):4139-47.
95. Institute of Medicine Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D, Calcium. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences.; 2011.
96. Paxton GA, Teale GR, Nowson CA, Mason RS, McGrath JJ, Thompson MJ, et al. Vitamin D and health in pregnancy, infants, children and adolescents in Australia and New Zealand: a position statement. *The Medical journal of Australia*. 2013;198(3):142-3.
97. Vidailhet M, Mallet E, Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP, et al. Vitamin D: still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2012;19(3):316-28.
98. Aksnes L, Aarskog D. Plasma concentrations of vitamin D metabolites in puberty: effect of sexual maturation and implications for growth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1982;55(1):94-101.
99. Wastney ME, Ng J, Smith D, Martin BR, Peacock M, Weaver CM. Differences in calcium kinetics between adolescent girls and young women. *The American journal of physiology*. 1996;271(1 Pt 2):R208-16.
100. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Gunn SK, Gundberg CM, Carpenter TO. Relationships among vitamin D levels, parathyroid hormone, and calcium absorption in young adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(10):5576-81.
101. Cranney A, Horsley T, O'Donnell S, Weiler H, Puil L, Ooi D, et al. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evidence report/technology assessment*. 2007(158):1-235.
102. Chung M, Balk EM, Brendel M, Ip S, Lau J, Lee J, et al. Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes. *Evidence report/technology assessment*. 2009(183):1-420.
103. van Dijk CE, de Boer MR, Koppes LL, Roos JC, Lips P, Twisk JW. Positive association between the course of vitamin D intake and bone mineral density at 36 years in men. *Bone*. 2009;44(3):437-41.
104. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *Guideline: Vitamin D Supplementation in Pregnant Women*. Geneva: World Health Organization Copyright © World Health Organization 2012.; 2012.
105. Holick MF. The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *The Journal of nutrition*. 2005;135(11):2726s-7s.
106. Cooke NE, David EV. Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha fetoprotein gene family. *The Journal of clinical investigation*. 1985;76(6):2420-4.
107. Kawakami M, Blum CB, Ramakrishnan R, Dell RB, Goodman DS. Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and its metabolites in normal human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1981;53(6):1110-6.
108. Braun A, Kofler A, Morawietz S, Cleve H. Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochimica et biophysica acta*. 1993;1216(3):385-94.
109. Cooke NE, McLeod JF, Wang XK, Ray K. Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1991;40(4-6):787-93.
110. Aarskog D, Aksnes L, Markestad T, Rødland O. Effect of estrogen on vitamin D metabolism in tall girls. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(6):1155-8.

111. Dick IM, Prince RL, Kelly JJ, Ho KK. Oestrogen effects on calcitriol levels in post-menopausal women: a comparison of oral versus transdermal administration. *Clinical endocrinology*. 1995;43(2):219-24.
112. Haddad JG, Fraser DR, Lawson DE. Vitamin D plasma binding protein. Turnover and fate in the rabbit. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67(5):1550-60.
113. Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocrine reviews*. 1989;10(3):294-307.
114. Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentration. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67(3):589-96.
115. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Human genetics*. 1993;92(2):183-8.
116. Braun A, Bichlmaier R, Cleve H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. *Human genetics*. 1992;89(4):401-6.
117. Kamboh MI, Ferrell RE. Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations. *Human genetics*. 1986;72(4):281-93.
118. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(6):2076-80.
119. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocrine reviews*. 1989;10(3):232-74.
120. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocrine reviews*. 1990;11(1):5-46.
121. Bikle DD, Pillai S, Gee E, Hincenbergs M. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferon-gamma. *Endocrinology*. 1989;124(2):655-60.
122. van Hoof HJ, de Sévaux RG, van Baelen H, Swinkels LM, Klipping C, Ross HA, et al. Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *European journal of endocrinology*. 2001;144(4):391-6.
123. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcified tissue international*. 2005;77(1):15-22.
124. Lauridsen AL, Vestergaard P, Nexø E. Mean serum concentration of vitamin D-binding protein (Gc globulin) is related to the Gc phenotype in women. *Clinical chemistry*. 2001;47(4):753-6.
