



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΜΑΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ
ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ ΙΙ/ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

TNF-a (rs1800629), IL-6 (rs1800795), SPINK5 (rs2303067), ORMDL3 (rs7216389),
MTNR1B (rs10830963), CDKAL1 (rs7756992), TCF7L2 (rs7903146), SLC30A8
(rs13266634), PPAR γ 2 (rs1801282), FTO (rs9939609)

ΜΑΡΙΑ ΣΥΚΑ
M. Sc. ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Νικόλαος Δρακούλης, Επίκουρος Καθηγητής, Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ,
επιβλέπων καθηγητής

Αγγελική Κουρουνάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Πέτρος Μπακάκος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νικόλαος Δρακούλης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Αγγελική Κουρουνάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Πέτρος Μπακάκος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Χάρις Λιάπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Τεντολούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μιχαήλ Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Καραλής, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την πορότρυνση, την διαρκή καθοδήγηση και αδιάκοπη βοήθεια του επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Επίκουρου Καθηγητή κ. Νικολάου Δρακούλη τόσο στην αρχική οργάνωση της μελέτης όσο και στην τελική διόρθωση της παρούσας διατριβής. Με την υποστήριξη και την υπομονή του συνέβαλε στην κατανόηση και αξιοποίηση της βιβλιογραφίας. Η συνεργασία μας αποτελεί εξαιρετική τιμή για μένα και τον ευχαριστώ θερμά.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πέτρο Μπακάκο για την πολύπλευρη επιστημονική συμβολή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου την ευκαιρία για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Αγγελική Κουρουνάκη για την ενθάρρυνση και στήριξη της.

Την ευγνωμοσύνη μου εκφράζω στην εξαιρετική Βιοχημικό επιστήμονα κα. Μάρθα Κατσαρού για τη πολύτιμη βοήθειά της καθ'όλη την διάρκεια της συγγραφής. Με τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις πολύτιμες συμβουλές της συνέβαλε καθοριστικά στην επιτυχία της μελέτης και στην περάτωση της διατριβής. Ευχαριστώ τους συναδέλφους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές στο Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας για το κλίμα συνεργασίας και κατανόησης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερος και να μην εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στην ιατρό κα. Ελισάβετ Κωνσταντέλου για την συνεργασία και το ενδιαφέρον της που χωρίς την συνεισφορά της δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Αθανάσιο Ράπη στην αξιολόγηση και ταξινόμηση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από ψυχής τους γονείς μου Ευαγγελία και Νικόλαο για την ηθική στήριξη, τον σύζυγο μου Ευάγγελο και τα λατρεμένα μου παιδιά Νικολέτα και Χρήστο για την υπομονή τους καθ'όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1.1. ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ	10
1.1.1. Ιστορικά στοιχεία βρογχικού άσθματος.....	10
1.1.2. Αιτιολογία και συχνότητα βρογχικού άσθματος.....	12
1.1.3. Παθογένεια βρογχικού άσθματος.....	14
1.1.4. Ερεθίσματα πρόκλησης ασθματικών κρίσεων.....	17
1.1.4.1. Αλλεργιογόνα που προκαλούν άσθμα.....	18
1.1.4.2. Φάρμακα που προκαλούν ασθματικές κρίσεις.....	19
1.1.4.3. Περιβάλλον και ατμοσφαιρικοί ρύποι στην ανάπτυξη άσθματος.....	20
1.1.4.4. Επαγγελματικοί παράγοντες που προκαλούν άσθμα	20
1.1.4.5. Λοιμώξεις που προκαλούν άσθμα.....	21
1.1.4.6. Σωματική άσκηση ως αίτιο για την ανάπτυξη άσθματος.....	21
1.1.4.7. Συναισθηματική φόρτιση και ο ρόλος της στην ανάπτυξη άσθματος.....	22
1.1.4.8. Ενδοκρινικοί παράγοντες, Συνοσηρότητες με το βρογχικό άσθμα.....	22
1.1.5. Αναδιαμόρφωση αεραγωγού στο βρογχικό άσθμα	23
1.1.6. Παθοφυσιολογικά δεδομένα βρογχικού άσθματος	24
1.1.7. Βρογχικό άσθμα και γονίδια	25
1.1.8. Αντιμετώπιση βρογχικού άσθματος.....	26
1.1.8.1. Φαρμακολογική Αντιμετώπιση Άσθματος.....	27
1.1.8.1.1. Διεγέρτες αδρενεργικών υποδοχέων	27
1.1.8.1.1.α. Βραχείας δράσης εκλεκτικοί β2 αδρενεργικοί διεγέρτες	28
1.1.8.1.1.β. Μακράς δράσης εκλεκτικοί β2 αδρενεργικοί διεγέρτες.....	30
1.1.8.1.1.γ. Μη εκλεκτικοί αδρενεργικοί διεγέρτες.....	31
1.1.8.1.2. Μεθυλοξανθίνες στην αντιμετώπιση του άσθματος	32
1.1.8.1.3. Αντιχολινεργικά στην αντιμετώπιση του άσθματος.....	34
1.1.8.1.4. Γλυκοκορτικοειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος	35
1.1.8.1.5. Κορτικοστεροειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος	36
1.1.8.1.6. Παράγοντες που σταθεροποιούν τα ιστιοκύτταρα	38
1.1.8.1.7. Ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων	39
1.1.8.1.8. Φάρμακα για την προφύλαξη κατά του άσθματος	39
1.1.8.1.9. Άλλοι Παράγοντες για την αντιμετώπιση του άσθματος	40
1.1.8.2. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του άσθματος.....	41
1.1.9. Πρόγνωση και κλινική πορεία του άσθματος	44
1.2. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II	44
1.2.1. Ιστορικά στοιχεία Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II	45
1.2.2. Αιτιολογία και Συχνότητα Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II	46
1.2.3. Παθογένεση Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II.....	47
1.2.4. Γενετική Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II.....	48
1.2.5. Παθοφυσιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II.....	48
1.2.6. Κλινική Εικόνα Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II.....	50
1.2.6.1. Ταξινόμηση Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II	50
1.2.6.2. Κλινικά χαρακτηριστικά Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II	51
1.2.7. Σχέση Σακχαρώδους Διαβήτη II και Παχυσαρκίας	52
1.2.7.1. Φλεγμονή λιπώδους ιστού κατά την παχυσαρκία: μία σύνδεση με τα συστατικά του μεταβολικού συνδρόμου.....	54

1.2.7.2. Αδιποκίνες, φλεγμονή και αντίσταση στην ινσουλίνη.....	57
1.2.8. Αντιμετώπιση Σακχαρώδους Διαβήτη II.....	58
1.2.8.1. Διατροφή	58
1.2.8.2. Φαρμακολογική αντιμετώπιση Σακχαρώδους Διαβήτη II	59
1.2.8.2.1. Από του στόματος χορηγούμενα φάρμακα	59
1.2.8.2.1.α. Σουλφονουλουργίες.....	59
1.2.8.2.1.β. Διγουανίδες.....	62
1.2.8.2.1.γ. Αναστολείς της αλφα γλυκοσιδάσης	64
1.2.8.2.1.δ. Θειαζολιδινεδιόνες	64
1.2.8.2.1.ε. Άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα	64
1.2.8.2.2. Ενέσιμα φάρμακα-ινσουλίνη.....	65
1.2.9. Υπογλυκαιμία.....	66
1.3. ΓΟΝΙΔΙΟ-ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ-ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	67
1.3.1. Πολυμορφισμός.....	68
1.3.2. SNPs (single nucleotide polymorphisms) και γενετικές ασθένειες..	69
1.3.3. Μετάλλαξη: Ορισμός-Είδη-Αιτία	70
1.4. ΠΑΡΑΓΩΝ ΝΕΚΡΩΣΕΩΣ ΟΓΚΩΝ α (TNF-α) rs1800629	72
1.4.1. Γονίδιο TNF-α	73
1.4.2. Σύνθεση και απελευθέρωση TNF-α	76
1.4.3. Μηχανισμός δράσης TNF-α	77
1.4.4. Βιολογικές επιδράσεις TNF-α	78
1.4.5. Ρόλος TNF-α στο βρογχικό άσθμα.....	78
1.4.6. Ρόλος TNF-α στον ΣΔτ2.....	80
1.4.7. TNF-α, παχυσαρκία και καχεξία	81
1.4.8. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική μεσω TNF-α.....	82
1.5. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 6 (IL-6) rs1800795	84
1.5.1. Γονίδιο IL-6.....	85
1.5.2. Υποδοχείς της IL-6.....	85
1.5.3. Βιολογικές επιδράσεις IL-6.....	88
1.5.4. Δομή πρωτεΐνης IL-6.....	89
1.5.5. Ρόλος IL-6 στο άσθμα.....	91
1.5.6. Ρόλος IL-6 στον ΣΔτ2	95
1.5.7. IL-6, παχυσαρκία και λιπώδης ιστός.....	96
1.5.8. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική, ανταγωνιστές της IL-6.....	96
1.6. SERINE PEPTIDASE INHIBITOR KAZAL TYPE 5 (SPINK5) rs2303067.....	98
1.6.1. Γονίδιο SPINK5	98
1.6.2. Δομή λεκτίνης (LEKT1).....	99
1.6.3. Μηχανισμός δράσης λεκτίνης	100
1.7. OROSOMUCOID 1-LIKE PROTEIN 3 (ORMDL3) rs7216389.....	102
1.7.1. Γονίδιο ORMDL3	102
1.7.2. Δομή πρωτεΐνης ORMDL3	103
1.7.3. Μηχανισμός δράσης ORMDL3	103
1.8. MELATONIN RECEPTOR 1B (MTNR1B) rs 10830963	104
1.8.1. Φυσιολογία και λειτουργία μελατονίνης.....	104
1.8.2. Ιστορικά στοιχεία υποδοχέων μελατονίνης.....	108
1.8.3. Γονίδιο MTNR1B.....	108
1.8.4. Δομή υποδοχέων μελατονίνης.....	109
1.8.5. Πολυμορφισμός υποδοχέων μελατονίνης	111
1.8.6. Έκφραση υποδοχέων μελατονίνης.....	111

1.8.7. Ρύθμιση υποδοχέων μελατονίνης.....	111
1.8.8. Λειτουργία υποδοχέων μελατονίνης	112
1.8.9. Οι υποδοχείς μελατονίνης ως θεραπευτικοί στόχοι	112
1.9. CDKAL1 (CDK5 REGULATORY SUBUNIT ASSOCIATED PROTEIN 1-LIKE) rs7756992	113
1.9.1. Δομή γονιδίου CDKAL1	113
1.9.2. Πρωτεϊνική δομή-σύνθεση-απελευθέρωση CDKAL1	114
1.9.3. Μηχανισμός δράσης CDKAL1	115
1.9.4. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική μέσω CDKAL1	117
1.10. TRANSCRIPTION FACTOR 7-LIKE 2 (TCF7L2) rs7903146.....	117
1.10.1. Δομή γονιδίου TCF7L2.....	117
1.10.2. Δομή πρωτεΐνης TCF7L2.....	119
1.10.3. Μηχανισμός δράσης TCF7L2	119
1.11. SOLUTE CARRIER FAMILY 30 (ZINC TRANSPORTER), MEMBER 8 (SLC30A8) rs13266634.....	121
1.11.1. Δομή γονιδίου SLC30A8	121
1.11.2. Δομή πρωτεΐνης SLC30A8	122
1.11.3. Μηχανισμός δράσης SLC30A8.....	123
1.12. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA-2 GENE (PPAR γ 2) POLYMORPHISM rs 1801282.....	125
1.12.1. Ιστορικά στοιχεία PPAR	125
1.12.2. Δομή γονιδίου PPAR γ 2.....	126
1.12.3. Δομή πρωτεΐνης PPAR γ 2.....	126
1.12.4. Μηχανισμός δράσης PPAR γ 2	128
1.12.5. Ρόλος PPAR γ 2 στον ΣΔτ2	131
1.12.6. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική, αγωνιστές PPAR γ	132
1.13. FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED GENE (FTO) rs9939609133	
1.13.1. Δομή γονιδίου FTO	133
1.13.2. Δομή πρωτεΐνης FTO	136
1.13.3. Ρόλος FTO στον ΣΔτ2.....	137
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	138
1.14. ΣΚΟΠΟΣ.....	139
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	140
2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	140
2.1.1. Γενικός πληθυσμός.....	140
2.1.2. Ειδικός πληθυσμός	140
2.2. Μέθοδοι συλλογής και επεξεργασίας γενετικού υλικού	141
2.2.1. Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός	141
2.2.2. Λήψη δείγματος DNA από τους συμμετέχοντες.....	142
2.3. Στάδια απομόνωσης DNA από επιθηλιακά κύτταρα στοματικής κοιλότητας.....	143
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	144
2.4.1. Αρχή Μεθόδου	144
2.4.2. Στάδια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	146
2.4.3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR).....	149
2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	150
2.5.1. Αρχή Μεθόδου Ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης ...	150
2.5.2. Παρασκευή αντιδραστηρίων σε πήκτωμα αγαρόζης	151
2.5.3. Στάδια ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	152

2.6. Διαδικασία Real-Time PCR με LightSNIP.....	153
2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	156
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	158
3.1. TNF-a (rs1800629).....	160
3.2. IL-6 (rs1800795).....	162
3.3. SPINK5 (rs2303067).....	164
3.4. ORMDL3 (rs7216389).....	166
3.5. MTNR1B (rs10830963).....	168
3.6. CDKAL1 (rs7756992).....	170
3.7. TCF7L2 (rs7903146).....	172
3.8. SLC30A8 (rs13266634).....	174
3.9. PPAR γ 2 (rs1801282).....	176
3.10. FTO (rs9939609).....	178
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	180
4.1. TNF-a (rs1800629).....	182
4.2. IL-6 (rs1800795).....	182
4.3. SPINK5 (rs2303067).....	183
4.4. ORMDL3 (rs7216389).....	184
4.5. MTNR1B (rs10830963).....	185
4.6. CDKAL1 (rs7756992).....	185
4.7. TCF7L2 (rs7903146).....	187
4.8. SLC30A8 (rs13266634).....	190
4.9. PPAR γ 2 (rs1801282).....	191
4.10. FTO (rs9939609).....	192
4.11. Περιορισμοί της μελέτης.....	194
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	195
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	196
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	213
7.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	213
7.2. ABSTRACT.....	215
7.3. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ-ΠΙΝΑΚΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	217

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΒΡΟΓΧΙΚΟ ΑΣΘΜΑ

Το άσθμα είναι μία κοινή φλεγμονώδης πάθηση των πνευμόνων της οποίας η συχνότητα αυξάνεται παγκοσμίως.¹ Το άσθμα είναι μια πολυγενετική, πολύπλοκη, χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών που χαρακτηρίζεται από ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων και υποτροπιάζοντα επεισόδια φλεγμονής των αεραγωγών, βρογχική υπεραντιδραστικότητα, υπερευαισθησία των αεραγωγών, περιορισμό της ροής του αέρα σε απάντηση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, αναστρέψιμη απόφραξη και αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.^{2,3} Ως νόσος των αεραγωγών, χαρακτηρίζεται από την αυξημένη ανταπόκριση του τραχειοβρογχικού δέντρου σε ποικίλα ερεθίσματα, στην οποία διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο κύτταρα όπως τα σιτευτικά, τα ηωσινόφιλα και τα Τ λεμφοκύτταρα.⁴

Σχεδόν 300 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο υποφέρουν από άσθμα. Η παθογένεση του άσθματος δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, αν και πιστεύεται ότι το άσθμα είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια που προέρχεται τόσο από γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες.¹

Κλινικά, εκδηλώνεται με παροξυσμική δύσπνοια, βήχα και συριγμό, τονισμένα από έντονες παροξύνσεις μαζί με ενδείξεις μεταβλητής απόφραξης της ροής του αέρα και υπεραπόκριση του αεραγωγού.⁵ Είναι μία νόσος που εμφανίζεται κατά κρίσεις και χαρακτηρίζεται από μεσοδιαστήματα, στα οποία ο ασθενής είναι ελεύθερος συμπτωμάτων. Συνήθως, η διάρκεια των κρίσεων είναι μικρή, κυμαίνεται, δηλαδή, από μερικά λεπτά μέχρι λίγες ώρες και ο ασθενής φαίνεται ότι αναρρώνει πλήρως μετά το πέρας της κρίσεως. Μπορεί, όμως, να υπάρξουν και φάσεις της νόσου κατά τις οποίες ο ασθενής παρουσιάζει καθημερινά κάποιου βαθμού απόφραξη των αεροφόρων οδών. Μία τέτοιου είδους φάση μπορεί να είναι ήπιας μορφής (με ή χωρίς ενδιάμεσα επεισόδια με βαρύτερη συμπτωματολογία) υπάρχει, όμως, πιθανότητα να είναι πολύ σοβαρότερη και η απόφραξη των αεραγωγών να διαρκεί επί μήνες ή και εβδομάδες. Η τελευταία αυτή περίπτωση καλείται status asthmaticus. Αρκετά σπάνια, οι παροξυσμοί αυτοί μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και το θάνατο.⁶

1.1.1. Ιστορικά στοιχεία βρογχικού άσθματος

Το άσθμα είναι μια νόσος γνωστή από την αρχαιότητα. Οι πρώτες γραπτές ενδείξεις για την ύπαρξη του άσθματος προέρχονται από την αρχαία Αίγυπτο. Ένας Αιγυπτιακός πάπυρος που ανακαλύφθηκε το 1870 και χρονολογείται από τον 16^ο αιώνα π.Χ. περιέχει σε ιερογλυφικά περιγραφές συμπτωμάτων και θεραπειών για μια νόσο που προσομοιάζει πολύ σε αυτό που αναφέρουμε σήμερα ως άσθμα. Αναφερόταν ότι αυτή η νόσος θεραπεύονταν με τη λήψη ενός μείγματος θυμιάματος, γνωστού ως kyphi. Ο όρος "ασθμαίνω" αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Όμηρο στην Ιλιάδα, για να περιγράψει την αναπνευστική δυσχέρεια και την αναπνοή με ανοιχτό στόμα του τραυματισμένου Έκτορα έξω από τα τείχη της Τροίας. Αναγνωρίστηκε επίσημα ως ειδικό πρόβλημα του αναπνευστικού από τον Ιπποκράτη (460-377 π.Χ.) γύρω στο 450 π.Χ., με την ελληνική λέξη για το «λαχάνιασμα» να αποτελεί τη βάση του σύγχρονου ονόματος της νόσου.⁷ Ο Ιπποκράτης ήταν εκείνος

που εισήγαγε τον όρο "άσθμα" στην ιατρική, στην Ιπποκρατική Συλλογή. Στα κείμενα του Ιπποκράτη, ωστόσο, ο όρος αναφέρεται πιθανότατα στο άσθμα ως σύμπτωμα και όχι στη νόσο που γνωρίζουμε σήμερα. Το 200 π.Χ. πιστεύεται ότι σχετίζονταν εν μέρει με τα συναισθήματα. Η πρώτη περιγραφή του άσθματος με την έννοια της νόσου που γνωρίζουμε σήμερα αποδίδεται στον Αρεταίο τον Καππαδόκη, έναν Έλληνα γιατρό που έζησε το 2^ο αιώνα μ.Χ. Ο Γαληνός (130-200 μ.Χ.) έχει αναφέρει πολλές φορές τον όρο άσθμα στα κείμενά του, με περιγραφές που συμφωνούν με τα Ιπποκρατικά κείμενα αλλά και με τον Αρεταίο, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην απόφραξη των βρόγχων. Ο Μαϊμωνίδης (1135-1204 μ.Χ.), ένας φιλόσοφος που άσκησε και την Ιατρική στην αυλή του Σουλτάνου Σαλαντίν της Αιγύπτου και της Συρίας, αναφέρει την επιδείνωση του άσθματος μετά από ιογενείς λοιμώξεις το χειμώνα και τη βελτίωση των συμπτωμάτων τους ξηρούς μήνες της Αιγύπτου, στο κείμενο που έγραψε παρατηρώντας έναν ασθενή του. Η πρώτη σύγχρονη προσέγγιση στη θεραπευτική αντιμετώπιση του άσθματος έρχεται από την Κίνα. Οι Κινέζοι έδιναν στους ασθενείς εισπνοές από βότανα που περιείχαν εφεδρίνη και αποτελούσαν την πρόδρομη μορφή των σύγχρονων βρογχοδιασταλτικών φαρμάκων, των β₂-διεγερτών. Ο Jean Baptiste van Helmont (1579-1644 π.Χ.), ένας Βέλγος χημικός και φυσιολόγος, μελέτησε τη σχέση του άσθματος με τους αεραγωγούς, ενώ ο Bernardino Ramazzini (1633-1714 π.Χ.), που θεωρείται ο πατέρας της αθλητιατρικής, ήταν ο πρώτος που αναφέρθηκε στη σχέση μεταξύ άσκησης και άσθματος. Το 1873, ένα από τα πρώτα βιβλία της σύγχρονης ιατρικής για το θέμα προσπάθησε να εξηγήσει την παθοφυσιολογία της νόσου, ενώ το 1872 ένα βιβλίο κατέληγε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να θεραπεύσει κανείς το άσθμα κάνοντας εντριβές στο στήθος με χρίσμα χλωροφόρμιου.^{8,9} Το 1880 η φαρμακευτική αγωγή περιελάμβανε τη χρήση ενδοφλέβιων δόσεων ενός φαρμάκου που ονομαζόταν πιλοκαρπίνη.¹⁰ Το 1886, ο F. H. Bosworth διατύπωσε τη σχέση μεταξύ άσθματος και αλλεργικής ρινίτιδας.¹¹

Το 19^ο αιώνα, μια δημοφιλής θεραπευτική προσέγγιση ήταν τα "τσιγάρα άσθματος", που κατασκευάζονταν από φύλλα του φυτού *Datura stramonium*. Ήταν η πρώτη μορφή εισπνεόμενης θεραπείας που, όπως γνωρίζουμε σήμερα, οφειλόταν στο γεγονός ότι περιείχαν ένα αλκαλοειδές με αντιχολινεργική δράση, που προκαλούσε βρογχοδιαστολή με μηχανισμό ανάλογο με φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην αντιμετώπιση του άσθματος, όπως το ιπρατρόπιο. Το 1905 έγινε για πρώτη φορά αναφορά στην επινεφρίνη για την αντιμετώπιση του άσθματος.¹² Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα το άσθμα θεωρείτο σε μεγάλο βαθμό ψυχοσωματική νόσος, μια άποψη που επικρατούσε για πολλά νοσήματα εκείνης της εποχής. Στη διάρκεια των δεκαετιών 1930–1950 το άσθμα ήταν γνωστό ως μία από τις «επτά άγιες» ψυχοσωματικές ασθένειες. Τα αίτιά του θεωρούνταν ψυχολογικά, με τη θεραπεία να βασίζεται συχνά στην ψυχανάλυση και σε άλλες θεραπείες μέσω της ομιλίας.¹³

Η προσέγγιση αυτή οδήγησε σε ψυχαναλυτική και ψυχοθεραπευτική αντιμετώπιση πολλών ασθενών με άσθμα, για να εγκαταλειφθεί οριστικά στη δεκαετία του 1950. Οι συσκευές χορήγησης εισπνεόμενων φαρμάκων για προσωπική χρήση χρησιμοποιήθηκαν στη δεκαετία του 1930 και χρησιμοποιούσαν ως βρογχοδιασταλτικό φάρμακο την επινεφρίνη. Αποτέλεσαν την πρόδρομη μορφή των σύγχρονων εισπνεόμενων φαρμάκων, όπως οι εισπνεόμενοι β₂-διεγέρτες που

εμφανίστηκαν στη δεκαετία του 1950. Τα από του στόματος λαμβανόμενα κορτικοστεροειδή άρχισαν να χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του άσθματος τη δεκαετία του 1950, ενώ στη δεκαετία του 1960 άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και επιλεγμένοι βρογχοδιασταλτικοί β-αγωνιστές βραχείας δράσης. Η διαπίστωση ότι το άσθμα οφείλεται σε φλεγμονή των αεραγωγών ξεκίνησε στη δεκαετία του 1960 και αποτέλεσε τη βάση για τη σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση του άσθματος με αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως είναι τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή.^{14,15}

1.1.2. Αιτιολογία και συχνότητα βρογχικού άσθματος

Το άσθμα είναι μια πολύ συχνή νόσος. Εκτιμάται ότι έχει προσβάλει το 4 με 5% του πληθυσμού των ΗΠΑ και παρόμοια ποσοστά έχουν ανακοινωθεί και για άλλες χώρες. Αφορά άτομα όλων των ηλικιών, κυρίως όμως, προσβάλλει μικρότερες ηλικίες. Οι μισές περίπου περιπτώσεις εμφανίζονται πριν την ηλικία των 10 ετών σε άλλο ένα τρίτο πριν την ηλικία των 40. Η αναλογία άρρενων:θηλέων είναι στην παιδική ηλικία 2:1, τείνει όμως να εξισωθεί στην ηλικία των 30 ετών.⁶

Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι περισσότερα από 500.000 άτομα πάσχουν από άσθμα, η αναλογία είναι υψηλότερη στις ηλικίες κάτω των 18 ετών και μειώνεται όσο προχωρούν τα χρόνια.¹⁶

Ο επιπολασμός του άσθματος έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο τις τελευταίες δεκαετίες και είναι ενδεχομένως απειλητική κατάσταση για τη ζωή. Μια ασθματική αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως με ποικίλους βαθμούς δύσπνοιας ή/και πίεσης στο στήθος, μπορεί να προκληθεί από έκθεση σε πολυάριθμους οργανικούς, συνθετικούς, και βιολογικούς παράγοντες. Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι όπως το όζον, τα σωματίδια, το διοξείδιο του θείου, τα οξείδια του αζώτου, οι πτητικές οργανικές ενώσεις, η εξάτμιση σωματιδίων και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH), μεταξύ άλλων, μπορεί να προκαλέσει δυσκολία στην αναπνοή και συριγμό σε μερικούς ανθρώπους. Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει συσχετίσεις μεταξύ άσθματος και αέριων ρύπων. Μικρά σωματίδια καθώς και το όζον έχουν προσελκύσει την προσοχή επειδή οι ρύποι σχετίζονται με το άσθμα.¹⁷

Για πολλά χρόνια, το άσθμα έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ορισμένες οικογένειες, παρατηρήσεις που υποδηλώνουν μια γενετική βάση για την ασθένεια. Οι ερευνητές προσπαθούν να εντοπίσουν γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τον κίνδυνο άσθματος. Η προσπάθεια αυτή, η οποία έχει δείξει κάποια ελπιδοφόρα αποτελέσματα, έχει εμποδιστεί, από τους περίπλοκους μηχανισμούς της ασθένειας αν και οι αλληλεπιδράσεις γονίδιο-γονίδιο και γονίδιο-περιβάλλον που ασχολούνται με το άσθμα είναι πολύπλοκες και όχι πλήρως οριοθετημένες. Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι ορισμένα γονίδια ελέγχουν διαφορετικές πτυχές του άσθματος. Τόσο η απομόνωση όσο και ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που σχετίζονται με τις αναπνευστικές απαντήσεις που σχετίζονται με την έκθεση σε ατμοσφαιρικούς ρύπους δεν έχει πλήρως καθοριστεί.¹⁷

Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν θεωρηθεί από καιρό ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην έκφραση των συμπτωμάτων του

άσθματος. Στην πραγματικότητα, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, η ατμοσφαιρική ρύπανση παραμένει ένας από τους πιο υποτιμημένους παράγοντες παροξύνσεων του άσθματος. Παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το οικογενειακό ιστορικό, την παχυσαρκία και την έκθεση σε πολυάριθμους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι τα ακάρεα της σκόνης, οι ρύποι, ο καπνός. Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι η πιο συχνή αιτία που πυροδοτεί το άσθμα. Ως αρχική θεραπεία για το άσθμα συνιστάται η σωστή χρήση των εισπνεόμενων στεροειδών και ο εμβολιασμός με αντιγριπικό εμβόλιο ως αποτέλεσμα του αυξημένου κινδύνου επιπλοκών της γρίπης.¹⁷

Ο μηχανισμός πρόκλησης του βρογχικού άσθματος ξεκινά με την είσοδο ενός αντιγόνου-αλλεργιογόνου στον οργανισμό το οποίο ενεργοποιεί τους φυσιολογικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς. Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο και μετατρέπονται σε Th2 λεμφοκύτταρα τα οποία διεγείρουν με τη σειρά τους τα B-λεμφοκύτταρα και παράγουν IgE αντισώματα για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Στη συνέχεια, τα IgE συνδέονται με τα σιτευτικά κύτταρα και η πρόσδεση του παραπάνω συμπλέγματος στην επιφάνεια των σιτευτικών κυττάρων απελευθερώνει μεσολαβητές βραχείας δράσης (ισταμίνη, τρυπτάση, λευκοτριένια) οι οποίοι επιφέρουν άμεση συστολή των λείων μυών καθώς και ιντερλευκίνες (IL-6) και τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF-a), οι οποίοι αυξάνουν την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Αυτά με τη σειρά τους προκαλούν χημειοταξία ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων οδηγώντας σε φλεγμονή των αεραγωγών.¹⁸

Παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια, όσον αφορά την αιτιολογία του άσθματος. Για καθαρά επιδημιολογικούς και κλινικούς σκοπούς, το άσθμα συνηθίζεται να ταξινομείται ανάλογα με τα κύρια ερεθίσματα τα οποία το προκαλούν ή απλά συσχετίζονται με τους παροξυσμούς. Πρέπει, όμως, να σημειωθεί ότι η ταξινόμηση αυτή είναι αυθαίρετη και η ασθματική αντίδραση που περιγράφεται σε μία υποκατηγορία μπορεί συνήθως να προκληθεί από περισσότερα του ενός ερεθίσματα. Επιπλέον, η εφαρμογή μοριακών και κυτταροβιολογικών τεχνικών στην έρευνα για την αιτιολογία του άσθματος έχει ήδη προκαλέσει αρκετές αλλαγές στην κλασική αυτή ταξινόμηση. Με τις παραπάνω, λοιπόν, επιφυλάξεις, το άσθμα μπορεί να διακριθεί σε δύο κύριες κατηγορίες: το αλλεργικό και το ιδιοπαθές.⁶

Το αλλεργικό άσθμα συχνά συσχετίζεται με ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό άλλων αλλεργικών διαταραχών, όπως ρινίτιδα, κνίδωση και έκζεμα, με θετική δερματική αντίδραση τύπου πομφού και ερυθρότητας μετά από ενδοδερμική ένεση εκχυλίσματος εισπνεόμενων αντιγόνων, με αύξηση των επιπέδων της ανοσοσφαιρίνης IgE του ορού ή και με θετική ανταπόκριση σε δοκιμασίες προκλήσεως οι οποίες περιλαμβάνουν την εισπνοή ειδικών αντιγόνων.⁶

Η αιτιολογία του άσθματος είναι σύνθετη και πολυπαραγοντική. Αν και έχουν γίνει σοβαρές πρόοδοι στην παθοφυσιολογία του άσθματος, ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί και ρυθμίζει τη νόσο δεν είναι πλήρως κατανοητός. Σύμφωνα με τους Woodruff et al., το άσθμα μπορεί να χωριστεί σε τουλάχιστον δύο διακριτούς μοριακούς φαινοτύπους που ορίζονται από τον βαθμό της φλεγμονής του Th2. Οι Simpson et al., έχουν δείξει ότι η αναλογία ηωσινόφιλων στα προκαλούμενα πτύελα είναι καλό μέσο διάκρισης για το ηωσινοφιλικό άσθμα, και παρέχει έναν ικανό να

αναπαραχθεί ορισμό μιας ομοιογενούς ομάδας. Τα υπόλοιπα, μη-ηωσινοφιλικά άτομα είναι ετερογενή και μπορούν να καταταγούν περαιτέρω με βάση την παρουσία ουδετερόφιλων. Το βρογχικό άσθμα κατηγοριοποιείται ευρέως ανοσολογικά σε εγγενές και εξωγενές, με γενική τάση να αντικατασταθούν αυτοί οι όροι με τους όρους ατοπικό (αλλεργικό) και μη-ατοπικό (μη-αλλεργικό). Αν και κάποιες μελέτες έχουν δείξει ομοιότητες μεταξύ των δύο τύπων άσθματος, τα κλινικά χαρακτηριστικά τους και η ανοσοπαθολογία φαίνονται σημαντικά διαφορετικές.²

1.1.3. Παθογένεια βρογχικού άσθματος

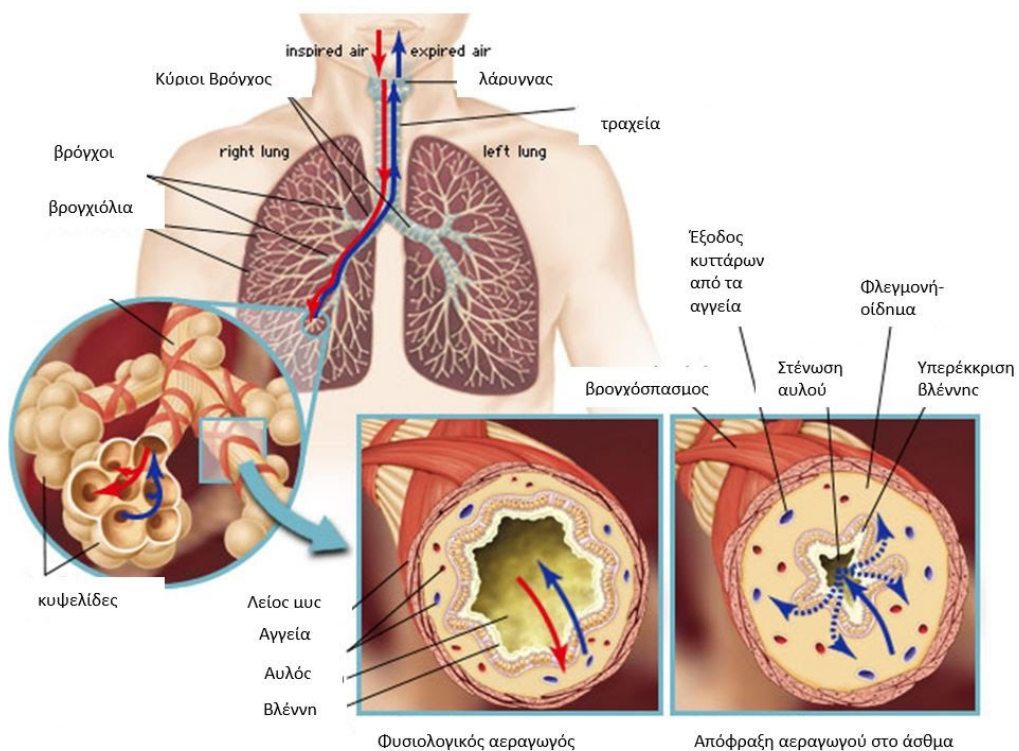
Έχουν γίνει πολλές υποθέσεις όσον αφορά την αιτιολογία της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών, ο βασικός όμως παθοφυσιολογικός μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος. Επί του παρόντος, η ευρύτερα παραδεκτή υπόθεση είναι αυτή της φλεγμονής των αεραγωγών. Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθματικών ασθενών έχουν βρεθεί αυξημένα ποσά ιστιοκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων, ουδετερόφιλων, ηωσινοφίλων και λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και αυξημένες συγκεντρώσεις μιας ποικιλίας μεσολαβητών της φλεγμονής. Επίσης συχνά παρατηρείται η παρουσία φλεγμονώδους διεργασίας σε δείγματα ενδοβρογχικών βιοψιών ασυμπτωματικών ασθενών. Το συνηθέστερο εύρημα είναι η γενικευμένη κυτταρική υπερπλασία, η οποία συνοδεύεται από αύξηση της πυκνότητας των τριχοειδών. Περιστασιακά παρατηρείται αποψίλωση των επιθηλίων.⁶

Αν και δεν έχει ακόμη επιτευχθεί η αιτιολογική σύνδεση των παραπάνω παθολογοανατομικών ευρημάτων με κάποια παθοφυσιολογική διεργασία, είναι γενικότερα αποδεκτό ότι τόσο τα παθοφυσιολογικά όσο και τα κλινικά χαρακτηριστικά του άσθματος σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των φλεγμονωδών κυτοκινών (τόσο τοπικών όσο και μεταναστευτικών) με το επιθήλιο των αεραγωγών. Τα κύτταρα τα οποία θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του άσθματος είναι τα ιστιοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα. Οι μεσολαβητές της φλεγμονής που απελευθερώνονται (δηλαδή η ισταμίνη, η βραδυκίνη, τα λευκοτριένια, ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και οι προσταγλανδίνες) προκαλούν μία έντονη και άμεση φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία συνίσταται σε βρογχόσπασμο, αγγειακή συμφόρηση και ανάπτυξη οιδήματος. Τα λευκοτριένια, πέρα από την ικανότητά τους να προκαλούν παρατεταμένη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών και οίδημα του βλεννογόνου, είναι υπεύθυνα και για ορισμένα άλλα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του άσθματος, όπως η αυξημένη παραγωγή βλέννας και η διαταραχή της βλεννοκροσσώτης κάθαρσης.^{6,19}

Τα έντονα αυτά τοπικά φαινόμενα μπορεί αργότερα να ακολουθηθούν από μία χρονιότερη διαταραχή. Οι χημειοτακτικοί παράγοντες που συντίθενται και απελευθερώνονται (αναφυλακτικοί παράγοντες χημειοταξίας των ηωσινοφίλων και των ουδετερόφιλων, λευκοτριένιο B₄) προσελκύουν στο σημείο της αντίδρασης ηωσινόφιλα, αιμοπετάλια και πολυμορφοπύρηνα. Τα κύτταρα αυτά, όπως επίσης και τα μακροφάγα της περιοχής και τα ίδια τα επιθηλιακά κύτταρα, αποτελούν, δυνητικά,

μία πρόσθετη πηγή μεσολαβητών της φλεγμονής, οι οποίοι ενισχύουν τόσο την άμεση όσο και την κυτταρική φάση της.⁶

Ενώ η φλεγμονή είναι σημαντική για την αναγέννηση των ιστών και την επούλωση των τραυμάτων, η βαθιά και παρατεταμένη φλεγμονώδης απόκριση που σχετίζεται με το άσθμα μπορεί να οδηγήσει σε αναδιαμόρφωση των αεραγωγών που περιλαμβάνει την υπερτροφία των λείων μυών, την επιθηλιακή υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων και την μόνιμη απόθεση των πρωτεϊνών εξωκυτταρικής μήτρας στους αεραγωγούς (Εικόνα 1). Αυτή η διαδικασία αναφέρεται κοινώς ως αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και περιλαμβάνει υπερτροφία των λείων μυών, επιθηλιακή υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων και μόνιμη απόθεση των αεραγωγών πρωτεϊνών εξωκυτταρικής μήτρας που μπορεί να αυξήσει την απόφραξη της ροής του αέρα.¹



Εικόνα 1: Η παθοφυσιολογία του βρογχικού άσθματος¹

Το κοινό στοιχείο όλων των μορφών άσθματος είναι η ευερεθιστότητα του τραχειοβρογχικού δέντρου. Όταν η αντιδραστικότητα των αεραγωγών είναι αυξημένη, τότε τα συμπτώματα είναι βαρύτερα και περισσότερα επίμονα και η θεραπεία πρέπει να είναι εντονότερη. Επιπρόσθετα, η πνευμονική λειτουργία παρουσιάζει μεγαλύτερες ημερήσιες διακυμάνσεις και, συχνά, η δύσπνοια αφυπνίζει τους ασθενείς κατά τη διάρκεια της νύχτας ή κατά τις πρωινές ώρες.⁶

Τόσο σε φυσιολογικά άτομα όσο και σε ασθματικούς ασθενείς, η αντιδραστικότητα των αεραγωγών αυξάνεται μετά από ιογενείς λοιμώξεις του

αναπνευστικού, καθώς και μετά από έκθεση σε οξειδωτικά αέρια, όπως το όζον και το διοξείδιο του αζώτου (αλλά όχι το διοξείδιο του θείου). Οι συνέπειες των ιογενών λοιμώξεων είναι εντονότερες και η αντιδραστικότητα των αεραγωγών μπορεί να παραμένει αυξημένη επί πολλές εβδομάδες μετά από μία φαινομενικά ασήμαντη λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού. Τα αλλεργιογόνα μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της αντιδραστικότητας μέσα σε μερικά μόνο λεπτά και η αντιδραστικότητα στην περίπτωση αυτή παραμένει αυξημένη επί εβδομάδες. Εάν η ποσότητα του αντιγόνου είναι αρκετά μεγάλη, είναι δυνατόν να εμφανίζονται, σε καθημερινή βάση, επεισόδια απόφραξης και η κατάσταση αυτή να παρατείνεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, έπειτα από μία μόνο έκθεση στο αντιγόνο αυτό.⁶

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τις αποκρίσεις της φλεγμονής παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του άσθματος. Αυτή η φλεγμονή ρυθμίζεται από έναν αριθμό διαφορετικών κυτοκινών που προέρχονται κυρίως από φλεγμονώδη κύτταρα.⁴

Τα άτομα με σοβαρό άσθμα υποφέρουν από υπερβολική επιβάρυνση των αναπνευστικών συμπτωμάτων και έχουν ακραία νοσηρότητα, συμπεριλαμβανομένου αυξημένου κινδύνου των παροξύνσεων και νοσοκομειακής περίθαλψης.³ Ωστόσο, οι σοβαρές παροξύνσεις μπορεί να συμβούν σε όλους τους ασθματικούς ανεξάρτητα από τα αρχικά συμπτώματα και την υποκείμενη σοβαρότητα της νόσου. Έτσι, παρά την ετερογένεια του άσθματος στο πλαίσιο του ευρύτερου πληθυσμού, όλα τα προσβεβλημένα άτομα με άσθμα, ανεξάρτητα από την αρχική σοβαρότητα τους, μοιράζονται τον κίνδυνο για ανεπιθύμητα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου, που σχετίζονται με το άσθμα. Παρά τις σημαντικές προόδους στην κατανόηση και τη θεραπεία του άσθματος κατά την τελευταία δεκαετία, η αιτιολογία του άσθματος και των ειδικών μηχανισμών που διέπουν τη μεταβλητή σοβαρότητα της διαταραχής δεν είναι κατανοητοί.¹

Σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη διεργασία διαδραματίζουν επίσης και τα T-λεμφοκύτταρα. Έχει παρατηρηθεί η παρουσία μεγάλου αριθμού των κυττάρων αυτών στους αεραγωγούς των ασθματικών ασθενών και η παραγωγή από αυτά κυτοκινών οι οποίες ενεργοποιούν την κυτταρική ανοσία καθώς και τις χυμικές (IgE) ανοσολογικές απαντήσεις. Επιπλέον, δύο υποκατηγορίες των T-λεμφοκυττάρων (T_H1 και T_H2) έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ασθματική αντίδραση. Τα T_H1 λεμφοκύτταρα παράγουν τις κυτοκίνες IL-2 και ιντερφερόνη γ (IFN-γ), οι οποίες προάγουν, οι μεν πρώτοι τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των B-κυττάρων και η δεύτερη την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Οι κυτοκίνες IL-4 και IL-5 που απελευθερώνονται από τα λεμφοκύτταρα διεγείρουν την παραγωγή B-κυττάρων και την απελευθέρωση ανοσοσφαιρινών, ενώ η IL-5 προάγει επιπλέον τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων και, τέλος, διευκολύνει την απελευθέρωση κοκκίων από τα βασεόφιλα. Η σχετική σημασία καθενός από τους παράγοντες αυτούς στην αύξηση της αντιδραστικότητας των αεραγωγών και στην εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων του άσθματος δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Είναι μάλλον απίθανο να μπορούν να αποδοθούν όλα τα χαρακτηριστικά της ασθματικής αντίδρασης σε κάποιο κυτταρικό τύπο ή μεσολαβητή της φλεγμονής.⁶

Η βραδεία ασθματική απόκριση συνοδεύεται από μια αύξηση στην ανταπόκριση

σε εισπνεόμενη ισταμίνη και μεταχολίνη. Η συνδυασμένη απελευθέρωση βρογχοενεργών παραγόντων εξηγεί την ανάπτυξη του άμεσου βρογχόσπασμου. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί που προκαλούν την βραδεία ασθματική απόκριση δεν είναι σαφώς κατανοητοί. Η ταχεία εισροή φλεγμονωδών κυττάρων και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με κορτικοστεροειδή στην βραδεία ασθματική απόκριση δείχνουν τη συμμετοχή προφλεγμονωδών μεσολαβητών σε αυτή την διαδικασία, μεταξύ των οποίων η έκκριση κυτοκινών. Πρόσφατα, τα μακροφάγα κύτταρα βροχολίων έχουν φανεί ως ισχυροί παραγωγοί TNF-a, IL-6. Στο επίπεδο του πνευμονικού παρεγχύματος, η κατάσταση μοιάζει πιο σύνθετη. Μετά από αλλεργιογόνο ή έναυσμα αντι-IgE, τα μακροφάγα κύτταρα βροχολίων απελευθερώνουν έναν ανασταλτικό της IL-1 παράγοντα. Παρόλα αυτά, μακροφάγα κύτταρα βροχολίων από αλλεργικούς ασθενείς μπορούν να συνθέτουν *in vitro* σημαντικές ποσότητες TNF-a μετά από προσθήκη αντι-IgE.¹⁹

Έχει προταθεί ένας ρόλος για την φλεγμονή στην βλάβη της λειτουργίας του αεραγωγού και στην διαμόρφωση της βρογχικής απόκρισης. Πολλοί ερευνητές έχουν ήδη προτείνει ότι η ανάπτυξη βραδείας ασθματικής απόκρισης απαιτεί εισροή λευκοκυττάρων. Αν και οι βρογχοενεργοί μεσολαβητές παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη ταχείας ασθματικής απόκρισης, η βραδεία ασθματική απόκριση φαίνεται να απαιτεί πρόσθετα προφλεγμονώδη συστατικά. Σε κάποιες πνευμονοπάθειες, οι κυτοκίνες προερχόμενες από μακροφάγα κύτταρα βροχολίων, όπως η IL-1, ο TNF-a και η IL-6, φαίνονται σημαντικές. Υπάρχει σημαντική έκκριση TNF-a και IL-6 από μακροφάγα κύτταρα βροχολίων σε ασθενείς με βραδεία ασθματική απόκριση. Επιπλέον συγκεντρώσεις του TNF-a και της IL-6 συσχετίζονταν καλά, δείχνοντας ότι ο TNF-a μπορεί να διεγείρει την σύνθεση IL-6 από μακροφάγα κύτταρα βροχολίων. Σε ασθενείς που αναπτύσσουν βραδεία ασθματική απόκριση, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το αλλεργιογόνο προκαλεί μια εξαρτώμενη από IgE σύνθεση TNF-a και IL-6 που συντηρείται στη διάρκεια και μετά από την βραδεία ασθματική απόκριση από ένα δεύτερο ερέθισμα. Έχει παρατηρηθεί ότι ταυτόχρονη συνδιέγερση από αντι-IgE και ανασυνδυασμένη IF- γ αύξησε σημαντικά την παραγωγή TNF-a από μακροφάγα κύτταρα βροχολίων σε φυσιολογικά άτομα. Επιπλέον, σε βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με άσθμα έχουν ανιχνευθεί βιολογικά ενεργές συγκεντρώσεις του παράγοντα διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων που προκαλούν έκφραση mRNA μονοκινών. Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός προτείνει ότι πολλοί πληθυσμοί κυττάρων, όπως τα μαστοκύτταρα, μακροφάγα κύτταρα βροχολίων, ηωσινόφιλα απελευθερώνουν PAF (platelet-activating factor) μετά από διέγερση εξαρτώμενη από IgE. Αυτός ο μεσολαβητής είναι επίσης γνωστό ότι αυξάνει την παραγωγή TNF-a από μακροφάγα κύτταρα βροχολίων αλλά ο ρόλος του στην σύνθεση IL-6 δεν έχει αναγνωριστεί μέχρι στιγμής.¹⁹

1.1.4. Ερεθίσματα πρόκλησης ασθματικών κρίσεων

Τα ερεθίσματα που επιδρούν στους αεραγωγούς και εκλύουν ασθματικές κρίσεις ταξινομούνται σε επτά κύριες κατηγορίες: αλλεργιογόνα, φάρμακα, περιβαλλοντικοί παράγοντες, ουσίες του εργασιακού χώρου, λοιμώδεις παράγοντες, σωματική άσκηση

συναισθηματικές αντιδράσεις, ενδοκρινικοί παράγοντες και συνοσηρότητες.

1.1.4.1. Αλλεργιογόνα που προκαλούν άσθμα

Το αλλεργικής αιτιολογίας άσθμα εξαρτάται από την παρουσία ανοσοσφαιρινών τύπου IgE, σε αυξημένο ποσό. Η αύξηση αυτή ελέγχεται από τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα. Οι ασθματικές κρίσεις εκλύονται μετά από την αλληλεπίδραση του αλλεργιογόνου με τα μόρια των IgE ανοσοσφαιρινών που είναι προσκολλημένα πάνω στην επιφάνεια των ιστιοκυττάρων. Τα περισσότερα από τα αλλεργιογόνα τα οποία προκαλούν ασθματικές κρίσεις είναι αερομεταφερόμενα. Για να αναπτυχθεί ευαισθησία σε αυτά, πρέπει να υπάρχουν σε περίσσεια στο περιβάλλον του ασθενούς για ικανό χρονικό διάστημα. Όταν ένα άτομο ευαισθητοποιηθεί σε κάποιο αλλεργιογόνο, παρουσιάζει έντονες αντιδράσεις και σοβαρούς ασθματικούς παροξυσμούς μετά από έκθεσή του, ακόμα και σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες του αλλεργιογόνου αυτού. Οι άνοσοι μηχανισμοί σχετίζονται αιτιολογικά με το 25-30% των περιπτώσεων του άσθματος και είναι πιθανόν να συμβάλλουν στην εκδήλωση του 1/3.⁶

Σε άλλες μελέτες έχουν υπολογισθεί υψηλότερες τιμές επιπολασμού, είναι όμως δύσκολη η ερμηνεία των δεδομένων, λόγω της παρουσίας συγχυτικών παραγόντων. Το αλλεργικό άσθμα παρουσιάζει συχνά εποχιακή κατανομή. Αυτό είναι ιδιαίτερα συνηθισμένο σε παιδιά και νέους ενήλικες. Οι περιπτώσεις που οφείλονται σε πούπουλα, τρίχωμα ζώων, ακάρεα της σκόνης, σπόρους μυκήτων και άλλα είδη αντιγόνων, που συναντώνται διαρκώς στο περιβάλλον, δεν παρουσιάζει εποχιακή κατανομή. Η έκθεση σε κάποιο αλλεργιογόνο προκαλεί, κατά κανόνα, μια άμεση αντίδραση κατά την οποία η απόφραξη των αεραγωγών αναπτύσσεται μέσα σε διάστημα λίγων λεπτών και ακολούθως υποχωρεί. Σε ένα ποσοστό 30-50%, εμφανίζεται μετά από 6-10 ώρες ένα δεύτερο «κύμα» βρογχόσπασμου (όψιμη αντίδραση). Τέλος, σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών, παρατηρείται μόνο η όψιμη αντίδραση. Η αντίδραση αυτή εθεωρείτο, παλαιότερα, απαραίτητη για την ανάπτυξη αυξημένης αντιδραστικότητας των αεραγωγών, μετά από έκθεση σε κάποιο αντιγόνο. Πρόσφατα όμως δεδομένα απέδειξαν ότι δεν ισχύει κάτι τέτοιο. Ο μηχανισμός με τον οποίο ένα εισπνεόμενο αντιγόνο προκαλεί την εμφάνιση ασθματικής κρίσης, συνιστάται, εν μέρει, στην αλληλεπίδραση αντιγόνου - αντισώματος στην επιφάνεια των πνευμονικών ιστιοκυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση και απελευθέρωση μεσολαβητών της αντίδρασης άμεσης υπερευαισθησίας. Σύμφωνα με νεώτερες θεωρίες, ειδικά αντιγονικά σωματίδια διαπερνούν τους αμυντικούς μηχανισμούς των πνευμόνων και έρχονται σε επαφή με τα ιστιοκύτταρα του επιθηλίου του αυλού των κεντρικών αεραγωγών. Προς το παρόν, δεν έχει προταθεί κάποιος μηχανισμός που να ερμηνεύει τον τρόπο με τον οποίο το αντιγόνο έρχεται σε επαφή με τα ιστιοκύτταρα του υποβλεννογονίου χιτώνα.⁶

1.1.4.2. Φάρμακα που προκαλούν ασθματικές κρίσεις

Οι φαρμακευτικές ουσίες, οι οποίες συχνότερα προκαλούν ασθματικές κρίσεις, είναι η ασπιρίνη, οι χρωστικές ουσίες τύπου ταρτραζίνης, οι β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές και οι παράγοντες που προκαλούν θείωση. Η πρόκληση βρογχόσπασμου από φάρμακα πρέπει να αναγνωρίζεται διότι συνδέεται με μεγάλη νοσηρότητα. Πρέπει μάλιστα να επισημανθεί το γεγονός ότι έχουν περιγραφεί περιπτώσεις θανάτων μετά από λήψη ασπιρίνης (ή άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων) και β-αδρενεργικών ανταγωνιστών. Η ευαισθησία του αναπνευστικού στην ασπιρίνη παρατηρείται συχνότερα σε ενήλικες, αν και η κατάσταση αυτή έχει περιγραφεί και σε παιδιά. Η αρχική εκδήλωση του προβλήματος αυτού είναι μία χρόνια αγγειοκινητική ρινίτιδα και στη συνέχεια αναπτύσσεται υπερπλασία του βλεννογόνου της ρινός και των παραρρινίων κόλπων και σχηματίζονται ρινικοί πολύποδες. Τελικά, εκδηλώνεται άσθμα προοδευτικής βαρύτητας. Με τη λήψη, έστω και μικρής ποσότητας, ασπιρίνης τα άτομα που έχουν ευαισθησία εμφανίζουν ρινική και οφθαλμική συμφόρηση και επεισόδια βρογχόσπασμου, συχνά μεγάλης βαρύτητας. Ο επιπολασμός της εμφάνισης ευαισθησίας στην ασπιρίνη σε ασθματικούς ασθενείς ποικίλλει από μελέτη σε μελέτη, πάντως οι περισσότεροι ειδικοί την υπολογίζουν στο επίπεδο του 10%. Παρατηρείται διασταυρούμενη ευαισθησία μεταξύ της ασπιρίνης και των άλλων μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (όπως η ινδομεθακίνη, η φαινοπροφένη, η ναπροξένη, η ιβουπροφένη, το μεφαιναμικό οξύ και η φαινυλβουταζόνη). Καλώς ανεκτές είναι ουσίες όπως η ακεταμινοφαίνη, το σαλικυλικό νάτριο, το σαλικυλαμίδιο και η προποξυφαίνη. Οι εκτιμήσεις του ποσοστού της διασταυρούμενης ευαισθησίας μεταξύ ασπιρίνης και τα ταρτραζίνης (ή άλλων χρωστικών) δεν είναι γενικά αποδεκτές, πάντως θεωρείται ότι ποσοστό περί 10% ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Η ευαισθησία στην ταρτραζίνη, η οποία παρατηρείται σε ευαίσθητους στην ασπιρίνη ασθματικούς ασθενείς, αποτελεί μία αξιοπερίεργη επιπλοκή, διότι οι χρωστικές αυτού του τύπου είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η πρόσληψή τους από τους ασθενείς αυτούς, χωρίς να γίνεται αντιληπτή.⁶

Η απευαισθητοποίηση στην ασπιρίνη επιτυγχάνεται με την καθημερινή χορήγησή της σε ευαίσθητα άτομα και συνεπάγεται την ανάπτυξη ανοχής και στους άλλους μη-στεροειδείς αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου εκλύεται βρογχόσπασμος από την ασπιρίνη και τα παρόμοια με αυτή φάρμακα, δεν έχει προς το παρόν αποσαφηνισθεί. Γίνεται όμως δεκτό ότι οφείλεται στην εκλεκτική απελευθέρωση λευκοτριενίων, η οποία προκαλείται από την ασπιρίνη. Δεν φαίνεται να συμμετέχει ο μηχανισμός της άμεσης υπερευαισθησίας. Υπάρχουν αποτελεσματικοί αναστολείς της σύνθεσης λευκοτριενίων και της δράσης των υποδοχέων τους, γεγονός το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού.⁶

Επειδή οι β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές προκαλούν απόφραξη των αεραγωγών σε ασθματικούς ασθενείς, καθώς και σε άλλες κατηγορίες ατόμων με αυξημένη αντιδραστικότητα των αεραγωγών, δεν πρέπει να χορηγούνται στις περιπτώσεις

αυτές. Ακόμα και οι εκλεκτικοί β₁-αναστολείς παρουσιάζουν την ιδιότητα αυτή, ιδιαίτερα όταν χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις. Έχει παρατηρηθεί επιδείνωση του άσθματος σε ασθενείς στους οποίους εφαρμόζονται, τοπικά, σκευάσματα που περιέχουν β₁-αναστολείς για τη θεραπεία του γλαυκώματος.⁶

Οι παράγοντες οι οποίοι προκαλούν θείωση, όπως για παράδειγμα το μεταδισουλφιδικό κάλιο, το σουλφιδικό κάλιο και νάτριο και το διοξείδιο του θείου, χρησιμοποιούνται ευρύτατα από τις βιομηχανίες τροφίμων και τις φαρμακοβιομηχανίες, ως παράγοντες εξυγίανσης και συντήρησης των προϊόντων τους. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν σε ευαίσθητα άτομα οξεία απόφραξη των αεραγωγών. Η έκθεση στους παράγοντες αυτούς γίνεται με κατανάλωση των τροφίμων ή των ποτών που τους περιέχουν (σαλάτες, φρέσκα φρούτα, πατάτες, οστρακοειδή και κρασί). Επίσης, παρόξυνση του άσθματος έχει παρατηρηθεί μετά από χρήση οφθαλμικών διαλυμάτων, ενδοφλέβιων γλυκοκορτικοειδών και ορισμένων εισπνεόμενων βρογχοδιασταλτικών, στα σκευάσματα των οποίων περιέχονται οι χημικοί αυτοί παράγοντες. Τόσο η επίπτωση όσο και ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι παράγοντες αυτοί προκαλούν βρογχόσπασμο είναι άγνωστα.⁶

1.1.4.3. Περιβάλλον και ατμοσφαιρικοί ρύποι στην ανάπτυξη άσθματος

Οι παράγοντες του περιβάλλοντος οι οποίοι συνδέονται αιτιολογικά με το άσθμα έχουν σχέση με τις κλιματικές εκείνες συνθήκες οι οποίες συμβάλλουν στη συσσώρευση ατμοσφαιρικών ρύπων ή αντιγόνα. Αυτές οι συνθήκες επικρατούν, συνήθως, σε βιομηχανικές ή πυκνοκατοικημένες αστικές περιοχές και, συχνά, σχετίζονται με τη θερμοκρασιακή αναστροφή και άλλες καταστάσεις οι οποίες ευνοούν τη στασιμότητα αερίων μαζών. Στις περιπτώσεις αυτές, όλα τα άτομα του πληθυσμού είναι δυνατόν να εμφανίσουν συμπτώματα από το αναπνευστικό, αλλά οι πάσχοντες από άσθμα ή από άλλες παθήσεις του αναπνευστικού, παρουσιάζουν σοβαρότερες διαταραχές. Ρύποι του περιβάλλοντος που προκαλούν διαταραχές του αναπνευστικού είναι το όζον, το διοξείδιο του αζώτου και το διοξείδιο του θείου. Η τελευταία αυτή χημική ένωση προκαλεί επιπλοκές μόνο όταν βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και εμφανίζει τη μέγιστη δράση της σε περιόδους με υψηλό αερισμό.⁶

Από την άλλη πλευρά, το κάπνισμα αναγνωρίζεται ως μείζων παράγοντας που συμβάλλει στο βαρύ άσθμα, επιδεινώνοντας τα συμπτώματα και επισπεύδοντας την εξασθένηση της λειτουργίας των πνευμόνων.⁴ Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου οδηγεί σε αντίσταση στα κορτικοστεροειδή σε μοριακό επίπεδο απενεργοποιώντας την HDAC2 (Histone deacetylase 2).²⁰

1.1.4.4. Επαγγελματικοί παράγοντες που προκαλούν άσθμα

Το επαγγελματικό άσθμα αποτελεί σοβαρό πρόβλημα της Δημόσιας Υγείας και έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις οξείας και χρόνιας απόφραξης των αεραγωγών μετά από έκθεση σε ένα μεγάλο αριθμό χημικών, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Έτσι, βρογχόσπασμος μπορεί να προκληθεί μετά από έκθεση σε άλατα μετάλλων (π.χ. λευκόχρυσου, χρωμίου, νικελίου), σε σκόνη ξύλου ή φυτών (π.χ.

οξιάς, ερυθρού Κέδρου, αλεύρου, δημητριακών, χλωρών κόκκων καφέ, αραβικού κόμμι, τραγάκανθου), σε φάρμακα (π.χ. αντιβιοτικά, πιπεραζίνη και σιμετιδίνη), σε βιομηχανικές χημικές ουσίες και πλαστικά (π.χ. δισοκυανικό τολουόλιο, ανυδρίτη του φθαλικού οξέος, τριμελλιτικό ανυδρίτη, θειούχες ενώσεις, αιθυλενοδιαμίνη και διάφορες χρωστικές), σε βιολογικά ένζυμα (π.χ. απορρυπαντικά και παγκρεατικά ένζυμα), σε περιττώματα ζώων και εντόμων, καθώς και σε άλλα προϊόντα απέκκρισης ζωντανών οργανισμών. Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι η έκθεση σε χημικά, τα οποία δεν προκαλούν ευαισθητοποίηση σε ορισμένα άτομα (ιδιαίτερα ουσίες οι οποίες περιέχονται σε κράματα, διαλύτες και πλαστικά), μπορούν να τους προκαλέσουν διαταραχές και κατά τη διάρκεια μη εργασιακών δραστηριοτήτων τους.⁶

Φαίνεται ότι τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση βρογχόσπασμου, μέσα στα πλαίσια του επαγγελματικού άσθματος: (1) σε ορισμένες περιπτώσεις, ο υπεύθυνος παράγων προκαλεί στη σύνδεση ειδικών IgE και συνεπώς συμμετέχουν ανοσολογικού τύπου διεργασίες (οι ανοσολογικές αντιδράσεις μπορεί να είναι άμεσες, όπως είναι οι μικτού τύπου), (2) σε άλλες περιπτώσεις, η χημική ουσία που προκαλεί την απελευθέρωση βρογχοσυσπαστικών παραγόντων και, τέλος (3), σε κάποιες περιπτώσεις, ο αιτιολογικός παράγων προκαλεί άμεση ή αντανακλαστική διέγερση των αεραγωγών σε άτομα με έκδηλο ή λανθάνον άσθμα.⁶

1.1.4.5. Λοιμώξεις που προκαλούν άσθμα

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού αποτελούν την πλέον συχνή αιτία έκλυσης ασθματικών κρίσεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ιοί που προσβάλλουν το αναπνευστικό αποτελούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες. Σε μικρά παιδιά, ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός, και η ιοί parainfluenza είναι οι σπουδαιότεροι λοιμώδεις παράγοντες, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά και σε ενήλικες οι ρινοϊοί και οι ιοί της γρίπης είναι οι σημαντικότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Για να προκληθεί κρίση άσθματος, δεν αρκεί ο απλός αποικισμός του τραχειοβρογχικού δένδρου, αλλά πρέπει να έχει προηγηθεί ή να υπάρχει ενεργός λοίμωξη της αναπνευστικής οδού. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι ιοί προκαλούν ασθματικούς παροξυσμούς, πιθανόν συσχετίζεται με την παραγωγή κυτοκινών από Τα-λεμφοκύτταρα, οι οποίες θα διευκολύνουν τη διάχυση των ήδη ευαίσθητων αεραγωγών από φλεγμονώδη κύτταρα.⁶

1.1.4.6. Σωματική άσκηση ως αίτιο για την ανάπτυξη άσθματος

Η σωματική δραστηριότητα είναι από τους συνηθέστερους εκλυτικούς παράγοντες οξέων επεισοδίων άσθματος. Αυτό το ερέθισμα διαφέρει από τις άλλες φυσικές προκλήσεις, όπως τα αντιγόνα ή οι ιογενείς λοιμώξεις, κατά το ότι δεν αφήνει κάποιο μακροχρόνιο κατάλοιπο ούτε μεταβάλλει την αντιδραστικότητα των αεραγωγών. Η σωματική άσκηση πιθανώς προκαλεί κάποιου βαθμού βρογχόσπασμο σε όλους τους ασθματικούς, ενώ για μερικούς μόνο αυτή πυροδοτεί την εμφάνιση συμπτωμάτων.

Πάντως, όταν κάποιοι ασθενείς παρακολουθούνται επί ικανό χρονικό διάστημα, διαπιστώνεται ότι συχνά αναπτύσσουν επανειλημμένα επεισόδια απόφραξης των αεραγωγών ανεξάρτητα από σωματική άσκηση· επομένως, η έναρξη αυτού του προβλήματος είναι συχνά η πρώτη εκδήλωση του ασθματικού συνδρόμου. Υπάρχει σημαντική συσχέτιση αφενός μεταξύ του αερισμού που προκαλεί η άσκηση, της θερμοκρασίας και της υγρασίας του εισπνεόμενου αέρα και αφετέρου του μεγέθους της απόφραξης μετά την άσκηση. Έτσι, υπό τις ίδιες συνθήκες εισπνεόμενου αέρα, το τρέξιμο θα προκαλέσει σοβαρότερη κρίση άσθματος από το βάδισμα. Αντίθετα, για την ίδια άσκηση, η εισπνοή ψυχρού αέρα θα αυξήσει σημαντικά την αντίδραση, ενώ ο θερμός και υγρός αέρας θα την αμβλύνει ή θα την αποτρέψει. Ο μηχανισμός με τον οποίο η σωματική δραστηριότητα δημιουργεί απόφραξη ίσως έχει σχέση με μία θερμικής αιτιολογίας υπεραιμία και συμφόρηση των τριχοειδών του βρογχικού τοιχώματος και όχι με σύσπαση λείων μυϊκών ινών.⁶

1.1.4.7. Συναισθηματική φόρτιση και ο ρόλος της στην ανάπτυξη άσθματος

Ένας μεγάλος αριθμός αντικειμενικών δεδομένων δείχνει ότι οι ψυχολογικοί παράγοντες μπορούν να αλληλεπιδρούν με την ασθματική προδιάθεση και να επιβραδύνουν ή να βελτιώνουν την κατάσταση του ασθενούς. Τόσο η φύση, όσο κι οι μορφές της αλληλεπίδρασης αυτής είναι πολύπλοκες, αλλά στους μισούς περίπου ασθενείς έχει αποδειχθεί ότι είναι λειτουργική, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό. Τα μέχρι τώρα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο παράγοντας αυτός μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε συγκεκριμένους ασθενείς που παρουσιάζουν έντονη ψυχική συμμετοχή σε διάφορα ερεθίσματα.⁶

Τα άτομα αυτής της κατηγορίας, είναι δυνατόν να αυξήσουν ή να ελαττώσουν την αποτελεσματικότητα των αδρενεργικών και χολινεργικών ερεθισμάτων στους αεραγωγούς των πνευμόνων τους, αν δεχθούν την κατάλληλη υποβολή. Ο βαθμός στον οποίο οι ψυχολογικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση ή την παράταση ενός παροξυσμού δεν είναι σταθερός αλλά ποικίλλει από άτομο σε άτομο και από επεισόδιο σε επεισόδιο.⁶

1.1.4.8. Ενδοκρινικοί παράγοντες, Συνοσηρότητες με το βρογχικό άσθμα

Η σύνδεση μεταξύ παχυσαρκίας, άσθματος και ατοπικών νόσων σε ατομικό επίπεδο είναι σχετικά πρόσφατη θεώρηση. Η παχυσαρκία είναι ένας νέος παράγοντας κινδύνου τόσο για το άσθμα, όσο και για την βαρύτητά του, ειδικά στις γυναίκες, με την απώλεια βάρους να συνοδεύεται από βελτιωμένο έλεγχο του άσθματος. Επιπλέον από τη σύνδεση με την παχυσαρκία, ενδοκρινικοί παράγοντες όπως η λεπτίνη και άλλες αδιποκίνες όπως η αδιπονεκτίνη και η ρεζιστίνη δρουν επίσης στα ανοσοκύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα.²¹

Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο άσθματος στα παιδιά, καθώς και στους ενήλικες. Ο συσχετισμός παχυσαρκίας και ατοπίας είναι λιγότερο σαφής. Πολλές διασταυρούμενες μελέτες έχουν υποθέσει ότι η παχυσαρκία είναι παράγων κινδύνου για άσθμα. Εντούτοις μελέτες προοπτικής είναι αναγκαίες για να

προσδιοριστεί η χρονική σχέση (η αιτιακή κατεύθυνση) της συσχέτισης παχυσαρκίας με άσθμα. Κάποιες μελέτες προοπτικής έχουν επιβεβαιώσει ότι η παχυσαρκία είναι παράγον κινδύνου για ανάπτυξη άσθματος. Μελέτες που έχουν συμπεριλάβει μετρήσεις της λειτουργίας των πνευμόνων έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μία μελέτη βρήκε αυξημένο κίνδυνο βρογχικής υπεραντιδραστικότητας σε παχύσαρκα άτομα. Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν μικρότερο κίνδυνο βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και λιγότερη απόφραξη της ροής αέρα σε παχύσαρκα άτομα, αν και αυτά τα άτομα είχαν περισσότερα συμπτώματα τύπου άσθματος και χρησιμοποιούσαν περισσότερα βρογχοδιασταλτικά από τα μη παχύσαρκα άτομα.⁹ Η απώλεια βάρους ή μια ελάχιστη αύξηση βάρους στη διάρκεια επανεξέτασης συνδέεται σημαντικά με την ύφεση του άσθματος. Στην πραγματικότητα, παρά τις διαφωνίες όσον αφορά στην σχέση μεταξύ βαρύτητας και BMI, η ύφεση του άσθματος μετά από απώλεια βάρους έχει επανειλημμένα αναφερθεί. Από την ευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη ENFUMOSA προέκυψε ότι το θηλυκό γένος και η γυναικεία παχυσαρκία ήταν ιδιαίτεροι παράγοντες κινδύνου για βαρύ άσθμα.²⁰ Το βαρύ άσθμα είναι δύο με τρεις φορές πιο κοινό στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Κατά την έναρξή του στην παιδική ηλικία, το άσθμα είναι πιο κοινό στα αγόρια, αλλά κατά την πρώτη εφηβεία, το βαρύ άσθμα γίνεται πιο συνηθισμένο στα κορίτσια από ό,τι στα αγόρια και αυτό το μοτίβο επιμένει και στην ενηλικίωση. Η μεγαλύτερη επικράτηση του άσθματος που ξεκινά σε ενήλικες και του σοβαρού άσθματος στις γυναίκες παρά στους άνδρες, είναι πιθανώς αποτέλεσμα ενδοκρινικών παραγόντων, αφού έχουν αναφερθεί ισχυροί συσχετισμοί με τον μηνιαίο κύκλο, ενώ στην εγκυμοσύνη το άσθμα συνήθως βελτιώνεται, ιδίως στο μεσαίο και το τελευταίο τρίμηνο.²¹

Οι ορμόνες του φύλου έχουν παρουσιαστεί ως ο λόγος για τα χειρότερα αποτελέσματα του άσθματος στις γυναίκες. Όμως, συνυπολογίζοντας και άλλους παράγοντες, οι γυναίκες έχουν επίσης μεγαλύτερη πιθανότητα ύφεσης από τους άνδρες, στηρίζοντας έτσι μια πιο σύνθετη σχέση μεταξύ φύλου και βαρύτητας του άσθματος από ότι έχει αναφερθεί.⁴ Η ανακάλυψη ενός γενετικού πολυμορφισμού του υποδοχέα οιστρογόνων που επηρεάζει την βαρύτητα της νόσου, παρέχει επίσης μια γενετική βάση για κάποια από αυτά τα ενδοκρινικά αποτελέσματα.²¹ Τέλος, η θυρεοτοξίκωση είναι ένας αναγνωρισμένος ενδοκρινικός παράγοντας που οδηγεί σε απώλεια ελέγχου του άσθματος.⁶

1.1.5. Αναδιαμόρφωση αεραγωγού στο βρογχικό άσθμα

Όλες οι μελέτες του σοβαρού άσθματος έχουν ταυτοποιήσει έναν βαθμό σταθερής απόφραξης αεραγωγού ως ιδιαίτερο χαρακτηριστικό. Εντούτοις, υπάρχει μια υποομάδα του βαρέος άσθματος με πολύ ασταθείς αεραγωγούς και έντονη βρογχική υπεραπόκριση, που ανιχνεύεται ακόμη και μετά από εισπνοή ισοτονικού αλατούχου διαλύματος, κάτι που έχει περιγραφεί ως ασταθές άσθμα. Αυτοί οι ασθενείς κινδυνεύουν από αναπάντεχο οξύ βρογχόσπασμο που μπορεί να είναι καταστροφικός. Οι ασθενείς συχνά είναι νέοι και γυναίκες με υψηλή ατοπία. Σε αντίθεση, το πιο δύσκολο στη αντιμετώπιση, χρόνια άσθμα συνοδεύεται από μειωμένη βασική

πνευμονική λειτουργία, που είναι μόνο εν μέρει αναστρέψιμη με έναν β2-αγωνιστή και συνοδεύεται από αυξημένους όγκους πνευμόνων, μειωμένη ζωτική ικανότητα, και έναν βαθμό υποξαιμίας. Η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών είναι ένας μηχανισμός προστασίας τους από τον επαναλαμβανόμενο βρογχόσπασμο. Αν και η σημασία της αναδιαμόρφωσης του αεραγωγού στο άσθμα αμφισβητείται, οι παράγοντες που προδιαθέτουν την επιτάχυνση της ελάττωσης της πνευμονικής λειτουργίας σε βάθος χρόνου, περιλαμβάνουν το κάπνισμα, το ανδρικό φύλο, ταυτόχρονη ρινοκολπίτιδα, και επίμονη ηωσινοφιλία στα πτύελα.²¹

Άλλες ανωμαλίες που σχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου περιλαμβάνουν την απώλεια ελαστικής επαναφοράς και αυξημένη συμμόρφωση πνευμόνων, που είναι αμφοτέρως παράγοντες κινδύνου για σχεδόν μοιραίο άσθμα. Καθώς το άσθμα γίνεται πιο βαρύ, ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι μια μειωμένη αντίληψη της δύσπνοιας, της οποίας ο υποκείμενος μηχανισμός είναι άγνωστος. Τέτοιοι ασθενείς βρίσκονται σε σαφώς αυξημένο κίνδυνο για μια κρίση απειλητική για τη ζωή τους.⁶

Άλλο χαρακτηριστικό είναι η αυξημένη παραγωγή βλέννας η οποία είναι πολύ προβληματική στο σοβαρό άσθμα. Η μεταπλασία καλυκοειδών κυττάρων είναι μερικώς οδηγούμενη από την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένες κυτοκίνες ειδικά τον TNF-α και την IL-13 που υποδηλώνει ότι αυτό το χαρακτηριστικό του άσθματος είναι ανιχνεύσιμο με τις καινούργιες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Όχι μόνο η ποσότητα και η φλεβοελαστικές ιδιότητες της βλέννας αυξάνονται στο σοβαρό άσθμα αλλά και αυτή η παραγωγή διασπείρεται στους πολύ μικρούς αεραγωγούς όπου η δράση της στην πνευμονική λειτουργία πιθανόν να είναι επιβλαβής.²¹

1.1.6. Παθοφυσιολογικά δεδομένα βρογχικού άσθματος

Παρά το γεγονός ότι μεγάλο μέρος πρέπει να διερευνηθεί για την παθοφυσιολογία του άσθματος, το κύριο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό στο άσθμα είναι η ελάττωση της διαμέτρου του αυλού των αεραγωγών. Αυτή προκαλείται από τη σύσπασση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων, την αγγειακή συμφόρηση, το οίδημα του τοιχώματος των βρόγχων και τη συνεχή παρουσία πυκνόρρευτων εκκρίσεων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της αντίστασης των αεραγωγών, η ελάττωση του όγκου αέρα που αποβάλλεται κατά τη διάρκεια βίαιης εκπνοής και η μείωση της ταχύτητας ροής, η υπερδιάταση των πνευμόνων και του θώρακα, η αύξηση του έργου της αναπνοής, η διαταραχή της λειτουργίας των αναπνευστικών μυών και η μεταβολή των ελαστικών δυνάμεων του πνεύμονα, η ανώμαλη κατανομή του αερισμού και της αιμάτωσης, με εμφάνιση διαταραχής στη σχέση αερισμού αιμάτωσης, και, τέλος, η διαταραχή των συγκεντρώσεων των αερίων του αίματος. Έτσι, ενώ ουσιαστικά το άσθμα είναι μία νόσος των αεραγωγών, στην πράξη, κατά τη διάρκεια μιας οξείας ασθματικής προσβολής, διαταράσσονται όλες οι παράμετροι της αναπνευστικής λειτουργίας. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με έντονα προβλήματα, διαπιστώνονται, συχνά, ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες συμβατές με υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας και πνευμονική υπέρταση.⁶

Η κύρια παθοφυσιολογική εκδήλωση είναι η διάχυτη στένωση των αεραγωγών, η οποία υποχωρεί αυτομάτως ή μετά από κάποια θεραπευτική παρέμβαση. Περίπου το

60% της ευαισθησίας στο άσθμα οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, με αλλεργικούς δείκτες, όπως τα επίπεδα IgE στον ορό που αποδεικνύουν κληρονομικότητα. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν επίσης ένα μεγάλο ρόλο στην ευαισθησία στο άσθμα και είναι πιθανό να οδηγούν σε αυξήσεις που σημειώθηκαν κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Πιο πρόσφατα δεδομένα από μελέτες κλωνοποίησης έχουν δείξει ότι οι αλλεργικές ασθένειες μπορεί επίσης να προκύψουν από μια δυσλειτουργία του επιθηλιακού φραγμού σε προσβεβλημένους ιστούς.²²

1.1.7. Βρογχικό άσθμα και γονίδια

Το άσθμα και οι αλλεργικές διαταραχές είναι πολύπλοκες γενετικές ασθένειες στις οποίες πολλαπλά γονίδια και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν ένα ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη τους. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους μπορεί να είναι το κλειδί στην ανάπτυξη και έκφραση της νόσου. Οι παράγοντες που ελέγχουν την απόκριση στην φλεγμονή έχουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση του άσθματος. Αυτή η φλεγμονή ρυθμίζεται από ποικίλες κυτοκίνες προερχόμενες από φλεγμονώδη και ιστικά κύτταρα. Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η *IL-1*, η *IL-6* και ο *TNF-α* έχουν σημαντικό ρόλο στο άσθμα.⁴

Πολυάριθμες μελέτες έχουν τεκμηριώσει ενώσεις μεταξύ γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση στην οξειδωτική καταπόνηση και των αναπνευστικών φαινοτύπων, αλλά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι δεν μπορεί να είναι συνεχής σε ολόκληρες εθνοτικές ομάδες λόγω διαφορών σε ενδο- και δια-εθνοτικές συχνότητες αλληλόμορφων. Η αυξανόμενη επικράτηση του άσθματος φαίνεται να συνδέεται με διαφορετικούς παράγοντες. Η ταχεία αλλαγή στον επιπολασμό του άσθματος δεν συνδέεται με γενετικές αλλαγές σε πληθυσμούς επειδή οι μηχανισμοί αυτοί είναι πολύ αργοί. Δεδομένα σχετικά με το ρόλο των αποτελεσμάτων των περιβαλλοντικών εκθέσεων σχετικά με τον κίνδυνο του άσθματος θα μπορούσαν να προκύψουν με διασταυρούμενες μελέτες που δεν επηρεάζονται από χρονικές μεταβολές. Το αποτέλεσμα της έκθεσης του περιβάλλοντος και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών παραγόντων και περιβαλλοντικών συνθηκών είναι ακόμα ένα θέμα συζήτησης. Λίγες μελέτες, στην πραγματικότητα, έχουν εξετάσει την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των γενετικών παραγόντων και του περιβάλλοντος.²³

Η μελέτη των γενετικών παραγόντων που εμπλέκονται σε πολύπλοκες παθολογίες όπως το άσθμα είναι επίπονη, όχι μόνο λόγω της ανθρώπινης γενετικής μεταβλητότητας, την ατελή διεισδυτικότητα αλλά και επειδή, στις πολύπλοκες ασθένειες, η σημασία και των γονιδίων και οι αλληλεπιδράσεις γονιδίου προς γονίδιο και γονιδίου με το περιβάλλον πρέπει να συνυπολογιστούν. Η αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος είναι ένας μηχανισμός όπου τα γονίδια καθορίζουν τις δυνατότητες και τους περιορισμούς μίας αντίδρασης ενός οργανισμού σε σχέση με τις συνθήκες περιβάλλοντος. Τα αποτελέσματα των γενετικών και των περιβαλλοντικών συνιστωσών επικαλύπτονται, και σε πολλές περιπτώσεις μπορεί το ένα να σχετίζεται με το άλλο. Έτσι, ένας ορισμένος φαινότυπος ή νόσος μπορεί να προκληθεί από ένα γενετικό παράγοντα, από μία περιβαλλοντική κατάσταση, ή με συνδυασμό των δύο.²³

Αρκετές μελέτες έχουν επισημάνει ότι το οξειδωτικό στρες καταστρέφει την πνευμονική λειτουργία και θα μπορούσε να λειτουργήσει ως βασικός παράγοντας στην επιδείνωση των συμπτωμάτων του άσθματος. Οι ζημίες που προκαλούνται από οξειδωτική βλάβη οδηγούν σε αύξηση της αντιδραστικότητας των αεραγωγών ή/και εκκρίσεις, επηρεάζουν την παραγωγή χημειοτακτικών και αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επιδεινώνουν την φλεγμονή. Αρκετά υποψήφια γονίδια έχουν ενοχοποιηθεί στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος. Ειδικότερα εκείνα που εμπλέκονται σε οξειδωτικούς απαντήσεις στο στρες είναι υποψήφια για άσθμα. Η επικράτηση των πολυμορφισμών των γονιδίων ποικίλλει σημαντικά σε παγκόσμιο επίπεδο, και ως εκ τούτου, η εθνικότητα θα πρέπει να θεωρηθεί ως ένας παράγοντας που θα μπορούσε να δράσει και να επηρεάσει την ανάπτυξη άσθματος. Η διαφορετική συχνότητα ενδογενώς σε έναν πληθυσμό καθώς και μεταξύ πληθυσμών, υποδηλώνουν ότι η σύνδεση μεταξύ ενός δεδομένου γενετικού πολυμορφισμού με το άσθμα δεν μπορεί να συναχθεί από μια εθνοτική ομάδα σε μία άλλη.²³

Οι κυτοκίνες, οι μεσολαβητές που εμπλέκονται στην ρύθμιση τόσο φλεγμονής και σύνθεσης IgE, μπορούν να χωριστούν σε διάφορες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των ιντερφερονών, *TNF-α* και ιντερλευκίνες, μεταξύ άλλων. Στην πραγματικότητα, η γενετική ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης είναι πιθανό να έχει σημαντική επίπτωση στην εκδήλωση της νόσου.¹⁹

1.1.8. Αντιμετώπιση βρογχικού άσθματος

Η στένωση των βρόγχων είναι το κύριο χαρακτηριστικό του βρογχικού άσθματος. Παλαιότερα η στένωση των βρόγχων στο βρογχικό άσθμα είχε αποδοθεί αποκλειστικά σε βρογχόσπασμο και ο βρογχόσπασμος είχε γίνει περίπου συνώνυμο του βρογχικού άσθματος. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο βρογχόσπασμος είναι μέρος μόνο της παθολογίας του βρογχικού άσθματος, το οποίο χαρακτηρίζεται πλέον ως «χρόνια φλεγμονώδης νόσος». Συνέπεια αυτού είναι τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, (κυρίως εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή που παρουσιάζουν σε πολύ μικρότερο βαθμό τις ανεπιθύμητες ενέργειες των συστηματικών) να αποτελούν πλέον τη βάση της θεραπείας του χρόνιου άσθματος. Αν και τα συμπτώματα του άσθματος είναι διαλείποντα σε ορισμένα άτομα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η ασθένεια μπορεί να ελεγχθεί καλά με θεραπεία εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών μόνο, ή σε συνδυασμό με μακράς διάρκειας β-αγωνιστές και άλλες θεραπείες σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες διαχείρισης. Εντούτοις, ως και 10% των πασχόντων από άσθμα έχουν βαριά πάθηση και παραμένουν άσχημα ελεγχόμενοι, παρά την βέλτιστη κανονική θεραπεία.^{3,5}

Τα εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά (κυρίως οι β2-διεγέρτες βραχείας δράσης) εξακολουθούν να είναι τα κύρια φάρμακα ταχείας ανακούφισης, κατά την «κρίση» βρογχικού άσθματος και δίδονται κατ' αρχήν επί ανάγκης. Οι β2-διεγέρτες μακράς δράσης είναι χρήσιμοι και στο άσθμα, αλλά μόνο μαζί με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή. Τελευταίως συνιστώνται και ως θεραπεία ανακούφισης. Επειδή στο άσθμα έχει μεγάλη σημασία η «εξοικονόμηση» κορτικοστεροειδών, δηλ. η

χορήγηση όσο δυνατόν μικρότερης δόσης, (ιδιαίτερα των συστηματικών) έχουν αναπτυχθεί άλλα αντιφλεγμονώδη ως φάρμακα προφύλαξης με κυριότερο εκπρόσωπο τους ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων. Το άσθμα είναι συχνά αλλεργικό. Παρόλα αυτά τα αντιισταμινικά φάρμακα ουδέποτε απέδωσαν και μπορεί να είναι και επικίνδυνα. Τέλος, τόσο στο άσθμα όσο και, κυρίως, στους παροξυσμούς ΧΑΠ συχνά συνυπάρχει μικροβιακή λοίμωξη που επιβάλλει χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών, χωρίς βεβαίως κατάχρηση.²⁴

Το πλέον αποτελεσματικό μέτρο αντιμετώπισης του αλλεργικού άσθματος είναι η απομάκρυνση του αιτιολογικού παράγοντα από το περιβάλλον του ασθενούς. Η απευαισθητοποίηση ή η ανοσοθεραπεία με εκχυλίσματα των ύποπτων αλλεργιογόνων είναι ευρέως διαδεδομένη, αλλά οι σχετικές τυφλές μελέτες είναι περιορισμένες σε αριθμό και δεν έχουν τεκμηριώσει την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών αυτών μεθόδων.⁶

1.1.8.1. Φαρμακολογική Αντιμετώπιση Άσθματος

Οι διαθέσιμοι φαρμακευτικοί παράγοντες για τη θεραπεία του άσθματος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα φάρμακα τα οποία αναστέλλουν τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών (β-αδρενεργικοί αγωνιστές, μεθυλοξανθίνες και αντιχολινεργικά) και τα φάρμακα που παρεμβαίνουν στις διαδικασίες της φλεγμονής (γλυκοκορτικοειδή και παράγοντες σταθεροποίησης των ιστιοκυττάρων). Στο στάδιο της κλινικής αξιολόγησης βρίσκονται παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν την σύνθεση των μεσολαβητών της φλεγμονής, καθώς και ανταγωνιστές των υποδοχέων τους.⁶

Οι περισσότεροι ασθενείς με άσθμα έχουν ήπια ως μέτρια νόσο, η οποία ελέγχεται καλά από ένα συνδυασμό αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, ιδίως κορτικοστεροειδών και β2-αγωνιστών. Εντούτοις, σε περίπου 10% των ασθενών, το άσθμα παραμένει συμπτωματικό παρά την θεραπεία με υψηλή δόση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών και μακράς διάρκειας β2-αγωνιστών. Ασθενείς με ανθεκτικό άσθμα έχουν την μεγαλύτερη βλάβη στον τρόπο ζωής τους και αποτελούν ένα μέρος της δυσανάλογης χρήσης των πόρων για την υγεία μέσω των εισαγωγών στα νοσοκομεία, των έκτακτων επισκέψεων στον γιατρό, και την χρήση των επειγόντων υπηρεσιών.²¹

Η βαρύτητα του άσθματος μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα μη-συμμόρφωσης με την αγωγή, συχνότερα λόγω φόβων για τις ανεπιθύμητες ενέργειες των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών ή δυσκολιών στη χρήση συσκευών εισπνοής. Αυτοί οι παράγοντες θα έπρεπε να ελέγχονται πριν τη διάγνωση ανθεκτικής νόσου. Μια δοκιμή με κορτικοστεροειδή από το στόμα και προσεκτική επίβλεψη από ειδική κλινική, είναι συνήθως αρκετά για να αποδειχθεί η κάτω της βέλτιστης θεραπεία και να διορθωθεί το πρόβλημα.²¹

1.1.8.1.1. Διεγέρτες αδρενεργικών υποδοχέων

Παλαιότερα είχαν χρησιμοποιηθεί στο άσθμα και στη ΧΑΠ μη εκλεκτικοί διεγέρτες αδρενεργικών υποδοχέων (β_1 , β_2). Από αυτούς χρησιμοποιείται σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις μόνο η επινεφρίνη υποδοριώς. Το φάρμακο αυτό

εξακολουθεί να είναι αναντικατάστατο της οξείας αναφυλακτικές αντιδράσεις. Σήμερα χρησιμοποιούνται μόνο εκλεκτικοί β_2 αδρενεργικοί διεγέρτες βραχείας και μακράς δράσης.²⁴

Οι παράγοντες αυτοί είναι ανάλογες ενώσεις και προκαλούν διάταση των αεραγωγών, μέσω της διέγερσης των β -αδρενεργικών υποδοχέων και ενεργοποίησης των πρωτεϊνών G με επακόλουθο σχηματισμό κυκλικού AMP. Επίσης, ελαττώνουν την απελευθερούμενη ποσότητα μεσολαβητών και βελτιώνουν τη βλεννοκροσσωτή κάθαρση.⁶

Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής που κυκλοφορούν στην Ελλάδα.

