

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή

Διατμηματικό Μ.Δ.Ε. “Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ ΙΙ

“Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD)”

Κότσα Εμμανουέλλα Α.Μ.: 41906



Επιβλέποντες : Δρ. Παναγιώτης Γεωργιάδης, Δρ. Βασιλική Πλέτσα

Τριμελής Επιτροπή :

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αν. Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Βασιλική Πλέτσα, Κύρια Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, ΕΙΕ

Αθήνα 2022

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ ΙΙ

“Ο ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD)”

Λέξεις - κλειδιά: NAFLD, CDKN1a, CDKN2a, Rb, επιγενετική, μεθυλίωση, παχυσαρκία

Key Words: NAFLD, CDKN1a, CDKN2a, Rb, epigenetics, methylation, obesity.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease, Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος

NASH: Nonalcoholic steatohepatitis, Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα

CpG: Cytosine-phospho-guanine

5-mC: 5-methylcytosine

5-hmC: 5-hydroxymethylcytosine

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης

ΣΔΤ1: Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

ΣΔΤ2: Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

cf DN : cell free DNA

CDKN1a: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1a

CDKN2a: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2a

Rb: retinoblastoma

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
<u>1.Μεταβολισμός και ασθένειες</u>	7
1.1 Μεταβολικό σύνδρομο.....	8
1.2 Παχυσαρκία	9
1.3 Σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ).....	12
1.4 Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD).....	15
<u>2 Κυτταρική γήρανση και ασθένειες</u>	21
<u>3 Επιγενετική</u>	25
<u>4 Υγρή βιοψία ως μέθοδος διάγνωσης της NAFLD</u>	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	56
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Γεωργιάδη, Κύριο Ερευνητή ΙΧΒ-ΕΙΕ καθώς και την Δρ. Βασιλική Πλέτσα για την υποστήριξη και την βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας που εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας (Πρόγραμμα Περιβάλλον & Υγεία) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Ένα ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Μαρία Σοφία Βιδάλη και τον κ. Αντώνιο Χατζηγεωργίου, Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την πολύτιμη βοήθειά τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη και την Δρ. Παναγιώτα Παπαζαφείρη για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), είναι η νόσος που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ και αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως. Περιλαμβάνει εύρος παθολογικών καταστάσεων από το απλό λιπώδες ήπαρ ως την στεατοηπατίτιδα, την ίνωση και την κίρρωση. Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος αποτελεί μέρος του μεταβολικού συνδρόμου και περιλαμβάνει παχυσαρκία, διαταραχές χοληστερίνης και τριγλυκεριδίων, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔΤ2) και αυξημένη αρτηριακή πίεση. Στη συγκεκριμένη εργασία έχουν συμπεριληφθεί 50 ασθενείς με διαγνωσμένη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος σε διαφορετικά στάδια της νόσου. Από τους ασθενείς αυτούς είχε ληφθεί ορός αίματος από τον οποίον απομονώθηκε DNA (cell-free DNA, n = 50). Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί, με τη μέθοδο Pyrosequencing, η μεθυλίωση γονιδίων σχετιζόμενων με την κυτταρική γήρανση (senescence) και συγκεκριμένα των *CDKN1a (p21)*, *CDKN2a (p16)* και *Rb* και να διερευνηθεί αν αυτή διαφέρει μεταξύ των σταδίων της νόσου. Βρέθηκε ότι σε όλα τα δείγματα, τα γονίδια εμφανίζονται υπομεθυλωμένα και ότι υπάρχει μια διαφοροποίηση της μεθυλίωσης ανάμεσα στα διαφορετικά στάδια της νόσου NALFD. Όμως απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω ευρημάτων.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the disease characterized by the accumulation of fat in the liver and is one of the most common causes of chronic liver disease worldwide. It includes a range of pathological conditions from simple fatty liver to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. Non-alcoholic fatty liver disease is part of the metabolic syndrome and includes obesity, cholesterol and triglyceride disorders, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and elevated blood pressure. In this work, 50 patients with diagnosed non-alcoholic fatty liver disease at different stages of the disease have been included. Blood serum was obtained from these patients from which DNA was isolated (cell-free DNA, n = 50). These samples were used to study, with the Pyrosequencing method, the methylation of genes related to cellular aging (senescence), namely *CDKN1a (p21)*, *CDKN2a (p16)* and *Rb*, and to investigate whether this differs between the stages of the disease. It was found that in all samples, the genes appear hypomethylated and that there is a differentiation of methylation between the different stages of NALFD disease. However, further investigation of the above findings is required.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

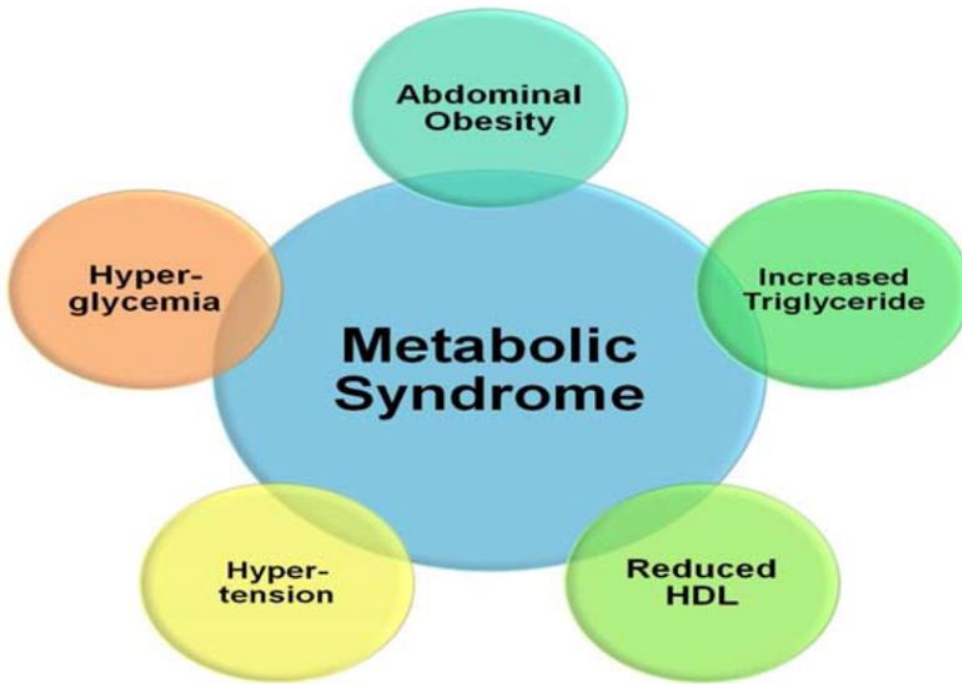
1. Μεταβολισμός και ασθένειες

Ο μεταβολισμός προέρχεται από την ελληνική λέξη *μεταβολή*, που σημαίνει «αλλαγή» και περιλαμβάνει το σύνολο όλων των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο και είναι απαραίτητες για τη ζωή. Η διαδικασία του μεταβολισμού περιλαμβάνει πολλές διασυνδεδεμένες κυτταρικές οδούς για να παράσχει τελικά στα κύτταρα την ενέργεια που απαιτείται για να εκτελέσουν τη λειτουργία τους. Οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα περιλαμβάνουν τόσο τη σύνθεση όσο και την αποικοδόμηση πολύπλοκων μακρομορίων και μπορούν να χωριστούν είτε σε καταβολισμό είτε σε αναβολισμό (Judge et al. 2020). Ο καταβολισμός είναι η αποδόμηση πολύπλοκων μακρομορίων σε απλούστερα μόρια όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό και η αμμωνία. Ο αναβολισμός είναι οι βιοσυνθετικές οδοί που δημιουργούν πολύπλοκα μακρομόρια όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπίδια.

Οι διαταραχές στο φυσιολογικό μεταβολισμό των κυττάρων συνδέονται με την εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων. Τέτοιες ασθένειες επηρεάζουν την ικανότητα του κυττάρου να επιτελεί ζωτικής σημασίας βιοχημικές αντιδράσεις που αφορούν στο μεταβολισμό των αμινοξέων, των λιπαρών οξέων και των υδατανθράκων κατά τη πρόσληψη, παραγωγή, διατήρηση ή διάσπαση των θρεπτικών συστατικών. Οι κακές διατροφικές συνήθειες και ο καθιστικός τρόπος ζωής που αλληλοεπιδρούν με γενετικούς παράγοντες οδηγούν σε μεταβολικές επιπλοκές, που με τη σειρά τους οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών όπως το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος. Τα μεταβολικά προβλήματα που απορρέουν από αυτές τις ασθένειες είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για πολλές άλλες ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, νεφρικές παθήσεις, βλάβες στον εγκέφαλο (Yates et al. 2012) και διάφορες μορφές καρκίνου (Avgerinos et al. 2019).

1.1 Μεταβολικό σύνδρομο

Με τον όρο μεταβολικό σύνδρομο (σύνδρομο X) χαρακτηρίζεται μια ομάδα κλινικών ευρημάτων (McCracken et al. 2018) που περιλαμβάνουν αυξημένο σπλαχνικό λίπος, αυξημένο σωματικό βάρος, υψηλή γλυκόζη, ινσουλινοαντίσταση, υψηλά τριγλυκερίδια και χαμηλά επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (High-density lipoprotein, HDL) (αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία), ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, διαταραχές στον ενδοθηλιακό φαινότυπο και υπέρταση. Τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου παρουσιάζονται στην Εικόνα 1. Είναι μια προθρομβωτική και προφλεγμονώδης κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αυξημένη φλεγμονώδη δραστηριότητα των κυτταροκινών, παράγοντες που αναμφίβολα συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων παθήσεων, όπως ο διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2) και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Το σύνδρομο έχει μια πολύπλοκη και πολύπλευρη προέλευση που δεν είναι πλήρως κατανοητή. Φαίνεται να προέρχεται κυρίως από ανισορροπία πρόσληψης θερμίδων και ενεργειακής δαπάνης, αλλά επηρεάζεται επίσης από τα γενετικά / επιγενετικά χαρακτηριστικά του ατόμου, την κυριαρχία της καθιστικής ζωής έναντι της σωματικής δραστηριότητας και άλλους παράγοντες όπως η ποιότητα και η σύνθεση της τροφής και η σύσταση των μικροβίων του εντέρου (Saklayen et al. 2018). Η αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να συνδέεται με σχεδόν όλες τις καταστάσεις μεταβολικού συνδρόμου και επομένως και του ΣΔΤ2 (Ndisang et al. 2017) και της NAFLD (Tanase et al. 2020).



Εικόνα 1: Κύρια συστατικά του μεταβολικού συνδρόμου. Η ύπαρξη τουλάχιστον τριών καθορίζει την παρουσία μεταβολικού συνδρόμου (Πηγή: *Cobbina et al. 2017*).

1.2 Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται ως μια πολύπλοκη ασθένεια. Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία ορίζονται ως η μη φυσιολογική ή υπερβολική συσσώρευση λίπους που μπορεί να βλάψει την υγεία. Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) 30 kg/m^2 ή μεγαλύτερος χρησιμοποιείται για την αναγνώριση ατόμων με παχυσαρκία. Τις τελευταίες 3 δεκαετίες, ο παγκόσμιος επιπολασμός της παχυσαρκίας έχει αυξηθεί κατά 27,5% για τους ενήλικες και 47,1% για τα παιδιά (Aronian et al. 2016). Η παχυσαρκία είναι το αποτέλεσμα πολύπλοκων σχέσεων μεταξύ γενετικών, κοινωνικοοικονομικών και πολιτισμικών επιρροών. Τα πρότυπα κατανάλωσης, η αστική ανάπτυξη και οι συνήθειες του τρόπου ζωής επηρεάζουν τον επιπολασμό της παχυσαρκίας. Η κατάσταση μπορεί να είναι αποτέλεσμα ασθένειας ή φαρμακολογικής θεραπείας. Μπορεί επίσης να είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη συννοσηρών καταστάσεων. Η παχυσαρκία σχετίζεται με αύξηση της θνησιμότητας και μείωση της διάρκειας ζωής έως και κατά 20 έτη. Θεωρείται ως κατάσταση χρόνιας φλεγμονής χαμηλής έντασης. Η παθογένεια της παχυσαρκίας είναι πολύπλοκη. Πληθώρα παραγόντων όπως

περιβαλλοντικοί, κοινωνικοπολιτιστικοί, φυσιολογικοί, ιατρικοί, συμπεριφορικοί, γενετικοί, επιγενετικοί, περιβαλλοντικοί μπορεί να ευθύνονται (Aronian et al. 2016). Η παχυσαρκία έχει συνδεθεί με μικροοργανισμούς, επιγενετικούς παράγοντες, αύξηση της ηλικίας της μητέρας, έλλειψη ύπνου, ενδοκρινικές διαταραχές, φαρμακευτική ιατρογένεση και ενδομήτριες και διαγενεακές επιδράσεις (Catalán et al. 2022). Σε προληπτικούς ελέγχους υγείας και επιδημιολογικές έρευνες γίνεται χρήση του ΔΜΣ. Είναι ένας απλός δείκτης που ορίζεται ως το βάρος ενός ατόμου σε κιλά διαιρούμενο με το τετράγωνο του ύψους του σε μέτρα (kg/m^2). Είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος για τον ορισμό του υπερβολικού βάρους ($\Delta\text{ΜΣ } 25\text{-}29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$) και της παχυσαρκίας ($\Delta\text{ΜΣ } \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$), ενώ δεν αποτελεί πραγματικό μέτρο του συσσωρευμένου λίπους. Στους ενήλικες, το υπερβολικό βάρος ορίζεται ως ΔΜΣ από $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ έως $29 \text{ kg}/\text{m}^2$ και η παχυσαρκία ως ΔΜΣ μεγαλύτερος από $30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Εάν συνεχιστούν οι τρέχουσες τάσεις, υπολογίζεται ότι μέχρι το έτος 2030, το 38% του ενήλικου πληθυσμού του πλανήτη θα είναι υπέρβαρο και ένα άλλο 20% παχύσαρκο (Smith et al. 2015).

Η παχυσαρκία είναι ιατρικό πρόβλημα και χαρακτηρίζεται παγκοσμίως ως πανδημία που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης άλλων ασθενειών και ευθύνεται για πολλά προβλήματα υγείας, όπως ο ΣΔΤ2, η NAFLD, καρδιαγγειακές παθήσεις και ορισμένους τύπους καρκίνου. Η παχυσαρκία επηρεάζει την ποιότητα της ζωής καθώς πέρα από τις σωματικές ασθένειες μπορεί να οδηγήσει σε ψυχολογικά προβλήματα, όπως κατάθλιψη και χαμηλή αυτοεκτίμηση.

Οι μηχανισμοί που συνδέουν την παχυσαρκία με διάφορες ασθένειες παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Πρόσφατα έχει αναγνωριστεί ότι στην παχυσαρκία παρατηρείται φλεγμονή με αυξημένη συσσώρευση και φλεγμονώδη απόκριση των ανοσοκυττάρων σε ιστούς όπως ο λιπώδης ιστός, ο σκελετικός μυς, το ήπαρ, το έντερο, οι παγκρεατικές νησίδες και ο εγκέφαλος (Kawai et al. 2021). Η φλεγμονώδης απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να συμβάλει σε μεταβολικές δυσλειτουργίες που με τη σειρά τους ευθύνονται για την εκδήλωση άλλων ασθενειών. Η στρατολόγηση, οι αλληλεπιδράσεις και η ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων που απελευθερώνουν

φλεγμονώδη μόρια μπορεί να αποτελούν το κύριο συστατικό της φλεγμονής σε διάφορους ιστούς (Kawai et al. 2021). Για παράδειγμα ο λιπώδης ιστός σε φυσιολογικές συνθήκες, είναι εμπλουτισμένος με ανοσοκύτταρα τύπου 2, που περιλαμβάνουν μακροφάγα τύπου M2, έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα τύπου 2 (ILC2), ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg), T βοηθητικά κύτταρα τύπου 2 (Th2), ηωσινόφιλα και άλλα, τα οποία αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και παράγουν κυτταροκίνες τύπου 2 όπως ιντερλευκίνη (IL) 4, IL-5 και IL-13. Αυτές αλληλοεπιδρούν με μόρια της κυτταρικής επιφάνειας και ρυθμίζουν την ύπαρξη του ανοσιακού περιβάλλοντος τύπου 2 (Van Herck et al. 2019). Στη παχυσαρκία, επικρατούν συνθήκες που προάγουν τη φλεγμονή τύπου 1 στον λιπώδη ιστό και οδηγεί σε αυξημένη φλεγμονή στα λιποκύτταρα. Συγκεκριμένα στο λιπώδη ιστό επικρατούν συνθήκες υποξίας καθώς η ταχεία επέκταση του λιπώδους ιστού οδηγεί σε υπερτροφία των λιποκυττάρων με αποτέλεσμα την ανεπαρκή αγγειοποίηση και αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από τα λιποκύτταρα. Επίσης η σίτιση με κορεσμένα λιπαρά οξέα σχετίζεται με μεταβολές στο μικροβίωμα του εντέρου και με αυξημένη εντερική διαπερατότητα, που μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα λιποπολυσακχαρίτη στο πλάσμα οδηγώντας στη λεγόμενη μεταβολική ενδοτοξαιμία (Van Herck et al. 2019). Ο συνδυασμός των παραπάνω οδηγεί σε ενεργοποίηση των μακροφάγων, T κυττάρων, B κυττάρων, ουδετερόφιλων και άλλων, τα οποία παράγουν μεγάλο αριθμό φλεγμονωδών μορίων τύπου 1 και επίσης αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους για να προκαλέσουν φλεγμονώδες περιβάλλον τύπου 1 στο λιπώδη ιστό. Η φλεγμονή έχει επίσης αρνητικές επιπτώσεις στον μεταβολισμό των προλιποκυττάρων /λιποκυττάρων και το γεγονός αυτό επιταχύνει τη διαρροή λίπους από το λιπώδη ιστό στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ, με αποτέλεσμα την έκτοπη εναπόθεση λίπους και την επαγωγή φλεγμονής και σε αυτούς τους ιστούς (Van Herck et al. 2019).

Πέρα από τη φλεγμονή σε διάφορους ιστούς, στη παχυσαρκία παρατηρείται και ένα άλλο φαινόμενο που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε φυσιολογικές συνθήκες η ινσουλίνη παράγεται και εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος ως αποτέλεσμα της αύξησης των μορίων γλυκόζης στο αίμα (Posner et al. 2017). Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα,

τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου. Στην περίπτωση της ινσουλινοαντίστασης ενώ τα κύτταρα του παγκρέατος παράγουν την απαιτούμενη ινσουλίνη ως απάντηση στην αύξηση της γλυκόζης του αίματος, τα κύτταρα του σώματος (κύτταρα-στόχοι) αδυνατούν να την αξιοποιήσουν. Η περίσσεια γλυκόζης που δημιουργείται και χαρακτηρίζεται ως υπεργλυκαιμία προκαλεί παθολογικές και λειτουργικές αλλαγές στους ιστούς - στόχους της ινσουλίνης. Από την άλλη, και τα κύτταρα του παγκρέατος λόγω της συνεχόμενης αύξησης της γλυκόζης στη κυκλοφορία του αίματος, παράγουν συνεχώς όλο και περισσότερη ινσουλίνη γεγονός που οδηγεί σε χρόνια υπερλειτουργία των κυττάρων αυτών (Ahmed et al. 2021).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη εμφανίζεται ως μέρος ενός συνόλου καρδιαγγειακών-μεταβολικών δυσλειτουργιών που συνήθως αναφέρονται ως "σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη" ή "μεταβολικό σύνδρομο". Αυτή η ομάδα δυσλειτουργιών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ασθενειών όπως ΣΔΤ2, επιταχυνόμενη αθηροσκλήρυνση, NAFLD, υπέρταση ή σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου.

1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ)

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης, είναι ένα σύνολο μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από υψηλό επίπεδο σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ΣΔ που έχουν διαφορετική αιτιολογία, αλλά οδηγούν σε παρόμοια αποτελέσματα: σε απώλεια λειτουργίας των νησίδων των β-κυττάρων που είναι αποκλειστικά υπεύθυνα για την έκκριση της ορμόνης ινσουλίνης και την διατήρηση της ισορροπίας της γλυκόζης στο αίμα.

Στις νησίδες του Langerhans, που είναι συστάδες κυττάρων του παγκρέατος, υπάρχουν δύο κύριες υποκατηγορίες ενδοκρινών κυττάρων: τα β-κύτταρα που παράγουν ινσουλίνη και α-κύτταρα που παράγουν γλυκαγόνη. Τα β- και α-κύτταρα αλλάζουν διαρκώς τα επίπεδα έκκρισης των ορμονών τους επηρεαζόμενα από τα ποσοστά γλυκόζης στο αίμα. Η ισορροπία μεταξύ ινσουλίνης και γλυκαγόνης διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Στην περίπτωση του ΣΔ, η ινσουλίνη είτε απουσιάζει είτε παράγεται σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες είτε έχει εξασθενημένη δράση λόγω του ότι τα κύτταρα του σώματος δεν ανταποκρίνονται σωστά στην παραγόμενη ινσουλίνη γεγονός, που χαρακτηρίζεται ως αντίσταση στη ινσουλίνη. Συχνά όταν κάποιος διαγνωστεί ότι πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη, δεν μπορεί με ακρίβεια να προσδιοριστεί ότι ανήκει σε ένα μόνο συγκεκριμένο τύπο.

