

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

Β' ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

ΘΕΜΑ: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ
MICRORNAS ΜΕ ΤΙΣ ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΥΣ ΤΟΥ
ΕΝΤΕΡΟΥ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Δ. ΣΤΑΜΑΤΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

Αφιερώνω τη διατριβή μου στον πατέρα μου Δημήτρη και στη μνήμη της μητέρας μου, Παρασκευής. Χωρίς την υποστήριξη των γονιών μου δε θα είχα καταφέρει να πραγματοποιήσω έως τώρα τα σχέδια μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή της Χειρουργικής κύριο Ιωάννη Παπακωνσταντίνου, ο οποίος υπήρξε δίπλα μου σε κρίσιμες και ουσιαστικές φάσεις αυτής της προσπάθειας. Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής Εντατικής Θεραπείας κύριο Γεώργιο Γκικόκα για την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια εκπόνησης την εν λόγω διατριβής, καθώς και για το γεγονός ότι με εισήγαγε από πολύ νωρίς στον γοητευτικό κόσμο της χειρουργικής εντατικής θεραπείας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Χειρουργικής κύριο Ιωάννη Βασιλείου για την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της συγκεκριμένης μελέτης.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ:

09-06-2008

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

29-07-2008

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Ιωάννης Βασιλείου, Καθηγητής Χειρουργικής

Γεώργιος Γκιάκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Εντατικής Θεραπείας

Ιωάννης Παπακωνσταντίνου, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής

ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

05-04-2012

Κέντρο διεξαγωγής της μελέτης: Β' Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Αρεταίειο

Νοσοκομείο, Εργαστήριο Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

Εκθέσεις προόδου:

1^η έκθεση προόδου:

03-06-2014

2^η έκθεση προόδου:

31-03-2015

3^η έκθεση προόδου:

03-10-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Ιωάννης Βασιλείου, Καθηγητής Χειρουργικής

Βασίλειος Σμυρνιώτης, Καθηγητής Χειρουργικής

Γεώργιος Γκικόκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Εντατικής Θεραπείας

Θεοδόσιος Θεοδοσόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

Μαρία Γαζούλη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας

Ιωάννης Παπακωνσταντίνου, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 06-12-2016

ΒΑΘΜΟΣ: **“ΑΡΙΣΤΑ”**

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήϊς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

“Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκουσιν, τάναντία τουτέων.

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέλφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

CURRICULUM VITAE

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Διεύθυνση: Πατριάρχου Ιερεμίου 5, 11471, Αθήνα

Τηλέφωνο: 6973040390

E-mail: kdstamatis@gmail.com

Ημερομηνία γέννησης: 18.01.1974

ΠΤΥΧΙΑ

2001 **ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ** Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2011 **Master of Science in Translational Medicine** University of Edinburgh

2014 **Master of Science in Stem Cells and Regeneration** University of Bristol

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Φεβρουάριος 2014 – σήμερα Clinical Fellow in Intensive Care Medicine, St George's

University Trust Hospital, London

Αύγουστος 2013 – Φεβρουάριος 2014 Clinical Fellow in Intensive Care Medicine, Charring

Cross Hospital, London

Σεπτέμβριος 2006 – Ιούλιος 2011 Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής, Αρεταίειο Νοσοκομείο

Μάιος 2005 – Ιανουάριος 2006 Ελληνικός Στρατός, Στρατιωτική θητεία

Μάρτιος 2004 – Δεκέμβριος 2005 Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής, Γενικό Νοσοκομείο

Αγρινίου

ΕΡΕΥΝΑ

Διδακτορική Διατριβή «Μελέτη της συσχέτισης των πολυμορφισμών στα microRNAs με τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου» Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Papaconstantinou I, Stamatis K, Tzathas C, Vassiliou I, Giokas G, Gazouli M. The role of variations within microRNA in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:399-403
2. Gazouli M, Papaconstantinou I, Stamatis K, Vaiopoulou A, Zeglinas C, Vassiliou I, Giokas G, Tzathas C. Association study of genetic variants in miRNAs in patients with inflammatory bowel disease: preliminary results. *Dig Dis Sci* 2013;58:2324-2328

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Αγγελάκης Χ, Χήτος Α, Σταμάτης Κ, Καλλιακμάνης Β, Παναγιωτόπουλος Σ.
Αποτελέσματα και επιπλοκές σε 780 λαπαροσκοπικές χολοκυστεκτομές. Πανελλήνιο συνέδριο λαπαροσκοπικής χειρουργικής, Ιωάννινα, Μάϊος 2005
- Αγγελάκης Χ, Χήτος Α, Σταμάτης Κ, Παρίσης Μ. Κακώσεις του σπληνός κατά την τελευταία δεκαετία. Συνέδριο της ελληνικής εταιρίας χειρουργικής τραύματος, Αθήνα, Φεβρουάριος 2005

ΠΟΣΤΕΡ

- Gazouli M, Papaconstantinou I, Stamatis K, Vaiopoulou A, Giokas G, Vassiliou I, Zeglinas C, Tzathas C. Association study of genetic variants in miRNAs in patients with

inflammatory bowel disease. 8th European Crohn's and Colitis Organization Congress, Vienna, Austria, February 2013

- Stamatis K, Gazouli M, Papaconstantinou I, Vaioroulou A, Giokas G, Vassiliou I, Zeglinas C, Tzathas H. Μελέτη συσχετισμού των πολυμορφισμών στα miRNAs σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. 32^ο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, Νοέμβριος – Δεκέμβριος 2012
- Αγγελάκης Χ, Χήτος Α, Σταμάτης Κ, Κελέσης Χ, Στεφανάτου Γ. Σηπτικές επιπλοκές στην αποκατάσταση κηλών με πλέγμα. Πανελλαδικό συνέδριο κήλης, Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2006

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Care of the Critically Ill Surgical Patient. Royal College of Surgeons, St George's University Trust Hospital, London, June 2016
- Imperial Thoracic US Course. Charing Cross Hospital, London, September 2013
- Basic Assessment and Support in Intensive Care. Charing Cross Hospital, London, August 2013
- Critical Care Transfer. Royal Marsden Hospital, London, August 2013
- Postgraduate Course in HPB Surgery. European Hepato-Pancreatic-Biliary Association, Kammenna Vourla, October 2012, Volos, March 2012
- Intensive Course on the Principles and Practice of Clinical Research. European Society of Clinical Investigation, Athens, October 2010
- 15th Postgraduate Refresher Course "Cardiovascular and Respiratory Physiology applied to Intensive Care Medicine". Free University of Brussels, Brussels, December 2009

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά – επίπεδο C2

Γερμανικά – επίπεδο B2

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Λεπτό έντερο ανατομία	13
Παχύ έντερο ανατομία	14
Εμβρυολογία	16
Ιστολογία	18
Φυσιολογία	21
Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	23
Αιτιοπαθογένεια της νόσου του Crohn	25
Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της νόσου του Crohn	26
Αιτιοπαθογένεια της ελκώδους κολίτιδας	27
Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της ελκώδους κολίτιδας	28
MicroRNAs	32
Τα miRNAs στο ανοσοποιητικό σύστημα	35
Τα miRNAs στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου	36
Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο μηχανισμό επεξεργασίας των miRNAs	39
Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε στόχους των miRNAs	44
Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σχετιζόμενοι με miRNAs και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	47
Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις	50

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή	52
----------	----

	13
Πληθυσμός της μελέτης	55
Γονοτυπική ανάλυση	57
Στατιστική ανάλυση	61
Αποτελέσματα	62
Συζήτηση	64
Περίληψη	68

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Λεπτό έντερο ανατομία

Το δωδεκαδάκτυλο, η νήστιδα και ο ειλεός απαρτίζουν το λεπτό έντερο. Αν και το δωδεκαδάκτυλο διακρίνεται σαφώς από το υπόλοιπο λεπτό έντερο, δεν υπάρχει σαφές ανατομικό όριο ανάμεσα στη νήστιδα, που αποτελεί τα αρχικά δύο πέμπτα του λεπτού εντέρου, και τον ειλεό που αποτελεί τα υπόλοιπα τρία πέμπτα. Η αγγείωση του δωδεκαδακτύλου προέρχεται από την κοιλιακή αρτηρία διαμέσου της γαστροδωδεκαδακτυλικής αρτηρίας, η οποία χορηγεί ως κλάδους την πρόσθια και οπίσθια άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία, καθώς και από την άνω μεσεντέριο αρτηρία, η οποία χορηγεί ως κλάδους την πρόσθια και οπίσθια κάτω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία¹. Η αρτηριακή παροχή της νήστιδας και του ειλεού προέρχεται από την άνω μεσεντέριο αρτηρία, η οποία χορηγεί τις 10-16 νηστιδικές και ειλεϊκές αρτηρίες. Η φλεβική αποχέτευση της νήστιδας και του ειλεού ακολουθεί την πορεία των αρτηριών, καταλήγοντας διαμέσου της άνω μεσεντερίου φλέβας στην πυλαία φλέβα, ενώ αυτή του δωδεκαδακτύλου επιτυγχάνεται διαμέσου της σπληνικής, της άνω μεσεντερίου και της πυλαίας φλέβας². Η λεμφική αποχέτευση του λεπτού εντέρου ακολουθεί τα αγγειακά τόξα και καταλήγει στη χυλοφόρο δεξαμενή, λειτουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ως βασική οδός μεταφοράς των απορροφούμενων λιπιδίων προς τη συστηματική κυκλοφορία, εκτός από την βασική ενδοθηλιακή λειτουργία που επιτελεί.

Παχύ έντερο ανατομία

Το παχύ έντερο εκτείνεται από το τέλος του ειλεού μέχρι και το ορθό, συμπεριλαμβάνοντας την ειλεοτυφλική βαλβίδα και την σκωληκοειδή απόφυση, με το κόλον να φτάνει μέχρι την ανάκαμψη του περιτοναίου στο ύψος της ορθοσιγμοειδικής συμβολής. Το παχύ έντερο έχει συνολικό μήκος το οποίο κυμαίνεται από 150-180 εκατοστά, και απαρτίζεται από το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατίον, το σιγμοειδές και το ορθό. Η αιμάτωση του παχέος εντέρου προέρχεται από κλάδους της άνω και κάτω μεσεντερίου αρτηρίας, οι οποίες απαρτίζουν την αρτηριακή παροχή του αρχέγονου μέσου και οπισθίου εντέρου, αντιστοίχως³. Η άνω μεσεντέριος αρτηρία εκφύεται από την κοιλιακή αρτηρία στο ύψος του πρώτου οσφυϊκού σπονδύλου και χορηγεί ως κλάδους την ειλεοκολική, τη δεξιά κολική και τη μέση κολική αρτηρία, ενώ η κάτω μεσεντέριος αρτηρία εκφύεται από την κοιλιακή αρτηρία στο ύψος του τρίτου οσφυϊκού σπονδύλου και χορηγεί ως κλάδους την αριστερή κολική, τις σιγμοειδικές αρτηρίες, καθώς και την άνω ορθική αρτηρία η οποία αιματώνει το άνω τριτημόριο του ορθού. Το ορθό αιματώνεται επίσης από τη μέση και κάτω ορθική αρτηρία, οι οποίες αποτελούν κλάδους της έσω λαγονίου και της έσω αιδοϊκής αρτηρίας, αντίστοιχα³. Η φλεβική αποχέτευση του παχέος εντέρου ανταποκρίνεται στην αρτηριακή αιμάτωση, με την κάτω μεσεντέριο φλέβα να εκβάλλει στη σπληνική φλέβα, η οποία συμφύεται με την άνω μεσεντέριο φλέβα προκειμένου να σχηματίσουν την πυλαία φλέβα. Το άνω τριτημόριο του ορθού αρδεύεται μέσω της άνω ορθικής φλέβας η οποία καταλήγει στην άνω μεσεντέριο φλέβα, ενώ η μέση και κάτω ορθική φλέβα εκβάλλουν στην έσω λαγόνιο και έσω αιδοϊκή φλέβα, αντίστοιχα. Η λεμφική αποχέτευση του άνω τριτημορίου του ορθού γίνεται προς την ομάδα των κάτω

μεσεντερίων λεμφαδένων, ενώ τα κατώτερα δύο τριτημόρια αρδεύονται προς την ομάδα των λεμφαδένων της έσω λαγονίου³.