125. Rejnmark L, Lauridsen AL, Vestergaard P, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L. Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism. *European journal of endocrinology*. 2002;146(5):635-42.
126. Bouillon R, van Baelen H, de Moor P. The measurement of the vitamin D-binding protein in human serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1977;45(2):225-31.
127. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1997;11(8):1165-79.
128. Uitterlinden AG, Fang Y, Bergink AP, van Meurs JB, van Leeuwen HP, Pols HA. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;197(1-2):15-21.
129. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;371(1-2):1-12.
130. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56.

131. Tizaoui K, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Lung*. 2014;192(6):955-65.
132. Despotovic M, Jevtovic Stoimenov T, Stankovic I, Basic J, Pavlovic D. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Serbian Patients With Bronchial Asthma: A Case-Control Study. *Journal of cellular biochemistry*. 2017;118(11):3986-92.
133. Einisman H, Reyes ML, Angulo J, Cerda J, López-Lastra M, Castro-Rodriguez JA. Vitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphisms in asthmatic children: a case-control study. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(6):545-50.
134. Iordanidou M, Paraskakis E, Giannakopoulou E, Tavridou A, Gentile G, Borro M, et al. Vitamin D receptor Apal a allele is associated with better childhood asthma control and improvement in ability for daily activities. *Omics : a journal of integrative biology*. 2014;18(11):673-81.
135. Papadopoulou A, Kouis P, Middleton N, Kolokotroni O, Karpathios T, Nicolaidou P, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents: a case-control study. *Multidisciplinary respiratory medicine*. 2015;10(1):26.
136. Zhang Y, Guo Y, Ma J, Lu XZ, Luo XQ. [Association of FokI rs2228570 and Tmprss6 rs855791 polymorphisms with cow's milk protein allergy in children]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*. 2018;20(8):641-6.
137. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007;357(3):266-81.
138. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;120(2-3):86-95.
139. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Vitamin D, respiratory infections, and asthma. *Current allergy and asthma reports*. 2009;9(1):81-7.
140. Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(4):2227-31.
141. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):803-11.
142. Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;294(1):G208-16.
143. Gruskay FL, Cooke RE. The gastrointestinal absorption of unaltered protein in normal infants and in infants recovering from diarrhea. *Pediatrics*. 1955;16(6):763-9.
144. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(1):43-52.e7.
145. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *European journal of immunology*. 2008;38(8):2210-8.
146. Hewison M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;321(2):103-11.
147. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(9):685-98.
148. von Essen MR, Kongsbak M, Schjerling P, Olgaard K, Odum N, Geisler C. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nature immunology*. 2010;11(4):344-9.

149. Rochat MK, Ege MJ, Plabst D, Steinle J, Bitter S, Braun-Fahrländer C, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy increases gene expression of ILT3 and ILT4 in cord blood. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(5):786-94.
150. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):291-307; quiz 8.
151. Anvari S, Miller J, Yeh CY, Davis CM. IgE-Mediated Food Allergy. 2019;57(2):244-60.
152. Morita H, Nomura I, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. Gastrointestinal food allergy in infants. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2013;62(3):297-307.
153. Tan JA, Smith WB. Non-IgE-mediated gastrointestinal food hypersensitivity syndrome in adults. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2014;2(3):355-7.e1.
154. Turnbull JL, Adams HN, Gorard DA. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;41(1):3-25.
155. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(6 Suppl):S1-58.
156. Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):668-76.e1-2.
157. Peters RL, Koplin JJ, Gurrin LC, Dharmage SC, Wake M, Ponsonby AL, et al. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(1):145-53.e8.
158. Venter C, Maslin K, Patil V, Kurukulaaratchy R, Grundy J, Glasbey G, et al. The prevalence, natural history and time trends of peanut allergy over the first 10 years of life in two cohorts born in the same geographical location 12 years apart. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2016;27(8):804-11.
159. Xepapadaki P, Fiocchi A, Grabenhenrich L, Roberts G, Grimshaw KE, Fiandor A, et al. Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life-the EuroPrevall birth cohort study. *Allergy*. 2016;71(3):350-7.
