



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
SCHOOL OF MEDICINE



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Κ. ΚΟΥΚΟΥΤΣΗ

Ιατρός Γαστρεντερολόγος

Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας, Τομέας Παθολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ηράκλειο 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ (ΙΦΝΕ).....	6
1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	6
1.1. Ιστορική αναδρομή.....	7
1.2. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	8
2. Ελκώδης κολίτιδα.....	10
2.1 Κλινικά χαρακτηριστικά.....	10
2.1.1 Συμπτώματα και σημεία.....	10
2.1.2 Εντόπιση.....	12
2.1.3 Φυσική πορεία νόσου.....	12
2.2 Ταξινόμηση και δείκτες βαρύτητας νόσου.....	13
3. Νόσος Crohn.....	17
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά.....	17
3.1.1 Συμπτώματα και σημεία.....	17
3.1.2 Εντόπιση και έκφραση νόσου.....	18
3.2 Ταξινόμηση και δείκτες βαρύτητας νόσου.....	19
3.3 Φυσική πορεία νόσου.....	23
4. Διάγνωση ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου.....	24
5. Εξωεντερικές εκδηλώσεις.....	24
6. Γενικές αρχές θεραπευτικής προσέγγισης.....	28
II. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	30
1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	30

2. Ο ρόλος της γενετικής στην αιτιοπαθογένεια της ΙΦΝΕ.....	31
2.1 Ενδείξεις γενετικής προδιάθεσης.....	31
2.2 Μελέτες συσχέτισης (linkage mapping studies).....	33
2.3 GWAS και ΙΦΝΕ.....	35
2.4 GWAS μετα-αναλύσεις.....	36
2.5 Επιγενετική.....	39
2.6 Η επιγενετική ως γέφυρα μεταξύ περιβάλλοντος και γονιδιώματος.....	41
3. Εντερικός επιθηλιακός φραγμός.....	42
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	42
3.2 Ανοσολογική διαταραχή του επιθηλίου (NOD2 και αυτοφαγία)..	45
3.3 Διαταραχή διαπερατότητας και διαταραχή βλέννης.....	50
3.4 Διαταραχή ακεραιότητας επιθηλίου.....	51
3.5 Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (p-glycoprotein).....	51
3.5.1 Δομή, λειτουργία.....	52
3.5.2 Το γονίδιο ABCB1/MDR1.....	55
3.5.3 Επίδραση των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στην έκφραση και λειτουργικότητα της p - γλυκοπρωτεΐνης.....	59
3.5.4 Έκφραση και λειτουργικότητα p-γλυκοπρωτεΐνης στην ΙΦΝΕ.....	61
3.5.5 Πολυμορφισμοί γονιδίου ABCB1 και ΙΦΝΕ.....	65
III. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	72
4. Ρόλος p-γλυκοπρωτεΐνης στην φαρμακοκινητική, στην πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση και στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας.....	72
4.1 Συσχέτιση πολυμορφισμών ABCB1 με φαρμακοκινητική υποστρωμάτων.....	73

4.2 Αντικαρκινική θεραπεία.....	76
4.3 Συσχέτιση πολυμορφισμών ABCB1 με ανθεκτική στην θεραπεία ΙΦΝΕ.....	79
5. Θειοπουρίνες και ΙΦΝΕ.....	82
5.1 Γενικά στοιχεία και ανεπιθύμητες ενέργειες.....	82
5.1.1 Τοξικότητα μυελού οστών.....	85
5.1.2 Ηπατοτοξικότητα.....	88
5.1.3 Τοξικότητα παγκρέατος.....	90
5.1.4 Γαστρεντερικές διαταραχές.....	91
5.2 TPMT	92
5.2.1 Το γονίδιο και απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί...95	
5.2.2 Συσχέτιση πολυμορφισμών TPMT με την ανταπόκριση στην αγωγή με θειοπουρίνες στην ΙΦΝΕ.....	100
5.2.3 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου και κλινικές εφαρμογές.....	103

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

IV. ΣΚΟΠΟΣ	107
V. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	109
6. Πληθυσμός μελέτης	109
6.1 Κλινική έρευνα: ενημέρωση-συλλογή υλικού.....	109
6.2 Μεθοδολογία κλινικής έρευνας – μελέτης.....	111
6.3 Ασθενείς, ομάδα ελέγχου για μελέτη γενετικής συσχέτισης....	114
7. Υλικά και μέθοδοι	116
7.1 Απομόνωση DNA.....	116
7.2 Τεχνική PCR-RFLP.....	118
7.3 Ανάλυση του πολυμορφισμού G238C (rs1800462) του γονιδίου TPMT.....	120
7.4 Ανάλυση του πολυμορφισμού G460A (rs1800460) του γονιδίου TPMT	123
7.5 Ανάλυση του πολυμορφισμού A719G (rs1142345) του γονιδίου TPMT	125
7.6 Ανάλυση των πολυμορφισμών C3435T (rs1045642), G2677T/A (rs2032582) του γονιδίου ABCB1/MDR1.....	127
7.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	131
8. Στατιστική ανάλυση	139
VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	140
9. Γενετική ανάλυση γονιδίου TPMT	141
9.1 Συσχέτιση γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.....	141
9.2 Συσχέτιση πολυμορφισμών με την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών κατά την λήψη αζαθειοπρίνης.....	144
10. Γενετική ανάλυση γονιδίου ABCB1/MDR1	146

10.1 Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.....	149
10.2 Οι πολυμορφισμοί C3435T και G2677A δεν σχετίζονται με την εκδήλωση νόσου.....	150
10.3 Οριακή στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού G2677T με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας.....	151
10.4 Συσχέτιση πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A με την ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή.....	151
VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	154
11. TPMT.....	154
12. ABCB1/MDR1.....	159
VIII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
IX. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	167
X. ABSTRACT.....	170
XI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	173

Ι. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου περιλαμβάνει νοσολογικές οντότητες οι οποίες χαρακτηρίζονται από χρόνια ή και υποτροπιάζουσα ανοσολογική διέγερση και φλεγμονή της γαστρεντερικής οδού. Οι δύο κύριες μορφές της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου είναι η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος Crohn. Άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, με αυξανόμενη συχνότητα, οι οποίες μπορούν να συμπεριληφθούν είναι οι μικροσκοπικές κολίτιδες όπως η κολλαγονική και η λεμφοκυτταρική κολίτιδα (1). Η ΙΦΕΝ διαδράμει σε μια χρόνια πορεία με εξάρσεις και υφέσεις και μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική νοσηρότητα μακροπρόθεσμα, ενώ, με τα έως τώρα δεδομένα, δεν υπάρχει οριστική θεραπεία (2).

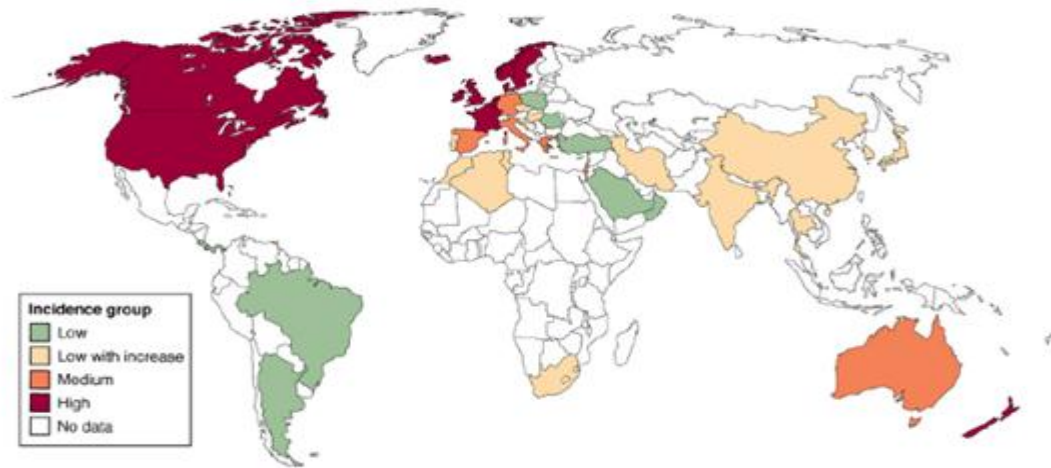
Οι δύο κύριες μορφές της Ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου μοιράζονται αρκετά κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και αρκετές φορές είναι δύσκολος ο διαχωρισμός τους στην κλινική πράξη, γεγονός απαραίτητο για την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας. Το ποσοστό της αταξινόμητης κολίτιδας μπορεί να φτάσει και στο 10% στους ασθενείς με ΙΦΕΝ κολίτιδα (3).

1.1. Ιστορική αναδρομή

Αρχικά, ο Ιπποκράτης στο βιβλίο του «Περί επιδημιών» περιγράφει παθήσεις του εντέρου, ενώ σε μια από αυτές αναφέρεται ως «τους τεινεσμούς τάσεις ούσας σφοδράς επί της κατά το απευθυσμένον ελκώσεως». Στα 300 π.χ. υπάρχει επίσης αναφορά σε νόσο όμοια με την περιγραφή της ελκώδους κολίτιδας από τον Αρεταίο της Καπαδοκίας.

Στα 1813 περιγράφηκε μια πιθανή περίπτωση νόσου Crohn από τους Combe και Saunders, ενώ στα 1828 από τον Abercrombie περιγράφηκαν επίσης περιπτώσεις ασθενών με νόσο τελικού ειλεού. Η κλασική αναλυτική περιγραφή της πάθησης που πήρε τελικά το όνομα του έγινε στα 1932 από τον Burrill B. Crohn (4). Όπως αναφέρεται στην εργασία του DeDombal (5), δεν θα μάθουμε ποτέ με βεβαιότητα ποιός περιέγραψε πρώτος την ελκώδη κολίτιδα. Ωστόσο, η πρώτη αναφορά στην νόσο με το όνομα της έγινε από τον Sir Samuel Wilks το 1859. Ακολούθως, τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου περιεγράφηκαν με λεπτομέρειες από τους Wilks και Moxon το 1875, τον Allchin το 1885 και Hole-White το 1888, ενώ έως το 1909 είχαν συλλεγεί περί τα 300 περιστατικά από τα νοσοκομεία του Λονδίνου (6). Καθοριστικό ρόλο στην διάγνωση και στην παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών με ΙΦΕΝ έπαιξε η ανακάλυψη των ενδοσκοπίων, αρχικά των άκαμπτων και αργότερα των εύκαμπτων.

1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα.



Εικόνα 1: Ο παγκόσμιος χάρτης της Ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου. Το κόκκινο χρώμα αναφέρεται σε ετήσια επίπτωση μεγαλύτερη από 10/100.000 άτομα, το πορτοκαλί σε επίπτωση 5-10/10⁵, το πράσινο σε επίπτωση >4/10⁵, το κίτρινο σε χαμηλά αλλά συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση. Απουσία χρώματος αντιστοιχεί σε απουσία στοιχείων.

Πηγή: (7) Jacques Cosnes, Corinne Gower-Rousseau, Philippe Seksik, Antoine Cortot. *Epidemiology and Natural History of Inflammatory bowel diseases. Gastroenterology* 2011;140:1785–1794

Η IBD είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως η νόσος των βιομηχανοποιημένων χωρών, με την επίπτωση της επίσης να αυξάνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από τον 19^ο αιώνα, η επίπτωση της IBD αυξάνεται σταθερά στην Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη (8). Συγκεκριμένα, για την ελκώδη κολίτιδα, στην Ευρώπη ήταν 24.3 ανά 100.000 άτομα-έτη, στην Ασία και Μέση Ανατολή 6.3 ανά 100.000 άτομα-έτη, ενώ στην Βόρεια Αμερική ήταν 19.2 ανά 100.000 άτομα-έτη. Για την CD, στην Ευρώπη η υψηλότερη ετήσια επίπτωση ήταν 12.7 ανά 100.000 άτομα-έτη, στην Ασία και Μέση

Ανατολή ήταν 5.0 ανά 100.000 άτομα-έτη, ενώ στην Βόρεια Αμερική ήταν 20.2 ανά 100.000 άτομα-έτη. Όσον αφορά στον επιπολασμό, ο υψηλότερος αναφέρεται στην Ευρώπη (UC 505 ανά 100.000 άτομα, CD 322 ανά 100.000 άτομα) και στην Βόρεια Αμερική (UC 249/100.000 άτομα, CD 322 ανά 100.000 άτομα). Σε βάθος χρόνου, το 75% των μελετών της νόσου Crohn και το 60% των μελετών της ελκώδους κολίτιδας έδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της επίπτωσης ($p < 0.5$). Πρόκειται συνεπώς για μια παγκόσμια νόσο αν και τα επιδημιολογικά δεδομένα από τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι περιορισμένα, η συχνότητα της οποίας ακολουθεί γεωγραφική κατανομή και παρουσιάζει μείωση από τον Βορρά στον Νότο και στα δύο ημισφαίρια και από την Δύση προς την Ανατολή (9,10).

Στην Ελλάδα, τα δεδομένα από τις έως τώρα επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν επίπτωση της ελκώδους κολίτιδας παρόμοια με αυτήν της Βόρειας Ευρώπης (11.2/10⁵ κατοίκους στην Κεντρική Ελλάδα, 8.9/10⁵ κατοίκους στην Κρήτη και 4.0/10⁵ κατοίκους στην Βορειοδυτική Ελλάδα) (11-13).

Για την νόσο Crohn, η επίπτωση είναι μικρότερη στην Βορειοδυτική Ελλάδα (0,3/10⁵ κατοίκους) σε σχέση με αυτή των χωρών της Βόρειας Ευρώπης (11, 14), ενώ στην Κρήτη η επίπτωση της νόσου Crohn, σύμφωνα με προοπτική μελέτη 5ετίας, είναι υψηλότερη από εκείνη της Βορειοδυτικής Ελλάδας (3.8/10⁵ κατοίκους το 1994) (15).

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος στα παιδιά παρουσιάζει λίγο διαφορετική κατανομή, με την νόσο Crohn να υπερισχύει της ελκώδους κολίτιδας. (16). Σε μια πρόσφατη μελέτη από την Σουηδία, η επίπτωση της CD ήταν 9.2 ανά 100.000 άτομα-έτη, ενώ κατά την ίδια περίοδο η επίπτωση της UC ήταν 2.8/100.000

άτομα-έτη (17). Παρόμοια επίπτωση έχει αναφερθεί και σε μελέτες που έγιναν στον Καναδά (18), στην Νορβηγία (19) και την Φιλανδία (20).

Από μελέτες σε μετανάστες έχει δειχθεί ότι η μετανάστευση από περιοχή με χαμηλή επίπτωση IBD σε περιοχή με υψηλή επίπτωση αυξάνει το σχετικό κίνδυνο του ατόμου. Αυτό σημαίνει ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση IBD. Σε μελέτες που έγιναν σε μετανάστες Ισπανούς σε άλλες χώρες, σημειώθηκε αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης IBD με την μετανάστευση σε Ευρωπαϊκές χώρες με Δυτικό τρόπο ζωής αλλά όχι με την μετανάστευση στην Λατινική Αμερική. (21)

Όσον αφορά στην κατανομή στα δύο φύλα, έχει δειχθεί σε πολλαπλές μελέτες ότι η επίπτωση είναι παρόμοια σε άνδρες και γυναίκες. Είναι συχνότερη την 2^η και 4^η δεκαετία της ζωής και η επίπτωση ξανά είναι υψηλή στην 6^η δεκαετία.

Συγκεκριμένα στους ηλικιωμένους ασθενείς, η επίπτωση της UC είναι υψηλότερη, συνήθως είναι άνδρες ασθενείς με αριστερή UC. (22)

2. Ελκώδης κολίτιδα

2.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών.

2.1.1 Συμπτώματα και σημεία

Οι ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα μπορούν να παρουσιάσουν με ποικίλες κλινικές εικόνες, ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου και την έκταση της. Γενικά στην νόσο αυτή, η βαρύτητα των συμπτωμάτων σχετίζεται με την βαρύτητα της

νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών στους οποίους τα ενδοσκοπικά ευρήματα είναι συμβατά με ενεργό νόσο, ενώ αυτοί είναι ασυμπτωματικοί. Συνήθως η νόσος εισβάλλει αργά και ύπουλα ενώ το μέσο διάστημα από την έναρξη των συμπτωμάτων μέχρι την διάγνωση είναι 9 μήνες. Ορισμένοι ασθενείς είναι δυνατόν να παρουσιαστούν με εικόνα που ομοιάζει οξείας λοιμώδους κολίτιδας, ενώ δεν είναι ασυνήθιστη η εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας μετά από τεκμηριωμένη λοιμώδη κολίτιδα από *Salmonella* ή *Cl. Difficile*. (1) Τα τυπικά συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν διαρροϊκό σύνδρομο με πρόσμιξη αίματος, κοιλιακό άλγος, τινεσμό και έπειξη προς αφόδευση, ενώ σε σοβαρή νόσο προστίθενται και συστηματικά συμπτώματα, όπως κακουχία, πυρετός, ταχυκαρδία και απώλεια βάρους (23). Οι ασθενείς με εντοπισμένη νόσο στον πρωκτό (πρωκτίτιδα) μπορεί να εκδηλώσουν δυσκοιλιότητα ή σκληρά κόπρανα (24).

Τα ευρήματα κατά την κλινική εξέταση ασθενούς με ελκώδη κολίτιδα εξαρτώνται από την βαρύτητα της νόσου. Συγκεκριμένα, σε νόσο ήπια και μέτριας βαρύτητας τα ευρήματα είναι ελάχιστα, όπως ευαισθησία κατά την ψηλάφηση της κοιλίας σύστοιχα με το πάσχον τμήμα του παχέος εντέρου, ενώ κατά την δακτυλική εξέταση μπορεί να υπάρχει ευαισθησία ή και αίμα στα κόπρανα. Σε σοβαρή νόσο έχουμε πυρετό και ταχυκαρδία, ωχρότητα, λόγω αναιμίας, οίδημα και σημεία υποθρεψίας, εάν η νόσος διαδράμει χρονίως χωρίς θεραπεία. Στα παιδιά, η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με διαταραχή της ανάπτυξης (25). Επιπλέον είναι απαραίτητη και η αναζήτηση σημείων εξωεντερικών εκδηλώσεων της νόσου, τα οποία θα αναφερθούν εκτενώς.

2.1.2 Εντόπιση νόσου

Η φλεγμονή στην ελκώδη κολίτιδα περιορίζεται στο παχύ έντερο.

Περιλαμβάνει το ορθό στο 95% των περιπτώσεων και οι βλάβες εκτείνονται εγγύτερα και είναι συνεχείς (26).

Η νόσος μπορεί να αφορά όλο το κόλον ή τμήμα του, ενώ σε λίγους ασθενείς μπορεί να συμμετέχει στην φλεγμονή και ο τελικός ειλεός (backwash ileitis), κάνοντας την διαφοροδιάγνωση από την Crohn ελαιοκολίτιδα εξαιρετικά δύσκολη. Συνήθως η νόσος εντοπίζεται στο ορθό, στο 30-60% των ασθενών (πρωκτίτιδα), στο αριστερό κόλον (έως την σπληνική καμπή) σε ποσοστό 16-40% (αριστερή κολίτιδα) ενώ σε ποσοστό που κυμαίνεται από 18-35% σε διάφορες μελέτες, η νόσος είναι εκτεταμένη, με βλάβες εγγύτερα της σπληνικής καμπής (27). Επιπλέον, η έκταση της νόσου σε κάθε ασθενή μπορεί να μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου. Σε ασθενείς με ορθίτιδα ή αριστερή κολίτιδα, η νόσος μπορεί να επεκταθεί σε εγγύτερα τμήματα του εντέρου. Η έκταση της νόσου επηρεάζει τόσο την κλινική πορεία όσο και την πρόγνωση (28).

2.1.3 Φυσική πορεία νόσου

Η πλειονότητα των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα ακολουθεί μια χρόνια πορεία με εξάρσεις και υφέσεις. Το ποσοστό των ασθενών με συνεχή χρόνια συμπτώματα μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η νόσος προκαλεί την μέγιστη επιβάρυνση τα πρώτα χρόνια μετά την διάγνωση, ιδιαίτερα σε εκτεταμένη και σοβαρή κολίτιδα. Μετά, η πιθανότητα χειρουργικής θεραπείας μειώνεται

δραματικά και η επιβίωση των ασθενών δεν διαφέρει από τον γενικό πληθυσμό. Οι περισσότεροι ασθενείς διάγουν μια φυσιολογική ζωή είτε με φαρμακευτική είτε με χειρουργική θεραπεία, η οποία εφαρμόζεται περίπου στο 20% των ασθενών στα πρώτα 10 χρόνια από την διάγνωση (29, 30). Στα πρώτα 10 χρόνια από την διάγνωση, το 67% των ασθενών θα παρουσιάσει τουλάχιστον ένα επεισόδιο υποτροπής, με το κάπνισμα και το μορφωτικό επίπεδο να αποτελούν παράγοντες κινδύνου (31). Οι ασθενείς με εκτεταμένη κολίτιδα και διάγνωση σε νεαρή ηλικία ή με συνοδό πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, έχουν αυξημένο κίνδυνο προόδου τής νόσου (32).

Επιπλέον, η θνητότητα στην ελκώδη κολίτιδα μειώνεται συνεχώς τα τελευταία 50 χρόνια, πιθανόν λόγω της προόδου στις θεραπευτικές μεθόδους, φαρμακευτικές και χειρουργικές, με αποτέλεσμα να μην διαφέρει από αυτήν του γενικού πληθυσμού (33). Τέλος, η νόσος χαρακτηρίζεται από αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου παχέος εντέρου, ενώ η χρήση των ανοσοκατασταλτικών έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λεμφώματος (34). Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη νεοπλασίας αποτελούν η νεαρή ηλικία διάγνωσης της νόσου, η μεγάλη διάρκεια (>10 έτη), η εκτεταμένη νόσος, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου και η συνοδός πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (35).

2.2 Ταξινόμηση και δείκτες βαρύτητας νόσου

Όπως είναι γνωστό, η ταξινόμηση της ελκώδους κολίτιδας με κριτήριο την έκταση της νόσου κατά την διάγνωση αλλά και κατά την διάρκεια του follow up, αλλά και ο καθορισμός της βαρύτητας με κλινικά και ενδοσκοπικά κριτήρια έχουν μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της κατάλληλης αντιμετώπισης αλλά και την πρόληψη μακροπρόθεσμων επιπλοκών όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου.

Η ταξινόμηση σύμφωνα με την έκταση της νόσου σε ακτινολογικό, ενδοσκοπικό ή ιστολογικό επίπεδο περιλαμβάνει τρεις υποομάδες:

1. Ελκώδης πρωκτίτιδα (E1): Αναφέρεται σε νόσο περιοριζόμενη στο ορθό, δηλαδή το εγγύς όριο της φλεγμονής βρίσκεται άπω της ορθοσιγμοειδικής συμβολής.

2. Αριστερή ελκώδης κολίτιδα (E2) (γνωστή και ως άπω ελκώδης κολίτιδα):

Αναφέρεται σε νόσο η οποία περιορίζεται στο τμήμα του εντέρου μεταξύ του ορθού και της σπληνικής καμπής.

3. Εκτεταμένη ελκώδης κολίτιδα (E3) (γνωστή και ως πανκολίτιδα): αναφέρεται σε νόσο η οποία εκτείνεται πέραν της σπληνικής καμπής (36).

Ένα μειονέκτημα αυτής της κατάταξης είναι η δυνατότητα μεταβολής της με την πάροδο του χρόνου. Ο πραγματικός κίνδυνος επέκτασης της πρωκτίτιδας εγγύτερα μετά από 10 χρόνια έχει υπολογιστεί μεταξύ 41% και 54%. Για την αριστερή κολίτιδα, η πιθανότητα προόδου σε εκτεταμένη κολίτιδα είναι ακόμη υψηλότερη.

Αν και δεν έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες, ακόμη και η διάγνωση της εκτεταμένης

ελκώδους κολίτιδας δεν παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου σε αρκετούς ασθενείς (37, 38).

Σύμφωνα με την κατάταξη του Montreal, η βαρύτητα της νόσου μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως εξής:

Πίνακας 1: Κατάταξη Montréal βαρύτητας ελκώδους κολίτιδας (ΕΚ)

<i>Βαρύτητα</i>		<i>Ορισμός</i>
S0	Κλινική ύφεση	Ασυμπτωματικός
S1	Ήπια νόσος	<4 κενώσεις /ημέρα με ή χωρίς αίμα, απουσία συστηματικής νόσου, φυσιολογικοί δείκτες φλεγμονής (CRP, ΤΚΕ)
S2	Μέτρια νόσος	>4 κενώσεις/ημέρα, με ελάχιστα σημεία συστηματικής νόσου
S3	Σοβαρή νόσος	Τουλάχιστον 6 αιματηρές κενώσεις/ημέρα, τουλάχιστον 90 σφύξεις/λεπτό, θερμοκρασία >37.5 °C Hgb <10g/100ml, ΤΚΕ >30mm/h.

Πηγή: (39).J Satsangi, M S Silverberg, S Vermeire, J-F Colombel. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut 2006;55:749–753.

Όσον αφορά στην ενδοσκοπική βαρύτητα της νόσου, επί του παρόντος χρησιμοποιούνται κυρίως 2 δείκτες, το Mayo score και ο δείκτης ενδοσκοπικής βαρύτητας της ελκώδους κολίτιδας (the ulcerative colitis endoscopic index of severity, UCEIS).

Το Mayo score το οποίο εισήχθη το 1987, περιλαμβάνει 4 κατηγορίες : 0: φυσιολογικός βλεννογόνος ή ανενεργή νόσος, 1: ήπια νόσος με ερύθημα, μείωση του αγγειακού δικτύου και ήπια ευθρυπτότητα, 2: μέτρια νόσος, με έντονο ερύθημα, απουσία αγγειακού δικτύου, με ευθρυπτότητα και διαβρώσεις και 3: σοβαρή νόσος με αυτόματη αιμορραγία και έλκη (40).

Ο δείκτης ενδοσκοπικής βαρύτητας της ελκώδους κολίτιδας (the ulcerative colitis endoscopic index of severity, UCEIS) εισήχθη στην κλινική πράξη το 2012 από τους Travis και συνεργάτες (41) και περιλαμβάνει βαθμολόγηση από (0-8) 3 υποκατηγοριών: Α) του αγγειακού δικτύου ως: φυσιολογικό (1), εξάλειψη κατά τόπους (2), πλήρης εξάλειψη αγγειακού δικτύου (3), Β) της αιμορραγίας ως: απουσία αιμορραγίας (1), βλεννογονική αιμορραγία (2), αιμορραγία εντός του αυλού ήπια (3), αιμορραγία εντός του αυλού μέτρια έως σοβαρή (4) και Γ) της παρουσίας διαβρώσεων και ελκών ως: απουσία (1), παρουσία διαβρώσεων (2) παρουσία επιφανειακών ελκών (3) και παρουσία σοβαρών ελκών (4).

3. Νόσος Crohn

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά

3.1.1 Συμπτώματα και σημεία

Η νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από χρόνια κοκκιωματώδη διατοιχωματική φλεγμονή, η οποία συνήθως αφορά σε διαφορετικά σημεία κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού.