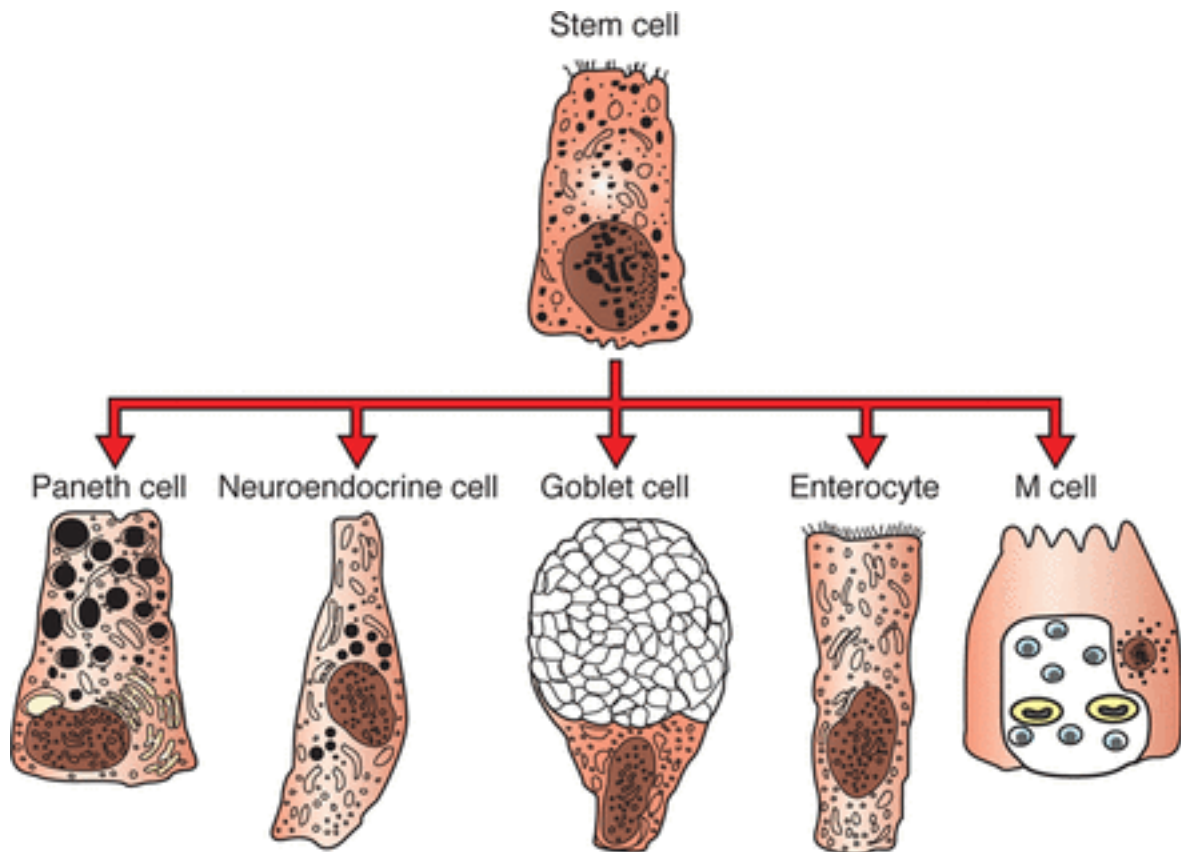
Εμβρυολογία

Ο εντερικός σωλήνας προέρχεται από το αρχέγονο μέσο και οπίσθιο έντερο. Από το μέσο έντερο, το οποίο αρδεύεται από την άνω μεσεντέρια αρτηρία, αναπτύσσονται η νήστιδα, ο ειλεός, το τυφλό, το ανιόν και τα εγγύς 2/3 του εγκαρσίου, ενώ από το οπίσθιο έντερο, το οποίο αρδεύεται από την κάτω μεσεντέρια αρτηρία, προέρχονται το άπω 1/3 του εγκαρσίου, το κατίον, το σιγμοειδές, το ορθό και ο πρωκτικός σωλήνας⁴. Το μέσο έντερο, το οποίο επικοινωνεί με το λεκιθικό ασκό, υφίσταται κατά της διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μια διαδικασία επιμήκυνσης και περιστροφής, κατά τη διάρκεια της οποίας προπίπτει φυσιολογικά δια μέσω του ανοίγματος του ομφάλιου λώρου, μεταξύ της 6ης και 10ης εβδομάδας της κύησης, λόγω του ότι το μικρό μέγεθος της κοιλιακής κοιλότητας του εμβρύου δεν μπορεί να φιλοξενήσει το ταχέως αναπτυσσόμενο σε μήκος λεπτό έντερο. Στη συνέχεια υφίσταται αντιωρολογιακή στροφή 90 μοιρών, η οποία φέρνει το εγγύς σκέλος της αγκύλης του μέσου εντέρου, από το οποίο θα αναπτυχθούν το δωδεκαδάκτυλο, η νήστιδα και ο ειλεός στα δεξιά, ενώ το άπω σκέλος που θα οδηγήσει στη δημιουργία της σκωληκοειδούς απόφυσης, του τυφλού, του ανιόντος και των αρχικών 2/3 του εγκαρσίου τοποθετείται προς τα αριστερά⁴. Κατά τη διάρκεια της 10ης εβδομάδας της κύησης, οι δομές του μέσου εντέρου επιστρέφουν στην κοιλιακή κοιλότητα του αναπτυσσόμενου εμβρύου και υφίστανται περαιτέρω αντιωρολογιακή στροφή 180 μοιρών³. Τελικά, όταν τα διαφορετικά τμήματα του αναπτυσσόμενου λεπτού εντέρου επιμηκυνθούν και καταλάβουν τις τελικές τους θέσεις το μεσεντέριο του ανιόντος συντήκεται με το τοιχωματικό περιτόναιο μετατρέποντας έτσι το ανιόν σε οπισθοπεριτοναϊκή δομή, ενώ το μεσεντέριο των υπολοίπων τμημάτων του μέσου εντέρου παραμένει προσκολλημένο στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα κατά τη μέση γραμμή³. Λόγω όμως της περιστροφής του μέσου

εντέρου περί τον άξονα της άνω μεσεντερίου αρτηρίας τελικά προσφύεται κατά μήκος ενός άξονα που εκτείνεται από το ύψος της δωδεκαδακτυλονηστιδικής συμβολής μέχρι την ειλεοτυφλική καμπή⁴. Όσον αφορά τις δομές που προέρχονται από το οπίσθιο έντερο πρέπει να σημειωθεί ότι το περιφερικό του τμήμα έρχεται σε επαφή με τον αρχέγονο πρωκτό, που αποτελεί εξωδερματικό εντύπωμα, με τη μορφή τυφλού ενδοδερματικού σάκου, δημιουργώντας έτσι τη μεμβράνη της αμάρας⁵. Η ανάπτυξη του ουροορθικού διαφράγματος μεταξύ της αλλαντοΐδας και του οπισθίου εντέρου διαχωρίζει την αμάρα σε πρόσθιο τμήμα, από το οποίο θα σχηματιστούν η ουροδόχος κύστη και ο ουρογεννητικός κόλπος, και σε οπίσθιο τμήμα το οποίο θα οδηγήσει στο σχηματισμό του πρωκτικού σωλήνα⁵.

Ιστολογία

Το τοίχωμα του λεπτού εντέρου αποτελείται από τον βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο και τον μυϊκό χιτώνα. Ο βλεννογόνος αποτελείται από το αδενικό επιθήλιο, το χόριο και τη βλεννογόνο μυϊκή στιβάδα, με το ενδοθήλιο να απαρτίζεται από μια σειρά διαφορετικών κυττάρων όπως τα εντεροκύτταρα, τα βλενοπαραγωγά ή καλυκοειδή κύτταρα, τα κύτταρα Paneth, τα ενδοκρινή κύτταρα, τα κύτταρα M και τα αρχέγονα κύτταρα⁶. Στον υποβλεννογόνο χιτώνα εντοπίζονται τα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, καθώς και τα γαγγλιακά κύτταρα τα οποία δημιουργούν το πλέγμα του Meissner, ενώ ανάμεσα στην έξω επιμήκη και την έσω κυκλοτερή στιβάδα του μυϊκού χιτώνα εντοπίζεται το μυεντερικό πλέγμα του Auerbach⁶. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στο ρόλο των κυττάρων Paneth, η έκκριση λυσοζύμης από τα οποία παρέχει προστασία από βακτηριακές λοιμώξεις, καθώς και στα κύτταρα M, σε σημεία της μεμβράνης των οποίων επικάθονται ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τα οποία έχουν βασική συμμετοχή στους ανοσολογικούς προστατευτικούς μηχανισμούς του λεπτού εντέρου⁷.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells), τα οποία εντοπίζονται στις εντερικές κρύπτες, είναι τα προγονικά κύτταρα όλων των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου όπως τα κύτταρα Paneth, τα νευροενδοκρινικά κύτταρα (neuroendocrine cells), τα καλυκοειδή κύτταρα (goblet cells), τα εντεροκύτταρα (enterocytes) και τα κύτταρα M⁷

Σε αναλογία με το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο αποτελείται από το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνιο και το μυϊκό χιτώνα, με το αδενικό επιθήλιο του βλεννογόνου να αποτελείται κυρίως από καλυκοειδή, απορροφητικά, και μικρότερο αριθμό ενδοκρινικών κυττάρων⁶.



Εικόνα 2. Ιστολογική απεικόνιση του τοιχώματος της νήστιδας όπου διακρίνονται ο βλεννογόνος, η βλεννογόνιος μυϊκή στιβάδα, ο υποβλεννογόνιος, ο μυϊκός χιτώνας και ο ορογόνος. Αναπαράγεται από Magscope και University of Birmingham UK σύμφωνα με τους όρους του Creative Commons Licence CC BY-NC-ND 3.0 E⁸

Φυσιολογία

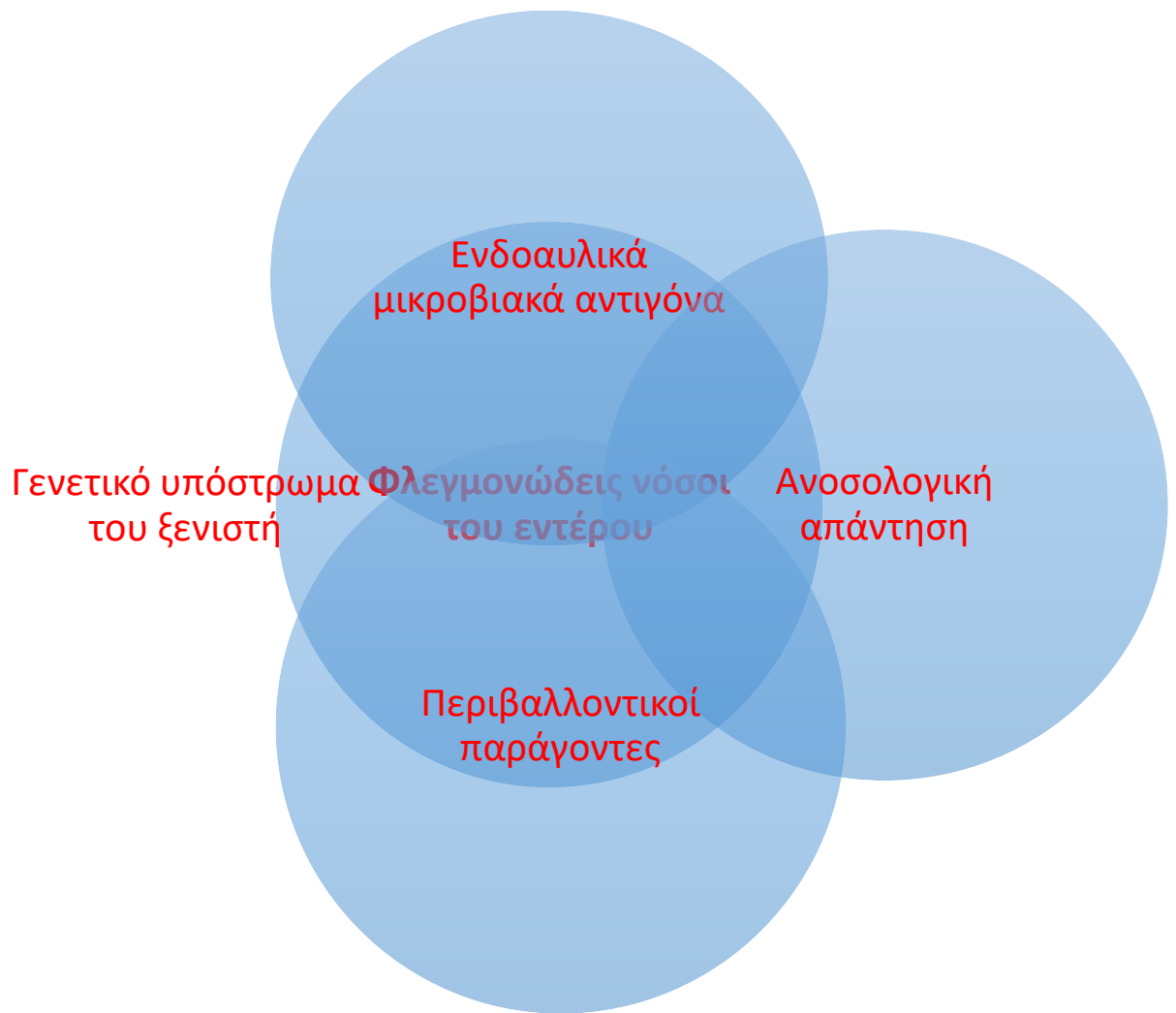
Η κύρια φυσιολογική λειτουργία του λεπτού εντέρου είναι η πέψη και η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών που προσλαμβάνονται με την τροφή. Η διαδικασία της πέψης διακρίνεται σε μηχανική και χημική φάση, με τη μηχανική φάση να αποτελείται από κινήσεις κατάτμησης, οι οποίες τεμαχίζουν και αναμιννύουν το χυλό της τροφής, και κινήσεις περισταλτισμού οι οποίες προωθούν τον εντερικό χυλό κατά μήκος του εντερικού σωλήνα⁹. Η χημική φάση της πέψης περιλαμβάνει τη διάσπαση των υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών μέσω της επίδρασης των διαφόρων πεπτικών ενζύμων. Τα πολυπεπτίδια που προκύπτουν από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών στο στομάχι από τη δράση της πεψίνης υφίστανται περαιτέρω διάσπαση μέσω της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται και εκκρίνονται με τη μορφή προενζύμων από το πάγκρεας¹⁰. Τέτοια ένζυμα είναι οι ενδοπεπτιδάσες θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστίνη, καθώς και οι καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β. Η παγκρεατική λιπάση διασπά τα προσλαμβανόμενα λιπίδια μέσω διαδοχικής υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων σε διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και γλυκερόλη, η φωσfolιπάση Α₂ προκαλεί υδρόλυση του λιπαρού οξέος στη θέση 2 των φωσfolιποειδών, όπως η φωσφατιδυλοχολίνη, ενώ η εστεράση της χοληστερόλης υδρολύει τη χοληστερόλη που έχει εστεροποιηθεί με λιπαρά οξέα¹⁰. Η παγκρεατική αμυλάση προκαλεί διάσπαση των υδατανθράκων, ενώ στη συνέχεια η μαλτάση διασπά τη μαλτόζη σε δύο μόρια γλυκόζης, η σουκράση διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, ενώ η λακτάση διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη¹¹. Η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, αφού έχει πρώτα πραγματοποιηθεί η διάσπαση σε στοιχειώδη μόρια με την επίδραση των παραπάνω ενζύμων, πραγματοποιείται είτε μέσω της διακυτταρικής οδού διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης των εντεροκυττάρων, είτε μέσω

της παρακυτταρικής οδού διαμέσου των στενοσυνδέσμων οι οποίοι βρίσκονται μεταξύ των εντεροκυττάρων¹¹. Μεγάλα οργανικά μόρια όπως τα αμινοξέα και τα απλά σάκχαρα μεταφέρονται μέσω της διακυτταρικής οδού με ενεργό μεταφορά, η οποία προϋποθέτει την κατανάλωση ενέργειας, ενώ η απορρόφηση του νερού πραγματοποιείται με απλή διάχυση. Ειδικοί υποδοχείς στην ενδοαυλική επιφάνεια των εντερικών λαχνών είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση κάθε ξεχωριστού μορίου που προέρχεται από την τελική διάσπαση των τροφών¹¹. Όσον αφορά το παχύ έντερο, οι βασικές του φυσιολογικές λειτουργίες είναι ο σχηματισμός και η αποβολή των κοπράνων, η ανακύκλωση θρεπτικών συστατικών μέσω της δράσης μικροβίων που αποτελούν την εντερική χλωρίδα και η απορρόφηση νερού. Η ζύμωση ουσιών οι οποίες δεν υφίστανται πέψη από το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα οδηγεί στο σχηματισμό των κοπράνων και στην απελευθέρωση βιταμινών, όπως οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β6, Β12), η βιταμίνη Κ και η βιοτίνη, και στην απελευθέρωση αερίων όπως το διοξείδιο του άνθρακα και το μεθάνιο. Η απορρόφηση του νερού οδηγεί στη συμπύκνωση και στη στερεοποίηση των κοπράνων, τα οποία στη συνέχεια παραμένουν στο σιγμοειδές και το ορθό μέχρι να αποβληθούν με την αφόδευση¹².

Φλεγμονώδεις νόσοι του παχέος εντέρου

Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, οι οποίες διακρίνονται στη νόσο του Crohn και στην ελκώδη κολίτιδα, είναι μια ομάδα ιδιοπαθών διαταραχών οι οποίες σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα. Ο επιπολασμός αυτών των ασθενειών έχει αυξηθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες, σε 120-200 ανά 100.000 πληθυσμού και σε 50-200 ανά 100.000 πληθυσμού για την ελκώδη κολίτιδα και τη νόσο του Crohn, αντίστοιχα¹³. Η παθοφυσιολογία των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί επαρκώς. Φαίνεται πάντως ότι ένα ευρύ φάσμα γενετικών, επιγενετικών, λοιμωδών, φυσιολογικών και ανοσολογικών παραγόντων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση και την εξέλιξη αυτών των ασθενειών^{14, 15}. Λόγω ακριβώς της πολύπλοκης αιτιολογίας τους, η πιο αποδεκτή θεωρία σήμερα είναι ότι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και η φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα που αυτές συνεπάγονται είναι το αποτέλεσμα μιας ανεπαρκούς ενεργοποίησης του συστήματος της φυσικής ανοσίας απέναντι σε έναν ενδοαυλικό παράγοντα, η οποία εμφανίζεται σε γενετικά προδιαθετειμένα άτομα.