160. Martin PE, Eckert JK, Koplin JJ, Lowe AJ, Gurrin LC, Dharmage SC, et al. Which infants with eczema are at risk of food allergy? Results from a population-based cohort. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(1):255-64.
161. Grimshaw KEC, Roberts G, Selby A, Reich A, Butiene I, Clausen M, et al. Risk Factors for Hen's Egg Allergy in Europe: EuroPrevall Birth Cohort. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2020;8(4):1341-8.e5.
162. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1331-6.
163. Leung R, Ho A, Chan J, Choy D, Lai CK. Royal jelly consumption and hypersensitivity in the community. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1997;27(3):333-6.
164. Rancé F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy*. 2000;55(5):496-500.
165. Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, et al. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;122(5):984-91.
166. Sicherer SH, Furlong TJ, Maes HH, Desnick RJ, Sampson HA, Gelb BD. Genetics of peanut allergy: a twin study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;106(1 Pt 1):53-6.

167. Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(6):1203-7.
168. Emmett SE, Angus FJ, Fry JS, Lee PN. Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members. *Allergy*. 1999;54(4):380-5.
169. Vassallo MF, Banerji A, Rudders SA, Clark S, Mullins RJ, Camargo CA, Jr. Season of birth and food allergy in children. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010;104(4):307-13.
170. Nwaru BI, Ahonen S, Kaila M, Erkkola M, Haapala AM, Kronberg-Kippilä C, et al. Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 yrs of age: a prospective cohort study. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2010;21(1 Pt 1):29-37.
171. Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;313(7056):518-21.
172. Crespo JF, James JM, Fernandez-Rodriguez C, Rodriguez J. Food allergy: nuts and tree nuts. *The British journal of nutrition*. 2006;96 Suppl 2:S95-102.
173. Howell WM, Turner SJ, Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: evidence from a family-based and case-control study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1998;28(2):156-62.
174. Sénéchal H, Geny S, Desvaux FX, Busson M, Mayer C, Aron Y, et al. Genetics and specific immune response in allergy to birch pollen and food: evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II allele HLA-DR7. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;104(2 Pt 1):395-401.
175. Hand S, Darke C, Thompson J, Stingl C, Rolf S, Jones KP, et al. Human leucocyte antigen polymorphisms in nut-allergic patients in South Wales. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(5):720-4.
176. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):661-7.
177. Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(2):438-44.
178. Campos E, Shimojo N, Inoue Y, Arima T, Suzuki S, Tomiita M, et al. No association of polymorphisms in the 5' region of the CD14 gene and food allergy in a Japanese population. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2007;56(1):23-7.
179. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996;380(6575):627-30.
180. Amoli MM, Hand S, Hajeer AH, Jones KP, Rolf S, Sting C, et al. Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy. *Genes and immunity*. 2002;3(4):220-4.
181. Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, et al. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2006;17(8):583-90.
182. Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature genetics*. 2000;25(2):141-2.

183. Kusunoki T, Okafuji I, Yoshioka T, Saito M, Nishikomori R, Heike T, et al. SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(3):636-8.
184. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):169-82.
185. Liu X, Beatty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, et al. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(3):489-95.
186. Yilmaz V, Yentür SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*. 2005;30(4):188-94.
187. Campos Alberto EJ, Shimojo N, Suzuki Y, Mashimo Y, Arima T, Matsuura T, et al. IL-10 gene polymorphism, but not TGF-beta1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2008;19(8):716-21.
188. Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25, and thymic stromal lymphopoietin) and allergic inflammation. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2015;15(1):98-103.
189. Blázquez AB, Berin MC. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(7):4441-50.
190. Sehra S, Yao W, Nguyen ET, Glosson-Byers NL, Akhtar N, Zhou B, et al. TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(2):433-40.e1.
191. Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, et al. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2016;27(3):276-82.
192. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008;63(11):1455-63.
193. Høst A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2002;13(s15):23-8.
194. Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA. The natural history of egg allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(6):1413-7.
195. Fleischer DM, Conover-Walker MK, Christie L, Burks AW, Wood RA. The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(1):183-9.
196. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(12):1679-88.
197. Eigenmann PA, Asigbetse KE, Frossard CP. Avirulent *Salmonella typhimurium* strains prevent food allergy in mice. *Clinical and experimental immunology*. 2008;151(3):546-53.