Ο **Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2)** είναι ο πιο συχνός διαβήτης καθώς οι πάσχοντες αποτελούν το 90-95% του πληθυσμού των διαβητικών. Ξεκινά με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε αυτή την περίπτωση ενώ τα κύτταρα του παγκρέατος παράγουν την απαιτούμενη ινσουλίνη ως απάντηση στην αύξηση της γλυκόζης του αίματος, τα κύτταρα του σώματος (κύτταρα-στόχοι) αδυνατούν να την αξιοποιήσουν και έτσι δημιουργείται λειτουργικό έλλειμμα ινσουλίνης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε χρόνια υπερλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η αδυναμία των β-κυττάρων να ανταπεξέλθουν σε αυτές τις καταστάσεις οφείλεται πρώτον στην απώλεια της ταυτότητας των κυττάρων, συγκεκριμένα των πρωτεϊνών τους που σχετίζονται με την λειτουργία τους (π.χ. ινσουλίνη και μεταγραφικούς παράγοντες) και την αποδιαφοροποίησή τους, που ορίζεται ως επιστροφή των β-κυττάρων σε κατάσταση προγονικών ή βλαστικών κυττάρων (De Jesus et al. 2019).

Η υπεργλυκαιμία που παρατηρείται σε αυτή την κατάσταση προκαλεί παθολογικές και λειτουργικές αλλαγές στα ιστούς - στόχους της ινσουλίνης, χωρίς να παρατηρούνται αρχικά κλινικά συμπτώματα, με αποτέλεσμα συνήθως να μεσολαβεί ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, που χαρακτηρίζεται ως ασυμπτωματική περίοδος, μέχρι να διαγνωστεί η νόσος. Αυτή η μορφή αναφερόταν στο παρελθόν

ως «μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης» ή «διαβήτης ενηλίκων». Η πιο συνηθισμένη αιτία είναι ο συνδυασμός του υπερβολικού σωματικού βάρους και της ανεπαρκούς άσκησης. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτή τη μορφή διαβήτη είναι παχύσαρκοι και η ίδια η παχυσαρκία προκαλεί κάποιο βαθμό αντίστασης στην ινσουλίνη. Ασθενείς οι οποίοι δεν είναι παχύσαρκοι ενδέχεται να έχουν αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους κυρίως στη κοιλιακή περιοχή (Kolb et al. 2017).

Ο ΣΔΤ2 περιλαμβάνει μια πιο πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της γενετικής και του τρόπου ζωής. Υπάρχουν σαφή στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η νόσος αυτή έχει ισχυρότερη κληρονομική προδιάθεση σε σύγκριση με το Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔΤ1). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 50 πολυμορφισμοί που συνδέονται με την εμφάνιση ΣΔΤ2. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες οδούς, συμπεριλαμβανομένης της παγκρεατικής ανάπτυξης, της σύνθεσης ινσουλίνης, της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα, της ωρίμανσης των β-κύτταρων, της αντοχής στην ινσουλίνη και της διαταραχής της ρύθμισης της γλυκονεογένεσης. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL) ρυθμίζεται από δύο πολυπεπτιδικές ορμόνες (ενδοκρινείς ορμόνες) οι οποίες εκκρίνονται απευθείας στο αίμα από το πάγκρεας. Και οι δύο ορμόνες παράγονται από τα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα.

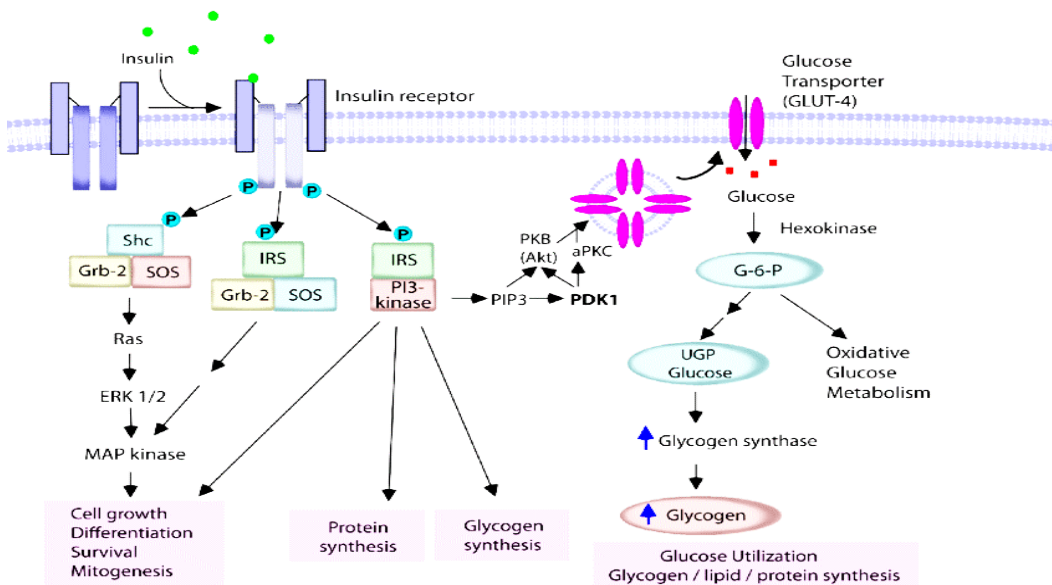
Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα μόρια γλυκόζης αποτελούν το κύριο ερέθισμα για την παραγωγή ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί

την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου.

Η περίσσεια γλυκόζης αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για το σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά την αποταμιευμένη στο ήπαρ (κυρίως) και στους μυς, γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.

Σε μοριακό επίπεδο, ένα κύτταρο «αισθάνεται» την ινσουλίνη μέσω των υποδοχέων ινσουλίνης. Το σήμα μεταδίδεται μέσω μιας αλληλουχίας σηματοδότησης που είναι συλλογικά γνωστή ως μονοπάτι σηματοδότησης PI3K / Akt / mTOR και παρουσιάζεται στην Εικόνα 2. Ακολουθεί ένας ενδοκυττάριος καταρράκτης χημικών αντιδράσεων – μεταγωγής του σήματος στον οποίο μεσολαβούν οι πρωτεΐνες IRS (Insulin Receptor Substrate – Υποστρώματα Υποδοχέα Ινσουλίνης). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, η ενεργοποίηση ενζύμων του μεταβολισμού και η κινητοποίηση των GLUT (Glucose Transporters - Μεταφορείς γλυκόζης) που είναι μεταφορικές πρωτεΐνες – υπεύθυνες για την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα.

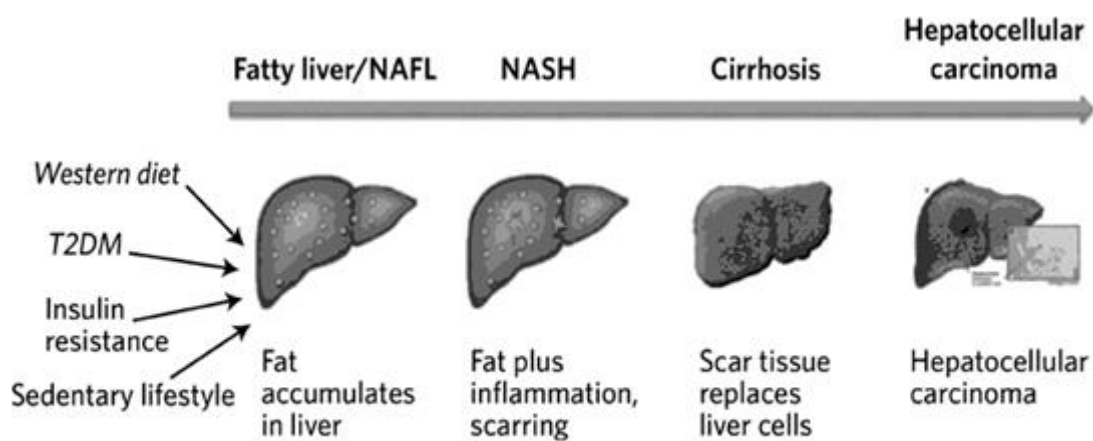


Εικόνα 2. Μεταγωγή σήματος της ινσουλίνης μέσω του μονοπατιού PI3 / Akt /mTOR
(Πηγή: www.researchgate.net, upload by Supachoke Mangmool).

Μερικές σπάνιες περιπτώσεις ΣΔ φαίνεται να οφείλονται σε μεταλλάξεις σε γονίδια που οδηγούν σε μη φυσιολογικό υποδοχέα ινσουλίνης και οδηγούν σε εκδήλωση διαφόρων φαινοτύπων όπως υπερινσουλιναιμία, υπεργλυκαιμία έως μεγάλης βαρύτητας ΣΔ.

1.4. Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD)

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) είναι η πιο κοινή, χρόνια ηπατική νόσος παγκοσμίως και ορίζεται από τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ, ελλείπει υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ και άλλων αιτιών ηπατικής στεάτωσης, και περιλαμβάνει ένα φάσμα καταστάσεων. Η ασθένεια μπορεί να εκδηλωθεί ως μια απλή στεάτωση (λιπώδης διήθηση - συσσώρευση λιπιδίων ειδικότερα τριγλυκεριδίων των ηπατοκυττάρων) ή αλλιώς ως μη αλκοολούχο λιπώδες ήπαρ (nonalcoholic fatty liver, NAFL) έως και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (nonalcoholic steatohepatitis, NASH). Σε μακροχρόνιες καταστάσεις μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση και κίρρωση του ήπατος. Τα παραπάνω απεικονίζονται και στην Εικόνα 3.



Note. NAFL, nonalcoholic fatty liver; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Εικόνα 3: Κλινικοπαθολογικό φάσμα της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (Πηγή: Thrasher et al.2016).

Αν και η πρωταρχική παθολογία στην NAFLD επηρεάζει τη ηπατική δομή και λειτουργία προκαλώντας νοσηρότητα και θνησιμότητα από κίρρωση, ηπατική ανεπάρκεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η πλειονότητα των θανάτων μεταξύ των ασθενών με NAFLD οφείλονται στη χρόνια νεφρική νόσο. Μέσα σε αυτό το φάσμα, η στεάτωση από μόνη της είναι φαινομενικά καλοήθης, ενώ η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η NAFLD συνδέεται έντονα με την παχυσαρκία, τη δυσλιπιδαιμία, τον ΣΔΤ2 και τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Mavrogiannaki and Migdalis 2013). Η παθογένεια της ηπατικής στεάτωσης δεν είναι ξεκάθαρα γνωστή αλλά τα κύρια χαρακτηριστικά της θεωρούνται η αντίσταση στην ινσουλίνη, η μιτοχondριακή δυσλειτουργία, η αυξημένη παλινδρόμηση ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό στο ήπαρ, η λιποτοξικότητα των ηπατοκυττάρων, η διέγερση χρόνιας φλεγμονής και η ινώδης απόκριση. Με τις πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία, οι προηγμένες τεχνικές απεικόνισης παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για διάγνωση. Υπάρχει σημαντική ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη μη επεμβατικής παρακολούθησης της εξέλιξης της νόσου για την διευκόλυνση της διάγνωσης του σταδίου της νόσου, μειώνοντας την ανάγκη βιοψίας ήπατος. Η ταυτοποίηση της NAFLD θα πρέπει να συμπεριληφθεί ως μέρος της αξιολόγησης ρουτίνας των διαβητικών τύπου 2, όπως γίνεται για τις μικροαγγειακές επιπλοκές και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, γιατί είναι

απαραίτητη για την έγκαιρη διάγνωση και τη σωστή παρέμβαση.

Η διατροφή, η άσκηση και η απώλεια βάρους παρέχουν σημαντικά κλινικά οφέλη και πρέπει να θεωρούνται πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της NAFLD. Η NAFLD είναι σήμερα μία από τις συχνότερες αιτίες χρόνιας ηπατοπάθειας παγκοσμίως ιδιαίτερα σε πληθυσμούς με υψηλό ποσοστό παχυσαρκίας. Μεγάλο ποσοστό των ασθενών με NAFLD έχει τουλάχιστον ένα χαρακτηριστικό στοιχείο του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ στο 1/3 των ασθενών αναγνωρίζεται το πλήρες φάσμα του συνδρόμου. Η NAFLD θεωρείται ότι αποτελεί την ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου. Τα στοιχεία δείχνουν ότι ο σπλαχνικός λιπώδης ιστός σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη και εξέλιξη του NAFLD. Οι σημαντικότεροι παθολογικοί μηχανισμοί στην ηπατική στεάτωση συνεπάγονται αυξημένη έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και λιποκινών και απελευθέρωση λιπαρών οξέων στο πυλαίο σύστημα και τη συστηματική κυκλοφορία, προκαλώντας δυσλιπιδαιμία και ινσουλινοαντίσταση. Έτσι η NAFLD μπορεί να θεωρηθεί ως μια πολυσυστημική ασθένεια, καθώς εκτός από το ήπαρ επηρεάζει και εξωηπατικά όργανα και ρυθμιστικές οδούς. Για παράδειγμα, η NAFLD αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση ΣΔΤ2, καρδιαγγειακών παθήσεων και χρόνιας νεφρικής νόσου. Η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΤ2 σε διπλάσιο ποσοστό. Επίσης η συγκέντρωση ηπατικών λιπιδίων (π.χ. δι-ακυλογλυκερόλη) που παρατηρείται στη νόσο μειώνει τη σηματοδότηση ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη) και αυτό συμβάλει στον μη φυσιολογικό ηπατικό μεταβολισμό. Τόσο η νόσος όσο και ο σακχαρώδης διαβήτης αυξάνουν την πιθανότητα ηπατικού καρκινώματος. Υπάρχουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δύο νόσους (τον ΣΔ και την NAFLD) και η ύπαρξη της μίας επηρεάζει την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της άλλης .

Η παχυσαρκία αντανακλά μια γενικευμένη προφλεγμονώδη κατάσταση με υψηλό κίνδυνο για μεταβολικές συννοσηρότητες. Το 80% των ασθενών με NAFLD είναι παχύσαρκοι με ΔΜΣ > 30 kg/m². Ωστόσο, η κατανομή του λιπώδους ιστού φαίνεται ότι παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην ινσουλινο-αντίσταση από ότι ο ΔΜΣ. Η μεγάλη ποσότητα σπλαχνικού λίπους σε νοσηρά

παχύσαρκους ($\Delta\text{ΜΣ} > 40 \text{ kg/m}^2$) συμβάλλει στον υψηλό επιπολασμό της νόσου. Ελεύθερα λιπαρά οξέα που προέρχονται από το σπλαχνικό λιπώδη ιστό και από διατροφικές πηγές αλλά και από τη de novo λιπογένεση, απελευθερώνονται στη κυκλοφορία. Μεγάλες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων και η χρόνια φλεγμονή στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό θεωρούνται δύο από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ηπατικής βλάβης στο NAFLD. Επιπλέον, η έκκριση λιποκινών από το σπλαχνικό λιπώδη ιστό καθώς και η συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ προάγει περαιτέρω τη φλεγμονή μέσω οδών σηματοδότησης του NF-κB οι οποίες οδοί ενεργοποιούνται επίσης από ελεύθερα λιπαρά οξέα και συμβάλλουν στην αντίσταση στην ινσουλίνη.

Οι μηχανισμοί που οδηγούν στη NAFLD δεν είναι σαφείς μέχρι σήμερα. Έχουν υπάρξει αρκετοί προτεινόμενοι μηχανισμοί αλλά η αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να είναι καθοριστική για την παθογένεια τόσο της NAFLD όσο και του ΣΔΤ2 (Ndisang et al. 2017, Tanase et al. 2020). Η μεταλλαγμένη μορφή του PNPLA3, ενός ένζυμου που εμπλέκεται στην υδρόλυση των τρι-ακυλογλυκερολών στα λιποκύτταρα αναφέρεται ότι σχετίζεται με NAFLD ανεξάρτητα από την εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου (Romeo et al. 2008, Sookoian et al. 2011). Επίσης η μεταλλαγμένη μορφή του μεταφορέα λιπιδίων TM6SF2 που βρίσκεται στα διαμερίσματα του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum, ER) και/ή του συστήματος Golgi (ER-Golgi) και προκαλεί απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης, αυξάνει την ηπατική εναπόθεση τριγλυκεριδίων (Dongiovanni et al. 2015). Η παθολογική εξέλιξη της NAFLD προκύπτει από μια διαδικασία «τριών χτυπημάτων» (Jou et al. 2008) που περιλαμβάνουν τη στεάτωση, την λιποτοξικότητα και την φλεγμονή.

Η στεάτωση προκύπτει ως αποτέλεσμα από της αλληλεπίδρασης μεταξύ της διατροφής και της μικροχλωρίδας του εντέρου, γενετικών παραγόντων και της de novo λιπογένεσης μέσω ανοδικής ρύθμισης των λιπογονικών παραγόντων μεταγραφής (Anderson & Borlak 2008). Τα λιπαρά οξέα (fatty acids, FAs) αποθηκεύονται κυρίως στον λιπώδη ιστό ως TAG (τρι-ακυλογλυκερόλη). Ωστόσο, σε παχύσαρκα άτομα, τα λιπαρά οξέα φαίνεται να δρομολογούνται εσφαλμένα από την κύρια θέση

αποθήκευσης σε έκτοπες θέσεις όπως τους σκελετικούς και ηπατικούς ιστούς για επανεστεροποίηση σε δι-ακυλογλυκερόλες (DAGs), ίσως μέσω αυξημένης λιπόλυσης των λιποκυττάρων. Η πρόσληψη λιπαρών οξέων από αυτά τα όργανα πιθανώς διευκολύνεται από τις πρωτεΐνες μεταφοράς των λιπαρών οξέων (FATPs) και των υποδοχέων των λιπαρών οξέων (FAT/CD36) που φαίνεται να έχουν αυξημένη έκφραση σε παχύσαρκα άτομα και σε ασθενείς με NAFLD (Isaeva et al. 2018).

Η στεάτωση οδηγεί σε αυξημένη σηματοδότηση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ μέσω της καταστολής του ΙΚΚβ (αναστολέας του NF-κβ). Η ενεργοποίηση του NF-κβ επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως TNF-α (παράγοντας νέκρωσης όγκων - άλφα), IL-6 (ιντερλευκίνη-6) και IL-1β (ιντερλευκίνη-1 β). Οι κυτταροκίνες αυτές συμβάλλουν στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer (ηπατικά μακροφάγα) (Anderson and Borlak 2008) για τη μεσολάβηση της φλεγμονής στο NASH (Ramadori and Armbrust 2001, Joshi-Barve et al. 2007). Επιπλέον, οι TNF-α και IL-6 έχουν αναφερθεί ότι παίζουν ρόλο στην ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη μέσω της αύξησης της ρύθμισης του SOCS3 (καταστολέας της σηματοδότησης κυτταροκινών (Persico et al. 2007, Torisu et al. 2007). Το υπερβολικό λίπος στο ήπαρ προκαλεί λιποτοξικότητα και οδηγεί σε ανεπάρκεια οργανιδίων και κυρίως σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Browning & Horton 2004, Bell et al. 2008). Ένα δυσλειτουργικό μιτοχόνδριο έχει αυξημένη ικανότητα να οξειδώνει τα FA με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS και την πρόκληση οξειδωτικού στρες λόγω ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS (Reactive Oxygen Species- ελεύθερες ρίζες) και προστατευτικών οξειδωτικών. Το οξειδωτικό στρες θεωρείται το τρίτο στάδιο σε ασθενείς με NAFLD (Sanyal et al. 2001, Tiniakos et al. 2010) που τελικά οδηγεί σε θάνατο των ηπατοκυττάρων. Η παθογένεια της NAFLD φαίνεται να είναι ένας φαύλος κύκλος στεάτωσης, λιποτοξικότητας και φλεγμονής, με αποτέλεσμα περίπλοκες αλλοιώσεις στα ιστοπαθολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του ήπατος.

Η αλλαγή του τρόπου ζωής με έμφαση στην υγιεινή διατροφή, την απώλεια βάρους όταν χρειάζεται και η τακτική σωματική άσκηση παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας σε ενήλικες (Zelber-

Sagi et al. 2016). Η βαριατρική χειρουργική ή οι βαριατρικές επεμβάσεις γίνονται στο πεπτικό σύστημα και έχουν ως στόχο τον περιορισμό της κατανάλωσης τροφής και της πρόσληψης ενέργειας. Ορισμένες βαριατρικές επεμβάσεις μπορούν επίσης να λειτουργήσουν θεραπευτικά στο ΣΔ και την υπερλιπιδαιμία. Γι' αυτό η βαριατρική χειρουργική που αποκαλείται σήμερα και μεταβολική χειρουργική μπορεί να αποδειχθεί ως καλή επιλογή σε επιλεγμένους ασθενείς, Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αντιστρέψει τη NASH και ακόμη και τη σημαντική ίνωση σε ορισμένους (Lassailly et al. 2015, Corey et al. 2016). Ωστόσο, η χειρουργική επέμβαση είναι δυνατή μόνο σε μια μειοψηφία των ασθενών.

