



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Ν.Π. «ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ»- Γ.Ν.Δ.Α. «Η ΑΓΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ»

Β' ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

«Η συμβολή των μεγάλων μη-κωδικών (long non-coding) RNAs στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ»

ΕΙΡΗΝΗ ΖΑΧΑΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ Γ.Ν.Ν.Π. «ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ»- Γ.Ν.Δ.Α. «Η ΑΓΙΑ ΒΑΡΒΑΡΑ»

Β' ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

«Η συμβολή των μεγάλων μη-κωδικών (long non-coding) RNAs στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ»

ΕΙΡΗΝΗ ΖΑΧΑΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2021



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**
— EST. 1837 —

MEDICAL SCHOOL

DEPT. OF GASTROENTEROLOGY GEN. HOSPITAL OF NIKEA & PIRAEUS “AG. PANTELEIMON”-

GEN. HOSPITAL OF WEST ATTICA “AG. VARVARA”

2nd DEPT. OF SURGERY, UNIVERSITY OF ATHENS

“The contribution of long non-coding RNAs in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases”

EIRINI ZACHAROPOULOU

GASTROENTEROLOGIST

PhD

ATHENS 2021

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου: 23/03/2016 Α.Π. 1516020753

- Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 26/05/2016 Α.Π. 1516027141
- Μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:
 1. ΒΕΖΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής (Επιβλέπων), Β' Χειρουργική Κλινική, «Αρεταίειο» Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
 2. ΓΑΖΟΥΛΗ ΜΑΡΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας, Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
 3. ΚΑΡΑΜΑΝΩΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Β' Χειρουργική Κλινική, Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Ημερομηνία ορισμού του Θέματος: 10/06/2016
- Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 23/12/2020
- Ημερομηνία ορισμού 7μελούς επιτροπής: 28/01/2021
- Ημερομηνία κρίσης: 23/01/2021
- Βαθμός: «Άριστα»
- Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης
- Μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής:
 1. ΒΕΖΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής (Επιβλέπων)
 2. ΓΑΖΟΥΛΗ ΜΑΡΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας
 3. ΚΑΡΑΜΑΝΩΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
 4. ΔΑΦΝΙΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ: Καθηγητής Χειρουργικής
 5. ΓΚΙΟΚΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: Καθηγητής Χειρουργικής
 6. ΒΛΑΧΟΓΙΑΝΝΑΚΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας
 7. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής



ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελεῖα ποιῆσειν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. ἡγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτῃσιν ἑμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάσειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μαθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἄκροῦσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἑμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγτεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δαήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἶρσειν. Οὐ δῶσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθορίον δῶσω. Ἄγνως δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτῃσιν ἀνδράσι πρῆσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ὣν ἐσίω, ἐξελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφορδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ὅν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήϊης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι, ἄρρήτῃ ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεῖα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης ἀσπασομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκουσι, τάναντία τούτων.

Αφιερωμένο στην αγαπημένη μου οικογένεια,

Θανάση, Σοφία και Δώρα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την προσπάθεια συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους με στήριξαν και συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής Δρ. Αντώνιο Βεζάκη καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας Δρ. Μαρία Γαζούλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γαστρεντερολογίας Δρ. Γεώργιο Καραμανώλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθώς και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν. Οι επιστημονικές υποδείξεις και η απαραίτητη παρότρυνσή τους ήταν καταλυτικές για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Ήταν τιμή μου να συνεργαστώ μαζί τους ως επιστήμονες αλλά και μεγάλη μου χαρά να τους γνωρίσω προσωπικά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη Δρ. Μαρία Τζουβαλά, διευθύντρια του Γαστρεντερολογικού Τμήματος του ΓΝΝΠ «Άγιος Παντελεήμων»- ΓΝΔΑ «Η Αγία Βαρβάρα», η οποία, ως Διευθύντρια μου καθ' όλη τη διάρκεια της ειδικότητάς μου, με εκπαίδευσε όχι μόνο στην άσκηση της ιατρικής ειδικότητας αλλά, κατά βάση, στην άσκηση της Ιατρικής Επιστήμης. Στήριξε με αμέριστη συμπαράσταση τις επιλογές μου και πίστεψε στις ικανότητες μου, συμβάλλοντας στο να εξελιχθώ ως ιατρός αλλά και ως άνθρωπος. Τέλος, συνέβαλε καταλυτικά στην έναρξη και την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής προσφέροντας πολύτιμες συμβουλές και έμπρακτη υποστήριξη, όποτε απαιτήθηκε, στη δύσκολη αυτή διαδρομή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο συνάδελφο και φίλο Δημήτρη Μόσχοβη ο οποίος ήταν συνοδοιπόρος μου στη διαδρομή της ιατρικής ειδικότητας αλλά και της διδακτορικής διατριβής και συνέβαλε με ηθική και υλική υποστήριξη στην επιτυχή ολοκλήρωση και των δυο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με έμαθε να εμπιστεύομαι τις ικανότητές μου και να αγωνίζομαι για να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου. Χάρis την άνευ όρων υποστήριξη και αγάπη τους έγινα μία γυναίκα δυνατή και ανεξάρτητη, έτοιμη να αντιμετωπίσω τις αναπόφευκτες δυσκολίες της επαγγελματικής και προσωπικής ζωής.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Εγκύκλιες σπουδές: 2003, Απολυτήριο Λυκείου από το 2^ο Ενιαίο Λύκειο Τρίπολης Αρκαδίας με βαθμό 19,8

Προπτυχιακή εκπαίδευση: 28/07/2009 Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Πτυχίο Ιατρικής με βαθμό Άριστα 8,64

Συνεχιζόμενη εκπαίδευση:

- Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (έναρξη 05/2016) με Θέμα: Η συμβολή των μεγάλων μη- κωδικά RNA (lncRNAs) στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ
- 2009, Advanced Trauma Life Support (ATLS)
- 2011, Advanced Cardiac Life Support (ACLS)
- 2011, Instructor's Development Course for ACLS και έκτοτε Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης
- 2013 έως σήμερα, Εκπαιδεύτρια σε σεμινάρια Εξειδικευμένης Υποστήριξης της Ζωής/ Advanced Life Support (ALS) και Άμεσης Υποστήριξης της Ζωής/ Immediate Life Support (ILS)
- 06/2015: Università Cattolica del Sacro Cuore, facoltà di Medicina e Chirurgia "A. Gemelli", Advanced Training Course on POEM/ Colonoscopy/ GI bleeding/Biliary and Enteral stenting
- 2015 και εξής: μετεκπαιδευτικά μαθήματα ΕΓΕ
- 2016, The Global Health Network, ICH- Good Clinical Practice
- 2017, Mayo Medical Laboratories, IATA Training in Transporting and Shipping Dangerous Goods, Infectious Substance Affecting Humans, Biological Substance
- 02/2018, 16th IBD Intensive Advanced Course, Βιέννη
- 05/2018, UEG Summer School 2018, Πράγα
- 2017-2018: 11^ο Σχολείο Κλινικής Ηπατολογίας, ΕΕΜΗ (Διάκριση: 3^η θέση στις εξετάσεις του Σχολείου)
- 07/07/2018, 4th AISDD hands-on course: Colon Polypectomy
- 12/2018, 38^ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Κλινικό Φροντιστήριο: Κληρονομικός Καρκίνος Π. Εντέρου
- 12/02/2020: 2nd ECCO-ESGAR Basic Imaging Workshop, Βιέννη
- 02/09/2019-31/08/2020 Υποτροφία εξωτερικού Ελληνικής Γαστρεντερολογίας Εταιρείας για εξειδίκευση στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσους του Εντέρου (Inflammatory Bowel Diseases Center at Humanitas Research Hospital, Καθηγητής Silvio Danese, Ιατρείο ΙΦΝΕ, ενδοσκόπηση, χρωμοενδοσκόπηση, Υπέρηχος εντέρου

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

-Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος: Τρίπολη 04/11/2009-4454

-Τίτλος Ειδικότητας Γαστρεντερολογίας: Αθήνα 15/03/2019- 4392

- Παρούσα θέση: από 10/2020: επικουρική επιμελήτρια Β', Γαστρεντερολογική Κλινική ΓΝΝΠ «Αγ. Παντελεήμων»- ΓΝΔΑ «Η Αγ. Βαρβάρα»,
- 09/2019-08/2020: Γαστρεντερολόγος, Centro IBD Humanitas Research Hospital, ετήσια υποτροφία εξωτερικού της ΕΓΕ
- 11/2018-08/2019: Γαστρεντερολογική Κλινική ΓΝΝΠ «Αγ. Παντελεήμων»- ΓΝΔΑ «Η Αγ. Βαρβάρα», ειδικευόμενη Γαστρεντερολογίας σε παράταση (03/2019- 08/2019 ως ειδικευμένη σε παράταση)
- 11/2014- 11/2018: Γαστρεντερολογική Κλινική ΓΝΝΠ «Αγ. Παντελεήμων»- ΓΝΔΑ «Η Αγ. Βαρβάρα», ειδικευόμενη Γαστρεντερολογίας
- 06/2012 - 12/2013: Παθολογική Κλινική ΓΠΝ Τρίπολης « Η Ευαγγελίστρια», ειδικευόμενη Παθολογίας
- 12/2013 - 11/2014: ΜΕΘ ΓΠΝΤ, ειδικευόμενη σε παράταση
- 11/2011- 06/ 2012: Ι.Ε.Κ. ΔΟΜΗ, Διδάσκουσα
- 07/2011- 05/2012: Θεραπευτήριο Κυψέλης Α. Τζίμα Α.Ε., Ιατρός εφημερίας
- 03/2010- 04/2011: Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο Π.Ι. Πιάνας Αρκαδίας (εφημερίες στο Κ.Υ. Δημητσάνας)

ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2006: Τιμητική Υποτροφία ΙΚΥ προγράμματος 2004-2005 (Αίεν Αριστεύειν, 1^ο έτος σπουδών)
- 2018: : 3^η θέση στις εξετάσεις του 11^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας, ΕΕΜΗ
- 2018: Υποτροφία Εξωτερικού της Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας για το 2019 (με κατεύθυνση τις ΙΦΝΕ και γράμμα αποδοχής από το Inflammatory Bowel Diseases Center at Humanitas Research Hospital, Καθηγητής Silvio Danese)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

- 11/2019 έως σήμερα μέλος του Ordine Provinciale dei Medici Chirurghi di Milano
- 12/11/2018 έως σήμερα: Fully registered, General Medical Council
- 11/2014 έως σήμερα μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Πειραιά
- 2010-2011 και 2012-2014 μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αρκαδίας
- 2011 μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών
- 09/2020 έως σήμερα Fellow of European Board of Gastroenterology and Hepatology
- 06/2020 έως σήμερα μέλος Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας
- 2019 έως σήμερα μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Ήπατος

- 2019 έως σήμερα μέλος της Ελληνικής Ομάδας Μελέτης ΙΦΝΕ
- 2018 έως σήμερα μέλος Υ-ECCO (European Crohn's and Colitis Organization)
- 11/2014 έως 02/2019 Δόκιμο μέλος Ελληνικής Γαστρεντερολογικής Εταιρείας
- 2013 έως σήμερα Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (έναρξη 05/2016) με Θέμα: Η συμβολή των μεγάλων μη- κωδικά RNA (lncRNAs) στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- 2015- 2019: 3 Μελέτες Φάσης IIb/III και 4 μελέτες IV (ΙΦΝΕ), ρόλος: Sub-investigator/ study coordinator, PI: Μ. Τζουβαλά

- 02/2020-08/2020: 36 Μελέτες Φάσης IIb/III (ΙΦΝΕ), ρόλος: Sub-investigator, PI: S. Danese

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

Δημοσιεύσεις σε ξένα περιοδικά:

1. Gabbiadini R, **Zacharopoulou E**, Furfaro F, Craviotto V, Zilli A, Gilardi D, Roda G, Loy L, Fiorino G, Peyrin-Biroulet L, Danese S, Allocca M. Application of Ultrasound Elastography for Assessing Intestinal Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease: Fiction or Reality? Curr Drug Targets. 2020 Nov 19
2. Allocca M, Chaparro M, Gonzalez HA, Bosca-Watts MM, Palmela C, D'Amico F, **Zacharopoulou E**, Kopylov U, Ellul P, Bamias G, Ntelis V, Lahat A, Mantzaris GJ, Papaconstantinou I, Katsanos K, Uspenskaya Y, Christodoulou D, Ben Horin S, Peyrin-Biroulet L, Torres J, Sebastian S, Gisbert JP, Danese S, Fiorino G. Patients with Inflammatory Bowel Disease Are Not at Increased Risk of COVID-19: A Large Multinational Cohort Study. J Clin Med. 2020 Oct 31;9(11):3533
3. **Zacharopoulou E**, Craviotto V, Fiorino G, Furfaro F, Zilli A, Gilardi D, Peyrin-Biroulet L, Danese S, Allocca M. Targeting the gut layers in Crohn's disease: mucosal or transmural healing? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2020 Jun 18:1-13
4. Solitano V, D'Amico F, **Zacharopoulou E**, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Early Intervention in Ulcerative Colitis: Ready for Prime Time? J Clin Med. 2020 Aug 14;9(8):2646
5. Vespa E, Furfaro F, Allocca M, Fiorino G, Correale C, Gilardi D, Argollo M, Zilli A, **Zacharopoulou E**, Loy L, Danese S. Endoscopy after surgery in inflammatory bowel disease: Crohn's disease recurrence and pouch surveillance. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2020 Aug 18:1-13
6. Dal Buono A, Roda G, Argollo M, **Zacharopoulou E**, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Treat to target or 'treat to clear' in inflammatory bowel diseases: one step further? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2020 Aug 18:1-11
7. N. Viazis, C. Pontas, G. Karampekios, E. Tsoukali, O. Giouleme, G. Theocharis, M. Tzouvala, A. Katsoula, M. Kalafateli, E. **Zacharopoulou**, E. Archavlis, A. Christidou, A. Manolakis, G J. Mantzaris. Efficacy of

Infliximab after Failure of Subcutaneous Anti-TNF Agents in Patients with Moderate to Severe Ulcerative Colitis. HOSPITAL CHRONICLES 2020, 15(4): 24–30

8. **Zacharopoulou E**, Ioakeim S, Tzouvala M, Karamanolis G, Vezakis A, Gazouli M. Correlation of polymorphisms in long non-coding RNAs with the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Dig Liver Dis. 2018 Jun;50(6):624-626. doi: 10.1016/j.dld.2018.03.008.
9. **Zacharopoulou E**, Gazouli M, Tzouvala M, Vezakis A, Karamanolis G. The contribution of long non-coding RNAs in Inflammatory Bowel Diseases. Dig Liver Dis. 2017 Oct;49(10):1067-1072
10. Fostira F, Mollaki V, Lypas G, Alexandrakis G, Christianakis E, Tzouvala M, **Zacharopoulou E**, Kalfakakou D, Konstantopoulou I, Yannoukakos D. Genetic analysis and clinical description of Greek patients with Peutz-Jeghers syndrome: Creation of a National Registry. Cancer Genet. 2018 Jan;220:19-23.

Σύμβουλος συντακτικής επιτροπής επιστημονικών περιοδικών (Reviewer):

1. Experimental & Molecular Medicine, Accepted, 08/2018
2. Annals of Gastroenterology Annals of Gastroenterology, 09/2019
3. Digestive Diseases and Sciences, 01/2020
4. Annals of Gastroenterology, 09/2020
5. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 10/2020

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΣΥΝΑΝΤΗΣΕΙΣ

Προσκεκλημένη ομιλήτρια

1. «Ποια είναι η επίδραση των θεραπειών στο ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με ΙΦΝΕ; Συμπεράσματα από την πανδημία COVID-19 σε σχέση με τις ΙΦΝΕ», διημερίδα ΕΟΜΙΦΝΕ. Αθήνα 2020
2. «Οι επιλοιώξεις στους ασθενείς με ΙΦΝΕ υπό θεραπεία» 15η Εκπαιδευτική συνάντηση ΕΛΙΓΑΣΤ, Αθήνα 2020
3. «Περίπτωση ασθενούς με Χρόνια διάρροια» Πανελλήνιες εκπαιδευτικές ημερίδες πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας «Γ. Παπαδάκης» Αθήνα, 2019
4. «Ασθενής με σοβαρή Ελκώδη Κολίτιδα», 14η Εκπαιδευτική συνάντηση ΕΛΙΓΑΣΤ, Αθήνα 2019
5. «Ασθενής με Πρωτοπαθή Σκληρυντική Χολαγγειίτιδα, χολερυθρίνη 16mg/dl και στένωση χοληδόχου πόρου», 17^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Καλαμάτα 2019
6. «Ανοσολογικές διαταραχές σε νοσήματα του Πεπτικού Συστήματος- Διαδραστική συζήτηση περιστατικών» Πανελλήνιες εκπαιδευτικές ημερίδες πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας «Γ. Παπαδάκης» Αθήνα, 2018

Προφορικές ανακοινώσεις:

Σε ελληνικά συνέδρια

1. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Χ. Βεΐμου, Ι. Ιντέρνος, Γ. Κεχαγιάς, Π. Παντούλα, Δ. Μόσχοβης, Ι. Γιώτης, Γ.Πενέσης, Β. Βαμβακούσης, Α. Ρογδάκης, Μ. Τζουβαλά «Ασθενής με ελκώδη κολίτιδα σε ανοσοκαταστολή και άλγος ΔΛΒ - Διεπιστημονική αντιμετώπιση περιπτώσεων με Ελκώδη Κολίτιδα» 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη, 2018
2. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Γ. Καραγιάννης, Ε. Τελίδη, Ε. Ποντίκη, Σ. Σουρούνη, Θ. Ζιάγκος, Δ. Γκαραγκάνης, Μ. Παναγάκη, Β. Βασιλείου, Ι. Ποντίκης, «Πολλαπλά αποστήματα και θρόμβωση ενδοκοιλιακών φλεβών σε ασθενή με βακτηριαμία από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο και πλασματοκυτταρική δυσκρασία» 16ο Ετήσιο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδας, Πάτρα, 2013
3. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Δ. Αλεξάκος, Μ. Παναγάκη, Σ.Κουτσοβίτη, Α. Χατζηδάκης, Κ. Παπαγγελοπούλου, Ε.Σοφού, Ε. Παπανικολάου, Μαρία Καλαφατέλη, Κ. Κιντής, Λ. Λαμπρόπουλος, Γ.Βλάχου, Ε. Γιαννοπούλου, Σ. Λουμπαρδιάς, Β. Βασιλείου «Παραπνευμονική πνευμονιοκοκκική συλλογή σε χρήστρια ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών με ηπατίτιδα C», προφορική ανακοίνωση, 39ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2013
4. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Μ. Σιδεράς, Ι. Μπότης, Δ. Θεοδούλου, Γ. Ζήνωνος, Χ. Αναγνωστόπουλος. «Deep Clin Stimulation», 14ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Αθήνα, 2008

Σε διεθνή συνέδρια

1. Bamias G., Gazouli M., Xourafas V., **Zacharopoulou E.**, Tsoukali E., Viazis N., Mantzaris G.J., Gizis M., Tzouvala M., Leonidakis G., Zampeli E., Michopoulos S., Makris K., Michalopoulos G., Papatheodoridis G. GREEK VEDOLIZUMAB STUDY GROUP «Mucosal molecular signatures differ between ulcerative colitis patients with or without response to Vedolizumab therapy» UEGW, Βαρκελώνη 2019

Αναρτημένες ανακοινώσεις:

Σε ελληνικά συνέδρια

1. Τζουβαλά Μ., Τριμπόνιας Γ., Γιώτης Ι., Παλατιανού Μ., Βεΐμου Χ., Μόσχοβης Δ., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Κεχαγιάς Γ., Ιντέρνος Ι., Βαμβακούσης Β. «Υποβοηθούμενη από ελαστικό δακτύλιο (endoscopic band ligation/ EBL – EMR) ενδοσκοπική βλεννογονεκτομή για την εξαίρεση επίπεδου αδενώματος 2ης μοίρας 12δακτυλου σε κίρρωτικό ασθενή», 39ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, 2019
2. Τριμπόνιας Γ., Μόσχοβης Δ., Βεΐμου Χ., Παλατιανού Μ., Γιώτης Ι., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Ιντέρνος Ι., Κεχαγιάς Γ., Βαμβακούσης Β., Τζουβαλά Μ. «Ριζική ενδοσκοπική εξαίρεση με endoscopic submucosal dissection (ESD) γαστρικού αδενοκαρκινώματος διάχυτου τύπου (signet-ring) και ενδοσκοπική παρακολούθηση βάσει “japanese expanded criteria”», 39ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, 2019

3. «Αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας ασθενών με ΙΦΝΕ με τη μέθοδο GLS. διάρκεια νόσου και βιολογικοί παράγοντες» Μόσχοβης Δ., Τριμπόνιας Γ., Παπασπυρόπουλος Α., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Λυράκος Γ., Βεΐμου Χ., Ιντέρνος Ι., Παλατιανού Μ., Γιώτης Ι., Κεχαγιάς Γ., Βαμβακούσης Β., Τζουβαλά Μ., 39ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, 2019
4. Μ. Παλατιανού, Γ. Τριμπόνιας, Δ. Μόσχοβης, Ι. Γιώτης, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Χ. Βεΐμου, Ι. Ιντέρνος, Ι. Δελάκης, Π. Τζοβλά, Μ. Καραγιάννη, Μ. Τζουβαλά «Πρωτολοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό (cmv) σε ασθενή με νόσο Crohn υπό βιολογικό παράγοντα (infliximab)». 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Αργολίδα, 2018
5. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ι. Σταματάτος, Χ. Ζαμάνης, Δ. Ξενής, Νικόλαος Ελευθερούλης, Γ. Δουμάνη, Ι. Γιώτης, Δ. Μόσχοβης, Γ. Τριμπόνιας, Ι. Ιντέρνος, Γ. Πενέσης, Γ. Κεχαγιάς, Ν. Τζατζαδάκης, Μ. Τζουβαλά «Σπάνιο Αίτιο Αιμορραγίας Ανώτερου Πεπτικού». 38ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 2018
1. Δ. Μόσχοβης, Γ. Τριμπόνιας, Γ. Καραμανώλης, Β. Νικολάου, Α. Ρογδάκης, Ρ. Μεννόνα, Ι. Γιώτης, Γ. Κεχαγιάς, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ι. Ιντέρνος, Γ. Πενέσης, Μ. Τζουβαλά, «Περίπτωση πλαστικής λινίτιδας στομάχου σε ηλικιωμένο ασθενή με εμφάνιση ως ψευδοαχαλασία και συνοδές πολλαπλές μεταστάσεις στο παχύ έντερο», 38ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 2018
6. Δ. Μόσχοβης, Ι. Γιώτης, Γ. Λυράκος, Ε. Ζαχαροπούλου, Χ. Βεΐμου, Ι. Ιντέρνος, Γ. Κεχαγιάς, Γ. Τριμπόνιας, Ε. Ανδρικόπουλος, Β. Βαμβακούσης, Μ. Τζουβαλά, «Ενσφηνώσεις βλωμού και ξένα σώματα στην ενδοσκόπηση- Αντιμετώπιση, επιπλοκές και συχνότεροι αιτιολογικοί παράγοντες. Η 5ετής εμπειρία ενός κέντρου (2013-2018), 38ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 2018
7. Δ. Μόσχοβης, Α. Παπασπυρόπουλος, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ι. Ιντέρνος, Γ. Κεχαγιάς, Χ. Βεΐμου, Γ. Μιχαλόπουλος, Β. Βαμβακούσης, Μ. Τζουβαλά. «Προοπτική Παρακολούθηση Καρδιακής λειτουργίας ασθενών με ΙΦΝΕ με τη μέθοδο GLS (Global Longitudinal Strain), 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη 2018
8. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ι. Ιντέρνος, Π. Παντούλα, Χ. Βεΐμου, Δ. Μόσχοβης, Γ. Κεχαγιάς, Ι. Γιώτης, Β. Βαμβακούσης, Μ. Τζουβαλά «Ασθενής με σοβαρή ελκώδη κολίτιδα, οξεία επιπλεγμένη λοίμωξη από C. difficile, βακτηριαμία και πιθανή υποτροπή CMV)», 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη 2018
9. Λυράκος Γ., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Μόσχοβης Δ., Τζουβαλά Μ. «Μέτρηση των επιπέδων άγχους κατάθλιψης και στρες σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους εντέρου με το DASS21» 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη 2018
10. Λυράκος Γ., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Ιντέρνος Ι., Σπινάρης Β., Τζουβαλά Μ. «Μέτρηση των επιπέδων γνωστικής έκπτωσης σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο εντέρου με το MoCA» 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη 2018

11. Γ. Κεχαγιάς, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ι. Ιντέρνος, Δ. Μόσχοβης, Χ. Βεΐμου, Β. Βαμβακούσης, Μ. Τζουβαλά
Ασθενής με ειλεοκολίτιδα, χελίτιδα και αφθώδη στοματίτιδα σε έδαφος χρόνιας ουδετεροπενίας
17ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Θεσσαλονίκη 2018
12. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Δ. Μόσχοβης, Χ. Βεΐμου, Β. Βαμβακούσης, Ε. Ανδρικόπουλος, Γ. Κεχαγιάς, Μ.
Τζουβαλά «Η εμπειρία ενός ελληνικού Κέντρου στη χορήγηση Vedolizumab», ηλεκτρονικά
αναρτημένη ανακοίνωση, 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του
Εντέρου, Ναύπλιο, 2017
13. Χ. Βεΐμου, Γ. Κεχαγιάς, Δ. Κατσαούνης, Α. Καρακώστα, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Δ. Μόσχοβης, Ε.
Ανδρικόπουλος, Β. Βαμβακούσης, Α. Παπαδόπουλος, Μ. Τζουβαλά « Σπάνια περίπτωση ανάπτυξης
νευροενδοκρινούς όγκου επί εδάφους χρόνιας παραμελημένης ελκώδους κολίτιδας » 16ο
Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Ναύπλιο 2017
14. Χ. Βεΐμου, Γ. Κεχαγιάς, Α. Γκλάβας, Β. Κατσίβα, Δ. Μόσχοβης, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Κ. Μανουσάκης, Ι.
Παπακωνσταντίνου, Μ. Τζουβαλά «Βελτίωση μετά από χειρουργική επέμβαση βαριάς, ανθεκτικής
υπαλβουμιναιμίας σε ασθενή με νόσο Crohn υπό αγωγή με βιολογικούς παράγοντες» 16ο
Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ, Ναύπλιο 2017
15. Δ. Μόσχοβης, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Χ. Βεΐμου, Γ. Κεχαγιάς, Β. Βαμβακούσης, Α. Παπασπυρόπουλος,
Μ. Τζουβαλά « Προοπτική παρακολούθηση καρδιακής λειτουργίας ασθενών με Ιδιοπαθή
Φλεγμονώδη νοσήματα του Εντέρου (ΙΦΝΕ) με τη μέθοδο GLS » 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΙΦΝΕ,
Ναύπλιο 2017
16. Κεχαγιάς Γ., Βεΐμου Χ., Μόσχοβης Δ., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Μεννόνα Ρ., Ιντέρνος Ι., Τζουβαλά Μ. «
Οξώδες ερύθημα σε ασθενή με ελκώδη κολίτιδα: πέρα από το προφανές αίτιο». 37ο Πανελλήνιο
Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2017.
17. **Ζαχαροπούλου Ε.**, Ιωακείμ Σ., Τζουβαλά Μ., Καραμανώλης Γ., Βεζάκης Α., Γαζούλη Μ. «Μελέτη
συσχέτισης πολυμορφισμών σε μεγάλα μη- κωδικά RNA με την αιτιοπαθογένεια των ιδιοπαθών
Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου», 37ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη,
2017
18. Κατσίβα Β., Καραγιάννη Μ., Γεράκης Γ., **Ζαχαροπούλου Ρ.**, Ανδρεσάκης Α., Καταβελάκου Κ.,
Μπούχρα Κ., Καζακίδης Π. Η διαγνωστική αξία της τεχνικής Διάχυσης (DW) στη Μαγνητική
Εντερογραφία (MRE) των ασθενών με Ν. Crohn, 20^ο Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο, Αθήνα,
2016
19. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ε. Σιδέρη, Π. Ιωαννίδης, Σ. Σολωμού, Γ. Κεχαγιάς, Χ. Βεΐμου, Δ. Μόσχοβης, Π.
Καζακίδης, Α. Καρακώστα, Γ. Ερωτοκρίτου, Μ. Τζουβαλά «Πρωτοδιάγνωση συνδρόμου Peutz-
Jeghers σε νεαρή ασθενή με ειλεό- εγκολεασμό λεπτού εντέρου», 36ο Πανελλήνιο Συνέδριο
Γαστρεντερολογίας, Αθήνα 2016

20. **Ε. Ζαχαροπούλου**, Α. Σπυροπούλου, Σ. Παπακωστόπουλος, Π. Μανής, Μ. Κελεπούρη, Κ. Πίκολας, Χ. Νάσσης, Μ. Guillaume «Περίπτωση ασθενούς με σύνδρομο υπερλειτουργίας του συμπαθητικού», 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εντατικής Θεραπείας, Αθήνα 2014
21. Β. Βασιλείου, **Ε. Ζαχαροπούλου**, Ε. Ποντίκη, Σ. Σουρούνη, Γ. Καραγιάννης, Ε. Τελίδη, Θ. Ζιάγκος, Δ. Γκαραγκάνης, Δ. Αλεξάκος, Ι. Ποντίκης Περίπτωση ασθενούς με Σύνδρομο Guillain Barre που είχε Πολλαπλούν Μυέλωμα ΘΜΣΣ.
22. Αθανασίου Β., **Ζαχαροπούλου Ε.**, Παπαδημητρίου Χ. «Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα σε ασθενή με κεφαλαλγία, διπλωπία, δυσκαταποσία », 2009, 15ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος

Σε διεθνή συνέδρια:

1. Α. Κ. Karachaliou, Μ. Bletsa, Ε. Galatoula, Γ. Mantzaris, Ε. Archavlis, Μ. Tzouvala, **Ε. Zacharopoulou**, Δ. Moschovis, Γ. Bamias, Γ. Kokkotis, Μ. Kontogianni, Prevalence of sarcopenia in patients with Crohn's disease using revised sarcopenia diagnostic criteria, ESPEN, Γενεύη 2020
2. Comparison of resting energy expenditure as calculated by predictive equations with that measured by indirect calorimetry in patients with Crohn's disease Α. Κ. Karachaliou, Μ. Bletsa, Ε. Galatoula, Γ. Mantzaris, Ε. Archavlis, Μ. Tzouvala, **Ε. Zacharopoulou**, Δ. Moschovis, Γ. Bamias, Γ. Kokkotis, Μ. Kontogianni ESPEN, Γενεύη 2020
3. Bamias G., Xourafas V., Tsoukali E., Viazis N., Mantzaris G.J., Gizis M., **Zacharopoulou E.**, Tzouvala M., Leonidakis G., Zampeli E., Michopoulos S., Makris K., Michalopoulos G., Papatheodoridis G., Greek Vedolizumab Study Group "Treatment outcomes following administration of Vedolizumab in patients with moderate to severe ulcerative colitis", UEGW, Βαρκελώνη 2019
4. G. Tribonias, G. Kechagias, Δ. Moschovis, **Ε. Zacharopoulou**, Ι. Giotis, Μ. Palatianou, Γ. Penesis, Ι. Internos, Μ. Tzouvala "Ligation- assisted endoscopic mucosal resection (EBL-EMR) as a safe alternative for the resection of a flat duodenal adenoma in a cirrhotic patient with ectopic duodenal varices" ESGE Days 2019, Prague, 2019
5. Δ. Moschovis, Μ. Velegraki, Α. Theodoropoulou, **Ε. Zacharopoulou**, Ι. Internos, Κ. Stylianos, Μ. Tzouvala "Fertility, conception and delivery in patients with IBD, a retrospective study in two centres in Greece", 14th Congress of ECCO, Copenhagen, 2019
6. G. Karamanolis, **Ε. Zacharopoulou**, Σ. Ioakeim, Μ. Tzouvala, Α. Vezakis, Μ. Gazouli "An association study of long non-coding RNAs in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases" International Symposium 210 "Crossing New Borders in IBD: Thoughts and Demands – From Mechanisms to Treatment, Lisbon, 2018
7. Δ. Moschovis, V. E. Nikolaou, Μ. Agrogianni, **Ε. Zacharopoulou**, C. Veimou, Γ. Kechagias, Ι. Internos, V. Vamvakousis, C. Drakoulis, Μ. Tzouvala Recurrent non-variceal upper gastrointestinal bleeding

caused by simultaneous extravasation of two different vessels treated with embolism (NVUGIB) 10th International Congress of Internal Medicine, Αθήνα, 2018

8. Kechagias G., **Zacharopoulou E.**, Skopelitis E., Moschovis D., Papadopoulos E., Karakosta A., Eid-Papastefanou K., Vamvakousis V., Andrikopoulos E., Tzouvala M. «An unexpected shortcut: Case report of a gastrocolic fistula (GCF) post-total pancreatectomy», 9th International Congress of Internal Medicine, Αθήνα, 2017
9. G. Kechagias D. Moschovis, **E. Zacharopoulou**, V. Vamvakousis, T. Peppas, C. Veimou, M. Tzouvala Mini Case Series: Successful Treatment of Gastric Dieulafoy Lesions with Endoscopic Band Ligation (EBL), 9th International Congress of Internal Medicine, Αθήνα, 2017

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	19
ABSTRACT	20
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
1 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	22
1.1 Γενικά στοιχεία	22
1.2 Επιδημιολογία	22
1.2.1 Επιδημιολογία στην Ελλάδα.....	24
1.3 Αιτιολογία και Παθογένεια	25
1.3.1 Ανοσολογικοί Παράγοντες	25
1.3.2 Μικροβίωμα	31
1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	33
1.3.4 Γενετικοί παράγοντες	41
1.4 Νόσος Crohn	47
1.4.1 Διάγνωση	47
1.4.2 Ορισμός της ενεργότητας και της σοβαρότητας της νόσου	51
1.4.3 Φυσική ιστορία.....	52
1.4.4 Παράγοντες κινδύνου για επιπλεγμένη νόσο	53
1.4.5 Διαχείριση	54
1.5 Ελκώδης Κολίτιδα.....	60
1.5.1 Διάγνωση	60
1.5.2 Ορισμός της ενεργότητας και της σοβαρότητας της νόσου	64
1.5.3 Φυσική ιστορία.....	65
1.5.4 Διαχείριση	66
1.5.5 Παρακολούθηση της νεοληκύθου	70
1.6 Γονιμότητα και κύηση στις ΙΦΝΕ.....	70
1.7 Επιτήρηση του καρκίνου π. εντέρου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ κολίτιδα	71
1.8 Εξωεντερικές εκδηλώσεις	72
1.8.1 Αρθροπάθεια.....	72
1.8.2 Παθήσεις δέρματος.....	73
1.8.3 Οφθαλμικές παθήσεις.....	74
1.8.4 Μεταβολική νόσος των οστών	74
1.8.5 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα	75
1.8.6 Εκδηλώσεις από το καρδιαγγειακό σύστημα	75

1.8.7	Θρομβοεμβολική νόσος	75
1.8.8	Αναιμία	76
2	ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	77
3	ΜΗ-ΚΩΔΙΚΑ RNAS	77
3.1.1	Γενικές πληροφορίες	77
3.1.2	Μικρά μη-κωδικά RNAs	78
3.1.3	Μεγάλα μη-κωδικά RNAs	78
4	Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στις ΙΦΝΕ	82
4.1	Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στη Νόσο Crohn	82
4.2	Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στην Ελκώδη κολίτιδα	85
4.3	Μεγάλα μη-κωδικά RNAs και ΙΦΝΕ	87
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	91
5	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	92
5.1	Τήρηση κανόνων	92
6	Υλικά και Μέθοδοι	92
6.1	Πολυμορφισμοί υπό μελέτη	92
6.2	Πληθυσμιακό δείγμα	93
6.3	Γονοτύπηση	93
6.4	Ανίχνευση πολυμορφισμών	94
6.4.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	94
6.4.2	Επιλογή εκκινητών	96
6.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με Πολυμορφισμό Μήκους Τμημάτων Περιορισμού (PCR-RFLP)	97
6.5	Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	99
6.5.1	Αλληλοειδική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	100
6.6	Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης	102
6.7	Στατιστική ανάλυση	105
6.7.1	Ισορροπία Hardy- Weinberg	105
6.7.2	Στατιστικό κριτήριο χ^2	106
7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	108
7.1	Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά πληθυσμού	108
7.2	Πολυμορφισμός rs3757247 (A>G)	109
7.3	Πολυμορφισμός rs597325 (A>G)	112
7.4	Πολυμορφισμός rs1476514 (G>A)	112
8	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών ευρέως γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχει αναδείξει εκατοντάδες πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τον κίνδυνο εκδήλωσης ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (ΙΦΝΕ), όπως η νόσος Crohn (NC) και η ελκώδης κολίτιδα (ΕΚ). Πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι τα μεγάλα μη-κωδικά RNA μετάγραφα (large non-coding RNA transcripts, lncRNAs) διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε ποικίλα νοσήματα, μεταβάλλοντας το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων προκαλώντας εναλλακτικό μάτισμα ή επιδρώντας στη δευτεροταγή δομή τους, συμπεριλαμβανομένων των ΙΦΝΕ.

Ωστόσο, η παθογένεση των ΙΦΝΕ παραμένει έως σήμερα ασαφής και υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των lncRNAs σε αυτές τις παθήσεις.

Επομένως, στόχος της παρούσας μελέτης είναι να εκτιμήσει τη συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών σε lncRNA γονίδια και την εκδήλωση ΙΦΝΕ στον ελληνικό πληθυσμό και να συμβάλει στην αποσαφήνιση της παθοφυσιολογίας των ΙΦΝΕ. Πραγματοποιήθηκε μελέτη πληθυσμού ασθενών-μαρτύρων και γονοτύπηση των πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms, SNPs) rs1476514, rs3757247 και rs597325 σε δείγμα ορού αίματος από 242 ασθενείς με NC, 185 ασθενείς με ΕΚ και 220 υγιείς μάρτυρες.

Βρέθηκε ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου Α του SNP rs1476514 επικρατεί στον υγιή πληθυσμό. Επιπροσθέτως, σχετικά με τον SNP rs3757247, η συχνότητα του αλληλόμορφου G είναι υψηλότερη στους υγιείς μάρτυρες σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΕΚ ενώ σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα διαπιστώθηκε ετεροζυγωτία για τον SNP rs597325.

Συμπερασματικά, η κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ είναι επί του παρόντος περιορισμένη και η αιτιολογία τους παραμένει άγνωστη. Καθώς όμως συσσωρεύονται δεδομένα που υποδεικνύουν ότι υπάρχει συσχέτιση ορισμένων SNPs σε lncRNAs με τις ΙΦΝΕ, θα χρειαστούν μελέτες με μεγαλύτερο πληθυσμό ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα και να αναζητηθεί ο ρόλος των απορρυθμισμένων lncRNAs στην παθογένεση των ΙΦΝΕ.

ABSTRACT

A number of Genome Wide Association Studies (GWAS) indicates hundreds of polymorphisms associated with Inflammatory Bowel Disease (IBD) risk, such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). In recent years, it has been shown that large non-coding RNA transcripts (lncRNAs) appear to have a regulatory role by altering the expression levels of genes causing alternative splicing or affecting their secondary structure in various diseases, including IBD.

However, the pathogenesis of the IBD remains unclear so far and there is scarce data about the role of lncRNAs in these diseases.

Thus, we aimed to evaluate the correlation between polymorphisms at lncRNAs and the pathophysiology of IBD in Greek population. Genotyping of rs1476514, rs3757247 and rs597325 single nucleotide polymorphisms (SNPs) was carried out in a population-based case-control study including 242 patients with NC, 185 with EC and 220 healthy controls.

According to the results, the frequency of allele A of rs1476514, appears to prevail in healthy population. As far as rs3757247 is concerned, the frequency of G allele is higher in healthy controls in comparison to UC whereas all samples tested for rs597325 were found heterozygous.

In conclusion, the understanding of the mechanisms of IBD presentation is limited so far and the etiology is basically still unknown. However, as accumulating evidence suggests that there is a correlation between selected lncRNA SNPs and IBDs, larger studies are needed in order to confirm our results and research further the role of dysregulated lncRNA polymorphisms in IBD pathogenesis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Γενικά στοιχεία

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του έντερου (ΙΦΝΕ) είναι χρόνιες υποτροπιάζουσες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος ανοσολογικής και φλεγμονώδους αρχής. Περιλαμβάνουν δύο κυρίως παθήσεις, την Ελκώδη Κολίτιδα (ΕΚ) και τη Νόσο του Crohn (NC), ενώ περίπου 10% των περιπτώσεων κολίτιδας δεν είναι διαγνωστικές για τη μία ή την άλλη μορφή και ονομάζονται αταξινόμητη κολίτιδα. Η αταξινόμητη ΙΦΝΕ είναι ένας όρος που αφορά μια μειονότητα των κολιτίδων οι οποίες δεν μπορούν να ταξινομηθούν σε ΕΚ ή NC λαμβάνοντας υπόψη στοιχεία από το ιστορικό, την ενδοσκόπηση, την ιστοπαθολογία πολλαπλών βιοψιών και την ακτινολογική απεικόνιση. Η αδιεκρίνιστη κολίτιδα είναι ο όρος που χρησιμοποιείται από τους παθολογοανατόμους για να περιγράψουν παρασκεύασμα κολεκτομής που έχει χαρακτηριστικά τόσο της ΕΚ όσο και της NC ¹.

Στην κατηγορία των ΙΦΝΕ συγκαταλέγονται και οι μικροσκοπικές κολίτιδες (κολλαγονώδης κολίτιδα και λεμφοκυτταρική κολίτιδα) οι οποίες είναι αρκετά σπάνιες, έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και για τις οποίες δε θα γίνει λόγος στην παρούσα μελέτη. Παρόλο που οι ΙΦΝΕ τείνουν να αναδειχθούν σε μείζον παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, καθώς η επίπτωση και ο επιπολασμός τους βρίσκονται σε διαρκή άνοδο τις τελευταίες δεκαετίες ², είναι ακόμα λιγοστά τα δεδομένα για την παθογένεση τους. Η σύγχρονη άποψη των ερευνητών είναι ότι προκύπτουν ως μία απρόσφορη και μη ελεγχόμενη ανοσολογική διαταραχή εναντίον συμβιωτικών μικροοργανισμών του εντέρου και ενδοαυλικών αντιγόνων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα ³.

1.2 Επιδημιολογία

Οι πρώτες αναφορές για τις ΙΦΝΕ υπάρχουν σε σποραδικές περιπτώσεις ήδη από την αρχαιότητα ⁴ αλλά αναδύθηκαν ως ιατρικό πρόβλημα που επηρεάζει εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως μόλις το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα, παράλληλα με τη βιομηχανική επανάσταση. Η βιομηχανική επανάσταση άλλαξε την κοινωνία με δραματικές μεταβολές στις μετακινήσεις, τη γεωργία, τις κατασκευές, την αστικοποίηση και τη διατροφή. Η εκβιομηχάνιση συνέβη κατά βάση στο δυτικό κόσμο, που περιλαμβάνει τη Ευρώπη και ορισμένες περιοχές που είχαν αποικιστεί από Ευρωπαίους (Βόρεια Αμερική και Αυστραλία) ⁵. Οι πρώτες σπάνιες περιπτώσεις ΕΚ περιγράφηκαν το 19ο αιώνα στο Λονδίνο ⁴ και σταδιακά η επίπτωση επιταχύνθηκε έως τον 20ο αιώνα.

Η ετήσια επίπτωση της ΕΚ ποικίλει από 0-19,2 περιπτώσεις στα 100.000 άτομα στη Βόρεια Αμερική έως 0,6-24,3 περιπτώσεις στα 100.000 άτομα στην Ευρώπη. Αντίστοιχα, ο επιπολασμός κυμαίνεται από 37,5-248,6 ανά 100.000 άτομα έως 4,9-505 ανά 100000. Η επίπτωση της NC είναι παρόμοια (0-20,2 ανά

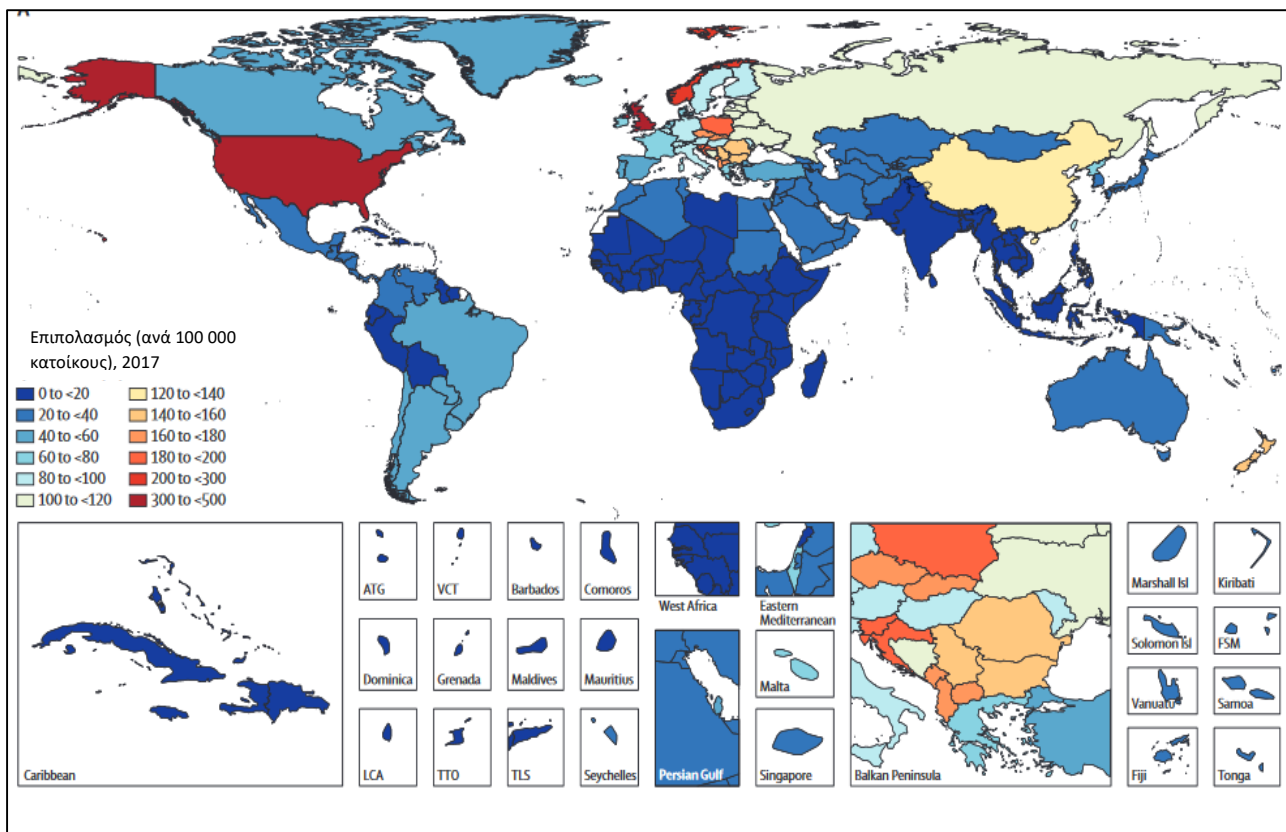
100.000 στη Βόρεια Αμερική και 0.3–12.7 ανά 100.000 στην Ευρώπη). Η διακύμανση των τιμών προκύπτει από το γεγονός ότι, εντός καθορισμένης γεωγραφικής περιοχής, η επίπτωση των νοσημάτων εμφανίζει ετερογένεια και πιο συγκεκριμένα είναι υψηλότερη σε αστικές παρά σε αγροτικές περιοχές⁶. Η παγκόσμια κατανομή του επιπολασμού των ΙΦΝΕ (ανά 100 000 κατοίκους) κατά το 2017 φαίνεται στην **Εικόνα 1**.

Παραδοσιακά η ΕΚ και η ΝΚ παρουσίαζαν την υψηλότερη επίπτωση στις αναπτυγμένες χώρες της Βόρειας Αμερικής και της Ευρώπης. Εντός της Ευρώπης, έχει διαπιστωθεί ένα πραινός από βορά προς νότο, με υψηλότερη επίπτωση σε βορειότερα γεωγραφικά πλάτη^{7,8}. Η υψηλότερη επίπτωση και επιπολασμός διαπιστώνονται στη Σκανδιναβία και το Ηνωμένο Βασίλειο (6,3 για τη ΝΚ, 11.4 για την ΕΚ) ενώ παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα στην ανατολική Ευρώπη (3.8 για τη ΝΚ, 8.0 για την ΕΚ)⁹. Εκτιμάται ότι 0,3% του ευρωπαϊκού πληθυσμού έχει προσβληθεί από ΙΦΝΕ, που ισοδυναμεί με 2,5-3 εκατομμύρια άτομα. Αδρά, υπολογίζονται 78000 νέα περιστατικά ΝΚ και 178000 περιστατικά ΕΚ κάθε έτος⁹.

Στο παρελθόν θεωρούνταν δεδομένο ότι οι ΙΦΝΕ είναι πιο συχνές στον Δυτικό κόσμο παρά στην Ανατολή. Νεότερα δεδομένα όμως προτείνουν ότι τόσο η ΕΚ όσο και η ΝΚ παρουσιάζουν αυξανόμενη επίπτωση σε πληθυσμούς της Ιαπωνίας, Χονγκ Κονγκ και Κορέας αλλά και της Σαουδικής Αραβίας. Είναι ενδιαφέρον ότι σε αυτούς τους πληθυσμούς η επίπτωση της ΕΚ όχι μόνο είναι υψηλότερη αλλά και αυξάνει με γρηγορότερους ρυθμούς από αυτή της ΝΚ^{10–12}. Οι ΙΦΝΕ παραμένουν σχετικά σπάνιες νόσοι για την Αφρική και την Νότια Αμερική παρόλο που υπάρχουν πλέον αναφορές πιο συχνής εμφάνισης^{6,13,14}. Οι πληθυσμοί με την αυξανόμενη επίπτωση παρουσιάζουν διακριτό γενετικό υπόβαθρο από τους Δυτικούς πληθυσμούς ενώ η επίπτωση χαρακτηριστικά αυξάνει εν παραλλήλω με την εκβιομηχάνιση και δυτικοποίηση του τρόπου ζωής. Οι μελέτες που περιλαμβάνουν πληθυσμούς μεταναστών ανέδειξαν ότι η δεύτερης γενιάς μετανάστες παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση ΙΦΝΕ σε σχέση με τον πληθυσμό στη χώρα καταγωγής ενώ είναι συγκρίσιμη με το γηγενή πληθυσμό στη χώρα εγκατάστασης^{6,15}. Οι επιδημιολογικές διαφορές ανάμεσα στο δυτικό κόσμο και τις αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως εξηγούνται από γενετικές και περιβαλλοντικές επιρροές. Εκτος αυτού, η πρόοδος των συστημάτων υγείας και της μεθοδολογίας επιδημιολογικής καταγραφής επίσης επηρεάζουν τις διαφορές που διαπιστώνονται μεταξύ χωρών.^{5,16}

Όσο αφορά τον επιπολασμό των ΙΦΝΕ, αυτός αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω στο μέλλον δεδομένης της νεαρής ηλικίας των νέων περιστατικών. Σε αυτό θα συνεφέρει η αύξηση των περιστατικών ΙΦΝΕ σε περιοχές παραδοσιακά χαμηλού επιπολασμού και αναμένεται μελλοντικά οι γαστρεντερολόγοι να διαχειρίζονται αυξανόμενο αριθμό ηλικιωμένων ασθενών με ΙΦΝΕ^{5,9,14,17}.