198. Järvinen KM, Beyer K, Vila L, Bardina L, Mishoe M, Sampson HA. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *Allergy*. 2007;62(7):758-65.
199. Vila L, Beyer K, Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(10):1599-606.

200. Pomés A. Relevant B cell epitopes in allergic disease. *International archives of allergy and immunology*. 2010;152(1):1-11.
201. Savage J, Johns CB. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2015;35(1):45-59.
202. Boyce JA, Assa'a A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2011;27(2):253-67.
203. Caubet JC, Nowak-Węgrzyn A, Moshier E, Godbold J, Wang J, Sampson HA. Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(1):222-4.e1-4.
204. Palosuo K, Kukkonen AK, Pelkonen AS, Mäkelä MJ. Gal d 1-specific IgE predicts allergy to heated egg in Finnish children. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2018;29(6):637-43.
205. Schoemaker AA, Sprickelman AB, Grimshaw KE. Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children--EuroPrevall birth cohort. 2015;70(8):963-72.
206. Peters RL, Dharmage SC, Gurrin LC, Koplin JJ, Ponsonby AL, Lowe AJ, et al. The natural history and clinical predictors of egg allergy in the first 2 years of life: a prospective, population-based cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):485-91.
207. Wilson JM, Platts-Mills TAE. Red meat allergy in children and adults. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2019;19(3):229-35.
208. Gonzales-González VA, Díaz AM, Fernández K, Rivera MF. Prevalence of food allergens sensitization and food allergies in a group of allergic Honduran children. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;14:23.
209. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008-25.
210. Martelli A, De Chiara A, Corvo M, Restani P, Fiocchi A. Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2002;89(6 Suppl 1):38-43.
211. Drouet M, Boutet S, Lauret MG, Chène J, Bonneau JC, Le Sellin J, et al. [The pork-cat syndrome or crossed allergy between pork meat and cat epithelia (1)]. *Allergie et immunologie*. 1994;26(5):166-8, 71-2.
212. Savi E, Rossi A, Incorvaia C. Cat-pork syndrome: a case report with a three years follow-up. *European annals of allergy and clinical immunology*. 2006;38(10):366-8.
213. Guillier A, Fauconneau A, De Barruel F, Guez S, Doutre MS. Allergic hypersensitivity to red meat induced by tick bites: a French case report. *European journal of dermatology : EJD*. 2015;25(3):277.
214. Kennedy JL, Stallings AP, Platts-Mills TA, Oliveira WM, Workman L, James HR, et al. Galactose- α -1,3-galactose and delayed anaphylaxis, angioedema, and urticaria in children. *Pediatrics*. 2013;131(5):e1545-52.
215. Sharp MF, Lopata AL. Fish allergy: in review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(3):258-71.
216. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, et al. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(5):1210-8.e4.
217. Longo G, Berti I, Burks AW, Krauss B, Barbi E. IgE-mediated food allergy in children. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9905):1656-64.

218. Nilsson N, Nilsson C, Ekoff H, Wieser-Pahr S, Borres MP, Valenta R, et al. Grass-Allergic Children Frequently Show Asymptomatic Low-Level IgE Co-Sensitization and Cross-Reactivity to Wheat. *International archives of allergy and immunology*. 2018;177(2):135-44.
219. Nilsson N, Sjölander S, Baar A, Berthold M, Pahr S, Vrtala S, et al. Wheat allergy in children evaluated with challenge and IgE antibodies to wheat components. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(2):119-25.
220. Cianferoni A. Wheat allergy: diagnosis and management. *Journal of asthma and allergy*. 2016;9:13-25.
221. Du Toit G, Sayre PH, Roberts G, Sever ML, Lawson K, Bahnson HT, et al. Effect of Avoidance on Peanut Allergy after Early Peanut Consumption. *The New England journal of medicine*. 2016;374(15):1435-43.
222. Abrams EM, Chan ES, Sicherer SH. Should Younger Siblings of Peanut Allergic Children Be Screened for Peanut Allergy? *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2018;6(2):414-8.