Αδρενεργικοί διεγέρτες	Έναρξη δράσης (λεπτά)	Διάρκεια δράσης (ώρες)
<i>Εισπνεόμενοι, βραχείας δράσης εκλεκτικοί (β_2) διεγέρτες</i>		
Κλενβουτερόλη	30	8-10
Ορσιπρεναλίνη (μερικός εκλεκτικός β αδρενεργικός διεγέρτης)	15-30	4
Σαλβουταμόλη	15	3-4
Τερβουταλίνη	6-15	2-4
<i>Εισπνεόμενοι, μακράς δράσης εκλεκτικοί (β_2) διεγέρτες</i>		
Σαλμετερόλη	10-20	12
Φορμοτερόλη	10-20	12

Πίνακας 1: Διεγέρτες αδρενεργικών υποδοχέων²⁴

1.1.8.1.1.α. Βραχείας δράσης εκλεκτικοί β_2 αδρενεργικοί διεγέρτες

Οι εκλεκτικοί β_2 -αδρενεργικοί διεγέρτες, αποτελούν σήμερα φάρμακα εκλογής για την αντιμετώπιση των κρίσεων βρογχικού άσθματος. Η δράση τους συνίσταται κυρίως σε χάλαση των λείων μυϊκών ινών των βρογχολίων με αποτέλεσμα τη λύση του βρογχόσπασμου. Παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλεονεκτήματα όπως ταχεία έναρξη και μεγάλη διάρκεια δράσης, πρόκληση έντονης βρογχοδιαστολής με περιορισμένες σχετικά ανεπιθύμητες ενέργειες. Κατά τη χορήγησή τους με εισπνοές διατηρείται η β_2 εκλεκτικότητα, σε αντίθεση με την από του στόματος χορήγηση, όπου εμφανίζεται διέγερση και των β_1 υποδοχέων. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ιατρός πρέπει να βεβαιώνεται ότι ο ασθενής έχει μάθει και εφαρμόζει σωστά την τεχνική των εισπνοών, ώστε να λαμβάνει την πρέπουσα δόση.²⁴ Η προτιμώμενη οδός χορήγησης είναι με τις εισπνοές, διότι αυξάνει η εκλεκτικότητά τους για το αναπνευστικό σύστημα και εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη δυνατή δραστηριότητα με τις λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Αυτό ισχύει τόσο κατά τη χρήση τους ως θεραπεία

συντήρησης, όσο και κατά την αντιμετώπιση ασθματικών κρίσεων. Κατά το παρελθόν, οι οξείες ασθματικές κρίσεις αντιμετωπιζόνταν με την ενδοφλέβια χορήγηση συμπαθομιμητικών όπως η ισοπροτερενόλη. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση δεν θεωρείται πλέον ορθή, αφού η ενδοφλέβια έγχυση της ουσίας αυτής μπορεί να προκαλέσει βλάβη του μυοκαρδίου. Πρέπει δε να τονιστεί ότι ακόμα και η ενδοφλέβια χορήγηση β₂-εκλεκτικών παραγόντων, όπως η τερβουταλίνη και η αλβουτερόλη δεν πλεονεκτεί έναντι της χορήγησής τους με εισπνοές.⁶

Η εισπνοή της σκόνης από καψάκια που θραύονται σε ειδική συσκευή γίνεται μόνο με την εισπνοή του ασθενή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και από μικρά παιδιά ή άτομα που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη συσκευή αερολυμάτων. Οι ασθενείς θα πρέπει να προειδοποιούνται ώστε να μην υπερβαίνουν τον αριθμό των καθορισμένων εισπνοών. Σε περίπτωση που, παρά τις εισπνοές, εμφανίζεται δύσπνοια θα πρέπει να συμβουλευονται τον γιατρό τους, γιατί προφανώς οι β₂ διεγέρτες δεν επαρκούν και χρειάζεται διαφορετική αντιμετώπιση.²⁴

Τα σκευάσματα αερολυμάτων υπό πίεση για εισπνοές μπορεί να περιέχουν ως προωθητικά αέρια φθοριοχλωριοπαραγόνα, τα οποία είναι δυνατό να προκαλέσουν ταχυφυλαξία, και, σε περιπτώσεις κατάχρησης, ταχυκαρδία και άλλες τοξικές επιδράσεις στην καρδιά. Τα εισπνεόμενα υδατικά διαλύματα χορηγούνται μέσω συσκευής που δημιουργεί υδρατμούς και η οποία προσαρμόζεται στο σωλήνα χορήγησης οξυγόνου. Απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή στη δοσολογία γι αυτό πρέπει να χορηγούνται μόνο από ειδικό γιατρό.²⁴

Τα από του στόματος σκευάσματα χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που είναι τελειώς αδύνατη η χορήγηση των εισπνεόμενων μορφών. Η υποδόρια, ενδομυϊκή ή και η ενδοφλέβια χορήγηση συνιστώνται σε σοβαρές οξείες κρίσεις άσθματος, με αυξημένα όμως κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Γενικά οι β₂ διεγέρτες χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά υπό μορφή εισπνοών. Ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των εκλεκτικών διεγερτικών δεν υπάρχουν εκτός από τη διάρκεια δράσης τους. Η ένδειξή τους είναι η συμπτωματική αντιμετώπιση του βρογχόσπασμου σε οξύ ή χρόνια βρογχικό άσθμα, βρογχίτιδα, εμφύσημα και γενικώς καταστάσεων με αναστρέψιμη απόφραξη των αεροφόρων οδών.²⁴

Η κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια των εκλεκτικών β₂-αδρενεργικών διεγερτών είναι ο τρόμος που συνήθως υποχωρεί με τη συνέχιση της αγωγής ή τη μείωση της δόσης. Οι παράγοντες αυτοί είναι αποτελεσματικοί ανεξαρτήτως της οδού χορήγησης και παρουσιάζουν μεγάλη διάρκεια δράσης, επειδή η χημική τους δομή τους επιτρέπει να παρακάμπτουν τις μεταβολικές οδούς αποδόμησης των κατεχολαμινών. Οι διαφορές ανάμεσα στη δραστηριότητα και στη διάρκεια δράσης των παραγόντων αυτών εξαλείφονται με κατάλληλες προσαρμογές των δόσεων ή των σχημάτων χορήγησης. Επίσης προκαλούν κεφαλαλγία, ίλιγγο, ναυτία, εμέτους, ταχυκαρδία, διαταραχές του καρδιακού ρυθμού, υπέρταση, περιφερική αγγειοδιαστολή, δυσάρεστη γεύση. Η ενδοφλέβια χορήγηση μπορεί να προκαλέσει παροδική υποκαλιαιμία, ενώ η ενδομυϊκή πόνο και τοπικό ερεθισμό στο σημείο της ένεσης.²⁴

Η κατεχολαμίνη που κυρίως χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη είναι η επινεφρίνη. Έχει βραχεία διάρκεια δράσης και ως εκ τούτου απαιτούνται επανειλημμένες χορηγήσεις. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές καρδιακές αρρυθμίες,

καθώς και άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χρήση της περιορίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις status asthmaticus νεαρών ατόμων, καθώς και στην αντιμετώπιση οξείων αναφυλακτικών αντιδράσεων και αγγειοοιδήματος. Αντενδείξεις αποτελούν οι καρδιακές αρρυθμίες με ταχυκαρδία και ταχυκαρδία από τοξικό δακτυλιδισμό.²⁴

Η συμπαθητικομιμητική τους δράση ενισχύεται με τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, τα παλιότερα αντισταμινικά και τη θυροξίνη. Μεταξύ τους εμφανίζουν συνεργική δράση. Με ξανθίνες, καρδιακούς γλυκοζίτες, κινιδίνη και τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης αρρυθμιών, όπως επίσης και με αλοθάνη, άλλους αλογονωμένους υδρογονάνθρακες και κυκλοπροπάνιο. Με αναστολείς της MAO αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης υπέρτασης. Οι β-αποκλειστές ανταγωνίζονται τη βρογχοδιασταλτική τους δράση. Οι εκλεκτικοί διεγέρτες μειώνουν επίσης το αντιυπερτασικό αποτέλεσμα της μεθυλντόπα, ρεσερπίνης και γουανεθιδίνης. Προσοχή στη χορήγηση σε περιπτώσεις υπερθυρεοειδισμού, σακχαρώδους διαβήτη, υπέρταση, στεφανιαίας ανεπάρκειας, συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, ιστορικό σπασμών, υπερήλικες και παιδιά, κύηση, τοκετό, γαλουχία.²⁴

1.1.8.1.1.β. Μακράς δράσης εκλεκτικοί β₂ αδρενεργικοί διεγέρτες

Έχουν παρόμοια δράση με τους βραχείας δράσης εκλεκτικοί β₂-αδρενεργικοί διεγέρτες, αλλά πολύ πιο παρατεταμένη (>12h). Έτσι αποτελούν μαζί με τα αντιχολινεργικά τη βάση θεραπείας της ΧΑΠ, ενώ είναι πολύ χρήσιμοι και στο βρογχικό άσθμα (μέτριας βαρύτητας και άνω, κυρίως προς εξοικονόμηση κορτικοστεροειδών). Δεν συνιστώνται για την αντιμετώπιση της οξείας ασθματικής κρίσης. Χρειάζεται ειδική φροντίδα και επίβλεψη, με ιδιαίτερη έμφαση στα δοσολογικά όρια, όταν υπάρχουν οι ακόλουθες καταστάσεις: καρδιαγγειακή νόσος, αρρυθμίες, υπέρταση, υπερθυρεοειδισμός, επιμήκυνση του διαστήματος QT, κύηση, γαλουχία. Λόγω της υπεργλυκαιμικής δράσης τους, συνιστώνται επιπρόσθετοι έλεγχοι της γλυκόζης του αίματος σε διαβητικούς. Μπορεί να συμβεί δυνητικά σοβαρή υποκαλιαιμία ως αποτέλεσμα της θεραπείας με β₂-αγωνιστές που μπορεί να ενισχυθεί από υποξία και ταυτόχρονη θεραπεία, δια τούτο συνιστάται ο έλεγχος των επιπέδων καλίου. Όπως συμβαίνει και με άλλες θεραπείες με εισπνοή, υπάρχει το ενδεχόμενο εμφάνισης παράδοξου βρογχόσπασμου και εάν εμφανιστεί πρέπει να σταματάει η χορήγηση του φαρμάκου και να υποκαθίσταται με εναλλακτική θεραπεία.²⁴

Συγχορήγηση με φάρμακα όπως η κινιδίνη, δισοπυραμίδη, προκαϊναμίδη, φαινοθειαζίδες, αντισταμινικά, αναστολείς της MAO και τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά μπορεί να συσχετισθούν με επιμήκυνση του διαστήματος QT και αυξημένο κίνδυνο κοιλιακών αρρυθμιών. Ταυτόχρονη χορήγηση άλλων συμπαθομιμητικών μπορεί να ενισχύσει τις ανεπιθύμητες ενέργειές της. Ταυτόχρονη θεραπεία με αναστολείς της MAO ή παράγοντες με παρόμοιες ιδιότητες, όπως φουραζολιδόνη, προκαρβαζίνη, μπορεί να προκαλέσει υπερτασική αντίδραση. Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης αρρυθμιών σε ασθενείς που υποβάλλονται ταυτόχρονα σε αναισθησία με αλογονωμένους υδρογονάνθρακες. Η ταυτόχρονη

θεραπεία με παράγωγα ξανθινών, στεροειδή ή διουρητικά μπορεί να ενισχύσει την υποκαλιαμική δράση των β2-αγωνιστών. Η υποκαλιαμία μπορεί να αυξήσει την τάση για καρδιακές αρρυθμίες σε ασθενείς, που υποβάλλονται σε θεραπεία με δακτυλίτιδα. Οι β-αποκλειστές μπορεί να εξασθενήσουν ή να ανταγωνισθούν τη δράση της (περιλαμβανόμενων των οφθαλμικών σταγόνων) και δεν πρέπει να συγχωρηθούν. Η L-Dopa, η L-θυροξίνη, η οκυτοκίνη και η αλκοόλη μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς την καρδιακή ανοχή έναντι των β2-διεγερτών. Ανεπιθύμητες ενέργειες είναι νευρικότητα, αϋπνία, ανησυχία, τρόμος, κεφαλαλγία, ταχυκαρδία, αίσθημα παλμών, μυϊκές κράμπες. Επίσης έχουν αναφερθεί περιφερικό οίδημα, παράδοξος βρογχόσπασμος, υποκαλιαμία, υπόταση, αγγειοοίδημα, κνίδωση και εξάνθημα.²⁴

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής που κυκλοφορούν στην Ελλάδα.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Φορμοτερόλη	Η φορμοτερόλη είναι ένας ισχυρός εκλεκτικός β2-αδρενεργικός διεγέρτης και ασκεί βρογχοδιασταλτική δράση σε ασθενείς με ανατάξιμη απόφραξη των αεροφόρων οδών. Επίσης αναστέλλει την απελευθέρωση της ισταμίνης και των λευκοτριενών από τους ευαισθητοποιημένους βρόγχους.
Σαλμετερόλη	Η σαλμετερόλη (salmeterol) είναι ένας εκλεκτικός παρατεταμένης δράσης (12 ώρες) β2-διεγέρτης, που διαθέτει μία μακριά πλευρική άλυσσο η οποία συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη του υποδοχέα. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες της σαλμετερόλης προσφέρουν αποτελεσματικότερη προστασία κατά του βρογχόσπασμου που προκαλείται από ισταμίνη και επιτυγχάνουν μεγαλύτερης διάρκειας βρογχοδιαστολή, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 12 ώρες συγκρινόμενη με τις συνιστώμενες δόσεις συμβατικών βήτα2 διεγερτών βραχείας διάρκειας δράσης.

Πίνακας 2: Μακράς δράσης εκλεκτικοί β2 αδρενεργικοί διεγέρτες²⁴

1.1.8.1.1.γ.Μη εκλεκτικοί αδρενεργικοί διεγέρτες

Τα φάρμακα αυτά, εξαιτίας των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών τους, σπανίως χρησιμοποιούνται σήμερα στην αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος. Η αδρεναλίνη (επινεφρίνη) έχει βραχεία διάρκεια δράσης και ως εκ τούτου απαιτούνται επανειλημμένες χορηγήσεις. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές καρδιακές αρρυθμίες, καθώς και άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χρήση της περιορίζεται σε ορισμένες

περιπτώσεις status asthmaticus νεαρών ατόμων, καθώς και στην αντιμετώπιση οξείων αναφυλακτικών αντιδράσεων και αγγειοοιδήματος.²⁴ Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Κλενβουτερόλη	Η κλενβουτερόλη (clenbuterol) είναι ένα βρογχοδιασταλτικό και χορηγείται για αντιμετώπιση του άσθματος και άλλων περιπτώσεων με αναστρέψιμη απόφραξη των αεροφόρων οδών. Δρα με εκλεκτική διέγερση των β-2 υποδοχέων. Είναι μερικός αγωνιστής. Η clenbuterol διαφέρει από τα άλλα β-2 ειδικά συμπαθομιμητικά λόγω της ταχείας και πλήρους απορρόφησης μετά από του στόματος ή δ'είσπνοής χορήγηση, χαμηλής δραστικής δόσεως, παρατεταμένου βιολογικού χρόνου ημίσειας ζωής και μικρού μεταβολικού εύρους
Σαλβουταμόλη	Η σαλβουταμόλη (salbutamol) είναι ένας εκλεκτικός διεγέρτης των βήτα-2 αδρενεργικών υποδοχέων. Σε θεραπευτικές δόσεις έχει δράση στους βήτα-2 αδρενεργικούς υποδοχείς των μυών των βρόγχων, με ασήμαντη ή ανύπαρκτη δράση στους βήτα-1 αδρενεργικούς υποδοχείς του μυοκαρδίου. Προσφέρει βραχείας διάρκειας (4-6 ώρες) βρογχοδιαστολή με ταχεία έναρξη δράσης (5 λεπτά) όταν υπάρχει αναστρέψιμη απόφραξη των αεροφόρων οδών
Τερβουταλίνη	Η τερβουταλίνη (terbutaline) είναι ένας αδρενεργικός διεγέρτης που διεγείρει εκλεκτικά τους β2-υποδοχείς, με αποτέλεσμα χάλαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων, αναστολή της απελευθέρωσης ενδογενών σπασμογόνων ουσιών, αναστολή του οιδήματος από ενδογενείς μεσολαβητές και ενίσχυση του βλεννοκροσσώτου μηχανισμού κάθαρσης των αεραγωγών

Πίνακας 3: Μη εκλεκτικοί αδρενεργικοί διεγέρτες²⁴

1.1.8.1.2. Μεθυλοξανθίνες στην αντιμετώπιση του άσθματος

Τα ξανθινικά παράγωγα εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος και της χρόνιας βρογχίτιδας, αλλά αποτελούν φάρμακα δεύτερης γραμμής σε σχέση με τους β₂ διεγέρτες. Πρόκειται κυρίως για τη θεοφυλλίνη και την αμινοφυλλίνη. Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους είναι συνάρτηση των επιπέδων του στο πλάσμα. Η θεοφυλλίνη και τα διάφορα άλατά της εκδηλώνουν μέτρια βρογχοδιασταλτική δραστηριότητα μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού. Τα θεραπευτικά επίπεδα της θεοφυλλίνης στο πλάσμα κυμαίνονται από 10-20μg/ml. Με υψηλότερες τιμές αυξάνεται η συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Έχει διατυπωθεί όμως η άποψη ότι θα πρέπει να διατηρούνται μεταξύ 5 και 15 μg/ml ώστε να αποτραπεί η εκδήλωση τοξικότητας. Η απαιτούμενη δοσολογία χορήγησής της θεοφυλλίνης, για να επιτευχθούν τα επίπεδα αυτά, ποικίλλει από άτομο σε άτομο, λόγω ιδιαιτεροτήτων του μεταβολισμού του φαρμάκου.² Ο

μεταβολισμός της ποικίλλει σημαντικά από άτομο σε άτομο και επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες. Ως εκ τούτου, οι ημερήσιες δόσεις της μπορεί να κυμαίνονται από 500 mg μέχρι 5g. Για τη σωστή χορήγησή της επιβάλλεται προσδιορισμός των επιπέδων της στο πλάσμα και ανάλογη ρύθμιση της δόσης.²⁴

Τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής εκτός από την βρογχοδιασταλτική τους δράση αυξάνουν τη συσταλτικότητα του διαφράγματος και του μυοκαρδίου με παράλληλη αγγειοδιασταλτική και διουρητική δράση. Σχετικό μειονέκτημά τους αποτελεί η ανάγκη συχνής χορήγησής τους για την επίτευξη σταθερών θεραπευτικών επιπέδων στο πλάσμα. Το μειονέκτημα αυτό έχει ξεπεραστεί σήμερα χάρη στις νεότερες φαρμακοτεχνικές μορφές παρατεταμένης δράσης, με τις οποίες επιτυγχάνεται μείωση της συχνότητας και έντασης των ανεπιθύμητων ενεργειών με παράλληλη βελτίωση της ανοχής από το γαστρεντερικό σωλήνα. Για τον καθορισμό της δόσης των ξανθινικών παραγώγων πρέπει να γίνεται αναγωγή τους σε άνυδρη θεοφυλλίνη. Η ισοδυναμία της αμινοφυλλίνης σε θεοφυλλίνη κυμαίνεται από 79-86% ενώ της θεοφυλλινικής χολίνης είναι 64%.²⁴

Η κάθαρση της θεοφυλλίνης, και συνεπώς η απαιτούμενη δοσολογία, είναι σημαντικά ελαττωμένη σε νεογνά, σε υπερήλικες, καθώς και σε άτομα που πάσχουν από οξεία και χρόνια ηπατική δυσλειτουργία, καρδιακή ανεπάρκεια και πνευμονική καρδιά. Επίσης, ελαττώνεται κατά τη διάρκεια εμπύρετων νοσημάτων, είναι όμως αυξημένη στα παιδιά. Ο μεταβολισμός της, τέλος, επηρεάζεται σε περιπτώσεις ταυτόχρονης χορήγησης άλλων φαρμάκων. Αντιβιοτικά, όπως η ερυθρομυκίνη και οι υπόλοιπες μακρολίδες, οι κινολόνες και η τρολεανδομυκίνη, καθώς και φάρμακα, όπως η σιμετιδίνη, η αλλοπουρινόλη ή η προπρανολόλη, ελαττώνουν την κάθαρση της θεοφυλλίνης, ενώ το κάπνισμα, η φαινοβαρβιτάλη, η φαινυτοΐνη και οποιοδήποτε άλλο φάρμακο, το οποίο και έχει την ικανότητα να επάγει τα μικροσωμικά ένζυμα του ήπατος, την αυξάνουν.⁶

Για τη θεραπεία συντήρησης, διατίθενται σκευάσματα μακράς διάρκειας δράσης, τα οποία μπορούν να χορηγηθούν δύο ή και μία φορά την ημέρα. Ο καθορισμός της δόσης γίνεται με βάση την κλινική ανταπόκριση και τις μετρήσεις της συγκέντρωσης της θεοφυλλίνης στον ορό. Χορήγηση του φαρμάκου το απόγευμα αποτρέπει την εμφάνιση συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια της νύχτας και της επόμενης ημέρας. Τόσο η θεοφυλλίνη όσο και η αμινοφυλλίνη κυκλοφορούν και σε σκευάσματα για ενδοφλέβια χορήγηση.⁶

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες της θεοφυλλίνης είναι η ευερεθιστότητα, η ναυτία, οι έμετοι, η ανορεξία και οι κεφαλαλγίες, ενώ, σε επίπεδα μεγαλύτερα των 30μg/ml, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης σπασμών και καρδιακών αρρυθμιών.² Η προσθήκη διαφόρων «αποχρεμπτικών» σε θεοφυλλινούχα σκευάσματα δεν προσφέρει θεραπευτικό πλεονέκτημα. Αντίθετα, σε ανάγκη χορήγησης μεγάλων δόσεων τα αποχρεμπτικά αυτά μπορούν να προκαλέσουν ναυτία, εμέτους, μιοχάλαση.²⁴ Στον Πίνακα 4 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Διπροφυλλίνη	Η διπροφυλλίνη (diprophylline) είναι ένα παράγωγο της ξανθίνης με βρογχοδιασταλτική και αγγειοδιασταλτική δράση. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των αναπνευστικών διαταραχών, όπως άσθμα, καρδιακή δύσπνοια, και βρογχίτιδα. Δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων αδενοσίνης και αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης
Θεοφυλλίνη	Η θεοφυλλίνη (theophylline) έχει ως κύρια φαρμακολογική δράση τη βρογχοδιαστολή και διαστολή των αγγείων των πνευμόνων, προκαλώντας με απ' ευθείας δράση, χάλαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων και των πνευμονικών αγγείων. Επίσης η θεοφυλλίνη προκαλεί διέγερση του εγκεφάλου, του μυοκαρδίου και των σκελετικών μυών, διαστολή των στεφανιαίων αγγείων και αύξηση της διούρησης

Πίνακας 4: Μεθυλοξανθίνες στην αντιμετώπιση του άσθματος²⁴

1.1.8.1.3. Αντιχολινεργικά στην αντιμετώπιση του άσθματος

Όπως αναφέρθηκε, η χρήση των κλασικών αντιχολινεργικών (ατροπίνης κλπ.) από τη συστηματική οδό χορήγησης έχει εγκαταλειφθεί προ πολλού.²⁴ Τα αντιχολινεργικά φάρμακα, όπως η θειϊκή ατροπίνη, προκαλούν βρογχοδιαστολή σε ασθματικούς ασθενείς, η χρήση τους όμως είναι περιορισμένη λόγω της συστηματικής δράσης τους. Τα παράγωγα του τεταρτοταγούς αμμωνίου (μεθυλονιτρική ατροπίνη και βρωμιούχο ιπρατρόπιο) δεν απορροφώνται και έτσι είναι αποτελεσματικά χωρίς να παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι ουσίες αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε ασθενείς που παρουσιάζουν και διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας, στους οποίους η χρήση των μεθυλοξανθινών και των β-αδρενεργικών αναστολέων μπορεί να αποδειχθεί επικίνδυνη.⁶

Σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα υπό μορφή εισπνοών το ιπρατρόπιο, που αποκλείει τους υπεύθυνους για το βρογχόσπασμο βρογχικούς χολινεργικούς υποδοχείς του παρασυμπαθητικού. Η απορρόφησή του από τον βλεννογόνο των βρόγχων είναι εξαιρετικά χαμηλή και γι' αυτό στερείται συνήθως συστηματικής δράσης κι ανεπιθύμητων γενικά ενεργειών, ενώ δεν διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σε περίπτωση εισπνοής υπερβολικής δόσης μπορεί να εμφανισθούν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ταχυκαρδία κλπ. Θεωρείται ότι η βρογχοδιασταλτική του δράση παραμένει και σε άτομα που λαμβάνουν β-αποκλειστές. Το φάρμακο μπορεί να είναι χρήσιμο όταν η χρήση ξανθινικών παραγώγων ή αδρενεργικών διεγερτών δεν ενδείκνυται ή δεν είναι ανεκτή από τον ασθενή. Προτιμάται σε ασθενείς με χρόνια βρογχίτιδα ή εμφύσημα. Η μέγιστη βρογχοδιασταλτική δράση παρατηρείται 30-90 περίπου λεπτά μετά την εισπνοή.²⁴

Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η ταυτόχρονη χορήγηση αντιχολινεργικών αυξάνει τη βρογχοδιασταλτική ικανότητα των συμπαθομιμητικών, αλλά όχι σε ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό. Τα κύρια μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι ουσίες της κατηγορίας αυτής είναι η βραδεία έναρξη της δράσης τους (είναι δυνατόν να μεσολαβήσουν 60-90min μέχρι να εμφανισθεί η μέγιστη βρογχοδιαστολή) και η

μέτρια δραστηριότητά τους.⁶ Το τιotropίο είναι μακράς δράσης (περίπου 24h) ειδικός ανταγωνιστής των χολινεργικών υποδοχέων, ο οποίος χορηγείται για τη θεραπεία συντήρησης της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Στον Πίνακα 5 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Βρωμιούχο τιotropίο	Το τιotropίο (tiotropium) είναι ένας μακράς δράσεως, ειδικός ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων, που στην κλινική ιατρική συχνά καλείται αντιχολινεργικό. Μέσω σύνδεσης στους μουσκαρινικούς υποδοχείς των βρογχικών λείων μυών, το τιotropίο αναστέλλει τις χολινεργικές (βρογχοσυσπαστικές) επιδράσεις της ακετυλοχολίνης, που απελευθερώνεται από τις απολήξεις των παρασυμπαθητικών νεύρων

Πίνακας 5: Αντιχολινεργικά φάρμακα στην αντιμετώπιση του άσθματος²⁴

1.1.8.1.4. Γλυκοκορτικοειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος

Τα γλυκοκορτικοειδή δεν εμφανίζουν βρογχοδιασταλτική δράση και η κύρια ένδειξη χρησιμοποίησής τους στο άσθμα είναι η μείωση της φλεγμονής των αεραγωγών. Τα γλυκοκορτικοειδή (είτε σε p.o. χορήγηση είτε παρεντερικά) δεν έχουν θέση στις οξείες περιπτώσεις που δεν ανταποκρίνονται ή και επιδεινώνονται, παρά την ενδεδειγμένη αγωγή με βρογχοδιασταλτικά, καθώς και στις χρόνιες εκείνες περιπτώσεις στις οποίες η ορθή εφαρμογή των θεραπευτικών μέσων απέτυχε και εμφανίζουν συχνές υποτροπές με βαρύτερη συμπτωματολογία.⁶

Διαφωνία υπάρχει σχετικά με τη δόση των γλυκοκορτικοειδών που θα πρέπει να χορηγούνται σε οξείες καταστάσεις. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, η χορήγηση πολύ υψηλών δόσεων δεν πλεονεκτεί σε σχέση με τα συντηρητικότερα σχήματα. Στις ΗΠΑ, συνηθίζεται να χορηγούνται, αρχικά, 40-60mg μεθυλοπρεδνιζολόνης ενδοφλεβίως, ανά εξάωρο. Επειδή η ενδοφλέβια και η p.o. χορήγηση προκαλούν παρόμοιο αποτέλεσμα, είναι δυνατή η χορήγηση 60mg πρεδνιζολόνης κάθε 6 ώρες. Κλινικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι μικρότερες δόσεις έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία που να το αποδεικνύουν. Στην Αγγλία και σε άλλες χώρες, οι οξείες περιπτώσεις άσθματος, τόσο οι ενδονοσοκομειακές όσο και εκτός νοσοκομείου, αντιμετωπίζονται με 30-40 mg πρεδνιζολόνης σε εφάπαξ ημερήσια χορήγηση. Τα αποτελέσματα της δράσης των στεροειδών σε οξείες περιπτώσεις άσθματος δεν εμφανίζονται αμέσως, αλλά μπορεί

να μεσολαβήσουν μέχρι και 6 ώρες μετά τη χορήγηση, γεγονός το οποίο καθιστά απαραίτητη την συνεχή αγωγή με βρογχοδιασταλτικά.⁶

Ανεξάρτητα από το σχήμα χορήγησης που εφαρμόζεται και τα γλυκοκορτικοειδή, η πρώιμη προσαρμογή του σχήματος χαμηλότερη δοσολογία μπορεί να προκαλέσει υποτροπή του βρογχόσπασμου. Η πλειοψηφία των ειδικών συνιστά τη σταδιακή ελάττωση της χορηγούμενης ποσότητας κατά το ήμισυ, κάθε τρίτη ως πέμπτη ημέρα από το οξύ επεισόδιο. Στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες είναι απαραίτητη η διαρκής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, είναι δυνατόν να χορηγηθούν κάθε δεύτερη ημέρα, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες τους. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για παιδιά στα οποία η συνεχής χορήγηση γλυκοκορτικοειδών αναστέλλει την ανάπτυξη. Αν επιλεγεί η μέρα παρά μέρα χορήγησης, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σκευάσματα στεροειδών μακράς διάρκειας δράσης, διότι προκαλούν παρατεταμένη καταστολή του άξονα υπόφυσης - επινεφριδίων και καθιστούν, έτσι, ανώφελα τα σχήματα αυτά.²

Κυκλοφορούν σκευάσματα εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών υψηλής δραστηριότητας που επιτρέπουν την αντικατάσταση των από του στόματος χορηγούμενων σκευασμάτων. Τα σκευάσματα αυτά ελαττώνουν την αντιδραστικότητα των αεραγωγών και αποτελούν την εναλλακτική λύση για τις περιπτώσεις στις οποίες τα συμπτώματα επιδεινώνονται. Συνιστάται, μάλιστα, από ορισμένους η χορήγηση στεροειδών σε μορφή αερολύματος, σε κάθε ασθενή στον οποίο η νόσος δεν ελέγχεται με εισπνεόμενα σκευάσματα. Αν τα συμπτώματα δεν υποχωρούν με τις συνηθισμένες δόσεις είναι δυνατός ο διπλασιασμός τους. Η πρακτική αυτή ελαττώνει την ανάγκη για χορήγηση γλυκοκορτικοειδών από το στόμα, αλλά αυξάνει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως η μυκωτική στοματίτιδα, δυσφωνία, ενώ η συστηματική απορρόφηση προκαλεί καταστολή των επινεφριδίων, εμφάνιση καταρράκτη, περιορισμό της ανάπτυξης στα παιδιά, διαταραχές του μεταβολισμού των οστών και πορφύρα. Η εμφάνιση αποτελέσματος από τη χρήση εισπνεόμενων στεροειδών απαιτεί την πάροδο 2-4 εβδομάδων. Συνεπώς, είναι σκόπιμη η συγχορήγησή τους με από του στόματος σκευάσματα, ώστε να αντιμετωπιστούν τα συμπτώματα ακολούθως αποσύρονται τα τελευταία και η νόσος ελέγχεται με εισπνεόμενα γλυκοκορτικοειδή.⁶

1.1.8.1.5. Κορτικοστεροειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος

Τα συστηματικώς χορηγούμενα κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις βρογχικού άσθματος, οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται με τα άλλα βρογχοδιασταλτικά. Σε βαριές κρίσεις χορηγούνται μεγάλες δόσεις κορτικοστεροειδών, όπως π.χ. υδροκορτιζόνη 200mg ενδοφλεβίως ή πρεδνιζολόνη 40-60mg από το στόμα, σε συνδυασμό με β₂ διεγέρτες και ξανθίνες. Σε οξείες προσβολές βρογχικού άσθματος μπορεί να χορηγηθούν από το στόμα κορτικοστεροειδή με βραχεία ημιπερίοδο ζωής (πρεδνιζόνη, πρεδνιζολόνη, μεθυλπρεδνιζολόνη) σε ικανή δόση, π.χ. 30-40mg πρεδνιζολόνης ημερησίως για μερικές ημέρες ή μέχρις ότου αντιμετωπιστεί η προσβολή και ακολουθεί σταδιακή μείωση και διακοπή. Η πρόληψη των κρίσεων του χρόνιου άσθματος μπορεί να

απαιτήσει τη συνεχή χορήγηση κορτικοστεροειδών από το στόμα. Στις περιπτώσεις αυτές χορηγούνται στις ελάχιστες αποτελεσματικές δόσεις και κατά προτίμηση εφ' άπαξ το πρωί ώστε να διατηρηθεί ο ημερήσιος ρυθμός έκκρισης της κορτιζόλης. Η ανά διήμερο χορήγησή τους δεν φαίνεται να καλύπτει για 48 ώρες τις ανάγκες του ασθενούς.²⁴

Η λήψη κορτικοστεροειδών με εισπνοές από το στόμα αντιθέτως είναι ακρογωνιαίος λίθος της αντιμετώπισης του χρόνιου βρογχικού άσθματος. Η συνδυασμένη λήψη τους με ένα β₂-διεγέρτη έχει συνεργική δράση και επιτρέπει την μείωση τη μείωση της δόσης των κορτικοστεροειδών. Η χορήγηση του β₂-διεγέρτη πρέπει να προηγείται κατά 15 λεπτά του κορτικοστεροειδούς. Η αντικατάσταση της λήψης κορτικοστεροειδούς από το στόμα σε λήψη με εισπνοές πρέπει να γίνεται όταν έχει ελεγχθεί πλήρως το άσθμα, με βραδύ ρυθμό και σταδιακή μείωση της χορηγούμενης από το στόμα δόσης. Στους ασθενείς αυτούς θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη το ενδεχόμενο εκδήλωσης λανθάνουσας και επινεφριδικής ανεπάρκειας όταν υφίστανται σωματική καταπόνηση.²⁴

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών είναι γενικώς ηπιότερες από εκείνες της χορήγησης δια της γενικής οδού (από του στόματος, παρεντερικώς), από το γεγονός όμως ότι τα εισπνεόμενα χορηγούνται συχνά μακροχρονίως και ενίοτε σε μεγάλες δόσεις η εμφάνιση τέτοιων αντιδράσεων είναι αναμενόμενη. Στις περιπτώσεις χορήγησης υψηλών δόσεων μπορούν να παρατηρηθούν είτε εκδηλώσεις υπερλειτουργίας των επινεφριδίων (ιατρογενές σύνδρομο Cushing, κατακράτηση νατρίου κ.λ.π.) είτε καταστολής (οξεία επινεφριδιακή ανεπάρκεια). Άλλες πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι λοιμώξεις των αναπνευστικών οδών, οστεοπόρωση, αύξηση του κινδύνου γλαυκώματος, βράγχος φωνής, καντιντίαση του στόματος, παράδοξος βρογχόσπασμος και σπανίως αντιδράσεις υπερευαισθησίας, κατάθλιψη, ευερεθιστότητα κ.λ.π. Στα παιδιά η ανάπτυξη του σώματος δεν φαίνεται να επηρεάζεται με τις συνιστώμενες δόσεις εισπνεομένων κορτικοστεροειδών, παρά ταύτα σε παιδιά που λαμβάνουν παρατεταμένη αγωγή εισπνεομένων κορτικοστεροειδών συνιστάται τακτικός έλεγχος του ύψους τους.²⁴

Ο σταθερός συνδυασμός εισπνεόμενου κορτικοστεροειδούς και μακράς δράσης β₂-διεγέρτη είναι κατάλληλος σε ασθενείς που δεν ελέγχονται ικανοποιητικά με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και κατ' επίκληση χρήση εισπνεομένων β₂-διεγερτών βραχείας δράσης ή ασθενείς που ήδη ελέγχονται ικανοποιητικά με αμφοτέρα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή και β₂-διεγέρτες μακράς δράσης. Στον Πίνακα 6 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Βεκλομεθαζόνη	Η βεκλομεθαζόνη (beclomethasone) αποτελεί προφάρμακο με ασθενή δραστηριότητα ως προς την σύνδεση με υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών. Υδρολύεται από εστεράσες προς τον ενεργό μεταβολίτη 17-μονοπροπιονική βεκλομεθαζόνη (beclomethasone-17-monopropionate: B-17-MP), η οποία έχει ισχυρή τοπική αντιφλεγμονώδη δράση
Βουδεσονίδη	Η βουδεσονίδη (budesonide) είναι ένα συνθετικό, μη αλογονωμένο κορτικοστεροειδές για τοπική χρήση με εισπνοές, το οποίο στις συνιστώμενες δόσεις διαθέτει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και στερείται συστηματικών επιδράσεων ή ανασταλτικής δράσης για την επινεφριδική λειτουργία
Φλουτικαζόνη	Η φλουτικαζόνη (fluticasone) έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, όμως όταν χρησιμοποιείται τοπικά στο ρινικό βλεννογόνο, δεν έχει ανιχνεύσιμη συστηματική δράση

Πίνακας 6: Κορτικοστεροειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος²⁴

1.1.8.1.6. Παράγοντες που σταθεροποιούν τα ιστιοκύτταρα

Το χρωμογλυκινικό νάτριο και η νατριούχος νεδοκρομίλη δεν επηρεάζουν τον τόνο των λείων μυϊκών ινών των αεραγωγών. Ο κύριος θεραπευτικός ρόλος τους έγκειται στην αναστολή της αποκοκκίωσης των ιστιοκυττάρων και κατά συνέπεια στην παρεμπόδιση της απελευθέρωσης των χημικών μεσολαβητών της αναφυλαξίας. Η νεδοκρομίλη και η χρωμογλυκίνη, όπως και τα εισπνεόμενα στεροειδή, βελτιώνουν τη λειτουργία των πνευμόνων, ελαττώνουν τα συμπτώματα και περιορίζουν την αντιδραστικότητα των αεραγωγών σε ασθματικούς. Είναι περισσότερο αποτελεσματικά σε ασθενείς με ατοπία που εμφανίζουν συμπτώματα εποχιακώς ή και διαρκή ερεθισμό των αεραγωγών. Συχνά είναι απαραίτητη η χορήγηση 2 εισπνοών 4 φορές την ημέρα επί 4-6 εβδομάδες, πριν να εμφανισθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα από τη χρήση τους. Σε αντίθεση με τα στεροειδή, η προφυλακτική χορήγηση των δυο αυτών παραγόντων αναστέλλει την εμφάνιση αποφρακτικών φαινομένων μετά από έκθεση σε αντιγόνα, βιομηχανικούς χημικούς παράγοντες ή ψυχρό αέρα. Στην περίπτωση μάλιστα της έκθεσης σε αντιγόνα δεν εκδηλώνονται ούτε τα όψιμα φαινόμενα. Συνεπώς, αν κάποιος ασθενής εμφανίζει οξέα επεισόδια άσθματος, μετά από διαλείπουσα έκθεση σε αντιγονικά ή μη αντιγονικά ερεθίσματα, δεν χρειάζεται να λαμβάνει τα φάρμακα αυτά συνεχώς, αλλά αρκεί η λήψη τους 15-20min πριν την έκθεση στον εκλυτικό παράγοντα.²⁴

1.1.8.1.7. Ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων

Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων αναστέλλουν τη δράση των λευκοτριενίων δρώντας στους κυτταρικούς υποδοχείς αυτών των ουσιών. Τα λευκοτριένια απελευθερώνονται από διάφορα κύτταρα (μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα) και προκαλούν σύσπαση των αεροφόρων οδών, έκκριση βλέννας και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων των λευκοτριενίων είναι βοηθητικά φάρμακα κατά του βρογχικού άσθματος ιδιαίτερα ήπιας ή μέσης βαρύτητας.²⁴

1.1.8.1.8. Φάρμακα για την προφύλαξη κατά του άσθματος

Τα φάρμακα που κυρίως χρησιμοποιούνται προφυλακτικώς κατά του βρογχικού άσθματος και κυκλοφορούν στη χώρα μας είναι η νεδοκρομίλη, το κετοτιφαίνιο και η ομαλιζουμάμπη. Το αποτέλεσμα τους καθυστερεί να εμφανισθεί. Συνήθως απαιτούνται 2-4 εβδομάδες από την έναρξη χορήγησής τους. Έτσι τυχόν απόφαση για διακοπή τους ως αναποτελεσματικών, δεν πρέπει να λαμβάνεται πριν από την παρέλευση των 4 εβδομάδων.²⁴

Η νεδοκρομίλη, λαμβανόμενη με εισπνοές, χρησιμοποιείται στην πρόληψη των κρίσεων του βρογχικού άσθματος και του βρογχόσπασμου που προκαλούνται μετά από κόπωση. Είναι περισσότερο αποτελεσματικό σε αλλεργικό άσθμα. Σε οξείες κρίσεις είναι αναποτελεσματικό και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται. Σε χρόνια χρήση μπορεί σπάνια να αναπτυχθεί ανοχή. Συνδυάζεται με βρογχοδιασταλτικά και κορτικοστεροειδή, γεγονός που επιτρέπει τη μείωση της δόσης της.²⁴

Το κετοτιφαίνιο είναι αντισταμινικό και χορηγείται από το στόμα, ιδιαίτερα σε ασθενείς που αδυνατούν να λάβουν φάρμακα με εισπνοές. Η δράση του φαίνεται να είναι παρόμοια με εκείνη του χρωμογλυκικού νατρίου, αλλά η αποτελεσματικότητά του μικρότερη. Γενικά, η αποτελεσματικότητα και των δύο φαρμάκων δεν έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα μεγάλη.²⁴

Η ομαλιζουμάμπη είναι εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα παρασκευαζόμενο με τεχνολογία ανασυνδυασμού του DNA, το οποίο δεσμεύει εκλεκτικά την ανοσοσφαιρίνη E (IgE) και προορίζεται για χορήγηση μόνο σε άτομα των οποίων το αλλεργικό άσθμα δημιουργείται μέσω της IgE μετά εισπνοή ενός αλλεργιογόνου. Χορηγείται σε περιπτώσεις σοβαρού επίμονου αλλεργικού άσθματος, όταν η συνήθης αγωγή (μεγάλες δόσεις εισπνεομένων κορτικοστεροειδών και β2-διεγερτών) είναι ανεπιτυχής.²⁴

Στον Πίνακα 7 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.²⁴

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Χρωμογλυκικό νάτριο	Το χρωμογλυκικό οξύ (chromoglicic acid) δρα αναστέλλοντας την απελευθέρωση της ισταμίνης και διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής προερχομένων από τις μεμβράνες, από τα μαστοκύτταρα
Κετοτιφαίνιο	Το κετοτιφαίνιο (ketotifen) είναι ένα μη βρογχοδιασταλτικό αντιασθματικό φάρμακο με έντονες αντι-αναφυλακτικές ιδιότητες και ειδική αντισταμινική δράση
Νεδοκρομίλη	Η νεδοκρομίλη (nedocromil) βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία, μειώνει τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των κρίσεων και ελαττώνει το βρογχόσπασμο, το βήχα και τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα

Πίνακας 7: Φάρμακα για την προφύλαξη κατά του άσθματος²⁴

1.1.8.1.9. Άλλοι Παράγοντες για την αντιμετώπιση του άσθματος

Σύμφωνα με ορισμένες απόψεις, οι ασθενείς των οποίων το άσθμα ελέγχεται με τη βοήθεια στεροειδών μπορεί να ωφεληθούν από τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικών, όπως η μεθοτρεξάτη και τα άλατα χρυσού. Τα αποτελέσματα από τη χορήγηση τέτοιων παραγόντων στη δοσολογία των στεροειδών και στη δραστηριότητα της νόσου είναι περιορισμένα, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να είναι σημαντικές. Η χρήση οπιούχων, κατασταλτικών και ηρεμιστικών πρέπει να αποφεύγεται σε περιπτώσεις οξέως άσθματος, διότι υπάρχει μεγάλος κίνδυνος μείωσης του κυψελιδικού αερισμού, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις καταστολής της αναπνευστικής λειτουργίας μέσα σε βραχύ χρονικό διάστημα από τη χορήγησή τους.⁶

Αντενδείκνυται, επίσης, η χρήση β-αναστολέων και παρασυμπαθητικομιμητικών επειδή προκαλούν έντονη έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας. Η χρήση αποχρεμπτικών και βλεννολυτικών, αν και ήταν πολύ διαδεδομένη στο παρελθόν, δεν προσφέρει σημαντικά στην αντιμετώπιση τόσο των οξείων όσο και των χρόνιων περιπτώσεων άσθματος. Μάλιστα, η χρήση βλεννολυτικών παραγόντων, όπως η ακετυλοκυστεΐνη, σε ευαίσθητα άτομα μπορεί να προκαλέσει βρογχόσπασμο. Η εμφάνιση αυτής της ανεπιθύμητης ενέργειας μπορεί να αποφευχθεί αν χορηγηθούν με τη μορφή αερολύματος σε διάλυμα που περιέχει και β-αδρενεργικό αγωνιστή. Υποστηρίζεται ότι η χορήγηση υγρών ενδοφλεβίως συμβάλλει στην αντιμετώπιση των ασθματικών κρίσεων, λίγα στοιχεία όμως επιβεβαιώνουν την άποψη αυτή. Η χρήση μη συμβατικών βρογχοδιασταλτικών, π.χ. χορήγηση θεικού μαγνησίου ενδοφλεβίως, για τη θεραπεία των ασθματικών κρίσεων δεν συνιστάται, διότι η αποτελεσματικότητά τους αμφισβητείται.⁶

1.1.8.2. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του άσθματος

Οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην χρόνια φλεγμονή σε όλες τις ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του βρογχικού άσθματος. Πολλές κυτοκίνες και χυμοκίνες έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία του άσθματος. Οι αναστολείς των κυτοκινών και των χυμοκινών έχουν εξέχουσα θέση σε αυτές τις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις⁶

Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα και τις φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντισώμα που εμποδίζει τον *TNF-α* (infliximab) και διαλυτοί υποδοχείς *TNF-α* (etanercept) έχουν δώσει αξιόλογες κλινικές αποκρίσεις, ακόμα και σε ασθενείς που δείχνουν σχετικά μικρή ανταπόκριση στα στεροειδή. Τέτοια αντισώματα ή διαλυτοί υποδοχείς *TNF-α* είναι μια λογική προσέγγιση στην θεραπεία του άσθματος ειδικά σε βαριά νοσούντες, και οι κλινικές δοκιμές έχουν ήδη ξεκινήσει.²⁵

Υπάρχουν αρκετές πιθανές προσεγγίσεις για την αναστολή συγκεκριμένων κυτοκινών. Αυτές περιλαμβάνουν φάρμακα που αναστέλλουν την σύνθεση κυτοκίνης (γλυκοκορτικοειδή, κυκλοσπορίνη Α, τακρόλιμους, Th2-επιλεκτικούς αναστολείς), εξανθρωπισμένα αντισώματα κυτοκινών ή των υποδοχέων τους, διαλυτούς υποδοχείς που απορροφούν τις εκκριθείσες κυτοκίνες, χαμηλού μοριακού βάρους ανταγωνιστές υποδοχέων και φάρμακα που εμποδίζουν τις διόδους μεταγωγής σημάτων που ενεργοποιούνται από τις κυτοκίνες. Αντιστοίχως, υπάρχουν κυτοκίνες που καταστέλλουν οι ίδιες την αλλεργική φλεγμονώδη διαδικασία και αυτές μπορεί να έχουν θεραπευτικές δυνατότητες για το βρογχικό άσθμα. Οι προερχόμενες από Th2 κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενορχήστρωση της ηωσινοφιλικής φλεγμονώδους ανταπόκρισης στο άσθμα, δείχνοντας ότι η παρεμπόδιση της έκλυσης ή των επιδράσεων αυτών των κυτοκινών μπορεί να έχει θεραπευτική δράση.²¹

Το αντι-IgE (Xolair) έχει δώσει μια νέα κατηγορία θεραπειών για το βαρύ ατοπικό άσθμα και έχει δείξει να βελτιώνει τα συμπτώματα, να ελαττώνει το φορτίο των συστηματικών κορτικοστεροειδών και να μειώνει την συχνότητα της παρόξυνσης. Δεν έχουν όλοι οι βαριά ασθματικοί ασθενείς ατοπία, και σε αυτούς που αυτό είναι ένα μείζον συστατικό της νόσου, δεν ανταποκρίνονται όλοι. Επομένως, μετά την επιτυχία του IgE, υπάρχει μεγάλος ενθουσιασμός για την ταυτοποίηση νέων θεραπειών για το βαρύ άσθμα και οι θεραπείες κατευθύνονται προς τις κυτοκίνες.⁴

Τα κορτικοστεροειδή είναι η βάση της θεραπείας για το άσθμα και εξασθενούν την φλεγμονώδη απόκριση. Εντούτοις, στο ανθεκτικό άσθμα τα αποτελέσματα είναι ανεπαρκή. Επομένως, η αντικυτοκινική θεραπεία παρουσιάζει μια σημαντική εναλλακτική ή επιπρόσθετη αγωγή στην τρέχουσα θεραπεία. Είναι άρα σημαντικό να γίνουν κατανοητοί οι συγκεκριμένοι ρόλοι των κυτοκινών που εμπλέκονται στην παθογένεση του άσθματος.⁴

Πολλοί αναστολείς συγκεκριμένων κυτοκινών και χυμοκινών είναι σήμερα σε διαδικασία ανάπτυξης για την αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος. Η αναστολή της *IL-4* με διαλυτούς υποδοχείς *IL-4* έχει δείξει θετικά πρώτα αποτελέσματα στο άσθμα. Η αντι-*IL-5* είναι πολύ αποτελεσματική στην μείωση του περιφερειακού αριθμού των ηωσινόφιλων στο αίμα και στους αεραγωγούς, αλλά δεν φαίνεται να

είναι αποτελεσματική κατά του συμπτωματικού άσθματος. Οι ανασταλτικές κυτοκίνες όπως η *IL-10*, οι ιντερφερόνες και η *IL-12*, υπόσχονται λιγότερα, καθώς η συστηματική παράδοση προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες, και μπορεί να είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν εισπνεόμενα συστήματα. Πολλές χυμοκίνες εμπλέκονται στην φλεγμονώδη απόκριση του άσθματος και αναπτύσσονται οι χαμηλού μοριακού βάρους αναστολείς των υποδοχέων χυμοκινών. Επειδή τόσες πολλές κυτοκίνες εμπλέκονται σε αυτές τις σύνθετες παθήσεις, τα φάρμακα που αναστέλλουν την σύνθεση πολλαπλών κυτοκινών μπορεί να έχουν μεγαλύτερη επιτυχία. Πολλές τέτοιες τάξεις φαρμάκων βρίσκονται τώρα σε κλινική ανάπτυξη. Ο κίνδυνος ανεπιθύμητων ενεργειών σε αυτούς τους μη εξειδικευμένους αναστολείς μπορεί να μειωθεί με την χρήση της εισπνεόμενης οδού. Η αναστολή του *TNF-α* μπορεί να είναι χρήσιμη για την αντιμετώπιση του βαρέος άσθματος.²⁵

Η θεραπεία του άσθματος με γλυκοκορτικοστεροειδή (GCS) είναι ο πιο αποτελεσματικός αντιφλεγμονώδης παράγοντας και έχει μια ευρεία κλίμακα δράσης σε πολλά δίκτυα κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών. Η αναστολή της παραγωγής *TNF-α* δεν αποτελεί εξαίρεση σε αυτή την δραστηριότητα. Το πλάτος αυτής της αναστολής και δραστηριότητας οδηγεί επίσης σε ανεπιθύμητες ενέργειες σε μεγαλύτερες δόσεις, και όταν η περίοδος θεραπείας είναι παρατεταμένη. Υπάρχει επομένως ανάγκη για αύξηση της κλίμακας των θεραπειών που προστατεύουν το GCS και που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελαττώσουν τη δόση αυτών των πολύ αποτελεσματικών φαρμάκων.

Άλλοι τύποι φαρμακολογικών αναστολέων *TNF-α* περιλαμβάνουν επιταχυντές της υποβάθμισης mRNA του *TNF-α* (π.χ. θαλιδομίδη), αναστολείς της μετάφρασης πρωτεΐνης του TNF (π.χ. τετρασθενείς γουανυλδραζονες), και αναστολείς μεταλλοπρωτεΐνωσης που εμποδίζουν την προσκόλληση της 26 kDa συνδεδεμένης με την μεμβράνη πρωτεΐνης στο ενεργό 17 kDa μόριο. Άλλες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν πρωτεΐνες σύντηξης υποδοχέων TNF και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν επίσης εγερθεί εναντίον του *TNF-α* και έχουν φτάσει στις δοκιμές σε εξανθρωπισμένο αντίσωμα ποντικών. Γενικά, αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, παρόλο που τα προβλήματα που σχετίζονται με αυτόν τον τύπο θεραπείας μπορεί να περιορίζουν την χρήση του σε ορισμένες κατηγορίες παθήσεων.²⁶ Λόγω των προβλημάτων που σχετίζονται με τις θεραπείες που βασίζονται σε αντισώματα, αναζητούνται αναστολείς του *TNF-α* με χαμηλό μοριακό βάρος. Το ένζυμο που μετατρέπει τον *TNF-α* είναι ένα ένζυμο σχετιζόμενο με την μεταλλοπρωτεάση, σημαντικό για την έκλυση *TNF-α* από την επιφάνεια των κυττάρων. Οι χαμηλού μοριακού βάρους αναστολείς ενζύμων μετατρεπτικών του *TNF-α* αναπτύσσονται ως p.o χορηγούμενοι αναστολείς *TNF-α*.²⁵

Η εισαγωγή του εξανθρωπισμένου μονοκλωνικού αντισώματος που μπλοκάρει την G1 ανοσοσφαιρίνη, στοχευμένο στην ανοσοσφαιρίνη E (omalizumab), αντιπροσωπεύει μια πρόοδο στην αντιμετώπιση του σοβαρού αλλεργικού άσθματος όταν τα συμπτώματα παραμένουν παρά την χρήση της βέλτιστης συνδυαστικής θεραπείας.²¹

Η πρώτη ανακάλυψη ότι ο ανταγωνισμός του *TNF-α* βελτίωνε την πνευμονική λειτουργία αναφέρθηκε σε μια αναδρομική μελέτη ασθενών που είχαν ταυτόχρονη

πάθηση των αεραγωγών και ρευματοειδή αρθρίτιδα και έπαιρναν infliximab για την τελευταία. Αναφέρθηκε σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων και της λειτουργίας των πνευμόνων και μπόρεσαν να ελαττώσουν την χρήση κορτικοστεροειδών όσο υποβάλλονταν στη θεραπεία.⁴

Σε άλλη μελέτη, με μη ελεγχόμενο άσθμα στους οποίους η συνδυαστική θεραπεία αυξήθηκε μέχρι να επιτευχθεί πλήρης έλεγχος ή να φτάσουν τα 1000 μg φλουτικαζόνης, 38% παρέμειναν ανεπαρκώς ελεγχόμενοι και αυτοί έπεσαν στο 31% μόνο μετά από προσθήκη στοματικών κορτικοστεροειδών. Σε μια σειρά έξι κλινικών δοκιμών φάσης III σε βαρύ αλλεργικό άσθμα ενηλίκων, με συμμετοχή ασθενών που λάμβαναν omalizumab ως πρόσθετη θεραπεία με υποδόρια ένεση δύο ως τέσσερις φορές την εβδομάδα για 28-52 εβδομάδες, υπήρξε όφελος σε πολλαπλά μέτρα αποτελεσμάτων άσματος μεταξύ αυτών παροξύνσεις, συμπτώματα, πνευμονική λειτουργία, και σχετική με το άσθμα ποιότητα ζωής. Εντούτοις, υπήρχαν μόνο μικρές αλλαγές στην βασική σπειρομέτρηση. Το omalizumab δοσολογείται σύμφωνα με την συνολική συγκέντρωση τον ορό του ασθενούς της ανοσοσφαιρίνης E (30-700 IU/mL) και το βάρος του σώματος. Το φάρμακο έχει αποτέλεσμα όχι μόνο απομακρύνοντας την κυκλοφορούσα και την ανοσοσφαιρίνη E του ιστού ως μικρά συμπλέγματα, αλλά επίσης και προωθώντας την απώλεια υποδοχέων ανοσοσφαιρίνης υψηλής έλξης στα μαστοκύτταρα, βασεόφιλα και δενδριτικά κύτταρα, συνοδευόμενη από μειωμένη φλεγμονή του αεραγωγού. Η κορύφωση της θεραπευτικής απόκρισης με omalizumab επιτυγχάνεται 12-16 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας. Αφού μόνο περίπου τα δύο τρίτα των ασθενών ανταποκρίνονται στο omalizumab, χρειάζεται να γίνει μια εκτίμηση 16 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας για να καθοριστεί αν θα συνεχιστεί, χρησιμοποιώντας την συνολική κλινική εκτίμηση του ιατρού για να ληφθεί αυτή η απόφαση. Όπως και σε άλλες παθήσεις, υπάρχει ανάγκη για μεγαλύτερη κατανόηση του ανταποκρινόμενου και μη ανταποκρινόμενου, για να αναπτυχθεί ένα απλό τεστ που θα μπορούσε να προβλέπει εκείνους που θα ωφελούνταν περισσότερο από αυτή την θεραπεία.²¹

Καθώς η νόσος προχωράει σε βαρύτητα, το μπλοκάρισμα της κυτοκίνης Th-1 στο κλινικό άσθμα θα ήταν πιο ωφέλιμο στο πιο βαρύ άκρο του φάσματος της νόσου. Η αποτυχία των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών να μειώσουν τον *TNF-α* και τις προερχόμενες από Th-1 κυτοκίνες στους ασθματικούς αεραγωγούς, θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή έχουν περιορισμένα αποτελέσματα στις πιο βαριές μορφές άσματος και είναι πιθανό οι θεραπείες με μπλοκάρισμα του *TNF-α* και η ανάμιξη με προερχόμενες από Th-1 κυτοκίνες να μπορούν να αντιπροσωπεύουν μια πρόοδο στη διαχείριση των ασθενών που δείχνουν ιδιαίτερη αντίσταση στις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες θεραπείες.²¹

Με βάση την αυξημένη έκφραση *TNF-α* στους αεραγωγούς του σοβαρού ανθεκτικού άσματος, μια συναρπαστική εξέλιξη αποτέλεσε η επίδειξη της αποτελεσματικότητας της πρωτεΐνης σύντηξης του διαλυτού υποδοχέα TNF etanercept. σημειώθηκαν ιδιαίτερα εντυπωσιακά αποτελέσματα κατά της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας και στην σχετική με το άσθμα ποιότητα ζωής, με ιδιαίτερα μικρή επίδραση στους δείκτες φλεγμονής. Η κύρια δράση του etanercept κατευθύνεται πιθανόν προς τον λείο μυ του αεραγωγού. Μεγάλες κλινικές δοκιμές με

etanercept και αντι-TNF- α μονοκλωνικά αντισώματα είναι τώρα σε εξέλιξη. Άλλες βιολογικές θεραπείες που επίσης δείχνουν πολλά υποσχόμενες στο βαρύ άσθμα περιλαμβάνουν την ιντερφερόνη- α , την αντι-IL-13 και τα αντι-CD25 (daclizumab) μονοκλωνικά αντισώματα. Το πιθανό κόστος των νέων, στοχευμένων θεραπειών θα κάνει ακόμα πιο σημαντικό να βρεθεί ο υποφαινότυπος του άσθματος, ώστε αυτοί που είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν σε μια συγκεκριμένη θεραπεία να αναγνωριστούν.²¹

Επίσης, αντιφλεγμονώδη φάρμακα για το άσθμα μπορούν να αναπτυχθούν στοχεύοντας στην αναστολή της παραγωγής κυτοκινών και των αποτελεσμάτων τους (όπως αντισώματα κυτοκινών, ανταγωνιστών υποδοχέων κυτοκινών ή αναστολείς συγκεκριμένων αποτελεσμάτων της μεταγωγής σήματος) ή χρησιμοποιώντας ή τροποποιώντας αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες.²⁷

1.1.9. Πρόγνωση και κλινική πορεία του άσθματος

Η θνητότητα από άσθμα είναι μικρή. Καλή πρόγνωση παρουσιάζει το 50-80% των ασθενών, ιδιαίτερα αυτοί με ήπια νόσο η οποία εμφανίστηκε κατά την παιδική ηλικία. Το ποσοστό των παιδιών που συνεχίζουν να παρουσιάζουν εκδηλώσεις άσθματος, 7-10 έτη μετά την αρχική διάγνωση, κυμαίνεται από 26 έως 78% (μέσος όρος 46%) αλλά σοβαρές διαταραχές εμφανίζονται σε χαμηλό ποσοστό (6-19%). Σε αντίθεση με άλλες νόσους των αεραγωγών (π.χ. χρόνια βρογχίτιδα), το άσθμα δεν ακολουθεί προοδευτική πορεία. Η εμφάνιση μη αναστρέψιμων επιπλοκών παρατηρείται σε ασθενείς που συνεχίζουν να εκτίθενται σε νοσηρούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα το κάπνισμα. Ακόμα και σε περιπτώσεις ασθενών που δεν υποβάλλονται σε θεραπεία, η νόσος δεν ακολουθεί εξελικτική πορεία προς βαρύτερες μορφές, αλλά παρουσιάζει υφέσεις και εξάρσεις. Σε ορισμένες μελέτες, διαπιστώθηκε αυτόματη ύφεση της νόσου σε ποσοστό 20% των ατόμων που εκδήλωσαν τη νόσο στην ενήλικη ζωή και υπολογίζεται ότι 40% των ασθενών θα παρουσιάσουν βελτίωση, με λιγότερο συχνές και ηπιότερες εκδηλώσεις, με την πάροδο της ηλικίας.⁶

1.2. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II είναι η συχνότερη ενδοκρινοπάθεια που λαμβάνει παγκοσμίως διαστάσεις επιδημίας. Η αυξανόμενη συχνότητα του ΣΔτ2 είναι ένδειξη μιας μεγάλης κρίσης στην παγκόσμια υγεία. Είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας.²⁸ Σήμερα υπάρχουν περισσότεροι από 400 εκατ. ενήλικες με δείκτη μάζας σώματος μεγαλύτερο των 30 kg/m² (παχύσαρκοι) και 220 εκατομμύρια με ΣΔτ2. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και δεδομένης της κλιμάκωσης των ποσοστών παχυσαρκίας και την παγκόσμια υιοθέτηση δυτικού τρόπου ζωής, ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί σε 700 και 366 εκατομμύρια αντιστοίχως μέχρι το 2030.²⁹

Ο ΣΔτ2 είναι μια μη αυτοάνοση, σύνθετη, ετερογενής και πολυγονιδιακή μεταβολική νόσος κατά την οποία ο οργανισμός αδυνατεί να παράγει αρκετή

ινσουλίνη και χαρακτηρίζεται από ανώμαλη ομοιόσταση γλυκόζης. Στην παθογένεση της φαίνεται να εμπλέκονται πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.²⁸

Ο ΣΔτ2 είναι χρόνια νόσος που οφείλεται σε διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων την οποία προκαλεί η σχετική ή η πλήρης έλλειψη ινσουλίνης. Στην ανεπαρκή παραγωγή ινσουλίνης οφείλεται η αύξηση του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και η παρουσία σακχάρου στα ούρα (σακχαροουρία). Ο ΣΔτ2 χαρακτηρίζεται από μεταβολικές διαταραχές και από μακροχρόνιες επιπλοκές που αφορούν τους οφθαλμούς, τους νεφρούς, τα νεύρα και τα αγγεία. Η διαταραχή δεν είναι ομοιογενής και υπάρχουν αρκετά διακριτά διαβητικά σύνδρομα.⁶ Η εμφάνισή του γίνεται όλο και συχνότερη και προβλέπεται να αυξηθεί ακόμα περισσότερο, παράλληλα με τις παρατηρούμενες τάσεις για παχυσαρκία. Αυτή η αυξανόμενη παρουσία του διαβήτη αποτελεί μια σημαντική επιβάρυνση για την ανθρώπινη υγεία, λόγω των πολυάριθμων και συχνά σοβαρών επιπλοκών του (νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια, καρδιαγγειακές παθήσεις περιοδοντίτιδα). Ο διαβήτης έχει επίσης οικονομικό κόστος, με συνολικό άμεσο και έμμεσο ιατρικό κόστος ήδη >132 δις μόνο στις ΗΠΑ.³⁰

Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αντανακλά το συνδυασμό να κληρονομηθεί σαν ποικιλομορφία σε πολλούς γονιδιακούς τύπους και την έκθεση σε νεότερους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και η μειωμένη σωματική άσκηση. Η σύγχρονη έκρηξη στην εμφάνιση του ΣΔτ2 πρέπει ωστόσο να οφείλεται κυρίως σε περιβαλλοντικές μεταβολές. Υπολογίζεται, όμως, ότι η κληρονομική προδιάθεση του ΣΔτ2 είναι περίπου 25%. Οι υπολογισμοί κληρονομικότητας είναι δυνατό να κυμαίνονται ανάλογα με το χρόνο και το χώρο, αντανακλώντας μεταβολές της περιβαλλοντικής ποικιλότητας και της γενικής επίπτωσης της νόσου. Το πρώτο βήμα που οδηγεί στη γονιδιωματική ιατρική είναι η αναγνώριση γενετικών ποικιλιών που αποδεδειγμένα σχετίζονται με την υπό εξέταση νόσο. Έτσι, ο ΣΔτ2, ως πολυπαραγοντική νόσος, υπήρξε το αρχικό στάδιο τεράστιας πρόκλησης.²⁹

Τα τελευταία χρόνια η γενετική έρευνα του ανθρώπου έχει προοδεύσει στο χαρακτηρισμό της γενετικής βάσης των συνήθων μορφών διαβήτη. Η ταυτοποίηση των γενετικών συνιστωσών του ΣΔτ2 είναι η πιο σημαντική περιοχή διερεύνησης του διαβήτη, διότι η διαλεύκανση των γονιδίων του διαβήτη (αλληλόμορφα) θα επηρεάσει όλες τις προσπάθειες προς μια μηχανιστική κατανόηση της νόσου, των επιπλοκών της, της θεραπείας της και την πρόληψη. Οι ερευνητές έχουν εντοπίσει μια σειρά από γενετικούς παράγοντες που μπορεί να είναι υπεύθυνοι για συγκεκριμένα ή περισσότερο γενικά για τους διαβητικούς ασθενείς. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα ελαττώματα στην αντιοξειδωτική άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία των διαβητικών επιπλοκών.²⁸

1.2.1. Ιστορικά στοιχεία Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Η ιστορία του διαβήτη θα μπορούσε να χωριστεί σε τέσσερις μεγάλες εποχές ή περιόδους. Σαν πρώτη εποχή θα μπορούσε να θεωρηθεί η "Εποχή της Κλινικής

Αναγνώρισης" του διαβήτη. Η δεύτερη εποχή συνδυάζεται με τη "Βιοχημική Αναγνώριση" της νόσου, δηλ. τη διαπίστωση πρώτα της σακχαρουρίας και ύστερα της υπεργλυκαιμίας. Η τρίτη εποχή ταυτίζεται με την "Ανακάλυψη της Ινσουλίνης" και θα μπορούσε να ονομαστεί και "Ηρωική Εποχή". Η τετάρτη εποχή είναι η "Εποχή των Υπογλυκαιμικών δισκίων". Τέλος, θα μπορούσε κανείς οραματιζόμενος, να προβλέψει και μια "πέμπτη" μελλοντική εποχή. Η εποχή αυτή είναι η "Εποχή της Πραγματοποίησης των Μεγάλων Προσδοκιών", δηλ. η εποχή των αναλόγων ινσουλίνης και των σούπερ ινσουλινών, της ινσουλίνης από το στόμα ή από τη μύτη με σπρέι, των μεταμοσχεύσεων νησιδίων του παγκρέατος, των αντλιών κλειστού κυκλώματος, με ενσωματωμένο βιοαισθητήρα γλυκόζης και, τέλος, της οριστικής λύσης αυτού του "γλυκού μυστηρίου". Οι προβλέψεις για την πραγματοποίηση των προσδοκιών αυτών στο άμεσο μέλλον διαγράφονται αισιόδοξες χάρις στη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί στους τομείς της γενετικής, της γενετικής μηχανικής και της βιοτεχνολογίας.²⁹

1.2.2. Αιτιολογία και Συχνότητα Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Η Ευρώπη και η Βόρεια Αμερική έχουν, σταδιακά σε πολλές εκατοντάδες χρόνια, αλλάξει τον τρόπο ζωής τους και την δημογραφική τους σύσταση. Έχουν αλλάξει από την αγροτική ζωή και την παραγωγή σε αστική ζωή και βιομηχανική παραγωγή. Ως αποτέλεσμα αυτών των εξελίξεων, υπάρχει μια αύξηση του μέσου προσδόκιμου ζωής, της υγιεινής και της ευημερίας. Η αύξηση της ευημερίας έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα τροφίμων και την μειωμένη σωματική δραστηριότητα, παράγοντες που συμβάλλουν σε αυξανόμενη επικράτηση του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας. Αυτές οι αλλαγές συσχετίζονται με την μετάβαση των προτύπων των ασθενειών από πρωτίστως μεταδοτικές ασθένειες ή λοιμώξεις, προς χρόνιες, μη μεταδοτικές ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο ΣΔτ2, οι ατοπικές νόσοι όπως το άσθμα και οι αλλεργίες, καθώς και οι αυτοάνοσες νόσοι. Πολλές αναπτυσσόμενες χώρες έχουν περάσει αυτήν την διαδικασία σε λίγες μόνο δεκαετίες.³²

Για παράδειγμα, ο αυτόχθων πληθυσμός της Γροιλανδίας έχει, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, υποστεί σημαντικές αλλαγές, μεταξύ αυτών ταχεία αστικοποίηση και μετάβαση από μια κοινωνία παραδοσιακά κυνηγών και ψαράδων, σε μια σύγχρονη κοινωνία στην οποία οι περισσότεροι άνθρωποι εργάζονται στο εμπόριο, την διοίκηση και τις υπηρεσίες. Ταυτόχρονα, έχουν εμφανιστεί αλλαγές στα πρότυπα των ασθενειών. Για παράδειγμα, η συχνότητα της ατοπίας όσον αφορά την ειδική IgE ευαισθητοποίηση σε εισπνεόμενα αλλεργιογόνα, είχε σχεδόν διπλασιαστεί μεταξύ 1987 (10%) και 1998 (19%). Η αύξηση είχε επίσης παρουσιαστεί και σε μεγαλύτερους ενήλικες, δείχνοντας ότι οι παράγοντες κινδύνου που είναι υπεύθυνοι για την αύξηση της ατοπίας δεν λειτουργούν μόνο στην παιδική ηλικία. Παράλληλα με την αύξηση της ατοπίας, φάνηκε με την χρήση στοιχείων από το 1963 και το 1998, και υπολογίζοντας έναν ειδικό για τους αυτόχθονες κανόνα δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ, Body Mass Index, BMI) ότι η αναλογία υπέρβαρων ανδρών 50-69 ετών είχε αυξηθεί πάνω από έξι φορές από 4,0% σε 25,6% ανάλογα με την αύξηση την

δυτικοποίηση. Η αναλογία υπέρβαρων γυναικών 50-69 ετών είχε διπλασιαστεί από 14,0% σε 30,7%. Έτσι, σε επίπεδο πληθυσμού, φαίνεται να υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ παχυσαρκίας και ατοπικής νόσου.³²

Η αιτία για τον κοινό ΣΔτ2, που επηρεάζει τουλάχιστον 100 εκατομμύρια ανθρώπων σε όλον τον κόσμο, δεν είναι γνωστή. Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζεται είναι να εξηγηθεί μηχανιστικά όχι μόνο η καθοριστική υπεργλυκαιμία αλλά και οι μυριάδες άλλων βιοχημικών και φυσιολογικών ανωμαλιών που χαρακτηρίζουν αυτή την ασθένεια. Αν και η αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να είναι μία κεντρική ανωμαλία, η προέλευση της ελαττωματικής δράσης της ινσουλίνης και ο τρόπος που αυτή εξηγεί τις πολλές άλλες ανωμαλίες του ΣΔτ2 δεν είναι γνωστή.³³

Ο ΣΔτ2 είναι μία εξελισσόμενη νόσος από μεταβολική νόσος μετατρέπεται σε φλεγμονώδη πάθηση. Το 1998, διατυπώθηκε μια υπόθεση που πρότεινε ότι η μακροχρόνια ενεργοποίηση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, που έχει ως αποτέλεσμα την χρόνια φλεγμονή, προκαλούσε παθήσεις αντί για επανόρθωση, οδηγώντας στην ανάπτυξη του ΣΔτ2. Τα τελευταία χρόνια, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η χαμηλού βαθμού φλεγμονή σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔτ2. Επιπλέον, σήμερα είναι αποδεκτό ότι η χρόνια υποκλινική φλεγμονή είναι μέρος του συνδρόμου αντίστασης στην ινσουλίνη και σχετίζεται ισχυρά με χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου.³⁴

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η χρόνια φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει ΣΔτ2 δεν είναι σαφείς. Τα πρόσφατα χρόνια, συλλέχθηκαν στοιχεία ότι στον ΣΔτ2 υπάρχει μια σχετιζόμενη με τις κυτοκίνες αντίδραση οξείας φάσης, μέρος της εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι ο λιπώδης ιστός μπορεί να συνθέσει και να απελευθερώσει τις βασικές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, *TNF- α* , *IL-1*, *IL-6*, και ότι οι δείκτες φλεγμονής σχετίζονται με τον όγκο του σωματικού λίπους. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης συμμετέχουν στους πολλαπλούς μεταβολικούς διαδρόμους που είναι σημαντικοί για την αντίσταση στην ινσουλίνη, μεταξύ αυτών την ρύθμιση της ινσουλίνης, τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και την λειτουργία των λιποκυττάρων. Επομένως, η ενεργοποιημένη εγγενής ανοσία και η φλεγμονή είναι σημαντικοί παράγοντες για τη παθογένεση του διαβήτη, με πειστικά δεδομένα ότι ο ΣΔτ2 περιλαμβάνει ένα φλεγμονώδες συστατικό.³⁴

1.2.3. Παθογένεση Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Πολλοί παράγοντες είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη του διαβήτη και των επιπλοκών του. Αυτοί περιλαμβάνουν την γενετική, την διατροφή, την καθιστική ζωή, την ηλικία, την παχυσαρκία. Παρ' όλα αυτά, η φλεγμονώδης βάση για τον διαβήτη και τις επιπλοκές του έχει αρχίσει να κερδίζει ενδιαφέρον. Ο ΣΔτ2 είναι η πιο κοινή μορφή και παρουσιάζεται κυρίως σε ενήλικες, αν και η εμφάνιση σε πιο νέους ανθρώπους αρχίζει να αυξάνεται σε σύνδεση με την παιδική παχυσαρκία. Ο ΣΔτ2 χαρακτηρίζεται από μια αύξηση στην αντίσταση στην ινσουλίνη μαζί με αδυναμία των παγκρεατικών β-κυττάρων να εκκρίνουν αρκετή ινσουλίνη προς αναπλήρωση.³⁰

Μολονότι ο ΣΔτ2 είναι η πιο κοινός από τον ΣΔτ1 και εμφανίζει συχνότερα οικογενή επίπτωση, η παθογένεση του είναι λιγότερο κατανοητή. Ωστόσο, τόσο η διαταραχή των β κυττάρων όσο και η ανοχή στην ινσουλίνη παρατηρούνται στην έκδηλη νόσο και ο κύριος περιβαλλοντικός παράγων είναι η παχυσαρκία. Η σχέση μεταξύ της διαταραχής των β κυττάρων και της ανοχής στην ινσουλίνη δεν έχει αποδειχθεί.⁶

1.2.4. Γενετική Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Παρόλο ότι ο ΣΔτ2 εμφανίζεται σε οικογένειες, ο τρόπος κληρονομικότητας δεν είναι γνωστός, εκτός από την παραλλαγή που καλείται νεανικός διαβήτης με έναρξη σε ώριμη ηλικία (MODY). Είναι πολύ πιθανόν ότι ο συνηθισμένος ΣΔτ2 είναι πολυγονιδιακός. Μεγάλη προσπάθεια έχει γίνει για την αξιολόγηση των υποψηφίων γονιδίων, με έμφαση στα μόρια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης στα β κύτταρα του παγκρέατος, στο ήπαρ, στους μυς και στο λίπος. Μερικές περιπτώσεις ΣΔτ2 φαίνεται ότι σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν ινσουλίνη, στοιχεία των μιτοχονδρίων, του υποδοχέα της ινσουλίνης, με τη γλυκοκινάση και τη συνθάση του γλυκογόνου.⁶

Περισσότερα από 250 υποψήφια γονίδια έχουν εξεταστεί από διάφορες ομάδες, αλλά κανένα δεν έχει αποδειχθεί υπεύθυνο για το συνήθη ΣΔτ2. Οποιαδήποτε και αν είναι η φύση του, η γενετική επίδραση είναι ισχυρή, εφόσον το ποσοστό συνύπαρξης διαβήτη σε μονοωογενείς διδύμους με τον τύπο II της νόσου ίσως φτάνει και τον 80%. Ο κίνδυνος στα παιδιά και τους συγγενείς των ασθενών με ΣΔτ2 είναι υψηλότερες από ότι στο ΣΔτ1. Σχεδόν, τα τέσσερα δέκατα των αδελφών τελικά εμφανίζουν παθολογική ανοχή στη γλυκόζη ή αληθή διαβήτη.⁶

1.2.5. Παθοφυσιολογία Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Οι ασθενείς με ΣΔτ2 εμφανίζουν δύο διαταραχές της φυσιολογικής λειτουργίας: παθολογική έκκριση ινσουλίνης και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους. Ποια από τις διαταραχές προηγείται δεν είναι γνωστό. Περιγραφικά, τρεις φάσεις μπορούν να αναγνωριστούν στη συνήθη κλινική εκδήλωση. Στην πρώτη φάση, η γλυκόζη του πλάσματος παραμένει φυσιολογική, παρά την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη, επειδή τα επίπεδα της ινσουλίνης είναι αυξημένα. Στην δεύτερη φάση, η αντίσταση στην ινσουλίνη τείνει να επιδεινωθεί, οπότε εμφανίζεται υπεργλυκαιμία μετά τη λήψη γεύματος, παρά τις αυξημένες συγκεντρώσεις ινσουλίνης. Στην τρίτη φάση, η αντίσταση στην ινσουλίνη δε μεταβάλλεται, αλλά η μειωμένη έκκριση ινσουλίνης προκαλεί υπεργλυκαιμία νηστείας και έκδηλο διαβήτη. Οι περισσότεροι ειδικοί πιστεύουν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι πρωτοπαθής και ότι η υπερινσουλιναιμία είναι δευτεροπαθής, δηλαδή η έκκριση ινσουλίνης αυξάνεται για να αντισταθμίσει την κατάσταση της αντίστασης.⁶

Ωστόσο, η υπερέκκριση ινσουλίνης μπορεί να προκαλέσει αντίσταση στην ινσουλίνη, δηλαδή μία πρωτοπαθής διαταραχή των κυττάρων των νησιδίων προκαλεί υπερέκκριση ινσουλίνης και η υπερέκκριση ινσουλίνης, στη συνέχεια, οδηγεί σε

αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι επεξηγηματικές θεωρίες περιλαμβάνουν την αυξημένη σύνθεση λίπους στο ήπαρ και την ενισχυμένη μεταφορά λίπους [μέσω των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL)], που οδηγεί σε δευτεροπαθή συσσώρευση λίπους στους μυς. Η αυξημένη οξείδωση του λίπους εμποδίζει την πρόσληψη γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκογόνου.⁶

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΣΔτ2 είναι παχύσαρκοι και η παχυσαρκία αφ'εαυτής προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, οι μη παχύσαρκοι συγγενείς ασθενών με ΣΔτ2 μπορεί να εμφανίσουν υπερινσουλιναιμία και μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, αποδεικνύοντας ότι η παχυσαρκία δεν είναι η μόνη αιτία αντίστασης. Αυτό δεν σημαίνει ότι ελαχιστοποιείται η σημασία του υπερβολικού λίπους, αφού μία μέτρια μείωση του βάρους συχνά συντελεί σε σημαντική βελτίωση της ρύθμισης της γλυκόζης αίματος σε παχύσαρκα άτομα με ΣΔτ2. Η όψιμη ελάττωση της έκλυσης ινσουλίνης μπορεί να οφείλεται στην υποκείμενη γενετική διαταραχή ή σε μεταβολική τοξικότητα στα β κύτταρα. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης ή τα αυξημένα επίπεδα των λιπαρών οξέων μεγάλων αλυσίδων στους ιστούς («λιποτοξικότητα») ίσως είναι τα υπεύθυνα μόρια για την καταστροφή. Είναι πιθανόν ότι τόσο η διαταραχή της έκλυσης ινσουλίνης όσο και η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι προϋποθέσεις για την έκφραση του διαβήτη, επειδή τα υπερβολικά παχύσαρκα άτομα με σημαντική αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να έχουν φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. Πιθανώς, η βλάβη των β κυττάρων δεν υπάρχει σε αυτά τα άτομα. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι η πρωτοπαθής διαταραχή βρίσκεται στα κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη. Τα περισσότερα β κύτταρα είναι ανέπαφα στον ΣΔτ2, σε αντίθεση με την περίπτωση του ΣΔτ1. Ο πληθυσμός των α κυττάρων είναι αυξημένος, με αποτέλεσμα την αυξημένη αναλογία των α προς τα β κύτταρα και την περίσσεια γλυκαγόνης σε σχέση με την ινσουλίνη, η οποία χαρακτηρίζει όλες τις υπεργλυκαιμικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του ΣΔτ2.⁶

Πρόσφατα έχει δοθεί έμφαση στο ρόλο των παγκρεατικών β-κυττάρων στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΣΔτ2. Κλινικές μελέτες και μελέτες αυτοψίας υποδεικνύουν ότι ο ΣΔτ2 χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική απώλεια της λειτουργίας τόσο των β-κυττάρων όσο και της μάζας. Το διαβητικό περιβάλλον εμπλουτίζεται με υψηλά επίπεδα γλυκόζης, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ελεύθερα λιπαρά οξέα και άλλα ενδιάμεσα λιπίδια. Αυτοί οι παράγοντες είναι άμεσα τοξικοί για τα β-κύτταρα και ενεργοποιούν αρκετές επικαλυπτόμενες οδούς στρες συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού και του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, της απόπτωσης και της νέκρωσης.³⁵

1.2.6. Κλινική Εικόνα Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

1.2.6.1. Ταξινόμηση Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης ταξινομείται σε συγκεκριμένες μορφές οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8).