Οι περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν μέγιστη επίπτωση μεταξύ της 2^{ης} και της 4^{ης} δεκαετίας της



Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης κατανομής του επιπολασμού των ΙΦΝΕ (ανά 100 000 κατοίκους), 2017 (προσαρμογή από GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020 Jan;5(1):17-30)

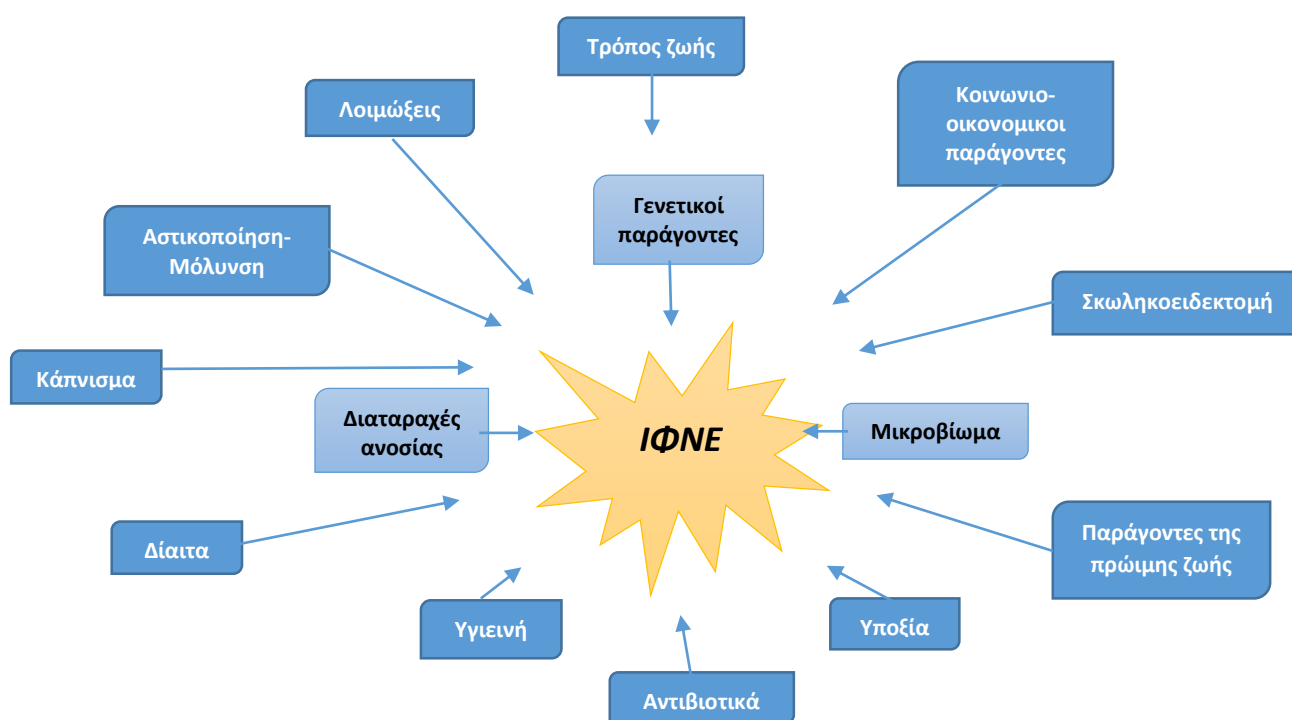
ζωής ενώ έχει διαπιστωθεί και ένα δεύτερο μέγιστο, χαμηλότερου ύψους, μεταξύ 6^{ης} και 7^{ης} δεκαετίας. Επίσης έχει τεκμηριωθεί ότι η επίπτωση είναι παρόμοια μεταξύ ανδρών και γυναικών ⁶.

1.2.1 Επιδημιολογία στην Ελλάδα

Σχετικά με την επιδημιολογία των ΙΦΝΕ στην Ελλάδα, μια αναδρομική επιδημιολογική μελέτη διεξήχθη στην Βορειοδυτική Ελλάδα (νομοί Ιωαννίνων, Άρτας, Πρέβεζας, Θεσπρωτίας, Κέρκυρας και Λευκάδας) για τα έτη 1982-2015 και κατέγραψε 1647 ασθενείς με ΙΦΝΕ. Η μέση ετήσια επίπτωση της NC ήταν 2,36/100000 και της ΕΚ ήταν 7,31/100000 κατοίκους. Καταγράφηκε αναλογία ανδρών: γυναικών 2:1 (1018 άνδρες και 619 γυναίκες) και η μέση ηλικία ήταν 50,59 με αυξημένο αριθμό ασθενών ηλικίας λιγότερο από 25ετων ¹⁸. Συγκριτικά με προηγούμενη μελέτη από το ίδιο κέντρο για την περίοδο 1981–1997, η μέση ετήσια επίπτωση της NC και της ΕΚ αυξήθηκαν (από 0.5/100000 και 6.6/100000 αντίστοιχα) και μάλιστα φαίνεται ότι η επίπτωση της NC αυξήθηκε με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με την ΕΚ ¹⁹.

1.3 Αιτιολογία και Παθογένεια

Τα δεδομένα για την αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ είναι ακόμα περιορισμένα. Πιστεύεται ότι προκύπτουν ως μία απρόσφορη και μη ελεγχόμενη ανοσολογική απόκριση εναντίον συμβιωτικών μικροοργανισμών του εντέρου και ενδοαυλικών αντιγόνων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα ³. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ διακρίνονται σε ανοσολογικούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ

1.3.1 Ανοσολογικοί Παράγοντες

1.3.1.1 Το εντερικό επιθήλιο

Η αρχική ανοσολογική απάντηση στο εντερικό μικροβίωμα ρυθμίζεται στενά και αυτή η ρύθμιση καθορίζει εάν θα επικρατήσει η ανοσοανοχή ή η αμυντική ανοσολογική απάντηση. Το εντερικό επιθήλιο είναι ο φραγμός ανάμεσα στο εντερικό μικροβίωμα και το λεμφικό σύστημα του γαστρεντερικού συστήματος (gastrointestinal system- associated lymphoid tissue, GALT) και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση την βλεννογονικής ανοσιακής απάντησης. Τα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα είναι το φυσικό όριο που εμποδίζει την υπερβολική είσοδο των βακτηρίων και άλλων αντιγόνων από τον εντερικό αυλό στην κυκλοφορία. Ένας αδιαπέραστος βλεννογονικός φραγμός στηρίζεται στις διακυτταρικές συνάψεις

(intercellular junctions) και τις στενές συνάψεις (tight junctions) που σφραγίζουν το διάστημα μεταξύ των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων. Στις ΙΦΝΕ ο παρακυττάριος χώρος εμφανίζει αυξημένη διαπερατότητα και έχει βρεθεί ότι είναι ελαττωματική η ρύθμιση των στενών συνάψεων. Αυτές οι ανωμαλίες είναι πιθανό να οφείλονται είτε σε πρωτοπαθές ελάττωμα στη λειτουργία φραγμού είτε στη φλεγμονή.

Επιπρόσθετη άμυνα ενάντια στην είσοδο βακτηρίων αποτελούν τα εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανόμενου των κυττάρων Paneth και των καλυκοειδών κυττάρων. Τα κύτταρα Paneth εκκρίνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια όπως α-ντιφενσίνες. Τα καλυκοειδή κύτταρα ρυθμίζουν την παραγωγή βλέννης και παραγόντων επιθηλιακής επιδιόρθωσης και ελέγχου της φλεγμονής. Η εντερική βλέννη επικαλύπτει το επιθήλιο περιορίζοντας την επαφή ανάμεσα στα βακτήρια και τα επιθηλιακά κύτταρα ενώ η αναγέννηση και η επιδιόρθωση του επιθηλίου συμβάλλουν στον έλεγχο και στην αποκατάσταση της φλεγμονώδους απάντησης. Στις ΙΦΝΕ, όμως, η φλεγμονώδης απάντηση συχνά οδηγεί σε μια συνεχόμενη επιθηλιακή βλάβη προκαλώντας διαβρώσεις, εξελκώσεις και μειωμένη παραγωγή ντιφενσινών, με αποτέλεσμα την αυξημένη άμεση έκθεση του επιθηλίου στο εντερικό μικροβίωμα και την ενίσχυση της φλεγμονώδους απάντησης.

Η ανοσολογική ανοχή έναντι του ενδοαυλικού μικροβιώματος συντηρείται στα υγιή άτομα και από τη στιβάδα του χορίου στον εντερικό βλεννογόνο η οποία περιέχει ένα πλούσιο πληθυσμό κυττάρων ανοσίας. Η εκσεσημασμένη διήθηση του χορίου από κύτταρα της φυσικής ανοσίας (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και Τ κύτταρα φυσικοί φονείς) και της επίκτητης ανοσίας (Β και Τ κύτταρα) είναι χαρακτηριστικά της ενεργού ΙΦΝΕ. Ο αυξημένος αριθμός και η ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο προκαλεί αύξηση, τοπικά, των επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNFα), ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), ιντερφερόνης-γ και κυτταροκινών του μονοπατιού IL-23–Th17 ²⁰.

1.3.1.2 Το αγγειακό δίκτυο του εντερικού τοιχώματος

Το αγγειακό δίκτυο του εντέρου και το ενδοθήλιο συντηρούν επαρκή αιματική ροή και ρυθμίζουν την είσοδο των λευκοκυττάρων στο εντερικό τοίχωμα. Η είσοδος κυττάρων στους εντερικούς ιστούς μεσολαβείται από μόρια προσκόλλησης (σελεκτίνες, ιντεγκρίνες) και χυμοκίνες (εκκρινόμενα μόρια που προσελκύουν τα ανοσολογικά κύτταρα). Τα Τ κύτταρα που ενεργοποιούνται στους μεσεντέριους λεμφαδένες και στις πλάκες Peyer μετατρέπονται σε κύτταρα ειδικά για το έντερο, εκφράζοντας την ιντεγκρίνη α4β7 και τον υποδοχέα χημειοκινών CCR970.

Η συσσώρευση των λευκοκυττάρων στους εντερικούς ιστούς είναι χαρακτηριστική των ΙΦΝΕ. Στη χρόνια νόσο, η προσκόλληση και η "επιστράτευση" των λευκοκυττάρων είναι αυξημένη στα μικροαγγεία και μεσολαβείται από την θετική ρύθμιση (up-regulation) των μορίων προσκόλλησης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα από τον TNF-α και την IL-1. Παράλληλα αυξημένα επίπεδα εντεροειδικών

προφλεγμονωδών χημειοκινών πολλαπλασιάζουν τη μετανάστευση λευκοκυττάρων. Ανωμαλίες στη λειτουργία της μικροαγγείωσης πιθανώς συνεισφέρουν στη φλεγμονή, την ισχαιμία και την διαταραγμένη βλεννογονική επούλωση. Η ισχαιμία προκαλεί τοπικά υποξία η οποία με τη σειρά της επηρεάζει παράγοντες που συμβάλλουν στην εντερική βλάβη ²⁰.

1.3.1.3 Η φυσική ανοσία

Οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας παρέχουν μία αρχική άμεση απάντηση στα μικρόβια. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας φέρουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν γενικά μικροβιακά μοτίβα (pattern-recognition receptors) σε αντίθεση με την αντιγόνο-ειδική αναγνώριση από υποδοχείς της επίκτητης ανοσίας. Το εντερικό επιθήλιο εκφράζει διάφορα είδη υποδοχέων φυσικής ανοσίας που συμμετέχουν στην άμυνα ενάντια στο ενδοαυλικό μικροβίωμα αλλά και επιτηρούν τα επιθηλιακά και τα αντιγονοαπρυσιαστικά κύτταρα επάγοντας τους μηχανισμούς ανοχής που συντηρούν την ανοσολογική εντερική ομοιόσταση. Η έκφραση των toll-like υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη και η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης και της απάντησης των υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβου (pattern) περιορίζουν την ενεργοποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων από ενδοαυτικά μικρόβια. Η συνεχής έκθεση στο εντερικό μικροβίωμα είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της εντερικής ανοσολογικής απάντησης.

Ορισμένα βοηθητικά T κύτταρα (Th1, Th2 και Th17) και ρυθμιστικά T κύτταρα (πχ forkhead box P3 [Foxp3+] Treg), τα οποία είναι υποκατηγορίες των CD4+ T κυττάρων, εκκρίνουν χαρακτηριστικούς τύπους κυτταροκινών. Η ρύθμιση αυτών των υποτύπων πρέπει να είναι συνεχής ώστε να διατηρηθεί η εντερική ανοσολογική ομοιόσταση. Οι υποτύποι των βοηθητικών T κυττάρων (Th1, Th2 και Th17) είναι, επίσης, απαραίτητοι για την άμυνα ενάντια στα παθογόνα και στην υπερβολική διείσδυση ενδοαυλικών μικροβίων, αλλά η υπερδραστηριότητα αυτών των κυττάρων σε σχέση με τα ρυθμιστικά CD4+ T κύτταρα είναι πιθανό να οδηγήσει σε εντερική φλεγμονή ²⁰. Οι μελέτες για την παθογένεση των ΙΦΝΕ σε ανθρώπους και ποντίκια αναδεικνύουν δυσλειτουργία των εντερικών CD4+ T κυττάρων. Στην NC υπάρχει αυξημένη παραγωγή της κυτταροκίνης των Th17, της ιντερλευκίνης-17, και της κυτταροκίνης των Th1, ιντερφερόνης-γ και TNFα, στον εντερικό βλεννογόνο ^{21,22}. Το μονοπάτι της ιντερλευκίνης-23 είναι κεντρικό στη λειτουργία των Th17 κυττάρων. Πολυμορφισμοί των πολυάριθμων γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτό το μονοπάτι και στη λειτουργία των Th17 κυττάρων έχουν συσχετιστεί τόσο με τη NC όσο με την ΕΚ ²³.

1.3.1.4 Διαταραχή της ανοσοανοχής των T-κυττάρων

Οι ανασταλτικές κυτταροκίνες IL-10 και TGF-β, στις πλάκες Peyer, στους μεσεντέριους λεμφαδένες και στο χόριο, συμμετέχουν στην ανοχή των T κυττάρων στο εντερικό τοίχωμα ²⁴. Τα ρυθμιστικά T κύτταρα διαφοροποιούνται στις πλάκες Peyer και στους μεσεντέριους λεμφαδένες μέσω της δράσης του TGF-β και του ρετινοϊκού οξέος. Ελλείμματα στη ανάπτυξη και τη λειτουργία των ρυθμιστικών T κυττάρων έχει φανεί

σε πειράματα σε ποντίκια ότι οδηγεί σε εντερική φλεγμονή. Το μονοπάτι της αυτοφαγίας συνεισφέρει στην ανοχή των T κυττάρων σε πολλαπλά επίπεδα, γεγονός που σημαίνει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια αυτοφαγίας, που έχουν συσχετιστεί με τη NC, μπορούν να προδιαθέσουν σε εντερική φλεγμονή μέσω ελλειμμάτων της T κυτταρικής ανοχής.²⁰ Επιπροσθέτως, υπάρχει μια γενετική συσχέτιση ανάμεσα στην ανασταλτική κυτταροκίνη IL-10 και την ΕΚ. Αυτή η συσχέτιση έχει βρεθεί σε ζωικά μοντέλα όπου η IL-10 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση της εντερικής φλεγμονής. Χαρακτηριστικό είναι ότι κολίτιδα και εντερική δυσπλασία εμφανίζονται αυτόματα σε IL-10– deficient mice²⁴.

1.3.1.5 Η επίκτητη ανοσία

Ο ρόλος των B κυττάρων στις ΙΦΝΕ δεν έχει μελετηθεί εκτενώς όσο αυτός των T κυττάρων. Τα εντερικά B κύτταρα παράγουν IgA αντισώματα τα οποία συνδράμουν στην ανοσολογική προστασία χωρίς να προκαλούν φλεγμονή. Σε ζωικά μοντέλα κολίτιδας έχουν περιγραφεί τόσο αντιφλεγμονώδεις όσο και προφλεγμονώδεις ρολοί των B κυττάρων. Η παρουσία κυκλοφορούντων αντιμικροβιακών αντισωμάτων σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (π.χ. αντισώματα έναντι φλαγγελίνης και αντισώματα έναντι του *Sacharomyces cerevisiae*) αλλά όχι σε υγιείς μάρτυρες, αναδεικνύει την ενεργότητα των B κύτταρων^{20,25}.

1.3.1.6 Th17 κύτταρα και σηματοδότηση μέσω ιντερλευκίνης-23 στις ΙΦΝΕ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-23 μεσολαβείται από τη σύνδεση του ετεροδιμερούς της IL-23 (που αποτελείται από τις υπομονάδες p19 και p40) με τον επίσης ετεροδιμερή υποδοχέα της (που αποτελείται από τον IL-23R και τον IL-23RB1). Η σύνδεση ενεργοποιεί το JAK stat σηματοδοτικό μονοπάτι (Janus-associated kinase–signal transducers and activators of transcription) το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή ποικίλων γονιδίων. Επιπροσθέτως, υπάρχουν αναφορές ισχυρής γενετικής συσχέτισης ανάμεσα στον IL-23R και τις ΙΦΝΕ, την Ψωρίαση, και την Αγκυλοποιητική Σπονδυλίτιδα που υποδεικνύουν το κοινό γενετικό υπόβαθρο που μοιράζονται οι αυτοάνοσες παθήσεις²⁰. Η IL-23 η οποία εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα денδριτικά κύτταρα πιθανώς συνεισφέρει στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των Th1. Συμμετέχει, επίσης, στην εντερική φλεγμονή μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων των Th17 κύτταρων²⁶. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της IL-23 και των Th17 κυτταροκινών είναι αυξημένα στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου τόσο στην NC όσο και στην ΕΚ²⁰.

1.3.1.7 Φλεγμονώδη μόρια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ

Η αύξηση των κυτταροκινών από κύτταρα της φυσικής ανοσίας, που περιλαμβάνουν ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και денδριτικά κύτταρα αλλά και από μη ενοριακά κύτταρα όπως τα επιθηλιακά ή τα στρωματικά κύτταρα, φαίνεται ότι συμμετέχει στην παθογένεση των ΙΦΝΕ. Η τροποποιημένη έκφραση των προ- και αντί-φλεγμονωδών μορίων προκαλεί ανισορροπία στην εντερική φυσική και επίκτητη ανοσία.

Η μελέτη αυτών των μηχανισμών υποστηρίζει ότι η NC και η EK, παρόλο που μοιράζονται ορισμένα κοινά κλινικά σημεία και συμπτώματα, είναι στην ουσία δυο διακριτές κλινικές οντότητες που χαρακτηρίζονται από διαφορετική ανοσοπαθολογία.

Στην παθολογία των ΙΦΝΕ έχουν εμπλακεί ομάδες φλεγμονωδών μορίων που περιλαμβάνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες, φλεγμονοσώματα (inflammasomes), μη-κωδικά RNAs αλλά και μόρια που αφορούν το εντερικό μικροβίωμα όπως τα μοριακά μοτίβα κινδύνου (danger-associated molecular patterns, DAMPs), αντιμικροβιακά πεπτίδια και νευροπεπτίδια. Έως σήμερα οι ΙΦΝΕ θεωρούνται ως απότοκο μια χρόνιας εντερικής φλεγμονής και ιστικής καταστροφής μέσω διαταραγμένης έκφρασης προ και αντί-φλεγμονωδών μορίων που συμμετέχουν στην φυσική και επίκτητη ανοσία ²⁷.

Το γεγονός ότι αντισώματα έναντι κυτταροκινών (όπως αντί-TNF και αντί-IL12/23) είναι βασικό όπλο στη θεραπευτική φαρέτρα υποστηρίζει όχι μόνο ότι τα μόρια της φλεγμονής είναι σημαντικά στην παθολογία των ΙΦΝΕ αλλά και ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μελλοντικοί θεραπευτικοί στόχοι. Η έρευνα που έχει ως στόχο να αναγνωριστούν νέα φλεγμονώδη μόρια και να αποκρυπτογραφηθεί η δράση τους στην παθολογία της NC και της EK θα συμβάλλει και στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων.

1.3.1.8 Μόρια που προέρχονται από τα κύτταρα φυσικής ανοσίας

Έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6, IL-18, TNF, μέλη της οικογένειας της IL-12 (IL12, IL-23, 27, 35), IFN-α και IFN-β από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ), όπως τα δενδριτικά κύτταρα του χορίου και τα μακροφάγα, ύστερα από διέγερση από το εντερικό μικροβίωμα και από την ενεργοποίηση του toll-like υποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί αυξημένη IL-1 τόσο στην NC όσο και στην EK. Η IL-1β φαίνεται ότι εκκινεί την εντερική φλεγμονή επιστρατεύοντας κοκκιοκύτταρα και ενεργοποιώντας τα λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν IL17-A καθώς και τα CD4+ Th17 κύτταρα. Επίσης, η IL-18, που ανήκει στην οικογένεια της IL-1 και που παράγεται από μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα, έχει βρεθεί αυξημένη στην NC.

Όσο αφορά την IL-6, εκκρίνεται από τα δενδριτικά κύτταρα του χορίου και τα CD4+ T κύτταρα στις ΙΦΝΕ και προκαλεί περαιτέρω παραγωγή των TNF, INF-γ και IL-1β σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα με τον IL-6R ώστε να εμποδίσει την απόπτωση των βλεννογονικών T-κυττάρων υπεύθυνων για τις προαναφερθείσες κυτταροκίνες. Παρόμοια, ο TNF από τα CD14+ μακροφάγα, τα T κύτταρα, τα αντιποκύτταρα και τους ινοβλάστες προάγει την προφλεγμονώδη απάντηση μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) ύστερα από μεμβρανική σύνδεση στον TNFR1 και TNFR2 υποδοχείς. Πρόσφατα δεδομένα για αυξημένη in vivo απόπτωση από τη σύνδεση αντί-TNF αντισωμάτων (όπως Infliximab και Adalimumab) στη μεμβράνη των T κυττάρων υποστηρίζουν ότι ο TNF έχει δράση παρόμοια με τη IL-6 στην αποτροπή της απόπτωσης. Η αυξημένη παραγωγή IL-12 από τα δενδριτικά

κύτταρα και τα μακροφάγα έχει επίσης εμπλακεί στην NC γεγονός που σημαίνει ότι τα ενεργοποιημένα ΑΠΚ ευνοούν μια Th1 ανοσιακή απάντηση. Επιπροσθέτως, στην NC, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα IL-23 που αυξάνουν την παραγωγή Th17 κυτταροκίνης ενώ περιορίζουν τις δραστηριότητες των ρυθμιστικών T κυττάρων (Treg) προτείνοντας ότι σε κάποιο βαθμό η Th17 ανοσιακή απάντηση συνοδεύει την Th1 ανοσιακή απάντηση στη NC. Από την άλλη μεριά η IL-27 έχει δείξει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα στις μελέτες όπου ορισμένες έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του IL-27R διεγείρει την φλεγμονώδη απάντηση με παραγωγή Th1 κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6 και μείωση των ρυθμιστικών T κυττάρων (Treg) ενώ άλλες μελέτες δε διαπίστωσαν συμμετοχή της IL-27 στη φλεγμονή. Αντίθετα, η IL-35 βρέθηκε να μειώνει την προφλεγμονώδη απάντηση των T-κυττάρων και να υποστρέφει τη φλεγμονώδη δραστηριότητα σε πειραματικά μοντέλα. Παρόμοια, οι INF-α και INF-β έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στη βλεννογονική επούλωση και στην επαγωγή των Treg που παράγουν IL-10 μέσω ενεργοποίησης του Toll-like υποδοχέα-9 ύστερα από επιθηλιακό τραύμα ²⁷.

1.3.1.9 Φλεγμονώδη μόρια προέρχονται από τα κύτταρα της χυμικής ανοσίας

Το σύστημα της επίκτητης ανοσίας, που περιλαμβάνει τη χυμική ανοσία, τα εκτελεστικά T κύτταρα (effector T), τα Treg, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και τα εγγενή λεμφοειδή κύτταρα επίσης παράγουν φλεγμονώδη μόρια που συμμετέχουν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ.

Σε ασθενείς με ΕΚ, κάποιο αυτοαντιγόνο, που προτείνεται απλό μελέτες να είναι η τροπομυοσίνη, έχει βρεθεί να συνδέεται με γ-ανοσοσφαιρίνες (IgG) στο δέρμα, στο χοληδόχο πόρο, στους οφθαλμούς και στις αρθρώσεις. Επίσης, περιπυρινικά κυτταροπλασματικά αντισώματα έναντι των ουδετεροφίλων (pANCA) υπολογίζεται ότι είναι θετικά στο 50-90% των ασθενών με ΕΚ, με τίτλο πολύ χαμηλότερο στη NC. Αντίθετα αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι του *Sacharomyces cerevisiae* (ASCA), έναντι φλαγγελίνης (anti-flagellin) και έναντι της εξωτερικής μεμβράνης C της *Eserichia coli* (anti-OmpC) έχουν αναφερθεί στη NC. Η κλινική σημασία όμως αυτών των αντισωμάτων και των αυτοαντισωμάτων στην παθογένεση των ΙΦΝΕ παραμένει αδιευκρίνιστη ²⁷.

1.3.1.10 Μόρια που προέρχονται από τα μη-εντοριακά κύτταρα

Η IL-6 και ο TNF, που έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα στις ΙΦΝΕ, εκκρίνονται, εκτός από τα ΑΠΚ, και από ινοβλάστες ώστε να απενεργοποιήσουν τα T κύτταρα και τα ΑΠΚ. Επίσης οι ινοβλάστες στη NC εκφράζουν αυξημένα επίπεδα του ιστικού αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης -1 (TIMP-1) που παρεμποδίζει την μεταλλοπρωτεϊνάση διάμεσου ιστού (MMP) να αποδομήσει την εξωκυττάρια ουσία και συνεισφέρουν στην παραγωγή περισσότερης ίνωσης στη NC από ότι στην ΕΚ. Έκτος από τους ινοβλάστες, τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα παράγουν σε υψηλά επίπεδα μόρια της οικογένειας της IL-1. Αυξημένα επίπεδα IL-33 παράγονται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και από τους ινοβλάστες στο βλεννογόνο

ασθενών με ΕΚ. Επιπροσθέτως, η IL-22 που παράγεται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και τα Treg κύτταρα, επάγει επιθηλιακή αναγέννηση μέσω STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) σηματοδότησης ²⁷.

1.3.1.11 Μοριακά μοτίβα κινδύνου

Τα μοριακά μοτίβα κινδύνου (danger-associated molecular patterns, DAMPs), είναι κυτταροπλασματικά ή πυρηνικά προϊόντα με προφλεγμονώδη δράση που απελευθερώνονται από τα κύτταρα όταν επέλθει κυτταρικός θάνατος. Τα DAMPs περιλαμβάνουν διάφορες πρωτεΐνες όπως high mobility group box-1 protein (HMGB1), πρωτεΐνες θερμικού σοκ, S100 πρωτεΐνες, κυτταροκίνες όπως οι IL-1α και IL-33, αμυλοειδές Α, προϊόντα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), ακόμα και μόρια μεταφορικού RNA (mRNAs) ²⁸ και είναι πιθανό να συμμετέχουν στην παθογένεια των ΙΦΝΕ. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες της ενεργότητας της νόσου όπως για παράδειγμα η καλπροτεκτίνη κοπράνων ²⁹. Άλλα μόρια που διερευνώνται είναι η εξωκυττάρια τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που συνδέεται στον υπερεκφραζόμενο στη NC υποδοχέα των πουρινών P2X7, καθώς και η IL-1^α, η οποία απελευθερώνεται από τα τραυματισμένα επιθηλιακά κύτταρα σε ένα πειραματικό μοντέλο ΕΚ και ενεργοποιεί τον καταρράκτη της φλεγμονής ²⁷. Ο ρόλος των DAMPs στις ΙΦΝΕ δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα και απαιτείται περισσότερη έρευνα.

1.3.2 Μικροβίωμα

Φυσιολογικά, το εντερικό μικροβίωμα σε ένα συγκεκριμένο άτομο διαφέρει κατά μήκος αλλά και εγκάρσια στο γαστρεντερικό αυλό, ενώ τα είδη των μικροβίων που το αποτελούν διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Αυτή η καλά ισορροπημένη κατάσταση συμβίωσης ξενιστή-μικροβίων πιθανώς ανταποκρίνεται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση λοίμωξης, διαιτητικών αλλαγών, λήψης φαρμάκων και έκθεσης σε κάθε ξένη προς τον οργανισμό ουσία (ξеноβιοτικά) ³⁰. Φαίνεται πως το εντερικό μικροβίωμα έχει ουσιώδη συμμετοχή τόσο στη διατήρηση της υγείας όσο και στην πρόκληση νόσου ενώ η σύνθεση του επηρεάζεται από παράγοντες του περιβάλλοντος αλλά και του ξενιστή. Η διαμόρφωση της ποικιλομορφίας του ξεκινάει ήδη από τη γέννηση του ατόμου και περίπου το 1/3 των ειδών (taxa) των εντερικών βακτηρίων είναι κληρονομήσιμα ³¹. Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα περιλαμβάνονται η γεωγραφική περιοχή, η υγιεινή, το στρες, φάρμακα, διατροφή αλλά και η γενετική ³². Είναι χαρακτηριστικό ότι 58 πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) έχουν ήδη συσχετιστεί με αυξημένη παρουσία 33 μικροβιακών ειδών. Μεταξύ αυτών των SNPs, επιβεβαιώθηκαν και σε ανεξάρτητη κοορτή 4 γενετικοί τόποι και φάνηκε ότι σχετίζονται με συγκεκριμένα μικροβιακά είδη: rs62171178 (πλησίον του γονιδίου UBR3) συσχετίστηκε με Rikenellaceae, rs1394174 (CNTN6) συσχετίστηκε με Faecalibacterium, rs59846192 (DMRTB1) συσχετίστηκε με Lachnospira, και rs28473221 (SALL3) συσχετίστηκε με Eubacterium ³³.

Τα μονοπάτια της μικροβιακής απάντησης και της φυσικής ανοσίας που υποστηρίχθηκαν από τις πρόσφατες εξελίξεις της γενετικής ανάλυσης οδήγησαν το ενδιαφέρον προς το εντερικό μικροβίωμα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ ^{34,35}. Πολλαπλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία διαφορετικού μικροβιώματος σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η αλλαγή στο φυσιολογικό μικροβιακό οικοσύστημα ορίζεται ως δυσβίωση και διαφέρει από τη λοίμωξη που αποτελεί την εισβολή και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών στους ιστούς από έναν ή περισσότερους αιτιολογικούς λοιμογόνους παράγοντες (που αναγνωρίζονται σε κλασική καλλιέργεια ή έμμεσα από το γενετικό τους αποτύπωμα) και προκαλώντας αντίστοιχη νόσηση ³¹.

Μελέτες κοορτής και αναλύσεις ασθενών-μαρτύρων ανέδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέγεθος οικογένειας, η πρώιμη έκθεση σε κατοικίδια και οικόσιτα ζώα και ο μεγαλύτερος αριθμός αδελφών και ο μητρικός θηλασμός σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τον κίνδυνο για ΙΦΝΕ ^{36,37}. Καθώς όλες αυτοί οι παράμετροι της πρώιμης παιδικής ηλικίας είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος στην ενήλικη ζωή ^{38,39}, ενισχύεται η υπόθεση ότι το μικροβίωμα συμμετέχει στην παθογένεση των ΙΦΝΕ.

Η δυσβίωση είναι περισσότερο έκδηλη σε ασθενείς με NC παρά με ΕΚ ⁶. Παρόλο που δεν έχουν αναγνωριστεί συγκεκριμένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί σε όλες τις μελέτες ΙΦΝΕ, έχει βρεθεί όμως ότι ορισμένοι φαινότυποι ίσως σχετίζονται με συγκεκριμένα μικροβιακά ερεθίσματα. Ένα παθογόνο το οποίο πιθανώς συνδέεται με την παθογένεια των ΙΦΝΕ είναι το προσκολλητικό διεισδυτικό στέλεχος *E coli* (AIEC). Το AIEC ίσως έχει ένα ρόλο στην NC εξαιτίας της ικανότητάς του να διεισδύει στο επιθήλιο και να συντηρείται εντός των μακροφάγων και έχουν εντοπιστεί AIEC στελέχη σε 22% ασθενών με NC τελικού ειλεού, σε αντίθεση με μόνο 6,2% των υγιών μαρτύρων ⁴⁰. Αντιθέτως ορισμένοι μικροβιακοί υποπληθυσμοί πιθανώς προσφέρουν προστασία από την εμφάνιση των ΙΦΝΕ. Τα βακτήρια που ανήκουν στο φύλο των Firmicutes ανευρίσκονται λιγότερο συχνά σε άτομα με NC ³⁵. Ειδικά το *Faecalibacterium prausnitzii*, ένα βακτήριο που παράγει βουτυρικό και ανήκει στο φύλο των Firmicutes, ανευρίσκεται λιγότερο συχνά σε ασθενείς με ΙΦΝΕ παρά σε υγιείς μάρτυρες και σχετίζεται αντίστροφα με τη σοβαρότητα της ενδοσκοπικής υποτροπής μετά από εντερεκτομή. Έχει επίσης βρεθεί ότι αυτά τα βακτήρια, όταν χορηγηθούν ενδογαστρικά, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και βελτιώνουν την κολίτιδα σε ποντίκια μέσω αύξησης της IL-10 και καταστολής της IL-17 ⁴¹.

Το εξωτερικό περιβάλλον είναι ισχυρός καθοριστικός παράγοντας για το εντερικό μικροβίωμα. Τόσο οι μακροπρόθεσμες όσο και βραχυπρόθεσμες τροποποιήσεις στη διαίτα επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα και οι αλλαγές στη σύνθεση του πιθανώς διαμεσολαβούν στην επίδραση της διαίτας στον κίνδυνο εμφάνισης των ΙΦΝΕ. Οι μακροπρόθεσμες συνήθειες διατροφής οδηγούν σε 2 τύπους εντερικού μικροβιώματος. Ο τύπος 1 που είναι εμπλουτισμένος με *Bacteroides spp.* και σχετίζεται με το Δυτικό τρόπο

διατροφής με υψηλή πρόσληψη ζωικών πρωτεϊνών και κορεσμένων λιπαρών, και το τύπο 2 που είναι πλούσιος σε *Prevotella spp.* και ανευρίσκεται σε άτομα που καταναλώνουν περισσότερο υδατάνθρακες και φυτικές ίνες. Επιπροσθέτως, οι βραχυπρόθεσμες δίαιτες αλλάζουν την ποικιλομορφία και τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος και είναι πιθανό να συνεισφέρουν στην εκδήλωση ΙΦΝΕ ^{42,43}. Η δυσβίωση στις ΙΦΝΕ δεν περιορίζεται μόνο σε βακτηριακά στελέχη αλλά σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν πιθανώς οι ιοί, τα *Archaea* και οι Μύκητες. Τόσο η NC όσο και η ΕΚ έχει σχετιστεί με επικράτηση των βακτηριοφάγων ιών που ανήκουν στην οικογένεια των *Caudovirales*, ανεξάρτητα με τη βακτηριακή δυσβίωση ενώ στελέχη μυκήτων επηρέασαν την ανοσιακή απάντηση και την προδιάθεση για κολίτιδα σε μελέτες με ποντίκια ⁶.

1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

1.3.3.1 *Exposome*

Ο όρος «exposome» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2005 για να συμπεριλάβει κάθε περιβαλλοντική έκθεση στη διάρκεια της ζωής από την περιγεννητική περίοδο και έπειτα ⁴⁴. Υποδιαιρείται περαιτέρω σε «adductome», χημική έκθεση που οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων DNA (DNA adducts) που οδηγούν στην καρκινογένεση, και στο "infectome", δια βίου έκθεση στις λοιμώξεις ⁶. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες πιθανώς έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στις ΙΦΝΕ. Έχουν μελετηθεί η χρήση των αντιβιοτικών, η μέθοδος τοκετού, ο θηλασμός, η μόλυνση της ατμόσφαιρας, η χρήση ΜΣΑΦ, η υποξία ή το υψηλό υψόμετρο, η διατροφή και τα αστικά περιβάλλοντα ³¹. Πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε και νέους πιθανούς παράγοντες έκθεσης: τα στρεσογόνα γεγονότα, τη χρήση αλκοόλ και την υπεραντιδραστικότητα των βρόγχων σχετίστηκαν με τις ΙΦΝΕ. Επιπροσθέτως, προγεννητική έκθεση στο κάπνισμα, η παρουσία συντρόφου στο κρεβάτι, οι αλλεργίες και η υπερευαισθησία στο γάλα αγελάδας σχετίστηκε με τη NC ενώ η παρουσία χαλιών στο πάτωμα και ο νευρωτισμός συνδέθηκαν μόνο με την ΕΚ ⁴⁵. Η ποσοτικοποίηση της έκθεσης σε ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με ΙΦΝΕ για να προβλέψει τη φυσική ιστορία των νοσημάτων και ίσως να βοηθήσει στον εντοπισμό ατόμων σε κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου (π.χ. πρώτου βαθμού συγγενείς). Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να υιοθετήσουν τα big data της πολυ-ωμικής ενσωματώνοντας τα πολυεπίπεδα δεδομένα των κλινικών παραμέτρων, των περιβαλλοντικών εκθέσεων, της γενετικής, της επιγενετικής, της ανοσολογικής λειτουργίας και της δομής των μικροβίων ³¹.

1.3.3.2 *Κάπνισμα*

Το κάπνισμα είναι ο πιο γνωστός παράγοντας έκθεσης που συσχετίστηκε με τις ΙΦΝΕ. Η σχέση ανάμεσα στο κάπνισμα και την ΕΚ περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Harries *et al.* ⁴⁶ το 1982 όταν επισήμανε τη μειωμένη συχνότητα καπνιστών μεταξύ των ασθενών με ΕΚ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Είναι επίσης πλέον γνωστή η αναστροφή συσχέτιση με το ιστορικό καπνίσματος (OR 0.58, 95% CI 0.45–0.75,)

αλλά όχι το ενεργό κάπνισμα, και την ΕΚ⁴⁷. Μία προοπτική μελέτη σε γυναίκες νοσηλεύτριες ανέδειξε ότι ο κίνδυνος για ΕΚ αυξανόταν εντός 2-5 ετών μετά τη διακοπή του καπνίσματος και παρέμεινε αυξημένος για 20 έτη⁴⁸. Σχετικά με τη ΝC, μία μετά-ανάλυση διαπίστωσε ότι το κάπνισμα συνδέεται με διπλάσια αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης της νόσου (OR 1.76, 95% CI 1.40–2.22)⁴⁷. Η πρώιμη, στην παιδική ζωή, έκθεση στον καπνό και στο παθητικό κάπνισμα έχει παρόμοια αποτελέσματα⁴⁹. Παρόλο που το κάπνισμα είναι ένας από τους σταθερά εμπλεκόμενους παράγοντες κινδύνου, η διαφορετική προδιάθεση βάσει του φύλου και της εθνότητας υποστηρίζει περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος. Σχετικά με την ΕΚ έχει δειχθεί ότι το ενεργό κάπνισμα σχετίζεται με καθυστερημένη εκδήλωση νόσου και χαμηλότερο κίνδυνο ανάγκης ανοσοκατασταλτικών στους άνδρες αλλά όχι στις γυναίκες. Αντιθέτως το κάπνισμα σχετίζεται με νεαρή ηλικία έναρξης και πιο συχνή χρήση ανοσοκατασταλτικών σε γυναίκες, αλλά όχι σε άνδρες ασθενείς με ΝC. Επίσης το κάπνισμα έχει σχετιστεί με πιο επιθετική πορεία της ΝC καθώς οι καπνιστές είναι πιο πιθανό να χρειαστούν ανοσοκατασταλτικά και χειρουργική επέμβαση και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής μετά από εκτομή τελικού ειλεού. Αντιθέτως, στην ΕΚ, η διακοπή καπνίσματος είναι συχνός προδιαθεσικός παράγοντας έξαρσης της νόσου εντός ενός έτους από τη διακοπή ενώ ο ενεργός καπνιστής έχει βρεθεί ότι έχει ηπιότερη πορεία της νόσου, λιγότερα χειρουργεία και λιγότερη ανάγκη για ανοσοκατασταλτικά⁶.

Ποικίλες υποθέσεις έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη σχέση μεταξύ καπνίσματος και ΙΦΝΕ αλλά δεν έχει αποδεχθεί ικανοποιητική εξήγηση για τη διαφορετική επίδρασή του ανάμεσα στην ΝC και την ΕΚ. Αφενός, η νικοτίνη είναι γνωστό ότι καταστέλλει τόσο τη φυσική όσο την επίκτητη ανοσία, καθώς ενεργοποιεί την έκκριση IL-10 που έχει αντί-φλεγμονώδη δράση. Αφετέρου, αυξάνει προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, ιντερφερόνη γάμμα (IFN-γ), IL-23, IL-6 και IL-1β.⁵⁰ Το κάπνισμα είναι πιθανό να μεταβάλλει τον τόνο των λείων μυϊκών ινών, να επιδρά στην ενδοθηλιακή λειτουργία μέσω της παράγωγης νιτρικού οξέος ή να επηρεάζει την ακεραιότητα του εντερικού βλεννογονικού φραγμού⁵¹. Η επίδραση του καπνίσματος πιθανώς μεσολαβείται δια του οξειδωτικού στρες και έχει βρεθεί ότι τα μονοκύτταρα καπνιστών με ΝC, αλλά όχι με ΕΚ, προστατεύονται λιγότερο από το οξειδωτικό στρες ελεύθερων ριζών καθώς συνθέτουν μειωμένη ποσότητα της πρωτεΐνης 70 του θερμικού σοκ⁵². Επιπροσθέτως, πολυμορφισμοί σε γονίδια που συνδράμουν στο μεταβολισμό της νικοτίνης και στην κυτταρική οξειδωτική απάντηση πιθανώς μεταβάλλουν την επίδραση του καπνίσματος στις ΙΦΝΕ⁵³. Τέλος, το κάπνισμα είναι γνωστό ότι επιδρά στο μικροβίωμα. Έχει διαπιστωθεί ότι καπνιστές ασθενείς με ΝC έχουν αυξημένη παρουσία *Bacteroides-Prevotella* στο μικροβίωμα του σε σχέση με μη καπνιστές. Η διακοπή καπνίσματος έχει σχετιστεί με μια πρώιμη αλλαγή στη σύνθεση του μικροβιώματος που είναι δυνατό να ερμηνεύει την επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στην ΕΚ μέσω αλληλεπίδρασης με την ανοσολογική απάντηση^{54,55}.

1.3.3.3 Υγιεινή

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι συνθήκες υγιεινής επηρεάζουν την εκδήλωση των ΙΦΝΕ και έχει προταθεί ως αιτία διαφοράς στην επίπτωση ανάμεσα στον αναπτυγμένο και τον αναπτυσσόμενο κόσμο ^{6,56}. Ο αριθμός των αδελφών, το μεγαλύτερο μέγεθος οικογένειας, η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος, η έκθεση σε κατοικίδια και οικόσιτα ζώα (ειδικά σε παιδική ηλικία) έχουν συσχετιστεί αντίστροφα με τον κίνδυνο για ΙΦΝΕ ⁶. Παρόλο που αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει σημαντική αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στο θηλασμό και στην εκδήλωση ΙΦΝΕ (περισσότερο ΕΚ και λιγότερο ΝC), αυτό το εύρημα δεν είναι σταθερό ⁵⁷. Ο τρόπος τοκετού είναι επίσης σημαντικός για το εντερικό μικροβίωμα στην παιδική ηλικία η σχέση με τις ΙΦΝΕ είναι λιγότερο ισχυρή ⁵⁸. Ενδιαφέρον όμως είναι ότι αντίστοιχες μελέτες στον αναπτυσσόμενο κόσμο ανέδειξαν αντίστροφη σχέση των παραγόντων υγιεινής με τις ΙΦΝΕ και αυξημένο κίνδυνο ΕΚ γεγονός που αναδεικνύει την περίπλοκη αλληλεπίδραση του περιβάλλοντος και την πιθανή ισχυρή συσχέτιση με το δυτικό τρόπο ζωής ⁶.

1.3.3.4 Λοιμώξεις

Η σχέση ανάμεσα σε λοιμώδη παθογόνα και τις ΙΦΝΕ έχει μελετηθεί αρκετά αλλά η έλλειψη μεταδοτικότητας, η άριστη απάντηση σε ανοσοκατασταλτική αγωγή και πτωχή απάντηση στα αντιβιοτικά υποστηρίζουν τη απουσία άμεσης αιτιολογικής σχέσης. Ωστόσο, η σημασία της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας, της ακεραιότητας του βλεννογονικού φραγμού και η απάντηση του ξενιστή στα παθογόνα κατά την παθογένεση της νόσου προτείνει έναν περίπλοκο τρόπο αλληλεπίδρασης της προδιάθεσης για τη νόσο και των πιθανών λοιμογόνων παραγόντων ⁶.

Ανάμεσα στα διάφορα παθογόνα, έχει ιδιαίτερα μελετηθεί το *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) (υπεύθυνο για τη νόσο Johnie στις αγελάδες) και έχει βρεθεί υψηλή συχνότητα απομόνωσής του σε ασθενείς με ΝC αλλά μία τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη δεν επιβεβαίωσε κλινικό όφελος από την αντιμυκοβακτηριακή αγωγή ⁵⁹. Έχει επίσης βρεθεί συσχέτιση των ΙΦΝΕ με λοίμωξη από *Salmonella* spp και *Cambylobacter* spp, καθώς και αυξημένος κίνδυνος ΙΦΝΕ ύστερα από επεισόδια γαστρεντερίτιδας ακόμα και χωρίς γνωστή βακτηριακή ή ιογενή αιτιολογία. Αυτός ο κίνδυνος είναι ισχυρότερος για ένα έτος μετά τη λοίμωξη ⁶⁰. Έχει μελετηθεί ο πιθανός ρόλος των ιών στην παθογένεια των ΙΦΝΕ και έχει διαπιστωθεί ότι είναι πιθανό να δρουν ως έναυσμα σε ένα γενετικά προδιαθετημένο άτομο ⁶¹. Τέλος, η υπόθεση της επίδρασης των λοιμογόνων παραγόντων στις ΙΦΝΕ υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι οι λοιμώξεις είναι συχνά αίτιο έξαρσης σε ασθενείς με διαγνωσμένη ΙΦΝΕ. Από αυτές πιο συχνή είναι η λοίμωξη από *C difficile* που αφορά ιδίως νοσηλευόμενους ασθενείς και επηρεάζει αρνητικά τη θνητότητα και τη νοσηρότητα ⁶².

1.3.3.5 Αντιβιοτικά

Μελέτη έχει αναδείξει ότι 58% παιδιών με ΙΦΝΕ είχαν λάβει κάποιο αντιβιοτικό τον πρώτο χρόνο της ζωής τους σε αντίθεση με το 39% των μαρτύρων⁶³. Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η έκθεση σε αντιβιοτικά κατά τη διάρκεια της κύησης και όχι κατά τη βρεφική ηλικία σχετίζεται με την ΙΦΝΕ πολύ πρώιμης έναρξης (very early onset, VEO)⁶⁴.

Υπάρχει μια δόσοεξαρτώμενη σχέση και περισσότερες λήψεις αντιβιοτικών συνεισφέρει σε μεγαλύτερη αύξηση του κινδύνου⁶⁵. Ενδιαφέρον είναι ότι αυτές οι μελέτες έχουν γίνει στο δυτικό κόσμο. Αντίστοιχες μελέτες στην Ασία, όπου ο πληθυσμός έχει υψηλότερα ποσοστά έκθεσης σε λοιμογόνα παθογόνα νωρίς στην παιδική ηλικία, ανέδειξαν ότι η πρώιμη λήψη αντιβιοτικών προσφέρει προφυλακτική δράση τόσο για την NC όσο και για την ΕΚ³⁴. Η σχέση της χρήσης αντιβιοτικών με την εκδήλωση ΙΦΝΕ πιθανώς αφορά στην επίδραση αυτών στο εντερικό μικροβίωμα, το οποίο ποικίλει και δεν έχει σταθεροποιηθεί κατά την παιδική ηλικία⁶.

1.3.3.6 Άλλα φάρμακα

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) ανήκουν στα πιο συχνά καταναλώσιμα φάρμακα και είναι γνωστή η συσχέτιση τους με πεπτικά έλκη. Η χρήση τους όμως έχει συνδεθεί και με την εκδήλωση των ΙΦΝΕ. Αφενός οι μη εκλεκτικοί αναστολείς της κυκλοξυγενάσης προκαλούν μειωμένη σύνθεση των προστατευτικών για το βλεννογόνο προσταγλανδινών. Αφετέρου διαταράσσουν τον κυτταροσκελετό και αυξάνουν την βλεννογονική διαπερατότητα με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η επίδραση των εντερικών βακτηρίων στο εντερικό τοίχωμα και να παρεμποδίζεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Έχει παρατηρηθεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης τόσο NC όσο και ΕΚ, όσο πιο συχνή και παρατεταμένη είναι η χρήση ΜΣΑΦ. Ταυτόχρονα έχει μελετηθεί η επίδραση των ΜΣΑΦ σε πάσχοντες από ΙΦΝΕ και βρέθηκε ότι αυτοί έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο έξαρσης εάν καταναλώνουν συχνά ή σε υψηλές δόσεις ΜΣΑΦ. Αντιθέτως οι εκλεκτικοί αναστολείς της κυκλοξυγενάσης-2 δεν έχουν την ίδια βλαπτική επίδραση στο βλεννογόνο και δε σχετίζονται με έξαρση των ΙΦΝΕ.

Άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα που έχουν σχετιστεί με την εκδήλωση ΙΦΝΕ αφορούν τα από του στόματος αντισυλληπτικά, τα οποία προσφέρουν έναν αυξημένο κίνδυνο για NC αλλά μετά τη διακοπή των σκευασμάτων αυτών μειώνεται το μέγεθος της επίδρασης^{6,31}.

1.3.3.7 Δίαιτα

Μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική έχουν αναδείξει την επίδραση των διατροφικών μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών στον κίνδυνο ανάπτυξης νόσου. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με τη διατροφή και τις ΙΦΝΕ ασχολούνται με τα

μακροθρεπτικά συστατικά (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη) αλλά εμφανίζουν περιορισμούς καθώς στηρίζονται σε μελέτες περιστατικών.

1.3.3.7.1 Φυτικές ίνες

Σταθερό εύρημα είναι η συσχέτιση των ΙΦΝΕ με τη χαμηλή πρόσληψη διαιτητικών ινών. Αντίστοιχα, βρέθηκε ότι γυναίκες με υψηλή και μακροπρόθεσμη ημερήσια πρόσληψη διαλυτών φυτικών ινών, από φρούτα και λαχανικά και όχι από προϊόντα ολικής άλεσης, έχει προστατευτική δράση και μειώνει κατά 40% την πιθανότητα εκδήλωσης ΝC (OR 0.59, 95% CI 0.39–0.90)⁶⁶. Αυτή η σύνδεση πιθανώς εξηγείται από το γεγονός ότι οι διαλυτές ίνες μεταβολίζονται από τα εντερικά μικρόβια σε λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου τα οποία αναστέλλουν τη μεταγραφή των προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Επιπλέον, οι φυτικές ίνες βοηθούν στη συντήρηση του επιθηλιακού φραγμού και περιορίζουν *in vitro* τη διαμετάθεση βακτηρίων *E. coli* του μικροβιώματος προς της πλάκες Peyer^{6,32}.

1.3.3.7.2 Μακροθρεπτικά συστατικά

Τα διαιτητικά λίπη, ιδίως τα κορεσμένα, είναι πιθανό να συμμετέχουν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ^{6,32}. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά προάγει τον πολλαπλασιασμό του δυνητικά παθογόνου μικροβίου *Bilophila wadsworthia* και, ειδικά σε IL-10-knockout ποντίκια, σχετίζεται με φλεγμονώδη απάντηση τύπου Th1 και κολίτιδα⁶⁷. Η αυξημένη κατανάλωση ωμεγα-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (n-6 polyunsaturated fatty acids, PUFA) και η χαμηλή κατανάλωση ωμεγα-3 PUFA (ή υψηλός λόγος ω-6/ω-3) έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για ΝC και ΕΚ και πιθανώς επηρεάζεται από πολυμορφισμούς σε γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, και πιο ειδικά τα ένζυμα CYP4F3 και FADS2⁶⁸. Ειδικότερα, η μελέτη EPIC, μία ευρωπαϊκή προοπτική μελέτη ανέδειξε ότι η αυξημένη κατανάλωση λινολεϊκού οξέως, εν;ος ωμέγα-6 PUFA, σχετίζεται με δοσοεξαρτώμενα αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης ΕΚ (P = 0.01) ενώ η αυξημένη πρόσληψη ωμεγα-3 λιπαρών οξέων έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΕΚ (P = 0.03). Αμφιλεγόμενα αποτελέσματα έχουν προκύψει με την πρόσληψη υδατανθράκων, σακχάρων και ζωικών πρωτεϊνών^{6,32}.