Η κλινική εικόνα συνήθως χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ετερογένεια. Σε μερίδα ασθενών, τα συμπτώματα μπορεί να προϋπάρχουν για μήνες ή ακόμα και χρόνια πριν να τεθεί η διάγνωση της νόσου. Σε αυτούς τους ασθενείς, το έναυσμα ενεργοποίησης της καταστροφικής φλεγμονώδους διεργασίας μπορεί να μην είναι πλέον δυνατόν να εντοπιστεί. Τα συμπτώματα που συνήθως οδηγούν τον ασθενή στον ειδικό γιατρό είναι η διάρροια, κοιλιακό άλγος και απώλεια βάρους, αν και δεν είναι πάντοτε παρόντα. Σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να υπάρχει μόνο κοιλιακό άλγος. Επιπλέον, ο εντοπισμός φλεγμονής του ειλεού κατά την διενέργεια λαπαροτομής για την αντιμετώπιση οξείας σκληροκοιτίτιδας μπορεί να είναι η πρώτη εκδήλωση της νόσου, ενώ σε άλλους ασθενείς εξωεντερικές εκδηλώσεις, όπως αρθροπάθεια ή δερματολογικές διαταραχές όπως οζώδες ερύθημα μπορεί να εκδηλωθούν, χωρίς συμπτώματα από το έντερο (42).

Επιπρόσθετα, η εκδήλωση της νόσου στην πλειονότητα των παιδιών συνοδεύεται από απώλεια βάρους, η οποία είναι αποτέλεσμα της πλημμελούς πρόσληψης τροφής, της δυσασπορρόφησης, των αυξημένων απωλειών από το πεπτικό και

πιθανόν των αυξημένων αναγκών που προκύπτουν από την χρόνια φλεγμονή. Ενίοτε, οι ασθενείς αυτοί ενδεχομένως να διαγνωστούν ως πάσχοντες από νευρογενή ανορεξία εξαιτίας του φόβου σίτισης που προκύπτει από το γεγονός της επιδείνωσης των συμπτωμάτων με την λήψη τροφής. Επιπλέον, η καθυστέρηση της ανάπτυξης είναι ένα σταθερό χαρακτηριστικό της κλινικής συμπτωματολογίας, η οποία είναι αποτέλεσμα της χρόνιας κακής θρέψης λόγω ανεπαρκούς πρόσληψης, αυξημένων απωλειών και αυξημένων ενεργειακών αναγκών (43).

3.1.2 Εντόπιση και έκφραση νόσου

Λόγω της διατοιχωματικής επέκτασης της εντερικής φλεγμονής, η νόσος Crohn μπορεί να έχει διαφορετικές εκφάνσεις σε κάθε ασθενή, φλεγμονώδη, στενωτική, συριγγοποιό και περιπρωκτική οι οποίες μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό αλλάζουν κατά την φυσική πορεία της νόσου. Συγκεκριμένα, ενώ το 90% των ασθενών διαγιγνώσκονται με την φλεγμονώδη έκφραση της νόσου, η πιθανότητα εμφάνισης επιπλοκών όπως στενώσεις ή συρίγγια αυξάνει με την πάροδο του χρόνου.

Αντίθετα, η εντόπιση της νόσου μεταβάλλεται ελάχιστα κατά την διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών και μόνο 10-15% των ασθενών θα μεταβάλλουν την εντόπιση της νόσου τους κατά την δεκαετία μετά την διάγνωση. Είναι γνωστό ότι η νόσος προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα της γαστρεντερικής οδού, από το στόμα έως τον πρωκτό, ωστόσο προτιμά το άπω λεπτό έντερο και το εγγύς κόλον, με το 40-50% των ασθενών να έχουν τέτοια εντόπιση κατά την διάγνωση. Σε ένα 30%, η νόσος

εντοπίζεται μόνο στο λεπτό έντερο, ενώ ένα 30% ασθενών εκδηλώνουν αποκλειστικά νόσο στο παχύ έντερο. Πολύ σπάνια, τουλάχιστον σε Καυκάσιους, η νόσος προσβάλλει αποκλειστικά το ανώτερο πεπτικό (44, 45).

3.2 Ταξινόμηση και δείκτες βαρύτητας νόσου

Η κατάταξη των ασθενών με βάση την ηλικία διάγνωσης, την εντόπιση και την έκφραση της νόσου είναι απαραίτητη για τον καθορισμό της πρόγνωσης αλλά και της βέλτιστης θεραπείας. Κατά την διάρκεια του παγκόσμιου συνεδρίου Γαστρεντερολογίας στην Βιέννη το 1998 και αργότερα στο Μόντρεαλ το 2005 αναπτύχθηκε ένα σχήμα ταξινόμησης της νόσου το οποίο λαμβάνει υπόψη την ηλικία κατά την διάγνωση (A), την εντόπιση (L) και την έκφραση (B) της νόσου.

Κατά την ταξινόμηση του Μόντρεαλ, η ηλικία διάγνωσης επεκτάθηκε ώστε να περιλάβει εκτός από τις υπάρχουσες 2 κατηγορίες, την ηλικία κάτω των 16 ετών λόγω του ότι οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν διαφορετικά γενετικά και ορολογικά χαρακτηριστικά. Έτσι η σημερινή ταξινόμηση είναι: A1: ηλικία διάγνωσης μικρότερη των 16 ετών και A2: ηλικία διάγνωσης μεταξύ 17-40 ετών και A3: ηλικία διάγνωσης μεγαλύτερη των 40 ετών.

Όσον αφορά στην εντόπιση και λόγω του ότι η νόσος του ανώτερου πεπτικού μπορεί να συνυπάρχει με νόσο ειλεού, παχέως εντέρου και ειλεού και παχέως εντέρου, η κατηγορία L4: νόσος ανώτερου πεπτικού μπορεί πλέον να προστίθεται στις υπάρχουσες κατηγορίες. Τέλος, όσον αφορά στην έκφραση της νόσου, και με βάση την παρατήρηση ότι η περιπρωκτική νόσος δεν σχετίζεται απαραίτητα με

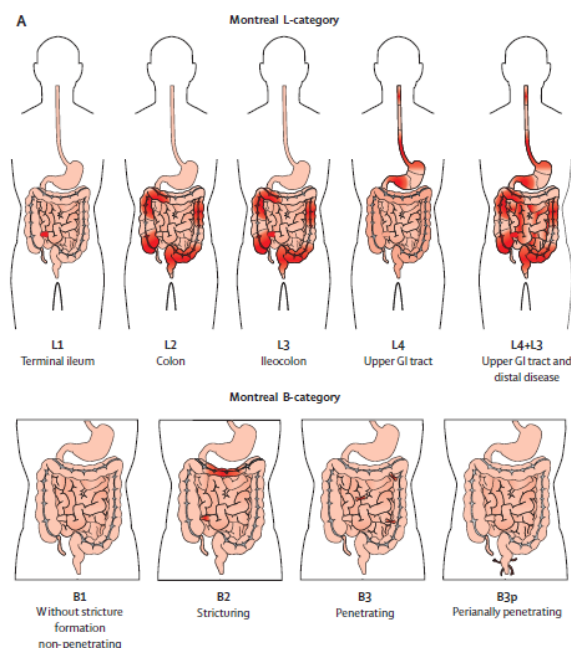
συριγγοποιό έκφραση της νόσου στο υπόλοιπο έντερο, κατά την ταξινόμηση του Μόντρεαλ προστέθηκε η κατηγορία p: περιπρωκτική νόσος, η οποία μπορεί να προστεθεί και στις υπόλοιπες κατηγορίες.

Πίνακας 2: Κατάταξη Βιέννης και Montreal εντόπισης και έκφρασης νόσου Crohn

	Vienna	Montreal
Age at diagnosis	A1 below 40 y A2 above 40 y	A1 below 16 y A2 between 17 and 40 y A3 above 40 y
Location	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 upper	L1 ileal L2 colonic L3 ileocolonic L4 isolated upper disease*
Behaviour	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating	B1 non-stricturing, non-penetrating B2 stricturing B3 penetrating p perianal disease modifier†

*L4 is a modifier that can be added to L1–L3 when concomitant upper gastrointestinal disease is present.
†“p” is added to B1–B3 when concomitant perianal disease is present.

Πηγή: (39) J Satsangi, M S Silverberg, S Vermeire, J-F Colombel *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications Gut* 2006;55:749–753.



Εικόνα 2: Φαινότυπος νόσου Crohn.

Πηγή: (46) Daniel C Baumgart, William J Sandborn Crohn's disease Lancet 2012; 380: 1590–1605.

Δείκτες βαρύτητας (κλινικοί και ενδοσκοπικοί)

Για την εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου Crohn, ο ευρέως αποδεκτός δείκτης είναι ο Δείκτης ενεργότητας της νόσου Crohn (Crohn's Disease Activity Index, CDAI). Για τον προσδιορισμό του, λαμβάνονται υπόψη τα ευρήματα της φυσικής εξέτασης, τα εργαστηριακά ευρήματα και τα συμπτώματα που αναφέρει ο ασθενής για τις προηγούμενες 7 ημέρες. Οι τιμές που μπορεί να λάβει κυμαίνονται ως εξής: <150 ορίζεται ως ύφεση, από 150-219 ήπια ενεργότητα, από 220-450 μέτρια ενεργότητα και 450> σοβαρή ενεργότητα.

Ο βραχύς CDAI αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο αναγνώρισης των συμπτωμάτων και εκτίμησης της ενεργότητας της νόσου, με χρήση μόνο ενός ερωτηματολογίου χωρίς την ανάγκη εργαστηριακών ή φυσικών ευρημάτων. Ο βραχύς CDAI λαμβάνει παρόμοιες τιμές με τον αρχικό CDAI.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ενεργότητα της συριγγοποιού νόσου Crohn, περιπρωκτικής ή μη, αναπτύχθηκε το 1995 από τους Irvine και συνεργάτες, ο δείκτης ενεργότητας της περιπρωκτικής νόσου, ο PDAI, ο οποίος εκτιμά 5 παραμέτρους: τις εκκρίσεις, το άλγος, τον περιορισμό της σεξουαλικής δραστηριότητας, τον τύπο της περιπρωκτικής νόσου και την παρουσία σκληρίας. Κάθε κατηγορία βαθμολογείται από 0 έως 5, με το 5 να υποδηλώνει βαρύτερη νόσο.

Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να εκτιμηθεί είναι η ποιότητα ζωής των ασθενών. Υπάρχουν 2 εργαλεία για τον σκοπό αυτό: Η Φόρμα κατάταξης των

ανησυχιών των ασθενών (the Rating Form of Inflammatory Bowel Disease Patient Concerns) και ο δείκτης IBDQ, ένα ερωτηματολόγιο που περιλαμβάνει 32 ερωτήσεις που αφορούν στα εξής: την λειτουργία του εντέρου, την συναισθηματική κατάσταση του ασθενούς, τα συστηματικά συμπτώματα και την κοινωνική λειτουργικότητα. Το σκορ κυμαίνεται από 32 έως 224 (47, 48).

Όσον αφορά στην εκτίμηση της βαρύτητας της ενδοσκοπικής εικόνας, συνήθως χρησιμοποιείται ο δείκτης ενδοσκοπικής βαρύτητας της νόσου Crohn (CDEIS), ο οποίος αναπτύχθηκε στα 1989 από την ομάδα GETAID (Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestive) και ο Ενδοσκοπικός Δείκτης της νόσου Crohn (SES-CD), ο οποίος είναι ένας απλοποιημένος CDEIS. Οι παράμετροι που εκτιμώνται είναι: η παρουσία ερυθήματος, κοκκίωσης, αφθωδών ελκών και ελκών ποικίλου μεγέθους και βάθους καθώς και συριγγίων και στενώσεων.

Επιπλέον, το σκόρ Rutgeerts χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μετεγχειρητικής ενδοσκοπικής υποτροπής, η βαρύτητα της οποίας φαίνεται να σχετίζεται με το ποσοστό της κλινικής υποτροπής. Όλοι οι ασθενείς που θα έχουν σοβαρή μετεγχειρητική ενδοσκοπική υποτροπή θα παρουσιάσουν κλινική υποτροπή σε διάστημα 4ετών (49, 50).

3.3 Φυσική πορεία νόσου

Παρά τις διαφοροποιήσεις που σημειώνονται όσον αφορά στην εκδήλωση και την αρχική πορεία της νόσου, φαίνεται ότι η μακροπρόθεσμη πρόγνωση είναι συνήθως σταθερή στους διάφορους ασθενείς. Σε μια σχετική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, κατά την διάγνωση περίπου το ένα τρίτο των ασθενών παρουσίαζε ειλεΐτιδα, κολίτιδα ή ειλεοκολίτιδα. Μετά 20 χρόνια, οι μισοί ασθενείς είχαν εκδηλώσει κάποια επιπλοκή. Σε παρατεταμένη ύφεση ήταν μόνο το 10% των ασθενών. Περίπου το ένα τρίτο χρειάστηκε θεραπεία με στεροειδή ενώ επίσης το ένα τρίτο οδηγήθηκε σε χειρουργική επέμβαση λόγω αποτυχίας της θεραπείας. Τέλος περίπου οι μισοί ασθενείς χρειάστηκαν χειρουργική επέμβαση 10 χρόνια μετά την διάγνωση. Η επίδραση των διαφόρων θεραπειών στην φυσική πορεία της νόσου είναι υπό μελέτη (45).

Ο καθορισμός παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν αρνητικά την φυσική πορεία και πρόγνωση των ασθενών με νόσο Crohn είναι σημαντικός, καθώς οι ασθενείς που είναι πιθανό να έχουν μια κακή πορεία και πρόγνωση θα πρέπει να αντιμετωπίζονται αρχικά πιο επιθετικά σε σχέση με τους ασθενείς που είναι πιθανότερο να έχουν μια πιο ομαλή πορεία. Η νεαρή ηλικία κατά την διάγνωση (μικρότερη από 40 έτη), η παρουσία περιπρωκτικής νόσου, η ανάγκη χορήγησης κορτικοειδών για την επίτευξη ύφεσης κατά την εκδήλωση της νόσου και η εντόπιση της νόσου στον ειλεό παρουσιάζονται από διάφορες μελέτες ως προγνωστικοί δείκτες δυσμενούς 5ετούς και 10ετούς πρόγνωσης (51).

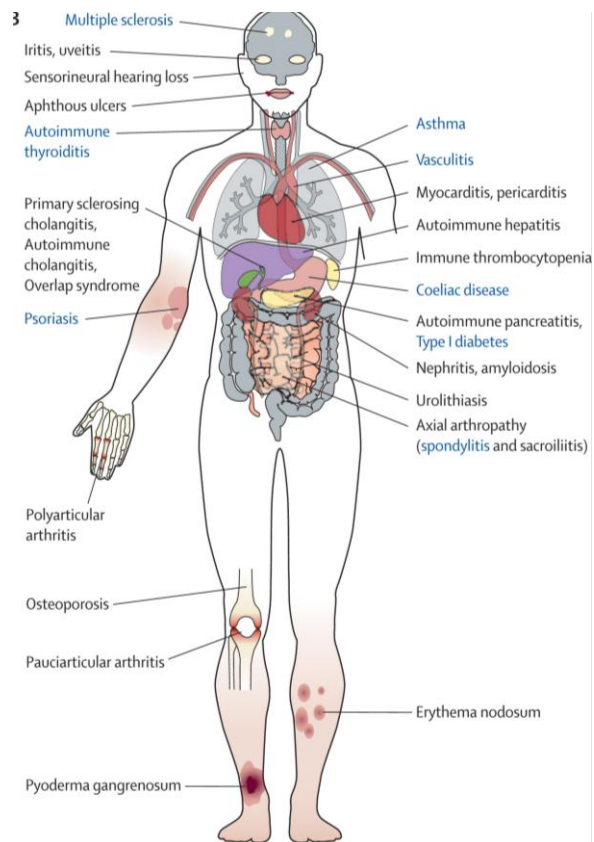
4 Διάγνωση

Η αρχική διάγνωση της φλεγμονώδους εντεροπάθειας θα πρέπει να βασίζεται στο ιστορικό και την κλινική εικόνα του ασθενούς, σε συνδυασμό με τα εργαστηριακά ευρήματα και τα ευρήματα από την ενδοσκόπηση, τις βιοψίες και την απεικόνιση. Δεν υπάρχει κάποιο χαρακτηριστικό εύρημα το οποίο να θέτει την διάγνωση (52, 53).

Ο ενδοσκοπικός έλεγχος θα πρέπει να γίνεται σε κάθε περίπτωση για την διάγνωση αλλά και τον καθορισμό της έκτασης της νόσου στην νόσο Crohn. Η λήψη βιοψιών παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες με την διαταραχή της αρχιτεκτονικής να επιβεβαιώνει την διάγνωση. Επιπλέον, ο έλεγχος με απεικονιστικές μεθόδους όπως είναι το διακοιλιακό υπερηχογράφημα και η μαγνητική ή αξονική εντερογραφία δίνει επιπρόσθετες πληροφορίες όσον αφορά στην έκφραση της νόσου Crohn (εντοπισμός στενώσεων ή συριγγίων) αλλά και στο εντοπισμό επιπλοκών όπως το τοξικό megacolon, η διάτρηση, η παρουσία αποστημάτων (54).

5. Εξωεντερικές εκδηλώσεις

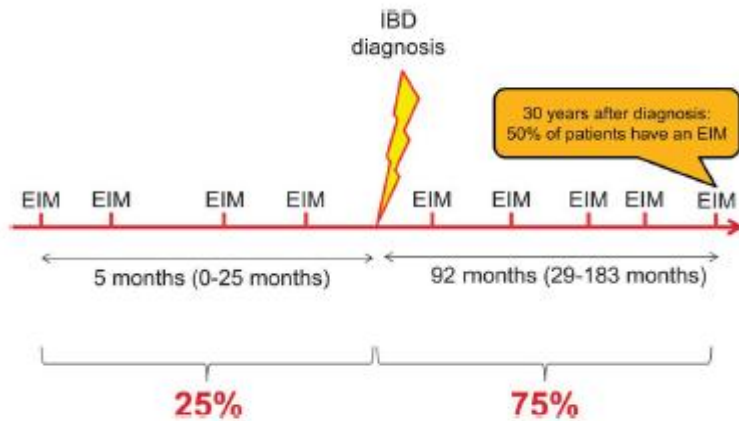
Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις οι οποίες μπορεί να συνοδεύουν την εκδήλωση φλεγμονώδους εντεροπάθειας επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής, την νοσηρότητα και την θνητότητα των ασθενών με ΙΦΕΝ. Η επίπτωση τους ποικίλει από 6-46% σε διάφορες μελέτες.



Εικόνα 3: Εξωεντερικές εκδηλώσεις Ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου

Πηγή: (46). Daniel C Baumgart, William J Sandborn Crohn's disease *Lancet* 2012; 380: 1590–1605

Η αιτιολογία τους είναι άγνωστη. Μπορεί να αφορούν σε οποιοδήποτε όργανο (55). Πολλαπλές εξωεντερικές εκδηλώσεις μπορεί να παρουσιαστούν ταυτόχρονα, ενώ η εμφάνιση μιας εξωεντερικής εκδήλωσης αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης και άλλων (56) .



Εικόνα 4: Χρονολόγιο εξωεντερικών εκδηλώσεων σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Στο ¼ των ασθενών, έως και 4 εξωεντερικές εκδηλώσεις παρουσιάζονται πριν την διάγνωση της νόσου (μέσος χρόνος εμφάνισης πριν την διάγνωση 5 μήνες, εύρος: 0-25 μήνες). Στο 75% των ασθενών η πρώτη εξωεντερική εκδήλωση εμφανίζεται μετά την διάγνωση της ΙΦΕΝ (μέσος χρόνος εμφάνισης 92 μήνες, εύρος: 29-183 μήνες). Έως και 50% των ασθενών έχει παρουσιάσει μια εξωεντερική εκδήλωση 30 χρόνια μετά την διάγνωση.

Πηγή: (57) Stephan R. Vavricka, MD, Alain Schoepfer, MD, Michael Scharl, MD, Peter L. Lakatos, MD, Alexander Navarini, MD and Gerhard Rogler, MD *Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1982–1992).

Διακρίνονται σε εξωεντερικές εκδηλώσεις και εξωεντερικές επιπλοκές. Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις αφορούν κυρίως αρθρώσεις (περιφερική και αξονική αρθροπάθεια), το δέρμα, το ήπαρ, τα χοληφόρα και τον οφθαλμό. Οι εξωεντερικές επιπλοκές, οι οποίες οφείλονται σε μεταβολικές ή ανατομικές διαταραχές που προκαλούνται από τις ΙΦΕΝ, περιλαμβάνουν την αναιμία, λόγω έλλειψης σιδήρου και φλεγμονής, τα θρομβοεμβολικά επεισόδια, λόγω διαταραχών υπερπηκτικότητας και ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, τις οστικές διαταραχές, λόγω της θεραπείας με κορτικοστεροειδή, της έλλειψης βιταμίνης D και της φλεγμονής, την διαταραχή της ανάπτυξης και την λιπώδη διήθηση του ήπατος λόγω υποθρεψίας, την δυσσαπορρόφηση με επακόλουθες ανεπάρκειες ιχνοστοιχείων,

την περιφερική νευροπάθεια, την νεφρολιθίαση, την χολολιθίαση αλλά και τις παρενέργειες της φαρμακευτικής αγωγής (57, 58).

Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις μπορούν περαιτέρω να διακριθούν σε δύο κατηγορίες : εκείνες τις εκδηλώσεις που συχνά σχετίζονται με την ενεργότητα της εντερικής φλεγμονής και πιθανά μοιράζονται τον ίδιο παθογενετικό μηχανισμό, που είναι η αρθρίτιδα, το οζώδες ερύθημα, το γαγγραινώδες πυόδερμα, η αφθώδης στοματίτιδα, η ιρίτιδα/ ραγοειδίτιδα και εκείνες στις οποίες περιλαμβάνονται πολλά αυτοάνοσα νοσήματα τα οποία διαδράμουν ανεξάρτητα από την εντερική νόσο, δεν θεωρούνται (με εξαίρεση την πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα) χαρακτηριστικές της ΙΦΕΝ, αλλά περισσότερο ως σχετιζόμενα αυτοάνοσα νοσήματα. Σε αυτά περιλαμβάνονται η γυροειδής αλωπεκία, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η αποφρακτική βρογχολίτιδα, η αιμολυτική αναιμία, η πορφύρα Henoch-Schoenlein, ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, η παγκρεατίτιδα, η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα, αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος και η πολυμυοσίτιδα (59-63).

6. Γενικές αρχές θεραπευτικής προσέγγισης ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου.

Η θεραπεία της IBD είναι πολύπλοκη. Αν και υπάρχουν διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες βασιζόμενες σε ενδείξεις, ο καθορισμός της κατάλληλης αγωγής και της κατάλληλης δόσης είναι μια πρόκληση δεδομένου ότι πολλοί παράγοντες όπως το είδος της νόσου η εντόπιση και η ενεργότητα, η παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων και επιπλοκών καθώς και χαρακτηριστικά του ίδιου του ασθενούς (η ανταπόκριση σε προηγούμενη αγωγή, η εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών τα συνοδά προβλήματα υγείας, αλλά και η συμμόρφωση στην αγωγή πρέπει να ληφθούν υπόψη (64). Βασικοί πυλώνες της θεραπείας αποτελούν τα αμινοσαλικυλικά, τα κορτικοστεροειδή και τα ανοσοκατασταλτικά όπως η αζαθειοπρίνη η μερκαπτοπουρίνη και η μεθοτρεξάτη. Τις τελευταίες 2 δεκαετίες αναπτύχθηκαν αναστολείς των ανταγωνιστών του TNF, οι οποίοι από τις αρχές της δεκαετίας του 2000 έφεραν επανάσταση στην αντιμετώπιση της IBD. Επιπλέον, η καλύτερη κατανόηση της βλεννογόνιας ανοσολογικής απάντησης οδήγησε σχετικά πρόσφατα στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατευθυνόμενων έναντι φλεγμονωδών κυτταροκινών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται το vedolizumab το οποίο μπλοκάρει την αλληλεπίδραση μεταξύ μιας ιντεγκρίνης των λεμφοκυττάρων της πεπτικής οδού και ενός υποδοχέα του ενδοθηλίου των αγγείων ($\alpha 4\beta 7$ και MAdCAM-1, αντίστοιχα), και το ustekinumab το οποίο στοχεύει κοινή p40 υποομάδα της ιντερλευκίνης (IL)-12 και IL-23. Υπάρχουν και άλλοι πολλά υποσχόμενοι στόχοι νεώτερων θεραπευτικών στρατηγικών όπως οι αναστολείς του μονοπατιού σηματοδότησης JAK/STAT (tofacitinib, filgotinib, upadacitinib κλπ) καθώς και αναστολείς ιντεγκρινών [αναστολέας ιντεγκρίνης $\beta 7$ (etrolizumab)]. Με την ανάπτυξη πολλών νέων θεραπειών με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, αυξάνεται η ανάγκη καλύτερου χαρακτηρισμού των ασθενών και επιλογής της

ευνοικότερης θεραπείας για τον κάθε ένα. Μερικοί ασθενείς είναι πιθανό να μην ανταποκριθούν σε μια θεραπεία ή να απωλέσουν την ανταπόκριση με τον χρόνο. Για παράδειγμα, η επίπτωση της αρχικής μη ανταπόκρισης σε ανταγωνιστές TNF κυμαίνεται στις διάφορες μελέτες μεταξύ 10-30% (65-67) και η ετήσια απώλεια της ανταπόκρισης από 13% για το infliximab (IFX) (68), έως 20,3% για το adalimumab (69). Η λογική της επιλογής της κατάλληλης θεραπείας για κάθε ασθενή ενισχύει την έννοια της εξατομικευμένης θεραπείας (70).

II ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1. Εισαγωγικά στοιχεία

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος όσον αφορά στην αποσαφήνιση της αιτιοπαθογένειας της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου, χωρίς, ωστόσο, αυτή να έχει καταστεί πλήρως κατανοητή.

Η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος Crohn μοιράζονται σε γενικές γραμμές έναν κοινό παθογενετικό μηχανισμό, ο οποίος συνίσταται σε διαταραχή της ανοσολογικής απάντησης προς αντιγονικούς επιτόπους της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας σε ένα άτομο με γενετική προδιάθεση. Η αλληλεπίδραση των τριών αυτών παραγόντων, της γονιδιακής σύστασης του ξενιστή, της ανοσολογικής αντίδρασης του βλεννογόνου και του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου και της μικροβιακής χλωρίδας πιθανόν να τροποποιείται περαιτέρω με την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι έχει βρεθεί ότι αλλάζουν την φυσική πορεία της ΙΦΝΕ (71).