223. Nilsson C, Berthold M, Mascialino B, Orme M, Sjölander S, Hamilton R. Allergen components in diagnosing childhood hazelnut allergy: Systematic literature review and meta-analysis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2020;31(2):186-96.
224. Maruyama N, Nakagawa T, Ito K, Cabanos C, Borres MP, Movérare R, et al. Measurement of specific IgE antibodies to Ses i 1 improves the diagnosis of sesame allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2016;46(1):163-71.
225. Asarnoj A, Hamsten C, Lupinek C, Melén E, Andersson N, Anto JM, et al. Prediction of peanut allergy in adolescence by early childhood storage protein-specific IgE signatures: The BAMSE population-based birth cohort. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(2):587-90.e7.
226. Liu M, Burks AW, Green TD. Tree nut allergy: risk factors for development, mitigation of reaction risk and current efforts in desensitization. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(5):673-9.
227. Smeekens JM, Bagley K, Kulis M. Tree nut allergies: Allergen homology, cross-reactivity, and implications for therapy. 2018;48(7):762-72.
228. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(6):1105-18.
229. Ho MH, Wong WH, Chang C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;46(3):225-40.
230. Sharma HP, Bansil S, Uygungil B. Signs and Symptoms of Food Allergy and Food-Induced Anaphylaxis. *Pediatric clinics of North America*. 2015;62(6):1377-92.
231. Sampson HA, Muñoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(2):391-7.
232. Upton J, Nowak-Wegrzyn A. The Impact of Baked Egg and Baked Milk Diets on IgE- and Non-IgE-Mediated Allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2018;55(2):118-38.
233. Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2008;100(3 Suppl 3):S1-148.

234. Peters RL, Gurrin LC, Allen KJ. The predictive value of skin prick testing for challenge-proven food allergy: a systematic review. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2012;23(4):347-52.
235. Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(11):1540-6.
236. Duncan SE, Annunziato RA. Barriers to self-management behaviors in college students with food allergies. *Journal of American college health : J of ACH*. 2018;66(5):331-9.
237. Hobbs CB, Skinner AC, Burks AW, Vickery BP. Food allergies affect growth in children. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2015;3(1):133-4.e1.
238. Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *Journal of the American Dietetic Association*. 2002;102(11):1648-51.
239. Sova C, Feuling MB, Baumler M, Gleason L, Tam JS, Zafra H, et al. Systematic review of nutrient intake and growth in children with multiple IgE-mediated food allergies. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2013;28(6):669-75.
240. Klemans RJ, van Os-Medendorp H, Blankestijn M, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, Knulst AC. Diagnostic accuracy of specific IgE to components in diagnosing peanut allergy: a systematic review. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(4):720-30.
241. Flores Kim J, McCleary N. Diagnostic accuracy, risk assessment, and cost-effectiveness of component-resolved diagnostics for food allergy: A systematic review. 2018;73(8):1609-21.
242. Santos AF, Shreffler WG. Road map for the clinical application of the basophil activation test in food allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2017;47(9):1115-24.
243. Elizur A, Appel MY, Nachshon L. NUT Co Reactivity - ACquiring Knowledge for Elimination Recommendations (NUT CRACKER) study. 2018;73(3):593-601.
244. Santos AF, Couto-Francisco N, Bécares N, Kwok M, Bahnson HT, Lack G. A novel human mast cell activation test for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;142(2):689-91.e9.
245. Song Y, Wang J, Leung N, Wang LX, Lisann L, Sicherer SH, et al. Correlations between basophil activation, allergen-specific IgE with outcome and severity of oral food challenges. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2015;114(4):319-26.
246. Santos AF, Du Toit G, O'Rourke C, Becares N, Couto-Francisco N, Radulovic S, et al. Biomarkers of severity and threshold of allergic reactions during oral peanut challenges. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2020;146(2):344-55.
247. Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS. Work Group report: oral food challenge testing. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(6 Suppl):S365-83.
248. Sampson HA, Aceves S, Bock SA, James J, Jones S, Lang D, et al. Food allergy: a practice parameter update-2014. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(5):1016-25.e43.
249. Sicherer SH, Simons FE. Self-injectable epinephrine for first-aid management of anaphylaxis. *Pediatrics*. 2007;119(3):638-46.