1.3.3.7.3 Μικροθρεπτικά συστατικά

Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τη συσχέτιση των ΙΦΝΕ με μικροθρεπτικά συστατικά. Δεδομένα προτείνουν ότι η Βιταμίνη D συμμετέχει στην παθογένεση των ΙΦΝΕ. Η έλλειψη της 1,25-διυδροξυ βιταμίνης D3 (1,25(OH)2D3) ή η δυσλειτουργία του υποδοχέα της βιταμίνης D σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο κολίτιδας στα ποντίκια ενώ η χορήγηση 1,25(OH) Βιταμίνης D βελτιώνει τη φλεγμονή και καταστέλλει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, όπως του TNF]. Επίσης η βιταμίνη D πιθανώς αναστέλλει την ανταπόκριση των μονοπύρηνων κύτταρων στα κυκλοφορούντα αντιγόνα. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D

είναι πιο συχνή στους ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση ΙΦΝΕ παρά στους υγιείς. Τα χαμηλά επίπεδα 25(OH) Βιταμίνης D (<20ng/ml) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάγκης χειρουργείου και νοσηλείας σε ασθενείς με NC ^{6,31}. Νεότερα δεδομένα όμως αδυνατούν να τεκμηριώσουν εάν η έλλειψη βιταμίνης D αποτελεί το αίτιο ή το αιτιατό των ΙΦΝΕ και δεν επιβεβαιώνεται η θεραπευτική δράση της σε κλινικές μελέτες ⁶⁹.

Ο ψευδάργυρος παρουσιάζει ποικιλία δράσεων στο ανοσολογικό σύστημα και ρυθμίζει τη λειτουργία της φυσικής ανοσίας συμπεριλαμβανόμενων μακροφάγων, ουδετεροφίλων και NK κυττάρων. Ο ψευδάργυρος επίσης αναστέλλει τη μεταγραφή φλεγμονωδών μεσολαβητών στο μονοπάτι NF-κΒ και μειώνει τη δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης. Ειδικά στην περίπτωση της NC ο ενδοκυττάριος ψευδάργυρος είναι σημαντικός για τη λειτουργία της αυτοφαγίας και της βακτηριακής κάθαρσης, μειώνοντας τη βλεννογονική διαπερατότητα. Σχετικά με το διαιτητικό σίδηρο, έχει βρεθεί ότι θα μπορούσε να προκαλέσει κολίτιδα μέσω του IL-6-IL-11-STAT3 μονοπατιού σηματοδότησης, της ενίσχυσης του οξειδωτικού στρες ή της επίδρασης στο μικροβίωμα ⁷⁰.

1.3.3.7.4 Γαλακτοματοποιητές

Η σχέση ανάμεσα στη διατροφή και τις ΙΦΝΕ πιθανώς δεν περιορίζεται μόνο στην επίδραση των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων αλλά εκτείνεται στην επίδραση των συνθετικών συστατικών που προστίθενται κατά την επεξεργασία των τροφίμων, όπως οι γαλακτοματοποιητές. Έχει μελετηθεί η τροποποίηση που προκαλούν δύο γαλακτοματοποιητές (carboxymethyl cellulose, CMC, και polysorbate 80, P80) στο εντερικό μικροβίωμα προς μια προ-φλεγμονώδη κατάσταση αυξάνοντας τα επίπεδα βιοενεργού βακτηριακής φλαγγελίνης εντός 24 ωρών. Εν συνεχεία, το τροποποιημένο μικροβίωμα φαίνεται πως οδηγεί σε μεταβολές στη έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων και στην ανάπτυξη κολίτιδας ³¹.

1.3.3.8 Τρόπος ζωής

Οι ΙΦΝΕ έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένους τύπους προσωπικότητας που περιλαμβάνουν νευρωτισμό, ιδεοψυχαναγκαστική συμπεριφορά, εξάρτηση και τελειομανία ενώ συχνά οι ασθενείς αναφέρουν ως έναυσμα της νόσου περιστάσεις ψυχοκοινωνικής πίεσης ⁷¹. Το άγχος είναι πιθανό να επηρεάσει την εντερική φλεγμονή με διάφορους μηχανισμούς μέσω του άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης - επινεφριδίων και του αυτόνομου νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ενεργοποίηση των μακροφάγων και μεταβολές στην εντερική διαπερατότητα και στο εντερικό μικροβίωμα ⁷². Μελέτες παρατήρησης επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση μεταξύ μειζόνων αγχωτικών εμπειριών ζωής, άγχους και κατάθλιψης και του αυξημένου κινδύνου για εκδήλωση ΙΦΝΕ. Η σύνδεση ανάμεσα στη φυσική άσκηση και τις ΙΦΝΕ υποστηρίζεται από μελέτη που αναγνώρισε ότι η καθιστική ζωή είναι παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΙΦΝΕ. Αντίθετα, η βαριά χειρονακτική εργασία αποτελεί

παράγοντα χαμηλού κινδύνου. Τέλος, η διαταραγμένη ποιότητα ύπνου είναι πιο συχνή σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και σχετίζεται ειδικά με την ενεργή νόσο ⁶

1.3.3.9 Αστικοποίηση

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει ότι οι ΙΦΝΕ είναι πιο συχνές στις αστικές περιοχές. Σε μια ελβετική μελέτη κοορτής η διαβίωση σε αστική ζώνη συσχετίστηκε τόσο με τη ΝC όσο και με την ΕΚ (σχετικός κίνδυνος (RR) 1.49, $P < 0.001$ και RR 1.63, $P < 0.001$ αντίστοιχα). Η επιρροή του αστικού περιβάλλοντος στον κίνδυνο εκδήλωσης νόσου είναι ιδιαίτερα εμφανής σε χώρες που βίωσαν την αστικοποίηση και δυτικοποίηση τις τελευταίες δεκαετίες. Παρόλο που η επίπτωση και ο επιπολασμός παραμένουν χαμηλές στο ανατολικό ημισφαίριο, πολλαπλασιάζονται τα δεδομένα που επιβεβαιώνουν γρήγορη αυξητική τάση στην επίπτωση των ΙΦΝΕ σε αναπτυσσόμενες και αναπτυγμένες χώρες της Ασίας. Η επίδραση της αστικοποίησης στην ανάπτυξη ΙΦΝΕ πιθανώς μεσολαβείται από τις μεταβολές που προκαλεί στον τρόπο ζωής, στη συμπεριφορά, στην έκθεση στη μόλυνση και στη διατροφή ^{31,32}.

1.3.3.10 Περιβαλλοντική μόλυνση

Διάφορα συστατικά της ατμοσφαιρικής μόλυνσης έχουν συσχετιστεί με το επίπεδο υγείας στο αστικό περιβάλλον. έχει βρεθεί σε μελέτες σε ποντίκια ότι βραχείας διάρκειας έκθεση του έντερου σε εναέρια μικροσωματίδια οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα και εξεσημασμένη απάντηση της φυσικής ανοσίας στο λεπτό έντερο ενώ χρόνια έκθεση καταλήγει σε αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταβολές στο μικροβίωμα. Διαπιστώθηκε ταυτόχρονα επιδείνωση της κολίτιδας σε IL-10^{-/-} ποντίκια ⁷³. Κάθε 1-log αύξηση της πυκνότητας της συνολικής εκπομπής ατμοσφαιρικών ρύπων έχει συσχετιστεί με 40% αύξηση των ΙΦΝΕ. Επιμέρους ανάλυση των ρύπων ανέδειξε ότι το CO, NO₂, SO₂, και τα λεπτά σωματίδια (fine particulate matter, PM_{2.5}) είναι αυτά που σχετίζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ⁷⁴.

1.3.3.11 Υψηλό υψόμετρο και Υποξία

Η υποξία είναι γνωστό ότι επάγει φλεγμονώδη απάντηση στα κύτταρα της ανοσίας και στα επιθηλιακά κύτταρα. Σε υποβαρικές συνθήκες υποξίας αυξάνεται η παραγωγή των κυτταροκινών IL-6, IL-1 α και της CRP ⁷⁵. Τα θηλαστικά έχουν γρήγορους προσαρμοστικούς μηχανισμούς στις συνθήκες υποξίας και αυξάνουν τη μεταγραφή παραγόντων αγγειογένεσης, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), γλυκόλυσης και ουροποίησης. Ασθενείς με ΙΦΝΕ έχει βρεθεί ότι έχουν αυξημένη έκφραση αυτών των παραγόντων και ότι είναι πιο πιθανό να εκδηλώσουν έξαρση εντός 4 εβδομάδων από ένα ταξίδι σε υψόμετρο >2000μ. πάνω από το επίπεδο της θάλασσας ^{31,76}. Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι η υποξία οδηγεί σε εντερική φλεγμονή και υπάρχει ανάγκη

για περαιτέρω μελέτες. Στο ίδιο πλαίσιο έχει μελετηθεί εάν το υπερβαρικό οξυγόνο μπορεί να αποτελέσει θεραπεία για τις ΙΦΝΕ με αμφιλεγόμενα έως τώρα αποτελέσματα ³¹.

1.3.3.12 Σκωληκοειδεκτομή

Η σκωληκοειδεκτομή παρουσιάζει μια διαφορετική επίδραση στην ΕΚ και στη ΝΚ ⁵⁶. Έχει διαπιστωθεί ότι η επίπτωση της ΕΚ είναι σημαντικά χαμηλότερη σε άτομα που χρειάστηκαν σκωληκοειδεκτομή πριν την ηλικία των 50 ετών λόγω σκωληκοειδίτιδας και μεσεντερίου λεμφαδενίτιδας παρά λόγω μη ειδικού κοιλιακού άλγους, γεγονός που υποστηρίζει ότι η φλεγμονή της σκωληκοειδούς απόφυσης και όχι τόσο η ίδια η σκωληκοειδεκτομή ίσως είναι υπεύθυνη για αυτήν την προστατευτική συσχέτιση. Η επίδραση της σκωληκοειδεκτομής στην εκδήλωση ΕΚ είναι περιορισμένη μετά την ηλικία των 20 ετών ⁷⁷. Αντίθετα, η σκωληκοειδεκτομή αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης ΝΚ έως και 20 έτη μετά την επέμβαση με λόγο ρυθμών επίπτωσης 2.11 (95% όρια αξιοπιστίας [CI], 1.21-3.79) για τις περιπτώσεις τις επιπλεγμένης σκωληκοειδίτιδας. Όταν όμως οι ασθενείς υποβάλλονταν σε σκωληκοειδεκτομή πριν την ηλικία των 10 ετών ο κίνδυνος αυτός ήταν μειωμένος (ρυθμός επίπτωσης 0.48, 95% CI, 0.23-0.97) ⁷⁸. Τέλος, για την ΕΚ η σκωληκοειδεκτομή έχει σχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο συνύπαρξης πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας, εκδήλωσης πανκολίτιδας και μειωμένης ανάγκης ανοσοκατασταλτικών αλλά δε διαπιστώθηκε επίδραση στον κίνδυνο κολεκτομής ⁷⁹.

1.3.3.13 Άλλοι παράγοντες της πρώιμης ζωής

Μελέτες αλληλούχησης που εξέτασαν το 16s ριβοσωμικό RNA (rRNA) έδειξαν ότι, στο τέλος του πρώτου χρόνου της ζωής ενός ατόμου, το ιδιοσυγκρασιακό μικροβιακό οικοσύστημα αρχίζει να προσλαμβάνει τα χαρακτηριστικά του ενήλικου γαστρεντερικού συστήματος, τονίζοντας την πιθανή σημασία των πιθανών επιρροών σε αυτήν την πρώιμη χρονική περίοδο σχετικά με τον μελλοντικό κίνδυνο ανάπτυξης ΙΦΝΕ. Για παράδειγμα έχει φανεί ότι τα βρέφη που γεννήθηκαν με καισαρική τομή δεν λαμβάνουν τα μικρόβια του μητρικού εντέρου και κόλπου και το μικροβίωμά τους χαρακτηρίζεται από έλλειψη υποχρεωτικώς αναερόβιων μικροβίων και την παρουσία δυνητικών αναερόβιων όπως τα *Clostridium spp* ³¹. Παρόλο την ύπαρξη δεδομένων σχετικά με την επίδραση του τρόπου γέννησης στο εντερικό μικροβίωμα, μια μελέτη πληθυσμού με 1671 άτομα με ΙΦΝΕ και 10488 υγιείς μάρτυρες δεν κατάφερε να αποδείξει σημαντική διαφορά για τον κίνδυνο ανάπτυξης ΙΦΝΕ ανάμεσα στα άτομα που γεννήθηκαν με καισαρική και σε αυτά που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό ⁸⁰.

Οι μελέτες έχουν αναδείξει μια ισχυρή επίδραση του μητρικού θηλασμού στη σύνθεση του βρεφικού εντερικού μικροβιώματος. Με τεχνολογία υψηλής απόδοσης (high-throughput) αλληλούχησης DNA συγκρίθηκε η σύνθεση του μικροβιώματος σε δείγματα κοπράνων από βρέφη ηλικίας 4 μηνών και βρεθήκαν *Actinobacteria* και *Firmicutes* στα δείγματα τόσο από παιδιά που θήλαζαν όσο και από παιδιά που σιτίζονταν

με βρεφική φόρμουλα. Τα βρέφη που θήλαζαν όμως παρουσίασαν μικρότερη ποικιλότητα ενώ τα παιδιά που σιτίζονταν με φόρμουλα είχαν αυξημένη ποσότητα *Peptostreptococcus* και κυρίως *Clostridioides Difficile* το οποίο έχει συσχετιστεί με ατοπία και αλλεργική ευαισθητοποίηση. Η έκθεση στο ανθρώπινο γάλα κατά την ανάπτυξη του βρεφικού ανοσιακού συστήματος μπορεί να προσφέρει ανοχή στα διαιτητικά και μικροβιακή αντιγόνα ³¹. Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση ανέδειξε ισχυρή αντίστροφη σχέση ανάμεσα στο θηλασμό και την NC (OR 0.71, 95% CI 0.59 – 0.85) και την EK (OR 0.78, 95% CI 0.67 – 0.91) με δοσοεξαρτώμενη δράση, δηλαδή όσο μακρύτερη είναι η περίοδος θηλασμού τόσο περισσότερο μειώνεται ο κίνδυνος για ΙΦΝΕ ⁸¹.

1.3.4 Γενετικοί παράγοντες

Η αρχική παρατήρηση περιστατικών σε οικογένειες και σε μελέτες διδύμων ανέδειξαν το ρόλο της γενετικής στην παθογένεση των ΙΦΝΕ και πρότειναν την ύπαρξη κληρονομικότητας που δεν ακολουθεί όμως το μενδελικό πρότυπο ^{20,82,83}. Είναι γνωστό ότι 2-14% των ασθενών με NC αναφέρουν οικογενειακό ιστορικό, κυρίως με την ίδια νόσο και σε μικρότερο ποσοστό με EK. Παρόμοιο ποσοστό, 8-14% των ασθενών με EK έχουν οικογενειακό ιστορικό ΙΦΝΕ, πιο συχνά EK. Ο σχετικός κίνδυνος εκδήλωσης ΙΦΝΕ σε συγγενείς πρώτου βαθμού ενός ασθενή με NC υπολογίζεται περίπου 5% σε μη-Εβραίους και 8% σε Εβραίους. Αντίστοιχα στην EK ο σχετικός κίνδυνος είναι 1,6 και 5,2% αντίστοιχα. Εάν και οι δύο γονείς πάσχουν, ο κίνδυνος να αναπτύξει ΙΦΝΕ ένας απόγονος πριν την ηλικία των 30 ετών υπολογίζεται σε 1:3 ⁸³. Οι μελέτες σε διδύμους επίσης πρότειναν σημαντικό κληρονομικό στοιχείο. Η πιθανότητα εκδήλωσης NC και στους 2 μονοζυγωτικούς διδύμους είναι 20-50% ενώ στους διζυγωτικούς 10%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για την EK είναι χαμηλότερα και υπολογίζονται σε 16% για τους μονοζυγωτικούς και 4% σε διζυγωτικούς διδύμους υποστηρίζοντας ασθενέστερη κληρονομική προδιάθεση. Μεταξύ των ζευγών διδύμων μπορεί να εμφανιστεί διαφορετική έκφραση των ΙΦΝΕ (NC ή EK) ή διαφορετική φυσική πορεία της νόσου, αναδεικνύοντας την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεση των νοσημάτων ⁶.

Οι ακραίοι φαινότυποι, όπως η νόσος πολύ πρώιμης έναρξης (very early onset disease, VEOD) που χαρακτηρίζεται από ανθεκτικότητα στις θεραπείες και σοβαρή περιεδρική νόσο έχει μονογονιδιακή προέλευση (πχ IL10R μεταλλάξεις). Αυτοί οι φαινότυποι φαίνεται πως απαντούν ικανοποιητικά στη μεταμόσχευση αρχηγόνων κύτταρων, σε αντίθεση με την τις κλασικές ΙΦΝΕ που έχουν πολυπαραγοντική παθογένεια ⁸⁴.

Οι GWAS έχουν εντοπίσει περισσότερους από 240 γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ ⁸⁵, είτε μόνο με τη NC ή την EK είτε και με τις δυο διαταραχές ⁸⁶. Πολλαπλά γονίδια στο σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-23, όπως IL-23R, JAK2, STAT3 και p40, έχουν συσχετιστεί και με τις δυο νόσους ²³. Οι γονιδιακές συσχετίσεις μόνο με NC, αλλά όχι με την EK, περιλαμβάνουν το NOD2 και τα γονίδια αυτοφαγίας

ATG16L²³. Αντίθετα έχει παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση της ΕΚ, αλλά όχι της ΝΚ, με την περιοχή του χρωμοσώματος 12q15 που περιλαμβάνει τα γονίδια της ιντερφερόνης γ και της IL-26⁸⁷. Επίσης σε GWAS της ΕΚ έχει διαπιστωθεί σημαντική σχέση με περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II πλησίον του HLA-DRA (άλφα αλυσίδα). Συγκεκριμένα αλληλόμορφα του HLA-DRB1 (βήτα αλυσίδα) έχουν συσχετιστεί και με τα δυο νοσήματα⁸⁸.

Τα περισσότερα υπεύθυνα γονίδια μπορούν να διαιρεθούν σε αυτά που επηρεάζουν τη φυσική ανοσιακή απάντηση, την αυτοφαγία, τη συντήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού φραγμού, την επίκτητη ανοσιακή απάντηση, την αναδόμηση των βλαβών, την απάντηση στο οξειδωτικό στρες και μικροβιακή άμυνα και αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Διάφοροι γενετικοί τόποι είναι πιθανό να επηρεάσουν την ανοσολογική λειτουργία εντός ενός μεμονωμένου μονοπατιού, για παράδειγμα τα γονίδια ATG16L1, NOD2, IRGM, LRRK2 συμμετέχουν στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί επίσης μπορεί να δράσουν σε συνέργεια και να επηρεάσουν έναν κυτταρικό φαινότυπο, όπως για παράδειγμα τη λειτουργία των κύτταρων Paneth^{6,86,89}.

1.3.4.1 NOD2 και ΝΚ

Το πρώτο γονίδιο που συσχετίστηκε με τις ΙΦΝΕ ήταν ένα γενετικός τόπος στο χρωμόσωμα 16 που το 2001 χαρακτηρίστηκε ως το γονίδιο NOD2 με 3 πολυμορφισμούς που επηρεάζουν την προδιάθεση για ΝΚ. Η συσχέτιση ανάμεσα στη ΝΚ και το γονίδιο NOD2 ενισχύει τη σημασία της διαταραγμένης απάντησης στα εντερικά βακτήρια στους ασθενείς με ΙΦΝΕ, καθώς αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα ενδοκυττάριο αισθητήρα πεπτιδογλυκάνης, βασικό στοιχείο του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η συσχέτιση αφορά σε 3 πολυμορφισμούς του NOD2 που αλλάζουν τα αμινοξέα στο NOD2, επηρεάζοντας την απάντηση στις πεπτιδογλύκανες. Το NOD2 εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που εμπλέκονται στις ΙΦΝΕ, επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα Paneth, μακροφάγα, δενδριτικά και ενδοθηλιακά. Φυσιολογικά η ενεργοποίηση αυτής της πρωτεΐνης από τη βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη ενεργοποιεί τα μονοπάτια του πυρηνικού παράγοντα κB (NF- κB) και της πρωτεϊνικής κινάσης επαγομένης από μιτογόνα (mitogen- activated protein, MAP) που οδηγούν στην παραγωγή κυτταροκινών (TNF and IL-1 β) και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Οι φορείς ενός μεταλλαγμένου NOD2 αλληλόμορφου εκδηλώνουν μειωμένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μειωμένη ενεργοποίηση του NF- κB από βακτηριακές πεπτιδογλυκάνες⁹⁰.

Αυτοί οι 3 πολυμορφισμοί συμβαίνουν με αυξημένη συχνότητα σε άτομα ευρωπαϊκής καταβολής, δεν είναι παρούσες σε ασιάτες ασθενείς και είναι σημαντικά λιγότερο συχνές σε αφροαμερικανούς ασθενείς με ΝΚ. Περίπου 30% των ευρωπαίων ασθενών έχουν τουλάχιστον έναν από τους 3 πολυμορφισμούς. Οι φορείς του NOD2 είναι πιο πιθανό να έχουν ειλεϊκή συμμετοχή της νόσου, από τους μη φορείς, και ινοδωστενωτικές επιπλοκές που απαιτούν χειρουργική επέμβαση. Η ομοζυγωτία στο NOD2 σχετίζεται με 20-40 φορές αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης της νόσου ενώ η ετεροζυγωτία παρέχει 2-4

φορές αύξηση του κινδύνου.^{91,92} Αυτός είναι ο υψηλότερος κίνδυνος που έχει παρατηρηθεί για οποιοδήποτε γονίδιο σχετικό με αυτή τη νόσο. Μόνο αυτοί οι πολυμορφισμοί όμως δεν είναι ικανοί να προσκαλέσουν τη νόσο, γεγονός που είναι ενδεικτικό της πολυπαραγοντικής διαταραχής^{90,93}.

1.3.4.2 Γονίδια αυτοφαγίας και NC

Έχει τεκμηριωθεί η συσχέτιση της NC με τα γονίδια ATG16L1 και immunity-related GTPase M protein (IRGM) που συμμετέχουν στην αυτοφαγία^{94–96}. Η αυτοφαγία είναι ο μηχανισμός εκκαθάρισης ενδοκυττάρων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων οργανιδίων, αποπτωτικών σωμάτων και μικροβίων. Το γονίδιο ATG16L1 είναι απαραίτητο σε όλες τις διαδικασίες αυτοφαγίας και οι φορείς της κωδικής μετάλλαξης T300A έχουν αυξημένο κίνδυνο NC⁹⁷. Στα ποντίκια φαίνεται ότι αυτό το γονίδιο ρυθμίζει την έκκριση IL-1β και αναστέλλει την εντερική φλεγμονή⁹⁸. Το IRGM ανήκει στην οικογένεια GTPασων που σχετίζονται με την ανοσιακή απάντηση (p47 immunity-related GTPase family). Οι πολυμορφισμοί του IRGM που συνδέονται με τη NC οδηγούν σε μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση. Τα επιθηλιακά και τα δενδριτικά κύτταρα που περιλαμβάνουν τα αλληλόμορφα των ATG16L1 και NOD2 παρουσιάζουν ελλείμματα στην αντιβακτηριακή αυτοφαγία⁹⁷.

1.3.4.3 Το μονοπάτι Th17-IL-23R

Η συμμετοχή του μονοπατιού Th17-IL-23 είναι τεκμηριωμένη στην παθογένεση των ΙΦΝΕ καθώς έχουν εντοπιστεί σχετικοί με αυτό προδιαθεσικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια IL23R, IL12B, JAK2, και STAT3 τόσο στην ΕΚ όσο και στην NC⁹⁷. Πιο συγκεκριμένα, πολλαπλές ανεξάρτητες συσχετίσεις εντός της περιοχής του γονιδίου του IL23R έχουν βρεθεί στις ΙΦΝΕ, με χαρακτηριστικό τον πολυμορφισμό Arg381Gln. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την υπομονάδα του υποδοχέα της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-23, η οποία συμμετέχει στην ενεργοποίηση των Th17 κύτταρων. Οι φορείς αυτού του σπάνιου αλληλόμορφου με γλουταμίνη είναι 2-3 φορές λιγότερο πιθανό να πάσχουν από ΙΦΝΕ σε σχέση με όσους φέρουν το πιο συχνό αλληλόμορφο με αργινίνη^{99,100}. Δεν έχει όμως ακόμα εξακριβωθεί η επίδραση των πολυμορφισμών στη λειτουργία του IL23R. Επιπροσθέτως, αλληλόμορφα της IL12B που κωδικοποιεί την υπομονάδα p40 της IL-12 και IL-23 έχουν συσχετιστεί τόσο με τις ΙΦΝΕ και όσο και με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις^{23,97,99}.

1.3.4.4 HLA

Το σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (human leucocyte antigen, HLA) στη χρωμοσωμική θέση 6p21.3 είναι η πιο μελετημένη γενετική θέση στις ΙΦΝΕ¹⁰¹. Πρόσφατη μελέτη με τεχνική γονοτύπησης υψηλής πυκνότητας (high-density genotyping) στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) που περιέλαβε 7.406 πολυμορφισμούς σε >30.000 ασθενείς με ΙΦΝΕ και >30.000 υγιείς μάρτυρες ανέδειξε

το ρόλο του HLA-DB1*01:03 τόσο στην NC όσο και στην ΕΚ¹⁰². Παρά την πληθώρα των μελετών, η συσχέτιση του HLA με τις ΙΦΝΕ παραμένει αδιευκρίνιστη¹⁰¹.

1.3.4.5 *TNFSF15*

Το προϊόν του γονιδίου *TNFSF15*, ο TL1A, είναι ένας TNF-like παράγοντας που εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λεμφοκύτταρα του εντερικού χορίου και στα μακροφάγα. Η έκφραση του παράγοντα TL1A έχει συνδεθεί με την ένταση της φλεγμονής στις προσβεβλημένες περιοχές στις ΙΦΝΕ¹⁰³. Η προφλεγμονώδη δράση του έχει βρεθεί ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των CD8+ κυτταροτοξικών Τ κυττάρων, των Th1, Th2 και των Th17 κυττάρων¹⁰⁴. Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *TNFSF15* στις ΙΦΝΕ, μία πρώτη GWAS το 2005 ανακάλυψε συσχέτιση ανάμεσα στον TL1A και τη NC σε πληθυσμό ασθενών στην Ιαπωνία¹⁰⁵. Επακόλουθες ευρωπαϊκές μελέτες επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση και σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς σε ασθενείς με NC και ΕΚ⁸⁶. Πρόσφατα, έχει εντοπιστεί, σε πληθυσμό ασθενών στην Κορέα, ένας πολυμορφισμός του γονιδίου *TNFSF15* (rs6478108 CC) που σχετίζεται με στενωτική και διεισδυτική NC ενώ έτερος πολυμορφισμός (rs4574921 CC) σχετίζεται με περιεδρική συρματοποιό νόσο¹⁰⁶.

1.3.4.6 *Άλλα γονίδια*

Ο κεντρικός ρόλος της IL-10 στη διαμεσολάβηση της εντερικής φλεγμονής διαφαίνεται και από το γεγονός ότι σπάνιες υπολειπόμενες μεταλλάξεις loss-of-function στα γονίδια IL10RA ή IL10RB του υποδοχέα της IL-10 οδηγούν σε εκδήλωση NC⁸⁴. Σε πρώιμες GWAS είχε παρατηρηθεί συσχέτιση ενός κοινού πολυμορφισμού στην περιοχή 1q32 που περιλαμβάνει το γονίδιο της IL-10 με την ΕΚ αλλά όχι με την NC²⁰. Τα αλληλόμορφα του γονιδίου cadherin 1 (CDH1), το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην κύτταρο-κυτταρική προσκόλληση και συμμετέχει στη επιθηλιακές στενές συνάψεις έχει συσχετιστεί με την ΕΚ⁸⁹. Άλλα γονίδια που ρυθμίζουν την ανοσιακή λειτουργία και με τα οποία έχει σχετιστεί η προδιάθεση για ΙΦΝΕ περιλαμβάνουν CARD9, IL1R2, REL, SMAD3, PRDM1⁹⁷.

1.3.4.7 *Γενετικό κενό και τεχνολογικές εξελίξεις*

Παρόλες τις εξελίξεις στη γενωμική, οι έως τώρα γνωστοί γονιδιακοί τόποι ερμηνεύουν λιγότερο από το 1/3 της κληρονομικότητας αυτών των νοσημάτων. Φαίνεται πως υπάρχει ένα κενό στη γνώση μας σχετικά με την γενετική προδιάθεση στις ΙΦΝΕ που αφορά κυρίως στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα γονίδια και στα προϊόντα τους και υποστηρίζει τον ισχυρό ρόλο του περιβάλλοντος και την επίδραση του εσωτερικού μικροπεριβάλλοντος (μικροβίωμα) στην ανοσολογική απάντηση^{6,97}.

Επομένως, το επόμενο βήμα στη διερεύνηση της παθογένεσης των ΙΦΝΕ απαιτεί να γεφυρωθεί το κενό ανάμεσα στις κλινικές και τις επιδημιολογικές παρατηρήσεις. Λόγω του μεγάλου αριθμού

περιβαλλοντικών παραγόντων η μελέτη των συσχετισμών απαιτεί τη χρήση μαθηματικών μοντέλων ώστε να οργανωθούν οι πληροφορίες σε δίκτυα (networks). Αυτή η προσέγγιση είναι βασισμένη σε βιολογικά συστήματα (systems biology approach) με σκοπό να γίνει κατανοητή η παθογένεια των νοσημάτων. Στη αυτή τη συστηματική προσέγγιση, τα βιολογικά δεδομένα (δείγματα αίματος, κοπράνων και βιοψιών) εντάσσονται στην ανάλυση και επεξεργάζονται με τεχνολογία υψηλής απόδοσης (high throughput). Με αυτές τις τεχνικές είναι δυνατό να εντοπιστούν γενετικοί τόποι που σχετίζονται με συγκεκριμένο κλινικό φαινότυπο και να αναγνωριστούν οι βιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ ³¹.

1.3.4.8 Μη- κωδικά RNA και στοιχεία ρύθμισης γονιδίων

Η μεγάλη ποσότητα μορίων μη-κωδικών RNA και η δραστηριότητα των διαγονιδιακών (intergenic) και ενδογονιδιακών (intragenic) ρυθμιστικών στοιχείων επίσης συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της κυτταρικής ταυτότητας διαμορφώνοντας πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Το μεγαλύτερο μέρος του DNA ενός κυττάρου σχηματίζει σύμπλεγμα με 8 ιστονες (πρωτεΐνες) και οργανώνεται σε νουκλεοσώματα, την πρωτοταγή δομική μονάδα της χρωματίνης. Τα συμπλέγματα των νουκλεοσωμάτων αλληλεπιδρούν με το DNA συνδέοντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Πιο ειδικά, η RNA πολυμεράση II (Pol II) αρχικά δεσμεύεται ανοδικά (upstream) στο σημείο της αρχής μεταγραφής στην εγγύς περιοχή ενός εκκινητή και είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή του DNA σε RNA. Άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA, όπως μεταγραφικοί παράγοντες που ενισχύουν ή περιορίζουν την μεταγραφή, επίσης συνδέονται στην περιοχή εκκίνησης αλλά και σε απομακρυσμένες γενωμικές περιοχές (περιοχές που δρουν ως ενισχυτές ή αποσιωπητές) που τελικά αλληλεπιδρούν με μία ή περισσότερες περιοχές εκκίνησης χάρη στην αναδίπλωση DNA. Οι ιστόνες εντός των νουκλεοσωμάτων αλλά και το ίδιο το DNA μπορεί να υποστούν χημική μετατροπή όπως προσθήκη μεθυλ- ομάδων (μεθυλίωση) γεγονός που επηρεάζει τη χρωματινική δομή και τη δραστηριότητα των στοιχείων γονιδιακής ρύθμισης επηρεάζοντας κατ' επέκταση τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης ⁸⁹. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη χαρτογράφηση υποψήφιων ρυθμιστικών στοιχείων εντός του γονιδιώματος ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου. Η run-on αλληλούχιση χρωματίνης (ChRO- seq) ¹⁰⁷ είναι τεχνική που αποτυπώνει τη δραστηριότητα της Pol II κατ μήκος του γονιδιώματος σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (στιγμιότυπο) και καθορίζει όχι μόνο τις μεταγραφόμενες γονιδιακές περιοχές αλλά και τα ενεργά ρυθμιστικά στοιχεία όπου η Pol II είναι παρούσα και όπου συνδέονται μεταγραφικοί παράγοντες. Οι μελέτες ανοικτής χρωματίνης αναγνωρίζουν περιοχές του DNA όπου απουσιάζουν τα νουκλεοσώματα και όπου οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να συνδεθούν και οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκινητές (promoters), ενισχυτές (enhancers), αποσιωπητές (silencers) και μονωτές (insulators). Οι περιοχές όπου οι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί στο DNA μπορούν να εντοπιστούν με τεχνική ανοσοκαθίζησης χρωματίνης ακολουθούμενη από αλληλούχιση (ChIP-seq). Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να χαρτογραφηθεί χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές όπως methylation sequencing (methyl-seq). Το πρότυπο της θέσης των νουκλεοσωμάτων και των μεταβολών στο DNA συχνά αναφέρεται ως επιγενετική

κατάσταση του κυττάρου. Το «επιγένωμα» είναι κρίσιμης σημασίας όχι μόνο για τον ορισμό της βασικής κυτταρικής δραστηριότητας αλλά και για τον καθορισμό του πώς ένα κύτταρο απάντα στα εξωτερικά ερεθίσματα ⁸⁹.

Τα μη-κωδικά μόρια RNA που περιλαμβάνουν τα lncRNAs, miRNAs και tRNA- προερχόμενα (derived) RNAs (tdRNAs) επίσης συνδράμουν στη διαμόρφωση της κυτταρικής ταυτότητας και λειτουργίας. Η ανίχνευση του τοπίου των μικρών RNA μία δεδομένη στιγμή εντός του κυττάρου, τα οποία επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στην πρόσληψη περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, προσαρμογή στο στρες και στην εισβολή παθογόνων, γίνεται με μελέτες όπως η αλληλούχιση του μικρού RNA ¹⁰⁸.

Για παράδειγμα το miRNA εκτελούν μετά-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης καθώς συνδέονται στο mRNA και επηρεάζουν τη σταθερότητα του ή/και τη μετάφρασή του σε πρωτεΐνη. Ένα μοναδικό miRNA μπορεί να στοχεύσει εκατοντάδες γονίδια για μετά-μεταγραφική ρύθμιση και συχνά σε συνεργασία με άλλα miRNAs να επιφέρει σημαντική επίδραση στην έκφραση μοριακών δικτύων διαμορφώνοντας τελικά τον κυτταρικό φαινότυπο. Τα miRNAs είναι σταθερά στην κυκλοφορία και έχει μελετηθεί η διαγνωστικές και θεραπευτικές τους πιθανότητες ⁸⁹.

Οι Weiser *et al.* μελέτησαν τη γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση (ως ρύθμιση χρησιμοποιήθηκε η προσβασιμότητα στη χρωματίνη) σε βιοψίες από μη φλεγμαίνον κόλον ασθενών με NC και φάνηκε ότι υπάρχουν δύο διακριτές ομάδες ασθενών με διαφορετική γονιδιακή έκφραση, μία που ομοιάζει με τη συνήθη έκφραση κυττάρων παχέος εντέρου και μία που περιλαμβάνει γονίδια που εκφράζονται σε κύτταρα ειλεού ¹⁰⁹. Παρομοίως, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των miRNA, και κυρίως του miR-31, σε δείγματα βιοψιών βλεννογόνου παχέος εντέρου μπορούν επίσης να διακρίνουν δύο υποτύπους ασθενών με NC με διαφορετικό φαινότυπο και διαφορετική πρόγνωση ¹¹⁰.

Επιγενετικοί δείκτες, ειδικά η μεθυλίωση του DNA, έχει προταθεί ως βιοδείκτης σε πολλές νόσους όπως οι αυτοάνοσα νοσήματα ¹¹¹, νευρολογικές διαταραχές (ν. Alzheimer, ν. Parkinson) ^{112,113} και ειδικά στον καρκίνο ¹¹⁴. Ωστόσο, οι μελέτες μεθυλίωσης του DNA μαζί με άλλες γενωμικές μελέτες εμφανίζουν σημαντικές δυσκολίες στην κλινική χρήση, όπως την προτυποποίηση, την εκπαίδευση των επαγγελματιών υγείας και την ανάγκη της επαναλαμβανόμενης εξέτασης καθώς το επιγένωμα του ασθενούς μεταβάλλεται με το χρόνο ¹¹⁵. Οι διαφορετικά μεθυλιωμένες γενωμικές περιοχές στους εντερικούς ιστούς έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να διαχωρίσουν προσβεβλημένους από υγιείς ιστούς με χαρακτηριστικές αλλαγές τόσο για την NC όσο και για την ΕΚ ¹¹⁶. Οι διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές του DNA έχει βρεθεί ότι πιθανώς ευθύνονται για τη διαφορετική έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στη NC. Η αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην θεμέλια ουσία και την προσκόλληση των κυττάρων συνεισφέρει στην συσσώρευση φλεγμονωδών λευκοκυττάρων, στην αυξημένη ενδοθηλιακή διαπερατότητα και τη μετανάστευση

λευκοκυττάρων στον εντερικό υποβλεννογόνιο χιτώνα προκαλώντας την εκδήλωση της νόσου αλλά και στη μετατροπή της θεμέλιας ουσίας σε ινώδη ιστό^{117,118}.

Είναι αντικείμενο μελέτης πώς οι γενετικοί τόποι σχετικοί με τις ΙΦΝΕ που έχουν ταυτοποιηθεί με της GWAS μελέτες συνεισφέρουν στο φαινότυπο των νοσημάτων αυτών. Καθώς η πλειοψηφία αυτών των τόπων βρίσκονται σε μη-κωδικές περιοχές, έχει γίνει προσπάθεια αυτές να χαρτογραφηθούν σε σχέση με γνωστά ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδιώματος των εντεροκυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν οι γενετικοί τόποι ποσοτικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την έκφραση (expression quantitative trait loci, eQTL) οι οποίοι είναι γενωμικές περιοχές όπου η παρουσία συγκεκριμένων γονιδιακών αλληλόμορφων, όπως SNPs, μπορεί να συσχετιστεί με τα επίπεδα έκφρασης ενός ή περισσότερων γονιδίων. Αναλύσεις eQTL έχουν αναδείξει συσχετίσεις ανάμεσα σε μη-κωδικούς τύπους και τη γονιδιακή ¹¹⁹.

1.4 Νόσος Crohn

1.4.1 Διάγνωση

1.4.1.1 Κλινική εικόνα

Η διάγνωση της NC στηρίζεται στο συνδυασμό συμπτωμάτων, απεικόνισης, ενδοσκόπησης και ιστολογικών κριτηρίων ^{120,121}. Θα πρέπει να αναζητηθούν στοιχεία από το ιστορικό σχετικά με ταξίδια, λοιμώξεις γαστρεντερικού και λήψη φαρμάκων. Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με ετερογενή και άτυπα συμπτώματα. Η κλινική εικόνα εξαρτάται από την έκταση της νόσου, τη σοβαρότητα της φλεγμονής και τη συμπεριφορά της νόσου. Η συνήθης εκδήλωση αφορά νέο ασθενή με άλγος στο δεξιό λαγόνιο βόθρο, χρόνια διάρροια (διάρροια για περισσότερο από εβδομάδες) και απώλεια βάρους. Η κόπωση και η ανορεξία είναι επίσης συχνά συμπτώματα. Ασθενείς με συμμετοχή του κόλου μπορεί να εκδηλωθεί αίμα από το ορθό ή αιματηρή διάρροια πιθανώς να είναι τα κύρια συμπτώματα ¹²⁰. Το 50% των ασθενών εμφανίζει εξωεντερικές εκδηλώσεις από το δέρμα, τις αρθρώσεις ή τους οφθαλμούς και μάλιστα μπορεί να προηγούνται τις διάγνωσης της NC ¹²⁰.

Κατά τη φυσική εξέταση θα πρέπει να διερευνώνται σημεία συστηματικής φλεγμονής, υποθρεψία, αφυδάτωση, αναιμία και δυσασπορρόφηση. Οι ασθενείς είναι πιθανό να έχουν επώδυνη μάζα στο δεξιό λαγόνιο βόθρο που αντιπροσωπεύει πεπαχυσμένες εντερικές έλικες, πεπαχυσμένο μεσεντέριο ή/και απόστημα. Θα χρειαστεί προσεκτική εξέταση της περιεδρικής περιοχής καθώς οι ασθενείς μπορεί να εκδηλώσουν βλάβες στο πρωκτόδερμα (έλκη και δερματικά ράκη), βλάβες στο πρωκτικό κανάλι (στένωση, ραγάδες και έλκη) και συρίγγια με ή χωρίς αποστήματα. Ο υψηλός πυρετός θέτει την υποψία της

περιεδρικής νόσου, την οποία παρουσιάζει περίπου το ένα τρίτο των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης¹²². Έκκεντρες πρωκτικές ραγάδες ακόμα και ασυμπτωματικές θα πρέπει να θέτουν την υποψία NC ενώ η παρουσία πρωκτικού άλγους και πυώδους εκροής συστήνει την ύπαρξη αποστήματος¹²⁰.

1.4.1.2 Εργαστηριακές εξετάσεις

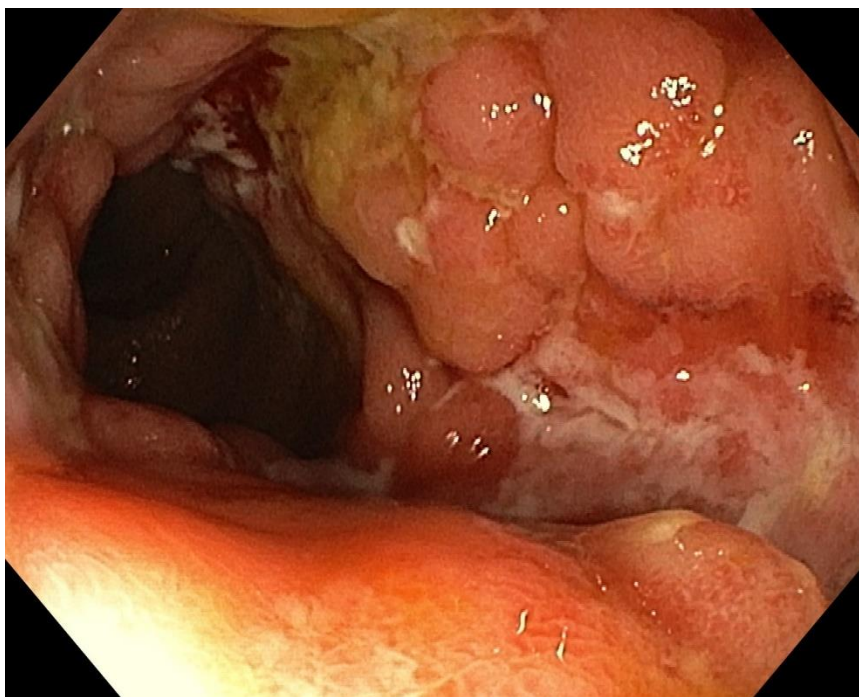
Τυπικά εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν θρομβοκυττάρωση, αύξηση των δεικτών φλεγμονής (ιδίως C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, CRP) και αναιμία. Η CRP είναι ένας βιοδείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ενεργότητας της νόσου αλλά σχετίζεται πτωχά με την ενδοσκοπική ενεργότητα και το ένα τρίτο των ασθενών δεν εμφανίζει ποτέ αύξηση της CRP¹²³. Η υποαλβουμιναιμία και οι ελλείψεις βιταμινών είναι συχνές και ειδικά σε εκτεταμένη νόσο λεπτού εντέρου. Περίπου 60-70% των ασθενών πιθανώς έχουν αντιμικροβιακά αντισώματα στον ορό, κυρίως το IgA αντίσωμα έναντι *Sacharomyces cerevisiae* (ASCA)¹²⁴. Η ειδικότητα και η ευαισθησία αυτών των αντισωμάτων είναι πολύ χαμηλές για διάγνωση αλλά υψηλοί τίτλοι αυξάνουν την πιθανότητα πιο επιθετικής νόσου¹²⁰.

1.4.1.3 Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες των κοπράνων όπως η καλπροτεκτίνη κοπράνων χρησιμοποιούνται όλο και πιο συχνά. Η καλπροτεκτίνη κοπράνων σχετίζεται με τη διήθηση ουδετεροφίλων στο εντερικό τοίχωμα και αντιπροσωπεύει έναν έμμεσο δείκτη εντερικής φλεγμονής με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για τη διάγνωση των ΙΦΝΕ. Τιμή καλπροτεκτίνης κοπράνων <40 μg/g σε ασθενείς με συμπτώματα συνδέεται μόνο με 1% πιθανότητα να πρόκειται για ΙΦΝΕ και είναι συνηγορική συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου. Σε ασθενείς με διάγνωση NC, η τιμή της καλπροτεκτίνης κοπράνων συσχετίζεται με την ενδοσκοπική ενεργότητα της νόσου και είναι χρήσιμος βιοδείκτης για την παρακολούθηση της ενεργότητας και της απάντησης στη θεραπεία, για την πρόβλεψη κλινικής έξαρσης ή μετεγχειρητικής υποτροπής. Το διαγνωστικό όριο για την τεκμηρίωση της βλεννογονικής φλεγμονής εξαρτάται από την τεχνική της εξέτασης και ποικίλει ανάμεσα σε 50-250μg/g. Στην περίπτωση μετεγχειρητικής NC καλπροτεκτίνη >100 μg/g προβλέπει ενδοσκοπική υποτροπή με υψηλή ευαισθησία¹²⁵.

1.4.1.4 Ενδοσκόπηση

Η ενδοσκόπηση παραμένει η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση. Τμηματική φλεγμονή, αφθώδη έλκη αλλά και επιμήκη, οφιοειδείς εξελκώσεις είναι τυπικά ευρήματα. Οι οφιοειδείς εξελκώσεις εν μέσω οιδηματώδους βλεννογόνου δημιουργούν τη χαρακτηριστική ενδοσκοπική εικόνα του «πλακόστρωτου» (**Εικόνα 3**). Καθώς η βλεννογονική επούλωση αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο η κολονοσκόπηση έχει ρόλο και στην παρακολούθηση της νόσου. Για την εκτίμηση της νόσου χρησιμοποιούνται ενδοσκοπικά σκορ όπως το Simplified Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) ώστε να επιτρέπεται σύγκριση μεταξύ των ενδοσκοπικών εκτιμήσεων. Τέλος η κολονοσκόπηση έχει σημαντική θέση στην επιτήρηση για τον κολοορθικό καρκίνο αλλά και για την αντιμετώπιση επιπλοκών όπως οι στενώσεις. Η ενδοσκόπηση του ανώτερου πεπτικού δε συστήνεται συνήθως σε ασθενείς χωρίς αντίστοιχα συμπτώματα.¹²¹



Εικόνα 3: Βαριά προσβολή παχέος εντέρου από ν. Crohn. Διακρίνονται μεγάλα ακανόνιστα έλκη και εικόνα πλακόστρωτου (προσωπικό αρχείο).

Η διαγνωστική ενδοσκοπική κάψουλα λεπτού εντέρου χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου οι ενδοσκοπήσεις ανώτερου και κατώτερου πεπτικού δεν έχουν θέσει τη διάγνωση αλλά υπάρχει ισχυρή κλινική υποψία. Επίσης οι άλλες απεικονιστικές μέθοδοι όπως η μαγνητική εντερογραφία (MR enterography, MRE) και το υπερηχογράφημα λεπτού εντέρου (intestinal US, IUS) δεν μπορούν να αποκλείσουν την παρουσία ΙΦΝΕ για αυτό σε ασθενείς με υψηλή κλινική υποψία και αυξημένη καλπροτεκτίνη θα πρέπει να διενεργείται SBCE. Η ενδοσκοπική κάψουλα λεπτού εντέρου (small bowel capsule endoscopy, SBCE) είναι ένα ευαίσθητο εργαλείο για τον εντοπισμό βλεννογονικών ανωμαλιών στο λεπτό έντερο. Υπάρχουν επί του παρόντος δυο τεκμηριωμένοι δείκτες ενεργότητας, Capsule Endoscopy

Crohn's Disease Activity Index [CECDAI] και το Lewis Score, που εκτιμούν την εντόπιση της νόσου και την ενεργότητα στο λεπτό έντερο. Το διαγνωστικό όριο της κάψουλας είναι συγκρίσιμο με άλλες τεχνικές (MRE, SICUS small intestine contrast us) εκτός από το εγγύς τμήμα της νήστιδας όπου η κάψουλα φαίνεται ανώτερη ¹²⁶. Καθώς η συμμετοχή του εγγύς τμήματος του λεπτού εντέρου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για χειρουργείο αυτή η ανώτερη ακρίβεια της κάψουλας συνοδεύεται από προγνωστική αξία ¹²¹. Η αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου για τη NC λεπτού εντέρου είναι πολύ υψηλή. Η παρουσία τουλάχιστον 3 μικρών εντερικών ελκών στην ενδοσκοπική κάψουλα λεπτού εντέρου υποστηρίζει ισχυρά τη διάγνωση NC με την προϋπόθεση ότι ο ασθενής δε λαμβάνει ΜΣΑΦ για τουλάχιστον 1 μήνα πριν την εξέταση. Παρόλη την ακρίβεια της μεθόδου, η κλινική σημασία ήσσονων βλαβών του λεπτού εντέρου και περαιτέρω ανάγκη για θεραπευτική αντιμετώπιση παραμένει αδιευκρίνιστη. Αντενδείξεις της κάψουλας είναι η εντερική απόφραξη, οι στενώσεις και διαταραχές κατάποσης ¹²⁷. Ο κίνδυνος κατακράτησης της κάψουλας σε ασθενείς με πιθανή NC, χωρίς προηγούμενα συμπτώματα απόφραξης και χωρίς ιστορικό εντερεκτομής ή γνώστη στένωση είναι πολύ χαμηλός. Δεδομένα αναφέρουν ποσοστά κατακράτησης σε ασθενείς με NC στο 2-13% και στο 1.5% περίπου σε ασθενείς με υποψία NC ¹²⁸. Εάν δεν μπορεί να αποκλειστεί η στένωση λεπτού εντέρου θα πρέπει να προηγηθεί κάψουλα βατότητας. Όλες οι κάψουλες βατότητας διαλύονται στις 72 ώρες. Η κάψουλα θεωρείται ασφαλής εάν η βατότητας έχει αποβληθεί πριν τις 30 ώρες, όταν αποβάλλεται άθικτη μετά τις 30 ώρες ή υπάρχει επιβεβαιωμένη διέλευση άθικτης κάψουλας στο παχύ έντερο ¹²¹.

Η μηχανικά υποβοηθούμενη ενδοσκόπηση (device assisted endoscopy, DAE) μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για διαγνωστική εκτίμηση όσο και για ενδοσκοπική παρέμβαση σε όλη την έκταση του λεπτού εντέρου ¹²¹.

1.4.1.5 Ιστοπαθολογία

Τα ιστολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν τις χρόνιες εστιακές τμηματικές ασυνεχείς και διατοιχωματικές φλεγμονώδεις διηθήσεις και τη διατήρηση των καλυκικών κυττάρων (διατήρηση της βλεννοπαραγωγής). Διατοιχωματικές συναθροίσεις λεμφοκυττάρων και πυλωρική μεταπλασία είναι επίσης συχνά ευρήματα. Το ιστολογικό σήμα κατατεθέν της NC είναι το επιθηλιοειδές κοκκίωμα το οποίο όμως ανευρίσκεται στο 15% των βλεννογονικών βιοψιών αλλά έως και στο 70% των χειρουργικών παρασκευασμάτων ¹²⁹.