Η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα σχετίζονται με διαφορές στην έκφραση γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση, στη φλεγμονώδη διαδικασία και στην αναδιαμόρφωση των ιστών, συμπεριλαμβανομένων κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων, διαμεσολαβητών της φλεγμονής, πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αντιμικροβιακών παραγόντων και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου¹⁶.



Εικόνα 1. Η αλληλεπίδραση διαφορετικών παραγόντων οι οποίοι συμβάλλουν στην εκδήλωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου σε άτομα με γενετική προδιάθεση στη νόσο

Αιτιοπαθογένεια της νόσου του Crohn

Περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι συμμετέχουν στην εμφάνιση της νόσου του Crohn, με το κάπνισμα να αποτελεί τον περισσότερο μελετημένο, ενώ άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες είναι η κατανάλωση δίαιτας δυτικού τύπου με υψηλό ποσοστό ζάχαρης και πολυακόρεστων λιπιδίων, η έκθεση σε υψηλά επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης, καθώς και η υιοθέτηση ενός καθιστικού τρόπου ζωής¹⁷. Γενετικοί παράγοντες φαίνεται επίσης ότι συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένεια της νόσου του Crohn, όπως υποδηλώνει το γεγονός ότι 35% των μονοζυγωτικών διδύμων, σε αντίθεση με το 3% των διζυγωτικών διδύμων, εμφανίζουν τη νόσο¹⁸. Μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies) έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση 71 θέσεων ευπάθειας σε 17 χρωμοσώματα¹⁹. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η νόσος του Crohn οφείλεται σε διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στους μικροβιακούς παράγοντες που υπάρχουν στον εντερικό σωλήνα και στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Από τα τέσσερα βακτηριακά φύλα (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria), που κατά κύριο λόγο διαβιούν στο ανθρώπινο έντερο, έχει ανευρεθεί ελαττωμένη ποικιλομορφία όσον αφορά τα φύλα Firmicutes και Bacteroides σε ασθενείς με νόσο του Crohn^{20, 21}. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση της νόσου στο πλαίσιο των προαναφερόμενων μεταβολών του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού είναι η παρουσία ενός προδιαθεσικού γονότυπου από τη μεριά του ασθενή.

Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της νόσου του Crohn

Η αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου λόγω ελαττωμένης έκφρασης των πρωτεϊνών των στενοσυνδέσμων (tight junctions) πιστεύεται ότι οδηγεί στην έκθεση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε αντιγόνα του εντερικού σωλήνα¹⁷. Ελαττωμένη έκφραση του γονιδίου της βλεννίνης MUC1 έχει βρεθεί στον τελικό ειλεό ατόμων που πάσχουν από τη νόσο, ενώ *in vitro* μελέτες καθώς και μελέτες σε πειραματόζωα υποδηλώνουν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε μεταβολές της διαπερατότητας του εντερικού ενδοθηλίου οι οποίες διαμεσολαβούνται από την κινάση ελαφρής αλυσίδας της μυοσίνης (myosin light chain kinase), και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών που δραστηριοποιούνται στη νόσο του Crohn, όπως ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α, και ιντερφερόνη-α^{22, 23, 24}. Δυσλειτουργία των κυττάρων Panneth του εντερικού επιθηλίου, η οποία οφείλεται στην παρουσία του πολυμορφισμού 300T>A του γονιδίου ATG16L, έχει επίσης διαπιστωθεί σε πάσχοντες από τη νόσο²⁵. Επιπρόσθετα, μικροβιακά αντιγονικά πρότυπα αναγνωρίζονται από κύτταρα του μη-ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, με τη διαμεσολάβηση υποδοχέων όπως οι υποδοχείς που ομοιάζουν με του υποδοχείς TOLL (TOLL-like receptors) και οι δεσμευτικοί των νουκλεοτιδίων, περιοχής ολιγομερισμού υποδοχείς (NOD-like receptors)¹⁷. Η κατανομή και η φαινοτυπική έκφραση των δενδριτικών κυττάρων φαίνεται ότι σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου του Crohn, όπως και η υπερέκφραση των υποδοχέων TLR2 και TLR4^{26, 27, 28, 29}.

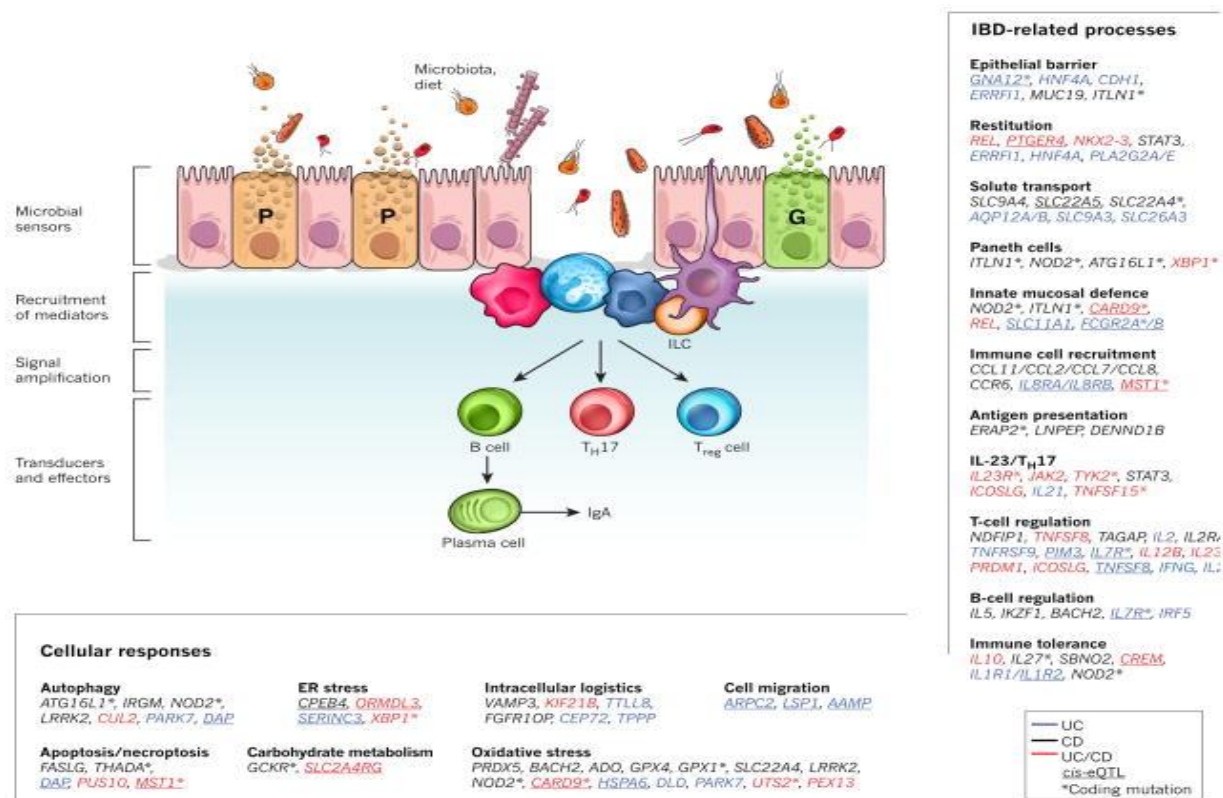
Αιτιοπαθογένεια της ελκώδους κολίτιδας

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ελκώδους κολίτιδας, με τη νόσο να είναι πιο συχνή στις αναπτυγμένες σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ το κάπνισμα φαίνεται να δρα προστατευτικά ως προς την ανάπτυξη νόσησης³⁰. Οξεία λοιμώδη νοσήματα του γαστρεντερικού συστήματος τα οποία προκαλούνται από μικροβιακά στελέχη όπως *Salmonella* spp, *Shigella* spp και *Campylobacter* spp αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σχεδόν στο διπλάσιο, υποδηλώνοντας ότι οι αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα που προκαλούνται από οξείες λοιμώξεις ενδέχεται να πυροδοτούν την έναρξη μιας χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα^{31, 32}. Μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν αναδείξει την ύπαρξη γονιδίων τα οποία αυξάνουν την ευπάθεια στην ελκώδη κολίτιδα, με την ύπαρξη συσχετισμών στην περιοχή του μείζονος σύμπλοκου ιστοσυμβατότητας τάξης 2 κοντά στην περιοχή HLA-DRA να είναι οι πιο χαρακτηριστικοί³³. Από τις 47 θέσεις ευπάθειας που έχουν συσχετισθεί με την ελκώδη κολίτιδα, οι 20 έχει βρεθεί ότι σχετίζονται και με την ανάπτυξη της νόσου του Crohn, όπως οι ιντερλευκίνες 23 και 10 και τα γονίδια που συμμετέχουν στο μοριακό μονοπάτι janus-kinase 3³⁴. Οι θέσεις ευπάθειας που είναι ειδικές για την ελκώδη κολίτιδα (ηπατοκυτταρικός πυρηνικός παράγοντας-4α, CDH1, λαμινίνη-B1) υποδεικνύουν ότι όπως και στη νόσο του Crohn, η διαταραχή του ενδοθηλιακού φραγμού του εντερικού βλεννογόνου ενδέχεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην προσκόλληση και σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων³⁵.

Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της ελκώδους κολίτιδας

Κατά παρόμοιο τρόπο με τη νόσο του Crohn, η ελκώδης κολίτιδα φαίνεται ότι αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των ανοσολογικών μηχανισμών του εντερικού ενδοθηλίου και της εντερικής χλωρίδας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα μια παθολογική και εκσεσημασμένη ανοσολογική αντίδραση εναντίον μη παθογόνων βακτηριακών στελεχών. Μελέτες σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα έχουν διαπιστώσει αυξημένο βακτηριακό φορτίο στο εντερικό ενδοθήλιο των πασχόντων από τη νόσο, ενώ υψηλές βακτηριακές συγκεντρώσεις φαίνεται να σχετίζονται με τις πιο σοβαρές μορφές της νόσου³⁶. Όπως και στη νόσο του Crohn, τα δενδριτικά κύτταρα που εντοπίζονται στο χορίο του βλεννογόνου συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της ελκώδους κολίτιδας μέσω μεταβολών της έκφρασης των υποδοχέων που ομοιάζουν με τους υποδοχείς TOLL. Αυξημένη έκφραση του υποδοχέα TLR4 έχει βρεθεί στο χορίο του βλεννογόνου του εντερικού ενδοθηλίου σε ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα, ενώ η παρουσία του πολυμορφισμού TLR4 D299G αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ελκώδους κολίτιδας^{37,38}. Επιπλέον, η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στα ρυθμιστικά και στα ανοσοδραστικά T λεμφοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας άτυπης κινητοποίησης των T-βοηθητικών 2 κυττάρων (Th2-cells), και που διαμεσολαβείται από μη-κλασσικά, φυσικούς φονείς T-λεμφοκύτταρα τα οποία παράγουν ιντερλευκίνες 5 και 13, οδηγεί σε αύξηση της απόπτωσης και μεταβολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των στενοσυνδέσμων του εντερικού ενδοθηλίου^{30, 39, 40}. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι αναστολή της ιντερλευκίνης 13 και μείωση του αριθμού των φυσικών φονέων T-λεμφοκυττάρων εμποδίζουν την ανάπτυξη της νόσου, ενώ ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNFα) έχει βρεθεί

αυξημένος στον ορό του αίματος, σε δείγματα κοπράνων, καθώς και στο βλεννογόνο ασθενων με ελκώδη κολίτιδα^{41, 42, 43, 44}. Βλάβη του ενδοθηλιακού φραγμού η οποία προκύπτει από μεταβολές στη σύνθεση και τη σουλφονυλίωση των υποτύπων 2 της βλεννίνης οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα, έκθεση σε αντιγόνα του εντερικού αυλού και κινητοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών, όπως υποδεικνύει η αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων β-ντιφενσινών (β-defensins) σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο^{39, 45, 46, 47}. Το παρακάτω σχήμα παρουσιάζει ένα μοντέλο για τους παθογενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην εκδήλωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, το οποίο βασίζεται σε αποτελέσματα από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος.



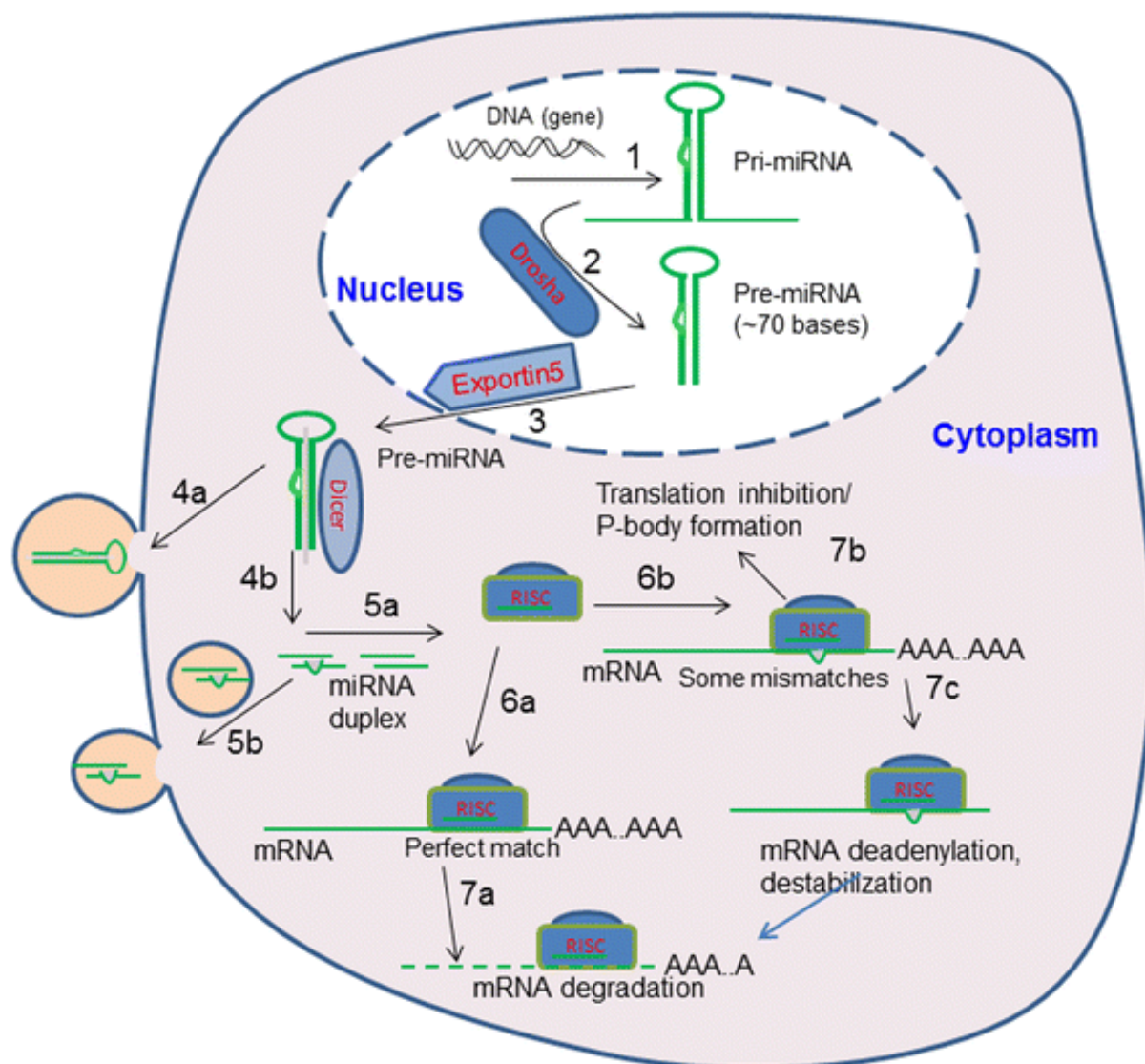
Εικόνα 2. Η εντερική ομοιόσταση εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση κυττάρων του εντερικού ενδοθηλίου και κυττάρων των συστημάτων της φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Η αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού βλεννογονικού φραγμού οδηγεί σε αύξηση της μικροβιακής διείσδυσης η οποία ανιχνεύεται από το σύστημα της φυσικής ανοσίας. Η επακόλουθη ανοσολογική αντίδραση διαμεσολαβείται από εξωκυττάρους διαμεσολαβητές, η απελευθέρωση των οποίων οδηγεί στην κινητοποίηση επιπλέον κυτταρικών παραγόντων, όπως κύτταρα που συμμετέχουν στο επίκτητο σύστημα ανοσίας. Η ισορροπία αυτών των σηματοδοτικών μηχανισμών επηρεάζεται από γενετικές παραλλαγές στο γονιδιακό υπόβαθρο του ξενιστή, τη μικροβιακή χλωρίδα και ανοσολογικούς παράγοντες. Στο παραπάνω διάγραμμα, γονίδια σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium, $r^2 > 0,8$) με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς συσχετιζόμενους με τις φλεγμονώδεις νόσους του παχέος εντέρου έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με το ρόλο