Οι απόψεις σχετικά με την παθοφυσιολογία της IBD έχουν αλλάξει αρκετές φορές στην πορεία των τελευταίων ετών, ανάλογα με τις εξελίξεις και τις δυνατότητες των ερευνητικών τεχνικών που είναι διαθέσιμες σε κάθε χρονική περίοδο. Έτσι, αρχικά πριν περίπου 20 χρόνια, η IBD θεωρούνταν μια τυπική αυτοάνοση νόσος. Με την πρόοδο της γενετικής, η έρευνα μετατοπίστηκε στο γονιδίωμα. Ωστόσο, στην πορεία κατέστη σαφές ότι μόνο το 50% των περιπτώσεων της IBD εξηγούνται με την προσέγγιση μόνο του γονιδιώματος και συνεπώς η έρευνα εστιάστηκε στα μονοπάτια τα οποία υπέδειξε η γενετική, ενώ παράλληλα η IBD χαρακτηρίστηκε ως νόσος του εντερικού φραγμού, όπου ο βλεννογόνος του εντέρου δεν επαρκεί για να αποτρέψει την εισβολή των εντερικών μικροβίων. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει εστιαστεί κυρίως στα εντερικά μικρόβια και στην ανάλυση του περιεχομένου του αυλού του εντέρου (72).

Η ανάλυση των γονιδίων και των γενετικών τόπων σχετικά με την παθογένεια της IBD αποκάλυψε την ύπαρξη διαφόρων μονοπατιών τα οποία εμπλέκονται την διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης και τα οποία περιλαμβάνουν: 1) την λειτουργία του εντερικού φραγμού, 2) την αναδόμηση του εντερικού επιθηλίου, 3) την άμυνα απέναντι στα μικρόβια, 4) την ρύθμιση της συγγενούς ανοσίας, 5) την αυτοφαγία, 6) την ρύθμιση της επίκτητης ανοσίας, 7) την δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου 8) το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και 9) τα μεταβολικά μονοπάτια, τα σχετιζόμενα με την κυτταρική ομοιόσταση (73).

2. Ο ρόλος της γενετικής στην αιτιοπαθογένεια της ΙΦΝΕ

2.1 Ενδείξεις γενετικής προδιάθεσης.

Τα επιδημιολογικά δεδομένα από πολλαπλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η γενετική προδιάθεση αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παθογένεια της νόσου (74). Ενδείξεις υπέρ αυτού αποτελούν οι εθνικές διαφορές που καταγράφονται στον επιπολασμό και την επίπτωση της νόσου, ο αυξημένος κίνδυνος νόσου μεταξύ συγγενών 1^{ου} βαθμού και η χαμηλή επίπτωση μεταξύ των συζύγων, η αυξημένη επίπτωση σε διδύμους (μονοζυγωτικοί νόσος Crohn: 37%, ελκώδης κολίτιδα: 10%, διζυγωτικοί νόσος Crohn: 7%, ελκώδης κολίτιδα: 3%), η αναγνώριση από τις genome wide association studies (GWAS) γενετικών τόπων που προδιαθέτουν στην εκδήλωση της νόσου, η συσχέτιση της ΙΦΕΝ με γενετικά σύνδρομα όπως το σύνδρομο Hermansky-Pudlak, το σύνδρομο Turner, η παχυδερμοπεριόστωση, η

νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου τύπου Ib, το σύνδρομο Wiskott-Aldrich, η συσχέτιση με άλλες νόσους με γνωστή γενετική προδιάθεση όπως η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η ψωρίαση, το έκζεμα, η εκδήλωση κολίτιδος σε γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικών, όπως τα knock-out ποντίκια για τους παράγοντες TCR- α , β , MHC II, TGF- β , IL2,10 και TNF ΔARE και διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν παράγοντες που προάγουν την νόσο όπως οι STAT-4, IL-7, CD 4 OL, TCR- α , β (75).

Η επίπτωση του οικογενειακού ιστορικού είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με πρώιμη έναρξη νόσου, υποδεικνύοντας έτσι μια ισχυρότερη γενετική ή και οικογενειακή περιβαλλοντική συμβολή στους ασθενείς αυτούς. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με νόσο Crohn και θετικό οικογενειακό ιστορικό τείνουν να εκδηλώνουν την νόσο σε μικρότερη ηλικία σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό (76).

Το γενετικό μοντέλο που συνδυάζει καλύτερα τα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα για την ΙΦΕΝ, είναι εκείνο στο οποίο η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος Crohn είναι πολυπαραγοντικές νόσοι οι οποίες μοιράζονται κάποιους κοινούς γενετικούς τόπους ενώ διαφέρουν σε άλλους. Η γενετική αυτή ετερογένεια δυσκολεύει την διαλεύκανση της γενετικής βάσης της νόσου, όπως και η ποικίλλουσα διεισδυτικότητα (η πιθανότητα άτομο με δεδομένο γονότυπο να εκδηλώσει το χαρακτηριστικό) καθώς και η ποικίλλουσα έκφραση (διαφορετικές εκδηλώσεις του ίδιου φαινότυπου για ένα δεδομένο γονότυπο) (77).

Οι γενετικές μελέτες, είτε μελετώντας υποψήφια γονίδια, είτε με μελέτες χαρτογράφησης συσχέτισης (linkage mapping studies) και κυρίως με τις μελέτες συσχέτισης ολοκλήρου του γονιδιώματος (genome-wide association studies

(GWASs), έχουν προάγει σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση της γενετικής προδιάθεσης στην IBD (78).

2.2 Μελέτες συσχέτισης (linkage mapping studies).

Μια μελέτη συσχέτισης αναγνωρίζει περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος που σχετίζονται με την εκδήλωση της νόσου, ελέγχοντας μια σειρά από αλληλόμορφα δείκτες για συν- μεταφορά στην νόσο, αναλύοντας έναν αριθμό οικογενειών (ή μια μεγάλη οικογένεια με πολλαπλά προσβεβλημένα μέλη). Λόγω του μεγάλου αριθμού των χρωμοσωμικών τμημάτων που συν-μεταφέρονται μέσα σε μια τυπική οικογένεια, συνήθως απαιτούνται περίπου 300 δείκτες μικροδορυφορικού DNA, κατανεμημένοι ισότιμα, για τον εντοπισμό της πλειονότητας των θέσεων ανασυνδυασμού των χρωμοσωμάτων των γονέων κατά την μείωση (79).

Από το 1996 έως το 2004, 11 μελέτες συσχέτισης ολοκληρώθηκαν σε ασθενείς με νόσο Crohn, (80) η μεγαλύτερη εκ των οποίων ήταν μια μετα-ανάλυση που αφορούσε σε 1068 προσβεβλημένα συγγενικά μέλη (81).

Το 2001, δύο ανεξάρτητες ομάδες ανακάλυψαν το πρώτο γονίδιο υπεύθυνο για την νόσο Crohn, το NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2) εντός του γενετικού τόπου IBD1. Η αναγνώριση του NOD2 υπήρξε καθοριστικής σημασίας, ενώ η συσχέτιση 3 απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), R702W, G908R και L1007fsinsC, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 81% των μεταλλαγών υπεύθυνων για την νόσο, έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες (82-84).

Η ανακάλυψη του NOD2, είχε σαν αποτέλεσμα την διεξαγωγή και άλλων μελετών συσχέτισης, όχι μόνο για την νόσο Crohn αλλά και για άλλες συνήθεις νόσους πολύπλοκης αιτιοπαθογένειας. Ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν άκρως αποθαρρυντικά, καθώς λίγοι γενετικοί τόποι συσχετίζονταν με επαναληψιμότητα (85). Το συμπέρασμα ήταν ότι, σε αντίθεση με τις Μενδελιανές νόσους, είναι απίθανο οι πολυπαραγοντικές νόσοι να οφείλονται σε έναν γενετικό τόπο υψηλής διεισδυτικότητας τον οποίο μπορούν να ανιχνεύσουν οι μελέτες συσχέτισης. Αντίθετα, αυτό που προτάθηκε από τους Risch και Merikangas το 1996 είναι ότι οι νόσοι αυτοί προκαλούνται από την συσσώρευση πολλών παραγόντων κινδύνου που έχουν μικρή επίδραση (the 'common disease, common variant' hypothesis), γεγονός που είναι δύσκολο να ανιχνευθεί από τις μελέτες συσχέτισης, καθώς οι υπεύθυνοι γενετικοί τόποι μπορεί να βρίσκονται διάσπαρτοι σε ολόκληρο το γονιδίωμα και όχι σε ένα τμήμα του. Σε αυτή την περίπτωση η εναλλακτική μελέτη συσχέτισης, στην οποία ελέγχονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην συχνότητα αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, είναι πιο ισχυρή, με την προϋπόθεση ότι θα επιλεγεί το κατάλληλο αλληλόμορφο μεταξύ εκατομμυρίων που είναι γνωστά (86). Για τον λόγο αυτό, επιλέγονταν υποψήφια γονίδια με βάση προηγούμενες βιολογικές υποθέσεις, αλλά η τακτική αυτή είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση συσχετίσεων με ασθενή στατιστική σημαντικότητα, οι οποίες δεν επιβεβαιώνονταν στις ακόλουθες μελέτες (87).

2.3 GWAS στην ΙΦΝΕ

Οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), στις οποίες γίνεται σύγκριση της συχνότητας ενός αλληλομόρφου μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, αποτέλεσαν το επόμενο βήμα για την κατανόηση της γενετικής αρχιτεκτονικής σύνθετων νόσων, όπως η ΙΦΕΝ. Οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανακάλυψη γενετικών τύπων με ελάχιστη επίδραση (88).

Οι πρώτες GWAS στην νόσο Crohn ξεκίνησαν το 2006. Αυτές επιβεβαίωσαν την συσχέτιση με το *NOD2* ενώ εντοπίστηκε μια επίσης ισχυρή συσχέτιση με το αλληλόμορφο του *IL23R*, που κωδικοποιεί πρωτεϊνικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης πολλών ειδών ανοσολογικών κυττάρων, μετά την πρόσδεση στον οποίο, αρχίζει ένας καταρράκτης αντιδράσεων για την προαγωγή της φλεγμονής και την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας (89).

Μια άλλη σημαντική ανακάλυψη ήταν η συσχέτιση με το γονίδιο *ATG16L1*, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μονοπάτι της αυτοφαγίας, της επεξεργασίας των ενδοκυττάρων βακτηρίων, στην νόσο Crohn (90).

Περαιτέρω GWAS στις οποίες αναλύθηκαν περισσότεροι ασθενείς, αποκάλυψαν τα εμπλεκόμενα μονοπάτια της συγγενούς (*NKX2-3*, *CARD9*) και επίκτητης ανοσίας (*TNFSF15*, *PTPN2*, *IL-12B*), καθώς και τον ρόλο της διαχείρισης των ενδοκυττάρων βακτηρίων στην νόσο Crohn (*NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*) (91).

Σε αυτές τις αρχικές μελέτες βρέθηκε επίσης ότι το 30% των σχετιζόμενων γενετικών τύπων είναι κοινοί για την νόσο Crohn και την ελκώδη κολίτιδα (92).

Οι GWAS στην ελκώδη κολίτιδα οδήγησαν στην ανακάλυψη νέων γενετικών τόπων ειδικών για την νόσο, σχετιζόμενων με ελλείμματα του επιθηλιακού φραγμού, όπως ο HNF4A, που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ρυθμιστικό της έκφρασης των επιμέρους συστατικών του δεσμού μεταξύ των κυττάρων, ο CDH1, υπεύθυνος για την παραγωγή μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης, απαραίτητης για την κυτταρική προσκόλληση και η οποία έχει συσχετιστεί και με τον καρκίνο του παχέος εντέρου και ο LAMB1, ο οποίος κωδικοποιεί την υποομάδα β1 της λαμνίνης, κυρίου συστατικού των βασικών μεμβρανών (93-95).

Οι GWAS στην ελκώδη κολίτιδα επιπλέον επιβεβαίωσαν την συσχέτιση με τον γενετικό τόπο του κλασσικού ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA), ζωτικής σημασίας για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας (96). Η συσχέτιση αποδείχθηκε πολύ ασθενέστερη με την νόσο Crohn (97).

Σύμφωνα με μια σχετικά πρόσφατη μελέτη, οι πολυμορφισμοί των HLA τάξης I και II συμβάλλουν ισότιμα στην εκδήλωση νόσου Crohn, ενώ οι πολυμορφισμοί της τάξης II σχετίζονται περισσότερο με την ελκώδη κολίτιδα (98).

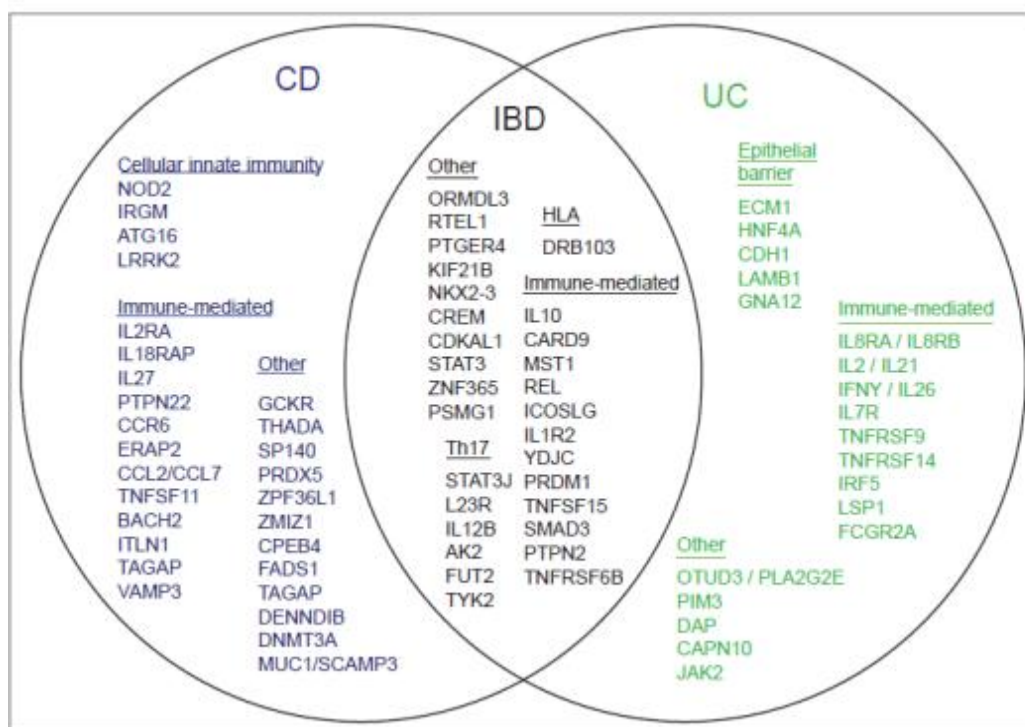
2.4 GWAS μετα-αναλύσεις

Λόγω του ότι τα δεδομένα από τις GWAS μπορούσαν να εξηγήσουν μόνο ένα μέρος της αναμενόμενης κληρονομικότητας από τις μελέτες διδύμων, εξαιτίας της ύπαρξης γενετικών τόπων με μικρότερη επίδραση από εκείνη που ανιχνεύουν οι GWAS ή γενετικών τόπων σε άλλους πληθυσμούς, μη Καυκάσιους, σύντομα κατέστη σαφής η αναγκαιότητα συνεργασίας και μετα-ανάλυσης των δεδομένων από τις

GWAS. Η αναγκαιότητα για μεγαλύτερες ομάδες ασθενών κινητοποίησε την Διεθνή Κοινοπραξία για την Γενετική των IBD (IIBDGC) (99).

Μια από τις μεγαλύτερες μετα-αναλύσεις το 2012, η οποία περιελάμβανε πάνω από 75.000 ασθενείς για πρώτη φορά και με νόσο Crohn αλλά και ελκώδη κολίτιδα, ανέδειξε 163 σχετιζόμενους γενετικούς τόπους και υπογράμμισε την εμπλοκή στην παθογένεια της νόσου πολλαπλών μονοπατιών όπως της συγγενούς ανοσολογικής βλεννογονικής άμυνας, του μονοπατιού σηματοδότησης JAK/STAT, της παραγωγής κυτταροκινών (IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-10) καθώς και της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων (100). Από αυτούς, οι 110 είναι κοινοί ενώ οι 30 και οι 23 σχετίζονται με την νόσο Crohn και την ελκώδη κολίτιδα αντίστοιχα (101).

Το συγκεκριμένο γονίδιο καθώς και τα υπεύθυνα αλληλόμορφα δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί σε πολλούς από αυτούς τους γενετικούς τόπους, ενώ δεν έχει προσδιοριστεί σαφώς η λειτουργική τους επίδραση. Η εικόνα 3 συνοψίζει τους γενετικούς τόπους που έχουν έως τώρα προσδιοριστεί.



Εικόνα 5: Οι γενετικοί τόποι, σχετιζόμενοι με την ΙΦΕΝ, που αντιπροσωπεύονται με το όνομα του κύριου γονιδίου σύμφωνα με την αντίστοιχη οδό. Οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ΙΦΕΝ παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ αυτοί που σχετίζονται με την νόσο Crohn και την ελκώδη κολίτιδα, με μπλε και πράσινο χρώμα αντίστοιχα

Πηγή: (102). Weronica E. Ek, Mauro D'Amato, Jonas Halfvarson. The history of genetics in infl ammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology* (2014) 27, 294-303.

Πρόσφατα, σε μια διεθνή μελέτη γενετικής συσχέτισης, η οποία περιέλαβε δεδομένα από 86,640 Ευρωπαίους ασθενείς και 9,846 ασθενείς με καταγωγή από Νοτιο-ανατολική Ασία, Ινδία και Ιράν, εντοπίστηκαν επιπλέον 38 γενετικοί τόποι οι οποίοι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ΙΒΔ (103).

Η πλειοψηφία των γενετικών αυτών τόπων παρουσιάζει την ίδια επίδραση σε Ευρωπαϊκές και μη μελέτες γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επιμέρους αλληλόμορφα είναι κοινά σε αυτούς τους πληθυσμούς, ενώ τα πιο σπάνια αλληλόμορφα είναι πιθανότερο να είναι ειδικά για τον κάθε πληθυσμό. Μόνο το γονίδιο TNFSF15 (του οποίου η έκφραση επάγεται από την μικροβιακή χλωρίδα (105) και το γονίδιο της αυτοφαγίας ATG16L1 είναι κοινά σε όλους τους

πληθυσμούς αλλά με διαφορετική βαρύτητα επίδρασης που πιθανά αντανακλά διαφορετική αλληλεπίδραση γενετικού υλικού και περιβάλλοντος στους διάφορους πληθυσμούς (104).

2.5 Επιγενετική

Η εξέλιξη στην διαλεύκανση της γενετικής αιτιοπαθογένειας της IBD, έχει οδηγήσει σε 2 πολύ βασικά συμπεράσματα: πρώτον, ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου και δεύτερον, σε αντιδιαστολή με το πρώτο συμπέρασμα, μόνο το 20-25% της κληρονομικότητας εξηγείται από τις μελέτες που έχουν, επί του παρόντος, διεξαχθεί. Το φαινόμενο αυτό, που έχει εντοπιστεί και σε άλλες πολυγονιδιακές νόσους, αναφέρεται ως «το μυστήριο της απύσας κληρονομικότητας κοινών χαρακτηριστικών» ή «γενετικό κενό (genetic vacuum)» (106). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει και η αποτυχία των GWAS να μειώσουν το γενετικό αυτό κενό, εντοπίζοντας νέους γενετικούς τόπους (107). Έτσι προτάθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων, μεταξύ γονιδίων και αντίστοιχων μονοπατιών και μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος πιθανόν να είναι η απάντηση για την κάλυψη του ελλείμματος κληρονομικότητας (106). Οι επιγενετικοί παράγοντες μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ περιβάλλοντος και γενετικού υλικού (111). Πρόκειται για αλλαγές κληρονομούμενες μέσω μίτωσης της λειτουργίας των γονιδίων, οι οποίες δεν εξηγούνται με αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Η γονιδιακή έκφραση μπορεί να μεταβληθεί με αλλαγές στην δομή και την λειτουργία της χρωματίνης (110). Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί

περιλαμβάνουν την μεθυλίωση του DNA και την μεταμεταγραφική τροποποίηση των ιστονών (108, 109).

Η μεθυλίωση αυτή αφορά στον άνθρακα στην θέση 5 του δακτυλίου κυτοσίνης, με αποτέλεσμα την δημιουργία 5-μεθυλοκυτοσίνης και αποτελεί βασικό ρυθμιστικό μηχανισμό της μεταγραφής των γονιδίων (112).

Πρόκειται για μια επιγενετική τροποποίηση της οποίας η συσχέτιση με την παθογένεια της IBD έχει σαφώς καθοριστεί. Όπως έχει καταδειχθεί από διάφορες μελέτες, ο βαθμός της μεθυλίωσης διαφέρει μεταξύ ιστών φυσιολογικών και ιστών με φλεγμονή από ασθενείς με UC και CD. Έτσι, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ασθενείς με IBD παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση σε πολλούς υποκινητές γονιδίων, όπως τα CDH1, p16, and MDR1 (113). Μια σχετική μελέτη στην οποία αναλύθηκε γενετικό υλικό από περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών μαρτύρων ανέδειξε 51 γονίδια με διάφορους βαθμούς μεθυλίωσης, μερικά από τα οποία εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση (IL21R, RPIK3 και MAPK) (114).

Όσον αφορά στην πολύπλοκη διαδικασία τροποποίησης των ιστονών, η οποία έχει μελετηθεί λιγότερο στην IBD, φαίνεται να εμπλέκεται στην φλεγμονώδη διεργασία μέσω της ανοσολογικής απάντησης στην μικροβιακή χλωρίδα. Το βουτυρικό, ένας ενδογενής μεταβολίτης ο οποίος παράγεται από την αποδόμηση των φυτικών ινών από τους εντερικούς μικροοργανισμούς, επιδρά αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου NOD2, μέσω αύξησης της ακετυλίωσης των ιστονών στον υποκινητή του (115).

Επιπλέον, ο Toll-like 4 υποδοχέας, που ρυθμίζει την εντερική ομοιόσταση παρεμποδίζοντας την υπέρμετρη φλεγμονώδη αντίδραση στην εντερική χλωρίδα, πιθανόν να ρυθμίζεται μέσω αποακετυλίωσης των ιστονών (116).

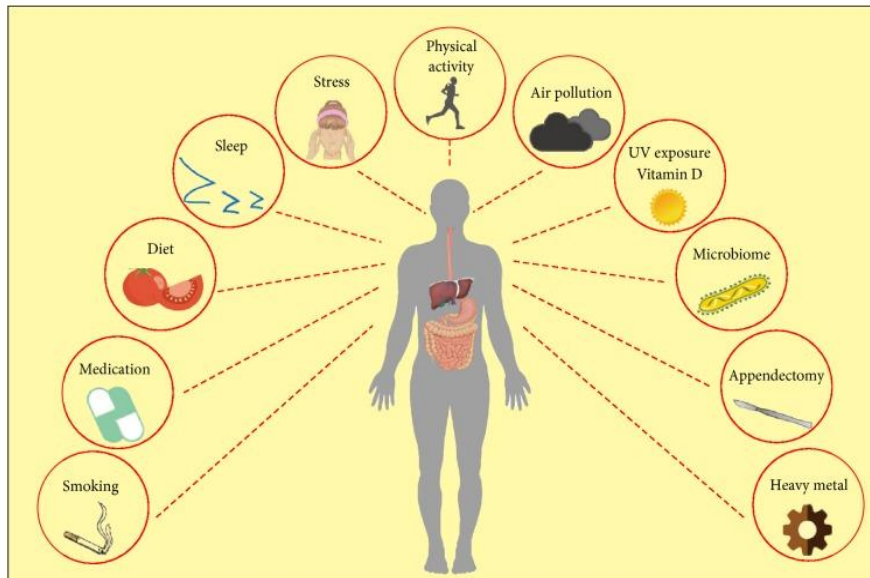
Επιπρόσθετα στους παραπάνω επιγενετικούς παράγοντες αναφέρονται και τα μικρο-RNAs (microRNAs) τα οποία είναι μικρά, μη-κωδικοποιούντα RNAs ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Έχει βρεθεί διαφορετικός βαθμός έκφρασης τους στον βλεννογόνο παχέος εντέρου ασθενών με ελκώδη κολίτιδα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [117]. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι ειδικά miRNAs είναι χαρακτηριστικά των διαφόρων υποτύπων της IBD, με χρήση στην κλινική πράξη [118].

Όλες οι προαναφερθείσες επιγενετικές αλλαγές αποτελούν το επιγονιδίωμα πού μεταφέρεται στα θυγατρικά κύτταρα κατά την μίτωση (119), αλλά περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επιδράσουν και να προκαλέσουν αλλαγές με την πάροδο του χρόνου (120). Στην IBD, συγκεκριμένες επιγενετικές αλλαγές μπορεί να συμβάλλουν στην εκδήλωση της νόσου μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που προάγουν την χρόνια φλεγμονή ή αναστολής της έκφρασης αντι-φλεγμονωδών γονιδίων (121).

2.6 Η επιγενετική ως γέφυρα μεταξύ περιβάλλοντος και γονιδιώματος.

Όπως προαναφέρθηκε, αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι δυνατόν να προκαλέσουν επιμεταλλαγές (επιγενετικές αλλαγές σχετιζόμενες με την νόσο), για την IBD. Αυτοί είναι το κάπνισμα, η διατροφή, η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και βαρέα μέταλλα, η μόλυνση του περιβάλλοντος αλλά και εσωτερικοί παράγοντες όπως η προηγηθείσα σκληροκοιλεκτομή αλλά και η δυσβίωση της εντερικής

χλωρίδας, οι οποίοι κυρίως αφορούν σε διαφορές στην μεθυλίωση του DNA (122-124).



Εικόνα 6: περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν εμπλεκόμενοι στην παθογένεια της IBD.
 Πηγή: (123) Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol.* 2012;863:359-76.

3. Εντερικός επιθηλιακός φραγμός

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Για την διασφάλιση της εσωτερικής ομοιόστασης, η γαστρεντερική οδός παίζει ρόλο διπτό. Στην πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, στην μεταφορά ύδατος και ηλεκτρολυτών και την απέκκριση ύδατος και πρωτεϊνών. Ο αμυντικός ρόλος της είναι εξίσου σημαντικός, καθώς αποτρέπει την είσοδο στον εντερικό βλεννογόνο επιβλαβών ουσιών όπως είναι παθογόνα, αντιγόνα και

προφλεγμονώδεις ουσίες και επιτρέπει εκλεκτικά την είσοδο ουσιών που προάγουν την ανοσολογική απάντηση.

Οι λειτουργίες αυτές συνιστούν τον εντερικό φραγμό, όπου η ομαλή του λειτουργία εξαρτάται από διάφορους ανοσολογικούς και μη μηχανισμούς (126). Όταν διαταραχθούν οι μηχανισμοί άμυνας, επιτρέπεται η είσοδος βλαβερών ουσιών με αποτέλεσμα την πυροδότηση ανοσολογικών απαντήσεων οι οποίες μπορούν να επιδεινώσουν την δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού και να συντηρηθεί έτσι η φλεγμονώδης αντίδραση. Οι αλλαγές στους μηχανισμούς άμυνας επιτρέπουν σε ουσίες που φυσιολογικά θα αποκλείονταν από τον εντερικό φραγμό, να εισέρχονται στο εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού, προκαλώντας έτσι μια υπέρμετρη ανοσολογική απάντηση η οποία επιδεινώνει την δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού προάγοντας την φλεγμονή του βλεννογόνου (125). Στα 1972 για πρώτη φορά οι Shorter και συν. ενοχοποίησαν την διαταραχή της διαπερατότητας ως το έναυσμα για την ενεργοποίηση εμμένουσας φλεγμονής στον εντερικό βλεννογόνο όπως στην περίπτωση της IBD(127) και η θεωρία τους υποστηρίχθηκε ακολούθως από πολλαπλές μελέτες (128).