1.4.1.6 Απεικόνιση

Οι απεικονιστικές μέθοδοι εγκάρσιας απεικόνισης (Cross-sectional imaging tests) όπως το υπερηχογράφημα, η αξονική εντερογραφία (CTE) και η μαγνητική εντερογραφία (MRE) καταλαμβάνουν όλο και πιο σημαντική θέση στη διαχείριση των ΙΦΝΕ και ειδικά της NC. Η CTE και η MRE χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του λεπτού εντέρου. Θα πρέπει να διενεργούνται κατά τη διάγνωση ώστε να εκτιμηθεί η έκταση και η ενεργότητα της νόσου βάσει του πάχους του τοιχώματος και της ενίσχυσης του ενδοφλέβιου σκιαγραφικού (enhancement) ¹³⁰ (Εικόνα 4) αλλά και η παρουσία επιπλοκών (συρίγγια, αποστήματα, στενώσεις). Επίσης χρησιμοποιούνται κατά τη μετέπειτα διαχείριση των ασθενών ώστε να εκτιμηθούν νέες πιθανές επιπλοκές καθώς και η ανταπόκριση στη θεραπεία. Η σύγκριση των δυο τεχνικών αναδεικνύει υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και για τις δυο τεχνικές λόγω της απουσίας ακτινοβολίας η MRE θα πρέπει να προτιμάται αντί της αξονικής, ιδίως σε νέους ασθενείς γιατί μειώνει τον αθροιστική έκθεση στην ακτινοβολία. ¹³¹.



Εικόνα 4: Μαγνητική εντερογραφία ασθενούς με NC με πάχυνση του τοιχώματος του λεπτού εντέρου που προκαλεί στένωση του αυλού (μπλε βέλος) και προστενωτική διάταση (λευκό βέλος) (προσωπικό αρχείο).

Το διακοιλιακό υπερηχογράφημα λεπτού εντέρου (intestinal ultrasound, IUS) είναι μία μη επεμβατική, φθηνή μέθοδος και όταν διενεργείται από εξειδικευμένο προσωπικό έχει παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα με της CTE και MRE στην εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου και των επιπλοκών. Η ακρίβεια του είναι χαμηλότερη για την εκτίμηση εγγύς εντερικών τμημάτων και του παχέος εντέρου. Η MRE και το IUS έδειξαν συμφωνία στον εντοπισμό της νόσου, των στενώσεων και των αποστημάτων. Η MRE ανέδειξε καλύτερα τα εντερο-εντερικά συρίγγια ¹³². Τέλος η MRI είναι η προτιμώμενη τεχνική για την διάγνωση και παρακολούθηση της περιεδρικής νόσου ¹²¹.

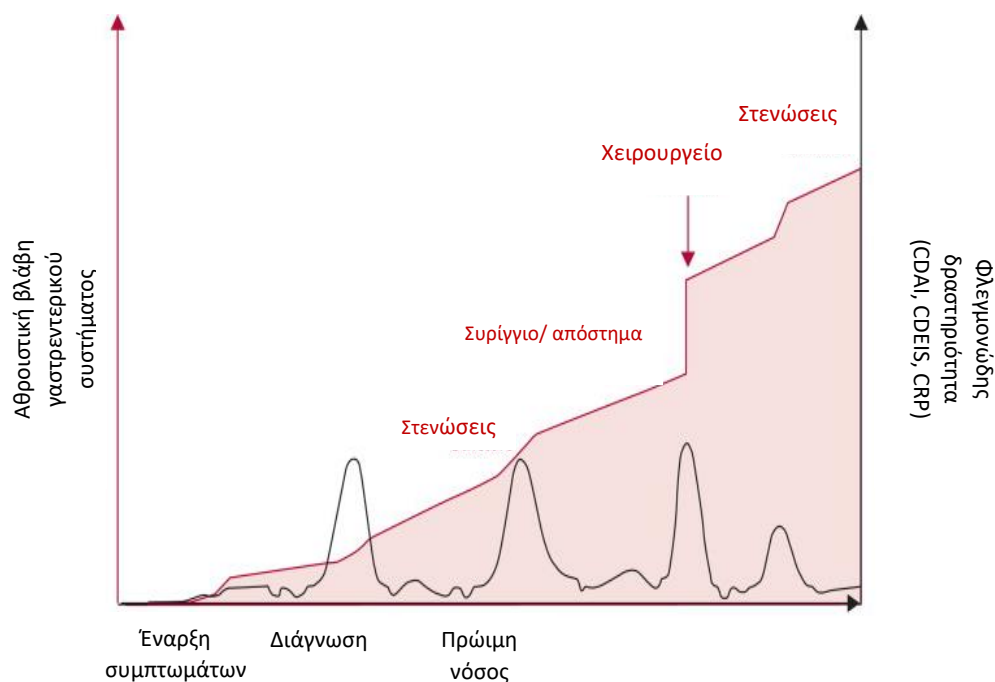
1.4.2 Ορισμός της ενεργότητας και της σοβαρότητας της νόσου

Η ενεργότητα της νόσου αναφέρεται στην εκτίμηση την νόσου σε μια δεδομένη χρονική στιγμή και είναι απαραίτητη για την επιλογή και την παρακολούθηση της θεραπείας και την εκτίμηση της ανάγκης

νοσηλείας. Μια κλινική κλίμακα ενεργότητας κατηγοριοποιεί τη νόσο σε ήπια, μέτρια ή σοβαρή ανάλογα με την απάντηση στη θεραπεία, την παρουσία υποθρεψίας, την παρουσία κοιλιακού άλγους, μάζας ή απόφραξης και το βαθμό της αναιμίας ή της απώλειας βάρους (Crohn's disease activity index, CDAI) ¹³³. Τα συμπτώματα δε σχετίζονται απαραίτητα με την αντικειμενική εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου όπως η ενδοσκόπηση, οι εγκάρσιες απεικονίσεις και οι βιοδείκτες (C-reactive protein, καλπροτεκτίνη). Επομένως τα συμπτώματα δε θα πρέπει να καθοδηγούν τις θεραπευτικές αποφάσεις ¹³⁴. Η σοβαρότητα της νόσου λαμβάνει υπ' όψη την επίδραση της νόσου στον ασθενή, την άθροιση των επιπλοκών, τις χειρουργικές εκτομές, την αναπηρία που προκύπτει από τη νόσο, το φλεγμονώδες βάρος της νόσου και την πορεία της ^{133,135}.

1.4.3 Φυσική ιστορία

Η NC χαρακτηρίζεται από περιόδους κλινικής ύφεσης που εναλλάσσονται με περιόδους έξαρσης. Παρ' αυτά υπάρχει διάκριση ανάμεσα στα κλινικά συμπτώματα και την ενεργότητα της νόσου που δυσχεραίνει την συμβατική παρακολούθηση της. Η εμμένουσα υποκλινική φλεγμονή που συμβαίνει κατά την κλινική ύφεση φαίνεται πως οδηγεί σε επιπλοκές (στενώσεις, συρίγγια και αποστήματα) και σε προοδευτική αθροιστική βλάβη του εντέρου ¹³⁵ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Θεωρητική απεικόνιση της αθροιστικής βλάβης του γαστρεντερικού συστήματος και της παρουσίας φλεγμονώδους δραστηριότητας σε σχέση με την πάροδο του χρόνου στη ν. Crohn (εικόνα προσαρμοσμένη από Pariente B, et al. Gastroenterology. 2015)

Η εντόπιση της NC τείνει να είναι σταθερή αλλά η συμπεριφορά της νόσου μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου. Η βλάβες του εντέρου (στενώσεις, συρίγγια και αποστήματα) εμφανίζονται στο ένα πέμπτο των σθενών κατά τη διάγνωση ¹³⁶. Η ετήσια επίπτωση νοσηλειών είναι περίπου 20% και εντός 10 ετών από τη διάγνωση οι μισοί ασθενείς χρειάζονται κάποιο χειρουργείο σχετικό με τη NC. Το ένα τρίτο θα

χρειαστεί πολλαπλά χειρουργικές επεμβάσεις. το 14% από αυτούς με σοβαρή νόσο ιδίως με συνοδό ορθική συμμετοχή θα απαιτήσουν μόνιμη στομία ¹³⁷.

Η εκτεταμένη νόσος του λεπτού εντέρου ή τα πολλαπλά χειρουργεία ή και τα δυο μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια του εντέρου και σύνδρομο βραχέος εντέρου, μια μη αναστρέψιμη επιπλοκή ¹³⁸. Δυστυχώς το χειρουργείο δεν είναι θεραπευτικό για τη NC καθώς το 50% των ασθενών θα υποτροπιάσει κλινικά, το 8% ενδοσκοπικά και το 30% θα χρειαστεί νέο χειρουργείο ¹³⁹.

Η ταξινόμηση της έκτασης και του φαινοτύπου κατά Montreal ¹⁴⁰ φαίνεται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση έκτασης και φαινοτύπου N. Crohn κατά Montreal

Ηλικία (έτη) διάγνωσης	A1: <16 A2: 17-40 A3: >40
Εντόπιση	L1: ειλεϊκή L2: κολική L3: ειλεοκολική L4: δείκτης ανώτερου πεπτικού
Συμπεριφορά	B1: μη στενωτική, μη διεισδυτική B2: στενωτική B3: διεισδυτική p: δείκτης περιεδρικής νόσου

1.4.4 Παράγοντες κινδύνου για επιπλεγμένη νόσο

Οι παράγοντες κινδύνου για επιπλεγμένη νόσο και πτωχή πρόγνωση έχουν αναζητηθεί σε πληθυσμιακές μελέτες και είναι η ειλεϊκή ή ειλεοκολική εντόπιση της νόσου, η εκτεταμένη προσβολή λεπτού εντέρου, η σοβαρή προσβολή ανώτερου πεπτικού, η νόσος του ορθού, οι περιπρωκτικές βλάβες, η πρώιμη στενωτική ή διεισδυτική νόσος, η νεαρή ηλικία διάγνωσης και το κάπνισμα. Το κάπνισμα είναι επίσης ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για μετεγχειρητική υποτροπή και ανάγκη δεύτερου χειρουργείου ^{120,133,141}. Αυτοί οι κλινικοί παράγοντες κινδύνου έχουν πτωχή ακρίβεια στην πρόγνωση της εξέλιξης της NC και ορισμένοι έχουν εντοπιστεί μόνο από αναδρομικές μελέτες. Επομένως υπάρχει ανάγκη για τον εντοπισμό βιοδεικτών που θα συνδράμουν στην πρόβλεψη της πορείας της νόσου. Ορολογικοί δείκτες

έχουν συσχετιστεί με στενωτική ή διεισδυτικές επιπλοκές και ανάγκη για χειρουργείο ^{120,133} αλλά έχουν μικρή ευαισθησία και δεν είναι διαθέσιμοι ευρέως με αποτέλεσμα να μην μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Παρόμοια, γενετικοί δείκτες πρόγνωσης δεν έχουν επιβεβαιωθεί. Εκτός από τις άμεσα σχετιζόμενες με τη νόσο επιπλοκές, οι ασθενείς με NC έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν εντερικές και εξωεντερικές κακοήθειες ¹²⁰.

1.4.5 Διαχείριση

Η θεραπεία της NC περιλαμβάνει σχήματα επαγωγής της ύφεσης και διατήρησης αυτής. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τη σοβαρότητα της νόσου και την απάντηση σε προηγούμενες θεραπείες. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα στη NC είναι τα κορτικοστεροειδή, τα ανοσοκατασταλτικά (θειοπουρίνες [αζαθειοπρίνη και μερκαπτοπουρίνη] και μεθοτρεξάτη), οι βιολογικοί παράγοντες [anti-TNF (Infliximab, Adalimumab, και Certolizumab pego)], anti-adhesion molecules [vedolizumab] και αντι-IL23/IL12 (Ustekinumab)].

1.4.5.1 Επαγωγή της ύφεσης

1.4.5.1.1 Ήπια- μέτρια νόσος

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, η ήπια προς μέτρια ενεργή νόσος θα πρέπει να θεραπεύεται με κορτικοστεροειδή (βουδεσονίδη ή πρεδνιζολόνη). Στην περίπτωση της τοπικής ελκώδους νόσου ή ελαιοφυλικής νόσου η βουδεσονίδη, ένα τοπικώς δρών γλυκοκορτικοειδές χωρίς συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες, θα πρέπει να προτιμάται παρά την χαμηλότερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την πρεδνιζολόνη. Τα συστηματικά κορτικοστεροειδή (πρεδνιζολόνη) χρησιμοποιούνται για όλες τις άλλες περιπτώσεις. Περίπου το 28% των ασθενών γίνονται κορτικο-ανθεκτικοί. Η βουδεσονίδη και η πρεδνιζολόνη δεν είναι αποτελεσματικές για τη διατήρηση της ύφεσης και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται φάρμακα που επιτρέπουν την αποδέσμευση από τα στεροειδή ώστε να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη μακροχρόνια έκθεση (πχ σακχαρώδης διαβήτης, οστεοπόρωση, υπέρταση και λοιμώξεις) ¹⁴².

Μετά-ανάλυση τυχαιοποιημένων μελετών για τη χρήση 5-αμινοσαλικυλικών (5-ASA) στη NC δεν έδειξε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε σχέση με το placebo και δε συστήνεται η χρήση τους για την επαγωγή της ύφεσης στη NC. Επίσης έχουν μικρή αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της μετεγχειρητικής υποτροπής ^{142,143}.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναζητήσει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών (κυρίως μετρονιδαζόλη, σιπροφλοξασίνη και αντιμυκοβακτηριακά φάρμακα) ως θεραπεία στη NC. Συνολικά κανένα δεν έχει αποδείξει αποτελεσματικότητα στην επαγωγή κλινικής ύφεσης ή βλεννογονικής επούλωσης ενώ

αναφέρονται συχνά ανεπιθύμητες ενέργειες. Επομένως συστήνονται μόνο στην αντιμετώπιση των σηπτικών επιπλοκών της NC. Παρόλο που ο ρόλος των προβιοτικών και της μεταμόσχευσης κοπράνων δεν έχει ακόμα καθιερωθεί ακόμα στη θεραπεία της NC και βρίσκεται υπό μελέτη ¹⁴².

1.4.5.1.2 Μέτρια- σοβαρή νόσος

1.4.5.1.2.1 Συστηματικά κορτικοστεροειδή

Ασθενείς με ενεργή μέτρια προς σοβαρή NC συστήνεται να λαμβάνουν συστηματικά κορτικοστεροειδή για την επαγωγή της ύφεσης. Χορηγείται από του στόματος μεθυλπρεδνιζολόνη 48mg/ημέρα) ή πρεδνιζολόνη 0.5-0.75mg/kg (μέγιστο 60mg). Η χορηγούμενη δόση μειώνεται βαθμιαία ανά εβδομάδα έως την πλήρη διακοπή τους για ένα διάστημα 8-12 εβδομάδων. Η χρήση των κορτικοστεροειδών συνδέθηκε με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών 5 φορές πιο συχνά σε σχέση με το εικονικό φάρμακο. Περιλαμβάνουν σύνδρομο Cushing, ακμή, λοιμώξεις (αυξημένος κίνδυνος ενδοκυτταρικών και πυελικών αποστημάτων σε ασθενείς με NC), εκχυμώσεις, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, οστεοπόρωση, καταρράκτη, γλαύκωμα και καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά ¹⁴².

1.4.5.1.2.2 Ανοσοκατασταλτικά (Θειοπουρίνες – Μεθοτρεξάτη)

Οι θειοπουρίνες δε συστήνονται για την επίτευξη της επαγωγής της ύφεσης λόγω της βραδείας έναρξης δράσης τους [8–12 εβδομάδες] και επομένως δεν είναι περισσότερο αποτελεσματικές από το εικονικό φάρμακο ¹⁴². Δεν έχει τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθοτρεξάτη στην επαγωγή της ύφεσης στη NC. Προτείνεται ως θεραπεία όταν δεν υπάρχουν εναλλακτικές επιλογές σε φάρμακα ή χειρουργείο με την επιφύλαξη ότι αντενδείκνυται στην κύηση ^{142,144}.

1.4.5.1.2.3 Μονοκλωνικά αντισώματα

Αντι-TNF

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του TNF-α είναι αποτελεσματικοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες με ταχεία δράση και έχουν εγκριθεί για την NC. Περιλαμβάνουν τα Ινφλιξιμάμπη (Infliximab, IFX), Ανταλιμουμάμπη (Adalimumab, ADA) και πεγκυλιωμένη Σερτολιζουμάμπη (Certolizumab pegol, CERTOP). Η CERTOP δεν έχει εγκριθεί στη Ευρώπη και είναι διαθέσιμο μόνο στην Ελβετία και τη Ρωσία. Οι τρεις εγκεκριμένοι αντι-TNF βιολογικοί είναι ομοίως αποτελεσματικοί στην επαγωγή και τη διατήρηση της ύφεσης στη NC. Η επιλογή ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες εξαρτάται από την επιλογή του ασθενούς, τη διαθεσιμότητα και το κόστος. Υπάρχει όμως μεταναλύση που αναδεικνύει ότι η IFX μαζί με AZA [OR: 3.1; 95% CI: 1.4–7.7] και η ADA [OR: 2.1; 95% CI: 1–4.6] ως μονοθεραπεία είναι ανώτερες της CERTOP στην επίτευξη της ύφεσης ^{142,145}. Επιπροσθέτως, το IFX και το ADA έχουν αποδείξει αποτελεσματικότητα στη

θεραπεία της περιεδρικής νόσου σε τυχαιοποιημένες μελέτες και συστήνονται από τις κατευθυντήριες οδηγίες σε αυτήν την κατηγορία ασθενών ^{142,146,147}.

Η IFX είναι ένα χιμαιρικό (από άνθρωπο και ποντίκι) IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα που χορηγείται ενδοφλέβια σε δόσεις 5mg/kg στις 0, 2 και εβδομάδες κατά την περίοδο επαγωγής και εν συνεχεία κάθε 8 εβδομάδες. Η ADA είναι πλήρως ανθρωποποιημένο IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα που χορηγείται υποδόρια σε δόση 160mg, μετά από 2 εβδομάδες 80mg και ακολούθως 40mg κάθε 2 εβδομάδες. Η CERTOp είναι ένα πεγκυλιωμένο Fab τμήμα αντισώματος έναντι του TNF-α και χορηγείται υποδορίως σε δόση 400mg τις εβδομάδες 0,2, και 4 ακολουθούμενο από 400mg κάθε 4 εβδομάδες. Το χρονικό σημείο που θα ξεκινήσει η θεραπεία με αντι-TNF είναι σημαντικό και αποτελεί αντικείμενο μελέτης. Προτείνεται ότι οι ασθενείς με αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες (πχ συριγγοποιό περιεδρική νόσο, εκτεταμένη νόσο, βαθιά έλκη, επιπλεγμένος φαινότυπος) επωφελούνται από την πρώιμη έναρξη των ενός αντι-TNF ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος χειρουργείου, νοσηλειών ή εμφάνισης επιπλοκών της νόσου ¹⁴⁸. Επίσης υπάρχουν δεδομένα ότι οι αντι-TNF παράγοντες είναι περισσότερο αποτελεσματικοί εάν εισαχθούν νωρίς στην πορεία της νόσου (τα πρώτα 2 έτη από τη διάγνωση) ¹⁴⁹. Όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πιθανό να προκαλέσουν ανοσογονικότητα. Η προσθήκη ενός ανοσοκατασταλτικού μειώνει την ανοσογονικότητα και αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική για τους ασθενείς που χάνουν την απάντηση στον αντι-TNF ¹⁴². Η τυχαιοποιημένη μελέτη SONIC [Study Of Biologic and Immunomodulator Naive Patients In Crohn's Disease] ¹⁵⁰ συνέκρινε την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με Ινφλιξιμάμπη σε συνδυασμό με την AZA σε σχέση με τη μονοθεραπεία με IFX και διαπιστώθηκε ότι η συνδυασμένη θεραπεία οδήγησε πιο συχνά σε κλινική ύφεση και βλεννογονική επούλωση την εβδομάδα 26 [RR: 1.64; 95% CI: 1.07–2.53 και RR: 1.82; 95% CI: 1.01–3.26 αντίστοιχα]. Παρόλ' αυτά έχει φανεί ότι η συνδυαστική θεραπεία σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο λεμφώματος και σοβαρών λοιμώξεων, συγκριτικά με τη μονοθεραπεία με αντι-TNF ¹⁵¹. Επομένως ο κλινικός γαστρεντερολόγος είναι υπεύθυνος για την απόφαση της θεραπείας λαμβάνοντας υπ' όψη του τα χαρακτηριστικά του ασθενούς, τις τοπικές οδηγίες, την ηλικία του ασθενούς και τον κίνδυνο κακοηθειών, καθώς οι ηλικιωμένοι κινδυνεύουν από λοιμώξεις και λεμφώματα ενώ οι νεότεροι από το ηπατοσπληνικό λέμφωμα ¹⁵². Δεν έχει επιβεβαιωθεί αντίστοιχη ευεργετική δράση του συνδυασμού με AZA για τη θεραπεία με ADA και δε συστήνεται η συνδυαστική θεραπεία ^{142,153}.

Η θεραπεία με αντι-TNF είναι γενικά καλώς αλλά αυξάνουν τον κίνδυνο για ευκαιριακές λοιμώξεις σε ασθενείς με ΙΦΝΕ ενώ υπάρχουν και δεδομένα ότι αυξάνουν το μελανωματικό καρκίνο δέρματος. Η συνδυαστική θεραπεία πιθανώς αυξάνει τον κίνδυνο σοβαρών λοιμώξεων αλλά και τον κίνδυνο λεμφώματος ¹⁵².

Τα βιοομοειδή έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία των ΙΦΝΕ το Σεπτέμβριο 2013 στην Ευρώπη και το Απρίλιο 2016 στις ΗΠΑ. Τα βιοομοειδή δεν παρουσιάζουν διαφορές όσο αφορά την αποτελεσματικότητα

και την ασφάλεια σε σχέση με το πρωτότυπο φάρμακο ¹⁵⁴ ενώ ταυτόχρονα απολαμβάνουν χαμηλότερο κόστος και έτσι γίνονται ευρέως προσβάσιμα.

Βεντολιζουμάμπη

Η Βεντολιζουμάμπη (VDZ) είναι ένα μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα που δρα μπλοκάροντας της α4β7 ιντεγκρίνη με αποτέλεσμα μια εντεροεκλεκτική αναστολή της διαπίδυσης των λεμφοκυττάρων στο βλεννογόνο και αντιφλεγμονώδη δράση. Χορηγείται ενδοφλεβίως σε δόση 300mg στις 0,2 και 6 εβδομάδες για την περίοδο της επαγωγής και εν συνεχεία κάθε 8 εβδομάδες. Οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται την εβδομάδα , μπορεί να επωφεληθούν από μια επιπλέον χορήγηση την εβδομάδα 10 ¹⁵⁵. Το φάρμακο έχει επιτύχει σε τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες την επαγωγή κλινικής ύφεσης χωρίς να αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική διαφορά των ΑΕ σ σχέση με το εικονικό φάρμακο [RR: 0.94; 95% CI: 0.61-1.45]. Επομένως η VDZ συστήνεται σε ασθενείς με μέτρια- προς σοβαρή NC που δεν ανταποκρίθηκαν επαρκώς ή έχουν αντένδειξη να λάβουν συμβατική θεραπεία ή/και αντι-TNF ¹⁴² αν και μελέτες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητά της είναι χαμηλότερη σε ασθενείς που έλαβαν προηγουμένως αντι-TNF ¹⁵⁶.

Ουστεκινουμάμπη

Η Ουστεκινουμάμπη (UST) είναι ένα IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται στην κοινή για τις IL-12 και 23 υπομονάδα p40. Χορηγείται στη NC ως μία πρώτη δόση επαγωγής ενδοφλέβια 6mg/kg και ακολούθως 90mg ανά 8 ή 12 εβδομάδες υποδόρια ¹⁵⁷. Έχει αποδεχθεί με τυχαιοποιημένες μελέτες η αποτελεσματικότητά του στην επαγωγή της ύφεσης σε ασθενείς με μέτρια προς σοβαρή φλεγμονώδη NC, τόσο σε ασθενείς που δεν είχαν πάρει αντι-TNF όσο και στους ασθενείς που ήταν ανθεκτικοί στους αντιTNF ¹⁵⁸. Επίσης συνολικά οι μελέτες δεν ανέδειξαν διαφορά ανάμεσα στην UST και το εικονικό φάρμακο όσο αφορά στις ΑΕ [5.2% vs. 6.4%; RR: 0.79; 95% CI: 0.54–1.15]. Επομένως η UST συστήνεται σε ασθενείς με μέτρια- προς σοβαρή NC που δεν ανταποκρίθηκαν επαρκώς ή έχουν αντένδειξη να λάβουν συμβατική θεραπεία ή/και αντι-TNF ¹⁴².

1.4.5.2 Η διατήρηση της ύφεσης

Οι πιο αποτελεσματικές θεραπείες για τη διατήρηση της ύφεσης στη μέτρια-σοβαρή NC είναι τα ανοσοκατασταλτικά και οι βιολογικοί παράγοντες. Τα 5ASA και τα κορτικοστεροειδή δε συστήνονται καθώς δεν είναι αποτελεσματικές θεραπείες ενώ τα κορτικοστεροειδή σε μακροχρόνια χορήγηση συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών. Για τους ασθενείς με ήπια νόσο δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την κατάλληλη θεραπεία και μία επιλογή είναι καμία θεραπεία και παρακολούθηση ¹⁴².

Οι θειοπουρίνες και η μεθοτρεξάτη πρέπει να θεωρούνται φάρμακα για τη διατήρηση της ύφεσης σε κορτικοεξαρτώμενη NC. ¹⁵⁹. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η χρήση θειοπουρινών στη NC σχετίζεται

με μειωμένη ανάγκη χειρουργείου αλλά έχει μέτριο θεραπευτικό αποτέλεσμα στη διατήρηση της ύφεσης¹⁴². Επίσης, αυτά τα φάρμακα σχετίζονται με έναν αυξημένο κίνδυνο κακοηθειών (λέμφωμα, μη-μελανωματικός καρκίνος δέρματος, αιματολογικές διαταραχές και καρκίνοι ουροποιητικού)¹⁵². Οι θειοπουρίνες θα πρέπει να δίνονται με προσοχή σε νέους άνδρες (ηλικίας <35ετών) και σε ηλικιωμένους ασθενείς. Η παρακολούθηση του μεταβολίτη των θειοπουρινών (6-θειογουανίνη) είναι χρήσιμη στην επίβλεψη της συμμόρφωσης των ασθενών, της υπό- ή υπερ-δοσολογίας, της αντοχής στις θειοπουρίνες, τον επιλεκτικό μεταβολισμό προς 6-MMP¹²⁰.

Υπάρχουν στοιχεία για την αποτελεσματικότητα της μεθοτρεξάτη αλλά δεν χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση καθώς αντενδείκνυται στην κύηση και οι ΙΦΝΕ προσβάλλουν συχνά νέους ασθενείς τους οποίους αφορά ατός ο περιορισμός.

Οι ασθενείς στους οποίους επιτεύχθη η ύφεση με αντι-TNF παράγοντες θα πρέπει να συνεχίσουν αυτούς τους παράγοντες για τη διατήρηση της ύφεσης. Σχετικά με τους ασθενείς στους οποίους η NC υφέθηκε με συνδυασμό αντι-TNF με ανοσοκατασταλικά, φάνηκε ότι η συνέχιση της αγωγής είτε με μονοθεραπεία είτε με συνδυαστική θεραπεία οδηγεί στην ίδια συχνότητα εξάρσεων ενώ διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος λεμφώματος στη συνδυαστική θεραπεία¹⁵².

Επίσης οι ασθενείς οι οποίοι τέθηκαν σε ύφεση με VDZ ή UST θα συνεχίσουν τους ίδιους παράγοντες καθώς έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητά τους σε τυχαιοποιημένες μελέτες¹⁴².

1.4.5.3 Διατροφική θεραπεία

Η διατροφική υποστήριξη είναι πολύ σημαντική στους ασθενείς με NC που έχουν απώλεια σωματικού βάρους ή υποθρεψία καθώς και πριν από χειρουργείο. Σε παιδιά με NC η αποκλειστική εντερική σίτιση συστήνεται ως θεραπεία πρώτης-γραμμής για την επαγωγή της ύφεσης ενώ στους ενήλικες ασθενείς δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν τη διατροφική θεραπεία¹⁴².

1.4.5.4 Διακοπή φαρμάκων

Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα ώστε να συστήνεται είτε η συνέχιση είτε η διακοπή των αντι-TNF σε ασθενείς με NC ύστερα από την επίτευξη μακροχρόνιας ύφεσης. Επομένως οι κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν ότι η απόφαση για τη συνέχιση της θεραπείας θα πρέπει να λαμβάνεται εξατομικευμένα σταθμίζοντας τους κινδύνους και τα οφέλη¹⁴².

1.4.5.5 Χειρουργική θεραπεία

Οι ασθενείς με ανθεκτική NC που αναπτύσσουν επιπλοκές (αποστήματα ή κακοήθεια) ή όσοι δεν ανέχονται τη φαρμακευτική αγωγή, είναι υποψήφιοι για χειρουργική αντιμετώπιση. Επίσης ασθενείς που

εκδηλώνουν αποφρακτικά συμπτώματα χωρίς στοιχεία ενεργού φλεγμονής, δε θα ωφεληθούν από την αντιφλεγμονώδη φαρμακευτική αγωγή και θα πρέπει να αντιμετωπιστούν χειρουργικά ¹²⁰. Οι συμπτωματικές στενώσεις του εντέρου είναι δυνατό να υποβληθούν σε ενδοσκοπική πνευματική διαστολή ή χειρουργείο. Και οι δύο τεχνικές είναι δόκιμες σε περιπτώσεις βραχέων (<5εκ) στενώσεων τελικού ειλεού. Μια επίσης ασφαλής επιλογή για τη θεραπεία στενώσεων λεπτού εντέρου στη NC είναι η στενωματοπλαστική, η οποία προτιμάται σε μεγάλου μήκους τμήματα στένωσης. Οι συμπτωματικές στενώσεις του εντέρου είναι δυνατό να υποβληθούν σε ενδοσκοπική πνευματική διαστολή ή χειρουργείο. Και οι δύο τεχνικές είναι δόκιμες σε περιπτώσεις βραχέων (<5εκ) στενώσεων τελικού ειλεού. Μια επίσης ασφαλής επιλογή για τη θεραπεία στενώσεων λεπτού εντέρου στη NC είναι η στενωματοπλαστική, η οποία προτιμάται σε μεγάλου μήκους τμήματα στένωσης ¹⁶⁰.

Γενικά θα πρέπει να προσφέρεται ως πρώτη επιλογή η λαπαρσκοπική χειρουργική προσέγγιση, ανάλογα με τις δυνατότητες κάθε χειρουργικού κέντρου ¹⁶⁰. Η υιοθέτηση ελαχίστως επεμβατικών χειρουργικών τεχνικών συμβάλει στη βραχύτερη νοσηλεία, ταχύτερη ανάρρωση και καλύτερα κοσμητικά αποτελέσματα ¹²⁰. Η λαπαρσκοπική εκτομή σε περιπτώσεις ασθενών με περιορισμένη μη στενωτική ειλεοφυλική NC (με πάσχον τμήμα τελικού ειλεού <40εκ) είναι μία πιθανή εναλλακτική της θεραπείας με αντι-TNF καθώς έχει φανεί ότι δε διαφέρει η ποιότητα ζωής των ασθενών στους 12 μήνες παρακολούθησης. Σχετικά με τη νόσο παχέος εντέρου, προτείνεται τμηματική κολεκτομή για νόσο περιορισμένη σε ένα τμήμα παχέος εντέρου. σε ανθεκτική κολίτιδα προτείνεται είτε (υφ)ολική κολεκτομή είτε προφυλακτική ειλεοστομία ¹⁶⁰.

Η απόφαση της χειρουργικής αντιμετώπισης θα πρέπει να συζητείται σε διεπιστημονική ομάδα και να περιλαμβάνει κατάλληλη προεγχειρητική απεικόνιση, βελτιστοποίηση της θρέψης, υποστήριξη του ασθενούς και προφύλαξη από θρομβοεμβολικά επεισόδια ^{120,160}.

Επισημαίνεται ότι η προεγχειρητική χρήση κορτικοστεροειδών (>6 εβδομάδες σε δόση $\geq 20\text{mg}$ πρεδνιζολόνης ή αναλόγου) αυξάνει τον κίνδυνο μετεγχειρητικών επιπλοκών. Ασθενείς που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή θα πρέπει να μειώσουν προεγχειρητικά τη λαμβάνουσα δόση προσεκτικά ώστε να μην επιβαρυνθεί σημαντικά το φλεγμονώδες φορτίο της NC. Εάν δεν είναι δυνατή η μείωσή τους Αντίθετα υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι προεγχειρητική θεραπεία με αντι-TNF, VDZ ή UST δεν αυξάνει τον κίνδυνο μετεγχειρητικών επιπλοκών και δεν είναι υποχρεωτική η διακοπή αυτών των φαρμάκων ¹⁶⁰.

Ειδικά για την αντιμετώπιση της επιπλεγμένης περιεδρικής νόσου, δεν υπάρχουν τυχαιοποιημένες μελέτες που να συγκρίνουν την αποκλειστική χειρουργική θεραπεία (συνήθως χρήση παροχέτευσης με seton), την αποκλειστική χρήση αντι-TNF και το συνδυασμό τους. Οι κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν τη χρήση συνδυασμού φαρμακευτικής/χειρουργικής αντιμετώπισης, βασισμένες σε μελέτες παρατήρησης. Συστήνεται η χρήση προωθητικών κρημνών σε επιπλεγμένα περιεδρικά συρίγγια. Η fibrin glue είναι πιθανή

θεραπεία με περιορισμένα αποτελέσματα όπως και η περίδεση του διασφιγκτηριακού συριγγίου. Πρόσφατα εγκρίθηκε η χρήση αλλογενών αρχέγονων κυττάρων από λιπώδη ιστό ως θεραπεία των σύνθετων περιεδρικών συριγγίων. Η πυελική σήψη και εμμένοντα σύμπτωμα περιεδρικής νόσου που δεν ανταποκρίνονται στη φαρμακευτική ή χειρουργική θεραπεία μπορούν να ελεγχθούν με στομία παράκαμψης ¹⁶⁰.

1.5 Ελκώδης Κολίτιδα

1.5.1 Διάγνωση

1.5.1.1 Κλινική εικόνα

Η διάγνωση της ΕΚ στηρίζεται σε κλινικά συμπτώματα και σε αντικειμενικά ευρήματα από την ενδοσκοπική και ιστολογική εξέταση ^{1,161}. Η αρχική εκδήλωση της ΕΚ είναι συχνά αμβληχρή και τα συμπτώματα συχνά προηγούνται της διάγνωσης για εβδομάδες ή μήνες. Περίπου 15% των ασθενών προσέρχονται με οξεία σοβαρή εισβολή της νόσου, με συστηματικά συμπτώματα, όπως απώλεια σωματικού βάρους, πυρετός, ταχυκαρδία, ναυτία και έμετος ¹. Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις και ειδικά η αξονική και περιφερική αρθροπάθεια, η επισκληρίτιδα και το οζώδες ερύθημα πιθανώς συνοδεύουν τη διάγνωση στο 10-20% των περιπτώσεων και μπορεί να προηγούνται των εντερικών συμπτωμάτων στο 10% των ασθενών ¹⁶².

Περισσότεροι από 90% των ασθενών αναφέρουν αποβολή αίματος από το ορθό. Τα συνοδά συμπτώματα γενικά αντανakλούν τη σοβαρότητα της φλεγμονής και πιθανώς διαφέρουν ανάλογα με την έκταση της νόσου ¹. Τα μαλακά ή υδαρή κόπρανα για περισσότερες από 6 εβδομάδες (χρόνια διάρροια)

διαφοροποιούν την ΕΚ από λοιμώδεις κολίτιδες ¹⁶³. Οι ασθενείς με ενεργή νόσο αναφέρουν συχνά έπειξη προς κένωση, τεινεσμό, βλενοπυώδες έκκριμα, νυχτερινή αφόδευση και κολικοειδή κοιλιακά άλγη. Αντίστοιχα, ασθενείς με ορθίτιδα συχνά εκδηλώνουν συμπτώματα όπως αποβολή αίματος από το ορθό, έπειξη, τεινεσμός αλλά και σοβαρή δυσκοιλιότητα. Περιστασιακά μπορεί να εμφανιστούν απλά συρίγγια σε ασθενείς με ΕΚ αλλά υποτροπιάζοντα ή σύνθετα συρίγγια δεν είναι συχνά και θα πρέπει να θέτουν την υποψία ΝC.¹.

Κατά τη διάγνωση θα πρέπει να λαμβάνεται λεπτομερές ιστορικό σχετικά με την έναρξη των συμπτωμάτων, την αιμορραγία από το ορθό, τη σύσταση των κοπράνων, τη συχνότητα των κενώσεων, την ύπαρξη τεινεσμού, έπειξης, κοιλιακού άλγους, ακράτειας ή νυχτερινής διάρροιας και την παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων. Θα πρέπει επίσης να καταγραφούν πρόσφατα ταξίδια, πιθανή επαφή με τις

εντερικές λοιμώξεις, λήψη φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένων αντιβιοτικών και ΜΣΑΦ), κάπνισμα, σεξουαλική συμπεριφορά, οικογενειακό ιστορικό ΙΦΝΕ ή ΚΠΕ και προηγούμενη σκωληκοειδεκτομή ¹

Τα λοιμώδη (πχ βακτήρια, παράσιτα, ιοί και μύκητες) και τα μη λοιμώδη (πχ μικροσκοπική κολίτιδα, δυσασπορόφιση χολικού οξέως, βακτηριακή υπερανάπτυξη, κακοήθειες και διάρροια επαγόμενη από φάρμακα) αίτια θα πρέπει να αποκλειστούν πριν τεθεί η διάγνωση της ΕΚ. Η φλεγμονή γενικά ξεκινάει από το ορθό και επεκτείνεται εγγύτερα κατά συνέχεια ιστού, περιλαμβάνοντας τμήμα το σύνολο του παχέος εντέρου. Παρολ' αυτά ορισμένοι ασθενείς με ορθίτιδα ή αριστερή κολίτιδα είναι δυνατό να έχουν τμηματική συμμετοχή του τυφλού ¹⁶⁴ ή σπάνια παρατηρείται να μην εμπλέκεται το ορθό. Ανάλογα με τα τμήματα που πάσχουν, η έκταση της νόσου ταξινομείται σε ορθίτιδα, αριστερή κολίτιδα και εκτεταμένη κολίτιδα εάν η προσβολή ξεπερνάει την αριστερή κοιλική καμπή (σπληνική) ¹.

Η έκταση θα πρέπει να ελέγχεται στη διάγνωση γιατί η γνώση της ανατομικής επέκτασης της βλεννογονικής φλεγμονής είναι απαραίτητη για την επιλογή της κατάλληλης τοπικής θεραπείας και έχει προγνωστική αξία για τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη παρακολούθηση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Η ταξινόμηση της ΕΚ βάσει της έκτασης

Κατηγορία	Έκταση	Περιγραφή
E1	Ορθίτιδα	Προσβολή μόνο του ορθού
E2	Αριστερή κολίτιδα	Προσβολή του βλεννογόνου εγγύτερα της σπληνικής καμπής
E3	Εκτεταμένη	Προσβολή του βλεννογόνου απώτερα της σπληνικής (συμπεριλαμβάνεται η πανκολίτιδα)

Η φυσική εξέταση περιλαμβάνει τα ζωτικά σημεία (σφύξεις, ΑΠ, θερμοκρασία) σωματικό βάρος και ύψος, και εξέταση της κοιλιακής χώρας. Η εξέταση του περινέου και δακτυλική εξέταση του πρωκτού θα πρέπει να προστίθενται κατά περίπτωση. Η φυσική εξέταση σε ασθενείς με ήπια- μέτρια νόσο μπορεί να είναι καθ' όλα φυσιολογική ¹.

1.5.1.2 Εργαστηριακές εξετάσεις

Κατά τη διάγνωση κάθε ασθενής θα υποβάλλεται σε εργαστηριακές εξετάσεις με γενική αίματος, δείκτες φλεγμονής (CRP), ηλεκτρολύτες και ηπατικά ένζυμα καθώς και μικροβιολογική εξέταση κοπράνων. Η καλπροτεκτίνη κοπράνων είναι ένας ακριβής δείκτης εντερικής φλεγμονής. Οι εργαστηριακές εξετάσεις πιθανώς να είναι φυσιολογικές σε ήπια-μέτρια νόσο. Η γενική αίματος μπορεί να αναδείξει

θρομβοκυττάρωση ως αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής, αναιμία αλλά και λευκοκυττάρωση ή οποία μπορεί να συνδέεται με λοιμώδη επιπλοκή ¹.

Τα δείγματα των κοπράνων θα πρέπει να ελέγχονται για τοξίνες του *C. Difficile* και, ανάλογα με το ιστορικό του ασθενούς, για παράσιτα. Επίσης η ενδοσκόπηση (εύκαμπτη ορθοσγμοειδοσκόπηση ή κολονοσκόπηση μαζί με την ιστολογική εξέταση απαιτούνται για τη διάγνωση αλλά και για την επιβεβαίωση μιας πιθανής έξαρσης. Απαιτούνται επίσης και για τον αποκλεισμό της κολίτιδας από Κυτταρομεγαλοϊό (CMV). Η αναζωπύρωση του CMV μπορεί να συμβεί σε ασθενείς με ΕΚ, ιδίως στους ανοσοκατασταλμένους με σοβαρή προσβολή ¹⁶⁵. Η παρουσία του CMV είναι πιθανό να προκαλεί ανθεκτική στις θεραπείες ΕΚ και σοβαρές εξάρσεις της νόσου. Η βέλτιστη μέθοδος για τον εντοπισμό της κλινικά σημαντικής CVM λοίμωξης δεν έχει τεκμηριωθεί αλλά οι ειδικοί συμφωνούν ότι χρειάζεται ιστολογική/ανοσοιστοχημική επιβεβαίωση παρά PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) στο αίμα. Περιστασιακά εντοπίζονται λίγα έγκλειστα CMV στις ιστολογικές εξετάσεις που δεν αναδεικνύουν απαραίτητα κλινικά σημαντική λοίμωξη. Μεγάλος αριθμός εγκλειστων (χωρίς να είναι σαφής ακόμα ο ελάχιστος αριθμός κατ' οπτικό πεδίο) συνήθως είναι κλινικά σημαντικός ^{1,165}.

1.5.1.3 Βιοδείκτες

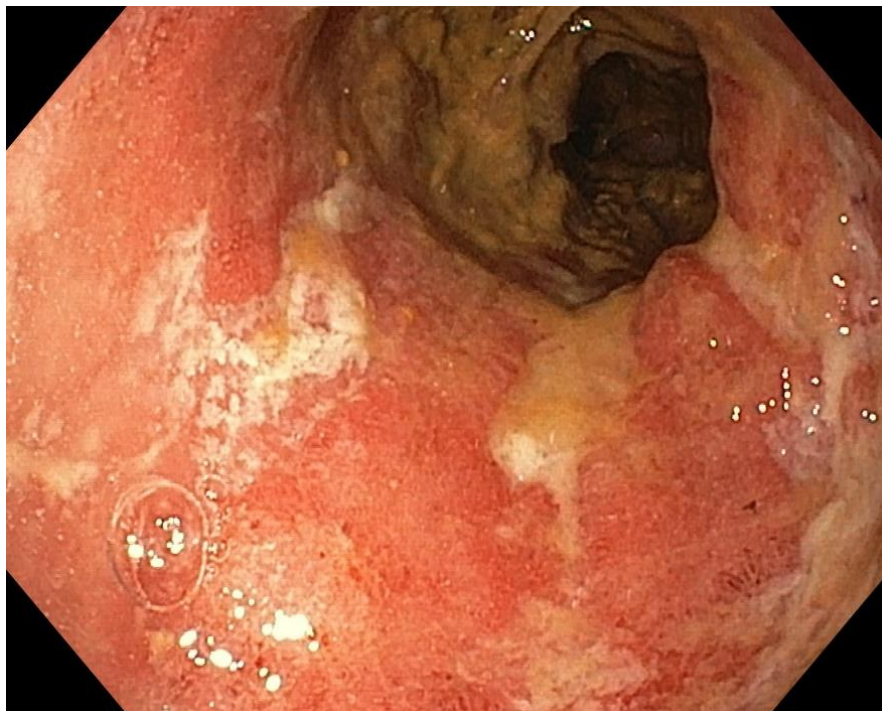
Οι πιο ευρέως μελετημένοι βιοδείκτες στην ΕΚ είναι τα περιπυρηνικά κυτταροπλασματικά αντισώματα έναντι ουδετεροφίλων (pANCAs). Τα pANCAs εντοπίζονται έως και στο 65% των ασθενών με ΕΚ και λιγότερο από το 10% των ασθενών με NC. Οι βιοδείκτες αυτοί έχουν επί του παρόντος μικρή ευαισθησία για τη διάγνωση της ΕΚ και δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη ¹.

1.5.1.4 Ενδοσκόπηση

Οι ενδοσκοπικές αλλοιώσεις χαρακτηριστικά άρχονται από το πρωκτικό δακτύλιο και εκτείνονται εγγύτερα κατά συνέχεια ιστού συγκεντρικά. Το όριο ανάμεσα στο φλεγμαίνοντα και το φυσιολογικό βλεννογόνο είναι συχνά διακριτό, ιδίως στην αριστερή κολίτιδα. Η φλεγμονή ξεκινάει χαρακτηριστικά από το ορθό και εκτείνεται εγγύτερα κατά ένα συνεχή και συγκεντρικό τρόπο επηρεάζοντας άλλοτε άλλη έκταση του παχέος εντέρου. Το εγγύς όριο της φλεγμονής είναι πιθανό να επεκτείνεται ή να υποχωρεί με την πάροδο του χρόνου. Η εκδήλωση της ΕΚ κατά συνέχεια ιστού αμφισβητείται από αναφορές περιπτώσεων όπου φείδεται του ορθού (πιο συχνά σε ασθενείς με PSC) και σε περιπτώσεις με περισκωληκοειδική φλεγμονή (peri-appendiceal patchy inflammation). Η ενδοσκοπική ενεργότητα χαρακτηρίζεται από διάφορα ενδοσκοπικά σημεία όπως κοκκίωση, απώλεια αγγειακού δικτύου, έλκη, αιμορραγία ή/και ευθρυπτότητα τα οποία συνδυάζονται στην ταξινόμηση Mayo ¹. Οι ασθενείς με πανκολίτιδα πιθανώς εκδηλώνουν σημεία φλεγμονής στα τελευταία (άπω) εκ του τελικού ειλεού. Αυτό το σύμπτωμα γνωστό και ως backwash

ειλεΐτιδα, και η έλλειψη βλαβών στο ορθό είναι δύο συμπτώματα που σχετίζονται ισχυρά με την ταυτόχρονη παρουσία πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδα ¹⁶⁶.

Η ενδοσκοπική κλίμακα ενεργότητας της ΕΚ (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity [UCEIS]) εκτιμά το αγγειακό δίκτυο και την παρουσία αιμορραγίας και εξελκώσεων σε 3- επίπεδα σοβαρότητας και αποτελεί το πρώτο επικυρωμένο ενδοσκοπικό σκορ ενεργότητας για την ΕΚ με βαθμολογία από το 0-8 ¹⁶⁷ τα ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά της ήπιας φλεγμονής είναι ερύθημα, αγγειακή συμφόρηση και έστω μερική απώλεια του αγγειακού δικτύου. Μέτρια ενεργότητα χαρακτηρίζεται από πλήρη απώλεια του αγγειακού δικτύου, αίμα προσκολλημένο στο βλεννογόνο και διαβρώσεις με κοκκίωση και ευθρυπτότητα του βλεννογόνου. Η σοβαρή κολίτιδα περιλαμβάνει την παρουσία αυτόματης αιμορραγίας και ελκών ¹. Η παρουσία βαθιών εξελκώσεων (**Εικόνα 6**) είναι κακό προγνωστικό σημείο ενώ σε μακροχρόνια νόσο η βλεννογονική ατροφία οδηγεί σε απώλεια των κολικών κυψελών, στένωση του αυλού και μεταφλεγμονώδεις «ψευδο»-πολύποδες ¹.



Εικόνα 6: Ενδοσκοπική εικόνα σοβαρής ΕΚ με έλκη του βλεννογόνου (προσωπικό αρχείο).

1.5.1.5

1.5.1.6 Ιστοπαθολογία

Η ιστοπαθολογία απαιτείται για τη διάγνωση, την εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου και τον εντοπισμό δυσπλασίας ή καρκίνου. Η ΕΚ είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία που περιορίζεται στο βλεννογόνο. Κατά την ιστολογική εξέταση εκτιμάται ένας μεγάλος αριθμός χαρακτηριστικών όπως η αρχιτεκτονική του βλεννογόνου, η κυτταροβρίθεια του χορίου, η διήθηση από ουδετερόφιλα και οι διαταραχές του επιθηλίου¹²⁹. Για την αξιόπιστη διάγνωση της ΕΚ απαιτούνται τουλάχιστον δύο βιοψίες από τουλάχιστον πέντε τμήματα του παχέος εντέρου, (συμπεριλαμβανομένου του ορθού) και του ειλεού. Οι βιοψίες θα πρέπει να συνοδεύονται από κλινικές πληροφορίες όπως τα ενδοσκοπικά ευρήματα, η χρονική διάρκεια της νόσου και η λαμβάνουσα θεραπεία. Τα δείγματα θα πρέπει να μονιμοποιούνται άμεσα σε φορμαλίνη ή αντίστοιχο διάλυμα πριν τη μεταφορά.

Στα πρώιμα στάδια της νόσου δεν εμφανίζονται όλα τα συνήθη χαρακτηριστικά της ΕΚ και μόνο το 20% των ασθενών έχουν διαταραχή των κρυπτών εντός των πρώτων δύο εβδομάδων από την έναρξη των συμπτωμάτων. Πρώιμο διαγνωστικό σημείο είναι η βασική πλασματοκυττάρωση και έχει υψηλή προγνωστική αξία για τη διάγνωση της ΕΚ. Ένα τα ευρήματα δεν είναι ικανά για τη διάγνωση θα πρέπει να επαναλαμβάνονται οι βιοψίες ύστερα από ένα χρονικό διάστημα¹.

Σε ήδη εγκατεστημένη νόσο, η μικροσκοπική διάγνωση της ΕΚ στηρίζεται στο συνδυασμό της διάχυτης διαταραχής της αρχιτεκτονικής των κρυπτών και βλεννογονική ατροφία. Επίσης αναφέρεται διάχυτη διήθηση του βλεννογόνου από φλεγμονώδη κύτταρα με χαρακτηριστική βασική πλασματοκυττάρωση ενώ η ενεργή φλεγμονή προκαλεί κρυπτίτιδα και κρυπτικά αποστημάτια. Δεν έχει τεκμηριωθεί ο ακριβής αριθμός των απαραίτητων ιστολογικών χαρακτηριστικών για τη διάγνωση της ΕΚ. Φαίνεται ότι η ορθή διάγνωση τίθεται στο 75% των περιπτώσεων όπου εντοπίζονται δύο ή τρία από τα εξής τέσσερα χαρακτηριστικά: σοβαρή διαταραχή της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, σοβαρά μειωμένη πυκνότητα των κρυπτών, ακανόνιστη επιφάνεια του βλεννογόνου και βαρεία διάχυτη διαβλεννογονική φλεγμονώδης διήθηση με απουσία αληθών κοκκιωμάτων^{1,129}. Η θεραπεία είναι πιθανό να τροποποιήσει την κατανομή της φλεγμονής ενώ η νόσος σε ύφεση έχει στοιχεία που σχετίζονται με κρυπτικές βλάβες και την επούλωση αλλά εξαφανίζεται η βασική πλασματοκυττάρωση και η περιορίζεται η κυτταροβρίθεια του βλεννογόνου.

1.5.2 Ορισμός της ενεργότητας και της σοβαρότητας της νόσου

Η κλασική ταξινόμηση της σοβαρότητας της ΕΚ προτάθηκε από τους Truelove και Witts το 1955¹⁶⁸ και θεωρείται ταξινόμηση αναφοράς για το γρήγορο εντοπισμό των ασθενών που απαιτούν άμεση

εισαγωγή στο νοσοκομείο και εντατική θεραπευτική αγωγή ¹ (Πίνακας 3). Η ταξινόμηση της ενεργότητας της νόσου σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Mayo στηρίζεται στον ημερήσιο αριθμό των κενώσεων και την παρουσία αίματος στις κενώσεις, τα ενδοσκοπικά ευρήματα και την εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς από τον θεράποντα ιατρό (Πίνακας 4) ¹⁶⁶.