Πρωτοπαθής
Αυτοάνοσος (τύπου I) Σακχαρώδης διαβήτης
Μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (NIDDM τύπου 1-παροδικός)
Ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (IDDM τύπου 1)
Μη Αυτοάνοσος (τύπου II) Σακχαρώδης διαβήτης
Ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (IDDM τύπου 2-παροδικός)
Μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (NIDDM τύπου 2)
Νεανικός διαβήτης με έναρξη σε ώριμη ηλικία (MODY)
Δευτεροπαθής
Διαβήτης που οφείλεται σε παγκρεατική νόσο
Διαβήτης που οφείλεται σε ορμονικές διαταραχές
Διαβήτης που επάγεται από φάρμακα ή χημικές ουσίες
Διαβήτης που οφείλεται σε διαταραχές του υποδοχέα της ινσουλίνης
Διαβήτης που συνοδεύει γενετικά σύνδρομα
Διαβήτης λοιπών αιτιών

Πίνακας 8: Ταξινόμηση σακχαρώδους διαβήτη⁶

Οι βασικές κατηγορίες είναι αυτές που συνιστώνται από το National Diabetes Data Group, εκτός της διάκρισης σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή τύπο. Πρωτοπαθής σημαίνει ότι δεν υπάρχει η συσχετιζόμενη νόσος, ενώ στη δευτεροπαθή κατηγορία κάποια αναγνωρίσιμη κατάσταση προκαλεί ή και ευνοεί την ανάπτυξη διαβητικού συνδρόμου. Η εξάρτηση από την ινσουλίνη σε αυτή την ταξινόμηση δεν έχει σχέση με την ινσουλινοθεραπεία. Πολλοί από τους ασθενείς που ταξινομούνται ως μη ινσουλινοεξαρτώμενοι χρειάζονται ινσουλίνη για τη ρύθμιση της υπεργλυκαιμίας, αν και δεν παθαίνουν κετοξέωση εάν διακοπεί η ινσουλίνη.⁶

Ο όρος διαβήτης τύπου 1 συχνά χρησιμοποιείται ως συνώνυμος του ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδους διαβήτη (IDDM) και ο διαβήτης τύπου 2 θεωρείται ισοδύναμος με τον μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (NIDDM). Αυτή η συσχέτιση δεν είναι ιδανική, γιατί μία υποομάδα ασθενών με φαινομενικά μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη αργότερα καθίσταται πλήρως ινσουλινοεξαρτώμενοι και με τάση εμφάνισης κετοξέωσης. Αυτοί οι ασθενείς δεν είναι παχύσαρκοι και συνήθως εκφράζουν αντιγόνα που σχετίζονται με επιρρέπεια στον ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη, ενώ εμφανίζουν επίσης ενδείξεις ανοσολογικής απάντησης στα αντιγόνα των κυττάρων των νησιδίων. Γι' αυτό το λόγο έχει προταθεί η τροποποίηση της ταξινόμησης που παρουσιάζεται στον πίνακα, έτσι ώστε οι όροι

ινσουλινοεξαρτώμενος και μη ινσουλινοεξαρτώμενος να περιγραφούν φυσιολογικές καταστάσεις (επιρρεπής σε κετοξέωση και ανθεκτικός σε κετοξέωση, αντίστοιχα), είναι ότι οι όροι Τύπος 1 και Τύπος 2 να αναφέρονται σε παθογενετικούς μηχανισμούς (ανοσολογικοί μεσολαβητές και μη ανοσολογική μεσολάβηση, αντίστοιχα).⁶

1.2.6.2. Κλινικά χαρακτηριστικά Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου II

Οι εκδηλώσεις του συμπτωματικού σακχαρώδους διαβήτη ποικίλουν. Συχνότερα, τα συμπτώματα οφείλονται στην υπεργλυκαιμία (πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία), αλλά η πρώτη εκδήλωση μπορεί να είναι μία οξεία μεταβολική διαταραχή με συνέπεια το διαβητικό κώμα. Μερικές φορές, η αρχική εκδήλωση είναι μία εκφυλιστική επιπλοκή, όπως η νευροπάθεια, με απουσία συμπτωματικής υπεργλυκαιμίας. Οι μεταβολικές διαταραχές του διαβήτη οφείλονται στη σχετική ή απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης και τη σχετική ή απόλυτη περίσσεια γλυκαγόνης. Φυσιολογικά, μία αύξηση της μοριακής αναλογίας γλυκαγόνης προς ινσουλίνη οδηγεί σε διαταραχή της μεταβολικής ισορροπίας. Οι μεταβολές αυτές τις ανάλογες μπορεί να οφείλονται σε μείωση της συγκέντρωσης ινσουλίνης ή σε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκαγόνης, ξεχωριστά ή μαζί. Η μεταβολή της βιολογικής απάντησης σε οποιαδήποτε από αυτές τις ορμόνες έχει την ίδια επίδραση. Επομένως, η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να προκαλέσει τις μεταβολικές επιδράσεις που αναμένονται από αυξημένη αναλογία γλυκαγόνης/ινσουλίνης, ακόμα κι αν η αναλογία που ανευρίσκεται με άνοσοπροσδιορισμό των δύο ορμονών στο πλάσμα είναι φυσιολογική ή και μειωμένη (με τη γλυκαγόνη βιολογικώς ενεργό και την ινσουλίνη σχετικώς ανενεργό). Τυπικά, τα κλινικά ευρήματα του ΣΔτ1 και ΣΔτ2 είναι διακριτά.⁶

Ο ΣΔτ2 συνήθως εμφανίζεται στη μέση ηλικία ή αργότερα. Ο τυπικός ασθενής είναι υπέρβαρος. Τα συμπτώματα αρχίζουν σταδιακά και η διάγνωση συχνά τίθεται όταν ένα ασυμπτωματικό άτομο βρεθεί να έχει αυξημένο επίπεδο γλυκόζης στο πλάσμα σε τυχαία εργαστηριακή εξέταση ρουτίνας. Σε αντίθεση με τον ΣΔτ1, τα επίπεδα της ινσουλίνης στο πλάσμα είναι φυσιολογικά έως υψηλά σε απόλυτες τιμές, αν και είναι χαμηλότερα από το αναμενόμενο σε σχέση με τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος, δηλαδή υπάρχει σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης. Με άλλα λόγια, αν η συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος σε μη διαβητικά άτομα αυξηθεί σε επίπεδα ισοδύναμα με αυτά που ανευρίσκονται σε ασθενείς με ΣΔτ2, οι τιμές της ινσουλίνης θα ήταν υψηλότερες στη φυσιολογική ομάδα. Αυτή η σχετική ανεπάρκεια αντανάκλα την προηγούμενη αναφορά στη διαταραχή της έκκρισης ινσουλίνης στον ΣΔτ2. Ο μεταβολισμός της γλυκαγόνης στον ΣΔτ2 είναι περίπλοκος. Ενώ οι αυξημένες συγκεντρώσεις στο πλάσμα νηστείας μπορεί να μειωθούν με μεγάλες ποσότητες ινσουλίνης, η υπερβολική απάντηση της γλυκαγόνης στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών δεν μπορεί να κατασταλεί, δηλαδή η λειτουργία των α κυττάρων παραμένει παθολογική. Για άγνωστους λόγους, οι ασθενείς με ΣΔτ2 δεν εμφανίζουν κετοξέωση, αλλά είναι ευαίσθητοι στην εμφάνιση υπερωσμωτικού, μη κετωσικού κώματος. Μία θεωρία που εξηγεί την απουσία κετοξέωσης κατά τη διάρκεια στρες

είναι ότι το ήπαρ έχει αντοχή στη γλυκαγόνη, οπότε τα επίπεδα του μαλονυλο-CoA παραμένουν υψηλά, αναστέλλοντας την οδό οξείδωση λιπαρών οξέων-κετογονίας. Αν είναι δυνατό να επιτευχθεί απώλεια βάρους, οι ασθενείς μπορεί να αντιμετωπισθούν μόνο με δίαιτα. Οι περισσότεροι ασθενείς που αποτυγχάνουν τη θεραπεία με δίαιτα ανταποκρίνονται σε σουλφονουλουρίες ή σε συνδυασμό σουλφονουλουρίας με μετφορμίνη, αλλά σε πολλούς, η επακόλουθη βελτίωση της υπεργλυκαιμίας δεν επαρκεί για τον έλεγχο του διαβήτη. Γι' αυτό το λόγο, ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΣΔτ2 θεραπεύονται με ινσουλίνη.⁶

1.2.7. Σχέση Σακχαρώδους Διαβήτη II και Παχυσαρκίας

Ο ΣΔτ2 και οι επιπλοκές του προκαλούν αυξανόμενη ανησυχία, δεδομένης της αύξησης της εμφάνισής του παγκοσμίως και της συσχέτισής του με την παχυσαρκία. Η παχυσαρκία αποτελεί την πιο συχνή μη-μολυσματική μορφή επιδημίας παγκοσμίως και μια από τις σημαντικότερες μάστιγες της εποχής μας. Το 2008 υπολογίζεται ότι 1,5 δισεκατομμύριο άνθρωποι ήταν υπέρβαροι, ενώ οι προβλέψεις για το 2030 είναι ακόμα πιο δυσοίωνες υποστηρίζοντας επιπλέον αύξηση της συχνότητας της παχυσαρκίας κατά 15%. Στα παιδιά, η συχνότητα της παχυσαρκίας αυξήθηκε από 4,2% το 1990 στο 6,7% το 2010 και η τάση αυτή αναμένεται να παρουσιάσει περαιτέρω αύξηση στο 9,1% το 2020. Στις ΗΠΑ, το 1/3 του πληθυσμού είναι παχύσαρκο, ενώ και στην Ευρώπη το πρόβλημα έχει λάβει ήδη επιδημικές διαστάσεις. Οι χώρες της Νοτιοανατολικής Ευρώπης και της Μεσογείου εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά παχυσαρκίας σε σχέση με αυτές της Βορειοδυτικής. Στην Ελλάδα, το πρόβλημα της παχυσαρκίας λαμβάνει ολοένα και περισσότερο ανησυχητικές διαστάσεις. Σε επίπεδο ενηλίκων, υπολογίζεται ότι το 20-25% είναι παχύσαρκο, ενώ τα πολύ υψηλά ποσοστά παιδικής παχυσαρκίας κατατάσσουν τη χώρα μας στην πρώτη θέση πανευρωπαϊκά. Η ραγδαία αύξηση της συχνότητας της παχυσαρκίας τα τελευταία χρόνια συνδέεται και με μια σημαντική επιδείνωση των συνοδών με αυτήν νοσημάτων. Η παχυσαρκία σχετίζεται με την εκδήλωση συνοδών νοσημάτων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η αρτηριακή υπέρταση, καρδιοαγγειακά νοσήματα, διάφορες μορφές καρκίνου και με την αύξηση της θνησιμότητας κατά 20-40% σε υπέρβαρα άτομα. Ο ΣΔτ2 έχει σαφώς μια γενετική συνιστώσα και οι ασθενείς είναι επιρεπείς σε ασθένειες. Αυτό αντανακλά μια αλληλεπίδραση μεταξύ πολλαπλών γονιδίων, περιβαλλοντικών προκλήσεων και ηλικίας. Η ισχυρότερη πρόκληση είναι η παχυσαρκία και, για παράδειγμα, οι άνδρες ευρωπαίοι με BMI>35 kg/m² και περίμετρος μέσης>102cm έχουν 22 φορές περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν ΣΔτ2 από τους άνδρες με χαμηλό BMI. Τα τελευταία 5 χρόνια υπήρξε μεγάλη πρόοδος στον εντοπισμό ανθρώπινων τόπων που σχετίζονται με τον ΣΔτ2 και την παχυσαρκία. GWAS μελέτες έχουν μέχρι στιγμής συσχετίσει πάνω από 50 γονίδια με ΣΔτ2.³⁶

Η παχυσαρκία αυξάνει την παρουσία της και συσχετίζεται με πολλά σοβαρά προβλήματα υγείας, όπως ο ΣΔτ2, η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση. Η επίδραση της παχυσαρκίας στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι σύνθετη και πιθανόν να οφείλεται σε μια αλληλεπίδραση γενετικών, διατροφικών και μεταβολικών παραγόντων. Πολλή

προσοχή έχει δοθεί στην ταυτοποίηση των μοριακών διαδρόμων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας και του ΣΔτ2.³⁷

Για τη διάγνωση της παχυσαρκίας χρησιμοποιείται το BMI (δείκτης σωματικής μάζας), το οποίο είναι το πηλίκο του βάρους σε κιλά προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα (Πίνακας 9).

Ελλειποβαρής	<18,5
Φυσιολογικός	18,5–24,9
Υπέρβαρος	25–29,9
Παχυσαρκία	
Class I	30–34,9
Class II	35–39,9
Extreme	>40

Πίνακας 9: Διάγνωση της παχυσαρκίας βάση ΔΜΣ (BMI) (Kg/m²)

Αν και χρησιμοποιείται το βάρος για την αναγνώριση των παχύσαρκων, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παχυσαρκία είναι διαταραχή των αποθηκών του λιπώδους ιστού. Συνεπώς, άλλος ένας παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σχετικά με τη διάγνωση της παχυσαρκίας είναι η κατανομή του λιπώδους ιστού, ο οποίος δεν κατανέμεται ισομερώς σε όλο το σώμα. Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία και ο ΣΔτ2 αποτελούν σημαντικούς παράγοντες θνητότητας. Μόνο το 2004, περισσότεροι των 112.000 θανάτων στις ΗΠΑ αποδόθηκαν σε αυξημένη καρδιαγγειακή νόσο λόγω παχυσαρκίας. Κατά το ίδιο έτος υπολογίστηκε ότι το 5% περίπου της παγκόσμιας θνητότητας οφείλεται σε επιπλοκές του διαβήτη. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι επιπλοκές του συνδρασμού ΣΔτ2 και παχυσαρκίας ήταν υπεύθυνες για το 8% του συνολικού κόστους υγείας στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2010. Παρά τους εντυπωσιακούς αυτούς αριθμούς και την αυξανόμενη απειλή ατόμων, οικογενειών και συστημάτων υγείας, τα νεότερα στοιχεία της γενετικής, καθώς και της παθοφυσιολογίας του ΣΔτ2, παραμένουν ανεπαρκή.²⁹

Η παχυσαρκία είναι μια πολύπλοκη ασθένεια στην αιτιοπαθογένεια της οποίας συμβάλλουν τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί παράγοντες. Ο George Bray το 2004 πολύ εύστοχα απέδωσε την αλληλεπίδραση περιβάλλοντος-γονιδίων στην παρακάτω φράση «το γενετικό υπόβαθρο οπλίζει το όπλο, αλλά το περιβάλλον τραβάει τη σκανδάλη».³⁸ Με άλλα λόγια, η προδιάθεση για παχυσαρκία είναι μερικώς προκαθορισμένη από το γενετικό υπόβαθρο, ωστόσο η ύπαρξη «παχύσαρκου» περιβάλλοντος είναι απαραίτητη για τη φαινοτυπική της έκφραση. Οι έρευνες σχετικά με την αλληλεπίδραση περιβάλλοντος-γονιδίων είναι πολλές. Μεμονωμένες μελέτες καθώς και μετά-ανάλυση έδειξαν ισχυρή αλληλεπίδραση της φυσικής δραστηριότητας και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η πρόοδος στις γνώσεις μας σχετικά με το

ρόλο των γονιδίων στην αιτιοπαθογένεια της παχυσαρκίας υπήρξε αξιοσημείωτη τα τελευταία χρόνια. Το 2001, μόνο έξι γονίδια είχαν συνδεθεί με την πρόκληση μονογονιδιακών μορφών παχυσαρκίας, ενώ κανένας γενετικός πολυμορφισμός δεν είχε σχετιστεί επανειλημμένα με πολυγονιδιακές μορφές. Το 2007 και έπειτα, η εφαρμογή των μελετών σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAs, Genome-Wide Association studies) και η αυτοματοποίηση των τεχνολογιών ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA έφερε επανάσταση στη γενετική της παχυσαρκίας. Σήμερα είναι γνωστό ότι 8 γονίδια και το έλλειμμα 16p11.2 εμπλέκονται σε μεντελικές μονογονιδιακές μορφές παχυσαρκίας και επίσης 61 πολυμορφισμοί SNPs σε 58 γονίδια σχετίζονται ισχυρά (σε τιμές $p < 5 \times 10^{-8}$) με την πολυγονιδιακή παχυσαρκία.³⁹

Είναι πλέον επιβεβαιωμένο ότι η παχυσαρκία είναι ένας ανεξάρτητος παράγων κινδύνου για ΣΔτ2, δυσλιπιδαιμία, και καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι, για μια δεδομένη παχυσαρκία, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στον μεταβολικό και καρδιαγγειακό κίνδυνο συνδεδεμένη κυρίως με την θέση του υπερβολικού λιπώδους ιστού. Η συσσώρευση κοιλιακού λιπώδους ιστού είναι ένας σημαντικός παράγοντας πρόβλεψης διαταραχών σε λιπίδια, γλυκόζη ή αθηρογόνων διαταραχών, ενώ η θέση του λιπώδους ιστού στο κάτω μέρος του σώματος δεν συνδέεται με αυξημένες μεταβολές στο μεταβολικό επίπεδο. Επομένως, σε επίπεδο ιστών, η παχυσαρκία δεν είναι αποκλειστικά μια νόσος λιποκυττάρων, αλλά εμπλέκει επίσης και άλλους τύπους κυττάρων που εδρεύουν στον λευκό λιπώδη ιστό (WAT). Αυτή η έννοια μας βοηθά να κατανοήσουμε τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στη ρίζα της αντίστασης στην ινσουλίνη και του ΣΔτ2.⁴⁰

Η παχυσαρκία, που παρουσιάζεται σε ποσοστό >80% των ασθενών με ΣΔτ2, αποτελεί τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου για ΣΔτ2. Εντούτοις, η σύνδεση μεταξύ παχυσαρκίας και διαβήτη δεν είναι καλά κατανοητή και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στα σύνδρομα παχυσαρκίας-διαβήτη ακόμα δεν είναι γνωστοί. Δύο επιδείξιμα φυσιολογικά ελαττώματα που οδηγούν στην ανάπτυξη ΣΔτ2 είναι η αντίσταση των ιστών στην επίδραση της ινσουλίνης. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει έναν ρόλο για τον *TNF-α* στην αντίσταση στην ινσουλίνη στην παχυσαρκία και τον ΣΔτ2. Αφού η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι πανταχού παρούσα στην συσχέτιση με την παχυσαρκία και σημαντικό συστατικό του ΣΔτ2, η αντίσταση στην ινσουλίνη θεωρείται γενικά βασικός παθοφυσιολογικός σύνδεσμος μεταξύ των δύο παθήσεων. Επιπροσθέτως, η αντίσταση στην ινσουλίνη πιστεύεται ότι παίζει ρόλο σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία, όπως οι δυσλιπιδαιμίες, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση και οι καρδιαγγειακές διαταραχές. Αν και η σημασία της σχέσης μεταξύ παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη έχει εδώ και καιρό αναγνωριστεί, η μοριακή βάση αυτής της σύνδεσης έχει παραμείνει αδιευκρίνιστη.⁴¹

1.2.7.1. Φλεγμονή λιπώδους ιστού κατά την παχυσαρκία: μία σύνδεση με τα συστατικά του μεταβολικού συνδρόμου

Μια πρόσφατη εντυπωσιακή ανακάλυψη είναι ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με μία χαμηλού βαθμού διαδικασία φλεγμονής στον λιπώδη ιστό, της οποίας οι

παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν ήταν καλά κατανοητοί, τονίζοντας την σχέση μεταξύ λιποκυττάρων και ανοσοποιητικού. Μια άλλη φυσιολογική και παθολογική πλευρά που έχει προκαλέσει αρκετές πειραματικές και κλινικές εργασίες κατά την τελευταία δεκαετία, είναι ότι τα λιποκύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν πολλά στοιχεία που συλλογικά καλούνται αδιποκίνες. Κάποιες από αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην σχετιζόμενη με την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη και τις καρδιαγγειακές επιπλοκές.⁴⁰

Ο λιπώδης ιστός είναι ένα ενεργό ενδοκρινικό όργανο, που εκτός από την ρύθμιση της μάζας του λίπους και την ομοίωση των θρεπτικών ουσιών, εκκλύει κάποιους βιοενεργούς μεσολαβητές (αδιποκίνες) όπως η *IL-6* και ο *TNF-α*. Έκτος από την ισχυρή προφλεγμονώδη επίδρασή τους στην άμυνα του ξενιστή, τόσο η *IL-6* όσο και ο *TNF-α* έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση της σηματοδότησης της ινσουλίνης και στον μεταβολισμό λιπιδίων σε περιφερειακούς ιστούς. Η *IL-6* έχει αναφερθεί ότι μειώνει την εξαρτημένη από την ινσουλίνη σύνθεση ηπατικού γλυκογόνου και την πρόσληψη γλυκόζης στα αδιποκύτταρα, ενώ ενισχύει την εξαρτημένη από την ινσουλίνη σύνθεση γλυκογόνου και πρόσληψη γλυκόζης στις γραμμωτές μυϊκές ίνες. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η παχυσαρκία μπορεί να είναι φλεγμονώδης πάθηση. Έχει προταθεί ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκκρίνονται από τον λιπώδη ιστό ασκούν ενδοκρινή επίδραση δίνοντας αντίσταση στην ινσουλίνη σε ήπαρ, σκελετικούς μύες και αγγειακό ενδοθηλιακό ιστό, οδηγώντας τελικά στην κλινική έκφραση του ΣΔτ2 και της καρδιαγγειακής νόσου. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένη παραγωγή κυτοκινών λιποκυττάρων, όπως ο *TNF-α* και η *IL-6* οδηγούν σε απόκριση οξείας φάσης με αυξημένη ηπατική παραγωγή C-αντιδραστικής πρωτεΐνης (CRP), ενός ευαίσθητου δείκτη χαμηλού βαθμού συστηματικής φλεγμονής. Ο *TNF-α*, η *IL-6* και η CRP όχι μόνο προωθούν ευθέως την αντίσταση στην ινσουλίνη, αλλά επίσης διεγείρουν την ενδοθηλιακή παραγωγή μορίων συγκόλλησης όπως η E-σελεκτίνη, το ενδοκυτταρικό μόριο συγκόλλησης-1 (ICAM-1), και το αγγειακό μόριο συγκόλλησης-1 (VCAM-1), κρίσιμοι μεσολαβητές της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στο τριχοειδές και αρτηριδιακό ενδοθήλιο.⁴² Το υπερβολικό πάχος είναι ο πιο σημαντικός παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔτ2. Όμως, οι μηχανισμοί δια των οποίων το σωματικό λίπος προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη σε απομακρυσμένους ιστούς δεν είναι καλά κατανοητοί.

Η παχυσαρκία σχετίζεται με μια χρόνια φλεγμονώδη απόκριση, που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη παραγωγή αδιποκινών, και την ενεργοποίηση κάποιων προφλεγμονωδών σηματοδοτικών διαδρόμων, με αποτέλεσμα την πρόκληση πολλών βιολογικών δεικτών φλεγμονής. Αντιστρόφως, μια μείωση του σωματικού βάρους συνοδεύεται από ελάττωση ή και ομαλοποίηση αυτών των βιολογικών παραμέτρων. Αυτός ο συσχετισμός είναι σημαντικός και πολλά μοντέλα ζώων δείχνουν ότι αυτές οι φλεγμονώδεις διαδικασίες έχουν αιτιακή σχέση με την παχυσαρκία και τις συνοσηρότητες, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο ΣΔτ2. Ο ρόλος των λιποκυττάρων στις μεταβολικές δυσλειτουργίες έχει εδώ και καιρό μελετηθεί, αλλά ο πιθανός τους ρόλος σε μια φλεγμονώδη διαδικασία είναι μια νέα σύλληψη. Εντούτοις πρόσφατα, πολλά ευρήματα έχουν συγκλίνει για να δείξουν ότι τα λιποκύτταρα μοιράζονται με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού κάποιες ιδιότητες όπως η

συμπληρωματική ενεργοποίηση και η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Οι πρόδρομοι των λιποκυττάρων έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τα μακροφάγα. Τα προλιποκύτταρα έχουν την ικανότητα για φαγοκυττάρωση ως απόκριση σε ορισμένα ερεθίσματα. Επιπλέον, πολυάριθμα γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες μετεγγραφής, κυτοκίνες, φλεγμονώδη σηματοδοτικά μόρια, και μεταφορείς λιπαρών οξέων, είναι ουσιώδη για την βιολογία των λιποκυττάρων, και επίσης εκφράζονται και είναι λειτουργικά στα μακροφάγα. Επιπλέον, υπάρχει συσχέτιση σε υγιή άτομα, μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και των επιπέδων CRP. Η *IL-6* έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την ηπατική παραγωγή CRP. Είναι ενδιαφέρον ότι το περιεχόμενο σε *IL-6* του λιπώδους ιστού είναι υψηλότερο σε παχύσαρκους ασθενείς που παρουσιάζουν αυξημένο επίπεδο CRP. Εκτός αυτού, υπάρχει δύο φορές μεγαλύτερος κίνδυνος για ΣΔτ2 μέσα σε 3-4 χρόνια, για αυτά τα παχύσαρκα άτομα με υψηλότερα επίπεδα CRP. Ο *TNF*-είναι κυτοκίνη που εκφράζεται κυρίως στα λιποκύτταρα, όπου είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων. Σε παχύσαρκα άτομα, η έκφραση *TNF-α* είναι ανεβασμένη και συσχετίζεται έντονα με την υπερινσουλιναίμια.³⁷

Στο επίπεδο του λιπώδους ιστού, ο *TNF-α* έχει δείξει να υπερεκφράζεται σε WAT από διαφορετικά μοντέλα ζώων με παχυσαρκία, και θεωρείται ότι είναι ένα μόριο που δημιουργεί σύνδεση μεταξύ φλεγμονής και παχυσαρκίας. Ο ανασυνδυασμένος TNF-μειώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, ενώ ποντίκια με μηδενική μετάλλαξη TNF-και άνευ υποδοχέα TNF-, έχουν αυξημένη ευαισθησία σε απόκριση σε αυτή την ορμόνη. Έτσι, είναι πιθανό ότι η υπερπαραγωγή TNF-από WAT από μοντέλα παχύσαρκων ζώων συντελεί στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο ρόλος του λιπώδους ιστού στη μεταβολική σηματοδότηση αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο, με το τύπου κυτοκίνης μόριο λεπτίνη ως καλύτερο παράδειγμα. Εντούτοις, οι συγκεντρώσεις TNF-δεν είναι αυξημένες σε φλεβικό αίμα αποστράγγισης από υποδόριο λιπώδη ιστό και οι συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία είναι απίθανο να αντιπροσωπεύουν κάποια ενδοκρινική λειτουργία, υπονοώντας έναν αυτοκρινή ή παρακρινικό ρόλο για αυτή την κυτοκίνη. Αντιθέτως, η *IL-6* πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύει τον βασικό ρυθμιστή της ηπατικής απόκρισης οξείας φάσης, έτσι ώστε μια σημαντική συμβολή στα κυκλοφορούντα επίπεδα από τον λιπώδη ιστό μπορεί να σημαίνει ότι η παχυσαρκία μπορεί να μοιάζει με κατάσταση φλεγμονής χαμηλού βαθμού.⁴²

Άλλα ειδικά για το λίπος μόρια που συμμετέχουν στον έλεγχο του μεταβολισμού της ενέργειας, ρυθμίζουν επίσης τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού. Για παράδειγμα, η λεπτίνη, εκτός από τον βασικό της ρόλο στην πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας, ρυθμίζει επίσης τις διαδικασίες του ανοσοποιητικού. Τα ποντίκια ή οι άνθρωποι με έλλειψη λεπτίνης παρουσιάζουν αλλοιωμένη ανοσολογική κατάσταση. Η μείωση των επιπέδων λεπτίνης θα μπορούσε να ευθύνεται για σχετική με το λίπος ανοσοκαταστολή.⁴⁰

Φλεγμονώδεις διαδικασίες συμμετέχουν στην έναρξη του διαβήτη και την πρόοδο των επιπλοκών. Το πάχος, και ιδιαίτερα η απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων μεσολαβητών από λιποκύτταρα, σχετίζεται με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη στον διαβήτη τύπου 2. Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη περιλαμβάνουν την παχυσαρκία και διατροφή

υψηλή σε λιπαρά, υπεργλυκαιμία και οξειδωτικό στρες. Η υπεργλυκαιμία είναι μείζων παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μικροαγγειακών διαβητικών επιπλοκών, όπως η αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια και νεφροπάθεια.³⁰

1.2.7.2. Αδιποκίνες, φλεγμονή και αντίσταση στην ινσουλίνη

Το όνομα αδιποκίνη δίνεται γενικά σήμερα σε κάθε πρωτεΐνη που μπορεί να συντεθεί και να εκκριθεί από λιποκύτταρα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή αδιποκινών αλλοιώνεται από την παχυσαρκία, τον ΣΔτ2 και το μεταβολικό σύνδρομο. Αυτό παρατηρείται για την λεπτίνη, τον *TNF*-την *IL-6*, την αδιπονεκτίνη και την ρεζιστίνη. Άλλες αδιποκίνες όπως το αγγειοτενσινογόνο, η PAI-1 ή η πρόσφατα ανακαλυφθείσα βισφατίνη, είναι επίσης σημαντικοί παίκτες στη ρύθμιση του μεταβολισμού.⁴⁰

Ο ΣΔτ2 χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στην έκκριση ινσουλίνης και από αντίσταση στην ινσουλίνη των βασικών ιστών-στόχων. Ιδιαίτερα η αντίσταση στην ινσουλίνη των σκελετικών μυών φαίνεται να παίζει κομβικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Πολλές μελέτες έχουν παλαιότερα ερευνήσει το αν μια ελαττωματική ικανότητα σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης συμβάλλει στην παθογένεση της αντίστασης στην ινσουλίνη των σκελετικών μυών. Οι περισσότερες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η αυτοφωσφορυλίωση ή η φωσφορυλίωση υποστρώματος της τυροσίνης κινάσης του υποδοχέα ινσουλίνης, που απομονώθηκε από διαβητικούς σκελετικούς μύες, είναι μειωμένη. Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης του υποδοχέα ινσουλίνης (IRK) σε ασθενείς με ΣΔτ2, δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Πάντως φαίνεται να είναι ελάττωμα επίκτητο και όχι κληρονομικό, καθώς οι μεταλλάξεις του υποδοχέα ινσουλίνης είναι εξαιρετικά σπάνιες σε κοινές μορφές του ΣΔτ2. Οι ρυθμιστές της λειτουργίας του υποδοχέα ινσουλίνης είναι άρα πιθανώς βαρύνουσας σημασίας για την παθογένεση της αντίστασης στην ινσουλίνη στον ΣΔτ2. Οι συνθήκες που ρυθμίζουν την σηματοδοτική λειτουργία του IRK έχουν μελετηθεί σε πολλά διαφορετικά συστήματα κυττάρων. Έχει φανεί ότι παράγοντες όπως η υπερινσουλιναιμία και η υποϊνσουλιναιμία, καθώς και αγωνιστές, μεταξύ αυτών οι κατεχολαμίνες, η αδενοσίνη και οι εστέρες φορβόλης είναι σε θέση να ρυθμίζουν την λειτουργία του υποδοχέα ινσουλίνης. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ρυθμιστικού ρόλου των G-πρωτεϊνών και άλλων πρωτεϊνών της μεμβράνης. Επιπλέον, η αναστολή του υποδοχέα ινσουλίνης από υψηλά επίπεδα γλυκόζης παρουσιάστηκε σε διάφορα μοντέλα κυττάρων, και, πιο πρόσφατα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η κυτοκίνη *TNF-α* μπορεί να είναι ένας άλλος σημαντικός ρυθμιστής της λειτουργίας του υποδοχέα ινσουλίνης. Η υπεργλυκαιμία και η προκαλούμενη από τον *TNF-α* ρύθμιση του υποδοχέα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί μπορεί να μεσολαβούν δύο ποσοτικά σημαντικά συστατικά της επίκτητης αντίστασης στην ινσουλίνη του σκελετικού μυός, δηλαδή την λεγόμενη μεταβολική αντίσταση στην ινσουλίνη και την συνδεδεμένη με την παχυσαρκία αντίσταση. Μια αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα ινσουλίνης είναι πολύ πιθανό να συμβάλλει σε αντίσταση των σκελετικών μυών στην ινσουλίνη προκαλούμενη από υπεργλυκαιμία. Ενώ η σημασία της προκαλούμενης από

υπεργλυκαιμία αντίστασης στην ινσουλίνη σε ΣΔτ2 ασθενείς είναι γενικώς αποδεκτή, ο ρόλος του *TNF-α* στην παθογένεση της αντίστασης στην ινσουλίνη στους ανθρώπους είναι ακόμα θέμα προς συζήτηση. Η υπόθεση ότι ο *TNF-α* μπορεί να παίζει ρόλο στην συνδεδεμένη με την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη, έγινε από τον Spiegelman με βάση τις παρατηρήσεις τους σε παχύσαρκα, με αντίσταση στην ινσουλίνη μοντέλα ζώων. Αυτή η ομάδα έχει δείξει ότι (α) η έκφραση *TNF-α* αυξάνεται στον λιπώδη ιστό αυτών των μοντέλων ζώων (β) η αντίσταση στην ινσουλίνη βελτιώνεται όταν στα ζώα χορηγείται μια δομή διαλυτού υποδοχέα *TNF-α* που ουδετεροποιεί τα αποτελέσματα του *TNF-α*, και (γ) η μειωμένη δραστηριότητα της τυροσίνης κινάσης των υποδοχέων ινσουλίνης στους σκελετικούς μύες αυτών των ζώων αντιστρέφεται πλήρως μετά την χορήγηση ανταγωνιστή του *TNF-α*. Συνοψίζοντας, αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν ότι ο *TNF-α* μπορεί να παράσχει έναν σύνδεσμο μεταξύ παχυσαρκίας και αντίσταση στην ινσουλίνη των σκελετικών μυών.⁴⁴

1.2.8. Αντιμετώπιση Σακχαρώδους Διαβήτη II

1.2.8.1. Διατροφή

Για πολλά χρόνια, οι δίαιτες που συνιστούσαν στους ασθενείς με διαβήτη ήταν αυστηρές και δύσκολες στην εφαρμογή. Έδιναν «εναλλακτικές» λίστες των κύριων τροφών, καταγράφοντας θερμίδες και σύσταση, και κατασκεύαζαν δίαιτες με τις εναλλακτικές τροφές, όπως είναι προκατασκευασμένες δίαιτες που παρείχε και η αμερικανική διαβητολογική εταιρεία (ADA). Αυτή η προσέγγιση σήμερα έχει καταληφθεί από την ADA, της οποίας η πολιτική για τη διαίτα/θρέψη έχει ως ακολούθως: σήμερα δεν υπάρχει μία διαίτα «διαβητικών» ή διαίτα ADA. Η προτεινόμενη διαίτα μπορεί να θεωρηθεί μόνον ως διαιτητική συνταγή που βασίζεται στην εκτίμηση της θρεπτικής κατάστασης και στο στόχο της θεραπείας. Η ιατρική διαιτητική θεραπεία για άτομα με διαβήτη πρέπει να εξατομικεύεται, με προσοχή τις διατροφικές συνήθειες και άλλους παράγοντες του τρόπου ζωής. Η παρακολούθηση μεταβολικών παραμέτρων, όπως η γλυκόζη αίματος, η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, τα λιπίδια, η αρτηριακή πίεση και το βάρος του σώματος, καθώς και της ποιότητας της ζωής, είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση επιτυχούς έκβασης.⁶

Η κατανομή των θερμίδων μεταξύ υδατανθράκων και λιπών θα πρέπει να εξατομικεύεται. Ο περιορισμός των λιπών συνήθως είναι φρόνιμος εάν επιδιώκεται η απώλεια βάρους, επειδή τα λίπη περιέχουν πολλή ενέργεια σε σχέση με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες. Μια μέση διαίτα για μη παχύσαρκους ασθενείς και αυτούς χωρίς υπερλιπιδαιμίες θα πρέπει να καλύπτει με λίπος το πολύ το 30% των συνολικών θερμίδων, με κορεσμένα λίπη κάτω από 10%. Στα άτομα με υπερχοληστερολαιμία, τα κεκορεσμένα λίπη θα πρέπει να μειώνεται κάτω από το 7% των θερμίδων και η πρόσληψη χοληστερόλης θα πρέπει να είναι κάτω των 200mg/ημέρα. Συνήθως, συνιστάται μία αύξηση των πολυακόρεστων λιπών. Μερικοί συγγραφείς θεωρούν ωφέλιμη την προσθήκη ιχθυελαίων, τα οποία περιέχουν το ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, αλλά αυτό δεν εφαρμόζεται στην πράξη.⁶

Η σημασία της δίαιτας την αντιμετώπιση του διαβήτη ποικίλει με τον τύπο της νόσου. Στους ινσουλινοεξαρτώμενους ασθενείς, ιδιαίτερα αυτούς που είναι σε εντατικό πρόγραμμα, η σύσταση του διαιτολογίου δεν είναι κρίσιμης σημασίας, επειδή η ρύθμιση της ποσότητας της ινσουλίνης μπορεί να καλύψει μεγάλες διαφορές στην πρόσληψη τροφής. Στους μη ινσουλινοεξαρτώμενους ασθενείς που δεν αντιμετωπίζονται με εξωγενή ινσουλίνη, απαιτείται μεγαλύτερη συμμόρφωση στη δίαιτα, επειδή τα ενδογενή αποθέματα είναι περιορισμένα. Αυτοί οι ασθενείς δεν μπορούν ανταποκριθούν στις αυξημένες ανάγκες που προέρχονται από τις αυξημένες θερμίδες ή την αυξημένη πρόσληψη ταχέως απορροφόμενων υδατανθράκων.⁶

1.2.8.2. Φαρμακολογική αντιμετώπιση Σακχαρώδους Διαβήτη II

1.2.8.2.1. Από του στόματος χορηγούμενα φάρμακα

Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται στους διαβητικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και πρέπει να συνταγογραφούνται μετά από αποτυχία της διαιτητικής αγωγής επί 1 μήνα τουλάχιστον. Θα πρέπει να δίδονται για να ενισχύσουν το θεραπευτικό αποτέλεσμα της δίαιτας και όχι να την αντικαταστήσουν. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες⁴⁵:

- Φάρμακα που διεγείρουν την έκκριση της ινσουλίνης, όπως οι σουλφονουλουρίες και τα ανάλογα της μεγλιτινίδης.
- Φάρμακα που ενισχύουν τη δράση της ινσουλίνης, όπως τα διγουανίδια και οι θειαζολιδινεδιόνες και
- Άλλα αντιδιαβητικά τα οποία κυρίως επηρεάζουν την απορρόφηση της γλυκόζης, όπως οι αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης.

1.2.8.2.1.α. Σουλφονουλουρίες

Οι σουλφονουλουρίες διακρίνονται στις σουλφονουλουρίες «πρώτης γενεάς», όπου ανήκουν η χλωροπροπαμίδη και οι τολβουταμίδη, τολαζαμίδη και ακετοεξαμίδη που δεν κυκλοφορούν πλέον στη χώρα μας και στις σουλφονουλουρίες «δεύτερης γενεάς», όπου ανήκουν οι γλιβενκλαμίδη, γλικλαζίδη και γλιπιζίδη. Οι τελευταίες δεν διαφέρουν πολύ από τις σουλφονουλουρίες της «πρώτης γενεάς», είναι όμως αποτελεσματικές σε μικρότερες δόσεις. όσον αφορά στην ινσουλινοτρόπο ενέργεια των σουλφονουλουριών υποστηρίζεται ότι συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στα β-κύτταρα του παγκρέατος και κλείνουν τους διαύλους καλίου (K^+) με αποτέλεσμα την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, διάνοιξη των διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}), είσοδο ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου και διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης. Η ισχύς των παραγώγων της σουλφονουλουρίας εξαρτάται από τον ρυθμό με τον οποίο μεταβολίζονται, από τη δραστηριότητα των μεταβολικών προϊόντων που προκύπτουν και από τον ρυθμό απέκκρισης. Ο ρυθμός μεταβολισμού είναι ταχύς για την τολβουταμίδη και την τολαζαμίδη, βραδύς για τη χλωροπροπαμίδη και ενδιάμεσος για τις υπόλοιπες σουλφονουλουρίες.⁴⁵

Η χλωροπροπαμίδη σε ποσοστό 80% δεν μεταβολίζεται και απεκκρίνεται αναλλοίωτη από τους νεφρούς, γι αυτό και δεν συνιστάται η χορήγησή της σε περιπτώσεις διαβητικών με νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και σε άτομα μεγάλης ηλικίας (αυξημένος κίνδυνος υπογλυκαιμίας). Τα μεταβολικά παράγωγα των σουλφονουριών είτε είναι αδρανή, είτε έχουν ασθενή υπογλυκαιμική ενέργεια, εκτός της ακετοεξαμίδης της οποίας το μεταβολικό προϊόν υδροξυεξαμίδη έχει 2½ φορές μεγαλύτερη υπογλυκαιμική δράση σε σύγκριση με τη μητρική ουσία. Γι' αυτό το λόγο, η ακετοεξαμίδη δεν συνιστάται σε διαβητικούς με νεφρική ανεπάρκεια. Η χλωροπροπαμίδη διεγείρει την έκκριση της αντιδιουρητικής ορμόνης και ενισχύει την επίδραση της τελευταίας στα ουροφόρα σωληνάκια με αποτέλεσμα την πρόκληση υπονατριαιμίας από αραιώση. Η αντιδιουρητική ενέργεια της χλωροπροπαμίδης είναι αποκλειστική ιδιότητα του υπογλυκαιμικού αυτού παράγοντα, σε αντίθεση με τις άλλες σουλφονουρίες που διευκολύνουν την απέκκριση ύδατος. Λόγω της α364ντιδιουρητικής της ενέργειας, η χλωροπροπαμίδη χρησιμοποιείται σε ήπιες μορφές άποιου διαβήτη. Το ενδεχόμενο αυξημένης πιθανότητας ισχαιμικής καρδιοπάθειας μετά από χρήση σουλφονουριών δεν έχει επιβεβαιωθεί.⁴⁵

Αντενδείξεις: Υπερευαισθησία στη δραστική ουσία ή σε άλλες σουλφονουρίες ή στις σουλφοναμίδες, ΣΔτ1, διαβήτη επιπλεκόμενος με κετοοξέωση ή κόμα, κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας, εγχειρήσεις διαβητικών και διαβήτη που επιπλέκεται με διαταραχές της ηπατικής, νεφρικής ή επινεφριδιακής λειτουργίας. Στις περιπτώσεις αυτές, η θεραπεία με ινσουλίνη είναι αναγκαία. Επίσης και σε άλλες οξείες καταστάσεις, όπως π.χ. οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, κόμα άλλης φύσης, βαριές ή παρατεινόμενες λοιμώξεις, τραυματισμοί. Στις περιπτώσεις αυτές επίσης η ινσουλινοθεραπεία είναι απαραίτητη με ταυτόχρονη παροδική διακοπή των αντιδιαβητικών δισκίων.⁴⁵

Ανεπιθύμητες ενέργειες: Γενικά οι σουλφονουρίες και ιδιαίτερα εκείνες της δεύτερης γενεάς είναι καλά ανεκτές από τους διαβητικούς και σπανίως οι ανεπιθύμητες ενέργειες επιβάλλουν τη διακοπή τους. Οι πιο συνήθεις αφορούν στο πεπτικό σύστημα: αίσθημα γαστρικού φόρτου ή και επιγαστραλγία, ναυτία, ή και έμετοι. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθούν ήπιες νευρολογικές εκδηλώσεις: αδυναμία, παραισθησίες. Τοξικές επιδράσεις στο αιμοποιητικό σύστημα (λευκοπενία, θρομβοπενία, ακοκκιοκυτταραιμία, απλαστική ή αιμολυτική αναιμία) είναι γενικά σπάνιες. Σπάνιες είναι και οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας (συνήθως στις πρώτες 6-8 εβδομάδες της θεραπείας), οι οποίες περιλαμβάνουν παροδικά εξανθήματα (που σπάνια εξελίσσονται σε πολύμορφο ερύθημα και αποφολιδωτική δερματίτιδα), φωτοευαισθησία, πυρετό και ίκτερο. Ερύθημα προσώπου μετά από λήψη οιοπνεύματος (αντίδραση όπως της δισουλφιράμης) μπορεί να παρατηρηθεί με χλωροπροπαμίδη ή τολβουταμίδη. Η εκδήλωση αυτή είναι ασυνήθης με τις άλλες σουλφονουρίες και ιδιαίτερα εκείνες της δεύτερης γενεάς.⁴⁵

Αλληλεπιδράσεις: Η υπογλυκαιμική ενέργεια των σουλφονουριών, και ιδιαίτερα της πρώτης γενεάς, ενισχύεται από τη σύγχρονη λήψη φαρμάκων, τα οποία εκτοπίζουν τις σουλφονουρίες από τις δεσμευτικές θέσεις τους στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα φάρμακα αυτά είναι: σαλικυλικά, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, σουλφοναμίδες, χλωραμφαινικόλη, κοτριμοξαζόλη, προβενεσίδη, δικουμαρόλη,

κλοφιβράτη, αναστολείς της MAO και σπανιότερα άλλα φάρμακα. Οι σουλφονουλουρίες της δεύτερης γενεάς έχουν διαφορετικό τρόπο δέσμευσης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και δεν εκτοπίζονται εύκολα από τα περισσότερα από τα παραπάνω φάρμακα. Επίσης η υπογλυκαιμική ενέργεια των σουλφονουλουριών ενισχύεται από τη σύγχρονη λήψη οιοπνεύματος, κουμαρινικών αντιπηκτικών, φλουκοναζόλης, μικοναζόλης και α-MEA. Οποσδήποτε, όμως, σε σύγχρονη χορήγηση των παραπάνω φαρμάκων, οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά για τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας.⁴⁵

Αντίθετα, η υπογλυκαιμική ενέργεια των σουλφονουλουριών ελαττώνεται από τη σύγχρονη χορήγηση φαρμάκων που επηρεάζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης ή και τη δράση της ινσουλίνης. Τα φάρμακα αυτά είναι: κορτικοστεροειδή (σε φαρμακολογικές δόσεις), θειαζιδικά διουρητικά, διουρητικά της αγκύλης, οιστρογόνα, αντισυλληπτικά, τεστοστερόνη, ριφαμπικίνη, συμπαθητικομιμητικά, θυρεοειδικά σκευάσματα, ισονιαζίδη, αποκλειστές διαύλων ασβεστίου, φαινοθειαζίνες, φαιντοϊνη. Οι β-αποκλειστές μπορεί να συγκαλύψουν τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας.⁴⁵

Προσοχή στη χορήγηση: Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε διαβητικούς με καρδιαγγειακή νόσο, καθώς επίσης και σε ηλικιωμένα άτομα λόγω αυξημένου κινδύνου σοβαρής υπογλυκαιμίας, ιδιαίτερα όταν η αγωγή με τις σουλφονουλουρίες συνοδεύεται με ασυνήθιστα μεγάλη κόπωση ή με παράλειψη γευμάτων ή γενικά με ακανόνιστη λήψη τροφής. Προσοχή επίσης απαιτείται σε καρδιοπαθείς που λαμβάνουν χλωροπροπαμίδη, λόγω του κινδύνου κατακράτησης ύδατος. Ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να μην ανταποκρίνονται σε διουρητική θεραπεία ακριβώς λόγω της αντιδιουρητικής δράσης της χλωροπροπαμίδης. Στις περιπτώσεις αυτές συνιστάται η αντικατάστασή της με άλλες σουλφονουλουρίες που προκαλούν απέκκριση ύδατος.⁴⁵

Στους Πίνακες 10 και 11 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Χλωροπροπαμίδη	Η χλωροπροπαμίδη (chlorpropamide) είναι υπογλυκαιμικός παράγοντας, χορηγούμενος από το στόμα και ανήκει στην ομάδα των σουλφονουλουριών

Πίνακας 10: Σουλφονουλουρίες πρώτης γενιάς

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Γλιβενκλαμίδη	Η γλιβενκλαμίδη ανήκει στις σουλφονουλουρίες β' γενεάς και είναι αντιδιαβητικό φάρμακο
Γλικλαζίδη	Η γλικλαζίδη (gliclazide) είναι αντιδιαβητική δραστική ουσία που ανήκει στις σουλφονουλουρίες και χορηγείται από το στόμα. Η γλικλαζίδη μειώνει τη γλυκόζη του αίματος διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans
Γλιμεπιρίδη	Η γλιμεπιρίδη (glimepiride) είναι μια από του στόματος, δραστική υπογλυκαιμική ουσία που ανήκει στην ομάδα των σουλφονουλουριών. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις μη ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδη διαβήτη. Η γλιμεπιρίδη δρα κυρίως με διέγερση της απελευθέρωσης ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος

Πίνακας 11: Σουλφονουλουρίες δεύτερης γενιάς

1.2.8.2.1.β. Διγουανίδες

Τα διγουανίδια φαινορμίνη και μετφορμίνη έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης από εκείνον των σουλφονουλουριών. Τα φάρμακα της ομάδας αυτής αν και στερούνται της ινσουλινοτρόπου δράσης των σουλφονουλουριών έχουν, εντούτοις, ανάγκη της παρουσίας λειτουργικών β-κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος για να ασκήσουν τη δράση τους. Από πλευράς υπογλυκαιμικής ικανότητας, τα διγουανίδια πρέπει να θεωρούνται μάλλον «ευγλυκαιμικοί» παράγοντες, παρά υπογλυκαιμικά φάρμακα.⁴⁵

Ως τρόποι ενέργειας των διγουανιδίων θεωρούνται:

- α)** Η προαγωγή της αναερόβιας γλυκόλυσης στους περιφερικούς ιστούς, με αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από το αίμα
- β)** Η αναστολή της ηπατικής νεογλυκογένεσης
- γ)** Η ελάττωση της εντερικής απορρόφησης της γλυκόζης
- δ)** Η προαγωγή της δέσμευσης της ινσουλίνης από τους υποδοχείς της στους περιφερικούς ιστούς-στόχους.

Η χρήση της φαινορμίνης έχει απαγορευθεί σε πολλές χώρες εξαιτίας του κινδύνου της γαλακτικής οξέωσης, ιδιαίτερα σε ασθενείς με νεφρική, ηπατική ή καρδιακή ανεπάρκεια και γενικά σε καταστάσεις που συνοδεύονται από ιστική υποξία. Η εμφάνιση γαλακτικής οξέωσης ευνοείται σε άτομα >65 ετών, σε αλκοολικούς και σε δόση >100mg/24ωρο. Εντούτοις, γαλακτική οξέωση μπορεί να εμφανισθεί και χωρίς την παρουσία προδιαθεσικών παραγόντων. Ο δείκτης θνησιμότητας στις περιπτώσεις αυτές πλησιάζει το 50%. Η μετφορμίνη θεωρείται ότι

προκαλεί σε μικρότερο ποσοστό γαλακτική οξέωση. Υποψήφιοι για χορήγηση διγουανιδίων θα πρέπει να θεωρούνται διαβητικοί, στους οποίους έχει αποτύχει η σωστή θεραπευτική αγωγή (δίαιτα ή δίαιτα και σουλφονουλιδίες), που αρνούνται τη χορήγηση ινσουλίνης ή, τέλος, που για οποιονδήποτε λόγο η τελευταία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει πάντα να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη και να σταθμίζονται προσεκτικά και οι λοιποί αποτρεπτικοί της χορήγησης του φαρμάκου παράγοντες που περιγράφονται στη συνέχεια.⁴⁵

Ενδείκνυται ιδιαίτερα σε παχύσαρκα άτομα, που δεν ρυθμίζεται με σωστή δίαιτα και σουλφονουλιδίες ή που για διάφορους λόγους δεν είναι δυνατή η χορήγηση ινσουλίνης.⁴⁵

Αντενδείξεις: Σε άτομα ηλικίας >65 ετών, διαβητική κετοξέωση, διαβητικό προκώμα, σε ασθενείς που έχουν ή μπορεί να αναπτύξουν ιστική υποξία, όπως πάσχοντες από καρδιαγγειακά νοσήματα (συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, έμφραγμα μυοκαρδίου, υπέρταση, υπόταση) ή αναπνευστική ανεπάρκεια. Επίσης σε ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια, σε οξείες καταστάσεις που ενδεχομένως συνοδεύονται από επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, όπως αφυδάτωση, βαρεία λοίμωξη ή γάγγραινα, καταπληξία, ενδοαγγειακή χορήγηση ιωδιούχων σκιαγραφικών μέσων, σε αλκοολισμό, οξεία δηλητηρίαση με οινόπνευμα, στην κύηση και γαλουχία.⁴⁵

Ανεπιθύμητες ενέργειες: Η γαλακτική οξέωση αποτελεί τη σοβαρότερη και πιο επικίνδυνη ανεπιθύμητη ενέργεια. Εκδηλώνεται συνήθως με ανορεξία, εμέτους, διάρροιες, σύγχυση που εξελίσσεται σε κώμα και συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αίμα. Επίσης αναφέρονται απώλεια βάρους, κεφαλαλγία, εξανθήματα, μεταλλική γεύση, αδυναμία, μείωση απορρόφησης της βιταμίνης B12 και μόνιμη ελάττωση της έκκρισης του ενδογενή παράγοντα, ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης και πολύ σπάνια υπογλυκαιμία.⁴⁵

Αλληλεπιδράσεις: Οι β-αποκλειστές, οι αναστολείς της MAO και το οινόπνευμα ενισχύουν τη δράση τους. Με το οινόπνευμα επίσης αυξάνεται σημαντικά ο κίνδυνος εμφάνισης γαλακτικής οξέωσης. Τα κορτικοστεροειδή, ACTH, διαζοξειδή, θειαζίδια, φουροσεμίδη, αντισυλληπτικά και γενικώς φάρμακα με υπεργλυκαιμική δράση ανταγωνίζονται την υπογλυκαιμική τους ενέργεια. Με αιθινυλοιστραδιόλη παρατηρείται αυξημένη ινωδολυτική δράση.⁴⁵

Προσοχή στη χορήγηση: Η θνησιμότητα από γαλακτική οξέωση υπερβαίνει το 50% και γι' αυτό πρέπει να τηρούνται αυστηρά οι ενδείξεις και αντενδείξεις των διγουανιδίων. Να διακόπτονται 48 ώρες πριν από χειρουργική επέμβαση με γενική αναισθησία και θα πρέπει να επανεισάγονται ύστερα από τουλάχιστον 48 ώρες. Να διακόπτονται πριν τη χορήγηση ιωδιούχου σκιαγραφικού μέσου και να επαναχορηγούνται μόνο 48 ώρες μετά την εξέταση και μόνο αφού επανεκτιμηθεί η νεφρική λειτουργία και βρεθεί φυσιολογική. Να αποφεύγεται η σύγχρονη λήψη οινόπνευματος και η υπέρβαση της συνιστώμενης δόσης. Να διακόπτονται αμέσως σε εμφάνιση εκδηλώσεων γαλακτικής οξέωσης.⁴⁵

Στον Πίνακα 12 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Μετφορμίνη	Η μετφορμίνη (metformin) είναι ένα διγουανίδιο με αντι-υπεργλυκισμικές ιδιότητες, το οποίο μειώνει και τη βασική και τη μεταγευματική γλυκόζη του πλάσματος. Δεν διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης και κατά συνέπεια δεν δημιουργεί υπογλυκαιμία.

Πίνακας 12: Διγουανίδες

1.2.8.2.1.γ. Αναστολείς της αλφα γλυκοσιδάσης

Η ακαρβόζη είναι αναστολέας του ενζύμου α-γλυκοσιδάση, το οποίο φυσιολογικώς προκαλεί στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου διάσπαση των πολυ-και ολιγοσακχαριτών της τροφής σε μονοσακχαρίτες, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της εντερικής απορρόφησης των υδατανθράκων και τη μείωση κατά συνέπεια της μεταγευματικής ανόδου της γλυκόζης στο αίμα, που φυσιολογικώς ακολουθεί τη λήψη ενός υδατανθρακούχου γεύματος.⁴⁵

1.2.8.2.1.δ. Θειαζολιδινεδιόνες

Η πιογλιταζόνη και η ροσιγλιταζόνη ανήκουν στις θειαζολιδινεδιόνες. Οσον αφορά στον τρόπο δράσης τους θεωρούνται «ευαισθητοποιητές» των περιφερικών ιστών (λιπώδης ιστός, γραμμωτοί μύες κλπ.) στη δράση της ινσουλίνης. Οι αντι-υπεργλυκαιμικοί αυτοί παράγοντες είναι, όπως και τα διγουανίδια, αποτελεσματικοί μόνο παρουσία ινσουλίνης και δεν προκαλούν υπογλυκαιμία. Χορηγούνται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με σουλφονουλουρίες ή διγουανίδια.⁴⁵

1.2.8.2.1.ε. Άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα

Τα ανάλογα της μεγλιτινίδης ρεπαγλινίδη, παράγωγο του βενζοϊκού οξέος και νατεγλινίδη, παράγωγο της δ-φαινυλαλανίνης με ταχύτερη έναρξη, αλλά πιο σύντομη διάρκεια δράσης από τη ρεπαγλινίδη, δρουν με τρόπο παρόμοιο με εκείνον των σουλφονουλουριών δηλ. ενέργεια διαμέσου ATP-ευαίσθητων διαύλων καλίου (K⁺) στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Χορηγούνται σε συνδυασμό με μετφορμίνη όταν αυτή από μόνη της δεν επιτυγχάνει επαρκή έλεγχο της γλυκαιμίας. Επιπλέον η ρεπαγλινίδη μπορεί να δοθεί και ως μονοθεραπεία.⁴⁵

Στον Πίνακα 13 συνοψίζονται οι κυριότερες ιδιότητες και δεδομένα των φαρμάκων της κατηγορίας αυτής.

Δραστική ουσία	Σύντομη περιγραφή
Νατεγλινίδη	Η νατεγλινίδη (nateglinide) είναι ένα παράγωγο αμινοξυ που μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η δράση αυτή εξαρτάται από τα ενεργά β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων
Ρεπαγλινίδη	Η ρεπαγλινίδη (repaglinide) μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα εντόνως διεγείροντας την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας, δράση που εξαρτάται από τα ενεργά β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων

Πίνακας 13: Άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα

1.2.8.2.2. Ενέσιμα φάρμακα-ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι πολυπεπτιδική ορμόνη. Η ινσουλίνη του εμπορίου παρελαμβάνετο με εκχύλιση κυρίως χοιρείου παγκρέατος και υφίστατο καθαρισμό με σειρά βιοχημικών επεξεργασιών. Σήμερα παρασκευάζεται βιοσυνθετικά με τη μέθοδο του ανασυνδυασμένου DNA, χρησιμοποιώντας *Escherichia coli* ή *Saccharomyces cerevisiae* ή ημισυνθετικά με ενζυμική τροποποίηση της χοίρειας ινσουλίνης, με αποτέλεσμα η χημική της δομή να είναι όμοια με αυτή που παράγει το ανθρώπινο πάγκρεας. Συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι οι φαρμακολογικές της ιδιότητες είναι ίδιες με εκείνες της βόειας και χοίρειας ινσουλίνης. Ως πλεονέκτημά της αναφέρεται η ελαχιστοποίηση των τοπικών και αλλεργικών αντιδράσεων, ιδιαίτερα σε υπερευαίσθητους ασθενείς και η χαμηλή ανοσογονικότητά της. Πρόσφατα παρασκευάστηκαν και ανάλογα της ανθρώπινης ινσουλίνης. Η ινσουλίνη ως πρωτεΐνη καταστρέφεται από τα πρωτεϊνολυτικά ένζυμα του πεπτικού σωλήνα και ως εκ τούτου πρέπει να δίδεται μόνο παρεντερικώς.⁴⁵

Τα σκευάσματα ινσουλίνης διακρίνονται αναλόγως του χρόνου και της διάρκειας δράσης σε: Ινσουλίνες βραχείας διάρκειας δράσης, Ινσουλίνες μέσης διάρκειας δράσης και διαφασικές (Intermediate-acting and biphasic insulins), Ινσουλίνες μακράς διάρκειας δράσης (Long-acting insulins). Η διάρκεια δράσης των μορφών της ινσουλίνης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ασθενών και είναι απαραίτητο να προσδιορίζεται για τον κάθε ασθενή εξατομικευμένα. Θα πρέπει επίσης να τονισθεί ότι ο τύπος της ινσουλίνης, η δόση και η συχνότητα χορήγησης εξαρτώνται αποκλειστικά από τις ανάγκες του κάθε ασθενούς. Οι περισσότεροι ασθενείς συνήθως αρχίζουν με ινσουλίνη μέσης διάρκειας δράσης δύο φορές ημερησίως και η βραχείας δράσης μπορεί να προστεθεί αργότερα ανάλογα με τις ανάγκες, για να αντιμετωπίσει λ.χ. τυχόν υπεργλυκαιμία μετά το πρωινό ή το βραδινό γεύμα.⁴⁵

Η συνήθης οδός χορήγησής της είναι η υποδόρια, αλλά και η ενδοφλέβια (μόνο η διαλυτή) ή και η ενδομυϊκή. Σήμερα εφαρμόζονται επίσης, σε ορισμένες ειδικές

περιπτώσεις, υποδόριες ή ενδοφλέβιες συνεχείς εγχύσεις ινσουλίνης με τη βοήθεια ειδικών αντλιών. Στη διαβητική κετοοξέωση η ινσουλίνη χορηγείται ενδοφλεβίως ή ενδομυϊκώς, ενώ αρκετοί εξακολουθούν την παράλληλη εφάπαξ χορήγησή της ενδοφλεβίως και υποδορίως. Η απορρόφηση της ινσουλίνης από τον υποδόριο ιστό ποικίλλει στα διάφορα σημεία του σώματος και η ανεπαρκής απορρόφησή της μπορεί να αποτελεί έναν από τους παράγοντες κακής ρύθμισης του διαβήτη. Η θεραπεία με ινσουλίνη είναι απαραίτητη στο 1/4 περίπου των διαβητικών, ιδιαίτερα στα παιδιά και στους νέους, στις έγκυες, σε καταστάσεις διαβητικής κετοοξέωσης και διαβητικού κώματος, σε ασθενείς που κατά την έναρξη του διαβήτη έχουν μεγάλη απώλεια βάρους και οξοναιμία και, σε περιπτώσεις με διαταραχές της ηπατικής ή νεφρικής λειτουργίας. Τα επίπεδα γλυκόζης αίματος ποικίλλουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της ημέρας, έτσι ώστε δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί ευγλυκαιμία καθ' όλο το 24ωρο χωρίς τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Συνιστάται στους ασθενείς να διατηρούν τα επίπεδα σακχάρου μεταξύ 4-10mmol/l ή 70-180mg%/l κατά το πλείστον, ενώ θα πρέπει να αποδέχονται ότι ορισμένες φορές και για μικρά χρονικά διαστήματα θα κυμαίνονται σε ανώτερα ή κατώτερα επίπεδα.⁴⁵

1.2.9. Υπογλυκαιμία

Η υπογλυκαιμία είναι ένας δυνητικός κίνδυνος όταν ο τύπος της ινσουλίνης αλλάζει, ιδιαίτερα κατά τη μετατροπή από βόειο σε ανθρώπινη, οπότε και πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Αρχικά η μείωση της δόσης να γίνεται κατά ποσοστό 10% περίπου με προσεκτική παρακολούθηση τις πρώτες ημέρες. Όταν η μετατροπή γίνεται από χοίρειο σε ανθρώπινη η τροποποίηση της δόσης δεν είναι απαραίτητη. Η απώλεια των προειδοποιητικών συμπτωμάτων της επερχόμενης υπογλυκαιμίας στους ινσουλινολήπτες μπορεί να αποτελεί ένα σοβαρό κίνδυνο (Hypoglycaemia unawareness). Η αιτία δεν είναι γνωστή, αλλά η πολύ αυστηρή ρύθμιση του σακχάρου αίματος στα επίπεδα της ευγλυκαιμίας, φαίνεται ότι ελαττώνει τον ουδό της στάθμης της γλυκόζης που προκαλεί τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας. Θεραπεία με β-αποκλειστές μπορεί επίσης να καλύψει τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας και να καθυστερήσει την ανάνηψη. Μερικοί ασθενείς αναφέρουν μειωμένη αντίληψη των συμπτωμάτων της υπογλυκαιμίας μετά την έναρξη με ανθρώπινη ινσουλίνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις ενδείκνυται η επιστροφή στη θεραπεία με χοίρειο ινσουλίνη.

Η παθογενετική θεώρηση του σακχαρώδους διαβήτη έχει αλλάξει τα τελευταία χρόνια, με τους φλεγμονώδεις διαδρόμους να παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και πρόοδο των διαβητικών επιπλοκών. Αυτοί οι νέοι παθογόνοι παράγοντες οδηγούν στην αναζήτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η ρύθμιση των φλεγμονωδών διαδικασιών στο πεδίο του διαβήτη είναι σήμερα ένα ζήτημα μεγάλου ενδιαφέροντος. Είναι πιθανόν ότι τα επόμενα χρόνια η ελπίδα για νέες θεραπευτικές στρατηγικές με βάση αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες με ωφέλιμη δράση για τις διαβητικές επιπλοκές, θα μεταφραστεί σε πραγματικές κλινικές θεραπείες.³⁴

Εφαρμογή των ίδιων εργαλείων σε προοπτικές μελέτες και κλινικές δοκιμασίες θα παράσχει ισοδύναμες απόψεις στη γενετική βάση ατομικών διαφορών στην ταχύτητα

εξέλιξης της νόσου και απόκριση σε θεραπευτικές ή προληπτικές παρεμβάσεις. Ένας κατάλογος σχετικών γενετικών τόπων έχει μικρή σημασία εκτός αν καταστεί δυνατό να συντεθούν τα ευρήματα αυτά σε ένα βελτιωμένο σχήμα νοσολογικής βιολογίας-παθοφυσιολογίας. Αυτό σημαίνει αναγνώριση των αιτιολογικών μεταλλάξεων και αποκάλυψη αμοφτέρων ων εγγύς (δηλαδή των μοριακών) και των άπω (δηλαδή των κυτταρικών και των φυσιολογικών) μηχανισμών, με τους οποίους επιτελείται η επίδραση στην προδιάθεση της νόσου.

Γνωρίζοντας το μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων που ανακαλύπτονται, η λήψη των μηχανιστικών απόψεων θα απαιτήσει πολύ ευρύτερη και καλύτερη ενσωμάτωση των πληροφοριών σε πολλά επίπεδα. Η δραστηριότητα αυτή πρέπει να παρακινηθεί από την ανάγκη για κλινική μετάφραση, ιδιαίτερα για πολυπαραγοντικές νόσους, ιδιαίτερα για το ΣΔτ2, που είναι σημαντική απειλητική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, ενώ οι σήμερα διαθέσιμες θεραπευτικές και προληπτικές δυνατότητες παραμένουν ανεπαρκείς. Αναμένεται ότι ένα πληρέστερο υπόδειγμα της παθογένειας της νόσου, όπως εξάγεται από τις ανακαλύψεις της γενετικής, αλλά και των περιβαλλοντικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνισή της, θα οδηγήσει σε πρωτοποριακές θεραπευτικές, διαγνωστικές και προληπτικές προσεγγίσεις με ευρύτατα οφέλη. Εν κατακλείδι, βρισκόμαστε στην αρχή φάσης γενετικών ανακαλύψεων, που έχουν την δυνατότητα να μετασχηματίσουν τους τρόπους με τους οποίους αντιμετωπίζονται νόσοι παγκόσμιας επίπτωσης, όπως ο διαβήτης. Είναι δύσκολο να προβλεφθούν οι ακριβείς τρόποι με τους οποίους ο μετασχηματισμός αυτός θα προχωρήσει, αλλά οι συνεχώς επιταχυνόμενες ανακαλύψεις της γενετικής του ανθρώπου (γονιδιωματική) θα αποκαλύψουν το χώρο στον οποίο θα επιτελεστούν οι αναπτύξεις αυτές.²⁹

1.3. ΓΟΝΙΔΙΟ-ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ-ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Γονίδιο είναι μια μονάδα κληρονομικότητας, ένα τμήμα ακολουθίας του DNA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. Τα γονίδια, τα οποία περιέχονται στο κάθε χρωμόσωμα, αποτελούνται από DNA που είναι η κύρια φυσική και λειτουργική μονάδα κληρονομικότητας. Στους ανθρώπους, τα γονίδια διαφέρουν σε μέγεθος, αποτελούμενα από μερικές εκατοντάδες ως και 2 εκατομμύρια βάσεις DNA. Εκτιμάται ότι οι άνθρωποι έχουν 20.000 με 25.000 γονίδια. Κάθε άνθρωπος έχει δύο αντίγραφα κάθε γονιδίου, ένα από τον κάθε γονιό. Αν συγκρίνει κανείς το γονιδίωμα δύο διαφορετικών ατόμων, θα παρατηρήσει διαφορές μόλις στο 1% των DNA αλληλουχιών τους, από τις οποίες το 0,02% είναι αυτές που συμβάλουν στην μοναδικότητα των φυσικών χαρακτηριστικών κάθε ανθρώπου.^{46,47}

Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από 100 εκατομμύρια κύτταρα περίπου. Το απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3×10^9 ζεύγη βάσεων DNA, τα οποία κατανέμονται σε χρωμοσώματα. Τα κληρονομικά χαρακτηριστικά ελέγχονται από γονίδια. Οι διαφορετικές μορφές του ίδιου χαρακτήρα ελέγχονται από αλληλόμορφα γονίδια που βρίσκονται στην ίδια θέση στα ομόλογα χρωμοσώματα και ελέγχουν την ίδια ιδιότητα. Αλληλόμορφα γονίδια είναι παραλλαγές μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα ή έναν πληθυσμό. Ορισμένα αλληλόμορφα είναι

επικρατή ως προς τη δράση τους και τα αποτελέσματά τους είναι ορατά σε βάρος του αλληλόμορφου που βρίσκεται στο ομόλογο χρωμόσωμα. Άλλα αλληλόμορφα γονίδια είναι υπολειπόμενα και τα αποτελέσματα της δράσης τους είναι ορατά μόνο όταν υπάρχει το ίδιο αλληλόμορφο στο ζεύγος των ομολόγων χρωμοσωμάτων. Ένα άτομο με ίδια αλληλόμορφα γονίδια για μία συγκεκριμένη ιδιότητα είναι ομόζυγο για την ιδιότητα αυτή, ενώ ένα άτομο με διαφορετικά αλληλόμορφα είναι ετερόζυγο.^{46,47}

Ορισμένες ασθένειες προκαλούνται από υπολειπόμενα αλληλόμορφα των γονιδίων και το άτομο για να πάσχει θα πρέπει να φέρει το αλληλόμορφο και στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα. Αυτή είναι η περίπτωση της υπολειπόμενης κληρονομικότητας. Εάν μία ασθένεια οφείλεται σε επικρατές αλληλόμορφο ενός γονιδίου, αρκεί το άτομο να κληρονομήσει το συγκεκριμένο αλληλόμορφο για να εκδηλώσει την ασθένεια. Σε αυτή την περίπτωση μιλάμε για επικρατή κληρονομικότητα. Τα ορατά χαρακτηριστικά είναι συνήθως αποτέλεσμα αρκετών γονιδίων που συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον.^{46,47}

1.3.1. Πολυμορφισμός

Πολυμορφισμός (φαινοτυπικός, γενετικός) είναι μια παραλλαγή στον πληθυσμό (φαινοτυπική ή γενετική) με συχνότητα μεγαλύτερη από κάποια αυθαίρετη τιμή (συνήθως 1% ή 5%). Το ομόζυγο άτομο έχει δύο όμοια αλληλόμορφα για έναν γενετικό πολυμορφισμό (ένα από κάθε γονέα) ενώ το ετερόζυγο άτομο έχει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα για έναν γενετικό πολυμορφισμό. Γονότυπος είναι η γενετική σύσταση ενός ατόμου ενώ φαινότυπος είναι η φυσική εμφάνιση ενός ατόμου. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms-SNPs) είναι μικρές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή σε ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας του DNA μια βάση υποκαθίσταται από μια άλλη. Αυτός ο τύπος πολυμορφισμού λέγεται και δι-αλληλομορφικός δείκτης λόγω των δυο δυνατών αλληλομόρφων. Μια μετάλλαξη για να θεωρηθεί πολυμορφισμός θα πρέπει να εμφανίζεται με συχνότητα που υπερβαίνει το 1% σε έναν πληθυσμό. Τα SNPs είναι συνηθισμένες μεταλλάξεις και υπάρχουν φυσιολογικά στο DNA κάθε ατόμου. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ένας πολυμορφισμός μπορεί να προκληθεί από την πρόσθεση ενός νουκλεοτιδίου, την διαγραφή ή την αντικατάστασή του.^{46,47}

Ο τύπος που προκαλείται από την υποκατάσταση ενός νουκλεοτιδίου ονομάζεται SNP (single nucleotide polymorphism). Τα SNPs παρατηρούνται πιο συχνά σε μη κωδικές περιοχές, όπως στον εκκινητή και στα ιντρόνια. Τα SNPs στην περιοχή του εκκινητή μπορεί να επηρεάσουν την μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου. SNPs υπάρχουν και σε κωδικές περιοχές. Τα SNPs που εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές ενός γονιδίου καλούνται cSNPs και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορούν να αλλάξουν την βιολογική λειτουργία μίας πρωτεΐνης. Κατά μέσο όρο, ένα SNP πιστεύεται ότι παρουσιάζεται σε κάθε 300 στις 1.000 βάσεις στον άνθρωπο. Επομένως, υπάρχουν αρκετά εκατομμύρια θέσεις νουκλεοτιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα στις οποίες παρατηρείται πολυμορφισμός.^{46,47}

Το πρόγραμμα HarMap επιδιώκει να βρει τις διαφορές μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα ανιχνεύοντας τα SNPs. Όλα τα SNPs είναι καταγεγραμμένα σε δημόσιες βάσεις δεδομένων όπως την dbSNP, την HGVbase, την CGAP κλπ. Μέχρι σήμερα περίπου 10 εκατομμύρια SNPs είναι καταγεγραμμένα για τον άνθρωπο στις βάσεις δεδομένων. Τα SNPs είναι συνήθως διαλληλομορφικά, αλλά, σπάνια, έχουν τρία ή τέσσερα αλληλόμορφα.^{46,47}

1.3.2. SNPs (single nucleotide polymorphisms) και γενετικές ασθένειες

Το γενετικό υλικό κάθε ατόμου περιέχει ένα μοναδικό πρότυπο. Έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με τον ΣΔτ1, με τον ΣΔτ2, με την νόσο του Crohn, τις καρδιακές παθήσεις, τον καρκίνο του μαστού, το γλαύκωμα, την σκλήρυνση κατά πλάκας, την ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και τον καρκίνο του ορθού. Τα SNPs δεν αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες των ασθενειών, αλλά μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό της πιθανότητας να αναπτυχθεί μία συγκεκριμένη ασθένεια, γιατί βρίσκονται κοντά σε γονίδια που έχει βρεθεί ότι συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες. Τα SNPs υπάρχουν σε μεγάλη πυκνότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, γεγονός που τα καθιστά ελκυστικούς δείκτες για την αναγνώριση των γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με μία συγκεκριμένη ασθένεια.^{46,47} Τα SNPs θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμα:

- α) στην αναγνώριση γονιδίων που σχετίζονται με μία ασθένεια
- β) στην αναγνώριση γονιδίων-στόχων για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων
- γ) στην αναγνώριση γονιδίων που μπορεί να προβλέπουν το αποτέλεσμα σε μία θεραπεία.

Οι γενετικές ασθένειες διαίρονται σε μονογονιδιακές και πολυγονιδιακές. Οι μονογονιδιακές ασθένειες οφείλονται σε αλλαγή ενός μόνο γονιδίου και κληρονομούνται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel. Οι πολυγονιδιακές ασθένειες προκαλούνται από αλλαγές σε αρκετά γονίδια και εξαρτώνται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για αυτό αναφέρονται συχνά ως σύνθετες ασθένειες.

Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού, ορισμένοι από αυτούς όμως έχουν αποδειχθεί σημαντικοί για τη διερεύνηση της ανθρώπινης υγείας. Ένας ή περισσότεροι SNPs μπορεί να καθορίζουν μια σειρά από χαρακτηριστικά όπως τον βαθμό απόκρισής μας σε μια φαρμακευτική αγωγή, τις πιθανότητες εκδήλωσης συγκεκριμένων ασθενειών, την ευαισθησία μας απέναντι σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως είναι οι τοξίνες) και την επιρρέπειά μας σε μολύνσεις. Παράλληλα, διεξάγονται μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, τα αποτελέσματα των οποίων συσχετίζουν τη σύγχρονη παρουσία πολλαπλών SNPs με την εκδήλωση των πολυπαραγοντικών παθήσεων, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου.^{46,47}

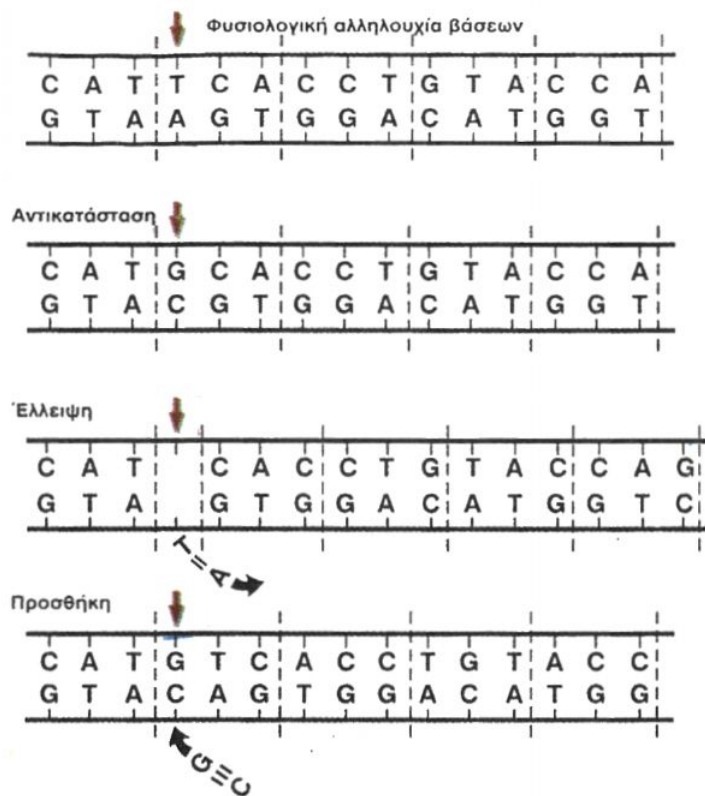
1.3.3. Μετάλλαξη: Ορισμός-Είδη-Αιτία

Η μετάλλαξη είναι μια μόνιμη αλλαγή στην αλληλουχία του DNA που σχηματίζει ένα γονίδιο. Οι γονιδιακές αλλαγές είναι υπεύθυνες για ορισμένες φυσιολογικές διαφορές μεταξύ των ανθρώπων, όπως είναι το χρώμα των ματιών, το χρώμα των μαλλιών και η ομάδα αίματος. Όταν, όμως, μια μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, τότε μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική ανάπτυξη του ατόμου ή να προκαλέσει μια ασθένεια. Μια τέτοια κατάσταση που οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα ή περισσότερα γονίδια, ονομάζεται γενετική διαταραχή. Το γενετικό υλικό μπορεί να υποστεί αλλαγές με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που ονομάζονται μεταλλάξεις, μπορεί να δημιουργούν ένα διαφορετικό φαινότυπο χωρίς όμως αυτό να είναι πάντοτε απαραίτητο. Αυτό εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο η αλλαγή επιδρά στο γονιδιακό προϊόν, δηλαδή στην πρωτεΐνη.^{46,47}

Οι γενετιστές κατατάσσουν τις μεταλλάξεις σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Τις γονιδιακές και τις χρωμοσωμικές. Ο τυπικός αυτός διαχωρισμός σχετίζεται με την έκταση της αλλαγής. Αν αυτή αφορά μικρό αριθμό βάσεων, στις οποίες συμβαίνει αντικατάσταση, προσθήκη ή έλλειψη, τότε ονομάζεται γονιδιακή μετάλλαξη. Αν αφορά αλλαγές σε μεγαλύτερο τμήμα του χρωμοσώματος, ονομάζεται χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι μεταλλάξεις συμβάλλουν στη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας στον πληθυσμό και ευθύνονται για πολλές κληρονομικές ασθένειες, καθώς και για πολλές περιπτώσεις καρκίνου. Μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε γεννητικό ή σωματικό κύτταρο ενός οργανισμού. Μόνο οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων, εν τούτοις, μπορεί να μεταβιβαστούν από τη μια γενιά στην επόμενη. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι οι σωματικές μεταλλάξεις είναι λιγότερο σημαντικές για την υγεία. Στην πραγματικότητα αποτελούν την πλειονότητα των μεταλλάξεων, δεδομένου ότι ένας ενήλικος οργανισμός αποτελείται από 10¹³ περίπου σωματικά κύτταρα.^{46,47}

Οι τύποι των γονιδιακών μεταλλάξεων είναι η αντικατάσταση βάσης, η προσθήκη ή έλλειψη βάσης.^{46,47}

Αντικατάσταση βάσης: Η αντικατάσταση βάσης από μία άλλη να έχει ποικίλα αποτελέσματα στην πρωτεΐνη που παράγεται από το αντίστοιχο γονίδιο (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Οι κύριες κατηγορίες γονιδιακών μεταλλάξεων⁴⁶

Στις περισσότερες περιπτώσεις, μια αντικατάσταση βάσης δημιουργεί μια τριπλέτα που κωδικοποιεί ένα διαφορετικό αμινοξύ και κατά συνέπεια μια αλλαγμένη πρωτεΐνη. Εάν το διαφορετικό αμινοξύ βρίσκεται στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου ή κοντά σε αυτό, τότε η ενεργότητά του, δηλαδή η ικανότητα κατάλυσης αντιδράσεων, μπορεί να ελαττωθεί ή και να μηδενισθεί. Επίσης, σε άλλα είδη πρωτεϊνών η μετάλλαξη μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της δομής τους και συνεπώς και της λειτουργίας τους, όπως στην περίπτωση της HbS στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Σε άλλες περιπτώσεις μία αντικατάσταση βάσης μπορεί να μετατρέψει ένα κωδικόνιο, που κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ, σε ένα κωδικόνιο λήξης, με αποτέλεσμα τον τερματισμό σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις καταστρέφεται η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.^{46,47}

Προσθήκη ή έλλειψη βάσεων: Ένας άλλος σημαντικός τύπος γονιδιακών μεταλλάξεων περιλαμβάνει προσθήκη ή έλλειψη βάσεων (Εικόνα 2). Αλλαγές στον αριθμό των βάσεων έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταλλαγμένων φαινοτύπων. Η προσθήκη ή η έλλειψη διαδοχικών βάσεων σε οποιοδήποτε αριθμό πολλαπλάσιο του τρία δημιουργεί, αντίστοιχα, προσθήκη ή έλλειψη ενός ή περισσότερων αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, που μπορεί να αλλάζει τη λειτουργικότητά της. Αν όμως ο αριθμός των βάσεων είναι διαφορετικός του τρία ή πολλαπλασίων του, τότε η αλληλουχία των αμινοξέων δεν εμφανίζει πλέον πολλές ομοιότητες με την αρχική.^{46,47}

Μολονότι οι περισσότερες μεταλλάξεις οδηγούν σε αποτέλεσμα που δεν είναι ευνοϊκό για τον οργανισμό, μερικές από αυτές εμφανίζουν πλεονεκτήματα. Χωρίς τις μεταλλάξεις, η γενετική ποικιλοότητα θα περιοριζόταν αρκετά και η εξέλιξη, όπως τη γνωρίζουμε σήμερα, δε θα είχε συμβεί. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις θεωρούνται επιβλαβείς, επειδή έχουν σοβαρές επιπτώσεις στον οργανισμό. Πολλές όμως δεν είναι επιβλαβείς και χαρακτηρίζονται ως ουδέτερες. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος μπορεί να έχουν ελάχιστη επίδραση στη στερεοδιάταξη και στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Οι αλλαγές που συμβαίνουν σ' ένα γονίδιο και δεν οδηγούν σε αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων της δημιουργούμενης πρωτεΐνης, λόγω εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, ονομάζονται σιωπηλές μεταλλάξεις. Αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων παρατηρούνται όχι μόνο σε περιοχές του DNA που μεταγράφονται (γονίδια) αλλά και στις υπόλοιπες.^{46,47}

Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται αιφνίδια μέσα στον πληθυσμό ονομάζονται αυτόματες και θεωρείται ότι προέρχονται από λάθη που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA ή κατά το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Όλες οι μεταλλάξεις δε δημιουργούνται αυτόματα. Πολλοί τύποι μεταλλάξεων μπορεί να προκληθούν από παράγοντες του περιβάλλοντος, που ονομάζονται μεταλλαξογόνοι. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται διάφορες χημικές ουσίες, καθώς και διάφοροι τύποι ακτινοβολιών, όπως η X και η γ-ακτινοβολία, καθώς και η κοσμική και η υπεριώδης ακτινοβολία. Μερικές από τις χημικές ουσίες που έχουν μεταλλαξογόνο δράση είναι η φορμαλδεΰδη, ορισμένες χρωστικές, αρωματικοί κυκλικοί υδρογονάνθρακες. Πώς λοιπόν ένα κύτταρο μπορεί να διατηρήσει σταθερή μια αλληλουχία βάσεων απαραίτητη για τη ζωή υπερπηδώντας αυτές τις αλλαγές που δημιουργούνται από τους διάφορους μεταλλαξογόνους παράγοντες; Η απάντηση είναι ότι τα κύτταρα περιέχουν πάρα πολλά ένζυμα, που αναγνωρίζουν τις βλάβες και επιδιορθώνουν το DNA. Περισσότερο από 99,9% των λαθών της αντιγραφής του DNA επιδιορθώνονται με αυτό τον τρόπο.^{46,47}

1.4. ΠΑΡΑΓΩΝ ΝΕΚΡΩΣΕΩΣ ΟΓΚΩΝ α (TNF-α) rs1800629

Ενδείξεις για την ύπαρξη ενός παράγοντα ο οποίος προκαλεί νέκρωση των όγκων υπήρχαν από το 18^ο αιώνα, προερχόμενες από την παρατήρηση ότι ασθενείς με καρκίνο υφίστατο ελάττωση των όγκων τους κατά την διάρκεια σοβαρών μικροβιακών λοιμώξεων.⁴⁸ Το 1968 ανακαλύφθηκε η λεμφοτοξίνη (TNFβ), μια διαλυτή πρωτεΐνη παραγόμενη από τα T-λεμφοκύτταρα.⁴⁹ Το 1975 πειράματα έδειξαν ότι μια πρωτεΐνη που ονομάστηκε παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor: TNF-α), απελευθερωνόταν στην κυκλοφορία πειραματόζωων μετά από πολυσακχαριδική διέγερση του δικτυοενδοθηλιακού τους συστήματος και είχε αντιογκοτική δράση.⁵⁰ Αυτή η πρωτεΐνη προκαλεί ταχεία νεκρωτική υποστροφή διαφόρων όγκων, απ' όπου και η ονομασία της. Ο TNF-α και η συγγενική του λεμφοτοξίνη (LT-α ή TNF-β), απομονώθηκε αρχικά ως ενεργός πρωταίτιος για την πρόκληση νεκρώσεως όγκων σε ζώα με βακτηριακή λοίμωξη. Έτσι ανακαλύφθηκε

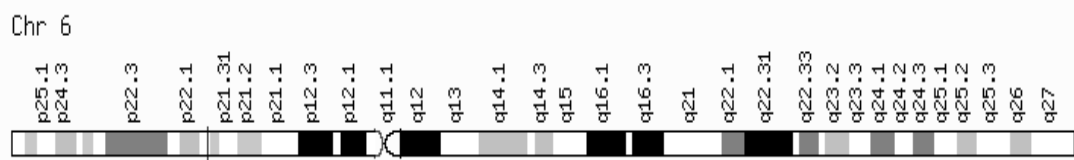
ότι ο TNF σχετίζεται με την *in vivo* αλλά και την *in vitro* νέκρωση καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, ανακαλύφθηκε και ένα μόριο, η καχεκτίνη που θεωρήθηκε υπεύθυνο για το σύνδρομο καχεξίας και το οποίο παρατηρήθηκε σε ποικίλες χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι ο *TNF-α* και η καχεκτίνη είναι το ίδιο μόριο.⁵¹ Επίσης ο *TNF-α* απομονώθηκε ως ο μεσολαβητής της υπερτριγλυκεριδαιμίας και της καχεξίας σε ζώα με παρασιτική λοίμωξη. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, ο *TNF-α* έχει σχετιστεί με σηπτικό σοκ, ρευματοειδή αρθρίτιδα, νόσο μοσχεύματος έναντι του ξενιστή, φλεγμονές του εντέρου, και ποικίλες άλλες διαταραχές. Ο *TNF-α* έχει επίσης βαθιά επίδραση στον μεταβολισμό λιπιδίων όλου του σώματος. Μελέτες έχουν συσχετίσει την έκφραση *TNF-α* με καταβολικές καταστάσεις (όπως ο καρκίνος και η λοίμωξη), που οδηγούν σε σύνδρομο καχεξίας. Τέλος, ο *TNF-α* και άλλες κυτοκίνες αλλάζουν τις λειτουργίες του άξονα βλεννογόνου-επιπεφριδίου και βλεννογόνου-θυρεοειδούς.⁵²

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί επηρεάζουν τα επίπεδα των κυτοκινών στον ορό διότι επηρεάζουν τον ρυθμό μεταγραφής τους. Οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και οι γενετικοί τους πολυμορφισμοί φαίνονται να είναι σημαντικοί. Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί την τελευταία δεκαετία που εστιάζουν σε μικρό αριθμό σημειακών νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων (SNPs) σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η φλεγμονή των αεραγωγών μερικώς σχετίζεται από τον γονότυπο των ασθενών. Ο *TNF-α* είναι μία προφλεγμονώδης κυτοκίνη που έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της φλεγμονής των αεραγωγών και στην δημιουργία των υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών. Ένας πολυμορφισμός στον εκκινητή του *TNF-α* στη θέση -308, που σχετίζεται με την έναρξη της μετάφρασης, μπορεί να είναι σημαντική στον καθορισμό της απόκρισης στον *TNF-α*. Στις περισσότερες μελέτες το αλληλόμορφο -308A είναι παρόν στους ασθενείς και ο γονότυπος GA εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στους μάρτυρες.⁵³

1.4.1. Γονίδιο *TNF-α*

Τα γονίδια του *TNF-α* και λεμφοτοξίνης-α (LTA) είναι μέλη της υπεροικογένειας του γονιδίου TNF που βρίσκεται στην περιοχή τάξης III του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 6 και συγκεκριμένα στη θέση p21.3 σε μια περιοχή που επανειλημμένα σχετίζεται με το άσθμα.^{54,55}

Το Atlas of Genetics αναφέρει τη θέση στο χρωμόσωμα από το 28862640 ζεύγος βάσεων έως το 28889960 ζεύγος βάσεων στην (+) έλικα του DNA. Το ανθρώπινο TNF-γονίδιο περιέχει 4 εξώνια που καταλαμβάνουν 2.762 ζεύγη αζωτούχων βάσεων διαταγμένα σε μήκος 3kb, με την παρεμβολή τριών ιντρονίων (Εικόνα 3).^{56,57}



Εικόνα 3: Θέση γονιδίου *TNF-a* στο χρωμόσωμα 6¹²⁰

Περισσότερο από το 80% του ώριμου *TNF-a* κωδικοποιείται από το τέταρτο εξόνιο, ενώ τα εξόνια I και II περιέχουν κυρίως αλληλουχίες του οδηγού πεπτιδίου. Η 5' περιοχή χαρακτηρίζεται από πολλές αλληλουχίες με ικανότητα δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Εξαιτίας της «πυκνής» συσσώρευσης γονιδίων στην περιοχή του MHC (είναι η πιο «πυκνή» και πολυμορφική περιοχή ολόκληρου του γονιδιώματος), όλα τα γονίδια σε μια έλικα του DNA της περιοχής έχουν την τάση να κληρονομούνται en bloc σαν ένας απλότυπος. Στο φαινόμενο ακριβώς αυτό αναφέρεται και η έννοια της γενετικής ανισορροπίας εκ συνδεσιμότητας (genetic linkage disequilibrium), που σημαίνει ότι τα γονίδια στην περιοχή, κατά την κληρονομικότητά τους, δεν ακολουθούν τυχαίο διαχωρισμό, αλλά μεταβιβάζονται en bloc κατά ομάδες (linkage). Εξαιτίας και της τοπογραφικής συνάφειας του γονιδίου του με το MHC, η έννοια αυτής της γενετικής ανισορροπίας, αφορά ιδιαίτερα και το γονίδιο του *TNF-a*. Το γονίδιο του *TNF-a* εμφανίζει πολυμορφισμούς σε επίπεδο διαφοράς μεμονωμένων νουκλεοσιδίων, ή και μικρών αλληλουχιών.⁵⁸

Οι περιοχές με τον πολυμορφισμό βραχέων ακολουθιών (microsatellite markers), έχουν χαρακτηριστεί σαν *TNF-a* (α και όχι α), *TNFb*, *TNFc*, *TNFd* και *TNFe*. Καθένας από του πολυμορφισμούς αυτούς έχει πολλά αλληλόμορφα, τα οποία προσδιορίζονται με αριθμούς. Μεταξύ των πολυμορφισμών αυτών υφίσταται επίσης γενετική ανισορροπία εκ συνδεσιμότητας. Η γενική άποψη είναι ότι υψηλότερα επίπεδα *TNF-a* συσχετίζονται με εντονότερη φλεγμονή, αν και είναι δύσκολο να καθοριστεί κατά πόσο περισσότερο *TNF-a* προκαλεί περισσότερη φλεγμονή, ή αντίστροφα, περισσότερη φλεγμονή οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση *TNF-a*. Η μελέτη των πολυμορφισμών του *TNF-a* σαν γενετικών ρυθμιστικών παραγόντων της έκφρασής του, στα διάφορα άτομα και πληθυσμούς, και σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις και ασθένειες, έχει επικεντρώσει πολύ ενδιαφέρον. Οι προσπάθειες των μελετών περιστρέφεται γύρω από το κύριο θέμα της ανάδειξης συγκεκριμένων απλότυπων, με βάση τους πολυμορφισμούς του 3-5 γονιδίου, οι οποίοι να σχετίζονται με αυξημένη ή μειωμένη παραγωγή *TNF-a*, και κατ' επέκταση με διαφορετική αντίδραση των οργανισμών κάτω από νοσογόνες καταστάσεις.⁵⁹⁻⁶²