Ο εντερικός φραγμός αποτελείται από ένα παχύ στρώμα βλέννης που περιέχει αντιμικροβιακούς παράγοντες, ένα μονόστοιβο εντερικό επιθήλιο και μια ομάδα υποκείμενων κυττάρων που είναι τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα δενδριτικά, τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα (129).

Τα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται στο κέντρο του συστήματος: από την πλευρά του εντερικού αυλού εκκρίνουν και ρυθμίζουν την σύσταση της βλέννης, ενώ από την πλαγιοβασική πλευρά αλληλεπιδρούν με τα υποκείμενα κύτταρα.

Έτσι ο εντερικός φραγμός μπορεί να διαχωριστεί σε άνω φραγμό και κάτω φραγμό.

Ο πρώτος συνιστά ένα φυσικό φραγμό που αποτρέπει την βακτηριακή προσκόλληση και διάχυση στους υποκείμενους ιστούς και έναν λειτουργικό φραγμό που διαχωρίζει την φυσιολογική εντερική χλωρίδα από τα παθογόνα. Ο δεύτερος ρυθμίζει την κυκλοφορία των αντιγόνων μέσω μιας συνεχούς αλληλεπίδρασης με τα ανοσολογικά κύτταρα της βασικής μεμβράνης.

Το εντερικό επιθήλιο αποτελείται από 4 τύπους επιθηλιακών κυττάρων: τα απορροφητικά εντεροκύτταρα, τα κύτταρα Paneth, τα κύτταρα goblet και νευροενδοκρινικά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τα πολυδύναμα εντερικά βλαστοκύτταρα (130). Τα εντεροκύτταρα χαρακτηρίζονται από μικροσκοπικές προσεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης, τις μικρολάχνες, στο ενδοαυλικό τμήμα του κυττάρου και καλύπτονται από τον γλυκοκάλυκα, μια βλεννώδη στοιβάδα που δρά ως φυσικός φραγμός έναντι στην εισβολή των μικροβίων (131).

Επιπλέον παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια, τις ντιφενσίνες (defensins), έναντι βακτηρίων, ιών και μυκήτων, ανοίγοντας πόρους στις μεμβράνες τους και έτσι καταστρέφοντας τα (132). Τα κύτταρα Paneth, εντός των κρυπτών, παράγουν αντιφενσίνες για να τις διατηρούν στείρες, ενώ τα κύτταρα goblet παράγουν επίσης ντιφενσίνες αλλά και βλεννίνες (mucins), δομικά μόρια του προστατευτικού στρώματος βλέννης. Αυτός ο αρνητικά φορτισμένος βιοχημικός και φυσικός φραγμός εμποδίζει την επαφή των παθογόνων με το επιθήλιο (133).

3.2 Ανοσολογική διαταραχή επιθηλίου (NOD2 και αυτοφαγία)

Τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία διαχωρίζουν το εξωτερικό περιβάλλον από το ανοσολογικό σύστημα του βλεννογόνου του εντέρου, έχουν ρόλο ζωτικής σημασίας στους ανοσολογικούς μηχανισμούς άμυνας έναντι ποικίλων παθογόνων, για την διατήρηση της ομοιόστασης. Βασικό ρόλο παίζουν επίσης τα μόρια των υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων πρωτογενούς (innate) ανοσίας (pattern-recognition receptors (PRRs)). Μία κατηγορία τών υποδοχέων αυτών, αναγνωρίζουν δομές ή μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (134).

Σέ μία άλλη κατηγορία των μορίων PRRs ανήκουν οι toll-like υποδοχείς (TLRs), οι οποίοι είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες που εκφράζονται από διάφορα είδη κυττάρων και από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα μόρια της οικογένειας TLR, που είναι τουλάχιστον 13 με ελάχιστες δομικές διαφορές μεταξύ τους, μέσω μια εξωκυττάριας περιοχής πλούσιας σε λευκίνη, αναγνωρίζουν διαφορετικά PAMPs, όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), πεπτιδογλυκάνη (PGN), μουραμυλ-διπεπτίδιο (MDP), καθώς και το βακτηριδιακό DNA (2). Η αναγνώριση αυτή δίνει το έναυσμα για ένα καταρράκτη σηματοδότησης μέσω δυο διαφορετικών μονοπατιών που οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ, πυροδότηση άλλων μονοπατιών συγγενούς ανοσίας, παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών και τελικά ενεργοποίηση και της επίκτητης (adaptive) ανοσίας (135).

Από μοντέλα ποντικών τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά έχει δειχθεί ότι η διαγραφή γονιδίων καθώς και συγκεκριμένων χρωμοσωμικών περιοχών που σχετίζονται με την λειτουργία του εντερικού επιθηλίου μπορεί να οδηγήσει σε

χρόνια εντερική φλεγμονή. Για παράδειγμα, ποντίκια *TLR5* knockout (KO), σε ποσοστό 35-40% ανέπτυξαν κολίτιδα, με εκτεταμένες περιοχές διήθησης από μονοκύτταρα, υπερπλασία επιθηλίου και καταστροφή κρυπτών. Η έλλειψη του μορίου *TLR5* προάγει αύξηση του μικροβιακού φορτίου και ενισχύει την ενεργοποίηση ποικίλων προφλεγμονωδών μονοπατιών (136). Η ενεργοποίηση του *NF-kB* οδηγεί σε ενεργοποίηση του προφλεγμονώδους καταρράκτη, στην ρύθμιση της συγγενούς ανοσολογικής απάντησης του επιθηλίου και στην διατήρηση της ομοιόστασης του γαστρεντερικού σωλήνα.

Σε μεταλλαγμένα ποντίκια, η διαγραφή του *NF-kB* των επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε σε απόπτωση τους, διαταραχή έκφρασης των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, αυξημένη μετανάστευση βακτηρίων εντός του βλεννογόνου και κατ' επέκταση εκδήλωση αυτόματης πανκολίτιδος (137).

NOD2

Τα γονίδια που κυρίως εμπλέκονται στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση του εντερικού επιθηλίου και τα οποία σχετίζονται με την IBD είναι εκείνα της οικογένειας *CARD/NOD* (caspase recruitment domain/nucleotide-binding oligomerization domain(*CARD/NOD*) καθώς και τα γονίδια της αυτοφαγίας.

Το γονίδιο *CARD15/NOD2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 και κωδικοποιεί κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα μυελοειδή, (138), τα επιθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα Paneth λεπτού εντέρου (139). Η πρωτεΐνη *CARD15/NOD2* είναι ένα μόριο PRR η οποία εμπλέκεται στην αναγνώριση των MDPs, συστατικών

του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (140, 141). Η αναγνώριση αυτή ενεργοποιεί τον NF-κB καθώς και την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNF, IL-1, IL-6, IL-8, και η IL-18 (138, 141, 142). Η πρωτεΐνη CARD15/NOD2 εμπλέκεται επίσης στην απελευθέρωση των α-ντιφενσινών HD5 και HD6 από τα κύτταρα Paneth (143-145). Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί του μεταγραφικού παράγοντα *TCF-4*, που εμπλέκεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων Paneth και την έκφραση των HD5 and HD6, έχουν συσχετιστεί με την νόσο Crohn τελικού ειλεού (146). Οι ασθενείς με νόσο Crohn τελικού ειλεού που φέρουν μεταλλαγές του *CARD15/NOD2* παρουσιάζουν διαταραχές στην έκφραση των α-ντιφενσινών (145, 147), καθώς και μειωμένη έκφραση β-ντιφενσινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου ως απάντηση στο μόριο MDP(148). Οι διαταραχές αυτές είναι πιθανό να εμπλέκονται στην εκδήλωση της IBD. Έτσι, η εκκαθάριση των βακτηρίων που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του *CARD15/NOD2* φαίνεται να είναι σημαντική για την διατήρηση της ομοιόστασης στο εντερικό επιθήλιο.

Αυτοφαγία

Ωστόσο, παρά την παρουσία του εντερικού φραγμού που αποτρέπει την είσοδο των μικροβίων, κάποια βακτήρια ξεπερνούν τους αμυντικούς μηχανισμούς και εισβάλουν στα επιθηλιακά κύτταρα.

Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία αποδόμησης σημαντική για την κυτταρική ομοιόσταση, διότι με τον τρόπο αυτό το κύτταρο ανακυκλώνει τα συστατικά του, αποδομώντας οργανίδια και κυτταρικά μακρομόρια στα λυσοσώματα, σε

καταστάσεις στρες όπως η έλλειψη τροφής και η στέρηση αυξητικών παραγόντων.

Η διαδικασία ωστόσο της αυτοφαγίας είναι και ένας θαυμάσιος μηχανισμός άμυνας μέσω αποδόμησης των βακτηρίων-εισβολέων (149).

Έχει δειχθεί ότι η λειτουργία της αυτοφαγίας στο εντερικό επιθήλιο ενεργοποιείται από διεισδυτικά βακτήρια, όπως η *S. typhimurium* και ο *E. Faecalis*, ενώ τα μη-διεισδυτικά όπως τα *Lactobacillus salivarius* ή *S. Typhimurium* δεν πυροδοτούν την δημιουργία αυτοφαγοσώματος στο εντερικό επιθήλιο (150).

Επί του παρόντος, η αυτοφαγία και το εντερικό επιθήλιο σχετίζονται μέσω των κυττάρων Paneth, τα οποία εκφράζουν αρκετούς μικροβιακούς PRRs, συμπεριλαμβανομένων Nod2 και TLRs (152, 153), που προκαλούν την απελευθέρωση του περιεχομένου από τα κοκκία των κυττάρων Paneth. (147, 154, 155). Τα κύτταρα αυτά ειδικεύονται στην παραγωγή και απελευθέρωση αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως λυσοζύμη, κρυπτιδίνες και RegIIIγ, μια λεκτίνη τύπου-C που είναι άμεσα βακτηριοκτόνος έναντι Gram-θετικών βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες αυτές προστατεύουν από τα παθογόνα αλλά και μεταβάλλουν την σύνθεση της εντερικής χλωρίδας (151).

Οι λειτουργίες αυτές των κυττάρων Paneth σχετίζονται με την παθογένεια της IBD, αφού η απώλεια πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την εκδήλωση IBD οδηγεί σε δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών. Πρόσφατα, η διαδικασία της αυτοφαγίας φάνηκε να είναι ελλειμματική σε ασθενείς με νόσο Crohn, αφού βρέθηκε ότι ένας πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1), την κεντρική πρωτεΐνη της αυτοφαγίας, σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου (156).

Σε ποντίκια που έφεραν τον πολυμορφισμό αυτόν σε ομοζυγωτία παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στο μονοπάτι της εξωκυττάρωσης κοκκίων από τα κύτταρα Paneth.

Παρόμοιες ανωμαλίες παρατηρήθηκαν και σε ομόζυγους ασθενείς με νόσο Crohn (157).

Ενισχύοντας τον ρόλο της αυτοφαγίας έναντι των βακτηρίων στην παθογένεια της νόσου Crohn, πρέπει να αναφερθεί η παρουσία ενός επιπλέον γονιδίου

σχετιζόμενου με την αυτοφαγία, του IRGM (immunity related GTPase M), το οποίο έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση νόσου Crohn και φυματίωσης. Έχει βρεθεί ότι

ένας απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός αλλάζει τα επίπεδα έκφρασης του

IRGM, αλλά και την κάθαρση των ενδοκυττάρων βακτηρίων μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας, όπως είναι τα *Mycobacterium bovis* και *Salmonella typhimurium* (158-161).

Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι σε μια πρόσφατη μελέτη, οι ενδοκυττάριοι PRRs

NOD1 και NOD2 έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην επαγωγή της αυτοφαγίας,

επιστρατεύοντας την πρωτεΐνη ATG16L1 στο σημείο εισόδου του βακτηρίου. Καθώς

η διαδικασία αυτή είναι ελλειμματική στην περίπτωση της μεταλλαγής L1007fsinsC

του γονιδίου NOD2 που σχετίζεται με την νόσο Crohn, φαίνεται πως το γονίδιο της

αυτοφαγίας ATG16L1 και το NOD2 αλληλεπιδρούν ισχυρά, και τα ελλείμματα στη

διαδικασία άμυνας έναντι των βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου (162).

3.3 Διαταραχή διαπερατότητας επιθηλίου και διαταραχή βλέννης

Η διαταραχή της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού είναι ζωτικής σημασίας και για πολλούς ο βασικός παθογενετικός μηχανισμός στην IBD (163, 164).

Ο φραγμός αυτός καθώς και η παρακυτταρική διαπερατότητα των ιόντων και των μικρών μορίων μηχανιστικά περιλαμβάνουν 3 είδη δεσμών, τις στενές συνάψεις [tight junctions (TJs)], τις συνάψεις προσκόλλησης και τα δεσμοσώματα (131).

Στους ασθενείς με IBD έχουν βρεθεί ανωμαλίες των στενών συνάψεων και ως εκ τούτου αυξημένη παρακυτταρική διαπερατότητα (165).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση και ανακατανομή αρκετών πρωτεϊνών που συναποτελούν τους στενούς δεσμούς δηλαδή των οκλουδινών (occludins), των κλοδινών (claudins) και των συνδετικών μορίων προσκόλλησης (JAM). Σε πειραματικό μοντέλο ποντικών βρέθηκε ότι η διαγραφή της κλοδίνης-7 αποτελεί έναυσμα για την εντερική φλεγμονή (166, 167). Το στρώμα βλέννης του εντερικού βλεννογόνου παρουσιάζει μεταβολές στους ασθενείς με IBD και κυρίως στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Οι αλλαγές αυτές έχει βρεθεί πως μειώνουν την αποτελεσματικότητα έναντι στην εισβολή των βακτηρίων (168).

Οι αλλαγές αυτές αφορούν στην μείωση των κυττάρων goblet (169), στην ελλειμματική παραγωγή ντιφενσινών (170), στην μείωση του πάχους του στρώματος βλέννης και στην αλλαγή της σύνθεσης του όσον αφορά τις βλεννίνες, την φωσφατιδυλχολίνη και την γλυκοζυλίωση (171). Επιπλέον, η δυσβίωση που

χαρακτηρίζει την IBD μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στην εντερική διαπερατότητα (172).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η διαταραχή του φραγμού πιθανά προηγείται της εκδήλωσης της νόσου. Η αυξημένη διαπερατότητα έχει σημειωθεί και σε ασθενείς με λανθάνουσα IBD (173) καθώς και στο 40% των συγγενών πρώτου βαθμού ασθενών με IBD (174-179). Οι μακροπρόθεσμες συνέπειες της αύξησης της διαπερατότητας δεν έχουν ακόμη καθοριστεί, αφού μόνο μια μελέτη συγγενών πρώτου βαθμού υπάρχει στην οποία οι συγγενείς εκδήλωσαν νόσο Crohn τελικού ειλεού και παχέος αρκετά χρόνια μετά (180).

3.4 Διαταραχή ακεραιότητας επιθηλίου

Για την λειτουργία του εντερικού επιθηλιακού φραγμού είναι απαραίτητη η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου. Συνεπώς σε περίπτωση αλλαγών στις δομικές τους πρωτεΐνες ή σε πρωτεΐνες σημαντικές για την κυτταρική ομοίωση η λειτουργικότητα του επιθηλίου παραβλάπεται.

3.5 Ρ-Γλυκοπρωτεΐνη (p-glycoprotein)

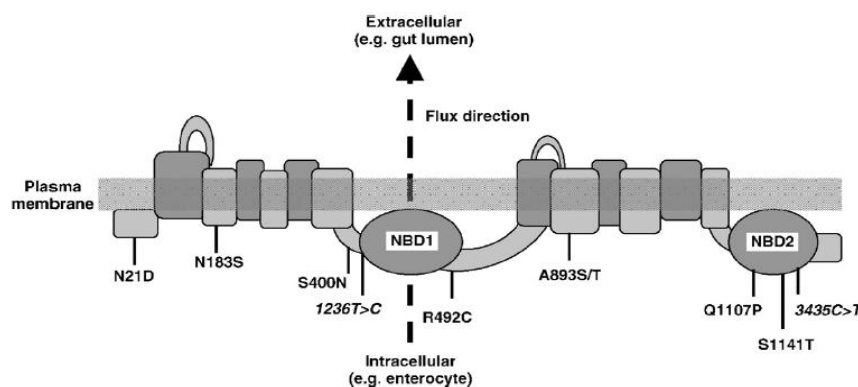
Η μεταφορά ενδογενών παραγόντων αλλά και ξενοβιοτικών διαμέσου βιολογικών μεμβρανών δεν πραγματοποιείται μόνο με παθητική διάχυση αλλά και ενεργητικά

μέσω μεταφορέα. Η υπεροικογένεια συνδέουσα το ATP (ATP-binding cassette superfamily ABC) είναι μια μεγάλη ομάδα μεταφορέων που εκφράζονται σε διάφορους οργανισμούς (181). Στους ανθρώπους έχουν αναγνωριστεί 48 ABC μεταφορείς οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταροπλασματική και στις διακυτταρικές μεμβράνες. Οι ανθρώπινοι ABC μεταφορείς διακρίνονται στις εξής 7 υποοικογένειες: ABC1 (12 μέλη), MDR/TAP (11 μέλη), MRP/CFTR (12 μέλη), ALD (4 μέλη), OABP (1 μέλος), GCN20 (3 μέλη) και White (5 μέλη) (181). Η p-γλυκοπρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο MDR1 (ABCB1) θεωρείται από τους σημαντικότερους μεταφορείς στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μόριο αυτό συμμετέχει στην διαμεμβρανική μεταφορά μακρομορίων, ρυθμίζοντας έτσι την επιθηλιακή διαπερατότητα καθώς και τις κυτταρικές διαδικασίες αποτοξίνωσης. Αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό έναντι δυνητικά τοξικών ξενοβιοτικών, τα οποία προσλαμβάνονται με την τροφή (182).

3.5.1 Δομή, λειτουργία

Η p-γλυκοπρωτεΐνη απομονώθηκε αρχικά από ωοθηκικά κύτταρα με αντοχή στην κολχικίνη, προερχόμενα από κινέζικα χάμστερ από τον Biedler το 1970 (183). Ωστόσο, ο ρόλος της έγινε κατανοητός μόλις το 1994, όταν οι Schinkel και συν παρατήρησαν 100 φορές αυξημένη διεισδυτικότητα του φαρμάκου βερμεκτίνη στον εγκέφαλο ποντικών γενετικά τροποποιημένων χωρίς το γονίδιο *mdr1a* (184). Η πρωτεΐνη παρέχει πολυφαρμακευτική αντοχή σέ πολλά κύτταρα καλοήθη και κακοήθη προλαλώντας απάντληση φαρμάκων από τό κυτταρόπλασμα. Πρόκειται για μια 170 kDa φωσφορυλιωμένη και γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη η

οποία αποτελείται από 1280 αμινοξέα, 2 ομόλογα τμήματα των 610 αμινοξέων, συνδεδεμένα μεταξύ τους με έναν ελαστικό σύνδεσμο των 60 αμινοξέων. Κάθε τμήμα συνιστά μια αμινοτελική υδρόφοβη περιοχή, η οποία περιέχει 6 διαμεμβρανικά τμήματα, και ακολουθείται από μια υδρόφιλη περιοχή η οποία περιέχει θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου. Η σύνδεση του ATP είναι απαραίτητη για την λειτουργία του μεταφορέα (185). Η μελέτη της δομής με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μέ ανάλυση στα 2.5 nm, αποκάλυψε ότι η ρ-γλυκοπρωτεΐνη είναι μια σπειροειδής συμμετρική πρωτεΐνη των 10 nm με έναν κεντρικό πόρο των 5 nm [5], το μεγάλο μέγεθος του οποίου ευθύνεται για την δέσμευση ποικίλων υποστρωμάτων (186).



Εικόνα 7 : Δυσδιάστατη δομή της πρωτεΐνης ABCB1 με απεικόνιση των θέσεων αντικατάστασης αμινοξέων καθώς και τον 2 συχνότερων συνώνυμων πολυμορφισμών (*italics*). (NBD: θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου)

Πηγή: (187) Ingolf Cascorbi. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 112 (2006) 457–473.

Η ρ-γλυκοπρωτεΐνη (ρ-gp) εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, εκτός των καρκινικών κυττάρων. Στην γαστρεντερική οδό, βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων του κυλινδρικού επιθηλίου του παχέως εντέρου, ενώ στο λεπτό έντερο εκφράζεται κυρίως στον τελικό ειλεό, με σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης στην

νήστιδα, το δωδεκαδάκτυλο και τον στόμαχο. Επιπλέον, εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των μικρών χοληφόρων, στο επιθήλιο των μικρών πόρων του παγκρέατος, στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια και στα επινεφρίδια (188), στα επιθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος στον εγκέφαλο αλλά και στο ενδοθήλιο των τριχοειδών του εγκεφάλου, όπου αποτελεί βασικό συστατικό του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (189-192). Βρίσκεται και σε άλλους ιστούς που διαθέτουν φραγμό, όπως ο πλακούντας, οι ωθήκες και οι όρχεις (193).

Όσον αφορά στο αιμοποιητικό σύστημα, η p-γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται στα περιφερικά μονοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα δενδριτικά καθώς και στα T και B λεμφοκύτταρα (194).

Η λειτουργία αλλά και η εντόπιση αυτού του μεταφορέα υποδηλώνουν ότι ο ρόλος του είναι κυρίως προστατευτικός, απομακρύνοντας τοξίνες από τον οργανισμό προς το αίμα, την χολή, τα ούρα και τον αυλό του εντέρου, προφυλάσσοντας έτσι τα ζωτικά όργανα αλλά και το έμβρυο από την συσσώρευση τοξικών παραγόντων.

Επιπλέον, η P-gp προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα τα ανθεκτικά στα χημειοθεραπευτικά, το χαρακτηριστικό της πολυφαρμακευτικής αντοχής, χαρακτηριστικό εξαιρετικής κλινικής σημασίας και σε άλλες θεραπείες λόγω του ρόλου της στην απορρόφηση και απέκκριση πολλών φαρμάκων (195).

Εκτός από την εντόπιση της στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, έχει επίσης εντοπιστεί στις ενδοκυττάρια μεμβράνες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο, όπου ο ακριβής φυσιολογικός της ρόλος είναι άγνωστος.

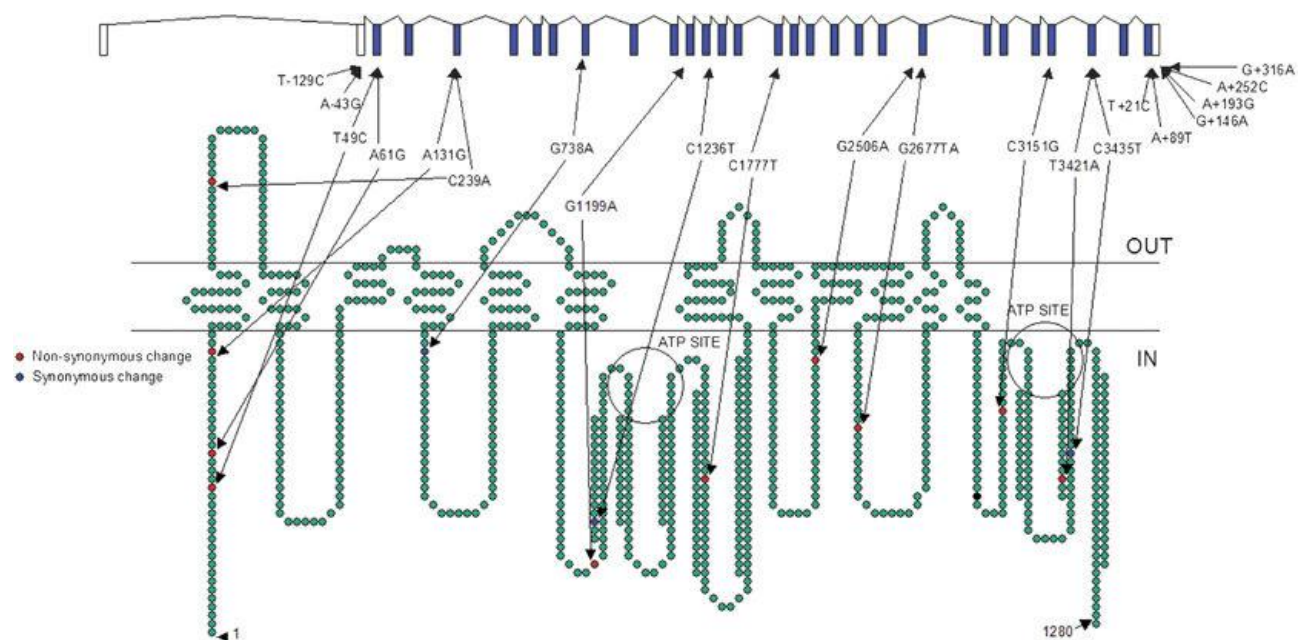
Πιστεύεται ότι σχετίζεται με τον μηχανισμό διακίνησης των κυττάρων (cell trafficking) (196).

Η p-γλυκοπρωτεΐνη μεταφέρει πολλά δομικώς διαφορετικά υποστρώματα, τα οποία μπορεί να είναι υδρόφοβα αρωματικά ή μη, βασικά ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα κυκλικά ή γραμμικά, αμφιπατικά, με μέγεθος από 250-4000 MB (197). Περιλαμβάνουν, ξενοβιοτικά, ενδογενείς παράγοντες (πεπτίδια, στεροειδή, λιπίδια, κυτταροκίνες, φάρμακα, διατροφικά συστατικά (γκρέιπφρουτ, πράσινο τσάι) τα οποία πιθανόν να τροποποιούν την έκφρασή της (198). Στα φάρμακα περιλαμβάνονται αντικαρκινικά, καρδιακά, αναστολείς πρωτεάσης HIV, ανοσοκατασταλτικά, αντιβιοτικά, β-αδρενεργικοί ανταγωνιστές, αντισταμινικά και κορτικοειδή (199). Η πλειοψηφία των υποστρωμάτων αλληλεπιδρούν επίσης με το κύριο ένζυμο μεταβολισμού των φαρμάκων, το CYP3A4 (200). Είναι χαρακτηριστικό ότι τα αντίστοιχα γονίδια βρίσκονται πολύ κοντά, στις θέσεις 7q22.1 και 7q21.1 για το CYP3A4 και το MDR1 αντίστοιχα. Τα δύο αυτά μόρια γειτνιάζουν σε όργανα που έχουν κύριο ρόλο στον μεταβολισμό των φαρμάκων, όπως το ήπαρ και το έντερο. Στις θέσεις αυτές συνεργάζονται προκειμένου να αποτραπεί η είσοδος των από του στόματος λαμβανόμενων ξενοβιοτικών στον οργανισμό (201-204).