που διαδραματίζουν στο πλαίσιο της εντερικής ομοιόστασης και της ανοσίας. Οι έγχρωμες επισημάνσεις στην εικόνα υποδεικνύουν αν τα γονίδια σχετίζονται με θέσεις ευπάθειας για τη νόσο του Crohn (CD, μαύρο), με την ελκώδη κολίτιδα (UC, μπλε), ή και με τις δύο νόσους (κόκκινο). Ο αστερίσκος υποδηλώνει αντίστοιχες μεταλλάξεις. G: καλυκοειδή κύτταρα, P: κύτταρα Paneth⁴⁸ [αναπαράγεται κατόπιν αδείας, αριθμός παραχώρησης 3850101339958]

MicroRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι ριβονουκλεϊκά οξέα (RNAs) βραχείους μήκους (19-25 νουκλεοτίδια), τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης⁴⁹. Το κανονικό μονοπάτι του σχηματισμού των miRNAs οδηγεί στην παραγωγή ώριμων miRNAs με τη συμμετοχή του ενζύμου Drosha, του συμπαράγοντα Pasha, και του συμπλέγματος Exportin 5-RAN/GTP⁴⁹. Ιδιαίτερης σημασίας για την καταστολή της έκφρασης των αγγελιοφόρων RNA-στόχων (target-mRNAs) στο επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγασης (RISC, RNA-interference silencing complex)⁵⁰ είναι η περιοχή εκβλάστησης (seed region) των miRNAs (τα νουκλεοτίδια 2-8 στο 5'-άκρο), η οποία επιτρέπει σύζευξη με την 3-μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UnTranslatedRegion) του αγγελιοφόρου RNA-στόχου, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο καταστολή της μετάφρασης και αποικοδόμηση του αγγελιοφόρου RNA⁵¹. Αποδόμηση του αγγελιοφόρου RNA-στόχου εμφανίζεται στην περίπτωση πλήρους συμπληρωματικότητας με το αντίστοιχο miRNA, ενώ σε περίπτωση ατελούς συμπληρωματικότητας παρατηρείται αποαδενυλίωση και αποσταθεροποίηση⁵². Στην περίπτωση όπου δεν συμβαίνει αποδόμηση του αγγελιοφόρου RNA ενδέχεται να παρατηρηθεί απευθείας καταστολή της έναρξης της μετάφρασης, ή συσσώρευση των αγγελιοφόρων RNA-στόχων σε κυτταρικά διαμερίσματα όπου πραγματοποιείται ελαττωμένη σύνθεση πρωτεϊνών, όπως τα σωμάτια P⁵². Κεντρικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία διαδραματίζει το επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγασης, ο πυρήνας του οποίου αποτελείται από τις πρωτεΐνες Argonaute (Ago 1 – Ago 4) και GW182. Οι πρωτεΐνες Ago δεσμεύουν το miRNA και με αυτόν τον τρόπο συμμετέχουν στην αναγνώριση του αγγελιοφόρου RNA-στόχου, ενώ οι πρωτεΐνες της οικογένειας GW182 φαίνεται ότι

σχηματίζουν μια μοριακή πλατφόρμα στην οποία προσδένονται σύμπλοκα δραστικών παραγόντων τα οποία διαμεσολαβούν την καταστολή των αγγελιοφόρων RNA-στόχων⁵³.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στα ευκαρυωτικά κύτταρα. 1) Μεταγραφή του DNA σε pri-miRNA. 2) Πέψη του pri-miRNA από το ένζυμο *Drosha* και δημιουργία του pre-miRNA (δομή μίσχου φουρκέτας – hairpin structure). 3). Μεταφορά του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης Exportin-5. 4a) Έκκριση του pre-miRNA από το κυτταρόπλασμα στο εξωκυττάριο διαμέρισμα, ή 4b) Μετατροπή του pre-miRNA μέσω της ενδοριβονουκλεάσης

Dicer σε ώριμο διπλής έλικας miRNA στο κυτταρόπλασμα. 5a) Σύζευξη του miRNA με πρωτεΐνες ώστε να δημιουργηθεί το επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγασης (RISC, RNA-Induced Silencing Complex). Μια από τις δύο έλικες αφαιρείται και μόνο η μία έλικα παραμένει. 5b) Το ώριμο miRNA εκκρίνεται από το κύτταρο. 6a) Πρόσδεση του RISC στο mRNA-στόχο με πλήρη συμπληρωματικότητα. 6b) Πρόσδεση του RISC στο mRNA-στόχο με ατελή συμπληρωματικότητα. 7a) Πρόσδεση του RISC με πλήρη συμπληρωματικότητα και αποδόμηση του mRNA-στόχου. 7b,c) Αναστολή της μετάφρασης ή αποαδενυλίωση του mRNA-στόχου σε περίπτωση ατελούς συμπληρωματικότητας⁵⁴.

Διαφορετικά miRNAs έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων βιολογικών λειτουργιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση⁵⁵, η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων⁵⁶, η μορφογένεση και η ανάπτυξη των διαφόρων οργάνων⁵⁷. Επιπροσθέτα, αρκετές μελέτες έχουν διαπιστώσει την ύπαρξη ισχυρής συσχέτισης ανάμεσα σε διαταραχές του προτύπου έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs και στην ανάπτυξη νεοπλασιών⁵⁸.

Τα miRNAs στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους στη λειτουργία των συστημάτων τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας⁵⁹. Το miRNA-155 συμμετέχει στη διατήρηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων καθώς και των δενδριτικών κυττάρων⁶⁰, ενώ τα miR-146a/b πιστεύεται ότι ρυθμίζουν τα μοριακά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν κυτοκίνες και οι υποδοχείς που ομοιάζουν με τους υποδοχείς Toll μέσω αναστολής του μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης της κινάσης-1 η οποία σχετίζεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1, καθώς και της πρωτεΐνης του παράγοντα Β ο οποίος σχετίζεται με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων⁶¹.

Τα αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται επίσης από χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης σε μια σειρά από miRNAs. Σε ασθενείς που πάσχουν από συστηματικό ερυθηματώδη λύκο έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός χαρακτηριστικού miRNA προτύπου έκφρασης, με 7 miRNAs να υποεκφράζονται και 9 miRNAs να υπερεκφράζονται⁶². Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το miR-146a υπερεκφράζεται σε αρθρικούς ιστούς, σε CD68-θετικά μακροφάγα, σε CD3-θετικούς υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων καθώς και σε CD79-θετικά Β-λεμφοκύτταρα⁶³, ενώ το miR-203, το οποίο είναι ειδικό για τα κερατινοκύτταρα, υπερεκφράζεται σε ψωριασικές βλάβες⁶⁴.

Τα miRNAs στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου

Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης σε μια σειρά από miRNAs. Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών δείχνουν ότι τροποποιήσεις των ολιγονουκλεοτιδικών προτύπων έκφρασης ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι οδηγούν στην εμφάνιση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Το miR-192, για παράδειγμα, το οποίο έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε δείγματα ιστών από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, περιέχει στη νουκλεοτιδική του ακολουθία δυνητικές θέσεις σύνδεσης για το MIP-2a miRNA, μια χημειοτακτική κυτοκίνη η οποία έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, και τα επίπεδα της οποίας έχουν βρεθεί αντιστρόφως συσχετιζόμενα με τα επίπεδα του miR-192 σε δείγματα κολονοσκοπικών βιοψιών από ασθενείς με ενεργό ελκώδη κολίτιδα⁶⁵. Η διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α, ο οποίος είναι ένας φλεγμονώδης διαμεσολαβητής ο οποίος διαδραματίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση της ελκώδους κολίτιδας⁶⁶, οδηγεί σε περαιτέρω υποέκφραση του MIP-2a, υποδηλώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ύπαρξη πιθανού συσχετισμού ανάμεσα σε διαταραχή του ολιγονουκλεοτιδικού προτύπου έκφρασης και στους μοριακούς μηχανισμούς που ευθύνονται για την ανάπτυξη της ελκώδους κολίτιδας⁶⁵. Διαταραχή του ολιγονουκλεοτιδικού προτύπου έκφρασης έχει επιπλέον διαπιστωθεί σε δείγματα από μη-φλεγμαίνοντα εντερικό βλεννογόνο (βαθμού 0 και 1) σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn⁶⁷. Έχει επίσης προταθεί ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες συμμετέχουν στους παθογενετικούς μηχανισμούς των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου μέσω επαγωγής της στρεσογόνου αντίδρασης του ενδοπλασματικού δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, η

οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού απόκρισης μη-αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (unfolded protein response)⁶⁸. Το γεγονός ότι συστατικά μόρια του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μηχανισμού, όπως τα XBP-1 και eIF2AK3, έχουν προβλεφθεί σε *in silico* πειράματα ως ενδεχόμενοι στόχοι των miRNAs το πρότυπο έκφρασης των οποίων έχει βρεθεί διαταραγμένο σε βιοψίες από μη-φλεγμαίνοντες ιστούς από ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, ενισχύει την άποψη ότι η διαταραχή στην έκφραση των ολιγονουκλεοτιδίων εμφανίζεται νωρίς στον εντερικό βλεννογόνο του παχέος εντέρου στους ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου και πιθανώς να αλληλεπιδρά με περιβαλλοντικούς παράγοντες προκειμένου να οδηγήσει στην εκδήλωση της κλινικά ενεργής νόσου⁶⁷.

Επιπροσθέτως, σε δείγματα από ενδοσκοπικές βιοψίες έχει βρεθεί ότι τα miRNAs miR-16, miR-21, miR-223 και miR-594 υπερεκφράζονται, και τα miRNAs miR-19b και miR-629 υποεκφράζονται σε ενεργο κολίτιδα του Crohn⁶⁹.

Αυτές οι διαταραχές του ολιγονουκλεοτιδικού προτύπου έκφρασης, οι οποίες είναι ειδικές για διαφορετικά τμήματα του εντερικού σωλήνα, υποδηλώνουν ότι διαφορετικά miRNAs ενδέχεται να συμμετέχουν σε πολλαπλά και διαφορετικά μοριακά μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην ανάπτυξη διαφορετικών υποτύπων των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου⁶⁹.

Μέσα σε αυτό το γενικότερο πλαίσιο, πολυμορφισμοί σε στοιχεία του μηχανισμού επεξεργασίας των miRNAs, καθώς και σε θέσεις δέσμευσης των miRNAs, μπορεί να επιδρούν στη γενικότερη αποτελεσματικότητα του μηχανισμού μέσω του οποίου τα miRNAs καταστέλλουν την έκφραση των αγγελιοφόρων RNA-στόχων, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη τροποποιημένης ευπάθειας στη νόσο και την εμφάνιση διαφορετικών νοσολογικών φαινοτύπων.

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έχουν ανιχνευθεί σε γονίδια σχετιζόμενα με miRNAs σε νεοπλασίες και αυτοάνοσες παθήσεις, ενώ ένας μικρός αριθμός μελετών έχει εστιάσει στους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με τα miRNAs στην περίπτωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, υποδηλώνοντας ότι περαιτέρω μελέτη των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών μπορεί να διαλευκάνει ενδεχομένως τους μηχανισμούς οι οποίοι ευθύνονται για την ανάπτυξη των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου.

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο μηχανισμό επεξεργασίας των miRNAs

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι γενετικοί πολυμορφισμοί σε miRNAs καθώς και σε στόχους των miRNAs μπορεί να επιδράσουν στη ρυθμιστική λειτουργία των miRNAs και επομένως στα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων αγγελιοφόρων RNAs. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σχετιζόμενοι με miRNAs μπορεί να βρεθούν σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν στοιχεία του μηχανισμού επεξεργασίας των miRNAs, σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs (τροποποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη δομή και τη λειτουργία των pri-miRNAs, pre-miRNAs, και των ώριμων miRNAs), καθώς και σε θέσεις σύζευξης των miRNAs στα αγγελιοφόρα RNA-στόχους⁷⁰. In silico πειράματα υποδηλώνουν ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs14035 στη σχετιζόμενη με το ογκογονίδιο RAS πρωτεΐνη πυρηνικής εξαγωγής (Ras-Associated nuclear export protein) αποδιοργανώνει το μη-μεταλλαγμένο αλληλίο το οποίο εντοπίζεται στη θέση σύζευξης για το miR-575. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός δημιουργεί μια νέα θέση σύζευξης για το miR-182*⁷¹. Οι εξπορτίνη-5 και η σχετιζόμενη με το ογκογονίδιο RAS πρωτεΐνη πυρηνικής εξαγωγής έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του οισοφάγου⁷², ενώ ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs11077 στην εξπορτίνη-5 έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου του νεφρού⁷³. Όσον αφορά τους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ενδοριβονουκλεάση Dicer, ο rs3742330 έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης προκαρκινικών στοματικών αλλοιώσεων⁷⁴, ενώ μεταλλάξεις αποκοπής στην ανταποκρινόμενη στην διενεργοποίηση δεσμευτική του RNA πρωτεΐνη (transactivation-responsive RNA-binding protein), μια ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία σταθεροποιεί το ένζυμο Dicer-1, έχουν συσχετισθεί με υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού στο σποραδικό

καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού, καθώς και στον καρκίνο του στομάχου⁷⁵. Παρά την ύπαρξη των παραπάνω ευρημάτων, οι περισσότερες μελέτες στον τομέα των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs εστιάζουν σε μεταλλάξεις οι οποίες επιδρούν σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν miRNAs και θέσεις σύζευξης των miRNAs. Οι πρώτες ενδείξεις ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs ενδέχεται να έχουν λειτουργικές συνέπειες εμφανίστηκαν το 2005, με την ανακάλυψη ότι μια ομόζυγη υποκατάσταση (κυτοσίνη στη θέση θυμίνης) στο pri-miR-16-1, η οποία καταλήγει σε ελαττωμένη έκφραση του miR-16-1, προδιαθέτει στην ανάπτυξη χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας⁷⁶. Έκτοτε αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε pri-miRNAs και pre-miRNAs συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων νεοπλασιών. Διάφοροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε στοιχεία του μηχανισμού επεξεργασίας των miRNAs έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς, σποραδικού και οικογενούς καρκίνου του μαστού, ηπατοκυτταρικού καρκίνου, καθώς και καρκίνου του στομάχου, του οισοφάγου και της ουροδόχου κύστης^{72, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83}. Μια σύνοψη των σχετικών παραδειγμάτων παρατίθεται στον πίνακα 1. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένοι συσχετισμοί έχουν προκύψει με τη χρήση μοντέλων στατιστικής ανάλυσης τα οποία δεν εξετάζουν τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο μηχανισμό επεξεργασίας των miRNAs συνεισφέρουν στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων κακόηθων φαινοτύπων. Αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης η διαλεύκανση των διαδοχικών γεγονότων τα οποία λαμβάνουν χώρα μεταξύ της αρχικής εμφάνισης ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού σε ένα miRNA το οποίο υποεκφράζεται ή υπερεκφράζεται και της ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Περισσότερες μελέτες «επικερδούς λειτουργικότητας»

(gain-of-function) καθώς και «ελαττωμένης λειτουργικότητας» (loss-of-function) απαιτούνται για αυτό το σκοπό, καθώς και για τη διαλεύκανση του φαινομενικά αντιφατικού γεγονότος ότι ο ίδιος γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση σε διαφορετικούς τύπους επιθηλίων. Αποτελεί ανοιχτό ερώτημα, για παράδειγμα, το γιατί ο πολυμορφισμός rs6505162 προάγει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και της ουροδόχου κύστης, από τη μία, ενώ από την άλλη φαίνεται να προστατεύει απέναντι στην ανάπτυξη καρκίνου του οισοφάγου⁷². Αν και οι περισσότερες μελέτες σε αυτόν τον τομέα έχουν εστιάσει στη σχέση ανάμεσα στους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια σχετιζόμενα με miRNAs και στην ανάπτυξη καρκίνου, πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε πολυμορφισμούς σε miRNAs και στην ανάπτυξη ανοσολογικών διαταραχών. Μια μελέτη από τους Yang και συνεργάτες έδειξε ότι η παρουσία του πολυμορφισμού rs3746444 στο pre-miR-499 σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών, υποδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την παρουσία μιας έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης σε αυτήν την υποομάδα των ασθενών⁸⁴. Η συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs3746444 στο pre-miR-499 και σε διαμεσολαβητές του μηχανισμού της φλεγμονώδους αντίδρασης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα αποτέλεσε το αντικείμενο μιας προηγούμενης μελέτης, η οποία διαπίστωσε υψηλότερα επίπεδα αντικυκλικών κιτρουλινικών αντισωμάτων (anti-cyclic citrullinated peptide antibodies) σε άτομα που ήταν φορείς του συγκεκριμένου μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού⁸⁵. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη μελέτη απέτυχε να αναδείξει την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην παρουσία του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs3746444 και την ανάπτυξη αυξημένης ευπάθειας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα⁸⁵.

Άλλες ερευνητικές προσπάθειες απέτυχαν να αναδείξουν την ύπαρξη συσχετισμού ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs3746444 και στην ύπαρξη αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη συστηματικού ερυθηματώδους λύκου⁸⁶. Αντιθέτως, η παρουσία του πολυμορφισμού rs57095329 στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου που κωδικοποιεί το miR-146a έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης συστηματικού ερυθηματώδους λύκου⁸⁷. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δημιουργεί ελαττωμένη συγγένεια σύζευξης για τον μεταγραφικό παράγοντα Ets-1 (E26 transformation-specific-1), έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος έχει βρεθεί να υποεκφράζεται σε ασθενείς που πάσχουν από συστηματικό ερυθηματώδη λύκο⁸⁷. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ελαττωμένη έκφραση του miR-146a, το οποίο είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο που υπό φυσιολογικές συνθήκες δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στο μοριακό μονοπάτι της ιντερφερόνης, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την παθολογική υπερδραστηριοποίηση του τύπου I μοριακού μονοπατιού της ιντερφερόνης, η οποία παρατηρείται στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο⁸⁷.

Πίνακας 1. Συσχετισμοί ανάμεσα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs και διαφορετικές μορφές καρκίνου

Καρκίνος του θυρεοειδούς	Καρκίνος του μαστού	Οικογενής καρκίνος του μαστού	Γλοίομα	Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως	Καρκίνος του οισοφάγου	Ηπατο- κυτταρικό καρκίνωμα	Καρκίνος του στομάχου	miRNA
rs2910164 ↑								Pre-miR-146a
	rs11614913 ↑		rs11614913 ↓			rs11614913 ↑	rs11614913 ↑	miR-196a2
	rs3746444 ↑							miR-499
	rs6505162 ↑			rs6505162 ↑	rs6505162 ↓			miR-423
		rs895819 ↓						miR-27a
				rs228903 ↑				miR-492
				rs7372209 ↑				miR-26a-1
				rs531564 ↑	rs531564 ↑			miR-124-1
					rs213210 ↑			miR-219-1

↑: αυξημένος κίνδυνος, ↓: ελαττωμένος κίνδυνος^{72,77, 78, 79, 80, 81, 82, 83}

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε στόχους των miRNAs

Οι αλλαγές που οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί προκαλούν στην αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν θέσεις δέσμευσης των miRNAs αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολή στην αλληλουχία που καθορίζει τη συμπληρωματικότητα με τα αντίστοιχα miRNAs, και επομένως μεταβολή των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών της αντίδρασης σύζευξης μεταξύ miRNA-mRNA⁸⁸. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs μπορεί να καταστρέψουν μια προϋπάρχουσα θέση σύζευξης ή να δημιουργήσουν μια νέα θέση σύζευξης στο αγγελιοφόρο RNA-στόχο⁷¹. Καθώς οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στις θέσεις στόχους των miRNAs επηρεάζουν μόνο τα αντίστοιχα αγγελιοφόρα RNA-στόχους και τα μοριακά μονοπάτια στα οποία οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συμμετέχουν, αναμένεται ότι η συγκεκριμένη κατηγορία πολυμορφισμών θα έχει πιο περιορισμένα και ειδικά αποτελέσματα⁷⁰. Οι He και συνεργάτες έδειξαν ότι οι πολυμορφισμοί rs17084733 και rs3733542 στις περιοχές που κωδικοποιούν τις αλληλουχίες σύζευξης για τα miR-221, miR-222, miR-146a και miR-146b στο πρώτο-ογκογονίδιο c-Kit επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του miRNA και του αντίστοιχου αγγελιοφόρου RNA-στόχου στην περίπτωση του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς⁸⁹. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός rs17084733 προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή η οποία αυξάνει την ελεύθερη ενέργεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του miRNA και της αντίστοιχης θέσης σύζευξης, ενώ ο πολυμορφισμός rs3733542 προκαλεί υβριδοποίηση του miRNA με μια διαφορετική περιοχή⁸⁹.

Επιπλέον, μια *in silico* ανάλυση η οποία έκανε χρήση γονοτυπικών δεδομένων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών οι οποίοι σχετίζονται με τις θέσεις σύζευξης miRNAs

έδειξε ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2747648 που προκαλεί μια υποκατάσταση κυτοσίνης στη θέση της θυμίνης στον υποδοχέα οιστρογόνων-1 έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχυρότερης ικανότητας σύζευξης για το miR-453, η οποία οδηγεί σε μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού⁹⁰. Επίσης, η παρουσία του πολυμορφισμού rs17281995 στο γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο CD86, ο οποίος ελαττώνει την ικανότητα σύζευξης των miR-337, miR-582, και miR-200a* στην 3'-μη-μεταφραζόμενη περιοχή και συγχρόνως αυξάνει τη συγγένεια σύζευξης για τα miR-184 και miR-212, βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου⁹¹. Επιπρόσθετα, μια υποκατάσταση θυμίνης από γουανίνη στη συμπληρωματική θέση 6 του miRNAlet-7 (Let-7 complementary site) στην 3'-μη-μεταφραζόμενη περιοχή του ογκογονιδίου KRAS (Kirsten Rat Sarcome viral oncogene homolog) έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του KRAS και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε πληθυσμό καπνιστών⁹². Παρόμοιοι συσχετισμοί ανάμεσα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε θέσεις σύζευξης miRNAs και σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοηθειών έχουν βρεθεί στις περιπτώσεις του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου⁹³.

⁹⁴. Στην περίπτωση των αυτοάνοσων νόσων, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs8259 στην 3'-μη-μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της βασιγίνης (basigin), το οποίο κωδικοποιεί μια ανοσοσφαιρίνη τα επίπεδα της οποίας έχουν βρεθεί αυξημένα σε μονοπυρηνικά κύτταρα από δείγμα περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση, δημιουργεί μια νέα θέση σύζευξης για το miR-492⁹⁵. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα διαμεσολαβούμενη μέσω του miR-492 καταστολή των επιπέδων της βασιγίνης και μείωση του κινδύνου για την ανάπτυξη ψωρίασης σε όσους είναι φορείς του συγκεκριμένου πολυμορφισμού⁹⁵. Επιπρόσθετα, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs3027898 στη

σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 κινάση, η οποία αποτελεί στόχο του miR-146, έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ρευματοειδούς αρθρίτιδας⁹⁶.

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σχετιζόμενοι με miRNAs και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Ένας αριθμός μελετών έχει προσφάτως εστιάσει την προσοχή στην ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με miRNAs και στον κίνδυνο ανάπτυξης φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Μελέτες βιοπληροφορικής, οι οποίες πραγματοποίησαν ανάλυση φαινοκώδικα νόσου μέσω της δημιουργίας χαρτών miRNAs (MirMaps) στη βάση αναγνώρισης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, ανέδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε 81 μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με ασθένειες, 17 miRNAs, και αγγελιοφόρα RNAs τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες⁹⁷.

Δεδομένα για μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, τα οποία προήλθαν από μελέτες συσχέτισμού ολόκληρου του γονιδιώματος και τα οποία συσχετίστηκαν με miRNAs ανέδειξαν την ύπαρξη ενός φαινοκώδικα για τη νόσο του Crohn, ο οποίος αποτελείται από τους πολυμορφισμούς rs11209026, rs7807268, rs254215, rs2542151 στο miR-125, rs1180530 στο miR-519, και rs56908425 στο miR-181. Καθώς τα miRNAs miR-125, miR-181 και miR-519 έχουν τη δυνατότητα να στοχεύουν αγγελιοφόρα RNAs τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία συμμετέχουν στο μοριακό μονοπάτι της ιμφορτίνης (importin pathway), ενώ επιπλέον τα miRNAs miR-125 και miR-181 είναι δυνητικοί ρυθμιστές παραγόντων που συμμετέχουν στο μοριακό μονοπάτι του φλεγμονοσώματος, είναι πιθανό ότι μεταβολές σε αυτά τα μοριακά δίκτυα μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου του Crohn⁹⁷. Επιπλέον, μια μελέτη από τους Brest και συνεργάτες προέβλεψε *in silico* ότι ένας πολυμορφισμός, c.313 T>C, στην πρωτεΐνη M της σχετιζόμενης με την ανοσία οικογένειας της τριφωσφορικής γουανίνης (IRGM, immunity-related GTPase

family M protein), που αποτελεί στόχο για το miR-196, ελαττώνει τη συγγένεια σύζευξης του αγγελιοφόρου RNA που κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη για το miR-196, έχοντας σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση σε φλεγμαίνοντα ενδοθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου⁹⁸.

Εφαρμογή διαδοχικού συγγενικού καθαρισμού (tandem affinity purification) στη συνέχεια επιβεβαίωσε την αυξημένη συγγένεια του αλληλίου c.313 C>T για το miR-196 σε κύτταρα του εντερικού ενδοθηλίου, υποδηλώνοντας ότι στη νόσο του Crohn, ο c.313 T>C πολυμορφισμός έχει σαν αποτέλεσμα απορρύθμιση της ξενοφαγικής ανταπόκρισης που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη M της σχετιζόμενης με την ανοσία οικογένειας της τριφωσφορικής γουανίνης και ανάπτυξη αυξημένης ευπάθειας στη νόσο⁹⁸.

Σε μια άλλη μελέτη, οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί rs11614913, rs2910164, και rs3746444 μελετήθηκαν σε δείγματα βιοψιών παχέος εντέρου και δείγματα περιφερικού αίματος, στη βάση δημοσιευμένων δεδομένων που τους συσχετίζουν με διάφορες νόσους⁹⁹.

Ο φαινότυπος AG (αδενίνη-γουανίνη) του πολυμορφισμού rs3746444 στο miR-499 βρέθηκε ότι αυξάνει την ευπάθεια στην ελκώδη κολίτιδα. Ο συγκεκριμένος γονότυπος φαίνεται να σχετίζεται με εμφάνιση της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία, κολίτιδα εντοπιζόμενη στο αριστερό κόλο όπως και πανκολίτιδα, καθώς και με την εμφάνιση ανθεκτικών φαινοτύπων⁹⁹. Από την άλλη πλευρά, ο φαινότυπος AA (αδενίνη-αδενίνη) στον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs3746444 βρέθηκε ότι έχει αντίστροφη συσχέτιση με το συνολικό χρόνο νοσηλείας, την εξάρτηση από τα στεροειδή και την εμφάνιση ανθεκτικών φαινοτύπων της νόσου⁹⁹. Αν και το μέγεθος του δείγματος δεν ήταν ικανό για να αποκλείσει το σφάλμα τύπου II, οι συγγραφείς της συγκεκριμένης μελέτης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι γονότυποι rs3746444 AA φαίνεται να συσχετίζεται με μια πιο ήπια κλινική μορφή της νόσου⁹⁹. Πιο πρόσφατα δεδομένα για την επίδραση των

μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των miRNA-στόχων στην ανάπτυξη των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου προέρχονται από μια μελέτη των Zwiars και συνεργατών, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση στην ανάπτυξη ευπάθειας στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου του πολυμορφισμού rs10889677 στο γονίδιο του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 23 (IL-23R) σε δείγματα αίματος¹⁰⁰. Το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, ο οποίος έχει προηγουμένως ανιχνευθεί σε μελέτες συσχέτισμού ολόκληρου του γονιδιώματος¹⁰⁰.

Η παρουσία μια υποκατάστασης (αδενίνη στη θέση της θυμίνης) οδηγεί στη δημιουργία μιας παραλλαγής στην 3'-μη-μεταφραζόμενη περιοχή στο αγγελιοφόρο RNA του γονιδίου IL-23R η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δεσμευτικής ικανότητας για τα Let-7e και Let-7f, τα οποία είναι δύο miRNAs για τα οποία αρχικά έγινε πρόβλεψη in silico η οποία στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε in vitro ότι έχουν σαν στόχο το IL-23R¹⁰⁰.

Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχει γίνει εμφανές ότι μεταβολές του προτύπου έκφρασης των miRNAs αποτελούν ένα σημαντικό γεγονός στην πολύπλοκη διαδικασία η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη και τελικά στην κλινική εκδήλωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι σχετίζονται με miRNAs, οι οποίοι εμφανίζονται είτε σε στοιχεία του μηχανισμού επεξεργασίας των miRNAs είτε σε θέσεις συζευξης των miRNAs, οι οποίοι σχετίζονται με την ανάπτυξη φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, ενδέχεται να έχουν σημαντική επίδραση στην παθογένεση και στα κλινικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων νόσων. Μελέτες συσχετισμού ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν δώσει τις πρώτες ενδείξεις, ενώ μελέτες ασθενών-μαρτύρων έχουν χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια προκειμένου να φανεί ο συσχετισμός ανάμεσα σε γενετικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν miRNAs, τα οποία σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, και τα χαρακτηριστικά των νόσων αυτών. Παρ'όλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω *in vitro* τεκμηρίωση προκειμένου να επιβεβαιωθούν στατιστικά σημαντικοί συσχετισμοί και να επιτραπεί η διατύπωση μιας συνεκτικής, παθοφυσιολογικά τεκμηριωμένης υπόθεσης, σχετικά με το πώς οι σχετιζόμενοι με miRNAs μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί συμμετέχουν στην παθογένεση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Η κατασκευή γενετικών χαρτών των σχετιζόμενων με miRNAs μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών μπορεί να επιτρέψει την αναγνώριση συγκεκριμένων γενετικών υπογραφών για διαφορετικούς υπότυπους της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου του Crohn, δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη δυνατότητα για μια εξατομικευμένη προσέγγιση για τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Μια τέτοια προσέγγιση ενδέχεται να έχει

σημαντικές συνέπειες όχι μόνο για την ταξινόμηση και την πρόγνωση των νόσων αυτών, αλλά επίσης για το μελλοντικό σχεδιασμό και ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών. Η επιτυχής μετάφραση των αρχικών ευρημάτων της βασικής έρευνας στην κλινική πράξη, μέσα σε ένα γενικότερο αντίστοιχο πλαίσιο, έχει τη δυνατότητα να αλλάξει ριζικά τη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου στο μέλλον.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Μελέτη συσχετισμού των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε miRNAs σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου

Εισαγωγή

Τα miRNAs ανήκουν στην ετερογενή οικογένεια των νουκλεϊκών οξέων τα οποία χαρακτηρίζονται ως μικρού μήκους, μη-κωδικά RNAs (short, non-coding RNAs), τα οποία εκδηλώνουν περιορισμένη ή καμία δυνατότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών¹⁰¹. Τα miRNAs είναι μια ομάδα μικρών (μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων), μη-κωδικών RNAs τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων με τα αντίστοιχα αγγελιοφόρα RNA-στόχους στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο σχάση του αγγελιοφόρου RNA και καταστολή της μετάφρασης^{102, 103}. Έχει προταθεί ότι τα miRNAs έχουν δεκάδες ή εκατοντάδες στόχους¹⁰⁴, και ότι ένας σημαντικός αριθμός διαφορετικών βιολογικών διεργασιών ρυθμίζεται από αυτά, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του κυτταρικού θανάτου, της αντίστασης στο stress, και της διαφοροποίησης των κυττάρων του εντερικού ενδοθηλίου^{105, 106}. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι η διαταραχή του προτύπου έκφρασης των miRNAs πιθανώς να συμμετέχει στην παθογένεση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου^{107, 108}. Αλλαγές στην αλληλουχία των miRNAs, μπορεί να μεταβάλλουν την έκφραση των miRNAs ή/και την ωρίμανση τους και έχουν συσχετισθεί με την παθογένεση διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων αρκετών κακοηθειών^{109, 110, 111}. Μελέτες συσχετισμού ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για τη μελέτη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs καθώς και

των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε θέσεις στόχους των miRNAs στα αγγελιοφόρα RNAs¹¹². Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι rs11614913 και rs2910164 στην pre-miRNA περιοχή των miRNAs miR-196a2 και miR-146a, αντίστοιχα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μια γενετική παραλλαγή στο miR-196a2 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διαφόρων μορφών καρκίνου, αλλά διαφορετικές μελέτες δείχνουν αντικρουόμενες συσχετίσεις^{113, 114, 115, 116}. Επιπλέον, το miR-196a2 είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων miR-196, το οποίο υπερεκφράζεται στο φλεγμαίνον εντερικό ενδοθήλιο των ασθενών με νόσο του Crohn και οδηγεί σε ελάττωση της έκφρασης του προστατευτικού αλληλίου c.313C της πρωτεΐνης M της σχετιζόμενης με την ανοσία οικογένειας της τριφωσφορικής γουανίνης (IRGM, immunity-related GTPase family M protein), αλλά όχι και του αλληλίου c.313T το οποίο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο. Η επακόλουθη απώλεια της ρύθμισης της έκφρασης της σχετιζόμενης με την ανοσία πρωτεΐνης M της οικογένειας της τριφωσφορικής γουανίνης διαταράσσει τον έλεγχο της ενδοκυτταρικής αναπαραγωγής του σχετιζόμενου με τη νόσο του Crohn προσκολλητικού-διηθητικού στελέχους του *Escherichia coli* (AIEC, Adherent- Invasive *Escherichia Coli*) μέσω αυτοφαγίας¹¹⁷. Κατ' αυτόν τον τρόπο μπορεί να υποτεθεί ότι ο πολυμορφισμός rs11614913 ενδέχεται να επηρεάζει περαιτέρω τη σύζευξη του miR-196 με τη σχετιζόμενη με την ανοσία πρωτεΐνη M της οικογένειας της τριφωσφορικής γουανίνης, και επομένως την ανάπτυξη ευπάθειας στη νόσο του Crohn¹¹⁷. Ο πολυμορφισμός rs2910164 στο miR-146a έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και καρκίνου της στοματικής κοιλότητας^{118, 119, 120, 121}. Είναι επίσης γνωστό ότι το miR-146a συμμετέχει στη φυσική ανοσία μέσω ρύθμισης της οξείας φλεγμονώδους απάντησης διαμέσου αναγνώρισης παθογόνων με τη διαμεσολάβηση υποδοχέων που ομοιάζουν με τους υποδοχείς Toll σε μονοκύτταρα ή μακροφάγα. Καθώς οι υποδοχείς που

ομοιάζουν με τους υποδοχείς Toll συμμετέχουν στην παθογένεση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, ο πολυμορφισμός rs2910164 ενδέχεται να διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη ευπάθειας για τις συγκεκριμένες νόσους⁶¹. Επιπροσθέτως, το miR-146a ενδέχεται να ρυθμίζει την έκφραση της σχετιζόμενης με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 κινάσης και του σχετιζόμενου με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων παράγοντα 6, οι οποίοι είναι ρυθμιστές του μοριακού μονοπατιού του παράγοντα νέκρωσης όγκων-άλφα¹²². Παρ' όλα αυτά, ο συσχετισμός μεταξύ των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα miRNAs και των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου εξακολουθεί να παραμένει άγνωστος. Οι Okubo και συνεργάτες διεξήγαγαν μια μελέτη συσχετισμού συχνών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών οι οποίοι σχετίζονται με miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των rs11614913 και rs2910164, στην ελκώδη κολίτιδα¹²³. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης υποδηλώνουν ότι ο πολυμορφισμός rs11614913 στο miR-196a2 ενδέχεται να επηρεάζει τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ελκώδους κολίτιδας¹²³. Καθώς οι λειτουργικές μεταβολές των miRNAs οι οποίες προκαλούνται από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς ενδέχεται να συμμετέχουν στην παθογένεια των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, ο σκοπός της μελέτης είναι να διερευνήσει το κατά πόσο οι πολυμορφισμοί rs2910164 και rs11614913 στα miR-146a και miR-196a2, αντιστοίχως, καθορίζουν την ανάπτυξη ευπάθειας στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου.

Υλικά και μέθοδοι

Πληθυσμός της μελέτης

Έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος από 242 ασθενείς με νόσο του Crohn, 210 ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και 300 υγιείς μάρτυρες οι οποίοι ήταν ταιριασμένοι κατά φύλλο και ηλικία. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε στα νοσοκομεία Αρεταίειο και Τζάνειο. Η διάγνωση της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας βασίστηκε σε κοινώς αποδεκτά και καθιερωμένα κλινικά, ενδοσκοπικά, ακτινολογικά και ιστολογικά κριτήρια^{124, 125, 126}. Πριν την έναρξη της μελέτης οι επιτροπές ηθικής στα συμμετέχοντα κέντρα ενέκριναν το ερευνητικό πρωτόκολλο, ενώ όλοι οι συμμετέχοντες ήταν ενημερωμένοι για τη μελέτη. Τα κλινικά χαρακτηριστικά για κάθε ομάδα ασθενών αναλύονται στη συνέχεια, ενώ μια περιληπτική παρουσίαση δίνεται στον πίνακα 2. Πιο συγκεκριμένα, από τους 242 ασθενείς με νόσο του Crohn, οι 108 ήταν άντρες και οι 134 γυναίκες, με μέση ηλικία τα 51,34 έτη (+/- 12,47). 83 ασθενείς (34,3%) είχαν νόσο εντοπισμένη στον ειλεό, 25 ασθενείς (10,33%) είχαν νόσο εντοπισμένη στο παχύ έντερο, ενώ 134 ασθενείς (55,37%) είχαν νόσο που εντοπιζόταν ταυτόχρονα στο λεπτό και στο παχύ έντερο. Όσον αφορά τη συμπεριφορά της νόσου, 156 ασθενείς (62,4%) είχαν φλεγμονώδη νόσο, 68 ασθενείς (28,1%) είχαν ινοστενωτική μορφή της νόσου, ενώ 23 ασθενείς (9,5%) είχαν αναπτύξει συρίγγια. Στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, η αναλογία αντρών προς γυναικών ήταν 101 προς 109, αντιστοίχως, με μέση ηλικία τα 50,89 έτη (+/- 13,42). Όσον αφορά την έκταση της νόσου, 114 ασθενείς (54,28%) είχαν πανκολίτιδα, 58 ασθενείς (27,62%) είχαν κολίτιδα εντοπισμένη στο αριστερό κόλον, ενώ 38 ασθενείς (18,09%) έπασχαν από πρωκτίτιδα. Στην

ομάδα ελέγχου, η αναλογία άντρες προς γυναίκες ήταν 141 προς 159, αντίστοιχα, με μέση ηλικία τα 48,65 έτη (+/- 14,32).

Πίνακας 2. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

<i>Χαρακτηριστικά</i>	<i>Νόσος του Crohn (n=242)</i>	<i>Ελκώδης κολίτιδα (n=210)</i>	<i>Ομάδα ελέγχου(n=300)</i>
Ηλικία	51,34 +/- 12,47	50,89 +/- 13,42	48,65 +/- 14,32
Φύλλο: Άντρες/Γυναίκες	108/134	101/109	141/159
Έκταση της νόσου(%)			
Πανκολίτιδα		114 (54,28)	
Αριστερό κόλον		58 (27,62)	
Πρωκτίτιδα		38 (18,09)	
Εντόπιση της νόσου (%)			
Ειλεός	83 (34,3)		
Παχύ έντερο	25 (10,33)		
Πανκολίτιδα	134 (55,37)		
Συμπεριφορά της νόσου (%)			
Φλεγμονώδης	151 (62,4)		
Ινοστενωτική	68 (28,1)		
Συριγγοποιός	23 (9,5)		

Γονοτυπική ανάλυση

Γενομικό DNA απομονώθηκε με χρήση του NucleoSpinBloodKit (Macherey-Nagel, GmbH&Co, KG, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το σύστημα έχει κατασκευαστεί για την απομόνωση γενομικού DNA από αίμα, ορό, πλάσμα και σωματικά υγρά, ενώ είναι κατάλληλο για χρήση τόσο με φρέσκα όσο και με κατεψυγμένα δείγματα¹²⁷. Η μέθοδος βασίζεται σε μια μεμβράνη πυριτίου η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή δεσμευτική ικανότητα για νουκλεϊκά οξέα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να πολλαπλασιαστούν με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Με τη χρήση του συστήματος μπορούν να απομονωθούν 4-6 µg καθαρού γενομικού DNA από 200 µL αίματος. Η επώαση του δείγματος γίνεται στους 70 βαθμούς Κελσίου σε διάλυμα που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις χαοτροπικών ιόντων, τα οποία διασπούν τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια του νερού, και πρωτεΐνάσης K, η οποία κυρίως διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς δίπλα στην καρβοξυλική ομάδα των αλιφατικών και αρωματικών αμινοξέων^{128, 129}. Η προσθήκη αιθανόλης στο προϊόν της λύσης των κυττάρων που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία οδηγεί στη δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών που επιτρέπουν τη δέσμευση των νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη πυριτίου των στηλών του NucleoSpinBloodKit. Η διαδικασία αυτή είναι δυνητικά αναστρέψιμη, ενώ η έκπλυση με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα επιτρέπει την απομάκρυνση προσμίξεων. Το καθαρό γενομικό DNA εκλούεται τελικά κάτω από συνθήκες χαμηλού ιονισμού σε ένα ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα. Η όλη διαδικασία συνήθως απαιτεί λιγότερο από 30 λεπτά¹²⁷. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί rs11614913 και rs2910164 καθορίστηκαν μέσω πολυμορφισμών μήκους τμημάτων περιορισμού βασισμένων σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-based Restriction Fragment

Length Polymorphism assays). Η παραπάνω μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση πολυμορφισμών σε ομόλογα τμήματα DNA με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού (restriction endonucleases). Τα θραύσματα DNA τα οποία προκύπτουν μετά την πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού χαρακτηρίζονται από διαφορετικό μήκος στην περίπτωση ύπαρξης γενετικών παραλλαγών, όπως οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, και μπορούν να διαχωριστούν με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε γέλη¹³⁰. Η σύζευξη της μεθόδου με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του DNA που πρόκειται να μελετηθούν, δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό πειραματικό εργαλείο το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση παραλλαγών του γονιδιώματος οι οποίες είναι ειδικές κατά είδος¹³¹. Μια συγκριτική παρουσίαση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της συγκεκριμένης μεθόδου όσον αφορά της εφαρμογή της για την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών παρατίθεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου πολυμορφισμών μήκους τμημάτων περιορισμού βασισμένων σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης¹³¹

Πλεονεκτήματα
• Χαμηλό κόστος • Απλός πειραματικός σχεδιασμός • Δυνατότητα ανίχνευσης τόσο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών όσο και μικρο-εισαγωγών/διαγραφών (microindels) • Δεν απαιτεί τη χρήση ακριβού πειραματικού εξοπλισμού • Χαμηλή καμπύλη εκμάθησης

- Εφαρμόσιμη σε μικρή κλίμακα

Μειονεκτήματα

- Προϋποθέτει ότι μια γενετική παραλλαγή δημιουργεί ή καταργεί μία θέση που μπορεί να αναγνωριστεί από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού
- Υψηλό κόστος για κάποιες από τις ενδονουκλεάσες περιορισμού
- Δεν επιτρέπει την ακριβή γονοτυπική χαρτογράφηση σε περίπτωση ύπαρξης περισσότερων της μίας νουκλεοτιδικών παραλλαγών στη θέση που αναγνωρίζεται από την ενδονουκλεάση περιορισμού
- Σχετικά χρονοβόρα – μεσολάβηση σημαντικού χρονικού διαστήματος από την έναρξη του πειράματος μέχρι την ανάλυση των αποτελεσμάτων
- Δεν ενδείκνυται για ανάλυση μαζικού ελέγχου (high-throughput screening)