Εντός και περί της περιοχής του γονιδίου *TNF-a* έχουν βρεθεί πολλοί πολυμορφισμοί οι περισσότεροι από τους οποίους προκύπτουν από την αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNPs). Έχουν καταγραφεί 118 πολυμορφισμοί για το γονίδιο, οι οποίοι αφορούν μεταλλάξεις στον υποκινητή ή στην περιοχή κωδικοποίησης του *TNF-a* και έχουν συσχετιστεί με άσθμα, ψωρίαση, λέπρα, σηπτικό σοκ κ.α. Η διαφοροποίηση μεταξύ ατομικών συγκεντρώσεων *TNF-a* έχει αποδοθεί σε μονούς πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων (SNPs) στην περιοχή του

προωθητή του TNF. Πολλοί SNPs έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή του εκκινητή του *TNF-α*, που θεωρούνται ότι επηρεάζουν την παραγωγή *TNF-α*. Οι καλύτερα καταγεγραμμένοι SNPs είναι στις θέσεις -308 (dbSNPrs1800629) και -238 (dbSNPrs361525) του προωθητή του γονιδίου *TNF-α*. Έχουν περιγράψει οκτώ παραλλαγές DNA ή SNPs εντός του προωθητή *TNF* σε θέσεις -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -308G/A, -244G/A, και -238G/A¹⁰⁻¹⁶ σχετικές με την τοποθεσία έναρξης μεταγραφής.⁶³ Το ενδιαφέρον με αυτές τις γενετικές μεταβλητές προέρχεται από την πιθανότητα οι γενετικές αλλαγές που εισαγάγουμε σε σύγκριση με την κοινή μορφή να μπορούν να επηρεάσουν το σύνδεσμο των μεταγραφικών παραγόντων, ελέγχοντας την δράση του εκκινητή και του mRNA και των επίπεδων πρωτεΐνης που προκύπτουν. Το επίπεδο παράγωγης *TNF* σε υγιή άτομα δείχνει ευρεία και σταθερή διακύμανση, με φαινοτύπους υψηλής και χαμηλής παράγωγης παρόντες στον πληθυσμό, δείχνοντας μια ουσιαστική γενετική συμβολή στη ρύθμιση του *TNF*.⁶⁴

Οι Wilson *et al* ταυτοποίησαν έναν G σε A διαλληλικό πολυμορφισμό μετάβασης που τοποθετείται στην θέση -308 στον προωθητή του *TNF*, τα *TNF1* (-308G) και *TNF2* (-308A) αλληλόμορφα. και περιλαμβάνουν την υποκατάσταση από την γουανίνη (G) (*TNF1*) της αδενίνης (A) (*TNF2*) και την δημιουργία δύο αλληλόμορφων (-308G/-238G και -308A/-238A) και τριών γονότυπων GG, GA και AA.⁶³

Η περιοχή στην οποία βρίσκεται το γονίδιο *TNF-α* εμφανίζει το μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών για το χρωμόσωμα 6. Μία πιθανή ερμηνεία είναι ότι το γονιδίωμα της συγκεκριμένης περιοχής είναι αυτό που εξασφαλίζει την ευρεία ποικιλία των ανοσολογικών αποκρίσεων. Έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί στο γενετικό τόπο του *TNF* σχετίζονται με μεταβολές στην κυτταρική έκφραση του *TNF-α*. Ο πολυμορφισμός rs 1800629 έχει φυσικό αλληλόμορφο το G και παθογόνο το A και πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη. Η μεταλλαγμένη αλληλουχία είναι η εξής: GTTTTGAGGGGCATGG/AGGACGGGGTTCAGCC. Αυτός ο πολυμορφισμός συνδέεται με το άσθμα και πλήθος άλλων παθολογικών καταστάσεων όπως η απόρριψη μοσχεύματος, η ΧΑΠ, η νόσος του Crown, το γαύκωμα, η νόσος του Grave. Επίσης, είναι συνδεδεμένος με την παχυσαρκία, την ινσουλινοαντίσταση και την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του *TNF-α*.^{65,66} Το αλληλόμορφο *TNF*-308A έχει ενδιαφέρον γιατί σχετίζεται με αυξημένη *in vitro* μεταγραφή του *TNF*.⁵⁴

Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου που τοποθετούνται εντός άλλων προωθητών γονιδίων έχουν δείξει να επηρεάζουν την δέσμευση του παράγοντα μεταγραφής και εξ'αυτού την έκφραση των γονιδίων. Ο πολυμορφισμός -308 θα μπορούσε δυνάμει να κατορθώσει την ειδική για τον τύπο κυττάρου και το ερέθισμα ρύθμιση της σύνθεσης *TNF* σε μεταγραφικό επίπεδο. Μια γενετική προδιάθεση για παραγωγή ανεβασμένων επιπέδων *TNF*, λόγω της παρουσίας του πολυμορφισμού -308A, μπορεί να αλλοιώσει την πορεία ανοσολογικής απόκρισης τόσο που ένα άτομο να έχει αυξημένο κίνδυνο να νοσήσει.⁶⁷

Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι ο -308 πολυμορφισμός έχει την πιο σημαντική επίδραση στην μεταγραφή *TNF* στα μακροφάγα. Ο *TNF* κυρίως παράγεται από κύτταρα της καταγωγής μονοκυττάρων-μακροφάγων. Έτσι μια πενταπλάσια αύξηση στην μεταγραφή *TNF* θα μπορούσε να οδηγήσει σε δραματική αλλαγή στα

κυκλοφορούντα επίπεδα TNF.⁶⁷ Ο πολυμορφισμός στην 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου του *TNF-α* στη θέση 308 του γονιδίου *TNF-α* μπορεί να αυξάνει την έκφραση αυτής της κυτοκίνης σε λιπώδη ιστό και να επηρεάζει τον όγκο του λίπους και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Επομένως, ο μεταγραφικός έλεγχος παίζει βασικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων TNF.⁶⁵

Θεωρείται ότι η αλλαγή νουκλεοτιδίου G σε A στον -308 αλλάζει ένα σημείο δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής, επηρεάζοντας τις δραστηριότητες δέσμευσης άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύουν στο -323 ως -285 στοιχείο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός αλλαγμένου σύνθετου μεταγραφικού στοιχείου.⁶⁷

Τα επίπεδα στον ορό των προφλεγμονωδών κυτοκινών μπορεί να επηρεάζονται από πολυμορφισμούς που αφορούν την κωδικοποίηση και τους εκκινητές γονιδίων. Παρόλο που οι γονότυποι GA και AA του γονιδίου *TNF-α* στη θέση -308 σχετίζονται με υψηλή παραγωγή της κυτοκίνης, ο γονότυπος GG σχετίζεται με χαμηλή παραγωγή. Τα γονίδια που προδιαθέτουν για άσθμα δεν είναι κοινά σε όλους τους πληθυσμούς.⁵³

1.4.2. Σύνθεση και απελευθέρωση *TNF-α*

Το ανθρώπινο *TNF-α* κλωνοποιήθηκε το 1985.⁶⁸ Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι από τους κυριότερους μεσολαβητές της φλεγμονής. Ο *TNF-α* προκαλείται από ποικίλα παθογόνα ερεθίσματα και προκαλεί άλλους χημικούς μεσολαβητές της φλεγμονής και πρωτεάσες που ενορχηστρώνουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις.⁶⁹

Οι δύο πρωτεΐνες, TNFα και TNFβ, απομονώθηκαν το 1984 από ενεργοποιημένα μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα.^{70,71} Η μελέτη του cDNA τους έδειξε 30% ομολογία αλληλουχίας των αμινοξέων τους. Οι υποδοχείς TNF, TNFR1 και TNFR2, απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν το 1990.⁷² Ο *TNF-α* συνδέεται υπό τη μορφή τριμερών με τρία μόρια του υποδοχέα. Η δομή του υποδοχέα χαρακτηρίστηκε τελικά το 1996.⁷³

Ο *TNF-α* σαν λιγανδίνη, και οι υποδοχείς του, TNFR1 και TNFR2, ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια λιγανδινών και υποδοχέων TNF (*TNF superfamily*).⁷⁴ Η υπεροικογένεια TNF αποτελείται από 19 μέλη από τα οποία τα πλέον ευρέως γνωστά είναι ο *TNF-α* ή καχεκτίνη, ο *TNF-β* ή λεμφοτοξίνη α και ο *TNF-c* ή λεμφοτοξίνη β. Όλα τα μέλη έχουν εξελικτική διατήρηση στις ακολουθίες των αμινοξέων τους και έχουν χαρακτηριστικά μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου 2, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της προέλευσης από το ίδιο προγονικό γονίδιο.⁸⁰

Ο *TNF-α* είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων.⁴⁰ Ο TNF παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, αλλά παράγεται επίσης από μια ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοειδών κυττάρων, τα μαστοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των καρδιακών μυοκυττάρων, τον λιπώδη ιστό, τους ινοβλάστες, και των νευρικών κυττάρων. Στο δέρμα, σιτευτικά κύτταρα φαίνεται να είναι η κυρίαρχη πηγή από προσχηματισμένα TNF, η οποία μπορεί να απελευθερωθεί από φλεγμονώδη ερεθίσματα (π.χ. LPS).⁷⁶

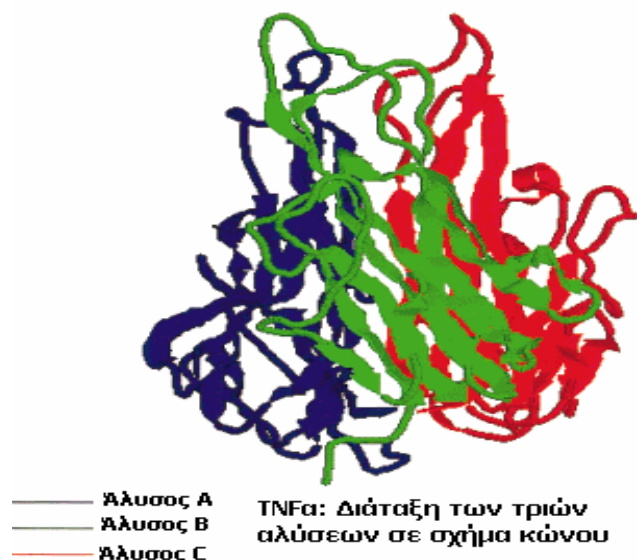
Υπάρχουν δύο βασικές μορφές του TNF: ο *TNF-α* και ο *TNF-β* που έχουν μόνο 35% ομολογία αμινοξέων αλλά συνδέονται με παρόμοιους υποδοχείς.²⁷ Η έκφραση

του γονιδίου *TNF-α* οδηγεί σε ένα mRNA με μέγεθος 1669 νουκλεοτίδια.⁷⁷ Η ανθρώπινη *TNF-α* πρωτεΐνη παράγεται ως μια βιολογικά ενεργή μονομερική πρωτεΐνη μεγέθους 25.6kDa, περιέχει αρχικά 233 αμινοξέα και είναι συνδεδεμένη με την μεμβράνη ως πρόδρομη πρωτεΐνη⁵. Κατόπιν, ο *TNF-α* απελευθερώνεται από τα κύτταρα με πρωτεολυτικό διαχωρισμό της συνδεδεμένης με την μεμβράνη μορφής από το μετατρεπτικό ένζυμο μεταλλοπρωτεϊνάσης μήτρας (MMP) που μετατρέπει τον *TNF-α* (TACE) για να δώσει τον 17kDa διαλυτό *TNF-α*.²⁷ Τελικά, Ο *TNF-α* εκφράζεται ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II με 212 αμινοξέα που συνδέεται με μια διαμεμβρανική περιοχή στο προπεπτίδιο.^{78,79} Το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται μέσα στο κύτταρο, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης.⁸⁰

Η εξωκυττάρια περιοχή του *TNF-α* συνδέεται με την επιφάνεια του κυττάρου με μια διαλυτή 17 kDa πρωτεΐνη, με ένα παρόμοιο με μεταλλοπρωτεϊνάση ένζυμο που έχει ονομαστεί ένζυμο μετατροπής *TNF-α* (TACE). Η πρωτεΐνη των 17kDa θεωρείται το ώριμο προϊόν, με την οποία επιτυγχάνεται η κυκλοφορία στο αίμα και στα βιολογικά υγρά, αλλά υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η σχετική με την μεμβράνη 26 kDa πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις κύτταρο με κύτταρο.²⁶

1.4.3. Μηχανισμός δράσης *TNF-α*

Ο *TNF-α* υφίσταται σαν τριμερές και συνδέεται με τους υποδοχείς του, που απαντούν στα περισσότερα κύτταρα. Το τριμερές του *TNF-α* έχει το σχήμα κώνου με τα τρία μέρη να εκτείνονται το καθένα από τη βάση μέχρι την κορυφή του κώνου, και να έχουν κοινό σημείο επαφής τους το γεωμετρικό ύψος του κώνου.⁸¹ Διάφορα μοντέλα για τον τρόπο σύνδεσης του τριμερούς *TNF-α* με τον υποδοχέα έχουν προταθεί.⁸² Σε κάθε περίπτωση, η σύνδεση του τριμερούς, δημιουργεί συνάθροιση των υποδοχέων με ολιγομεροποίηση των κυτταροπλασματικών τους περιοχών, γεγονός που εκκλύει την ενδοκυττάρια διαβίβαση του σήματος (Εικόνα 4). Η βιολογική ρύθμιση της παραγωγής και της δράσης του *TNF-α* γίνεται με τρεις βασικούς μηχανισμούς: 1) με την ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιό του, 2) με τον έλεγχο της σταθερότητας του ειδικού mRNA, 3) με μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης από τον παραγόμενο *TNF-α*.⁸³ Ο *TNF-α* αναστέλλει ο ίδιος την παραγωγή του. Αυτό το αποτέλεσμα επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων TNFR1 και TNFR2. Κύτταρα από ποντίκια με έλλειψη TNFR1 και TNFR2, παράγουν μετά από διέγερση σημαντικά περισσότερο *TNF-α*.⁸⁴



Εικόνα 4: Στερεοχημική απεικόνιση δομής πρωτεΐνης *TNF-α*

1.4.4. Βιολογικές επιδράσεις *TNF-α*

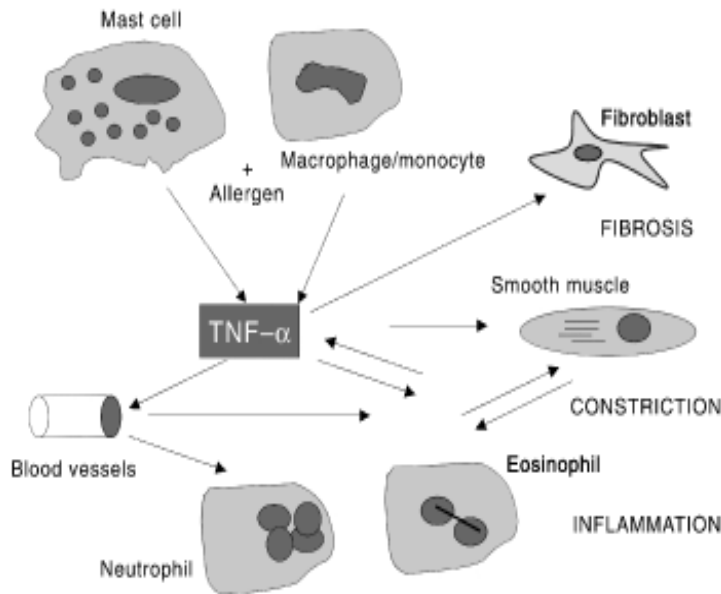
Οι βιολογικές επιδράσεις του *TNF-α* ποικίλουν, και ο μηχανισμός τους είναι πολύπλοκος. Καθώς η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί αντίσταση σε συγκεκριμένες λοιμώξεις, και προκαλεί παθολογικές επιπλοκές, οι ρόλοι της εμφανίζονται αντιφατικοί. Μια καλύτερη κατανόηση αυτής της πολυπλοκότητας επιτυγχάνεται με το διαχωρισμό των βιολογικών αποτελεσμάτων, ανάλογα με τη διάρκεια δράσης και τη συγκέντρωση του *TNF-α*. Σε οξείες καταστάσεις, η τοπική δράση του *TNF-α* είναι ευνοϊκή.^{85,76} Μια τοπική αύξηση της συγκέντρωσης του TNF θα προκαλέσει σημεία φλεγμονής: θερμότητα, οίδημα, ερυθρότητα, πόνο και απώλεια της λειτουργίας. Ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις του TNF προκαλούν συμπτώματα σοκ, η χαμηλή συγκέντρωση του TNF μπορεί να οδηγήσει σε καχεξία.⁸⁷

Όπως άλλες κυτοκίνες, ο *TNF-α* έχει τρομερή ποικιλία λειτουργιών, τόσο στο ανοσοποιητικό, όσο και στο εξωανοσοποιητικό σύστημα (πρόκληση αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, λύση κυττάρων όγκων, ανάπτυξη θυμοκυττάρων, διέγερση παραγωγής άλλων κυτοκινών, καταστολή της δραστηριότητας της λιποπρωτεΐνης λιπάσης).⁵²

1.4.5. Ρόλος *TNF-α* στο βρογχικό άσθμα

Το άσθμα θεωρείται μια ασθένεια Τ-βοηθού τύπου 2 (Th2) με συγκεκριμένο προφίλ απελευθέρωσης κυτοκίνης, που πιστεύεται ότι περιλαμβάνει και τις *IL-4* και *IL-5*. Αυξανόμενες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι άλλες κυτοκίνες, που σε ποντίκια

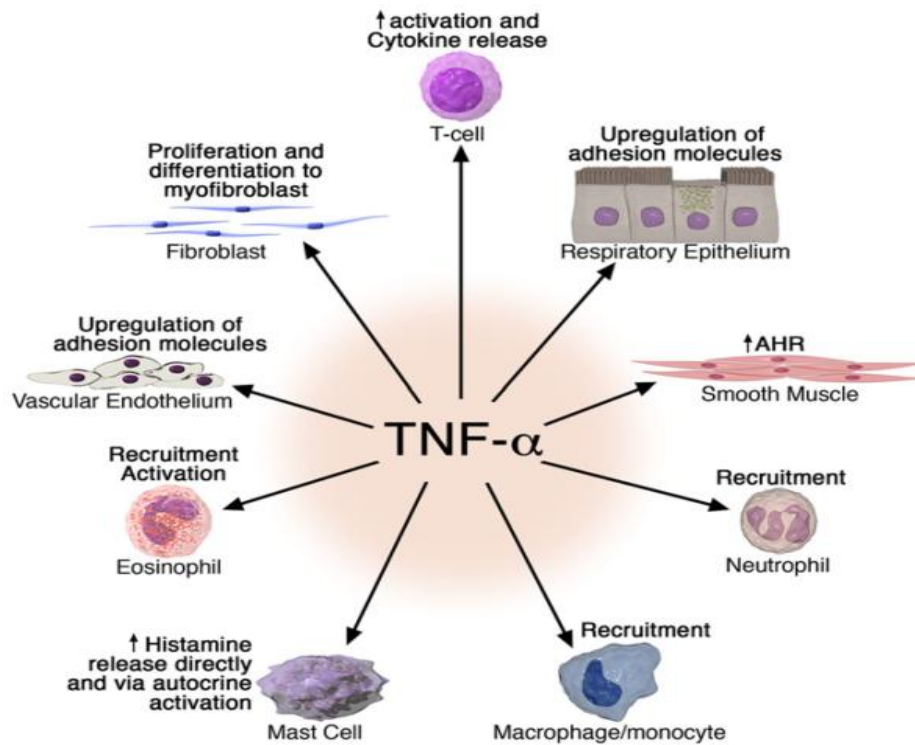
θεωρούνται ότι ανήκουν σε προφίλ τύπου Th1, επίσης σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση που χαρακτηρίζει το ανθρώπινο άσθμα. Ένας τέτοιος μεσολαβητής είναι ο *TNF-α*, που έχει εμπλακεί στην ασθματική φλεγμονή από μια ευρεία σειρά υποκυτταρικών *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* και άλλες γενετικές μελέτες και εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού (Εικόνα 5).²⁶



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα δράσης *TNF-α* εντός του αεραγωγού²⁶

Υψηλά επίπεδα *TNF-α* έχουν παρατηρηθεί σε υγρό βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, σε όρο και βρογχικό υποβλέννιο ιστό ασθματικών ασθενών. Ο *TNF-α* φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλαπλά χαρακτηριστικά του άσθματος: φλεγμονή των αεραγωγών, αυξημένη βρογχική υπεραπόκριση και ατοπία.⁵⁴

Ο κεντρικός ρόλος της φλεγμονής των αεραγωγών στο άσθμα και τα αυξημένα επίπεδα *TNF* στους ασθματικούς πνεύμονες, δείχνουν ότι οι λειτουργικές παραλλαγές του γονιδίου του *TNF* μπορεί να είναι σημαντικές στην ασθένεια (Εικόνα 6).⁸⁸



Εικόνα 6: Ο ρόλος του *TNF-α* στην παθογένεση του άσθματος. Ο *TNF-α* παίζει έναν κεντρικό ρόλο σε πολλά από τα χαρακτηριστικά του άσθματος ασκώντας σημαντικές επιδράσεις φλεγμονώδη και δομικά κύτταρα.⁸⁸

Ο *TNF-α* μπορεί να έχει σημαντική μεγεθυντική επίδραση στην ασθματική φλεγμονή. Υπάρχουν ενδείξεις αυξημένης έκφρασης στους ασθματικούς αεραγωγούς και η ενεργοποίηση IgE σε ευαισθητοποιημένους πνεύμονες οδηγεί σε αυξημένη έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα τόσο σε πνεύμονα επίμυων όσο και ανθρώπων. Έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση *TNF-α* mRNA σε δείγματα βρογχικών βιοψιών ασθματικών ασθενών. Ο *TNF-α* είναι επίσης παρών στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθματικών ασθενών και η απελευθέρωση *TNF-α* από βρογχοκυψελιδικά λευκοκύτταρα ασθματικών ασθενών είναι αυξημένη. *TNF-α* επίσης απελευθερώνεται από κυψελιδικά μακροφάγα ασθματικών ασθενών μετά από δοκιμασία αλλεργιογόνων. Επιπλέον, τόσο τα μονοκύτταρα του αίματος, όσο και κυψελιδικά μακροφάγα δείχνουν αυξημένη έκφραση γονιδίων του *TNF-α* μετά από ενεργοποίηση IgE in vitro και αυτό το αποτέλεσμα ενισχύεται από την IFN-γ.⁸⁹

1.4.6. Ρόλος *TNF-α* στον ΣΔτ2

Ένα μόριο με πιθανό ρόλο στην σχετιζόμενη με την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη είναι ο *TNF-α*. Εκτός από την προφλεγμονώδη και κατά των όγκων δράση του, ο *TNF-α* επίσης διαμορφώνει την βιολογία των λιποκυττάρων και επηρεάζει τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Αυτές οι μεταβολικές λειτουργίες

περιλαμβάνουν ρύθμιση της λιπογένεσης και λιπόλυσης και αναστολή της δράσης της ινσουλίνης, ιδίως στην παχυσαρκία. Ο γενικός μηχανισμός της προκαλούμενης από τον *TNF-α* αντίστασης στην ινσουλίνη, περιλαμβάνει αναστολή της σηματοδότησης των υποδοχέων ινσουλίνης. Ο *TNF-α* υπερεκφράζεται στον λιπώδη ιστό σε πολλά μοντέλα τρωκτικών με παχυσαρκία και επηρεάζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Η πλήρης απουσία του γονιδίου *TNF-α* ή και των δύο υποδοχέων του έχει ως αποτέλεσμα σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σε ποντίκια με διατροφική, υποθαλαμική ή γενετική παχυσαρκία. Η υψηλή έκφραση *TNF-α* σε λιπώδη και μυϊκό ιστό σχετίζεται θετικά με τον βαθμό παχυσαρκίας και το επίπεδο υπερινσουλιναιμίας και σχετίζεται αρνητικά με την δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης του λιπώδους ιστού. Πολλές πρόσφατες μελέτες δείχνουν επίσης ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα *TNF-α* αυξάνονται σε παχύσαρκους ασθενείς με ΣΔτ2 και σχετίζονται θετικά με συγκεντρώσεις ορού λεπτίνης, μιας πρωτεΐνης ομοιόστασης, που προέρχεται από τα λιποκύτταρα.⁹⁰

Ο *TNF-α* και κάποιες άλλες κυτοκίνες (π.χ. *IL-1* και *IFN-γ*) επηρεάζουν επίσης την ομοιόσταση της γλυκόζης σε διάφορους ιστούς. Ο *TNF-α* διεγείρει την ανεξάρτητη από την ινσουλίνη χρησιμοποίηση της γλυκόζης σε ιστούς πλούσιους σε μακροφάγα, ενώ αναστέλλει την διεγερόμενη από την ινσουλίνη πρόσληψη γλυκόζης σε λίπος και μύες. Επομένως, η διαχείριση του *TNF-α* οδηγεί σε καθαρή αύξηση στην παραγωγή βασικής γλυκόζης και σε μείωση της χρησιμοποίησης της διεγερόμενης από την ινσουλίνη περιφερειακής γλυκόζης. Αν και αυτό το αποτέλεσμα έχει εμφανιστεί ότι οφείλεται σε παρεκκλίνουσα ρύθμιση των μεταφορών γλυκόζης σε διάφορους ιστούς *TNF-α* έχει φανεί να επηρεάζει πιο κοντινά συμβάντα που ρυθμίζουν τη δράση της ινσουλίνης και την ομοιόσταση γλυκόζης. Η διαχείριση του *TNF-α* προκαλεί επίσης αύξηση στις ορμόνες (αντιρρυθμιστικές ορμόνες) όπως η γλυκαγόνη, η κορτιζόλη και η επινεφρίνη, που ρυθμίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης και διεγείρουν την γλυκονεογένεση στο ήπαρ.⁵²

1.4.7. *TNF-α*, παχυσαρκία και καχεξία

Η έκφραση *TNF-α* έχει συσχετιστεί με καχεξία, μια διαταραχή φθοράς που σχετίζεται με τον λιπώδη και μυϊκό ιστό. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η παρεκκλίνουσα παραγωγή *TNF-α* μπορεί να παίζει ρόλο στην καχεξία, κυρίως όταν εμφανίζεται σε πλαίσιο μίγματος κυτοκινών ή άλλων ουσιών που εκκρίνονται από όγκους. Η παροχή *TNF-α* μόνο προκαλεί ανορεξία, χωρίς προτίμηση στην απώλεια μυϊκού ιστού. Επιπλέον, όταν ο *TNF-α* έχει συσχετιστεί με καχεξία, έχουν υπάρξει σημαντικά κυκλοφορούντα επίπεδα (200 ng/ml) αυτής της κυτοκίνης. Σε αντίθεση, λίγη ή καθόλου έκφραση άλλων κυτοκινών εκτός του *TNF-α* σε μοντέλα παχυσαρκίας-διαβήτη και τα κυκλοφορούντα επίπεδα *TNF-α* σε αυτά τα μοντέλα είναι πολύ χαμηλά, της τάξεως των 10-200pg/ml όταν είναι ανιχνεύσιμα. Επιπλέον, η παχυσαρκία συχνά σχετίζεται με άλλες ορμονικές ανωμαλίες, όπως ανεβασμένα γλυκοκορτικοειδή και ινσουλίνη που μπορούν να αλλάξουν την απόκριση στον *TNF-α*.⁵⁰

Ουσιαστικά όλα τα μοντέλα ζώων για παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη

που έχουν εξεταστεί έως σήμερα φαίνεται να παράγουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA *TNF-α* και πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα λεπτά αντίστοιχά τους. Πρόσφατες αναφορές έδειξαν επίσης ανεβασμένη έκφραση mRNA *TNF-α* και πρωτεϊνών στην ανθρώπινη παχυσαρκία. Η έκφραση του *TNF-α* ήταν σε ισχυρή θετική συσχέτιση με τον βαθμό παχυσαρκίας (δείκτης μάζας σώματος, ΔΜΣ) και το επίπεδο υπερινσουλιναιμίας και σε αρνητική συσχέτιση με την δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης του λιπώδους ιστού. Πρόσφατα, η αναστολή δράσης της ινσουλίνης και της σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης από τον *TNF-α* παρουσιάστηκε σε καλλιεργημένα ανθρώπινα λιποκύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρύθμιση και λειτουργία της έκφρασης *TNF-α* στην ανθρώπινη παχυσαρκία είναι πολύ παρόμοια με αυτή των μοντέλων τρωκτικών. Μια αρχική μελέτη που χρησιμοποίησε μια μόνη δόση ενός ουδετεροποιητικού αντισώματος δεν έχει δώσει αλλαγές στην ευαισθησία στην ινσουλίνη σε ασθενείς με βεβαιωμένο ΣΔτ2. Άρα, η διεκρίνιση του ρόλου του *TNF-α* στην ανθρώπινη νόσο και οι τρόποι με τους οποίους δοκιμάζουμε αυτήν δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί.⁵⁶

Σε αυτό το πλαίσιο, *TNF-α* εκφραζόμενος από λιπώδη ιστό μπορεί να προκαλέσει ένα αποκλίνον φάσμα βιολογικών αποκρίσεων μέσω ενός αυτοκρινούς/παρακρινικού τρόπου δράσης. Παρόλ'αυτά, οι ακριβείς παράγοντες που επιτρέπουν σε ένα μόριο να παίζει ρόλους σε αυτές τις διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, δεν έχουν προσδιοριστεί.⁵² Ούτε οι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτή την περιορισμένη δραστηριότητα, ούτε τα συστήματα υποδοχέων που συμμετέχουν στην σηματοδότηση του *TNF-α* είναι σαφώς κατανοητά.⁹¹ Μπορούμε να υποθέσουμε ότι άλλοι μηχανισμοί με συμμετοχή συστημικής επίδρασης της λεπτίνης ή άλλων αδιποκινών μπορεί να προκαλέσουν έκκριση *TNF-α* από άλλους τύπους κυττάρων, όπως τα μακροφάγα. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος του *TNF-α* στην ανθρώπινη παχυσαρκία απαιτεί περαιτέρω έρευνα.⁴⁰

1.4.8. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική μεσω *TNF-α*

Αφού η έκφραση *TNF-α* στην παχυσαρκία των τρωκτικών είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών μοντέλων, υπάρχει αρκετό ενδιαφέρον για την πιθανότητα οι λιπώδεις ιστοί παχύσαρκων ανθρώπινων πληθυσμών να υπερεκφράζουν *TNF-α* και να προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε μια πρώτη μελέτη που έγινε με βιοψία σε ανθρώπινο κοιλιακό λιπώδη ιστό, υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού παχυσαρκίας (δείκτης μάζας σώματος) υπερινσουλιναιμίας και σχετικών επιπέδων mRNA *TNF-α* σε λιπώδη ιστό. Περαιτέρω μελέτες θα είναι απαραίτητες για να αξιολογηθούν οι λεπτομερείς μεταβολικές παράμετροι σε υπο-τύπους παχυσαρκίας και ΣΔτ2 και η σχέση τους με την έκφραση *TNF-α* σε λιπώδη ιστό.⁵²

Αν ο προερχόμενος από λίπος *TNF-α* παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση αντίστασης στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ΣΔτ2, μπορεί να έχει αξία να κάνουμε υποθέσεις για πιθανά θεραπευτικά συμπεράσματα. Πρώτον, πολλά στοιχεία από ποικίλες μελέτες δείχνουν ότι παράγοντες που βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη μπορεί να έχουν μεγάλη αξία στην αντιμετώπιση του ΣΔτ2. Η πιο προφανής θεραπευτική θα ήταν η ουδετεροποίηση του *TNF-α* με ένα αντίσωμα ή με

ανοσοσυγκολλητίνη, όπως η διαλυτή TNFR-IgG πρωτεΐνη σύντηξης. Ενώ τέτοια αντιδραστήρια θα απαιτούσαν πιθανόν έγχυση, είναι αρκετά σταθερά στην κυκλοφορία του αίματος και δεν θα χρειαζόταν συχνή χορήγηση. Βέβαια, η μακροχρόνια ουδετεροποίηση του *TNF-α* τελικά θα έθετε σε κίνδυνο τις ευεργετικές λειτουργίες αυτής της κυτοκίνης στο ανοσοποιητικό, όπως η ικανότητα να αντιμετωπίζει κάποιες λοιμώξεις και η διέγερση της αύξησης των θυμοκυττάρων. Αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να παρακαμφθεί με κατάλληλη δοσολογία του ουδετεροποιητικού παράγοντα αν είναι απαραίτητο λιγότερο *TNF-α* για να δώσει τα ευεργετικά αποτελέσματα του TNF παρά τα επιβλαβή. Εναλλακτικά, μπορεί τελικά να είναι δυνατό να ξεκαθαριστούν αυτά τα αποτελέσματα στο επίπεδο των υποδοχέων, με την δημιουργία ειδικών για τους υποδοχείς ανταγωνιστών. Τέλος, αφού η αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να συνδέεται με ακατάλληλη ειδικά στο λίπος έκφραση *TNF-α*, η ανάπτυξη φαρμάκων που ρυθμίζουν ειδικά αυτή την διαδικασία θα μπορούσε θεωρητικά να έχει τον επιθυμητό βαθμό εξειδίκευσης. Το αν κάποια από αυτές τις τάξεις παραγόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του ανθρώπινου ΣΔτ2 παραμένει να προσδιοριστεί. Εντούτοις, παλαιότερες μελέτες έχουν δώσει κάποιες ενδείξεις ότι η ουδετεροποίηση του *TNF-α* μπορεί να είναι βάσιμη θεραπευτική προσέγγιση στο ΣΔτ2. Η πεντοξυφυλλίνη έχει χρησιμοποιηθεί και σε ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη και σε ΣΔτ2 για την αντιμετώπιση αγγειακών επιπλοκών. Κατά τη διάρκεια κάποιων από αυτές τις μελέτες, παρατηρήθηκε μια αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ΣΔτ2. Αυτό εξηγήθηκε από βελτιώσεις στη μικροκυκλοφορία, αλλά τώρα είναι γνωστό ότι η πεντοξυφυλλίνη είναι αναστολέας της παραγωγής *TNF-α*, αν και αυτό δεν έχει μελετηθεί στο λίπος. Αν και υποθετική, η ικανότητα να επηρεαστεί η αντίσταση στην ινσουλίνη από την πεντοξυφυλλίνη μπορεί να υποστηρίξει τον ρόλο του *TNF-α* στον ΣΔτ2 σε ανθρώπους.⁵²

Πρόσφατα πειράματα με χρήση καλλιεργείων πρωταρχικών ανθρώπινων λιποκυττάρων έχουν δείξει επίσης ότι αν και οι ειδικοί για TNFR1 αγωνιστές μιμούνται τα ανασταλτικά αποτελέσματα του *TNF-α* στην σηματοδότηση ινσουλίνης, αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να μπλοκαριστούν από ένα αντίσωμα ανταγωνιστικό προς το TNFR2, υποδηλώνοντας την εμπλοκή και των δύο TNFRs σε αυτή την δραστηριότητα. Παρόλο που ο ρόλος του *TNF-α* στην δράση της ινσουλίνης έχει παρουσιαστεί σε πολλά *in vitro* πειραματικά συστήματα, δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον *in vivo* ρόλο κάθε TNFR σε αυτή την δράση.⁹⁰

Ο *TNF-α* δεσμεύεται και μπορεί να εξουδετερωθεί από τους λεγόμενους βιολογικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι μονοκλωνικά αντισώματα ή πρωτεΐνες σύντηξης που προκαλούν ύφεση της νόσου για το χρονικό διάστημα που χορηγούνται. Πολλές προσεγγίσεις της αναστολής της σύνθεσης *TNF-α* των αποτελεσμάτων ερευνώνται τώρα για το άσθμα, μεταξύ αυτών τα μονοκλωνικά αντισώματα στον TNF και οι διαλυτοί υποδοχείς TNF.⁸⁹

Ενδείξεις που στηρίζουν τον βασικό ρόλο του *TNF-α* σε σχετιζόμενη με την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη, ήρθαν από μελέτες που δείχνουν ότι η διαγραφή του *TNF-α* ή των υποδοχέων του *TNF-α* είχε ως αποτέλεσμα μεγάλη βελτίωση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, τόσο σε λόγω διατροφής παχύσαρκα

ποντίκια, όσο και σε ob/ob ποντίκια με έλλειψη λεπτίνης. Η εξουδετέρωση του *TNF-α* αύξησε την αντίσταση στην ινσουλίνη στα παχύσαρκα ποντίκια. Εντούτοις, η έγχυση αντισωμάτων που ουδετεροποιούν τον *TNF-α* σε παχύσαρκα άτομα με αντίσταση στην ινσουλίνη ασθενείς με ΣΔτ2, δεν βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Ο *TNF-α* έχει φανεί να αναστέλλει την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και να μειώνει την παράγωγη της στις γραμμές αδιποκυττάρων, καθώς και να αυξάνει την λιπόλυση.⁹²

Μελέτες που χρησιμοποιούν βραχυπρόθεσμη χορήγηση ουδετεροποιητικών αντισωμάτων ή διαλυτών υποδοχέων *TNF-α* σε σχήμα μονοθεραπείας, δεν έχουν δείξει καθόλου αποτελέσματα αυτών των θεραπειών στην ευαισθησία στην ινσουλίνη παχύσαρκων ατόμων με αντίσταση στην ινσουλίνη και αναγνωρισμένο διαβήτη. Αν μελετηθούν μαζί, αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να αντανάκλουν την έλλειψη αποτελεσματικότητας αυτών των αντιδραστηρίων ή την διάρκεια των θεραπειών για το μπλοκάρισμα της δράσης του *TNF-α*, που αρχικά εμφανίζεται με έναν αυτοκρινή/παρακρινικό τρόπο. Επομένως, μπορεί να είναι απαραίτητες μακροπρόθεσμες μελέτες με εναλλακτικούς τρόπους για να αντιμετωπιστεί οριστικά ο πιθανός ρόλος του *TNF-α* στις ανθρώπινες παθήσεις.⁶⁴

Αυτό μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στις ανθρώπινες ασθένειες, γιατί η χρήση ουδετεροποιητικών αντισωμάτων έχει επίσης αποτύχει να παράξει αποτελέσματα πάνω στην ευαισθησία στην ινσουλίνη παχύσαρκων ατόμων με εγκατεστημένο ΣΔτ2. Αυτές οι μελέτες επίσης δείχνουν την ανάγκη για καλύτερο χαρακτηρισμό των ατόμων που είναι πιθανό να ωφεληθούν από θεραπείες αντι-*TNF-α*.⁹⁰

1.5. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 6 (IL-6) rs1800795

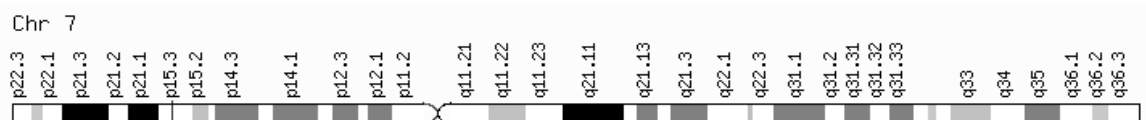
Είναι περίπου δύο δεκαετίες από τότε που επιστήμονες οι οποίοι ασχολούνταν με την ταυτοποίηση παραγόντων ανάπτυξης, με έκπληξη τους διαπίστωσαν ότι είχαν όλοι απομονώσει την ίδια πρωτεΐνη, την οποία καθένας τους είχε ονομάσει με διαφορετικούς όρους. Έτσι, το μόριο που σήμερα ονομάζεται ιντερλευκίνη-6 (IL-6), αρχικά είχε αποδοθεί με όρους όπως ιντερφερόνη-β2, παράγοντας 26K, διεγερτικός παράγοντας II των β-λεμφοκυττάρων, αναπτυξιακός παράγοντας υβριδώματος, αναπτυξιακός παράγοντας πλασματοκυττώματος, διεγερτικός παράγοντας του ηπατοκυττάρου, αιμοποιητικός παράγοντας, και παράγοντας διαφοροποίησης των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Κάθε μία από τις παραπάνω ονομασίες αποκαλύπτει και μια διαφορετική λειτουργία της ίδιας πρωτεΐνης.⁹³

Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη που ρυθμίζει ποικιλία γεγονότων, όπως την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, την επιβίωση, αλλά και την απόπτωση κυττάρων. Η *IL-6* παίζει σημαντικό ρόλο κυρίως στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αιμοποίηση και τη φλεγμονή. Επιπλέον επιδρά σε μια πληθώρα συστημάτων, όπως το νευρικό, το ενδοκρινικό, στον οστικό μεταβολισμό, στους σκελετικούς μύες, καθώς και σε πολλά άλλα συστήματα και όργανα. Στον πλειοτροπισμό αυτόν οφείλεται η σύγχυση που επικράτησε κατά την

ανακάλυψη της *IL-6* και η αναφορά της από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες με διαφορετικές ονομασίες. Η ανίχνευση και δημιουργία των cDNA των παραγόντων αυτών, δηλαδή των μορίων DNA που προκύπτουν από ανάστροφη μεταγραφή του αγγελιαφόρου RNA (mRNA) και ως εκ τούτου περιέχουν μόνο τις μεταφραζόμενες περιοχές (εξόνια, exons) του αντίστοιχου γονιδίου, καθώς και η μεταξύ τους σύγκριση απέδειξε ότι πρόκειται για τον ίδιο παράγοντα. Ακολούθησε η απομόνωση του παράγοντα και από άλλες ερευνητικές ομάδες και τελικά το 1989 αποφασίστηκε να δοθεί στην πλειοτροπική αυτή πρωτεΐνη η κοινή ονομασία Ιντερλευκίνη-6 (*IL-6*).⁹³

1.5.1. Γονίδιο *IL-6*

Το γονίδιο της *IL-6* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7p21 του ανθρώπου και στο χρωμόσωμα 5 του ποντικίου (Εικόνα 7).⁹⁴ Τα γονίδια για τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί.⁹⁵ Κάθε γονίδιο περιέχει 4 ιντρόνια και 5 εξόνια. Μέσα στην κωδικοποιούμενη περιοχή, οι οριοθετήσεις των ιντρονίων/εξονίων, τα μήκη των εξονίων καθώς και οι θέσεις των αμινοξέων κυστεΐνης, διατηρούνται μεταξύ των ειδών. Διαφορές ανευρίσκονται στο 5' άκρο του πρώτου εξονίου και στο 3' άκρο του εξονίου 5, που βρίσκονται εκτός της κωδικοποιούμενης αλληλουχίας. Παρόμοια διατήρηση της γονιδιακής δομής μεταξύ των ειδών, έχει περιγραφεί και για τον παράγοντα G-CSF, ο οποίος εμφανίζει ομολογία αλληλουχίας με την *IL-6*.⁹⁶



Εικόνα 7: Θέση γονιδίου *IL-6* στο χρωμόσωμα 7⁹⁴

Ο μελετώμενος πολυμορφισμός προκύπτει από μία σημειακή νουκλεοτιδική παραλλαγή (SNP) μιας κυτοσίνης (C) με μια γουανίνη (G) στον υποκινητή της *IL-6* στη θέση 1800795. Αυτή η μεταλλαγή επηρεάζει τα επίπεδα της συντιθέμενης πρωτεΐνης.^{83,84}

1.5.2. Υποδοχείς της *IL-6*

Η *IL-6* είναι μια ισχυρή πλειοτροπική κυτοκίνη που μεσολαβεί με μια πληθώρα παθοφυσιολογικών ρόλων στις φλεγμονώδεις παθήσεις και παρέχει πολλαπλά σήματα σε διάφορους ιστούς και κύτταρα.⁹⁹ Αυτά τα σήματα μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (α) πρόκληση διαφοροποίησης ή έκφρασης συγκεκριμένου γονιδίου, όπως η πρόκληση Ig σε B κύτταρα ή η πρόκληση πρωτεϊνών οξείας φάσης σε ηπατοκύτταρα (β) διέγερση αύξησης κυττάρων, όπως η πρόκληση ανάπτυξης μυελώματος/πλασματοκυτώματος ή ανάπτυξη T κυττάρων, και (γ) αναστολή ανάπτυξης κυττάρων, όπως η αναστολή ανάπτυξης κυττάρων μυελοειδούς λευχαιμίας ή κυττάρων καρκίνου του μαστού. Ο μηχανισμός με τον οποίο μία μόνη κυτοκίνη

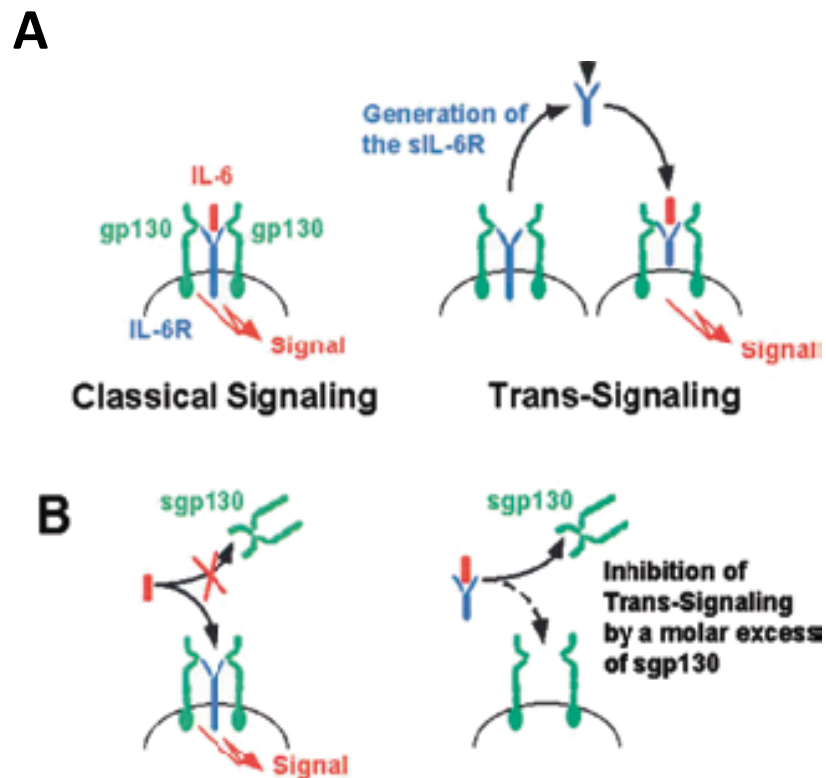
μπορεί να παρέχει πολλαπλά σήματα, αποκαλύπτεται με την γνώση της μοριακής δομής του συγκεκριμένου υποδοχέα. Ο αριθμός των υποδοχέων κυτοκίνης είναι συνήθως της τάξης του 10^2 ως 10^3 , που είναι 100 φορές λιγότερο από εκείνον για υποδοχείς ορμονών ή αυξητικών παραγόντων. Οι υποδοχείς εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα, όπως τα ενεργοποιημένα Β κύτταρα, τα αδρανή Τ κύτταρα, οι Β λεμφοβλαστοειδείς γραμμές κυττάρων, οι γραμμές κυττάρων μυελώματος, οι γραμμές ηπατώματος και οι γραμμές μονοκυττάρων.¹⁰⁰

Ο υποδοχέας αποτελείται από 468 αμινοξέα με ένα μόνο διαμεμβρανικό τμήμα. Το ενδοκυτταροπλασματικό τμήμα αποτελείται από 82 αμινοξέα και δεν έχει περιοχή τυροσινικής κινάσης. Ο υποδοχέας της *IL-6* έχει 5 πιθανές τοποθεσίες *N*-γλυκοζυλίωσης και το μοριακό βάρος (mol wt) της ώριμης πρωτεΐνης είναι 80 Kd.¹⁰⁰ Η *IL-6* ασκεί την δράση της μέσω δέσμευσης με δύο λειτουργικά διαφορετικές μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες της: τον προσδέτη που συνδέει τον υποδοχέα *IL-6* υποδοχέα-α (*IL-6Ra*) (γνωστό επίσης ως gp80), και τον υποδοχέα gp130 (130 kDa) που μεταβιβάζει το σήμα.⁹⁹ Οι δύο αυτοί υποδοχείς ανήκουν στις μεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I δηλ. περιέχουν μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα εξωκυττάριο αμινο-τελικό άκρο.⁹³ Σε αντίθεση, για την πανταχού παρούσα έκφραση του gp130 (καρδιά, ήπαρ, σκελετικοί μύες, σπλήνας, νεφροί, εγκέφαλος κ.ά.), η κυτταρική κατανομή του συγγενικού *αIL-6R* περιορίζεται στα ηπατοκύτταρα και κάποιους υποπληθυσμούς λευκοκυττάρων και ως εκ τούτου ο υποδοχέας *IL-6Ra* είναι που καθορίζει τα κύτταρα-στόχους της *IL-6*.⁹³

Αφού η *IL-6* συνδεθεί συγκεκριμένα στον *IL-6Ra*, το σύμπλεγμα *IL-6-IL-6Ra* στρατολογεί τον υποδοχέα σημάτων gp130, ο οποίος ξεκινά την περαιτέρω σηματοδότηση μέσω φωσφορυλίωσης και πυρηνικής μετατόπισης του αισθητηρίου σημάτων και του ενεργοποιητή 3 (STAT3) για να επιτραπούν τα επακολουθούντα κυτταρικά συμβάντα. Μολονότι ο gp130 εκδηλώνεται παντού στην κυτταρική μεμβράνη, η έκλυση της συνδεδεμένης με την μεμβράνη μορφής του *IL-6Ra* (*mIL-6Ra*) είναι πιο περιορισμένη και αυστηρά ρυθμισμένη, αφήνοντας έτσι πολλούς τύπους κυττάρων χωρίς την ικανότητα να αποκριθούν στην *IL-6* μέσω του κλασικού συμπλέγματος *mIL-6Ra – gp130*. Εκτός από τον μεμβρανικό υποδοχέα *IL-6Ra* στον ορό του ανθρώπου έχει απομονωθεί και μία διαλυτή μορφή του συγγενούς *IL-6Ra* (*sIL-6Ra*, *soluble-6Ra*) και παρέχει στην *IL-6* έναν εναλλακτικό μηχανισμό μέσω του οποίου μπορεί να ενεργοποιήσει τον gp130 και έτσι να προκαλέσει σηματοδότηση σε τύπους κυττάρων που δεν μπορούν εγγενώς να αποκριθούν στην *IL-6*. Αυτός ο εναλλακτικός μηχανισμός, που ονομάζεται *IL-6 trans-σηματοδότηση*, μπορεί να αποδειχθεί κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών, επειδή ο *sIL-6Ra* έχει παρουσιαστεί να είναι αυξημένος στο βρογχικό άσθμα και σε άλλες φλεγμονώδεις παθήσεις.⁹⁹

Η μορφή αυτή του υποδοχέα προσδένεται στην *IL-6* με συγγένεια παρόμοια με τον μεμβρανικό υποδοχέα (0,5-2 nM) και παρατείνει τον χρόνο ημίσειας ζωής της *IL-6*.^{101,102,103} Το σημαντικότερο όμως είναι ότι το σύμπλεγμα *sIL-6Ra/IL-6* είναι σε θέση να ενεργοποιήσει κύτταρα που εκφράζουν μόνο τον μεμβρανικό υποδοχέα gp130.¹⁰⁴ Έτσι το σύμπλεγμα αυτό λειτουργεί ως αγωνιστής σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες ενώ εκφράζουν τον gp130 δεν θα μπορούσαν από μόνες τους να διεγερθούν

από την *IL-6*. Αυτό αποτελεί μία σπάνια περίπτωση, αφού συνήθως οι διαλυτές μορφές των υποδοχέων των κυτοκινών λειτουργούν ως ανταγωνιστές εμποδίζοντας την πρόσδεση της κυτοκίνης στους μεμβρανικούς υποδοχείς. Η παραγωγή του sIL-6Ra φαίνεται ότι γίνεται από κύτταρα που εκφράζουν και τον μεμβρανικό υποδοχέα μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών και μέσω εναλλακτικού ματίσματος του mRNA (splicing).¹⁰⁵ Το σύμπλεγμα sIL-6Ra/IL-6 εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση και στην ενεργοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών. Ωστόσο η δράση του συμπλέγματος δεν είναι τόσο απλή, αφού στον ανθρώπινο ορό υπάρχει και ο υποδοχέας gp130 σε διαλυτή μορφή (soluble, sgp130), ο οποίος ενώνεται με το σύμπλεγμα sIL-6Ra/IL-6, αλλά όχι με την ελεύθερη *IL-6* και εμποδίζει τη δράση του. Έτσι ο συνδυασμός των sIL-6Ra και sgp130 ίσως να δρα ως ρυθμιστής των συστηματικών επιδράσεων της κυκλοφορούσας *IL-6*.¹⁰⁶ Σχηματικά η σηματοδότηση απεικονίζεται στην Εικόνα 8.¹⁰³



Εικόνα 8: *IL-6R trans-Signaling* και η αναστολή της από τη διαλυτή μορφή του υποδοχέα gp130 (sgp130)

(A) Classical signaling: Η *IL-6* (κόκκινο) προσδένεται στον μεμβρανικό υποδοχέα *IL-6R* (γαλάζιο). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο *IL-6/IL-6R* προσδένεται στον υποδοχέα *gp130* (πράσινο), προκαλώντας τον σχηματισμό δραστικού εξαμερούς. Trans-signaling: Μετά τη δημιουργία του διαλυτού υποδοχέα sIL-6Ra (γαλάζιο), η *IL-6* συνδέεται με τον sIL-6Ra και το σύμπλοκο *IL-6/sIL-6Ra* προσδένεται στον υποδοχέα *gp130* κυττάρων που δεν παράγουν *IL-6Ra* και προκαλεί τη διέγερσή τους. (B) Η *IL-6* δεν προσδένεται από μόνη της στον υποδοχέα *sgp130*. Ως εκ τούτου, ο *sgp130* δεν μπορεί να αναστείλει την κλασική οδό. Ωστόσο το σύμπλοκο της *IL-6* με τον sIL-6Ra προσδένεται με ανάλογη συγγένεια τόσο στον μεμβρανικό, όσο και στον διαλυτό υποδοχέα *sgp130*. Έτσι ο *sgp130* μπορεί να αναστείλει τη δράση του συμπλόκου *IL-6/sIL-6Ra*, αφού εμποδίζει την πρόσδεση του στον μεμβρανικό υποδοχέα *gp130*.¹⁰³

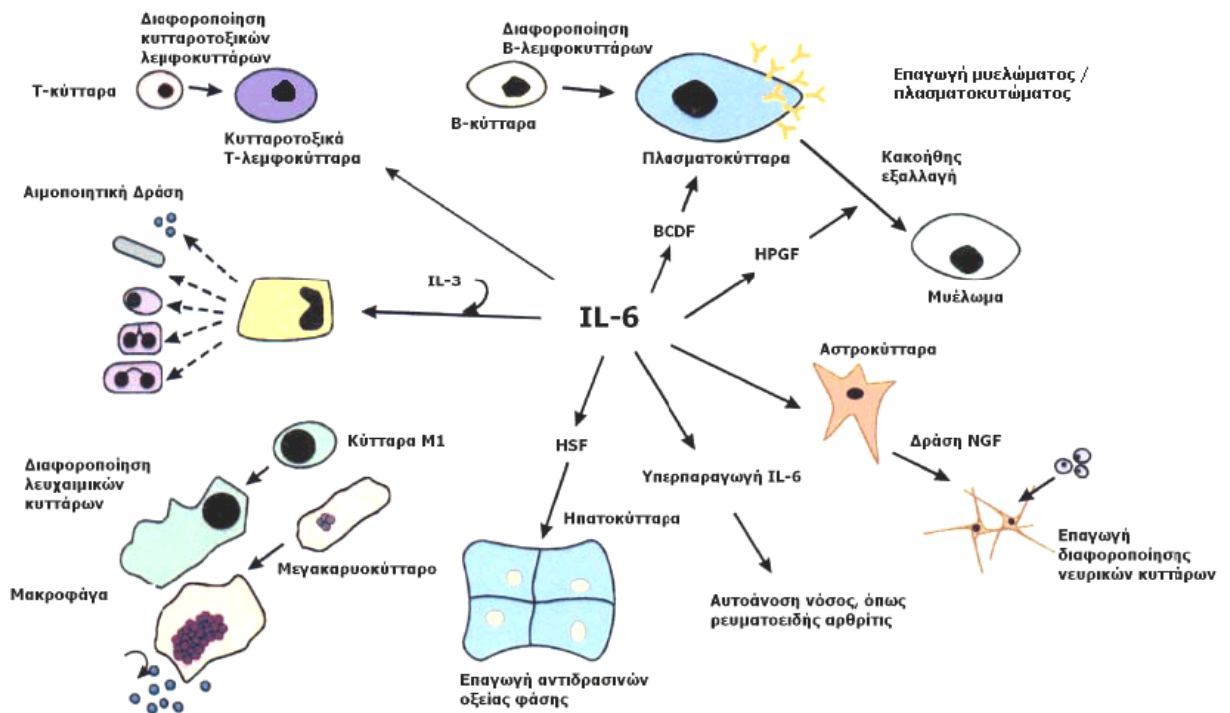
1.5.3. Βιολογικές επιδράσεις IL-6

Σε αντίθεση με τις κλασσικές ορμόνες, οι κυτοκίνες παράγονται τοπικά από ποικίλα κύτταρα, δρουν τοπικά, και απαντούν στην κυκλοφορία σε ελάχιστες συγκεντρώσεις. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η τοπική παραγωγή τους είναι ένας οικονομικός τρόπος για τον οργανισμό, να χρησιμοποιεί την ίδια κυτοκίνη για να επιτυγχάνει διαφορετικές δράσεις. Η *IL-6* έχει πολυάριθμες και σύνθετες βιολογικές επιδράσεις και δρα σε πολλά κύτταρα και ιστούς. Εκτός από τους ρόλους της στο καρδιαγγειακό σύστημα και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, η παρουσία παντού της *IL-6* είναι εκπληκτική. Η *IL-6* είναι μια πρωτεΐνη του ανοσοποιητικού συστήματος που ανήκει στην οικογένεια των κυτταροκινών και εμφανίζει ευρεία ποικιλία βιολογικών λειτουργιών. Ρυθμίζει τις χυμικές και κυτταρικές αποκρίσεις και παίζει κεντρικό ρόλο στην φλεγμονή και τους τραυματισμούς των ιστών.¹⁰⁷

Η *IL-6* είναι μείζων προφλεγμονώδης κυτοκίνη και είναι μικρή γλυκοπρωτεΐνη. Παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων (ινοβλάστες, αστροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα) και πολλούς ιστούς (π.χ. λιπώδης).^{108,109} Η *IL-6* μαζί με τον *TNF-α* και το *IL-1β* παραδοσιακά θεωρείται ως δείκτης της προοδευτικής φλεγμονής παρά ως μια ρυθμιστική κυτταροκίνη με δυνατότητα να ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση. Μπορεί να διαμορφώσει την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης αναστέλλοντας την ανάπτυξη T-ρυθμιστικών κυττάρων. Συνεπώς, η *IL-6* μπορεί να είναι ο παράγοντας κλειδί για τον καθορισμό του ισοζυγίου των CD4 T-κυττάρων στο να γίνουν ρυθμιστικά ή φλεγμονώδη κύτταρα.¹¹⁰

Η *IL-6* έχει ρυθμιστικά αποτελέσματα της αύξησης σε πολλά κύτταρα και συμμετέχει στην ενεργοποίηση, αύξηση και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Είναι ένας τερματικός διαφοροποιητικός παράγων για τα B κύτταρα και προκαλεί έκκριση ανοσοσφαιρίνης (IgG, IgA, IgM).²⁷ Παρόλο που μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή της *IL-6*, ένα κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα να προκαλούν κυτταρικό στρες ή βλάβη. Τα επίπεδα της *IL-6* στον ορό έχουν βρεθεί αυξημένα σε αρκετές φλεγμονώδεις παθήσεις. Σαν αποτέλεσμα αυτού, η *IL-6* θεωρείται ως γενικός δείκτης φλεγμονής μαζί με τον *TNF-α* και *IL-1β*. Παρόλα αυτά, γίνεται αντιληπτό ότι η *IL-6* στον ορό δεν είναι ένας απλός προφλεγμονώδης δείκτης, αλλά ένας ενεργός παράγοντας που συνεισφέρει στην παθογένεση συγκεκριμένων φλεγμονωδών νόσων ένας επιτυχής στόχος για κάποιες από αυτές τις παθήσεις.¹⁰⁸

Εκφράζοντας μια χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή, έχει αναφερθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της *IL-6* σχετίζονται απευθείας με την βαρύτητα της σηψαιμίας, την υπέρταση, την χαμηλή επιβίωση μεταξύ των ασθενών με καρκίνο στο κεφάλι και τον τράχηλο, την ανάπτυξη λευχαιμίας τριχωτών κυττάρων, τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, ένταση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, παχυσαρκία, αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη κλπ. (Εικόνα 9).¹¹¹



Εικόνα 9: Βιολογικές δράσεις IL-6¹¹¹

1.5.4. Δομή πρωτεΐνης IL-6

Η IL-6 προερχόμενη από διαφορετικά είδη οργανισμών εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες. Περιέχει στο αμινικό άκρο μια υδρόφοβη ακολουθία 24-28 αμινοξέων ενός οδηγού πεπτιδίου, το οποίο αποκόπτεται κατά την ωρίμανση του μορίου. Διαφορές στο μήκος του αποκοπτόμενου πεπτιδίου, δημιουργούν διαφορές έως δύο αμινοξέων στο αμινικό άκρο της πρωτεΐνης, μεταξύ των διαφόρων ειδών (οργανισμών). Η ομοιότητα που εμφανίζει η αλληλουχία της IL-6 μεταξύ των ειδών ποικίλει από 34% (σύγκριση του ποντικίου με την θαλάσσια ενυδρίδα), έως 97% (σύγκριση μεταξύ των πιθήκων mangabey και macaque). Αν για την σύγκριση χρησιμοποιηθεί η έννοια των παρόμοιων, και όχι των ταυτόσημων αμινοξέων, τότε τα ποσοστά ομοιότητας ανεβαίνουν σε 54% και 99% αντίστοιχα. Η ομοιότητες του μορίου IL-6 μεταξύ των διαφόρων ειδών είναι περισσότερο εμφανείς στην κεντρική περιοχή του μορίου (αμινοξέα 40-100), καθώς και στην περιοχή κοντά στο καρβοξυάκρο (αμινοξέα 165-184).¹⁰⁰

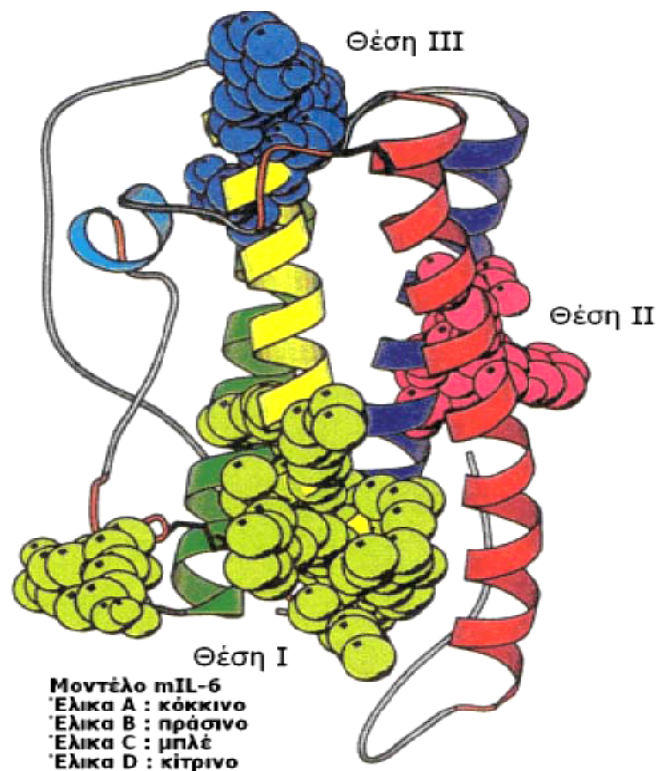
Η σύγκριση της ακολουθίας cDNA της ανθρώπινης *IL-6* με αυτή των ποντικών δείχνει μια ομολογία 65% στο επίπεδο του DNA και 42% στο επίπεδο των πρωτεϊνών. Η θέση των τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης είναι πλήρως συντηρημένη και εννέα κατάλοιπα αμινοξέων (αρ.56 ως 65) μεταξύ δύο κατάλοιπων κυστεΐνης (αρ.50 και 73) είναι ταυτόσημα, δείχνοντας ότι η πλούσια σε κυστεΐνη μεσαία περιοχή της ώριμης πρωτεΐνης μπορεί να παίζει κρίσιμο ρόλο στην δράση της *IL-6*. Πρόσφατα, ένα βιολογικά ενεργό ανασυνδυασμένο γονίδιο της *IL-6* συνετέθη χημικά στη βάση της ακολουθίας του cDNA της ανθρώπινης *IL-6*. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι μια ελεύθερη από κυστεΐνη, αποτέλεσμα βιομηχανικής r*IL-6* πρωτεΐνη ήταν ενεργή, δείχνοντας ότι η πρωταρχική ακολουθία της *IL-6* μπορεί να περιέχει τις πληροφορίες που είναι απαραίτητες για να διπλώσει η αλυσίδα πεπτιδίων σε ενεργή διαμόρφωση και μπορεί να μην απαιτούνται κατάλοιπα κυστεΐνης.¹⁰⁰

Η ανθρώπινη *IL-6* αποτελείται από 184 αμινοξέα με δύο πιθανά σημεία γλυκοζυλίωσης και τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης με μοριακό βάρος από 21 kDa έως 28 kDa. στην πλήρως γλυκοζυλιωμένη μορφή της (N- και O- γλυκοζυλίωση).¹¹²

Το μόριο της *IL-6* περιέχει 4 αμινοξέα κυστεΐνης, που αποτελούν τις θέσεις για την ανάπτυξη δισουλφιδικών δεσμών.¹¹³ Ο θέση των αμινοξέων κυστεΐνης και των δισουλφιδικών δεσμών διατηρούνται κατά εντυπωσιακό τρόπο μεταξύ των ειδών (άνθρωπος, αρουραίος, ποντίκι, αιλουροειδή, κύνες, χοίροι, πίθηκος, φώκια, ενυδρίς, βοοειδή, πρόβατα, μινκ). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί χρησιμεύουν για την δομική σταθερότητα των θέσεων σύνδεσης με τον υποδοχέα μάλλον, παρά για την στερεοτακτική διαμόρφωση του συνολικού μορίου. Αντικατάσταση των τεσσάρων αμινοξέων κυστεΐνης με διαφορετικά αμινοξέα, οδηγεί σε ελάττωση της βιολογικής δραστηριότητας σε λιγότερο από το 1%, όταν αυτή εξεταστεί σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.¹¹⁴ Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει και η χημική αναγωγή και αλκυλίωση των δισουλφιδικών δεσμών.¹¹⁵

Η ανθρώπινη *IL-6* (h*IL-6*), περιέχει μια μοναδική τρυπτοφάνη στη θέση 157, θέση που διατηρείται μεταξύ των ειδών. Η θέση αυτή βρίσκεται κοντά σε σημείο σύνδεσης με τον υποδοχέα (θέση III). Οι πέντε βάσεις μεθειονίνης του μορίου εμφανίζουν διαφορετική επιδεκτικότητα σε οξειδωση, η οποία κατά σειρά είναι: Met 49, Met 117, Met 184, Met 161.⁴⁶ Η Met 67 είναι ανθεκτική σε οξειδωση. Από τις τρεις βάσεις τυροσίνης, μόνο η Tyr 31 ιωδιώνεται με ευκολία, πράγμα που δεν επηρεάζει την σύνδεση με τον υποδοχέα.¹¹⁶

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X έδειξε πως η *IL-6* αποτελείται από μία δέσμη τεσσάρων α -ελικών (A,BC,D,) (Εικόνα 10) οι οποίες σχηματίζουν δύο ζεύγη αντιπαράλληλων α -ελικών. Η δομή αυτή είναι διαδεδομένη στην οικογένεια των κυτοκινών, ενώ με βάση το μήκος των α -ελικών, η *IL-6* ανήκει στην οικογένεια των "long-chain" κυτοκινών που περιέχει επιπλέον την αυξητική ορμόνη (GH), την ερυθροποιητίνη και τον παράγοντα G-CSF19. Για τη σύνδεση της *IL-6* με τους υποδοχείς της, μελέτες μεταλλαξιγένεσης έχουν αναδείξει τρεις σημαντικές περιοχές του μορίου της.⁹³ Σε σχέση με την πορεία της A έλικας (N- προς C-τελικό άκρο), η B έλικα κινείται παράλληλα, ενώ οι C και D έλικες αντιπαράλληλα.¹¹⁷



Εικόνα 10: Τριτοταγής δομή της IL-6

Παρουσιάζονται οι τέσσερις α-έλικες (χρωματισμένες) που σχηματίζουν το μόριο της IL-6 και οι βρόγχοι σύνδεσης (γκρι) των α-ελικών. Σημειώνονται επίσης οι περιοχές σύνδεσης της IL-6 με τους υποδοχείς της που συμβολίζονται ως site I, II και III.⁹³

1.5.5. Ρόλος IL-6 στο άσθμα

Οι κυταροκίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια που επιδρούν σε μία ποικιλία κυττάρων και εμπλέκονται στη φυσιολογία πολλών οργάνων μεταξύ των οποίων και του πνεύμονα.⁹³ Η IL-6 είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη της οποίας ο ρόλος στο άσθμα παραμένει ασαφής παρόλο που έχει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό άμυνας.²⁷

Ασθενείς με σταθερό άσθμα παρουσιάζουν αύξηση στην κυκλοφορούσα IL-6 και τα επίπεδά της είναι αυξημένα σε μεγαλύτερο βαθμό στη διάρκεια της ασθματικής κρίσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φλεγμονή του αεραγωγού που προκαλείται από την εισπνοή αντιγόνου, θα μπορούσε παρομοίως να αυξήσει τα κυκλοφορούντα επίπεδα της IL-6. Μια αυξημένη έκφραση του γονιδίου της IL-6 και της πρωτεΐνης παρουσιάστηκε στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα ασθματικών ασθενών. Μαστοκύτταρα και ηωσινόφιλα, που είναι αυξημένα στους ασθματικούς αεραγωγούς, αναφέρεται ότι απελευθερώνουν IL-6. Επίσης, υπάρχει αυξημένη απελευθέρωση IL-6 από κυψελιδικά μακροφάγα ασθματικών ασθενών μετά από δοκιμασία αλλεργιογόνων και αυξημένη βασική απελευθέρωση σε σύγκριση με μη ασθματικούς

ασθενείς. Η εξαρτημένη από την IgE ενεργοποίηση διεγείρει την έκκριση της IL-6 τόσο σε μονοκύτταρα του αίματος όσο και σε κυψελιδικά μακροφάγα *in vitro*.²⁷

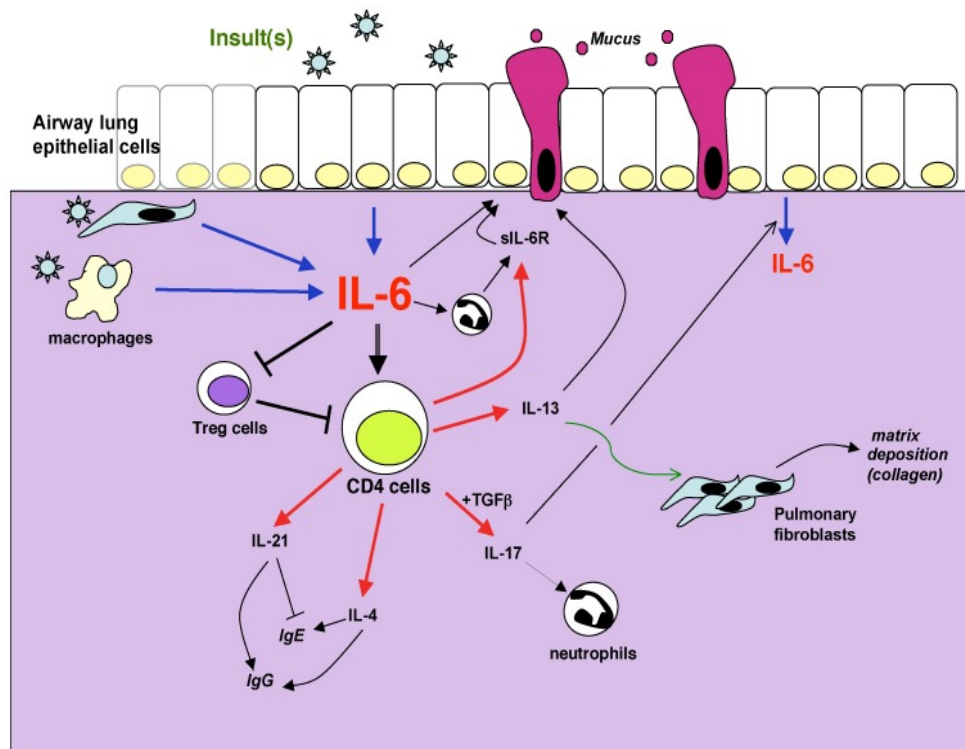
Παρόλο που έχει βρεθεί ότι τα μακροφάγα των κυψελίδων και τα επιθηλιακά κύτταρα ασθματικών ασθενών παράγουν υψηλές ποσότητες, ο γονότυπος -174GG φαίνεται να είναι προστατευτικός για το βρογχικό άσθμα. Επίσης, οι γονότυποι GG και GC του γονιδίου *IL-6* στη θέση-174 σχετίζονται με υψηλή παραγωγή της κυτοκίνης ενώ ο γονότυπος CC σχετίζεται με χαμηλή παραγωγή.⁵³ Η *IL-6* φαίνεται πως επιδρά στους λείους μύες των αεραγωγών και συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών στο άσθμα. *In vitro* μελέτες φανέρωσαν πως αν και οι λείοι μύες των αεραγωγών δεν εκφράζουν τον μεμβρανικό υποδοχέα της *IL-6*, εντούτοις διεγείρονται από την *IL-6* παρουσία του διαλυτού υποδοχέα της, με μια διαδικασία που ονομάζεται *trans-activation*.⁹³

Η *IL-6* παρουσιάζει μια ποικιλία ανοσολογικών και προφλεγμονωδών αποτελεσμάτων. Μπορεί να ενεργοποιήσει τα T-κύτταρα καθώς και τα φυσικά NK (natural killers) κύτταρα, με μια τέτοιο τρόπο που είναι χαρακτηριστική των ασθματικών ασθενών. Η *IL-6* εμπλέκεται στη σύνθεση ανθρώπινου IgE που προκαλείται από την *IL-4*, αναστέλλει την ανάπτυξη ινοβλαστών και βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων. Μπορεί να προωθήσει απευθείας την επιβίωση των μαστοκυττάρων χωρίς την εμπλοκή αυτοκρινών παραγόντων. Η προεπάση των μαστοκυττάρων με *IL-6* μπορεί να ρυθμίσει σημαντικά προς τα πάνω την μεσολαβούμενη από το IgE απελευθέρωση ισταμίνης. Εντούτοις, η ειδικά από επιθηλιακά κύτταρα έκφραση της *IL-6* σε διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί σε φλεγμονή του αεραγωγού και σε μείωση στην βρογχική αντιδραστικότητα στη μεταχολίνη, δείχνοντας ότι η παραγωγή *IL-6* μπορεί να έχει ευεργετικό αποτέλεσμα στο βρογχικό άσθμα. Τέτοιες παρατηρήσεις δείχνουν τη συμμετοχή της *IL-6* στη παθοφυσιολογία του βρογχικού άσθματος. Η *IL-6* δρα μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων που αποτελούνται από την δεσμευτική γλυκοπρωτεΐνη gp80 και τον μεταβιβαστή σήματος gp130. Ο διαλυτός υποδοχέας *IL-6* (sIL-6R, sCD126) είναι φτιαγμένος από gp80 και αποβάλλεται ως ένα μόριο 52-kD στα ανθρώπινα ούρα. Αντίθετα με άλλους διαλυτούς υποδοχείς, η διαλυτή μορφή των μελών της οικογένειας υποδοχέων όπως η *IL-6*, ο ακτινωτός νευροτροφικός παράγων, ο παράγων αναστολής της λευχαιμίας, και η *IL-6* μπορούν να δράσουν ως αγωνιστές. Η διαλυτή *IL-6R* μπορεί να συνδεθεί στην *IL-6* Με τη σειρά του, αυτό το σύμπλεγμα μπορεί να συνδεθεί στην κυτταρική επιφάνεια gp130 για την μεταγωγή του σήματος της *IL-6*. Μια σταθερά ανεβασμένη συγκέντρωση ορού *IL-6* μπορεί να ρυθμίσει προς τα κάτω το gp80 και να κάνει τα κύτταρα να μην ανταποκρίνονται στην *IL-6*. Μια τέτοια ανθεκτική κατάσταση ξεπερνιέται *in vitro* από την προσθήκη sIL-6R. Ετσι, η sIL-6R θεωρείται σημαντική για τις αποκρίσεις που μεσολαβεί η *IL-6*.²⁷

Μία διασταυρωμένη μελέτη μεταξύ ασθματικών ασθενών έδειξε ότι τα επίπεδα της *IL-6* σε πτύελα σχετίζονται με μείωση της κεντρικής λειτουργίας των αεραγωγών. Σε παχύσαρκους ασθενείς, τα αυξημένα επίπεδα της *IL-6R* στον ορό σχετίζονται με μειωμένη πνευμονική λειτουργία. Όλες οι μελέτες υποδηλώνουν ότι η παρουσία της *IL-6* στους αεραγωγούς σχετίζονται με μειωμένη λειτουργία των πνευμόνων σε διαφορετικές υποομάδες ασθματικών ασθενών και υποδηλώνουν ότι η *IL-6* πιθανόν

να σχετίζεται άμεσα με την παθογένεση του άσθματος και με την προοδευτική απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας που παρατηρείται σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν αγωγή, επομένως η παρουσία της IL-6R στον πνεύμονα σχετίζεται με αλλαγή της λειτουργίας του. Άρα, *IL-6* είναι πιθανόν να αποτελεί στόχο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.¹⁰⁸

Η *IL-6* μπορεί επίσης να έχει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Αναστέλλει την έκφραση και απελευθέρωση της *IL-1* και του *TNF-α* από μακροφάγα in vitro και την προκαλούμενη από ενδοτοξίνη παραγωγή *TNF-α* και εισροή ουδετερόφιλων στους αεραγωγούς in vivo.²⁷ Παράγεται από φλεγμονώδη κύτταρα και από αρχικά επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα σε απόκριση ποικιλίας διεγερτών συμπεριλαμβανομένων αλλεργιογόνων, ιών του αναπνευστικού και άσκηση. Επιπρόσθετα, μία πρόσφατη μελέτη έχει δείξει υψηλά επίπεδα mRNA της *IL-6* σταθερά παρόντα σε αρχικά κύτταρα επιθηλίου επίμυων αλλά όχι σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται στον πνεύμονα. Η *IL-6* έχει αναδειχθεί σαν ένας σημαντικός ρυθμιστής των διεγερτών των CD4 T κυττάρων, προαγωγής της παραγωγής *IL-4* κυττάρων κατά την διαφοροποίηση των Th2 κυττάρων, αναστολής της διαφοροποίησης των Th1 κυττάρων και μαζί με την TGFβ, προαγωγής της διαφοροποίησης των Th17 κυττάρων. Αυτή η πλειοτροπική φύση αυτών των ανοσορυθμιστικών ρόλων υποδηλώνουν ότι η *IL-6* μπορεί να έχει ένα ρόλο συνεισφοράς στο άσθμα καθώς και σε άλλες πνευμονικές νόσους όπου το επιθήλια των πνευμόνων είναι κατεστραμμένα. Σχηματικά πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η *IL-6* μπορεί να συμβάλει στις ασθένειες των πνευμόνων απεικονίζονται στην Εικόνα 11.¹⁰⁸



Εικόνα 11: Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η IL-6 μπορεί να συμβάλει στις ασθένειες των πνευμόνων

Η IL-6 στον πνεύμονα μπορεί να παραχθεί από διάφορες πηγές, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, διάμεσοι ινοβλάστες, μακροφάγα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα. Η παραγωγή επάγεται σε απόκριση σε μία ποικιλία ερεθισμάτων, που ορίζονται ως εισβολές επειδή συχνά προκαλούν κυτταρικό στρες ή βλάβη. Αυτές περιλαμβάνουν αλλεργιογόνα, σωματική άσκηση, ιούς του αναπνευστικού, περιβαλλοντικά σωματίδια, εισπνεόμενα τοξικά σωματίδια. IL-6 μπορεί να ρυθμίσει τις διάφορες πτυχές της απάντησης με τη μεσολάβηση των CD4 T κυττάρων συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής κυτοκινών, την παραγωγή sIL-6R και την κατασταλτική δραστηριότητα. Αυτοί οι μεσολαβητές με τη σειρά τους συμβάλλουν στην καταστροφή του πνεύμονα μέσω των επιπτώσεών τους στην παραγωγή βλέννας, απελευθέρωση πρωτεασών από κοκκιοκύτταρα. Με την παρουσία του sIL-6R, η IL-6 μπορεί επίσης να ρυθμίζει διαφορετικές λειτουργικές πτυχές και των μη ανοσοκυττάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα.¹⁰⁸

Η IL-6 έχει καταγραφεί τόσο στην προ-, όσο και στην αντιφλεγμονώδη λειτουργία. Σωρευμένες ενδείξεις από μοντέλα σε ποντίκια για το άσθμα υποστηρίζουν τον ρόλο του sIL-6Ra στην καθοδήγηση της μετάβασης από τον ένα στον άλλο ρόλο. Υπό μη φλεγμονώδεις συνθήκες, η IL-6 ενισχύει την επιβίωση των T-ρυθμιστικών κυττάρων μέσω του mIL-6Ra. Ίσως αυτό να παρέχει μια εξήγηση για την μείωση της φλεγμονής όταν η IL-6 υπερεκλύεται διαγονιδιακά στους αεραγωγούς. Στο άσθμα, όπου υπάρχει αύξηση του sIL-6Ra, η IL-6 μπορεί να προκαλεί την επέκταση των προφλεγμονωδών (Th2) κυττάρων ως αναστολή του sIL-6Ra (χρησιμοποιώντας μια πρωτεΐνη σύντηξης gp130Fc) μειωμένα CD4+Th2 κύτταρα στον πνεύμονα ποντικών. Επομένως, η

αλληλεπίδραση της *IL-6* με διαφορετικά συστατικά των υποδοχέων ελέγχει την ισορροπία μεταξύ των T-ρυθμιστικών και των Th2 τελεστών κυττάρων, δείχνοντας ότι η διαμόρφωση της trans-σηματοδότησης *IL-6* μπορεί να είναι μια νέα μοριακή προσέγγιση για την αντιμετώπιση του αλλεργικού άσθματος. Η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών θεωρείται συνέπεια της μακροχρόνιας φλεγμονής που δημιουργείται από πολλαπλά επεισόδια αλλεργικού άσθματος.⁹⁹

1.5.6. Ρόλος *IL-6* στον ΣΔτ2

Είναι πια γνωστό ότι η παραγωγή *IL-6* από τον λιπώδη ιστό ενισχύεται στην παχυσαρκία. Πιστεύεται ότι 15 ως 30% των κυκλοφορούντων επιπέδων προέρχεται από παραγωγή λιπώδους ιστού με απουσία οξείας φλεγμονής. Εντούτοις, στον λιπώδη ιστό, η μεγαλύτερη αναλογία *IL-6* δεν παράγεται από ώριμα λιποκύτταρα αλλά μάλλον από κύτταρα στο κλάσμα αγγειακού στρώματος, περιλαμβάνοντας προλιποκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα.²⁷ Η *IL-6* παράγεται από πολλούς ιστούς, μεταξύ αυτών και τον λιπώδη^{108,109}

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η *IL-6* μπορεί να εμπλέκεται στην αντίσταση στην ινσουλίνη και τις επιπλοκές της. Όποιοι κι αν είναι οι μηχανισμοί που συμμετέχουν, οι κυτοκίνες σαν τον *TNF-α* και την *IL-6* μπορούν να μειώσουν την δράση της ινσουλίνης. Επομένως, εκτός από την όξυνση του καρδιαγγειακού κινδύνου που συνδέεται με την φλεγμονή, η χρόνια αύξηση στα επίπεδα της κυκλοφορούσας κυτοκίνης μπορεί να συμβάλλει στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Πριν από έναν αιώνα, προτάθηκε ότι η φλεγμονή μπορεί να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία του ΣΔ2. Παρόλο που οι μοριακοί μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί, έχει προταθεί ότι όχι μόνο οι προ-φλεγμονώδεις δράσεις των κυτοκινών αλλά και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στην παχυσαρκία μεσολαβούνται μέσω συγκεκριμένων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, που μπορούν να αλληλεπιδρούν με την ινσουλίνη μέσω ανασταλτικής φωσφοριλίωσης σερίνης/θρεονίνης. Γενετικοί ή φαρμακολογικοί χειρισμοί αυτών των διαφορετικών μορίων της φλεγμονώδους απόκρισης ρυθμίζουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε διαφορετικά μοντέλα ζώων. Η εμπλοκή φλεγμονωδών μονοπατιών υποδηλώνεται από την προστατευτική δράση αντιφλεγμονωδών παραγόντων εναντίον της αντίστασης στην ινσουλίνη που συνδέεται με την παχυσαρκία.⁴⁰

Επιπροσθέτως, η *IL-6* φαίνεται να ενσαρκώνει έναν αρνητικό ρόλο και στους δύο κύριους τύπους διαβήτη. Μετά τη ρύθμιση ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, τον δείκτη μάζας σώματος, την αναλογία μέσης-προς-γοφό (WHR), τον αθλητισμό, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ και άλλες μεταβλητές, η *IL-6* αναδεικνύεται ως ανεξάρτητος πρώιμος δείκτης του ΣΔτ2 πριν από της κλινική του έναρξη. Οι νεαροί ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1-ακόμα και με καλό γλυκαιμικό έλεγχο παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα *IL-6* και ινωδογόνου από μάρτυρες.¹¹¹

Εκτός από την γλυκαγόνη, η *ghIL-6* έχει δείξει να διεγείρει τις άλλες κύριες αντιρυθμιστικές της γλυκόζης ορμόνες (κορτιζόλη, GH, και κατεχολαμίνες). In vitro δεδομένα έχουν δείξει ότι η *IL-6* μπορεί επίσης να έχει απευθείας διεγερτική επίδραση στην απελευθέρωση ηπατικής γλυκόζης από δεξαμενές γλυκογόνου

αναστέλλοντας την συνθάση γλυκογόνου. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός για τα αποτελέσματα της *IL-6* στον μεταβολισμό της γλυκόζης μπορεί να είναι μέσω πρόκλησης περιφερειακής αντίστασης στην ινσουλίνη. Αυτή θα μπορούσε εν μέρει να μεσολαβείται από τις προκαλούμενες από την *IL-6* αυξήσεις σε συγκεντρώσεις κορτιζόλης, GH, και κατεχολαμίνης, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί μια ευθεία επίδραση της *IL-6* στον καταρράκτη σήματος ινσουλίνης σε ιστούς στόχους, όπως συμβαίνει στην προκαλούμενη από τον TNF- α αντίσταση στην ινσουλίνη.¹¹⁸

1.5.7. *IL-6*, παχυσαρκία και λιπώδης ιστός

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο των μέτρων αρτηριοφλεβικής διαφοράς σε ένα στρώμα υποδόριου λιπώδους ιστού και εκτιμήσεις με ράδιο-ξένο για την ροή αίματος στον λιπώδη ιστό, έχει παρουσιαστεί *in vivo* η καθαρή παραγωγή *IL-6* από τον ανθρώπινο υποδόριο λιπώδη ιστό. Σε υγιείς άνδρες και γυναίκες η παραγωγή *IL-6*, καθώς και οι συστηματικές συγκεντρώσεις, αυξάνονται με το πάχος και περίπου ένα τρίτο των συνολικών συγκεντρώσεων *IL-6* στην κυκλοφορία προέρχονται από λιπώδη ιστό. Η *IL-6*, όπως ο TNF- α , εκφράζεται στο λιπώδη ιστό με τις *in vitro* μελέτες να δείχνουν μια μεγαλύτερη συμβολή από κοιλιακό παρά από υποδόριο λίπος. Δεν είναι ακόμη σαφές αν το ώριμο λιποκύτταρο, το προλιποκύτταρο ή τα κύτταρα αγγειακού στρώματος στον λιπώδη ιστό αντιπροσωπεύουν την βασική κυτταρική πηγή της *IL-6*

119

1.5.8. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική, ανταγωνιστές της *IL-6*