3.5.2 Το γονίδιο ABCB1/ MDR1

10 χρόνια μετά την ανακάλυψη της p-γλυκοπρωτεΐνης απομονώθηκε το γονίδιο που την κωδικοποιεί από τους Chen και συν και Roninson και συν από ανθρώπινα νεοπλασματικά κύτταρα που παρουσίαζαν πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση, και ονομάστηκε MDR1 (ABCB1) (205). Βρίσκεται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 7 (7q21.12) και αποτελείται από την περιοχή του εκκινητή και 29

εξόνια και έχει μήκος 209 kb (206). Η περιοχή του εκκινήτη περιέχει λίγους, σπάνιους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς και είναι σχετικά αμετάβλητη σε σχέση με άλλα γονίδια (207). Το mRNA έχει μήκος 4872 bp, συμπεριλαμβανομένης της 5' αμετάφραστης περιοχής, που κωδικοποιεί την ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp) (208).



Εικόνα 8: Απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου ABCB1 με συχνότητα υπολειπόμενου αλληλομόρφου 45%.

πηγή: (209). GD Leschziner, T Andrew, M Pirmohamed and MR Johnson. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *The Pharmacogenomics Journal* (2007) 7, 154–179.

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην επίδραση της γενετικής ποικιλότητας του γονιδίου *ABCB1* στην έκφραση και την λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), αποτελούν τον πιο συχνό τρόπο διαφοροποίησης της γενετικής πληροφορίας, με διαφορετική επίδραση ανάλογα με την θέση τους στο γονίδιο. Οι SNPs που βρίσκονται στα ιντρόνια ή στις περιοχές του γονιδίου που δεν μεταφράζονται, πιθανά επιδρούν στην δημιουργία, ακεραιότητα και επεξεργασία του mRNA. Εκείνοι που βρίσκονται στις κωδικές περιοχές, είναι πιθανό να αλλάξουν άμεσα την δομή της πρωτεΐνης, προκαλώντας αντικαταστάσεις αμινοξέων (μη-συνώνυμοι SNPs-non-synonymous SNPs) ή να μεταβάλλουν την αλληλουχία του mRNA και πιθανά την δομή και την σταθερότητα του, κωδικοποιώντας για το ίδιο αμινοξύ (συνώνυμοι SNPs- synonymous SNPs) (210). Στην τελευταία βάση δεδομένων dbSNP (the NCBI dbSNP (Build131) database online resource 5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) βρέθηκαν συνολικά 1279 SNPs στην περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου *ABCB1*, εκ των οποίων 66 SNPs της κωδικής περιοχής, συμπεριλαμβανομένων 24 συνώνυμων (sSNPs) και 42 μη-συνώνυμων (nsSNPs) SNPs. Δύο sSNPs και 12 nsSNPs έχουν συσχετιστεί με μεταβολές στην έκφραση και την λειτουργία της p-γλυκοπρωτεΐνης και περαιτέρω με την ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή καθώς και με την εκδήλωση πολλαπλών νόσων όπως η IBD. Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, οι τρεις έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι δύο είναι συνώνυμοι (rs1128503, εξόνιο 13/1236C>T και rs1045642 εξόνιο 27/3435C>T), ενώ ο τρίτος (rs2032582, εξόνιο 22/2677G>T/A) είναι ένας μη-συνώνυμος πολυμορφισμός τριών αλληλομόρφων που προκαλεί αντικατάσταση της σερίνης στην θέση 893 από αλανίνη/θρεονίνη (211-213). Οι

πολυμορφισμοί αυτοί βρίσκονται σέ ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) και σε διαφορετικές συχνότητες στους διάφορους πληθυσμούς (214). Τα αλληλόμορφα τα οποία συνδέονται στενά με άλλα αλληλόμορφα που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, γνωστά ως απλότυπος, φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση νόσων αλλά και στην ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή (215). Αυτή η μη τυχαία συσχέτιση των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ονομάζεται ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium (LD)). Οι σχετικές μελέτες δείχνουν μια ισχυρή LD μεταξύ των SNPs στα εξόνια 12 (C1236T), 21 (G2677T) και 26 (C3435T) (213). Έτσι, οι πολυμορφισμοί αυτοί σχηματίζουν 2 κοινούς απλότυπους (T1236/T2677/T3435 ή C1236/G2677/C3435) (195).

Απλότυποι

Οι ανάλυση απλότυπου έδειξε ότι υπάρχουν τουλάχιστον 64 ABCB1 απλότυποι, συμπεριλαμβανομένου του συχνού απλότυπου *ABCB1*13*, που περιλαμβάνει τους τρεις προαναφερθέντες πολυμορφισμούς (212).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι λειτουργικές αλλαγές στην πρωτεΐνη ανιχνεύονται όταν είναι παρών ο πολυμορφισμός 2677G>T και είτε ο 1236C>T ή ο 3435C>T σε συνδυασμό και όχι ο 2677G>T μόνον. Αυτή η λειτουργική αλλαγή πιθανά να οφείλεται σε αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης (216).

Οι συχνότητες των πολυμορφισμών αλλά και των απλοτύπων του γονιδίου ABCB1 διαφέρουν μεταξύ των εθνοτήτων. Οι Kroetz και συν (2003) βρήκαν 16 αλληλόμορφα ειδικά για τους Αφροαμερικανούς, 8 για τους Καυκάσιους και 3 για τους Αμερικανούς με ασιατική καταγωγή (212). Τα τρία προαναφερθέντα

αλληλόμορφα είναι 2 φορές συχνότερα στους Καυκάσιους σε σχέση με τους Αφρο-αμερικανούς. Συνεπώς, τα υποστρώματα της p-γλυκοπρωτεΐνης πιθανόν να υποστηρίζονται διαφορετικά ανάλογα με την εθνικότητα. (212, 216, 217).

3.5.3. Επίδραση των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στην έκφραση και λειτουργικότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης

Οι Hoffmeyer και συν πρώτοι περιέγραψαν τον πολυμορφισμό C3435T στο εξόνιο 26 και ανέφεραν ότι επηρεάζει την έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης στο δωδεκαδάκτυλο καθώς και την ενεργότητα της (218). Οι Hitzl και συν. έδειξαν ότι στα κύτταρα CD56⁺, ο γονότυπος 3435 TT σχετίζεται με μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης σε σχέση με τον γονότυπο CC (219).

Οι Nakamura και συν. διερεύνησαν την επίδραση της μεταλλαγής C3435T στα επίπεδα του MDR1 mRNA στα κύτταρα δωδεκαδακτύλου υγιών Ιαπώνων. Βρήκαν ότι τα άτομα με TT γονότυπο είχαν αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τον CC γονότυπο (220). Οι Taheri και συν. διερεύνησαν την επίδραση του C3435T πολυμορφισμού στα επίπεδα έκφρασης της p-γλυκοπρωτεΐνης σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, και βρήκαν ότι σε αντίθεση με τους υγιείς μάρτυρες, οι ασθενείς είχαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης όταν έφεραν το αλληλόμορφο T σε ομοζυγωτία (P = 0.001) (221).

Σε μια πρόσφατη μελέτη των Fung και συν αναπτύχθηκαν τέσσερις κυτταρικές σειρές στις οποίες εκφράζονταν ανασυνδυασμένη p-γλυκοπρωτεΐνη για να διευκρινιστεί η επίδραση των πολυμορφισμών και των απλοτύπων του γονιδίου

ABCB1. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι οι πολυμορφισμοί αλλάζουν σημαντικά την λειτουργία της p-γλυκοπρωτεΐνης (222), ενώ αναφέρεται ότι ο πολυμορφισμός C3435T φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του *ABCB1* mRNA μεταβάλλοντας την σταθερότητα του (223).

Αντίθετα, οι Morita και συν δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης μεταξύ κυττάρων στα οποία εκφράζονταν 5 πολυμορφικοί τύποι του *MDR1* cDNAs (2677G/3435T, 2677A/3435C, 2677A/3435T, 2677T/3435C, 2677T/3435T) και κυττάρων στα οποία εκφράζονταν τα wild-type αλληλόμορφα (2677G/3435C), υποδηλώνοντας ότι οι δύο συχνότεροι πολυμορφισμοί δεν είχαν καμιά επίδραση στην ικανότητα μεταφοράς της p-γλυκοπρωτεΐνης σε κύτταρα LLC-PK1 *in vitro*, και πως η έκφραση και η *in vivo* ενεργότητα της πιθανά ελέγχεται από άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (224).

Σε μελέτη που αφορούσε την συσχέτιση ανάμεσα στους 2 πολυμορφισμούς 3435C>T και τον μη-συνώνυμο 2677G>A και στην έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, αναφέρθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στην έκφραση αλλά χωρίς να τεκμηριώνεται ότι η αιτία των διαφορών ήταν η παρουσία των πολυμορφισμών (225).

Σε διάφορες άλλες μελέτες όπου έγινε προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης του mRNA ή της έκφρασης της p-γλυκοπρωτεΐνης με την παρουσία των πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A αλλά και άλλων πολυμορφισμών, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά (226-229). Ωστόσο, έχει περιγραφεί μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό -129T>C στο εξόνιο 1 και στην έκφραση

της p-γλυκοπρωτεΐνης σε πλακουντιακά κύτταρα Ιαπώνων ασθενών με $p=0.002$ (230).

Η ανάλυση απλότυπου, εκτός από την ανάλυση των SNPs, μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Σε μια σχετική μελέτη, οι φορείς του απλότυπου 1236T/2677G/3435T είχαν υψηλότερη ενεργότητα P-gr σε σχέση με τους μη-φορείς (213). Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι ο πολυμορφισμός C3435T στο εξόνιο 27 πιθανά μεταβάλλει την τεταρτοταγή δομή της p-γλυκοπρωτεΐνης και ακολούθως την σταθερότητα ή την έκφραση της, όταν συμβεί μια διακοπή του ριβοσώματος κατά την μετάφραση του mRNA. Έχει προταθεί ότι η διακοπή αυτή συμβαίνει λόγω της παρουσίας ενός σπάνιου κωδικόνιου και αλλάζει τον ρυθμό μετάφρασης του mRNA και της διευκολυνόμενης μέσω σαπερόνιου αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (216, 231, 232).

3.5.4 Έκφραση και λειτουργικότητα p-γλυκοπρωτεΐνης στην ΙΦΝΕ

Η έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης στην γαστρεντερική οδό κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, παρουσιάζει ποικίλες διακυμάνσεις, ενώ κατά κύριο λόγο χαρακτηρίζεται από αύξηση στα άπω τμήματα του εντέρου (ειλεός και κόλον) (233). Ρυθμίζεται από πολυάριθμους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, τον βαθμό ενεργοποίησης του κάθε κυττάρου και τις επιδράσεις από το περιβάλλον του. Η μεταφορά ξеноβιοτικών από την p-γλυκοπρωτεΐνη στον εντερικό βλεννογόνο επηρεάζει τη συγγενή και επίκτητη ανοσολογική απάντηση, το φλεγμονώδες και οξειδωτικό στρες, τα διαιτητικά αντιγόνα, την μικροβιακή χλωρίδα και άλλους

περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έχει δειχθεί ότι η μειωμένη έκφραση σχετίζεται με την οξεία φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου σε πειραματικό μοντέλο ποντικών με κολίτιδα επαγόμενη από δεξτράνη θειικού νατρίου (dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis) (234) καθώς και σε ορισμένους ασθενείς με ενεργό ελκώδη κολίτιδα (235).

Ίσως τα σημαντικότερα δεδομένα σχετικά με τον φυσιολογικό ρόλο της p-γλυκοπρωτεΐνης στην γαστρεντερική οδό προέρχονται από πειραματικά μοντέλα ποντικών στα οποία είχε διαγραφεί το γονίδιο *mdr1a*. Η ανάπτυξη των πειραματικών αυτών μοντέλων κατευθύνθηκε κυρίως από το γεγονός ότι το γονίδιο MDR1 βρίσκεται σε περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος, η οποία περιλαμβάνει γονίδιο που σχετίζεται με την εκδήλωση IBD (236). Έχει δειχθεί ότι τα *mdr1a* knockout ποντίκια (*mdr1a*^{-/-}) είναι επιρρεπή στην εκδήλωση σοβαρής αυτόματης εντερικής φλεγμονής κάτω από συγκεκριμένες στείρες συνθήκες ανάπτυξης, και η φλεγμονή αυτή είναι παρόμοια με την IBD. Τυπικά, η πανκολίτιδα στα *mdr1a* knockout ποντίκια χαρακτηρίζεται από γενικευμένη φλεγμονώδη πάχυνση του βλεννογόνου, αύξηση του μήκους των κρυπτών ενίοτε με αποστημάτια και απώλεια των κυττάρων goblet (237).

Επιπρόσθετα, τα *mdr1a*(^{-/-}) ποντίκια μόνο με διαταραχή του επιθηλιακού φραγμού, χωρίς ανοσολογική διαταραχή, είναι πιθανό να εκδηλώσουν κολίτιδα ακόμη και με φυσιολογική εντερική χλωρίδα (238).

Είναι γνωστό ότι η εντερική χλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της IBD. Στην ενεργό IBD, διαταράσσεται η ανοχή του οργανισμού στα βακτηριακά αντιγόνα και οι αλλαγές στην μικροβιακή χλωρίδα συμβάλλουν την εντερική

φλεγμονή. Υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις ότι ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών συνδέεται με την εντερική χλωρίδα μέσω της p-γλυκοπρωτεΐνης (239).

Η p-γλυκοπρωτεΐνη περιορίζει την εισβολή των μικροβίων. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου οδηγεί σε αντίσταση στην φλεγμονή από *Listeria monocytogenes* ή *Salmonella typhimurium* (240, 241), ενώ τα ποντίκια που δεν διαθέτουν MDR1a μετά από λοίμωξη με *Listeria monocytogenes* έχουν αυξημένο αριθμό μικροβίων σε σχέση με τα wild type ποντίκια (240).

Επιπρόσθετα, στα ποντίκια αυτά, λόγω της απουσίας αντλίας είναι ευκολότερη η συσσώρευση ξενοβιοτικών και μεταβολιτών στον εντερικό βλεννογόνο, με αποτέλεσμα η δυσβίωση καθώς και οι προφλεγμονώδεις καταστάσεις να είναι συχνότερες. Τα ξενοβιοτικά και οι μεταβολίτες μπορούν να αλλάξουν ολόκληρη την ισορροπία του μικροβιώματος (242), παρέχοντας υπόστρωμα για την ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών μικροβίων, ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση διαταράσσοντας την μικροβιακή ανοχή και διεγείροντας την ανοσολογική απάντηση έναντι μικροβίων της φυσιολογικής χλωρίδας (243).

Αλλά και αντίστροφα, τα μικρόβια μπορούν να τροποποιήσουν την σηματοδότηση της p-γλυκοπρωτεΐνης στον εντερικό βλεννογόνο, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την απομάκρυνση των ξενοβιοτικών και των μεταβολιτών (242). Για παράδειγμα, η λοίμωξη από *Salmonella typhimurium* καταστέλλει την έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης (241, 244).

Το επόμενο βήμα στην διαδικασία διερεύνησης του ρόλου της p-γλυκοπρωτεΐνης στην παθογένεια της IBD, ήταν η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης στην νόσο.

Προς αυτή την κατεύθυνση, διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στις οποίες η έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης μεταβάλλεται στην IBD.

Οι Yacyshyn και συν προσδιόρισαν την έκφραση, το MDR1 mRNA καθώς και την ενεργότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης σε ασθενείς με νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα η έκφραση της πρωτεΐνης μελετήθηκε σε ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα, λεμφοκύτταρα βασικής μεμβράνης και περιφερικού αίματος, με χρήση του αντισώματος MRK-16, το οποίο αναγνωρίζει επιφανειακό αντιγόνο της p-γλυκοπρωτεΐνης, ενώ για την ενεργότητα χρησιμοποιήθηκε λειτουργική δοκιμασία Rh123 (Rhodamine dye efflux assay, Rh123). Συνολικά, διαπιστώθηκε μειωμένη ενεργότητα της πρωτεΐνης καθώς και μειωμένη έκφρασή της σε CD3+ εντερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με UC σε σχέση με την CD και υγιείς μάρτυρες, καθώς και μειωμένα επίπεδα MDR1 mRNA (245).

Στην μελέτη των Langmann και συν, η έκφραση του MDR1 mRNA καθώς και του PXR (pregnane X receptor), ενός πυρηνικού υποδοχέα ο οποίος ρυθμίζει μια σειρά γονιδίων, όπως το MDR1 τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία απομάκρυνσης των ξενοβιοτικών από το ήπαρ και το έντερο, βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στο παχύ έντερο ασθενών με ελκώδη κολίτιδα, αλλά όχι σε ασθενείς με νόσο Crohn (246). Σε μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε IL10 knockout ποντίκια (IL10 -/-), που αυτόματα αναπτύσσουν φλεγμονή λεπτού και παχέος εντέρου, και σε ποντίκια με κολίτιδα επαγόμενη από δεξτράνη θεικού νατρίου (dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis) βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα καθώς και μειωμένη ενεργότητα p-γλυκοπρωτεΐνης και μάλιστα στον μη φλεγμαίνοντα τελικό ειλεό ποντικών με DSS-επαγόμενη κολίτιδα τα επίπεδα της της p-γλυκοπρωτεΐνης αλλά και η ενεργότητα της ήταν αυξημένα, γεγονός πιθανόν αντιρροπιστικό της μείωσης των επιπέδων και της ενεργότητας στο φλεγμαίνον κόλον (247).

Επιπλέον, στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με UC, CD, εκκολπωματίτιδα, κολλαγονική κολίτιδα και υγιών μαρτύρων προσδιορίστηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης σε πραγματικό χρόνο (real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR), Western blotting και/ή ανοσοιστοχημεία τα επίπεδα έκφρασης των MDR1, iNOS, MRP1, CYP3A4, and PXR, αλλά και τα επίπεδα του MDR1 στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου παχέως εντέρου DLD-1, μετά επίδραση κυτταροκινών TNF-α, IFN-γ, και/ή IL-1β. Αν και η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μικρό αριθμό ασθενών, βρέθηκε ότι η έκφραση του MDR1 ήταν σημαντικά μειωμένη σε φλεγμαίνοντα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με CD, UC, κολλαγονική κολίτιδα και εκκολπωματίτιδα. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε επίσης και μετά την επίδραση κυτταροκινών στις βιοψίες εντερικού βλεννογόνου, αλλά όχι στα καρκινικά κύτταρα (248).

Φαίνεται ότι η μείωση της έκφρασης της ρ-γλυκοπρωτεΐνης στους ασθενείς με IBD οφείλεται πιθανόν στην μη φυσιολογική της αναδίπλωση και επακόλουθη αποδόμηση (232).

3.5.5 Πολυμορφισμοί γονιδίου ABCB1/MDR1 και IΦNE

Από το 2002 έως σήμερα, υπάρχουν δεδομένα από 21 μελέτες γενετικής συσχέτισης (genome association studies) από διάφορους πληθυσμούς, στις οποίες αφορούν στην συσχέτιση των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών κυρίως και λιγότερο των απλοτύπων του γονιδίου ABCB1 με την IBD. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Στους πίνακες 3 και 4 αναφέρονται οι μελέτες και οι μετααναλύσεις

πάνω στο θέμα. Οι Schwab και συν το 2003 πρώτοι συσχέτισαν την παρουσία του πολυμορφισμού C3435T την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας (249).

Ακολούθως, οι Brant και συν, σε μια μεγάλη πολυκεντρική μελέτη στην Β. Αμερική ανέφεραν συσχέτιση του πολυμορφισμού G2677T/A με την IBD (250),

ενώ οι Croucher και συν. σε Βρετανούς και Γερμανούς ασθενείς με IBD, δεν βρήκαν συσχέτιση του πολυμορφισμού C3435T με ελκώδη κολίτιδα ή νόσο Crohn (251).

Οι Ho και συν. το 2005 αναφέρουν ότι ο 3435TT γονότυπος καθώς και το αλληλόμορφο T σχετίζεται με ελκώδη κολίτιδα και μάλιστα η συσχέτιση ήταν ισχυρότερη με εκτεταμένη νόσο, και όχι με νόσο Crohn, ενώ δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τον πολυμορφισμό G2677T/A και την IBD (252). Οι Potocnik και συν, σε ομάδα ασθενών από την Σλοβενία, μελέτησαν τους 3 συχνότερους πολυμορφισμούς C1236T, G2677T/A και C3435T καθώς και 2 πολυμορφισμούς σε ιντρόνια με στόχο τον καθορισμό των απλοτύπων καθώς και της ανισορροπίας σύνδεσης εντός του γονιδίου, βρήκαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των απλοτύπων και των πολυμορφισμών των ιντρονίων και της ελκώδους κολίτιδας αλλά και της ανθεκτικής στην θεραπεία νόσου Crohn (253).

Στην συνέχεια, 2 μελέτες από την Ιταλία δεν κατέδειξαν γενετική συσχέτιση (254, 255) και ακολούθησαν οι μελέτες των Fiedler και συν. από την Γερμανία, στην οποία βρέθηκε ότι ο συνδυασμένος γονότυπος των πολυμορφισμών G2677T/A και C3435T σχετίζεται με εμφάνιση UC σε νεαρή ηλικία αλλά και βαρύτερη νόσο, των Urcelay και συν. από την Ισπανία, στην οποία συσχετίστηκε η παρουσία του πολυμορφισμού C3435T με CD και όχι UC (256), αλλά και των Omnie και συν στην

οποία περιλαμβάνονταν και μετα-ανάλυση των υπαρχουσών μελετών και βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού G2677T με την UC (257).

Στον αντίποδα των μελετών αυτών, οι Fischer και συν και οι Oostenbrug και συν. σε δείγματα ασθενών από την Ουγγαρία και την Σκανδιναβία δεν βρήκαν καμία συσχέτιση (258, 259), ενώ το 2009 οι Huebner και συν, από την Νέα Ζηλανδία, αναφέρουν προστατευτικό ρόλο των πολυμορφισμών C1236T και G2677T/A στην εκδήλωση UC (260).

Ακολουθούν μελέτες από Βόρεια Ινδία και Ιράν οι οποίες ενισχύουν τον ρόλο των πολυμορφισμών στην εμφάνιση UC (261, 262) αλλά και η μελέτη των Østergaard M και συν σε Δανούς ασθενείς με IBD, στην οποία δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A με την νόσο (263), όπως και στην μελέτη των Dudarewicz και συν το 2012 σε μικρό σχετικά δείγμα Πολωνών ασθενών με IBD, στην οποία ο πολυμορφισμός C3435T δεν σχετίστηκε με την εκδήλωση IBD (264).

Ωστόσο, σε 2 μελέτες που δημοσιεύτηκαν αργότερα και αφορούσαν σε Κροάτες και Σέρβους ασθενείς με IBD, οι MDR1 πολυμορφισμοί C3435T, G2677T/A και C1236T καθώς και οι απλότυποι συσχετίστηκαν με εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας (265, 266).

Σε μια τελευταία πρόσφατη μελέτη σε Πολωνούς και Βόσνιους ασθενείς με CD, η παρουσία των πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την νόσο (267).

Από την ανασκόπηση της υπάρχουσας έως τώρα βιβλιογραφίας βρέθηκαν 4 μετα-αναλύσεις, οι τρεις εκ των οποίων αναφέρουν συσχέτιση του πολυμορφισμού C3435T με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας και όχι νόσο Crohn (268-270), ενώ

στην μετα-ανάλυση των Wang και συν. στην οποία περιελήφθησαν 13 μελέτες σε συνολικά 6.757 ασθενείς με IBD, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση (271).

Πίνακας 3: Μελέτες συσχέτισης γονιδίου ABCB1 με την εκδήλωση ΙΦΝΕ και την ανταπόκριση στη θεραπεία

Συγγραφέας (έτος, χώρα) αναφορά (No.)	Αριθμός ασθενών	SNPs μελέτης	Αποτελέσματα
Fischer S (2007, Ουγγαρία) (258)	414	C3435T, G2677T/A	Καμία συσχέτιση με νόσο ή ανταπόκριση σε θεραπεία
Yang QF (2015, Κίνα) (327)	156	C3435T, G2677T/A	Συσχέτιση με ανταπόκριση στα κορτ/δή και εκδήλωση νόσου CD
Dudarewicz M (2012, Κεντρική Πολωνία) (264)	108	C3435T	Καμία συσχέτιση
Brinar M (2013, Κροατία) (265)	310	C3435T, G2677T/A	Συσχέτιση με ΙΦΝΕ (ισχυρότερη με UC)
Potocnik U (2004, Σλοβενία) (253)	307	C1236 T, Ala893Ser/Thr, και	Συσχέτιση με UC και ανθεκτική CD

		C3435T.	
<u>Huebner C</u> (2009 Νέα Ζηλανδία) (260)	784	C3435T, G2677T/A, C1236T	Συσχέτιση με UC
Ho GT (2005, UK) (252)	603	C3435T, G2677T	Συσχέτιση του C3435T με UC
Brant SR (2003, USA) (250)	211 λευκοί	G2677T/A (Ala893Ser/Thr), C3435T	Συσχέτιση του Ala893Ser/Thr με IBD.
Palmieri O (2005, Ιταλία) (254)	946	C3435T, G2677T/A	Καμιά συσχέτιση
Urcelay E (2006, Ισπανία) (256)	651	C3435T, G2677T/A	Συσχέτιση του C3435T με CD (αναγνώριση απλότυπου 2677T/C3435T
Østergaard M (2009, Δανία) (263)	914	C3435T, G2677T/A	Καμιά συσχέτιση
Juyal G (2009, Βόρειοι Ινδιάνοι) (261)	270	C1236T, G2677T/A, και C3435T	Συσχέτιση SNP's με UC και ειδικούς φαινότυπους νόσου
Schwab M (2003, Γερμανία) (249)	275	C3435T	Συσχέτιση με UC
Oostenbrug LE (2006, Σκανδιναβία)	781	C3435T και 6 μικροδορυφορικοί	Καμιά συσχέτιση

(259)		markers κοντά και εντός του γεν. τόπου MDR1	
Ardizzone S (2007, Ιταλία) (255)	308	C3435T, G2677T/A	Καμιά συσχέτιση
Onnie CM (2006, Βρετανία) (257)	1408	C3435T, G2677T/A	Συσχέτιση του γονότυπου 2677TT και του αλληλίου T με σοβαρή UC και με χρήση c/s

ΙΦΝΕ: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn, C/S: κορτικοστεροειδή

Πίνακας 4: Μελέτες μετα-ανάλυσης πολυμορφισμών γονιδίου ABCB1/MDR1 με ΙΦΝΕ .