Πίνακας 3: Ταξινόμηση σοβαρότητας της ΕΚ σύμφωνα με την ταξινόμηση Truelove και Witts

Παράμετροι	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή
Συχνότητα κενώσεων (φορές/ημέρα)	<4 και	Ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ ήπιας και σοβαρής	>6 και
Αίμα στα κόπρανα	(-) ή (+) και		(+++) και
Σημεία συστηματικής φλεγμονής (πυρετός $\geq 37,5$, σφύξεις ≥ 90 /λεπτό, Hb ≤ 10 g/dL, ΤΚΕ ≥ 30 mm/h)	Απόντα		Έστω ένα σημείο παρόν

Πίνακας 4: Ταξινόμηση ενεργότητας ΕΚ κατά Mayo

Παράμετροι	0	1	2	3
Συχνότητα κενώσεων	Φυσιολογικός αριθμός	1-2/ημέρα > από φυσιολογικό αριθμό	3-4/ημέρα > από φυσιολογικό αριθμό	≥ 5 /ημέρα > από φυσιολογικό αριθμό
Αίμα από το ορθό	Απουσία	Ίχνη αίματος σε <50% των κενώσεων	Εμφανής παρουσία αίματος σε >50% των κενώσεων	Αποβολή μόνο αίματος
Βλεννογόνος στην ενδοσκόπηση	Φυσιολογικός βλεννογόνος	Ερύθημα, ασαφopoίηση του αγγειακού δικτύου, ήπια ευθρυπτότητα	Μέτριου βαθμού ευθρυπτότητα με εκσεσημασμένη υπεραιμία και μικροδιαβρώσεις	Αυτόματες αιμορραγίες και έλκη.
Γενική εκτίμηση κατάστασης	Φυσιολογική	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή

1.5.3 Φυσική ιστορία

Η κλινική πορεία της ΕΚ χαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενες περιόδους ύφεσης και εξάρσεων. Κατά τη διάγνωση οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ήπια έως μέτρια συμπτώματα και λιγότερο από 10% εκδηλώνουν σοβαρή νόσο ¹⁶¹. Η σύντομη περίοδος από τη διάγνωση (2 έτη) έως την πρώτη έξαρση, η παρουσία πυρετού ή απώλειας βάρους κατά τη διάγνωση και η ενεργή νόσος τον προηγούμενο χρόνο έχουν

φανεί ως παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο επακόλουθης έξαρσης ¹⁶¹. Οι ασθενείς που διαγνώστηκαν σε νεαρή ηλικία και εκείνοι με συνοδό πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα είναι πιο πιθανό να έχουν εκτεταμένη προσβολή κατά τη διάγνωση.

Επίσης, εξάρσεις που συνοδεύονται από επέκταση της νόσου συχνά ακολουθούν μια πιο επιθετική πορεία και θα πρέπει να θεραπεύονται πιο εντατικά. Η έκταση της ΕΚ είναι προγνωστικός παράγοντας για τη σοβαρότητα της νόσου, την ανάγκη χειρουργείου και τον κίνδυνο καρκίνου παχέος εντέρου ¹⁶¹. Οι ασθενείς με εκτεταμένη κολίτιδα έχουν 3,5- φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για κολεκτομή από αυτούς με ορθίτιδα ¹⁶⁹. Σε μια πληθυσμιακή μελέτη, το ένα πέμπτο των ασθενών με ορθίτιδα ή αριστερή κολίτιδα παρουσίασαν πρόοδο της νόσου σε εκτεταμένη κολίτιδα. Ο κίνδυνος κολεκτομής μετά από 10 έτη είναι 9.8% (95% CI: 7.4-12.4%) και σχετίζεται με την εκτεταμένη κολίτιδα, την ταχύτητα καθίζησης ερυθρών $\geq 30\text{mm/h}$. Ηλικία ≥ 50 έτη στη διάγνωση είναι προστατευτική για κολεκτομή ¹⁷⁰.

1.5.4 Διαχείριση

Οι θεραπευτικοί στόχοι στην ΕΚ έχουν εξελιχθεί από τον έλεγχο των συμπτωμάτων σε πιο αυστηρούς στόχους, όπως η διατήρηση της ύφεσης χωρίς κορτικοστεροειδή, η πρόληψη της νοσηλείας και του χειρουργείου, η βλεννογονική επούλωση, η βελτίωση της ποιότητας ζωής και η αποφυγή της αναπηρίας. Η θεραπεία της ΕΚ αποτελείται κυρίως από μεσαλαμίνη, κορτικοστεροειδή, ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, μονοκλωνικά αντισώματα και νεώτερα μικρά μόρια. Η επιτυχία της θεραπείας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η καταλληλότητα της αγωγής (επαγωγή ύφεσης έναντι διατήρηση αυτής), η βελτιστοποίησης της δόσης και της συμμόρφωσης του ασθενούς ^{1,161}. Η θεραπεία θα πρέπει να εξατομικεύεται βάσει της ενεργότητας της νόσου (ήπια, μέτρια σοβαρή), την έκταση (ορθίτιδα, αριστερή ή εκτεταμένη κολίτιδα) ¹.

1.5.4.1 Επαγωγή της ύφεσης

1.5.4.1.1 Ήπια – μέτρια ενεργή νόσος

Η μεσαλαμίνη είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για την ήπια – μέτρια ενεργή ΕΚ. Η από του στόματος μεσαλαμίνη παρέχεται σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές με διαφορετικό ρυθμό κολικής αποδέσμευσης του φάρμακου που όμως έχουν όλες παρόμοια αποτελεσματικότητα. Η ήπια- μέτρια ορθίτιδα θα πρέπει να θεραπεύεται τοπικά με 1gr μεσαλαμίνης (υπόθετα) που είναι πιο αποτελεσματικά από το τοπικά κορτικοστεροειδή ή την από του στόματος μεσαλαμίνη. Η αριστερόπλευρη ελκώδης κολίτιδα αντιμετωπίζεται με κλύσματα μεσαλαμίνης (1gr/ημέρα) σε συνδυασμό με από του στόματος θεραπεία ($\geq 2.4\text{gr/ημέρα}$). Η συνδυαστική θεραπεία υπερέχει της μονοθεραπείας με μεσαλαμίνη, ή της τοπικής θεραπείας με κορτικοστεροειδή ¹⁷¹.

Η εκτεταμένη κολίτιδα θα πρέπει πάντα να λαμβάνει από του στόματος μεσαλαμίνη. Ο συνδυασμός (από του στόματος και τοπικά σκευάσματα) οδηγούν σε μεγαλύτερα ποσοστά ύφεσης σε σχέση με την κάθε θεραπεία μόνη της. Η μεγαλύτερη δόση μεσαλαμίνης (4,8gr) είναι περισσότερο αποτελεσματική για την επαγωγή της ύφεσης από χαμηλότερες δόσεις. Η από του στόματος μεσαλαμίνη συνήθως δρα μετά από 2-4 εβδομάδες.

1.5.4.1.2 Μέτρια – σοβαρή νόσος

Στην περίπτωση μιας μέτριας προς σοβαρής ΕΚ που δεν ανταποκρίνεται στη μεσαλαμίνη θα πρέπει να προστεθεί κορτιζόνη. Σχεδόν το 70% των ασθενών ανταποκρίνονται στο πρώτο κύκλο θεραπείας με κορτιζόνη, 22% αναπτύσσουν εξάρτηση στα κορτικοστεροειδή και μόνο οι μισοί διατηρούν την ύφεση ελεύθερη κορτικοστεροειδών^{161,171}. Σε περιπτώσεις ήπιας-μέτριας ΕΚ που δεν ανταποκρίνεται στη μεσαλαμίνη προτείνεται η διπροπιονική μπεκλομεθαζόνη (5mg/ημέρα) αλλά και η Βουδεσονίδα MMX (9mg/ημέρα) που έχει λιγότερες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες και καλύτερη ανοχή. Σε περιπτώσεις μέτριας-σοβαρής ΕΚ, η αρχική θεραπεία με κορτικοστεροειδή συνήθως είναι 40mg/ ημέρα πρεδνιζολόνης για μία εβδομάδα και εν συνεχεία η δόση μειώνεται σταδιακά κατά 5mg ανά εβδομάδα, με αποτέλεσμα ένα θεραπευτικό κύκλο 8 εβδομάδων¹⁷¹.

Ασθενείς που παρουσιάζουν ≥ 6 αιματηρές διάρροιες/ ημέρα και έστω ένα σημείο συστηματικής φλεγμονής (σφύξεις >90 /λεπτό, θερμοκρασία $>37,8^{\circ}\text{C}$, αιμοσφαιρίνη $<10,5\text{gr/dl}$, TKE $>30\text{mm/h}$ ή CRP $>30\text{mg/L}$) έχουν σοβαρή κολίτιδα και θα πρέπει να νοσηλεύονται στο νοσοκομείο ώστε να αντιμετωπιστούν με εντατικοποιημένη αγωγή. Η αντιμετώπιση περιλαμβάνει την ενυδάτωση, τη διόρθωση των ηλεκτρολυτικών διαταραχών, την ορθοσγμοειδοσκόπηση έτσι ώστε να ληφθούν βιοψίες για αποκλεισμό CMV λοίμωξης, τη λήψη κοπράνων για αποκλεισμό λοίμωξης από *C. Difficile*, τη χορήγηση ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους. Αν υπάρχουν ενδείξεις χορηγείται αντιβιοτική αγωγή και πραγματοποιείται μετάγγιση αίματος. Η αρχική θεραπεία περιλαμβάνει ενδοφλέβια κορτικοστεροειδή (μεθυλπρεδνιζολόνη 60 mg/ημέρα ή υδροκορτιζόνη 100 mg τέσσερις φορές/ημέρα.). Παρόμοιας αποτελεσματικότητας είναι η κυκλοσπορίνη (2mg/kg/ημέρα) και συνηθίζεται επί αντενδείξεων στα κροτικοστεροειδή. Αν την τρίτη ημέρα από τη στιγμή της χορήγησης της κορτιζόνης δεν υπάρχει επαρκής ανταπόκριση (ορίζεται ως λιγότερες από 8 κενώσεις/ημέρα και CRP $<45\text{mg/L}$), ο ασθενής θα πρέπει να λάβει θεραπεία διάσωσης με IFX. Επί μη ανταπόκρισης στη θεραπεία διάσωσης εντός 4-7 ημερών ή επί επιπλοκών (τοξικό megacolon, διάτρηση, αιμορραγία) ο ασθενής θα πρέπει να υποβληθεί σε χειρουργείο και υφολική κολεκτομή^{161,171}.

Οι ασθενείς με κορτικοεξαρτώμενη νόσο ή αυτοί που υποτροπιάζουν παρά την βέλτιστη δόση μεσαλαμίνης μπορούν να θεραπευτούν με θειοπουρίνες (αζαθειοπρίνη ή μερκαπτοπουρίνη), αντι-TNF (σε συνδυασμό με τις θειοπουρίνες στην περίπτωση του IFX), VDZ ή μεθοτρεξάτη. Επί αποτυχίας μιας από αυτές

τις αγωγές, χορηγείται ένας βιολογικός παράγοντας που δεν έχει ήδη αποτύχει ως θεραπεία δεύτερης γραμμής ή προτείνεται το χειρουργείο (κολεκτομή) ¹⁷¹.

Οι δοσολογίες των φαρμάκων και τα μεσοδιαστήματα των βιολογικών παραγόντων έχουν συζητηθεί στο κεφάλαιο της NC.

Πρόσφατα εγκρίθηκε η Τοφαστινίμπη (tofacitinib, TOFA) ως ένας νέος θεραπευτικό παράγοντας για την ΕΚ. Πρόκειται για ένα μικρό μόριο, αναστολέας των JAK1/JAK3 κινασών που έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητά του στην επαγωγή και διατήρηση της κλινικής και ενδοσκοπικής ύφεσης στη ΕΚ σε σχέση με το εικονικό φάρμακο. Χορηγείται από του στόματος σε δόση 5mg 2 φορές την ημέρα, με δυνατότητα εντατικοποίησης σε 10mg 2 φορές την ημέρα. Προς το παρόν η χρήση της έχει συσχετιστεί μικρή αύξηση των λοιμώξεων και ειδικά αναζωπύρωση του έρπητα ζωστήρα ¹⁷². Επίσης φάνηκε ότι η δόση των 10mg έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (επίσης ένδειξη του φαρμάκου) και η χρήση της γίνεται με προσοχή σε ασθενείς με σχετικό ιστορικό ^{173,174}.

1.5.4.2 Διατήρηση της ύφεσης

Ο στόχος της θεραπείας συντήρησης είναι να διατηρηθεί ύφεση ελεύθερη κορτικοστεροειδών κλινικά και ενδοσκοπικά. Συστήνεται μακροχρόνια θεραπεία συντήρησης σχεδόν σε όλους τους ασθενείς. Ίσως είναι αποδεκτή διαλείπουσα θεραπεία σε ασθενείς με ορθίτιδα.

Η επιλογή της θεραπείας συντήρησης εξαρτάται από την έκταση της νόσου, την πορεία της (συχνότητα και σοβαρότητα εξάρσεων), την αποτυχία προηγούμενων θεραπευτικών παραγόντων, τη σοβαρότητα της πιο πρόσφατης έξαρσης και τη θεραπεία με την οποία επιτεύχθηκε η ύφεση. Επίσης λαμβάνεται υπ' όψη δεδομένα ασφάλειας και νεοπλασματικού κινδύνου εξατομικευμένα για τον κάθε ασθενή ¹⁷¹.

Σε περιπτώσεις που η ύφεση έχει τεθεί με μεσαλαμίνη ή κορτικοστεροειδή (όχι σοβαρή ΕΚ), η πρώτη γραμμή θεραπείας συντήρησης είναι η μεσαλαμίνη τοπική, από του στόματος ή συνδυασμός ανάλογα με την έκταση της νόσου. Η από του στόματος δόση είναι 2g/ημέρα. Τοπικά αρκεί χορήγηση 3g/εβδομάδα. Οι θειοπουρίνες συστήνονται για τους ασθενείς με ήπια-μέτρια νόσο με αποτυχία ή δυσανεξία στη μεσαλαμίνη, για τους κοριτικοεξαρτώμενους ασθενείς και για τους ασθενείς με σοβαρή νόσο που ανταποκρίθηκαν στα κυκλοσπορίνη/τακρολιμους. Τέλος οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν σε βιολογικούς παράγοντες (αντι-TNF ή VDZ) ή TOFA προτείνεται η συνέχιση της ίδια αγωγής (με συγχορήγηση αζαθειοπρίνης στην περίπτωση του IFX) ¹⁷¹.

1.5.4.3 Προβιοτικά

Έχει συγκριθεί σε τυχαιοποιημένες μελέτες το προβιοτικό στέλεχος E. Coli Nissle (EcN) με τα 5-ASA για τη συντήρηση της ύφεσης στην ΕΚ και έχει φανεί ότι δεν είναι κατώτερο της μεσαλαμίνης σε δόση 100 mg/ημέρα EcN για 4 ημέρες και στη συνέχεια 200 mg/ημέρα. Η διάθεση του στην παγκόσμια αγορά όμως είναι περιορισμένη¹⁷¹.

1.5.4.4 Χειρουργική θεραπεία

Η σύγχρονες χειρουργικές τεχνικές στην ελκώδη κολίτιδα προσφέρει καλύτερη ποιότητα ζωής στους ασθενείς που οδηγούνται στην κολεκτομή. Έως τις αρχές της δεκαετίας του 1980 η συνήθης χειρουργική αντιμετώπιση των ασθενών αυτών ήταν η πρωκτοκολεκτομή και η δημιουργία μόνιμης ειλεοστομίας. Την τελευταία 20ετία η νέα καθιερωμένη τεχνική είναι η ειλεοπρωκτική αναστόμωση με τη δημιουργία νεοληκύθου (ileal pouch-anal anastomosis, IPAA).

Η λήψη της απόφασης του χειρουργείου σε ένα ασθενή με ΕΚ είναι αποτέλεσμα διεπιστημονική ομάδας και, όταν τεθεί η ένδειξη, το χειρουργείο δεν πρέπει να καθυστερήσει καθώς έχει βρεθεί ότι αυξάνεται ο κίνδυνος χειρουργικών επιπλοκών.

Σε ασθενείς με οξεία σοβαρή ελκώδη κολίτιδα, σε ασθενείς που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή σε δοσολογία ≥ 20 mg για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 βδομάδων και σε ασθενείς που λαμβάνουν anti-TNF παράγοντα προτείνεται μια κατά στάδια χειρουργική διαδικασία, αρχικά με υφολική κολεκτομή. Η λαπαροσκοπική προσπέλαση έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματική και ασφαλής ακόμα και σε επείγουσες καταστάσεις, καθώς μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης λοιμώξεων, αποστημάτων και βραχύνει το χρόνο νοσηλείας του ασθενούς. Όταν χρησιμοποιείται η κατά στάδια χειρουργική τεχνική συστήνεται η δημιουργία μίας προφυλακτική ειλεοστομίας αγκύλης ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιπλοκών, όπως διαφυγή της αναστόμωσης.

Όταν δημιουργείται η νεοληκύθος το μέγιστο επιτρεπτό τμήμα ορθού από την οδοντωτή γραμμή έως την αναστόμωση δε θα πρέπει να ξεπερνά τα 2cm. Σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει ο κίνδυνος εμμένουσας φλεγμονής του ορθικού κολοβώματος (στην βιβλιογραφία συναντάται με το όρο «cuffitis») που μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία της νεοληκύθου και σπάνια σε καρκίνο.

Επίσης, η χειρουργική αυτή τεχνική (IPAA) θα πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα κέντρα αναφοράς, καθώς έχει αποδειχθεί ότι σε κέντρα με αυξημένο ετήσιο αριθμό περιστατικών ποσοστό των μετεγχειρητικών επιπλοκών είναι μειωμένο και υπάρχει μεγαλύτερη εμπειρία της αντιμετώπισης της δυσλειτουργίας της νεοληκύθου. Δεν έχουν καθιερωθεί τα κριτήρια για να οριστεί ένα τέτοιο κέντρο αναφοράς.

Έχειδειχθείότιειλεοπρωκτικήαναστόμωσημετηδημιουργίανεοληκύθουμειώνειτηγονιμότητασεγυναίκεςπουβρίσκονταισεαναπαραγωγικήηλικία,διότιδημιουργούνταισυχνάσυμφύσειςγύρωαπότιςσάλπιγγες.Ημείωσητηςγονιμότηταςστιςμελέτεςκυμαίνεταιαπό30%-70%.Πιθανώςηλαπαροσκοπικήτεχνικήμειώνειαυτήντηνεπιπλοκήαλλάπροςτοπαρόνπροτείνεταιεναλλακτικά,σεγυναίκεςαναπαραγωγικήςηλικίας,ηυφολικήκολεκτομήμετελικήειλεοστομίακαιηειλεο-ορθικήαναστόμωση¹.

1.5.5 Παρακολούθηση της νεοληκύθου

Ύστερα από ένα χειρουργείο IPAA, προτείνεται ενδοσκόπηση της νεοληκύθου σε συμπτωματικούς ασθενείς ώστε να τεκμηριωθεί η δυσλειτουργία της νεοληκύθου και να αποκλειστούν άλλα αίτια (νόσος Crohn, ισχαιμία, CMV ή C. Difficile λοίμωξη, σύνδρομο ευερέθιστης νεοληκύθου). Εν συνεχεία προτείνεται ετήσια ενδοσκόπηση σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για νεοπλασία (δυσπλασία ή καρκίνος πριν την κολεκτομή, ατροφία βλεννογόνου, σοβαρή φλεγμονή) και ΠΣΧ. Δεν είναι σαφή τα δεδομένα παρακολούθησης για τους ασυμπτωματικούς ασθενείς χωρίς παράγοντες κινδύνου ¹.

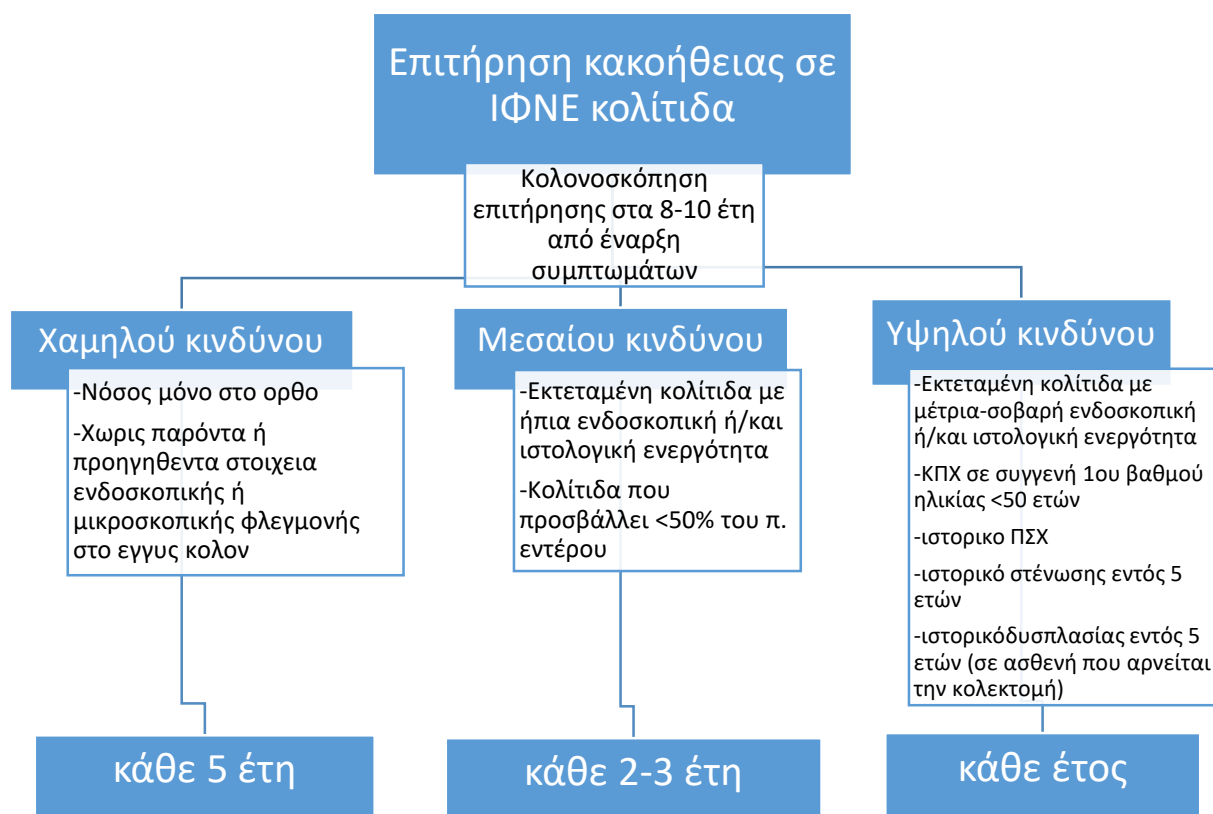
1.6 Γονιμότητα και κύηση στις ΙΦΝΕ

Η γονιμότητα στους ασθενείς σε ύφεση και χωρίς ιστορικό ενδοπυελικού χειρουργείου είναι ίδια με αυτή του γενικού πληθυσμού. Παρόλο που δεν έχει διαπιστωθεί αύξηση στις συγγενείς ανωμαλίες σε κύσεις γυναικών με ΙΦΝΕ, έχει αναφερθεί πιθανός αυξημένος κίνδυνος πρόωρης γέννησης (OR 1·85; 95% CI 1·67–2·05), έμβρυα μικρά για την ηλικία κύησης (OR 1·36; 95% CI 1·16–1·60) και αυτόματες αποβολές (OR 1·57; 95% CI 1·03–2·38) ¹⁷⁵. Αυτά τα ανεπιθύμητα γεγονότα σχετίζονται κυρίως με ενεργή νόσο και επομένως ο επαρκής έλεγχος της NC πριν και κατά τη διάρκεια της κύησης είναι απαραίτητη. Τα περισσότερα φάρμακα για τις ΙΦΝΕ με εξαίρεση την μεθοτρεξάτη (η οποία θα πρέπει να διακοπεί τουλάχιστον 3 μήνες πριν τη σύλληψη) θεωρούνται ασφαλή κατά τη διάρκεια της κύησης και του θηλασμού ¹⁴⁴. Μια μεγάλη προοπτική μελέτη δεν ανέδειξε αυξημένο κίνδυνο για συγγενείς ανωμαλίες ή επιπλοκές της κύησης για τα βρέφη που εκτέθηκαν στη μήτρα σε θειοπουρίνες ή βιολογικούς ¹⁷⁶.

Τα βρέφη που είχαν εκτεθεί σε συνδυαστική θεραπεία εμφάνισαν ελάχιστο αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων έως την ηλικία των 12 μηνών (σχετικός κίνδυνος 1·50 [95% CI 1·08–2·09])¹⁷⁶. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι IgG μόρια που διαπερνούν τον πλακούντα στην αρχή του δεύτερου τριμήνου και οι συγκεντρώσεις στα βρέφη είναι 4 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στις μητέρες ¹⁷⁷. Καθώς δεν είναι γνωστές οι μακροχρόνιες επιπτώσεις από την βρεφική έκθεση στους βιολογικούς, συστήνεται η διακοπή των φαρμάκων στο τέλος του δεύτερου τριμήνου, εφόσον η ΙΦΝΕ της μητέρας είναι σε ύφεση ¹⁴⁴. Ασθενείς με σοβαρή περιεδρική νόσο θα πρέπει να υποβληθούν σε καισαρική τομή. Τέλος, τα βρέφη που γεννήθηκαν από μητέρες που λαμβάνουν βιολογικούς παράγοντες δε θα πρέπει να λαμβάνουν ζώντα εμβόλια τους πρώτους μήνες της ζωής τους.

1.7 Επιτήρηση του καρκίνου π. εντέρου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ κολίτιδα

Η μακροχρόνια ΕΚ και ΝΚ με συμμετοχή του παχέος εντέρου σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου. Η επίπτωση ποικίλει ανάμεσα στις μελέτες και αυξάνεται με την πάροδο των ετών της νόσου. Πρόσφατη μεταανάλυση αναφέρει 2,4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και η επίπτωση φτάνει στο 7-18% μετά από 30 έτη νόσου^{1,178,179}. Για αυτό το λόγο προτείνεται μία πρώτη κολονοσκόπηση επιτήρησης 8 έτη από την έναρξη των συμπτωμάτων σε όλους τους ασθενείς με ιστορικό προσβολής (μακροσκοπικής ή μικροσκοπικής) του παχέος εντέρου ώστε να επανεκτιμάται η έκταση της νόσου και να αποκλείεται δυσπλασία. Δε συμπεριλαμβάνονται στο πρόγραμμα της επιτήρησης οι ασθενείς στους οποίους η νόσος περιορίζεται στο ορθό. Ειδικά όμως στους πάσχοντες από ΠΣΧ συστήνεται ετήσια κολονοσκόπηση ανεξαρτήτως έκτασης της προσβολής του παχέος εντέρου λόγω του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης κολο-ορθικού καρκίνου σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Γενικά οι ασθενείς διακρίνονται σε 3 κατηγορίες, με χαρακτηριστικά υψηλού, μέτριου ή χαμηλού κινδύνου για κάλο-ορθικό καρκίνο και προτείνονται αντίστοιχα ως μεσοδιαστήματα κολονοσκόπησης επιτήρησης τα 1, 2-3 ή 5 έτη (**Εικόνα 7**). Η επιτήρηση κολονοσκόπησης θα πρέπει να πραγματοποιείται όταν η ΙΦΝΕ είναι σε ύφεση και με πολύ καλή εντερική προετοιμασία ώστε να βελτιστοποιείται ή διάκριση ανάμεσα στη δυσπλασία και τη φλεγμονή στις βιοψίες



Εικόνα 7: Αλγόριθμος ενδοσκοπικής επιτήρησης ασθενών με μακροχρόνια κολίτιδα σύμφωνα με τους παράγοντες κινδύνου.

Επιπροσθέτως η κολονοσκόπηση επιτήρησης θα πρέπει να λαμβάνει χώρα σε εξειδικευμένο κέντρο αναφοράς και προτείνεται να περιλαμβάνει χρωμοενδοσκόπηση με ψεκασμό χρωστικής με στοχευμένες βιοψίες που αυξάνουν το ποσοστό διάγνωσης δυσπλασίας. Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ενδοσκόπηση λευκού φωτός, προτείνεται ενδοσκόπιο υψηλής ευκρίνειας (high definition) και θα πρέπει να συμπληρώνεται από τυχαίες βιοψίες (ανά 10 εκ αυλού, 1 βιοψία ανά τεταρτημόριο) καθώς και στοχευμένες βιοψίες σε κάθε ορατή βλάβη. Εάν ανευρεθεί δυσπλασία (χαμηλού ή σοβαρού βαθμού) χωρίς συνοδό ορατή βλάβη, επείγει η επανάληψη της ενδοσκόπησης σε εξειδικευμένο κέντρο αναφοράς με χρωμοενδοσκόπηση. Κάθε ιστολογική διάγνωση δυσπλασίας συστήνεται να επιβεβαιώνεται από εξειδικευμένο ανεξάρτητο παθολογοανατόμο. Ένα επιβεβαιωθεί η χαμηλού βαθμού δυσπλασία χωρίς ορατή βλάβη ο ασθενής θα πρέπει να υποβληθεί εν νέου σε χρωμοενδοσκόπηση εντός 3 μηνών με λήψη τυχαίων βιοψιών. Οι ορατές βλάβες, εάν είναι εξαιρέσιμες, θα πρέπει να εκτέμονται με ενδοσκοπικές τεχνικές (ενδοσκοπική βλεννογονεκτομή, ενδοσκοπική υποβλεννογόνια εκτομή) και σε αντίθετη περίπτωση να προτείνεται χειρουργική αντιμετώπιση. Τέλος, επί του παρόντος δεν προτείνεται στην επιτήρηση του κολο-ορθικού καρκίνου στις ΙΦΝΕ η ψηφιακή χρωμοενδοσκόπηση^{121,180}.

1.8 Εξωεντερικές εκδηλώσεις

Έως και 50% των ασθενών με ΙΦΝΕ εκδηλώνουν τουλάχιστον μία έξω-εντερική εκδήλωση (EEE), η οποία είναι πιθανό να προηγείται της εκδήλωσης της ΙΦΝΕ. Οι EEE επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και ορισμένες όπως η ΠΣΧ ή η θρομβολεμβολική νόσος πιθανώς να είναι επικίνδυνες για τη ζωή. Η πιθανότητα ανάπτυξης κάποιας EEE αυξάνει όσο αυξάνει η διάρκεια της ΙΦΝΕ και σε ασθενείς που έχουν ήδη μια EEE. Οι EEE είναι πιο συχνές στη vC από ότι στην EK, ιδίως σε ασθενείς με NC παχέος εντέρου. Ορισμένες EEE, όπως η ραγοειδίτιδα/ιριδοκυκίτιδα είναι πιο συχνές σε γυναίκες ενώ η ΠΣΧ και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα είναι πιο συχνή σε άρρενες. Οι περισσότερες EEE συνυπάρχουν με την ενεργή ΙΦΝΕ με εξαίρεση την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και τη ραγοειδίτιδα (πιθανώς και τη ΠΣΧ και το γαγγραινώδες πυόδερμα) η αντιμετώπιση περίπλοκων EEE απαιτεί συζήτηση σε διεπιστημονική ομάδα.

1.8.1 Αρθροπάθεια

Οι αρθροπάθειες που σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ ανήκουν την κατηγορία της οροαρνητικής σπονδυλαρθροπάθειας (SpA). Οι σπονδυλαρθροπάθειες διακρίνονται σε αξονική και περιφερική ανάλογα με τα προεξάρχοντα συμπτώματα. Η διάγνωση της αξονικής SpA βασίζεται σε MRI ή ακτινογραφικά χαρακτηριστικά ιερολαγονίτιδας και είναι συχνή τόσο σε EK όσο και NC, με συχνότητα εμφάνισης 20-50% των ασθενών με ΙΦΝΕ. Η προοδευτική αξονική SpA με συνδεσμοφύτα είναι πιο σπάνια και εμφανίζεται στο 1-10% των ασθενών. Το αντιγόνο του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, HLA-B27, ανευρίσκεται στο 25-75% των ασθενών με ΙΦΝΕ και αξονική SpA αλλά μόνο σε 7-15% των ασθενών με μεμονωμένη ιερολαγονίτιδα.

Η διάγνωση της περιφερικής αρθροπάθειας βασίζεται στα σημεία φλεγμονής. Η διάγνωση της περιφερικής αρθροπάθειας και της ενθεσίτιδας βασίζεται σε σημεία φλεγμονής και αποκλεισμό άλλων ειδικών μορφών αρθρίτιδας η τύπου 1, οξεία ολιγοαρθρική προσβολή που προσβάλλει μεγάλες κυρίως μεγάλες αρθρώσεις και συνυπάρχει με την ενεργότητα της. Η τύπου 2 ή αλλιώς πολυαρθρική επηρεάζει μεγαλύτερο αριθμό αρθρώσεων και είναι ανεξάρτητη με τη ενεργότητα της ΙΦΝΕ. Όσο αφορά στη θεραπεία της αρθροπάθειας, οι θεραπευτικές αποφάσεις για τους ασθενείς με αξονική σπονδυλαρθροπάθεια θα πρέπει να λαμβάνονται από κοινού με τους ρευματολόγους και περιλαμβάνουν εντατική φυσικοθεραπεία και βραχυπρόθεσμη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ). Η σουλφασαλαζίνη και η μεθοτρεξάτη είναι περιορισμένης αποτελεσματικότητας και επομένως η πρώιμη χρήση αντι-TNF είναι η προτιμότερη επιλογή σε ανθεκτικές περιπτώσεις. Στους ασθενείς με περιφερική αρθρίτιδα, είναι συχνά επαρκής η θεραπεία της υποκείμενης εντερικής φλεγμονής, παρόλο που χρήση βραχυπρόθεσμα ΜΣΑΦ και τοπικών ενέσιμων κορτικοστεροειδών είναι αποτελεσματική για την συμπτωματική ύφεση ¹⁶².

1.8.2 Παθήσεις δέρματος

1.8.2.1 Οζώδες ερύθημα

Το οζώδες ερύθημα αναγνωρίζεται εύκολα και χαρακτηρίζεται από επηρμένα, σκληρά, επώδυνα, ερυθρά υποδόρια οζίδια, διαμέτρου 1-5εκ. Εντοπίζεται συνήθως στις εκτατικές επιφάνειες των άκρων, ειδικά στην πρόσθια κνήμη και εκδηλώνεται συνήθως παράλληλα με την ενεργή ΙΦΝΕ. Εκδηλώνεται στο 4,2-7,5% των ασθενών με ΙΦΝΕ, πιο συχνά στη NC και σε γυναίκες. Η θεραπεία περιλαμβάνει τη θεραπεία της υποκείμενης ΙΦΝΕ ή και συστηματικά κορτικοστεροειδή. Σε υποτροπιάζουσες ή ανθεκτικές μορφές προτείνεται η χρήση ανοσοκατασταλτικών ή αντι-TNF ¹⁶².

1.8.2.2 Γαγγραινώδες πυόδερμα

Μπορεί να εκδηλωθεί οπουδήποτε στο σώμα, με πιο συχνή εντόπιση στη γαστροκνημία και πλησίον χειρουργικής στομίας. Εκδηλώνεται στο 0,6-2,1% των ασθενών με ΕΚ και λιγότερο συχνά στη NC. Είναι πιθανό να εκδηλωθεί και ανεξάρτητα από την ενεργότητα της ΙΦΝΕ και υποτροπιάζει στο 25% των ασθενών παρά την επιτυχημένη θεραπεία, συνήθως στην ίδια θέση. Η θεραπεία περιλαμβάνει συστηματικά κορτικοστεροειδή, αντι-TNF, ή αναστολείς καλσινευρίνης τοπικά ή συστηματικά ¹⁶².

1.8.2.3 Σύνδρομο Sweet

Το σύνδρομο Sweet δεν είναι συχνό και χαρακτηρίζεται από επώδυνα, ερυθρά οζίδια και βλατίδες τα οποία εμφανίζονται συνήθως στα άνω άκρα, στο λαιμό και στο πρόσωπο. Συνηθέστερα εμφανίζεται στις

γυναίκες, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ παχέος εντέρου και σε ασθενείς με ενεργή ΙΦΝΕ. Θεραπευτικά χορηγούνται συστηματικά κορτικοστεροειδή και ανοσοκατασταλτικά ¹⁶².

1.8.3 Οφθαλμικές παθήσεις

Οι οφθαλμικές εκδηλώσεις είναι σχετικά συχνές και μελέτες αναφέρουν ότι εκδηλώνονται στο 4-29% των ασθενών με ΙΦΝΕ. Η πρόσθια ραγοειδίτιδα και η επισκληρίτιδα είναι οι πιο συχνές οφθαλμικές εκδηλώσεις ¹⁶².

1.8.3.1 Επισκληρίτιδα

Η επισκληρίτιδα χαρακτηρίζεται από υπεραιμία της επιφάνειας του σκληρού οφθαλμικού χιτώνα και των επιπεφυκότων. Επίσης μπορεί να υπάρχει ήπιο άλγος και αίσθημα κνησμού. Η απλή επισκληρίτιδα δεν απαιτεί οφθαλμολογική εκτίμηση και διαφοροποιείται από τη ραγοειδίτιδα και τη σκληρίτιδα από το γεγονός ότι απουσιάζει σοβαρό οφθαλμικό άλγος, φωτοφοβία, θόλωση ή και μείωση της όρασης. Η επισκληρίτιδα είναι αυτοπεριοριζόμενη πάθηση και συμπτωματικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν τοπικά ή συστηματικά ΜΣΑΦ και τοπικά κορτικοστεροειδή ¹⁶².

1.8.3.2 Σκληρίτιδα- Ραγοειδίτιδα

Η σκληρίτιδα και η ραγοειδίτιδα χαρακτηρίζονται από σοβαρό οφθαλμικό άλγος, διαταραχές στην όραση, φωτοφοβία και κεφαλαλγία. Όταν εκδηλώνονται τα ανωτέρω συμπτώματα ο ασθενής θα πρέπει να παραπέμπεται σε εξειδικευμένο οφθαλμίατρο και να εξετάζεται σε σχισμοειδή λυχνία. Αν δε θεραπευτούν μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια της όρασης. Θεραπευτικά χορηγούνται κορτικοστεροειδή τοπικά και συστηματικά, κλασσικά ανοσοκατασταλτικά (αζαθειοπρίνη, μεθοτρεξάτη) και αντι-TNF βιολογικοί παράγοντες ¹⁶².

1.8.4 Μεταβολική νόσος των οστών

Είναι συχνή η οστεοπενία και η οστεοπόρωση τόσο σε γυναίκες όσο και σε άντρες ασθενείς με ΙΦΝΕ (20-50%). Οι προδιαθεσικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τη φλεγμονή, τη χρήση κορτικοστεροειδών, την εκτεταμένη νόσο ή εκτομή λεπτού εντέρου, την ηλικία, το κάπνισμα, τη χαμηλή φυσική δραστηριότητα και τα θρεπτικά ελλείμματα. Η διάγνωση της οστεοπόρωσης τίθεται στους ενήλικες με την μέτρηση οστικής πυκνότητας (T-score <-2.5), αποτελεί παράγοντα κινδύνου για κατάγματα και απαιτεί θεραπεία. Οι θεραπευτικές οδηγίες περιλαμβάνουν ισομετρική άσκηση, διακοπή καπνίσματος, επαρκή πρόσληψη ασβεστίου (1g/ημέρα) και προφυλακτική χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D σε ασθενείς που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή. Επίσης είναι σημαντική η θεραπεία της υποκείμενης εντερικής νόσου ειδικά σε νέους

ασθενείς ενώ σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή σε ασθενείς με ιστορικό αυτόματων καταγμάτων απαιτείται τακτική χρήση διφοσφωνικών σκευασμάτων ¹⁶².

1.8.5 Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα

Η Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) είναι η πιο συχνή ηπατοπάθεια στους ασθενείς με ΙΦΝΕ και υπολογίζεται ότι προσβάλλει έως και 4-5% των ασθενων. Ταυτόχρονα, σε βορειοευρωπαϊκές μελέτες, 70-80% των ασθενων με ΠΣΧ πάσχει από ΙΦΝΕ, κυρίως ΕΚ και λιγότερο συχνά ΝC. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κακουχία, κνησμό, πυρετό, νυχτερινούς ιδρώτες και άλγος στο δεξιό υποχόνδριο. Κάθε ασθενής με ΙΦΝΕ που εμφανίζει χολόσταση θα πρέπει να υποβάλλεται σε εργαστηριακές εξετάσεις, υπερηχογράφημα και μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας. Εφόσον αναδειχθούν οι χαρακτηριστικές στενώσεις και διατάσεις του χοληφόρου δένδρου επιβεβαιώνεται η διάγνωση. Βιοψία ήπατος θα πραγματοποιηθεί όταν η MRCP δεν αναδείξει παθολογικά ευρήματα, η χολόσταση επιμένει και υπάρχει υποψία ΠΣΧ μικρών πόρων. Ηπατική βιοψία απαιτείται και τις περιπτώσεις που υπάρχει υποψία αυτοάνοσης ηπατίτιδας (υπερτρανσαμινασαιμία, υψηλή IgG και σχετικά αυτοαντισώματα). Δεν υπάρχει φαρμακευτική θεραπεία για την ΠΣΧ που αποδεδειγμένα να μειώνει την ανάγκη μεταμόσχευσης ήπατος, το χολαγγειοκαρκίνωμα ή το θάνατο από ΠΣΧ. Το ουρσοδεοξυχολικό οξύ (UDCA, 15-20mg/kg/ημέρα) βελτιώνει τις εργαστηριακές εξετάσεις της ηπατικής βιοχημείας. Τα κορτικοστεροειδή και η αζαθειοπρίνη συστήνονται όταν συνυπάρχει αυτοάνοση ηπατίτιδα. Σε ασθενείς που παρουσιάζουν κλινική ή ακτινολογική υποψία κυρίαρχης στένωσης θα πρέπει να πραγματοποιείται παλίνδρομη χολαγγειοπαγκρεατογραφία (ERCP) ώστε να ληφθεί κυτταρολογική και να αποκλειστεί η κακοήθεια αλλά και να αντιμετωπιστεί με πνευματική διαστολή. Σε προχωρημένη νόσο ή συμπτώματα ανθεκτική χολόστασης μπορεί να απαιτηθεί μεταμόσχευση ήπατος. Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ και ΠΣΧ θα πρέπει να υποβάλλονται ετησίως σε κολονοσκόπηση επιτήρησης για τον κολο-ορθικό καρκίνο,, όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια, αλλά και σε υπερηχογράφημα ήπατος-χοληφόρων ώστε να αποκλειστεί καρκίνος χοληδόχου κύστης ¹⁶².

1.8.6 Εκδηλώσεις από το καρδιαγγειακό σύστημα

Έχει φανεί ότι ο κίνδυνος ισχαιμικής καρδιοπάθειας, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και μεσεντερίου ισχαιμίας είναι μετρίως αυξημένα στους ασθενείς με ΙΦΝΕ, ειδικά σε γυναίκες. Η συστηματική φλεγμονή προδιαθέτει για πρόωρη αθηροσκλήρωση αλλά δεν έχει αποδειχθεί αυξημένη θνητότητα ¹⁶².

1.8.7 Θρομβοεμβολική νόσος

Η φλεβική Θρομβοεμβολική νόσος σχετίζεται με την ενεργότητα των ΙΦΝΕ και ο κίνδυνος είναι 2 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και η πνευμονική

εμβολή είναι τα συχνότερα θρομβοεμβολικά επεισόδια. Συστήνεται η χορήγηση προφύλαξης με ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους σε όλους τους ασθενείς με ΙΦΝΕ που νοσηλεύονται στο νοσοκομείο. Επίσης, θα πρέπει να προτείνεται και κατά την περίοδο μετά το εξιτήριο, ύστερα από χειρουργεία καθώς και σε εξωτερικούς ασθενείς με ενεργή νόσο ¹⁶².

1.8.8 Αναιμία

Η αναιμία είναι η συχνή εξω-εντερική εκδήλωση και συνήθως πρόκειται για σιδηροπενική αναιμία, αναιμία χρόνιας νόσου ή μεικτή αναιμία. Ο ορισμός της αναιμίας είναι επίπεδα αιμοσφαιρίνης <13g/dL για τους άνδρες και <12g/dL για τις γυναίκες. Η αρχική διερεύνηση στηρίζεται στο μέσο όγκο ερυθρών (MCV). Η μικροκυτταρική αναιμία είναι ο πιο συχνός τύπος αναιμίας και υποδεικνύει σιδηροπενία. Η μακροκυττάρωση σχετίζεται με έλλειψη βιταμίνης B12 ή φυλλικού οξέος, αλλά ανευρίσκεται συχνά και κατά τη θεραπεία με θειοπουρίνες. Η νορμοκυτταρική αναιμία υποστηρίζει ως αίτιο την αναιμία χρόνιας νόσου. Όσο αφορά στη σιδηροπενία, τα διαγνωστικά κριτήρια για την τεκμηρίωσή της εξαρτώνται από το επίπεδο της φλεγμονής. Σε ασθενείς με κλινική, ενδοσκοπική και βιοχημική ύφεση, φερριτίνη ορού <30μg/L είναι κατάλληλο διαγνωστικό όριο. Αντίθετα σε ασθενείς με ενδείξεις ενεργού φλεγμονής φερριτίνη <100μg/L είναι πιθανό να σχετίζεται με σιδηροπενία. Παράλληλα το διαγνωστικό κριτήριο για την τεκμηρίωση αναιμία χρόνιας νόσου είναι φερριτίνη ορού <100μg/L και κορεσμός τρασφερρίνης <20%, όταν υπάρχει ενεργή ΙΦΝΕ. Εάν η φερριτίνη ορού βρίσκεται σε επίπεδα 30-100μg/L, είναι πιθανός ένας συνδυασμός σιδηροπενίας και αναιμίας χρόνιας νόσου ¹²¹.

2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Παρόλο που τα γονίδια του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν ταυτοποιηθεί, ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων, η οποία εξηγεί τις διαφοροποιήσεις στην κληροδότηση χαρακτηριστικών και νοσημάτων. Ο πιο κοινός τύπος γενετικής ποικιλομορφίας αφορά στους πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) και πρόκειται για μια συγκεκριμένη θέση ενός ομόλογου ζεύγους χρωμοσωμάτων (γενετικός τόπος) όπου υπάρχει διαφορά ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Διακρίνονται από τις μεταλλάξεις καθώς εμφανίζονται με συχνότητα >1% στον ανθρώπινο πληθυσμό και συναντώνται στο γονιδίωμα σε συχνότητα ~ 1 στα 1.000 bp. Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 600 εκατομμύρια ανθρώπινοι γενετικοί πολυμορφισμοί στις βάσεις δεδομένων 181. Οι SNPs συναντώνται σε μη- κωδικές περιοχές του γονιδιώματος σχεδόν σε ποσοστό 90% και ονομάζονται μη-κωδικοί πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (Non-coding Single Nucleotide Polymorphisms, ncSNPs). Οι ncSNPs είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για τη δομή και την ποικιλομορφία της χρωματίνης και στη γονιδιακή έκφραση, σε αντίθεση με τους SNPs των κωδικών περιοχών οι οποίοι μεταβάλλουν άμεσα τη δομή των παραγόμενων πρωτεϊνών 182. Οι SNPs σε γονίδια lncRNAs φαίνεται να έχουν ρυθμιστικό ρόλο μεταβάλλοντας τα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs και συμμετέχουν ενεργά στην εκδήλωση νοσημάτων 183.

3 ΜΗ-ΚΩΔΙΚΑ RNAS

3.1.1 Γενικές πληροφορίες

Έως το 1970 οι μη-κωδικές περιοχές του DNA θεωρούνταν «άχρηστο DNA» («junk») 184. Σήμερα, οι αναλύσεις μεταγραφώματος ευρέως γονιδιώματος (genome wide transcriptome analyses), συμπεριλαμβανομένης της πρόσφατης μελέτης ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) consortium, αποκάλυψαν ότι το γονιδίωμα των θηλαστικών μεταγράφεται διάχυτα, κάτω από ποικίλες συνθήκες, παράγοντας μια ποικιλία κωδικών (mRNA) και μη κωδικών RNA (ncRNA) μεταγράφων. Παρόλο που το ~90% του ευκαρυωτικού γονιδιώματος μεταγράφεται, το mRNA αποτελεί μόνο το 1-2% του συνολικού RNA. Το υπόλοιπο είναι ncRNA και μπορεί να διαιρεθεί σε δυο κατηγορίες: «housekeeping» όπως το ριβοσωμικό (rRNA), το μεταφορικό (tRNA), το μικρό πυρηνικό (snRNA) και το μικρό RNA του πυρινίσκου (snoRNA), και το «ρυθμιστικό» όπως το μικρό μη-κωδικό RNA (miRNA) και το μεγάλο μη-κωδικό RNA (lncRNA) 185.

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για το «ρυθμιστικά» ncRNAs καθώς καθίσταται εμφανές ότι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων συνεισφέροντας στην ποικιλομορφία και την πολυπλοκότητα των

οργανισμών. Επομένως μπορεί να είναι υπεύθυνα για τις επιγενετικές διαδικασίες και την ανάπτυξη νοσημάτων όπως οι ΙΦΝΕ ¹⁸⁶.

3.1.2 Μικρά μη-κωδικά RNAs

Ανάμεσα στο «ρυθμιστικά» ncRNAs, τα μικρά μη-κωδικά RNAs (microRNA, miRNA) αποτελούν το πιο μελετημένο είδος. Είναι ήδη γνωστό ότι τα miRNAs πιθανώς ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση μέσω αλληλεπίδρασης με το mRNA ή με τη μεταφραστική διαδικασία στο κυτταρόπλασμα. Εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών συνήθων νόσων, συμπεριλαμβανομένων των ΙΦΝΕ, καθώς ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση και άλλες βιολογικές δραστηριότητες ^{187,188}. Σημαντικός αριθμός μελετών έχουν εντοπίσει αρκετά miRNAs των οποίων η συγκέντρωση είναι τροποποιημένη στο βλεννογόνο ή στο αίμα ασθενών με ΙΦΝΕ ^{189,190} και τα έχουν επίσης συσχετίσει με mRNA στόχους επηρεάζοντας μονοπάτια φλεγμονής όπως η ενεργοποίηση του NFκΒ ¹⁹¹, η εντερική επιθηλιακή διαπερατότητα ¹⁹², η διαταραχή της αυτοφαγίας ^{193,194} και η ρύθμιση κυτταροκινών και χημειοκινών ^{195,196}.

Ο εντοπισμός του miR-214, ως πιθανού θεραπευτικού στόχου στο δίκτυο της ΕΚ, είναι ένα παράδειγμα. Με την ενοποίηση των μεταγραφικών και επιγενωμικών δεδομένων από ιστούς π. εντέρου από μοντέλα ποντικών αναγνωρίστηκε το miR-214 ως κεντρικό ρυθμιστικό μόριο στο μοριακό δίκτυο φλεγμονής. Η IL-6 ρυθμίζει προς τα άνω τη διαμεσολαβούμενη από το STAT3 μεταγραφή του miR214 σε βιοψίες π. Εντέρου και οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ. Η ενεργοποίηση αυτού του κυκλώματος συσχετίζεται με την ενεργότητα της ΕΚ ¹⁹⁷. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα miR-124 σε ιστούς π. εντέρου παιδιών με ενεργή ΕΚ. Καθώς έχει βρεθεί ότι το miR-124 ρυθμίζει την έκφραση του STAT3, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του STAT3 σε αυτόν τον πληθυσμό συμβάλει στην φλεγμονή και στην παθογένεση της ΕΚ ¹⁹⁸.

Αντίστοιχες μελέτες στη NC έχουν αναδείξει ότι τα επίπεδα το miR-215 σε αρχικές βιοψίες ασθενών με ανεπίπλεκτη NC σχετίζονται με την εξέλιξη σε διεισδυτική νόσο ¹⁹⁹. Ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ότι το miR-31 ήταν αυξημένο σε ασθενείς με NC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες ενώ ήταν ιδιαίτερα αυξημένο σε ασθενείς με νόσο τελικού ειλεού σε σχέση με αυτούς που είχαν νόσο π. Εντέρου ¹¹⁰.