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανόηση του ρόλου των διαλυτών υποδοχέων κυτοκίνης στην υγεία και τις ασθένειες, για να εξερευνηθεί η χρήση τους ως νέων θεραπευτικών στόχων στην φλεγμονή. Οι συνδεδεμένοι με την μεμβράνη και οι διαλυτοί υποδοχείς συνδέουν τους προσδέτες τους με παρόμοια σχέση. Ενώ οι περισσότεροι διαλυτοί υποδοχείς ανταγωνίζονται με τους αντίστοιχούς τους συνδεδεμένους με την μεμβράνη για τον προσδέτη κυτοκίνης, ούτως ώστε να λειτουργήσουν σαν ανταγωνιστές, ορισμένοι διαλυτοί υποδοχείς (όπως ο sIL-6Ra) μπορούν να δρουν ως αγωνιστές. Με την *IL-6*, ο sIL-6Ra σχηματίζει ένα αγωνιστικό σύμπλεγμα που συνδέει κύτταρα που δεν εκλύουν τον mIL-6Ra, μέσω του πανταχού παρόντος gp130. Μέσα από αυτή την διαδικασία, που ονομάζεται *IL-6 IL-6 trans-σηματοδότηση*, παρουσιάζεται η ενδοκυτταρική STAT3 σηματοδότηση σε κύτταρα που συνήθως δεν ανταποκρίνονται.⁹⁹

Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να ανταγωνιστεί κανείς τη δράση της *IL-6* στα κύτταρα στόχους *in vitro*.⁶⁴ Ουσίες που δεσμεύουν την gp130, όπως η ογκοστατίνη M (OSM), τα εξουδετερωτικά αντισώματα ενάντια στην gp130, καθώς επίσης και η διαλυτή μορφή sgp130, αποτελούν μη ειδικούς τρόπους, δεδομένου ότι παρεμβαίνουν στη δραστηριότητα και άλλων μελών της οικογένειας των κυτοκινών. Η ακτιβίνη A αποτελεί ανταγωνιστή της *IL-6* και της *IL-11* που δρα στην ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος μετά από την ενεργοποίηση της gp130. Στους ειδικούς ανταγωνιστές περιλαμβάνονται εξουδετερωτικά μονοκλωνικά αντισώματα της *IL-6*,

antisense ολιγονουκλεοτίδια του mRNA της *IL-6*, εξουδετερωτικά αντισώματα του *IL-6R*, μεταλλαγμένες μορφές του *IL-6R* οι οποίες συνδέονται με την *IL-6*, αλλά δεν μπορούν να συνδεθούν με την *gp130*, καθώς επίσης και μεταλλαγμένη στις περιοχές II ή III *IL-6*. Ο υπερανταγωνιστής Sant7 αποτελεί μεταλλαγμένη μορφή της *IL-6*, στην οποία μεταλλάξεις τόσο στην θέση II, όσο και στην θέση III εμποδίζουν τη σύνδεση με την *gp130*, ενώ πρόσθετη μετάλλαξη στη θέση I αυξάνει κατά πολύ τη συγγένεια με τον *IL-6R*.⁹⁹

Η ιδέα ότι η *IL-6* είναι ένας βλαπτικός παράγων έχει αναπτυχθεί κυρίως στην βάση στατιστικών συσχετισμών σε κλινικές μελέτες, *in vitro* κυτταρικές μελέτες σε άνω του φυσιολογικού επίπεδα *IL-6* και ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούν ποντίκια. Πολλά σημαντικά σημεία πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν γίνεται έρευνα πάνω στις ιντερλευκίνες: 1) τα αυξημένα επίπεδα μιας δεδομένης *IL*, παρουσιάζοντας στατιστικό συσχετισμό με τη νόσο, δεν σημαίνουν αναγκαστικά αιτιότητα, 2) αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται από ουσιαστικό πλεονασμό, με την έννοια ότι οι διάφορες ιντερλευκίνες έχουν παρόμοιες και αλληλοκαλυπτόμενες λειτουργίες, 3) οι ιντερλευκίνες μπορεί να διεγείρουν την έκκριση άλλων ιντερλευκινών, ενισχύοντας ή αναστέλλοντας η μία την άλλη, 4) οι ιντερλευκίνες κατέχουν “παράδοξες” επιδράσεις, εκφραζόμενες ως προστατευτικές ιδιότητες όσον αφορά ένα δεδομένο σύστημα, ενώ μπορεί να κάνουν ζημιά σε ένα άλλο σύστημα, και 5) οι προστατευτικές ή βλαπτικές επιδράσεις μιας δεδομένης ιντερλευκίνης μπορεί να εξαρτώνται από την συγκέντρωση.¹¹¹

Αυτοί οι γενικοί κανόνες αφορούν επίσης συγκεκριμένα την *IL-6*. Έτσι, οι μελέτες που “κατηγορούν” την *IL-6* βασιζόμενες σε στατιστικές αναλύσεις ή καλλιέργειες κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις *IL-6*, θα μπορούσαν να είναι μερικώς προκατειλημμένες από τα αναφερθέντα εγγενή εμπόδια. Όσον αφορά τις μελέτες σε ποντίκια, θα έπρεπε να τονιστεί ότι η συγκριτική γονιδιωματική έρευνα έδειξε ότι η *IL-6* στο ποντίκι και τον άνθρωπο έχουν κοινή μόνο το 42% της ταυτότητας των αμινοξέων. Επομένως, σε αυτή την συγκεκριμένη περίπτωση, η προέκταση των ευρημάτων από ποντίκια σε ανθρώπους απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.¹¹¹

Σε πρόσφατα χρόνια, το tocilizumab, ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντισώμα κατά των υποδοχέων της *IL-6*, αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας. Οι κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν γαστρεντερικά, ρινοφαρυγγικά, και λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού. Αναφέρθηκαν επίσης πιο σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (αναφυλακτοειδής αντίδραση, γαστρεντερική αιμορραγία). Αυτά τα συμβάντα σχετίζονται πιθανόν με αναστολή στον υποδοχέα *IL-6*.¹² Η πρωτεΐνη σύντηξης *gp130Fc* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντιφλεγμονώδης θεραπεία για να ουδετεροποιήσει την *sIL-6R* που είναι αυξημένη στη διάρκεια της φλεγμονής του αεραγωγού. Αυτό θα οδηγούσε σε βελτίωση των συμπτωμάτων φλεγμονής επειδή στοχεύει απευθείας στα πλήρως ανεπτυγμένα *Th2* κύτταρα στους αεραγωγούς.¹²¹

Έχει παρατηρηθεί ότι η κλιμακούμενη χορήγηση *rhIL-6* προκαλεί εξαρτημένες από τη δόση αυξήσεις στις συγκεντρώσεις *IL-6* στο πλάσμα. Οι σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι σύντομες μέτριες αυξήσεις της θερμοκρασίας, δυσφορία και περιστασιακός πονοκέφαλος.¹¹⁸

1.6. SERINE PEPTIDASE INHIBITOR KAZAL TYPE 5 (SPINK5) rs2303067

Η πλήρης ονομασία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SPINK5* είναι Serine Peptidase Inhibitor, Kazal type 5.^{122,123} Η *SPINK5* είναι μία πρωτεΐνη που αναστέλλει την πεπτιδάση της σερίνης και εκφράζεται κυρίως στον επιθηλιακό ιστό. Σταματάει, αποτρέπει ή μειώνει τη δραστηριότητα των ενδοπεπτιδασών του τύπου της σερίνης, ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών σε ολιγοπεπτίδια ή πολυπεπτίδια. Αυτή η αναστολή διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αντιφλεγμονώδη προστασία του επιθηλίου στους βλεννογόνους.¹²⁴ Το άσθμα χαρακτηρίζεται από IgE-διαμεσολαβούμενες απαντήσεις σε κοινά αλλεργιογόνα πολλά από τα οποία είναι πεπτιδάσες. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SPINK5*, η λεκτίνη (LEKT1), είναι αναστολέας πρωτεάσης σερίνης και έχει επανειλημμένα συνδεθεί με την παθογένεση του άσθματος.¹²⁵

Λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων της και τον εντοπισμό του γονιδίου, ένας αριθμός από μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση για τις ενώσεις μεταξύ των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *SPINK5* και του άσθματος. Μολονότι πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει το ρόλο των γενετικών παραλλαγών που ανήκουν στο γονίδιο *SPINK5*, ο λειτουργικός ρόλος της πρωτεΐνης λεκτίνης στο άσθμα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.¹²⁶

1.6.1. Γονίδιο *SPINK5*

Το γονίδιο *SPINK5* ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που ονομάζονται *SPINK* (πεπτιδάση σερίνης, αναστολείς τύπου Kazal) και είναι αναστολείς πρωτεΐνάσης σερίνης.¹²⁷ Μια οικογένεια γονιδίων είναι μια ομάδα γονιδίων που μοιράζονται σημαντικά χαρακτηριστικά. Ταξινόμηση μεμονωμένων γονιδίων σε οικογένειες βοηθά τους ερευνητές να περιγράφουν πώς τα γονίδια σχετίζονται μεταξύ τους. Τουλάχιστον 70 *SPINK5* γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί σε άτομα με άσθμα, σύνδρομο Netherton, και έκζεμα.¹²⁸

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *SPINK5* έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανώμαλης ενεργοποίησης (υπερευαισθησία) του ανοσοποιητικού συστήματος (ατοπία) που οδηγεί σε διαταραχές όπως οι αλλεργίες, έκζεμα και το άσθμα. Παραλλαγές του γονιδίου *SPINK5* μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα του να ελέγχει πεπτιδάσες LEKT1 που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο αυτών των διαταραχών.¹²⁸

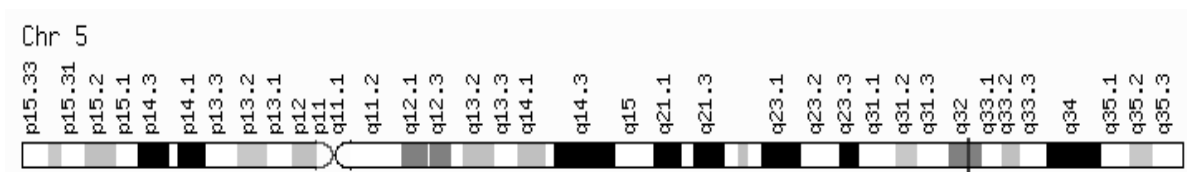
Το *SPINK5* είναι μέλος μιας οικογένειας γονιδίου που βρίσκεται στο μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στη θέση 5q31-q32. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *SPINK5* βρίσκεται από το ζεύγος βάσεων 148 063 971 έως το 148 137 361 στο χρωμόσωμα 5. Το γονίδιο *SPINK5* έχει μήκος 61 kb και περιέχει 33 εξόνια.¹²⁹

Στην παρούσα μελέτη μελετάται ο πολυμορφισμός rs2303067. Πρόκειται για έναν σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (SNP) όπου στη νουκλεοτιδική αλληλουχία γίνεται αντικατάσταση G1258A. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της αλληλουχίας της πολυπεπτιδικής αλυσίδας καθώς το αμινοξύ γλουταμίνη στη θέση

420 μετατρέπεται σε λυσίνη (Glu420Lys) και μειώνεται η έκφραση *SPINK5* και ως εκ τούτου ενδεχομένως διαταράσσεται η ανοσοκατασταλτική λειτουργία της LEKT1. Συνεπώς, όταν δεν εκφράζεται *SPINK5*, δεν υπάρχει LEKT1 άρα δεν υπάρχει αντιφλεγμονώδης προστασία.^{130,131}

Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *SPINK5* έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό τριών διαφορετικών γονιδιακών προϊόντων που έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα.¹³² Έχουν εντοπισθεί 32 SNP στο εξώνιο 6 του γονιδίου με συνέπεια την απώλεια δραστηριότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης και την αδυναμία να επιφέρει τη φυσιολογική της δράση στον οργανισμό. Έχει αποδειχθεί σύνδεση μεταξύ του SNP G1258A (Glu420Lys) και ατοπίας, ατοπικής δερματίτιδας και αυξημένα επίπεδα IgE στον ορό και άσθμα. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες όπου αυτό δεν έχει καταδειχθεί.^{124,126,128,133,134,135,136}

Το φυσικό αλληλόμορφο είναι η γουανίνη (G) και το μεταλλαγμένο είναι η αδενίνη (A) που είναι το αλληλόμορφο κινδύνου.^{137, 138} Η θέση γονιδίου *SPINK5* στο χρωμόσωμα 5 απεικονίζεται στην Εικόνα 12.¹³⁹



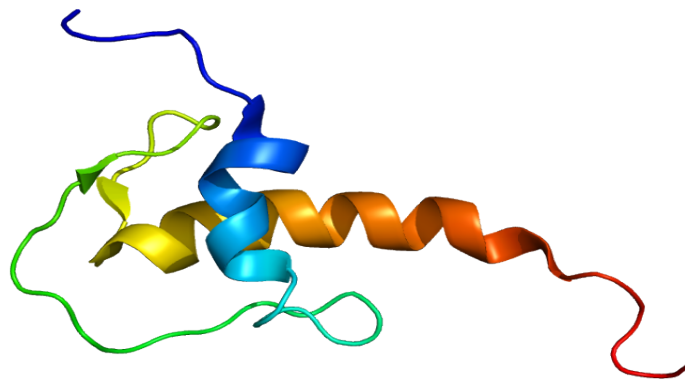
Εικόνα 12: Θέση γονιδίου *SPINK5* στο χρωμόσωμα 5¹³⁹

1.6.2. Δομή λεκτίνης (LEKT1)

Το γονίδιο *SPINK5* παρέχει οδηγίες για την κατασκευή μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται LEKT1 η οποία είναι ένας τύπος αναστολέα πεπτιδάσης της σερίνης που ελέγχει τη δραστηριότητα των πεπτιδασών σερίνης, οι οποίες διασπούν άλλες πρωτεΐνες.¹⁴⁰

Η *SPINK5* εκφράζεται κυρίως στο δέρμα και στον θύμο αδέν. ¹²⁸ Στον επιθηλιακό ιστό σταματάει, αποτρέπει ή μειώνει τη δραστηριότητα των ενδοπεπτιδασών του τύπου της σερίνης, ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών σε ολιγοπεπτίδια ή πολυπεπτίδια. Ένα κατάλοιπο σερίνης βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτή η αναστολή διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αντιφλεγμονώδη προστασία του επιθηλίου στους βλεννογόνους.¹²⁴ Η *SPINK5* κωδικοποιεί μια πρόδρομη πρωτεΐνη των 1064 αμινοξέων που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη λειτουργία φραγμού του επιδερμικού ρυθμίζοντας την δράση της πρωτεάσης. Δυσλειτουργία αυτού του γονιδίου οδηγεί σε εκδηλώσεις δερματικής ατοπίας λόγω της μη ισορροπημένης δράσης της πρωτεάσης.¹³²

Η λεκτίνη αποτελείται από 15 τμήματα που διασπώνται σε μικρότερα, λειτουργικά θραύσματα. Μόνο δύο από αυτές τις περιοχές (2 και 15) περιέχουν 6 ισοκατανεμημένες κυστεΐνες υπεύθυνες για 3 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, χαρακτηριστικό των αναστολέων τύπου Kazal. Οι υπόλοιπες περιοχές περιέχουν 4 κυστεΐνες. Αυτοί οι δισουλφιδικοί δεσμοί έχουν αναγκάσει το μόριο σε μια άκαμπτη διαμόρφωση που επιτρέπει την πρωτεΐνη να αλληλεπιδράσει με μια πρωτεάση-στόχο μέσω εκτεταμένης βήτα διαμόρφωσης. Όλες οι περιοχές (εκτός από 1, 2 και 15) περιέχουν μία αργινίνη στο P1, υποδεικνύοντας ότι οι πρωτεάσες θρυψίνης είναι οι πιθανοί στόχοι.¹³² Η τριτοταγής δομή λεκτίνης απεικονίζεται στην Εικόνα 13.¹⁴¹



Εικόνα 13: Τριτοταγής δομή λεκτίνης¹⁴¹

1.6.3. Μηχανισμός δράσης λεκτίνης

Το ανθρώπινο σώμα είναι εξοπλισμένο με μια σειρά από αναστολείς πρωτεασών. Η ενεργοποίηση των πρωτεασών διακόπτει τη λειτουργία αναστολέων οι οποίοι ισορροπούν τις επιβλαβείς επιδράσεις των πρωτεασών από ενδογενείς και εξωγενείς πηγές πρωτεάσης. Επιπλέον, η χορήγηση ενός αναστολέα πρωτεάσης σερίνης κατά τη διάρκεια της ευαισθητοποίησης σε ακάρεα οικιακής σκόνης έδειξε να εμποδίζει την ανάπτυξη της αλλεργικής φλεγμονής των αεραγωγών και την υπερ-αντιδραστικότητα, την παραγωγή της IL-8 και GM-CSF σε επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγού διεγερμένα με ακάρεα οικιακής σκόνης.¹²⁶

Οι πρωτεάσες μπορούν να είναι εξωγενείς ή ενδογενείς. Καλά γνωστές ενδογενείς πρωτεάσες περιλαμβάνουν την θρομβίνη, την πλασμίνη, την καθεψίνη G και την καλλικρεΐνη. Τα κεντρικά σημεία της αλλεργικής φλεγμονής έχουν δραστηριότητα πρωτεάσης. Η ελαστάση απελευθερώνεται από ουδετερόφιλα ενώ η τρυπτάση και η χυμάση απελευθερώνονται από ιστιοκύτταρα. Ως εξωγενείς πηγές, σχεδόν όλα τα κύρια αλλεργιογόνα, όπως γύρη, μύκητες, ακάρεα, κατσαρίδες και υμενόπτερα περιέχουν πρωτεάσες και διάφοροι μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ρινοϊό και ο ιός της γρίπης έχουν δραστηριότητες πρωτεάσης.¹²⁶

Οι πρωτεάσες δρουν μέσω ειδικών υποδοχέων κυτταρικής μεμβράνης που ονομάζονται ενεργοποιημένοι υποδοχείς πρωτεάσης (protease-activated receptors, PARs). Αυτοί οι υποδοχείς εκφράζονται σε σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων και ως εκ τούτου, οι πρωτεάσες έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης. Εκτός από τους ρόλους τους στην πήξη και την ομοιόσταση, έχουν την ικανότητα να διεγείρουν τα φλεγμονώδη κύτταρα και τα κύτταρα των αεραγωγών, γεγονός που τις καθιστά κρίσιμες για τις φλεγμονώδεις παθήσεις των αναπνευστικών οδών, όπως το άσθμα. Η SPINK5 έχει βιολογικές δράσεις εκτός από την αναστολή της πρωτεάσης που μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεση του άσθματος. Αυτές περιλαμβάνουν την αυξημένη παραγωγή της *IL-6*, *IL-8* από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, μειωμένη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών μετά από ερέθισμα οξειδωτικού και ελαφρώς μειωμένη παραγωγή βλέννας σε επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών. Η *IL-6*, *IL-8* και *RANTES* παράγονται σε υψηλότερα επίπεδα από τα φλεγμονώδη κύτταρα των ασθματικών αεραγωγών και έχουν σημαντικούς ρόλους στη φλεγμονή που βασίζεται η παθογένεση του άσθματος. Η *IL-6* είναι ένας σημαντικός αυξητικός παράγοντας για τα T και B κύτταρα και επάγει παραγωγή αντισωμάτων, *IL-8* είναι ένας πολύ ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας για ουδετερόφιλα και *RANTES* είναι ένα ισχυρό χημειοελκτικό για ηωσινόφιλα. Κρίνοντας από τις επιδράσεις της *IL-6*, *IL-8* και *RANTES*, προκύπτει ότι η *SPINK5* είναι ικανή να διεγείρει την εμπλοκή μια ποικιλίας διαφορετικών κυττάρων όπως B και T λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα που δραστηριοποιούνται στη φλεγμονώδη διαδικασία των αεραγωγών μέσω διέγερσης του επηρεάζει τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες.¹²⁶

Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού η οποία οδηγεί σε αλλεργίες, άσθμα, έκζεμα και σε άτομα με σύνδρομο Netherton πιθανόν προκύπτει από μια έλλειψη της LEKT1 που εμπλέκονται στην πυροδότηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.¹⁴⁰

Όταν μεταλλάσσεται η πρωτεΐνη *SPINK5* τα άτομα παρουσιάζουν υπερευαισθησία στην εμφάνιση άσθματος και συνεπώς το *SPINK5* αποτελεί έναν μείζονα προδιαθεσικό παράγοντα.^{142,143}

Αναστολείς πρωτεάσης έχουν δειχθεί να αναστέλλουν την απελευθέρωση κυτοκίνης που ενεργοποιείται από πρωτεάση στο επιθήλιο αεραγωγού και άλλα κύτταρα (ινοβλάστες πνεύμονα και επιθηλιακά κύτταρα επιπεφυκότα). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η βιολογική δράση του *SPINK5* διαφέρει από άλλους αναστολείς πρωτεάσης, δεδομένου ότι διεγείρει την απελευθέρωση της *IL-6* και *IL-8*. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει έντονα ότι ακόμη και αν οι αναστολείς πρωτεάσης μπορεί να έχουν ορισμένες κοινές δράσεις και αναστέλλουν πρωτεάσες, ορισμένες βιολογικές ιδιότητες μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των συγκεκριμένων μορίων.¹²⁶

1.7. OROSOMUCOID 1-LIKE PROTEIN 3 (ORMDL3) rs7216389

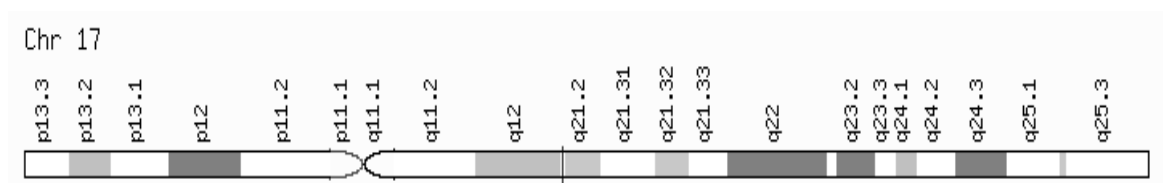
Μεταξύ των πολλαπλών γενετικών παραγόντων και περιβαλλοντικών κινδύνων που έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεση του άσθματος είναι και το γονίδιο *ORMDL3* και συγκεκριμένα το rs7216389.¹⁴⁴

Η πρώτη μελέτη του γονιδιώματος (GWAS) σε επίπεδο σύνδεσης ειδικά για το άσθμα προσδιόρισε την πρωτεΐνη *ORMDL3* ως σχετιζόμενη με το άσθμα το 2007. Αλλαγή στα επίπεδα μεταγραφής του *ORMDL3* βρέθηκαν σε μετασχηματισμένες λεμφοβλαστοειδικές κυτταρικές σειρές με τον ιό Epstein-Barr που είχαν ληφθεί από ασθματικά παιδιά. Από τότε, η σχέση μεταξύ άσθματος και γενετικών μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα 17q21, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο *ORMDL3*, μελετήθηκε εκτενώς σε πολλές ομάδες διαφορετικών πληθυσμών.¹⁴⁵

1.7.1. Γονίδιο *ORMDL3*

Η οικογένεια γονιδίων *ORM*, στην οποία ανήκει η *ORMDL3*, είναι εξελικτικά διατηρημένη και κωδικοποιεί διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου.¹⁴⁵

Το γονίδιο *ORMDL3* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στην περιοχή 17q21.1 (Εικόνα 14).¹⁴⁶



Εικόνα 14: Θέση γονιδίου *ORMDL3* στο χρωμόσωμα 17¹⁴⁶

Το γονίδιο *ORMDL3* ανήκει στην οικογένεια γονιδίων η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης σφιγγολιπιδίων. Ο μελετώμενος πολυμορφισμός rs7216389 έχει μήκος 6560 bps, συμπεριλαμβανομένων τριών εξονίων.¹⁴⁴

Ανήκει σε μία οικογένεια γονιδίων που περιλαμβάνει επίσης τα γονίδια *ORMDL1* και *ORMDL2* και είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου.¹⁴⁷ Έρευνες έχουν δείξει ότι μια παραλλαγή στην αλληλουχία της περιοχής συνδέεται με την ηλικία κατά την έναρξη και τη σοβαρότητα του άσθματος.³⁶ Ο μελετώμενος πολυμορφισμός rs7216389 οφείλεται σε σημειακή νουκλεοτιδική παραλλαγή.

Η μεταλλαγμένη αλληλουχία είναι η εξής:
CCCAGTGACCTCTCCC/TGTTCCCTTGGACCCC.¹⁴⁶

Η παρουσία του φυσικού γονιδίου T σχετίζεται με την εμφάνιση άσθματος ενώ το μεταλλαγμένο είναι το αλληλόμορφο C.¹⁴⁶

1.7.2. Δομή πρωτεΐνης *ORMDL3*

Η *ORMDL3* ανήκει σε μια εξαιρετικά διατηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών.¹⁴⁸ Ο πολυμορφισμός rs7216389 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 153 αμινοξέων με τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές και είναι αγκυροβολημένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο με μέγεθος 17495 Da.¹⁴⁴

Οι πρωτεΐνες *ORM* λειτουργούν ως μεσολαβητές της ομοιόστασης σφιγγολιπιδίων και η απορρύθμιση τους θα μπορούσε να σχετίζεται με την ανάπτυξη του παιδικού άσθματος. Οι *ORM* πρωτεΐνες έχουν βρεθεί να είναι αρνητικοί ρυθμιστές της σύνθεσης σφιγγολιπιδίων. Αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης στις αμινο-τελικές περιοχές των πρωτεϊνών *ORM1* και *ORM2* προσδιορίστηκαν ως κρίσιμης σημασίας στην μεταβολική διαδικασία της πορείας σύνθεσης σφιγγολιπιδίων. Ως εκ τούτου, η αμινοτελική περιοχή των πρωτεϊνών *ORM* έχει προταθεί ως απαραίτητη για φυσιολογική βιολογική δραστηριότητα. Η υπερέκφραση της *ORMDL3* προωθεί ισχυρότερη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που επάγονται με το στρες (UPR). Εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA θεωρείται ευρέως ως ένα σημαντικό βιολογικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την επέκταση της λειτουργίας των γονιδίων και την επίτευξη εξελικτικής ποικιλομορφίας αποφεύγοντας σημαντικές αυξήσεις στο μέγεθος του γονιδιώματος. Περίπου 40~60 % των ανθρώπινων γονιδίων είναι γνωστό ότι υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα.¹⁴⁵ Το γονίδιο *ORMDL3* εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς, ειδικά στο ήπαρ και σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος.¹⁴⁴

1.7.3. Μηχανισμός δράσης *ORMDL3*

Μελέτες έχουν δείξει ότι η *ORMDL3* είναι ο πρώτος γενετικός παράγοντας που σχετίζεται με το παιδικό άσθμα και μάλιστα πιστεύεται ότι η σύνδεση του γονιδίου με το άσθμα οφείλεται στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής απάντησης και τη διευκόλυνση των φλεγμονωδών αντιδράσεων στο ενδοπλασματικό δίκτυο.¹⁴⁴

Αν και η κατανόηση του ρόλου της *ORMDL3* είναι περιορισμένη, είναι γνωστό ότι η βιολογική λειτουργία εμπλέκεται στον μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων, καθώς και στη ρύθμιση της προσλήψεως Ca^{+2} από το κυτοσόλιο στο ενδοπλασματικό δίκτυο.¹⁴⁷ Μεταβάλλει το ενδοπλασματικό δίκτυο με μεσολάβηση στην ομοιόσταση Ca^{2+} και διευκολύνει την απόκριση πρωτεΐνης, η οποία θεωρήθηκε ως ένας ενδογενής διεγέρτης της φλεγμονής.¹⁴⁴ Η εκτυλισσόμενη πρωτεϊνική απάντηση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων και την αυξημένη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τη φλεγμονή.^{149, 150, 151}

Στην περίπτωση της υπερέκφρασης *ORMDL3*, το ενδοπλασμικό δίκτυο με την δραστηριότητα της αντλίας Ca^{2+} μειώνεται, οδηγώντας έτσι σε ανισορροπία στα επίπεδα Ca^{2+} και στην αντίδραση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την φλεγμονή.¹⁴⁸

Η *ORMDL3* συμμετέχει επίσης στον μεταβολισμό σφιγγολιπιδίων. Βιοδραστικοί μεταβολίτες σφιγγολιπιδίων όπως σφιγγοσίνη 1 φωσφορικού (S_1P) ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές διεργασίες που είναι σημαντικές για την φλεγμονή και τις ανοσολογικές αποκρίσεις και συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί αλλαγές στις συγκεντρώσεις S_1P σε συγκεκριμένες θέσεις ιστών και στο αίμα στο άσθμα.¹⁴

1.8. MELATONIN RECEPTOR 1B (MTNR1B) rs 10830963

Η μελατονίνη είναι μία ορμόνη που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος των ομοιοστατικών μηχανισμών του οργανισμού. Συνδέεται με δύο υποδοχείς: τον MT1 και τον MT2. Το υπό εξέταση γονίδιο *MTNR1B* κωδικοποιεί τον υποδοχέα MT2, ο οποίος είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των G-πρωτεϊνών και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q21-22. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μια συσχέτιση της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης πλάσματος νηστείας, το οποίο είναι πρόωρο στάδιο της ανεπάρκειας έκκρισης ινσουλίνης, και αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2 σε άτομα με γενετικές παραλλαγές στο *MTNR1B* γονίδιο που κωδικοποιεί τον MT2 υποδοχέα μελατονίνης (Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009).

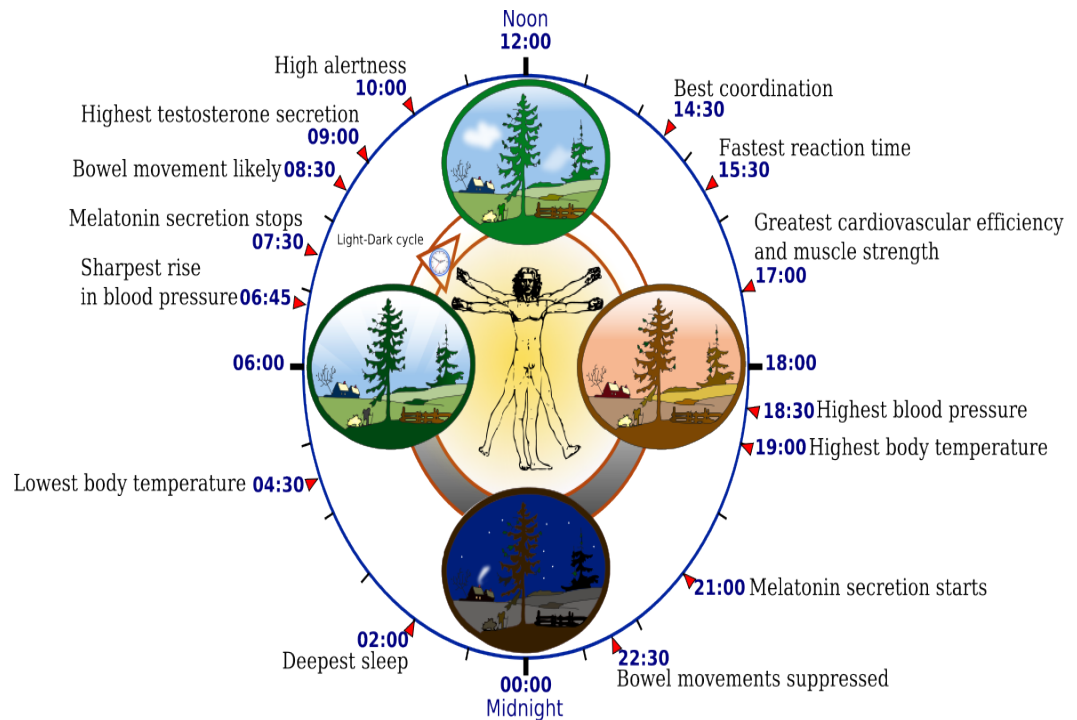
1.8.1. Φυσιολογία και λειτουργία μελατονίνης

Η μελατονίνη είναι μια ινδολο-αμίνη και συντίθεται από το αμινοξύ L-τροπτοφάνη (L-τροπτοφάνη->5-υδροξυτροπτοφάνη->5-υδροξυτροπταμίνη=σεροτονίνη->N-ακετυλσεροτονίνη->μελατονίνη). Τα δυο κύρια ένζυμα που ελέγχουν τη σύνθεση της μελατονίνης είναι η N-Ακετυλ-σεροτονίνη-τρανσφεράση (NAT) και η υδροξυινδολο-O-μεθυλ-τρανσφεράση (HIOMT).^{152, 153}

Εκκρίνεται από ενδοκρινικά κύτταρα στην επίφυση, η οποία βρίσκεται στη μέση γραμμή του εγκεφάλου, κατά την διάρκεια της νύχτας στον κύκλο φωτός/σκοταδιού. Παράγεται επίσης από νευροενδοκρινικά κύτταρα στον αμφιβληστροειδή, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πάγκρεας. Στον αμφιβληστροειδή υπάρχει ένας μηχανισμός ρολογιού μέσα στον ίδιο και φαίνεται να οδηγεί το ρυθμό μελατονίνης σε αυτόν τον ιστό.¹⁵⁴

Ο πιο γνωστός ρόλος της μελατονίνης είναι η συμμετοχή της στη ρύθμιση τόσο του εποχικού όσο και του κirkάδιου ρυθμού. Ο κirkάδιος ρυθμός (circadian rhythm) είναι μια βιολογική διαδικασία που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή στη διάρκεια ενός 24ώρου. Αυτός ο ρυθμός ορίζεται από ένα κirkάδιο ρολόι κι έχει παρατηρηθεί σε πολλούς ζωντανούς οργανισμούς, όπως σε φυτά, ζώα, μύκητες και κυανοβακτήρια. Ο όρος *κirkάδιος* προέρχεται από την λατινική λέξη *circa*, που σημαίνει "γύρω" (ή "περίπου") και *diem* ή *dies*, που σημαίνει "ημέρα". Παρόλο που οι κirkάδιοι ρυθμοί είναι ενδογενείς, προσαρμόζονται στο τοπικό περιβάλλον από

εξωγενείς παράγοντες, ο πιο σημαντικός από τους οποίους είναι το φως της ημέρας (Εικόνα 15).^{155,156}



Εικόνα 15: Κιρκάδιος ρυθμός¹⁵⁵

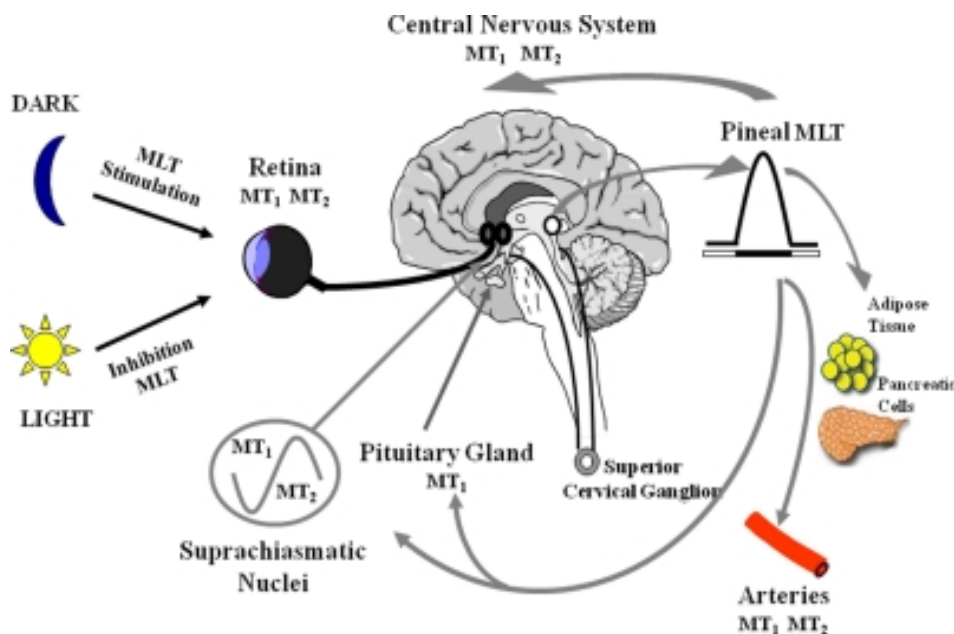
Σε καθημερινή βάση, η μελατονίνη έχει μια μικρή ρυθμιστική επίδραση στη δραστηριότητα του βηματοδότη του κιρκάδιου ρυθμού στον υπερχιασματικό πυρήνα. Σε εποχιακή βάση, οι διαφορετικές διακυμάνσεις των κυκλοφορούντων επιπέδων της μελατονίνης ακολουθούν τις αλλαγές κατά τη διάρκεια της ημέρας. Επειδή η διάρκεια της νυκτερινής έκκρισης μελατονίνης είναι ευθέως ανάλογη με το μήκος της νύχτας, αυτή η ορμόνη παρέχει επίσης ένα σήμα για την εποχιακή μεταβολή. Ο ρυθμός της μελατονίνης είναι ένα σημαντικό ορμονικό σήμα που οδηγείται από το ενδογενές ρολόι, το οποίο ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικός συγχρονιστής. Η μελατονίνη επίσης δρα άμεσα στον υπερχιασματικό πυρήνα και διαμορφώνει το ίδιο το ρολόι. Ο κιρκάδιος ρυθμός της σύνθεσης και της απελευθέρωσης μελατονίνης από την επίφυση οδηγείται από κύτταρα-βηματοδότη του κιρκάρδιου ρυθμού (το "κύριο ρολόι") που βρίσκονται στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN) του υποθαλάμου.¹⁵⁴

Μεταλλάξεις ή διαγραφές των υπεύθυνων γονιδίων για τη λειτουργία του κιρκάδιου κύκλου σε ποντίκια έχουν δείξει τη σημασία του βιολογικού ρολογιού στην εξασφάλιση του κατάλληλου συγχρονισμού στις κυτταρικές/μεταβολικές διεργασίες.^{155,156}

Ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN), μία μικρή περιοχή του υποθαλάμου είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση του κιρκάρδιου ρυθμού. Καταστροφή του πυρήνα αυτού έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια του φυσιολογικού κύκλου ύπνου-

αφύπνιση. Ο υπερχιασματικός πυρήνας λαμβάνει πληροφορίες για την φωτεινότητα του περιβάλλοντος από τους οφθαλμούς. Πιο συγκεκριμένα, ειδικά γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που περιέχουν τη φωτοχρωστική ουσία μελανοψίνη, παράγουν σήματα, τα οποία πορεύονται στην αμφιβληστροειδοϋποθλαμική οδό και καταλήγουν στον υπερχιασματικό πυρήνα. Νευρικά σήματα από το SCN ακολουθούν πολυσυναπτικά μονοπάτια με τα ανώτερα αυχενικά γάγγλια. Από εκεί η πληροφορία μεταβιβάζεται στην επίφυση, η οποία απαντά με την έκκριση της μελατονίνης.^{154,157,158}

Η μελατονίνη επίσης επηρεάζει το καρδιαγγειακό σύστημα και αλληλεπιδρά με το ανοσοποιητικό. Παράλληλα, εμπλέκεται και στον μεταβολικό έλεγχο, ενώ είναι ενδιαφέρον και το χαρακτηριστικό της να ενεργεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, λόγω της χημικής δομής της. Είναι ικανή να εξουδετερώνει τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και νιτρωδών (RNS) και παρέχει αποτελεσματική προστασία ενάντια στα τοξικά φαινόμενα που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στους ιστούς.^{152,153} Η μελατονίνη έχει αναφερθεί ότι διαμορφώνει πολλές άλλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής, νευροενδοκρινικής, αναπαραγωγικής, νευροανοσοποιητικής, και αγγειακής φυσιολογίας (Εικόνα 16).¹⁵⁴



Εικόνα 16: Ρύθμιση της παραγωγής μελατονίνης και λειτουργία υποδοχέων

Η μελατονίνη συντίθεται στην επίφυση και στον αμφιβληστροειδή. Στην επίφυση, η σύνθεση μελατονίνης (MLT) ακολουθεί ένα ρυθμό που κινείται από τον υπερχιασματικό πυρήνα, το κύριο βιολογικό ρολόι. Νευρωνικά σήματα από το SCN ακολουθούν ένα πολυσυναπτικό μονοπάτι προς την ανώτερα αυχενικά γάγγλια. Η νορεπινεφρίνη που απελευθερώνεται από μεταγαγγλιακές ίνες ενεργοποιεί $\alpha 1$ - και $\beta 1$ -αδρενεργικούς υποδοχείς στην pinealocyte, οδηγώντας σε αυξήσεις σε δευτερογενείς αγγελιοφόρους (δηλαδή, cAMP και τριφωσφορικής ινοσιτόλης) και η δραστηριότητα της AA-NAT, το περιοριστικό βήμα στη σύνθεση της μελατονίνης. Το σύστημα αναστέλλεται δραματικά από το φως που είναι το εξωτερικό σύνθημα που επιτρέπει τον συντονισμό με τον περιβαλλοντικό κύκλο φωτός/σκότους. Το ευφωτικό σήμα που λαμβάνεται από τον αμφιβληστροειδή μεταδίδεται στον SCN μέσω αμφιβληστροειδοϋποθαλαμικής οδού, η οποία προέρχεται από ένα υποσύνολο των γαγγλιοκυττάρων του αμφιβληστροειδούς. Η μελατονίνη που εκκρίνεται από την επίφυση χρησιμεύει ως εσωτερικό σήμα που αναμεταδίδει την διάρκεια της ημέρας, και επιτρέπει τη ρύθμιση της νευρωνικής δραστηριότητας (MT1) και τους κερκαδικούς ρυθμούς (MT1, MT2) στο SCN, τις νευροχημικές λειτουργίες στον εγκέφαλο μέσω των MT1 και MT2 υποδοχέων, του αγγειακού τόνου μέσω της ενεργοποίησης του MT1 (συστολή) και των υποδοχέων MT2 (διαστολή) στις αρτηρίες, καθώς και εποχιακές αλλαγές στην αναπαραγωγική φυσιολογία και τη συμπεριφορά μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων MT1 στο *pars tuberalis*. Οι *pars tuberalis* της υπόφυσης ερμηνεύει αυτό το ρυθμικό σήμα μελατονίνης και παράγει έναν ακριβή κύκλο της έκφρασης των κερκαδικών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων MT1. Σύνθεση μελατονίνης στους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς ακολουθεί παρόμοιο κερκάδιο ρυθμό που δημιουργείται από τοπικούς ταλαντωτές. Η ενεργοποίηση του MT1 και MT2 υποδοχέων μελατονίνης ρυθμίζουν τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς και ως εκ τούτου μετάδοση πληροφορίας φωτός στον εγκέφαλο¹⁵⁴

1.8.2. Ιστορικά στοιχεία υποδοχέων μελατονίνης

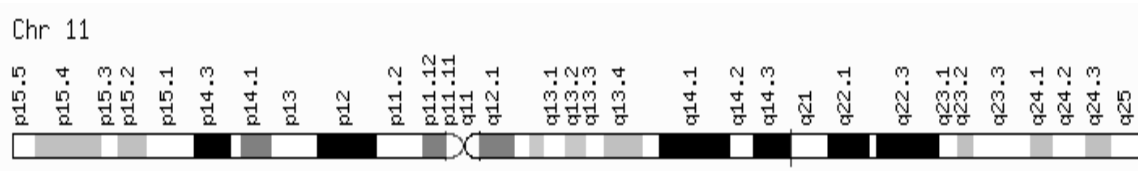
Οι υποδοχείς μελατονίνης πρώτα ταξινομήθηκαν σύμφωνα με κλασικά φαρμακολογικά κριτήρια χρησιμοποιώντας δεδομένα που λαμβάνονται από *in vitro* βιολογικές δοκιμασίες και ραδιοσημασμένους προσδέτες σε φυσικούς ιστούς. Το πρώτο σύστημα ταξινόμησης διέκρινε δύο υποθετικούς υποδοχείς, που ονομάζονται ML1 και ML2 βάσει κινητικών και φαρμακολογικών διαφορών που παρατηρήθηκαν σε θέσεις πρόσδεσης σημασμένης με 2-[125I] ιωδομελατονίνης. Το επόμενο ορόσημο ήταν η κλωνοποίηση δύο G πρωτεϊνών θηλαστικών συζευγμένων με υποδοχείς μελατονίνης (GPCRs) που τώρα ονομάζονται MT1 και MT2 (πρώην Mel1a και Mel1b). Αυτοί οι δύο υποδοχείς μελατονίνης ορίστηκαν ως μοναδικά είδη επί τη βάση των διακριτών μοριακών δομών και του χρωμοσωμικού εντοπισμού.¹⁵⁴

1.8.3. Γονίδιο *MTNR1B*

Μοριακές αναλύσεις γονιδιώματος έδειξαν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ανθρώπινους υποδοχείς MT1 και MT2 μελατονίνης περιλαμβάνουν δυο εξόνια που διαχωρίζονται από ένα ιντρόνιο 13 kb. Το ιντρόνιο στον πρώτο κυτταροπλασματικό βρόχο των γονιδίων του MT1 και MT2 υποδοχέων μελατονίνης θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε εναλλακτικές μορφές ματίσματος με διακριτή δομή υποδοχέα, καθώς και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της μεταγωγής. Τέτοια λειτουργικά ματίσματα, ωστόσο, δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο υποδοχέας MT2 αρουραίου αποτελείται από τρία εξόνια, αν και το τελευταίο δεν περιέχει εξόνιο με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Ishii et al, 2009).¹⁵⁴

Οι υποδοχείς μελατονίνης έχουν διακριτές χρωμοσωματικές περιοχές. Ο MT1 υποδοχέας μελατονίνης εντοπίστηκε στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 4q35.1 και εκτείνεται σε 13,16kb. Αντίθετα, ο MT2 υποδοχέας μελατονίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11q21-22 (Reppert et al., 1995a).⁶⁵ Το γονίδιο *MTNR1B* κωδικοποιεί μια από τις δυο μορφές υψηλής συγγένειας του υποδοχέα της μελατονίνης. Δυο λειτουργικοί υποδοχείς έχουν βρεθεί στα θηλαστικά, οι Mel1a (ή MT1) και Mel1b (ή MT2) υποδοχείς που κωδικοποιούνται στον άνθρωπο από τα γονίδια *MTNR1A* και *MTNR1B* αντίστοιχα.¹⁵²

Μεταξύ των snps του γονιδίου *MTNR1B* οι πολυμορφισμοί rs10830962 και rs10830963 φαίνεται να είναι λειτουργικοί και έχει αναφερθεί ότι συνδέονται στενά με το μεταβολισμό της γλυκόζης και με διαταραχές στη λειτουργία των β-κυττάρων, καθώς και με αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση ΣΔτ2 στον άνθρωπο ¹⁵⁹. Ο πολυμορφισμός rs10830963 βρίσκεται σε μέση απόσταση από το εξόνιο 1(+5,6 kb) και 2(-5,9 kb), ενώ ο πολυμορφισμός rs10830962 βρίσκεται στη 5'-περιοχή πλαισίωσης του γονιδίου.¹⁶⁰ Η θέση του γονιδίου *MTNR1B* στο χρωμόσωμα 11 απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 17).¹⁶¹

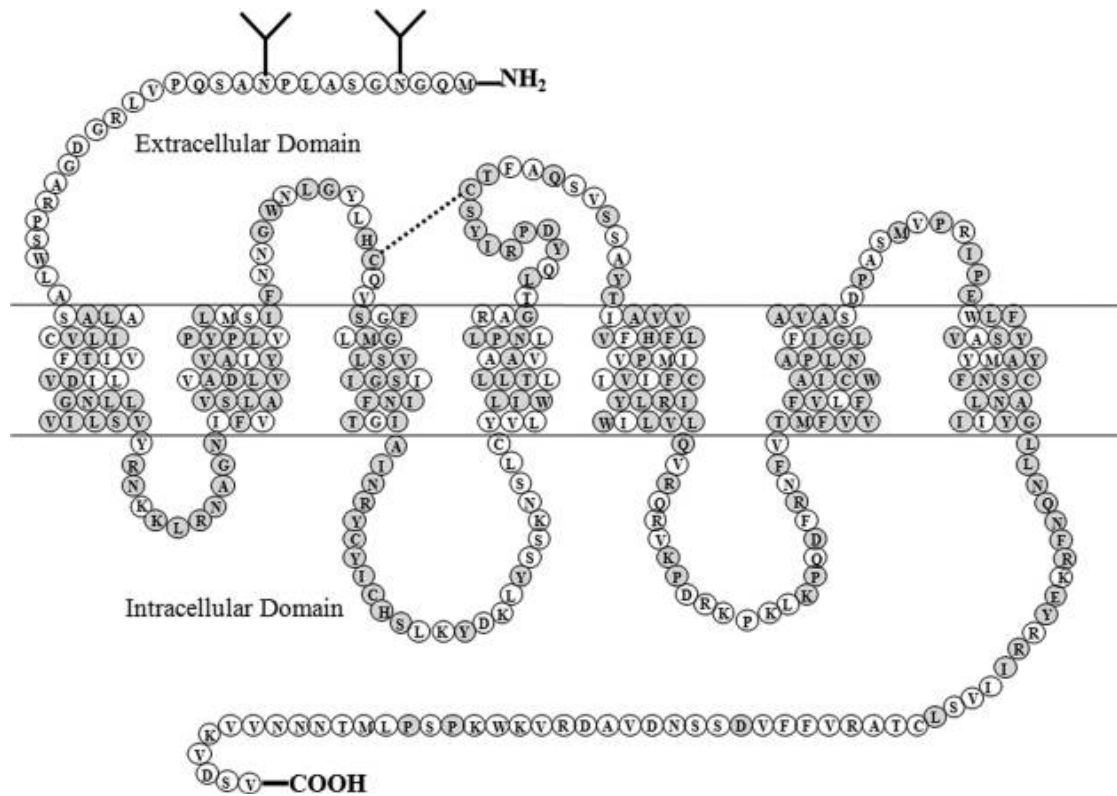


Εικόνα 17: Θέση του *MTNR1B* στο χρωμόσωμα 11¹⁶¹

Η παρουσία του φυσικού γονιδίου κυτοσίνης (C) δεν σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΔΠ ενώ το μεταλλαγμένο είναι το αλληλόμορφο γουανίνη (G) που η παρουσία του συνδέεται με εμφάνιση ΣΔτ2.¹⁶²

1.8.4. Δομή υποδοχέων μελατονίνης

Οι MT1 και MT2 υποδοχείς της μελατονίνης περιλαμβάνουν τη δική τους υποομάδα εντός της υπεροικογένειας GPCR. Οι υποδοχείς μελατονίνης είναι ταξινομημένοι στην οικογένεια ροδοψίνης/β2-αδρενεργικών υποδοχέων.¹⁵⁴ Ο MT2 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των G-πρωτεϊνών η οποία συνδυάζεται με τον 7-διαμεμβρανικό υποδοχέα. Η προκύπτουσα πρωτεΐνη αποτελείται από 362 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 40,2kD. Διαθέτει μια εξωκυττάρια αμινοτελική και μια ενδοκυττάρια καρβοξυτελική περιοχή.¹⁵⁹ Αμφότεροι οι υποδοχείς μελατονίνης έχουν ένα γενικό δομικό μοτίβο που αποτελείται από επτά διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα που συνδέονται με την εναλλαγή ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών βρόχων, με το αμινοτελικό άκρο να βρίσκεται στην εξωκυτταρική πλευρά και το καρβοξυτελικό άκρο στην ενδοκυτταρική πλευρά (Εικόνα 18).¹⁶³ Αυτά τα επτά α-ελικοειδή τμήματα περιέχουν τμήματα 20 έως 25 αμινοξέων, κυρίως υδρόφοβα υπολείμματα, τα οποία διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.¹⁵⁴



Εικόνα 18: Τοπολογία μεμβράνης υποδοχέα μελατονίνης hMT1

Η τοπολογία της μεμβράνης του υποδοχέα μελατονίνης hMT1 δείχνει διατηρημένα αμινοξέα και στον υποδοχέα hMT2. Οι γκρι κύκλοι συμβολίζουν πανομοιότυπα αμινοξέα και στους δύο υποδοχείς μελατονίνης. Οι δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης συμβολίζονται ως (Y) στο άμινο τελικό άκρο.¹⁶³

Οι ανθρώπινοι MT1 και MT2 υποδοχείς μελατονίνης κωδικοποιούν πρωτεΐνες 350 και 362 αμινοξέων, αντίστοιχα. Η προβλεπόμενη μάζα τους είναι 39.374 και 40.188 Da αντίστοιχα, ωστόσο οι αριθμοί αυτοί δεν λαμβάνουν υπόψη τις πιθανές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Η ομολογία αμινοξέων για τους ανθρώπινους MT1 και MT2 υποδοχείς μελατονίνης είναι περίπου 60% συνολικά και 73% στις διαμεμβρανικές περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο του MT1 υποδοχέα μελατονίνης περιέχει δύο συναινετικές θέσεις για γλυκοζυλίωση με την συνδεδεμένη ασπαραγίνη στο αμινοτελικό άκρο, ενώ εκείνη του MT2 δεικνύει μόνον μία θέση. Το καρβοξυτελικό άκρο των δύο υποδοχέων περιέχει συναινετικές θέσεις για κινάση καζεΐνης 1α, κινάση καζεΐνης II, και της πρωτεϊνικής κινάσης C. (Hung και Sheng, 2002).¹⁵⁴

Ο MT2 (πρώην Mel1b, MEL1B, ML1B) αναφέρεται στο δεύτερο κλωνοποιημένο υποδοχέα μελατονίνης θηλαστικών (Reppert et al, 1995a). Είναι ένας $G_{i/o}$ υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνη ικανής να αναστείλει την cAMP και την cGMP παραγωγή

σε ανασυνδυσασμένα συστήματα και παρακινώντας τη δραστηριότητα PKC στον SCN.¹⁵⁴

1.8.5. Πολυμορφισμός υποδοχέων μελατονίνης

Έχουν αναφερθεί γενετικοί πολυμορφισμοί για υποδοχείς μελατονίνης στον άνθρωπο και στα πρόβατα. Στον άνθρωπο, οι πολυμορφισμοί έχουν σχέση τόσο για MT1 όσο και MT2 σε ασθενείς με διαταραχές του κερκάρδιου ρυθμού του ύπνου. Η έκκριση μελατονίνης ακολουθεί τον κερκάρδιό ρυθμό με υψηλά επίπεδα τη νύχτα. Αντίθετα, η απελευθέρωση της ινσουλίνης είναι υψηλή κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η πτώση των επιπέδων της ινσουλίνης το βράδυ μπορεί να προκύπτει με αναστολή από ενδογενή μελατονίνη μέσω της ενεργοποίηση των MT1 και MT2 σε παγκρεατικά νησίδια. Με βάση τις αυξήσεις έκφρασης mRNA του MT2 υποδοχέα μελατονίνης σε ανθρώπινα παγκρεατικά νησίδια σε άτομα χωρίς διαβήτη με το αλληλόμορφο κινδύνου και σε άτομα με ΣΔΙΙ, οδήγησε στην υπόθεση ότι η αύξηση στην πυκνότητα υποδοχέων MT2 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση αυτών των συνθηκών. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν οι αυξήσεις στην έκφραση του mRNA αντικατοπτρίζουν τις αυξήσεις στην πυκνότητα των MT2 υποδοχέων μελατονίνης σε παγκρεατικά νησίδια.¹⁵⁴

1.8.6. Έκφραση υποδοχέων μελατονίνης

Στα θηλαστικά, οι υποδοχείς MT1 και MT2 φαίνεται να μεσολαβούν στα φυσιολογικά αποτελέσματα της ενδογενούς και εξωγενούς μελατονίνης. Οι υποδοχείς αυτοί εμφανίζουν διακριτές μοριακές δομές, χρωμοσωμικές εντοπίσεις, και φαρμακολογικά προφίλ. Οι υποδοχείς μελατονίνης έχουν εντοπιστεί στον ανθρώπινο εγκέφαλο (εγκεφαλική παρεγκεφαλίδα, ινιακό, βρεγματικό, κροταφικό, μετωπιαίο φλοιό, ιππόκαμπος, ΚΝΣ) και στους περιφερικούς ιστούς (αμφιβληστροειδής). Χρησιμοποιώντας RT-PCR, και για τα δύο είδη mRNA, αυτά έχουν βρεθεί σε ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό, κύτταρα granuloze, PAZ6 λιποκύτταρα, και κύτταρα των στεφανιαίων αρτηριών.¹⁵⁴

1.8.7. Ρύθμιση υποδοχέων μελατονίνης

Η ρύθμιση του σήματος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση έγκαιρης και αποτελεσματικής κυτταρικής απόκρισης και ομοιόστασης. Η ενεργοποίηση των GPCRs οδηγεί σε αλλαγές στην ευαισθησία των υποδοχέων (απευαισθητοποίηση, ευαισθητοποίηση, η εσωτερικοποίηση), που οδηγούν σε αλλαγές της αποτελεσματικότητας του συνδέτη. Οι υποδοχείς MT1 και MT2 της μελατονίνης ρυθμίζονται ευδιάκριτα από φυσιολογικές (30-400 pM) και υπερ-φυσιολογικές (1-1000 pM) συγκεντρώσεις μελατονίνης. Φυσιολογικές συγκεντρώσεις νυκτερινής μελατονίνης (100-400 pM) είναι ήδη πολύ πάνω από την δραστηριότητα (EC50) για τους υποδοχείς μελατονίνης, τα οποία ενεργοποιούνται από πικομοριακές συγκεντρώσεις μελατονίνης. Οι συγκεντρώσεις της ημέρας συνήθως πέφτουν κάτω

από 30 pM και όμως μπορούν ακόμη να επάγουν την ενεργοποίηση και απευαισθητοποίηση των υποδοχέων μελατονίνης μετά από παρατεταμένη έκθεση στην ορμόνη (~8 ώρες). Ωστόσο, από του στόματος δόσεις μελατονίνης ή άλλοι προσδέτες σε συγκέντρωση ≥ 1 mg μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα στο αίμα αρκετές φορές πάνω από τη συγκέντρωση που είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση υποδοχέων μελατονίνης και επομένως μπορεί να μεταβάλλει την ευαισθησία του υποδοχέα.¹⁵⁴

1.8.8. Λειτουργία υποδοχέων μελατονίνης

Η λειτουργία υποδοχέων μελατονίνης εντοπίζεται σε συγκεκριμένα συστήματα. Αυτά είναι το Κ.Ν.Σ, όπου οι λειτουργικοί υποδοχείς MT1 και MT2 έχουν χαρακτηριστεί σε φαρμακολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν δυο ανταγωνιστές του υποδοχέα μελατονίνης την luzindole και 4P – PDOT καθώς και σε μελέτες επίμυων με γενετική διαγραφή στους MT1 ή/και MT2 υποδοχείς, στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης, στο καρδιαγγειακό και στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και στον καρκίνο. Στο μεταβολισμό έχει περιγραφεί μια σχέση μεταξύ του κερκάδιου ρυθμού απελευθέρωσης μελατονίνης και ενεργειακού ισοζυγίου. Η μελατονίνη διαμορφώνει την ομοιόσταση της γλυκόζης κυρίως μέσω μεταβολών στην έκκριση ινσουλίνης και την παραγωγή λεπτίνης. Η έκφραση του MT1 και MT2 υποδοχείς έχει επίσης αναφερθεί για τον ανθρώπινο παγκρεατικό ιστό. Παρατεταμένη προεπεξεργασία μελατονίνης από παγκρεατικά κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων μελατονίνης MT1 και cross-talk με GLP-1 υποδοχείς, ευαισθητοποιεί το σύστημα σήμανσης cAMP, την αύξηση της παραγωγής cAMP και την έκκριση ινσουλίνης.¹⁵⁴

1.8.9. Οι υποδοχείς μελατονίνης ως θεραπευτικοί στόχοι

Η μελατονίνη, ενεργώντας μέσω ενός προσυναπτικού ετεροϋποδοχέα, αναστέλλει την απελευθέρωση ντοπαμίνης του αμφιβληστροειδούς και αυτή η βιοανάλυση χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί η σχετική σειρά ισχύος για μια σειρά αγωνιστών και θεωρούμενων ανταγωνιστών, καθώς και για να ανακαλύψει τον πρώτο ανταγωνιστή μελατονίνης την luzindole.¹⁵⁴

Η luzindole (N-0774), (N-ακετυλ-2-benzyltryptamine) είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στην επιστημονική έρευνα για τη μελέτη του ρόλου της μελατονίνης στο σώμα. Η luzindole δρα ως εκλεκτικός ανταγωνιστής υποδοχέα μελατονίνης με περίπου 11- έως 25-φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα MT2 σε σχέση με τον MT1. Οι αγωνιστές του υποδοχέα μελατονίνης που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά ή είναι σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξης, είναι όλοι μη εκλεκτικοί αγωνιστές των υποδοχέων μελατονίνης MT1, MT2. Αυτοί οι αγωνιστές που αναφέρονται βρίσκονται σε εξέλιξη για έναν αριθμό καταστάσεων που κυμαίνονται από αϋπνία και διαταραχή του κερκάδιου ρυθμού μέχρι κατάθλιψη και εποχιακή συναισθηματική διαταραχή. Η μελατονίνη και οι συνθετικοί αγωνιστές μελατονίνης γενικά στερούνται τις κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες που συχνά παρατηρούνται με

φαρμακευτική αγωγή για ύπνο (π.χ. απομείωση της μάθησης, της μνήμης, ή κινητική λειτουργία).¹⁵⁴

Η αγομελατίνη έχει μελετηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας *in vitro* και *in vivo* μοντέλα. Αυτός ο υψηλής συγγένειας MT1/MT2 αγωνιστής υποδοχέα μελατονίνης είναι επίσης ένας ανταγωνιστής υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT_{2C}. Η αγομελατίνη, ένα νέο και αποτελεσματικό αντικαταθλιπτικό, παρουσιάζει ένα μοναδικό φαρμακολογικό προφίλ με υψηλή αποτελεσματικότητα για τον ύπνο, την δυσλειτουργία του κικκάρδιου ρυθμού και την κατάθλιψη.¹⁵⁴

Η Ramelteon είναι ένας νέος, υψηλής συγγένειας, μη εκλεκτικός MT1/MT2 αγωνιστής υποδοχέων με μικρή συγγένεια για άλλους GPCRs που αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία της αϋπνίας και τις διαταραχές του ύπνου του κικκαδικού ρυθμού.¹⁵⁴

Το PD 6735 (LY 156735) είναι μια ινδόλη ανάλογη της μελατονίνης και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια και για τους δύο MT1 και MT2 υποδοχείς. Σε άτομα με μέτρια έως σοβαρή αϋπνία, η PD 6735 δίνεται για 2 διαδοχικές ημέρες σε μειωμένη λανθάνουσα κατάσταση ύπνου που καθορίζεται από πολυπνογραφία και μείωσε την υποκειμενική λανθάνουσα κατάσταση ύπνου.¹⁵⁴

Η κικκαδίνη έχει πρόσφατα εγκριθεί για εμπόριο στην Ευρώπη ως ένα σκεύασμα μελατονίνης παρατεταμένης αποδέσμευσης που μιμείται το φυσιολογικό προφίλ έκκρισης μελατονίνης.¹⁵⁴

1.9. CDKAL1 (CDK5 REGULATORY SUBUNIT ASSOCIATED PROTEIN 1-LIKE) rs7756992

Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περισσότερα από 50 γονίδια που συνδέονται στενά με τον ΣΔτ2 και το *CDKAL1* είναι ένα από αυτά. Το γονίδιο *CDKAL1* ανακαλύφθηκε το 2007 με τις πρώτες GWAS στην Ισλανδία και συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) σε *CDKAL1* έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη του ΣΔτ2.¹⁶⁴ Οι ισχυρότερες συσχετίσεις με τον ΣΔτ2 παρατηρούνται για τα rs7754840 και rs10946398. Επιπλέον, μια συσχέτιση του G αλληλόμορφου (φυσικό) στο rs7756992 με ΣΔτ2 έχει αναφερθεί σε Ισλανδική μελέτη και η συσχέτιση αυτή επαναλήφθηκε σε πέντε μελέτες Ευρωπαϊκών και Ασιατικών πληθυσμών.¹⁶⁵

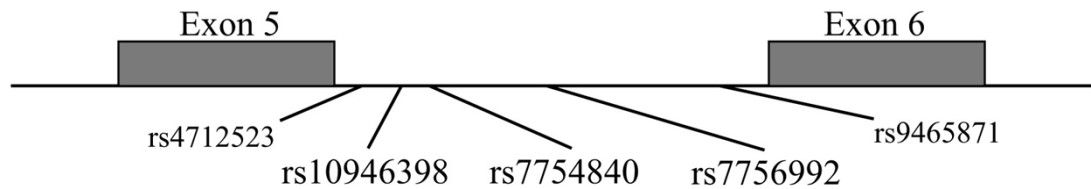
Η *CDKAL1* είναι ομόλογο προς CDK5RAP1, έναν αναστολέα της εξαρτώμενης από κυκλίνη κίνησης CDK5, η οποία μπορεί να μεταγάγει σήματα γλυκοτοξικότητας σε β παγκρεατικά κύτταρα. Παρά την αρχική παρατήρηση ότι η βιοχημική λειτουργία της *CDKAL1* ήταν ασαφής, περαιτέρω αναλύσεις και λειτουργικές δοκιμασίες κατέταξαν την *CDKAL1* ως το πρώτο μέλος της οικογένειας μεθυλθειο-τρανσφεράσης (MTase) ευκαρυωτικών κυττάρων που έχει βρεθεί μέχρι στιγμής.³⁶

1.9.1. Δομή γονιδίου *CDKAL1*

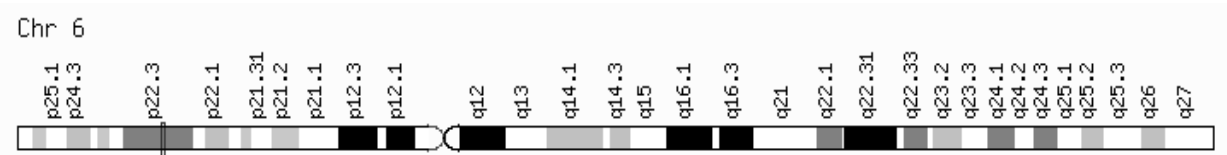
Υπάρχουν 5 snps που συνδέονται με ΣΔτ2 στο γονίδιο *CDKAL1* τα οποία βρίσκονται στο ιντρόνιο 5, στο χρωμόσωμα 6p22.3 (Εικόνα 19, Εικόνα 20).¹⁶⁵ Το

γονίδιο *CDKAL1* και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός rs7756992 (A/G) έχει προταθεί ότι σχετίζεται με το ΣΔτ2, αλλά τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα.¹⁶⁶

Το γονίδιο *CDKAL1* εκτείνεται σε περίπου 700kb στη θέση 6p22.3 και έχει 16 εξόνια.^{167,164}



Εικόνα 19: Θέση των πολυμορφισμών που σχετίζονται με ΣΔτ2 στο γονίδιο *CDKAL*.¹⁶⁵



Εικόνα 20: Θέση του *CDKAL1* στο χρωμόσωμα 6.^{165,168}

1.9.2. Πρωτεϊνική δομή-σύνθεση-απελευθέρωση *CDKAL1*

Η επίδραση στον κίνδυνο για ΣΔτ2 προκαλείται μέσω μίας πρωτογενούς επίδρασης στην παχυσαρκία και ρύθμιση του ΔΜΣ καταργεί την σύνδεση με ΣΔτ2. Σε όλες τις μελέτες, οι αποδείξεις για σχέση του *CDKAL1* είναι εμφανείς. Έχει σημειωθεί ένα διάστημα 200kb που πιθανόν να περιέχει την αιτιολογική παραλλαγή.^{169,170}

Η *CDKAL1* ανήκει στην οικογένεια μεθυλθειοτρανσφερασών που καταλύει την τροποποίηση μεθυλθείου της N6-θρεονυλ-καρβαμοϋλ-αδενοσίνης για να παραχθεί 2-μεθυλθειο-N6-θρεονυλ-καρβαμοϋλ-αδενοσίνη στη θέση 37 του tRNA-lys (αντικωδικόνιο UUU). Αυτή η τροποποίηση σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση κωδικονίου-αντικωδικονίου για την ακριβή αποκωδικοποίηση του κωδικονίου λυσίνης AAA και AAG.¹⁷¹

Ένα έλλειμμα αυτής της τροποποίησης προκαλεί ανώμαλη σύνθεση πρωτεΐνης, και συνδέεται με την ανεπάρκεια της έκκρισης ινσουλίνης τόσο σε μοντέλα επίμυων όσο και ανθρώπου. Ωστόσο, είναι άγνωστο αν τα SNPs του *CDKAL1* που σχετίζονται με ΣΔτ2 συνδέονται με προς τα κάτω ρύθμιση του *CDKAL1* με ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ο νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός σε ένα μόνο ιντρόνιο αυτού του γονιδίου δείχνει αυξημένη συσχέτιση με ΣΔτ2.¹⁶⁴

Η πρωτεΐνη *CDKAL1* έχει μέγεθος 65-kD και αποτελείται από 579 αα.^{164, 167, 170} Η κύρια δομή της *CDKAL1* έχει τα χαρακτηριστικά της οικογένειας των μεθυλθειοτρανσφερασών (MTTase) μιας υποομάδας της υπεροικογένειας των ενζύμων AdoMet. Η MTTase καταλύει χημικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τη μετατροπή του δεσμού μεταξύ C-H σε δεσμό C-SCH₃. Οι αντιδράσεις αυτές συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως η τροποποίηση του tRNA και των ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Αν και η λειτουργία της είναι ακόμα ασαφής, η πρωτεΐνη είναι παρόμοια με κυκλίνη-εξαρτώμενη από κινάση 5 κανονιστική υποομάδα που σχετίζεται με πρωτεΐνη (CDK5RAP-1) η οποία εκφράζεται σε νευρωνικούς ιστούς και αναστέλλει τη δραστηριότητα του CDK5 με τη δέσμευση του ενεργοποιητή του p35.¹⁷¹ Το CDK5 είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, που ανήκει στην οικογένεια της κυκλίνης κινάσης και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Το CDK5 διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη νευρωνική ανάπτυξη αλλά εμφανίζει και αρκετές δραστηριότητες εκτός του εγκεφάλου. Στα νησίδια του παγκρέατος έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη ρύθμιση έκκρισης της ινσουλίνης.¹⁶⁶

Η *CDKAL1* εκφράζεται έντονα στο ανθρώπινο πάγκρεας, στους σκελετικούς μυς και στον εγκεφαλικό ιστό και μπορεί να αναστείλει ειδικά την δράση της CDK5. Το 2010, ο Ohara-Imaizumi *et al* διαπίστωσε ότι η *CDKAL1* ελέγχει την εξωκύτωση ινσουλίνης πρώτης φάσης σε β κύτταρα, διευκολύνοντας την παραγωγή ATP, την απόκριση του καναλιού και την μεταγενέστερη δραστηριότητα των καναλιών Ca²⁺ μέσω διαφορετικών οδών, από CDK5 μεσολάβηση.¹⁶⁶

1.9.3. Μηχανισμός δράσης *CDKAL1*

Χρησιμοποιώντας ένα knockout ποντίκι, ο Wei *et al.* ήταν σε θέση να αποδείξει ότι το *CDKAL1* τροποποιεί συγκεκριμένα την tRNA για τη λυσίνη από t⁶A (N6-θρεονυλ καρβαμοϋλ αδενοσίνη) στη θέση 37 σε ms²t⁶A (2-μεθυλοθειο-N6- θρεονυλ-καρβαμοϋλ-αδενοσίνη), μία τροποποίηση ειδικά για το συγκεκριμένο tRNA που είναι απαραίτητη για την πρόληψη εσφαλμένης ανάγνωσης κωδικονίου³⁶

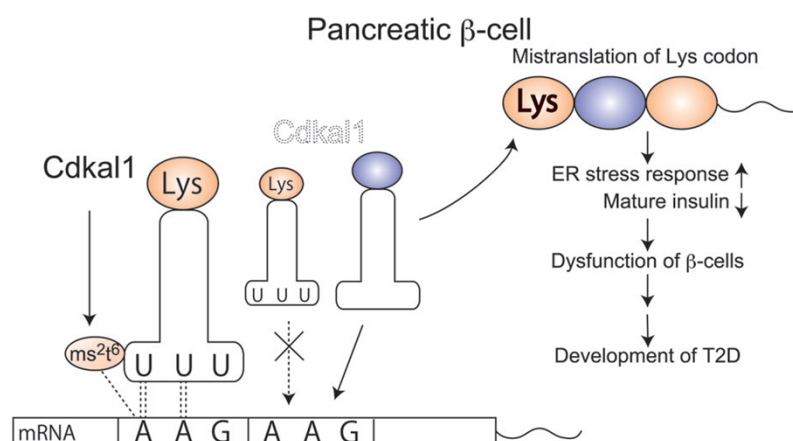
Οι *CDKAL1* knockout επίμυες έχουν μειωμένη λειτουργία β-κυττάρων, το οποίο δείχνει διαταραγμένη απελευθέρωση ινσουλίνης *in vitro* που διεγείρεται από γλυκόζη. Ο Wei *et al* χρησιμοποίησε β-κύτταρα από knockout επίμυες, βρίσκοντας υπερτροφία νησιδίων, μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και διαταραγμένο έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι εσφαλμένη ανάγνωση ενός κωδικονίου Lys στην προϊνσουλίνη, έχει ως αποτέλεσμα μείωση της γλυκόζης που διεγείρεται με σύνθεση προϊνσουλίνης. Αυτή η μείωση της ακρίβειας της μετάφρασης, προκαλεί τη σύνθεση της ανώμαλης ινσουλίνης, η οποία προκαλεί στρες στα β-κύτταρα. Οι δυσμενείς επιδράσεις αυτής της μετάλλαξης επιδεινώθηκαν από διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Αυτές οι μελέτες δείχνουν μια σαφή σχέση μεταξύ αυτού του γονιδίου σε ένα τόπο GWAS και ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης που μπορεί να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, τη σύνδεση με τον ΣΔτ2.³⁶

Η *CDKAL1* πρωτεΐνη φωσφορυλιώνει την υπομονάδα a1C του L-τύπου τασσεοεξαρτώμενου διαύλου Ca²⁺ (L-VGCC) σε Ser783 και ως εκ τούτου αναστέλλει

την εισροή Ca^{2+} στα β -κύτταρα και την έκκριση ινσουλίνης. Σε αντίθεση, αναστολή του CDK5 οδηγεί σε αυξημένη έκκριση ινσουλίνης από τα β -κύτταρα του παγκρέατος και προστατεύει τα νησίδια από γλυκοτοξικότητα.¹⁷¹

Η *CDKAL1* μοιράζεται σημαντικές περιοχές της πρωτεΐνης και ομολογία αμινοξέων με την CDK5 ρυθμιστική υπομονάδα που συνδέεται με πρωτεΐνη 1 (CDK5RAP1), έναν γνωστό αναστολέα της ενεργοποίησης CDK5. Η CDK5 έχει ενοχοποιηθεί στη ρύθμιση της λειτουργίας των β κυττάρων του παγκρέατος, μέσω του σχηματισμού συμπλόκων p35/CDK5 που ρυθμίζουν προς τα κάτω την έκφραση ινσουλίνης.¹⁷⁰ Η CDK5 ενεργοποιείται με την παραγωγή ενώσεων CDK5/p35 στον παγκρεατικό ιστό, έτσι τα β κύτταρα εκφυλίζονται και η έκκριση ινσουλίνης αναστέλλεται, ειδικά σε καταστάσεις υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης. Έχει διαπιστωθεί ότι σε εσωτερικό περιβάλλον υψηλής γλυκόζης, η υπερδραστηριότητα CDK5 θα μπορούσε να μειώσει το ρυθμό απελευθέρωσης της ινσουλίνης, να μειώσει την παραγωγή της ινσουλίνης και να συγκρατεί την έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης. Επομένως, η αναστολή της δραστηριότητας CDK5 θα μπορούσε να προστατεύσει τα παγκρεατικά κύτταρα από γλυκοτοξικότητα.¹⁶⁶

Ομοίως, έλλειψη του p35, ενεργοποιητή του CDK5, οδηγεί σε αύξηση έκκρισης της ινσουλίνης. Το *CDKAL1* που παρατηρήθηκε στα β -κύτταρα μεσολαβεί για ρύθμιση προς τα κάτω του CDK5. Διαφορετικά, μειωμένα επίπεδα του *CDKAL1* στις νησίδες θα οδηγήσει σε αυξημένη δραστηριότητα του CDK5 και πράγματι σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης (Εικόνα 21).¹⁷² Η *CDKAL1* (rs7756992 A/G) πιθανότατα οδηγεί στην αναστολή της απώλειας την επίδρασης στην CDK5, έτσι ο κίνδυνος ΣΔτ2 είναι αυξημένος. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της *CDKAL1* που αλλάζει το μοτίβο έκκρισης ινσουλίνης είναι ακόμα ασαφής και θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες.¹⁶⁶



Εικόνα 21: Σχηματικό μοντέλο ρύθμισης λειτουργίας β -κυττάρων από *Cdkal1*

Η *Cdkal1* μεθυλιώνει *tRNA^{Lys}* (UUU) σε στη θέση A37, το οποίο σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση μεταξύ *tRNA^{Lys}* (UUU) και του AAG κωδικονίου της, καθώς και AAA. Ανεπάρκεια της τροποποίησης *ms2t6* σε *tRNA^{Lys}* (UUU) από ανεπάρκεια *Cdkal1* προκαλεί λανθασμένη μετάφραση του κωδικονίου Lys στην προΐνσουλίνη, και προκαλείται αντίδραση στο στρες και μειωμένη περιεκτικότητα ώριμης ινσουλίνης στα β -κύτταρα. Δυσλειτουργία του β -κυττάρων από ανεπάρκεια *Cdkal1* θα οδηγούσε τελικά στην ανάπτυξη ΣΔτ2¹⁷²

1.9.4. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική μέσω *CDKAL1*

Μελέτες σε ασθενείς με ΣΔτ2 οι οποίοι ήταν σε θεραπεία με σουλφονουλιδίες παρουσίασαν διαφορετικά επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο πλάσμα (FPG) μεταξύ των 3 γονότυπων της *CDKAL1*. Φορείς του G αλληλόμορφου επιτυγχάνουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα FPG σε σύγκριση με τους ασθενείς με γονότυπο AA. Ο μηχανισμός που διέπει την επίδραση των πολυμορφισμών του *CDKAL1* με τη θεραπευτική δράση των σουλφονουλιδιών είναι άγνωστος. Συμπερασματικά, το μέγεθος της μείωσης της FPG μετά από θεραπεία με σουλφονουλιδία 6 μηνών σε ασθενείς με ΣΔτ2 συνδέεται με τη διακύμανση του *CDKAL1*.¹⁷⁰

1.10. TRANSCRIPTION FACTOR 7-LIKE 2 (*TCF7L2*) rs7903146

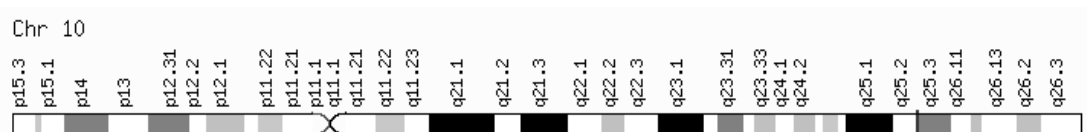
Ο παράγοντας μεταγραφής 7-σαν 2 (Transcription factor 7-like 2), επίσης γνωστός ως *TCF7L2* είναι μία πρωτεΐνη που ενεργεί ως παράγοντας μεταγραφής. Στον άνθρωπο αυτή η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το *TCF7L2* γονίδιο το οποίο είναι από τα πρώτα γονίδια προδιάθεσης που ανακαλύφθηκαν για ΣΔτ2.^{173,174,29} Το SNP εντός του γονιδίου *TCF7L2*, rs7903146, είναι, μέχρι σήμερα, ο σημαντικότερος γενετικός δείκτης που σχετίζεται με ΣΔτ2.¹⁷⁵ Οι SNPs σε αυτό το γονίδιο συνδέονται με υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ΣΔτ2 όπως επίσης και διαβήτη κύησης.¹⁷⁶

1.10.1. Δομή γονιδίου *TCF7L2*

Το γονίδιο *TCF7L2* βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 10q25.3 στο ιντρόνιο 4 και αποτελείται από 17 εξόνια, τα οποία εκφράζονται σε όλους τους ιστούς. Από αυτά, 5 ή 6 αντίστοιχα είναι εναλλακτικά^{36,177}, υφίστανται δηλαδή εναλλακτικό μάτισμα το οποίο είναι ειδικό για κάθε ιστό (Εικόνα 22).^{177,178}

Το φυσικό γονίδιο είναι το C και είναι το υπολειπόμενο σε σχέση με το T που προκαλεί ΣΔτ2.^{178, 179, 180}

Το T αλληλόμορφο βρίσκεται σε περίπου 20% του γενικού πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένων και σχεδόν το 30% των ανθρώπων της ευρωπαϊκής και αφρικανικής καταγωγής, αλλά μόνο το 2% των ανθρώπων ασιατικής καταγωγής. Αυτό αντανάκλα σε προσαρμοστική διατροφική μετάβαση από κοινωνία κυνηγών-συλλεκτών σε αγροτική.¹⁸¹

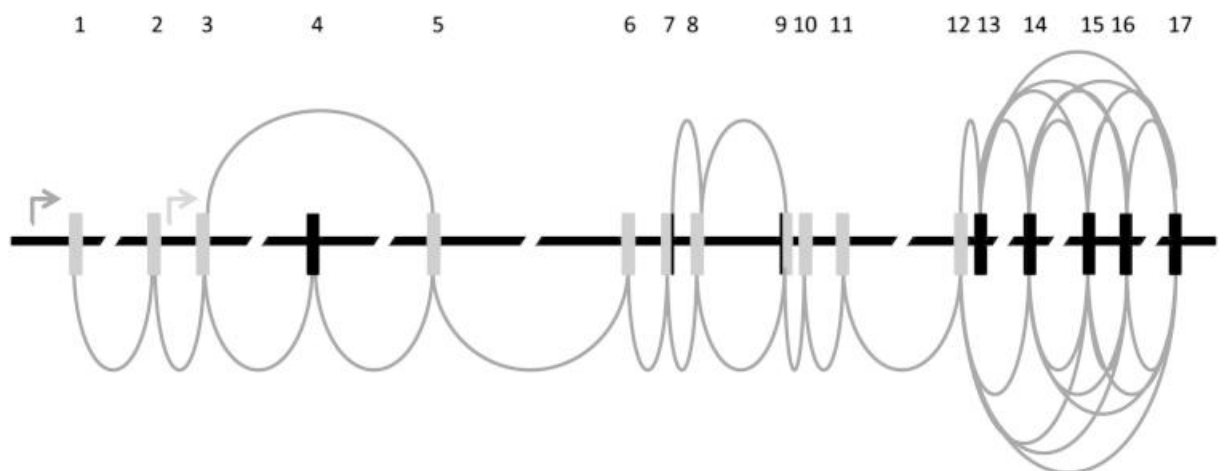


Εικόνα 22: Θέση του *TCF7L2* στο χρωμόσωμα 10¹⁷³

Ο Gaulton *et al* (2009) έχουν δείξει ότι η χρωματίνη του *TCF7L2* ιντρονίου είναι σε ανοικτή διαμόρφωση στα νησίδια. Περαιτέρω, ο διαβήτης που σχετίζεται με το T αλληλόμορφο του rs7903146 είναι σε μια πιο ανοικτή διαμόρφωση από το αλληλόμορφο C. Μια ανοικτή διαμόρφωση υποδεικνύει ρυθμιστικά στοιχεία του ενεργού γονίδιο τα οποία ενδέχεται να επηρεάσουν μεταγραφικά ποσοστά, τη χρήση υποκινητή και διαφορικό μάτισμα. Δοκιμασίες έδειξαν ενισχυμένη δράση του αλληλόμορφου T σε σύγκριση με το αλληλόμορφο C σε β-κυτταρικές σειρές. Αυτά τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση από το αλληλόμορφο κινδύνου στα νησίδια που οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο για ΣΔτ2.¹⁸²

Κοινές μη-κωδικοποιήσιμες παραλλαγές εντός του τόπου *TCF7L2* έχουν μια ισχυρή επίδραση στον ΣΔΠ μέσω αδιευκρίνιστων μηχανισμών. Έχει ταυτοποιηθεί ένας λειτουργικός πολυμορφισμός στα νησίδια, αν και αυτό δεν εξηγεί τη σχέση μεταξύ γονότυπου και γονιδιακής έκφρασης σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Τα ομόζυγα άτομα για τα αλληλόμορφα κινδύνου εκφράζουν 2,6 φορές υψηλότερα επίπεδα *TCF7L2* mRNA σε σύγκριση με άτομα ομόζυγα για τα αλληλόμορφα μη κινδύνου.¹⁸³

Το *TCF7L2* είναι μέλος της οικογένειας παραγόντων μεταγραφής, που ενεργοποιείται από την οδό WNT σηματοδότησης. Το γονίδιο εκτείνεται σε 215,9 kb και αποτελείται από 17 εξώνια. Το γονίδιο έχει δύο κύρια πεδία: ένα πεδίο δέσμευσης κατενίνης (εξόνιο 1) και μια κεντρική περιοχή δέσμευσης DNA (εξώνια 10 και 11). Τουλάχιστον πέντε εξώνια μπορεί εναλλακτικά να ματιστούν και οι περισσότεροι ανθρώπινοι ιστοί εκφράζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτού του παράγοντα μεταγραφής.¹⁸⁴ Αν και τα σχετιζόμενα SNPs με T2D βρίσκονται σε μη-κωδικοποιούμενες περιοχές δεν είναι σαφές αν αυτά τα SNPs, ή μια παραλλαγή που βρίσκεται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (LD) με αυτά, παίζουν ρόλο στην εναλλακτική συρραφή, στην γονιδιακή έκφραση, ή στην πρωτεϊνική δομή (Εικόνα 23).¹⁸³



Εικόνα 23: Δομή του γονιδίου *TCF7L2*

Τα βέλη υποδεικνύουν θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Οι γκριζες μπάρες δείχνουν τα εξώνια. Οι μαύρες μπάρες δείχνουν εναλλακτικά συγκολλημένα εξώνια. Οι κυκλικές γραμμές μεταξύ εξωνίων δείχνουν εναλλακτικά προϊόντα ματίσματος.¹⁸³

1.10.2. Δομή πρωτεΐνης *TCF7L2*

Η πρωτεΐνη που παράγεται από την έκφραση αυτού του γονιδίου είναι η *TCF7L2*, ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχει την περιοχή HMG (high mobility group), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το DNA και επηρεάζει την μεταγραφή αρκετών γονιδίων ασκώντας μια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών εντός του κυττάρου. Η πρωτεΐνη αυτή είναι κύριο συστατικό της σηματοδότησης μέσω του wnt/ β -κατενίνη σηματοδοτικού μονοπατιού. Η σηματοδότηση εξαρτάται από τα επίπεδα β -κατενίνης στο κύτταρο, η ρύθμιση της οποίας γίνεται σε στενά όρια. Απουσία σήματος wnt (όταν δηλαδή δεν συνδέονται οι wnt πρωτεΐνες στους υποδοχείς τους) οδηγεί σε φωσφορλίωση της β -κατενίνης και αποικοδόμηση. Όσο δεν υπάρχει διαθέσιμη β -κατενίνη η *TCF7L2* παραμένει συνδεδεμένη στα γονίδια στόχους του wnt και λειτουργεί ως καταστολέας. Όταν όμως διεγερθούν οι υποδοχείς, πυροδοτείται μια αλληλουχία γεγονότων που εμποδίζει την φωσφορλίωση και αποικοδόμηση της β -κατενίνης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της, την είσοδο της στον πυρήνα και το σχηματισμό διμερούς με την *TCF7L2*.¹⁸⁵ Το διμερές ενεργοποιεί τότε τα γονίδια στόχους, ειδικά την καταστολή σύνθεσης προγλυκαγόνου σε εντεροενδοκρινικά κύτταρα.¹⁷⁶

1.10.3. Μηχανισμός δράσης *TCF7L2*

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μια ιντρονική παραλλαγή επηρεάζει την παθοφυσιολογία μιας τόσο πολυσύνθετης νόσου όπως ο ΣΔτ2 είναι αδιευκρίνιστος. Ο *TCF7L2* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ασκεί τις δράσεις του συμμετέχοντας στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών άλλων γονιδίων. Παρόλα αυτά, επειδή οι παραλλαγές του *TCF7L2* εκφράζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο νοσηρότητας από ΣΔτ2 συγκριτικά με κάθε άλλη γενετική παραλλαγή που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα (σε Ευρωπαίους), καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια να αποκρυπτογραφηθεί ο μηχανισμός δράσης τους, χωρίς πάντως να έχει προταθεί ένας ολοκληρωμένος μηχανισμός.¹⁷⁸

Ένας προφανής δυναμικός ιστός-στόχος είναι τα παγκρεατικά νησίδια, και μια μελέτη της *TCF7L2* σε αυτόν τον ιστό διαπίστωσε αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε φορείς με αλληλόμορφο κινδύνου. Μια άλλη μελέτη διερεύνησε την έκφραση του γονιδίου *TCF7L2* σε επιπλέον ιστούς-στόχους: λιπώδη και μυϊκό ιστό. Σε αντίθεση με την μελέτη σε παγκρεατικά νησίδια, ορισμένες μορφές ματίσματος στον υποδόριο λιπώδη ιστό συσχετίστηκαν με χαμηλή έκφραση του γονιδίου *TCF7L2* σε άτομα ομόζυγα για τα αλληλόμορφα κινδύνου T, αλλά η έκφραση του γονιδίου *TCF7L2* δεν συσχετίστηκε σημαντικά με rs7903146 γονότυπο. Προτάθηκε σχετικά πρόσφατα ότι η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο ΣΔτ2 είναι χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι και μεγάλο μέρος της έρευνας σήμερα εμπλέκεται με την κατανόηση του ρόλου των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος του σώματος σε μεταβολικές διαταραχές. Τα επίπεδα του *TCF7L2* ρυθμίζουν την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και γενικότερα τη λειτουργία των β κυττάρων στα παγκρεατικά νησίδια. Η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης μέσω siRNA είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη

απόπτωση αλλά και την μείωση της επαγόμενης από τη γλυκόζη έκκρισης ινσουλίνης ενώ η τεχνητή υπερέκφραση του γονιδίου και η αύξηση της πρωτεΐνης εμφάνισε αντίθετα αποτελέσματα σε νησίδια ανθρώπων και ποντικών.¹⁸⁶

Επιπλέον, η ομάδα του Lyssenco διαπίστωσε διαταραγμένη έκκριση ινσουλίνης, φαινομένου ινκρετίνης αλλά και ηπατικής παραγωγής γλυκόζης στους φορείς του T αλληλόμορφου ενώ η αντίσταση στην ινσουλίνη δεν φάνηκε να επηρεάζεται. Πιστεύοντας πως η παρατηρούμενη διαφορά ήταν αποτέλεσμα τροποποιημένης έκφρασης του *TCF7L2* εξαιτίας της παρουσίας του T αλληλόμορφου, η ομάδα μέτρησε το mRNA σε νησίδια, απομονωμένα από διαβητικά και φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαβητικά νησίδια είχαν 5 φορές περισσότερο mRNA *TCF7L2* από τα φυσιολογικά. Η διαφορά δεν ήταν αποτέλεσμα της διαβητικής ή μη-κατάστασης καθώς η παρουσία της T στο rs7903146 αύξανε τη μεταγραφή και στα μη διαβητικά νησίδια. Από τη μία αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης *TCF7L2* φαίνεται να συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία των β κυττάρων και από την άλλη στη διαβητική κατάσταση φαίνεται να έχουμε αυξημένο *TCF7L2* mRNA εξαιτίας του ύποπτου T αλληλόμορφου.¹⁸⁷

Μια άλλη πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η θέση του rs7903146 είναι μια θέση στην οποία η χρωματίνη είναι ανοιχτή (προσβάσιμη) στα νησίδια του παγκρέατος, μια ιδιότητα εκλεκτική για τα νησίδια, κάτι που είναι σημαντικό γιατί οι θέσεις στις οποίες η χρωματίνη είναι ανοιχτή, είναι χαρακτηριστικές για κάθε ιστό.¹⁸² Η παρουσία του T αλληλόμορφου προσέδιδε στην περιοχή του rs7903146 καλύτερες ιδιότητες ενισχυτή σε σχέση με την παρουσία του C, αποτέλεσμα συμβατό με την αύξηση του μετάγραφου *TCF7L2* στους T φορείς. Μια ακόμη πιο πρόσφατη μελέτη σε μονοκύτταρα αιματικά κύτταρα επιβεβαίωσε την αύξηση των επιπέδων mRNA *TCF7L2* σε ομόζυγους TT σε σχέση με ομόζυγους CC κατά 2,6 φορές.¹⁸³ Οι μελέτες αυτές δείχνουν πως η αύξηση του *TCF7L2* mRNA είναι ένα άμεσο πρωτογενές αποτέλεσμα της παρουσίας του ύποπτου T αλληλόμορφου. Το *TCF7L2* υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε ιστό. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη εντόπισε ένα σήμα πολυαδενυλίωσης στο ιντρόνιο 4, χρωμοσωμική θέση στην οποία βρίσκεται και ο rs7903146. Το εναλλακτικό αυτό σήμα πολυαδενυλίωσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης, μικρότερης προφανώς της φυσιολογικής, η οποία διατηρεί τη δομή σύνδεσης με τη β-κατενίνη αλλά όχι το HMG-box που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση με το DNA. Μια τέτοια ισομορφή απομονώνει (δεσμεύει) τη β-κατενίνη και εμποδίζει την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του *TCF7L2*.¹⁸⁸

Οι παραπάνω μελέτες προσπαθούν να βρουν την άμεση σύνδεση του πολυμορφισμού με τον μηχανισμό παθογένεσης της νόσου, εστιάζοντας σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Ο *TCF7L2* βρέθηκε in vitro ότι συνδέεται με 3646 προωθητές γονιδίων σε παγκρεατικά νησίδια αρουραίων.¹⁸⁹ Μεταξύ των γονιδίων αυτών υπάρχουν και γνωστά γονίδια που εκφράζουν προδιάθεση (όπως το ADAMTS2 και το FTO) αλλά και γονίδια που σχετίζονται άμεσα με την ομοιόσταση της γλυκόζης όπως αυτό που κωδικοποιεί την προγλυκαγόνη. Μια άλλη μελέτη σε κυτταρική σειρά βρήκε πως η πρωτεΐνη συνδέεται σε 548 γονίδια εκ των οποίων ένα μεγάλο ποσοστό

εκφράζει κίνδυνο για διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του σακχαρώδη διαβήτη.¹⁹⁰

Ο *TCF7L2* μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών γονιδίων. Δεδομένης μάλιστα της ποικιλίας ισομορφών σε κάθε ιστό είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί ο ακριβής του ρόλος στην παθογένεση του ΣΔτ2. Μια κατεύθυνση που εξερευνήθηκε αρκετά από τους επιστήμονες είναι αυτή των ινκρετινών. Η έκφραση του γονιδίου της γλυκαγόνης, που κωδικοποιεί και για το GLP-1, βρέθηκε να ρυθμίζεται από το *TCF7L2* μέσω του wnt/ β -κατενίνης μονοπατιού σε νευροενδοκρινική κύτταραρική σειρά του εντέρου αλλά όχι σε αντίστοιχη παγκρεατική.¹⁹¹

Με βάση τα στοιχεία των μελετών, οι επιδράσεις του *TCF7L2* και των πολυμορφισμών του φαίνεται πως ασκούνται στο β -κύτταρο, χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί η σημασία στην εκδήλωση αντίστασης στην ινσουλίνη στο ήπαρ. Η μελέτη των διαφόρων ισομορφών μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη. Η πρόβλεψη του rs7903146 (C>T) είναι απαραίτητη στον τομέα της έρευνας φαρμάκων και θεραπεία ρουτίνας, όπου οι πληροφορίες θα είναι χρήσιμες σε κλινικό επίπεδο για την βελτιστοποίηση των αντιδράσεων της θεραπείας και των ανεπιθύμητων ενεργειών και να προβληθεί η αντίδραση στο φάρμακο σε άτομα που κινδυνεύουν από ΣΔτ2.¹⁷⁸

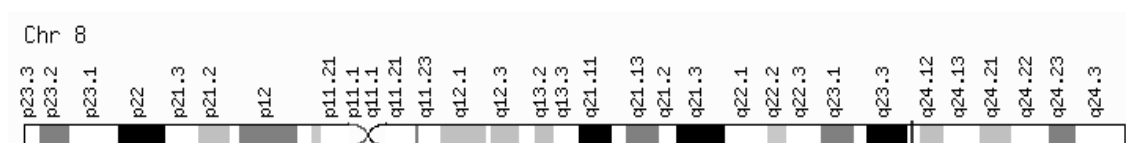
1.11. SOLUTE CARRIER FAMILY 30 (ZINC TRANSPORTER), MEMBER 8 (SLC30A8) rs13266634

Το *SLC30A8* είναι ένα από τα εννέα ανθρώπινα γονίδια για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Διευκολύνει την εκροή Zn^{+2} από το κύτταρο και την παγίδευση σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν την ύπαρξη συσχέτισης των πολυμορφισμών του γονιδίου *ZnT8* με ΣΔτ2 και ιδίως την κωδικοποίηση είτε Arg ή Trp στο aa325. Το μείζον, Arg325-κωδικοποιείται από C αλληλόμορφο και προσδίδει ένα μεγάλο κίνδυνο της εμφάνισης ΣΔΙΙ.¹⁹²

Προϊόν της έκφρασης του γονιδίου *SLC30A8* είναι ένας μεταφορέας ψευδαργύρου, ο ZnT-8, που ανήκει στην οικογένεια των CDF (carrier diffusion facilitator) πρωτεϊνών.