Τα δεδομένα προηγούμενων κλινικών δοκιμών υποδηλώνουν ότι η πιογλιταζόνη ή η βιταμίνη E μπορεί να είναι ευεργετικές σε μη διαβητικούς ασθενείς με NASH (Sanyal et al. 2021), ενώ το όφελος της πιογλιταζόνης στην αναστροφή της NASH και στη βελτίωση της ίνωσης επιβεβαιώθηκε πρόσφατα και σε διαβητικούς ασθενείς. Δεν υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα για τη NASH αλλά πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι μπορεί να υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις που είναι ευεργετικές σε υποομάδες ασθενών με NASH. Το πιθανότερο είναι ότι καμία μεμονωμένη θεραπεία δεν θα αναστρέψει τη NASH σε όλους τους ασθενείς, καθώς διαφορετικοί ασθενείς πιθανόν εκδηλώνουν τον φαινότυπο της NASH ως απόκριση της έκθεσης σε διαφορετικούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

2. Κυτταρική γήρανση και ασθένειες

Η κυτταρική γήρανση (senescence) είναι η απάντηση στο στρες που προκαλεί η ύπαρξη βλαβών στα κύτταρα ενός ιστού και οδηγεί στη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος που θα αναλάβει την απομάκρυνση των κυττάρων που παρουσιάζουν σοβαρές βλάβες. Πρόκειται κυρίως για μη επιδιορθώσιμες βλάβες του DNA του κυττάρου. Κατά τη γήρανση, τα κύτταρα υφίστανται αλλαγές που περιλαμβάνουν την σμίκρυνση των τελομερών, και τη θραύση του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA, οδηγώντας σε μη αντιστρεπτή διακοπή του κυτταρικού κύκλου και σε έκκριση

προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Έτσι τα γηρασμένα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, επομένως εξασφαλίζεται ότι δεν θα μετατραπούν σε καρκινικά και στη συνέχεια το ανοσοποιητικό σύστημα αναλαμβάνει την απομάκρυνσή τους. Με αυτή την διαδικασία επιτυγχάνεται η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Herranz et al. 2018).

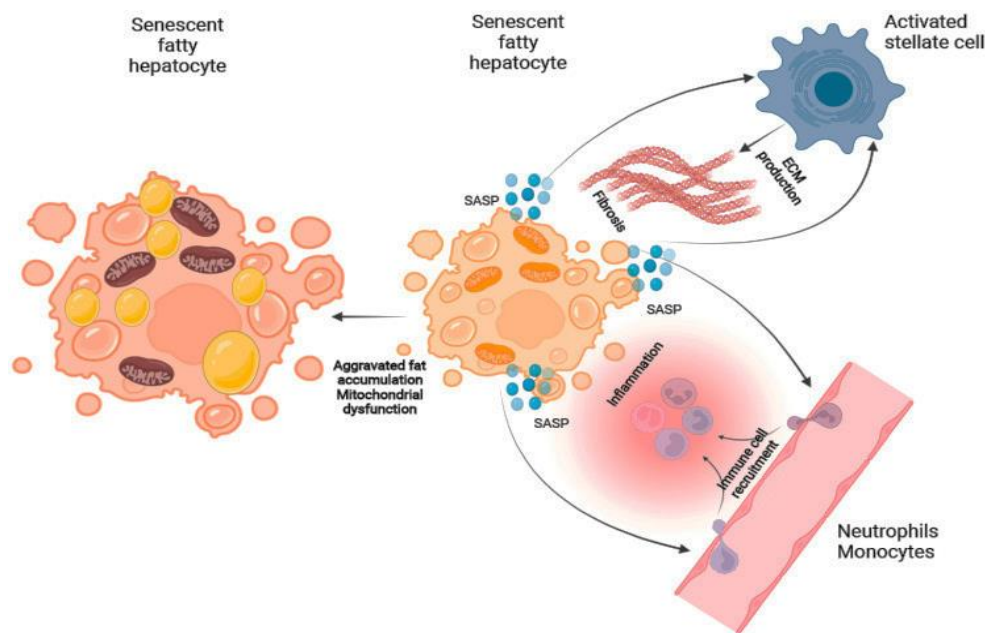
Η κυτταρική γήρανση λαμβάνει χώρα κατά τη φυσιολογική διαδικασία γήρανσης, που εμποδίζει την ογκογένεση, περιορίζει τη βλάβη των ιστών και βοηθά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Όμως ως διαδικασία παίζει και σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη μιας πληθώρας χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων μεταβολικών και φλεγμονωδών διαταραχών και της ογκογένεσης. Η αύξηση της κυτταρικής γήρανσης μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για έναν ιστό, που οδηγούν σε δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων, στη μείωση της φυσιολογικής τους δραστηριότητας και σε πρόωμη θνησιμότητα (Shmulevich & Krizhanovsky 2021).

Κυτταρική γήρανση σε ιστούς, όπως το πάγκρεας, οι μυς και το ήπαρ είναι πιθανό να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στο παθογένεια του ΣΔΤ2. Η αφθονία των γηρασμένων κυττάρων στο λιπώδη ιστό αυξάνεται και στην παχυσαρκία. Η αύξηση της κυτταρικής γήρανσης, σε άτομα που έχουν γενετική προδιάθεση εμφάνισης του ΣΔΤ2, παρατηρείται πριν την εκδήλωση της νόσου (Palmer et al. 2019).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* ως ρυθμιστής της λιπογένεσης παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. (Kung & Murphy 2016). Για την διαφοροποίηση των προγονικών λιπογόνων κυττάρων σε λιποκύτταρα ως απάντηση στην δράση της ινσουλίνης είναι απαραίτητη η αναστολή του *p53*. Όμως πολύ νωρίς στην διαδικασία ανάπτυξης της παχυσαρκίας παρατηρείται ενεργοποίηση του *p53* με αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης του λιπώδους ιστού. Η ενεργοποίηση του *p53* αναστέλλει επίσης την πρόσληψη γλυκόζης που προάγεται από την ινσουλίνη και αυξάνει τη λιπόλυση στα λιποκύτταρα, συμβάλλοντας περαιτέρω τόσο στη φλεγμονή όσο και στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Η υπερέκφραση του *p53* στον λιπώδη ιστό εμφανίζεται και στην περίπτωση του ΣΔΤ2. Τα γηρασμένα κύτταρα εκφράζουν εκκριτικό φαινότυπο και μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των γειτονικών τους κυττάρων. Επίσης τα γηρασμένα κύτταρα

συμβάλλουν στην προσέλκυση μακροφάγων στον σπλαχνικό λιπώδη ιστό. Η κυτταρική γήρανση συνδέεται στενά με την παθογένεια του διαβήτη και συμβάλει στην εξέλιξη της νόσου και την ανάπτυξη επιπλοκών που συνδέονται με αυτή.

Ομοίως η γήρανση συμμετέχει και στην παθογένεση και την ανάπτυξη της στεάτωσης του ήπατος, και συμβάλει στη εξέλιξη της νόσου σε NASH, η οποία χαρακτηρίζεται από την επιπρόσθετη εμφάνιση φλεγμονής και την ίνωση του ήπατος. Ο πιθανός ρόλος της γήρανσης στην εξέλιξη της νόσου NAFLD παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Η ανάπτυξη NAFLD και η πρόοδός της σε NASH συνοδεύονται συνήθως από διάφορα παθοφυσιολογικά φαινόμενα, όπως μεταβολική δυσλειτουργία και φλεγμονώδη φαινόμενα που συμβαίνουν στο ήπαρ και μπορεί να συμβάλλουν ή να προέλθουν από την κυτταρική γήρανση, γεγονός που δείχνει ότι η γήρανση μπορεί να είναι ταυτόχρονα και ερέθισμα και συνέπεια της νόσου (Ogrodnik et al. 2017).



Εικόνα 4: Ο πιθανός ρόλος της κυτταρικής γήρανσης στην εξέλιξη της NAFLD. Η ηπατοκυτταρική γήρανση και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να επιδεινώσουν τη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα. Ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP) ξεκινά τη στρατολόγηση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων, προκαλώντας έτσι φλεγμονή και μετάβαση σε NASH. Με τον ίδιο τρόπο, ο SASP ενεργοποιεί τα ηπατικά αστερικά κύτταρα οδηγώντας σε ίνωση. (Πηγή: Engelmann, & Tacke 2022).

Όσον αφορά τα γονίδια που παίζουν ρόλο στην κυτταρική γήρανση σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις άρα και στην περίπτωση της νόσου NAFLD που είναι και τα γονίδια που εξετάζονται στη παρούσα εργασία είναι τα *CDKN1a*, *CDKN2a* και το *Rb*. Το *CDKN1a* ή *p21* είναι ένα από τα πιο σημαντικά γονίδια των κυττάρων που έχει συγκεκριμένους, βασικούς ρόλους όπως: τη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, τη διακοπή της G1 φάσης ως απόκριση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων στρες, και επίσης προάγει την απόπτωση μετά από ενεργοποίηση των κασπασών (Kho et al. 2004). Το *Rb* επίσης είναι ένα γονίδιο που κάτω από κανονικές συνθήκες καθορίζει την πρόοδο του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το παραπάνω γονίδιο παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του κύκλου της κυτταρικής διαίρεσης. Το *Rb* σχηματίζει σύμπλοκα με την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων E2F και καταστέλλει την έκφραση πολλών γονιδίων. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του συμπλόκου Rb-E2F είναι και ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που χαρακτηρίζονται ως βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (Salama et al. 2014). Η φωσφορυλίωση του *Rb* προκαλεί την διάλυση του συμπλεγματος Rb-E2F οδηγώντας σε έκφραση των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Το γονίδιο *CDKN1a* ενεργοποιείται μεταγραφικά από το γονίδιο *p53*. Επίσης το γονίδιο *CDKN2a* ή *p16* μαζί με άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια χαρακτηρίζουν τον εγγενή βραχίονα της κυτταρικής γήρανσης σχηματίζοντας δύο μονοπάτια. Το p16-pRb όπου το *p16* δρα ως ανοδικός ρυθμιστής του *Rb*, και το p53-p21 όπου το *p21* δρα ως καταστολέας του *p53* (Rayess et al. 2012). Το κύριο ρυθμιστικό κλειδί αυτών των οδών είναι η αναστολή των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών CDK4/6 και CDK2, οι οποίες στη συνέχεια ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και εμπλέκονται σε φυσιολογικές διεργασίες που εξαρτώνται από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως ο καρκίνος, η αναγέννηση των ιστών, η κυτταρική γήρανση και η ανάπτυξη.

3. Επιγενετική

Τον 21ο αιώνα, ο επιστημονικός τομέας της επιγενετικής προσφέρει νέες προσεγγίσεις για την κατανόηση της θεμελιώδους βιολογίας, αλλά υπόσχεται επίσης νέα γνώση για την κατανόηση ασθενειών και τη δυνατότητα τροποποίησης των εμπλεκόμενων γονιδίων (Ling & Rönn 2019). Με την ευρεία έννοια, η «επιγενετική» περιγράφει μια σειρά πληροφοριών και διεργασιών, οι οποίες δρουν σε συνδυασμό με την αλληλουχία DNA για να καθορίσουν τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού. Μια επιγενετική αλλαγή συμβαίνει εκεί όπου η γονιδιακή έκφραση και ο φαινότυπος αλλάζουν, αλλά χωρίς αλλαγή στην αλληλουχία του DNA, αν και μπορεί να υπάρξει αλλαγή στη χημική τροποποίηση του DNA ή “στο πακετάρισμά” του εντός του πυρήνα. Το πεδίο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τρεις λόγους. Πρώτον οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται σε πολλούς θεμελιώδεις τομείς της βιολογίας, δεύτερον η επιγενετική ρύθμιση διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και επομένως μπορεί να εμπλέκεται ή και να υπευθύνεται για την έναρξη των διαδικασιών μιας νόσου, και τρίτον ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων και συμπλεγμάτων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε επιγενετικές διαδικασίες μπορεί να γίνουν πιθανοί στόχοι για αναστολή μέσω μικρών μορίων με στόχο τη θεραπεία ασθενειών (Zhang et al. 2020). Η επιγενετική παίζει ρόλο τόσο στη ρύθμιση ανά πάσα στιγμή της γονιδιακής δραστηριότητας ως απόκριση στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, όσο και στη μακροπρόθεσμη διατήρηση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης σε όλη τη διάρκεια ζωής ενός κυττάρου. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης προσδιορίζεται ως απόκριση σε εξωκυτταρικές ή ενδοκυτταρικές συνθήκες.

Ο ορισμός της επιγενετικής αναφέρει ότι οι μοριακές τροποποιήσεις στο DNA που μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή δραστηριότητα είναι ανεξάρτητες από την αλληλουχία του DNA και μιτωτικά σταθερές (Li et al. 2021). Αυτοί οι μηχανισμοί θεωρούνται αναστρέψιμοι, καθώς ρυθμίζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και η ανισορροπία τους μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ευρέος φάσματος διαταραχών ποικίλης σοβαρότητας. Η διαταραχή των προτύπων

γονιδιακής έκφρασης που διέπονται από την επιγενετική μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνο και διάφορες άλλες ασθένειες. Η επιγενετική αποτελεί νέο πρόσφατο πεδίο έρευνας και τα νέα δεδομένα που προκύπτουν προσφέρουν καινούργια εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προληπτικοί, διαγνωστικοί και θεραπευτικοί δείκτες. Σε αντίθεση με τις γενετικές αλλαγές, οι οποίες είναι δύσκολο να αντιστραφούν, οι επιγενετικές αλλαγές μπορεί να είναι φαρμακευτικά αναστρέψιμες. Με την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν σε συγκεκριμένους επιγενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η ανάπτυξη και η χρήση επιγενετικών εργαλείων είναι μια κατάλληλη και αποτελεσματική προσέγγιση που μπορεί να εφαρμοστεί κλινικά στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Zhang et al. 2020).

Στους επιγενετικούς μηχανισμούς εμπεριέχονται **η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης , οι τροποποιήσεις των ιστονών , η μεθυλίωση του DNA και τα μη κωδικοποιούντα RNAs.**

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης διευκολύνει την πρόσβαση ενός μεταγραφικού παράγοντα. Η διαμόρφωση του DNA που σχετίζεται με τη συγκρότηση νουκλεοσωμάτων, εμποδίζει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες να αποκτήσουν πρόσβαση στις θέσεις δέσμευσής τους. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης είναι μεγάλα σύμπλοκα πολλαπλών υπομονάδων που χρησιμοποιούν την υδρόλυση του ATP για να διολισθήσουν ή να εκδιώξουν τα νουκλεοσώματα από αυτές τις θέσεις και έτσι επιτρέπουν τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ένα ευρύ φάσμα παραλλαγών ιστόνης, εξελικτικά συντηρημένων, που περιέχουν μικρές αλλαγές στην πρωτοταγή αλληλουχία αμινοξέων ή ουσιαστικές διαφορές από την τυπική «κανονική» αλληλουχία ιστόνης. (Skene et al. 2013). Οι παραλλαγές αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό των συνολικών ιστονών στο κύτταρο, αλλά συγκεντρώνονται σε περιοχές χρωματίνης με συγκεκριμένους λειτουργικούς ρόλους, συμπεριλαμβανομένης της επισήμανσης του ανενεργού χρωμοσώματος X ή της κεντρομερούς ετεροχρωματίνης (CENP-A) ή είναι τοποθετημένες δίπλα σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής (H2A–Z) και θέσεις που σχετίζονται με μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή RNA πολυμεράση II.

Οι τυπικές «κανονικές» ισομορφές ιστόνης συναρμολογούνται στη χρωματίνη με τρόπο εξαρτώμενο από την αντιγραφή και εναποτίθενται στο DNA από στοιχεία του μηχανισμού αντιγραφής που δημιουργούν εντοπισμένες περιοχές χρωματίνης όπου τα νουκλεοσώματα έχουν διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες ή νέες θέσεις για μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Συνοπτικά, οι παραλλαγές ιστόνης χρησιμοποιούνται για να προκαθορίσουν τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες της χρωματίνης, για να διευκολύνουν ή να αποκλείσουν την επακόλουθη δέσμευση παραγόντων και τις σχετικές ρυθμιστικές τους ιδιότητες. Ως εκ τούτου, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και οι παραλλαγές ιστόνης δρουν για να ρυθμίσουν τη δομή της χρωματίνης τοπικά και ασκούν λειτουργικές επιδράσεις έμμεσα με μη ειδικό τρόπο για να επιτρέψουν ή να αποτρέψουν τη δέσμευση ενός ευρέος φάσματος ρυθμιστών.

Οι τροποποιήσεις των αμινοτελικών άκρων των ιστονών είναι βασικοί παράγοντες στη διατήρηση της δομής της χρωματίνης και της γονιδιακής έκφρασης. Έχει περιγραφεί ότι οι ανώμαλες τροποποιήσεις ιστόνης προάγουν την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και, κατά συνέπεια, της NAFLD (Lee et al. 2014). Μεταξύ των κύριων τροποποιήσεων είναι οι ακετυλιώσεις, που σχετίζονται με την ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής και καταλύονται από τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HAT), και οι αποακετυλιώσεις, που εμπλέκονται στην καταστολή των γονιδίων και καταλύονται από τις αποακετυλάσες ιστόνης (HDAC).

Η μεθυλίωση του DNA παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών και η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA συνδέεται συχνά με την ανάπτυξη πολλαπλών ασθενειών. Η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της μεταγραφής, της δομής της χρωματίνης, της αδρανοποίησης των χρωμοσωμάτων X, της γονιδιωματικής αποτύπωσης και της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος επηρεασμού των βιολογικών διαδικασιών μέσω της μεθυλίωσης του DNA είναι ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης μέσω δυναμικής ρύθμισης της κατάστασης μεθυλίωσης των νησίδων CpG (Cytosine-phospho-guanine) στη ρυθμιστική περιοχή ενός συγκεκριμένου γονιδίου

(Robertson & Wolffe 2000). Οι νησίδες CpG είναι τμήματα DNA μήκους περίπου 1000 ζευγών βάσεων που έχουν υψηλότερη πυκνότητα CpG από το υπόλοιπο γονιδίωμα. Η πλειονότητα των προαγωγέων των γονιδίων, περίπου το 70%, βρίσκεται εντός των νησιών CpG (Moore et al. 2013).

Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG στη γονιδιακή ρυθμιστική περιοχή, όπως ο προαγωγέας, συνδέεται κανονικά με μια συμπαγή ή κλειστή δομή χρωματίνης με αποτέλεσμα τη μεταγραφική σίγαση του συνδεδεμένου γονιδίου. Αντίθετα, η υπομεθυλίωση των νησίδων CpG οδηγεί σε μια ανοιχτή δομή χρωματίνης, η οποία γενικά σχετίζεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων. Οι εκτροπές της μεθυλίωσης του DNA που σημειώνονται εντός των περιοχών του προαγωγέα κρίσιμων γονιδίων θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης όπως τη σίγαση ή την ενεργοποίηση ενός κρίσιμου γονιδίου οδηγώντας τελικά σε εκδήλωση ασθενειών.

Έχουν εντοπιστεί πολλαπλές μορφές μεθυλίωσης DNA σε θηλαστικά, που περιλαμβάνουν τη 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC: 5-methylcytosine) την 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC: 5-hydroxymethylcytosine) και τα προϊόντα οξειδωσης 5-φορμυλοκυτοσίνης (5fC : 5 - fluorocytosine) και 5-καρβοξυλοκυτοσίνης (5caC: 5-carboxylcytosine) (Kriaucionis et al. 2009), Tahiliani et al. 2009, Maiti et al. 2011). Η θέση 5 της κυτοσίνης μεθυλιώνεται ομοιοπολικά από τις DNA μεθυλτρανσφεράσες κυτοσίνης (DNMTs) με την παρουσία του συμπάραγοντα S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM). Η 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC) προκύπτει ύστερα από τη μεθυλίωση και την επακόλουθη υδροξυλίωση από τις διοξυγενάσες κυτοσίνης TETs. Η κύρια επιγενετική τροποποίηση είναι η 5mC ενώ συναντάμε και το υδροξυλιωμένο παράγωγο της 5hmC στα γονιδιώματα των θηλαστικών (Wu et al. 2010). Αντίθετα, οι 5fC και 5caC είναι εξαιρετικά σπάνιες και θεωρούνται ως ενεργά ενδιάμεσα απομεθυλίωσης του DNA (Maiti et al. 2011, He et al. 2011, Meng et al. 2014). Οι αυξανόμενοι συσχετισμοί 5mC με τη γονιδιακή σίγαση υποδεικνύουν σημαντικούς ρόλους στη εκδήλωση συγκεκριμένων φαινοτύπων στα θηλαστικά, την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, την καταστολή επαναλαμβανόμενων στοιχείων και τη ρύθμιση έκφρασης της ειδικής γενεαλογίας (Illingworth et al. 2009, Li et al. 2002, Bernstein et al. 2007). Η ενδιάμεση 5hmC ανακαλύφθηκε

πρόσφατα ως δεύτερη τροποποίηση στο DNA σπονδυλωτών και σχηματίζεται με προσθήκη μιας ομάδας υδροξυλίου σε 5mC μέσω των TET (Tahiliani et al. 2009, Iyer et al. 2009). Επειδή η 5hmC είναι πιο σταθερή από τα προϊόντα οξείδωσης των 5fC και 5caC, η ομάδα υδροξυμεθυλίου είναι πιθανό να έχει βιολογικές ιδιότητες και μπορεί να είναι ένα επιγενετικό σημάδι (Inoue et al. 2011, Song et al. 2013)

Στα σπονδυλωτά η 5mC είναι η πιο σημαντική τροποποίηση που παρατηρείται στην πλειονότητα των ιστών θηλαστικών (Wu et al., 2011). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο τύπος μεθυλίωσης 5mC συμμετέχει στην άμεση ρύθμιση πολλών αναπτυξιακών γονιδίων (Meissner et al. 2008, Lister et al. 2013). Οι περισσότερες (70%-80%) CpG θέσεις στα θηλαστικά είναι μεθυλιωμένες και οι υψηλά μεθυλιωμένες αλληλουχίες βρίσκονται σε δορυφορικά DNA, σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία, σε σώματα γονιδίων και σε μη επαναλαμβανόμενο διαγονιδιακό DNA (Wu et al. 2011). Οι εξαιρέσεις σε μια τέτοια ενιαία υπερμεθυλιωμένη κατάσταση είναι οι πλούσιες σε CpG αλληλουχίες DNA που ονομάζονται νησίδες CpG (CGIs), οι οποίες είναι ως επί το πλείστον υπομεθυλιωμένες σε σχέση με το κύριο γονιδίωμα σε φυσιολογικές καταστάσεις (Angeloni et al. 2021). Τα CGI χαρακτηρίζονται από τα χαρακτηριστικά των αλληλουχίας DNA που περιλαμβάνουν υπομεθυλίωση DNA, αυξημένη περιεκτικότητα σε CpG και GC και παρουσία θέσεων δέσμευσης μεταγραφικού παράγοντα. Αυτά τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας ταιριάζουν με τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων και ενζύμων τροποποίησης της χρωματίνης και γενικά με τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Τα CGI συνεντοπίζονται με θέσεις μεταγραφικής έναρξης σε υπερμεθυλιωμένα γονιδιώματα σπονδυλωτών. Τα μη μεθυλιωμένα CGI σε περιοχές των προαγωγέων συνδέονται με την ειδική για τον ιστό έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε πρώιμα εμβρυικά κύτταρα και στα μετέπειτα δημιουργούμενα σωματικά κύτταρα. Ωστόσο, αυτά τα CGI μεθυλιώνονται σε μεγάλο βαθμό de novo κατά την απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, με αποτέλεσμα τη γονιδιακή σίγαση στο απενεργοποιημένο χρωμόσωμα (Hughes et al. 2020).