Καταβάλλεται επίσης προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν τα miRNAs ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και την πρόγνωση των ΙΦΝΕ και των υποτύπων τους ²⁰⁰.

3.1.3 Μεγάλα μη-κωδικά RNAs

Ενώ τα miRNA υπόκεινται εκτεταμένη μελέτη και έχουν γίνει ευρέως κατανοητά, λίγα είναι γνωστά για τα μεγάλα μη-κωδικά RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs). Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ότι

αυτά τα μόρια πιθανώς διευκολύνουν τη γονιδιακή ρύθμιση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, μετά τη μεταγραφή και κατά τις επιγενετικές διαδικασίες και εμπλέκονται στην διαμόρφωση του οργανισμού και στην ανάπτυξη νοσημάτων^{201–203}. Επομένως στο μέλλον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη στοχευόμενων θεραπειών^{204,205}.

Τα lncRNAs ορίζονται ως μόρια RNA με μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια που έχουν λίγο ή καθόλου δυναμικό κωδικοποίησης πρωτεϊνών^{206,207}. Στο γονιδίωμα υπάρχουν παρόντα πολυάριθμα lncRNA μόρια^{208,209}. Έως σήμερα 96.411 lncRNA γονίδια (και 173.112 lncRNA μετάγραφα) έχουν αναγνωρισθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα με τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (next generation sequencing) και περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων NONCODEv6.0²¹⁰. Συγκριτικά ο αριθμός των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι μόνο 19.954²¹¹.

Αυτές οι αναλύσεις ευρέως γονιδιώματος επίσης αποκάλυψαν ότι τα lncRNAs συνήθως εκφράζονται λιγότερο από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ότι η έκφραση τους εξαρτάται από το είδος, τα χαρακτηριστικά του ιστού και το στάδιο ανάπτυξης, υποστηρίζοντας την άποψη ότι διαδραματίζουν κύριο ρόλο στις εξειδικευμένες λειτουργίες των κυττάρων²¹².

Τα lncRNAs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη χρωματίνη. Ορισμένα όμως μόρια ανευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή ακόμα και στο εξωκυττάρια υγρό²¹³. Όπως τα mRNAs, τα lncRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και μετά τη μεταγραφή υποβάλλονται σε προσθήκη καλύπτρας, εναλλακτικό μάτισμα και πολυαδενυλίωση^{202,214,215}.

Σύμφωνα με τη γενωμική τους θέση, τα γονίδια των lncRNAs κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικές κατηγορίες. Τα περισσότερα lncRNA γονίδια βρίσκονται πλησίον γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες²¹⁶ και ταξινομούνται κυρίως στις εξής κατηγορίες, βάσει της θέσης και της φοράς μεταγραφής τους^{214,217}:

1. Όμοιας κατεύθυνσης (sense): μεταγράφονται από τμήμα ή ολόκληρη την κωδική αλυσίδα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες,
2. Αντίθετης κατεύθυνσης (antisense): μεταγράφονται από την μη κωδική αλυσίδα, λέγονται επίσης natural antisense transcripts, NAT
3. Ιντρονικό (intronic): μεταγράφονται από περιοχή εσωνίου
4. Αμφίδρομο (bidirectional): μεταγράφονται από την περιοχή ενός εκκινητή με κατεύθυνση αντίθετη αυτής του γονιδίου
5. Μεγάλο διαγωνιδιακό (long intergenic): βρίσκονται εκτός κωδικών περιοχών, συμπεριλαμβάνουν τα eRNA από απομακρυσμένους ενισχυτές μεταγραφής (enhancers)

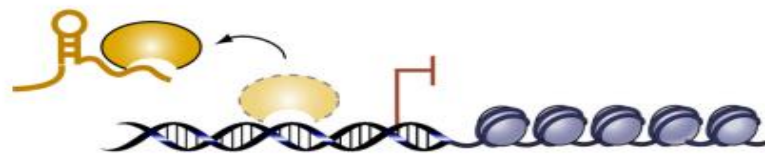
3.1.3.1 Μηχανισμοί λειτουργίας

Η δευτεροταγής δομή των lncRNAs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητά τους ²¹⁸. Με στόχο τη γονιδιακή ρύθμιση, έχει φανεί από μελέτες ότι επιδρούν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το εναλλακτικό μάτισμα, η μεταγραφή, η μετά- μεταγραφική επεξεργασία, η ενδοκυτταρική διακίνηση ^{214,219}. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους φαίνεται ότι επιτελούν τις λειτουργίες τους τα lncRNAs ^{203,220} (**Εικόνα 8**):

I. Σήμα



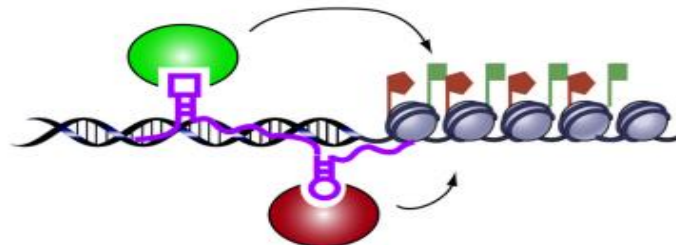
II. Αντιπερισπασμός



III. Οδηγός



IV. Ικρίωμα



Εικόνα 8: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης των lncRNAs (προσαρμοσμένη από Wang et al. Mol Cell. 2011)

1. ως «σήματα» (signals), σηματοδοτώντας μεταγραφικά γεγονότα
2. ως «αντιπερισπασμός» (decoys), δεσμεύονται σε μόρια και αποτρέπουν τις λειτουργίες τους
3. ως «οδηγοί» (guides), υποβοηθώντας μόρια να αλληλεπιδράσουν με τη χρωματίνη

4. ως «ικριώματα» (scaffolds), παρέχοντας σταθερότητα σε μοριακά συμπλέγματα
5. με ένα συνδυασμό αυτών των μηχανισμών
6. Επίσης μπορούν να δρουν ως ενισχυτικά RNAs, ακόμα και να κωδικοποιούν μικρά πεπτίδια με ρυθμιστική λειτουργία ^{214,221}.

Είναι επίσης γνωστό ότι επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων είτε με *cis* (σε γειτονικά γονίδια) είτε με *trans* (σε απομακρυσμένα γονίδια) τρόπο ²⁰⁴ και ότι διαδραματίζουν ρόλο σε ένα επίπεδο μετά-μεταγραφικό ^{213,220}.

Πρόσφατα, δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα lncRNAs είναι εξειδικευμένα για τους ιστούς, τα κύτταρα αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων πολύ περισσότερο από τα mRNAs. Επιπροσθέτως άλλα τυπικά χαρακτηριστικά είναι ότι η έκφρασή τους διακυμαίνεται σημαντικά κατά την πάροδο του χρόνου και ότι οι χρόνοι ημίσειας ζωής τους είναι συνήθως βραχύτεροι από αυτούς των mRNAs. Χάρη σε αυτά τα χαρακτηριστικά είναι γεγονός ότι εντοπίζοντας το «στιγμιότυπο» του προφίλ lncRNA ενός κυτταρικού τύπου με απλές τεχνικές RNA αλληλούχισης είναι εξαιρετικά δύσκολο, ειδικά όσο αφορά περίπλοκα και ιδιαίτερα διαφοροποιημένα κύτταρα ²²².

Οι πρώτοι βιολογικοί μηχανισμοί που αποδόθηκαν στα lncRNAs ήταν η αποτύπωση (imprinting) και η απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος και είχε γίνει κατανοητό ότι το προϊόν του γονιδίου Xist (X-inactive specific transcript) στο κέντρο απενεργοποίησης του Χ χρωμοσώματος στα θηλαστικά είναι ένα lncRNA που δρα ως σήμα αποτύπωσης και ως οδηγός για ένα σύμπλοκο μεθυλίωσης (polycomb repressive complex 2), οδηγώντας σε τροποποίηση της χρωματίνης ^{220,223}. Έκτοτε ο ρυθμιστικός ρόλος των lncRNAs έχει ευρέως μελετηθεί και έχει συνδεθεί ειδικά με τον καρκίνο ^{214,224} αλλά και με καρδιαγγειακή νόσο ^{225,226}, νευρολογικές διαταραχές ²²⁷ και microbial susceptibility ²²⁸. Είναι ενδιαφέρον ότι τα lncRNAs επίσης συνεισφέρουν στη ρύθμιση της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας και επομένως εμπλέκονται στην ανάπτυξη αυτοανοσίας ^{225,229}. Έχει βρεθεί ότι το ~10% των SNPs που σχετίζονται με αυτοάνοσες διαταραχές βρίσκονται σε lncRNA γονίδια ²²⁹.

4 Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στις ΙΦΝΕ

4.1 Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στη Νόσο Crohn

Έως σήμερα πολύ λίγα lncRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στις ΙΦΝΕ. Μια από τις πρώτες συσχετίσεις ανάμεσα στα lncRNAs και την παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ έγινε το 2013 όταν ο Qiao et al. μελέτησε τα επίπεδα του ncRNA DQ786243, που είναι γνωστό ότι υπερκεφράζεται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνο, σε ασθενείς με NC. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς με κλινικά ενεργή NC εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα DQ786243 στα μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος, σε σχέση με τους ασθενείς σε ύφεση ή του υγείας μάρτυρες. Μια ex vivo μελέτη επίσης έδειξε ότι το DQ786243 οδηγεί στην υπερέκφραση της cAMP response element binding protein (CREB) και ίσως και του response element in the forkhead box P3 (Foxp3) του υποδοχέα των T- κυττάρων (TCR), επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα Treg και οδηγώντας στην υπόθεση ότι εμπλέκεται στην παθογένεση των ΙΦΝΕ ²³⁰.

Ένα άλλο lncRNA που έχει συσχετιστεί με τη παθοφυσιολογία της NC είναι το NRON (non-coding repressor of NFAT). Αυτό το μόριο συμμετέχει σε ένα RNA- πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που δρα ως καταστολέας του NFAT εμποδίζοντας την πυρηνική μετακίνησή του. Το γονίδιο leucine-rich repeat kinase-2 (LLRK2), που έχει βρεθεί με GWAS ως προδιαθεσικό γονίδιο για τη NC, επίσης αποτελεί τμήμα αυτού του συμπλέγματος. Ύστερα από την παρατήρηση ότι LRRK2 deficient mice είναι περισσότερα επιρρεπή σε DSS-επαγόμενη κολίτιδα, προτάθηκε ένας μοριακός μηχανισμός που συνδέεται με τη σοβαρότητα της NC ²³¹.

Ακολουθώντας αυτές τις παρατηρήσεις, έγινε τεράστια προσπάθεια να αναγνωριστούν τα σχετιζόμενα με ΙΦΝΕ lncRNAs και οι πιθανοί συσχετισμοί τους με τα προδιαθεσικά για ΙΦΝΕ γονίδια, χρησιμοποιώντας βάσεις δεδομένων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και lncRNAs. Κατ' αυτόν τον τρόπο, κατέστη δυνατό να εντοπιστούν 3665 lncRNAs που εμπλέκονται με 1168 ΙΦΝΕ- υποψήφια γονίδια αλλά και 1131 άλλα lncRNAs πλησίον τέτοιων γονιδίων (lincRNAs) ²¹⁸.

Επιπροσθέτως, οι πολυμορφισμοί σε πιθανές ρυθμιστικές περιοχές των lncRNAs γονιδίων μελετήθηκαν καθώς είναι γνωστό ότι μπορούν να αυξήσουν την προδιάθεση για διάφορα νοσήματα ²³². Έτσι, 2063 SNPs που βρίσκονται εντός 468 σχετιζόμενων με ΙΦΝΕ lncRNA γονιδίων αναγνωρίστηκαν και τα περισσότερα από αυτά βρέθηκε να σχετίζονται με δεσμευτικούς παράγοντες (binding factors) όπως δεσμευτικό μεταγραφικό παράγοντα, expression quantitative trait loci (eQTLs), DNAase peak, υποστηρίζοντας ότι οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή των lncRNAs πιθανώς επηρεάζει το πρόσδεση. Σημαντικές μετατροπές στη δευτεροταγή δομή βρέθηκε να προκαλούνται από 362 από αυτούς τους SNPs. Για παράδειγμα, 2 SNPs (rs3757247 και rs597325) επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή του sense exonic lncRNA NONHSAG044354 που σχετίζεται με το υποψήφιο για ΙΦΝΕ γονίδιο BACH2. Επίσης, 7 SNPs που

προκαλούν διαταραχή δομής (rs5763746, rs1476514, rs41176, rs41158, rs3757247, rs597325 and rs602662) βρέθηκε να εντοπίζονται μέσα σε lncRNAs σχετιζόμενα με ΙΦΝΕ. Τέσσερις από αυτούς τους SNPs (rs5763746, rs1476514, rs41176 and rs41158) εδράζονται στο NONHSAG033653, ένα lncRNA που είναι επίσης πλησίον του HORMAD2 (22q12.2), ενός ΙΦΝΕ υποψήφιου γονιδίου.

Εξετάζοντας τα πρότυπα συνέκφρασης ανάμεσα στους υπό μελέτη SNPs και τα υποψήφια γειτονικά τους γονίδια σε διαφορετικούς ιστούς, κατέστη προφανές ότι ο rs3757247 για το NONHSAG044354 ήταν σημαντικά σχετιζόμενο με το προδιαθεσικό για ΙΦΝΕ γονίδιο BACH2 στο ολικό αίμα. Επιπροσθέτως το anti-sense lncRNA NONHSAG026183 βρέθηκε να συνεκφράζεται με το επίσης υποψήφιο προδιαθεσικό γονίδιο FUT2 σε διάφορους ιστούς. Χρειάζεται περισσότερη μελέτη για να αναγνωριστούν περισσότεροι SNPs σε ΙΦΝΕ σχετιζόμενα lncRNA και τη σχέση τους με ΙΦΝΕ-υποψήφια γονίδια ²¹⁸.

Επιπροσθέτως, εκτός από την έρευνα σε υπάρχουσες βάσεις δεδομένων, συνεχής είναι η μελέτη για τον εντοπισμό απορυθμισμένων lncRNA στο αίμα ή σε ενδοσκοπικές βιοψίες ασθενών με ΙΦΝΕ. Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση μεταγραφώματος σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς με NC και παρατηρήθηκαν 1988 σημαντικά απορυθμισμένα lncRNAs. Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και τα 10 πιο υποεκφραζόμενα lncRNAs σε δείγμα αίματος ασθενών με NC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες φαίνονται στον πίνακα 5 ²³³. Από αυτά το GAS5 έχει συσχετιστεί με διάφορα είδη καρκίνου ²³⁴ υποστηρίζοντας ότι τα κυκλοφορούντα lncRNAs θα πρέπει να μελετηθούν διεξοδικά για να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες.

Πίνακας 5: Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs (και το όνομα του αντίστοιχου γονιδίου) σε δείγμα αίματος ασθενών με NC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.

Υπερεκφραζόμενα		Υποεκφραζόμενα	
lncRNA	Όνομα γονιδίου	lncRNA	Όνομα γονιδίου
ENST00000466668	GUSBP2	uc001ody.3	AF113016
ENST00000422548	RP5-968D22.1	ENST00000575787	ALOX12P2
ENST00000502712	RP11-68L1.2	uc010bmo.1	AGSK1
ENST00000425364	RP11-428F8.2	ENST00000509252	CTC-338M12.3
NR_037605	GAS5-AS1	ENST00000413954	AC064871.3
NR_038927	DDX11-AS1	ENST00000431104	RP11-510H23.3

ENST00000562996	RP11-923I11.5	uc011dhd.2	LOC729678
TCONS_00014043	XLOC_005955	TCONS_00020749	XLOC_010037
TCONS_00012771	XLOC_005807	NR_027074	LOC283761
ENST00000569039	AC009133.20	TCONS_00027621	XLOC_013142

Παρομοίως, μελετήθηκαν ενδοσκοπικές βιοψίες από φλεγμαίνων και μη φλεγμαίνων βλεννογόνο από NC και απομονώθηκαν 438 απορυθμισμένα lncRNAs στο φλεγμαίνων βλεννογόνο σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα περισσότερα από αυτά είναι κοινά ανάμεσα στη NC και την ΕΚ αλλά 100 ήταν μοναδικά για τη NC. Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs σε βιοψίες φαίνονται στον **Πίνακα 6**

235

Πίνακας 6: Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs (και το όνομα του αντίστοιχου γονιδίου) σε βιοψίες ασθενών με NC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.

Υπερεκφραζόμενα

Υποεκφραζόμενα

lncRNA	Όνομα γονιδίου	lncRNA	Όνομα γονιδίου
ENST00000460164.1	RP11-731 F5.2	ENST00000432658.1	DPP10-AS1
ENST00000532855.1	MMP12	ENST00000401008.2	PDZK1P2
ENST00000326227.5	MMP12	ENST00000553575.1	DIO3OS
ENST00000419897.1	RP11-465 L10.10	ENST00000554694.1	DIO3OS
ENST00000520185.1	RP11-44 K6.2	ENST00000557532.1	DIO3OS
ENST00000526690.1	FAM66D	ENST00000557109.1	DIO3OS
ENST00000445003.1	LINC01272	ENST00000422420.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000522970.1	RP11-44 K6.4	ENST00000428597.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)

ENST00000524555.1	SAA2-SAA4	ENST00000554441.1	DIO3OS
ENST00000429315.2	KIF9-AS1	ENST00000554735.1	DIO3OS

Παρόμοια ευρήματα συλλέχθηκαν με την απομόνωση 546 απορυθμισμένων lncRNAs σε γονίδια ειλεού από παιδιατρικούς ασθενείς με NC ²³⁶. Σε πρόσφατη μελέτη, με σκοπό τον εντοπισμό βιοδεικτών για τη διάγνωση της NC, χρησιμοποιήθηκε μικροσυτοιχία RNA (microarray) για την ανίχνευση lncRNA στο πλάσμα ασθενών με NC και εντοπίστηκαν περισσότερα από 1200 υπερεκφραζόμενα και περισσότερα από 700 υποεκφραζόμενα lncRNAs. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) και ταυτοποιήθηκαν τα GUSBP2 και AF113016 ως τα lncRNAs με τον υψηλότερο ρυθμό μεταβολής (fold change) υπερέκφρασης και υποέκφρασης αντίστοιχα ²³³.

4.2 Μεγάλα μη-κωδικά RNAs στην Ελκώδη κολίτιδα

Όσο αφορά την ΕΚ, πρόσφατα αναγνωρίστηκαν lncRNAs που εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα σε ασθενείς με ενεργή ΕΚ, με ΕΚ σε ύφεση και υγιείς μάρτυρες, υποστηρίζοντας ότι τα lncRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και στην ΕΚ ²³⁷.

Η ανάλυση του μεταγραφώματος σε ενδοσκοπικές βιοψίες από ασθενείς με ΕΚ έχουν ήδη αποκαλύψει 745 σημαντικά απορυθμισμένα lncRNA έναντι των υγιών μαρτύρων. Από αυτά, 400 είναι μοναδικά για την ΕΚ και τα υπόλοιπα είναι κοινά με τη NC. Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs σε βιοψίες ασθενών με UC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες φαίνονται στον **Πίνακα 7** ²³⁵.

Πίνακας 7: Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs (και το όνομα του αντίστοιχου γονιδίου) σε βιοψίες ασθενών με UC σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.

Υπερεκφραζόμενα		Υποεκφραζόμενα	
lncRNA	Όνομα γονιδίου	lncRNA	Όνομα γονιδίου
ENST00000460164.1	RP11-731 F5.2	ENST00000422420.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000532855.1	MMP12	ENST00000428597.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000326227.5	MMP12	ENST00000585267.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)

ENST00000419897.1	RP11-465 L10.10	ENST00000580576.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000429315.2	KIF9-AS1	ENST00000577551.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000526690.1	FAM66D	ENST00000581051.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000524555.1	SAA2-SAA4	ENST00000582072.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)
ENST00000476886.1	CLRN1-AS1	ENST00000401008.2	PDZK1P2
ENST00000517774.1	RP11-1149O23.3	ENST00000432658.1	DPP10-AS1
ENST00000578280.1	RP5-1028 K7.2	ENST00000421632.1	ANRIL (CDKN2B-AS1)

Γνωρίζοντας ότι τα lncRNA είναι πιθανό να ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε cis τρόπο οδήγησε στη μελέτη πιθανών μοντέλων συνέκφρασης ανάμεσα στα lncRNA που έχουν καταγραφεί ως απορυθμισμένα στις ΙΦΝΕ και τα γειτονικά τους γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ανάμεσα στα μόρια lncRNA που βρεθήκαν απορυθμισμένα σε δείγματα ιστού από ασθενείς με ΕΚ, το IFNG-AS1 βρέθηκε να σχετίζεται με τον συχνό στην ΕΚ πολυμορφισμό rs7134599 ενώ εδράζεται πλησίον του γονιδίου IFN-γ (φλεγμονώδης κυτταροκίνη). Σε μια T-κυτταρική σειρά jurkat μελετήθηκε η επίδραση του IFNG-AS1 και διαπιστώθηκε ότι συμβάλλει στην υπερέκφραση της IFN-γ υποστηρίζοντας το ρόλο των lncRNAs στη φλεγμονώδη απόκριση που σχετίζεται με τις ΙΦΝΕ ^{235,237}. Επιπροσθέτως, το lncRNA RP11-465 L10.10 βρέθηκε να συνεκφράζεται με το σχετικό με ΙΦΝΕ SNP rs1569723 ²³⁵.

Παρομοίως ένα άλλο lncRNA, το BC012900, βρέθηκε να υπερεκφράζεται σημαντικά σε ενεργή ΕΚ και να διεγείρεται από κυτταροκίνες και παθογόνο. Επιπλέον, έγινε η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση του BC012900 σε επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί σημαντική καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αυξάνει την ευπάθεια στην απόπτωση ²³⁸.

Το lncRNA H19 ρυθμίζει πληθώρα γονιδίων που συμμετέχουν σε γενετικά νοσήματα και καρκίνους. Σχετικά με τις ΙΦΝΕ, έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη έκφραση του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) στην ΕΚ. Φυσιολογικά, η ενεργή μορφή της βιταμίνης D3 (1,25(OH)2D3), μεσολαβείται από τον πυρηνικό παράγοντα VDR στο ανθρώπινο σώμα και έχει βρεθεί ότι προστατεύει από τα επιθηλιακά τραύματα. Η υπερέκφραση του H19 επηρεάζει τη διαπερατότητα πειραματικού επιθηλιακού μοντέλου και μειώνει την έκφραση των πρωτεϊνών των στενών συνάψεων και του VDR. Επομένως η επίδραση του lncRNA H19 είναι καταστροφική για τον επιθηλιακό φραγμό και πιθανώς συμμετέχει στην εκδήλωση της ΕΚ ²³⁹.

4.3 Μεγάλα μη-κωδικά RNAs και ΙΦΝΕ

Η ΝΚ και η ΕΚ είναι αυτοάνοσα νοσήματα με πολλά κοινά στοιχεία, όπως κοινούς ΙΦΝΕ σχετιζόμενους γενετικούς τόπους που ήδη έχουν καταγραφεί σε βάσεις δεδομένων όπως προαναφέρθηκε. Με τη χρήση του ImmunoChip, μιας συστοιχίας δηλαδή 200.000 SNPs σχετιζόμενων με ανοσολογικές διαταραχές, οι Hardlickova et al. συνέλλεξαν τα πιο κοινά SNPs για 9 αυτοάνοσες νόσους (ΑΝ), συμπεριλαμβανομένων των ΙΦΝΕ, και τους σχετιζόμενους με αυτές γενετικούς τόπους. Οι πολυμορφισμοί εξετάστηκαν για την παρουσία lncRNAs και γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες στα κύτταρα της ανοσίας τα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην παθογένεση των ΑΝ. Τελικά βρέθηκε ότι τα lncRNAs που σχετίζονται με γενετικούς τόπους κοινούς μεταξύ των ΑΝ, εκφράζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στα κύτταρα της ανοσίας σε σχέση με τα lncRNAs από το συνολικό γονιδίωμα ($P < 0.0007$). Επίσης, ταυτοποιήθηκε ότι τα κύτταρα φυσικοί φονείς, Th0 και Th2, εντοπίζονται στις ΙΦΝΕ σε αυξημένο βαθμό. Τα Τ και τα Β κύτταρα σχετίστηκαν ειδικά με την ΕΚ. Η συνέκφραση των lncRNAs και των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μελετήθηκε και προτάθηκαν μοντέλα αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Για παράδειγμα, ο γενετικός τόπος IL21/IL21-AS1 που σχετίζεται με τις ΙΦΝΕ περιέχει 4 κωδικοποιά γονίδια (KIAA1109, ADAD1, IL2, IL21) και ένα lncRNA (IL21-AS1). Αυτό το lncRNA συνεκφράζεται με την IL-21 στα Th1 κύτταρα, προτείνοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση ²⁴⁰.

Έχει, επίσης, βρεθεί συνέκφραση και μεταξύ των σχετικών με ΙΦΝΕ lncRNAs και των γειτονικών (overlapping ή cis neighbouring) κωδικοποιών γονιδίων. Έξι από αυτά τα ζεύγη lncRNAs και γειτονικών γονιδίων βρίσκονται τον **Πίνακα 8** ²³⁵

Πίνακας 8: lncRNAs που σχετίζονται με ΙΦΝΕ γενετικούς τόπους και γειτονικά κωδικοποιά γονίδια.

lncRNAs	Γειτονικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες
ENST00000509204.1 (rs907611)	LSP1
ENST00000443574.1(rs9268853, rs6927022)	HLA-DQB1
ENST00000563780.1(rs9822268, rs3197999)	MST1
ENST00000498745.1(rs472 8142),	TSPAN33
ENST00000417795.1(rs2188962, rs12521868)	SLC22A5
ENST00000442524.1(rs12994997, rs3792109)	DGRD

Παρά τις εξελίξεις στη γενετική δεν έχει επιβεβαιωθεί η χρήση μορίων lncRNAs ως διαγνωστικά εργαλεία. Χαρακτηριστικά, οι Mirza et al. απομόνωσαν 23 απορυθμισμένα lncRNAs από βιοψίες ασθενών με NC και EK (τα περισσότερα φαίνονται στον **Πίνακα 9**), αλλά δεν κατέστη δυνατό να κατηγοριοποιήσουν επιτυχώς τα δείγματα ιστού σε NC και σε EK, με βάση το πρότυπο έκφρασης των lncRNAs ²³⁵.

Πίνακας 9: Τα 10 πιο υπερεκφραζόμενα και υποεκφραζόμενα lncRNAs σε βιοψίες ασθενών με NC σε σχέση με βιοψίες ασθενών με EK.

Υπερεκφραζόμενα		Υποεκφραζόμενα	
lncRNA	Όνομα γονιδίου	lncRNA	Όνομα γονιδίου
ENST00000514926.1	FLJ42969	ENST00000412518.1	AL928742.12
ENST00000455232.1	AC007182.6	ENST00000540811.1	RP11-444D3.1
ENST00000599411.1	RP11-542 M13.2	ENST00000427543.1	AL928742.12
ENST00000453998.1	RP11-399 F4.4	ENST00000426412.2	FAM25D
ENST00000455995.1	FAM95B1	ENST00000515643.1	RP11-274 N19.2
ENST00000432521.2	RP3-395 M20.8	ENST00000579007.1	RP11-838 N2.4
ENST00000448624.2	RP3-395 M20.8	ENST00000558941.1	RP11-279 F6.3
ENST00000426825.1	OPLAH	ENST00000559212.1	RP11-279 F6.3
ENST00000534424.1	OPLAH	ENST00000555860.1	LINC00524
ENST00000592738.1	SPPL2B	ENST00000438318.1	VAV3-AS1

Ανάμεσα στα lncRNAs που έχουν συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ, το ANRIL (antisense non-coding RNA in the INK4 locus, γνωστό και ως CDKN2B-As) είναι γνωστό ότι περιέχει SNPs που σχετίζονται με διάφορα νοσήματα και υπερεκφράζεται σε στεφανιαία νόσο, διαβήτη, λευχαιμία, καρκίνο του προστάτη, βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και γλοίωμα ^{241,242}. Σχετικά με τις ΙΦΝΕ, είναι ενδιαφέρον ότι το ANRIL υποεκφράζεται τόσο στην ενεργή NC ²³⁶ όσο και στην ενεργή EK, ιδίως η ισομορφή του cANRIL ²³⁵. Από τα lncRNAs που σχετίζονται με το ANRIL τα ENST00000422420.1 και ENST00000428597.1 υπερεκφράζονται σε βιοψίες ασθενών με NK ενώ τα ENST00000422420.1, ENST00000428597.1, ENST00000585267.1,

ENST00000580576.1, ENST00000577551.1, ENST00000581051.1, ENST00000582072.1, ENST00000421632.1 υποεκφράζονται σε βιοψίες ασθενών με ΕΚ ²⁴³.

Οι Wang et al. επέλεξαν να μελετήσουν το επίπεδο έκφρασης των KIF9-AS1, LINC01272 and DIO3OS σε ιστούς και πλάσμα ασθενών με ΙΦΝΕ, χρησιμοποιώντας reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) σε δείγματα πλάσματος και ιστού ασθενών με ΙΦΝΕ αλλά και υγιών μαρτύρων. Τα μόρια αυτά είναι lncRNAs των οποίων η συσχέτιση τους με τις ΙΦΝΕ είχε εντοπιστεί σε προηγούμενη μελέτη ²³⁵. Επιβεβαιώθηκε ότι τα LINC01272 και KIF9-AS1 υπερεκφράζονται σημαντικά τόσο σε βιοψίες και στο πλάσμα ασθενών με ΝC όσο και ασθενών με ΕΚ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. ($P < 0.001$ για όλες τις συσχετίσεις). Αντίθετα, το DIO3OS υποεκφράζεται σημαντικά σε ασθενείς με ΝC και ΕΚ, στα δείγματα τόσο ιστού όσο και πλάσματος ($P < 0.001$ για τις 2 συσχετίσεις συσχετίσεις) ²⁴⁴. Η υποέκφραση του DIO3OS επιβεβαιώνει, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, παλαιότερη εύρημα των Mirza et al. ²³⁵ που αφορούσε δείγματα βιοψιών σε ασθενείς με ΝC. Αντίθετα μελέτη των Chen et al. ²³³ είχε διαπιστώσει υπερέκφραση αυτού του lncRNA στο πλάσμα ασθενών με ΝC. Πιθανή εξήγηση της ανακολουθίας των ευρημάτων ανάμεσα στη μελέτη των Wang et al. και των Chen et al. θα μπορούσε να είναι το είδος των δειγμάτων (βιοψίες έναντι πλάσματος, αντίστοιχα) αλλά και ο αριθμός τους (N=84 έναντι N=12, αντίστοιχα).

Το GAS5 είναι ένα lncRNA που έχει αναγνωριστεί ως ογκοκατασταλτικό σε διάφορα είδη καρκίνων ²³⁴ και η έκφραση του είναι απορυθμισμένη σε δίκτυα lncRNAs που συνδέονται με την παθογένεση αυτοάνοσων και φλεγμονωδών παθήσεων. Είναι γνωστό ότι το GAS5 περιορίζει την έκφραση και την ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2 και MMP9, οι οποίες συμμετέχουν στη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού. Συγκεκριμένα η MMP2 συμβάλλει στη διαπίδυση λευκοκυττάρων στο φλεγμαίνοντα ιστό και η MMP9 μεσολαβεί στην ιστική βλάβη σε κολίτιδες. Πρόσφατες μελέτες σε βιοψίες ασθενών με ΙΦΝΕ ανέδειξαν ότι το GAS5 υποεκφράζεται σε φλεγμαίνοντα ιστό ενώ αντίστοιχα υπερεκφράζονται οι μεταλλοπρωτεϊνάσες προτείνοντας τη συμμετοχή του GAS5 στην ανάπτυξη κολίτιδας και ιστικής καταστροφής ²⁴⁵.

Οι μελέτες στις οποίες γίνεται αναφορά εμπεριέχονται συνοπτικά στον **Πίνακα 10**.

Πίνακας 10: Συνοψη των μελετών που έχουν συσχετίσει lncRNAs με τις ΙΦΝΕ.

Μελέτη	Μέθοδος- δείγμα	Νόσος	Αποτελέσματα / lncRNAs που εντοπίστηκαν	Ref.
<i>Liu et al (2011)</i>	Ιστός π. εντέρου	DSS- κολίτιδα	NRON	231
<i>Qiao et al (2013)</i>	PBMCs από ολικό αίμα	NC	DQ786243	230
<i>Mirza et al (2014)</i>	Τράπεζες δεδομένων (NONCODEv4, IBDsite, GWAS/ Immunochip, ανάλυση αλληλούχησης)	ΙΦΝΕ	a) 4272 γονίδια lncRNA εντός ή πλησίον ΙΦΝΕ-υποψήφια γονιδίων c) 2063 SNPs b) Ειδικότητα για τους ιστούς	218
<i>Hrdlickova et al (2014)</i>	Τράπεζες δεδομένων (GENCODEv4/ Immunochip)	NC, EK, ΙΦΝΕ (κοινά)	a)14 lncRNAs σε NC b) 24 lncRNAs σε EK c)107 lncRNAs for ΙΦΝΕ (κοινά)	240
<i>Mirza et al (2015)</i>	Βιοψίες ιστού	NC, EK, ΙΦΝΕ (κοινά)	a) 438 lncRNAs σε ενεργή NC b) 745 lncRNAs σε ενεργή EK c) 96 lncRNAs σχετιζόμενα με ΙΦΝΕ –γενετικούς τύπους	235
<i>Wu et al (2016)</i>	Βιοψίες ιστού	EK	455 lncRNAs	238
<i>Chen et al (2016)</i>	Πλάσμα	NC	1988 lncRNAs	233
<i>Padua et al (2016)</i>	Ιστός π. εντέρου	EK	1931 lncRNAs	237
<i>Haberman et al (2017)</i>	Βιοψίες ειλεού	NC (παιδιατρικοί ασθενείς προ θεραπείας)	546 lncRNAs	236
<i>Chen et al. (2016)</i>	Πειραματικό επιθηλιακό μοντέλο	EK	Το H19 υπερεκφράζεται	239
<i>Wang et al (2018)</i>	Δείγματα πλάσματος και ιστού	ΙΦΝΕ	Τα KIF9-AS1 και LINC01272 υπερεκφράζονται. Το DIO3OS υποεκφράζεται	244
<i>Lucafò et al. (2019)</i>	Βιοψίες ιστού	ΙΦΝΕ	Το GAS5 υποεκφράζεται	245

lncRNA, long non-coding RNA; DSS, Dextran sulfate sodium; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; NRON, Non-Coding Repressor Of NFAT; GWAS, Genome-wide association study; NC, νόσος Crohn; EK, ελκώδης κολίτιδα; ΙΦΝΕ, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου; KIF9-AS1, KIF9 Antisense RNA 1; DIO3OS, DIO3 Opposite Strand Upstream RNA; GAS5, Growth Arrest Specific 5.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της κατανομής των συχνοτήτων τριών πολυμορφισμών που εδράζονται σε γονίδια lncRNAs γνωστά για τη συσχέτιση τους με τις ΙΦΝΕ σε ένα τυχαίο πληθυσμιακό δείγμα της Ελλάδας (ασθενών με ΕΚ και ΝC και υγιών μαρτύρων) και η συσχέτιση αυτών των lncRNAs με την παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ και τον κίνδυνο εκδήλωσης ΙΦΝΕ. Η μελέτη αφορά τον πολυμορφισμό rs1476514 του γονιδίου HORMAD2-AS1 (HORMAD2 and MTMR3 antisense RNA 1, γνωστό και ως NONHSAG033653) και για δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου NONHSAG044354 (rs3757247 και rs597325).

Το πληθυσμιακό δείγμα περιλαμβάνει δύο ομάδες ασθενών με ΝC και ΕΚ και μία ομάδα ελέγχου με υγιή άτομα. Επομένως, η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στο πληθυσμιακό δείγμα που επιλέχθηκε, είναι μια προσπάθεια αποσαφήνισης της σχέσης τους με τη νόσο, στον ελληνικό πληθυσμό. Η ανακάλυψη κάθε θετικής ή αρνητικής συσχέτισης των πολυμορφισμών με τις ΙΦΝΕ αποτελεί μία νέα γνώση τόσο για την ΕΚ όσο και για τη ΝC, με απώτερο στόχο την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών και την ανάπτυξη νέων και εξατομικευμένων θεραπευτικών παραγόντων.

5.1 Τήρηση κανόνων

Πριν την έναρξη της συλλογής των δειγμάτων η μελέτη γνωστοποιήθηκε και πήρε έγκριση από την Επιτροπή Έρευνας και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Αρεταίειο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών (Αριθ. πρωτοκόλλου Β-175/31-05-2016).

6 Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Πολυμορφισμοί υπό μελέτη

Το HORMAD2-AS1 είναι ένα αντίθετης κατεύθυνσης (antisense) lncRNA, πλησίον του γονιδίου HORMAD2 (22q12.2) το οποίο έχει συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ. Ο πολυμορφισμός rs1476514 αφορά εσώνιο του γονιδίου HORMAD2 και αποτελεί γνωστό πολυμορφισμό που διαταράσσει τη δομή του lncRNA.

Το NONHSAG044354 (γνωστό και ως lnc-MAP3K7-3) είναι ένα όμοιας κατεύθυνσης (sense) μακρύ διαγονιδιακό lncRNA που εντοπίζεται πλησίον του γονιδίου BACH2 (6q15). Το γονίδιο BACH2 έχει συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ και περιλαμβάνει σημαντικούς πολυμορφισμούς που οδηγούν σε διαταραχή της δομής του παραγόμενο μορίου όπως οι rs3757247 και rs597325, οι οποίοι και μελετήθηκαν. Βάσει παλαιότερων μελετών²¹⁸ οι παραπάνω πολυμορφισμοί, φαίνεται να σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ.

6.2 Πληθυσμιακό δείγμα

Στη μελέτη εντάχθηκαν 242 ασθενείς με NC, 185 ασθενείς με EK και 220 υγιείς μάρτυρες Ελληνικής καταγωγής από τους οποίους συλλέχθηκε περιφερικό αίμα. Πριν την έναρξη της μελέτης, όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν σχετικά με αυτή και παρείχαν ενυπόγραφη ενημερωμένη συγκατάθεση. Η διάγνωση της NC και της EK βασίστηκε σε γνωστά κλινικά, ενδοσκοπικά, ακτινολογικά και ιστολογικά κριτήρια ¹²¹.

6.3 Γονοτύπηση

Το DNA όλων των συμμετεχόντων απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα με το NucleoSpin® Blood kit, (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι κατάλληλα σχεδιασμένη για την απομόνωση υψηλής καθαρότητας γενωμικού DNA από ιστούς, κύτταρα, βακτήρια, ζύμες, ορό, πλάσμα αλλά και ανθρώπινο αίμα. Με σκοπό τη λύση των κυττάρων το δείγμα επωάζεται σε διάλυμα πρωτεϊνάσης K. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν στήλες χαλαζία στις οποίες η πρόσδεση του DNA επιτυγχάνεται με την προσθήκη χαστροπικών αλάτων και αιθανόλης. Η διαδικασία προσρόφησης του DNA στη στήλη, είναι αντιστρεπτή και ειδική ως προς τα νουκλεϊκά οξέα. Εν συνεχεία, οι επιμολύνσεις απομακρύνθηκαν από το δείγμα με έκλυση με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τελικά, προέκυψε καθαρό, γενωμικό DNA υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος, σε ένα ελαφρώς αλκαλικό διάλυμα έκλυσης.

Τα ακριβή στάδια της διαδικασίας περιγράφονται ως εξής:

1. Προσθήκη 25 μ L πρωτεϊνάσης K σε 200 μ L αίματος, σε σωλήνα φυγοκέντρησης 1.5 ml τύπου Eppendorf.
2. Προσθήκη 200 μ L διαλύματος B3 σε κάθε δείγμα και ανάδευση για 10- 20 sec.
3. Επώση δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
4. Επώση δειγμάτων στους 70°C για 10- 15 min.
5. Προσθήκη 210 μ L αιθανόλης (96- 100%) σε κάθε δείγμα και ανάδευση.
6. Μεταφορά του μείγματος στη NucleoSpin® blood στήλη (τοποθετημένη σε σωλήνα φυγοκέντρησης 1.5 mL). Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 11.000 x g, για 1 min.
7. Αφαίρεση της στήλης και απόρριψη του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης.
8. Ακολουθεί προσθήκη 500 μ L διαλύματος πλύσης BW στη στήλη και φυγοκέντρηση με ταχύτητα 11.000 x g, για 1 min.
9. Αφαίρεση της στήλης και απόρριψη του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης.

10. Προσθήκη 600 μ L διαλύματος B5 στη στήλη και φυγοκέντρωση με ταχύτητα 11.000 x g, για 1 min.
11. Αφαίρεση της στήλης και απόρριψη του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε νέο σωλήνα φυγοκέντρωσης.
12. Φυγοκέντρωση των στηλών τους σωλήνες με ταχύτητα 11.000 x g, για 1 min ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια διαλυμάτων.
13. Αφαίρεση της στήλης και απόρριψη του διηθήματος. Επανατοποθέτηση της στήλης σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 1.5 ml τύπου Eppendorf.
14. Προσθήκη 100 μ L διαλύματος έκλουσης BE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
15. Φυγοκέντρωση με ταχύτητα 11.000 x g, για 1 min.
16. Τέλος, το διήθημα που προκύπτει περιέχει το απομονωμένο DNA το οποίο αποθηκεύεται στους -20°C.

6.4 Ανίχνευση πολυμορφισμών

6.4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού ακολούθησε ο *in vitro* γρήγορος πολλαπλασιασμός προεπιλεγμένης μικρής ακολουθίας DNA (θραύσματα) σε πολλά αντίγραφα με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction). Η PCR αποτελεί μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kary Mullis το 1980²⁴⁶ και τιμήθηκε για αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993.

Ο πολυμορφισμός rs1476514 (G/A) πολλαπλασιάστηκε αρχικά με την τεχνική της κλασικής PCR και στη συνέχεια ακολούθησε πέψη με ένζυμο περιορισμού ώστε να πραγματοποιηθεί ανάλυση Πολυμορφισμού Μήκους Τμημάτων Περιορισμού (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP).

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών rs3757247(A/G) και rs597325 (A/G) ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλοειδικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Allele- Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR).

Στην τεχνική PCR χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές, με διαφορετική κατεύθυνση (forward- reverse) οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τις αλληλουχίες του DNA στόχου. Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται εκθετικά έπειτα από πολλαπλούς κύκλους αντιγραφής, σε τέτοιο βαθμό ώστε να είναι ανιχνεύσιμο. Ο πολλαπλασιασμός του DNA επιτυγχάνεται με την επίδραση της DNA πολυμεράσης του θερμοφιλικού βακτήριου *Thermus aquaticus* (Taq), η οποία είναι ένα θερμοσταθερό ένζυμο που δεν επηρεάζεται από τις συνεχείς συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών.

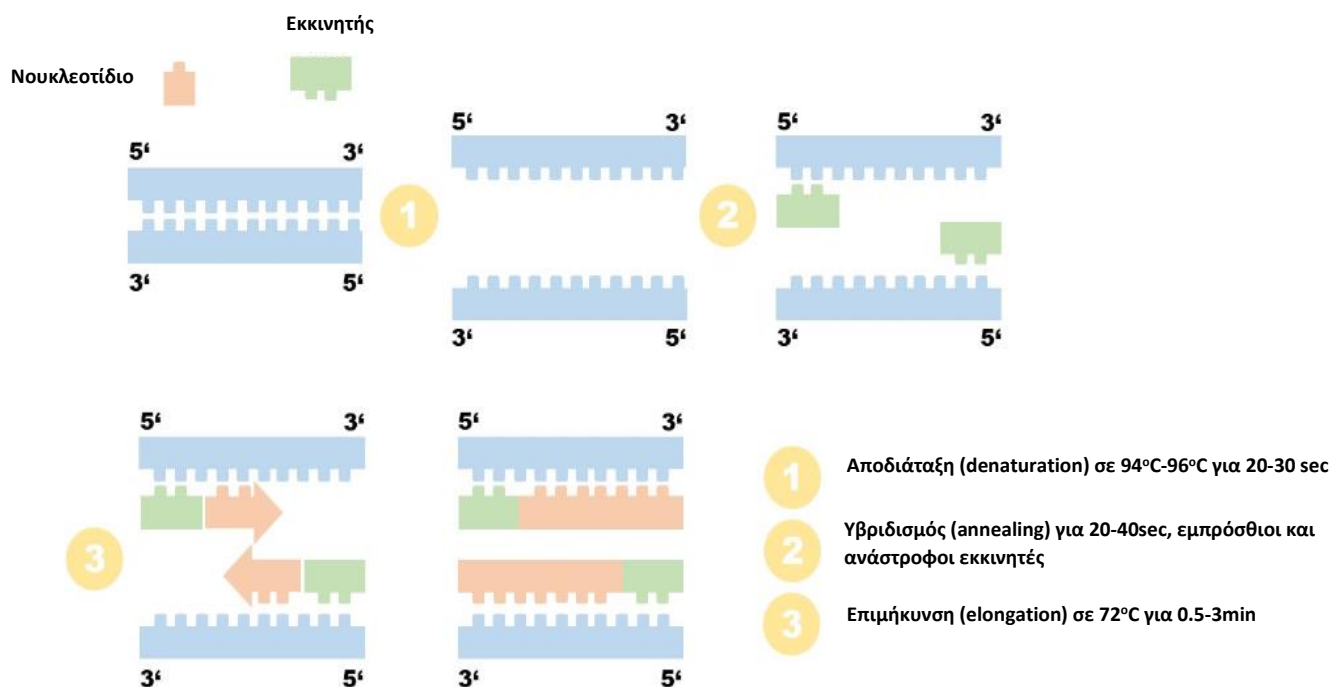
Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε ειδικό μηχάνημα, τον θερμοκυκλοποιητή (Thermocycler). Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τα τρία παρακάτω βήματα (**Εικόνα 9**) τα οποία επαναλαμβάνονται για n κύκλους (όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης):

1. Αναδιάταξη του δίκλωνου DNA στόχου στους 94ο C- 96ο C (denaturation). Σε αυτό το στάδιο, σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις συμπληρωματικές αζωτούχες βάσεις (20- 30 sec)

2. Πρόσδεση των εκκινητών (υβριδισμός) στις συμπληρωματικές τους ακολουθίες σε θερμοκρασία που εξαρτάται από τις ιδιότητες των εκκινητών (annealing) (20- 45 sec).

3. Επιμήκυνση (elongation) των υβριδισμένων εκκινητών οι οποίοι λειτουργούν ως εκμαγείο ώστε η πολυμεράση να προσθέσει δεοξυνουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς τον κλώνο στόχο. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 72ο C με κατεύθυνση 5' → 3', σχηματίζοντας έτσι τους νέους θυγατρικούς κλώνους DNA (0.5- 3 min).

Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται για 25-40 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων. Ουσιαστικά, τα μόρια DNA που παράχθηκαν στον προηγούμενο κύκλο χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Το κύριο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα κομμάτι δίκλωνου DNA, που τα άκρα του καθορίζονται από το 5' άκρο του εκκινητή και το μέγεθος του από την απόσταση των δύο εκκινητών.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αντίδρασης PCR (<https://www.hoelzel-biotech.com/en/infothek/pcr/>)

6.4.2 Επιλογή εκκινητών

Για την επιτυχημένη επιλογή των κατάλληλων εκκινητών (primers) της μεθόδου PCR, ακολουθούνται ορισμένοι κανόνες. Το μήκος των εκκινητών συνήθως δεν ξεπερνά τις 18- 22 βάσεις, η σύνθεσή τους σε G/C δεν πρέπει να υπερβαίνει το 50- 60% ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται, η χρήση εκκινητών με συμπληρωματικότητα αλληλουχιών εντός του κλώνου τους αλλά και οι επαναλήψεις G/C, ειδικότερα στο 3' άκρο. Οι κατάλληλοι εκκινητές, δεν διαθέτουν αλληλουχίες συμπληρωματικές με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA, ενώ απορρίπτονται εκκινητές οι οποίοι εμφανίζουν ομολογία με ανεπιθύμητες αλληλουχίες σε ποσοστό άνω του 70%. Τέλος, οι επαναλήψεις των δινουκλεοτιδίων δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τις τέσσερις.

Πίνακας 11: Οι εκκινητές και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Πολυμορφισμοί	Εκκινητές	Μέθοδος	Αλληλουχία
rs1476514 (G>A)	Εμπρόσθιος (F)	PCR-RFLP	5'- TATTTTAGGTGTATTCCCC -3'
	Ανάστροφος (R)		5'- GAATATCAAAGACTAAAGGA- 3'
rs3757247 (A>G)	Εμπρόσθιος (F)	AS-PCR	5'- CTCCAAGAAAGATACAGAATGC- 3'
	Ανάστροφος A (R-A)		5'- TAATAGCTATCCCTGGAATGTT- 3'
	Ανάστροφος G (R-G)		5'- TAATAGCTATCCCTGGAATGTC- 3'
rs597325 (A>G)	Εμπρόσθιος G (F-G)	AS-PCR	5'- CAAGCAGCCCCCAGGCCGACG-3'
	Εμπρόσθιος A (F-A)		5'-CAAGCAGCCCCCAGGCCGACA-3'
	Ανάστροφος (R)		5'-GGAGCAGGGCATAGTGTGGAGTGGC-3'

Στο αρχικό στάδιο της ανίχνευσης του πολυμορφισμού rs1476514 (G/A) με την τεχνική της κλασικής PCR χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών, εμπρόσθιος (forward), και ανάστροφος (reverse). Ο πολυμορφισμός rs1476514 περιλαμβάνει την αντικατάσταση μιας βάσης γουανίνης (G) στο προγονικό γονίδιο, και την αντικατάσταση της με μία αδενίνη (A).

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών rs3757247(A/G) και rs597325 (A/G) με την μέθοδο της AS-PCR χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκκινητές για τον κάθε πολυμορφισμό. Δύο εμπρόσθιοι και ένας ανάστροφος ή το αντίστροφο. Οι ανάστροφοι είναι σχεδόν ταυτόσημοι μεταξύ τους, και το 3' τελικό νουκλεοτίδιο τους, στη μία περίπτωση είναι συμπληρωματικό με το φυσιολογικό αλληλόμορφο (A) και στην άλλη με το μεταλλαγμένο (G).

Όλοι οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αποτελούν προϊόντα εμπορίου τα οποία προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Οι αλληλουχίες των εκκινητών αναγράφονται στον **Πίνακα 11**. Οι εκκινητές παρελήφθησαν λυοφιλωμένοι, συνεπώς ενυδατώθηκαν και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (- 4 °C).

6.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με Πολυμορφισμό Μήκους Τμημάτων Περιορισμού (PCR-RFLP)

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR-RFLP για τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1476514 (G/A). Η τεχνική περιλαμβάνει ως πρώτο βήμα την τεχνική της κλασσικής PCR για την αρχική ενίσχυση τμήματος μήκους 158 bp στο οποίο περιέχεται ο πολυμορφισμός rs1476514 εντός του lncRNA HORMAD2-AS1. Εν συνεχεία, το ενισχυμένο τμήμα υποβάλλεται σε επεξεργασία με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο (περιοριστική ενδονουκλεάση). Καθώς η παρουσία ή η απουσία της αντίστοιχης θέσης αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου οδηγεί στο σχηματισμό περιοριστικών τμημάτων άλλοτε άλλου μήκους, η ταυτοποίηση των αλληλόμορφων πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση των παραγόμενων τμημάτων .

Χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR kit της εταιρείας KAPA BIOSYSTEMS. Τα συστατικά που εμπεριέχονται στο kit, χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις όπως αναγράφεται στον **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12:Συστατικά για την κλασσική PCR που χρησιμοποιήθηκε, για τον έλεγχο του γονότυπου για τον πολυμορφισμό rs1476514. Αναγράφονται οι αρχικές συγκεντρώσεις όλων των συστατικών του kit που χρησιμοποιήθηκε καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση.