1.11.1. Δομή γονιδίου *SLC30A8*

Το γονίδιο *SLC30A8* βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24.11 και αποτελείται από 8 εξόνια που καταλαμβάνουν μια περιοχή 37kb (Εικόνα 24).^{193, 194}



Εικόνα 24: Θέση του *SLC30A8* στο χρωμόσωμα 8¹⁹⁴

Σε μη διαβητικά άτομα με οικογενειακό ιστορικό ΣΔτ2, το C αλληλόμορφο συνδέεται με την αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, αυξημένη κυκλοφορούσα αναλογία προϊνσουλίνης προς ινσουλίνη, και μειωμένη απόκριση ινσουλίνης σε ενδοφλέβια δοκιμή ανοχής στη γλυκόζη, υποδεικνύοντας μία κυρίαρχη επίδραση στην έκκριση ινσουλίνης.¹⁹²

Αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία και το ύποπτο αλληλόμορφο είναι το φυσικό κυτοσίνη (C) που κωδικοποιεί το αμινοξύ αργινίνη ενώ το μεταλλαγμένο είναι η θυμίνη (T) που κωδικοποιεί την τρυπτοφάνη.¹⁹⁵

1.11.2. Δομή πρωτεΐνης SLC30A8

Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ψευδαργύρου και ο εντοπισμός του ρυθμίζονται αυστηρά. Οι δύο κύριες συνιστώσες που εμπλέκονται στην ομοίωση του ψευδαργύρου είναι οι μεταλλοθειονίνες και οι μεταφορείς της κυτταρικής μεμβράνης. Οι μεταλλοθειονίνες εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική αποθήκευση και στη διακίνηση του ψευδαργύρου, ενώ οι μεμβρανικοί μεταφορείς εξασφαλίζουν τη μεταφορά του ψευδαργύρου κατά μήκος των βιολογικών μεμβρανών. Οι πρωτεΐνες Zip επιτρέπουν την ενδοκυτταρική πρόσληψη ψευδαργύρου, ενώ οι πρωτεΐνες μεταφορείς ψευδαργύρου (ZnT) επιτρέπουν την κυτταρική εκροή του ψευδαργύρου στον εξωκυττάριο χώρο ή σε ενδοκυτταρικά κυστίδια.¹⁹⁶

Μέχρι σήμερα, οι γενετικές και γονιδιωματικές μελέτες έχουν εντοπίσει επτά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην εξώθηση του ψευδαργύρου σε κύτταρα θηλαστικών που ονομάζονται ZnT-1 μέχρι -7. Η πρωτεΐνη SLC30A8 αποτελείται από 369 αμινοξέα και η προβλεπόμενη τοπολογία είναι η ίδια με τις άλλες ZnT πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων έξι διαμεμβρανικών περιοχών και έναν πλούσιο σε ιστιδίνη βρόγχο μεταξύ των διαμεμβρανικών περιοχών IV και V σύμφωνα με τις μελέτες των Chimienti *et al.*¹⁹³

Η περιεκτικότητα ψευδαργύρου στα παγκρεατικά κύτταρα είναι μεταξύ των υψηλότερων στο σώμα, αλλά λίγες πληροφορίες σχετικά με το ποιες πρωτεΐνες μπορούν να διαχειριστούν ψευδάργυρο στο κύτταρο είναι διαθέσιμες. Υπάρχουν μελέτες που έχουν προσδιορίσει ότι κάποια ZnT γονίδια εμπλέκονται στην πρόσληψη του ψευδαργύρου και στην αποθήκευσή του στα παγκρεατικά κύτταρα και η έκφραση τους ρυθμίζεται στα παγκρεατικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες ZnT έχουν ρόλους στη μεταφορά του ψευδαργύρου έξω από τα κύτταρα ή στην δέσμευση ψευδαργύρου σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Η ZnT-8 εμπλέκεται στην μετατόπιση του κυτταροπλασματικού ψευδαργύρου σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, εκφράζεται ειδικά στο πάγκρεας και εντοπίζεται σε εκκριτικά κοκκία ινσουλίνης. Αυτή η ZnT μπορεί να είναι ένα σημαντικό συστατικό για την παροχή ψευδαργύρου για ωρίμανση και/ή αποθήκευση της ινσουλίνης σε κυτταρικές διεργασίες παγκρεατικών κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου SLC30A8 είναι αυστηρά περιορισμένη στα κύτταρα νησιδίων του παγκρεάτος και οι μεταφορείς συγκεντρώνονταν κυρίως στη μεμβράνη παίζοντας σημαντικό ρόλο στην είσοδο ψευδαργύρου στα κοκκία.^{196,197}

Το 2009 οι Murgia C. *et al.* επιβεβαίωσαν πως τα νησίδια του παγκρέατος είναι ο κύριος ιστός στον οποίο εκφράζεται ο ZnT-8 σε πειράματα σε ποντίκια ενώ είδαν ότι μπορεί να εκφραστεί σε μικρότερο βαθμό και σε άλλα εκκριτικά όργανα όπως ο θυρεοειδής και ο φλοιός.¹⁹⁷

1.11.3. Μηχανισμός δράσης SLC30A8

Η σημασία του μεταφορέα, αλλά και του ίδιου του ψευδαργύρου στην ομοίωση της γλυκόζης τροποποιεί τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Είναι γνωστό πως ο ψευδάργυρος συμμετέχει σε κύριες κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η επιδιόρθωση του DNA, η προστασία από το οξειδωτικό στρες και η κυτταρική απόπτωση. Στα β-κύτταρα του παγκρέατος η περιεκτικότητα ψευδαργύρου είναι από τις μεγαλύτερες που παρατηρούνται σε ιστούς του σώματος. Η συσσώρευση αυτή δεν είναι τυχαία καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στο πακετάρισμα της ινσουλίνης στα εκκριτικά κοκκία.¹⁹⁸

Στο πάγκρεας, στα νησίδια του Langerhans, κυρίως στα κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη, συσσωρεύονται πολύ υψηλές ποσότητες ψευδαργύρου. Η ινσουλίνη πιστεύεται ότι αποθηκεύεται (κρυσταλλώνεται) μέσα σε εκκριτικά κυστίδια ως ένα στερεό εξαμερές που δεσμεύονται δύο Zn^{+2} ιόντα ανά εξαμερές. Η ινσουλίνη, που παράγεται και αποθηκεύεται σε παγκρεατικά κύτταρα απελευθερώνεται από εξωκύτωση σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης ή αργινίνης.¹⁹⁶ Η εξωκύτωση οδηγεί σε διάλυση του εξαμερούς και απελευθέρωση του συνδεδεμένου ψευδαργύρου, ο οποίος πιστεύεται πως μπορεί να ασκεί παρακρινή/αυτοκρινή έλεγχο στα γειτονικά κύτταρα.¹⁹⁸

Όταν πραγματοποιείται η εξωκυττάρωση της ινσουλίνης, κοκκία με ινσουλίνη συντήκονται με μεμβράνη πλάσματος και απελευθερώνουν τα περιεχόμενά τους, την ινσουλίνη καθώς και τον ψευδάργυρο, στην κυκλοφορία. Επιπλέον, εκεί φαίνεται να είναι μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ ψευδαργύρου και ΣΔτ1 και ΣΔτ2, διότι διάφορες επιπλοκές του διαβήτη μπορεί να προκαλούνται μέσω του οξειδωτικού στρες, το οποίο ενισχύεται εν μέρει από ανεπάρκεια ψευδαργύρου. Ως εκ τούτου, ο ψευδάργυρος είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της αποθήκευσης και της έκκρισης ινσουλίνης και αναμφίβολα τα κύτταρα χρειάζονται πολύ αποδοτικούς και εξειδικευμένους μεταφορείς για να συσσωρεύουν ψευδάργυρο στα εκκριτικά κυστίδια.¹⁹⁶

Η οδός της σύνθεσης και έκκρισης ινσουλίνης, καθώς και ενδεχομένως η ενδοκυττάρια ομοίωση του ελεύθερου ψευδαργύρου επηρεάζεται από περισσότερες από μία ZnT στα παγκρεατικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες ZnT υπάρχουν σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, δηλαδή, η ZnT-1 στην κυτταρική μεμβράνη και η ZnT-5 στην συσκευή Golgi, και είναι απαραίτητα για να αμβλυνθούν ο κυτταροπλασματικός ψευδάργυρος και στην μεταφορά ψευδαργύρου στις σωστές τοποθεσίες στο κύτταρο. Επιπλέον, η φυλογενετική ανάλυση καταδεικνύει ότι η ZnT-8 είναι στενά συνδεδεμένη με τις ZnT-2, -3, -4, μια υποοικογένεια της ZnT πρωτεϊνών που συμμετέχει σε εκκριτική/συναπτική μεταφορά κυστιδίων και λυσοσωμικά/ενδοσωμικά κυστίδια αποθήκευσης ψευδαργύρου σε διαφορετικά

κύτταρα. Λαμβανόμενα μαζί, αυτά τα δεδομένα είναι ισχυρά και υποδηλώνουν ότι η ZnT-8 εμπλέκεται στη μεταφορά του ψευδαργύρου σε ένα μοναδικό κυστικό διαμέρισμα, στα εκκριτικά κυστίδια ινσουλίνης στα παγκρεατικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, η ZnT-8 μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της ινσουλίνης, στην αποθήκευση, ή/και την έκκριση.¹⁹⁶

Ο ψευδάργυρος είναι γνωστό ότι παίζει βασικό ρόλο στη σύνθεση και στη δράση της ινσουλίνης, τόσο φυσιολογικά όσο και στην παθολόγο κατάσταση του διαβήτη. Απαιτείται για τη σύνθεση της ινσουλίνης και την αποθήκευση και έτσι μεγάλες ποσότητες ψευδαργύρου απελευθερώνονται με ινсуλίνη μετά από διέγερση με γλυκόζη. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την ανατομική δομή των νησιδίων του Langerhans, είναι πιθανό ότι τα κύτταρα ρυθμίζουν επίσης λειτουργία των γειτονικών κυττάρων μέσω παρακρινών/αυτοκρινών αλληλεπιδράσεων.¹⁹⁶

Έτσι, ο ψευδάργυρος είναι πρωταρχικής σημασίας τόσο για την έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα όσο και για την επικοινωνία παρακρινών/αυτοκρινών νησιδίων. Αναφορικά με παθολογικές καταστάσεις, φαίνεται να υπάρχει μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ ψευδαργύρου και ΣΔτ1 και ΣΔτ2. Διαμορφώσεις της περιεκτικότητας σε ψευδάργυρο σε ολόκληρο το σώμα που επάγονται στη παθολογική κατάσταση του διαβήτη μπορεί να έχουν επιπλοκές. Η κυρίαρχη δράση του διαβήτη στην ομοίωση του ψευδαργύρου είναι τα χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπερ-ψευδαργυρουρία, την μειωμένη απορρόφηση, ή και τα δύο.¹⁹⁶

Πριν από σαράντα χρόνια, οι Quarterman *et al* απέδειξαν ότι αρουραίοι που είχαν στερηθεί ψευδάργυρο είχαν εξασθενημένη απόκριση της έκκρισης ινσουλίνης σε διέγερση γλυκόζης καθώς και άλλες μελέτες έδειξαν μειωμένη περιεκτικότητα ινσουλίνης σε κύτταρα νησιδίων σε κατάσταση ελλείψεως ψευδαργύρου. Αντίθετα, τα συμπληρώματα ψευδαργύρου βελτιώνουν σημαντικά την υπεργλυκαιμία των διαβητικών ποντικών. Επιπλέον, η ενδοκυτταρική εξάντληση του ψευδαργύρου που προκαλείται από τον διαβήτη μπορεί να έχει άλλες επιπτώσεις. Επίσης, η υπερβολική απόπτωση των παγκρεατικών κυττάρων έχει συσχετιστεί με διαβήτη. Επειδή ο ψευδάργυρος είναι ένας ισχυρός αναστολέας της απόπτωσης, η εξάντληση του ψευδαργύρου από μόνη της μπορεί να ενισχύσει την κυτταρική απόπτωση. Συμπερασματικά, ο ψευδάργυρος παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε όλες τις διαδικασίες της ινσουλίνης, δηλαδή, τη σύνθεση, την αποθήκευση, την έκκριση, και την επικοινωνία των κυττάρων Langerhans. Επιπλέον, οι διαμορφώσεις ψευδαργύρου μπορεί να έχουν επιβλαβή επιρροή στο διαβήτη. Έτσι, ο ZnT-8 μπορεί να είναι ένα σημαντικό στοιχείο στην παροχή ψευδαργύρου στην ωρίμανση της ινσουλίνης και/ή στις διαδικασίες αποθήκευσης στα κύτταρα που εκκρίνουν ινсуλίνη.¹⁹⁶

Εξειδικευμένοι φορείς και πρωτεΐνες (μεταλλοθειονίνες) ρυθμίζουν τις διαδικασίες εισόδου και εξόδου του ιόντος από τα κύτταρα, όμως στα εκκριτικά κοκκία σημαντικό ρόλο παίζει ο ZnT-8, που εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο β-κύτταρο. Πρόκειται για ρυθμιστή της χωρητικότητας του β-κυττάρου καθώς σε μελέτες στην κυτταρική σειρά INS-1E η υπερέκφραση του γονιδίου του μεταφορέα σχετιζόταν με αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ιόντος και της ικανότητας του να το αποθηκεύει, ανεξάρτητα από τις εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις. Κάτι τέτοιο μάλιστα

φάνηκε να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγουν χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντος ενώ δεν το καθιστούσε ευάλωτο σε έκθεση σε υψηλές, τοξικές συγκεντρώσεις.¹⁹⁹

Είναι λοιπόν σαφές από μελέτες τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα πως ο μεταφορέας ZnT-8 είναι σημαντικός για την ομοίωση της γλυκόζης επηρεάζοντας την λειτουργία των β-κυττάρων και τη δυναμική της έκκρισης ινσουλίνης αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Ο μεταφορέας έχει επίσης αναγνωριστεί ως σημαντικό αυτοαντιγόνο και στον ΣΔτ1.²⁰⁰

Η προβληματική μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη, το ανεπαρκές πακετάρισμα της ινσουλίνης στα κυστίδια, αλλά και η γενικότερη έκπτωση της λειτουργίας των β-κυττάρων (μείωση μάζας λόγω αυξημένης απόπτωσης ή μειωμένου πολλαπλασιασμού) είναι πιθανό να προκύπτουν από προβληματική διαχείριση του ψευδαργύρου λόγω μιας παραλλαγμένης πρωτεΐνης εξαιτίας του rs13266634C.⁸⁵ Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ανικανότητα των κυστιδίων αυτών να εισάγουν επαρκή ποσότητα ψευδαργύρου ώστε να κρυσταλλώσουν και να πακετάρουν επαρκώς την ινσουλίνη. Η ανεπάρκεια του ιόντος προκαλεί προβλήματα στη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη, διαδικασία που ολοκληρώνεται στα κυστίδια. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι πρωτεΐνες που ελέγχουν τη μετατροπή αυτή εκφράζονται λιγότερο, πιθανόν λόγω ανεπάρκειας ψευδαργύρου, που είναι γνωστός συν-παράγοντας μεταγραφικών στοιχείων.¹⁹⁹

Επίσης, ίσως πρέπει να αξιολογηθεί επαρκέστερα και ο ρόλος του ιόντος στα ακύτταρα, καθώς παραμένει αμφιλεγόμενο αν η αύξηση των επιπέδων του, προκαλεί ελάττωση της έκκρισης γλυκαγόνης.^{201,202}

Η μελέτη του *SLC30A8* δείχνει τις προοπτικές που προσφέρει η μελέτη της γενετικής καθώς φωτίζοντας τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια της νόσου, βοηθά τόσο στην κατανόηση όσο και στη θεραπεία της νόσου καθώς ο μεταφορέας ZnT-8 θα μπορούσε να αποτελέσει φαρμακολογικό στόχο νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων.

1.12. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA-2 GENE (PPAR γ 2) POLYMORPHISM rs 1801282

Ένα μεγάλο και αυξανόμενο σώμα της βιβλιογραφίας έχει διερευνήσει τη σχέση του πολυμορφισμού Pro12Ala του γονιδίου *PPAR γ 2* και διάφορων διαταραχών όπως ο ΣΔτ2, η ευαισθησία στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία, ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος και η νόσος Αλτσχάιμερ.²⁰³ Οι PPARs είναι προσδέτες ενεργοποιημένων παραγόντων μεταγραφής που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, και ρυθμίζουν διάφορες βιολογικές διεργασίες. Πιστεύεται ότι προέρχονται από έναν κοινό προγονικό υποδοχέα 600 εκατομμυρίων ετών.²⁰⁴

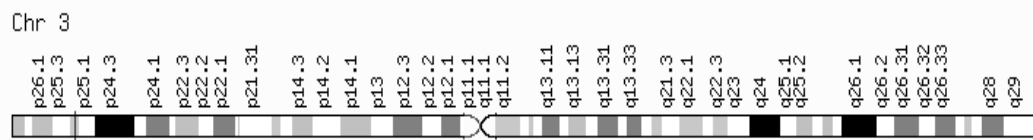
1.12.1. Ιστορικά στοιχεία PPAR

Ο PPAR αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε αρουραίους που έλαβαν θεραπεία με κλοφιβράτη στη δεκαετία του 1960. Αργότερα, ένας αριθμός ενώσεων

ανακαλύφθηκαν οι οποίοι μοιράζονται το ίδιο χαρακτηριστικό της επαγωγής του πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωμάτων. Έτσι πήραν το όνομά τους ως πολλαπλασιαστές υπεροξυσωμάτων. Το 1990, ο πρώτος υποδοχέας για αυτές τις ενώσεις κλωνοποιήθηκε από ήπαρ ποντικού και ονομάστηκε ως υποδοχέας που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστές υπεροξυσώματος (PPAR). Σύντομα, έγινε αντιληπτό ότι οι PPARs στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύουν μία ομάδα από τρεις υποδοχείς PPAR-α, PPAR-β/δ και PPAR-γ.²⁰⁴

1.12.2. Δομή γονιδίου *PPARγ2*

Το γονίδιο *PPARγ2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p25.2 στη θέση 12351626 και έχει 11 εξόνια (Εικόνα 25).²⁰⁵



Εικόνα 25: Θέση του *TCF7L2* στο χρωμόσωμα 3²⁰⁶

Η *PPARγ2* θεωρείται ως βασικό στοιχείο στην ομοιόσταση της γλυκόζης, στον μεταβολισμό λιποπρωτεϊνών και στην αγγειακή ομοιόσταση. Ο πιο κοινός πολυμορφισμός του *PPARγ2* γονιδίου είναι ο Pro12Ala (rs1801282) πολυμορφισμός, ο οποίος δημιουργεί μια ανταλλαγή κυτοσίνης-γουανίνης (CCA προς GCA), που επηρεάζει το αμινοτελικό άκρο που ορίζει την ειδική *PPARγ2* ισομορφή στα λιποκύτταρα οπότε η προλίνη γίνεται αλανίνη.²⁰⁵ Το πιο κοινό (C) αλληλόμορφο (σε dbSNP προσανατολισμό) κωδικοποιεί την προλίνη σε αυτή τη θέση SNP στο υπόλειμμα 12 της πρωτεΐνης *PPARγ2*. Λειτουργική ανάλυση αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας που εκφράζει αυτό το αλληλόμορφο εμφανίζει μειωμένη συγγένεια-σύνδεση με το DNA και εξασθενημένη μεταγραφική δραστηριότητα στα γονίδια στόχους.²⁰⁷

Το rs1801282 έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο, αλλά υπάρχουν και μελέτες που δεν μπόρεσαν να αναπαράγουν οποιαδήποτε ισχυρή ή σημαντική επίδραση.²⁰⁸ Το φυσικό γονίδιο είναι το C και είναι το υπολειπόμενο σε σχέση με το G που προκαλεί παχυσαρκία.²⁰⁹

1.12.3. Δομή πρωτεΐνης *PPARγ2*

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η *PPARγ* και είναι ένας ρυθμιστής της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. Η *PPARγ* έχει ενοχοποιηθεί για την παθολογία πολλών νόσων όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση και

ο καρκίνος.²⁰⁶ Αρκετές έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι η λιπογένεση, η ομοιόσταση της γλυκόζης και ο μεταβολισμός των λιπιδίων είναι οι κύριοι μηχανισμοί PPAR γ . Συμμετέχουν επίσης στη βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη και έχουν βασικό ρόλο στη φλεγμονή και στην νεοπλασματική ανάπτυξη.²⁰⁴

Έχουν περιγραφεί παραλλαγές εναλλακτικού ματίσματος που κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές.²⁰⁶ Όλες οι ισομορφές PPAR λειτουργούν κυρίως ως παράγοντες μεταγραφής. Ελέγχουν και ρυθμίζουν την έκφραση του μεγάλου αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση του ενδιάμεσου μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων, στην ομοιόσταση, στην λιπογένεση, στην ευαισθησία στην ινσουλίνη, στην ανοσοαπόκριση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση.²⁰⁴

Υπάρχουν τρεις ισομορφές των PPAR γ που έχουν καλά ταυτοποιηθεί: η *PPAR γ 1*, *PPAR γ 2*, και *PPAR γ 3* και προέρχονται από το ίδιο γονίδιο με τη χρήση εναλλακτικών εκκινητών. Η *PPAR γ 1* διαφέρει με την παρουσία 30 αμινοξέων επιπλέον στο N-τελικό άκρο. Οι μεταγραφές RNA των *PPAR γ 1* και γ 3 μεταφράζονται σε πανομοιότυπη *PPAR γ 1* πρωτεΐνη. Από μελέτες σε knock-out ποντίκια, δηλαδή σε ποντίκια που είχαν πλήρη απουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ήταν φανερό ότι οι PPAR γ είναι ειδικοί για λιποκύτταρα εκφράζοντας υποκυτταρικά λιποκύτταρα, ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη στο ήπαρ, αλλά όχι στους μύες. Ωστόσο, δεδομένου ότι η έκφραση του PPAR γ είναι εξαρτώμενη από τους ιστούς, η *PPAR γ 1* βρίσκεται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών, η *PPAR γ 2* περιορίζεται σε λιπώδη ιστό και η *PPAR γ 3* είναι άφθονη στα μακροφάγα, στο παχύ έντερο, και στο λευκό λιπώδη ιστό.²⁰⁴

Η ισομορφή *PPAR γ 2* συμπεριφέρεται ως ένας «μοριακός αισθητήρας» δεσμευτικός για ένα ευρύ φάσμα μορίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, και έχει μελετηθεί εκτενώς στο διαβήτη και στην παχυσαρκία λόγω του ρόλου της στην ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης.²¹⁰ Ο *PPAR γ 2* ενεργοποιείται με την σύνδεση, εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό και ασκεί ένα ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, στην αποθήκευση των λιπιδίων, στην ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη και έχει καθοριστικό ρόλο στην εμπλοκή του λιπώδους ιστού στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε θεραπευτική κατάσταση. Η ενεργοποίηση του γονιδίου PPAR γ 2 οδηγεί σε προς τα πάνω ρύθμιση των γονιδίων που μεσολαβούν στην πρόσληψη λιπαρών οξέων.²⁰⁷

Η *PPAR γ 2* παρουσιάζει ένα πολύ περιορισμένο πρότυπο έκφρασης και παρατηρείται κυρίως σε λιπώδη ιστό, όπου ρυθμίζει την διαφοροποίηση λιποκυττάρων και το μεταβολισμό των λιπιδίων.²¹⁰ Εκφράζεται επίσης σε ανοσολογικά/φλεγμονώδη κύτταρα (π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα), στο βλεννογόνο του παχέος και του τυφλού εντέρου, καθώς και στον πλακούντα. Η έκφρασή της είναι χαμηλότερη στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ. Είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση και την λειτουργία των λιποκυττάρων και προάγει την συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Επίσης έχει την ικανότητά να ρυθμίζει την κυτταρική διαφοροποίηση σε πολλές κυτταρικές γραμμές όπως τα κερατινοκύτταρα, λιποκύτταρα, ή τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.²⁰⁴

1.12.4. Μηχανισμός δράσης PPAR γ 2

Όπως είναι γνωστό η ινσουλίνη είναι ο πιο ισχυρός φυσιολογικός αναβολικός παράγοντας, προωθώντας την αποθήκευση και τη σύνθεση των λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων και αναστέλλοντας την κατανομή τους και την απελευθέρωση στην κυκλοφορία.²⁰⁴

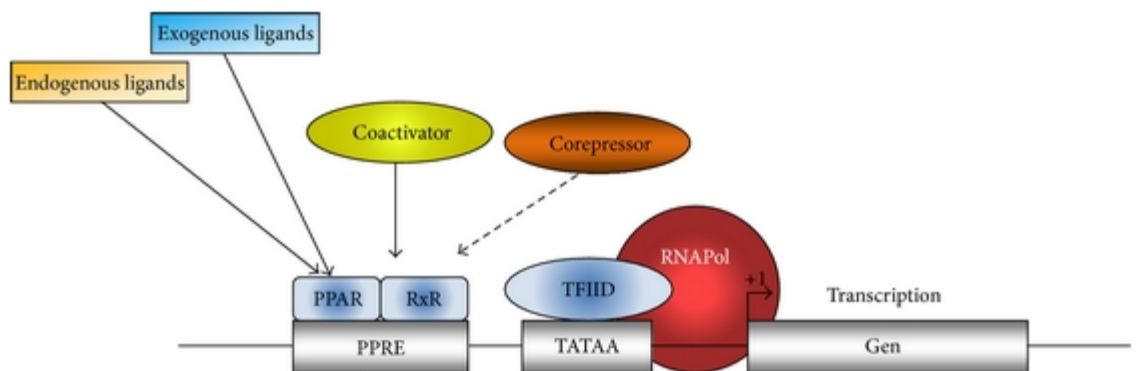
Το πρώτο βήμα κατά το οποίο η ινσουλίνη αυξάνει την αποθήκευση ενέργειας ή την χρησιμοποίηση της, περιλαμβάνει τη ρυθμιζόμενη μεταφορά της γλυκόζης στο κύτταρο, που προκαλείται από τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT4. Η ινσουλίνη αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης κυρίως εμπλουτίζοντας τη συγκέντρωση των GLUT4 πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη, παρά με την αύξηση της ενδογενούς δραστηριότητας του μεταφορέα. Οι PPAR γ αγωνιστές ενεργοποιούν μια αύξηση στις συγκεντρώσεις της αδιπνεκτίνης πλάσματος, μια ορμόνη που εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό που βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με ΣΔτ2. Η αδιπνεκτίνη αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Σε γενικές γραμμές, η αδιπνεκτίνη βελτιώνει την ευαισθησία ινσουλίνης στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ και μειώνει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ, έχοντας σαν αποτέλεσμα μειωμένα κυκλοφορούντα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια και επίπεδα γλυκόζης. Είναι δελεαστική η υπόθεση ότι η ποικιλομορφία των λειτουργιών των PPAR έχει αποκτηθεί σε συνδυασμό με την πλούσια ποικιλία των προσδετών.²⁰⁴

Έχουν ταυτοποιηθεί μια ποικιλία από ενδογενείς και συνθετικούς προσδέτες για PPARs. Η ενεργοποίηση των PPARs με ένα κατάλληλο προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη συν-ενεργοποιητών και απώλεια συν-καταστολέων που αναδιαμορφώνει την χρωματίνη και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων. Επιπλέον, η ποικίλη κατανομή στους ιστούς έχει δείξει ότι έχει πολλαπλές λειτουργίες κατά την ενεργοποίηση όπως η οξείδωση των λιπαρών οξέων και η αντιφλεγμονώδης δράση.² Πρόσφατα, ένα μεγάλο μέρος της έρευνας έχει επικεντρωθεί στα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα της ενεργοποίησης του PPAR από ενδογενείς και εξωγενείς προσδέτες σε περιφερικά όργανα και στο ΚΝΣ μετά από οξείες και χρόνιες προσβολές.²¹⁰

Γονιδιωματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PPAR γ συνδέεται με διάφορα γονίδια που επηρεάζουν τη δράση της ινσουλίνης. Αυτός ο υποδοχέας προκαλεί καταστολή της δράσης της ινσουλίνης και προωθεί την αντίσταση στην ινσουλίνη. Συγκεκριμένα, η PPAR γ φαίνεται να σχετίζεται με τα γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά λιπαρών οξέων, το σχηματισμό λιπιδίων σταγονιδίων και σύνθεση TAG. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του PPAR γ αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη των λιποκυττάρων και αυτό μπορεί να διαμεσολαβείται εν μέρει από την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες της οδού σηματοδότησης της ινσουλίνης.²⁰⁴

Αν και υπήρξαν αντιφατικά αποτελέσματα από knock-out μοντέλα PPAR γ εντός της νησίδας, μια ευρύτερη κατανόηση του ρόλου του PPAR γ στο πάγκρεας έχει παρασχεθεί από μια σειρά από μελέτες που βασίζονται σε κύτταρα. Για να ερμηνευθούν αυτές οι μελέτες, είναι χρήσιμο να επανεξεταστούν οι μοριακοί μηχανισμοί της δράσης του PPAR γ .²¹¹

Για να λειτουργήσει ως μεταγραφικός ρυθμιστής, η PPAR γ θα πρέπει να ενεργοποιηθεί με προσδέτη, οπότε υφίστανται ετεροδιμερισμός με τους υποδοχείς ρητινοειδούς X (RXRs:NR2B) και πρόσληψη συν-παραγόντων που αναγνωρίζουν ειδικά στοιχεία απόκρισης πολλαπλασιαστή περοξυσώματος (PPREs) στην περιφέρεια του 5' προαγωγέα του γονιδίου-στόχου για να ρυθμιστεί η μεταγραφή του. Η συναινετική αλληλουχία για μια PPRE αποτελείται από δύο απευθείας επαναλήψεις που αποτελούνται από AGGTCA (άμεση επανάληψη 1 και 2 ή DR1 και DR2) που χωρίζονται από ένα νουκλεοτίδιο, αν και έχουν περιγραφεί αρκετές παραλλαγές αυτής της σύνδεσης. Μέσα σε ένα τυπικό PPRE, το 5'-μισο καταλαμβάνεται από PPAR γ , ενώ το 3'-μισο καταλαμβάνεται από RXR. Περαιτέρω, αυστηρή πρόσδεση του RXR στο 3'-ήμισο του PPRE έχει μεγαλύτερη επιρροή επί της συνδέσεως του PPAR γ / RXR ετεροδιμερές από την ικανότητα του PPAR γ να δεσμεύουν το DNA. Επιπλέον, η PPAR γ έχει δείχθει ότι προσδέεται ως ομοδιμερές σε παλίνδρομες αλληλουχίες που διαχωρίζονται από τρία νουκλεοτίδια. Σε απουσία προσδέτη, η PPAR γ δεσμεύεται από ένα συν-καταστολέα και τα μεταγραφικά αποτελέσματα μπλοκάρονται (Εικόνα 26).²¹¹

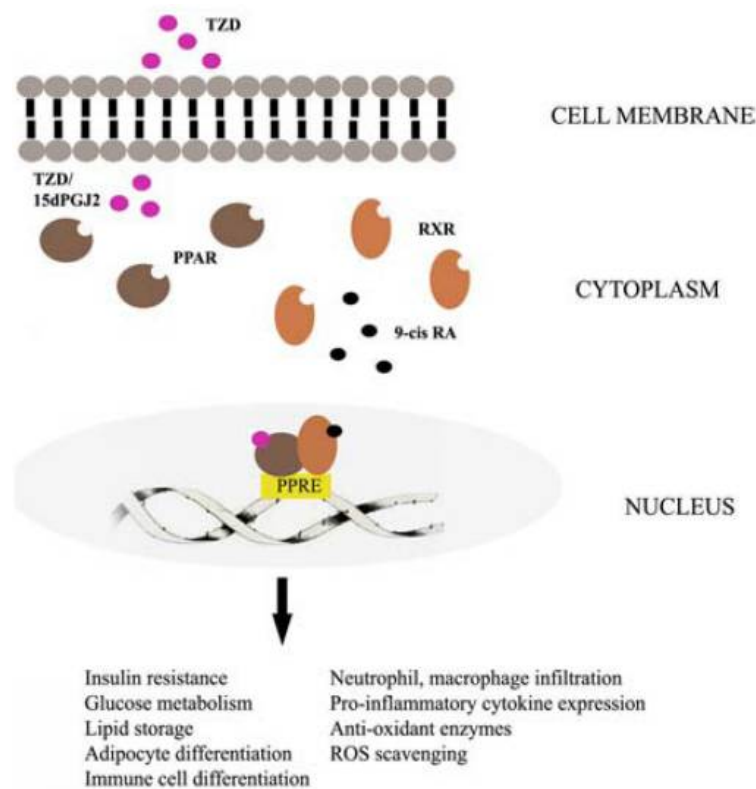


Εικόνα 26: Μηχανισμοί μεταγραφής του γονιδίου PPAR²¹¹

Στην απενεργοποιημένη κατάσταση, οι PPAR αλληλεπιδρούν με τον συνκαταστολέα και αυτό το συγκρότημα έχει δραστικότητα αποακετυλάσης ιστόνης αναστέλλοντας έτσι τη διαδικασία μεταγραφής. Μετά την σύνδεση του εξωγενούς προσδέτη (φάρμακο) ή ενδογενούς προσδέτη (λιπαρά οξέα, προσταγλανδίνες, κλπ), με τον PPAR να ενεργοποιείται και να ετεροδιμερίζεται με τον RXR και να στρατολογεί συν-ενεργοποιητές, οι οποίοι έχουν δραστικότητα ακετυλάσης ιστόνης διευκολύνοντας την μεταγραφή αρκετών γονιδίων

Μετά την δέσμευση με PPAR γ , το ετεροδιμερές σύμπλοκο PPAR γ :RXR προσλαμβάνει συν-παραγόντα και ενεργοποιεί (ή καταστέλλει) γονίδια – στόχους που

είναι υπό τον έλεγχο PPAR. Από την άλλη πλευρά, στην απουσία ενός προσδέτη, το σύμπλοκο PPAR γ :RXR μπορεί να προσλάβει συνκαταστολέα και να συνδεθεί με PPRE, καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Εικόνα 27).²¹⁰



Εικόνα 27: Διμερισμός PPAR και RXR

Μετά την πρόσδεση, η PPAR και RXR διμερίζονται. Το ετεροδιμερές σύμπλοκο μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τα PPRE για την ενεργοποίηση ή *trans*-καταστολή των γονιδίων. Αυτό οδηγεί στην διαφοροποίηση αρκετών φυσιολογικών και παθολογικών εκδηλώσεων.²¹⁰

Οι PPARs είναι ρυθμιστές μεταγραφής που εμπλέκονται σε διάφορες μεταβολικές οδούς και είναι σε θέση να παρεμβαίνουν σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες καθώς και να αλλάζουν διαδικασίες που τελικά οδηγούν σε παθολογία. Η μεγάλη χωρητικότητά του και η αυστηρή θέση ελέγχου επιτρέπουν σε αυτές τις ρυθμιστικές αρχές του πυρήνα να ελέγχουν πολύπλοκες διαδικασίες, όπως η φλεγμονή και ο έλεγχος της ενεργειακής ομοιόστασης. Ένας άλλος παράγοντας που τους καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέροντες είναι η ικανότητά τους να ενεργοποιούνται ή να καταστέλλονται από εσωτερικούς ή φυσικούς προσδέτες και συνθετικούς ή εξωγενείς προσδέτες. Αυτή η ικανότητα ανοίγει χιλιάδες δυνατότητες στη θεραπεία διαφόρων

παθολογικών καταστάσεων με πολλές διαδικασίες που είναι ικανές να ελέγχουν γονίδια.²⁰⁴

Η PPAR γ είναι επίσης γνωστό ότι ρυθμίζει τα συστατικά του κλασσικού K_{ATP}-εξαρτώμενου μονοπατιού και ρυθμίζει την έκκριση ινσουλίνης από το β παγκρεατικό κύτταρο. Οι προαγωγοί της GLUT2 και γλυκοκινάσης έχουν αναφερθεί ότι έχουν λειτουργικές PPREs που δεσμεύουν τον PPAR γ σε γ /RXRa ετεροδιμερές, και η ενεργοποίηση του PPAR γ οδηγεί σε μεταγραφική upregulation αυξορρυθμισμένη αυτών των γονιδίων στο κύτταρο β . Σε αυτό το μοντέλο, η γλυκόζη παραλαμβάνεται εντός του β κυττάρου μέσω του μεταφορέα γλυκόζης (GLUT). Στα ανθρώπινα β κύτταρα, η GLUT1 φαίνεται να παίζει πιο σημαντικό ρόλο, ενώ στα τρωκτικά η GLUT2 είναι η κυρίαρχη ισόμορφη.²¹¹

Η PPAR γ έχει την ικανότητα να δεσμεύει μία ποικιλία μικρών λιπόφιλων ενώσεων που προέρχονται από τον μεταβολισμό και τη διατροφή, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τους ειδικούς συν-παράγοντες μεταγραφής που στρατολογούνται και τελικά τις πολύπλοκες οδούς με τις οποίες ρυθμίζεται η μεταγραφή γονιδίου.²¹⁰

1.12.5. Ρόλος PPAR γ 2 στον ΣΔτ2

Η ενεργοποίηση του PPAR γ στον παγκρεατικό β κύτταρο έχει συνδεθεί με μια ποικιλία από επιδράσεις στο πλαίσιο του ΣΔτ2. Υπάρχει ένας αριθμός τοξικών μεσολαβητών σε ΣΔτ2 που οδηγούν σε ενεργοποίηση των οδών στρες. Αυτά περιλαμβάνουν αυξημένη γλυκόζη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και αμυλοειδές πολυπεπτίδιο νησίδης (IAPP). Οι παράγοντες αυτοί εργάζονται για την προώθηση της δυσλειτουργίας των β κυττάρων και του θανάτου μέσα από διάφορους μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων του οξειδωτικού στρες, της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, επιγενετικής διαταραχής και της ενεργοποίησης των οδών στρες. Επιπλέον, αν και έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο, η ενεργοποίηση του PPAR μπορεί επίσης να ενισχύσει τη λειτουργία β κυττάρων και την επιβίωση μέσω της ενεργοποίησης μη γονιδιωματικών οδών.²¹¹

Το β -κύτταρο είναι το μόνο κύτταρο του οργανισμού που είναι υπεύθυνο για την φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης. Έτσι διαθέτει ένα συμπλήρωμα υψηλής εξειδίκευσης κυτταρικού μηχανισμού για να ολοκληρώσει τα βασικά καθήκοντα της αίσθησης της γλυκόζης και την απελευθέρωση της ινσουλίνης. Κατά την είσοδο εντός του β κυττάρου, η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκόζη-6-φωσφορική από γλυκοκινάση. Η γλυκοκινάση, σε αντίθεση με άλλες ισομορφές εξοκινάση σε άλλους τύπους ιστών, έχει χαμηλή συγγένεια (υψηλή K_m) για γλυκόζη, εμφανίζει ύπαρξη συνεργασίας σε σχέση με την γλυκόζη και χρησιμεύει ως το στάδιο περιορισμού του ρυθμού για την πρόσληψη γλυκόζης. Η 6-φωσφορική γλυκόζη στη συνέχεια μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ στη γλυκολυτική οδό, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ακετυλο συνένζυμο Α (CoA) και εισέρχεται στον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Ο κύκλος TCA παράγει αναγωγικά ισοδύναμα και ATP με αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας ATP/ADP εντός της νησίδας. Αυτή η αύξηση στην αναλογία ATP/ADP επιφέρει το κλείσιμο των καναλιών K_{ATP}, οδηγώντας σε μεμβρανική εκπόλωση και την επακόλουθη ενεργοποίηση των τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca²⁺

καθώς και εισροή Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο και ER. Αυτή η αύξηση της κυτοσολικής Ca^{2+} υπηρετεί εν τέλει την ενεργοποίηση της ινσουλίνης και την απελευθέρωση από μια δεξαμενή άμεσης απελευθέρωσης εκκριτικών κυστιδίων.²¹¹

1.12.6. Ανθρώπινες νόσοι και θεραπευτική, αγωνιστές PPAR γ

Η παθογένεση του ΣΔτ2 περιλαμβάνει τόσο την περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη όσο και τη δυσλειτουργική έκκριση ινσουλίνης από παγκρεατικά β κύτταρα. Επί του παρόντος, υπάρχει έντονη ερευνητική εστίαση στην οριοθετεί τις αιτιολογίες της δυσλειτουργίας παγκρεατικών β κυττάρων στο ΣΔτ2. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει μία ανικανοποίητη κλινική ανάγκη για τη δημιουργία θεραπευτικών κατευθυντήριων γραμμών και στρατηγικών που δίνουν έμφαση στην διατήρηση της λειτουργίας των παγκρεατικών β κυττάρων σε κίνδυνο και σε προσβεβλημένα άτομα. Οι θειαζολιδινεδιόνες είναι από το στόματος δραστικοί παράγοντες που έχουν εγκριθεί για χρήση σε ΣΔτ2 και δρουν ως αγωνιστές του πυρηνικού υποδοχέα ορμόνης PPAR γ . Αυτά τα φάρμακα βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη, αλλά υπάρχει επίσης μια αυξανόμενη εκτίμηση των δράσεων PPAR γ εντός του κυττάρου β . Η PPAR γ έχει δείχθει ότι ρυθμίζει άμεσα βασικά γονίδια β κυττάρων που εμπλέκονται στην αίσθησης γλυκόζης, την έκκριση ινσουλίνης και την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης.²¹¹

Με δεδομένο την ευρύτερη και εξελισσόμενη κατανόηση του ρόλου του β κυττάρου στην παθογένεση του ΣΔτ2, υπάρχει μία κλινική ανάγκη να προσδιοριστούν οι στρατηγικές θεραπείας και οι φαρμακολογικοί στόχοι που εμποδίζουν την ανάπτυξη του διαβήτη σε γενετικά ή επιγενετικά άτομα υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, υπάρχει μια παράλληλη ανάγκη να διατηρηθεί η λειτουργία των β κυττάρων και η μάζα σε προσβεβλημένα άτομα.²¹¹

Κατά την τελευταία δεκαετία έχει αποδειχθεί εκτενώς ότι παράγοντες κινδύνου μεταβολικού συνδρόμου συχνά συνδέονται με την παχυσαρκία, η οποία χαρακτηρίζεται από διείσδυση μακροφάγων και ενεργοποίηση στο λιπώδη ιστό και το ήπαρ μπορεί να θεραπευτεί μέσω PPARs στόχων. Στην πραγματικότητα, η φλεγμονή που είναι ένα σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της υγείας και οι επιπλοκές εμφανίζονται σε υπερβολικό βάρος και στην παχυσαρκία, η οποία υπογραμμίζει ό,τι η σχέση μεταξύ της διατροφής, των μεταβολικών οργάνων και του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορεί να ρυθμίζεται από τους PPAR στόχους.²⁰⁴

Το 15dPGJ2, ένα μη-ενζυματικό προϊόν διάσπασης της προσταγλανδίνης D2, έχει τεκμηριωθεί ότι είναι ένας ενδογενής PPAR γ συναγωνιστής ενώ οι θειαζολιδινοδιόνες (TZDs), που είναι συνθετικές ενώσεις που δρουν ως ενεργοποιητές υψηλής συνάφειας του PPAR γ ευαίσθητες στην ινσουλίνη έχουν αναδειχθεί ως ισχυροί, εξωγενείς αγωνιστές του PPAR γ είχαν αρχική έγκριση για κλινική χρήση στην αγωγή του ΣΔτ2 το 1997 και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της υπερλιπιδαιμίας και της υπεργλυκαιμίας.^{206, 211}

Οι θειαζολιδινοδιόνες (TZDs) είναι ισχυροί εξωγενείς αγωνιστές.²¹⁰ Είναι γνωστές για την αντι-διαβητική τους δράση (τρογλιταζόνη, πιογλιταζόνη, ροσιγλιταζόνη, ενγλιταζόνη) και είναι μια κατηγορία συνθετικών αγωνιστών που ενεργοποιούν

PPAR γ , των οποίων οι ιδιότητες είναι η βελτίωση της αντοχής στην ινσουλίνη και τα χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.²⁰⁴ Οι TZDs έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης σε διαβητικούς.²¹⁰

1.13. FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED GENE (FTO) rs9939609

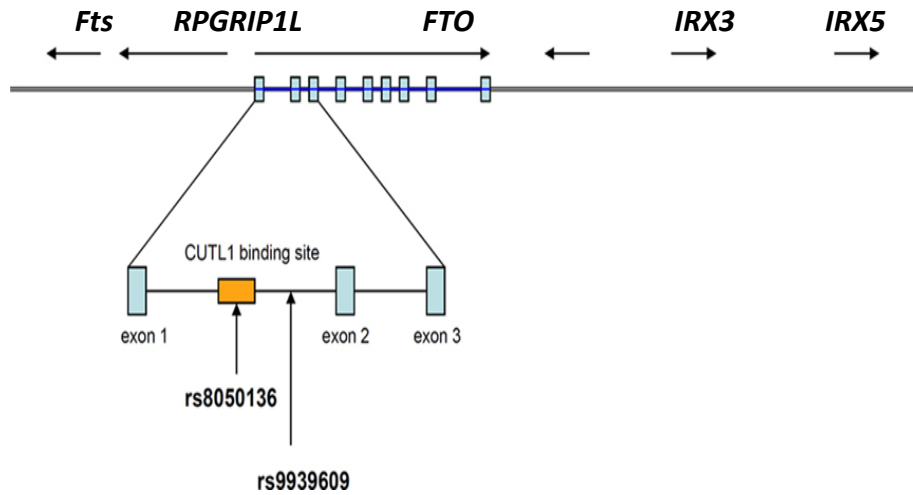
Το γονίδιο *FTO* αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1999 στο πλαίσιο μιας έρευνας που αφορούσε τη μετάλλαξη «συντηγμένα δάχτυλα» (fused toes) σε ποντίκια. Η μετάλλαξη αυτή προκύπτει από έλλειμμα αρκετών kb στο χρωμόσωμα 8 των ποντικών και οι ερευνητές προσπάθησαν να εντοπίσουν τα γονίδια αυτής της περιοχής. Έτσι έφτασαν στην αναγνώριση ενός άγνωστου μέχρι τότε γονιδίου το οποίο είχε μέγεθος τουλάχιστον 250kb και επειδή ακριβώς αυτό το μέγεθος θεωρήθηκε μεγάλο το ονόμασαν *fatso* ή *FTO*.²¹²

1.13.1. Δομή γονιδίου *FTO*

Στις πολυγονιδιακές μορφές, το γονίδιο *FTO*, θεωρείται μέχρι σήμερα το πιο ισχυρά σχετιζόμενο με την παχυσαρκία γονίδιο.³⁹ Πρόσφατα, σε τμήμα μιας μελέτης για τη συσχέτιση του γονιδιώματος διαπιστώθηκε ότι αρκετοί SNPs του γονιδίου *FTO* συνδέονται στενά με την παχυσαρκία και τον ΣΔτ2.²⁸ Βιοπληροφορική ανάλυση και *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για μια απομεθυλάση του DNA, η οποία εκφράζεται στην υποθαλαμική περιοχή του εγκεφάλου, συμμετέχει σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, δρα ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της ενέργειας της ομοιόστασης, στην απομεθυλίωση των νουκλεϊκών οξέων, και στη ρύθμιση του σωματικού λίπους με τη λιπόλυση.²⁸

Πλήρης ανεπάρκεια στην παραγωγή *FTO* έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θανατογόνου συνδρόμου, με κύριο γνώρισμα τις αναπτυξιακές ανωμαλίες. Έχουν περιγραφεί αρκετοί πολυμορφισμοί SNPs του γονιδίου, ωστόσο για δύο από αυτούς (rs1421085/rs9939609) υπάρχουν πολύ ισχυρές ενδείξεις συσχέτισης με την παχυσαρκία. Εντοπίζονται σε ιντρονικές περιοχές του γονιδίου και κάθε πρόσθετο αλληλόμορφο κινδύνου αυξάνει το δείκτη BMI κατά 0,26-0,66Kg/m² ή 0,84-2,1Kg για ένα ενήλικο άτομο ύψους 1,80m. Η συσχέτιση του γονιδίου *FTO* με την παχυσαρκία έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε πληθυσμούς της Ευρώπης, όπου οι ομόζυγοι φορείς του αλληλόμορφου κινδύνου ζύγιζαν 3Kg περισσότερο και είχαν κατά 1,67 φορές αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης παχυσαρκίας σε σχέση με τους μη-φορείς, όσο και σε πληθυσμούς της Ασίας και της Αμερικής.³⁹

Η γενωμική οργάνωση του *FTO* απεικονίζεται στην Εικόνα 28.

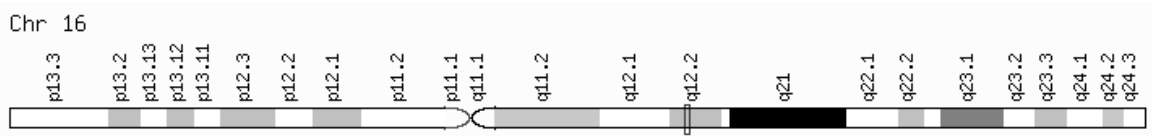


Εικόνα 28: Γενωμική οργάνωση του *FTO* και των γειτονικών γονιδίων

Το γονίδιο *FTO* περιέχει εννέα εξόνια τα οποία απεικονίζονται με μπλε ορθογώνια και το SNP *rs9939609* βρίσκεται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου. Η θέση πρόσδεσης *CUTL1* είναι πλησίον του *rs8050136* *FTO*²¹³

Στην Ελλάδα, η διερεύνηση της γενετικής βάσης της παχυσαρκίας χαρακτηρίζεται από περιορισμένο αριθμό μελετών. Παρόλο που η συχνότητα της παχυσαρκίας είναι ιδιαίτερα αυξημένη στον ελληνικό πληθυσμό, τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες, η επιστημονική κοινότητα δεν έχει δείξει ανάλογο ενδιαφέρον για τη συνεισφορά των γονιδίων. Η πλειοψηφία των μελετών στην Ελλάδα αφορά κυρίως παιδιά προσχολικής ή σχολικής ηλικίας και εφήβους κάτω των 18 ετών.²¹⁴

Σήμερα γνωρίζουμε ότι το γονίδιο *FTO* προέκυψε πριν από 450.000.000 χρόνια και έχει μήκος 417,97 βάσεις στη χρωμοσωμική θέση 16q12.2 στον άνθρωπο και αποτελείται από 9 εξόνια.^{212,215,216} Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *FTO* βρίσκεται από το ζεύγος βάσεων 53,703,963 έως το 54,121,941 στο χρωμόσωμα 5 (Εικόνα 29).²¹⁵



Εικόνα 29: Θέση του *FTO* στο χρωμόσωμα 16²¹⁵

Η συχνότητα του πολυμορφισμού του γονιδίου *FTO* είναι αρκετά μεταβλητή σε διαφορετικές γεωγραφικές και εθνικές ομάδες. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος ΣΔτ2 σχετίζεται με το αλληλόμορφο A του *FTO* (*rs9939609*) και την έντονη μεσολάβηση του BMI, και έχει αποδειχθεί ότι ενδεχομένως να επηρεάζεται η μάζα

και όχι το ύψος. Το γονίδιο *FTO* (rs 9939609) αποδείχθηκε να συνδέεται στενά με κίνδυνο ΣΔτ2 (OR 1,27, $p=5 \times 10^{-8}$) στο γονιδίωμα σε πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου.²⁸

Το φυσικό αλληλόμορφο είναι το T και δεν σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για παχυσαρκία, ενώ το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο A σχετίζεται.^{217,218} Η αύξηση του BMI, που συνδέεται με τους φορείς του αλληλόμορφου A, ξεκινά από την νεαρή ηλικία και διατηρείται στην ενήλικη ζωή.^{215, 220}

Είναι γεγονός πως οι πολυμορφισμοί του *FTO* έχουν συσχετιστεί με πολλές μη-μεταδοτικές ασθένειες όπως ο ΣΔτ2, ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η νεφρική ασθένεια τελικού σταδίου αλλά και γενικότερα με αυξημένη θνησιμότητα. Έτσι εκφράζεται η υπόθεση ότι τα γεγονότα αυτά είναι συνέπειες της παχυσαρκίας, όμως σε πολλές περιπτώσεις η συσχέτιση με τους πολυμορφισμούς παραμένει παρά τις διορθώσεις για το BMI. Η *FTO* μπορεί να ασκεί ρυθμιστικές επιδράσεις σε διάφορα γονίδια.²²⁰

Οι πολυμορφισμοί του *FTO* μπορεί να επηρεάζουν την έκφραση άλλων γονιδίων. Στο ιντρόνιο 1 φαίνεται πως βρίσκεται μια ρυθμιστική περιοχή η οποία περιέχει θέσεις πρόσθεσης μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης τόσο της *FTO* όσο και του *RPGRIP1L*, ενός γονιδίου που βρίσκεται δίπλα στο *FTO*²²¹ (Εικόνα 30).²²² Επιπλέον, οι παραλλαγές του ιντρονίου 1 έχουν συσχετιστεί με την έκφραση του *IRX-3*, γονίδιο που βρίσκεται σε πιο μακρινή απόσταση στο ίδιο χρωμόσωμα 3(kb). Μια ενδιαφέρουσα μελέτη έδειξε πως ο ύποπτος απλότυπος στο ιντρόνιο 1 συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης και με δεδομένο πως στην περιοχή αυτή βρίσκεται ένας ενισχυτής δεν αποκλείστηκε πως η αυξημένη μεθυλίωση οδηγεί σε τροποποίηση της ικανότητας του ενισχυτή να ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, όπως του *IRX-3*.²²³



Εικόνα 30: Θέση των πολυμορφισμών *FTO* σε σχέση με τα γονίδια²²²

1.13.2. Δομή πρωτεΐνης *FTO*

Η πρωτεΐνη που παράγεται από την έκφραση του γονιδίου αποτελείται από 502 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι 58kD, αλλά δεν έχει κατανοηθεί ο βιολογικός της ρόλος παρότι έχει αναγνωρισθεί ένα σήμα εντοπισμού στον πυρήνα στο αμινοτελικό άκρο.²¹²

Η πρωτεΐνη *FTO* εξελικτικά συναντάται μόνο σε σπονδυλωτά και θαλάσσια φύκη, ενώ απουσιάζει από ασπόνδυλα, μύκητες, φυτά, βακτήρια. Το *FTO* εκφράζεται καθολικά σε όλους τους ιστούς εμβρύων και ενηλίκων, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια και αρουραίους, αν και τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στον εγκέφαλο και πιο συγκεκριμένα σε έναν αριθμό υποθαλαμικών πυρήνων (τοξοειδής, παρακοιλιακός, μεσοραχιαίος, μεσοκοιλιακός), υπεύθυνων για τον κεντρικό έλεγχο της ενεργειακής ομοιόστασης. Για μεγάλο διάστημα από την ανακάλυψη του, ο ρόλος της παραγόμενης πρωτεΐνης παρέμενε άγνωστος, δεδομένου ότι το γονίδιο δεν φαινόταν να παρουσιάζει ομολογία με κάποιο άλλο από τα τότε γνωστά γονίδια. Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας έδειξε ότι η *FTO* πρωτεΐνη μοιράζεται ορισμένα χαρακτηριστικά με την οικογένεια των εξαρτώμενων από Fe^{2+} και οξυγλουταρικό (2-OG) διοξυγονασών σε μια σειρά μελετών. Τα μέλη της οικογένειας αυτών των πρωτεϊνών καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις σε πολλαπλά υποστρώματα χρησιμοποιώντας ως συνένζυμο τον ελεύθερο (μη συνδεδεμένο με την αίμη) σίδηρο και ως συν-υπόστρωμα το οξυγλουταρικό και με τον τρόπο αυτό συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Μία μελέτη το 2007 έδειξε ότι η ανθρώπινη πρωτεΐνη *FTO* έχει υψηλή ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας με την πρωτεΐνη AlkB του *E. Coli* και τα αντίστοιχα θηλαστικά ομόλογα της, ABH2 και 3.²¹⁶

Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να επιδιορθώσουν βλάβες στο DNA εξαιτίας μεθυλίωσης, υδροξυλιώνοντας τις πρόσθετες μεθυλομάδες, κάτι που οδηγεί στην απομάκρυνση τους. Έτσι, υποτέθηκε ότι και η πρωτεΐνη *FTO* είναι μια διμεθυλάση. Είναι πιθανό η λειτουργία της να σχετίζεται με την απομεθυλίωση των νουκλεϊκών οξέων, κάτι που μπορεί να αποτελεί είτε επιδιορθωτικό μηχανισμό είτε μηχανισμό τροποποίησης της έκφρασης ίσως σε επίπεδο RNA, αν και τα ενδογενή υποστρώματα της *FTO* πρωτεΐνης είναι ακόμα άγνωστα.^{221,224}

Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης αυτής το 2010 (με ακτίνες X) αποκάλυψε τη δομική βάση για την κατανόηση των υποστρωμάτων της.²²⁵

Η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο δομές. Η πρώτη βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και είναι όμοια με αυτή που συναντάται στις Alkb πρωτεΐνες και η άλλη βρίσκεται στο C άκρο με άγνωστη δομική ομολογία. Οι δύο αυτές δομές αλληλεπιδρούν ώστε να εκδηλώσει η *FTO* καταλυτική δραστηριότητα. Επιπλέον, η *FTO* έχει έναν επιπλέον βρόγχο ο οποίος διατηρείται σε *FTO* πρωτεΐνες από διάφορα είδη αλλά δεν συναντάται στις Alkb και ABH πρωτεΐνες. Ο βρόγχος αυτός φαίνεται πως εμποδίζει την μη μεθυλιωμένη έλικα του δίκλωνου RNA/DNA να αποκτά πρόσβαση στο σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος της *FTO*, κάτι που εξηγεί την προτίμηση της

πρωτεΐνης για μονόκλιωνα μόρια νουκλεϊκών οξέων. Μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία διαπίστωσε πως η N-6 μεθυλοαδενοσίνη σε πυρηνικό RNA αποτελεί το σημαντικότερο υπόστρωμα της *FTO* σε in vitro πειράματα, κάτι που επαληθεύτηκε και σε κυτταρικές σειρές. Βέβαια ο ρόλος της οξειδωτικής απομεθυλίωσης του RNA δεν έχει διευκρινιστεί.²²⁶

Ο ρόλος της *FTO* ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, η δράση της ως απομεθυλάση, η συμμετοχή της στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των νουκλεϊκών οξέων, σε επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση του DNA είναι συμβατός με το γεγονός πως μια πρόσφατη μελέτη πρότεινε πως η *FTO* μπορεί να λειτουργεί ως πλειοτροπικός παράγοντας, δηλαδή μια χρωμοσωμική περιοχή που ασκεί επιδράσεις σε πολλαπλούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες.²²⁷ Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η *FTO* μπορεί να λειτουργήσει ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής καθώς φάνηκε να αυξάνει την μεταγραφική δυναμική των CCATT/enhancer binding proteins, που αποτελούν γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες, τόσο σε μεθυλιωμένους όσο και σε μη μεθυλιωμένους προωθητές γονιδίων, κάτι αντιφατικό με βάση τον ρόλο της ως απομεθυλάση.²²⁸

1.13.3. Ρόλος *FTO* στον ΣΔτ2

Η συσχέτιση του *FTO* με τον ΣΔτ2 αποτελεί ένα ιδιαίτερα αμφιλεγόμενο ζήτημα. Ένας μεγάλος αριθμός GWAS έχει δείξει πως οι πολυμορφισμοί του *FTO* αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔτ2 (μέτρια), όμως πολλές από αυτές αποδίδουν τον κίνδυνο σε έμμεσες επιδράσεις μέσω της αύξησης του BMI, που ως γνωστόν αποτελεί ισχυρό παράγοντα κινδύνου. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες μελέτες στις οποίες η συσχέτιση παραμένει σημαντική παρά τις διορθώσεις για το BMI. Το γεγονός πως η *FTO* πρωτεΐνη είναι πιθανό να αποτελεί έναν πλειοτροπικό παράγοντα είναι ένα στοιχείο που δείχνει πως μπορεί να συνεισφέρει ανεξάρτητα τόσο στο ΣΔτ2 όσο και στην παχυσαρκία. Άλλα στοιχεία που στηρίζουν την υπόθεση αυτή είναι το γεγονός πως ενώ οι πολυμορφισμοί του *FTO* έχουν συσχετιστεί με αντίσταση στην ινσουλίνη, τα επίπεδα mRNA του *FTO* σε σημαντικούς για την παθογένεση του διαβήτη ιστούς (παγκρεατικά α και β νησίδια, ήπαρ, σκελετικοί μύες, λιπώδης ιστός) ρυθμίζονται από τη διαβητική κατάσταση, από τα επίπεδα γλυκόζης και από φάρμακα (ροσιγλιταζόνη). Επιπλέον, τα επίπεδα mRNA του *FTO* σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκονεογένεση στο ήπαρ και με τον *TNF* στον λιπώδη ιστό. Επιπλέον ο *TCF7L2*, ένα από τα σημαντικότερα γονίδια του ΣΔτ2 συνδέεται στον προωθητή του *FTO* (σε κυτταρική σειρά). Πάντως, σημαντική παραμένει η παρατήρηση ότι στα ζωικά μοντέλα, ενώ η απαλοιφή ή υπερέκφραση της *FTO*, έχει σαφή επίδραση στο σωματικό βάρος και την παχυσαρκία, δεν φαίνεται να σχετίζεται με κάποιον εμφανή διαβητικό φαινότυπο.²²⁹

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι κατανοητό γιατί το *FTO* έχει συγκεντρώσει τόσο μεγάλο ενδιαφέρον. Πέρα από την συμβολή στην κατανόηση της γενετικής βάσης της παχυσαρκίας, μπορεί να αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα στον ΣΔτ2.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.14. ΣΚΟΠΟΣ

Το άσθμα και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι πολυπαραγοντικά και πολυγονιδιακά νοσήματα. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν την ύπαρξη γενετικού υποστρώματος που προδιαθέτουν την εμφάνιση των νόσων και περιβαλλοντικών παραγόντων που προκαλούν την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η παρούσα μελέτη είναι μη παρεμβατική, μη επεμβατική. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί εάν υπάρχει γονιδιακή συσχέτιση πολυμορφισμών και συγκεκριμένα των *TNF-α* (rs1800629), *IL-6* (rs1800795), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *CDKAL1* (rs7756992), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *PPARγ2* (rs1801282), *FTO* (rs9939609), με την κλινική εμφάνιση του βρογχικού άσθματος και ταυτόχρονα του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αναλύθηκε το γονιδίωμα 1498 ατόμων συνολικά (ασθενείς και μάρτυρες), με σκοπό τον εντοπισμό σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα γονίδια τους.

Στην παρούσα μελέτη, το γονιδίωμα των ατόμων ελέγχθηκε για τους πολυμορφισμούς rs1800629, rs1800795, rs2303067, rs7216389, rs 10830963, rs7756992, rs7903146, rs13266634, rs 1801282, rs9939609, που φαίνονται να συσχετίζονται με την κλινική εκδήλωση βρογχικού άσθματος και ΣΔτ2.

2.1.1. Γενικός πληθυσμός

Από τους 1391 μάρτυρες, στους οποίους πραγματοποιήθηκε έλεγχος, οι 726 ήταν γυναίκες (52,2%) και οι 665 άνδρες (47,8%). Όλοι οι συμμετέχοντες είναι ελληνικής καταγωγής και κατοικούν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Λόγω ανωνυμοποίησης του δείγματος, κανένας συσχετισμός δημογραφικών στοιχείων και ιστορικού (προσωπικού και οικογενειακού) των εθελοντών, εκτός από το φύλο, δεν ήταν δυνατός. Έτσι, δεν υπήρχαν στοιχεία για την κατάσταση της υγείας των συμμετεχόντων, ούτε για την παρουσία ή μη βρογχικού άσθματος και ΣΔτ2, που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη.

Κατά συνέπεια, το δείγμα των ατόμων που συμμετείχαν στον έλεγχο του γονιδιώματος για συγκεκριμένα SNPs μπορεί να αναφερθεί ως “γενικός πληθυσμός”, εφόσον δεν συνυπολογίζονται άλλες παράμετροι σχετικές με την υγεία και τις συνήθειές τους εκτός από το γονότυπό τους.

2.1.2. Ειδικός πληθυσμός

Πριν την συμμετοχή τους στην κλινική μελέτη, όλοι οι εθελοντές ενημερώθηκαν αναλυτικά για τη διαδικασία που επρόκειτο να ακολουθηθεί και δόθηκε εγγράφως η συναίνεσή τους. Σε κάθε άτομο που συμπεριλήφθηκε στη μελέτη, έγινε λήψη πλήρους οικογενειακού ιστορικού, δημογραφικά στοιχεία και σωματομετρικά στοιχεία.

Από τους 107 ασθματικούς ασθενείς, στους οποίους πραγματοποιήθηκε έλεγχος, οι 58 ήταν γυναίκες (54,2%) και οι 49 άνδρες (45,8%). Όλοι οι συμμετέχοντες είναι ελληνικής καταγωγής και κατοικούν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι ασθενείς ήταν ενήλικες με ηλικίες από 32 έως 62 ετών. Οι ασθενείς ελάμβαναν θεραπευτική αγωγή που δεν περιελάμβανε κορτιζόνη. Πραγματοποιήθηκε ανωνυμοποίηση και αποταυτοποίηση των δειγμάτων.

Το πρωτόκολλο της μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Σωτηρία» ενώ υπήρξε γραπτή συγκατάθεση από το κάθε άτομο-εθελοντή που συμμετείχε (Πίνακας 14).

			Ομάδα		Σύνολο
			Μάρτυρες	Ασθενείς	
Φύλο	Θήλυ	Αριθμός	726	58	784
		% μέσα στο Φύλο	92,6%	7,4%	100,0%
Άρρεν		Αριθμός	665	49	714
		% μέσα στο Φύλο	93,1%	6,9%	100,0%
Σύνολο		Αριθμός	1391	107	1498
		% μέσα στο Φύλο	92,9%	7,1%	100,0%

Πίνακας 14: Περιγραφικά στοιχεία εθελοντών

2.2. Μέθοδοι συλλογής και επεξεργασίας γενετικού υλικού

2.2.1. Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός

Για την εξαγωγή του DNA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Black Swab DNA kit
 1. Buccal Swabs
 2. Lysis Solution TLS
 3. Binding Solution TBS
 4. Proteinase K
 5. Washing Solution HS
 6. Washing Solution MS
 7. Elution Buffer
 8. Pre-filter (clear)
 9. Spin- filter (black)
 10. Receiver tubes
 11. Elution tubes
 - ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9 % NaCl, ΒΙΟΣΕΡΑ.Ε, Ελλάδα)
 - ✓ Απόλυτη αιθανόλη EtOH (Merck, 96-100%, Γερμανία)
 - ✓ Απεσταγμένο και αποστειρωμένο H₂O, ελεύθερο νουκλεασών και πυρετογόνων

- ✓ Μικροφυγόκεντρος (Sorvall/MC12V, DUPONT Γαλλία)
- ✓ Επωαστήρας σωληναρίων (Techne PRI-BLOCK DB3, Αγγλία)
- ✓ Συσκευή Vortex (Vibrofix VF1 Electronic, Janke and Kunkel, IKA labortechnik)
- ✓ Πιπέτες 0,1-20 μL και 50-1000 μL (GILSON, Γαλλία)
- ✓ Αναλώσιμα στόμια μικροπιπετών 100 μL και 1000 μL Saarstedt, Γερμανία

Για τη διαδικασία της PCR:

1. Real Time PCR Light Cyclor 480 Roche, Γερμανία
2. Primers (εκκινητές), Light Snip, TibMolBiol, Γερμανία
3. MgCl_2
4. 96X0,2ml plate(KiskerGbR, Germany)
5. PCR clear Seal 135x80 (Nippon Genetics, Europe)
6. Fast Start DNA Master Probe

Για την παρασκευή γέλης αγαρόζης:

1. EDTA (Scharlau, Γερμανία)
2. Βορικό οξύ (Scharlau, Γερμανία)
3. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, buffer substance (Scharlau, Germany)
4. Βρωμιούχο αιθίδιο ROTH, Γερμανία
5. Άγαρόζη Bio-Rad, Αγγλία
6. Ηλεκτροφορητική συσκευή (Pharmacia LKB GNA 100, Σουηδία)

2.2.2. Λήψη δείγματος DNA από τους συμμετέχοντες

Για την λήψη δείγματος γενετικού υλικού από τα άτομα που συμμετείχαν στην ανάλυση του γονιδιώματος για την ύπαρξη των πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί με τους οποίους πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος επιθηλιακών κυττάρων.

Κάθε στυλεός αποσφραγίσθηκε και εισήχθη στη στοματική κοιλότητα του ατόμου, το οποίο μετακινεί το στυλεό στο εσωτερικό της παρειάς για, περίπου, 40 δευτερόλεπτα. Ο στυλεός τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο συλλογής, το οποίο σφραγίσθηκε, και αναγράφηκε ο κωδικός αριθμός του κάθε συμμετέχοντα. Τα δείγματα φυλλάχθηκαν -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Όλα τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα ληφθέντα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας, και στη συνέχεια πολλαπλασιασμός αυτού του DNA με την βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Όλες οι μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά σε επόμενα κεφάλαια.

2.3. Στάδια απομόνωσης DNA από επιθηλιακά κύτταρα στοματικής κοιλότητας

Το πρώτο βήμα διαχείρισης των δειγμάτων είναι η απομόνωση του DNA από τα ληφθέντα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας των συμμετεχόντων. Με την διαδικασία αυτή καθίσταται δυνατή η λύση του κυττάρου και η εκλεκτική δέσμευση μόνο του ανθρώπινου γενετικού υλικού, παρουσία πληθώρας δομικών λίθων που απαρτίζουν ένα ανθρώπινο κύτταρο. Η συγκεκριμένη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έγκειται στην απομόνωση του DNA με την χρήση ειδικών κολώνων/στηλών (DNA Extraction with Tissue Columns). Με τη χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για έκπλυση και ρύθμιση του pH και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων γίνεται κατακράτηση μόνο του DNA πάνω στην μεμβράνη, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Η μεγάλη ιονική ισχύς των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται ευνοεί τη κατακράτηση DNA στην silica. Το DNA που απομονώνεται εκούεται σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον και είτε χρησιμοποιείται άμεσα για αντιδράσεις PCR είτε φυλάσσεται μακροπρόθεσμα σε καταψύκτη στους -20°C.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με τις στήλες Analytik Jena, Life Science (Γερμανία) των προπαρασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) blackPREP Swab DNA kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1. Κοπή στυλεών και τοποθέτησή τους σε tubes των 1,5μL
2. Προσθήκη φυσιολογικού ορού μέχρι να καλυφθεί η μπατονέτα (2-3 σταγόνες)
3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, σε κινούμενη πλάκα για 20 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας, τα δείγματα ανακινούνται στο μονό ανακινητή (Vortex) ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
4. Στις στήλες από τις κομμένες μπατονέτες τοποθετούμε την άκρη των μικροπιπετών των 100μL (tips) και ανακινούμε τις μπατονέτες μέσα στο υγρό
5. Κρατάμε το υγρό που περιέχει τα κύτταρα και απορρίπτουμε την μπατονέτα.
6. Φυγοκεντρηση στις 4000 rpm για 15.
7. Αφαίρεση υπερκείμενου υγρού με μία πιπέτα των 200μL
8. Προσθήκη στο tube 400μL Lysis Solytion TLS και 25μL Proteinase
9. Έντονη ανάδευση για 5sec στη συσκευή Vortex
10. Τοποθέτηση των tubes σε επωαστήρα σωληναρίων στους 50°C για 10-15min και ανάδευση στη συσκευή VORTEX ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
11. Προσθήκη Pre-filter σε receiver tube των 2μL
12. Μεταφορά του δείγματος (swab και υγρό) στο Pre-filter
13. Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 1min
14. Απόρριψη Pre-filter
15. Προσθήκη 400μL Binding Solution TBS στο διήθημα
16. Άμεση ανάδευση για 15sec Vortex
17. Προσθήκη spin filter σε καθαρό receiver tube των 2μL και μεταφορά του διηθήματος στο Spin Filter
18. Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 2min

19. Απόρριψη του receiver tube με το διήθημα και τοποθέτηση του Spin Filter σε καθαρό receiver tube των 2μL
20. Προσθήκη 500μl Washing Solution MS
21. Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 2min
22. Απόρριψη του receiver tube με το διήθημα και τοποθέτηση του Spin Filter σε καθαρό receiver tube των 2μL
23. Προσθήκη 750μl Washing Solution MS
24. Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 2min
25. Απόρριψη του receiver tube με το διήθημα και τοποθέτηση του Spin Filter σε καθαρό receiver tube των 2μL
26. Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 2min
27. Απόρριψη του receiver tube με το διήθημα και τοποθέτηση του Spin Filter σε καθαρό receiver tube των 2μL
28. Προσθήκη 200μl Elution Buffer
29. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min
30. Φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για 1min
31. Επανάληψη των βημάτων 22-24

Το παραληφθέν υγρό με αυτή τη διαδικασία περιέχει DNA είναι έτοιμο για ανάλυση.

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.4.1. Αρχή Μεθόδου

Αποτελεί την πλέον επικρατή μέθοδο για ανίχνευση και ταυτοποίηση γονιδίων, καθώς με την τεχνική αυτή το τμήμα του DNA με την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει μπορεί να πολλαπλασιαστεί γρήγορα και εκλεκτικά.

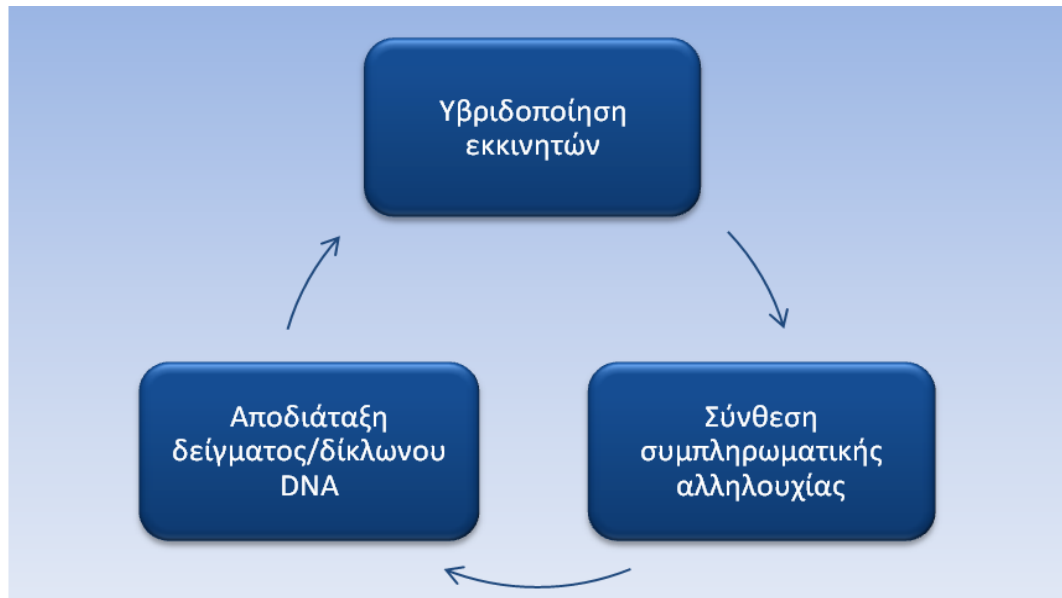
Η PCR είναι μια μέθοδος αποτελεσματική για την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων DNA. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και πρόκειται να ενισχυθεί. Οι παράγοντες που επιδρούν στην επιτυχημένη έκβαση μιας PCR είναι:

- Οι συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (μήκους ~20 νουκλεοτιδίων ο καθένας, εκκινητές). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί συγκεκριμένων περιοχών και στις δυο αλυσίδες έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους η επιθυμητή περιοχή DNA. Μετά τον υβριδισμό στο DNA στόχο έχουν τα 3' -OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών.
- Μια αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-3500 bp.
- Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq), ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA.
- Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου Mg^{2+} .
- Η παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστήριων που δρουν ενισχυτικά ή ανασταλτικά.

- Η συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ή αλλιώς dNTPs).
- Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια του DNA, όταν θερμαινόμενα σε υψηλές θερμοκρασίες αποδιατάσσονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA καθορίζεται από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές, που συνδέονται με την μήτρα σε αυτά ακριβώς τα σημεία. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Η PCR αξιοποιεί ορισμένα χαρακτηριστικά της in-vivo αντιγραφής του DNA, όπως ότι η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση της συμπληρωματικής του αλληλουχίας και, επίσης, ότι απαιτείται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο θα πρέπει να είναι συμπληρωματικό της γειτονικής αλληλουχίας του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει, δημιουργείται το απαραίτητο για την έναρξη δίκλωνο DNA. Με το σχηματισμό αυτού, η DNA πολυμεράση κατευθύνεται, στη συνέχεια, να συνθέσει το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή, που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (PCR thermal cycler), η οποία καθιστά δυνατή την ακριβή ρύθμιση και αυξομείωση της θερμοκρασίας κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Χάρη στις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας, πραγματοποιείται συνεχώς αποδιάταξη και υβριδοποίηση των συμπληρωματικών αλληλουχιών του DNA, επιτρέποντας, τη σύνθεση νέων αλληλουχιών, χρησιμοποιώντας τις υπάρχουσες ως εκμαγείο. Έτσι, μετά το πέρας ενός ορισμένου αριθμού τέτοιων κύκλων, έχει επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας σε επαρκείς ποσότητες για τη διεξαγωγή περαιτέρω αναλύσεων (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Για την ανάλυση του γονιδιώματος των συμμετεχόντων και τον έλεγχο ύπαρξης του πολυμορφισμού, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RealTimePCR), η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, εφόσον έχουν ιχνηθετηθεί τα προϊόντα της αντίδρασης με φθορίζοντα μόρια. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μέθοδο, ένα ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής ιχνηθετείται στο 5' άκρο του με ένα φθορίζον μόριο-ανταποκριτή και στο 3' άκρο του με ένα μόριο-αποσβέστη. Όταν οι εκκινήτες συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο, τότε το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής καταστρέφεται από τη DNA πολυμεράση, λόγω της ταυτόχρονης δράσης της ως 5-εξωνουκλεάση. Μέσω της δράσης αυτής, απομακρύνεται το φθορίζον μόριο-ανταποκριτής από το μόριο-αποσβέστη, οπότε παρατηρείται η παρουσία σήματος φθορισμού, το οποίο και αυξάνεται ανάλογα με την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα.

2.4.2. Στάδια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Αρχικά πραγματοποιείται αποστείρωση του χώρου, με χρήση UV ακτινοβολίας, στον οποίο θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία ανάμειξης των αντιδραστηρίων (λ.χ. εκκινήτες, πολυμεράση, νερό, μαγνήσιο). Ακολουθεί αποστείρωση με UVακτινοβολία του εργαστηριακού εξοπλισμού που απαιτείται όπως πιπέτες, tips, και stands.