Εκτός από τα κανονικά CGI που βρίσκονται σε χαρακτηρισμένες τοποθεσίες έναρξης μεταγραφής

(TSS), ορφανά CGI άγνωστης λειτουργίας βρίσκονται εντός γονιδίων (ενδογονιδιακά) και μεταξύ ενεργών γονιδίων (διαγονιδιακά). Τα μη μεθυλιωμένα CGI στα 5' άκρα πολλαπλών γονιδίων συσχετίζονται θετικά με τη μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ ένας μικρός αριθμός γονιδίων υπερμεθυλιώνονται στους CGI προαγωγείς τους και καταστέλλονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Ανώμαλα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA επηρεάζουν την κυτταρική ομοιόσταση, όπως η υπερμεθυλίωση, που σχετίζεται με γονιδιακή καταστολή, και η υπομεθυλίωση, που σχετίζεται με τη γονιδιακή ενεργοποίηση. Πολλές μεθυλίώσεις λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως η διατροφή (Barnett et al. 2015). Η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA φαίνεται να είναι το σημείο εκκίνησης για την καρκινογένεση, ειδικά στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που σχετίζεται με NAFLD (Xu et al. 2017). Μεταβολίτες που προέρχονται από το μεταβολικό σύνδρομο, όπως η ινσουλίνη, η γλυκόζη ή τα λιπίδια, θα μπορούσαν να διαταράξουν τη γονιδιακή ρύθμιση σε επιγενετικό επίπεδο, οδηγώντας τον οργανισμό σε μια προφλεγμονώδη κατάσταση που διαταράσσει τις μεταβολικές οδούς (Tian et al. 2013).

Τα MicroRNA είναι μια κατηγορία μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA μονής αλυσίδας που δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και συμμετέχουν στη μετάφραση πρωτεϊνών. Μπορούν να επηρεάσουν κάθε πτυχή της κυτταρικής δραστηριότητας, όπως η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η απόπτωση και η καρκινογένεση (Giordano et al. 2013). Οι στόχοι των microRNA μπορεί να είναι πολλαπλά γονίδια (πολλαπλότητα), ή πολλαπλά microRNA μπορεί να στοχεύουν ένα μόνο γονίδιο (συνεργατικότητα). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την εμπλοκή τους στην καρκινογένεση, τα microRNA μπορούν να χαρακτηριστούν ως ογκογονίδια (De Conti et al. 2017). Η σταθερότητα των microRNA έχει αποδειχθεί στον ορό, το πλάσμα, το σάλιο και τα ούρα. Αυτά τα μόρια τυγχάνουν αυξανόμενης προσοχής, καθώς συνήθως απορυθμίζονται σε παθολογικές καταστάσεις και είναι επί του παρόντος οι πιο εντατικά μελετημένοι επιγενετικοί παράγοντες στη NAFLD. Τα microRNAs κυκλοφορούν προστατευμένα από την αποικοδόμηση από

RNAάσες που περιέχονται στα σωματικά υγρά και επί του παρόντος μελετώνται ευρέως για τη μη επεμβατική διάγνωση μιας σειράς ηπατικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD (Tan et al. 2014). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η ανώμαλη έκφραση των microRNA μπορεί να έχει μηχανιστική σημασία στην καρκινογένεση του ήπατος που σχετίζεται με τη NASH, άρα μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος που προέρχεται από αυτήν.

4. Υγρή βιοψία ως μέσο διάγνωσης της NAFLD

Η κλασική βιοψία ήπατος παραμένει η βασική μέθοδος διάγνωσης της NAFLD και την αξιολόγηση του σταδίου και της σοβαρότητας της νόσου σε μεμονωμένους ασθενείς, επειδή οι υπάρχουσες διαθέσιμες μη επεμβατικές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων απεικονιστικών και ορολογικών μεθόδων, δεν έχουν την ευαισθησία και την ειδικότητα για τον εντοπισμό πρώιμων σταδίων της ίνωσης και δεν είναι χρήσιμες στη διάκριση της φλεγμονής από την ηπατοκυτταρική βλάβη (Saleh et al. 2007). Ενώ η βιοψία του ιστού είναι ένα σημαντικό και χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο, είναι ταυτόχρονα επεμβατική και απαιτητική για την προετοιμασία και αξιολόγηση σημαντικών δειγμάτων από έναν παθολόγο, και οι παραλλαγές τόσο στη δειγματοληψία όσο και στην ερμηνεία, καθώς και ο περιορισμός της ανάλυσης στο στάδιο της νόσου όταν εκτελείται δεν παρέχουν επίπεδο λεπτομερών μοριακών πληροφοριών για νόσο.

Τα τελευταία χρόνια, μια νέα διαγνωστική ιδέα γνωστή ως «υγρή βιοψία» έχει εμφανιστεί (Diaz et al. 2014, Alix-Panabières et al. 2016). Η υγρή βιοψία αναπτύχθηκε και εξελίχθηκε στο πλαίσιο της ογκολογίας. Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου ορίζει την υγρή βιοψία ως μια εξέταση που γίνεται σε δείγμα αίματος για την αναζήτηση καρκινικών κυττάρων από τον όγκο που κυκλοφορούν στο αίμα ή για τμήματα DNA από κύτταρα του όγκου επίσης που βρίσκονται στο αίμα (Palmirotta et al. 2018). Η υγρή βιοψία μπορεί να ανιχνεύσει κυκλοφορούντα επιθηλιακά κύτταρα (CEC) στο πλαίσιο εντοπισμένων καρκίνων καθώς και προνεοπλασματικών βλαβών, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία τους δεν περιορίζεται σε κύτταρα που προέρχονται από εγκατεστημένους καρκίνους (Stott, et al.

2014) Επίσης κυκλοφορούντα κύτταρα εντοπίζονται από ιστούς που νοσούν και σε άλλες πέρα του καρκίνου, παθολογικές καταστάσεις. Τα ηπατικά CEC δεν έχουν μελετηθεί ευρέως απουσία κακοήθειας, αλλά υπάρχουσες μελέτες υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως ισχυρός βιοδείκτης για την ευρεία διάγνωση και παρακολούθηση διαφόρων χρόνιων ηπατικών νόσων καθώς και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Σε αυτές τις παθολογικές καταστάσεις το ελεύθερο DNA (cfDNA) που ανιχνεύεται στο αίμα προσφέρει μια λιγότερο επεμβατική υγρή βιοψία, δίνοντας δυνατότητες για τη δυναμική ανάλυση και αξιολόγηση σε πραγματικό χρόνο της εμφάνισης, της εξέλιξης και της ανταπόκρισης στη θεραπεία της νόσου με τεράστιο αντίκτυπο στον ιατρικό τομέα (Valastyan et al. 2011). Το DNA τυλίγεται γύρω από ιστόνες σε πυρηνικά σωμάτια νουκλεοσώματος. Η πέψη της χρωματίνης αποδίδει τμήματα DNA πολλαπλάσια των 200 bp (1 νουκλεόσωμα). Έτσι το cfDNA εμφανίζεται με τη μορφή θραυσμάτων που μπορεί να είναι μονομερή (1 νουκλεόσωμα), διμερή (2 νουκλεοσώματα), τριμερή (3 νουκλεοσώματα), κοκ. Η παρουσία του cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να παρέχει δύο τύπους πληροφοριών. Οι ποσοτικές αλλαγές αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και ακόμη και την υποτροπή, ενώ οι ποιοτικές αλλαγές στις γονιδιωματικές ανωμαλίες (παραλλαγές αριθμού αντιγράφων DNA, γονιδιακές μεταλλάξεις, σχήματα μεθυλίωσης ειδικά για όγκο, απώλεια ετεροζυγωτίας ή/και μικροδορυφορική αστάθεια) μπορεί να αντικατοπτρίζουν την εξέλιξη της νόσου (Chan et al. 2013).

Το cfDNA είναι μια ετερογενής δεξαμενή κατακερματισμένου DNA που περιλαμβάνει γονιδιωματικό, μιτοχondριακό DNA του ξενιστή και DNA βακτηριακής προέλευσης (Grabuschnig et al. 2020). Τα μόρια cfDNA εμφανίζονται κυρίως με τη μορφή δίκλωνου DNA (dsDNA) και είναι ως επί το πλείστον μικρού μεγέθους, που κυμαίνονται μεταξύ 100 και 200 ζευγών βάσεων (bp). Μεγαλύτερα θραύσματα, ακόμη και στην περιοχή πολλών ζευγών κιλοβάσεων (Kbp) έχουν επίσης αναφερθεί (Thierry et al. 2016). Είναι ένας δυναμικός δείκτης και μπορεί να προέρχεται από διαφορετικούς μηχανισμούς απελευθέρωσης όπως ο κυτταρικός θάνατος και οι διαδικασίες ενεργού

έκκρισης (Kustanovich et al. 2019). Για να μεταφερθεί η ανάλυση cfDNA στην κλινική πρακτική, υπάρχει ανάγκη να τυποποιηθούν οι προαναλυτικές συνθήκες προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα του δείγματος και να ληφθούν δεδομένα καλής ποιότητας σε επόμενες διαδικασίες (Locke et al. 2019) .

Σε αντίθεση με τη χειρουργική ή τη στερεά βιοψία, η υγρή βιοψία έχει σημαντικά πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα, είναι μια ελάχιστα επεμβατική διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί τακτικά χωρίς εκτεταμένη εκπαίδευση, επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία που μπορεί να προσφέρει παρακολούθηση της νόσου με την πάροδο του χρόνου και οι μοριακές αναλύσεις νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα αποτυπώνουν καλύτερα τη συνολική γενετική πολυπλοκότητα των βλαβών. Επιπλέον, τα δείγματα είναι ευκολότερα στην επεξεργασία και την αποθήκευση και είναι φθηνότερα από τις κλασικές διαδικασίες βιοψίας και μπορεί να είναι πιο κατάλληλα για την έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών λόγω της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας των τρεχουσών μοριακών μεθοδολογιών (Karachaliou et al. 2015). Μια υγρή βιοψία συλλέγει το δείγμα μη στερεού βιολογικού ιστού του σώματος, όπως αίμα για διαφορετικές αναλύσεις. Αρκετά άλλα σωματικά υγρά θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένες εφαρμογές υγρής βιοψίας, όπως εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) για όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος, σάλιο για όγκους κεφαλής και τραχήλου, υπεζωκοτικό υγρό για καρκίνους θώρακα και μεταστατικούς, ασκίτη για καρκίνους κοιλίας , κόπρανα για καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα και ούρα για καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος (Corcoran & Chabner 2018, Dawson et al. 2013, van 't Veer et al. 2002, Diehl et al. 2005)

Η πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών των παθολογικών ιστών και οργάνων που φυσιολογικά απελευθερώνουν κύτταρα και κυτταρικά συστατικά στην κυκλοφορία του αίματος καθιστά την υγρή βιοψία ως μια νέα, λιγότερο επεμβατική, πηγή βιοδεικτών για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης, συνεισφέροντας σημαντικά στο πεδίο εφαρμογής της ιατρικής ακριβείας.

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

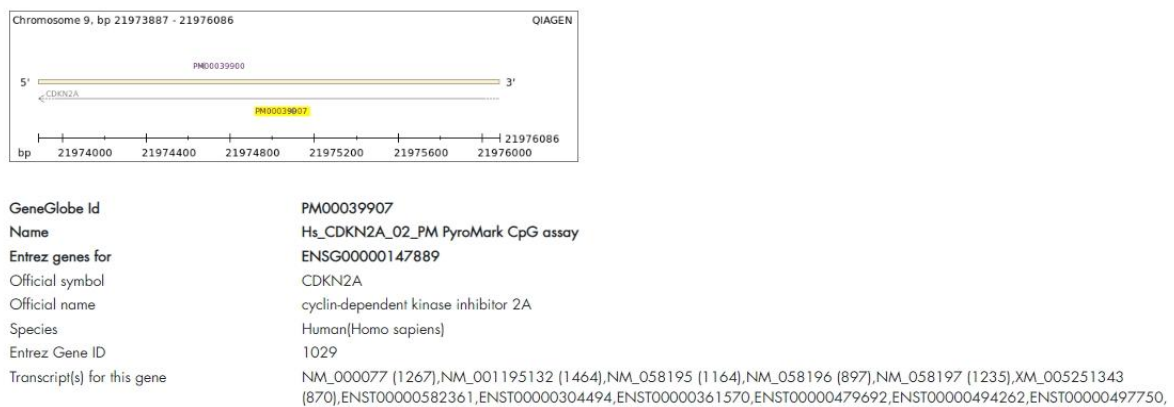
Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να βρεθεί αν η μεθυλίωση των εκκινητών των γονιδίων *CDKN1a*, *CDKN2a* και *Rb* που εμπλέκονται στη γήρανση, διαφέρει μεταξύ των σταδίων της νόσου NAFLD ώστε να διαπιστώσουμε αν μέσω αυτής, η έκφραση των γονιδίων αυτών επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

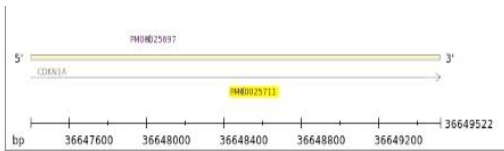
Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος 50 ασθενών με διαγνωσμένη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος σε διαφορετικά στάδια της νόσου από απλή στεάτωση, στεατοηπατίτιδα με ίνωση έως και κίρρωση. Από τους παραπάνω ασθενείς είχε ληφθεί ορός αίματος από τον οποίο απομονώθηκε DNA (cell free DNA, n=50) με τη μέθοδο της υγρής βιοψίας. Τα δείγματα αυτά δόθηκαν σε μας έτοιμα προκειμένου να μελετηθεί η μεθυλίωση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και συγκεκριμένα των γονιδίων *CDKN1a* (*p21*), *CDKN2a* (*p16*) και *Rb* και να διερευνηθεί αν αυτή διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της νόσου.

Σχεδιασμός εκκινήτων

Αρχικά μέσα από site της Qiagen (<https://geneglobe.qiagen.com/cn/product-groups/pyromark-cpg-assays>) αντλήσαμε κάποιες πληροφορίες (θέση στο χρωμόσωμα, περιοχή μελέτης, αμπλικόνιο) που αφορούν τα υπό μελέτη γονίδια *CDKN2a* (*p16*), *CDKN1a* (*p21*) και *Rb* και παρουσιάζονται στις Εικόνες 5,6 και 7.



Εικόνα 5: Γονίδιο *CDKN2a* (Πηγή: <https://geneglobe.qiagen.com/cn/product-groups/pyromark-cpg-assays>).



GeneGlobe Id	PM00025711
Name	Hs_CDKN1A_03_PM PyroMark CpG assay
Entrez genes for	ENSG00000124762
Official symbol	CDKN1A
Official name	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
Species	Human(Homo sapiens)
Entrez Gene ID	1026
Transcript(s) for this gene	NM_000389 (2175),NM_001220777 (2119),NM_001220778 (2284),NM_078467 (2122),NR_037150 (2327),NR_037151 (2285),NR_037152 (2120),NM_001291549 (2325),ENST00000478800,ENST00000244741,ENST00000373711,ENST00000405375,ENST00000448526,ENST00000615513

Additional information for this product ¹

Amplicon Length	119 bp
Sequenced Strand	antisense
Biotin Modification on ²	reverse PCR primer
PyroMark Assay setup file ³	Download
Chromosomal Location ⁴	Chromosome 6, BP 366484XX-366484XX
Sequence to Analyze	CCRCGGCGGTTCCGCGCCGCCAGCCCCCACTCCCGCGGA
Sequence After Bisulfite Treatment	TTRYGGYGGTTYGYGTAGTTTTATTYGGGA
Number of CpG sites included	7
Nucleotide dispensation order ⁵	ATGATCGTCGTCGATCGATGTTAGTTCGTCG

Εικόνα 6: Γονίδιο *CDKN1a* (Πηγή: <https://geneglobe.qiagen.com/cn/product-groups/pyromark-cpg-assays>).



GeneGlobe Id	PM00054873
Name	Hs_RB1_01_PM PyroMark CpG assay
Entrez genes for	ENSG00000231473
Official symbol	LINC00441
Official name	long intergenic non-protein coding RNA 441
Species	Human(Homo sapiens)
Entrez Gene ID	100862704
Transcript(s) for this gene	NR_046414 (1191),ENST00000433480
Name	Hs_RB1_01_PM PyroMark CpG assay
Entrez genes for	ENSG00000139687
Official symbol	RB1
Official name	retinoblastoma 1
Species	Human(Homo sapiens)
Entrez Gene ID	5925
Transcript(s) for this gene	NM_000321 (4772),ENST00000531171,ENST00000267163

Additional information for this product ¹

Amplicon Length	148 bp
Sequenced Strand	antisense
Biotin Modification on ²	reverse PCR primer
PyroMark Assay setup file ³	Download
Chromosomal Location ⁴	Chromosome 13, BP 488776XX-488777XX
Sequence to Analyze	RCATCCGGCCCGCCCGCCGACGT
Sequence After Bisulfite Treatment	RTATTYGGYGGTTYGGAYGT
Number of CpG sites included	5
Nucleotide dispensation order ⁵	TCATCATCGTCGTCGATCG

Εικόνα 7: Γονίδιο *Rb* (Πηγή: <https://geneglobe.qiagen.com/cn/product-groups/pyromark-cpg-assays>).

Με βάση την αλληλουχία των τριών γονιδίων και με τη χρήση του λογισμικού PyroMark AssayDesign Software 2.0 της εταιρείας Qiagen σχεδιάστηκαν σετ τριών εκκινητών για κάθε γονίδιο ένας ευθύς (Forward, F), ένας ανάστροφος (reverse, R) εκκινητής και ένας εκκινητής αλληλούχισης (Sequencing, S) (Πίνακας 1). Οι κατάλληλοι εκκινητές πληρούν κάποιες προϋποθέσεις. Πρώτον δεν πρέπει να παρατηρούνται επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια αδενίνης (A) και θυμίνης (T) στο 3' άκρο. Δεύτερον δεν πρέπει να υπάρχει υψηλή συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών, ώστε να μην σχηματίζονται δευτεροταγείς δομές και διμερή εκκινητών. Και τέλος η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών να μην διαφέρει περισσότερο από 3°C ανάμεσα σε κάθε ζεύγος. Ο R εκκινητής κάθε ζευγαριού ήταν βιοτινυλιωμένος στο 5' άκρο του, έτσι ώστε το PCR προϊόν που προκύπτει, να είναι κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί στην επακόλουθη διαδικασία του Pyrosequencing. Οι εκκινητές αλληλούχισης είναι αναγκαίοι για την αλληλούχιση που έπεται της PCR .