Συγγραφέας (έτος, χώρα) αναφορά (No.)	Αριθμός μελετών	SNP's μελέτης	Αποτελέσματα
Wang J (2014, Κίνα) (271)	13 (6.757 ασθενείς με ΙΦΝΕ)	C3435T	Καμιά συσχέτιση με ΙΦΝΕ
Annese V (2006, Ιταλία) (268)		C3435T, G2677T/A	Σημαντική συσχέτιση αλληλίου 2677T με UC
Zhao JJ (2015, Κίνα) (269)	12 (1860 UC ασθενείς)	C3435T	C3435T SNP μπορεί να προδιαθέτει σε UC

Zintzaras E (Ελλάδα, 2012) (270)	20	C3435T, G2677T/A	Όχι ξεκάθαρα αποτελέσματα- οριακή συσχέτιση C3435T με UC
-------------------------------------	----	---------------------	--

ΙΦΝΕ: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn

III ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

4. Ρόλος p-γλυκοπρωτεΐνης στην φαρμακοκινητική στην πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση και στην αποτελεσματικότητα θεραπείας

Είναι γνωστές οι διαφορές που απαντώνται στην κλινική πράξη όσον αφορά στην τοξικότητα και στην αποτελεσματικότητα μιας φαρμακευτικής αγωγής στους διάφορους ασθενείς. Τα αίτια των διαφορών μπορεί να είναι επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων, αλληλεπιδράσεις φαρμάκων, ενώ φαίνεται ότι επιπλέον εμπλέκεται ο γονότυπος του ασθενούς. Η παρατήρηση αυτή θέτει τις βάσεις για την εξατομικευμένη φαρμακευτική αγωγή, προσαρμοσμένη στο γενετικό προφίλ του κάθε ασθενούς. Οι συχνότερες γενετικές διαφοροποιήσεις αφορούν σε πολυμορφισμούς γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων καθώς και πρωτεΐνες μεταφορείς φαρμάκων.

Με βάση το γεγονός ότι ο ABCB1 γονότυπος επηρεάζει την έκφραση ή/και την λειτουργικότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης, θα πρέπει να σχετίζεται με αλλαγές στην φαρμακοκινητική φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα της.

4.1 Συσχέτιση πολυμορφισμών p-γλυκοπρωτεΐνης με την φαρμακοκινητική υποστρωμάτων.

Η p-γλυκοπρωτεΐνη επηρεάζει την φαρμακοκινητική μέσω περιορισμού της *per os* απορρόφησης, της νεφρικής κάθαρσης και της διείσδυσης σε όργανα στόχους όπως ο εγκέφαλος (272).

Συνεπώς, σε άτομα με αυξημένη έκφραση ή/και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης θα πρέπει να παρατηρείται μειωμένη από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, μείωση των μεγίστων συγκεντρώσεων στο πλάσμα και αυξημένη κάθαρση από τους νεφρούς.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλαπλές μελέτες σχετικά με τον ρόλο της p-γλυκοπρωτεΐνης στην φαρμακοκινητική πολλών φαρμάκων τα οποία είναι γνωστά υποστρώματα όπως η δακτυλίτιδα, τα αντι-ιικά φάρμακα, τα ανοσοκατασταλτικά, τα κορτικοειδή και άλλα . Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα.

Οι Hoffmeyer και συν. πρώτοι περιέγραψαν τον πολυμορφισμό C3435T στο εξόνιο 26 και ανέφεραν ότι επηρεάζει την έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης στο δωδεκαδάκτυλο καθώς και την ενεργότητα της. Στην μελέτη αυτή, τα άτομα που έφεραν τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία (γονότυπος TT) παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης στο δωδεκαδάκτυλο και υψηλά επίπεδα δακτυλίτιδας στο ορό. Επιπρόσθετα, μετά από σταθερή χορήγηση δακτυλίτιδας, τα άτομα με TT γονότυπο παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση της μέγιστης συγκέντρωσης στον ορό (38%) σε σχέση με τα άτομα με CC γονότυπο (218).

Ακολουθως, τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε μια μελέτη στην οποία τα άτομα με γονότυπο 3435TT είχαν αυξημένες μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στον ορό σε σχέση με τα άτομα με γονότυπους 3435CT και 3435CC (273).

Υπάρχουν ωστόσο μελέτες οι οποίες περιγράφουν αντίθετη (274) ή καθόλου συσχέτιση (275).

Οι Kroetz και συν πραγματοποίησαν ανάλυση απλότυπου σε 247 δείγματα DNA διαφόρων εθνοτήτων ενώ σε ανάλυση *in vitro* μερικών από αυτούς τους απλότυπους όσον αφορά στην ενεργότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης, βρέθηκε ότι αρκετοί από αυτούς έχουν κλινική σημασία. Για παράδειγμα, ο απλότυπος 2677G/3435T συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα μετά από χορήγηση δακτυλίτιδας *per os*, ενώ ο απλότυπος 2677G/3435C συσχετίστηκε με χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα (212, 276).

Οι Kim και συν έδειξαν ότι ο απλότυπος MDR 1*2 (G2677T/C3435T) σχετίζεται με αυξημένη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης *in vitro* και μειωμένες συγκεντρώσεις ενός υποστρώματός της, της φεξοφenaδίνης (213). Οι Fellay et al έδειξαν ότι ο γονότυπος 3435 TT σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος αλλά και με χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα των αντικών φαρμάκων νελφίναβιρη και εφιβιρένζη (277).

Οι Hitzl και συν έδειξαν ότι στα κύτταρα CD56+, ο γονότυπος 3435 TT σχετίζεται με μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα της πρωτεΐνης σε σχέση με τον γονότυπο CC όσον αφορά στο υπόστρωμα ροδαμίνη 123 (219).

Οι Yi SY και συν έδειξαν ότι μετά από μια δόση, τα επίπεδα της φεξοφenaδίνης ήταν μειωμένα στα άτομα με γονότυπο 2677AA/3435CC σε σχέση με τα άτομα με τους υπόλοιπους γονοτυπικούς συνδυασμούς των πολυμορφισμών G2677T/A and C3435T (278), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με τον γονότυπο όσον αφορά στην λοπεραμίδη (279), στην ροδαμίνη 123 και στην βινκριστίνη (280, 281).

Οι Morita και συν δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση της p-γλυκοπρωτεΐνης μεταξύ κυττάρων στα οποία εκφράζονταν 5 πολυμορφικοί τύποι του MDR1 cDNAs (2677G/3435T, 2677A/3435C, 2677A/3435T, 2677T/3435C, 2677T/3435T) και κυττάρων στα οποία εκφράζονταν τα wild-type αλληλόμορφα (2677G/3435C), υποδηλώνοντας ότι οι δύο συχνότεροι πολυμορφισμοί δεν είχαν καμιά επίδραση στην ικανότητα μεταφοράς της p-γλυκοπρωτεΐνης σε κύτταρα LLC-PK1 in vitro, και πως η έκφραση και η in vivo ενεργότητα της πιθανά ελέγχεται από άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (224).

Σε πρόσφατη μελέτη των Dickens D και συν, εκφράστηκε το αλληλόμορφο που έφερε και τους τρεις πολυμορφισμούς (1236C>T, 2677G>T και 3435C>T) σε ωκύτταρα του *Xenopus laevis* (αφρικανικού ονυχοφόρου βατράχου) και έγινε προσπάθεια εκτίμησης της επίδρασης των πολυμορφισμών αυτών στην μεταφορά της δακτυλίτιδας και του αναστολέα τυροσινικής κινάσης ιματινίμπη. Δεν βρέθηκε καμιά λειτουργική επίδραση των πολυμορφισμών αυτών με την μεταφορά των υποστρωμάτων αυτών της p-γλυκοπρωτεΐνης (282).

Επιπρόσθετα, στην πλειοψηφία των μελετών στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα tacrolimus, κυκλοσπορίνη ή sirolimus, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών με την φαρμακοκινητική τους (283-289).

4.2 Αντικαρκινικά φάρμακα

Είναι γνωστός ο σημαντικός ρόλος της p-γλυκοπρωτεΐνης, αλλά και άλλων μεταφορέων εκροής, στην απορρόφηση και απέκκριση αντικαρκινικών φαρμάκων (290, 291).

Η κλασική πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση, μέσω της p-γλυκοπρωτεΐνης (MDR) αναγνωρίστηκε αρχικά στα 1970 και είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο πειραματικά φαινόμενο. Η υπερέκφρασή της σε καρκινικά κύτταρα προκαλεί φαρμακευτική αντίσταση σε μια μεγάλη γκάμα χημειοθεραπευτικών (183).

Τα χημειοθεραπευτικά που ανήκουν στην κατηγορία των ταξανών όπως τα docetaxel και paclitaxel, αναστέλλουν την μίτωση οδηγώντας έτσι σε κυτταρικό θάνατο και κυρίως χρησιμοποιούνται στον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα και των ωθηκών (292).

Για τις ταξάνες, το γονίδιο ABCB1 θεωρείται ένας από τους καλύτερους υποψήφιους βιοδείκτες κλινικής ανταπόκρισης και τοξικότητας εξαιτίας διαφορών φαρμακοκινητικής (293).

Σε ασθενείς που έφεραν τους τρεις προαναφερθέντες πολυμορφισμούς του γονιδίου ABCB1, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση στο πλάσμα και αλλαγή στην κάθαρση της δοξορουμπικίνης, μιας ανθρακυκλίνης που χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση των συμπαγών όγκων, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την φαρμακοκινητική άλλων ανθρακυκλινών (294-296).

Οι Sai K και συν συσχέτισαν τον απλότυπο T1236/G2677/T3435 με μειωμένη νεφρική κάθαρση ιρινοτεκάνης ενός αναστολέα της τοποισομεράσης, που χρησιμοποιείται στην θεραπεία του κολορθικού καρκίνου ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη (5-FU), άρα αυξημένα επίπεδα στον ορό, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (297).

Οι περισσότεροι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs) μεταφέρονται μέσω της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης και έτσι οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς αυτούς πιθανόν να επηρεάζουν την φαρμακοκινητική τους. Ο καλύτερα μελετημένος είναι η ιματινίμη (imatinib), στην θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και στους στρωματικούς όγκους της γαστρεντερικής οδού (298).

Ωστόσο, από τις μελέτες έως τώρα, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (299-302).

Για τους 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς TKIs, αξιτινίμη, βοσουτινίμη, νιλοτινίμη, ντασατινίμη, σοραφενίμη και πονατινίμη (axitinib, bosutinib, nilotinib, dasatinib, sorafenib, ponatinib), η συγγένεια υποστρώματος για τους μεταφορείς είναι μικρότερη από αυτή της ιματινίμης. Έτσι, η αποτελεσματικότητά τους δεν επηρεάζεται σημαντικά από πολυμορφισμούς των κωδικών γονιδίων των μεταφορέων (298).

Για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν πιθανόν να συμβάλλουν η πιθανή αλληλεπίδραση με το σύστημα του κυτταροχρώματος P450, η συμβολή άλλων συστημάτων μεταφοράς στην συγκέντρωση των διαφόρων υποστρωμάτων, αλλά και οι διαφορές στην σχεδίαση των διαφόρων μελετών.

Μετά την γονοτύπηση του ανθρώπινου γονιδιώματος υπολογίζεται ότι περίπου 500-1200 γονίδια κωδικοποιούν πρωτείνες μεταφορείς (145). Οι κυριότεροι από αυτούς είναι οι πρωτείνες πολλαπλής φαρμακευτικής αντίστασης (MDRs), οι σχετιζόμενες με πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση πρωτείνες (MRPs), οι μεταφορείς οργανικών ανιόντων (OATs), τα πολυπεπίδια μεταφοράς οργανικών ανιόντων (OATPs), οι μεταφορείς οργανικών κατιόντων (OCTs) και οι μεταφορείς πεπτιδίων (PerTs) (303, 304).

Οι δύο βασικοί καθοριστές της φαρμακοκινητικής των φαρμάκων ωστόσο είναι οι μεταφορείς φαρμάκων όπως η ρ-γλυκοπρωτεΐνη και τα ένζυμα μεταβολισμού των φαρμάκων, όπως η υπεροξειδογένεια των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Έχει παρατηρηθεί ότι η ρ-γλυκοπρωτεΐνη και το CYP3A4 έχουν πολλά κοινά υποστρώματα, εκφράζονται στην επιφάνεια των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και του ήπατος και εμπλέκονται στην μεταφορά και τον μεταβολισμό των κορτικοστεροειδών (305).

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι ένας πυρηνικός παράγοντας, ο υποδοχέας στεροειδών και ξενοβιοτικών SXR (επίσης γνωστός και ως PXR, PAR, PRR), εμπλέκεται στην επαγωγή της έκφρασης τόσο του MDR1 αλλά και του CYP3A4 (306).

Επιπρόσθετα, για να ελεγχθεί το εάν ένα φάρμακο είναι ή όχι υπόστρωμα του MDR1, χρησιμοποιούνται κύτταρα που υπερεκφράζουν το MDR1, όπως τα Caco-2 (307), και LLCGA5-COL150 (308, 309) ή *mdr1a* knock-out ποντίκια (188).

4.3 Συσχέτιση πολυμορφισμών ABCB1/MDR1 με ανθεκτική στην θεραπεία ΙΦΝΕ.

Για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας στην IBD, θα πρέπει καταρχήν να εκτιμηθεί η βαρύτητα της νόσου με κλινικούς και ενδοσκοπικούς δείκτες. Επιπλέον, είναι σημαντικό να παρακολουθηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με επανεκτίμηση κλινικών scores και φλεγμονωδών δεικτών όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η καλπροτεκτίνη κοπράνων. Ο κύριος στόχος της θεραπείας είναι η επούλωση του εντερικού βλεννογόνου (310).

Οι μισοί περίπου από τους ασθενείς με IBD είναι υποψήφιοι για ανοσοκατασταλτική θεραπεία, είτε λόγω σοβαρής έξαρσης νόσου είτε λόγω χρόνιας ενεργότητας, με μακροχρόνια λήψη κορτικοστεροειδών για τον έλεγχο των συμπτωμάτων (311).

Εκτός των κορτικοστεροειδών, έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της νόσου αζαθειοπρίνη, μερκαπτοπουρίνη, μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη και τακρόλιμους, τα οποία επιτυγχάνουν ύφεση της νόσου σε ποσοστά που κυμαίνονται από μόλις 40% [για την μεθοτρεξάτη στην CD (312)] έως 80% [για την κυκλοσπορίνη στην UC (313)].

Η διατήρηση της ύφεσης είναι ακόμη πιο δύσκολη. Τα σκευάσματα 5-αμινοσαλικυλικού οξέος, ενώ είναι αποτελεσματικά σε πολλούς ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, δεν είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο της νόσου Crohn, εκτός εάν η ύφεση έχει επιτευχθεί με χειρουργική παρέμβαση. Οι θειοπουρίνες και η μεθοτρεξάτη θα διατηρήσουν τους μισούς έως τα 2/3 των ασθενών με CD σε ύφεση (314, 315) και το ίδιο ισχύει για την UC, ιδιαίτερα την κορτικοεξαρτώμενη νόσο

(316), ενώ πολλά υποσχόμενες είναι οι νεότερες βιολογικές θεραπείες (αντι-TNF) κλπ.

Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (CS) χρησιμοποιούνται σε μέτριες και σοβαρές εξάρσεις της νόσου και αν και είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά, το 16-20% των Καυκάσιων ασθενών παρουσιάζουν αντοχή σε αυτά, ενώ το 28-36% είναι κορτικοεξαρτώμενοι (311, 317-319).

Η αντιφλεγμονώδης δράση των κορτικοειδών συνίσταται στην αναστολή της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων και της έκκρισης κυτταροκινών, που ακολουθούν την πρόσδεση του φαρμάκου στους ενδοκυττάριους υποδοχείς κορτικοειδών (GR- α), και οι οποίοι αλλάζουν την στερεοδομή τους. Τα κορτικοειδή είναι αναποτελεσματικά σε 3 περιπτώσεις: λόγω δυσλειτουργίας του υποδοχέα, λόγω πληθώρας προφλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες μειώνουν την συγγένεια του υποδοχέα για το φάρμακο και λόγω μείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φαρμάκου εξαιτίας απομάκρυνσής του από το εσωτερικό του κυττάρου (320). Ο τελευταίος μηχανισμός εξαρτάται από την p-γλυκοπρωτεΐνη. Η αύξησή της στην επιφάνεια του κυττάρου πιθανά προκαλεί αυξημένη απελευθέρωση φαρμάκου στην κυκλοφορία.

Εκτός από τα κορτικοειδή, η κυκλοσπορίνη αποτελεί επίσης υπόστρωμα της p-γλυκοπρωτεΐνης (309, 321). Αυξημένη βρέθηκε η έκφραση της στα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με IBD ανθεκτική στην θεραπεία (322).

Η χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοειδών είναι πιθανό να αυξάνει την έκφραση του *ABCB1/MDR1* mRNA σε ασθενείς με UC (323). Πρόσφατα, σε ασθενείς με CD, αναγνωρίστηκε η παρουσία μιας παθογόνου υπο-ομάδας Th17-κυττάρων, η οποία σταθερά εκφράζει p-γλυκοπρωτεΐνη. Τα κύτταρα αυτά παρουσίαζαν αντοχή σε διάφορα κορτικοειδή (244), συμβάλλοντας έτσι σε μια χρόνια κορτικοανθεκτική φλεγμονή στην IBD. Αντίστροφα, η αναστολή της p-γλυκοπρωτεΐνης αυξάνει σημαντικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση κορτιζόλης και κυκλοσπορίνης *in vitro*, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στην ανθεκτική στην θεραπεία IBD (324). Ωστόσο *in vivo* δεν υπάρχουν αποδείξεις. Οι αναστολείς της p-γλυκοπρωτεΐνης δεν μπορούσαν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε άλλες νόσους (325).

Στην μελέτη των Rotocnik και συν. φάνηκε μια ασθενής συσχέτιση μεταξύ της κορτικοανθεκτικής νόσου Crohn και των πολυμορφισμών στα ιντρόνια 13 και 16 του γονιδίου *ABCB1* (253).

Το εύρημα ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκε από ακόλουθες μελέτες. Το 2007, οι Cucchiarra και συνεργάτες μελέτησαν τον πολυμορφισμό C3435T σε 200 Ιταλούς παιδιατρικούς ασθενείς με CD και 186 ασθενείς με UC που έλαβαν κορτικοειδή και έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός αυτός δεν σχετίστηκε με την ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή (326)

Επιβεβαιώνοντας αυτά τα αποτελέσματα, σε μεγάλη μελέτη ενηλίκων ασθενών με IBD, δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην κλινική ανταπόκριση μετά την χορήγηση κορτικοειδών και στην παρουσία των πολυμορφισμών C3435T και G26677T/A (254, 326).

Σε μια πρόσφατη σχετικά μελέτη σε Κινέζους ασθενείς με IBD αναφέρθηκε ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ABCB1 προδιαθέτουν στην εκδήλωση νόσου Crohn και σχετίζονται με την ανταπόκριση στην θεραπεία με κορτικοειδή (327).

Ομοίως σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων από την Βραζιλία βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός C3435T (rs1045642) του εξονίου 26 του γονιδίου MDR1 σχετίζεται με αντοχή στα κορτικοειδή σε ασθενείς με νόσο Crohn αλλά όχι σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (328).

5. Θειοπουρίνες και ΙΦΝΕ

5.1 Γενικά στοιχεία και ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι θειοπουρίνες, που ανακαλύφθηκαν στα μέσα του προηγούμενου αιώνα από τους Elion και Hitching περιλαμβάνουν την αζαθειοπρίνη (AZA), την 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) και την 6-θειγουανίνη(6-TG) (329). Τα φάρμακα αυτά έχουν κυτταροτοξικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Η 6-MP και η AZA αποτελούν κεντρική αγωγή για την IBD. Πρώτη χρήση τους αναφέρεται στα 1962 από τον Bean για την θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας (330). Επί του παρόντος περίπου οι μισοί ασθενείς με IBD λαμβάνουν θειοπουρίνες (331, 332). Τόσο η AZA όσο και η 6-MP έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην επαγωγή της ύφεσης στην ενεργό νόσο Crohn (333, 334) για την διατήρηση της ύφεσης και την αποδέσμευση από τα στεροειδή στην κορτικοεξαρτώμενη νόσο Crohn, (314, 335) ή για την

πρόληψη υποτροπής μετά το χειρουργείο σε ασθενείς με νόσο Crohn (336-340).

Στην ελκώδη κολίτιδα χρησιμοποιούνται για την διατήρηση της ύφεσης (341).

Ωστόσο οι ασθενείς παρουσιάζουν μια μεγάλη γκάμα ανταπόκρισης στην χορήγηση θειοπουρινών. Περίπου το 15% με 28% των ασθενών παρουσιάζουν παρενέργειες, αιματολογικές, ηπατικές, παγκρεατικές (342-344). Επιπλέον, περίπου το 9% των ασθενών παρουσιάζει αντίσταση στις θειοπουρίνες (345). Οι διαφορές στην ανταπόκριση προκύπτουν κυρίως από τον μεταβολισμό των θειοπουρινών, και συνεπώς η κατανόηση του είναι σημαντική για την πρόληψη των ανεπιθύμητων ενεργειών και την βελτιστοποίηση της θεραπείας.

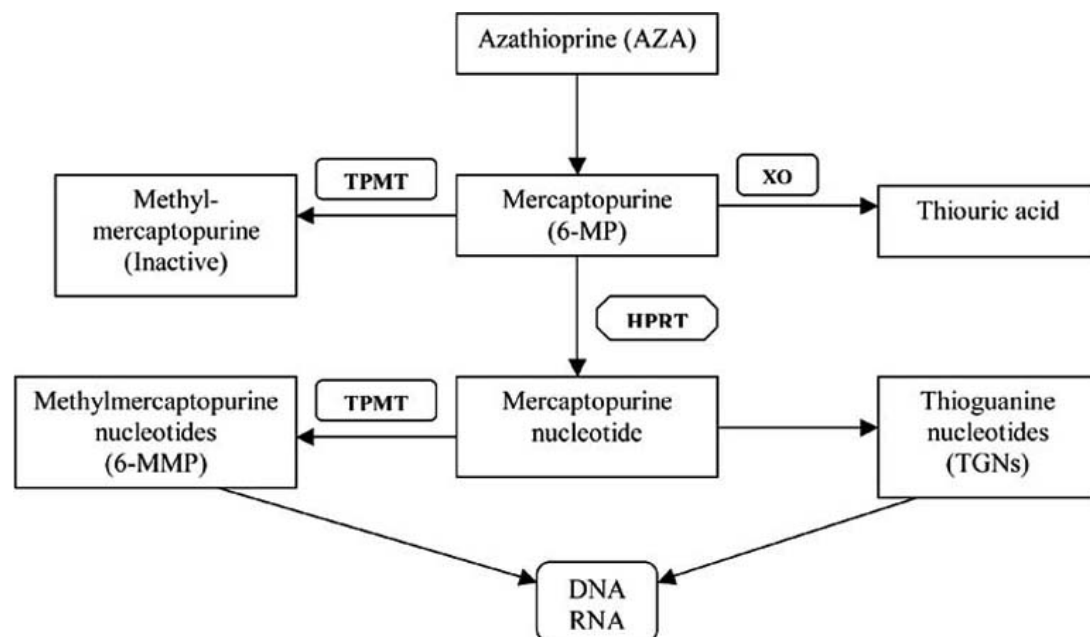
Η αζαθειοπρίνη είναι ένα προ-φαρμακο το οποίο απαιτεί μετατροπή στους ενεργούς του μεταβολίτες (εικόνα 9). Αρχικά, η αζαθειοπρίνη μετατρέπεται σε 6-MP κυρίως στο ήπαρ, μέσω κυρίως του ενζύμου γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (346).

Στο ήπαρ και το έντερο η 6-MP υφίσταται περαιτέρω μετατροπή. Οι θειοπουρίνες απαιτούν πολύπλοκη μεταβολική ενεργοποίηση, η οποία αρχίζει με την παρέμβαση της υποξανθινικής γουανινικής φωσφοριβοζυλο-τρανσφεράσης (HGPRT), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κυτταροτοξικών θειογουανινικών νουκλεοτιδίων (TGNs) (347), τα οποία ακολούθως ενσωματώνονται στο DNA και το RNA (348, 349).

Τα TGNs δρουν ως μεταβολικά ανάλογα και είναι υπεύθυνα τόσο για την ανοσοκατασταλτική ενεργότητα όσο και για την τοξικότητα της αζαθειοπρίνης.

Από την άλλη πλευρά, η S-μεθυλίωση από το TPMT ή η οξειδωση από την ξανθινική οξειδάση απενεργοποιεί τις θειοπουρίνες, σχηματίζοντας 6-μεθυλ-μερκαπτοπουρίνη και θειουρικό οξύ αντίστοιχα. Επιπλέον, το 6-θειοιοσινο-5' μονοφωσφορικό (TIMP) επίσης υφίσταται S-μεθυλίωση από το TPMT,

σχηματίζοντας μεθύλ-TIMP, το οποίο αναστέλλει την de novo σύνθεση των πουρινών, αποτελώντας έτσι έναν εναλλακτικό δρόμο κυτταροτοξικότητας (349).



Εικόνα 9: Μεταβολισμός θειοπουρινών. Σε αυτό το απλουστευμένο σχήμα η αζαθειοπρίνη (AZA) μετατρέπεται σε 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP), η οποία στην συνέχεια μεταβολίζεται μέσω τριών μονοπατιών: μέσω του TPMT προς μεθυλ-μερκαπτοπουρίνη, η οποία είναι ανενεργός, μέσω οξειδωσης από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) προς θειουρικό οξύ και τέλος καταβολισμός προς 6-θειογουανινικά νουκλεοτίδια (TGNs), τα οποία είναι κυτταροτοξικά όταν ενσωματωθούν στο DNA/RNA μέσω της υποξανθινικής φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης (HPRT). Το TPMT εμπλέκεται επίσης στην μετατροπή του μερκαπτοπουρινικού νουκλεοτιδίου προς 6-μεθυλ-μερκαπτοπουρινικά νουκλεοτίδια (6-MMP), τα οποία αναστέλλουν de novo την πουρινική σύνθεση, οδηγώντας σε κυτταροτοξικότητα.

Πηγή: (350) Shufeng Zhou. *Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase*. *Current Clinical Pharmacology*, 2006, 1, 119-128

Ενώ οι θειοπουρίνες είναι ανενεργά μόρια με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 1-2 ώρες, η θεραπευτική τους δράση σχετίζεται με την παραγωγή και συσσώρευση 6-

θειογουανινικών νουκεοτιδίων (6-TGN) (351). *In vivo*, σταθερή συγκέντρωση των 6-TGN επιτυγχάνεται περίπου μετά χορήγηση 4–5 εβδομάδων, με τον χρόνο ημίσειας ζωής τους να κυμαίνεται από 3 ημέρες έως 13 ημέρες (352-355). Συνεπώς η κλινική αποτελεσματικότητα είναι εμφανής 12-17 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας (334).

Ανεπιθύμητες ενέργειες θειοπουρινών

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες διακρίνονται σε δύο τύπους. Η δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα, η οποία σχετίζεται με την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ενεργών μεταβολιτών, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί μήνες ή χρόνια μετά την έναρξη της θεραπείας. Κυρίως εκδηλώνεται με καταστολή του μυελού των οστών και ηπατοτοξικότητα. Ο δεύτερος τύπος αφορά στην ανεξάρτητη από την δόση τοξικότητα και εκδηλώνεται κυρίως ως μυαλγία, συμπτώματα ομοιάζοντα με γρίπη, εξάνθημα και οξεία παγκρεατίτιδα.