Όλα τα αντιδραστήρια παρέμειναν στην κατάψυξη, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος διατηρούνται σε παγοκύστη, προκειμένου να μην γίνει πρόωρη έναρξη του πολλαπλασιασμού του DNA από την πολυμεράση, και να αποφευχθούν έτσι

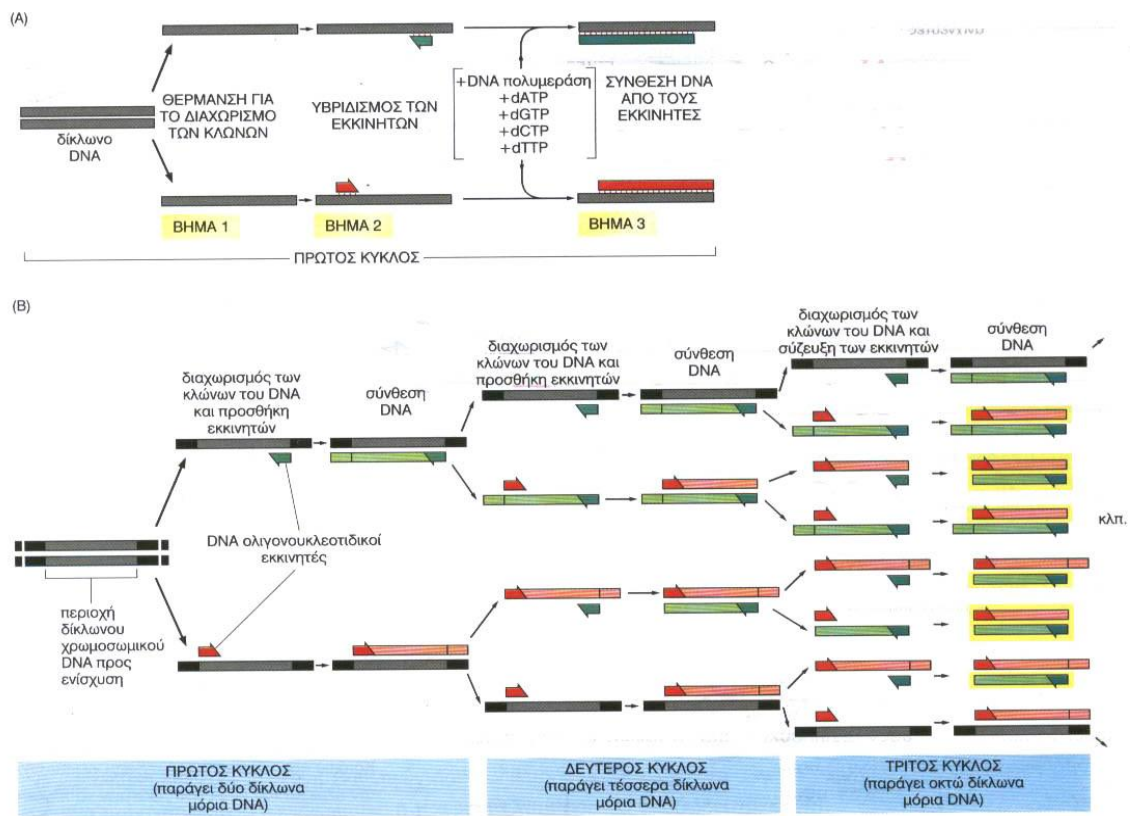
πιθανά σφάλματα. Σε πρώτο στάδιο, με χρήση αποστειρωμένου tube, παρασκευάζεται το μείγμα των αντιδραστηρίων για την εκάστοτε αντίδραση. Πραγματοποιείται ανάμιξη της Taqpolymerase (HotStarTaqPlusMasterMix), του μείγματος των εκκινητών για την αντίδραση [Primers (εκκινητές), TibMolBiol, Γερμανία] και υπερκάθαρο νερό (RNase-free water). Η ανάμιξη υποβοηθείται με μηχανική ανάδευση σε vortex. Το μείγμα παρασκευάζεται αθροιστικά για το σύνολο των δειγμάτων και πάντα συνυπολογίζεται και μια ποσότητα η οποία θα αντιστοιχεί στο τυφλό διάλυμα (blank). Το τυφλό στερείται δείγματος γενετικού υλικού και χρησιμοποιείται για την διαπίστωση τυχόν επιμόλυνσης καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

Σε ειδική αποστειρωμένη πλάκα διεξαγωγής PCR, επισημαίνεται το δείγμα που αντιστοιχεί σε κάθε πηγάδι. Σε καθένα εξ αυτών διαμοιράζεται η ποσότητα από το μείγμα αντιδραστηρίων, δίνοντας προτεραιότητα στα δείγματα και, τέλος στο λευκό. Έπειτα σε κάθε πηγάδι δείγματος προστίθεται το απομονωμένο γενετικό υλικό, ενώ η θέση του λευκού διαλύματος παραμένει άνευ DNA. Στην πλάκα PCR προστίθενται το απομονωμένο DNA. Η ποσότητα του DNA ανακατεύεται με το μείγμα αντιδραστηρίων με την βοήθεια πιπέτας. Για την αποφυγή επιμόλυνσης, το κάθε tube που περιέχει DNA πρέπει να ανοίγει και να κλείνει προσεκτικά, μακριά από την πλάκα PCR. Μετά την ολοκλήρωση πλήρωσης των πηγαδιών, πάνω από την πλάκα επικολλάται ειδική μεμβράνη (Platamax axyseal sealing film PCR-SP), η οποία διαχωρίζει τα πηγάδια της πλάκας, με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσης.

Μετά την ολοκλήρωση της προετοιμασίας, η πλάκα PCR φυγοκεντρείται και στη συνέχεια τοποθετείται, με κατάλληλη φορά, στο μηχάνημα της RealTimePCR. Ο θερμικός κυκλοποιητής (PCR Thermal Cycler) ρυθμίζει με ακρίβεια την θερμοκρασία καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης. Μία τυπική διαδικασία PCR περιλαμβάνει έναν αριθμό κυκλικών διαδικασιών που επαναλαμβάνονται 25-40 φορές κατά την διάρκεια μίας αντίδρασης PCR. Το πρώτο βήμα κάθε κύκλου είναι η θερμική αποδιάταξη (template denaturation) της δίκλωνης αλυσίδας, που επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 94-95°C και οδηγεί στο σχηματισμό δύο μονόκλωνων DNA. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη των εκκινητών (primer annealing) στις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου, σε χαμηλότερη θερμοκρασία, κατάλληλη για υβριδισμό. Το τρίτο στάδιο είναι η επιμήκυνση της αλυσίδας (chain elongation) από την DNA πολυμεράση. Η θερμοκρασία αυξάνεται στην βέλτιστη τιμή για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης (συνήθως 72°C). Ξεκινώντας από τους υβριδισμένους εκκινητές, η πολυμεράση προσθέτει dNTPs συμπληρωματικά ως προς το μονόκλωνο DNA, με κατεύθυνση 5'-3'. Σε κάθε νέο κύκλο, ο αριθμός των αντιγραμμένων αλληλουχιών αυξάνεται εκθετικά (θεωρητικά 2ⁿ), καθώς από κάθε αρχικό μονόκλωνο τμήμα DNA προκύπτουν δύο νέα δίκλινα DNA. Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των δύο εκκινητών.

Από τον υπολογιστή, που βρίσκεται συνδεδεμένος με το μηχάνημα, επιλέγεται το πρόγραμμα λογισμικού που δίνει τις κατάλληλες εντολές στο μηχάνημα για τον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού. Το πρωτόκολλο διεξαγωγής των PCR αντιδράσεων έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Στον

ηλεκτρονικό υπολογιστή παρακολουθείται η θερμοκρασία και οι κύκλοι πολλαπλασιασμού καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας, η οποία διαρκεί περίπου 2,5 ώρες (Εικόνα 32, Εικόνα 33).



Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση της PCR

(A) Αναπαράσταση του πρώτου κύκλου της PCR. (B) Αναπαράσταση των τριών πρώτων κύκλων. (<http://panacea.med.uoa.gr>)



Εικόνα 33: RealTimePCRLC480 HRM (HighResolutionMeltingconditions)

2.4.3. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η real-time PCR ακολουθεί τις αρχές της συμβατικής PCR με την διαφορά ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε «πραγματικό χρόνο», συνδυάζοντας έτσι ενίσχυση και ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ιχνηθέτηση του παραγόμενου προϊόντος, μετράται η ένταση του παραγόμενου φθορισμού και, τελικά, η συγκέντρωση συσχετίζεται με την ένταση του φθορισμού.

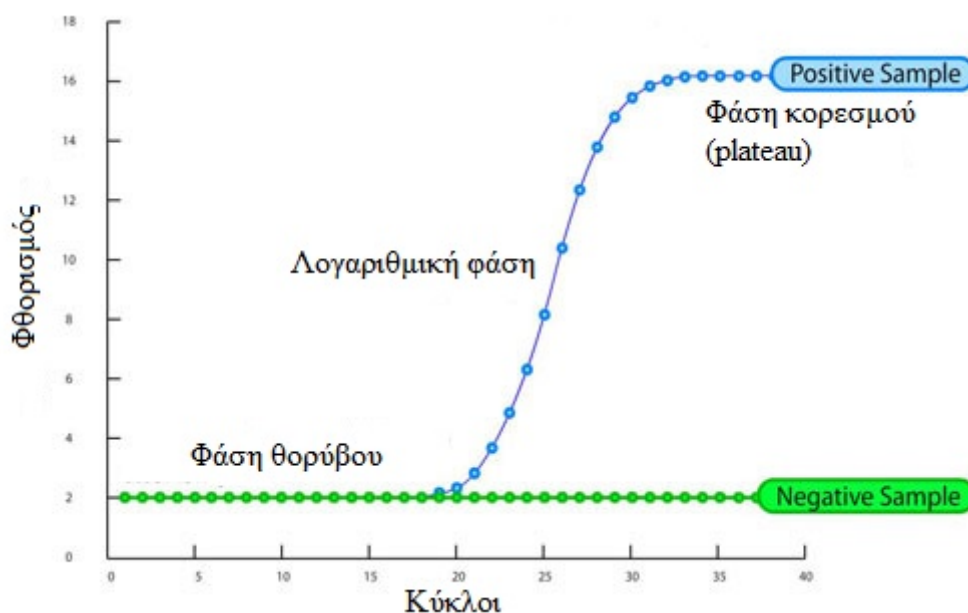
Οι δυο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων είναι:

1. Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στην διπλή έλικα του DNA, όπως οι SYBRGreen, LCGreen, EvaGreen, Cyto9
2. Ειδικές αλληλουχίες DNA ανιχνευτών οι οποίοι αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορίζουσα ουσία η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδισμό του ανιχνευτή με την συμπληρωματική του αλληλουχία, όπως οι ανιχνευτές υδρόλυσης διπλής χρωστικής τύπου TaqMan, οι ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes), οι μοριακοί φάροι (molecular beacons) κλπ.

Μετά το πέρας της real-time PCR, ακολουθεί ανάλυση καμπυλών τήξης (melting curves analysis) κατά την οποία ανιχνεύονται συγκεκριμένοι νουκλεοτιδικοί

πολυμορφισμοί (SNPs) και διαπιστώνεται αν το δείγμα DNA ανήκει σε ετερόζυγο ή ομόζυγο για το φυσικό ή μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Η real-time PCR αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση υποβάθρου ή φάση θορύβου, την εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση και την φάση κορεσμού. Σε κάθε αντίδραση real-time PCR χρησιμοποιούμε πάντα έναν θετικό μάρτυρα (positive control) για να βεβαιώνεται η ορθότητα της αντίδρασης και ένα αρνητικό μάρτυρα (negative control) για να βεβαιώνεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Η κινητική της real-time PCR (www.abbottmolecular.com)

2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα (blank) προκειμένου να διασφαλιστεί η απουσία επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων και επομένως ο αποκλεισμός σφαλμάτων. Στα αρχικά πειράματα που διενεργήθηκαν, η μελέτη καθαρότητας του λευκού πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα (gel) αгарόζης.

2.5.1. Αρχή Μεθόδου Ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αгарόζης

Η πηκτή αгарόζης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αгарόζης), των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής. Η τελευταία σχηματίζεται σε θερμοκρασία 100° C από διάλυμα αгарόζης, το οποίο πολυμερίζεται δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία κάτω των 45°C. Λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, η πηκτή αгарόζης αποτελεί

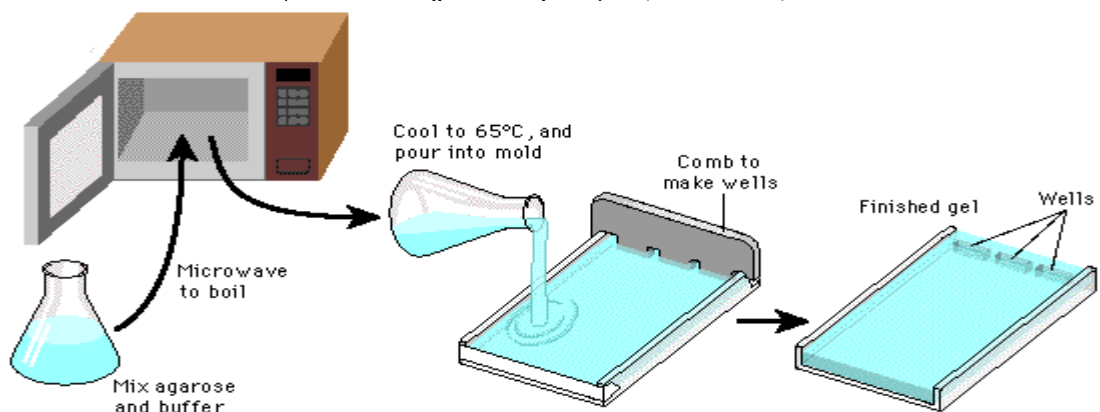
ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό, που δεν παρεμποδίζει, στερεοχημικά, την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων, όπως το DNA.

Το DNA σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι μετά από παροχή ηλεκτρικού ρεύματος (ηλεκτροφόρηση) τα μόρια DNA μετακινούνται προς την άνοδο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του αριθμού των βάσεων τους. Ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους (και μοριακού βάρους) στηρίζεται στο γεγονός ότι τα μικρότερα μόρια DNA, μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Καθώς το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε “ζώνες” και γίνονται ορατά με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Κατά αυτό τον τρόπο, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και πολύ μικρή ποσότητα DNA, με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσής του με ακτινοβολία UV.

2.5.2. Παρασκευή αντιδραστηρίων σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ζυγίζονται 0,8 έως 1,0 gr αγαρόζης, η οποία διαλύεται σε διάλυμα TBE 0.5M μέχρις όγκου 40 ml. Το επιθυμητό διάλυμα TBE, παρασκευάζεται με χρήση TBE 5M, υπό αραιώση 1:10, με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος αυτού περίπου στους 100°C σε φούρνο μικροκυμάτων που βρίσκεται σε απαγωγό για 2-4 λεπτά. Αφήνεται για λίγο το διάλυμα, μέχρι να φτάσει περίπου σε θερμοκρασία 40-60° και προστίθενται 2 μl βρωμιούχου αιθιδίου με την χρήση κυτταροστατικού γαντιού, εντός απαγωγού, και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα φτιάχνεται το καλούπι του πηκτώματος χρησιμοποιώντας κολλητική ταινία και ειδικά κτένια που θα δημιουργήσουν αργότερα στην πηκτή πηγάδια φόρτωσης των δειγμάτων. Το διάλυμα αγαρόζης προστίθεται στο καλούπι και αφήνεται να πήξει για 20 με 30 min.

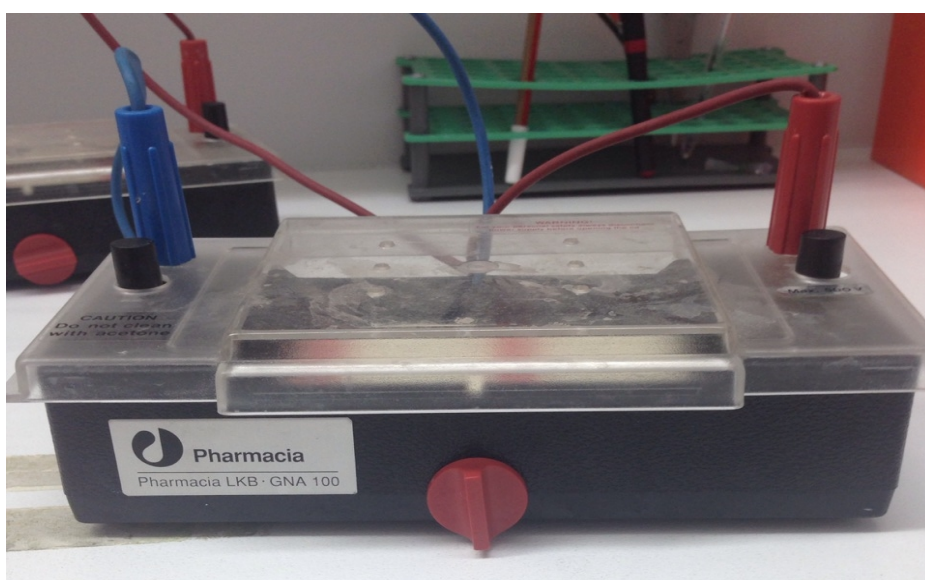
Μετά την πήξη απομακρύνεται από το καλούπι του πηκτώματος το σελοτέιπ και το ειδικό κτένιο, με κατεύθυνση ακριβώς κάθετη στην πηκτή, έτσι ώστε να μην τραυματιστεί. Στην συνέχεια, το πήκτωμα, με το καλούπι, τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε ειδική θέση και προστίθεται μικρή ποσότητα διαλύματος TBE 0.5M έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το πήκτωμα (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Απεικόνιση των σταδίων παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης

2.5.3. Στάδια ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Όπως αναφέρθηκε, το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε ειδική θέση, και προστίθεται μικρή ποσότητα διαλύματος TBE 0.5M έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρο. Μαζί με το τυφλό τοποθετήθηκαν στο πήκτωμα και δείγματα γενετικού υλικού, έτσι ώστε το λευκό να μπορεί να συγκριθεί μαζί τους, ως προς την καθαρότητά του. Κατά την προετοιμασία αυτή αναμιγνύονται 6-7 μL δείγματος από κάθε αντίδραση PCR, ξεχωριστά, με 2 μL χρωστικής, για να είναι εμφανής η κίνηση του DNA μέσα στο πήκτωμα. Εκτός αυτών αναμιγνύονται και 5 μL ladder με 2 μL χρωστικής. Το ladder είναι το αντιδραστήριο εκείνο που λειτουργεί σαν μεζούρα βάσεων DNA κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και αποτελεί μέτρο αναγνώρισης αλληλουχιών γενετικού υλικού (Εικόνα 36, Εικόνα 37).



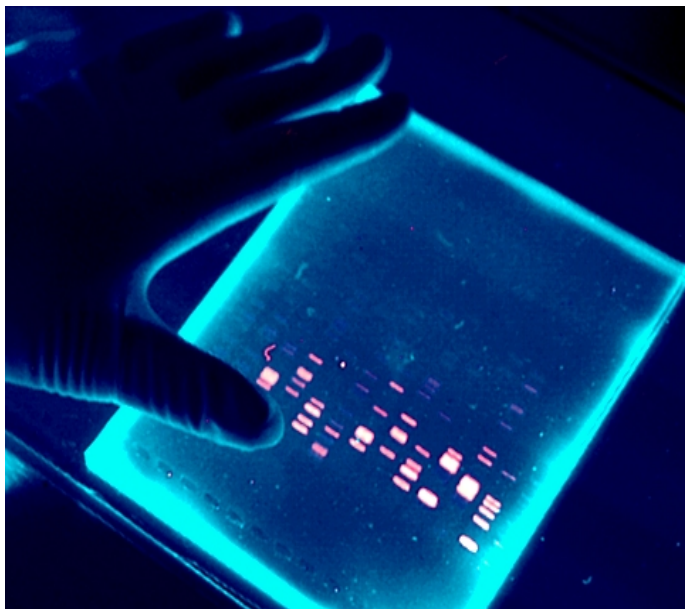
Εικόνα 36: Ηλεκτροφορητική συσκευή (PharmaciaLKBGNA 100)



Εικόνα 37: Απεικόνιση της «φόρτωσης» δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης
Στο πρώτο πηγάδι τοποθετείται πάντα το μίγμα του ladder, με την χρωστική, και ακολούθως εισάγεται το λευκό και τα δείγματα με συγκεκριμένη σειρά

Στην συνέχεια γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα, όπως φαίνεται στο εικόνα. Στο πρώτο πηγάδι τοποθετείται πάντα το μίγμα του ladder με την χρωστική και ακολούθως φορτώνεται το λευκό και τα δείγματα με συγκεκριμένη σειρά. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία και ρυθμίζεται στην ένδειξη 135 mA.

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20 λεπτά μέχρις ότου οι 'ζώνες' DNA να διαχωριστούν, επαρκώς, η μία από την άλλη. Τέλος τα αποτελέσματα γίνονται ορατά με παρατήρηση κάτω από UV ακτινοβολία, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Παρατήρηση των ζωνών του DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) στα 312nm, λόγω εκομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο

2.6. Διαδικασία Real-Time PCR με LightSNIP

Χρησιμοποιήθηκε ο Light Cycler 480 Instrument (ROCHE DIAGNOSTICS, Γερμανία), ο οποίος είναι ένας ταχύς θερμικός κυκλοποιητής με ικανότητα παρακολούθησης της PCR σε "πραγματικό χρόνο". Ο Light Cycler 480 (LC480) παρέχει την δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης 96 δειγμάτων με όγκους από 20μl έως 100μl και χρησιμοποιεί 5 φίλτρα διέγερσης και 6 φίλτρα εκπομπής, τα οποία κάθε φορά συνδυάζονται κατάλληλη για την ακριβή ανίχνευση φθορισμού. Αποτελείται από δύο κύρια συστήματα:

A) την μονάδα του θερμικού κυκλοποιητή, που συνοδεύεται από τη θέση υποδοχής των πλακών πολλαπλών θέσεων

B) τη μονάδα ανίχνευσης, που αποτελείται από την λάμπα Xenon, την οπτική μονάδα και την CCD κάμερα.

Σημαντικό πλεονέκτημα του LC480 είναι η ταχύτητα της αντίδρασης, καθώς μόλις σε 30min ολοκληρώνεται μία αντίδραση PCR 30 κύκλων. Οποιαδήποτε ασυμβασία μεταξύ DNA και Simple Probe μειώνει τους δεσμούς υδρογόνου και συνεπώς η θερμοκρασία τήξης κατά την αποδιάταξη των αλυσίδων, καθιστώντας έτσι αδύνατη την ανάλυση των πολυμορφισμών. Κατά τη ανάλυση με LightSNIP ως σύστημα ανίχνευσης φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε το Simple Probe, που αποτελεί πατέντα τη TIBMOLBIOL (Γερμανία). Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με ειδικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτές αγαρόζης.

Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πολυμορφισμών με την διαδικασία της PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Αντιδραστήρια	Όγκος
ddH ₂ O	10,4 μL
Reagent Mix buffer(Qiagen)	1,00 μL
FastStart DNA Master	2,0 μL
MgCl ₂	1,6 μL
Converted DNA	5,0 μL (50ng)
Τελική συγκέντρωση MgCl ₂	3,0Mm

Πίνακας 15: Αναλογίες Reaction Mix για την διαδικασία PCR

Ειδικότερα για τον TNF-α για τον πολυμορφισμό -308A/G (rs1800629) οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5'-GGAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' και 5'-CTGTCTCGGTTTCTTCTCCATGGCG-3'. Η βάση στο 3-άκρο του εμπρόσθιου εκκινητή ενσωματώθηκε για να φτιάξει τη θέση περιορισμού NcoI στην μελετούμενη πολυμορφική περιοχή (Wilson et al., 1992) Το παραγόμενο επιθυμητό προϊόν για τον πολυμορφισμό -308A/G του TNF-α είχε μέγεθος 195bp. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	45 sec	40
Αποδιάταξη	65°C	60 sec	
Υβριδοποίηση	72°C	60 sec	
Επέκταση	72°C	10 min	

Πίνακας 16: Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του TNF-α (rs1800629)

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό ORMDL3 (rs7216389), το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Nsi I και οι συνθήκες της PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	5 min	35
Αποδιάταξη	94°C	40 sec	
Υβριδοποίηση	72°C	50 sec	
Επέκταση	72°C	10 min	

Πίνακας 17: Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του ORMDL3 (rs7216389)

Για τον πολυμορφισμό MTNR1B (rs10830963) οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 5'-ATGCTAAGAATTACACACCAGCT-3' και 5'-CACAGTGCAGACTGTTTTCTAATC-3'. Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι το PvuII και οι συνθήκες της PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Το παραγόμενο επιθυμητό προϊόν είχε μέγεθος 125bp.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	5 min	35
Αποδιάταξη	94°C	1 min	
Υβριδοποίηση	60°C	1 min	
Επέκταση	72°C	25 sec	
Τελική Επέκταση	72°C	10 min	

Πίνακας 18: Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του MTNR1B (rs10830963)

Για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς οι συνθήκες PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 19.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	10 min	45
Αποδιάταξη	95°C	10 sec	
Υβριδοποίηση	60°C	10 sec	
Επέκταση	72°C	15 sec	
Ψύξη	40°C	20 sec	

Πίνακας 19: Συνθήκες PCR αντίδρασης για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς

2.7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το δείγμα αποτελείται από 1498 άτομα (784 [52,3%] γυναίκες και 714 [47,7%] άνδρες). 1391 άτομα (92,9%) ήταν μάρτυρες και 107 (7,1%) ήταν ασθενείς (Πίνακας 11 ανωτέρω).

Για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε έγινε ανάλυση της κατανομής τους σε σχέση με την ομάδα (ασθενείς vs μαρτύρων). Το αντίστοιχο στατιστικό τεστ σε αυτές τις περιπτώσεις είναι το χ^2 ως τεστ ομοιογένειας της κατανομής μεταξύ των δύο ομάδων. Σε περίπτωση που έχουμε $p < 0,05$ απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας της κατανομής, που σημαίνει ότι πιθανόν το γονίδιο αυτό να έχει σχέση με το άσθμα ή/και τον $\Sigma\Delta\tau 2$.

Για τη σύγκριση μεταβλητών μεταξύ μαρτύρων και ασθενών έγινε χρήση του κριτηρίου Pearson χ^2 test. Το κριτήριο χ^2 χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των αποκλίσεων από την ισορροπία Hardy-Weinberg για κάθε έναν εκ των έντεκα πολυμορφισμών. Υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γονότυπων, των αλληλόμορφων, υπολογίστηκαν τα p value και οι σχετικοί λόγοι (odds ratio). Όλες οι τιμές p βασίστηκαν σε δίπλευρους ελέγχους και συγκρίθηκαν με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ίσο με 5%.

Η στατιστική μεθοδολογία αναφέρει ότι όταν το odds ratio (OR) είναι 1, τότε υπάρχει 50% πιθανότητα να εμφανιστεί νόσος. Εάν $OR > 1$, τότε θα εμφανιστεί νόσος ενώ εάν $OR < 1$ δεν θα εμφανιστεί νόσος.

Το μοντέλο Hardy-Weinberg, περιγράφει και προβλέπει συχνότητες γονότυπου και αλληλόμορφων σε έναν μη εξελισσόμενο πληθυσμό. Το μοντέλο έχει πέντε βασικές υποθέσεις: 1) ο πληθυσμός είναι μεγάλος, 2) δεν υπάρχει ροή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών, από μετανάστευση ή μεταφορά γαμετών, 3) οι μεταλλάξεις είναι αμελητέες, 4) τα άτομα ζευγαρώνουν τυχαία 5) η φυσική επιλογή δεν λειτουργεί στον πληθυσμό. Με βάση αυτές τις υποθέσεις, οι γονότυποι και οι συχνότητες αλληλόμορφων του πληθυσμού θα παραμείνουν αμετάβλητες σε διαδοχικές γενιές και ο πληθυσμός λέγεται ότι βρίσκεται στην ισορροπία Hardy-Weinberg. Το μοντέλο Hardy-Weinberg μπορεί επίσης να εφαρμοστεί στη συχνότητα γονότυπου ενός μόνο γονιδίου. Το μοντέλο Hardy-Weinberg μας επιτρέπει να συγκρίνουμε την πραγματική γενετική δομή του πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου με τη γενετική δομή που θα περίμενε κανείς αν ο πληθυσμός ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (δηλαδή δεν εξελίσσεται). Εάν οι συχνότητες γονότυπου διαφέρουν από εκείνες που θα περιμέναμε κάτω από την ισορροπία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι παραβιάζονται μία ή περισσότερες από τις παραδοχές του μοντέλου και προσπαθούμε να προσδιορίσουμε ποια είναι αυτή.

Πέραν τούτου στις περιπτώσεις που θα αποδεχτούμε τη στατιστική σημαντικότητα πρέπει η κατανομή των δύο αλληλόμορφων στον υγιή πληθυσμό να ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Αν ένα γονίδιο εκφράζεται με δύο αλληλόμορφα, το επικρατές A με σχετική συχνότητα p και το υπολειπόμενο a με σχετική συχνότητα q που σημαίνει ότι:

$$p + q = 1$$

Ταυτόχρονα όμως πρέπει να ισχύει στον υγιή πληθυσμό και η ακόλουθη εξίσωση:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

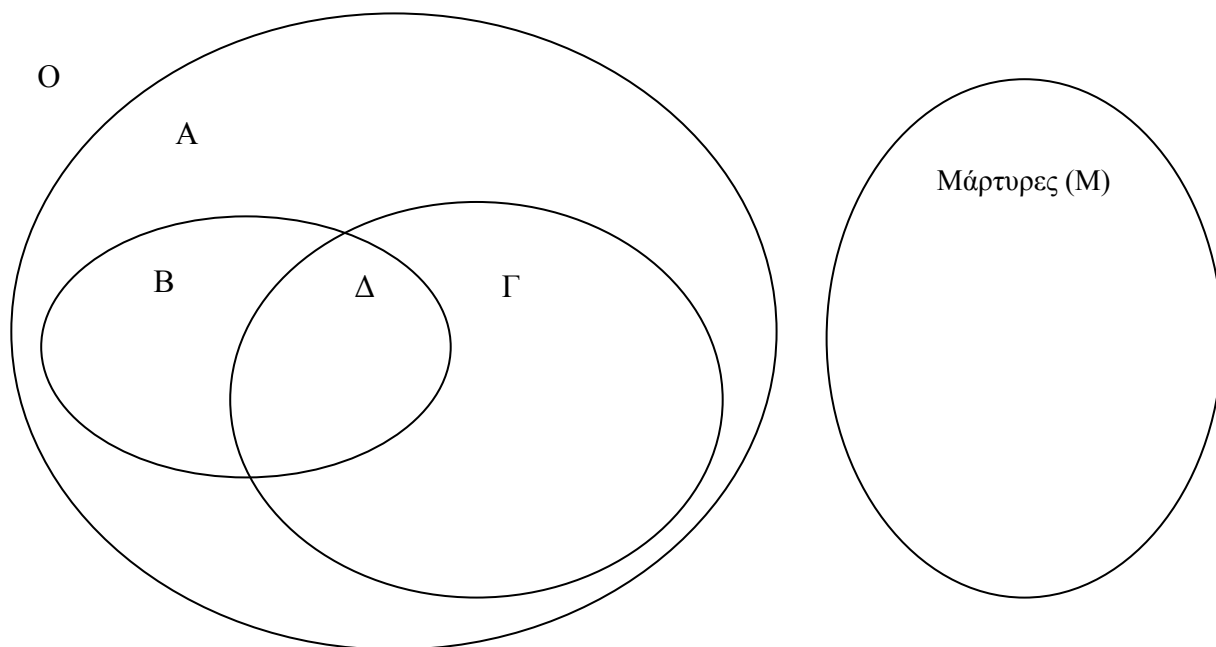
Εάν ο υπό διερεύνηση πληθυσμός είναι σε ισορροπία τότε $\text{freq}(AA)=p^2$ για τους AA ομοζυγώτες του πληθυσμού, $\text{freq}(aa)=q^2$ για τους aa ομοζυγώτες του πληθυσμού και $\text{freq}(Aa)=2pq$ για τους ετεροζυγώτες. Η τιμή 3,84 του κριτηρίου χ^2 αντιστοιχεί στο όριο της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0,05$). Αν η τιμή του κριτηρίου χ^2 είναι μεγαλύτερη από το 3,84, τότε υπάρχουν ενδείξεις για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Για να πραγματοποιηθούν οι παραπάνω υπολογισμοί και να γίνει έλεγχος κατά πόσον η κατανομή για τον υγιή πληθυσμό που έχουμε δεν διαφέρει από την αναμενόμενη, πρέπει να υπάρχουν δεδομένα για την αναμενόμενη κατανομή. Λόγω του μεγάλου αριθμού των στατιστικών δοκιμασιών έγινε διόρθωση του κριτηρίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διερεύνηση της ανεξάρτητης σχέσης του βρογχικού άσθματος, του ΣΔτ2/παχυσαρκία και καθενός των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο και με ανάλυση ανά αλληλόμορφο. Αναλυτικά η κατανομή των γονοτύπων και τα αποτελέσματα των μοντέλων λογαριθμικής παλινδρόμησης, χωριστά για κάθε πολυμορφισμό καθώς και η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση υποομάδων ασθενών και μαρτύρων. Συγκεκριμένα, σε σχηματική απεικόνιση πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις των κάτωθι υποομάδων (σχήμα 1):



Ασθματικοί ασθενείς (O) (A+B+Γ+Δ)

A: Ασθματικοί ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2

B: Ασθματικοί ασθενείς με ΣΔτ2

Γ: Ασθματικοί ασθενείς με παχυσαρκία

Δ: Ασθματικοί ασθενείς με παχυσαρκία, ΣΔτ2

Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση συγκρίσεων υποομάδων

1. Η σύγκριση μεταξύ του συνόλου των ασθενών και των μαρτύρων (O vs M)
2. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών χωρίς παχυσαρκία και χωρίς ΣΔτ2 και των μαρτύρων και (A vs M)
3. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα και ΣΔτ2 και των μαρτύρων (B vs M)
4. Η σύγκριση μεταξύ των των ασθενών με άσθμα και παχυσαρκία και των μαρτύρων (Γ vs M)
5. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα, ΣΔτ2 και παχυσαρκία και των μαρτύρων (Δ vs M)
6. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα, χωρίς ΣΔτ2 και χωρίς παχυσαρκία με τους ασθενείς με άσθμα και ΣΔτ2 (A vs B)
7. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα, χωρίς ΣΔτ2 και χωρίς παχυσαρκία με τους ασθενείς με άσθμα και παχυσαρκία (A vs Γ)
8. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα, χωρίς ΣΔτ2 και χωρίς παχυσαρκία με τους ασθενείς με άσθμα, ΣΔτ2 και παχυσαρκία (A vs Δ)
9. Η σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα και ΣΔτ2 με τους ασθενείς με άσθμα και παχυσαρκία (B vs Γ)

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ασθενών με άσθμα και ΣΔτ2 έναντι των ασθενών με άσθμα, ΣΔτ2 και παχυσαρκία διότι αυτό είναι ανέφικτο για μαθηματικούς λόγους (B vs Δ). Ομοίως δεν πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ασθενών με παχυσαρκία έναντι των ασθενών με άσθμα, ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Γ vs Δ).

3.1. *TNF-a* (rs1800629)

Για το γονίδιο *TNF-a* (rs1800629) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 20).

ΟΜΑΔΕΣ	AA+GA (n)	GG (n)	OR	95%CI	p-value
Ασθενείς (O)	18.86%(20)	81.14%(86)	1.30	0.78-2.16	0.312
Μάρτυρες	15.18% (201)	84.82% (1123)			
Ασθενείς(A)	14.28%(3)	85.72%(18)	0.93	0.27-3.19	1.000
Μάρτυρες	15.18%(201)	84.82%(1123)			
Ασθενείς (B)	21.95%(9)	78.05%(32)	1.57	0.74-3.34	0.237
Μάρτυρες	15.18%(201)	84.82%(1123)			
Ασθενείς (Γ)	20.23%(17)	79.77%(67)	1.42	0.82-2.46	0.214
Μάρτυρες	15.18%(201)	84.82%(1123)			
Ασθενείς (Δ)	22.50%(9)	77.50%(31)	1.62	0.76-3.46	0.206
Μάρτυρες	15.18%(201)	84.82%(1123)			
(A)	14.28%(3)	85.72%(18)	0.59	0.14-2.47	0.735
(B)	21.95%(9)	78.05%(32)			
(A)	14.28%(3)	85.72%(18)	0.66	0.17-2.49	0.758
(Γ)	20.23%(17)	79.77%(67)			
(A)	14.28%(3)	85.72%(18)	0.57	0.14-2.40	0.518
(Δ)	22.50%(9)	77.50%(31)			
(B)	21.95%(9)	78.05%(32)	1.11	0.45-2.76	0.825
(Γ)	20.23%(17)	79.77%(67)			

Πίνακας 20: Ανάλυση πολυμορφισμού rs1800629

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 21, Πίνακας 22).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	AA	9	8.327	p=0.079	0.054
	AG	192	193.346	q=0.921	0.009
Υπολειπόμενο	GG	1123	1122.327	Χ²=0.064	0.000

Πίνακας 21: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800629 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	AA	1	1.040	p=0.099	0.002
	AG	19	18.920	q=0.901	0.000
Υπολειπόμενο	GG	86	86.040	Χ²=0.002	0.000

Πίνακας 22: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800629 για ασθενείς

3.2. IL-6 (rs1800795)

Για το γονίδιο **IL-6** (rs1800795) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 23)

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>GG (n)</i>	<i>CC+CG (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (Ο)</i>	7.54%(8)	92.46%(98)	0.96	0.46-2.03	0.919
<i>Μάρτυρες</i>	7.82%(106)	92.18%(1249)			
<i>Ασθενείς (Α)</i>	0%(0)	100%(21)	-	-	-
<i>Μάρτυρες</i>	7.82%(106)	92.18%(1249)			
<i>Ασθενείς (Β)</i>	19.5%(8)	80.5%(31)	3.04	1.36-6.78	0.011
<i>Μάρτυρες</i>	7.82%(106)	92.18%(1249)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	9.50%(8)	90.50%(76)	1.24	0.58-2.64	0.575
<i>Μάρτυρες</i>	7.82%(106)	92.18%(1249)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	20.00%(8)	80.00%(32)	2.95	1.32-6.55	0.013
<i>Μάρτυρες</i>	7.82%(106)	92.18%(1249)			
<i>(Α)</i>	0%(0)	100%(21)	-	-	-
<i>(Β)</i>	19.5%(8)	80.5%(31)			
<i>(Α)</i>	0%(0)	100%(21)	-	-	-
<i>(Γ)</i>	9.50%(8)	90.50%(76)			
<i>(Α)</i>	0%(0)	100%(21)	-	-	-
<i>(Δ)</i>	20.00%(8)	80.00%(32)			
<i>(Β)</i>	19.5%(8)	80.5%(31)	2.45	0.84-7.11	0.092
<i>(Γ)</i>	9.50%(8)	90.50%(76)			

Πίνακας 23: Ανάλυση πολυμορφισμού rs1800795

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 24, Πίνακας 25).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	GG	106	94.850	p=0.265	1.311
	CG	505	527.299	q=0.735	0.943
Υπολειπόμενο	CC	744	732.850	X²=2.423	0.170

Πίνακας 24: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800795 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	GG	8	6.134	p=0.241	0.567
	CG	35	38.731	q=0.759	0.359
Υπολειπόμενο	CC	63	61.134	X²=0.984	0.057

Πίνακας 25: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800795 για ασθενείς

3.3. *SPINK5* (rs2303067)

Για το γονίδιο *SPINK5* (rs2303067), η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 26).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>AA+GA (n)</i>	<i>GG (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	75.67%(56)	24.33%(18)	0.98	0.57-1.69	0.946
<i>Μάρτυρες</i>	76.02%(1005)	23.98%(317)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	87.50%(14)	12.50%(2)	2.21	0.50-9.77	0.385
<i>Μάρτυρες</i>	76.02%(1005)	23.98%(317)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	76.92%(20)	23.08%(6)	1.05	0.42-2.64	0.915
<i>Μάρτυρες</i>	76.02%(1005)	23.98%(317)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	73.68%(42)	23.32%(15)	0.88	0.48-1.6	0.686
<i>Μάρτυρες</i>	76.02%(1005)	23.98%(317)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	80.00%(20)	20.00%(5)	1.26	0.47-3.39	0.644
<i>Μάρτυρες</i>	76.02%(1005)	23.98%(317)			
<i>(A)</i>	87.50%(14)	12.50%(2)	2.10	0.37-11.96	0.688
<i>(B)</i>	76.92%(20)	23.08%(6)			
<i>(A)</i>	87.50%(14)	12.50%(2)	2.5	0.51-12.32	0.329
<i>(Γ)</i>	73.68%(42)	23.32%(15)			
<i>(A)</i>	87.50%(14)	12.50%(2)	1.75	0.30-10.34	0.685
<i>(Δ)</i>	80.00%(20)	20.00%(5)			
<i>(B)</i>	76.92%(20)	23.08%(6)	1.19	0.40-3.53	0.753
<i>(Γ)</i>	73.68%(42)	23.32%(15)			

Πίνακας 26: Ανάλυση πολυμορφισμού rs2303067

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 27, Πίνακας 28).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	AA	350	347.206	p=0.512	0.022
	AG	655	660.588	q=0.488	0.047
Υπολειπόμενο	GG	317	314.206	X²=0.095	0.025

Πίνακας 27: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs2303067 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	AA	17	18.003	p=0.493	0.056
	AG	39	36.993	q=0.507	0.109
Υπολειπόμενο	GG	18	19.003	X²=0.218	0.053

Πίνακας 28: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs2303067 για ασθενείς

3.4. *ORMDL3* (rs7216389)

Για το γονίδιο *ORMDL3* (rs7216389), η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 29).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>TT</i> (<i>n</i>)	<i>CC+TC</i> (<i>n</i>)	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	29.48(23)	70.52%(55)	1.07	0.65-1.76	0.802
<i>Μάρτυρες</i>	28.18%(375)	71.82%(956)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	31.25%(5)	68.75%(11)	1.16	0.40-3.36	0.783
<i>Μάρτυρες</i>	28.18%(375)	71.82%(956)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	21.42%(6)	78.58%(22)	0.70	0.28-1.73	0.432
<i>Μάρτυρες</i>	28.18%(375)	71.82%(956)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	29.5%(18)	70.50%(43)	1.07	0.61-1.87	0.821
<i>Μάρτυρες</i>	28.18%(375)	71.82% (956)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	22.22%(6)	77.75%(21)	0.73	0.29-1.82	0.496
<i>Μάρτυρες</i>	28.18%(375)	71.82% (956)			
<i>(A)</i>	31.25%(5)	68.75%(11)	1.67	0.41-6.69	0.492
<i>(B)</i>	21.42%(6)	78.58%(22)			
<i>(A)</i>	31.25%(5)	68.75%(11)	1.09	0.33-3.58	1.000
<i>(Γ)</i>	29.5 %(18)	70.50%(43)			
<i>(A)</i>	31.25%(5)	68.75%(11)	1.59	0.39-6.41	0.719
<i>(Δ)</i>	22.22%(6)	77.75%(21)			
<i>(B)</i>	21.42%(6)	78.58%(22)	0.65	0.23-1.8	0.425
<i>(Γ)</i>	29.5%(18)	70.50%(43)			

Πίνακας 29: Ανάλυση πολυμορφισμού rs7216389

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 30, Πίνακας 31).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	TT	375	380.875	p=0.535	0.091
	TC	674	662.251	q=0.465	0.208
Υπολειπόμενο	CC	282	287.875	Χ²=0.419	0.120

Πίνακας 30: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7216389 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	TT	23	22.080	p=0.532	0.038
	TC	37	38.840	q=0.468	0.087
Υπολειπόμενο	CC	18	17.080	Χ²=0.175	0.050

Πίνακας 31: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7216389 για ασθενείς

3.5. *MTNR1B* (rs10830963)

Για τον πολυμορφισμό *MTNR1B* (rs 10830963), η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 32).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>GG+CG (n)</i>	<i>CC (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	49.35%(38)	50.65%(39)	1.13	0.71-1.78	0.611
<i>Μάρτυρες</i>	46.37%(614)	53.63%(710)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	37.50 %(6)	62.50 %(10)	0.69	0.25-1.92	0.479
<i>Μάρτυρες</i>	46.37%(614)	53.63%(710)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	37.04%(10)	62.96%(17)	0.68	0.31-1.50	0.335
<i>Μάρτυρες</i>	46.37%(614)	53.63%(710)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	53.33%(32)	46.67%(28)	1.32	0.79-2.22	0.291
<i>Μάρτυρες</i>	46.37%(614)	53.63%(710)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	38.46%(10)	61.54%(16)	0.72	0.33-1.60	0.423
<i>Μάρτυρες</i>	46.37%(614)	53.63%(710)			
<i>(A)</i>	37.50%(6)	62.50 %(10)	1.02	0.28-3.66	0.976
<i>(B)</i>	37.04%(10)	62.96%(17)			
<i>(A)</i>	37.50%(6)	62.50%(10)	0.53	0.17-1.63	0.260
<i>(Γ)</i>	53.33%(32)	46.67%(28)			
<i>(A)</i>	37.50%(6)	62.50 %(10)	0.96	0.27-3.47	0.950
<i>(Δ)</i>	38.46%(10)	61.54%(16)			
<i>(B)</i>	37.04%(10)	62.96%(17)	0.51	0.20-1.31	0.059
<i>(Γ)</i>	53.33%(32)	46.67%(28)			

Πίνακας 32: Ανάλυση πολυμορφισμού rs10830963

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια δεν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες (Πίνακας 33) ενώ βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg για τους ασθενείς (Πίνακας 34).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	GG	115	100.348	p=0.275	2.139
	CG	499	528.305	q=0.725	1.626
Υπολειπόμενο	CC	710	695.348	X²=4.074	0.309

Πίνακας 33: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs10830963 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	GG	7	6.575	p=0.292	0.028
	CG	31	31.851	q=0.708	0.023
Υπολειπόμενο	CC	39	38.575	X²=0.055	0.005

Πίνακας 34: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs10830963 για ασθενείς

3.6. *CDKAL1* (rs7756992)

Για τον πολυμορφισμό *CDKAL1* (rs7756992) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 35).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>AA (n)</i>	<i>GG+GA (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (Ο)</i>	68.03%(49)	31.94%(23)	2.07	1.24-3.43	0.004
<i>Μάρτυρες</i>	50.77%(661)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Α)</i>	73.34%(11)	26.66%(4)	2.67	0.84-8.42	0.082
<i>Μάρτυρες</i>	50.77%(661)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Β)</i>	65.39%(17)	34.61%(9)	1.83	0.81-4.14	0.140
<i>Μάρτυρες</i>	50.77%(661)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	67.86%(38)	32.14%(18)	2.05	1.16-3.62	0.012
<i>Μάρτυρες</i>	50.77%(661)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	68.00%(17)	32.00%(8)	2.06	0.88-4.81	0.088
<i>Μάρτυρες</i>	50.77%(661)	49.23%(641)			
<i>(Α)</i>	73.34%(11)	26.66%(4)	1.46	0.36-5.91	0.734
<i>(Β)</i>	65.39%(17)	34.61%(9)			
<i>(Α)</i>	73.34%(11)	26.66%(4)	1.30	0.36-4.66	0.763
<i>(Γ)</i>	67.86%(38)	32.14%(18)			
<i>(Α)</i>	73.34%(11)	26.66%(4)	1.29	0.31-5.35	1.000
<i>(Δ)</i>	68.00%(17)	32.00%(8)			
<i>(Β)</i>	65.39%(17)	34.61%(9)	0.89	0.33-2.39	0.825
<i>(Γ)</i>	67.86%(38)	32.14%(18)			

Πίνακας 35: Ανάλυση πολυμορφισμού rs7756992

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 36, Πίνακας 37).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	GG	105	106.858	p=0.286	0.032
	AG	536	532.284	q=0.714	0.026
Υπολειπόμενο	AA	661	662.858	X²=0.063	0.005

Πίνακας 36: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7756992 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	GG	2	2,170	p=0,174	0,013
	AG	21	20,660	q=0,826	0,006
Υπολειπόμενο	AA	49	49,170	X²=0,020	0,001

Πίνακας 37: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7756992 για ασθενείς

3.7. *TCF7L2* (rs7903146)

Για τον πολυμορφισμό *TCF7L2* (rs7903146) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 38).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>TT+CT (n)</i>	<i>CC (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	73.97%(54)	26.03%(19)	2.32	1.36-3.96	0.001
<i>Μάρτυρες</i>	55.00%(724)	45.00%(592)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	80.00%(12)	20.00%(3)	3.27	0.92-11.64	0.053
<i>Μάρτυρες</i>	55.00%(724)	45.00%(592)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	77.7%(21)	22.3%(6)	2.86	1.15-7.14	0.036
<i>Μάρτυρες</i>	55.00%(724)	45.00%(592)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	73.68%(42)	26.32%(15)	2.29	1.26-4.17	0.005
<i>Μάρτυρες</i>	55.00%(724)	45.00%(592)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	80.76%(21)	19.24%(5)	3.43	1.29-9.16	0.009
<i>Μάρτυρες</i>	55.00%(724)	45.00%(592)			
<i>(A)</i>	80.00%(12)	20.00%(3)	1.14	0.24-6.42	0.946
<i>(B)</i>	77.7%(21)	22.3%(6)			
<i>(A)</i>	80.00%(12)	20.00%(3)	1.43	0.35-5.77	0.700
<i>(Γ)</i>	73.68%(42)	26.32%(15)			
<i>(A)</i>	80.00%(12)	20.00%(3)	0.95	0.19-4.71	0.700
<i>(Δ)</i>	80.76%(21)	19.24%(5)			
<i>(B)</i>	77.7%(21)	22.3%(6)	1.25	0.42-3.69	0.534
<i>(Γ)</i>	73.68%(42)	26.32%(15)			

Πίνακας 38: Ανάλυση πολυμορφισμού rs7903146

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 39, Πίνακας 40).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	TT	149	144.781	p=0.332	0.123
	CT	575	583.437	q=0.668	0.122
Υπολειπόμενο	CC	592	587.781	X²=0.275	0.030

Πίνακας 39: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7903146 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	TT	14	15.836	p=0.466	0.213
	CT	40	36.329	q=0.534	0.371
Υπολειπόμενο	CC	19	20.836	X²=0.745	0.162

Πίνακας 40: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7903146 για ασθενείς

3.8. SLC30A8 (rs13266634)

Για τον πολυμορφισμό *TCF7L2* (rs7903146) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 41).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>CC (n)</i>	<i>GG+GA (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	65.82%(52)	31.94%(23)	2.10	1.27-3.48	0.003
<i>Μάρτυρες</i>	52.20%(689)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	56.25%(9)	26.66%(4)	2.09	0.64-6.83	0.211
<i>Μάρτυρες</i>	52.20%(689)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	71.43%(20)	34.61%(9)	2.07	0.19-1.00	0.067
<i>Μάρτυρες</i>	52.20%(689)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	67.75%(42)	32.14%(18)	2.17	1.24-3.81	0.006
<i>Μάρτυρες</i>	52.20%(689)	49.23%(641)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	70.38%(19)	32.00%(8)	2.21	0.96-5.08	0.056
<i>Μάρτυρες</i>	52.20%(689)	49.23%(641)			
<i>(A)</i>	56.25%(9)	26.66%(4)	1.01	0.25-4.17	1.000
<i>(B)</i>	71.43%(20)	34.61%(9)			
<i>(A)</i>	56.25%(9)	26.66%(4)	0.93	0.26-3.54	1.000
<i>(Γ)</i>	67.75%(42)	32.14%(18)			
<i>(A)</i>	56.25%(9)	26.66%(4)	0.95	0.22-3.99	1.000
<i>(Δ)</i>	70.38%(19)	32.00%(8)			
<i>(B)</i>	71.43%(20)	34.61%(9)	0.95	0.36-2.49	0.921
<i>(Γ)</i>	67.75%(42)	32.14%(18)			

Πίνακας 41: Ανάλυση πολυμορφισμού rs13266634

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες ενώ τα 2 αλληλόμορφα γονίδια δεν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg για τους ασθενείς. (Πίνακας 42, Πίνακας 43).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	CC	689	684.432	p=0.720	0.030
	CT	523	532.136	q=0.280	0.157
Υπολειπόμενο	TT	108	103.432	X²=0.389	0.202

Πίνακας 42 : Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs13266634 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	CC	52	47.877	p=0.778	0.355
	CT	19	27.247	q=0.222	2.496
Υπολειπόμενο	TT	8	3.877	X²=7.237	4.386

Πίνακας 43: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs13266634 για ασθενείς

3.9. PPAR γ 2 (rs1801282)

Για τον πολυμορφισμό *PPAR γ 2* (rs1801282) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 44).

<i>ΟΜΑΔΕΣ</i>	<i>CG+GG (n)</i>	<i>CC (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95%CI</i>	<i>p-value</i>
<i>Ασθενείς (O)</i>	10.66%(8)	89.34%(67)	0.51	0.23-1.09	0.078
<i>Μάρτυρες</i>	19.10%(85)	80.90%(360)			
<i>Ασθενείς (A)</i>	6.25%(1)	93.75%(15)	0.2	0.04-2.17	0.326
<i>Μάρτυρες</i>	19.10%(85)	80.90%(360)			
<i>Ασθενείς (B)</i>	17.86%(5)	82.14%(23)	0.92	0.34-2.49	0.871
<i>Μάρτυρες</i>	19.10%(85)	80.90%(360)			
<i>Ασθενείς (Γ)</i>	12.07%(7)	87.935(51)	0.58	0.25-1.33	0.193
<i>Μάρτυρες</i>	19.10%(85)	80.90%(360)			
<i>Ασθενείς (Δ)</i>	18.52%(5)	81.48%(22)	0.96	0.35-2.61	0.940
<i>Μάρτυρες</i>	19.10%(85)	80.90%(360)			
<i>(A)</i>	6.25%(1)	93.75%(15)	0.31	0.03-2.89	0.392
<i>(B)</i>	17.86%(5)	82.14%(23)			
<i>(A)</i>	6.25%(1)	93.75%(15)	0.49	0.06-4.27	0.678
<i>(Γ)</i>	12.07%(7)	87.935(51)			
<i>(A)</i>	6.25%(1)	93.75%(15)	0.29	0.03-2.77	0.386
<i>(Δ)</i>	18.52%(5)	81.48%(22)			
<i>(B)</i>	17.86%(5)	82.14%(23)	1.58	0.45-5.52	0.515
<i>(Γ)</i>	12.07%(7)	87.935(51)			

Πίνακας 44: Ανάλυση πολυμορφισμού rs1801282

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 45, Πίνακας 46)

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	GG	8	4.859	p=0.104	2.030
	CG	77	83.282	q=0.896	0.474
Υπολειπόμενο	CC	360	356.859	X²=2.532	0.028

Πίνακας 45: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1801282 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O) ² /E
Επικρατές	GG	0	0.213	p=0.053	0.213
	CG	8	7.573	q=0.947	0.024
Υπολειπόμενο	CC	67	67.213	X²=0.238	0.001

Πίνακας 46: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1801282 για ασθενείς

3.10. FTO (rs9939609)

Για τον πολυμορφισμό FTO (rs9939609) η ανάλυση είναι η ακόλουθη (Πίνακας 47).

ΟΜΑΔΕΣ	AA+TA (n)	TT (n)	OR	95%CI	p-value
Ασθενείς (O)	67.53%(52)	32.47%(25)	0.98	0.60-1.61	0.944
Μάρτυρες	67.92%(849)	32.085(401)			
Ασθενείς (A)	43.75%(7)	56.25%(9)	0.37	0.14-0.99	0.040
Μάρτυρες	67.92%(849)	32.085(401)			
Ασθενείς (B)	74.07%(20)	25.93%(7)	1.35	0.57-3.22	0.497
Μάρτυρες	67.92%(849)	32.085(401)			
Ασθενείς (Γ)	75.00%(45)	25.00%(15)	1.42	0.78-2.57	0.250
Μάρτυρες	67.92%(849)	32.085(401)			
Ασθενείς (Δ)	76.92%(20)	23.08%(6)	1.57	0.63-3.95	0.330
Μάρτυρες	67.92%(849)	32.085(401)			
(A)	43.75%(7)	56.25%(9)	0.27	0.07-1.01	0.047
(B)	74.07%(20)	25.93%(7)			
(A)	43.75%(7)	56.25%(9)	0.26	0.08-0.82	0.017
(Γ)	75.00%(45)	25.00%(15)			
(A)	43.75%(7)	56.25%(9)	0.23	0.06-0.90	0.029
(Δ)	76.92%(20)	23.08%(6)			
(B)	74.07%(20)	25.93%(7)	0.95	0.34-2.70	0.927
(Γ)	75.00%(45)	25.00%(15)			

Πίνακας 47: Ανάλυση πολυμορφισμού rs9939609

Η ανάλυση για την ισορροπία Hardy-Weinberg για τους μάρτυρες και τους ασθενείς έδειξε ότι τα 2 αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. (Πίνακας 48, Πίνακας 49).

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	AA	246	239.805	p=0.438	0.160
	TA	603	615.390	q=0.562	0,249
Υπολειπόμενο	TT	401	394.805	X²=0.507	0.097

Πίνακας 48: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs9939609 για μάρτυρες

	Γονότυποι	Παρατηρούμενες Συχνότητες	Αναμενόμενες Συχνότητες	Αποτελέσματα	(E-O)2/E
Επικρατές	AA	12	13.299	p=0.416	0.127
	TA	40	37.403	q=0.584	0.180
Υπολειπόμενο	TT	25	26.299	X²=0.371	0.064

Πίνακας 49: Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs9939609 για ασθενείς

Οι πολυμορφισμοί *TNF-a* (rs1800629), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *CDKAL1* (rs7756992), *TCF7L2* (rs7903146), *PPAR γ 2* (rs1801282), *IL-6* (rs1800795), *FTO* (rs9939609), ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα των μαρτύρων. Ένδειξη για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg εντοπίστηκαν στην περίπτωση των πολυμορφισμών *MTNR1B* (rs10830963) με τιμή $\chi^2= 4,074$ για του μάρτυρες και *SLC30A8* (rs13266634), για την ομάδα των ασθενών με τιμή $\chi^2=7,237$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα με 1.498 συμμετέχοντες ελληνικής καταγωγής. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών γονιδίων με το βρογχικό άσθμα και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι *TNF-a* (rs1800629), *IL-6* (rs1800795), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *CDKAL1* (rs7756992), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *PPARγ2* (rs1801282), *FTO* (rs9939609).

Η επιλογή των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν έγινε με βάση τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό που μπορεί να οδηγεί σε βρογχικό άσθμα και συσχετίστηκαν με την κλινική συνύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Κατά συνέπεια μελετήθηκαν πολυμορφισμοί που σχετίζονται με βρογχικό άσθμα και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ υποομάδων ασθενών και μαρτύρων.

Το άσθμα είναι μια πολυπαραγοντική χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή των αεραγωγών και μια ποικιλία γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων συμβάλλουν στην παθογένεσή του. Τα ανοσολογικά και φλεγμονώδη στοιχεία είναι σημαντικοί παράγοντες για την πρόκληση, την πρόοδο και τα κλινικά αποτελέσματα του άσθματος. Η διαχείριση του άσθματος και των φαρμάκων θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τους παράγοντες που εμπλέκονται και συμβάλλουν σε αποκρίσεις στα φάρμακα και επομένως καθορίζουν την εξέλιξη της νόσου.

Για δεκαετίες, πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να ταυτοποιήσουν γενετικούς συνδέσμους με την προδιάθεση για άσθμα, συχνά σε μοναδικούς και ιδιαίτερα ομοιογενείς πληθυσμούς. Όμως, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες απέτυχαν να παρέχουν σαφείς και αξιόπιστους συσχετισμούς που θα βοηθούσαν την ταυτοποίηση της γενετικής βάσης του άσθματος. Αυτή η αποτυχία έχει οδηγήσει σε αμφισβήτηση της σημασίας της γενετικής του άσθματος για την ανάπτυξη νέων θεραπειών. Εντούτοις, η ταχεία ανάπτυξη πιο κατανοητών περιοχών της αλληλουχίας γονιδιωμάτων και της γενετικής (αλληλουχία ολόκληρου γονιδιώματος) έχει διευκολύνει τις μελέτες σε πολύ μεγάλους πληθυσμούς παγκοσμίως. Τις τελευταίες δεκαετίες συνεχίζονται να συσσωρεύονται οι ενδείξεις σχετικά με την κλινική σημασία των εργαστηριακών δεικτών των παθοφυσιολογικών γεγονότων. Αυτοί οι δείκτες είναι μόρια, συνήθως στην κλίμακα picogram (pg), που λέγονται βιοδείκτες. Συνεχώς απομονώνονται νέοι και πιο εξειδικευμένοι βιοδείκτες με τη χρήση εξελιγμένων προσεγγίσεων βιοπληροφορικής. Ο βιοδείκτης ορίζεται ως ένα βιοχημικό χαρακτηριστικό που μπορεί αντικειμενικά να ποσοτικοποιηθεί και να αξιολογηθεί ως ένδειξη φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθογόνων συμβάντων, ή αποκρίσεων σε φαρμακολογικές ή άλλες θεραπευτικές παρεμβάσεις. Έτσι, οι βιοδείκτες κατατάσσονται σε 3 διαφορετικούς τύπους: τον τύπο 0, που εκτιμά την εμφάνιση ή πρόοδο μιας νόσου, τον τύπο 1, που μετράει την ανταπόκριση στις θεραπευτικές παρεμβάσεις, και τον τύπο 2, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναπληρωματικό κλινικό καταληκτικό σημείο.¹¹¹

Η εύρεση γενετικών βιοδεικτών, όπως είναι οι γενετικοί πολυμορφισμοί, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της εμφάνισης της νόσου αλλά και στην ανεύρεση νέων θεραπειών. Οι γενετικές ασθένειες διαιρούνται σε μονογονιδιακές και πολυγονιδιακές μορφές. Οι μονογονιδιακές ασθένειες οφείλονται σε αλλαγή/ές σε ένα μόνο γονίδιο και κληρονομούνται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel. Οι πολυγονιδιακές ασθένειες προκαλούνται από αλλαγές σε αρκετά γονίδια και εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, αναφέρονται, συχνά, ως σύνθετες ασθένειες. Μέχρι πρόσφατα, είχε εκτιμηθεί ο ρόλος μόνο ενός πολύ μικρού αριθμού γονιδίων. Τώρα με τη χρήση microchip τεχνολογίας που περιέχει περισσότερους από 500.000 πολυμορφισμούς, μπορεί να αναλυθεί το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο ρόλος περισσότερων γονιδίων που προδιαθέτουν για την εμφάνιση μίας νόσου καθώς και να αναγνωριστούν γονίδια που δε θεωρούνταν υποψήφια για τη συγκεκριμένη ασθένεια.⁴⁶

Διαφορετικές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση γονιδίων που σχετίζονται με σύνθετες ασθένειες. Σε μία στρατηγική επιλέγονται γονίδια για τα οποία υπάρχουν σημαντικές πληροφορίες για το βιολογικό τους ρόλο, ενώ άλλη στρατηγική αναφέρεται στην εύρεση θέσης, όπου τα γονίδια που ενδιαφέρουν εντοπίζονται βάση του προτύπου συγκληρονόμησης με γνωστούς γενετικούς δείκτες που παρατηρούνται σε οικογένειες και πληθυσμούς. Στην περίπτωση του ΣΔτ2 υπάρχουν τουλάχιστον δύο κύρια προβλήματα στην εύρεση των υπεύθυνων γονιδίων. Πρώτον, μόνο μία μικρή ομάδα ανθρώπινων γονιδίων έχουν γνωστή βιολογική δράση και δεύτερον οι γνώσεις σχετικά με τα κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη δράση και στην έκκριση της ινσουλίνης δεν είναι ολοκληρωμένες. Αυτός είναι ο λόγος που η μέθοδος διερεύνησης του ανθρώπινου γονιδιώματος καθώς και οι αναλύσεις σύνδεσης χρησιμοποιούνται κυρίως για να αποκαλύψουν στα χρωμοσώματα τους πιθανούς υπεύθυνους τόπους για σύνθετες ασθένειες όπως ο ΣΔτ2. Η σάρωση του γονιδιώματος βασίζεται στην αναζήτηση με κατάλληλες εργαστηριακές και αναλυτικές μεθόδους, ενός στατιστικού σήματος που να δείχνει την πιθανότητα συσχέτισης μιας συγκεκριμένης χρωμοσωματικής θέσης με τη νόσο.

Οι γενετικές αναλύσεις συσχέτισης είναι σημαντικές για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό των πολυμορφισμών που εντοπίζονται στο γονιδίωμα και σχετίζονται με προδιάθεση για σύνθετες ασθένειες, όπως είναι τα βρογχικό άσθμα και ο ΣΔτ2. Στις γενετικές αναλύσεις συσχέτισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο οικογενειακό υλικό όσο και υλικό βασισμένο στον πληθυσμό. Συγκεκριμένα, σε αυτές τις αναλύσεις, συγκρίνονται γονιδιώματα ατόμων που πάσχουν από κάποια ασθένεια με γονιδιώματα ατόμων του γενικού πληθυσμού. Μέσω αυτής της σύγκρισης, αναγνωρίζονται οι γενετικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και στους μάρτυρες, ακόμα και αν οι γενετικές διαφορές είναι μικρές. Είναι πιθανό, για κοινές ασθένειες οι διαφορές να έχουν ήπιες επιδράσεις στα άτομα, ο συνδυασμός, ωστόσο, αρκετών ελαφρά αλλαγμένων γονιδίων και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου.

4.1. *TNF-a (rs1800629)*

Αναλυτικότερα, στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο πολυμορφισμός rs1800629 του γονιδίου *TNF-a* με φυσικό αλληλόμορφο το G και παθογόνο το A και πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη. Αυτός ο πολυμορφισμός συνδέεται με το άσθμα και είναι συνδεδεμένος με την παχυσαρκία και την ινσουλινοαντίσταση. Το γονίδιο του *TNF-a* έχει θετικώς συσχετισθεί με κλινικά συμπτώματα άσθματος και μπορεί να επηρεάζει το άσθμα μέσω τροποποίησης μη-συγκεκριμένης φλεγμονής. Το *TNF2* σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα *TNF-a* στο πλάσμα και στο υγρό εκπλύματος πνευμόνων από ασθματικούς ασθενείς (BALF). Επομένως, ο κεντρικός ρόλος της φλεγμονής των αεραγωγών στο άσθμα και τα αυξημένα επίπεδα του *TNF-a* σε ασθματικούς πνεύμονες υποδηλώνουν ότι η λειτουργική ποικιλία του *TNF* γονιδίου μπορεί να είναι σημαντική για την νόσο.⁵⁵ Ο *TNF-a* μπορεί να είναι σημαντικός μεσολαβητής στην έναρξη της χρόνιας φλεγμονής ενεργοποιώντας την έκκριση κυτοκινών από μια ποικιλία κυττάρων στους αεραγωγούς.⁸⁹

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ελαττωματική σηματοδότηση από τον υποδοχέα ινσουλίνης είναι σημαντικό συστατικό της αντίστασης στην ινσουλίνη που σχετίζεται με παχυσαρκία τόσο σε μοντέλα ζώων, όσο και σε ανθρώπους. Μελέτες πάνω στην μεσολαβούμενη από τον *TNF-a* αντίσταση στην ινσουλίνη σε καλλιεργημένα κύτταρα, καθώς και σε ολόκληρους οργανισμούς, έχουν δείξει επίσης ότι ο *TNF-a* προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη, τουλάχιστον μερικώς, μέσω της ικανότητάς του να αναστέλλει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση από τον υποδοχέα ινσουλίνης. Επιπλέον, αυτή η αναστολή μπορεί να αντιστραφεί με ουδετεροποίηση του *TNF-a* in vivo. Η έκφραση του *TNF-a* από τον λιπώδη ιστό είναι αυξημένη στην παχυσαρκία και αυτή η αύξηση σχετίζεται με τα επίπεδα υπερινσουλιναϊμίας που είναι δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη.⁴¹

Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αναφέρουν ότι υπάρχει σχέση του πολυμορφισμού rs 1800629 του γονιδίου *TNF-a* με το βρογχικό άσθμα και το ΣΔτ2. Συγκεκριμένα, στη παρούσα μελέτη το A αλληλόμορφο έχει OR=1.30 στους ασθενείς (O) σε σχέση με τους μάρτυρες με CI (Confidence of Interval-διάστημα εμπιστοσύνης) 95%:0,78-2,16, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) (OR=1.57, CI(95%):0.74-3.34), στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) (OR=1.42, CI(95%): 0.82-2.46) και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και ΣΔτ2 (Δ) (OR=1.62, CI(95%): 0.76-3.46) αλλά δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p > 0.05$). Δεν σημειώθηκε επίδραση στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς ΣΔτ2, χωρίς παχυσαρκία (A) (OR=0.93, CI(95%):0.27-3.19, $p=1.000$)

4.2. *IL-6 (rs1800795)*

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *IL-6* έχει εμπλακεί στην παθογένεια του άσθματος καθώς ελέγχει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων στους αεραγωγούς κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.²³⁰ Η *IL-6* έχει αποδειχθεί ότι είναι αυξημένη σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις των αεραγωγών. Στο άσθμα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει υψηλά επίπεδα *IL-6* στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

(BAL) και στον ορό καθώς και αυξημένη έκκριση *IL-6* από τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα που συλλέγονται από ασθματικούς.²³¹

Στην παρούσα μελέτη, διερευνάται ο πολυμορφισμός rs 1800795 με φυσικό αλληλόμορφο το G και μεταλλαγμένο το C και πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη.²⁴¹ Το γονίδιο *IL-6* καθολικά αναφέρεται ως IL6 "-174" πολυμορφισμός. Τείνει να είναι αρκετά πολυμορφικό σε Καυκάσιους, αλλά σε ασιατικούς και αφρικανικούς πληθυσμών είναι σχεδόν μονομορφικό (για το G) αλληλόμορφο. Το rs1800795 (C) αλληλόμορφο παράγει λιγότερο από το *IL-6* (G) αλληλόμορφο. Το rs1800795 (G) αλληλόμορφο, συνδέεται γενικά με υψηλότερα επίπεδα IL6 και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο με ΣΔτ2.⁹⁴ Σε μια μελέτη με 700 ηλικιωμένους Καυκάσιους μετά από μεταμόσχευση νεφρού, ασθενείς με rs1800795 (GG) γονότυπους είχαν υψηλότερο κίνδυνο νέας εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη και υψηλότερη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη επίπεδα) σε σχέση με το CC γονότυπο.²³²

Τα γονίδια του *TNF-α* και της *IL-6* αλληλεπιδρούν με τον *TNF-α* να ρυθμίζει την έκφραση *IL-6* και την *IL-6* να ρυθμίζει προς τα κάτω τον *TNF-α*.¹⁰³ Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της *IL-6* στις θέσεις -174 G/C μεταβάλλουν τον ρυθμό έκφρασης του γονιδίου καθώς και τα επίπεδα της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης στον ορό. Η έλλειψη σχέσης των πολυμορφισμών της *IL-6* και των επιπέδων την πρωτεΐνης στον ορό είναι σε συμφωνία με κάποιες μελέτες και σε διαφωνία με κάποιες άλλες.^{232, 233, 234} Χαμηλή παραγωγή της *IL-6* στον υποθάλαμο που πιθανώς οφείλεται στο C αλληλόμορφο φαίνεται ότι σχετίζεται με την παχυσαρκία. Ασθενείς με γονότυπο C:C έχουν αυξημένο BMI.²³⁵

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν άμεση σχέση της ύπαρξης του πολυμορφισμού *IL-6* (rs1800795) σε ομόζυγη κατάσταση GG στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) (OR=3.04, CI(95%): 1.36-6.78, p=0.011), σε ασθματικούς ασθενείς με βρογχικό άσθμα, παχυσαρκία και ΣΔτ2 (Δ) (OR=2.95, CI(95%):1.32-6.55, p=0.013). Στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) (OR=1.24, CI(95%): 0.58-2.64, p=0.575) δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα ((p>0.05). Δεν σημειώθηκε επίδραση στο σύνολο των ασθενών (O) (OR=0.96, CI(95%):0.46-2.03, p=0.919), και στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς ΣΔτ2, χωρίς παχυσαρκία (A) γιατί δεν σημειώθηκε ασθενείς να φέρει τον γονότυπο GG επομένως ήταν αδύνατη η στατιστική επεξεργασία.

4.3. *SPINK5* (rs2303067)

Βιβλιογραφικά αναφέρεται σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs2303067 (AA ομοζυγώτες) του γονιδίου *SPINK5* και της ανάπτυξης άσθματος.¹²⁶ Η αυξημένη παραγωγή της *IL-6*, *IL-8* από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, η μειωμένη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών μετά από ερέθισμα οξειδωτικού και ελαφρώς μειωμένη παραγωγή βλέννας σε επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών που προκαλεί η *SPINK5* σχετίζεται με την παθογένεση του άσθματος.

Στην παρούσα μελέτη, όμως, δεν φάνηκε στατιστική σημαντικότητα για τον πολυμορφισμό rs2303067 του γονιδίου *SPINK5* ενώ, αντίθετα, ο πολυμορφισμός *IL-*

6 (rs1800795) είχε πολύ υψηλή στατιστική σημαντικότητα για τους ασθενείς με βρογχικό άσθμα και ΣΔτ2. Συγκεκριμένα, το A αλληλόμορφο έχει OR=2.21 στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (A) με διάστημα εμπιστοσύνης 95%:0.50-9.77 και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και ΣΔτ2 (Δ) το OR είναι 1.26, (CI(95%): 0.47-3.39), αλλά δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p>0.05$). Επίσης, δεν σημειώθηκε επίδραση στο σύνολο των ασθενών (O) (OR=0.98, CI(95%):0.57-1.69, $p=0.946$), στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) (OR=1.05, CI(95%):0.42-2.64 $p=0.915$) ούτε στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) (OR=0.88, CI(95%):0.48-1.61, $p=0.686$).

4.4. *ORMDL3* (rs7216389)

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού rs7216389 του γονιδίου *ORMDL3* και την ευαισθησία σε εμφάνιση άσθματος. Ωστόσο, τα συμπεράσματα των μελετών αυτών είναι αντικρουόμενα. Παρά το γεγονός ότι μια μετα-ανάλυση έδειξε ότι το T αλληλόμορφο του rs7216389 συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο παιδικού άσθματος, παραμένει ασαφές εάν το rs7216389 σχετίζεται με το άσθμα σε ολόκληρο τον πληθυσμό. Μελέτες δείχνουν ότι οι ομοζυγώτες TT και οι ετεροζυγώτες TC έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για άσθμα, σε σύγκριση με τους CC ομοζυγώτες.¹⁴⁴ Όσον αφορά στη διάκριση σε άνδρες και γυναίκες δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης σε σχέση με το φύλο.¹⁴⁶

Σε μια μελέτη του Galanter *et al* (2008), η συσχέτιση μεταξύ SNPs στο γονίδιο *ORMDL3* και στο παιδικό άσθμα βρέθηκε να είναι σημαντική σε πολλές ομάδες πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των Πορτορικανών και Μεξικανών, αλλά όχι των Αфро-Αμερικανών. Ομοίως, ο Hirota *et al* (2008) βρήκε ότι ο rs7216389 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο άσθματος σε ιαπωνικό πληθυσμό. Επιπλέον, ο Leung *et al* (2009) βρήκε ότι η διάγνωση του άσθματος σχετιζόταν με το rs11650680 και πέντε άλλα SNPs, συμπεριλαμβανομένου του rs7216389, σε πληθυσμό του Χονγκ Κονγκ. Ο Kang *et al* (2012) βρήκε επίσης ότι το box SNPs του *ORMDL3* συμπεριλαμβανομένου του rs7216389, μπορεί να σχετίζεται με την ευαισθησία του άσθματος σε κορεάτικο παιδικό πληθυσμό.¹⁴⁷ Ωστόσο, ο Jin *et al* (2010) δεν βρήκε καμία συσχέτιση μεταξύ των SNPs του *ORMDL3* και παιδικού άσθματος σε κινεζικό πληθυσμό, αλλά βρήκε γενετική συσχέτιση με ατοπία. Μια μελέτη του Sun *et al* (2010) διαχώρισε την πειραματική ομάδα σε ασθενείς με ήπιο ή σοβαρό άσθμα και διαπίστωσε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο γονότυπο rs7216389 TT μεταξύ της ήπιας ομάδα και των μαρτύρων, ενώ το ποσοστό του T αλληλόμορφο στην ομάδα με σοβαρό άσθμα ήταν υψηλότερη από ό, τι στις άλλες δύο.¹⁴⁷

Η παρούσα μελέτη έδειξε προστατευτική δράση με τη παρουσία του T αλληλόμορφου σε ομόζυγη κατάσταση στην περίπτωση των ασθματικών ασθενών με ΣΔτ2 (B) (OR=0.70, CI(95%): 0.28-1.73) και την περίπτωση των ασθματικών ασθενών με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) (OR=0.73, CI(95%):0.29-1.82) αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($p>0.05$). Επίσης, δεν σημειώθηκε επίδραση στο σύνολο

των ασθενών (Ο) (OR=1.07, CI(95%):0.65-1.76, p=0.802), στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς ΣΔτ2, χωρίς παχυσαρκία (Α) (OR=1.16, CI(95%):0.40-3.36, p=0.783) ούτε στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) (OR=1.07, CI(95%):0.61-1.87, p=0.821).

4.5. *MTNR1B* (rs10830963)

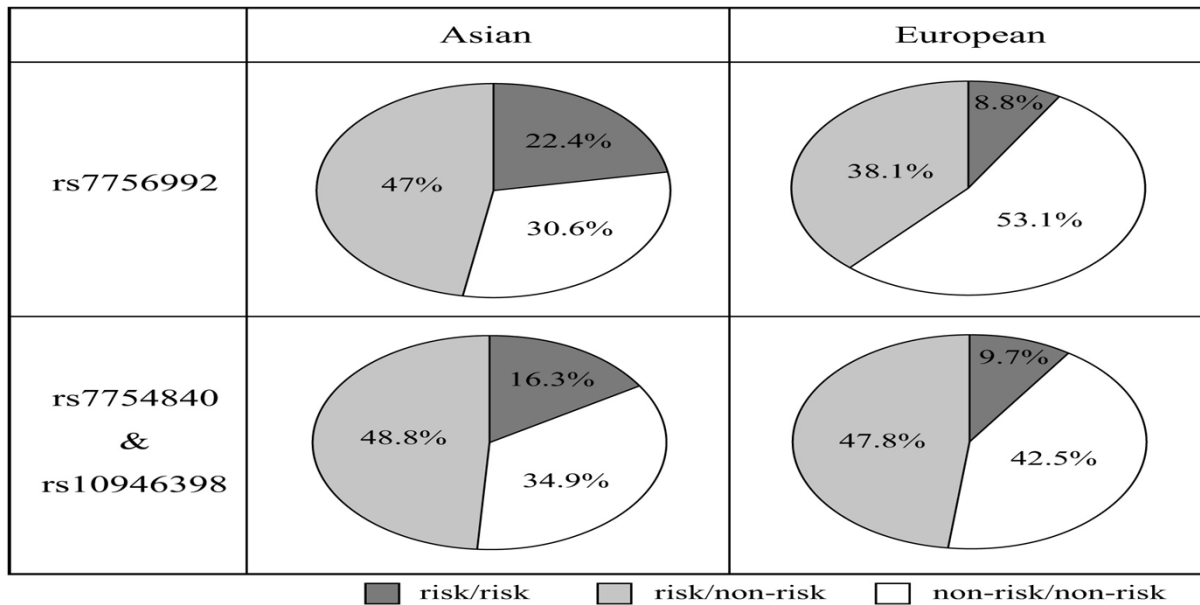
Όσο αφορά τον πολυμορφισμό rs10830963 του γονιδίου *MTNR1B*, πρόσφατες μελέτες, μεγάλης κλίμακας, χρησιμοποιώντας δεδομένα από 10 GWAS εντόπισαν παραλλαγές στο γονίδιο *MTNR1B* ή κοντά σε αυτό οι οποίες σχετίζονται με τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας σε πληθυσμούς Ευρωπαϊκής καταγωγής, με το σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs10830963 να εμφανίζει τη σημαντικότερη συσχέτιση.²³⁶ Σε μια μετα-ανάλυση *MTNR1B* του 2009 που συμμετείχαν 36.610 υγιείς ενήλικες βρέθηκε ότι το γονίδιο *MTNR1B* όχι μόνο συσχετίζεται με τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας αλλά και ότι φορείς του φερόμενου ως επικίνδυνου αλληλόμορφου G του πολυμορφισμού rs10830963 είχαν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη διαβήτη.²³⁷ Η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το γονίδιο *MTNR1B* συμβάλλει στη διακύμανση των επιπέδων γλυκόζης σε μη διαβητικά άτομα μπορεί να βοηθήσει να καταλάβουμε τη συσχέτιση του γονιδίου με τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη. Οι Lyssenko et al. αναφέρουν ότι ο επικίνδυνος γονότυπος σχετίζεται με μειωμένη έγκαιρη ανταπόκριση έκκρισης ινσουλίνης σε από του στόματος και ενδοφλέβια φόρτιση με γλυκόζη και με ταχύτερη επιδείνωση της έκκρισης της ινσουλίνης με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, άτομα που φέρουν το προδιαθεσικό αλληλόμορφο G του rs10830963 παρουσιάζουν μειωμένη εκκριτική ανταπόκριση ινσουλίνης, όπως επίσης και μειωμένη ευαισθησία των β-κυττάρων στη γλυκόζη, ενώ καμία επίδραση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη δεν φάνηκε στο σύνολο του σώματος.²³⁸

Η παρούσα μελέτη έδειξε προστατευτική επίδραση του G αλληλόμορφου στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (Α) (OR=0.69, CI(95%): 0.25-1.92), στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (Β) (OR=0.68, CI(95%): 0.31-1.50) και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) ενώ στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) (OR=1.32, CI(95%): 0.79-2.22) φάνηκε το αντίθετο. Σε καμία περίπτωση, όμως, δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα (p>0.05).

4.6. *CDKAL1* (rs7756992)

Η βιβλιογραφία για τον πολυμορφισμό rs7756992 του *CDKAL1* είναι άκρως ενδιαφέρουσα. Το 2011, ο Chistiakov et al. διαπίστωσε ότι το αλληλόμορφο G του rs7756992 του *CDKAL1* εμφανίζει υψηλότερο κίνδυνο για ΣΔτ2 και αποτελεί προδιαθεσικό γονίδιο σε ένα ρωσικό πληθυσμό. Το 2013, ο Li W et al βρήκαν παρόμοιο αποτέλεσμα σε ένα κινεζικό πληθυσμό. Αντίθετα, το 2007, ο Horikoshi et al παρατήρησε ότι σε έναν πληθυσμό της Ιαπωνίας με γονότυπο *CDKAL1*

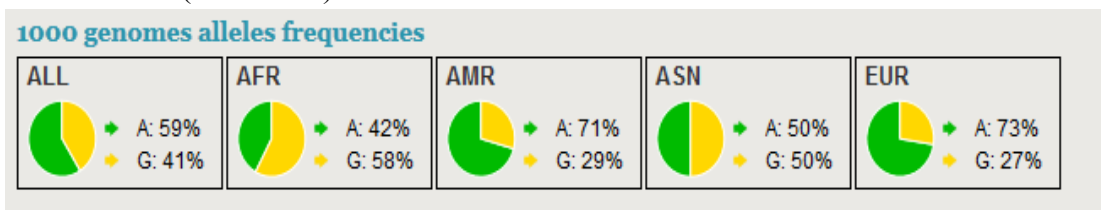
(rs7756992) GG, ο κίνδυνος ΣΔτ2 ήταν σημαντικά μειωμένος. Ωστόσο, το 2010, ο Xu *et al* ανέφερε ότι το γονίδιο *CDKAL1* δεν συσχετίστηκε σημαντικά με ΣΔτ2.¹⁶⁶ Υπάρχουν αρκετοί πολυμορφισμοί του *CDKAL1* όπως rs7756992, rs7754840 και rs10946398 ωστόσο η παρούσα μελέτη αφορά τον πολυμορφισμό rs7756992. Είναι ενδιαφέρον ότι ο λόγος για το ύποπτο αλληλόμορφο του *CDKAL1* είναι υψηλότερος στις χώρες της Ασίας από τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Εικόνα 39).¹⁶⁵



Εικόνα 39: Σύγκριση της αναλογίας των αλληλόμορφων κινδύνου και μη-κινδύνου του *CDKAL1* μεταξύ ασιατικών και ευρωπαϊκών πληθυσμών¹⁶⁵

Παγκόσμιες μελέτες δείχνουν τη σύνδεση των snps στο *CDKAL1* με ορισμένα παθολογικά χαρακτηριστικά του ΣΔτ2. Ομόζυγοι φορείς του φερόμενου ως επικίνδυνου αλληλόμορφου του rs7756992, δηλαδή του G, έχουν κατ' εκτίμηση 22% χαμηλότερη ανταπόκριση στην ινσουλίνη σε από του στόματος φόρτιση με γλυκόζη, από ότι μη-φορείς. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του rs7756992 με το ΣΔτ2 (odds ratio (OR)=1.15, 95% confidence interval (CI) = 1.07-1.23, p<0.0001) η οποία όμως ποικίλει σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες.²³⁹

Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τις συχνότητες των πολυμορφισμών, όπως προκύπτει από τα δεδομένα του «1000 genomes» (database)²⁴. Η συνολική συχνότητα του G αλληλόμορφου το οποίο είναι το φυσικό είναι 41%, αλλά εμφανίζονται σημαντικές αποκλίσεις, αφού στους ευρωπαίους είναι 27% και στους αφρικανούς φτάνει στο 58% (Εικόνα 40).²⁴⁰



Εικόνα 40: Συχνότητα αλληλόμορφων του rs7756992²⁴⁰

Στην παρούσα μελέτη προέκυψε ότι το αλληλόμορφο A σε ομόζυγη κατάσταση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2. Συγκεκριμένα, στο σύνολο των ασθενών (O) εμφανίζεται OR=2.07, CI(95%):1.24-3.43, p=0.004, στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (A) εμφανίζεται OR=2.67, CI(95%): 0.84-8.42, p=0.084, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) εμφανίζεται OR=1.83, CI(95%) 0.81-4.14, p=0.140, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) εμφανίζεται OR=2.05, CI (95%): 1.16-3.62, p=0.012 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) εμφανίζεται OR=2.06, CI(95%) 0.88-4.81, p=0.088.

4.7. *TCF7L2* (rs7903146)

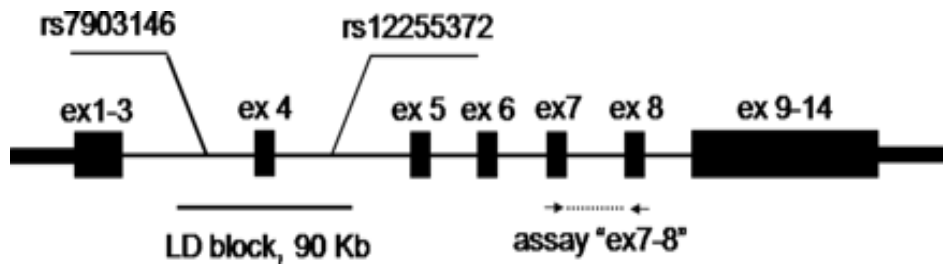
Ο τόπος *TCF7L2* αρχικά χαρτογραφήθηκε ως μια υπό εξέταση περιοχή με σύνδεση στο χρωμόσωμα 10 σε ισλανδικό πληθυσμό και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε. Τα επόμενα GWAS έδειξαν ότι η *TCF7L2* είναι σταθερό ισχυρό σήμα σε πολλές μελέτες και παρουσιάζει ένα από τα μεγαλύτερα αποτελέσματα (λόγος πιθανοτήτων ανά αλληλόμορφο περίπου 1.37) έως σήμερα. Τα άτομα που φέρουν αλληλόμορφα κινδύνου (T) έχουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Μελέτες με απομονωμένα νησίδια και κυτταρικές σειρές που εκκρίνουν ινσουλίνη, έδειξαν ότι η απώλεια του *TCF7L2* οδηγεί σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Πειράματα σε επίμυες έδειξαν ότι η απουσία του γονιδίου οδηγεί σε θνησιμότητα λίγο μετά τη γέννηση και οφείλεται σε προβλήματα της γαστρεντερικής οδού και έτσι αποκλείεται η ανάλυση της ομοιότητας της γλυκόζης σε αυτά τα ζώα.³⁶

Από την πρώτη αναφορά του πολυμορφισμού *TCF7L2* (rs7903146) το 2006, ανεξάρτητοι ερευνητές έχουν αναπαράγει εύκολα το εύρημα ότι σε όλες τις κύριες εθνοτικές ομάδες εμφανίζεται σύνδεση με την εμφάνιση ΣΔτ2. Επιπλέον, από την πρώτη ευρεία γονιδιακή μελέτη σύνδεσης (GWAS) για ΣΔτ2 στους Καυκάσιους και μετά, η ισχυρότερη σχέση είναι σταθερά με τον τόπο *TCF7L2*. Πράγματι, μια μετα-ανάλυση των δημοσιευμένων μελετών σε όλο τον κόσμο ήδη από το 2007, εκτιμά μια συγκεντρωτική αναλογία πιθανοτήτων 1,46 (με ένα εντυπωσιακό $p=5.4 \times 10^{-140}$), καθιστώντας το ένα από τα πιο στατιστικά σημαντικά γενετικά ευρήματα στο ΣΔτ2.¹⁸⁴

Τα άτομα που είναι φορείς δύο αντιγράφων του μεταλλαγμένου γονιδίου *TCF7L2* έχουν διπλάσιες πιθανότητες να εκδηλώσουν ΣΔτ2 συγκριτικά με τα άτομα που δεν είναι φορείς κανενός αντιγράφου.²⁹ Ο ρόλος του *TCF7L2* στον οργανισμό δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, αλλά πιστεύεται ότι έχει σημασία για το πάγκρεας, όπου παράγεται η ινσουλίνη. Επιπλέον, είναι πιθανόν το μεταλλαγμένο γονίδιο να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στο μέλλον.