Πίνακας 1 : Τα υπό μελέτη γονίδια και οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία F εκκινητή	Αλληλουχία R (βιοτινυλιωμένος) εκκινητή
<i>CDKN2a</i>	CDKN2A_02	TTGGGGAGATTTTAGGGGTGTT A	CAACCCCTCCTCTTTCCTC
<i>CDKN1a</i>	CDKN1A_03	GAAGGGTGGTAATGGTATAG	CATCACTACTCCCTCCAAC
<i>Rb</i>	RB1_01	AGTTATGAGGAATTAATTGGG AAAT	CACAATCACCACCAAAC

Επεξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο Bisulfite Conversion

Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του bisulfite conversion, μέθοδος που χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση και ανίχνευση μη μεθυλιωμένων έναντι μεθυλιωμένων κυτοσινών με σκοπό την ανάλυση μεθυλίωσης του DNA. Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε απαμίνωση των υπολειμμάτων μη

μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ουρακίλη, αφήνοντας ανέπαφα τα 5-mC ή 5-hmC, (τη 5-μεθυλκυτοσίνη όσο και τη 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη) δηλαδή τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Η σύγκριση των πληροφοριών αλληλουχίας μεταξύ του γονιδιώματος αναφοράς και του επεξεργασμένου με διθειώδες DNA μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα πρότυπα μεθυλίωσης της κυτοσίνης. Τα δείγματα DNA επεξεργάστηκαν με όξινο θειώδες νάτριο χρησιμοποιώντας το EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Catalog Nos. D5020 & D5021) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- Proteinase K and Storage Buffer*
- M-Digestion Buffer (2X)
- CT Conversion Reagent
- M-Dilution Buffer
- M- Solubilization Buffer
- M-Reaction Buffer
- M-Binding Buffer
- M-Wash Buffer
- M-Desulphonation Buffer
- M-Elution Buffer
- Zymo-Spin™ IC Columns
- Collection Tubes

Τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν σύμφωνα με το κατασκευαστή, παρουσιάζονται στο link :

https://files.zymoresearch.com/protocols/_d5001_d5002_ez_dna_methylation_o_kit.pdf

Στη συνέχεια όλα τα δείγματα ενισχύθηκαν με PCR προκειμένου να αναλυθούν τα γονίδια *CDKN1a* (*p21*), *CDKN2a* (*p16*) και *Rb* βάσει αντίστοιχων εκκινητών (primers) που σχεδιάστηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Αντίδραση PCR

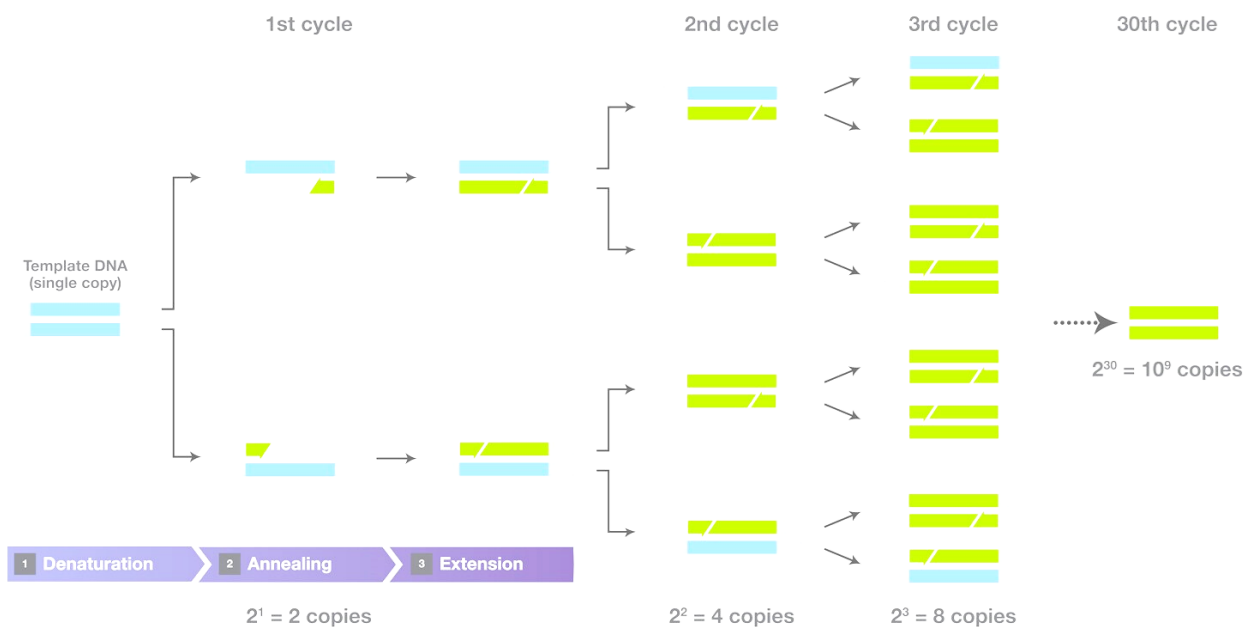
Η PCR είναι μια βιοχημική διαδικασία που χρησιμοποιείται για να ενισχύσει ένα μόνο μόριο DNA σε εκατομμύρια αντίγραφα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) βασίζεται στα παρακάτω βήματα (Εικόνα 8).

- (1) μετουσίωση/denaturation , στην οποία θερμαίνονται δίκλωνα εκμαγεία DNA για να διαχωριστούν οι κλώνοι. Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 15 λεπτά με αποτέλεσμα οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA να διασπώνται και τα δίκλωνα μόρια DNA αποχωρίζονται τελείως. Έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση.
- (2) Υβριδοποίηση/annealing κατά την οποία βραχέα μόρια DNA που ονομάζονται εκκινητές συνδέονται σε πλευρικές περιοχές του DNA στόχου. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται απότομα και η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 40-72°C ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA και ο ένας εκκινητής προσδένεται στο 3' άκρο της μιας αλυσίδας, ενώ ο άλλος στο 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA.
- (3) Επέκταση/extension στην οποία η πολυμεράση DNA επεκτείνει το 3' άκρο κάθε εκκινητή κατά μήκος των κλώνων του εκμαγείου. Σε αυτό το βήμα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (συνήθως Taq πολυμεράση), ώστε να εκτελεστεί η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Αυτά τα βήματα επαναλαμβάνονται 25-35 φορές για να παραχθούν εκθετικά ακριβή αντίγραφα του DNA στόχου. Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να διεξαχθούν με οποιαδήποτε πολυμεράση DNA. Όμως λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επιτυγχάνονται για την αποδιάταξη του DNA υποστρώματος, οι κοινές DNA πολυμεράσες αποδιατάσσονται για αυτό το λόγο γίνεται η χρήση των

θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (π.χ. Ταq πολυμεράση) που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς που ζουν σε θερμές πηγές και έτσι δεν απαιτείται προσθήκη ενζύμου σε κάθε κύκλο. Όλες οι DNA πολυμεράσες έχουν δραστηριότητα πολυμεράσης 5'→ 3', η οποία είναι η ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων για την επέκταση των εκκινητών στα 3' άκρα τους στην κατεύθυνση 5' προς 3'.

- (4) Αποδιάταξη των προϊόντων. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C και έτσι τα νεοσυντιθέμενα δίκλιωνα μόρια αποχωρίζονται ώστε να αποτελέσουν υποστρώματα για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Τέλος ακολουθεί ένα στάδιο επιμήκυνσης που διαρκεί 10 λεπτά που είναι ο απαραίτητος χρόνος για να επιτευχθεί η επέκταση όλων των προϊόντων από την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.



Εικόνα 8: Τα τρία στάδια της PCR-μετουσίωσης, υβριδοποίησης και επέκτασης- όπως φαίνεται στον πρώτο κύκλο, και η εκθετική ενίσχυση του DNA στόχου με επαναλαμβανόμενο κύκλο (Πηγή: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html#pcr>).

Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για τη μέθοδο PCR, ονομάζεται PCR Thermal Cycler (Εικόνα 9) (αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής) και είναι ένα όργανο που αυτοματοποιεί τον κύκλο της θερμοκρασίας και τους χρόνους επώασης για την PCR. Πριν από την εισαγωγή των θερμικών κυκλοποιητών, η PCR ήταν μια επίπονη διαδικασία που περιλάμβανε τη μεταφορά δειγμάτων μεταξύ λουτρών νερού διαφορετικών θερμοκρασιών και απαιτούσε ακριβή χρόνο για κάθε βήμα.



Εικόνα 9: PCR Thermal Cycler (C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad)) (Πηγή : <https://www.alysos.com>).

Αντιδραστήρια PCR και ηλεκτροφόρηση

Τα αντιδραστήρια της PCR που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

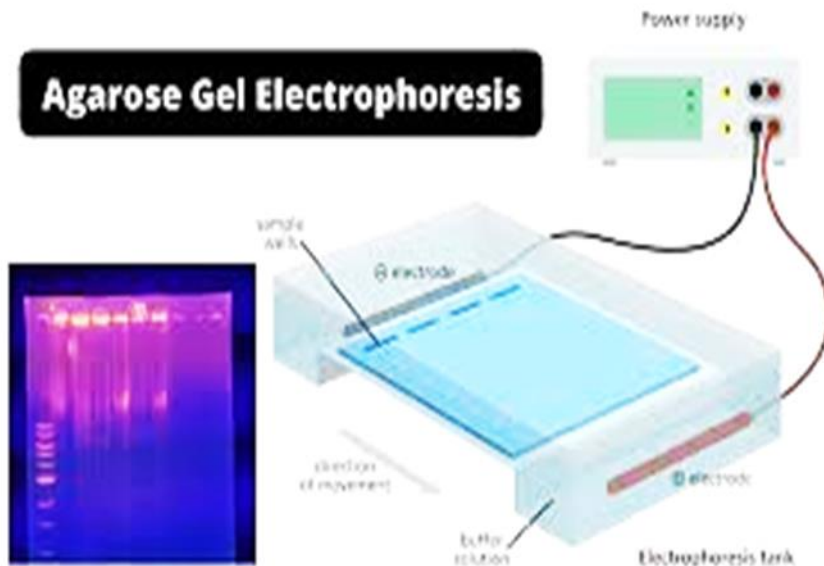
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια PCR

Αντιδραστήριο	Αναλογία (Όγκος σε μl)
PCR Master mix (ένζυμο DNA Taq πολυμεράση και 12,5 μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs))	
Χρωστική (Coral)	2,5

Εκκινητής F (Primer Forward)	0,5
Εκκινητής R (Primer Reverse)	0,5
H ₂ O (Ελεύθερο από (δεοξυ)ριβονουκλεάσες)	7,5
MgCl ₂	0,5
DNA εκμαγείο	1
Σύνολο	25

Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR οπτικοποιήθηκαν σε gel αγαρόζης 2% (gel electrophoresis) έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι έχουμε μια ενιαία, έντονη μπάντα και όχι μη ενσωματωμένους εκκινητές. Για την ανίχνευση του προϊόντος στο gel χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide).

Η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (AGE) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάκριση μορίων DNA ή RNA με βάση τα μοριακά τους μεγέθη. Ο διαχωρισμός των μορίων RNA και DNA επιτυγχάνεται όταν τα νουκλεϊκά οξέα που είναι αρνητικά φορτισμένα «ταξιδεύουν» μέσω μιας δομής αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικών πεδίων (ηλεκτροφόρηση). Τα μικρότερα μόρια «ταξιδεύουν» μακρύτερα από τα μεγαλύτερα. Η θέση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης αποκαλύπτεται με χρώση του gel με χαμηλή ποσότητα παρεμβαλλόμενων φθοριζόντων χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο. Η διαδικασία αποτελείται από τρία βασικά βήματα: 1. Παρασκευή του gel αγαρόζης, 2. Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA και 3. Οπτικοποίηση του αποτελέσματος. Τα πηκτώματα αγαρόζης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό θραυσμάτων με μήκος από 50 bp έως μερικές χιλιάδες βάσεις, αλλάζοντας το πορώδες του gel και την εφαρμογή ρεύματος (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση σε Gel αγαρόζης (Πηγή: <https://microbiologynote.b-cdn.net/wp-content/uploads/2021/11/Agarose-Gel-Electrophoresis-1024x576.jpg.webp>).

Διαδικασία Pyrosequencing

Για τον προσδιορισμό των προτύπων μεθυλίωσης των γονιδίων ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλληλούχησης γονιδιωμάτων Pyrosequencing. Το Pyrosequencing έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP) οι οποίοι μπορούν να δημιουργηθούν τεχνητά σε θέσεις CpG μέσω τροποποίησης διθειώδους (bisulfate conversion). Η μέθοδος αυτή ποσοτικοποιεί με ευαισθησία τις συχνότητες σωματικών μεταλλάξεων και τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA τόσο σε θέσεις CpG όσο και σε μη CpG (CpN) και παρουσιάζει αυτά τα αποτελέσματα ως ποσοστό. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το PyroMark Q24 της Qiagen (Εικόνα 11).

Η μέθοδος pyrosequencing απαιτεί ένα μονόκλωνο αμπλικόνιο που χρησιμεύει ως πρότυπο DNA, τέσσερα διαφορετικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της DNA πολυμεράσης, της ATP σουλφουρυλάσης, της λουσιφεράσης και της απυράσης και δύο διαφορετικά υποστρώματα συμπεριλαμβανομένης της 5' φωσφοθεικής αδενοσίνης (APS) και της λουσιφερίνης (Ronaghi et al. 1998). Πρώτον, ένας εκκινητής προσδιορισμού αλληλουχίας συγκολλάται σε ένα μονόκλωνο πρότυπο DNA (ssDNA). Με την προσθήκη ενός απλού νουκλεοτιδίου, η DNA πολυμεράση ενσωματώνει το κατάλληλο νουκλεοτίδιο (dNTP) στο επεκτεινόμενο σκέλος, απελευθερώνοντας

πυροφωσφορικό (PPi). Στη συνέχεια, η ATP σουλφουρυλάση παράγει ATP από το PPi και το υπόστρωμα APS, το οποίο ενεργοποιεί τη μετατροπή της λουσιφερίνης μέσω της λουσιφεράσης στην οξυλουσιφερίνη και εκπέμπεται φως. Το φως εκπέμπεται ανάλογα με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που προστίθεται στον επιμηκνόμενο κλώνο και καταγράφεται από μια ενσωματωμένη κάμερα. Η περίσσεια νουκλεοτιδίου αποικοδομείται από την απυράση, μετά την οποία διανέμεται το επόμενο νουκλεοτίδιο. Η σύγκριση της μέγιστης εκπομπής φωτός της ενσωμάτωσης του C ή του T σε μια θέση CpG μέσα στο αμπλικόνιο δίνει ένα ακριβές μέτρο της ποσότητας μεθυλίωσης σε αυτή τη θέση μέσα στο δείγμα.



Εικόνα 11: Μηχάνημα PyroMark Q24 της Qiagen (Πηγή: <https://www.qiagen.com>).

Ενώ λειτουργεί το μηχάνημα PyroMark Q24 (Εικόνα 11), το ίχνος φωτός για κάθε "πηγαδάκι" που ανιχνεύεται από την κάμερα παρουσιάζεται σε πραγματικό χρόνο, δημιουργώντας μια σειρά κορυφών, το ύψος των οποίων υποδεικνύει τη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων. Κάθε μη CpG κορυφή γίνεται κορυφή αναφοράς που χρησιμοποιεί το λογισμικό για να υπολογίσει το ποσοστό μεθυλίωσης του δείγματος. Ωστόσο, η ποσοτική ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά την ολοκλήρωση της

διαδικασίας διαβάσματος της αλληλουχίας.

Το προς ανάλυση DNA ενισχύεται μέσω PCR χρησιμοποιώντας 2 εκκινητές, ο ένας από τους οποίους είναι βιοτινυλιωμένος. Το βιοτινυλιωμένο προϊόν PCR στη συνέχεια ακινητοποιείται επάνω σε σφαιρίδια Sepharose® επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη.

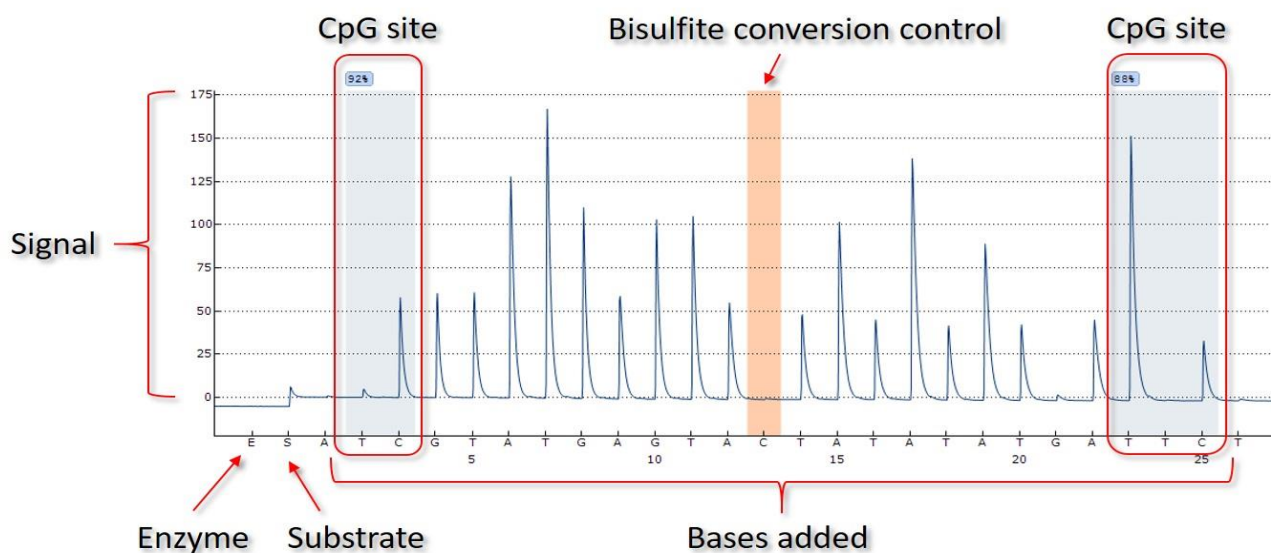
Για την προετοιμασία των δειγμάτων απαιτούνται ο ακόλουθος εξοπλισμός και αντιδραστήρια. Όλα τα αντιδραστήρια και διαλύματα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν την έναρξη. Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά.

Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για Pyrosequencing

- Σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 MDx
- Αναδευτήρας πλακιδίων για την ακινητοποίηση σε σφαιρίδια
- Θερμικό μπλοκ ικανό να φθάσει τους 80°C
- Πλακίδιο PyroMark Q24
- Πλακίδιο ή ταινίες PCR με 24 πηγαδάκια
- Φύσιγγα PyroMark Q24
- Πώματα ταινίας
- Streptavidin Sepharose High Performance (Sepharose στρεπταβιδίνης υψηλής απόδοσης) (34 μm, 5 ml, GE Healthcare βλ. www.gelifesciences.com)
- Προσδιορισμοί με την επισήμανση IVD για Pyrosequencing της QIAGEN
- Νερό υψηλής καθαρότητας (Milli-Q18,2 MΩ x cm ή ισοδύναμο)
- Αιθανόλη (70%)
- Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα PyroMark
- Διάλυμα αποδιάταξης PyroMark
- Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης PyroMark
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύνδεσης PyroMark

Πριν χρησιμοποιηθεί ο σταθμός εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 MDx, γίνεται έλεγχος για το αν οι δειγματολήπτες με φίλτρο λειτουργούν κανονικά. Για αυτό το σκοπό εκτελείται ο έλεγχος λειτουργίας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια εφόσον έχει προηγηθεί η ενίσχυση του υπό μελέτη DNA μέσω PCR χρησιμοποιώντας έναν από τους εκκινητές που είναι βιοτινυλιωμένος, τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα PCR ακινητοποιούνται επάνω σε επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη σφαιρίδια Sepharose (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare). Ακολουθεί ο διαχωρισμός των κλώνων DNA και η απελευθέρωση των δειγμάτων στο πλακίδιο PyroMark Q24. Σε επόμενο βήμα εφόσον γίνει η προετοιμασία των αντιδραστηρίων PyroMark Gold Q24, γίνεται η φόρτιση της φύσιγγας των αντιδραστηρίων και του πλακιδίου στο μηχάνημα PyroMark Q24 Mdx και επιλέγουμε εκκίνηση της εκτέλεσης. Το όργανο θα αρχίσει να διανέμει αντιδραστήρια όταν η πίεση στη μονάδα διανομής, η ταχύτητα του αναδευτήρα, και οι θερμοκρασίες του θερμικού μπλοκ, του καλύμματος θαλάμου διαδικασίας και του ψυκτικού υγρού έχουν φθάσει στα προκαθορισμένα επίπεδά τους. Όταν



ολοκληρωθεί η εκτέλεση, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού PyroMark Q24 MDx Software και ειδικών γραφημάτων που ονομάζονται πυρογράμματα. Ένα παράδειγμα πυρογράμματος παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.

Εικόνα 12: Ενδεικτικό πυρόγραμμα (Pyrogram) στο οποίο φαίνονται οι κορυφές σήματος που αντικατοπτρίζουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Με μπλε είναι σημασμένες οι περιοχές όπου γίνεται έλεγχος για μεθυλιωμένη ή μη κυτοσίνη. Πάνω από κάθε θέση αναγράφεται το ποσοστό μεθυλίωσης των περιοχών αυτών. Η πορτοκαλί σημασμένη περιοχή αποτελεί νουκλεοτίδιο ελέγχου για την απόδοση της αντίδρασης bisulfite conversion

(Πηγή: <https://toptipbio.com/bisulfitepyrosequencing/bisulfite-pyrosequencing-annotated-pyrogram/>).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανθρωπομετρικά δεδομένα

Παρακάτω στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη έρευνα.