5.1.1 Τοξικότητα του μυελού των οστών

Κυρίως αφορά στην λευκοπενία (λευκά αιμοσφαίρια (WBC): $2.0-4.0 \times 10^9/L$) και ουδετεροπενία (απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων $<1.5 \times 10^9/L$), που αποτελούν τις συχνότερες παρενέργειες των θειοπουρινών (356, 357).

Στις συνήθεις δόσεις, παρατηρούνται στο 2 με 10.5% των ασθενών με IBD, ανάλογα με τον χρόνο παρακολούθησης της μελέτης και τον χρησιμοποιούμενο ορισμό της

λευκοπενίας. Σε μια αναδρομική μελέτη 27 ετών που περιελάμβανε 739 ασθενείς με IBD, το 3.8% εκδήλωσε λευκοπενία και από αυτούς το 1.2% σοβαρή λευκοπενία ($WBC < 2.0 \times 10^9/L$) (356, 358, 359).

Η μυελοτοξικότητα μπορεί να εκδηλωθεί κάθε στιγμή κατά την θεραπεία, αλλά συνήθως παρατηρείται τους πρώτους μήνες, από τις 2 εβδομάδες μετά την έναρξη των θειπουρινών. Απαιτείται συχνή παρακολούθηση με γενική αίματος. Συνήθως πρόκειται για αναστρέψιμη μυελοτοξικότητα μετά την διακοπή του φαρμάκου ή την μείωση της δόσης στο 50% (358).

Στους ασθενείς με IBD έχει αναφερθεί σοβαρή μυελοκαταστολή, συμπεριλαμβανομένης λευκοπενίας θρομβοπενίας και πανκυτταροπενίας, η οποία μπορεί να είναι θανατηφόρος στο 1% από αυτούς και η επίπτωση τους δεν φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη (360).

Η εκδήλωση μυελοκαταστολής σχετίζεται σημαντικά με την συγκέντρωση των 6-θειγουανινικών νουκλεοτιδίων (6-TGN) στο αίμα και την μειωμένη ενεργότητα του TPMT (361-363).

Τα επίπεδα των 6-TGN στα ερυθρά είναι αντιπροσωπευτικά των επιπέδων στον μυελό των οστών, που οδηγούν σε μυελοτοξικότητα (364, 365).

Οι Weinshilboum και Sladek πρώτοι μελέτησαν τις διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου TPMT στα ερυθρά αιμοσφαίρια 298 Καυκάσιων. Από αυτούς, 88.6% παρουσίαζαν υψηλή ενεργότητα του ενζύμου (13.50 ± 1.86 U, mean \pm SD), 11.1% ενδιάμεση ενεργότητα (7.20 ± 1.08 U), και 0.3% είχαν μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα (366).

Στους ασθενείς με μειωμένη ή μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα του ενζύμου TPMT ευνοείται ο μεταβολισμός προς 6-TGN μέσω του μονοπατιού της υποξανθινικής φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης (HPRT) και υπάρχει κίνδυνος μυελοκαταστολής (360, 367-369).

Όσον αφορά στους ασθενείς με ενδιάμεση TPMT ενεργότητα, φαίνεται να παρουσιάζουν λευκοπενία σε ποσοστό μεγαλύτερο σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογική ενεργότητα του ενζύμου, γεγονός που αποτελεί το συμπέρασμα μιας μεγάλης μετα-ανάλυσης που περιέλαβε 4306 ασθενείς από 47 μελέτες (370).

Ωστόσο η μετα-ανάλυση αυτή περιέλαβε πολλές ετερογενείς αναδρομικές και προοπτικές μελέτες, με κυρίως ήπια λευκοπενία και στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί τρόποι ελέγχου του TPMT. Επιπλέον, ακόμη και εάν όλοι οι ασθενείς που λαμβάνουν θειοπουρίνες σε τυπικές δόσεις εκδηλώσουν μυελοκαταστολή, η έλλειψη του TPMT ενζύμου μπορεί να ενοχοποιηθεί μόνο για το ¼ των περιπτώσεων (371-372).

Οι ασθενείς αυτοί μπορούν να αντιμετωπιστούν με μείωση της δόσης των θειοπουρινών, χωρίς αιματολογικές ανεπιθύμητες ενέργειες (373-375).

Ωστόσο, έχει ενδιαφέρον να τονιστεί ότι στην μελέτη των Hindorf και συν., μια προοπτική μελέτη 60 ασθενών, με 10 περιπτώσεις μυελοτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις των 6-θειογουανιδικών νουκλεοτιδίων δεν προέβλεπαν την εκδήλωση μυελοτοξικότητας και η μέση ενεργότητα του ενζύμου TPMT ήταν υψηλή. Ο μόνος ανεξάρτητος παράγοντας που βρέθηκε να σχετίζεται με την μυελοτοξικότητα ήταν η μέγιστη συγκέντρωση του 6-meTIMP (6-μεθυλ-θειονόσινο-

μονοφωσφορικού) στα ερυθρά των ασθενών (352). Η μεθυλίωση του θειοινοσινο-μονοφωσφορικού (TIMP), το οποίο αποτελεί μερκαπτοπουρινικό νουκλεοτίδιο, καταλύεται από το ένζυμο TPMT, και οδηγεί στην παραγωγή μεθυλ-θειοινοσινο-μονοφωσφορικού (meTIMP). Ο μεταβολίτης αυτός βρίσκεται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες αυτών των 6-θειογουανινικών νουκλεοτιδίων (6-TGN) και αποτελεί *in vitro* αναστολέα της *de novo* σύνθεσης των πουρινών, και τα υψηλά του επίπεδα έχουν συσχετιστεί επίσης με ηπατοτοξικότητα (345, 376).

5.1.2 Ηπατοτοξικότητα

Τα θειοπουρινικά φάρμακα είναι δυνατόν να επηρεάσουν το ήπαρ με 3 τρόπους: αντίδραση υπερευαισθησίας, ιδιοσυστασιακή χολοστατική αντίδραση και εστιακή οζώδη υπερπλασία (377). Οι ασθενείς που λαμβάνουν θειοπουρίνες είναι δυνατόν να παρουσιάσουν ήπια, παροδική και αναστρέψιμη αύξηση τρανσαμινασών, που αποτελεί και την πιο συχνή παρενέργεια (345).

Οι θειοπουρίνες προκαλούν τόσο ηπατοκυτταρική όσο και χολοστατική βλάβη (378). Οι ασθενείς παρουσιάζουν τρανσαμινασαιμία σε ποσοστό 8,6-21% (379, 380).

Η πρώτη προοπτική μελέτη για την εκτίμηση της ηπατοτοξικότητας των θειοπουρινών έγινε το 2005 (381). Σε αυτήν, 161 ασθενείς με IBD έλαβαν συνήθεις δόσεις για 9 μήνες, και παρουσίασαν τρανσαμινασαιμία, οριζόμενη ως αύξηση των ηπατικών ενζύμων τουλάχιστον 2 φορές, σε ποσοστό 10%, ενώ η συγχορήγηση κορτικοστεροειδών θεωρήθηκε ως παράγοντας επιβαρυντικός.

Σε μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση αναδρομικών μελετών η οποία περιέλαβε 3485 ασθενείς με ΙΦΕΝ, διαπιστώθηκε ηπατοτοξικότητα σε ποσοστό 3,4% (375).

Συνήθως παρουσιάζεται μετά 1,5-3 μήνες κατά μέσο όρο από την έναρξη της αγωγής. Έτσι, όταν εμφανιστεί όψιμα πρέπει να αναζητώνται άλλα αίτια, όπως ιογενείς, ηπατίτιδες ή αλκοολική ηπατίτιδα (382). Επιπλέον, στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς ομαλοποιούν τις τρανσαμινάσες παρά την συνέχιση της AZA/6-MP. Οι υπόλοιποι ανταποκρίνονται στην μείωση της δόσης ή την διακοπή της θεραπείας (377).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι θειοπουρίνες προκαλούν ηπατική βλάβη είναι άγνωστοι. Μερικές περιπτώσεις αποδίδονται στην υπερευαισθησία, κυρίως όμως σχετίζονται με υψηλά επίπεδα 6-MMP και λόγω του ότι η ενεργότητα του TPMT στο ήπαρ είναι παρόμοια με αυτή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, φαίνεται ότι η υψηλή ενεργότητα του ενζύμου σχετίζεται με υψηλά επίπεδα μεθυλιωμένων παραγώγων, κυρίως 6MMP (383).

Στην μελέτη των Hande και συν. βρέθηκε θετική συσχέτιση της τρανσαμινασαιμίας και των υψηλών επιπέδων 6-MMP (384), καθώς και στην προοπτική μελέτη 43 ασθενών με λευχαιμία (385). Ωστόσο, το εύρημα δεν επιβεβαιώθηκε σε δυο ακόλουθες μελέτες σε ασθενείς με IBD (386-387). Οι λόγοι για τα διαφορετικά αποτελέσματα πιθανά να είναι η διαφορετική διάρκεια έκθεσης στους 6MMP μεταβολίτες, καθώς και οι διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών που χρησιμοποιήθηκαν (376, 388).

Ένας τρόπος μείωσης του κινδύνου εκδήλωσης ηπατοτοξικότητας σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η συγχορήγηση με αλλοπουρινόλη, συνδυασμός που οδηγεί σε δραματικά μειωμένα επίπεδα 6-MMP (389-390).

Έχει επιπλέον αναφερθεί ο μειωμένος κίνδυνος ηπατοτοξικότητας της 6-MP, σε σχέση με την αζαθειοπρίνη, αλλά οι ενδείξεις για κάτι τέτοιο δεν είναι ισχυρές (377, 391-393).

Μια άλλη πτυχή της ηπατοτοξικότητας των θειοπουρινών, είναι η σπάνια εκδήλωση εστιακής οζώδους υπερπλασίας, με επιπλοκή την ανάπτυξη πυλαίας υπέρτασης και μακροπρόθεσμα την ανάγκη μεταμόσχευσης ήπατος (394-395).

Η επιπλοκή παρουσιάζεται όψιμα στην αγωγή με αζαθειοπρίνη, αφού απαιτούνται κατά μέσο όρο 50 μήνες χορήγησης για την εκδήλωση της. Η μέση επίπτωση σε 10 χρόνια υπολογίζεται σε 1,25%, (396) ενώ το αρσενικό φύλο και η εντερεκτομή >50cm θεωρούνται παράγοντες κινδύνου (397).

Δεν έχει διατυπωθεί ακριβής παθοφυσιολογική υπόθεση όσον αφορά στην αιτιολογία της διαταραχής, αν και μερικές περιπτώσεις έχουν συσχετιστεί με ετερόζυγο TPMT γονότυπο και αυξημένα επίπεδα 6-TGN (398-400).

5.1.3 Τοξικότητα παγκρέατος

Η παγκρεατίτιδα συνήθως εκδηλώνεται με επιγαστραλγία, ναυτία, εμέτους, εμπύρετο. Με την διακοπή του φαρμάκου, τα συμπτώματα εξαφανίζονται και η

αμυλάση του ορού επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα σε τρία 24ωρα κατά μέσο όρο, ενώ δεν έχουν αναφερθεί επιπλοκές, όπως χρόνια παγκρεατίτιδα (401).

Σε μια αναδρομική μελέτη σε 396 ασθενείς οι οποίοι ελάμβαναν 6-MP, η επίπτωση της παγκρεατίτιδας ήταν 3,3%. Όλες οι περιπτώσεις εκδηλώθηκαν κατά μέσο όρο 23 ημέρες μετά την έναρξη των θειοπουρινών (358). Στην μελέτη των Dubinsky και συν. αναφέρθηκε αύξηση της αμυλάσης και της λιπάσης στο 8% των ασθενών, ενώ κλινικά εμφανής παγκρεατίτιδα εκδηλώθηκε μόλις στο 1%. (376) Ο υποκείμενος παθοφυσιολογικός μηχανισμός είναι άγνωστος, είναι όμως πιθανή η αλλεργικού τύπου αντίδραση, και γι αυτό οι θειοπουρίνες δεν θα πρέπει να επαναχορηγούνται στις περιπτώσεις αυτές (402-403).

Επί του παρόντος, η εκδήλωση παγκρεατίτιδας δεν έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα των 6-TGN και των 6-MMP, ούτε με την δόση των φαρμάκων (376, 402).

5.1.4 Γαστρεντερικές διαταραχές.

Είναι συχνές, περίπου στο 20% των ασθενών, αφορούν κυρίως επιγαστρική δυσφορία, ναυτία και εμέτους που συνήθως εκδηλώνονται τις πρώτες εβδομάδες μετά την έναρξη της αγωγής (382, 403).

Οι μεταλλαγές του γονιδίου TPMT σε ετεροζυγωτία, φαίνεται να σχετίζονται με την εκδήλωση γαστρεντερικών διαταραχών σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, αν και το εύρημα δεν επιβεβαιώθηκε σε μεγάλη αναδρομική μελέτη (382, 404).

Οι Marinaki και συν, σε μια μελέτη κοόρτη ανέφεραν συσχέτιση του μεταλλαγμένου γονότυπου με την εκδήλωση ναυτίας και εμέτων (344).

Ο υποκείμενος μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί. Ωστόσο, η παρενέργεια αυτή οδηγεί στην διακοπή της θεραπείας περίπου στο 10% των ασθενών, ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό (382), και φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη παρενέργεια. Η επαναχορήγηση του φαρμάκου σε μικρότερη δόση, μετά από ένα μικρό χρονικό διάστημα διακοπής, φαίνεται να είναι αποτελεσματική (405).

Σε κάποιες περιπτώσεις γαστρεντερικής δυσανεξίας στην αζαθειοπρίνη έχει χορηγηθεί 6-MP με καλά αποτελέσματα. Πιθανόν η δυσανεξία να οφείλεται στο παράγωγο ιμιδαζόλης που παράγεται μετά την μετατροπή της αζαθειοπρίνης σε 6-MP και όχι στον γονότυπο του ενζύμου TPMT (406, 407).

5.2 TPMT

Η θειοπουρινική S-μεθυλτρανσφεράση (Thiopurine S-methyltransferase, TPMT) είναι ένζυμο, μια κυτταροπλασματική τρανσμεθυλάση, το οποίο απαντάται σε είδη θηλαστικών και πτηνών. Χρησιμοποιώντας την S-αδενόσυλ-L-μεθειονίνη σαν δότη μεθυλίων καταλύει την μεθυλίωση ατόμων θείου προς αρωματικές και

ετεροκυκλικές ενώσεις. Δεν υπάρχει κανένα γνωστό ενδογενές υπόστρωμα και ο φυσιολογικός του ρόλος παραμένει άγνωστος, αν και το TPMT βρίσκεται στους περισσότερους ιστούς, όπως η καρδιά, στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στον πλακούντα, στο πάγκρεας και στο έντερο. Το μοριακό του βάρος είναι 28 kDA, και περιέχει 246 αμινοξέα (350).

Για την μέτρηση της ενεργότητας του χρησιμοποιείται μια βιοχημική μέθοδος προσδιορισμού του βαθμού μεθυλίωσης της 6-μερκαπτοπουρίνης με (C14- μεθυλ-S-αδενόσυλ-L-μεθειονίνη ως δότη μεθυλίων). Η μέτρηση της ενεργότητας στα ερυθρά θεωρείται αντιπροσωπευτική της ενεργότητας στους ιστούς μεταβολισμού των φαρμάκων.

Η ενεργότητα του ενζύμου παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων. Στους Καυκάσιους φαίνεται να έχει τριπλή κατανομή, με το 89-94% των ατόμων να έχουν υψηλή ενεργότητα του ενζύμου, το 6-11% να παρουσιάζουν ενδιάμεση ενεργότητα και το 0,3%, δηλαδή 1 στα 300 άτομα, να παρουσιάζει χαμηλή ενεργότητα (366, 408).

Μεταξύ των ατόμων με υψηλή ενεργότητα, περίπου το 15% παρουσιάζουν ενεργότητα μεγαλύτερη από την φυσιολογική, ενώ σε 1-2% διαπιστώνεται ακόμη υψηλότερη ενεργότητα (343). Αυτή μπορεί να επηρεαστεί και από μη-γενετικούς παράγοντες, όπως είναι η μετάγγιση αίματος, η ουραιμία καθώς και η λήψη θειοπουρινικών φαρμάκων, που είναι γνωστοί επαγωγείς του ενζύμου. Η αζαθειοπρίνη επάγει την ενεργότητα του ενζύμου κατά τον πρώτο μήνα μετά την μεταμόσχευση. Αντίθετα, κάποια φάρμακα δρουν σαν δυνητικοί αναστολείς του ενζύμου TPMT, όπως η ολσαλαζίνη και η σουλφασαλαζίνη (409).

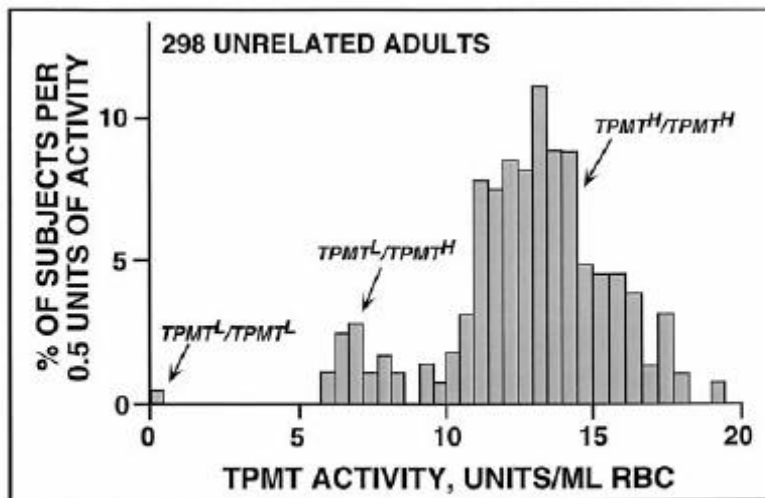


FIG. 1. RBC TPMT frequency distribution histogram for 298 randomly selected Caucasian subjects.

Εικόνα 10: Κατανομή συχνότητας ενεργότητας ενζύμου TPMT στα ερυθρά αιμοσφαίρια 298 τυχαία επιλεγμένων ατόμων (Καυκάσιοι).

Πηγή: (366) Weinshilboun RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Human Genet* 1980; 32: 651-652.

Στην εικόνα φαίνεται η τριπλή κατανομή που παρατηρήθηκε ότι χαρακτηρίζει την ενεργότητα του ενζύμου TPMT στα ερυθρά υγείων Καυκάσιων. Η μειωμένη ενεργότητα, στο 0,3%, αντιπροσωπεύεται από γονότυπο μειωμένης έκφρασης $TPMT^L/TPMT^L$, η ενδιάμεση ενεργότητα (11%) υποδηλώνει ετεροζυγωτία $TPMT^L/TPMT^H$ και η υψηλή ενεργότητα (89%) υποδηλώνει ομοζυγο γονότυπο υψηλής έκφρασης $TPMT^H/TPMT^H$. Αργότερα καθορίστηκαν τα $TPMT^*3A$ και $TPMT^*3C$ ως τα κύρια υπεύθυνα αλληλία.

Ωστόσο, η μέση ενεργότητα είναι 20% χαμηλότερη σε Αφρικανούς-Αμερικανούς και έχει διπλή κατανομή στους Κινέζους, αλλά μονή κατανομή στους Κορεάτες (408, 410-412).

5.2.1 Το γονίδιο και απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

Το ανθρώπινο TPMT γονίδιο έχει μήκος 34 kb, αποτελείται από 10 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p22.3 (413) και έχει ένα ψεύδο-γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18 (414). Τα 8 από αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνη 245 αμινοξέων. Έως σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 3 άγριου τύπου αλληλόμορφα και 38 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (415), τα περισσότερα από τα οποία σχετίζονται με μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου (416). Τα περισσότερα αφορούν σε μη-συνώνυμους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs). Μεταξύ των γονοτύπων που καθορίζονται από τους πολυμορφισμούς αυτούς, οι TPMT*2, *3A, *3B, and *3C έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά το κλινικό αντίκτυπο αλλά και τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς. Ωστόσο, 4 από τα γνωστά αλληλόμορφα που φέρουν μεταλλαγές (TPMT*2, -*3A, -*3B, -*3C) ενοχοποιούνται για μειωμένη ενεργότητα ενζύμου στο 80-95% των ατόμων, ενώ τα υπόλοιπα είναι εξαιρετικά σπάνια (417).

Οι Szumlanski και συν. (413) και οι Tai και συν (418) περιέγραψαν τον γονότυπο TPMT*3A, πού είναι ο πιο συχνός στους Καυκάσιους που σχετίζεται με μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου (συχνότητα περίπου 5%) Πίνακας. Ο γονότυπος αυτός περιέχει 2 μη-συνώνυμους κωδικούς πολυμορφισμούς, έναν στο εξόνιο 7, G460A (rs1800460), ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση της αλανίνης στην θέση 154 με θρεονίνη (Ala154Thr), και έναν στο εξόνιο 10, A719G (rs1142345) ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση της τυροσίνης στην θέση 240 από κυστεΐνη (Tyr240Cys). Ο

απλότυπος αυτός έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και την εκδήλωση τοξικότητας κατά την χορήγηση θειοπουρινών (418).

Ο γονότυπος TPMT*3B είναι σπάνιος και περιέχει μόνον τον πολυμορφισμό στο εξόνιο 7 (G460A, rs1800460). Η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα ζύμης και σε κύτταρα θηλαστικών όπως τα COS-1, κατέδειξε ταχεία αποδόμησή της, με σημαντικά μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης και ενεργότητας του ενζύμου. Επίσης σχετίζεται με τοξικότητα κατά την χορήγηση θειοπουρινών (413).

Ο γονότυπος TPMT*3C χαρακτηρίζεται από την παρουσία του πολυμορφισμού A719G (rs1142345) στο εξόνιο 10. Αποτελεί το συχνότερο αλληλόμορφο σε πληθυσμούς ανατολικής Ασίας, σε αфро-αμερικανούς και σε ορισμένους αφρικανικούς πληθυσμούς (εκτιμώμενη συχνότητα 2%) (419-421). Σχετίζεται με μειωμένη ενεργότητα ενζύμου και μειωμένη ποσότητα πρωτεΐνης, ως αποτέλεσμα επιταχυνόμενης αποδόμησης της σε κύτταρα θηλαστικών, αλλά η επίδραση είναι μικρότερη από εκείνη των γονοτύπων TPMT*3A και TPMT*3B (417). Από πληθυσμιακές μελέτες που έχουν γίνει ανα τον κόσμο, τα αλληλόμορφα *4 και *8 απαντώνται σε σχετικά μεγαλύτερη συχνότητα (0,05% και 2% αντίστοιχα) σε Αφρικανούς (423) και Νοτιοαμερικανούς (422).

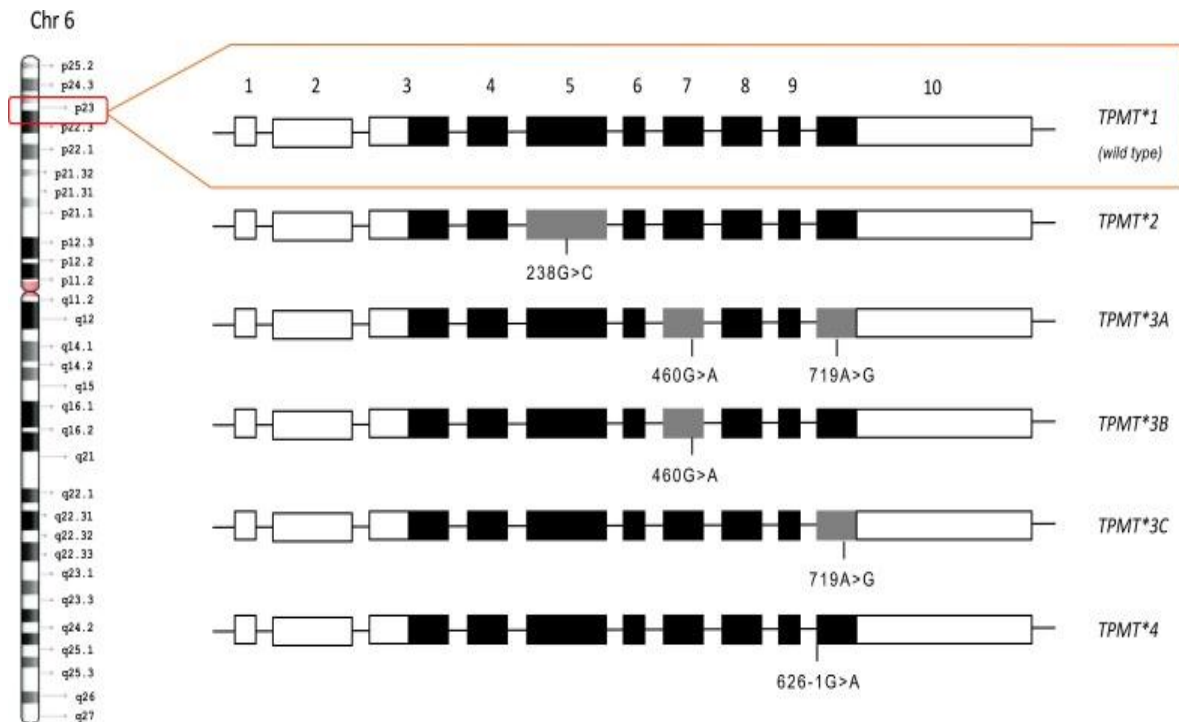
Το αλληλόμορφο TPMT*2 είναι τα πρώτο που περιγράφηκε, και είναι λιγότερο συχνό από τα TPMT*3A και *3C (rs1800462). Η γονοτύπηση του μεταλλαγμένου TPMT cDNA αποκάλυψε μια σημειακή μεταλλαγή, αντικατάσταση της γουανίνης από κυτοσίνη στην θέση 238 της κωδικής αλληλουχίας (G238C, rs1800462), η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος στο κωδικόνιο 80 (αλανίνη σε προλίνη). Όταν εκτιμήθηκε η λειτουργικότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα ζύμης,

βρέθηκε ότι η ενζυματική δραστηριότητά της μειώθηκε κατά 100 φορές σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεΐνη, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA ήταν παρόμοια. Επιπλέον, αποδομείται ταχέως με αποτέλεσμα μειωμένη ενεργότητα ενζύμου και αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας κατά την χορήγηση θειοπουρινών (424, 425).

Πίνακας 5: Συχνότητες (%) των διαφόρων TPMT αλληλομόρφων σε ασθενείς και υγιείς πληθυσμούς.