Συστατικά	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq Buffer A	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	10 mM/ έκαστο	0.2 mM
Εμπρόσθιος εκκινητής	46.8 nmol/μL	0.0005 mM
Ανάστροφος εκκινητής	541.1 nmol/μL	0.0005 mM
DNA πολυμεράση Taq	5 U/μL	0.0005 mM

Ύστερα από την προετοιμασία των αντιδραστηρίων στις προβλεπόμενες ποσότητες για κάθε αντίδραση, συντίθεται το κεντρικό μίγμα και το DNA εκμαγείο προστίθεται στο τέλος. Το ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq Buffer A έχει ενσωματωμένο το MgCl₂. Πιο αναλυτικά, με τη χρήση πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου, κατανέμονται ίσες ποσότητες του κεντρικού μείγματος σε κάθε ένα από τα σωληνάρια της

αντίδρασης. Στη συνέχεια, προστίθενται τα δείγματα DNA στα σωληνάρια. Στην παρούσα εργασία, κάθε σωληνάριο περιείχε διαφορετικό δείγμα DNA, συνεπώς χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ακρορύγχιο για την αποφυγή επιμολύνσεων μεταξύ των δειγμάτων. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται στον θερμοκυκλοποιητή όπου εκτίθενται σε ελεγχόμενες συνθήκες και αλλαγές θερμοκρασίας για καθορισμένα χρονικά διαστήματα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής Super Cyclor της εταιρείας Kyratec. Οι θερμοκρασίες και ο χρόνος της αντίδρασης, προγραμματίστηκαν κατάλληλα στον θερμοκυκλοποιητή ανάλογα με τις ιδιότητες του πειράματος και αναγράφονται στον **Πίνακα 13**.

Πίνακας 13: Συνθήκες της κλασσικής PCR, που χρησιμοποιήθηκαν.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι	Στάδιο
94°C	5 λεπτά	1	αρχική αποδιάταξη
94°C	45 δευτερόλεπτα	40	αποδιάταξη
50°C	45 δευτερόλεπτα	40	υβριδισμός
72°C	45 δευτερόλεπτα	40	επιμήκυνση
72°C	5 λεπτά	1	τελική επιμήκυνση

Η επιτυχής ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA, εξαρτάται τόσο από τους εκκινητές όσο και από τη θερμοκρασία σύνδεσής τους ($T_{\alpha} - T_{annealing}$). Συνήθως είναι 5°C μικρότερη από την θερμοκρασία τήξης ($T_m - T_{melting}$), στην οποία τα μισά μόρια του εκκινητή συνδέονται με τη μήτρα του DNA ενώ τα υπόλοιπα δεν σταθεροποιούνται πάνω σε αυτή και παραμένουν ελεύθερα. Εάν η θερμοκρασία στο στάδιο της υβριδοποίησης υπερβαίνει σημαντικά την T_m , οι εκκινητές δεν θα προσδεθούν αποτελεσματικά στην αλληλουχία DNA. Αντιθέτως, εάν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, οι εκκινητές τείνουν να ενωθούν σε μη ειδικές θέσεις με τις οποίες εμφανίζουν μερική συμπληρωματικότητα. Η παραπάνω διαδικασία πιθανώς να οδηγήσει στον σχηματισμό παραπροϊόντων. Τέλος, απαιτείται μεγάλη προσοχή στην αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων από εξωγενές DNA. Συνεπώς, χρησιμοποιείται για κάθε μίγμα της αντίδρασης, ένας αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, οποίος περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια της PCR χωρίς DNA εκμαγείο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs1476514, ακολούθησε πέψη των δειγμάτων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 5.7.

6.5 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1476514, έπειτα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολούθησε πέψη (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) των δειγμάτων με περιοριστικά ένζυμα - ενδονουκλεάσες (restriction enzymes). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των περιοριστικών ενζύμων να αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA (θέσεις περιορισμού- restriction sites) μήκους συνήθως 4-8 νουκλεοτιδίων, και να πέπτουν το μόριο εντός ή πλησίον της αλληλουχίας αναγνώρισης. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του DNA προκαλώντας περιοριστικά θραύσματα (restriction fragments). Σχεδόν όλα τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν παλίνδρομες θέσεις, δηλαδή θέσεις στις οποίες η αλληλουχία στον κάθε κλώνο είναι η ίδια όταν διαβάζεται με κατεύθυνση 5'→3'. Οι περισσότερες ενδονουκλεάσες λειτουργούν ως διμερή και προσαρμόζονται στο DNA με τέτοιο τρόπο ώστε ο άξονας της αμφίπλευρης συμμετρίας να συμπίπτει με αυτόν της αλληλουχίας αναγνώρισης.

Στην παρούσα εργασία, για τη γονοτύπηση του πολυμορφισμού rs1476514, πραγματοποιήθηκε πέψη των δειγμάτων DNA με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου BfaI, της εταιρείας NEW ENGLAND BioLabs (Beverly, MA, USA) το οποίο απομονώθηκε από το βακτήριο *Escherichia coli* το οποίο έχει κλωνοποιηθεί με γονίδιο του *Bacteroides fragilis* και αναγνωρίζει την παρακάτω αλληλουχία:



Τα βέλη υποδεικνύουν το σημείο πέψης του ενζύμου BfaI.

Οι συνθήκες της αντίδρασης κατάτμησης επιλέχθηκαν με βάση τη θερμοκρασία μέγιστης ενεργότητας του ενζύμου, δηλαδή τους 37 ο C. Ο χρόνος επώασης καθορίστηκε στις δύο ώρες έπειτα από δοκιμαστικές επώσεις με σκοπό το βέλτιστο αποτέλεσμα κατάτμησης. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω διαδικασία είναι ο κλίβανος Incucell της εταιρείας MMM Medcenter Einrichtungen GmbH. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο ώστε να απενεργοποιηθεί η δράση του ενζύμου και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (3.5% w/v) για τον καθορισμό του γονοτύπου βάσει του μοτίβου των περιοριστικών θραυσμάτων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πέψη των προϊόντων PCR είναι η εξής:

1. Προσθήκη ποσότητας του ενζύμου (10 units) στον τελικό όγκο της αντίδρασης PCR.
2. Επώαση των δειγμάτων για 2 ώρες.
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3.5% w/v όπως περιγράφεται στην ενότητα 5.8.

6.5.1 Αλληλοειδική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλληλοειδική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Allele- Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR) είναι γνωστή ως «σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση» (Amplification Refractory Mutation System, PCR-ARMS) ή PCR πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων αλληλόμορφων (Amplification of Specific Alleles, PASA) και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πολυμορφισμών οι οποίοι σχετίζονται με διάφορους φαινοτύπους. Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR (**Εικόνα 10**), αποτελεί ο σχεδιασμός ειδικών εκκινητών οι οποίοι επιτρέπουν την επιλεκτική ενίσχυση τμημάτων από την DNA πολυμεράση, μόνο όταν το 3' νουκλεοτίδιο του εκκινητή είναι απόλυτα συμπληρωματικό είτε με τη βάση της αλληλουχίας άγριου τύπου ή με την αλληλουχία που περιέχει τη σημειακή μετάλλαξη. Με αυτή την τεχνική δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης γνωστών σημειακών μεταλλάξεων στο DNA αλλά και η διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ετερόζυγων και ομόζυγων μεταλλαγμένων γονότυπων. Εάν δεν υπάρχει πλήρης συμπληρωματικότητα μεταξύ του 3' νουκλεοτιδίου του εκκινητή και του αντίστοιχου DNA εκμαγείου, η κλασική PCR εμφανίζει χαμηλή απόδοση ή αδυνατεί πλήρως να πολλαπλασιάσει οποιοδήποτε τμήμα. Για τον παραπάνω λόγο, απαιτείται το πλήρες ζευγάρι στο 3' άκρο του εκκινητή προκειμένου να επιτευχθεί αποδοτική ενίσχυση. Εάν χρησιμοποιηθεί εκκινητής του οποίου το 3' νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με το φυσιολογικό αλληλόμορφο αλλά μη συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, θα ενισχυθεί ειδικά το φυσιολογικό αλληλόμορφο και όχι το μεταλλαγμένο. Αντιστρόφως, με τη χρήση εκκινητή συμπληρωματικού στο 3' νουκλεοτίδιο με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, θα ενισχυθεί το μεταλλαγμένο και όχι το φυσιολογικό αλληλόμορφο.



Εικόνα 10: Απεικόνιση της βασικής αρχής της μεθόδου AS-PCR (Patrinos G & Ansorge W, eds. *Molecular Diagnostics 2nd edition*, Elsevier/Academic Press, 2009).

Όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκκινητές, για τον προσδιορισμό του γονότυπου για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς rs3757247 και rs597325. Για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, ο εμπρόσθιος εκκινητής είναι κοινός ενώ ο πρώτος ανάστροφος είναι συμπληρωματικός με το προγονικό αλληλόμορφο (A) και ο δεύτερος με το αλληλόμορφο (G) που περιέχει τον μονονουκλεοτιδικό

πολυμορφισμό. Η αντίδραση περιλαμβάνει την αμφίδρομη ενίσχυση, με το προγονικό αλληλόμορφο να ενισχύεται χρησιμοποιώντας τον έναν κλώνο ως μήτρα και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο να ενισχύεται με βάση τον συμπληρωματικό. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να είναι κατάλληλοι για την εύκολη διάκριση των τμημάτων DNA με συμβατική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπως αναφέρεται στην ενότητα 5.8. Με τη χρήση της μεθόδου AS-PCR δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου της ομοζυγωτίας για το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ομοζυγωτίας για τον πολυμορφισμό αλλά και ετεροζυγωτίας.

Για τους rs3757247 και rs597325, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο KAPA Taq PCR kit της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS. Ομοίως, οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, αναγράφονται στον **Πίνακα 14**.

Πίνακας 14: Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην AS-PCR.

Συστατικά	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα KAPA Taq Buffer A	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM
dNTPs	10 mM/ έκαστο	0.2 mM
Εμπρόσθιος εκκινητής	46.8 nmol/μL	0.0005 mM
Ανάστροφος εκκινητής	541.1 nmol/μL	0.0005 mM
DNA πολυμεράση Taq	5 U/μL	0.0005 mM
Δισαπεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)		Όσο απαιτείται για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου ίσο με 50 μL
DNA εκμαγείο	10 ⁵ -10 ⁶ αντίγραφα σε 10 μL	10 ² -10 ³ σε 5 μL

Οι θερμοκρασίες και ο χρόνος της αντίδρασης, προγραμματίστηκαν κατάλληλα στον θερμοκυκλοποιητή ανάλογα με τις ιδιότητες του πειράματος και αναγράφονται στον **Πίνακα 15**.

Πίνακας 15: Συνθήκες της AS- PCR, που χρησιμοποιήθηκαν.

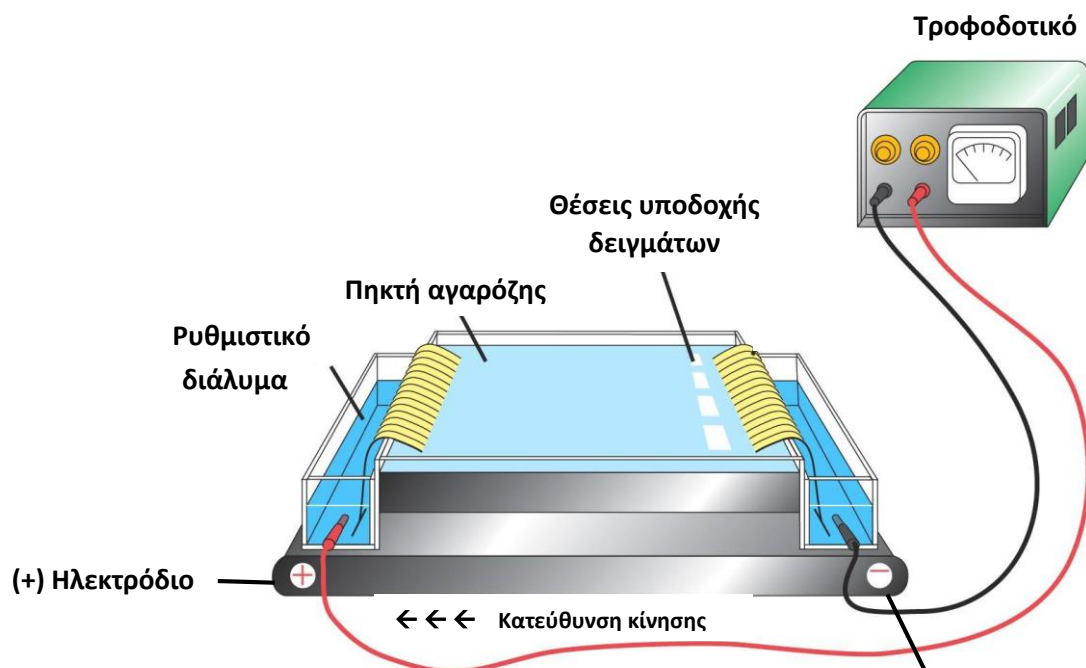
Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι	Στάδιο
94°C	5 λεπτά	1	αρχική αποδιάταξη
94°C	45 δευτερόλεπτα	40	αποδιάταξη
57°C	45 δευτερόλεπτα	40	υβριδισμός
72°C	45 δευτερόλεπτα	40	επιμήκυνση
72°C	5 λεπτά	1	τελική επιμήκυνση

6.6 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η PCR ήταν επιτυχής, τα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχθηκαν μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης της εταιρείας NIPPON Genetics EUROPE GmbH. Πρόκειται για μία κλασική μέθοδο διαχωρισμού και απομόνωσης κλασμάτων DNA. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από θαλάσσια ροδοφύκη και η πηκτή που σχηματίζει αποτελείται από πόρους. Η διαδικασία βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων με ηλεκτρικό φορτίο, να μετακινούνται εντός της πηκτής που σχηματίζεται από τον πολυμερισμό της αγαρόζης παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω των φωσφορικών ομάδων που περιέχουν στο σκελετό τους και μετακινούνται προς τον θετικό (+) πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η κινητικότητα των μορίων DNA εξελίσσεται οριζόντια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, λόγω της μικρής μηχανικής αντοχής της πηκτής. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα τμήματα DNA, εξαρτάται από το μήκος τους, το φορτίο και το σχήμα τους. Συνήθως, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος τους.

Η κινητικότητα των θραυσμάτων DNA μέσα από τους πόρους της πηκτής αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη του $\log_{10}$ του μοριακού τους βάρους.

Όσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο μεγαλύτεροι πόροι σχηματίζονται. Τα μικρά τμήματα διαπερνούν με μεγαλύτερη ευκολία τους πόρους της πηκτής ενώ τα μεγαλύτερα με καθυστέρηση.

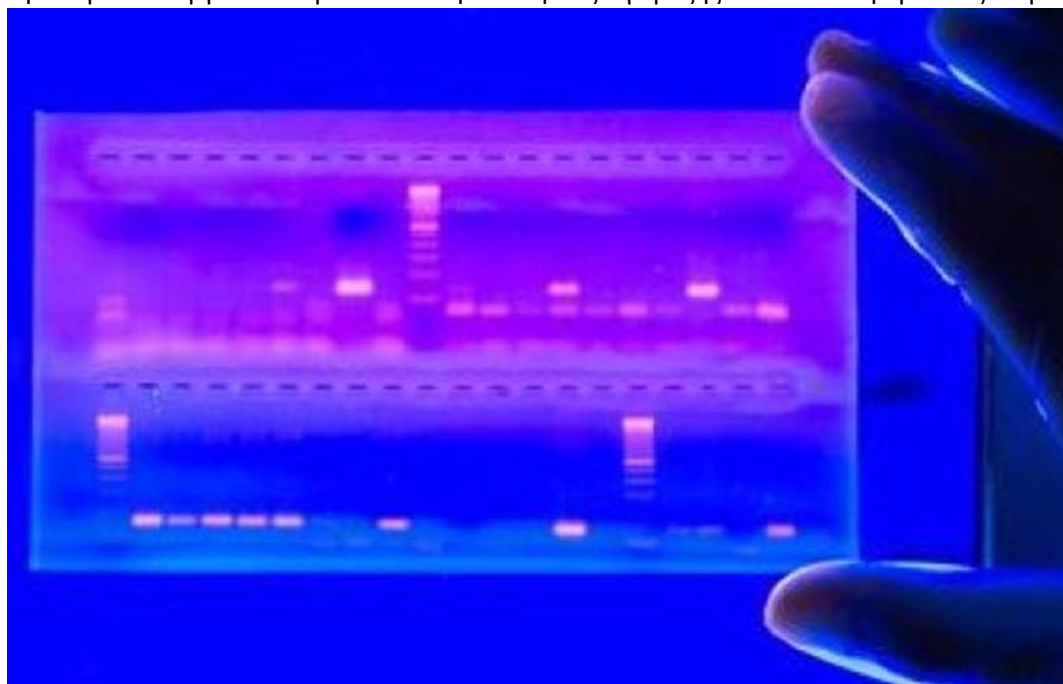


Εικόνα 11: Απεικόνιση του εξοπλισμού της ηλεκτροφόρησης DNA που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA κατά μέγεθος. Η πηκτή αγαρόζης βρίσκεται εντός της δεξαμενής που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής, στο ένα άκρο της πηκτής και το ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται διαμέσου της πηκτής. Το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (<https://www.mun.ca/biology>)

Ο εξοπλισμός της ηλεκτροφόρησης (**Εικόνα 11**) περιλαμβάνει ένα εκμαγείο στο οποίο τοποθετείται η πηκτή με τις θέσεις υποδοχής δειγμάτων («πηγαδάκια» που σχηματίζονται από ειδικά χτενάκια κατά την πήξη του διαλύματος), το δοχείο εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης (tank), δύο ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με τους αντίστοιχους πόλους και ένα τροφοδοτικό παροχής ρεύματος. Απαραίτητο συστατικό για την εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρέχει την ανάλογη ιονική ισχύ που απαιτεί το κύκλωμα της ηλεκτροφόρησης. Τα πιο συνηθισμένα είναι το TAE (Tris- Acetate EDTA) και το TBE (Tris- Borate EDTA).

Κατά τη μετακίνηση των διάφορων τμημάτων DNA και ανάλογα με το μέγεθός τους, σχηματίζονται κατά μήκος της πηκτής χαρακτηριστικές ζώνες οι οποίες γίνονται ορατές έπειτα από προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide, EtBr) και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων της δίκλωνης αλυσίδας του DNA και φθορίζει παρουσία UV (**Εικόνα 12**). Για την προστασία των οφθαλμών του χρήστη από την υπεριώδη ακτινοβολία, συστήνεται η χρήση κατάλληλης μάσκας.

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν πηκτές αγαρόζης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 12: Οι ζώνες που σχηματίζονται σε μια πηκτή αγαρόζης, σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (<https://geneticeducation.co.in/agarose-gel-electrophoresis/>)

Πιο συγκεκριμένα, για τον έλεγχο της επιτυχίας της PCR και της AS-PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή με περιεκτικότητα αγαρόζης 2% w/v ενώ η πηκτή για την ανίχνευση των πολυμορφισμών έπειτα από πέψη των προϊόντων PCR είχε περιεκτικότητα αγαρόζης 3,5% w/v. Τα συστατικά της μεθόδου, οι αναλογίες και οι ποσότητες αναγράφονται στον **Πίνακα 16**.

Πίνακας 16: Συστατικά παρασκευής πηκτών αγαρόζης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Συστατικά	Πηκτή 2% w/v	Πηκτή 3.5% w/v
Αγαρόζη	2 gr	3.5 gr
TAE 1X	100 mL	100 mL
EtBr	0.5 µg/ml	0.5 µg/ml

Η παρασκευή πηκτής αγαρόζης γίνεται ως εξής:

1. Ζύγιση της αγαρόζης σε ζυγό ακριβείας.
2. Τοποθέτηση σε κωνική φιάλη της σκόνης αγαρόζης που ζυγίστηκε μαζί με TAE 1X.
3. Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει διαυγές.
4. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης.
5. Όταν είναι έτοιμο, προστίθενται στο διάλυμα 5 µL της χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο1 (EtBr) και ακολουθεί ανακίνηση της κωνικής φιάλης.
6. Έπειτα, η ρευστή αγαρόζη τοποθετείται στο εκμαγείο το οποίο έχει προετοιμαστεί έτσι ώστε να είναι κλειστές οι πλευρές του με χαρτοταινία και εφαρμόζονται τα ειδικά χτενάκια για τον σχηματισμό των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων που ομοιάζουν με πηγαδάκια.
7. Η αγαρόζη αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 min.

Μετά την ολοκλήρωση της πήξης του διαλύματος αγαρόζης, αφαιρούνται τα ειδικά χτενάκια και η πηκτή τοποθετείται στο δοχείο εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης μέσα στο οποίο έχει προηγουμένως τοποθετηθεί διάλυμα TAE 1X (ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή της πηκτής). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου, αφού προηγουμένως έχουν αναμιχθεί με διάλυμα φόρτωσης 6X (Πίνακας 17). Το διάλυμα φόρτωσης προσδίδει μπλε ορατές ζώνες οι οποίες προσφέρουν μια αδρή εκτίμηση του ρυθμού μετακίνησης των μορίων DNA στην πηκτή κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 17: Συστατικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος φόρτωσης 6X και οι περιεκτικότητές τους (cytographica.com).

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Κυανούν βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)	0.25%
Κυανολικό ξυλένιο (xylene cyanol FF)	0.25%
Γλυκερόλη σε dH2O	30%

Μαζί με τα δείγματα DNA, σε ξεχωριστή θέση, τοποθετείται και ένας μάρτυρας (ladder) γνωστού μοριακού βάρους ο οποίος εμφανίζει ζώνες γνωστού μεγέθους ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το μέγεθος των δειγμάτων DNA που ηλεκτροφορήθηκαν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός μάρτυρας για κάθε πολυμορφισμό λόγω διαφορών στα μεγέθη των προϊόντων PCR, ωστόσο και οι δύο είναι της εταιρείας NIPPON GENETICS EUROPE. Ειδικότερα, για την μελέτη των rs3757247 και rs597325 χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μεγέθους 100 bp ο οποίος εμφανίζει ζώνες ανά 100 bp ενώ για τον πολυμορφισμό rs1476514 χρειάστηκε μάρτυρας μεγέθους 50 bp. Τέλος, η συσκευή τίθεται σε λειτουργία και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε κύκλωμα των 100 Volt/60 mA περίπου για 20 min.

Μετά τον τερματισμό της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η μεταφορά της πηκτής σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας όπου ελέγχεται εάν έχει επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος. Λόγω της φθορίζουσας χρωστικής που έχει προστεθεί στο πήκτωμα, τα μόρια DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως ιώδεις ζώνες.

6.7 Στατιστική ανάλυση

Στη στατιστική ανάλυση συμμετείχαν οι γονότυποι όλου του υπό μελέτη πληθυσμιακού δείγματος συμπεριλαμβανομένων υγιών και ασθενών. Το πρώτο βήμα της στατιστικής επεξεργασίας αποτέλεσε ο έλεγχος των γονοτυπικών συχνοτήτων, της παρούσας μελέτης, με την ισορροπία Hardy-Weinberg. Επειδή, είναι σημαντικό να επικρατούν συνθήκες τυχαίας διασταύρωσης (random mating) σχετικά με τον εκάστοτε γενετικό τύπο, και τα δεδομένα να μην είναι αποτέλεσμα μεροληπτικής (biased) στατιστικής ανάλυσης, εφαρμόστηκε το στατιστικό κριτήριο χ^2 (chi-square). Ο έλεγχος χ^2 μπορεί να καθορίσει εάν οι αναμενόμενες συχνότητες διαφέρουν από αυτές που παρατηρούμε στο δείγμα του πληθυσμού. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης των ποιοτικών δεδομένων και η πιθανή συσχέτιση των μελετημένων πολυμορφισμών με τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου.

6.7.1 Ισορροπία Hardy-Weinberg

Το θεώρημα της ισορροπίας Hardy-Weinberg (Hardy Weinberg Equilibrium, HWE) αποτελεί το βασικό θεώρημα της γενετικής πληθυσμών που δηλώνει ότι η γενετική ποικιλοότητα σε έναν πληθυσμό παραμένει σταθερή από τη μια γενιά στην επόμενη, απουσία παρεμβαλλόμενων παραγόντων. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ο πληθυσμός αναμένεται να είναι σε HWE και οι συχνότητες των γονοτύπων σε ένα πληθυσμό ακολουθούν ένα πρότυπο. Βασικές προϋποθέσεις για την πληρότητα του θεωρήματος είναι οι εξής:

1. Το μέγεθος του πληθυσμού να είναι άπειρο.
2. Τα αλληλόμορφα να διαχωρίζονται ακολουθώντας τους νόμους του Μέντελ.

3. Οι επιδράσεις της μετανάστευσης και των μεταλλαγών στις συχνότητες των αλληλόμορφων (πόσο κοινό είναι ένα αλληλόμορφο μέσα σε ένα πληθυσμό) πρέπει να είναι αμελητέες. Δηλαδή ο πληθυσμός να αποτελεί ένα κλειστό σύστημα.
4. Δεν επιλέγεται ένας γονότυπος έναντι κάποιου άλλου.
5. Η σύζευξη μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού να είναι τυχαία και εξίσου πιθανή για όλα τα πιθανά ζευγάρια αρσενικών και θηλυκών ατόμων.
6. Τέλος, αφορά τους διπλοειδείς οργανισμούς με αμφιγονικό τρόπο αναπαραγωγής.

Οι συχνότητες των γονότυπων σε ένα πληθυσμό ο οποίος βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας, δίνονται από τη σχέση: $p^2 + q^2 + 2pq = 1$. Ο παραπάνω τύπος χρησιμοποιείται και για τις συχνότητες γονότυπων για έναν τόπο με δύο αλληλόμορφα. Επίσης, η συχνότητα των ετερόζυγων είναι στο μέγιστο όταν για τις συχνότητες των αλληλόμορφων ισχύει $p = q = 0.5$. Στην παρούσα εργασία, η διερεύνηση της ισχύος του νόμου Hardy-Weinberg πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες με τις αναμενόμενες, υπό τις συνθήκες της HWE. Ωστόσο, η ισορροπία Hardy-Weinberg μπορεί να διαταραχθεί από πληθώρα γεγονότων, όπως οι μεταλλάξεις, η φυσική επιλογή, η μη τυχαία σύζευξη, η γενετική παρέκκλιση και η γονιδιακή ροή. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις διαταράσσουν την ισορροπία των συχνοτήτων των αλληλόμορφων εισάγοντας νέα αλληλόμορφα σε έναν πληθυσμό. Παρομοίως, η φυσική επιλογή και η μη τυχαία σύζευξη διαταράσσουν την HWE καθώς προκαλούν αλλαγές στις συχνότητες των γονιδίων. Αυτό συμβαίνει επειδή ορισμένα αλληλόμορφα βοηθούν ή βλάπτουν την αναπαραγωγική επιτυχία των οργανισμών που τις μεταφέρουν. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να διαταράξει αυτή την ισορροπία είναι η γενετική παρέκκλιση, η οποία συμβαίνει όταν οι συχνότητες των αλληλόμορφων, τυχαία αυξάνονται ή μειώνονται, και συνήθως λαμβάνουν χώρα σε μικρούς πληθυσμούς. Η γονιδιακή ροή, η οποία συμβαίνει κατά την αναπαραγωγή μεταξύ δύο πληθυσμών όταν μεταφέρονται νέα αλληλόμορφα σε έναν πληθυσμό, μπορεί επίσης να μεταβάλει την HWE. Όλες οι παραπάνω διαταραχές συνήθως συμβαίνουν στη φύση, επομένως η HWE στην πραγματικότητα, σπάνια εφαρμόζεται. Ουσιαστικά, αυτή η ισορροπία περιγράφει μια εξιδανικευμένη κατάσταση και οι γενετικές παραλλαγές που συναντώνται στη φύση αποτελούν αλλαγές αυτής της κατάστασης ισορροπίας.

6.7.2 Στατιστικό κριτήριο χ^2

Πρόκειται για ένα μη παραμετρικό κριτήριο που δεν απαιτεί καμία υπόθεση για την ακριβή μορφή της κατανομής του πληθυσμού. Το χ^2 (chi-square) αποτελεί το κατάλληλο κριτήριο στην περίπτωση όπου τα δεδομένα της έρευνας είναι ποιοτικά και η κλίμακα μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατηγορική. Συνεπώς, δεν χρειάζεται να μετρηθεί η επίδοση των συμμετεχόντων, αντίθετα, απλά εντάσσονται σε μία κατηγορία. Επειδή οι συμμετέχοντες δεν μπορούν να ενταχθούν σε περισσότερες από μία κατηγορίες (υγιείς, NC, EK), το χ^2 είναι κατάλληλο μόνο για προβλέψεις σχετικά με τη διαφορετικότητα των

συμμετεχόντων στην κάθε κατηγορία. Το χ^2 στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιείται ως στατιστικό κριτήριο για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας μεταξύ δύο ποιοτικών μεταβλητών (ασθενείς- υγιείς). Έτσι, εξετάζεται αν δύο μεταβλητές που διασταυρώνονται σε έναν πίνακα διπλής εισόδου ή διασταύρωσης (contingency table), είναι ανεξάρτητες ή εξαρτημένες και αν οι συχνότητες των διαφόρων κατηγοριών μπορούν να προκύψουν τυχαία ή είναι συστηματικές, αντίστοιχα. Το στατιστικό κριτήριο χ^2 αντανakλά το μέγεθος των διαφορών μεταξύ των πραγματικών και των αναμενόμενων συχνοτήτων. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η διαφορά, τόσο πιθανότερο είναι να προκύψει στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Στην παρούσα εργασία, το συγκεκριμένο στατιστικό κριτήριο, μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε την απόκλιση μεταξύ των θεωρητικών αναμενόμενων συχνοτήτων και των παρατηρούμενων. Για δύο ποιοτικές μεταβλητές υπολογίζεται με βάση τον εξής τύπο: $\chi^2 = \sum \frac{(\Pi - A)^2}{A}$. Όπου Π , αντιπροσωπεύονται οι παρατηρούμενες τιμές και όπου A , οι θεωρητικά αναμενόμενες. Για τον υπολογισμό της τιμής χ^2 , χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad InStat software. Ο υπολογισμός γίνεται για συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας οι οποίοι εκφράζουν τους παράγοντες που μπορούν να μεταβάλουν ένα σύστημα. Επίσης, υπολογίζεται η πιθανότητα (P) ταύτισης των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών με τις τιμές που παρατηρήθηκαν. Στην παρούσα μελέτη, ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5% δηλαδή, όρια εμπιστοσύνης 95% (Odd ratio 95%). Πιθανότητα μεγαλύτερη του επιπέδου σημαντικότητας σημαίνει ότι τα αποτελέσματά μας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά άρα γίνεται αποδεκτή η μηδενική υπόθεση, συνεπώς για τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο, ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy Weinberg. Αντίθετα, όταν η τιμή της πιθανότητας (P) που υπολογίστηκε, είναι μικρότερη του επιπέδου σημαντικότητας 0,05, υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των θεωρητικών και των παρατηρούμενων τιμών και κατά συνέπεια, η μηδενική υπόθεση δεν γίνεται αποδεκτή. Ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Βαθμοί ελευθερίας} = [\text{αριθμός διαφορετικών γονοτύπων}-1] - [\text{αριθμός αλληλομόρφων}-1].$$

Το χ^2 δεν είναι πολύ ασφαλές στην περίπτωση του ενός βαθμού ελευθερίας καθώς είναι αυξημένες οι πιθανότητες σφάλματος. Επειδή στην παρούσα εργασία οι βαθμοί ελευθερίας είναι 1, έγινε τροποποίηση στον υπολογισμό του χ^2 , γνωστή και ως διόρθωση κατά Yates (Yates' correction). Η παραπάνω τροποποίηση εμπεριέχεται στο στατιστικό εγχειρίδιο InStat και το χ^2 , σ' αυτή την περίπτωση υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: $\chi^2 = \sum \frac{(|\Pi - A|)^2}{A}$, όπου $|\Pi - A|$ = η απόλυτη τιμή της διαφοράς της πραγματικής συχνότητας Π από την αναμενόμενη συχνότητα A για καθεμία από τις κατηγορίες της μεταβλητής.

7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τρεις πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για τους rs1476514, rs3757247 και rs597325 SNPs. Ο rs1476514 συμβαίνει εντός του lncRNA NONHSAG033653 το οποίο προκύπτει από μεταγραφή αντίθετης φοράς (antisense) και εντοπίζεται σε κοντινή απόσταση από το γονίδιο HORMAD2 (22q12.2). Οι πολυμορφισμοί rs3757247 και rs597325 εδράζονται πλησίον του lncRNA NONHSAG044354 και του γονιδίου BACH2 (6q15). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τους τρεις πολυμορφισμούς, πραγματοποιήθηκε εφόσον εξακριβώθηκε ότι, τόσο η ομάδα των ασθενών όσο και των υγιών ατόμων, δεν παρεκκλίνει από το ισοζύγιο Hardy-Weinberg, βάσει της αξιολόγησης με τη δοκιμασία χ^2 . Για την τιμή $P < 0.05$ θεωρήθηκε κάθε αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό. Η διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων εμφάνισης των γονότυπων και των αλληλόμορφων αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμασίας χ^2 . Η συσχέτιση των SNPs με τις ΙΦΝΕ πραγματοποιήθηκε με βάση την αναλογία πιθανοτήτων (Odds Ratio, OR) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% (Confidence Interval, CI).

7.1 Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά πληθυσμού

Η διερεύνηση των πολυμορφισμών έγινε σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα ασθενών με NC, EK αλλά και υγιών ατόμων. Το πληθυσμιακό δείγμα αποτελείται από 427 ασθενείς (242 με NC και 185 με EK) και 220 υγιείς. Η αναλογία ανδρών/ γυναικών είναι κατά προσέγγιση 1: 1.24 για την NC, 1: 1.10 για την EK και 1: 1.13 για τους υγιείς. Το ηλικιακό εύρος κυμαίνεται μεταξύ 28- 81 έτη για τους ασθενείς με NC, 23- 44 έτη για τους ασθενείς με EK και 31- 52 έτη για τον υγιή πληθυσμό. Οι τρεις ομάδες του δείγματος δε διαφέρουν σημαντικά ως προς τον αριθμό, την ηλικία και το φύλο. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμιακού δείγματος, συνοψίζονται στον **Πίνακα 18**.

Πίνακας 18: Δημογραφικά χαρακτηριστικά δείγματος

Χαρακτηριστικά	NC	EK	Υγιείς μάρτυρες
Αριθμός (n)	242	185	220
Ηλικία	36,71 ± 8,42	34,42 ± 10,55	42,22 ± 10,55
Φύλο (άρρεν/ θήλυ)	108/134	88/97	103/117
Έκταση νόσου, n (%) κατά Montreal			
Εκτεταμένη κολίτιδα (E1)		98 (52,97)	
Αριστερή κολίτιδα (E2)		50 (27,03)	
Ορθίτιδα (E3)		37 (20)	

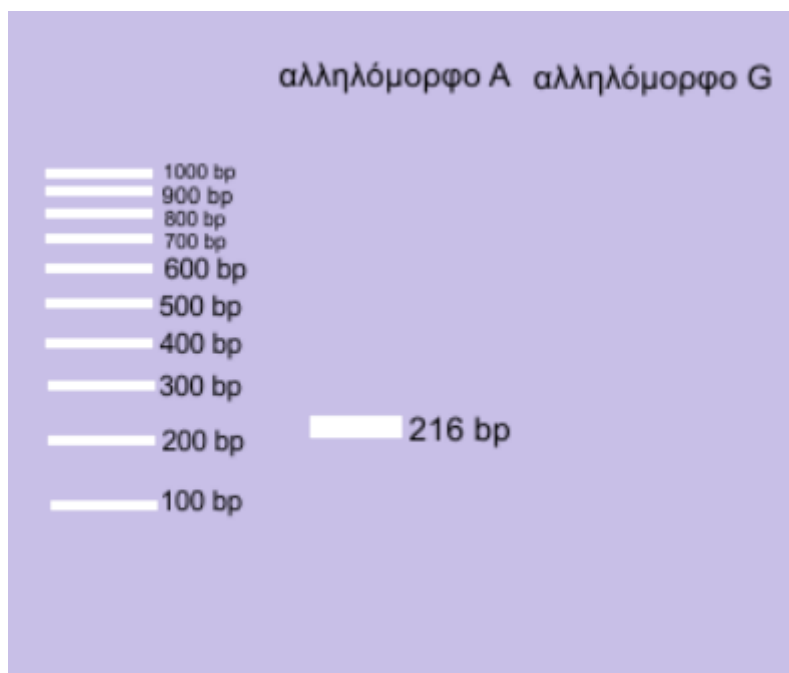
Εντοπισμός νόσου, n (%) κατά Montreal			
Ειλεΐτιδα (L1)	83 (34,29)		
Κολίτιδα (L2)	17 (7,03)		
Ειλεοκολίτιδα (L3)	142 (58,68)		
Συμπεριφορά νόσου, n (%)			
Φλεγμονώδης	149 (61,57)		
Στενωτική	66 (27,27)		
Συριγγοποιός	27 (11,16)		

Οι ασθενείς του πληθυσμιακού δείγματος της παρούσας μελέτης, εμφανίζουν ετερογένεια ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, για την ΕΚ, το 52.7% του πληθυσμού εμφάνιζε εκτεταμένη κολίτιδα κατά την οποία η νόσος καταλαμβάνει το κόλον έως απώτερα της σπληνικής καμπής. Στο 27.03% του ίδιου πληθυσμού, η νόσος εντοπίζεται στο αριστερό κόλον ενώ το 20% πάσχει από ορθίτιδα με φλεγμονή του βλεννογόνου του ορθού. Όσον αφορά τη ΝΚ, στο 34.29% των ασθενών η νόσος εντοπίζεται στον ειλεό ενώ στο 7.0% στο κόλον. Επίσης, ένα συγκριτικά μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού με ΝΚ (58.68%) πάσχει τόσο στον ειλεό όσο και στο κόλον εμφανίζοντας ειλεοκολίτιδα. Επιπλέον, η νόσος του Crohn στο μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού (61.57%) εκδηλώνεται ως μόνο φλεγμονώδης, ενώ κατά το μικρότερο ποσοστό του πληθυσμού (11.16%) είναι συριγγοποιός. Το 27.27% των ασθενών με ΝΚ παρουσιάζει τη στενωτική μορφή της νόσου.

7.2 Πολυμορφισμός rs3757247 (A>G)

Στον πολυμορφισμό rs3757247, γίνεται αντικατάσταση μιας αδερίνης (A) από μία γουανίνη (G) στο lncRNA NONHSAG044354 το οποίο εδράζεται πλησίον του πρωτεϊνικού γονιδίου BACH2. Συνεπώς, το προγονικό αλληλόμορφο περιέχει A ενώ το αλληλόμορφο που περιέχει τον πολυμορφισμό διαθέτει το G.

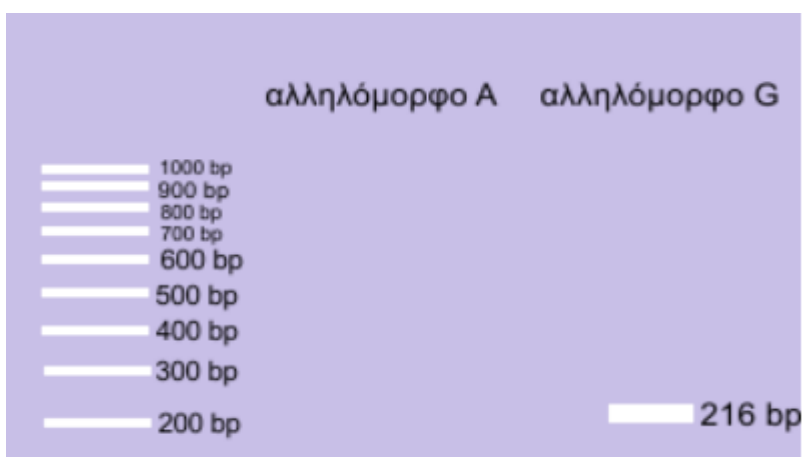
Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα για τον χαρακτηρισμό των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε AS-PCR με τρεις εκκινητές. Ο ένας εκκινητής είναι κοινός ενώ οι υπόλοιποι δύο στοχεύουν στο προγονικό και στο αλληλόμορφο με τον πολυμορφισμό, αντίστοιχα. Ο χαρακτηρισμός των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρότυπο της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 100 bp. Η εμφάνιση μίας ζώνης μεγέθους 216 bp, στη θέση του δείγματος με ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών, στο πήκτωμα αγαρόζης, αντιπροσωπεύει την ύπαρξη του αντίστοιχου αλληλόμορφου.



Εικόνα 13: Απεικόνιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου για τον γονότυπο A/A, για τον πολυμορφισμό rs3757247, με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 100 bp

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές σε εναλλάξ ζεύγη. Συνεπώς, για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν δύο θέσεις στο πηκτώμα, μία για κάθε ζεύγος εκκινητών (Forward/ Reverse- A και Forward/ Reverse- G). Κατά την ηλεκτροφόρηση, η εμφάνιση μίας μόνο ζώνης στη θέση όπου τοποθετήθηκε δείγμα με εκκινητές για το A αλληλόμορφο, υποδεικνύει την ομοζυγωτία (A/A) για το προγονικό αλληλόμορφο, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην **Εικόνα 13**. Στην παρούσα εργασία, ο γονότυπος A/A ανιχνεύθηκε σε 53 δείγματα με NC, σε 50 με EK και σε 44 υγιή δείγματα ελέγχου.

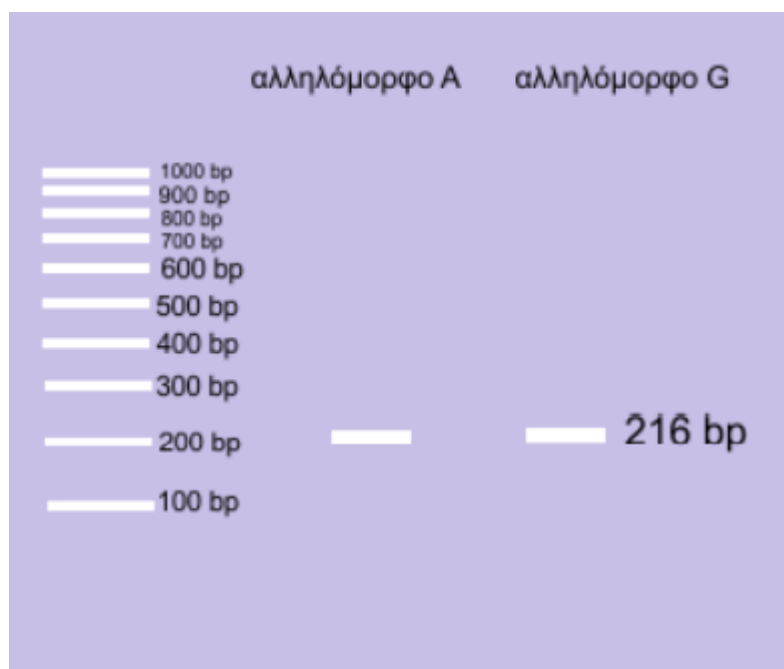
Στην περίπτωση του γονότυπου G/G, σε αντίθεση με τον A/A, εμφανίζεται μία μόνο ζώνη στη θέση όπου τοποθετήθηκε δείγμα με εκκινητές για το G αλληλόμορφο. Συνεπώς, η εμφάνιση του πηκτώματος όπως



Εικόνα 14: Απεικόνιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου για τον γονότυπο G/G, για τον πολυμορφισμό rs3757247, με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 100 bp.

φαίνεται στην **Εικόνα 14**, αντιπροσωπεύει την ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο που περιέχει τον πολυμορφισμό rs3757247. Ο γονότυπος G/G εμφανίστηκε σε 60 δείγματα με NC, σε 55 με EK και σε 79 δείγματα υγιών ατόμων.

Σχετικά με την ετεροζυγωτία, τα δείγματα με γονότυπο A/G εμφανίζουν δύο ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι ζώνες μεγέθους 216 bp, εντοπίζονται και στις δύο θέσεις με τους εκκινητές για το αλληλόμορφο A και G αντιστοίχως, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην **Εικόνα 15**. Ο γονότυπος A/G εμφανίστηκε σε 129 δείγματα με NC, σε 80 με EK και σε 97 υγιή δείγματα ελέγχου.



Εικόνα 15: Απεικόνιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου για τον γονότυπο A/G, για τον πολυμορφισμό rs3757247, με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 100 bp.

Όσον αφορά τη γονοτύπηση, η αναλογία πιθανοτήτων (Odds Ratio, OR) και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% (Confidence Interval, CI) αναγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα 19**, ανά ομάδα ασθενών με NC και EK καθώς και υγιών ατόμων. Η συσχέτιση όλων των τιμών όπως πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό InStat, έγινε σε συσχέτιση με τον υγιή πληθυσμό.

Για τον πολυμορφισμό rs3757247, ο γονότυπος G/G (79/222), φαίνεται να υπερτερεί στον υγιή πληθυσμό ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η NC (60/242) και η EK (55/185), με μικρότερο αριθμό εμφάνισης, χωρίς όμως να είναι αυτές οι διαφορές στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, οι ασθενείς με NC εμφανίζουν σε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα τον γονότυπο A/G με την τιμή του OR στο 1.75 (95% CI, 1.14-1.68; P= 0.013) σε σχέση με τους υγιείς. Η αντίστοιχη τιμή για την EK του OR είναι 1.18 (95% CI, 0.75-1.86; P= 0.49). Όσον αφορά τον γονότυπο A/A, δεν υπάρχει διαφορά εμφάνισης μεταξύ των πληθυσμιακών ομάδων. Το

προγονικό αλληλόμορφο A, εντοπίστηκε οριακά πιο συχνά στους ασθενείς με NC σε σχέση με του υγιείς (P=0.048). Αντίθετα, το αλληλόμορφο G δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών και των ασθενών με ΙΦΝΕ.

Πίνακας 19: Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs3757247 με την πιθανότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ

	Υγιείς μάρτυρες (n=220)	NC (n=242)	P;OR (95%CI)	EK (n=185)	P;OR (95%CI)
G/G	79	60	1	55	1
A/G	97	129	0.013;1.75 (1.14-2.68)	80	0.49; 1.18 (0.75-1.86)
A/A	44	53	0.09;1.59 (0.94-2.67)	50	0.08;1.63 (0.96-2.78)
Αλληλό- μορφο A	185	235	0.048;1.3 (1.01-1.69)	180	0.06;1.31 (0.99-1.72)
Αλληλό- μορφο G	255	249	1	190	1

7.3 Πολυμορφισμός rs597325 (A>G)

Ο πολυμορφισμός rs597325 επίσης εδράζεται πλησίον του lncRNA γονιδίου NONHSAG044354 και του BACH2 γονιδίου και στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι το προγονικό αλληλόμορφο περιέχει A ενώ το αλληλόμορφο που περιέχει τον πολυμορφισμό διαθέτει το G ²⁴⁷.

Όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη αυτού του πολυμορφισμού η τεχνική της AS- PCR με τρεις εκκινητές. Ο ένας εκκινητής είναι κοινός ενώ οι υπόλοιποι δύο στοχεύουν στο προγονικό και στο αλληλόμορφο με τον πολυμορφισμό, αντίστοιχα. Ο χαρακτηρισμός των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρότυπο της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ανιχνεύτηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα (NC, EK και μάρτυρες) ο γονότυπος A/G (ετεροζυγώτες).

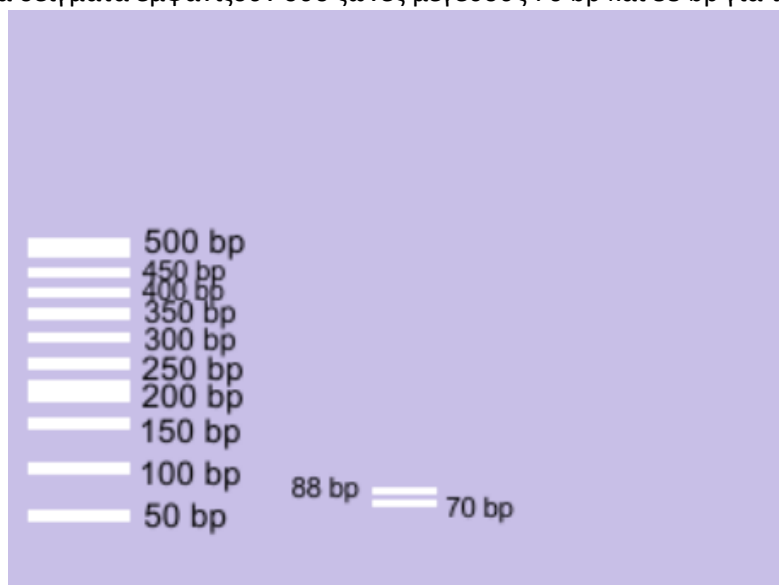
7.4 Πολυμορφισμός rs1476514 (G>A)

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό μονού νουκλεοτιδίου rs1476514, γίνεται αντικατάσταση μιας γουανίνης (G) από μία αδενίνη (A) στο lncRNA NONHSAG033653 (HORMAD2-AS1). Συνεπώς, το προγονικό αλληλόμορφο περιέχει G ενώ το αλληλόμορφο που περιέχει τον πολυμορφισμό διαθέτει το A ²⁴⁸.

Για τον χαρακτηρισμό των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε κλασική μέθοδος PCR και ακολούθησε η διαδικασία πέψης των προϊόντων ενίσχυσης, με το περιοριστικό ένζυμο BfaI. Ο χαρακτηρισμός των γονοτύπων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρότυπο της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο κοπής ή μη- κοπής από το ένζυμο, δίνει τον τελικό χαρακτηρισμό του γονότυπου. Το προϊόν που προκύπτει μέσω της ενίσχυσης με τη μέθοδο PCR έχει μέγεθος 158 bp. Το περιοριστικό ένζυμο BfaI πέπτει το προϊόν όταν συναντά την αλληλουχία κοπής στο αλληλόμορφο G. Συνεπώς, τα δείγματα που έχουν το προγονικό αλληλόμορφο γουανίνης (G), εμφανίζουν δύο ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση. Το ένζυμο δεν πέπτει την αλληλουχία που περιέχει αδενίνη (A). Όλοι οι γονότυποι αξιολογήθηκαν με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 50 bp.

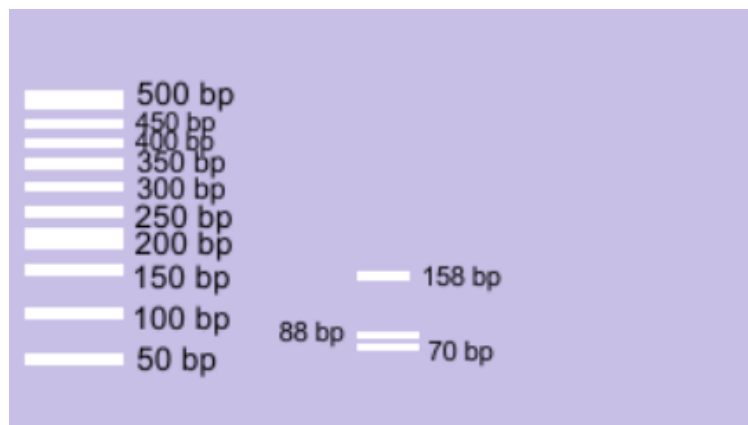
Όλα τα δείγματα με το προγονικό αλληλόμορφο G εμφάνισαν ηλεκτροφορητικό πρότυπο δύο ζωνών μεγέθους 70 bp και 88 bp (**Εικόνα 17**). Διαπιστώθηκε ομοζυγωτία του αλληλόμορφου G, με γονότυπο G/G, σε 169 (από 220) δείγματα υγιών μαρτύρων, σε 218 (από 242) δείγματα με NC και 166 (από 185) με ΕΚ. Αντίθετα, δεν εντοπίστηκαν καθόλου γονότυποι A/A σε κανένα από τα πληθυσμιακά δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν.

Τα ετερόζυγα δείγματα εμφανίζουν δύο ζώνες μεγέθους 70 bp και 88 bp για το G αλληλόμορφο και



Εικόνα 16 Απεικόνιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου για τον γονότυπο G/G, για τον πολυμορφισμό rs1476514, με τη χρήση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους 50 bp.