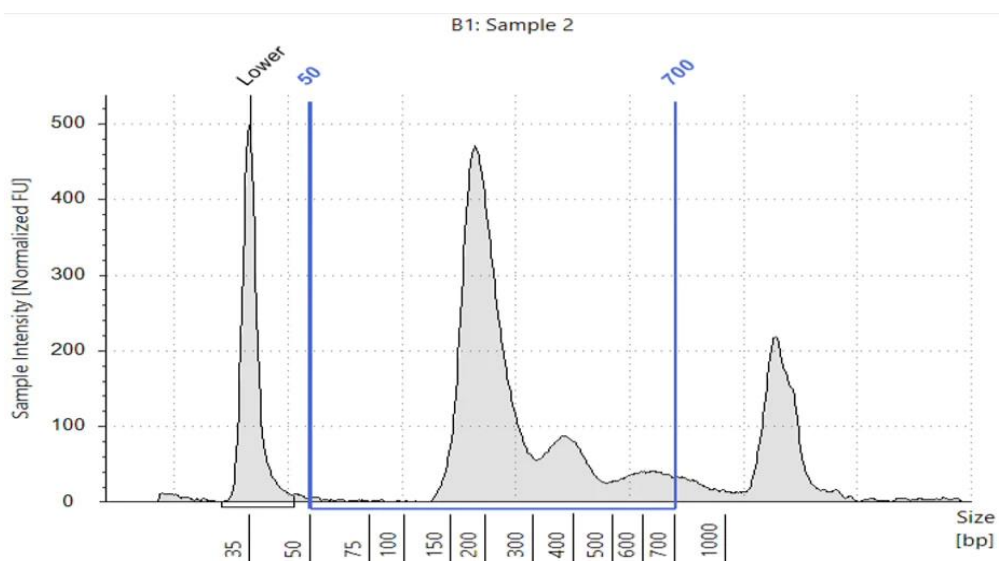
Πίνακας 3: Δημογραφικά δεδομένα

Σύνολο ατόμων	50
Ηλικία σε έτη: Μέσος όρος (Τυπική απόκλιση)	59,1(11,6)
ΔΜΣ σε kg/m²: Μέσος όρος (Τυπική απόκλιση)	31,5(5,1)
Φύλο	
Άρρεν (%)	26 (52)
Θήλυ(%)	24(48)
Κάπνισμα	
Μη Καπνιστές (%)	20(40)
Πρώην καπνιστές (%)	16(32)
Ενεργοί καπνιστές (%)	14(28)
Ολική χοληστερόλη σε mg/dL	175(44,65)
Μέσος όρος (Τυπική απόκλιση)	

HDL χοληστερόλη σε mg/dL Μέσος όρος(Τυπική απόκλιση)	52,59(15,9)
LDL χοληστερόλη σε mg/dL Μέσος όρος (τυπική απόκλιση)	95,8(36,5)
Τριγλυκερίδια σε mg/dL Μέσος όρος (τυπική απόκλιση)	119,95(50,53)
Διάγνωση	
Λιπώδες ήπαρ(%)	10(20)
NASH(%)	24(48)
Κίρρωση ήπατος(%)	16(32)

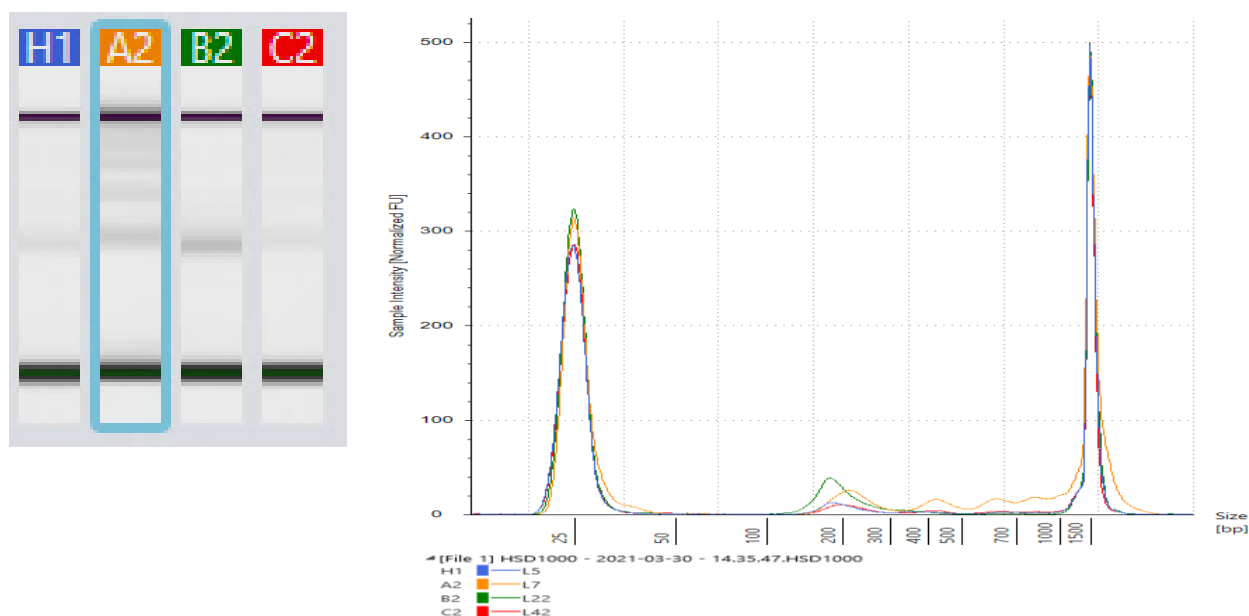
Έλεγχος ποιότητας DNA

Η μέθοδος TapeStation επιτρέπει την οπτική αξιολόγηση της κατανομής των μεγθών θραυσμάτων και μετρά τις συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων για επιλεγμένο μέγεθος. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε αναλύσεις DNA και βοηθάει στην οπτικοποίηση της ποσότητας των διακριτών μονο- και δινουκλεοσωμικών θραυσμάτων DNA. Η πρότυπη εικόνα (Εικόνα 13) που προκύπτει από τη μέθοδο παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 13: Πρότυπο διάγραμμα ελέγχου ποιότητας DNA μέσω της μεθόδου Tapestation.

Επιλέγοντας κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα από το πλάσμα των ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα και εφαρμόζοντας τη μέθοδο Tapestation προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 14).



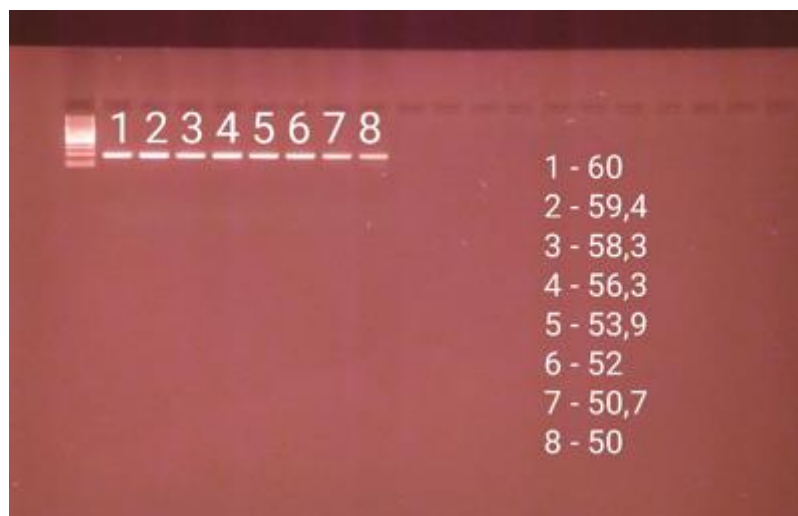
Εικόνα 14: Διάγραμμα που προέκυψε από τον έλεγχο ποιότητας των υπό μελέτη δειγμάτων.

Το DNA τυλίγεται γύρω από ιστόνες σε πυρηνικά σωμάτια νουκλεοσώματος. Η πέψη της χρωματίνης αποδίδει τμήματα DNA πολλαπλάσια των 200 bp (1 νουκλεόσωμα). Το cfDNA εμφανίζεται με τη μορφή θραυσμάτων που μπορεί να είναι μονομερή (1 νουκλεόσωμα), διμερή (2 νουκλεοσώματα), τριμερή (3 νουκλεοσώματα), κ.ο.κ. Ελέγχοντας το μέγεθος των θραυσμάτων κάποιων αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και συγκρίνοντας το διάγραμμα που προκύπτει από τη μέθοδο Tapestation με το πρότυπο διάγραμμα καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα. Πρώτον η ποσότητα

cell free DNA των δειγμάτων μας είναι πολύ μικρή και δεύτερον το DNA είναι κατακερματισμένο κυρίως σε τμήματα που αντιστοιχούν σε ένα νουκλεόσωμα, μόνο το A2 εμφανίζει μονομερή, διμερή κοκ. Ο παραπάνω έλεγχος γίνεται γιατί τα μονομερή ή και μικρότερα θραύσματα δεν μπορούν να πολυμεριστούν και δεν θα δώσουν προϊόν PCR άρα ούτε και αποτέλεσμα στη μέθοδο Pyrosequencing.

Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών για τους εκκινητές PCR

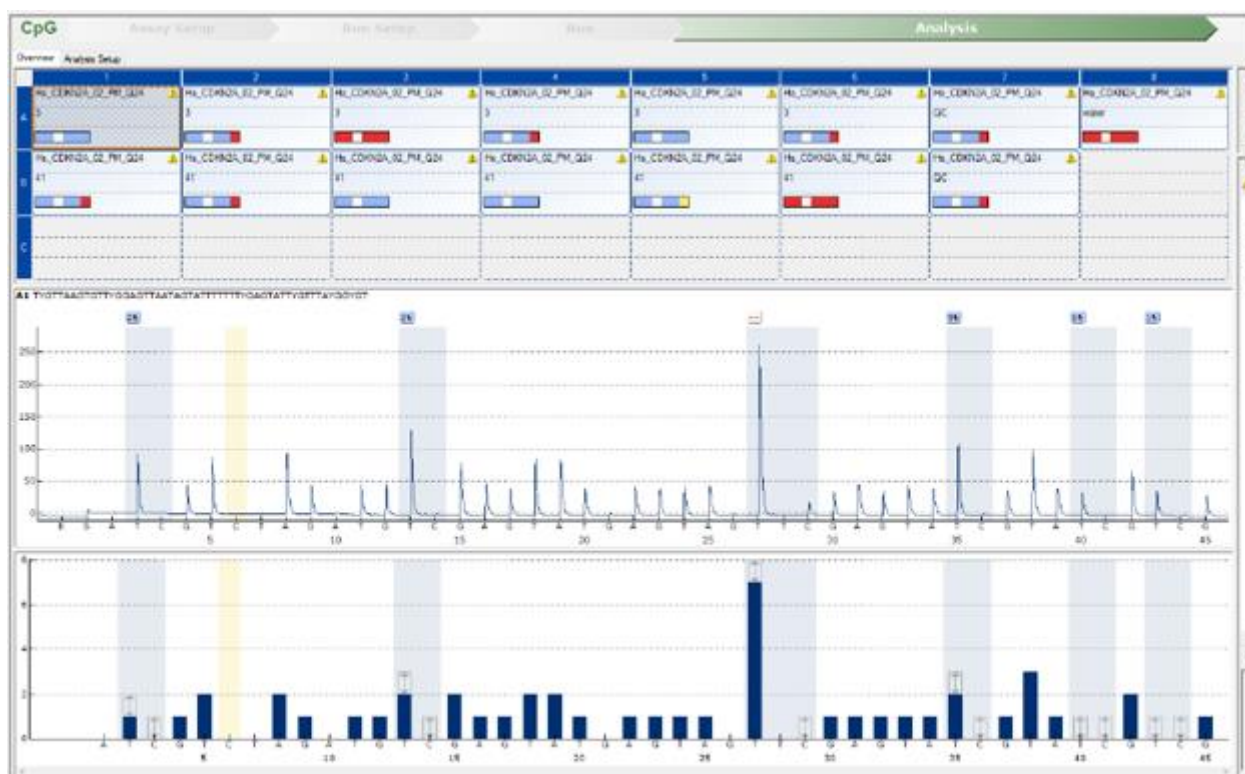
Για την σωστή διεξαγωγή της PCR, μια από τις βασικές παραμέτρους είναι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών. Έγιναν δοκιμές με διάφορες τιμές θερμοκρασίας που κυμαίνοντας στο εύρος 50 – 60°C. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις παραπάνω τιμές θερμοκρασίας προκύπτει προϊόν PCR και επιλέχθησαν ως βέλτιστες θερμοκρασίες 52 – 60°C. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στη παρακάτω Εικόνα 15.



Εικόνα 15: Το PCR προϊόν που προέκυψε σε διαφορετικές θερμοκρασίες annealing για τον εκκινητή CDKN2A_02 και χρησιμοποιώντας το δείγμα 03 (1-60 °C/2-59,4 °C/3-58,3 °C/4-56,3 °C/5-53,9 °C/6-52 °C/7-50,7 °C/8-50 °C).

Στη συνέχεια έπρεπε να προσδιορίσουμε την κατάλληλη ποσότητα cfDNA που θα μας δώσει αποτέλεσμα στη PCR και αργότερα στη διαδικασία pyrosequencing. Για αυτό το σκοπό έγιναν δοκιμές χρησιμοποιώντας τα δείγματα 03 και 41 (αυτά με την μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA). Οι

δοκιμές έγιναν εις διπλούν για τρεις διαφορετικές αρχικές ποσότητες DNA (500, 150, 50 picograms) πριν τη διαδικασία bisulfite conversion. Το πυρόγραμμα που προέκυψε παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 16).



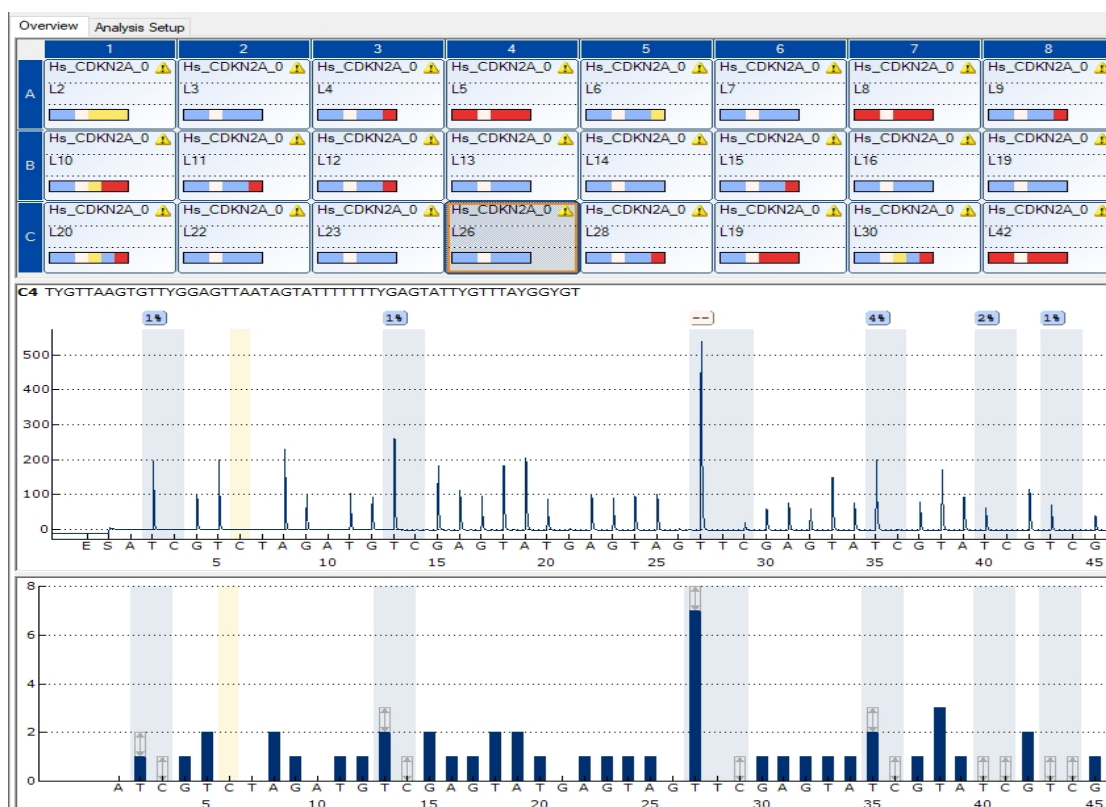
Εικόνα 16: Χαρακτηριστικό πυρόγραμμα δοκιμών για το προσδιορισμό της κατάλληλης ποσότητας DNA. Το μπλέ χρώμα που εντοπίζεται στο σκιασμένο δείγμα σημαίνει ότι η ανάλυση είναι πολύ καλή, το κόκκινο χρώμα που εμφανίζεται σε κάποια δείγματα σημαίνει ότι για κάποιο λόγο δεν έχουμε αποτέλεσμα και το κίτρινο σημαίνει ότι κάποιος από τους παράγοντες της αντίδρασης χρειάζεται προσοχή.

Τα αποτελέσματα είναι πολύ καλά και επαναλήψιμα. Η ανάλυση είναι πολύ καλή όταν εμφανίζονται 6 CpG κορυφές. Η μικρότερη ποσότητα, αυτή των 50 picogramm, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί γιατί 2 στις 4 φορές αποτυγχάνει η ανάλυση. Αυτό συμβαίνει γιατί στα 50 picogram το DNA εμφανίζεται με τη μορφή μονομερών. Τα μονομερή δεν μπορούν να πολυμεριστούν γιατί ο εκκινητής

δεν μπορεί να υβριδιστεί στα μονομερή, με αποτέλεσμα να μην μας δώσουν αποτελέσματα στη PCR.

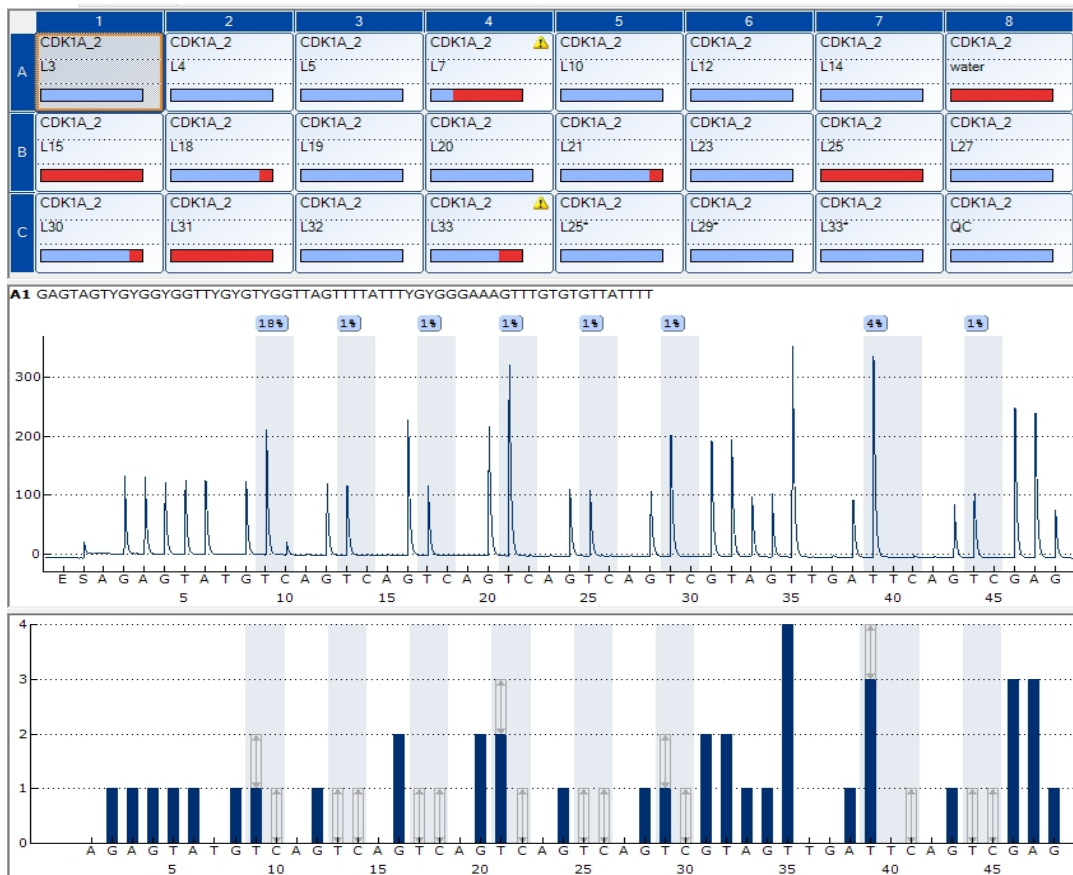
Χαρακτηριστικά πυρογράμματα των υπό μελέτη γονιδίων

Παρακάτω παρουσιάζονται χαρακτηριστικά πυρογράμματα που προέκυψαν από τα υπό μελέτη γονίδια *CDKN2a*, *CDKN1a* και *Rb* (Εικόνες 17, 18 και 19).



Εικόνα 17: Γονίδιο *CDKN2A* / Χαρακτηριστικό πυρογράμμα για το σκιασμένο δείγμα όπου απεικονίζονται οι 6 θέσεις μεθυλίωσης που αντιστοιχούν στις σκιασμένες με μπλέ χρώμα κορυφές.

Ομοίως παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 18 και 19) τα αντίστοιχα διαγράμματα για τα δύο άλλα γονίδια που μελετήθηκαν.



Εικόνα 18: Γονίδιο *CDKN1α*



Εικόνα 19: Γονίδιο *Rb*

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να βρεθεί η συσχέτιση (ο βαθμός με τον οποίο δύο μεταβλητές έχουν γραμμική σχέση η μία με την άλλη) μεταξύ των δεδομένων που προέκυψαν από τα πειράματα και των ανθρωπομετρικών δεδομένων που έχουμε στη διάθεσή μας, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Ο συντελεστής αυτός χαρακτηρίζεται ως μη παραμετρικό μέτρο της στατιστικής εξάρτησης μεταξύ δύο ή περισσότερων μεταβλητών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (bivariate correlation) που είναι ένα μέτρο γραμμικής συσχέτισης μεταξύ δυο συνόλων δεδομένων. Είναι ο λόγος μεταξύ της συνδιακύμανσης δύο μεταβλητών και του γινομένου των τυπικών αποκλίσεων τους. Είναι ουσιαστικά μια κανονικοποιημένη μέτρηση της συνδιακύμανσης έτσι ώστε το αποτέλεσμα να έχει πάντα μια τιμή μεταξύ -1 και 1.

Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση

των ανθρωπομετρικών δεδομένων ώστε να εξεταστεί η συσχέτιση μεταξύ τους.