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) ήταν οι ακόλουθες:

rs11614913F: 5' CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA 3' και rs11614913R: 5'

CGAAAACCGACTGATGTAACCTCCG 3', και rs2910164F: 5' CATGGGTTGTGTCAGTGTGTCAGAGCT

3', και rs2910164R: 5' TGCCTTCTGTCTCCAGTCTTCCAA 3' (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Ακολουθίες των εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

rs11614913F	5' CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA 3'
rs11614913R	5' CGAAAACCGACTGATGTAACCTCCG 3'
rs2910164F	5' CATGGGTTGTGTCAGTGTGTCAGAGCT 3'
rs2910164R	5' TGCCTTCTGTCTCCAGTCTTCCAA 3'

Οι συνθήκες του κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τον πολυμορφισμό rs11614913 αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 94 °C, για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 35 κύκλους στους 94 °C για 1 λεπτό, στους 63 °C για 1 λεπτό, στους 72 °C για 1 λεπτό, και ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια θραύσματα PCR (αμπλικόνια –amplicons) μεγέθους 149 ζευγών βάσεων υποβλήθηκαν σε πέψη περιορισμού (restriction digestion) με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού MspI. Το ένζυμο MspI αποτελεί ισοσχιζομερές της περιοριστικής ενδονουκλεάσης HpaII και αναγνωρίζει την ακολουθία 5' – CCGG ανεξάρτητα από την παρουσία μεθυλομάδας σε αυτή την θέση^{132, 133}. Το αλληλίο T απέδωσε ένα προϊόν μεγέθους 149 ζευγών βάσεων, ενώ το αλληλίο C απέδωσε δύο προϊόντα μεγέθους 125 και 24 ζευγών βάσεων, αντιστοίχως. Οι συνθήκες του κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τον πολυμορφισμό rs2910164 αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 94 °C, ακολουθούμενο από 30 κύκλους στους 94 °C για 1 λεπτό, στους 62 °C για 1 λεπτό, στους 72 °C για 1 λεπτό, και ένα τελικό στάδιο επέκτασης για 5 λεπτά στους 72 °C. Στη συνέχεια, τα θραύσματα PCR μεγέθους 147 ζευγών βάσεων υποβλήθηκαν σε πέψη περιορισμού με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού SacI, η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAGCTC-3'¹³⁴. Το αλληλίο C απέδωσε δύο προϊόντα μεγέθους 122 και 25 ζευγών βάσεων, αντίστοιχα, ενώ το αλληλίο G απέδωσε ένα προϊόν μεγέθους 147 ζευγών βάσεων. Η ανάλυση των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε ζελ αγαρόζης 3% και η απεικόνιση έγινε με χρήση υπεριώδους ανοσοφθορισμού μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide).

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του πακέτου λογισμικού SPSS για Windows (SPSSInc, Chicago, IL, USA). Η ισχύς της μελέτης ασθενών-μαρτύρων υπολογίστηκε με χρήση του λογισμικού <http://sampsize.sourceforge.net/iface/s3.html3#cc>. Η εκτιμώμενη ισχύς ήταν περίπου 64,02% για τον πολυμορφισμό rs2910164 και 10,59% για τον πολυμορφισμό rs11614913. Η σύγκριση της συχνότητας των μεταλλάξεων έγινε με χρήση του τεστ χ^2 . Ο υπολογισμός των λόγων συμπληρωματικών πιθανοτήτων (odds ratios) και των κατα 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, 95% CI) έγινε με χρήση του αντιστοίχου χ^2 τεστ κατανομής. Οι τιμές P οι οποίες ελήφθησαν ήταν αμφίπλευρες και καθορίστηκε να θεωρηθούν στατιστικά σημαντικές στο επίπεδο $P < 0,005$. Η ισορροπία κατά Hardy-Weinberg επιβεβαιώθηκε μέσω υπολογισμού των αναμενόμενων συχνοτήτων και τιμών και ελέγχθηκε ξεχωριστά σε ασθενείς και σε υγιείς μάρτυρες με χρήση του τεστ χ^2 για έλεγχο καλής προσαρμογής (goodness-of-fit χ^2 test).

Αποτελέσματα

Οι συχνότητες των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών rs11614913 και rs2910164 παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6. Σε όλες τις περιπτώσεις οι καταγεγραμμένες συχνότητες των γονότυπων ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg. Ο γονότυπος CC για τον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs2910164 στο miRNA miR-146a και οι συχνότητες του αλληλίου C ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα ασθενών με νόσο του Crohn σε σύγκριση με την ομάδα υγιών μαρτύρων ($P < 0,0001$, $OR = 4,57$, 95%CI: 2,11-9,92 και $P < 0,0001$, $OR = 2,20$, 95%CI: 1,66-2,91, αντίστοιχα). Ο γονότυπος CC του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs2910164 και το αλληλίο C βρέθηκε ότι δε σχετίζονταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την εμφάνιση ελκώδους κολίτιδας ($P = 0,93$, $OR = 0,95$, 95%CI: 0,34-2,68 και $P = 0,69$, $OR = 1,08$, 95%CI: 0,78-1,49, αντίστοιχα). Επίσης δε διαπιστώθηκαν διαφορές στο γονότυπο και στη συχνότητα των αλληλίων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs11614913 του miRNA miR-196a2 μεταξύ ασθενών με ελκώδη κολίτιδα ή νόσο του Crohn και των υγιών μαρτύρων της ομάδας ελέγχου.

Όσον αφορά την ελκώδη κολίτιδα, η παρουσία του γονότυπου TT και του T αλληλίου φαίνεται να ασκεί προστατευτική επίδραση ως προς την ανάπτυξη ελκώδους κολίτιδας ($P = 0,019$, $OR = 0,048$, 95%CI: 0,27-0,86 και $P = 0,008$, $OR = 0,69$, 95%CI: 0,53-0,90, αντίστοιχα).

Η παρουσία των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών rs11614913 και rs2910164 δε φάνηκε να επηρεάζει τα χαρακτηριστικά της νόσου, τόσο στην περίπτωση της ελκώδους κολίτιδας όσο και στην περίπτωση της νόσου του Crohn.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα, συχνότητες και βαθμός στατιστικής σημαντικότητας για τον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs2910164 στο miR-164a

rs2910164	Γονότυποι					Αλληλία			
	GG	GC	CC	CC γονοτυπικές συχνότητες	Διαγώνιο πηλίκιο	G	C	Συχνότητα του αλληλίου C (%)	Διαγώνιο πηλίκιο
Νόσος του Crohn	105	113	24	9,92	4,57(α)	326	161	33,26	2,20(α)
Ελκώδης κολίτιδα	126	78	6	2,86	0,95	330	80	19,05	1,08
Ομάδα ελέγχου	200	90	10	3,33		490	110	18,33	

α: $P < 0,0001$ ως προς την ομάδα ελέγχου

Πίνακας 6. Αποτελέσματα, συχνότητες και βαθμός στατιστικής σημαντικότητας για τον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs11614913 στο miR-196a2

rs11614913	Γονότυποι					Αλληλία			
	CC	CT	TT	TT γονοτυπικές συχνότητες	Διαγώνιο πηλίκιο	C	T	Συχνότητα του αλληλίου T (%)	Διαγώνιο πηλίκιο
Νόσος του Crohn	83	108	51	21,07	1,38	274	210	43,39	1,15
Ελκώδης κολίτιδα	98	91	21	10	0,48(β)	287	133	31,67	0,69(β)
Ομάδα ελέγχου	108	144	48	16		360	240	40	

β: $P < 0,05$ ως προς την ομάδα ελέγχου

Συζήτηση

Προσφατες μελέτες αναφέρουν ότι τα miRNAs είναι σημαντικά στοιχεία του γενετικού υλικού τα οποία ενδεχομένως να συμμετέχουν στη ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος των miRNAs στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Διάφοροι ερευνητές έχουν διαπιστώσει πρόσφατα διαταραχές του προτύπου έκφρασης των miRNAs στην ελκώδη κολίτιδα και τη νόσο του Crohn^{65, 69, 107, 135}. Επίσης, εκτός από τις μεταβολές της έκφρασης των miRNAs, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί οι οποίοι επηρεάζουν τη βιογένεση των miRNAs και την αναγνώριση των στόχων τους αντιπροσωπεύουν εν δυνάμει λειτουργικές παραλλαγές οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση πολλών γονιδίων (τα οποία ρυθμίζονται από τα αντίστοιχα miRNAs) και να συνεισφέρουν σε παθολογικές διαδικασίες όπως η καρκινογένεση και η φλεγμονή^{99,109, 110, 11, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119,120, 121}. Ο κρίσιμος ρόλος των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε miRNAs τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη νόσων επισημάνθηκε από τον Glinsky^{97, 112}. Ο Glinsky χρησιμοποίησε χάρτες miRNAs ομόλογης ακολουθίας (SNP sequence homology-guided miRNA maps, MirMaps) προκειμένου να αναγνωρίσει στοιχεία ομοφωνίας (consensus components) μιας ομάδας ασθενών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Crohn, και να περιγράψει έναν φαινοκώδικα αποτελούμενο από 81 μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε 17 miRNAs, που έχουν σαν στόχους γονίδια σχετιζόμενα με το φλεγμονόσωμα (inflammasome-related genes)⁹⁷. Οι Jazdzewski και συνεργάτες αναφέρουν ότι οι πολυμορφισμοί στην αλληλουχία του miR-146a προκαλούν την επιπλέον δημιουργία ώριμων miRNAs από την έλικα επιβάτη (passenger strand) του πρόδρομου (precursor) miRNA, τα οποία ενδέχεται να είναι

λειτουργικώς σημαντικά εξαιτίας της διαφορετικής επιλογής στόχων που η δημιουργία τους συνεπάγεται¹³⁶.

Παλιότερες μελέτες έδειξαν ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2910164 στο pre-miR-146a (G>C) σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με αρκετές νόσους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη, του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς, και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου^{137, 138, 139}. Στη μελέτη που παρουσιάζουμε βρήκαμε ότι η παρουσία του C αλληλίου του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs2910164 στο γονίδιο που κωδικοποιεί το miR-146a, σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την ανάπτυξη ευπάθειας στη νόσο του Crohn, ενώ δε διαπιστώθηκε η ύπαρξη συσχετισμού μεταξύ της παρουσίας του C αλληλίου και της ανάπτυξης ευπάθειας στην ελκώδη κολίτιδα. Όσον αφορά την ελκώδη κολίτιδα, τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα οποία έχουν παρουσιαστεί από τους Okubo και συνεργάτες⁹⁹. Για τη νόσο του Crohn, από όσα είναι δυνατό να γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την πιθανή συσχέτιση μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σχετιζομένων με microRNAs και της νόσου του Crohn. Παρ' όλα αυτά, καθώς η έκφραση του miR-146a δεν είχε βρεθεί διαταραγμένη στην περίπτωση των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου μέχρι τη στιγμή της δημοσίευσης των αποτελεσμάτων μας, αρχικά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2910164 ενδέχεται να μην ασκεί σημαντική επίδραση στην αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης. Επόμενες μελέτες όμως έδειξαν ότι τα επίπεδα του ώριμου miR-146a είναι αυξημένα σε δείγματα κολονοσκοπικών βιοψιών του παχέονος εντέρου από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα¹⁴⁰. Μελέτες σε πειραματόζωα επίσης έδειξαν ότι το miR-146a ενδέχεται να ρυθμίζει τους ανοσολογικούς μηχανισμούς του εντερικού ενδοθηλίου και τη λειτουργία του εντερικού βλεννογονικού φραγμού μέσω καταστολής γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις παραπάνω

διαδικασίες¹⁴⁰. Σε επίμυες στους οποίους η έκφραση του miR-146a έχει κατασταλεί έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση γονιδίων της ομάδας Reg3 της τύπου Γ αντιμικροβιακής λεκτίνης, όπως τα Reg3α, Reg3β και Reg3γ, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν βακτηριοκτόνο δράση εναντίον Gram-αρνητικών βακτηρίων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του εντερικού βλεννογονικού φραγμού^{140, 141, 142}. Στο λεπτό έντερο της ίδιας ομάδας πειραματόζων διαπιστώθηκε επίσης αυξημένη έκφραση του αμυλοειδούς του ορού α1 (Serum amyloid α1), ενός γονιδίου που προάγει τη φλεγμονώδη διαδικασία και που επίσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με αντιβακτηριακή δράση, και που ενδέχεται να παρέχει προστασία από την ανάπτυξη κολίτιδας. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι επίμυες στους οποίους η έκφραση του miR-146a έχει κατασταλεί είναι ανθεκτικοί στην ανάπτυξη κολίτιδας μετά από χορήγηση θειϊκής νατριούχου δεξτράνης (dextrane sulfate sodium-induced colitis), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση για το ρόλο του miR-146a στην ανάπτυξη των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου¹⁴⁰. Προς το παρόν, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ένας μικρός αριθμός microRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-155, miR-181a, miR-17-92, miR-146 και miR223, ενδέχεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη αρκετών νόσων οι οποίες σχετίζονται με διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το πρωτοπαθές σύνδρομο Sjogren και η ψωρίαση¹⁴³. Το miR-146a μπορεί να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου του Crohn, καθώς επάγεται από κυτοκίνες που συμμετέχουν στο μοριακό μονοπάτι της φλεγμονώδους απάντησης/αντίδρασης και μικροβιακά συστατικά (συμπεριλαμβανομένων λιποπολυσακχαριτών), και θα μπορούσε να δρα ως μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης κατά την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης, και κατ' αυτόν τον τρόπο να επηρεάζει την φυσιολογική ανοσία και αυτοανοσία¹⁴⁴. Είναι γενικά γνωστό ότι το miR-196 υπερεκφράζεται στο φλεγμονώδες

εντερικό ενδοθήλιο των ασθενών με νόσο του Crohn¹¹⁷. Ο γενετικός πολυμορφισμός rs11614913 στο miR-196a2 μεταβάλλει την έκφραση του ώριμου miR-196a2 και τη δεσμευτική ικανότητα του αγγελιοφόρου RNA-στόχου⁷⁸. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η παραλλαγή rs11614913 σχετίζεται σε σημαντικό βαθμό με την ανάπτυξη ευπάθειας σε διάφορες μορφές καρκίνου¹¹⁴. Στη δική μας μελέτη δε διαπιστώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης με την ανάπτυξη ευπάθειας ούτε για τη νόσο του Crohn, ούτε και για την ελκώδη κολίτιδα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα οποία έχουν παρουσιασθεί από τους Okubo και συνεργάτες⁹⁹. Περιληπτικά, τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν ότι η παρουσία του πολυμορφισμού rs2910164 στο miR-146a ενδέχεται να αυξήσει της ευπάθεια στη νόσο του Crohn. Καθώς υπάρχουν περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν τη σχέση ανάμεσα σε μονοκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με miRNAs και τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα.