μία ζώνη μεγέθους 158 bp, για την άπεπτη αλληλουχία του αλληλόμορφου A, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην **Εικόνα 18** Στην παρούσα εργασία, έπειτα από την αξιολόγηση γονοτύπων, βρέθηκαν 51 δείγματα υγιών, 24 ασθενών με NC και 19 με ΕΚ με γονότυπο A/G.



Εικόνα 17: Απεικόνιση του ηλεκτροφορητικού προτύπου για τον γονότυπο G/A, για τον πολυμορφισμό rs1476514, με τη χρήση μάρτυρα γνωστ ού μοριακού βάρους 50 bp

Ο **Πίνακας 20** περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της γονοτύπησης, την αναλογία πιθανοτήτων (Odds Ratio, OR) αλλά και το διάστημα αξιοπιστίας κατά 95% (Confidence Interval, CI) για κάθε ομάδα ασθενών με νόσο του Crohn (NC) και ελκώδη κολίτιδα (ΕΚ) αλλά και των υγιών ατόμων, σχετικά με τον πολυμορφισμό rs1476514. Οι ετεροζυγώτες με γονότυπο A/G, συναντώνται με μεγαλύτερη συχνότητα στην ομάδα των υγιών σε σχέση με τις ομάδες ασθενών ($P=0.0001$ με NC και $P=0.006$ με ΕΚ). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν άτομα με γονότυπο A/A σε κανένα πληθυσμιακό δείγμα. Ωστόσο, το αλληλόμορφο A εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στον υγιή πληθυσμό σε σχέση με τις ομάδες των ασθενών με NC και ΕΚ ($P=0.003$ και $P=0.001$ αντίστοιχα). Το προγονικό αλληλόμορφο G, εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα, με μικρή διαφορά, στην ομάδα των ασθενών με NC .

Πίνακας 20 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1476514 με την πιθανότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ

	Υγιείς μάρτυρες (n=220)	NC (n=242)	P;OR (95%CI)	ΕΚ (n=185)	P;OR (95%CI)
G/G	169	218	1	166	1
A/G	51	24	0.0001;0,57 (0,4-0,79)	19	0.006; 0,55 (0.37-0,82)
A/A	0	0	-	0	-
Αλληλόμορφο A	51	24	0.0003;0,59 (0,42-0,83)	19	0.001;0,57 (0,38-0,85)
Αλληλόμορφο G	389	460	1	351	1

8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ΙΦΝΕ, που περιλαμβάνουν την ΕΚ και τη ΝC, είναι χρόνιες υποτροπιάζουσες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος ανοσολογικής και φλεγμονώδους αρχής. Παρόλο που οι ΙΦΝΕ τείνουν να μετατραπούν σε μείζον πρόβλημα της παγκόσμιας υγείας, καθώς η επίπτωση και ο επιπολασμός αυξάνονται σταδιακά στον αναπτυγμένο αλλά και στον αναπτυσσόμενο κόσμο, είναι περιορισμένα τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με την παθογένεση τους. Επί του παρόντος, μελέτες υποστηρίζουν το οι ΙΦΝΕ είναι το αποτέλεσμα της απρόσφορης και μη ελεγχόμενης ανοσολογικής απορύθμισης έναντι συμβιωτικών μικροοργανισμών και ενδοαυλικών αντιγόνων σε έναν γενετικά προδιαθετημένο ξενιστή. Παρόλες τις επιστημονικές εξελίξεις, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους γενετικούς, τους περιβαλλοντικούς και τους ανοσολογικούς παράγοντες είναι περίπλοκες και παραμένουν ασαφείς.

Στην προσπάθεια αποκρυπτογράφησης του γενετικού υπόβαθρου των ΙΦΝΕ αλλά και της συμμετοχής του επιγеноμάτος, έχει αυξηθεί δραστικά ο αριθμός των μελετών που συσχετίζουν τις ΙΦΝΕ με πολυμορφισμούς στα lncRNAs ^{243,249}.

Οι SNPs που αφορούν τα lncRNA γονίδια NONHSAG033653 και NONHSAG044354 έχουν βρεθεί να είναι απορρυθμισμένοι σε ασθενείς με ΙΦΝΕ ²¹⁸. Παρόλ' αυτά οι SNPs που σχετίζονται με αυτά τα δυο γονίδια απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Ο κύριος στόχος της μελέτης μας ήταν να εξεταστεί η συσχέτιση μεταξύ τριών πολυμορφισμών, οι οποίοι έχουν πρόσφατα αναδειχθεί από μελέτες GWAS ως ΙΦΝΕ σχετιζόμενοι SNPs σε lncRNAs, και τις ΙΦΝΕ στον ελληνικό πληθυσμό.

Ο πολυμορφισμός rs1476514 του lncRNA γονιδίου NONHSAG033653 (HORMAD2-AS1) αφορά εσώνιο του γονιδίου HORMAD2 και αποτελεί γνωστό πολυμορφισμό που διαταράσσει τη δομή του lncRNA ²¹⁸. Τα HORMADs γονίδια (HORMA Domain Containing, HORMAD) των θηλαστικών, HORMAD1 και HORMAD2, μοιράζονται την ίδια πρωτεϊνική περιοχή, HORMA-domain, η οποία είναι συντηρημένη σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των ζυμομυκήτων, των φυτών, των νηματωδών και των θηλαστικών και συμμετέχει στη διαδικασία της μείωσης καθώς και στα σημεία ελέγχου της μίτωσης, στις χρωμοσωμικές συνάψεις και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ²⁵⁰.

Το γονίδιο HORMAD2, πλησίον του οποίου εδράζεται το NONHSAG033653, βρέθηκε ότι περιλαμβάνει πολυμορφισμούς που σχετίζονται με νοσήματα ανοσολογικής αρχής όπως ο rs2412973 που συσχετίζεται με την IgA νεφροπάθεια. Ο πιθανός ρόλος αυτού του γενετικού τύπου στις ΙΦΝΕ δεν έχει διευκρινιστεί παρόλο που γνωρίζουμε ότι οι ΙΦΝΕ σχετίζονται με τις δευτεροπαθείς μορφές της IgA νεφροπάθεια ²⁵¹.

Οι Mirza et al. εντόπισαν τον υπό μελέτη πολυμορφισμό, rs1476514, ο οποίος συσχετίστηκε τόσο με τις ΙΦΝΕ όσο και με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι. Ωστόσο, δεν τεκμηριώθηκε ισχυρή συσχέτιση, σε επίπεδο έκφρασης, ανάμεσα στο lncRNA NONHSAG033653 και το γονίδιο HORMAD2 ²¹⁸.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή το αλληλόμορφο Α του rs1476514 βρέθηκε ότι σχετίζεται σημαντικά με τον υγιή πληθυσμό, σε σχέση με την ΕΚ και τη ΝC. Παρόλο που παρατηρήθηκε μειωμένη εμφάνιση του rs1476514 Α αλληλόμορφου στον πληθυσμό με ΙΦΝΕ, δεν είναι σαφής ο προστατευτικός του ρόλος στην εκδήλωση των ΙΦΝΕ και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Σχετικά με το G αλληλόμορφο, δεν εντοπίσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην πιθανότητα εμφάνισης στον υγιή πληθυσμό και στους ασθενείς με ΙΦΝΕ.

Ο πολυμορφισμός rs3757247 του lncRNA NONHSAG044354, όπως αναφέρθηκε, έχει συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ. Εντοπίζεται πλησίον του γονιδίου BACH2 (6q15) το οποίο επίσης έχει συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ αλλά και με άλλες ανοσολογικές διαταραχές όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι (ΣΔΙ) και η κοιλιοκάκη ²⁵². Εντός του ίδιου lncRNA γονιδίου εδράζεται και ο έτερος υπό μελέτη πολυμορφισμός, ο rs597325.

Το γονίδιο BACH2 είναι γνωστό ότι ρυθμίζει ποικίλες πλευρές της λειτουργίας των Β και Τ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ελλείμματα στο γονίδιο BACH2 οδηγούν στην απώλεια των naïve Τ-κυττάρων και επάγουν τη λειτουργία των Th2 σχετικών γονιδίων. Επιπλέον στα BACH2^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια τα Τ και Β κύτταρα τείνουν να διαφοροποιούνται ταχύτερα προς Th2 και πλασματοκύτταρα αντίστοιχα, εξαφανίζοντας ταυτόχρονα τα naïve κύτταρα. Το γονίδιο BACH 2 ελέγχει, επίσης, την ισορροπία μεταξύ της ανοσοανοχής και της ανοσοδιέγερσης. Ειδικά η λειτουργία των Treg επηρεάζεται σημαντικά από το BACH2 και επομένως η δυσλειτουργία του έχει συνδεθεί με πολλές παθήσεις που σχετίζονται με ανοσιακές διαταραχές ²⁵³.

Επιπροσθέτως, επιγενετικές αλλαγές σε αυτό το γονίδιο ίσως έχουν προφλεγμονώδη δράση καθώς έχει βρεθεί ότι διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης του BACH2 συνδέεται ειδικά με τη ΝC αλλά όχι με την ΕΚ

²⁵⁴.

Οι Mirza et al. διαπίστωσαν ότι, ο SNP rs3757247, που διαταράσσει τη δευτεροταγή δομή του NONHSAG044354 lncRNA, σχετίζεται τόσο με τις ΙΦΝΕ όσο και με το ΣΔΙ. Συνεπώς, οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η αλλαγή της δομής του lncRNA μπορεί να παρέμβει στη μοριακή λειτουργία του και να οδηγήσει στην εκδήλωση της νόσου. Επιπλέον διαπίστωσαν ότι το NONHSAG044354 lncRNA εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου BACH2 σε 14 ανθρώπινους ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή ρύθμιση της έκφρασης των mRNAs, από γειτονικά lncRNA αντίθετης ή κανονικής φοράς ²¹⁸.

Όταν μελετήθηκε ειδικά ο πολυμορφισμός rs3757247 από τους Wegner *et al.*, εντοπίστηκε ότι το αλληλόμορφο A τείνει να είναι πιο συχνό σε ασθενείς με ΣΔΙ, αλλά δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα αλληλόμορφα του rs3757247 και στην εκδήλωση ΣΔΙ ή των επιπλοκών του. Εξαίρεση αποτέλεσε η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, με την οποία το αλληλόμορφο A συσχετίστηκαν σημαντικά ($P < 0.044$). Σύμφωνα με τους συγγραφείς το εύρημα πιθανώς σχετίζεται με την ικανότητα του γονιδίου BACH2 να επάγει την απόπτωση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια ο υπό μελέτη πολυμορφισμός είναι πιθανό να εμπλέκεται στην απόπτωση των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς ²⁵⁵.

Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι το T αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs3757247 ήταν σημαντικά πιο συχνό σε Ιάπωνες ασθενείς με ΣΔΙ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες ²⁵⁶. Έτερη δημοσιευμένη μελέτη ανέδειξε ότι ο rs3757247 σχετίζεται με τη νόσο Addison, γνωστή ως πρωτοπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια, σε πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου. Ο γονότυπος TT εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στον πληθυσμό των ασθενών με ν. Addison ενώ είναι μειωμένη η συχνότητα του γονότυπου CC στους ασθενείς ²⁵⁷.

Υποστηρίζοντας τα ως άνω ευρήματα, στην παρούσα μελέτη το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs3757247 εντοπίστηκε οριακά πιο συχνά στους ασθενείς με NC σε σχέση με του υγιείς. Διαπιστώσαμε όμως ότι η A/G ετεροζυγωτία υπερτερεί σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στο υπό μελέτη δείγμα των ασθενών με NC συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό ελέγχου (δεν εντοπίστηκε η ίδια διαφορά στους ασθενείς με ΕΚ). Η διαφορά στα αποτελέσματα των δημοσιευμένων μελετών με τη παρούσα διατριβή πιθανώς αντικατοπτρίζει τις διαφορές τους σχετικά με το μέγεθος του δείγματος και τους κλινικούς φαινοτύπους των πληθυσμών.

Δυστυχώς, υπάρχουν περιορισμένα επιστημονικά δεδομένα σχετικά με τον έτερο πολυμορφισμό του lncRNA γονιδίου NONHSAG044354, τον rs597325, στις ΙΦΝΕ. Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε ότι όλα τα δείγματα είχαν ετεροζυγωτία (A/G ετεροζυγωτία) και επομένως δεν αναδείχθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τις ΙΦΝΕ, παρόλο που οι Mirza *et al.* αναφέρουν ότι ο rs597325 επιδρά στη δευτεροταγή δομή του σχετιζόμενου με τις ΙΦΝΕ lncRNA NONHSAG044354 ²¹⁸.

Η σύγχρονη έρευνα σχετικά με τους γενετικούς μηχανισμούς περίπλοκων νοσημάτων έχει στραφεί προς τις μη-κωδικές περιοχές του γονιδιώματος. Τα lncRNAs είναι εμφανές ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση και θα μπορούσαν να αποτελέσουν τον έως τώρα αόρατο συνδετικό κρίκο ανάμεσα στη γενετική και την επιγενετική και να ερμηνεύσουν την αιτιοπαθογένεια των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Έως σήμερα, τα lncRNAs έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε διάφορα είδη καρκίνων. Είναι όμως σε εξέλιξη η έρευνα για τη συνδρομή τους στις αυτοάνοσες παθήσεις όπως οι ΙΦΝΕ.

Εκατοντάδες lncRNAs μόρια έχουν βρεθεί να είναι απορρυθμισμένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ και μερικά από αυτά έχουν συσχετιστεί με γειτονικά γονίδια προτείνοντας μοριακούς μηχανισμούς νόσησης που μένει

να επιβεβαιωθούν. Εφόσον, όπως προαναφέρθηκε, τα lncRNAs εντοπίζονται σε εξωκυττάρια υγρά, όπως το πλάσμα, και έχει διαπιστωθεί ότι είναι ειδικά όσο αφορά τους ιστούς, τα κύτταρα αλλά και το στάδιο του κύκλου ζωής, διαφαίνεται πιθανό να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. Προς το παρόν όμως, τα μόρια lncRNA που απομονώθηκαν σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (σε δείγμα ιστών ή αίματος) δεν έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικά για τις ΙΦΝΕ. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι έχει διαπιστωθεί σημαντική αλληλοεπικάλυψη στα αποτελέσματα των μελετών μεταξύ της αυτοανοσίας και του καρκίνου. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να αποσαφηνιστούν οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται τα lncRNAs και να αποδοθούν συγκεκριμένα μόρια σε συγκεκριμένες παθήσεις. Κατ' αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, παρέχοντας μη επεμβατικά διαγνωστικά εργαλεία και στοχεύοντας στην προσωποποιημένη θεραπεία.

Υπάρχει μεγάλη ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σε αυτό το καινοτόμο και ομολογουμένως τεράστιο γνωστικό πεδίο. Οι ερευνητές πιθανώς να υπερβούν τις δυσκολίες χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων, τις νέες τεχνικές ανάλυσης μεταγραφώματος καθώς και τις μεθόδους τεχνητής νοημοσύνης.

Συμπερασματικά, τεκμηριώσαμε ότι το αλληλόμορφο A του rs1476514 υπερτερεί στον υγιή πληθυσμό σε σχέση με τους ασθενείς με ΙΦΝΕ και ότι το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs3757247 εντοπίζεται οριακά πιο συχνά στους ασθενείς με NC σε σχέση με του υγιείς. Δεν επετεύχθη εξαγωγή συμπερασμάτων για τον rs597325 καθώς σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα διαπιστώθηκε ετεροζυγωτία. Με σκοπό να επιβεβαιωθούν τα ως άνω αποτελέσματα αυτής της διδακτορικής διατριβής, είναι απαραίτητο να διενεργηθούν μελέτες ευρύτερης κλίμακας και σε διαφορετικές εθνότητες.

Βιβλιογραφία

1. Magro, F. *et al.* Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J. Crohn's Colitis* **11**, 649–670 (2017).
2. Molodecky, N. A. *et al.* Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* **142**, 46–54.e42 (2012).
3. Van Limbergen, J., Radford-Smith, G. & Satsangi, J. Advances in IBD genetics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 372–385 (2014).
4. Kirsner, J. B. Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **10**, 286–297 (1988).
5. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 720–727 (2015).
6. Ananthakrishnan, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 205–217 (2015).
7. Nerich, V. *et al.* Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: A study based on national health insurance data. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 218–226 (2006).
8. Khalili, H. *et al.* Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut* **61**, 1686–1692 (2012).
9. Burisch, J., Jess, T., Martinato, M. & Lakatos, P. L. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohn's Colitis* **7**, 322–337 (2013).
10. Thia, K. T., Loftus, E. V., Sandborn, W. J. & Yang, S. K. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *American Journal of Gastroenterology* **103**, 3167–3182 (2008) doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x.
11. Ng, S. C. *et al.* Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-Pacific Crohn's and colitis epidemiology study. *Gastroenterology* **145**, 158–165 (2013).
12. Al-Mofarreh, M. & Al-Mofleh, I. Emerging inflammatory bowel disease in saudi outpatients: A report of 693 cases. *Saudi J. Gastroenterol.* **19**, 16–22 (2013).
13. Kotze, P. G. *et al.* Progression of Inflammatory Bowel Diseases Throughout Latin America and the Caribbean: A Systematic Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 304–312 (2020).
14. Kaplan, G. G. & Windsor, J. W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2020) doi:10.1038/s41575-020-00360-x.
15. Li, X., Sundquist, J., Hemminki, K. & Sundquist, K. Risk of inflammatory bowel disease in first- and second-generation immigrants in Sweden. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1784–1791 (2011).
16. Vegh Z, Kurti Z, L. P. The epidemiology of inflammatory bowel diseases from West to East. *J Dig Dis.*

Feb;18(2):, (2017).

17. Alatab, S. *et al.* The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* (2020) doi:10.1016/S2468-1253(19)30333-4.
18. Skamnelos, A. *et al.* P751 Trends in incidence of inflammatory bowel disease in northwest Greece. *J. Crohn's Colitis* **11**, S466–S466 (2017).
19. Tsianos, E. V. *et al.* The epidemiological profile of inflammatory bowel disease in different parts of North-West Greece. *Ann. Gastroenterol.* **18**, 434–440 (2005).
20. Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2066–2078 (2009).
21. Kobayashi, T. *et al.* IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**, 1682–1689 (2008).
22. Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* (2003) doi:10.1136/gut.52.1.65.
23. Barrett, J. C. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 955–962 (2008).
24. Elson, C. O. *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews* (2005) doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00291.x.
25. Olson, T. S. *et al.* Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease. *J. Clin. Invest.* (2004) doi:10.1172/JCI200420855.
26. Izcue, A. *et al.* Interleukin-23 Restrains Regulatory T Cell Activity to Drive T Cell-Dependent Colitis. *Immunity* (2008) doi:10.1016/j.immuni.2008.02.019.
27. Park, J. H., Peyrin-Biroulet, L., Eisenhut, M. & Shin, J. II. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun. Rev.* **16**, 416–426 (2017).
28. Piccinini, A. M. & Midwood, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**, 1–21 (2010).
29. Foell, D., Wittkowski, H. & Roth, J. Monitoring disease activity by stool analyses: From occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* (2009) doi:10.1136/gut.2008.170019.
30. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature09944.
31. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 39–49 (2018).
32. Altajar, S. & Moss, A. Inflammatory Bowel Disease Environmental Risk Factors: Diet and Gut Microbiota. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **22**, 57 (2020).

33. Turpin, W. *et al.* Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat. Genet.* (2016) doi:10.1038/ng.3693.
34. Gevers, D. *et al.* The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* (2014) doi:10.1016/j.chom.2014.02.005.
35. Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology* (2014) doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009.
36. Castiglione, F. *et al.* Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the 'hygiene hypothesis': A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J. Crohn's Colitis* (2012) doi:10.1016/j.crohns.2011.09.003.
37. Ng, S. C. *et al.* Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: A population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* (2015) doi:10.1136/gutjnl-2014-307410.
38. Chong, C. Y. L., Bloomfield, F. H. & O'Sullivan, J. M. Factors affecting gastrointestinal microbiome development in neonates. *Nutrients* **10**, 1–17 (2018).
39. VanVandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, Wabitsch M. denplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, W. M. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* **Oct;78:110**, (2020).
40. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* (2004) doi:10.1053/j.gastro.2004.04.061.
41. Martín, R. *et al.* The commensal bacterium *faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.* (2014) doi:10.1097/01.MIB.0000440815.76627.64.
42. Wu, G. D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* (80-.). (2011) doi:10.1126/science.1208344.
43. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* (2014) doi:10.1038/nature12820.
44. Wild, C. P. Complementing the genome with an 'exposome': The outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* (2005) doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0456.
45. van der Sloot, K. W. J., Weersma, R. K., Alizadeh, B. Z. & Dijkstra, G. Identification of Environmental Risk Factors Associated With the Development of Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohn's Colitis* (2020) doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa114.
46. Harries, A. D., Baird, A. & Rhodes, J. Non-Smoking: A Feature of Ulcerative Colitis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* (1982) doi:10.1136/bmj.284.6317.706.
47. Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A. & Galandiuk, S. Smoking and inflammatory

- bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* (2006) doi:10.4065/81.11.1462.
48. Higuchi, L. M. *et al.* A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am. J. Gastroenterol.* (2012) doi:10.1038/ajg.2012.196.
 49. Mahid, S. S., Minor, K. S., Stromberg, A. J. & Galandiuk, S. Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* (2007) doi:10.1002/ibd.20070.
 50. Alqasrawi, D., Abdelli, L. S. & Naser, S. A. Mystery solved: Why smoke extract worsens disease in smokers with crohn's disease and not ulcerative colitis? gut map! *Microorganisms* (2020) doi:10.3390/microorganisms8050666.
 51. McGilligan, V. E., Wallace, J. M. W., Heavey, P. M., Ridley, D. L. & Rowland, I. R. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* (2007) doi:10.1002/ibd.20020.
 52. Bergeron, V. *et al.* Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with crohn's disease and ulcerative colitis: Relevance to its adverse role in the disease. *Inflamm. Bowel Dis.* (2012) doi:10.1002/ibd.21889.
 53. Ananthakrishnan, A. N., Nguyen, D. D., Sauk, J., Yajnik, V. & Xavier, R. J. Genetic polymorphisms in metabolizing enzymes modifying the association between smoking and inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* (2014) doi:10.1097/MIB.0000000000000014.
 54. Biedermann, L. *et al.* Smoking cessation alters intestinal microbiota: Insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm. Bowel Dis.* (2014) doi:10.1097/MIB.0000000000000129.
 55. Alqasrawi, D., Qasem, A. & Naser, S. A. Divergent effect of cigarette smoke on innate immunity in inflammatory bowel disease: A nicotine-infection interaction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–12 (2020).
 56. Salgado, V. C. L. *et al.* Risk factors associated with inflammatory bowel disease: A multicenter case-control study in Brazil. *World J. Gastroenterol.* **26**, 3611–3624 (2020).
 57. Barclay, A. R. *et al.* Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr.* (2009) doi:10.1016/j.jpeds.2009.03.017.
 58. Bager, P., Simonsen, J., Nielsen, N. M. & Frisch, M. Cesarean section and offspring's risk of inflammatory bowel disease: A national cohort study. *Inflamm. Bowel Dis.* (2012) doi:10.1002/ibd.21805.
 59. Selby, W. *et al.* Two-Year Combination Antibiotic Therapy With Clarithromycin, Rifabutin, and Clofazimine for Crohn's Disease. *Gastroenterology* (2007) doi:10.1053/j.gastro.2007.03.031.
 60. Jess, T. *et al.* Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut* (2011) doi:10.1136/gut.2010.223396.

61. Cadwell, K. *et al.* Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell* (2010) doi:10.1016/j.cell.2010.05.009.
62. Issa, M., Ananthakrishnan, A. N. & Binion, D. G. Clostridium difficile and inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* (2008) doi:10.1002/ibd.20500.
63. Shaw, S. Y., Blanchard, J. F. & Bernstein, C. N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* (2010) doi:10.1038/ajg.2010.398.
64. Örtqvist, A. K., Lundholm, C., Halfvarson, J., Ludvigsson, J. F. & Almqvist, C. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gut* (2019) doi:10.1136/gutjnl-2017-314352.
65. Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R. & Coffin, S. E. Antibiotic exposure and IBD development among children: A population-based cohort study. *Pediatrics* (2012) doi:10.1542/peds.2011-3886.
66. Ananthakrishnan, A. N. *et al.* A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* (2013) doi:10.1053/j.gastro.2013.07.050.
67. Devkota, S. *et al.* Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature* (2012) doi:10.1038/nature11225.
68. Costea, I. *et al.* Interactions between the dietary polyunsaturated fatty acid ratio and genetic factors determine susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Gastroenterology* (2014) doi:10.1053/j.gastro.2013.12.034.
69. Myint, A., Sauk, J. S. & Limketkai, B. N. The role of vitamin D in inflammatory bowel disease: a guide for clinical practice. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 539–552 (2020).
70. Mahalhal, A. *et al.* Oral iron exacerbates colitis and influences the intestinal microbiome. *PLoS One* **13**, 1–18 (2018).
71. Bernstein, C. N. *et al.* A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am. J. Gastroenterol.* (2010) doi:10.1038/ajg.2010.140.
72. Bonaz, B. L. & Bernstein, C. N. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (2013) doi:10.1053/j.gastro.2012.10.003.
73. Kish, L. *et al.* Environmental Particulate Matter Induces Murine Intestinal Inflammatory Responses and Alters the Gut Microbiome. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0062220.
74. Ananthakrishnan, A. N., McGinley, E. L., Binion, D. G. & Saeian, K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: An ecologic analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* (2011) doi:10.1002/ibd.21455.
75. Hartmann, G. *et al.* High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein. *Cytokine* (2000) doi:10.1006/cyto.1999.0533.

76. Vavricka, S. R. *et al.* High altitude journeys and flights are associated with an increased risk of flares in inflammatory bowel disease patients. *J. Crohn's Colitis* (2014) doi:10.1016/j.crohns.2013.07.011.
77. Andersson, R. E., Olaison, G., Tysk, C. & Ekblom, A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* (2001) doi:10.1056/NEJM200103153441104.
78. Andersson, R. E., Olaison, G., Tysk, C. & Ekblom, A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* (2003) doi:10.1053/gast.2003.50021.
79. Radford-Smith, G. L. What is the importance of appendectomy in the natural history of IBD? *Inflamm. Bowel Dis.* (2008) doi:10.1097/00054725-200810001-00038.
80. Bernstein, C. N. *et al.* Cesarean Section Delivery Is Not a Risk Factor for Development of Inflammatory Bowel Disease: A Population-based Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2016) doi:10.1016/j.cgh.2015.08.005.
81. Xu, L. *et al.* Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2017) doi:10.1111/apt.14291.
82. Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G. & Floderus-Myrhed, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* (1988) doi:10.1136/gut.29.7.990.
83. Halme, L. *et al.* Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* (2006) doi:10.3748/wjg.v12.i23.3668.
84. Glocker, E. O. *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* (2009) doi:10.1056/NEJMoa0907206.
85. Mirkov, M. U., Verstockt, B. & Cleynen, I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* 2:224–34 (2017) doi:10.1016/S2468-1253(16)30111-X.
86. Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* (2012) doi:10.1038/nature11582.
87. Silverberg, M. S. *et al.* Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat. Genet.* (2009) doi:10.1038/ng.275.
88. Fernando, M. M. A. *et al.* Defining the role of the MHC in autoimmunity: A review and pooled analysis. *PLoS Genetics* (2008) doi:10.1371/journal.pgen.1000024.
89. Furey, T. S., Sethupathy, P. & Sheikh, S. Z. Redefining the IBDs using genome-scale molecular phenotyping. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 296–311 (2019).
90. Abraham, C. & Cho, J. H. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflammatory Bowel Diseases* (2006) doi:10.1097/01.MIB.0000225332.83861.5f.
91. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* (2001) doi:10.1038/35079107.
92. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.

Nature (2001) doi:10.1038/35079114.

93. Economou, M., Trikalinos, T. A., Loizou, K. T., Tsianos, E. V. & Ioannidis, J. P. A. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: A metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* (2004) doi:10.1111/j.1572-0241.2004.40304.x.
94. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* (2007) doi:10.1038/ng1954.
95. Rioux, J. D. *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* (2007) doi:10.1038/ng2032.
96. McCarroll, S. A. *et al.* Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genet.* (2008) doi:10.1038/ng.215.
97. Zhang, Y. Z. & Li, Y. Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 91–99 (2014).
98. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* (2008) doi:10.1038/nature07383.
99. Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* (80-.). (2006) doi:10.1126/science.1135245.
100. Tremelling, M. *et al.* IL23R Variation Determines Susceptibility But Not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* (2007) doi:10.1053/j.gastro.2007.02.051.
101. Ahmad, T. Genetics of inflammatory bowel disease: The role of the HLA complex. *World J. Gastroenterol.* **12**, 3628 (2006).
102. Goyette, P. *et al.* High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat. Genet.* **47**, 172–179 (2015).
103. Kadiyska, T., Tourtourikov, I., Popmihaylova, A.-M., Kadian, H. & Chavoushian, A. Role of TNFSF15 in the intestinal inflammatory response . *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **9**, 73–78 (2018).
104. Ślebioda, T. J. & Kmiec, Z. Tumour Necrosis Factor Superfamily Members in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–15 (2014).
105. Yamazaki, K. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum. Mol. Genet.* (2005) doi:10.1093/hmg/ddi379.
106. Yang, D. H. *et al.* TNFSF15 is an independent predictor for the development of Crohn's disease-related complications in Koreans. *J. Crohn's Colitis* (2014) doi:10.1016/j.crohns.2014.04.002.
107. Chu, T. *et al.* Chromatin run-on and sequencing maps the transcriptional regulatory landscape of glioblastoma multiforme. *Nat. Genet.* (2018) doi:10.1038/s41588-018-0244-3.
108. Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. MicroRNA profiling: Approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics* (2012) doi:10.1038/nrg3198.

109. Weiser, M. *et al.* Molecular classification of Crohn's disease reveals two clinically relevant subtypes. *Gut* (2018) doi:10.1136/gutjnl-2016-312518.
110. Keith, B. P. *et al.* Colonic epithelial miR-31 associates with the development of Crohn's phenotypes. *JCI insight* (2018) doi:10.1172/jci.insight.122788.
111. Zhang, Z. & Zhang, R. Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. *Autoimmunity Reviews* (2015) doi:10.1016/j.autrev.2015.05.008.
112. Qazi, T. J., Quan, Z., Mir, A. & Qing, H. Epigenetics in Alzheimer's Disease: Perspective of DNA Methylation. *Molecular Neurobiology* (2018) doi:10.1007/s12035-016-0357-6.
113. Miranda-Morales, E. *et al.* Implications of DNA methylation in Parkinson's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* (2017) doi:10.3389/fnmol.2017.00225.
114. Koch, A. *et al.* Analysis of DNA methylation in cancer: Location revisited. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018) doi:10.1038/s41571-018-0004-4.
115. Widschwendter, M. *et al.* Epigenome-based cancer risk prediction: Rationale, opportunities and challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2018) doi:10.1038/nrclinonc.2018.30.
116. Lin, Z. *et al.* Identification of disease-associated DNA methylation in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Genet.* **80**, 59–67 (2011).
117. Sadler, T. *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clin. Epigenetics* (2016) doi:10.1186/s13148-016-0193-6.
118. Petrey, A. C. & de la Motte, C. A. The extracellular matrix in IBD. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **33**, 234–238 (2017).
119. Gaffney, D. J. *et al.* Dissecting the regulatory architecture of gene expression QTLs. *Genome Biol.* **13**, R7 (2012).
120. Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F. & Peyrin-Biroulet, L. Crohn's disease. *Lancet* **389**, 1741–1755 (2017).
121. Maaser, C. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J. Crohn's Colitis* **13**, 144–164K (2019).
122. Eglinton, T. W., Barclay, M. L., Gearry, R. B. & Frizelle, F. A. The Spectrum of Perianal Crohn's Disease in a Population-Based Cohort. *Dis. Colon Rectum* **55**, 773–777 (2012).
123. Mosli, M. H. *et al.* C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **110**, 802–819 (2015).
124. Vermeire, S. *et al.* Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies (ASCA), Phenotypes of IBD, and Intestinal Permeability: A Study in IBD Families. *Inflamm. Bowel Dis.* **7**, 8–15 (2001).
125. Menees, S. B., Powell, C., Kurlander, J., Goel, A. & Chey, W. D. A meta-analysis of the utility of C-

- reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am. J. Gastroenterol.* (2015) doi:10.1038/ajg.2015.6.
126. Kopylov, U. *et al.* Diagnostic yield of capsule endoscopy versus magnetic resonance enterography and small bowel contrast ultrasound in the evaluation of small bowel Crohn's disease: Systematic review and meta-analysis. *Digestive and Liver Disease* (2017) doi:10.1016/j.dld.2017.04.013.
 127. Van Weyenberg, S. J. B. *et al.* Comparison of MR enteroclysis with video capsule endoscopy in the investigation of small-intestinal disease. *Abdom. Imaging* (2013) doi:10.1007/s00261-012-9892-4.
 128. Nemeth, A. *et al.* Use of patency capsule in patients with established Crohn's disease. *Endoscopy* (2016) doi:10.1055/s-0034-1393560.
 129. Magro, F. *et al.* European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* (2013) doi:10.1016/j.crohns.2013.06.001.
 130. Qiu, Y. *et al.* Systematic review with meta-analysis: Magnetic resonance enterography vs. computed tomography enterography for evaluating disease activity in small bowel Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2014) doi:10.1111/apt.12815.
 131. Fiorino, G. *et al.* Prospective comparison of computed tomography enterography and magnetic resonance enterography for assessment of disease activity and complications in ileocolonic Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* (2011) doi:10.1002/ibd.21533.
 132. Castiglione, F. *et al.* Noninvasive diagnosis of small bowel crohn's disease: Direct comparison of bowel sonography and magnetic resonance enterography. *Inflamm. Bowel Dis.* (2013) doi:10.1097/MIB.0b013e3182802b87.
 133. Gomollón, F. *et al.* 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J. Crohn's Colitis* **11**, 3–25 (2017).
 134. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. *Am. J. Gastroenterol.* **110**, 1324–1338 (2015).
 135. Pariente, B. *et al.* Development of the Lémann Index to Assess Digestive Tract Damage in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* **148**, 52-63.e3 (2015).
 136. Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Colombel, J. F. & Sandborn, W. J. The natural history of adult crohn's disease in population-based cohorts. *American Journal of Gastroenterology* (2010) doi:10.1038/ajg.2009.579.
 137. Cosnes, J. *et al.* Factors affecting outcomes in Crohn's disease over 15 years. *Gut* (2012) doi:10.1136/gutjnl-2011-301971.
 138. Limketkai, B. N., Parian, A. M., Shah, N. D. & Colombel, J. F. Short bowel syndrome and intestinal failure in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* (2016) doi:10.1097/MIB.0000000000000698.
 139. Buisson, A., Chevaux, J. B., Allen, P. B., Bommelaer, G. & Peyrin-Biroulet, L. Review article: The

natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2012) doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05002.x.

140. Silverberg, M. S. *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* (2005) doi:10.1155/2005/269076.
141. Gionchetti, P. *et al.* 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 2: Surgical management and special situations. *J. Crohn's Colitis* (2017) doi:10.1093/ecco-jcc/jjw169.
142. Torres, J. *et al.* ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J. Crohns. Colitis* **14**, 4–22 (2020).
143. Ford, A. C., Khan, K. J., Talley, N. J. & Moayyedi, P. 5-Aminosalicylates Prevent Relapse of Crohn's Disease After Surgically Induced Remission: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **106**, 413–420 (2011).
144. van der Woude, C. J. *et al.* The second European evidenced-based consensus on reproduction and pregnancy in inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* (2015) doi:10.1093/ecco-jcc/jju006.
145. Hazlewood, G. S. *et al.* Comparative effectiveness of immunosuppressants and biologics for inducing and maintaining remission in Crohn's disease: A network meta-analysis. *Gastroenterology* (2015) doi:10.1053/j.gastro.2014.10.011.
146. Present, D. H. *et al.* Infliximab for the Treatment of Fistulas in Patients with Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* (1999) doi:10.1056/nejm199905063401804.
147. Gecse, K. B. *et al.* A global consensus on the classification, diagnosis and multidisciplinary treatment of perianal fistulising Crohn's disease. *Gut* (2014) doi:10.1136/gutjnl-2013-306709.
148. Khanna, R. *et al.* Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): A cluster randomised controlled trial. *Lancet* (2015) doi:10.1016/S0140-6736(15)00068-9.
149. Colombel, J. F. *et al.* Adalimumab induces deep remission in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2014) doi:10.1016/j.cgh.2013.06.019.
150. Colombel, J. F. *et al.* Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1383–1395 (2010).
151. Kirchgesner, J. *et al.* Risk of Serious and Opportunistic Infections Associated With Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **155**, 337–346.e10 (2018).
152. Annese, V. *et al.* European Evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. *J. Crohn's Colitis* **9**, 945–965 (2015).
153. Matsumoto, T. *et al.* Adalimumab monotherapy and a combination with azathioprine for Crohn's disease: A prospective, randomized trial. *J. Crohn's Colitis* (2016) doi:10.1093/ecco-jcc/jjw152.
154. Papamichael, K. *et al.* Review article: Pharmacological aspects of anti-TNF biosimilars in

inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2015)
doi:10.1111/apt.13402.

155. European Medicine Agency Entyvio - Summary of Product Characteristics. 2014. Last Update on Apr 2019, Accessed on Sep 16, 2019, Available on https://www.ema.europa.eu/en/documents/productinformation/entyvio-epar-product-information_en.pdf.
156. Sands, B. E. *et al.* Effects of Vedolizumab Induction Therapy for Patients With Crohn's Disease in Whom Tumor Necrosis Factor Antagonist Treatment Failed. *Gastroenterology* **147**, 618-627.e3 (2014).
157. European Medicine Agency Stelara - Ustekinumab. 2009. Last Update on Sep 2019, Accessed on Sep 16, 2019, Available on https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/stelara-epar-productinformation_en.pdf.
158. Sandborn, W. *et al.* O-001 A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase3 Study of Ustekinumab, a Human IL-12/23P40 mAB, in Moderate-to-Severe Crohn's Disease Refractory to Anti-TFN α . *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, S1 (2016).
159. Cosnes, J. *et al.* Early Administration of Azathioprine vs Conventional Management of Crohn's Disease: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **145**, 758-765.e2 (2013).
160. Adamina, M. *et al.* ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Surgical Treatment. *J. Crohn's Colitis* **14**, 155–168 (2020).
161. Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Ulcerative colitis. *Lancet* **380**, 1606–1619 (2012).
162. Harbord, M. *et al.* The first european evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* (2016) doi:10.1093/ecco-jcc/jjv213.
163. Fine, K. D. & Schiller, L. R. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. *Gastroenterology* (1999) doi:10.1016/S0016-5085(99)70513-5.
164. D'Haens, G. *et al.* Patchy cecal inflammation associated with distal ulcerative colitis: a prospective endoscopic study. *Am. J. Gastroenterol.* **92**, 1275–9 (1997).
165. Rahier, J. F. *et al.* Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* **8**, 443–468 (2014).
166. Loftus, E. V. *et al.* PSC-IBD: A unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* (2005) doi:10.1136/gut.2004.046615.
167. Travis, S. P. L. *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: The Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* (2012) doi:10.1136/gutjnl-2011-300486.

168. Truelove, S. C. Cortisone in Ulcerative Colitis Final Report on a Therapeutic Trial. *Br. Med. J.* (1955) doi:10.1136/bmj.2.4947.1041.
169. Hoie, O. *et al.* Low Colectomy Rates in Ulcerative Colitis in an Unselected European Cohort Followed for 10 Years. *Gastroenterology* (2007) doi:10.1053/j.gastro.2006.11.015.
170. Solberg, I. C. *et al.* Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand. J. Gastroenterol.* **44**, 431–440 (2009).
171. Harbord, M. *et al.* Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management. *J. Crohn's Colitis* (2017) doi:10.1093/ecco-jcc/jjx009.
172. Sandborn, W. J. *et al.* Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* (2017) doi:10.1056/nejmoa1606910.
173. European Medicines Agency Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC) assessment report, 2020. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/xeljanz-h-20-1485-c-4214-0017-assessment-report-article-20_en.pdf.
174. ClinicalTrials.gov Safety study of tofacitinib versus tumor necrosis factor (TNF) inhibitor in subjects with rheumatoid arthritis, 2017. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02092467>.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02092467>.
175. O'Toole, A., Nwanne, O. & Tomlinson, T. Inflammatory Bowel Disease Increases Risk of Adverse Pregnancy Outcomes: A Meta-Analysis. *Dig. Dis. Sci.* (2015) doi:10.1007/s10620-015-3677-x.
176. Mahadevan, U. *et al.* 865 PIANO: A 1000 Patient Prospective Registry of Pregnancy Outcomes in Women With IBD Exposed to Immunomodulators and Biologic Therapy. *Gastroenterology* (2012) doi:10.1016/s0016-5085(12)60561-7.
177. Mahadevan, U. *et al.* Placental Transfer of Anti-Tumor Necrosis Factor Agents in Pregnant Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2013) doi:10.1016/j.cgh.2012.11.011.
178. Eaden, J. A. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**, 526–535 (2001).
179. Jess, T., Rungoe, C. & Peyrin-Biroulet, L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2012) doi:10.1016/j.cgh.2012.01.010.
180. Laine, L. *et al.* SCENIC International Consensus Statement on Surveillance and Management of Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **148**, 639–651.e28 (2015).
181. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/content/org_summary/.
182. Edwards, S. L., Beesley, J., French, J. D. & Dunning, A. M. Beyond GWASs: Illuminating the Dark Road from Association to Function. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 779–797 (2013).
183. Gong, J., Liu, W., Zhang, J., Miao, X. & Guo, A.-Y. IncRNASNP: a database of SNPs in lncRNAs and

- their potential functions in human and mouse. *Nucleic Acids Res.* **43**, D181–D186 (2015).
184. Ohno, S. So much ‘junk’ DNA in our genome. *Brookhaven Symp. Biol.* **23**, 366–70 (1972).
 185. Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101–108 (2012).
 186. Yi, J. M. & Kim, T. O. Epigenetic Alterations in Inflammatory Bowel Disease and Cancer. *Intest. Res.* (2015) doi:10.5217/ir.2015.13.2.112.
 187. Kalla, R. *et al.* MicroRNAs: new players in IBD. *Gut* **64**, 504–513 (2015).
 188. Lin, J. *et al.* Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Mod. Pathol.* (2014) doi:10.1038/modpathol.2013.152.
 189. Paraskevi, A. *et al.* Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J. Crohn’s Colitis* **6**, 900–904 (2012).
 190. Wu, F. *et al.* Peripheral blood MicroRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* (2011) doi:10.1002/ibd.21450.
 191. Feng, X. *et al.* Up-Regulation of microRNA-126 May Contribute to Pathogenesis of Ulcerative Colitis via Regulating NF-kappaB Inhibitor Ikb α . *PLoS One* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0052782.
 192. Ye, D., Guo, S., Alsadi, R. & Ma, T. Y. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology* (2011) doi:10.1053/j.gastro.2011.07.005.
 193. Nguyen, H. T. T. *et al.* Crohn’s disease-associated adherent invasive escherichia coli modulate levels of microRNAs in intestinal epithelial cells to reduce autophagy. *Gastroenterology* (2014) doi:10.1053/j.gastro.2013.10.021.
 194. Lu, C. *et al.* MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy. *Gastroenterology* (2014) doi:10.1053/j.gastro.2013.09.006.
 195. Huang, Z. *et al.* MIR-141 regulates colonic leukocytic trafficking by targeting CXCL12 β during murine colitis and human crohn’s disease. *Gut* (2014) doi:10.1136/gutjnl-2012-304213.
 196. Chen, W.-X., Ren, L.-H. & Shi, R.-H. Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* (2014) doi:10.4291/wjgp.v5.i2.63.
 197. Polytarchou, C. *et al.* MicroRNA214 Is Associated With Progression of Ulcerative Colitis, and Inhibition Reduces Development of Colitis and Colitis-Associated Cancer in Mice. *Gastroenterology* **149**, 981-992.e11 (2015).
 198. Koukos, G. *et al.* MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* (2013) doi:10.1053/j.gastro.2013.07.001.
 199. Peck, B. C. E. *et al.* MicroRNAs classify different disease behavior phenotypes of Crohn’s disease and may have prognostic utility. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 2178–2187 (2015).
 200. Schaefer, J. S. MicroRNAs: How many in inflammatory bowel disease? *Curr. Opin. Gastroenterol.* **32**,

258–266 (2016).

201. Schmitz, S. U., Grote, P. & Herrmann, B. G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2491–2509 (2016).
202. Mercer, T. R. & Mattick, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 300–307 (2013).
203. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
204. Wang, H.-M., Lu, J.-H., Chen, W.-Y. & Gu, A.-Q. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of lung cancer and is closely related to clinical diagnosis as a predictive biomarker in plasma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 11824–30 (2015).
205. Olesen, M. T. J., Ballarín-González, B. & Howard, K. A. The application of RNAi-based treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Delivery and Translational Research* (2014) doi:10.1007/s13346-013-0156-9.
206. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* (2011) doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018.
207. Anderson, D. M. *et al.* A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* (2015) doi:10.1016/j.cell.2015.01.009.
208. Birney, E. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* (2007) doi:10.1038/nature05874.
209. Carninci, P. *et al.* Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* (80-.). (2005) doi:10.1126/science.1112014.
210. <http://www.noncode.org>.
211. <https://www.gencodegenes.org/human/stats.html>.
212. Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* (2012) doi:10.1101/gr.132159.111.
213. Karlsson, O. & Baccarelli, A. A. Environmental Health and Long Non-coding RNAs. *Curr. Environ. Heal. reports* **3**, 178–187 (2016).
214. Fang, Y. & Fullwood, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **14**, 42–54 (2016).
215. Li, R., Zhu, H. & Luo, Y. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
216. Jia, H. *et al.* Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *RNA* (2010) doi:10.1261/rna.1951310.
217. Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends in Biochemical Sciences* (2014) doi:10.1016/j.tibs.2014.02.007.

218. Mirza, A. H., Kaur, S., Brorsson, C. A. & Pociot, F. Effects of GWAS-Associated Genetic Variants on lncRNAs within IBD and T1D Candidate Loci. *PLoS One* **9**, e105723 (2014).
219. Cao, J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol. Proced. Online* **16**, 42 (2014).
220. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2011;43(6):904–914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018. **43**, 904–914 (2012).
221. Nam, J. W., Choi, S. W. & You, B. H. Incredible RNA: Dual functions of coding and noncoding. *Mol. Cells* **39**, 367–374 (2016).
222. Gloss, B. S. & Dinger, M. E. The specificity of long noncoding RNA expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 16–22 (2016).
223. Brockdorff, N. *et al.* The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* (1992) doi:10.1016/0092-8674(92)90519-I.
224. Yan, X. *et al.* Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell* (2015) doi:10.1016/j.ccell.2015.09.006.
225. Archer, K. *et al.* Long non-coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences* (2015) doi:10.3390/ijms161023651.
226. Wang, P., Fu, H., Cui, J. & Chen, X. Differential lncRNA-mRNA co-expression network analysis revealing the potential regulatory roles of lncRNAs in myocardial infarction. *Mol. Med. Rep.* (2016) doi:10.3892/mmr.2015.4669.
227. Briggs, J. A., Wolvetang, E. J., Mattick, J. S., Rinn, J. L. & Barry, G. Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Mammalian Nervous System Development, Plasticity, Disease, and Evolution. *Neuron* (2015) doi:10.1016/j.neuron.2015.09.045.
228. Gomez, J. A. *et al.* The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- γ locus. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.01.015.
229. Ricaño-Ponce, I. & Wijmenga, C. Mapping of immune-mediated disease genes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (2013) doi:10.1146/annurev-genom-091212-153450.
230. Qiao, Y. Q. *et al.* lncRNA DQ786243 affects Treg related CREB and Foxp3 expression in Crohn's disease. *J. Biomed. Sci.* **20**, 1–7 (2013).
231. Liu, Z. *et al.* The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat. Immunol.* **12**, 1063–1070 (2011).
232. Kumar, V. *et al.* Human Disease-Associated Genetic Variation Impacts Large Intergenic Non-Coding RNA Expression. *PLoS Genet.* (2013) doi:10.1371/journal.pgen.1003201.
233. Chen, D. *et al.* Plasma long noncoding RNA expression profile identified by microarray in patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* (2016) doi:10.3748/wjg.v22.i19.4716.

234. Ji, J., Dai, X., Yeung, S.-C. J. & He, X. The role of long non-coding RNA GAS5 in cancers. *Cancer Manag. Res.* **Volume 11**, 2729–2737 (2019).
235. Mirza, A. H. *et al.* Transcriptomic landscape of lncRNAs in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* **7**, 1–22 (2015).
236. Haberman, Y. *et al.* Long ncRNA Landscape in the Ileum of Treatment-Naive Early-Onset Crohn Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **24**, 346–360 (2018).
237. Padua, D. *et al.* A long noncoding RNA signature for ulcerative colitis identifies IFNG-AS1 as an enhancer of inflammation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* (2016) doi:10.1152/ajpgi.00212.2016.
238. Wu, F., Huang, Y., Dong, F. & Kwon, J. H. Ulcerative colitis-associated long noncoding RNA, BC012900, regulates intestinal epithelial cell apoptosis. *Inflamm. Bowel Dis.* (2016) doi:10.1097/MIB.0000000000000691.
239. Chen, S. W. *et al.* Effect of Long Noncoding RNA H19 Overexpression on Intestinal Barrier Function and Its Potential Role in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 2582–2592 (2016).
240. Hrdlickova, B. *et al.* Expression profiles of long non-coding RNAs located in autoimmune disease-associated regions reveal immune cell-type specificity. *Genome Med.* **6**, 88 (2014).
241. Cunnington, M. S., Koref, M. S., Mayosi, B. M., Burn, J. & Keavney, B. Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression. *PLoS Genet.* (2010) doi:10.1371/journal.pgen.1000899.
242. Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M. & Bièche, I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J.* (2011) doi:10.1096/fj.10-172452.
243. Zacharopoulou, E., Gazouli, M., Tzouvala, M., Vezakis, A. & Karamanolis, G. The contribution of long non-coding RNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *Dig. Liver Dis.* **49**, (2017).
244. Wang, S. *et al.* KIF9-AS1, LINC01272 and DIO3OS lncRNAs as novel biomarkers for inflammatory bowel disease. *Mol. Med. Rep.* **17**, 2195–2202 (2018).
245. Lucafò, M. *et al.* Long non-coding RNA gas5 and intestinal mmp2 and mmp9 expression: A translational study in pediatric patients with IBD. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–12 (2019).
246. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**, 17–27 (1992).
247. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs597325>.
248. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1476514>.
249. Dechamethakun, S. & Muramatsu, M. Long noncoding RNA variations in cardiometabolic diseases. *J. Hum. Genet.* **62**, 97–104 (2017).
250. Liu, M. *et al.* HORMAD2/CT46.2, a novel cancer/testis gene, is ectopically expressed in lung cancer

tissues. *Mol. Hum. Reprod.* (2012) doi:10.1093/molehr/gas033.

251. Gharavi, A. G. *et al.* Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat. Genet.* **43**, 321–327 (2011).
252. Lees, C. W., Barrett, J. C., Parkes, M. & Satsangi, J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* **60**, 1739–1753 (2011).
253. Li, X., Shen, J. & Ran, Z. Crosstalk between the gut and the liver via susceptibility loci: Novel advances in inflammatory bowel disease and autoimmune liver disease. *Clin. Immunol.* **175**, 115–123 (2017).
254. Klasić, M. *et al.* Promoter methylation of the MGAT3 and BACH2 genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease. *Clin. Epigenetics* **10**, 1–14 (2018).
255. WEGNER, M. *et al.* Association investigation of BACH2 rs3757247 and SOD2 rs4880 polymorphisms with the type 1 diabetes and diabetes long-term complications risk in the Polish population. *Biomed. Reports* **3**, 327–332 (2015).
256. Onuma, H. *et al.* Variants in the BACH2 and CLEC16A gene might be associated with susceptibility to insulin-triggered type 1 diabetes. *J. Diabetes Investig.* **10**, 1447–1453 (2019).
257. Pazderska, A. *et al.* A variant in the BACH2 gene is associated with susceptibility to autoimmune addison's disease in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2016) doi:10.1210/jc.2016-2368.