250. Simons FE, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(6):1139-50.e4.
251. Noimark L, Cox HE. Nutritional problems related to food allergy in childhood. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2008;19(2):188-95.

252. Groetch M, Nowak-Węgrzyn A. Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(3):212-21.
253. Dreborg S. When should adrenaline be given and by whom? *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(1):97-8.
254. Brown J, Tuthill D, Alfaham M, Spear E. A randomized maternal evaluation of epinephrine autoinjection devices. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(2):173-7.
255. Fisher HR, du Toit G, Lack G. Specific oral tolerance induction in food allergic children: is oral desensitisation more effective than allergen avoidance?: a meta-analysis of published RCTs. *Archives of disease in childhood*. 2011;96(3):259-64.
256. Sánchez-García S, Rodríguez del Río P, Escudero C, García-Fernández C, Ramirez A, Ibáñez MD. Efficacy of oral immunotherapy protocol for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2012;14(1):43-7.
257. Anagnostou K, Clark A. Peanut immunotherapy. *Clinical and translational allergy*. 2014;4:30.
258. Nozawa A, Okamoto Y, Movérare R, Borres MP, Kurihara K. Monitoring Ara h 1, 2 and 3-sIgE and sIgG4 antibodies in peanut allergic children receiving oral rush immunotherapy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2014;25(4):323-8.
259. Rodríguez del Río P, Díaz-Perales A, Sanchez-García S, Escudero C, do Santos P, Catarino M, et al. Oral immunotherapy in children with IgE-mediated wheat allergy: outcome and molecular changes. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2014;24(4):240-8.
260. Zapatero L, Alonso E, Fuentes V, Martínez MI. Oral desensitization in children with cow's milk allergy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2008;18(5):389-96.
261. Pajno GB, Caminiti L, Salzano G, Crisafulli G, Aversa T, Messina MF, et al. Comparison between two maintenance feeding regimens after successful cow's milk oral desensitization. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2013;24(4):376-81.
262. Sampson HA, Shreffler WG, Yang WH, Sussman GL, Brown-Whitehorn TF, Nadeau KC, et al. Effect of Varying Doses of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Exposure Among Patients With Peanut Sensitivity: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2017;318(18):1798-809.
263. Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Gorelik M, Schroeder J, Hamilton RG, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1275-82.e1-6.
264. Sicherer SH, Wood RA, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, et al. The natural history of egg allergy in an observational cohort. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):492-9.
265. Peters RL, Allen KJ, Dharmage SC, Koplin JJ, Dang T, Tilbrook KP, et al. Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;135(5):1257-66.e1-2.
266. Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Godbold J, et al. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(2):473-80.e1.
267. Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, Noone S, Moshier EL, Sampson HA. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(1):125-31.e2.

268. Nowak-Węgrzyn A, Albin S. Oral immunotherapy for food allergy: mechanisms and role in management. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(2):368-83.
269. de Silva D, Halken S. Preventing food allergy in infancy and childhood: Systematic review of randomised controlled trials. 2020;31(7):813-26.
270. Tham EH, Shek LP, Van Bever HP, Vichyanond P, Ebisawa M, Wong GW, et al. Early introduction of allergenic foods for the prevention of food allergy from an Asian perspective-An Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory & Immunology (APAPARI) consensus statement. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2018;29(1):18-27.
271. Andersson NW, Hansen MV, Larsen AD, Hougaard KS, Kolstad HA, Schlünssen V. Prenatal maternal stress and atopic diseases in the child: a systematic review of observational human studies. *Allergy*. 2016;71(1):15-26.
272. Anacker C, O'Donnell KJ, Meaney MJ. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2014;16(3):321-33.
273. Hong X, Wang X. Early life precursors, epigenetics, and the development of food allergy. *Seminars in immunopathology*. 2012;34(5):655-69.
274. Hong X, Wang X. Epigenetics and development of food allergy (FA) in early childhood. *Current allergy and asthma reports*. 2014;14(9):460.
275. Angeloni A, Bogdanovic O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays in biochemistry*. 2019;63(6):707-15.