Το 2006 οι Grant *et al*²⁴¹ εστίασαν στην χρωμοσωμική περιοχή 10q, που σύμφωνα με παλαιότερες αναφορές, συσχετιζόταν με το ΣΔΠ. Για να μελετήσουν τη συγκεκριμένη περιοχή χαρτογράφησαν 228 μικροδορυφόρους δείκτες σε υγιείς και σε διαβητικούς Ισλανδούς. Ένας μικροδορυφόρος, ο DG10S478 στο ιντρόνιο 3 του *TCF7L2* συσχετίστηκε σημαντικά με ΣΔτ2. Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν από τους ίδιους σε δανική και αμερικανική ομάδα. Επιπλέον, 5 snps στην περιοχή,

(rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs11196205, rs7895340) σε LD με το δορυφόρο, έδειχναν παρόμοια αποτελέσματα, με σημαντικότερα για τα T αλληλόμορφα των rs7903146 στο ιντρόνιο 3 και του rs12255372 στο ιντρόνιο 4 (Εικόνα 41).



Εικόνα 41: Θέση δύο snps στο γονίδιο του *TCF7L2*¹⁷⁷

Το 2007, ο Helgason *et al* προσπαθώντας να επαναλάβει και να ισχυροποιήσει τα αποτελέσματα, αύξησε τον αριθμό των εθελοντών από την Δανία και την Ισλανδία και επέκτεινε την έρευνα και στη δυτική Αφρική²⁴². Στους αφρικανούς εθελοντές, οι διαφορές ήταν ακόμη μεγαλύτερες, εύρημα ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της μεγαλύτερης γενετικής ανομοιομορφίας του πληθυσμού αυτού, που χαρακτηρίζεται από περιοχές με μικρότερο LD. Επίσης η μελέτη των απλοτύπων που συνίσταται από τους παραπάνω πολυμορφισμούς, απουσία του rs7903146T, αδυνατούσε να εξηγήσει τη συσχέτιση. Η χαρτογράφηση των εξονίων αλλά και ολόκληρου του LD block στο οποίο περιέχεται το rs7903146T, δεν κατάφερε να εντοπίσει κάποιο καλύτερο εναλλακτικό ύποπτο αλληλόμορφο, και οι ερευνητές συμπέραναν ότι ακόμα και αν δεν είναι το T αλληλόμορφο του rs7903146 υπεύθυνο για την παρατηρούμενη αύξηση του κινδύνου, τότε το πραγματικά υπεύθυνο, βρίσκεται στο LD block του, οπότε ο rs7903146 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πολυμορφισμός αναφοράς για το γονίδιο *TCF7L2* σε σχέση με το διαβήτη στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Το 2007 η μετα-ανάλυση των αρχικών ερευνών πάνω στο *TCF7L2* έδειξε έναν σταθερό και επαναλήψιμο κίνδυνο για τους φορείς του rs7903146T στα επίπεδα του 50% (OR 1.46) στους ανομοιομόρφους πληθυσμούς της Αφρικής, Ασίας, Βόρειας Ευρώπης και σε καυκάσιους.²⁴³

Μια άλλη μετα-ανάλυση το 2009 με μεγάλο όγκο εθελοντών (33135 με ΣΔτ2 και 36316 υγιείς) κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα. Η παρουσία του T αλληλόμορφου στο rs7903146 ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα των διαβητικών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το T αλληλόμορφο βρέθηκε να εκφράζει έναν συνολικό κίνδυνο 1.968 σε ομόζυγους και 1.406 σε ετερόζυγους με υψηλή στατιστική σημαντικότητα. Μεταξύ των μελετών υπήρχε ετερογένεια, πηγή της οποίας ήταν οι διαφορετικές εθνικότητες και άρθηκε σε μεγάλο βαθμό όταν οι ερευνητές μελέτησαν ξεχωριστά τους διαφόρους πληθυσμούς. Παρόλα αυτά για τους καυκάσιους παρέμεινε εν μέρει ακόμα και μετά το διαχωρισμό των Γάλλων από τους υπόλοιπους. Επιπλέον πρότειναν ένα συνεπικρατές, πολλαπλασιαστικό μοντέλο γενετικής δράσης σε όλες της φυλές με εξαίρεση τους αφρικανούς, για τους οποίους δεν υπήρχαν αρκετά στοιχεία. Ο αποδιδόμενος πληθυσμιακός κίνδυνος [παράμετρος PAR (population attributable risk)], είναι μια σημαντική παράμετρος σε τέτοιες

μελέτες γιατί λαμβάνει υπόψη και τη συχνότητα και μας δείχνει πόση συμμετοχή έχει ο rs7903146T στην εκδήλωση της νόσου σε έναν πληθυσμό. Έτσι με συνολικό PAR 16.9 μπορούμε να ισχυριστούμε ότι ο rs7903146T έχει συμμετοχή περίπου στο 1/5 των συνολικών περιπτώσεων διαβήτη παγκοσμίως, με εξαίρεση την ανατολική Ασία όπου εξαιτίας της χαμηλής συχνότητας δεν φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου (Πίνακας 50). Από τα ευρήματα πάντως αυτής της μελέτης προκύπτει ότι ο ΣΔτ2 είναι αποτέλεσμα τόσο γενετικών παραγόντων όσο και συνθηκών του τρόπου ζωής των ενηλίκων. Ο εντοπισμός, όμως, του συγκεκριμένου γονιδίου εγκαίρως θα πρέπει να λειτουργεί προειδοποιητικά σε όσους το φέρουν ώστε να ακολουθήσουν μια υγιεινή διατροφή που θα αποτρέψει το ενδεχόμενο παχυσαρκίας και μαζί του τον κίνδυνο εκδήλωσης ΣΔτ2.²⁴⁴

Πληθυσμός	Συχνότητα T(%)	OR TTvsCC	OR TCvsCC	PAR
Καυκάσιοι	29	2.303	1.483	23.2
B. Ευρώπη	21.9	1.944	1.357	14.1
Ανατ. Ασία	3.2	1.595	1.352	2.5
Ινδιάνοι	28.1	1.669	1.406	17.9
Αφρικανοί	23*	1.802	1.696	27
Συνολικά	20.2	1.968	1.406	16.9

*Ίσως συμπεριλαμβάνει και άλλες φυλές

Πίνακας 50: Πληθυσμοί και στατιστικές κατανομές *TCF7L2*²⁴⁴

Μια άλλη πρόσφατη μελέτη εστίασε στην έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά νησίδια από διαβητικούς και μη διαβητικούς εθελοντές, *in vitro*. Τα νησίδια των φορέων του rs7903146T παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη έκκριση ινσουλίνης (επαγόμενης από τη γλυκόζη) συγκριτικά με τους φορείς του C αλληλόμορφου. Η αδυναμία στην έκκριση ινσουλίνης των φορέων φάνηκε να ασκείται στο επίπεδο της εξωκύττωσης της από τα εκκριτικά κοκκία. Η συνολική εξωκύττωση ήταν προβληματική ενώ η κατανομή των κοκκίων δεν φάνηκε να επηρεάζεται δείχνοντας μια επίδραση στο τελικό στάδιο έκκρισης ινσουλίνης.²⁴⁵

Παρόμοια αποτελέσματα είχε και μελέτη σε αρουραίους, όπου η τεχνητή μείωση των επιπέδων του *TCF7L* με siRNA δεν είχε επίδραση στην ποσότητα ινσουλίνης που έφεραν τα νησίδια, αλλά η εξωκύττωση ήταν προβληματική. Φάνηκε ότι ο *TCF7L2* μπορεί να επηρεάζει άμεσα την έκφραση πρωτεϊνών όπως η συνταξίνη 1A και η Munc 18-1, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εξωκύττωση της ινσουλίνης.²⁴⁶

Άλλες μελέτες εστίασαν στον λόγο προϊνσουλίνης-ινσουλίνης, καθώς η παρουσία του προδιαθεσικού T αλληλόμορφου φάνηκε να αυξάνει τη συγκέντρωση της προϊνσουλίνης άρα και το κλάσμα, δείχνοντας σε μια κατεύθυνση που έχει να κάνει με την επεξεργασία της προϊνσουλίνης.²⁴⁷⁻²⁵²

Σε μία από αυτές τις μελέτες οι 2 κύριες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη η PC1 και PC2 έχουν δεσμευτικές αλληλουχίες για τον *TCF7L2* στους προωθητές των γονιδίων τους.²⁴⁷

Πέρα από την έκκριση της ινσουλίνης διάφορες μελέτες προσπάθησαν να βρουν αν οι παραλλαγές του *TCF7L2* έχουν κάποια επίδραση στους περιφερειακούς ιστούς επηρεάζοντας την ευαισθησία/αντίστασή τους στη δράση της ινσουλίνης. Τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα με πολλές μελέτες να αδυνατούν να βρουν συσχέτιση αν και υπάρχουν κάποιες με θετικά αποτελέσματα.^{247, 253,254}

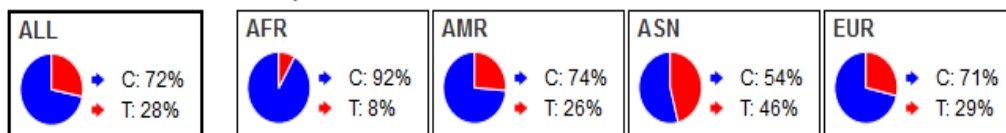
Ένας πιθανός ιστός στόχος φαντάζει το ήπαρ όπου ο *TCF7L2* φαίνεται πως είναι σημαντικός ρυθμιστής της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης. Μια πρόσφατη μελέτη βρήκε πως η τεχνητή μείωση των επιπέδων του *TCF7L2* in vitro σε ηπατική κυτταρική σειρά αύξανε την βασική ηπατική παραγωγή γλυκόζης, δράση που φάνηκε να ασκείται μέσω αυξημένης έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για την γλυκονεογένεση όπως τα *Fbp1*, *Pck1* και *G6pc*.²⁶⁴ Ο *TCF7L2* συνδέεται με πολλά γονίδια όπως τα *Pck1*, *Fbp1*, *Irs1*, *Irs2*, *Akt2*, *Adipor1*, *Pdk4* και *Cpt1a* που σχετίζονται με τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ, η έκφραση των οποίων είναι πιθανό να ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό αυτό παράγοντα. Και άλλες μελέτες έχουν επισημάνει την πιθανότητα οι παθοφυσιολογικές δράσεις του παράγοντα να ασκούνται μέσω της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης.^{187,226,257}

Στην παρούσα μελέτη το T αλληλόμορφο εμφάνισε υψηλή στατιστική σημαντικότητα για την εμφάνιση ΣΔτ2. Συγκεκριμένα, στο σύνολο των ασθενών (O) εμφάνισε OR=2.32, CI(95%):1.36-3.96, p=0.001, στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (A) εμφάνισε OR=3.27, CI(95%): 0.92-11.64, p=0.053, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) εμφάνισε OR=2.86, CI(95%): 1.15-7.14, p=0.036, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) εμφάνισε OR=2.29, CI(95%): 1.26-4.17, p=0.005 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) εμφάνισε OR=3.43, CI (95%): 1.29-9.16, p=0.009.

4.8. *SLC30A8 (rs13266634)*

Σε μια σειρά GWAS σε ευρωπαϊκούς και αμερικάνικους πληθυσμούς βρέθηκε πως η παρουσία της C (φυσικό) του πολυμορφισμού (*rs13266634*) του *SLC30A8* επηρεάζει την αμινοξική αλληλουχία και το ύποπτο αλληλόμορφο είναι το φυσικό κυτοσίνη (C) που κωδικοποιεί το αμινοξύ αργινίνη ενώ το μεταλλαγμένο είναι η θυμίνη (T) που κωδικοποιεί την τρυπτοφάνη. Ο κίνδυνος αυξάνει εμφάνισης ΣΔτ2 με την ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε επίπεδα OR 1.12-1.15 έχει p value τέτοια που να ικανοποιεί την στατιστική σημαντικότητα που απαιτείται σε GWAS.¹⁹⁵ Επιπλέον, σε δύο ιαπωνικές μελέτες ο πολυμορφισμός αυτός εκφράζει αυξημένο κίνδυνο.¹⁹⁸ Σε ότι αφορά στην συχνότητα του φερόμενου ως επικίνδυνου C αλληλόμορφου, σύμφωνα με δεδομένα από το «1000 Genomes» (database), πρόκειται για ένα πολύ κοινό αλληλόμορφο με τη συχνότητα να φτάνει τα επίπεδα του 72% παγκοσμίως. Το C αλληλόμορφο φαίνεται να είναι το φυσικό, και η συχνότητα του ποικίλλει στους διάφορους πληθυσμούς κυμαινόμενη από 54% σε ασιάτες και φτάνοντας σε 92% σε αφρικανούς με ενδιάμεσες τιμές για ευρωπαίους και αμερικάνους (Εικόνα 42).¹⁹⁵

1000 Genomes allele frequencies



Εικόνα 42: Συχνότητα αλληλόμορφων rs13266634¹⁹⁵

Στην παρούσα μελέτη η ομόζυγη κατάσταση CC παρουσιάζει σχέση με την εμφάνιση ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών (O) με OR=2.10, CI(95%): 1.27-3.48, p=0.003, στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (A) με OR=2.09, CI(95%): 0.64-6.83, p=0.211, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) με OR=2.07, CI(95%): 0.19-1.00, p=0.067, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) με OR=2.17, CI(95%): 1.24-3.81, p=0.006 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) με OR=2.21, CI(95%): 0.96-5.08, p=0.056.

4.9. PPAR γ 2 (rs1801282)

Οι μελέτες που έχουν εκπονηθεί για την σύνδεση του πολυμορφισμού rs 1801282 είναι αντικρουόμενες. Συγκεκριμένα, ο Scacchi et al. διαπίστωσε προστατευτικό ρόλο της συχνότητας Ala κατά της συχνότητας εμφάνισης ΣΔτ2 σε δείγμα ιταλικού πληθυσμού. Ο Tavares et al. έδειξαν ότι οι φορείς του Ala12 αλληλόμορφου του γονιδίου PPAR γ 2 ήταν πιο ευαίσθητοι στην αντίσταση στην ινσουλίνη σε σύγκριση με φορείς Pro12 σε πληθυσμό από την Βραζιλία. Επίσης, έχει αναφερθεί η προστασία έναντι της διαβητικής νεφροπάθειας σε διαβητικό πληθυσμό από την Βραζιλία που προκαλείται από την παρουσία του αλληλόμορφου για την αλανίνη.²⁰³

Αποδείχθηκε ότι το αλληλόμορφο για την αλανίνη επέφερε χαμηλότερη ανάπτυξη του ΣΔτ2 σε Καυκάσιους. Επιπλέον, τα ευρήματά ήταν σε συμφωνία με αυτές των Mori et al στην οποία βρήκαν Ala παραλλαγή του PPAR γ που σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο για την ανάπτυξη του διαβήτη σε Ιάπωνες. Ωστόσο, Maciej et al. δεν μπόρεσε να επιβεβαιώσει την επιρροή του Pro αλληλόμορφου για αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη του ΣΔτ2. Επίσης αναφέρθηκε σχέση για αυξημένο κίνδυνο ΣΔτ2 και αλληλόμορφο προλίνης του PPAR γ 2 γονίδιο σε ένα ρωσικό πληθυσμό. Επιπλέον, έχει σημειωθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του Pro12Ala πολυμορφισμού του γονιδίου PPAR γ 2 με ΣΔτ2. Επίσης ο Ala/Ala γονότυπος είχε σημαντική παρουσία σε μη διαβητικά άτομα.²⁰³

Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη στη Κορέα έδειξε ότι PPAR γ 2 Pro12Ala πολυμορφισμός ήταν προστατευτικός κατά ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με ΣΔτ2. Ο Horiki et al. έδειξε μια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Pro12Ala του PPAR γ και γενετική προδιάθεση για ΣΔτ2 και υπέρτασης σε ένα ιαπωνικό πληθυσμό. Η σύνδεση μεταξύ του PPAR γ 2 και ΣΔτ2 σημειώθηκε σε κινεζικό πληθυσμό διαβητικών. Επίσης, ισχυρή σχέση μεταξύ Pro12Ala πολυμορφισμού PPAR γ 2 και ΣΔτ2 αποδείχθηκε σε Σιχ που ζουν στις βόρειες πολιτείες της Ινδίας. Παρουσιάστηκε έλλειψη σύνδεσης μεταξύ των

μεταβλητών Pro12Ala και ΣΔτ2 σε μια μελέτη σε νότιο ινδικό πληθυσμό. Επιπλέον, η μελέτη που εκπονήθηκε από Stefanski et al. δεν εντόπισε κανένα αποδεικτικό στοιχείο για τη σύνδεση της παραλλαγής Pro12Ala *PPARγ2* με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε καυκάσιο πληθυσμό.²⁰³

Στην παρούσα μελέτη, το C αλληλόμορφο σε ομόζυγη κατάσταση είχε προστατευτική επίδραση στο το σύνολο των ασθματικών ασθενών (O) με OR=0.51, CI(95%): 0.23-1.09, p=0.078, στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς ΣΔτ2, χωρίς παχυσαρκία (A) με OR=0.28, CI(95%):0.04-2.17, p=0.326, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) με OR=0.58, CI(95%):0.25-1.33, p=0.193 και χωρίς επίδραση στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (B) με OR=0.92, CI(95%): 0.34-2.49, p= 0.871 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) με OR=0.96, CI(95%): 0.35-2.61, p= 0.940.

4.10. *FTO* (rs9939609)

Οι προσπάθειες για την κατανόηση της βιολογικής δράσης του *FTO* έχουν ενταθεί από το 2007 όπου μια ερευνητική ομάδα βρήκε ότι διάφορα snps στο *FTO* συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της κοινής παχυσαρκίας σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.²⁵⁸ Η μελέτη αρχικά ήταν μια GWAS για τον ΣΔτ2 και διάφορα snps μέσα στο γονίδιο του *FTO* φάνηκε να αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη. Όταν όμως τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν για το BMI, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η συσχέτιση χανόταν, κάτι που τους υπέδειξε ότι η αύξηση του κινδύνου για ΣΔτ2 ασκείται μέσω του BMI. Η συσχέτιση προερχόταν από μια ομάδα 10 SNPs του ιντρονίου 1, αλλά επέλεξαν να μελετήσουν περαιτέρω το rs9939609 επειδή παρουσίαζε 100% χαρτογραφική επιτυχία. Διαπίστωσαν ότι το συσχετιζόμενο με τον διαβήτη αλληλόμορφο A σχετιζόταν επίσης με αύξηση του BMI κατά 0,36 kg/m² ανά αλληλόμορφο. Επιπλέον, οι ομόζυγοι για το A αλληλόμορφο παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παχυσαρκίας (OR=1.67, 95% CI=1.47-1.89, p=1×10⁻¹⁴) αλλά και ήταν υπέρβαροι (OR=1.38, 95% CI=1.26-1.52 p=4×10⁻¹¹) σε σχέση με τους T ομόζυγους. Παρόλα αυτά οι ίδιοι ερευνητές επισήμαναν πως το rs9939609 βρίσκεται σε ένα LD block το οποίο περιλαμβάνει 45 επιπλέον snps σε μια περιοχή 47kb κατά μήκος των δύο πρώτων ιντρονίων και του δεύτερου εξονίου του *FTO* και οποιοδήποτε θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη συσχέτιση, καθώς δεν προέκυψε κάποιο στοιχείο που να δείχνει ότι το rs9939609 έχει κάποια λειτουργική επίδραση. Από τότε πολλές ανεξάρτητες μελέτες επιβεβαίωσαν πως στο ιντρόνιο 1 του *FTO* διάφορα SNPs σχετίζονται με την παχυσαρκία αλλά και με συνεχείς μεταβλητές αυτής όπως η περιμέτρος ισχύων, το σωματικό βάρος, καθώς και ο λόγος περιμέτρου μέσης-ισχύων σε διάφορες εθνικές ομάδες (Ευρωπαίοι, Αφρικανοί, Ασιάτες) αλλά και ηλικιακές ομάδες.²²⁴

Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση έδειξε ότι 5 snps (rs9939609, rs1421085, rs8050136, rs17817449, και rs1121980) αυξάνουν τον κίνδυνο σε διάφορους πληθυσμούς, αλλά δεν υπάρχει κάποιο snp το οποίο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως snp επισήμανσης σε όλες τις εθνικές ομάδες καθώς για παράδειγμα ο rs9939609 σε Ισπανούς και

Αφρικανούς, ο rs1121980 σε Καυκάσιους και ο rs8050136 σε Ασιάτες και Αφρικανούς δεν φαίνεται να προδιαθέτουν σε παχυσαρκία στις ομάδες αυτές. Οι παρατηρούμενες διαφορές πιθανότατα οφείλονται στη διαφορετική συχνότητα του ύποπτου αλληλόμορφου αλλά και της διαφοροποιημένης γενετικής σύνδεσης στους διάφορους πληθυσμούς. Παρόλα αυτά στους Καυκάσιους ο rs9939609 είναι σε έντονη LD με τους άλλους 4 πολυμορφισμούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως SNP επισήμανσης, αν και υπάρχει διαφορά στον κίνδυνο που εκφράζεται από κάθε SNP.²⁵⁹

Παρά την επαναλαμβανόμενη συσχέτιση, οι ερευνητές δεν έχουν κατορθώσει να δείξουν το μηχανισμό με τον οποίο οι παραλλαγές στο ιντρόνιο 1 του *FTO*, που συνήθως εκφράζονται από τον rs9939609, προδιαθέτουν στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Είναι γνωστό πως η παχυσαρκία εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της διαταραχής του ενεργειακού ισοζυγίου, το οποίο καθορίζεται από την ενεργειακή πρόσληψη και κατανάλωση. Μια σειρά μελετών έχει δείξει πως οι παραλλαγές του *FTO* σχετίζονται με αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης και της όρεξης ενώ δεν φαίνεται να ασκούν κάποια επίδραση στην κατανάλωση. Έτσι, οι ομόζυγοι για το A αλληλόμορφο καταναλώνουν σημαντικά περισσότερες ποσότητες φαγητού, έχουν μειωμένο αίσθημα κορεσμού και προτιμούν φαγητό υψηλότερης ενεργειακής πυκνότητας και θερμιδικής αξίας έναντι των ομόζυγων T.²²⁴ Βέβαια η αξία των ευρημάτων τέτοιων ερευνών περιορίζεται από το γεγονός ότι οι πλήρεις επιδράσεις του γονιδίου φαίνεται πως ασκούνται από μικρή ηλικία, με αποτέλεσμα ο μεταβολισμός, η όρεξη, και η φυσική δραστηριότητα να εμφανίζονται παραλλαγμένα ως αποτέλεσμα της παχυσαρκίας. Η στατιστική προσαρμογή με βάση το ΔΜΣ δεν λύνει πάντα το πρόβλημα, ενώ πάντα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός πως οι υπέρβαροι και παχύσαρκοι συχνά υποεκτιμούν την τροφή που καταναλώνουν και προκύπτουν έτσι και μεθοδολογικά ζητήματα.²⁶⁰

Παρά τη σημαντική πρόοδο που σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια, απέχουμε πολύ απ το να κατανοήσουμε την λειτουργία της *FTO* και το πως οι πολυμορφισμοί στο ιντρόνιο 1 αυξάνουν στον κίνδυνο ανάπτυξης παχυσαρκίας. Μια υπόθεση είναι πως οι παραλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάζουν την έκφραση της *FTO*, αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχτεί, με εξαίρεση μόνο μία μελέτη που βρήκε πως σε φορείς του A αλληλόμορφου η έκφραση της *FTO* είναι μεγαλύτερη από τους T φορείς, αλλά αφορούσε μικρό αριθμό εθελοντών.²²²

Το 2007 εντοπίστηκαν GWAS για τον ΣΔτ2 και συγκεκριμένα ένα ισχυρό σήμα στο rs9939609, στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FTO*. Η σχέση αυτή οφειλόταν στον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ), και παρότι το SNP αφορούσε ιντρόνιο, το γονίδιο όπου διαπιστώθηκε ήταν άγνωστης λειτουργίας και ήταν πλησίον του *RPGRIP1L* (πρώην *FTM*). Τα ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο κινδύνου (A αλληλόμορφο) ζυγίζουν κατά μέσο όρο 3 κιλά περισσότερα από αυτά τα άτομα χωρίς αυτό, και δεδομένου ότι από την αναγνώριση αυτού του SNP αρκετές ομάδες έχουν εργαστεί στην περιοχή αυτή για να κατανοήσουν την αιτία της αυξημένης BMI, έχουν δημιουργηθεί πολλά διαφορετικά μοντέλα ποντικών για τη μελέτη παχυσαρκίας και ΣΔΠ. Αυτά τα μοντέλα ποντικών υποδεικνύουν ότι *FTO* παίζει ένα ρόλο στον έλεγχο του σωματικού βάρους και της σύνθεσης. Ως εκ τούτου, η αναγνωρισμένη SNP θα μπορούσε να επηρεάσει τη λειτουργία του *FTO* ή έκφραση. Παρά το γεγονός ότι *FTO*

δεν είναι άμεσα υποψήφιο γονίδιο για ΣΔτ2, αυξάνει τον κίνδυνο για να γίνουν υπέρβαρα. Αυτό μπορεί να φανεί στο μοντέλο ποντικών που υπερεκφράζουν το γονίδιο όπως όταν τα ζώα αυτά τρέφονται με μία δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και έχουν μειωμένη ανοχή γλυκόζης.³⁶

Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση σε Ανατολικούς και Νότιους Ασιάτες, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο γονίδιο κινδύνου για παχυσαρκία αύξησε επίσης τον κίνδυνο για ΣΔτ2. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε σκανδιναβικό πληθυσμό.²⁶⁰

Στην παρούσα μελέτη στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (Α) το αλληλόμορφο T σε ομόζυγη κατάσταση παρουσιάζει μία προστατευτική δράση με OR=0.37, CI(95%): 0.14-0.99, p=0.04, ενώ στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 (Β) το αλληλόμορφο A παρουσιάζει αύξηση του κινδύνου για ΣΔτ2 με OR=1.35, CI(95%): 0.57-3.22, p= 0.497, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία (Γ) με OR=1.42, CI(95%): 0.78-2.57, p= 0.250 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) με OR=1.57, CI(95%): 0.63-3.95, p= 0.330. Επίσης, κατά την σύγκριση ασθματικών ασθενών χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (Α) έναντι ασθματικών ασθενών με παχυσαρκία (Γ) παρατηρήθηκε OR=0.26, CI(95%): 0.08-0.82, p= 0.017 και κατά την σύγκριση ασθματικών ασθενών χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 (Α) έναντι ασθματικών ασθενών με ΣΔτ2 και παχυσαρκία (Δ) παρατηρήθηκε OR=0.23, CI(95%): 0.06-0.90, p= 0.029.

4.11. Περιορισμοί της μελέτης

Σημαντικός παράγοντας που μπορεί να συμβάλει σε λανθασμένα συμπεράσματα σε μία μελέτη είναι η πληθυσμιακή ετερογένεια στο υπό μελέτη δείγμα. Πληθυσμιακή ετερογένεια προκύπτει εάν το υπό μελέτη δείγμα προέρχεται από άτομα από διαφορετικούς πληθυσμούς. Εάν οι ασθενείς από άγνωστη ή μη εκτιμώμενη ετερογένεια δεν αντιπροσωπεύουν τον ίδιο πληθυσμό με τους μάρτυρες, είναι πιθανό η συχνότητα να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων οδηγώντας σε λανθασμένη συσχέτιση ενός συγκεκριμένου αλληλόμορφου με την ασθένεια. Για αυτό και στην παρούσα μελέτη περιλάβαμε άτομα αποκλειστικά και μόνο ελληνική καταγωγής.

Αδυναμία της παρούσας μελέτης είναι το μικρό μέγεθος του δείγματος. Κρίνεται, επομένως, απαραίτητο να πραγματοποιηθούν και άλλες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μαρτύρων οι οποίες θα μας επιτρέψουν να ερμηνεύσουμε με μεγαλύτερη ασφάλεια την επίδραση των μελετηθέντων πολυμορφισμών στον κίνδυνο εκδήλωσης βρογχικού άσθματος και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη των πολυμορφισμών κατέδειξε ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί συνδέονται μεμονωμένα με την εμφάνιση συνδυασμών κλινικών αποτελεσμάτων. Τα SNPs στα γονίδια που σχετίζονται με κάποια ασθένεια μπορεί να αυξάνουν ή να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε άμεση σχέση της ύπαρξης του πολυμορφισμού *IL-6* (rs1800795) σε ομόζυγη κατάσταση GG και αύξησης του κινδύνου εμφάνισης του άσθματος στις περιπτώσεις των ασθματικών ασθενών ΣΔτ2 ($p=0.011$) και των ασθματικών ασθενών με παχυσαρκία και ΣΔτ2 ($p=0.013$).

Για τον πολυμορφισμό *CDKAL1* (rs7756992), η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το αλληλόμορφο A σε ομόζυγη κατάσταση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών ($p=0.004$) και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία ($p=0.012$).

Για τον πολυμορφισμό *TCF7L2* (rs7903146) το T αλληλόμορφο σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΔτ2 στους ασθενείς ($p=0.001$), στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 ($p=0.036$), στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία ($p=0.005$) και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία ($p=0.009$).

Για τον πολυμορφισμό *SLC30A8* (rs13266634), στην παρούσα μελέτη η ομόζυγη κατάσταση CC παρουσιάζει σχέση με την εμφάνιση ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών ($p=0.003$) και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία ($p=0.006$).

Για τον πολυμορφισμό *FTO* (rs9939609) τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T σε ομόζυγη κατάσταση έχουν στατιστικά σημαντική μειωμένη τάση να εμφανίσουν ΣΔτ2 ($p=0.04$).

Παρατηρήθηκε απουσία συσχέτισης για τους πολυμορφισμούς *TNF-a* (rs1800629) *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *PPARγ2* (rs1801282) για το άσθμα και το ΣΔτ2.

Καθώς πρόκειται για μία μελέτη με σχετικά μικρό δείγμα πληθυσμού, οι παρεχόμενες πληροφορίες θα μπορούσαν να διερευνηθούν περαιτέρω για εξαγωγή συμπερασμάτων με μεγαλύτερη ασφάλεια στην επίδραση των μελετηθέντων πολυμορφισμών στον κίνδυνο εκδήλωσης βρογχικού άσθματος και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siqiao Liang, Xuan Wei, Chen Gong, Jinmei Wei, Zhangrong Chen, Xiaoli Chen, Zhibo Wang and Jingmin Deng. Significant association between asthma risk and the GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms: An updated meta-analysis of case-control studies. *Respirology*. 2013;18:774–783.
2. R.M. Subrahmanyam. Can bronchial asthma be classified based on the immunological status? *Lung India*. 2011;28(2):110–113.
3. Anne M. Fitzpatrick, Dean P. Jones, Lou Ann S. Brown. Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox. Signal*. 2012;7(2):375–408.
4. S. A. Mahdavian, N. Rezaei, B. Moradi, S. Dorkhosh, A. A. Amirzargar, M. Movahedi. Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms Among Iranian Patients with Asthma. *J. Clin. Immunol*. 2009;29:57–62.
5. D. Desai, C. Brgihtling. Cytokines and cytokine – specific therapy in asthma. *Advances in clinical chemistry*. 2012;57:57-8.
6. E.R.Mc Fadden. Ασθμα. Harrison's, Εσωτερική Παθολογία 14^η έκδοση (1998), Επιστημονικές εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, Αθήνα, κεφ. 252, σελ. 1761-1769
7. Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine. (5th ed. έκδοση). Robert Mason V.Courtney Broaddus Thomas Martin Talmadge King Dean Schraufnagel John Murray Jay Nadel Jay Nadel. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. 2010.Chapter 38.
8. Thorowgood JC. On bronchial asthma. *British Medical Journal*. 1873;673 (2):600.
9. Gaskoin G. On the treatment of asthma. *British Medical Journal*. 1872;587(1): 39.
10. Berkart JB. The treatment of asthma. *British Medical Journal*. 1880;1016(1): 917–8.
11. Bosworth FH. Hay fever, asthma, and allied affections. *Transactions of the Annual Meeting of the American Climatological Association*. 1886;2:151–70.
12. Doig RL. Epinephrin; especially in asthma. *California State Journal of Medicine*. 1905;3(2):54–5.
13. Opolski M, Wilson I. Asthma and depression: a pragmatic review of the literature and recommendations for future research. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health*. 2005;1:18.
14. von Mutius, E. A patient with asthma seeks medical advice in 1828, 1928, and 2012. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(9):827–34.
15. Crompton G. A brief history of inhaled asthma therapy over the last fifty years *Primary care respiratory journal. journal of the General Practice Airways Group*. 2006;15(6):326–31.
16. Katsilambros N. *Diabetes in clinical practice: questions and answers from case studies*. Chichester, John Wiley and sons; 2006.
17. Robert J. McCunney, MD, MPH, Asthma, Genes, and Air Pollution. *MS JOEM*. 2005;47 (12):1285-1291.
18. Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin. Chem*. 2011;57:241-54.
19. P. Gosset, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, C. Vannimendus, M. Joseph, A.B. Tonnel, A. Capron. Increased secretion of tumor necrosis factor α and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J. Allergy, Clin. Immunol*. 1991;88(4):561-571.
20. R. Louis Severe asthma: how can we differentiate phenotypes?, *Swiss Med*.

- WKLY. 2009;139(19-20):274-277.
21. S. T. Holgate, R. Polosa The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*. 2006;368:780-793.
 22. J. Genuneit, J. L. Cantelmo, G. Weinmayr, G. W. K. Wong, P. J. Cooper, M.-A. Riiikj, M. Gotua, M. Kabesch, E. von Mutius, F. Forastiere, J. Crane, W. Nystad, N. El-Sharif, Batlles-Garrido, L. Garcia-Marcos, G. Garcia-Hernandez, M. Morales-Suarez-Varela, L. Nilsson, L. Braback, Y. Saraclar, S. K. Weiland, W. O. C. Cookson, D. Strachan, M. F. Moffatt. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2 Clinical & Experimental. *Allergy*. 2009;39:1875-1888.
 23. S Piacentini, R Polimanti, B Moscatelli, MA RE, D Manfellotto, M Fuciarelli. Lack of Association Between GSTM1, GSTP1, and GSTT1 Gene Polymorphisms and Asthma in Adult Patients From Rome, Central Italy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2012;22(4):252-256.
 24. Εθνικό Συνταγολόγιο ΕΟΦ 2007, σελ. 161-174.
 25. J. Barnes. Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. *Eur. Respir.J.*, 2001;34:67s-77s.
 26. P.S.Thomas. Tumor necrosis factor- α :the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunology and Cell Biology*. 2001;79:132-140.
 27. K.F. Chung, P.J. Barnes. Cytokines in asthma. *Thorax*, 1999;54, 825-857.
 28. Raza ST, Abbas S, Ahmad A, Ahmed F, Zaidi ZH, Mahdi F. Association of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and FTO gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus cases in northern India. *BJMG*. 2014;17(1):47-54.
 29. Bartsocas CS. Genetics of Type 2 Diabetes Mellitus. *New data Iatrika Analekta* 2012;3:706-708.
 30. G. L. King. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of Periodontology*. 2008;79(8):1527-1534.
 31. Φώτης Παυλάτος, τ. αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, Διαβητολογικά Νέα, Ιούλιος – Σεπτέμβριος 1998.
 32. L-G Hersoug, A. Linneberg. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decrease immune tolerance?, *Allergy*. 2007;62:1205-1213.
 33. J.C. Pickup, M.A Crook. Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?, *Diabetologia*. 1998;41:1241-1248.
 34. J.F. Navarro, C. Mora. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial. Transplant*. 2005;20:2601-2604.
 35. Tatsuyoshi Kono, Geonyoung Ahn, Dan R. Moss, Liann Gann, Angel Zarain-Herzberg, Yurika Nishiki, Patrick T. Fueger, Takeshi Ogihara, and Carmella Evans-Molina. PPAR- γ Activation Restores Pancreatic Islet SERCA2 Levels and Prevents β -Cell Dysfunction under Conditions of Hyperglycemic and Cytokine Stress. *Mol Endocrinol*. 2012;26(2): 257-271.
 36. Fiona McMurray & Lee Moir & Roger D. Cox From Mice to Humans, *Curr. Diab. Rep*. 2012;12:651-58.
 37. J. Walston, M. Seibert, C. J Yen, L.J. Cheskin, R.E. Andersen. Tumor Necrosis Factor- α -238 and-308 Polymorphisms Do Not Associate With Traits Related to Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*.1999;48:2096-2098.
 38. Bray GA. The epidemic of obesity and changes in food intake: the Fluoride Hypothesis. *Physiol Behav*. 2004;82(1):115-21.

39. Choquet H, Meyre D. Genetics of Obesity: What have we Learned? *Current Genomics*. 2011;12:169-79.
40. J-P Bastard, M. Maachi, C. Lagathu, M.J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, B. Feve Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur.Cytokine Netw*. 2006;17:4-12.
41. G. S. Hostamisligil, P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, B. M. Spiegelman. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Human Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Invest*. 1995;95:2409-2415.
42. F.B.Hu, J.B.Meigs, T.Y.Li, N.Rifai, JA. E. Manson. Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes*. 2004, 53(3):693-700.
43. J.S Yudkin, M Kumari, S.E.Humphries, V. Mohamed-Ali Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?, *Atherosclerosis*. 2000;148(2):209-214.
44. G. Kroder, B. Bossenmaier, M. Kellerer, E. Capp., B. Stoyanov, A. Muhlhofer, L. Berti, H. Horikoshi, A. Ullrich, H. Haring Tumor Necrosis Factor- α and Hyperglycemia-induced Insulin Resistance. *J. Clin. Invest*. 1996;97:1471-1477.
45. www.galinos.gr (06/2017)
46. Αλεπόρου-Μαρίνου Β, Αργυροκαστρίτης Α, Κομητοπούλου Α, Πιαλόγλου Π, Σγουρίτσα Β. Βιολογία Θετικής Κατεύθυνσης Γ' Τάξης Γενικού Λυκείου. Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων.15, 20,70, 77, 125, 126.
47. Garvin W., Adley C., Dixon B., Frings J., Madden D., Marcussen L., Turner J., Paul E. European Initiative for Biotechnology Education, Issues in human genetics. 1995 (4):3-11.
48. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci*. 1893;105:487-511.
49. Granger GA, Wiliams TW. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor. *Nature*. 1968;218:1253-1254.
50. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-3670.
51. Argiles M. Josep, Lopez-Soriano Joaquin, Busqueth Silvia and Lopez-Soriano J. Francisco. Journey from cachexia to obesity byTNA. *FASEBJ*.1997;11:43-751.
52. G. Hostamisligil, B. Spiegelman. Tumor Necrosis Factor α : A Key Component of the Obesity-Diabetes Link. *Diabetes*. 1994;43:1271-76.
53. Seyed AlirezaMahdaviani, Nima Rezaei, Batoui Moradi, Shahin Dorkhosh, Ali Akhar Amirzargar, Masoud Movahedi. Proinflammatory Cytokine Gene Polylrphisms among Iranian patients with Asthma. *J. Clin.Immunol*. 2009;29:57-62.
54. J.S.Witte, L.J.Palmer, R.D. O'Connor, P.J.Hopkins, J.M.Hall. Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNF- α and risk of asthma. *European Journal of Human Genetics* 2002;10:82-85.
55. J. Gao, G. Shan, B. Sun, P.J.Thompson, X. Gao. Association between polymorphism of tumour necrosis factor α -308 gene promoter and asthma:a meta-analysis. *Thorax*. 2006;61:466-471.
56. G.S.Hotamisligil. The role of TNF- α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. of Internal Medicine*. 1999;245:621-625.

57. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=tnf-a>. (10/2017)
58. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*. 2000;50:216-228.
59. Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*. 1996;103:391-396.
60. He B, Navikas V, Lundahl J, Soderstrom M, Hillert J. Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol*. 1995;63:143-147.
61. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langerhans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997;72:149-153.
62. Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet*. 1999;22:145-150.
63. Yonggang Wei, Fei Liu, Bo Li, Xi Chen, Yu Ma, Lvan Yan, Tianfu Wen, Mingquin Xu, Wentao Wang, Jiayin Yang. Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor- α and Hepatocellular Carcinoma Risk: A Huge Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci*. 2011;56:2227-2236.
64. J-P Bayley, THM Ottenhoff, CL Verweij. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes and Immunity*. 2004;5:315-329.
65. J. Walston, M. Seibert, C. J Yen, L.J. Cheskin, R.E. Andersen, Tumor Necrosis Factor- α -238 and-308 Polymorphisms Do Not Associate With Traits Related to Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 1999;48:2096-2098.
66. M.F. Moffat, W.O.C.M. Cookson. Tumour Necrosis Factor haplotypes and asthma. *Human Molecular Genetics*, 1997;6,4:551-554.
67. L.J. Abraham, K.M. Kroeger. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Journal of Leukocyte Biology* 1999;66:562-566.
68. Old KJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985;230 (4726):630-2.
69. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*. 2008;13:5094-107.
70. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwall BB, Goeddel DV. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312:724-729.
71. Gray PW, Aggarwall BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature*. 1984;312:721-724.
72. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine*. 1990;2:231-237.
73. Naismith JH, Devine TQ, Kohno T, Sprang SR. Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure*. 1996;4:1251-1262.

74. Idriss HT, Naismith JH. TNF- α and the TNF receptor superfamily: structure/function relationship(s). *Mol Cell Res Tech*. 2000;50:184-195.
75. Lionel B. Ivashkiv. The History, Basic Science and Biology of TNF- α . 2003 www.hss.edu.
76. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(10):4220-4.
77. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/tnfaID319.html>. Atlas of Genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology
78. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1998) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1998;53 (1):45-53.
79. Tang P, Hung MC, Klostergaard J Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer, *Biochemistry*. 1996;35(25):8216-25.
80. Genetics Home Reference <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TNF> (10/2017).
81. Baeyens KJ, De Bondt HL, Raeymaekers A, Fiers W, De Ranter CJ. The structure of mouse tumor-necrosis factor at 1.4 Å resolution: towards modulation of its selectivity and trimerization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1999;55:772-778.
82. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334:1717-1725.
83. Kontoyannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut associated immunopathologies. *Immunity*. 1999;10:387-398.
84. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Claccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol*. 1998;160:943-952.
85. Barbara JA, Van Ostade X, Lopez A. Tumour necrosis factor- α (TNF α): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol cell Biol*. 1996;74:434-443.
86. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:8667- 8671.
87. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, Fonseca SG, Van Grevenynghe J, Boulassel MR, Bruneau J, Shoukry NH, Routy JP, Douek DC, Haddad EK, Sekaly RP. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat. Med*. 2010;16 (4):452–9.
88. Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF- α : a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;21(1):5–12.
89. H.D.Shin, b.l.Park, L.H.Kim, J.H.Jung, H.J.Wang, Y.J. Kim, H.S.Park, S.J.Hong, B.W.Choi, D.J.Kim, C.S. Park. Association of tumor necrosis factor

- polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Human Molecular Genetics* 2004;13(4):397-403.
90. K. Theoman Uysal, S. M. Wiesbrock, G. Hotamisligil. Functional analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- α -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity. *Endocrinology*.1998;139(12).
 91. J.M.Fernandez-Real, M.Broch, W.Ricart, R. Casamitjana, C. Gutierrez, J. Vendrell, C. Richart. Plasma Levels of the Soluble Fraction of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 and Insulin Resistance. *Diabetes* 1998; 47:1757-1762.
 92. P. Mitrou, E. Boutati, V. Lambadiari, A. Tsaegka, A.E. Raptis, N. Tountas, T. Economopoulos, S.A. Rapis, G. Dimitriadis. Insulin resistance in hyperthyroidism: the role of IL-6 and TNF- α . *Eur. Soc. Of Endocrinology*. 2010;162:121-126.
 93. Τουμπανάκης Δημήτριος, Βασιλακόπουλος Θεόδωρος. Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6). *Πνεύμων*. 2007;20(2):143.
 94. <https://livelwello.com/snp/rs1800795> (10/2017).
 95. Zilberstein A, Ruggieri R, Horn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J*. 1986;5:2529-2537.
 96. Tanabe O, Akira S, Kamiya T, Wong GG, Hirano T, Kishimoto T. Genomic structure of the murine IL-6 Gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J. Immunol*. 1988;141:3875-3881.
 97. Corvol H, De Giacomo A, Eng C, Seibold M, Ziv E, Chapela R, Rodriguez-Santana JR, Rodriguez-Cintron W, Thyne S, Watson HG, Meade K, LeNoir M, Avila PC, Choudhry S, Burchard EG. Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study; Study of African-Americans, Asthma, Genes and Environments (SAGE) Investigators. Genetic ancestry modifies pharmacogenetic gene-gene interaction for asthma. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(7):489-96.
 98. Neveu WA, Allard JL, Raymond DM, Bourassa LM, Burns SM, Bunn JY, Irvin CG, Kaminsky DA, Rincon M. Elevation of IL6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respir Res*. 2010;11:28.
 99. Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2007;292:L199-L206.
 100. T Kishimoto. The Biology of Interleukin-6. *Blood*, Review Article.1989;74:1, 1-10.
 101. Grossmann RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriasis skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6367-6371.
 102. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierful P, Espevik T. The Complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association Between Interleukin-6, Interleukin-1 and Fatal Outcome. *J Exp*

- Med. 1989;169:333-338.
103. A. Kubaszek. Promoter Polymorphisms of the TNF- α (G-308A) and IL-6 (C-174G) Genes Predict the Conversion From Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003;52:1872-1876.
 104. Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:45-77.
 105. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its Receptor: α paradigm for cytokines. *Science*. 1992;258:593-597.
 106. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*. 1993;82:3515-3523.
 107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene+il6> (5/2015).
 108. M. Rincon, C. G. Irvin. Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases. *Int. J. Biol. Sci*. 2012;8:1281-1290.
 109. A.D.Pradhan, J.E.Manson, N.Rifai, J.E. Buring, P.M.Ridker. C-Reactive Protein, Interleukin 6 and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*. 2001;286(3):327-334.
 110. Alison M. Morris, Leonie K. Heilbronn a, Manny Noakes, Karen L. Kind, Peter M. Clifton. -308 Nco I Polymorphism of tumor necrosis factor α on overweight Caucasians. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2003;62: 197-201.
 111. E. Z. Fisman, A. Tenenbaum. The ubiquitous interleukin-6:a time for reappraisal. *Cardiocascular Diabetology*, 2010;9:62.
 112. May LT, GhrayebJ, Santhanam U, Tatter SB, Sthoeger Z, Helfgott DC, Chiorrazi N, Greininger G, Sehgal PB. Synthesis and secretion of multiple forms of β 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem*. 1988;263:7760-7766.
 113. Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys*. 1989;272:144-151.
 114. Snouwaert JN, Leebeek FWG, Fowlkes DM. Role of disulfide bonds in biological activity of human interleukin-6. *J Biol Chem*. 1991;266:23097-23102.
 115. Zhang J-G, Matthews JM, Ward LD, Simpson RJ. Disruption of the disulfide bonds of recombinant murine interleukin-6 induces formation of a partially unfolded state. *Biochemistry* 1997;36:2380-2385.
 116. Nishimura C, Ekida T, Masuda S, Futatsugi K, Itoh S-I, Yasukawa K, Kishimoto T, Arata Y. Chemical modification and ¹H-NMR studies on the receptor-binding region of human interleukin-6. *Eur J Biochem*. 1991;196:377-384.
 117. Presnell SR, Cohen FE. Topological distribution of four- α -helix bundles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6592-6596.
 118. C.Tsigos, D. Papanicolaou, I. Kyrou, C. Mitsiadis, G. P. Chrousos. Dose-Dependent Effects of Recombinant Human Interleukin-6 on Glucose Regulation. *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(12):4167-4170.
 119. J.S Yudkin, M Kumari, S.E.Humphries, V. Mohamed-Ali. Inflammation, obesity,

- stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000;148:209-214.
120. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Science*. 1997;6:929-955.
 121. S. Finotto. Impact of IL-6 in Allergic Asthma. *Mod. Asp. Immunobiol*. 2006;18(7).
 122. Detmers, S.K. Lo, E. Olsen-Egbert, A. Walz, M. Baggiolini, Z.A. Cohn. Neutrophil-activating protein-1/interleukin-8 stimulates the binding activity of the leucocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*. 1990;171:1155-1162.
 123. H. Numanami, S. Koyama, E. Sato, M. Haniuda, D.K. Nelson, J.C. Hoyt, J.L. Freels, M.P. Habib, R.A. Robbins. Serine protease inhibitors modulate chemotactic cytokine production by human lung fibroblasts in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284 (5):L882-L890.
 124. Kusunoki T, Okafuji I, Yoshioka T, Saito M, Nishikomori R, Heike T, Sugai M, Shimizu A, Nakahata T. SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3): 636-8.
 125. D. Subramaniam, C. Hollander, U. Westin, J. Erjefält, T. Stevens, S. Janciauskiene. Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits neutrophil apoptosis. *Respirology* 2011;16 (2):300–307.
 126. Esra Birben, Cansın Sackesen, Nihan Turgutoğlu, Ömer Kalayc. The role of SPINK5 in asthma related physiological events in the airway epithelium. *Respiratory medicine* 2012;106:349-355.
 127. H. Jongepier, G. H. Koppelman, I. M. Nolte, M. Bruinenberg, E. R. Bleeker, D. A. Meyers, G. J. te Meerman, D. S. Postma. Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3):486-92.
 128. M. Kabesch, D. Carr, SK Weiland, E von Mutius. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, Kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin exp. Allergy* 2004; 34:340-345
 129. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SPINK5>
 130. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet*. 2010;19(1):111-21.
 131. He, M.M., Smith, A.S., Oslob, J.D., Flanagan, W.M., Braisted, A.C., Whitty, A., Cancilla, M.T., Wang, J., Lugovskoy, A.A., Yoburn, J.C., Fung, A.D., Farrington, G., Eldredge, J.K., Day, E.S., Cruz, L.A., Cachero, T.G., Miller, S.K., Friedman, J.E., Choong, I.C., Cunningham, B.C. Small-molecule inhibition of TNFalpha. *Science* 2005;310:1022-1025.
 132. Qiji Liu, Yu Xia, Wenjing Zhang, Jisheng Li, Pin Wang, Huaichen Li, Chunhua Wei, Yaoqin Gong. A functional polymorphism in the SPINK5 gene is

- associated with asthma in a Chinese Han Population. *BMC Med Genet.* 2009;10:59.
133. S. Chavanas, C. Bodemer, A. Rochat, D. Hamel-Teillac, M. Ali, A.D. Irvine, J.L. Bonafé, J. Wilkinson, A. Taïeb, Y. Barrandon, J.I. Harper, Y. de Prost. A. Hovnanian Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome *Nat Genet* 2000;25 (2):141-142.
 134. A. Kato, K. Fukai, N. Oiso, N. Hosomi, T. Murakami, M. Ishii. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol*, 2003;148 (4):665-669.
 135. T. Okabayashi, S. Yokota, Y. Yoto, H. Tsutsumi, N. Fujii. Fosfomycin suppresses chemokine induction in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(6):859-865.
 136. A. Lanza, A. Tava, M. Catalano, L. Ragona, I. Singuaroli, F.S. Robustelli della Cuna, G. Robustelli della Cuna. Effects of the *Medicago scutellata* trypsin inhibitor (MsTI) on cisplatin-induced cytotoxicity in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 2004;24(1):227-233.
 137. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2303067. (09/2017)
 138. Weidinger S, Baurecht H, Wagenpfeil S, Henderson J, Novak N, Sandilands A, Chen H, Rodriguez E, O'Regan GM, Watson R, Liao H, Zhao Y, Barker JN, Allen M, Reynolds N, Meggitt S, Northstone K, Smith GD, Strobl C, Stahl C, Kneib T, Klopp N, Bieber T, Behrendt H, Palmer CN, Wichmann HE, Ring J, Illig T, McLean WH, Irvine AD. Analysis of the individual and aggregate genetic contributions of previously identified serine peptidase inhibitor Kazal type 5 (SPINK5), kallikrein-related peptidase 7 (KLK7), and filaggrin (FLG) polymorphisms to eczema risk. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):976.
 139. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPINK5> (09/2017).
 140. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SPINK5> Clin exp. Allergy 2004, 34, 340-345(09/2017).
 141. <https://en.wikipedia.org/wiki/LEKTI>(09/2017).
 142. Bleeker ER, Postma DS, Meyers DA. Evidence for multiple genetic susceptibility loci for asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(4 Pt 2):S113-6.
 143. Moffatt MF, Cookson WOCM, Linkage and Candidate Gene Studies in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(4):S110-S112.
 144. Huimin Shi, Dan Cheng, Lingling Yi, Xiaorong Huo, Kan Zhang, and Guohua Zhen. Association between ORMDL3 polymorphism and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):3173-3183.
 145. Rui Jin, Wen-Xiao Yuan., Hua-Guo Xu, Wei Ren, Li-Li Zhuang, Guo-Ping Zhou. Characterization of a novel isoform of the human ORMDL3 gene. *Cell and Tissue Research.* 2011;346,(2):203-208.
 146. <http://www.snpedia.com/index.php/ORMDL3> 08/2017)
 147. W.H. Zhai, C.Y. Song, Z.G. Huang and H. Sha. Correlation between the genetic polymorphism of ORMDL3 gene and asthma risk: a meta-analysis. *Mol. Res.* 2015;14 (2):7101-7112.

148. M BalantiĀ, 1 M Rijavec, 1 M Fležar, 1 T Camlek, I Hudoklin, M Košnik, P Korošec, S ŠuškovĀ. A Polymorphism in ORMDL3 Is Associated Not Only With Asthma Without Rhinitis but Also With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(4):256-261.
149. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SAG., Wong KCC., Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WOC. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-473.
150. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, Valverde MA, Vicente R. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet*. 2010;19(1):111-21.
151. Jin R, Xu HG, Yuan WX, Zhuang LL, Liu LF, Jiang L, Zhu LH, Liu JY, Zhou GP. Mechanisms elevating ORMDL3 expression in recurrent wheeze patients: role of Ets-1, p300 and CREB. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(7):1174-83.
152. Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia*. 2009;52:1240-9.
153. Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, et al. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(6):65-80.
154. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors, Margarita L. Dubocovich, Philippe Delagrange, Diana N. Krause, David Sugden, Daniel P. Cardinali, and James Olcese *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):343-380.
155. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 2005;308 (5724):1043–5.
156. Delezie J, Dumont S, Dardente H, et al. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J*. 2012;26(8):321-35.
157. Cheer FA, Wright KP, Kronauer RE, Czeisler CA. Plasticity of the intrinsic period of the human circadian timing system. 2007 *Plos ONE* 2 (8): e721.
158. Duffy JF, Wright KP. Entrainment of the human circadian system by light. *J Biol Rhythms*. 2005;20(4): 326–38.
159. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ \(04/2016\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ (04/2016)).
160. Li C, Shi Y, You L, Wang L, Chen ZJ. Association of rs10830963 and rs10830962 SNPs in the melatonin receptor (MTNR1B) gene among Han Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2011;17:193-8.
161. [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTNR1B \(02/2017\)](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTNR1B (02/2017))
162. Thomas Sparsø, Amélie Bonnefond, Ehm Andersson, Nabila Bouatia-Naji, Johan

- Holmkvist, Lise Wegner, Niels Grarup, Anette P. Gjesing, Karina Banasik, Christine Cavalcanti-Proença, Marion Marchand, Martine Vaxillaire, Guillaume Charpentier, Marjo-Riitta Jarvelin, Jean Tichet, Beverley Balkau, Michel Marre, Claire Lévy-Marchal, Kristine Færch, Knut Borch-Johnsen, Torben Jørgensen, Sten Madsbad, Pernille Poulsen, Allan Vaag, Christian Dina, Torben Hansen, Oluf Pedersen, and Philippe Froguel. G-allele of Intronic rs10830963 in MTNR1B Confers Increased Risk of Impaired Fasting Glycemia and Type 2 Diabetes Through an Impaired Glucose-Stimulated Insulin Release. *Diabetes*. 2009;58(6):1450-1456.
163. Reppert SM, Weaver DR. Melatonin madness. *Cell*. 1995;83:1059-1062.
164. Zhou B, Wei FY, Kanai N, Fujimura A, Kaitsuka T, Tomizawa K. Genet Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. *Hum. Mol. Genet*. 2014;23:4639-4650.
165. Wei FY, Tomizawa K. Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. *Endocr J*. 2011;58:819-25.
166. Yan-yan Li, Lian-sheng Wang, Xin-zheng Lu, Zhi-jian Yang, Xiang-ming Wang, Chuan-wei Zhou, Jian Xu, Yun Qian & Ai-ling Chen. CDKAL1 gene rs7756992 A/G polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 62,567 subjects *Scientific Reports*. 2013;3:3131.
167. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-678.
168. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKAL1> (5/2017).
169. Schroner Z, Javorsky M, Haluskova J, et al. Variation in CDKAL1 gene is associated with therapeutic response to sulphonylureas. *Physiol Res*. 2012;61:177-83.
170. Eleftheria Zeggini, Michael N. Weedon, Cecilia M. Lindgren, Timothy M. Frayling, Katherine S. Elliott, Hana Lango, Nicholas J. Timpson, John R.B. Perry, Nigel W. Rayner Rachel M. Freathy, Jeffrey C. Barrett, Beverley Shields, Andrew P. Morris, Sian Ellard, Christopher J. Groves, Lorna W. Harries, Jonathan L. Marchini, Katharine R. Owen, Beatrice Knight, Lon R. Cardon, Mark Walker, Graham A. Hitman, Andrew D. Morris, Alex S.F. Doney, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Mark I. McCarthy, and Andrew T. Hattersley. Multiple type 2 diabetes susceptibility genes following genomewide association scan in UK samples. *Science*. 2007;316(5829):1336–1341.
171. Chistiakov DA, Potapov VA, Smetanina SA, Bel'chikova LN, Suplotova LA, Nosikov VV. The carriage of risk variants of CDKAL1 impairs beta-cell function in both diabetic and non-diabetic patients and reduces response to non-sulfonylurea and sulfonylurea agonists of the pancreatic KATP channel. *Acta Diabetol*. 2011;48:227-35.
172. Fan-Yan Wei and Kazuhito Tomizawa. Development of type 2 diabetes caused by a deficiency of a tRNAlys modification *Islets*. 2012;4(1):71-73.

173. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TCF7L2> (4/2017).
174. Jan Castrop, Klaske van Norren and Hans Clevers. A gene family of HMG-box transcription factors with homology to TCF-1. *Nucleic Acids Research*. 1992; 20(3):611.
175. Vaquero AR, Ferreira NE, Omae SV, Rodrigues MV, Teixeira SK, Krieger JE, Pereira AC. Using gene-network landscape to dissect genotype effects of TCF7L2 genetic variant on diabetes and cardiovascular risk. *Physiol Genomics*. 2012;44(19):903-14.
176. Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*. 2008;22(11):2383-92.
177. Prokunina-Olsson L, Welch C, Hansson O, et al. Tissue-specific alternative splicing of TCF7L2. *Human molecular genetics* 2009;18:3795-804.
178. Mojgan Allahdini, Behnam Kamalidehghan, Leila Akbari, Parisa Azadfar, Ali Rahmani, Fatemeh Ahmadipour, Goh Yong Meng, Abbas Masserrat, Massoud Houshmand. Prevalence of the rs7903146C>T polymorphism in TCF7L2 gene for prediction of type 2 diabetes risk among Iranians of different ethnicities. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:5835-5841.
179. Kahveci C, Koldemir M, Cagatay P, Bayer H, Yildiz S, Bagriacik N, Duman BS. Relationship of transcription factor 7 like 2 gene rs7903146 variation with type 2 diabetes and obesity related parameters. *Diabetes Metab Syndr..* 2012;6(1):48-53.
180. Q. Aston Acton. *Diabetes: New Insights for the Healthcare Professional*. 2013 Edition, Scholarly editions, chapter 4, Genetics.
181. <https://www.gbhealthwatch.com/HotTopic-type-2-diabetes-TCF7L2.php>. (3/2017)
182. Gaulton KJ, Nammo T, Pasquali L, et al. A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nature genetics*. 2010;42:255-9.
183. D.X. Pang, A.J.P. Smith, and S.E. Humphries. Functional analysis of TCF7L2 genetic variants associated with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(6):550–556.
184. Struan F.A. Grant. Understanding the Elusive Mechanism of Action of TCF7L2 in Metabolism. *Diabetes*. 2012;61(11):2657-2658.
185. Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Molecular endocrinology*. 2008;22:2383-92.
186. Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K. Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 2008;57:645-53.
187. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J. Clin Invest*. 2007;117:2155-63.
188. Locke JM, Da Silva Xavier G, Rutter GA, Harries LW. An alternative polyadenylation signal in TCF7L2 generates isoforms that inhibit T cell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LEF)-dependent target genes. *Diabetologia*. 2011;54:3078-82.

189. Zhou Y, Zhang E, Berggreen C, et al. Survival of pancreatic beta cells is partly controlled by a TCF7L2-p53-p53INP1-dependent pathway. *Hum Mol Genet* 2012;21:196-207.
190. Zhao J, Schug J, Li M, Kaestner KH, Grant SF. Disease-associated loci are significantly over-represented among genes bound by transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) in vivo. *Diabetologia*. 2010;53:2340-6.
191. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 2005;280:1457-64.
192. Janet M. Wenzlau, Yu Liu, Liping Yu, Ong Moua, Kimberly T. Fowler, Sampathkumar Rangasamy, Jay Walters, George S. Eisenbarth, Howard W. Davidson, and John C. Hutton. A Common Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism in the SLC30A8 Gene Determines ZnT8 Autoantibody Specificity in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2008;57(10): 2693-2697.
193. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004;53:2330-7.
194. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZnT-8> (05/2017).
195. <http://browser.1000genomes.org/index.html>. (05/2017).
196. Fabrice Chimienti, Severine Devergnas, Alain Favier, and Michel Seve. Identification and Cloning of a Cell-Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules. *Diabetes*. 2004;53(9):2330-7.
197. Murgia C, Devirgiliis C, Mancini E, Donadel G, Zalewski P, Perozzi G. Diabetes-linked zinc transporter ZnT8 is a homodimeric protein expressed by distinct rodent endocrine cell types in the pancreas and other glands. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19:431-9.
198. Chimienti F, Favier A, Seve M. ZnT-8. A pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *Biometals*. 2005;18:313-7.
199. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci* 2006;119:4199-206.
200. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:17040-5.
201. Strawbridge RJ, Dupuis J, Prokopenko I, et al. Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:2624-34.
202. Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia*; 2010;53:1656-68.
203. Azadeh Motavallian, Sasan Andalib, Golnaz Vaseghi, Hamid Mirmohammad-Sadeghi, Masoud Amini. Association between PRO12ALA polymorphism of

- the PPAR- γ 2 gene and type 2 diabetes mellitus in Iranian patients. *Indian J Hum Genet.* 2013;19(2):239-244.
204. Francisco A. Monsalve, Radha D. Pyarasani, Fernando Delgado-Lopez, Rodrigo Moore-Carrasco. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:549627
 205. Pilar García-Broncano, Juan Berenguer, Amanda Fernández-Rodríguez Daniel Pineda-Tenor, María Ángeles Jiménez-Sousa Mónica García-Alvarez, Pilar Miralles, Teresa Aldámiz-Echevarria, Juan Carlos López, Dariela Micheloud and Salvador Resino. PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism was associated with favorable cardiometabolic risk profile in HIV/HCV coinfecting patients: a cross-sectional study. *Journal of Translational Medicine.* 2014;12:235.
 206. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPARG2> (03/2017).
 207. C. Galbete, E. Toledo, M.A. Martínez-González, J.A. Martínez, F. Guillén-Grima and A. Marti. Pro12Ala variant of the PPARG2 gene increases body mass index: An updated meta-analysis encompassing 49,092 subjects. *Obesity.* 2013;21(7):1486-1495.
 208. <http://www.snpedia.com> (02/2017).
 209. Hsiao TJ, Lin E. The Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) gene in relation to obesity and metabolic phenotypes in a Taiwanese population. *Endocrine.* 2015;48(3).
 210. Ramya Kapadia, Jae-Hyuk Yi, and Raghu Vemuganti. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci.* 2008;13:1813-1826.
 211. D. Gupta, T. Kono, and C. Evans-Molina. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12(12):1036-1047.
 212. Peters T, Ausmeier K, Ruther U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 1999;10:983-6.
 213. Man-Ka Marcella Cheung, Giles S. H. Yeo. FTO biology and obesity: why do a billion of us weigh 3 kg more?, *Front. Endocrinol.*, 2011;2:4.
 214. Choquet H, Meyre D. Molecular Basis of Obesity: Current Status and Future Prospects. *Current Genomics.* 2011;12:154-68.
 215. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=fto> (09/2017).
 216. Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 2007;318:1469-72.
 217. de Luis DA, Aller R, mConde R, Izaola O, de la Fuente B, Sagrado MG. Relation of the rs9939609 gene variant in FTO with metabolic syndrome in obese female patients. *J Diabetes Complications.* 2013;27(4):346-50.
 218. RI Ursu, C Badiu, N Cucu, GF Ursu, and E Severin. The study of the rs9939609 FTO gene polymorphism in association with obesity and the management of obesity in a Romanian cohort. *J Med Life.* 2015; 8(2): 232–238.
 219. Marian Tanofsky-Kraff, Joan C Han, Kavitha Anandalingam, Lauren B

- Shomaker, Kelli M Columbo, Laura E Wolkoff, Merel Kozlosky, Camden Elliott, Lisa M Ranzenhofer, Caroline A Roza, Susan Z Yanovski, and Jack A Yanovski. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(6):1483-1488.
220. Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta* 2012;413:1222-5.
221. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 2010;26:266-74.
222. Berulava T, Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1054-6.
223. Bell CG, Finer S, Lindgren CM, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS One* 2010;5:e14040.
224. Cheung MK, Yeo GS. FTO Biology and Obesity: Why Do a Billion of Us Weigh 3 kg More? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011;2:4.
225. Han Z, Niu T, Chang J, et al. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature.* 2010;464:1205-9.
226. Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* 2011;7:885-7.
227. Huang J, Johnson AD, O'Donnell CJ. PRIME: a method for characterization and evaluation of pleiotropic regions from multiple genome-wide association studies. *Bioinformatics* 2011;27:1201-6.
228. Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, Serna Ide L, Chin KV. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401:390-5.
229. Meyre D. Is FTO a type 2 diabetes susceptibility gene? *Diabetologia.* 2012;55:873-6.
230. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299 (5609):1033-1036.
231. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs1800795> (09/2017).
232. Nauck, M., Winkelmann, B.R., Hoffmann, M.M., Bohm, B.O., Wieland, H., Marz, W. The interleukin -6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *J Mol Med.* 2002;80:507-513.
233. Fissman D, Faulds G, Jeffery, R. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin -6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* 1998;102:1369-1376.
234. Henningson S., Hakansson A., Baghaei F., Rosmond R., Holm G., Ekman A., Nissbrandt H, Eriksson E. Interleukin 6 gene polymorphism -174G/C influences plasma lipid levels in women. *Obesity.* 2006;14:1868-1873.
235. Liu C, Wu Y, Li H, et al. MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired beta-cell function in Chinese Hans from

- Shanghai. *BMC Med Genet.* 2010;11:59.
236. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet.* 2009;41:77-81.
 237. Langenberg C, Pascoe L, Mari A, et al. Common genetic variation in the melatonin receptor 1B gene (MTNR1B) is associated with decreased early-phase insulin response. *Diabetologia.* 2009;52:1537-42.
 238. Dehwah MA, Wang M, Huang QY. CDKAL1 and type 2 diabetes: a global meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2010;9:1109-20.
 239. <http://browser.1000genomes.org/index.html> (05/2017).
 240. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature genetics.* 2006;38:320-3.
 241. Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nature genetics.* 2007;39:218-25.
 242. Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, et al. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *Journal of molecular medicine.* 2007;85:777-82.
 243. Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Liu H, Zhang B. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2009;10:15.
 244. Rosengren AH, Braun M, Mahdi T, et al. Reduced Insulin Exocytosis in Human Pancreatic beta-Cells With Gene Variants Linked to Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2012;61:1726-33.
 245. da Silva Xavier G, Loder MK, McDonald A, et al. TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells. *Diabetes.* 2009;58:894-905.
 246. Loos RJ, Franks PW, Francis RW, et al. TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and beta-cell function in a British European population. *Diabetes* 2007;56:1943-7.
 247. Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, et al. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia.* 2008;51:597-601.
 248. Stolerman ES, Manning AK, McAteer JB, et al. TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia* 2009;52:614-20.
 249. Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Zabena C, Perez-Barba M, Serrano-Rios M. Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. *Diabetologia.* 2008;51:1993-7.
 250. Stancakova A, Kuulasmaa T, Paananen J, et al. Association of 18 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes with indices of insulin release, proinsulin conversion, and insulin sensitivity in 5,327 nondiabetic Finnish men. *Diabetes.*

- 2009;58:2129-36.
251. Silbernagel G, Renner W, Grammer TB, et al. Association of TCF7L2 SNPs with age at onset of type 2 diabetes and proinsulin/insulin ratio but not with glucagon-like peptide 1. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27:499-505.
 252. Elbein SC, Chu WS, Das SK, et al. Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and type 2 diabetes, glucose homeostasis traits and gene expression in US participants of European and African descent. *Diabetologia*. 2007;50:1621-30.
 253. Roth CL, Hinney A, Reinehr T, et al. TCF7L2 polymorphism rs7903146 and predisposition for type 2 diabetes mellitus in obese children. *Horm Metab Res*. 2008;40:713-7.
 254. Norton L, Fourcaudot M, Abdul-Ghani MA, et al. Chromatin occupancy of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) and its role in hepatic glucose metabolism. *Diabetologia*. 2011;54:3132-42.
 255. Pilgaard K, Jensen CB, Schou JH, et al. The T allele of rs7903146 TCF7L2 is associated with impaired insulinotropic action of incretin hormones, reduced 24 h profiles of plasma insulin and glucagon, and increased hepatic glucose production in young healthy men. *Diabetologia*. 2009;52:1298-307.
 256. Wegner L, Hussain MS, Pilgaard K, et al. Impact of TCF7L2 rs7903146 on insulin secretion and action in young and elderly Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4013-9.
 257. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316:889-94.
 258. Peng S, Zhu Y, Xu F, Ren X, Li X, Lai M. FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. *BMC Med* 2011;9:71.
 259. Frayling TM, Ong K. Piecing together the FTO jigsaw. *Genome Biol* 2011;12:104.
 260. Cheung MK, Gulati P, O'Rahilly S, Yeo GS. FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(5):744-7.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το βρογχικό άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη ενδοκρινοπάθεια. Και οι δύο νόσοι εμφανίζουν ραγδαία ταχύτητα αύξησης στον παγκόσμιο πληθυσμό. Η κλινική τους εκδήλωση επηρεάζει την ποιότητα ζωής των ασθενών. Η φαρμακευτική αντιμετώπιση παρέχει επαρκή έλεγχο των συμπτωμάτων η οποία θα ήταν πιο αποτελεσματική με την ακριβή χαρτογράφηση των γονιδιακών πολυμορφισμών έκαστου ασθενούς.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η γενετική συσχέτιση πολυμορφισμών των γονιδίων *TNF-a* (rs1800629), *IL-6* (rs1800795), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *CDKAL1* (rs7756992), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *PPAR γ 2* (rs1801282), *FTO* (rs9939609), με το βρογχικό άσθμα και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και να εκτιμηθεί η υπόθεση εάν αυτοί οι πολυμορφισμοί σχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα κλινικής εκδήλωσης τους σε δείγμα ελληνικού πληθυσμού.

Υλικό–Μέθοδος: Το δείγμα αποτελείται από 107 ασθενείς από την Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική του Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Ξωτηρία και 1.391 μάρτυρες. Το γενομικό DNA που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από τα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας. Για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA μέσω ενζυμικής παραγωγής του DNA, χωρίς τη χρήση ζωντανών οργανισμών, χρησιμοποιήθηκε realtime PCR. Για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε, έγινε ανάλυση της κατανομής του (ετερόζυγοι, ομόζυγοι) σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων. Το αντίστοιχο στατιστικό τεστ σε αυτές τις περιπτώσεις είναι το χ^2 ως τεστ ομοιογένειας της κατανομής μεταξύ των δύο ομάδων. Σε περίπτωση που έχουμε $p < 0.05$, απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση της ομοιογένειας της κατανομής, που σημαίνει ότι το γονίδιο αυτό πιθανόν έχει σχέση με την νόσο. Πέραν αυτού, στις περιπτώσεις που θα αποδεχθούμε τη στατιστική σημαντικότητα, πρέπει η κατανομή των δύο αλληλόμορφων στον υγιή πληθυσμό να ακολουθεί την ισορροπία κατά Hardy-Weinberg.

Αποτελέσματα: Από το σύνολο των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν, προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση βρογχικού άσθματος και ΣΔτ2 για το συγκεκριμένο δείγμα πληθυσμού παρουσιάζουν οι κάτωθι πολυμορφισμοί: το αλληλόμορφο A για τον πολυμορφισμό *TNF-a* (rs1800629) σε όλους τους ασθενείς, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία, το αλληλόμορφο G σε ομόζυγη κατάσταση του πολυμορφισμού *IL-6* (rs1800795) στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *ORMDL3* (rs7216389), το αλληλόμορφο T έχει προστατευτική δράση σε ομόζυγη κατάσταση στην περίπτωση των ασθματικών ασθενών με ΣΔτ2 και στην περίπτωση των ασθματικών ασθενών με ΣΔτ2 και παχυσαρκία. Το A αλληλόμορφο

του *SPINK5* (rs2303067) αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του άσθματος στις περιπτώσεις των ασθματικών ασθενών χωρίς ΣΔτ2 και χωρίς παχυσαρκία και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και ΣΔτ2. Για τον πολυμορφισμό *MTNR1B* (rs10830963) παρατηρήθηκε προστατευτική επίδραση του G αλληλόμορφου στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία ενώ στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία φάνηκε το αντίθετο. Για τον πολυμορφισμό *CDKAL1* (rs7756992), η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το αλληλόμορφο A σε ομόζυγη κατάσταση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 με υψηλή στατιστική σημαντικότητα στο σύνολο των ασθενών και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *TCF7L2* (rs7903146) στην παρούσα μελέτη το T αλληλόμορφο εμφάνισε υψηλή στατιστική σημαντικότητα για την εμφάνιση ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία ενώ στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 παρουσίασε στατιστικά οριακή σημαντικότητα. Για τον πολυμορφισμό *SLC30A8* (rs13266634), στην παρούσα μελέτη η ομόζυγη κατάσταση CC παρουσιάζει σχέση με την εμφάνιση ΣΔτ2 με υψηλή στατιστική σημαντικότητα στο σύνολο των ασθενών και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και στατιστικά οριακή σημαντικότητα στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *PPAR γ 2* (rs1801282), στην παρούσα μελέτη το C αλληλόμορφο σε ομόζυγη κατάσταση είχε προστατευτική επίδραση στο σύνολο των ασθματικών ασθενών, στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς ΣΔτ2, χωρίς παχυσαρκία, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *FTO* rs9939609, στην παρούσα μελέτη στους ασθματικούς ασθενείς χωρίς παχυσαρκία, χωρίς ΣΔτ2 το αλληλόμορφο T σε ομόζυγη κατάσταση παρουσιάζει προστατευτική δράση με στατιστική σημαντικότητα.

Συζήτηση: Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε άμεση σχέση της ύπαρξης του πολυμορφισμού *IL-6* (rs1800795) σε ομόζυγη κατάσταση GG και αύξησης του κινδύνου εμφάνισης του άσθματος στις περιπτώσεις των ασθματικών ασθενών ΣΔτ2 και των ασθματικών ασθενών με παχυσαρκία και ΣΔτ2. Για τον πολυμορφισμό *CDKAL1* (rs7756992), το αλληλόμορφο A σε ομόζυγη κατάσταση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *TCF7L2* (rs7903146) το T αλληλόμορφο σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΔτ2 στους ασθενείς στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2, στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία και στους ασθματικούς ασθενείς με ΣΔτ2 και παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *SLC30A8* (rs13266634), στην παρούσα μελέτη η ομόζυγη κατάσταση CC παρουσιάζει σχέση με την εμφάνιση ΣΔτ2 στο σύνολο των ασθενών και στους ασθματικούς ασθενείς με παχυσαρκία. Για τον πολυμορφισμό *FTO* (rs9939609) τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T σε ομόζυγη κατάσταση έχουν στατιστικά σημαντική μειωμένη τάση να εμφανίσουν ΣΔτ2.

Παρατηρήθηκε απουσία συσχέτισης για τους πολυμορφισμούς *TNF- α* (rs1800629) *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *PPAR γ 2* (rs1801282) για το άσθμα και το ΣΔτ2.

7.2. ABSTRACT

Introduction: Bronchial asthma is a complex chronic inflammatory airways disease and type 2 diabetes mellitus is the most common endocrinopathy. Both diseases have a rapid growth rate in the world population. Their clinical manifestation affects patients' quality of life. Treatment provides adequate symptom control which would be more effective with accurate mapping of each patient's genomic polymorphisms.

Aim: This study was conducted to gain an insight of the possible association of bronchial asthma and type 2 diabetes mellitus with eleven polymorphisms namely *TNF- α* (rs1800629), *IL-6* (rs1800795), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *CDKAL1* (rs7756992), *TCF7L2* (rs7903146), *SLC30A8* (rs13266634), *PPAR γ 2* (rs1801282), *FTO* (rs9939609) and to evaluate the hypothesis if these polymorphisms are related to the increased probability of their clinical manifestation in the Greek population.

Materials-Method: All patients were recruited from Sotiria Athens General Hospital and so were the controls. SNPs were genotyped using PCR realtime analysis. Chi-square test was used to access differences among cases and controls. The genomic DNA used was isolated from the epithelial cells of the oral cavity. For each gene studied, its distribution (wildtype, heterozygous, homozygous) was analyzed in relation to the control group. If we have $p < 0.05$, we reject the null hypothesis of homogeneity of distribution, which means that this gene is probably related to the disease. Besides, in cases where we accept statistical significance, the allocation of the two alleles in the healthy population should follow the Hardy-Weinberg equilibrium.

Results: A total of 107 patients diagnosed with bronchial asthma and co-existence of type 2 diabetes mellitus and 1.391 controls participated in the study. The predisposing factor for asthma and type 2 diabetes mellitus for this population sample are the allele A for *TNF- α* polymorphism (rs1800629) in all patients, in asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus, in asthmatic obese patients and in asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and obesity and the G allele in the homozygous state of *IL-6* polymorphism (rs1800795) in asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and asthmatic obese patients with type 2 diabetes mellitus.

For the *ORMDL3* polymorphism (rs7216389), the T allele has a protective effect in the homozygous state in the case of asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and in the case of asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. A *SPINK5* A allele (rs2303067) increases the risk of asthma in cases of asthmatic patients without type 2 diabetes mellitus and without obesity and in asthmatic patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. For the polymorphism *MTNR1B* (rs10830963), a protective effect of G allele was observed in asthmatic patients without obesity, with no type 2 diabetes mellitus, in asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and in asthmatics with type 2 diabetes mellitus and obesity, while in asthmatic patients with obesity the opposite appeared.

For CDKAL1 polymorphism (rs7756992), the study showed that the homozygous T allele A increases the risk of developing type 2 diabetes mellitus with high statistical significance in all patients and asthmatic obese patients. In the study, the T allele of polymorphism TCF7L2 (rs7903146) showed high statistical significance for the incidence of type 2 diabetes mellitus in all patients, asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus, asthmatic obese patients and asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. In asthmatic patients without obesity and without type 2 diabetes mellitus showed marginal statistically significance. For the SLC30A8 polymorphism (rs13266634), in the study the homozygous CC status is related to the occurrence of type 2 diabetes mellitus with high statistical significance in all patients and in obese asthmatic patients but in and asthmatic obese patients with type 2 diabetes mellitus showed marginal statistically significance. For PPAR γ 2 polymorphism (rs1801282), the homozygous C allele had a protective effect on all asthmatic patients, in asthmatic patients without obesity, without obesity and in obese subjects with asthma. For FTO rs9939609 polymorphism, in asthmatic patients without obesity, without type 2 diabetes mellitus the T allele in the homozygous state presents a protective effect with statistical significance.

Discussion: The study revealed that statistical significance was noted for *IL-6* polymorphism (rs1800795) in cases of asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus and in asthmatics with type 2 diabetes mellitus and obesity, for *SLC30A8* (rs13266634) polymorphism, CC homozygotes are related to the occurrence of type 2 diabetes mellitus in all the patients and in obese asthmatic patients while asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus showed marginal significance. For the polymorphism *TCF7L2* (rs7903146), the T allele displayed high statistical significance for the occurrence of type 2 diabetes mellitus in all patients, asthmatic patients with type 2 diabetes mellitus, in asthmatic obese patients and in asthmatics with type 2 diabetes mellitus and obesity, while in asthmatic patients without obesity nor type 2 diabetes mellitus showed statistically significance. For the *CDKAL1* (rs7756992) polymorphism, homozygous AA presented a risk of developing type 2 diabetes mellitus with high statistical significance in all patients and asthmatic patients with obesity, while in the *FTO* (rs9939609) polymorphism the homozygous T allele exhibits protective effect in asthmatic patients without obesity, without type 2 diabetes mellitus.

We failed to replicate the relationship of polymorphisms *TNF- α* (rs1800629), *SPINK5* (rs2303067), *ORMDL3* (rs7216389), *MTNR1B* (rs10830963), *PPAR γ 2* (rs1801282),) with bronchial asthma and type 2 diabetes observed in other studies. The above polymorphisms through different mechanisms of action are associated with a condition of inflammation which must lead to individualized treatment to cope with the occurrence and course of coexisting diseases.

7.3. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ-ΠΙΝΑΚΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ

α/α	ΕΙΚΟΝΕΣ	ΣΕΛΙΔΑ
Εικόνα 1	Η παθοφυσιολογία του βρογχικού άσθματος	15
Εικόνα 2	Οι κύριες κατηγορίες γονιδιακών μεταλλάξεων	71
Εικόνα 3	Θέση γονιδίου TNF-a στο χρωμόσωμα 6	74
Εικόνα 4	Στερεοχημική απεικόνιση δομής πρωτεΐνης TNF-a	78
Εικόνα 5	Σχηματικό διάγραμμα δράσης TNF-a εντός του αεραγωγού	79
Εικόνα 6	Ο ρόλος του TNF-a στην παθογένεση του άσθματος	80
Εικόνα 7	Θέση γονιδίου IL-6 στο χρωμόσωμα 7	85
Εικόνα 8	IL-6R trans-Signaling και η αναστολή της από τη διαλυτή μορφή του υποδοχέα gp130 (sgp130)	87
Εικόνα 9	Βιολογικές δράσεις IL-6	89
Εικόνα 10	Τριτοταγής δομή της IL-6	91
Εικόνα 11	Πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η IL-6 μπορεί να συμβάλει στις ασθένειες των πνευμόνων	94
Εικόνα 12	Θέση γονιδίου SPINK5 στο χρωμόσωμα 5	99
Εικόνα 13	Τριτοταγής δομή λεκτίνης	100
Εικόνα 14	Θέση γονιδίου ORMDL3 στο χρωμόσωμα 17	102
Εικόνα 15	Κιρκάδιος ρυθμός	105
Εικόνα 16	Ρύθμιση της παραγωγής μελατονίνης και λειτουργία υποδοχέων	107
Εικόνα 17	Θέση του MTNR1B στο χρωμόσωμα 11	109
Εικόνα 18	Τοπολογία μεμβράνης υποδοχέα μελατονίνης hMT1	110
Εικόνα 19	Θέση των πολυμορφισμών που σχετίζονται με ΣΔτ2 στο γονίδιο CDKAL1	114
Εικόνα 20	Θέση του CDKAL1 στο χρωμόσωμα 6	114
Εικόνα 21	Σχηματικό μοντέλο ρύθμισης λειτουργίας β-κυττάρων από CDKAL1	116
Εικόνα 22	Θέση του TCF7L2 στο χρωμόσωμα 10	117
Εικόνα 23	Δομή του γονιδίου TCF7L2	118
Εικόνα 24	Θέση του SLC30A8 στο χρωμόσωμα 8	121
Εικόνα 25	Θέση του TCF7L2 στο χρωμόσωμα 3	126
Εικόνα 26	Μηχανισμοί μεταγραφής του γονιδίου PPAR	129
Εικόνα 27	Διμερισμός PPAR και RXR	130
Εικόνα 28	Γενωμική οργάνωση του FTO και των γειτονικών γονιδίων	134
Εικόνα 29	Θέση του FTO στο χρωμόσωμα 16	134
Εικόνα 30	Θέση των πολυμορφισμών FTO σε σχέση με τα γονίδια	135
Εικόνα 31	Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	146
Εικόνα 32	Σχηματική αναπαράσταση της PCR	148
Εικόνα 33	RealTime PCR LC480 HRM (High Resolution Melting)	149

	conditions)	
Εικόνα 34	Η κινητική της real-time PCR	150
Εικόνα 35	Απεικόνιση των σταδίων παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης	151
Εικόνα 36	Ηλεκτροφορητική συσκευή (Pharmacia LKBGNA 100)	152
Εικόνα 37	Απεικόνιση της «φόρτωσης» δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης	152
Εικόνα 38	Παρατήρηση των ζωνών του DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV)	153
Εικόνα 39	Σύγκριση της αναλογίας των αλληλόμορφων κινδύνου και μη-κινδύνου του CDKAL1 μεταξύ ασιατικών και ευρωπαϊκών πληθυσμών	186
Εικόνα 40	Συχνότητα αλληλόμορφων του rs7756992	186
Εικόνα 41	Θέση δύο snps στο γονίδιο του TCF7L2	188
Εικόνα 42	Συχνότητα αλληλόμορφων rs13266634	191
ΠΙΝΑΚΕΣ		
Πίνακας 1	Διεγέρτες αδρενεργικών υποδοχέων	28
Πίνακας 2	Μακράς δράσης εκλεκτικοί β2 αδρενεργικοί διεγέρτες	31
Πίνακας 3	Μη εκλεκτικοί αδρενεργικοί διεγέρτες	32
Πίνακας 4	Μεθυλοξανθίνες στην αντιμετώπιση του άσθματος	34
Πίνακας 5	Αντιχολινεργικά φάρμακα στην αντιμετώπιση του άσθματος	35
Πίνακας 6	Κορτικοστεροειδή στην αντιμετώπιση του άσθματος	38
Πίνακας 7	Φάρμακα για την προφύλαξη κατά του άσθματος	40
Πίνακας 8	Ταξινόμηση σακχαρώδους διαβήτη	50
Πίνακας 9	Διάγνωση της παχυσαρκίας βάση ΔΜΣ (Kg/m ²)	53
Πίνακας 10	Σουλφονουλορίες πρώτης γενιάς	61
Πίνακας 11	Σουλφονουλορίες δεύτερης γενιάς	62
Πίνακας 12	Διγουανίδες	64
Πίνακας 13	Άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα	65
Πίνακας 14	Περιγραφικά στοιχεία εθελοντών	141
Πίνακας 15	Αναλογίες Reaction Mix για την διαδικασία PCR	154
Πίνακας 16	Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του TNF-a (rs1800629)	154
Πίνακας 17	Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του ORMDL3 (rs7216389)	155
Πίνακας 18	Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον υποκινητή του MTNR1B (rs10830963)	155
Πίνακας 19	Συνθήκες PCR αντίδρασης για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς	155
Πίνακας 20	Ανάλυση πολυμορφισμού rs1800629	160
Πίνακας 21	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800629 για μάρτυρες	161
Πίνακας 22	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800629 για	161

	ασθενείς	
Πίνακας 23	Ανάλυση πολυμορφισμού rs1800795	162
Πίνακας 24	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800795 για μάρτυρες	163
Πίνακας 25	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1800795 για ασθενείς	163
Πίνακας 26	Ανάλυση πολυμορφισμού rs2303067	164
Πίνακας 27	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs2303067 για μάρτυρες	165
Πίνακας 28	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs2303067 για ασθενείς	165
Πίνακας 29	Ανάλυση πολυμορφισμού rs7216389	166
Πίνακας 30	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7216389 για μάρτυρες	167
Πίνακας 31	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7216389 για ασθενείς	167
Πίνακας 32	Ανάλυση πολυμορφισμού rs10830963	168
Πίνακας 33	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs10830963 για μάρτυρες	169
Πίνακας 34	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs10830963 για ασθενείς	169
Πίνακας 35	Ανάλυση πολυμορφισμού rs7756992	170
Πίνακας 36	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7756992 για μάρτυρες	171
Πίνακας 37	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7756992 για ασθενείς	171
Πίνακας 38	Ανάλυση πολυμορφισμού rs7903146	172
Πίνακας 39	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7903146 για μάρτυρες	173
Πίνακας 40	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs7903146 για ασθενείς	173
Πίνακας 41	Ανάλυση πολυμορφισμού rs13266634	174
Πίνακας 42	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs13266634 για μάρτυρες	175
Πίνακας 43	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs13266634 για ασθενείς	175
Πίνακας 44	Ανάλυση πολυμορφισμού rs1801282	176
Πίνακας 45	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1801282 για μάρτυρες	177
Πίνακας 46	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs1801282 για ασθενείς	177
Πίνακας 47	Ανάλυση πολυμορφισμού rs9939609	178
Πίνακας 48	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs9939609 για μάρτυρες	179

	μάρτυρες	
Πίνακας 49	Ανάλυση ισορροπίας Hardy-Weinberg rs9939609 για ασθενείς	179
Πίνακας 50	Πληθυσμοί και στατιστικές κατανομές TCF7L2	189
ΣΧΗΜΑΤΑ		
Σχήμα 1	Σχηματική απεικόνιση συγκρίσεων υποομάδων	158