Πίνακας 4: Στατιστική ανάλυση των ανθρωπομετρικών δεδομένων /Εύρεση της μεταξύ τους συσχέτισης

		Ηλικία	Φύλο	Κάπνισμα	ΔΜΣ	Ολική χοληστερόλη	HDL χοληστερόλη	LDL χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Διάγνωση
Ηλικία	Correlation Coefficient									
	Sig. (2-tailed)									
	N									
Φύλο	Correlation Coefficient	-.072								
	Sig. (2-tailed)	,621								
	N	49								
Κάπνισμα	Correlation Coefficient	-.094	-.046							
	Sig. (2-tailed)	,522	,753							
	N	49	49							
ΔΜΣ	Correlation Coefficient	-.082	,467	-.467						
	Sig. (2-tailed)	,580	,001	,095						
	N	48	48	48						
Ολική χοληστερόλη	Correlation Coefficient	-.298	-.298	,181	-.113					
	Sig. (2-tailed)	,038	,976	,212	,445					
	N	49	49	49	48					
HDL χοληστερόλη	Correlation Coefficient	,033	,091	-.066	,047	,508				
	Sig. (2-tailed)	,824	,542	,661	,752	,000				
	N	47	47	47	47	47				
LDL χοληστερόλη	Correlation Coefficient	-.337	,012	,203	-.098	,859	,148			
	Sig. (2-tailed)	,031	,939	,203	,544	,000	,354			
	N	41	41	41	41	41	41			
Τριγλυκερίδια	Correlation Coefficient	-.131	,165	,092	-.068	,131	-.513	,115		
	Sig. (2-tailed)	,368	,258	,528	,644	,369	,000	,473		
	N	49	49	49	48	49	47	41		
Διάγνωση	Correlation Coefficient	,533	,056	-.052	,238	-.213	-.061	-.280	,019	
	Sig. (2-tailed)	,000	,701	,723	,103	,142	,683	,076	,899	
	N	49	49	49	48	49	47	41	49	

Παρατηρείται ότι όσον αφορά τη διάγνωση της νόσου φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών. Αυτό σημαίνει ότι με την αύξηση της ηλικίας αυξάνεται η πιθανότητα διάγνωση στο στάδιο της κίρρωσης. Επίσης θετική συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει ανάμεσα στις μεταβλητές φύλο και ΔΜΣ. Αυτό σημαίνει ότι οι άντρες εμφανίζουν υψηλότερο ΔΜΣ από ότι οι γυναίκες. Μια άλλη παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι η ολική χοληστερόλη όπως και η LDL χοληστερόλη εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σε ασθενείς μικρότερης ηλικίας, υπάρχει δηλαδή αρνητική συσχέτιση. Επίσης αυξανόμενη LDL χοληστερόλη και HDL χοληστερόλη σημαίνει αυξημένη ολική χοληστερόλη αφού στο Πίνακα 4 φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών αυτών. Τέλος μια άλλη παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε είναι ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση

ανάμεσα στις τιμές που λαμβάνουν η μεταβλητή τριγλυκερίδια και η HDL χοληστερόλη.

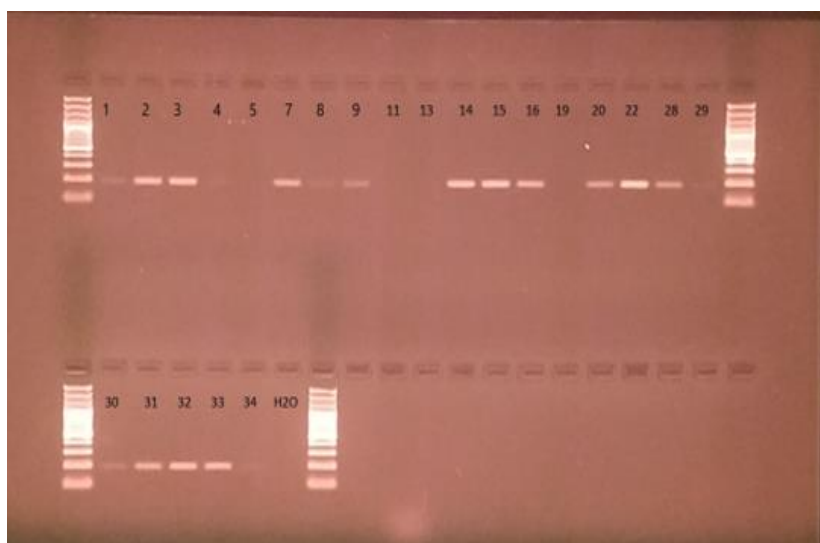
Πίνακας 5: Περιγραφική στατιστική beta value

ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ (beta value)						
	N	ΕΥΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
CDKN2A_1 (%)	30	,1157	,0062	,1219	,014957	,0205957
CDKN2A_2 (%)	31	,0869	,0123	,0992	,025119	,0210022
CDKN2A_3 (%)	30	,2476	,0199	,2675	,065647	,0595225
CDKN2A_4 (%)	30	,2612	,0129	,2741	,059457	,0682228
RB1_2	40	,1341	,0068	,1409	,019835	,0261394
RB1_3	41	,1257	,0039	,1296	,012871	,0224495
RB1_4	40	,1158	,0028	,1186	,010200	,0201465
RB1_5	41	,3879	,0073	,3952	,027541	,0716195
RB1_6	40	,0123	,0041	,0164	,008215	,0024718
CDKN1A_1	18	,1715	,0107	,1822	,025389	,0397428
CDKN1A_2	18	,0221	,0061	,0282	,009683	,0055291
CDKN1A_3	17	,0246	,0051	,0297	,009241	,0061710
CDKN1A_4	17	,0227	,0107	,0334	,014171	,0054210
CDKN1A_5	17	,0262	,0057	,0319	,009435	,0063890
CDKN1A_6	17	,0332	,0062	,0394	,011435	,0077143
CDKN1A_7	17	,4148	,0234	,4382	,080129	,1147729
CDKN1A_8	17	,0320	,0042	,0362	,009676	,0099072
Valid N (listwise)	9					

Πίνακας 6: Περιγραφική στατιστική m value

Περιγραφική στατιστική						
	N	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	
CDKN2A_1 (%)	30		-7,32	-2,85	-6,40	0,78
CDKN2A_2 (%)	31		-6,33	-3,18	-5,53	0,77
CDKN2A_3 (%)	30		-5,62	-1,45	-4,20	1,06
CDKN2A_4 (%)	30		-6,26	-1,41	-4,53	1,24
RB1_2	40		-7,19	-2,61	-6,15	1,05
RB1_3	41		-8,00	-2,75	-6,88	1,05
RB1_4	40		-8,48	-2,89	-7,34	1,10
RB1_5	41		-7,09	-0,61	-6,25	1,33
RB1_6	40		-7,92	-5,91	-6,97	0,41
CDKN1A_1	18		-6,53	-2,17	-5,81	1,05
CDKN1A_2	18		-7,35	-5,11	-6,82	0,59
CDKN1A_3	17		-7,61	-5,03	-6,92	0,66
CDKN1A_4	17		-6,53	-4,85	-6,19	0,41
CDKN1A_5	17		-7,45	-4,92	-6,89	0,65
CDKN1A_6	17		-7,32	-4,61	-6,60	0,64
CDKN1A_7	17		-5,38	-0,36	-4,30	1,52
CDKN1A_8	17		-7,89	-4,73	-7,05	0,91
Valid N (listwise)	9					

Παραπάνω βλέπουμε τη συνοπτική παρουσίαση της συσχέτισης του ποσοστού μεθυλίωσης των γονιδίων που μελετήθηκαν (b value και m value, Πίνακας 5 και 6) με την διάγνωση του σταδίου της νόσου NAFLD. Στη πρώτη στήλη βλέπουμε τις θέσεις μεθυλίωσης για το κάθε γονίδιο, και στην δεύτερη στήλη βλέπουμε τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία εντοπίζεται η μεθυλίωση αυτή. Βλέπουμε ότι για το γονίδιο *CDKN1a* έχουμε αποτέλεσμα σε πολύ λιγότερα δείγματα (N = 18) σε σχέση με τα γονίδια *Rb* (N=41) και *CDKN2a* (N=41). Αυτό συμβαίνει γιατί κάποια δείγματα είχαν και μικρή ποσότητα DNA αλλά και το DNA που υπήρχε, ήταν πολύ κατακερματισμένο με αποτέλεσμα να μην μας δώσουν προϊόν PCR. Το cfDNA δηλαδή εμφανίζεται με τη μορφή θραυσμάτων που μπορεί να είναι μονομερή (1 νουκλεοσώμα), διμερή (2 νουκλεοσώματα), τριμερή (3 νουκλεοσώματα), κ.ο.κ. Παρακάτω παρατίθεται μια εικόνα (Εικόνα 20) που δείχνει ένα πήκτωμα από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR και βλέπουμε ότι αρκετά δείγματα δεν έδωσαν προϊόν στη PCR αντίδραση (απουσία αντίστοιχης ζώνης στο πήκτωμα).



Εικόνα 20: Παράδειγμα gel ηλεκτροφόρησης που αποδεικνύει ότι αρκετά δείγματα δεν έδωσαν προϊόν PCR.

Όσον αφορά τη συσχέτιση της διάγνωσης με τα ποσοστά μεθυλίωσης βλέπουμε ότι σε κάποια φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση αλλά χρειάζεται περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

Πίνακας 7: Συσχέτιση διάγνωσης με τους μεταβλητές ηλικία, φύλο, ΔΜΣ και κάπνισμα.

		Ηλικία	Φύλο	Κάπνισμα	ΔΜΣ	Διάγνωση
CDKN2A_1 (%)	Correlation Coefficient	,036	-,104	,096	,090	-,096
	Sig. (2-tailed)	,853	,593	,620	,641	,622
	N	29	29	29	29	29
CDKN2A_2 (%)	Correlation Coefficient	,048	,124	,111	,159	-,154
	Sig. (2-tailed)	,802	,515	,561	,401	,418
	N	30	30	30	30	30
CDKN2A_3 (%)	Correlation Coefficient	,139	,186	,006	-,042	-,239
	Sig. (2-tailed)	,472	,335	,976	,827	,212
	N	29	29	29	29	29
CDKN2A_4 (%)	Correlation Coefficient	-,115	,425	-,033	,075	-,357
	Sig. (2-tailed)	,551	,022	,867	,699	,058
	N	29	29	29	29	29
RB1_2	Correlation Coefficient	-,228	,223	,080	-,015	-,399
	Sig. (2-tailed)	,162	,172	,626	,927	,012
	N	39	39	39	39	39
RB1_3	Correlation Coefficient	,083	,037	-,017	-,053	-,135
	Sig. (2-tailed)	,611	,821	,917	,747	,405
	N	40	40	40	40	40
RB1_4	Correlation Coefficient	-,099	,119	,137	-,025	-,183
	Sig. (2-tailed)	,549	,471	,404	,882	,264
	N	39	39	39	39	39
RB1_5	Correlation Coefficient	-,193	-,033	,152	-,160	-,327
	Sig. (2-tailed)	,233	,842	,348	,324	,040
	N	40	40	40	40	40
RB1_6	Correlation Coefficient	,037	-,050	,151	,049	-,106
	Sig. (2-tailed)	,823	,761	,360	,767	,521
	N	39	39	39	39	39
CDKN1A_1	Correlation Coefficient	,102	,108	,288	,061	-,102
	Sig. (2-tailed)	,686	,670	,246	,810	,686
	N	18	18	18	18	18
CDKN1A_2	Correlation Coefficient	,169	,476	,282	,201	-,033
	Sig. (2-tailed)	,503	,046	,257	,424	,898
	N	18	18	18	18	18
CDKN1A_3	Correlation Coefficient	-,177	,337	-,136	,202	-,271
	Sig. (2-tailed)	,496	,186	,604	,436	,293
	N	17	17	17	17	17
CDKN1A_4	Correlation Coefficient	-,183	,469	,471	,271	-,062
	Sig. (2-tailed)	,481	,057	,056	,293	,813
	N	17	17	17	17	17
CDKN1A_5	Correlation Coefficient	-,115	,674	,080	,266	-,164
	Sig. (2-tailed)	,660	,003	,760	,302	,530
	N	17	17	17	17	17
CDKN1A_6	Correlation Coefficient	-,009	,433	,012	,193	-,011
	Sig. (2-tailed)	,974	,082	,962	,459	,966
	N	17	17	17	17	17
CDKN1A_7	Correlation Coefficient	-,093	,457	,471	,196	-,062
	Sig. (2-tailed)	,721	,065	,056	,451	,813
	N	17	17	17	17	17
CDKN1A_8	Correlation Coefficient	-,266	,446	,177	,385	-,424
	Sig. (2-tailed)	,302	,073	,497	,127	,090
	N	17	17	17	17	17

Στο παραπάνω Πίνακα 7 προσθέτουμε και άλλες παραμέτρους συγκεκριμένα την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και τον ΔΜΣ για να δούμε πώς η διάγνωση και τα ποσοστά μεθυσίας σχετίζονται με αυτές τις παραμέτρους. Και σε αυτόν τον πίνακα βλέπουμε ότι κάποια σχετίζονται όμως και πάλι δεν μπορούμε να βγάλουμε σαφή αποτελέσματα.

Στη συνέχεια εφαρμόζουμε το τεστ One Way ANOVA (Ανάλυση Διακύμανσης) για να διερευνήσουμε αν θα προκύψει τελικά κάποια συσχέτιση. Έγινε πρώτα έλεγχος ύπαρξης ακραίων τιμών και έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων. Έγινε αποδεκτό ότι τα δείγματα εμφανίζουν ομοιογένεια, δεν παρατηρούνται δηλαδή ακραίες τιμές και έχουν την ίδια περίπου τυπική απόκλιση αφού η τυπική απόκλιση σε όλα τα δείγματα παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 0,05). Έτσι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το τεστ ANOVA για περαιτέρω στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας (Πίνακας 8) περιγραφικής στατιστικής που σχετίζει τη διάγνωση με τα ποσοστά μεθυσίας σε κάθε θέση μεθυσίας του κάθε υπό μελέτη γονιδίου.

Πίνακας 8: Συσχέτιση διάγνωσης με τα ποσοστά μεθυσίας σε κάθε θέση μεθυσίας του κάθε υπό μελέτη γονιδίου.

		N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
CDKN2A_1 (%)	0	7	1,3571	,73828	,79	2,91
	1	12	1,0617	,22759	,62	1,57
	2	10	2,1480	3,53401	,75	12,19
	Total	29	1,5076	2,09497	,62	12,19
CDKN2A_2 (%)	0	7	2,2129	,86083	1,23	3,60
	1	13	2,7692	2,31230	1,31	9,92
	2	10	2,4770	2,61211	1,23	9,89
	Total	30	2,5420	2,12933	1,23	9,92
CDKN2A_3 (%)	0	7	9,5586	8,65896	2,72	26,75
	1	12	5,8492	3,38055	2,96	13,70
	2	10	5,7300	6,32298	1,99	23,30
	Total	29	6,7034	6,00801	1,99	26,75
CDKN2A_4 (%)	0	7	7,5043	7,18983	2,02	22,31
	1	12	8,0242	8,77952	1,91	27,41
	2	10	2,7290	,80407	1,29	3,83
	Total	29	6,0728	6,90680	1,29	27,41
CDKN2A mean%	0	7	5,1582	4,12513	1,69	13,21
	1	13	4,2567	2,64588	1,56	9,96
	2	10	3,2710	1,95366	1,49	7,13
	Total	30	4,1385	2,84935	1,49	13,21
RB1_2B	0	7	3,4243	4,73237	,86	14,09
	1	20	1,8430	2,20239	0,00	8,24
	2	13	1,3492	1,37522	,68	5,87
	Total	40	1,9593	2,62805	0,00	14,09
RB1_3B	0	7	1,0043	,65856	,50	2,42
	1	20	1,1850	1,72261	,44	8,33
	2	13	1,6577	3,40857	,39	12,96
	Total	40	1,3070	2,26987	,39	12,96
RB1_4B	0	7	,7914	,72628	,28	2,31
	1	20	1,4320	2,79105	0,00	11,86
	2	13	,4723	,13173	,29	,73
	Total	40	1,0080	2,01938	0,00	11,86
RB1_5B	0	7	1,2900	,77675	,77	2,99
	1	20	3,2630	8,57959	,74	39,52
	2	13	,9000	,12616	,73	1,15
	Total	40	2,1498	6,10308	,73	39,52
RB1_6B	0	7	,6957	,37916	0,00	1,19
	1	20	,8560	,29980	,41	1,64
	2	13	,7608	,15272	,62	1,21
	Total	40	,7970	,27775	0,00	1,64
RB mean%	0	7	1,5116	1,02772	,61	3,38
	1	19	1,7984	1,88890	,62	8,61
	2	13	1,0280	,69573	,60	3,18
	Total	39	1,4901	1,45958	,60	8,61
CDKN1A_1B	0	1	18,2200		18,22	18,22
	1	11	1,6109	,83290	1,10	3,73
	2	6	1,6267	,49249	1,07	2,24
	Total	18	2,5389	3,97428	1,07	18,22
CDKN1A_2B	0	1	1,3100		1,31	1,31
	1	11	1,0191	,69477	,61	2,82
	2	6	,8183	,13408	,63	1,05
	Total	18	,9683	,55291	,61	2,82
CDKN1A_3B	0	1	,7100		,71	,71
	1	10	1,0860	,76852	,60	2,97
	2	6	,6900	,16769	,51	,99
	Total	17	,9241	,61710	,51	2,97
CDKN1A_4B	0	1	1,1200		1,12	1,12
	1	10	1,5440	,68134	1,08	3,34
	2	6	1,2550	,15294	1,07	1,51
	Total	17	1,4171	,54210	1,07	3,34
CDKN1A_5B	0	1	,9200		,92	,92
	1	10	1,0620	,81692	,57	3,19
	2	6	,7500	,17855	,60	1,09
	Total	17	,9435	,63890	,57	3,19
CDKN1A_6B	0	1	,9700		,97	,97
	1	10	1,2750	,99141	,66	3,94
	2	6	,9533	,22607	,62	1,28
	Total	17	1,1435	,77143	,62	3,94
CDKN1A_7B	0	1	4,0300		4,03	4,03
	1	10	9,4910	14,00200	2,34	43,82
	2	6	6,2133	7,56314	2,53	21,62
	Total	17	8,0129	11,47729	2,34	43,82
CDKN1A_8B	0	1	,6900		,69	,69
	1	10	1,2210	1,24810	,51	3,62
	2	6	,5917	,15329	,42	,87
	Total	17	,9676	,99072	,42	3,62
CDKN1A mean%	0	1	3,4963		3,50	3,50
	1	11	2,1728	1,87233	,92	6,31
	2	6	1,6123	,87008	1,02	3,36
	Total	18	2,0595	1,57643	,92	6,31

Πίνακας 9: Συσχέτιση της διάγνωσης 0 (λιπώδες ήπαρ) με τις διαγνώσεις 1 (στεατοηπατίτιδα) και 2 (κίρρωση).

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
CDKN2A_1 (%)	1	0	-,29548	1,00562	,934
	2	0	,79086	1,04201	,653
CDKN2A_2 (%)	1	0	,55637	1,02875	,798
	2	0	,26414	1,08141	,953
CDKN2A_3 (%)	1	0	-3,70940	2,85265	,325
	2	0	-3,82857	2,95588	,328
CDKN2A_4 (%)	1	0	,51988	3,18200	,979
	2	0	-4,77529	3,29715	,258
CDKN2A mean%	1	0	-,90148	1,33960	,710
	2	0	-1,88721	1,40818	,304
RB1_2B	1	0	-1,58129	1,13976	,269
	2	0	-2,07505	1,21672	,155
RB1_3B	1	0	,18071	1,01693	,973
	2	0	,65341	1,08559	,743
RB1_4B	1	0	,64057	,88829	,660
	2	0	-,31912	,94827	,907
RB1_5B	1	0	1,97300	2,70366	,654
	2	0	-,39000	2,88621	,984
RB1_6B	1	0	,16029	,12189	,301
	2	0	,06505	,13011	,811
RB mean%	1	0	,28685	,64397	,846
	2	0	-,48357	,68281	,670

Εδώ εξετάζουμε τη συσχέτιση μεταξύ της διάγνωσης 0 και των διαγνώσεων 1 και 2 όσον αφορά το ποσοστό μεθυλίωσης των γονιδίων. Βλέπουμε και πάλι ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p > 0,05$). Αξιοσημείωτο είναι το γονίδιο *CDKN1a* δεν έδωσε αποτελέσματα στο ANOVA τεστ και ο λόγος είναι, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στον παραπάνω πίνακα της περιγραφικής στατιστικής, ότι υπάρχει μόνο ένα δείγμα με διάγνωση 0 για το γονίδιο αυτό.

Στο επόμενο βήμα γίνεται συσχέτιση της μεθυλίωσης με το στάδιο της νόσου λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη φορά και ως συμπαραγόντες τις μεταβλητές ηλικία, φύλο και ΔΜΣ (παράγοντες που συνεπηρεάζουν τη διάγνωση). Χρησιμοποιήθηκε γραμμικό μοντέλο συσχέτισης του ποσοστού

μεθυλίωσης για κάθε CpG θέση μεθυλίωσης με το στάδιο της νόσου. Ως ανεξάρτητη μεταβλητής υπολογίστηκε το m value της μεθυλίωσης από το τύπο $b = 2^m / 1 + 2^m$ για λόγους κανονικοποίησης της κατανομής. Παρατηρείται αρνητική συσχέτιση μεταξύ του σταδίου της νόσου και του ποσοστού μεθυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων μεθυλίωσης των γονιδίων *CDKN1a* (θέση 1) και *CDKN2a* (θέση 3 και 4) όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10, 11, 12)

Πίνακας 10 : Γονίδιο *CDKN2a*, θέση μεθυλίωσης 3.