Περίληψη

Διαταραχή του προτύπου έκφρασης και δομικές μεταβολές των miRNAs θεωρείται ότι συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία και στην ανάπτυξη του καρκίνου. Έχει προταθεί ότι συχνοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε miRNAs συσχετίζονται με την ανάπτυξη ευπάθειας σε αρκετές νόσους. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε τους συσχετισμούς μεταξύ δύο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (rs2910164 και rs11614913 στα miRNAs miR-146a και miR-196a2, αντιστοίχως), και το κίνδυνο ανάπτυξης φλεγμονωδών νόσων του εντέρου σε ένα ελληνικό πληθυσμό. Έγινε γονοτυπική ανάλυση των πολυμορφισμών rs2910164 και rs11614913 σε 242 ασθενείς με νόσο του Crohn, 210 ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, και 300 υγιείς μάρτυρες. Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο γονότυπο ή στην κατανομή των αλληλίων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs2910164 μεταξύ της ομάδας των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα και της ομάδας ελέγχου. Παρ' όλα αυτά, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν στο γονότυπο ή στην κατανομή των αλληλίων του πολυμορφισμού rs2910164 μεταξύ της ομάδας των ασθενών με νόσο του Crohn και της ομάδας ελέγχου ($P < 0,0001$ και $P < 0,0001$, αντιστοίχως). Όσον αφορά στον πολυμορφισμό rs11614913, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο γονότυπο ή στην κατανομή των αλληλίων μεταξύ της ομάδας των ασθενών με νόσο του Crohn και της ομάδας ελέγχου, ενώ ο γονότυπος TT και το T αλληλίο φαίνεται ότι ασκούν προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης ελκώδους κολίτιδας ($P = 0,017$ και $P = 0,007$, αντιστοίχως). Η παρουσία των πολυμορφισμών rs2910164 και rs11614913 δεν επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός rs2910164 διαδραματίζει ένα βασικό ρόλο στην ανάπτυξη γενετικής ευπάθειας για τη νόσο του Crohn αλλά όχι και για την ελκώδη κολίτιδα, ενώ ο πολυμορφισμός rs11614913 ασκεί

προστατευτική επίδραση απέναντι στην ανάπτυξη ελκώδους κολίτιδας, τουλάχιστον στον πληθυσμό που μελετήσαμε. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω ευρήματα σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών, καθώς και σε ασθενείς με διαφορετική εθνική καταγωγή

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1 Evers BM. Small intestine, in Sabiston Textbook of Surgery, 1278-1332. 18th edition, 2008, Saunders Elsevier

2 Otterson MF, Binion D, Karp SJ et al. Small intestine, in Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 989-1024. 6th edition, Saunders Elsevier, 2007

3 Skandalakis JE, Kingsnorth AN, Colborn GL et al. Large Intestine and anorectum, in Skandalakis' Surgical Anatomy. The Embryologic and Anatomic basis of Modern Surgery, 863-1002, Vol 2. Athens: Paschalidis Medical Publications, 2004

4 O'Rahilly R, Müller F. The digestive system, 229-285, in Human Embryology & Teratology. 3rd edition. New York: Wiley-Liss 2001

5 Αγγελοπούλου Ρ. Ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος, 299-311. Εμβρυολογία II, Ιατρικές Εκδόσεις Π Χ Πασχαλίδης, Αθήνα 1993

6 Stevens A and Lowe J. Ο πεπτικός σωλήνας, 156-175. Ιστολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π Χ Πασχαλίδης, Αθήνα 1993

7 Gelberg HB. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicol Pathol* 2014;42:54-66

8 Gonzalea AM, Perryer DG. Magscope & University of Birmingham

9 Husebye E. The patterns of small bowel motility: physiology and implications in organic disease and functional disorder. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:141-161

10 Thomson AB, Keelan M, Thiesen A et al. Small bowel review: normal physiology part 1. *Dig Dis Sci* 2001;46:2567-2587

11 Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr* 1992;55(1 Suppl):299S-308S

12 Nordgaard I, Mortensen PB. Digestive processes in the human colon. *Nutrition* 1995;11:37-45

13 Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785-1794

14 Hugot JP Genetic origin of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:S11-S15

15 Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001;120:622-635

16 Wei B, Pei G. microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol* 2010;7:175-181

- 17 Baumgaart DC and Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;380:1590-1605
- 18 Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:968–976
- 19 Franke A, McGovern DP, Barrett JC et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42:1118–1125
- 20 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:13780–13785
- 21 Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*. 2010;139:1844–1854 (e1.)
- 22 Buisine, MP, Desreumaux, P, Debailleul, V et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:24–32
- 23 Weber, CR, Raleigh, DR, Su, L et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem*. 2010;285:2037–12046

- 24 Barreau, F, Madre, C, Meinzer, U et al. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut*. 2010;59:207–217
- 25 Cadwell, K, Liu, JY, Brown, SL et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456:259–263
- 26 Niess, JH, Brand, S, Gu, X et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307:254–258
- 27 Baumgart, DC, Metzke, D, Guckelberger, O et al. Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 2011;166:46–54
- 28 Baumgart, DC, Thomas, S, Przesdzing, I et al. Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;157:423–436
- 29 Baumgart, DC, Metzke, D, Schmitz, J et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 2005;54:228–236
- 30 Ordas I, Eckmann L, Talamini M et al. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;380:1606-1619

- 31 Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006;130:1588-1594
- 32 Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA et al. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135:781-786
- 33 Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;41:216-220
- 34 Anderson CA, Boucher G, Lees CW et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246-252
- 35 Barrett JC, Lee JC, Lees CW et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41:1330-1334
- 36 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54
- 37 Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET et al. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun* 2010;16:93-103

38 Shen X, Shi R, Zhang H et al. The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion* 2010;81:69-77

39 Heller F, Florian P, Bojarski C et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550-564

40 Heller F, Fromm A, Gitter AH et al. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol* 2008;1:S58-S61

41 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002;17:629-638

42 Murch SH, Lamkin VA, Savage MO et al. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991;32:913-917

43 Braegger CP, Nicholls S, Murch SH et al. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339:89-91

44 Masuda H, Iwai S, Tanaka T, Hayakawa S. Expression of IL-8, TNF-alpha and IFN-gamma mRNA in ulcerative colitis particularly in patients with inactive phase. *J Clin Lab Immunol* 1995;46:111-123

- 45 Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW et al. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 1999;44:387-393
- 46 Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B et al. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:847-855
- 47 Rahman A, Fahlgren A, Sundstedt C et al. Chronic colitis induces expression of β -defensins in murine intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2011;163:123-130
- 48 Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474(7351):307-317
- 49 Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J* 2008;14:1-6
- 50 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269
- 51 Agami R. MicroRNAs, RNA binding proteins and cancer. *Eur J Clin Invest* 2010; 40:370-374
- 52 Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in MicroRNA delivery. *J Control Release* 2010;172:962-974

53 Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies.

Trends Cell Biol 2015;25:137-147

54 Yao S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and

differentiation. *Biol Proced Online* 2016;18:8doi: 10.1186/s12575-016-0037-y. eCollection

2016

55 Leaman D, Chen PY, Fak J et al. Antisense mediated depletion reveals essential and

specific functions of microRNAs in Drosophila development. *Cell* 2005;121:1097-1108

56 Chen CZ, Li L, Lodish HF et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.

Science 2004;303:83-86

57 Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in

zebrafish. *Science* 2005;308:833-838

58 Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and

therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012;4:143-159

59 Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system.

Immunology 2009;127:291-298

60 Rodriguez, Vigorito E, Clare S et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal

immune function. *Science* 2007;316:608-611

61 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12481-12486

62 Dai Y, Huang YS, Tang M et al. Microarray analysis of microRNA-146 in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2007;16:939-946

63 Nakasa T, Miyaki S, Okubo A et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58:1284-1292

64 Sonkoly E, Wei T, Janson PC et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PloS One* 2007;2:e610

65 Wu F, Zikusoka M, Trindade A et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 α . *Gastroenterology* 2008;135:1624-1635

66 Sands BE, Kaplan GG. The role of TNF α in ulcerative colitis. *J Clin Pharmacol* 2007;47:930-941

67 Fasseu M, Treton X, Guichard C et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PloS One* 2010;5:e13160

68 Scharl M, Rogler G. Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:301-309

69 Wu F, Zhang S, Dassopoulos T et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1729-1738

70 Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M et al. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med* 2012;16:8-21

71 Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10:389-402

72 Ye Y, Wang KK, Gu J et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008;1:460-469

73 Horikawa Y, Wood C, Yang H et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA-machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;23:7956-7962

74 Clague J, Lippman SM, Yang H et al. Genetic variation in microRNA genes and risk for oral premalignant lesions. *Mol Carcinog* 2010;49:183-189

75 Melo SA, Ropero S, Moutinho C et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* 2009;41:365-370

76 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-1801

77 Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K et al Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7269-7274

78 Hoffman AE, Zheng T, Yi C et al. MicroRNA-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 2009;69:5970-5977

79 Li XD, Li ZG, Song XX et al. A variant in microRNA-196a-2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology* 2010;42:669-673

80 Peng S, Kuang Z, Cheng C et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2010;55:2288-2293

81 Hu Z, Liang J, Wang Z et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat* 2009;30:79-84

82 Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M et al. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer* 2010;127:589-597

83 Yang H, Dinney CP, Ye Y et al. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res* 2008;68:2530-2537

84 Yang B, Chen J, Li Y et al. Association of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Hum Immunol* 2012;73:101-106

85 Yang B, Zhang JL, Shi YY et al. Association study of single nucleotide polymorphisms in pre-miRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *Mol Bio Rep* 2011;38:4913-4919

86 Zhang J, Yang B, Ying B et al. Association of pre-microRNAs genetic variats with susceptibility in systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2011;38:1463-1468

87 Luo X, Yang W, Ye DQ et al. A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PloS Genet* 2011;7:e1002128

88 Chen K, Song F, Calin GA et al. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 2008;29:1306-1311

89 He H, Yazdewski K, Li W et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19075-19080

90 Tchatchou S, Jung A, Hemminki K et al. A variant affecting a putative miRNA target site in estrogen receptor (ESR) 1 is associated with breast cancer risk in premenopausal women.

Carcinogenesis 2009;30:59-64

91 Landi D, Gemignani F, Naccarati A et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2008;29:579-584

92 Chin LJ, Ratner E, Leng S et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' UTR increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008;68:8535-8540

93 Zhou X, Chen X, Hu L et al. Polymorphisms involved in the miR-218-LAMB3 pathway and susceptibility of cervical cancer, a case-control study in Chinese women. *Gynecol Oncol* 2010;11:287-290

94 Gao Y, He Y, Ding J et al. An insertion/deletion polymorphism at miRA-122-binding site in the interleukin-1 alpha 3' untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:2064-2069

95 Wu LS, Li FF, Sun LD et al. A miRNA-492 binding-site polymorphism in BSG (basigin) confers risk to psoriasis in central south Chinese population. *Hum Genet* 2011;130:749-757

96 Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I et al. A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 2010;77:411-413

97 Glinsky GV. SNP-guided microRNA maps (MirMaps) of 16 common human disorders identify a clinically accessible therapy reversing transcriptional aberrations of nuclear import and inflammasome pathways. *Cell Cycle* 2008;7:3564-3576

98 Brest P, Lapaquette P, Souidi M et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011;43:242-245

99 Okubo M, Tahara T, Shibata T et al. Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2011;31:69-73

100 Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan TCTM et al. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induced loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol* 2012;188:1573-1577

101 Glinsky GV. Phenotype-defining functions of multiple non-coding RNA pathways. *Cell Cycle* 2008;7:1630-1639

102 Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:203-208

103 Archanioti P, Gazouli M, Theodoropoulos G et al. Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:520-524

- 104 Seitz H. Redefining microRNA targets. *Curr Biol* 2009;19:870-873
- 105 Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113:673-676
- 106 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009;136:26-36
- 107 Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I et al. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2012;6:900-904
- 108 Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR et al. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat* 2012;33:551-560
- 109 Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J et al. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:2827-2831
- 110 Liu Z, Li G, Wei S et al. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2010;116:4753-4760

- 111 Chu YH, Tzebg SL, Lin CW et al. Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. *PloS One* 2012;7:e39777
- 112 Glinky GV. Disease phenocode analysis identifies SNP-guided microRNA maps (MirMaps) associated with human “master” disease genes. *Cell Cycle* 2008;7: 3680-3694
- 113 Jedlinski DJ, Gabrovska PN, Weinstein SR et al. Single nucleotide polymorphism in has-mir-196a-2 and breast cancer risk: a case control study. *Twin Res Hum Genet* 2011;14:417-421
- 114 Guo J, Jin M, Zhang M, Chen K. A genetic variant in miR-196a2 increased digestive system cancer risks: a meta-analysis of 15 case-control studies. *PloS One* 2012;7:e30585
- 115 Min KT, Kim JW, Jeon YJ et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog* 2011;51:E65-73
- 116 Zhang M, Jin M, Yu Y et al. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2012;21:274-280
- 117 Brest P, Lapaquette P, Mograbi B et al. Risk predisposition for Crohn disease: a “menage a trois” combining IRGM allele, miRNA and xenophagy. *Autophagy* 2011;7:786-787

- 118 Lung RW, Wang X, Tong JH et al. A single nucleotide polymorphism in microRNA-146a is associated with the risk for nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 2012 doi: 10.1002/mc.21937
- 119 Zhou F, Zhu H, Kuo D et al. A functional polymorphism in pre-miR-146a is associated with susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012;31:1290-1295
- 120 Lian H, Wang L, Zhang J. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a rs2910164 polymorphism in Europeans. *PloS One* 2012;7:e31615
- 121 Hung PS, Chang KW, Kao SY et al. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral Oncol* 2012;48:404-408
- 122 Pauley KM, Satoh M, Chan AI et al. R-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008;10:1-10
- 123 Okubo M, Tahara T, Shibata T et al. Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2011;31:69-73
- 124 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;325:928-937

125 Dignass A, Eliakim R, Magro F et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2012;6:965-990

126 Van Assche G, Dignass G, Panes J et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2010;4:7-27

127 Macherey-Nagel webpage. <http://www.mn-net.com/Products/DNAandRNAPurification/DNAfrombloodandbiologicalfluids/NucleoSpinBlood/tabid/1343/language/en-US/Default.aspx>.

128 Parmar AS, Muschol M. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Biophys J* 2009;97:590-598

129 Morihara K, Tsuzuk H. Specificity of proteinase K from *Tritirachium album* Limber for synthetic peptides. *Agric Biol Chem* 1975;39:1489-1492

130 Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980;32:314-332

131 Rasmussen HB. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – Valuable tool for genotyping and genetic

fingerprinting. Gel electrophoresis – Principles and basics, Dr Samuel Mageldin (Ed.) InTech 2012 DOI: 10.5772/37724

132 Waalwijk C, Flavell RA. MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nuclei Acid Res* 1978;5:3231-3236

133 Singer J, Roberts-Ems J, Riggs AD. Methylation of mouse liver DNA studied by means of the restriction enzymes msp I and hpa II. *Science* 1979;203:1019-1021

134 New England Biolabs Inc. <https://www.neb.com/products/r0156-saci>

135 Zahm AM, Thayu M, Hand NJ et al. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:26-33

136 Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1502-1505

137 Xu B, Feng NH, Li PC et al. A functional polymorphism in pre-miR146a gene is associated with prostatic cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010;70:467-472

138 Gao LB, Bai P, Pan XM et al. The association between two polymorphisms in pre-miRNAs and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:571-574

139 Su XW, Yang Y, Lv ML et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in pre-miRNAs and the risk of asthma in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2011;30:919-923

140Runtsch MC, Hu R, Alexander M et al. MicroRNA-146a constrains multiple parameters of intestinal immunity and increases susceptibility to DSS colitis. *Oncotarget* 2015;6:28556-28572

141 Brandl K, Plitas G, Schnabl B et al. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 2007;204:1891-1900

142 Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011;334:255-258

143 Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012;11:305-314

144 Boldin MP, Taganov KD, Rao DS et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 2011;208:1189-1201