276. Minskaia E, Saraiva BC, Soares MMV, Azevedo RI, Ribeiro RM, Kumar SD, et al. Molecular Markers Distinguishing T Cell Subtypes With TSDR Strand-Bias Methylation. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2540.
277. Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(4):774-82.e5.
278. Hew KM, Walker AI, Kohli A, Garcia M, Syed A, McDonald-Hyman C, et al. Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(1):238-48.
279. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science (New York, NY)*. 1990;248(4952):220-3.
280. Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. 2014;2014:734068.
281. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. 2008;111(10):4862-70.
282. Pankratz S, Bittner S, Herrmann AM, Schuhmann MK, Ruck T, Meuth SG, et al. Human CD4+ HLA-G+ regulatory T cells are potent suppressors of graft-versus-host disease in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(8):3435-45.
283. Hong X, Hao K, Ladd-Acosta C, Hansen KD, Tsai HJ, Liu X, et al. Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children. *Nature communications*. 2015;6:6304.
284. Kostara M, Chondrou V, Sgourou A, Douros K, Tsaouri S. HLA Polymorphisms and Food Allergy Predisposition. *Journal of pediatric genetics*. 2020;9(2):77-86.
285. Kular L, Jagodic M. Epigenetic insights into multiple sclerosis disease progression. 2020;288(1):82-102.
286. Stamou P, Marioli D, Patmanidi AL, Sgourou A, Vittoraki A, Theofani E, et al. Simple in vitro generation of human leukocyte antigen-G-expressing T-regulatory cells through

- pharmacological hypomethylation for adoptive cellular immunotherapy against graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2017;19(4):521-30.
287. Polansky JK, Schreiber L, Thelemann C, Ludwig L, Krüger M, Baumgrass R, et al. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2010;88(10):1029-40.
 288. Fornes O, Castro-Mondragon JA, Khan A, van der Lee R, Zhang X, Richmond PA, et al. JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*. 2020;48(D1):D87-d92.
 289. Chondrou V, Markopoulos GS, Patrinos GP, Kouraklis-Symeonidis A, Symeonidis A, Papachatzopoulou A, et al. LRF/ZBTB7A conservation accentuates its potential as a therapeutic target for the hematopoietic disorders. *Gene*. 2020;760:145020.
 290. Pichler J, Gerstmayr M, Szépfalusi Z, Urbanek R, Peterlik M, Willheim M. 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatric research*. 2002;52(1):12-8.
 291. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Sweep FC, Joosten I, Netea MG, et al. Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164(1):72-9.
 292. Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFNgamma axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2006;83(7):1299-309.
 293. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):3-12; quiz 3.
 294. Noval Rivas M, Burton OT, Oettgen HC, Chatila T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;138(3):801-11.e9.
 295. Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby AL, Gurrin LC, Wake M, Vuillermin P, et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):1109-16, 16.e1-6.
 296. Koplin JJ, Suaini NH, Vuillermin P, Ellis JA, Panjari M, Ponsonby AL, et al. Polymorphisms affecting vitamin D-binding protein modify the relationship between serum vitamin D (25[OH]D3) and food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(2):500-6.e4.
 297. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(5):1195-202.
 298. Kannan S, Perzanowski MS, Ganguri HB, Acevedo-Garcia D, Acosta LM, Spatcher M, et al. Complex relationships between vitamin D and allergic sensitization among Puerto Rican 2-year-old children. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2018;120(1):84-9.
 299. Baek JH, Shin YH, Chung IH, Kim HJ, Yoo EG, Yoon JW, et al. The link between serum vitamin D level, sensitization to food allergens, and the severity of atopic dermatitis in infancy. *The Journal of pediatrics*. 2014;165(4):849-54.e1.
 300. Silva CM, Silva SAD, Antunes MMC, Silva G, Sarinho ESC, Brandt KG. Do infants with cow's milk protein allergy have inadequate levels of vitamin D? *Jornal de pediatria*. 2017;93(6):632-8.
 301. Ercan N, Bostanci İ B, Ozmen S, Tekindal MA. Is there an association between vitamin D levels and cow's milk protein allergy at infancy? *Archivos argentinos de pediatria*. 2019;117(5):306-13.