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-8,011	1,804		-4,441	,000
	Age	,063	,021	,671	3,084	,005
	Sex	,520	,387	,250	1,342	,192
	BMI	,024	,039	,123	,617	,543
	Diagnosis	-,894	,292	-,654	-3,062	,005

a. Dependent Variable: CDKN2A_3 (%)

Πίνακας 11: Γονίδιο *CDKN2a*, θέση μεθυλίωσης 4

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-6,192	2,028		-3,053	,005
	Age	,039	,023	,347	1,681	,106
	Sex	1,344	,435	,547	3,088	,005
	BMI	-,011	,044	-,049	-,258	,798
	Diagnosis	-,863	,328	-,533	-2,629	,015

a. Dependent Variable: CDKN2A_4 (%)

Πίνακας 12: Γονίδιο *CDKN1a*, θέση μεθυλίωσης 1

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	-6,688	2,374		-2,817	,015
Age	,034	,025	,424	1,374	,193
Sex	,419	,540	,205	,775	,452
BMI	-,001	,051	-,005	-,019	,985
Diagnosis	-1,124	,535	-,618	-2,099	,056

a. Dependent Variable: CDKN1A_1

Ενώ για το Rb δεν προέκυψε κανένας στατιστικά σημαντικός συσχετισμός ούτε για κάθε θέση μεμονωμένα ούτε και για το μέσο όρο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για το σκοπό της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 50 δείγματα DNA από ασθενείς σε διάφορα στάδια της NAFLD. Παρόλα αυτά, δεν μας έδωσαν αποτέλεσμα όλα τα δείγματα. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι το DNA που απομονώθηκε ήταν cell free DNA, κατακερματισμένο δηλαδή DNA που εντοπίζεται με τη μορφή μονομερών, μικρών μορίων μεγέθους συνήθως 100 έως 200 ζεύγη βάσεων. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολο το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών, κατά τη διαδικασία ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων. Δηλαδή στα δείγματα όπου ο εκκινητής των γονιδίων δεν κατάφερε να συνδεθεί με το τμήμα του DNA, που έπρεπε να ενισχυθεί, δεν παράγεται προϊόν PCR. Οπότε τέτοια δείγματα δεν έδωσαν αποτελέσματα στην διαδικασία του Pyrosequencing. Αυτό αντανακλάται στη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στα υπό μελέτη γονίδια όσον αφορά το σύνολο των δειγμάτων που έδωσαν αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6, για το γονίδιο *CDKN2a* από το σύνολο των δειγμάτων (N=50), τα 31 περίπου δείγματα έδωσαν αποτέλεσμα. Ο αντίστοιχος αριθμός για τα άλλα δύο γονίδια είναι 41 για το *Rb* και 18 για το *CDKN1a*. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος των τμημάτων που ενισχύονται με τη PCR ανά γονίδιο και προκύπτουν ως αποτέλεσμα της κατάτμησης του cfDNA. Έτσι το αμπλικόνιο

του *Rb* που έδωσε αποτέλεσμα σε όλα σχεδόν τα δείγματα έχει μικρότερο μέγεθος (148 bp) σε σχέση με το αμπλικόνιο του *CDKN2a* (199 bp) που έδωσε αποτέλεσμα σε λιγότερα δείγματα. Ενώ το αμπλικόνιο του *CDKN1a* (202 bp) έδωσε ακόμη λιγότερα αποτελέσματα. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι το μεγαλύτερο αμπλικόνιο «δυσκολεύεται» να βρει μεγάλο τμήμα DNA για να μπορέσει να υβριδιστεί και να δώσει προϊόν PCR.

Μια γενική παρατήρηση που μπορεί να γίνει με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης εργασίας είναι ότι σε όλα τα δείγματα τα γονίδια εμφανίζονται υπομεθυλιωμένα αλλά υπάρχει μια διαφοροποίηση ανάμεσα στα διαφορετικά στάδια της νόσου που αντιστοιχούν και στα διαφορετικά στάδια της διάγνωσης (0= λιπώδες ήπαρ, 1= στεατοηπατίτιδα, 2= κίρρωση ήπατος). Το συμπέρασμα αυτό στηρίζεται από δεδομένα που έχουμε αντλήσει από τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι επιγενετικές αλλοιώσεις εμπλέκονται στη ρύθμιση του ηπατικού μεταβολισμού των λιπιδίων, στην αντίσταση στην ινσουλίνη, στη μιτοχονδριακή βλάβη, στην απόκριση του οξειδωτικού στρες και στην απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, τα οποία έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD (Sun et al. 2015). Γνωρίζουμε επίσης ότι η νόσος NAFLD σχετίζεται με αλλαγές στο μεταγραφικό επίπεδο που επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση και τον φαινότυπο των κυττάρων του ήπατος (Lee et al. 2014). Ολοένα αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η μεθυλίωση του ηπατικού DNA και η αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με NAFLD είναι κρίσιμοι παράγοντες για τη μετατροπή από απλή στεάτωση σε σοβαρή ινωτική NASH (Tian et al. 2013). Μια μελέτη μεθυλώματος (methyloome) και μεταγραφώματος διαπίστωσε ότι υπάρχουν διαφορές στη μεθυλίωση γονιδίων οι οποίες μπορεί να διακρίνουν τους ασθενείς με προχωρημένο NASH από την απλή στεάτωση (Murphy et al. 2013) και συγκεκριμένα δείχθηκε ότι τα γονίδια σε ανθρώπινο ήπαρ με προχωρημένο NAFLD ήταν γενικά υπομεθυλιωμένα σε σχέση με αυτά σε ήπαρ με ήπιο NAFLD. Τέτοιες ολοκληρωμένες μελέτες έχουν αποκαλύψει τον κρίσιμο ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην εξέλιξη της NAFLD.

Στη συγκεκριμένη εργασία ,σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα που δείχνουν ότι είχαμε μόνο για

τρεις συγκεκριμένες θέσεις μεθυλίωσης , από τις οποίες οι δύο ανήκουν στο γονίδιο *CDKN2a* και η μια στο γονίδιο *CDKN1a*. Όλες οι υπόλοιπες θέσεις όπως και ο μέσος όρος μεθυλίωσης δεν έδειξε κάποια συσχέτιση. Για το γονίδιο *Rb* καμία από τις θέσεις ούτε και ο μέσος όρος έδειξαν συσχέτιση. Τα υπό μελέτη γονίδια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σχετίζονται με τη κυτταρική γήρανση και η υπομεθυλίωσή τους οδηγεί σε υπερέκφρασή τους με αποτέλεσμα να προάγεται η κυτταρική γήρανση των ηπατοκυττάρων στην περίπτωση της νόσου NALFD. Και όπως ήταν αναμενόμενο η υπομεθυλίωση εμφανίζεται από το πρώτο στάδιο της νόσου και παρατηρείται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα πιο σοβαρά στάδια. Υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία που συσχετίζουν την υπερέκφραση του *CDKN1a* με την ανάπτυξη των ηπατοκυττάρων σε παθολογικές καταστάσεις (Dudley 2011). Επίσης *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα έδειξαν ότι η σίγαση του *CDKN2a* εμπόδιζε τη λιπογένεση και τη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ (Zhang et al. 2021) γεγονός που αναδεικνύει το σημαντικό ρόλο του γονιδίου στην εξέλιξη της NAFLD. Για το γονίδιο *Rb* δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία όσον αφορά τη συσχέτισή του με την εξέλιξη της NALFD, ωστόσο το *Rb* εμπλέκεται σε σημαντικό βαθμό στη γήρανση (Rayess et al. 2012).

Συμπερασματικά υπάρχει μια ένδειξη ότι τα γονίδια *CDKN1a* και *CDKN2a* άρα και η κυτταρική γήρανση παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της NAFLD και πιθανόν η μεθυλίωση των εκκινητών τους σε υγρές βιοψίες να αποτελεί βιοδείκτη για τον χαρακτηρισμό της σταδιοποίησης της νόσου. Έτσι προτείνεται επανάληψη του πειράματος με αύξηση του δειγματοχώρου και βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας του cfDNA των δειγμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed, Bulbul et al. "Adipose tissue and insulin resistance in obese." *Biomedicine & pharmacotherapy* = *Biomedecine & pharmacotherapie* vol. 137 (2021): 111315. doi:10.1016/j.biopha.2021.111315
2. Alix-Panabières, Catherine, and Klaus Pantel. "Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy." *Cancer discovery* vol. 6,5 (2016): 479-91. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483
3. Angeloni, Allegra, and Ozren Bogdanovic. "Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands." *Biochemical Society transactions* vol. 49,3 (2021): 1109-1119. doi:10.1042/BST20200695
4. Apovian, Caroline M. "Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden." *The American journal of managed care* vol. 22,7 Suppl (2016): s176-85.
5. Avgerinos, Konstantinos I et al. "Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives." *Metabolism: clinical and experimental* vol. 92 (2019): 121-135. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.001
6. Barnett, Matthew P G et al. "Low folate and selenium in the mouse maternal diet alters liver gene expression patterns in the offspring after weaning." *Nutrients* vol. 7,5 3370-86. 8 May. 2015, doi:10.3390/nu7053370
7. Bovolini, António et al. "Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors." *International journal of sports medicine* vol. 42,3 (2021): 199-214. doi:10.1055/a-1263-0898
8. Bruce, Kimberley D, and Felino R Cagampang. "Epigenetic priming of the metabolic syndrome." *Toxicology mechanisms and methods* vol. 21,4 (2011): 353-61. doi:10.3109/15376516.2011.559370
9. Catalán, Victoria et al. "Time to Consider the "Exposome Hypothesis" in the Development of the Obesity Pandemic." *Nutrients* vol. 14,8 1597. 12 Apr. 2022, doi:10.3390/nu14081597

10. Chan, K C Allen et al. "Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing." *Clinical chemistry* vol. 59,1 (2013): 211-24. doi:10.1373/clinchem.2012.196014
11. Cobbina, Enoch, and Fatemeh Akhlaghi. "Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters." *Drug metabolism reviews* vol. 49,2 (2017): 197-211. doi:10.1080/03602532.2017.1293683
12. Corcoran, Ryan B, and Bruce A Chabner. "Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment." *The New England journal of medicine* vol. 379,18 (2018): 1754-1765. doi:10.1056/NEJMra1706174
13. Dawson, Sarah-Jane et al. "Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer." *The New England journal of medicine* vol. 368,13 (2013): 1199-209. doi:10.1056/NEJMoa1213261
14. De Conti, Aline et al. "MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis." *Oncotarget* vol. 8,51 88517-88528. 1 Aug. 2017, doi:10.18632/oncotarget.19774
15. De Jesus, Dario F, and Rohit N Kulkarni. "'Omics' and 'epi-omics' underlying the β -cell adaptation to insulin resistance." *Molecular metabolism* vol. 27S,Suppl (2019): S42-S48. doi:10.1016/j.molmet.2019.06.003
16. Delaney, Colin et al. "Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1343 (2015): 249-64. doi:10.1007/978-1-4939-2963-4_19
17. Diaz, Luis A Jr, and Alberto Bardelli. "Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 32,6 (2014): 579-86. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011

18. Diehl, Frank et al. "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102,45 (2005): 16368-73. doi:10.1073/pnas.0507904102
19. Dongiovanni, Paola et al. "Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis." *BioMed research international* vol. 2015 (2015): 460190. doi:10.1155/2015/460190
20. Dudley, Kevin J et al. "Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation." *PloS one* vol. 6,7 (2011): e21662. doi:10.1371/journal.pone.0021662
21. Engelmann, Cornelius, and Frank Tacke. "The Potential Role of Cellular Senescence in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *International journal of molecular sciences* vol. 23,2 652. 7 Jan. 2022, doi:10.3390/ijms23020652
22. Giordano, Silvia, and Amedeo Columbano. "MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma?." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 57,2 (2013): 840-7. doi:10.1002/hep.26095
23. Grabuschnig, Stefan et al. "Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms." *International journal of molecular sciences* vol. 21,21 8062. 29 Oct. 2020, doi:10.3390/ijms21218062
24. Harrington, Colleen T et al. "Fundamentals of pyrosequencing." *Archives of pathology & laboratory medicine* vol. 137,9 (2013): 1296-303. doi:10.5858/arpa.2012-0463-RA
25. Herranz, Nicolás, and Jesús Gil. "Mechanisms and functions of cellular senescence." *The Journal of clinical investigation* vol. 128,4 (2018): 1238-1246. doi:10.1172/JCI95148
26. Hughes, Amy L et al. "Understanding the interplay between CpG island-associated gene promoters and H3K4 methylation." *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms* vol. 1863,8 (2020): 194567. doi:10.1016/j.bbagr.2020.194567

27. Iacobazzi, Vito et al. "Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool." *Molecular genetics and metabolism* vol. 110,1-2 (2013): 25-34. doi:10.1016/j.ymgme.2013.07.012
28. Isaeva, A P et al. *Voprosy pitaniia* vol. 87,1 (2018): 18-27. doi:10.24411/0042-8833-2018-10002
29. Jou, Janice et al. "Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease." *Seminars in liver disease* vol. 28,4 (2008): 370-9. doi:10.1055/s-0028-1091981
30. Judge, Ayesha, and Michael S Dodd. "Metabolism." *Essays in biochemistry* vol. 64,4 (2020): 607-647. doi:10.1042/EBC20190041
31. Karachaliou, Niki et al. "Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment." *Annals of translational medicine* vol. 3,3 (2015): 36. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.16
32. Kawai, Tatsuo et al. "Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity." *American journal of physiology. Cell physiology* vol. 320,3 (2021): C375-C391. doi:10.1152/ajpcell.00379.2020
33. Kolb, Hubert, and Stephan Martin. "Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes." *BMC medicine* vol. 15,1 131. 19 Jul. 2017, doi:10.1186/s12916-017-0901-x
34. Kriaucionis, Skirmantas, and Nathaniel Heintz. "The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain." *Science (New York, N.Y.)* vol. 324,5929 (2009): 929-30. doi:10.1126/science.1169786
35. Kung, Che-Pei, and Maureen E Murphy. "The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes." *The Journal of endocrinology* vol. 231,2 (2016): R61-R75. doi:10.1530/JOE-16-0324
36. Kustanovich, Anatoli et al. "Life and death of circulating cell-free DNA." *Cancer biology &*

- therapy vol. 20,8 (2019): 1057-1067. doi:10.1080/15384047.2019.1598759
37. Lee, Joo Ho et al. "Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition." *Nutrients* vol. 6,8 3303-25. 21 Aug. 2014, doi:10.3390/nu6083303
38. Li, Yuanyuan. "Modern epigenetics methods in biological research." *Methods (San Diego, Calif.)* vol. 187 (2021): 104-113. doi:10.1016/j.ymeth.2020.06.022
39. Liao, Wenjun et al. "Value of quantitative and qualitative analyses of circulating cell-free DNA as diagnostic tools for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." *Medicine* vol. 94,14 (2015): e722. doi:10.1097/MD.0000000000000722
40. Locke, Warwick J et al. "DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic." *Frontiers in genetics* vol. 10 1150. 14 Nov. 2019, doi:10.3389/fgene.2019.01150
41. Lorenz, Todd C. "Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies." *Journal of visualized experiments : JoVE* ,63 e3998. 22 May. 2012, doi:10.3791/3998
42. Lucci, Anthony et al. "Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study." *The Lancet. Oncology* vol. 13,7 (2012): 688-95. doi:10.1016/S1470-2045(12)70209-7
43. Maiti, Atanu, and Alexander C Drohat. "Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites." *The Journal of biological chemistry* vol. 286,41 (2011): 35334-35338. doi:10.1074/jbc.C111.284620
44. Mavrogiannaki, A N, and I N Migdalis. "Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data." *International journal of endocrinology* vol. 2013 (2013): 450639. doi:10.1155/2013/450639
45. McCracken, Emma et al. "Pathophysiology of the metabolic syndrome." *Clinics in*

- dermatology vol. 36,1 (2018): 14-20. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004
46. Moore, Lisa D et al. "DNA methylation and its basic function." *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology vol. 38,1 (2013): 23-38. doi:10.1038/npp.2012.112
47. Murphy, Susan K et al. "Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* vol. 145,5 (2013): 1076-87. doi:10.1053/j.gastro.2013.07.047.
48. Ndisang, Joseph Fomusi et al. "Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017." *Journal of diabetes research* vol. 2017 (2017): 1478294. doi:10.1155/2017/1478294
49. Ogrodnik, Mikolaj et al. "Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis." *Nature communications* vol. 8 15691. 13 Jun. 2017, doi:10.1038/ncomms15691
50. Palmer, Allyson K et al. "Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes." *Diabetologia* vol. 62,10 (2019): 1835-1841. doi:10.1007/s00125-019-4934-x
51. Palmirotta, Raffaele et al. "Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology." *Therapeutic advances in medical oncology* vol. 10 1758835918794630. 29 Aug. 2018, doi:10.1177/1758835918794630
52. Posner, Barry I. "Insulin Signalling: The Inside Story." *Canadian journal of diabetes* vol. 41,1 (2017): 108-113. doi:10.1016/j.jcjd.2016.07.002
53. Rayess, Hani et al. "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." *International journal of cancer* vol. 130,8 (2012): 1715-25. doi:10.1002/ijc.2731618
54. Rhim, Andrew D et al. "Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions." *Gastroenterology* vol. 146,3 (2014): 647-51. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.007
55. Robertson, K D, and A P Wolffe. "DNA methylation in health and disease." *Nature reviews*.

- Genetics vol. 1,1 (2000): 11-9. doi:10.1038/35049533
56. Romeo, Stefano et al. "Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease." *Nature genetics* vol. 40,12 (2008): 1461-5. doi:10.1038/ng.257
57. Ronaghi, M et al. "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science (New York, N.Y.)* vol. 281,5375 (1998): 363, 365. doi:10.1126/science. 281.5375.363
58. Saklayen, Mohammad G. "The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome." *Current hypertension reports* vol. 20,2 12. 26 Feb. 2018, doi:10.1007/s11906-018-0812-z
59. Salama, Rafik et al. "Cellular senescence and its effector programs." *Genes & development* vol. 28,2 (2014): 99-114. doi:10.1101/gad.235184.113
60. Saleh, Husain A, and Ahmad H Abu-Rashed. "Liver biopsy remains the gold standard for evaluation of chronic hepatitis and fibrosis." *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* vol. 16,4 (2007): 425-6.
61. Sanyal, Arun J et al. "Prospective Study of Outcomes in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The New England journal of medicine* vol. 385,17 (2021): 1559-1569. doi:10.1056/NEJMoa2029349
62. Shmulevich, Riva, and Valery Krizhanovsky. "Cell Senescence, DNA Damage, and Metabolism." *Antioxidants & redox signaling* vol. 34,4 (2021): 324-334. doi:10.1089/ars.2020.8043
63. Skene, Peter J, and Steven Henikoff. "Histone variants in pluripotency and disease." *Development (Cambridge, England)* vol. 140,12 (2013): 2513-24. doi:10.1242/dev.091439
64. Smith, Kristy Breuhl, and Michael Seth Smith. "Obesity Statistics." *Primary care* vol. 43,1 (2016): 121-35, ix. doi:10.1016/j.pop.2015.10.001
65. Sookoian, Silvia, and Carlos J Pirola. "Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol.

- 53,6 (2011): 1883-94. doi:10.1002/hep.24283
66. Stott, Shannon L et al. "Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer." *Science translational medicine* vol. 2,25 (2010): 25ra23. doi:10.1126/scitranslmed.3000403
67. Sun, Chao et al. "Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease." *International journal of molecular sciences* vol. 16,3 5161-79. 5 Mar. 2015, doi:10.3390/ijms16035161)
68. Tahiliani, Mamta et al. "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." *Science (New York, N.Y.)* vol. 324,5929 (2009): 930-5. doi:10.1126/science.1170116
69. Tan, Youwen et al. "A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease." *PloS one* vol. 9,8 e105192. 20 Aug. 2014, doi:10.1371/journal.pone.0105192
70. Tanase, Daniela Maria et al. "The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." *Journal of diabetes research* vol. 2020 3920196. 31 Jul. 2020, doi:10.1155/2020/3920196
71. Thierry, A R et al. "Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology." *Cancer metastasis reviews* vol. 35,3 (2016): 347-76. doi:10.1007/s10555-016-9629-x
72. Thrasher, Tyler, and Manal F Abdelmalek. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *North Carolina medical journal* vol. 77,3 (2016): 216-9. doi:10.18043/ncm.77.3.216
73. Tian, Yuan et al. "Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease." *Seminars in cancer biology* vol. 23,6 Pt B (2013): 471-82. doi:10.1016/j.semcancer.2013.08.010 .
74. Valastyan, Scott, and Robert A Weinberg. "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." *Cell* vol. 147,2 (2011): 275-92. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024

75. Van Herck, Mikhaïl A et al. "The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity." *Frontiers in immunology* vol. 10 82. 6 Feb. 2019, doi:10.3389/fimmu.2019.00082
76. Van 't Veer, Laura J et al. "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." *Nature* vol. 415,6871 (2002): 530-6. doi:10.1038/415530a
77. Wang, Li-jun et al. "Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high-fat diet." *The Journal of nutritional biochemistry* vol. 25,3 (2014): 329-36. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.11.007
78. Wu, Susan C, and Yi Zhang. "Active DNA demethylation: many roads lead to Rome." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 11,9 (2010): 607-20. doi:10.1038/nrm2950
79. Xu, Rui-Hua et al. "Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma." *Nature materials* vol. 16,11 (2017): 1155-1161. doi:10.1038/nmat4997
80. Yates, Kathy F et al. "Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* vol. 32,9 (2012): 2060-7. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252759
81. Zelber-Sagi, Shira et al. "Lifestyle changes for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a review of observational studies and intervention trials." *Therapeutic advances in gastroenterology* vol. 9,3 (2016): 392-407. doi:10.1177/1756283X16638830
82. Zhang, Lian et al. "Epigenetics in Health and Disease." *Advances in experimental medicine and biology* vol. 1253 (2020): 3-55. doi:10.1007/978-981-15-3449-2_1
83. Zhang, Zhi et al. "CDKN2A deregulation in fatty liver disease and its accelerative role in the process of lipogenesis." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* vol. 35,4 (2021): e21230. doi:10.1096/fj.202000683R