302. Willits EK, Wang Z, Jin J, Patel B, Motosue M, Bhagia A, et al. Vitamin D and food allergies in children: A systematic review and meta-analysis. *Allergy and asthma proceedings*. 2017;38(3):21-8.
303. Jenerowicz D, Silny W, Dańczak-Pazdrowska A, Polańska A, Osmola-Mańkowska A, Olek-Hrab K. Environmental factors and allergic diseases. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2012;19(3):475-81.
304. Kalach N, Bellaïche M, Elias-Billon I, Dupont C. Family history of atopy in infants with cow's milk protein allergy: A French population-based study. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*. 2019;26(4):226-31.
305. Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *The New England journal of medicine*. 2003;348(11):977-85.
306. Liu X, Zhang S, Tsai HJ, Hong X, Wang B, Fang Y, et al. Genetic and environmental contributions to allergen sensitization in a Chinese twin study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(7):991-8.
307. Matsumoto N, Yorifuji T, Nakamura K, Ikeda M, Tsukahara H, Doi H. Breastfeeding and risk of food allergy: A nationwide birth cohort in Japan. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2020;69(1):91-7.
308. Goldsmith AJ, Koplin JJ, Lowe AJ, Tang ML, Matheson MC, Robinson M, et al. Formula and breast feeding in infant food allergy: A population-based study. *Journal of paediatrics and child health*. 2016;52(4):377-84.
309. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2015;104(467):38-53.
310. Kiliç S, Silan F, Hız MM, Işık S, Öğretmen Z, Özdemir Ö. Vitamin D Receptor Gene BSMI, FOKI, APAI, and TAQI Polymorphisms and the Risk of Atopic Dermatitis. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2016;26(2):106-10.
311. Zhang L, Zhang S, He C, Wang X. VDR Gene Polymorphisms and Allergic Diseases: Evidence from a Meta-analysis. *Immunological investigations*. 2020;49(1-2):166-77.
312. Ou Y, Jiang X, Guan H. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Risk of Atopic Dermatitis in Chinese Han Population. *International journal of general medicine*. 2021;14:5301-12.
313. Leiter K, Franks K, Borland ML, Coleman L, Harris L, Le Souëf PN, et al. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with severity of wheezing illnesses and asthma exacerbations in children. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020;201:105692.
314. Petrus NCM, Henneman P, Venema A, Mul A, van Sinderen F, Haagmans M, et al. Cow's milk allergy in Dutch children: an epigenetic pilot survey. *Clinical and translational allergy*. 2016;6:16.
315. Bønnelykke K, Sparks R, Waage J, Milner JD. Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations. *Current opinion in immunology*. 2015;36:115-26.
316. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Pezzella V, Di Costanzo M, et al. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clinical epigenetics*. 2015;7(1):38.
317. Zhou X, Han X, Lyu SC, Bunning B, Kost L, Chang I, et al. Targeted DNA methylation profiling reveals epigenetic signatures in peanut allergy. *JCI insight*. 2021;6(6).
318. Brunst KJ, Leung YK, Ryan PH, Khurana Hershey GK, Levin L, Ji H, et al. Forkhead box protein 3 (FOXP3) hypermethylation is associated with diesel exhaust exposure and risk for childhood asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(2):592-4.e1-3.
319. Krogulska A, Polakowska E, Wąsowska-Królikowska K, Małachowska B, Młynarski W, Borowiec M. Decreased FOXP3 mRNA expression in children with atopic asthma and IgE-mediated food allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2015;115(5):415-21.

320. Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Aitoro R, D'Argenio V, Del Monaco V, et al. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow's milk allergy. *Clinical epigenetics*. 2016;8:86.
321. Keil T, Lau S, Roll S, Grüber C, Nickel R, Niggemann B, et al. Maternal smoking increases risk of allergic sensitization and wheezing only in children with allergic predisposition: longitudinal analysis from birth to 10 years. *Allergy*. 2009;64(3):445-51.
322. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
323. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature genetics*. 2012;44(3):291-6.
324. Martino DJ, Ashley S, Koplun J, Ellis J, Saffery R, Dharmage SC, et al. Genomewide association study of peanut allergy reproduces association with amino acid polymorphisms in HLA-DRB1. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2017;47(2):217-23.