Ethnicity	*2	*3A	*3B	*3C	*4
Caucasian	0.2	3.5	0.04	0.4	0.1
Mediterranean	0.4	2.5	0.4	0.5	-
Middle Eastern	0.7	1.1	0.5	0.5	-
Asian	0	0.01	0	1.5	-
African	0.08	0.2	0	4.9	-
South American	0.8	2.8	0.05	0.9	0.05
European	0.5	5.7	0	0.8	-
British	0.5	4.5	0	0.3	-
German	0.2	4.5	0	0.4	-
Russian	0.1	2.3	0	0.4	-
Italian-Caucasian	0	2.2	0.3	0.3	-
Spanish	0	2.5	0.7	1	-
Turkish	0	0.9	0	0.9	-
Iranian	2.2	1.7	1.6	0.5	-
Israeli	0	1.2	0	0.4	-
Kazak	0	0.3	0	0.9	-
Egyptian	0	0.3	0	1.3	-
Chinese	0	0.1	0	1	-
Japanese	0	0	0	1.6	-
Korean	0	0	0	1	-
Indian	0	0.5	0	0.8	-

Πηγή: (426) Chingiz Asadov, Gunay Aliyeva and Kamala Mustafayeva. Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 15, 23-30



Εικόνα 11 : Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου γονιδίου του ενζύμου TPMT και των συχνότερων αλληλομόρφων. Οι μεταλλαγές των συχνότερων αλληλίων βρίσκονται στα εξόνια 5, 7, 10. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα τετράγωνα που περιέχουν μεταλλαγές. Με άσπρο χρώμα απεικονίζονται οι αμετάφραστες περιοχές και με μαύρο χρώμα τα εξόνια εκτός του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης.

Πηγή: (426) Chingiz Asadov, Gunay Aliyeva and Kamala Mustafayeva. Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 15, 23-30

Από τους μη-συνώνυμους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου TPMT, 13 μελετήθηκαν όσον αφορά στις λειτουργικές συνέπειες σε επίπεδο πρωτεΐνης. Ειδικότερα, τα αλληλόμορφα που περιελάμβαναν τους πολυμορφισμούς αυτούς εκφράστηκαν σε κύτταρα COS-1 και καθορίστηκαν η ενεργότητα του ενζύμου και η ποσότητα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν

ότι 11 από τους 13 πολυμορφισμούς είχαν λειτουργικές συνέπειες μετά την έκφρασή τους σε κύτταρα θηλαστικών. Αν και σημειώθηκαν αλλαγές στην κινητική του υποστρώματος, οι λειτουργικές συνέπειες ήταν κυρίως αποτέλεσμα αλλαγών στα επίπεδα της ενζυμικής πρωτεΐνης (417).

Από τα αλλοένζυμα που μελετήθηκαν τα TPMT*3A, *3B, *3C και *2 είχαν την μεγαλύτερη επίδραση. Το φαινόμενο αυτό αρχικά παρατηρήθηκε μια δεκαετία πριν όταν περιγράφηκαν για πρώτη φορά τα TPMT*3A, *3B και *3C (413).

Η συσχέτιση των μη-συνώνυμων απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεΐνης φαίνεται να αποτελεί έναν κοινό μηχανισμό εξήγησης των λειτουργικών επιδράσεων αυτού του είδους των γενετικών πολυμορφισμών. Η παρατήρηση αυτή εγείρει το ερώτημα πως αλλάζοντας μόνο 1 με 2 αμινοξέα αλλάζει η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Υπάρχουν πολλές ερμηνείες, όπως μειωμένη σταθερότητα του mRNA, μείωση του ρυθμού σύνθεσης της πρωτεΐνης ή αύξηση του ρυθμού αποδόμησής της. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως και στο TPMT, η αυξημένη αποδόμηση φαίνεται να είναι ο κυριότερος μηχανισμός.

Πειράματα που έγιναν στο ενδοπλασματικό δικτύο κουνελιών, σύστημα που χρησιμοποιείται κυρίως για την μελέτη της αποδόμησης πρωτεϊνών, έδειξαν ότι το αλλοένζυμο TPMT*3A αποδομούνται πιο γρήγορα σε σχέση με το φυσιολογικό ένζυμο (425, 427, 428).

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ουμπικουϊνίωση (Ubiquitination) του αλοενζύμου, δηλαδή πρόσδεση μιας ειδικής πρωτεΐνης, μιας ουμπικιτίνης, η οποία σηματοδοτεί την αποδόμηση του, μέσω πρωτεασώματος (425, 427).

5.2.2 Συσχέτιση πολυμορφισμών TPMT με την ανταπόκριση στην αγωγή με θειοπουρίνες στην ΙΦΝΕ

Μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση 47 μελετών που σχετικά με τον κίνδυνο μυελοκαταστολής σε σχέση με την ενδιάμεση TPMT ενεργότητα, ανέδειξε αύξηση του κινδύνου εκδήλωσης μυελοτοξικότητας κατά 4.19 φορές στους IBD ασθενείς με μειωμένη ενεργότητα ενζύμου σε σχέση με εκείνους που είχαν φυσιολογική ενεργότητα. Η μετα-ανάλυση αυτή δέχθηκε την κριτική ότι περιέλαβε μελέτες μικρές με <100 ασθενείς και ότι οι περισσότερες ήταν αναδρομικές μελέτες κοόρτη (370).

11 μελέτες ωστόσο ήταν προοπτικές. Σε μια από αυτές, με ένα σχετικά μεγάλο δείγμα ασθενών, βρέθηκε ότι ο ετερόζυγος TPMT γονότυπος προέβλεπε την πρόωμη διακοπή της θεραπείας εξαιτίας παρενεργειών (79% στους ετεροζυγώτες έναντι 35% σε ομοζυγώτες αγρίου τύπου, $P<0.001$). Οι γαστρεντερικές διαταραχές ήταν ο κυριότερος λόγος διακοπής της θεραπείας, ενώ βρέθηκε ότι η μυελοτοξικότητα καθώς και οι γαστρεντερικές διαταραχές ήταν συχνότερα τους ετερόζυγους ασθενείς (26% και 37%, αντίστοιχα) σε σχέση με τους ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (0.5% και 7%, αντίστοιχα) (404). Άλλες προοπτικές μελέτες αναφέρουν ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες στις θειοπουρίνες ήταν συχνότερες σε ασθενείς με μειωμένη και ενδιάμεση ενεργότητα του ενζύμου, όταν δεν γινόταν προσαρμογή της χορηγούμενης δόσης (352) με συχνότερη την μυελοτοξικότητα (353).

Δυο ανεξάρτητες μετα-αναλύσεις, οι οποίες ανέλυσαν 14 και 9 μελέτες αντίστοιχα, σχετικά με την επίδραση των πολυμορφισμών στην εκδήλωση παρενεργειών στους ασθενείς με IBD, και οι οποίες περιέλαβαν 2206 και 1309 ασθενείς αντίστοιχα κατέληξαν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου TPMT σχετίστηκαν σημαντικά με την εκδήλωση συνολικά ανεπιθύμητων ενεργειών και μυελοτοξικότητας αλλά όχι ηπατοτοξικότητας, παγκρεατίτιδας συμπτώματα γρίπης, γαστρεντερικές ή δερματικές διαταραχές (429, 430).

Η μελέτη TARGET (TPMT: Azathioprine Response to Genotyping and Enzyme Testing (TARGET) είναι μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη η οποία διερεύνησε τα αποτελέσματα της κατευθυνόμενης από τον γονότυπο χορήγησης αρχικής δόσης αζαθειοπρίνης με ακόλουθη αύξηση ή μείωση της, έως την μέγιστη καλύτερα ανεκτή δόση σε σχέση με τον μη καθορισμό του γονότυπου και την χορήγηση τυπικής δόσης αζαθειοπρίνης. Περιέλαβε 333 ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους και το αρχικό σκέλος της ήταν το εάν αυτή η στρατηγική είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των περιπτώσεων διακοπής θεραπείας λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές. (συχνότητα: 27.7% έναντι 28.8%; odds ratio [OR]: 1.1; 95% CI: 0.66–1.8; $P=0.74$). Επιπλέον, η μελέτη δεν εντόπισε καμιά διαφορά στην επίτευξη ύφεσης μεταξύ των ασθενών στους οποίους καθορίστηκε ο γονότυπος και στην ομάδα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι η τροποποίηση της δόσης δεν είχε επίδραση στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ένας ασθενής στην ομάδα που έλαβε τυπική δόση αζαθειοπρίνης χωρίς προσδιορισμό γονότυπου εκδήλωσε σοβαρή ουδετεροπενία, και ακολούθως βρέθηκε ότι έφερε μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε

ομοζυγωτία. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τον ρόλο του προσδιορισμού του γονότυπου σε αυτή την ομάδα των ασθενών (431).

Ομοίως μια μεγαλύτερη και πιο πρόσφατη προοπτική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη η TOPIC (Thiopurine response Optimization by Pharmacogenetic testing in Inflammatory bowel disease Clinics), στην οποία περιελήφθησαν 784 ασθενείς με IBD, δεν έδειξε συνολικά σημαντική επίδραση της κατευθυνόμενης από τον γονότυπο αγωγής με θειοπουρίνες πάνω στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας ή στον κίνδυνο εκδήλωσης αιματολογικών ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως λευκοπενία και θρομβοπενία μεταξύ των ομάδων ασθενών που γονοτυπήθηκαν και όχι. (Συχνότητα: 7.4% έναντι 7.9%; σχετικός κίνδυνος: 0.93; 95% CI: 0.57–1.52). Η μελέτη αποτελεσματικότητας στην έρευνα αυτή έδειξε ότι μείωση της χορηγούμενης δόσης θειοπουρινών επίσης δεν οδήγησε σε υποθεραπεία. Επιπλέον, η ανάλυση μιας υποομάδας εντός της μελέτης, στην οποία συγκρίθηκαν οι φορείς των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων μεταξύ των δύο σκελών, ανέδειξε ότι η φαρμακογενετική προσέγγιση θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο αιματολογικών ανεπιθύμητων ενεργειών στους φορείς τουλάχιστον ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (συχνότητα: 2.6% έναντι 22.9%; σχετικός κίνδυνος: 0.11; 95% CI: 0.01–0.85) (432). Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TPMT γονότυπου και της εκδήλωσης ηπατοτοξικότητας, παγκρεατίτιδας, εξανθήματος ή γαστρεντερικών διαταραχών, σε συμφωνία και με άλλα αποτελέσματα στην βιβλιογραφία (429, 432, 434).

5.2.3 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου και κλινικές εφαρμογές.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, συνολικά στους πληθυσμούς των διαφόρων εθνικοτήτων 1 στα 300 άτομα είναι ομοζυγώτες για ένα μεταλλαγμένο TPMT αλληλόμορφο και έχουν πολύ χαμηλή ή απύσχα ενεργότητα του ενζύμου ενώ περίπου το 4%–11% των ατόμων είναι ετερόζυγοι και γενικά θεωρούνται ως έχοντες ενδιάμεση ενζυματική ενεργότητα (370, 422, 433).

Ωστόσο, μια ταξινόμηση βασιζόμενη μόνο στον γονότυπο δεν αντιπροσωπεύει πλήρως την ενζυματική ενεργότητα. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα των μελετών συσχέτισης γονότυπου-φαινότυπου είναι ποικίλα και κυμαίνονται από 100% συσχέτιση έως 77% σε ορισμένες μελέτες (370, 434-440).

Η ασυμφωνία παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με ενδιάμεση ενεργότητα στους οποίους η εκτιμώμενη πιθανότητα συσχέτισης με γονότυπο κυμαινόταν από 70% έως 86% (436, 438, 441, 442).

Πολλοί παράγοντες είναι εκείνοι που δυνητικά επηρεάζουν την ενζυμική ενεργότητα και κατ' επέκταση την συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου, όπως η ηλικία και το φύλο του ασθενούς, συγχορήγηση φαρμάκων που δυνητικά επηρεάζουν την νόσο ή την ενεργότητα του TPMT, όπως η μεθοτρεξάτη (443), τα επίπεδα του συμπαράγοντα του TPMT S-αδενόσυλο-μεθειονίνη (444), η πρόσφατη μετάγγιση αίματος (445), ο χρόνος ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (446) καθώς και αλληλόμορφα σπάνια, ή αυτά που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί στην κωδική και ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου TPMT (447).

Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην ενζυματική ενεργότητα μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών, με τους Αφρικανούς να παρουσιάζουν μειωμένη ενεργότητα σε σχέση με τους Καυκάσιους και τους πληθυσμούς της νότιας Ασίας (448, 449).

Συμπερασματικά, υπάρχει πάντα κίνδυνος να μην ταξινομηθεί σωστά ένας ασθενής αν πραγματοποιηθεί μόνο η μια από τις δύο μεθόδους, αλλά από την άλλη μεριά δεν είναι λογικό να προσδιορίζεται και ο φαινότυπος και ο γονότυπος σε όλους τους ασθενείς. Μια πρόσφατη τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη κατέληξε στο ότι δεν πλεονεκτεί ο προσδιορισμός του γονότυπου σε σχέση με τον φαινότυπο (431), ενώ μια πιο πρόσφατη μελέτη κατέληξε ότι ο προσδιορισμός του γονότυπου πλεονεκτούσε και θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την προ θεραπείας εκτίμηση της λειτουργίας του TPMT (439).

Ο σύγχρονος προσδιορισμός γονότυπου και φαινότυπου μπορεί να χρησιμοποιείται σε ειδικές περιστάσεις όπως σε ασθενείς με πρόσφατη μετάγγιση αίματος, η ως επιβεβαίωση της ενδιάμεσης ενεργότητας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (431).

Οι εξελίξεις στην φαρμακογενετική του TPMT επέτρεψαν την τροποποίηση των δόσεων των θειοπουρινών ώστε η θεραπεία να εξατομικεύεται και να αποφεύγονται τοξικότητες (450).

Ωστόσο, η εφαρμογή των δεδομένων της φαρμακογενετικής στην κλινική πράξη είναι περιορισμένη εξαιτίας της έλλειψης άμεσων ενδείξεων από μεγάλης κλίμακας τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες σχετικά με την χρησιμότητα μιας τέτοιας στρατηγικής (370, 431, 432).

Η επίδραση της ενεργότητας του ενζύμου TPMT στην τοξικότητα μετά την λήψη θειοπουρινών, ιδίως στην εκδήλωση μυελοκαταστολής, έχει οδηγήσει στην

διατύπωση κλινικών κατευθυντήρων οδηγιών και έτσι ο FDA καθώς και τα British National Formulary και Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) συστήνουν έλεγχο της ενεργότητας του ενζύμου προ θεραπείας είτε με γονοτύπηση είτε με προσδιορισμό φαινότυπου και γενικά την μείωση της δόσης των χορηγούμενων θειοπουρινών στις περιπτώσεις των ομοζυγωτών για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (436, 450).

Κλινική εφαρμογή

Η αλλαγή αυτή στην κλινική πράξη εκτιμήθηκε από την μελέτη TARGET, στην οποία καταγράφηκε ότι οι κλινικοί ιατροί ακολουθούσαν τις κατευθυντήριες οδηγίες της Βρετανικής εταιρίας δερματολογίας και ρευματολογίας για τους ετεροζυγώτες ασθενείς και όντως χρησιμοποιούσαν χαμηλότερη αρχική δόση αζαθειοπρίνης, πρακτική που εφαρμόζαν όμως σε όλους τους ασθενείς και εκείνους που δεν έφεραν κανένα γνωστό μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (431).

Η πρακτική αυτή προκύπτει από την κλινική παρατήρηση ότι ο ασθενής που δεν φέρει μεταλλαγμένα γνωστά αλληλόμορφα έχει μειωμένο κίνδυνο μυελοκαταστολής αλλά είναι πιθανή η εκδήλωσή της. Είναι γνωστό ότι ακόμη και wild-type ασθενείς είναι πιθανό να έχουν ενδιάμεση ενεργότητα ενζύμου και άλλοι παράγοντες να συμβάλλουν στην εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών (431, 438, 441).

Κλινική σημασία έχει επίσης το γεγονός ότι άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες των θειοπουρινών δεν μπορούν να προβλεφθούν από τον γονότυπο του TPMT, όπως είναι η ηπατοτοξικότητα, η παγκρεατίτιδα, οι γαστρεντερικές διαταραχές (370, 430).

Ο έλεγχος του ενζύμου TPMT πριν την έναρξη της θειοπουρινικής αγωγής ποικίλει. Από σχετική μελέτη φαίνεται ότι το χρησιμοποιεί το 94% των δερματολόγων, το 60% των γαστρεντερολόγων και μόνο το 47% των ρευματολόγων, γεγονός που πιθανόν αντικατοπτρίζει την διαφορά στις κατευθυντήριες οδηγίες ανά ειδικότητα (436, 451).

Είναι σχετικά ξεκάθαρο επί του παρόντος, το ότι άτομα με ελλειματικό TPMT γονότυπο (είτε ομόζυγοι για το ίδιο αλληλόμορφο είτε οι φέροντες 2 διαφορετικά αλληλόμορφα) και σε μικρότερο βαθμό άτομα που φέρουν αλληλόμορφο μεταλλαγμένο σε ετεροζυγωτία έχουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης σοβαρής μυελοτοξικότητας από θειοπουρίνες (450).

Εκτός από τον γονότυπο, ο κίνδυνος αυτός τροποποιείται και από άλλους παράγοντες όπως η συγχορήγηση φαρμάκων και η πρόοδος της νόσου. Τα άτομα που φέρουν 2 μεταλλαγμένα αλληλόμορφα θα ωφεληθούν από την μειωμένη αρχικά δόση θειοπουρινών, αλλά αυτό δεν ισχύει απόλυτα για τους ετεροζυγώτες. Δεν θα εκδηλώσουν όλοι δυσανεξία ενώ το 30-60% θα ανεχθεί την αγωγή, και από την άλλη πλευρά, ένα μέρος των ασθενών που δεν φέρουν κανένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι πιθανόν να παρουσιάσουν υποτροπή ή να μην ανταποκριθούν στην αγωγή, πράγμα που περιπλέκει περαιτέρω την εύρεση της αποτελεσματικότερης αγωγής με την μικρότερη τοξικότητα (438, 450).

Συνεπώς, ο τακτικός κλινικός έλεγχος και η αιματολογική εκτίμηση παραμένουν απαραίτητες για την παρακολούθηση ασθενών που λαμβάνουν θειοπουρίνες, ενώ ο γενετικός έλεγχος προσθέτει ένα πλεονέκτημα στον ακριβή καθορισμό της αρχικής δόσης και στην διαλογή των ασθενών (452).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

IV. ΣΚΟΠΟΣ

Στην Ελλάδα τα ως σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά σε μελέτες σε ασθενείς με IBD ως προς την αναζήτηση γενετικών πολυμορφισμών στην αιτιοπαθογένεια και στην ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή είναι περιορισμένα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα προαναφερθέντα βιβλιογραφικά δεδομένα και την ήδη υπάρχουσα επιστημονική γνώση, οριοθετούμε τον προσανατολισμό της μελέτης στοχεύοντας στα εξής :

- Καταγραφή των δημογραφικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn, καθώς και των κλινικών χαρακτηριστικών.
- Προσδιορισμός συχνότητας των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών G460A, A719G και G238C του γονιδίου του ενζύμου θειοπουρινική μεθυλ-τρανσφεράση (TPMT) σε ασθενείς με IBD και υγιείς μάρτυρες.
- Προσδιορισμός του είδους και της συχνότητας των ανεπιθύμητων ενεργειών κατά την λήψη αζαθειοπρίνης ή 6-μερκαπτοπουρίνης στους ασθενείς με IBD.
- Συσχέτιση παρουσίας πολυμορφισμών με την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών στους ασθενείς που έλαβαν θειοπουρινικά φάρμακα.

- Προσδιορισμός της συχνότητας των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου ABCB1 σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και υγιείς μάρτυρες.
- Συσχέτιση παρουσίας πολυμορφισμών με την εκδήλωση ΙΒΔ, την εντόπιση της νόσου Crohn και την έκφρασή της καθώς και με την έκταση της ελκώδους κολίτιδος.
- Συσχέτιση παρουσίας πολυμορφισμών με την εκδήλωση αντοχής στην φαρμακευτική αγωγή (διενέργεια χειρουργικής επέμβασης).

V. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. Πληθυσμός της μελέτης

6.1 Κλινική έρευνα: Ενημέρωση-Συλλογή υλικού

Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη παρακολουθούνταν στο εξωτερικό ιατρείο των φλεγμονωδών εντεροπαθειών της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, όπου και έλαβε χώρα η διαδικασία της κλινικής μελέτης καθώς και η συλλογή του υλικού.

Συνολικά 223 ασθενείς (111 με νόσο Crohn και 112 με ελκώδη κολίτιδα, 126 άνδρες και 97 γυναίκες) περιλήφθηκαν στην μελέτη. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής που ήταν διάγνωση ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου, ελκώδους κολίτιδας ή νόσου Crohn, επιβεβαιωμένης με κριτήρια κλινικά, ακτινολογικά, ενδοσκοπικά και ιστολογικά.

Η εντόπιση και η έκφραση της νόσου ορίστηκε σύμφωνα με την κατάταξη του Montreal (39).

Οι συμμετέχοντες στην μελέτη ενημερώθηκαν για τον σκοπό καθώς και την διαδικασία και υπέγραψαν σχετικό έντυπο συγκατάθεσης (ένθετο). Ακολούθησε συμπλήρωση ερωτηματολογίου από τους ασθενείς κατά την εισαγωγή τους στην μελέτη, το οποίο περιελάμβανε δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά.

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ	
Αφού ενημερώθηκα για την μελέτη «Γενετική μελέτη της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου» δέχομαι να λάβω μέρος.	
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	
ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΙΑΤΡΟΥ

Ένθετο: έντυπο συγκατάθεσης ασθενούς

Από τα ιατρικά αρχεία των ασθενών με IBD της Γαστρεντερολογικής Κλινικής έγινε αναδρομική καταγραφή των στοιχείων που αφορούσαν στην προηγηθείσα φαρμακευτική αγωγή, την εκδήλωση παρενεργειών καθώς και του ιστορικού εντερεκτομής λόγω μη ανταπόκρισης στην συντηρητική αγωγή για όσους ασθενείς διαγνώστηκαν τα προηγούμενα χρόνια. Οι ασθενείς παρακολουθούνταν κάθε 3 μήνες στο εξωτερικό γαστρεντερολογικό ιατρείο για διάστημα 6 ετών, από τον Μάρτιο του 2011 έως τον Μάρτιο του 2017 και έγινε προοπτική καταγραφή των ίδιων κλινικών χαρακτηριστικών.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 119 υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς από το τμήμα αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου

Τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς εθελοντές είχαν κρητική καταγωγή και κατοικούσαν επίσης στην Κρήτη.

6.2 Μεθοδολογία κλινικής έρευνας- μελέτης

Όλοι οι ασθενείς μετά την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο υπό ιατρική καθοδήγηση (ένθετο).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΙΦΕΝ

Ασθενής: Νο:

Ημ. Γέννησης:/...../20....

Τόπος γέννησης: Τόπος διαμονής:

Τηλέφωνο:

Οικογενειακό ιστορικό ΙΦΕΝ: ναι όχι

(περιγραφή.....)

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου: ναι όχι

(περιγραφή.....)

κάπνισμα: ναι (ρ/γ) όχι παλαιός

ΔΙΑΓΝΩΣΗ:

1. Ελκώδης κολίτις

Εντόπιση: ορθίτις αριστερή κολίτις εκτεταμένη

2. Νόσος Crohn

Εντόπιση: ειλεός ανώτερο πεπτικό παχύ έντερο

Μορφή: φλεγμονώδης στενωτική Διαιτηραίνουσα

3. Αδιευκρίνιστη

Μήνας και έτος διάγνωσης:...../.....

Εξωεντερικές εκδηλώσεις:

Αρθρίτις ιερολαγονίτις Αγκυλ. Σπονδ/τις PSC οφθαλμικές εκδηλώσεις

Πληκτροδακτυλία αφθώδης στοματίτις οζώδες ερύθημα γαγγραινώδες

πυόδερμα

Νεφρολιθίαση ΧΝΑ αιμολυτική αναιμία θρόμβωση άλλη

Συνυπάρχουσες παθήσεις:

ναι όχι

Προηγούμενα φαρμ. Αγωγή :

Ανεπιθύμητες ενέργειες:

Τρέχουσα φαρμακευτική αγωγή:

Επεμβάσεις σχετικές με την νόσο: ναι όχι (ημ/νία
επέμβασης:.....)

Καρκίνος πεπτικού: ναι όχι

Μετάγγιση αίματος τους τελευταίους 6 μήνες: ναι όχι

Ημερομηνία συμπλήρωσης:...../...../.....

Follow up :

Ένθετο: ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το ερωτηματολόγιο εμπεριείχε στοιχεία κοινωνικο-δημογραφικά (ηλικία, φύλο, κάπνισμα, τόπο γέννησης, τόπο διαμονής) και κλινικά: διάγνωση, έτη από διάγνωση, εντόπιση και έκφραση νόσου, παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων και αναλυτική περιγραφή τους, ιστορικό επεμβάσεων σχετικών με την νόσο και περιγραφή τους με ιδιαίτερη έμφαση στην διενέργεια εντερεκτομής και

κολεκτομής, ατομικό αναμνηστικό, περιγραφή προηγηθείσας και τρέχουσας φαρμακευτικής αγωγής, με έμφαση στην λήψη αζαθειοπρίνης και 6-μερκαπτοπουρίνης, ιστορικό εκδήλωσης παρενεργειών στην φαρμακευτική αγωγή με αναλυτική περιγραφή των ανεπιθύμητων ενεργειών από την λήψη αζαθειοπρίνης ή 6-μερκαπτοπουρίνης, οικογενειακό και ατομικό ιστορικό καρκίνου πεπτικού και ιστορικό μετάγγισης αίματος τους τελευταίους 6 μήνες.

Η συλλογή των δεδομένων ξεκίνησε από τον Μάρτιο του 2010 έως τον Μάρτιο του 2011.

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

6.3 Ασθενείς και ομάδα ελέγχου για τη μελέτη γενετικής συσχέτισης .

Ολικό περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από 223 ασθενείς (97 γυναίκες, μέσης ηλικίας: 53 έτη, εύρος: 16-90 έτη) με IBD (111 με νόσο Crohn και 113 με ελκώδη κολίτιδα) και από 119 (67 γυναίκες, μέσης ηλικίας 52 έτη) υγιείς εθελοντές που δέχθηκαν να συμμετάσχουν και οι οποίοι δεν έπασχαν από νόσο πεπτικής οδού. Το αίμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση γενετικών καθοριστών που πιθανόν

να συνδέονται με την εκδήλωση IBD και με την εκδήλωση παρενεργειών μετά την λήψη ανοσοκατασταλτικών (6-μερκαπτοπουρίνης και αζαθειοπρίνης) καθώς και με την εκδήλωση αντοχής στην θεραπεία όπως αυτή εκφράζεται από την αναγκαιότητα χειρουργικής αντιμετώπισης.

Ως διάρκεια νόσου υπολογίστηκε το χρονικό διάστημα από την διάγνωση μέχρι την ημερομηνία αιμοληψίας για την γενετική ανάλυση.

7. Υλικά και μέθοδοι

7.1 Απομόνωση DNA

Αρχικά ελήφθη 1 ml περιφερικού φλεβικού αίματος υπό στείρες συνθήκες, το οποίο συλλέχθηκε σε σωληνάριο ψεκασμένο με αντιπηκτικό EDTA και φυλάχθηκε στους -80°C . Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην απομόνωση DNA από τα εμπύρηννα λευκοκύτταρα και τον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα (salting-out) στα επόμενα στάδια (453).

Συνοπτικά, η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε θερμοκρασία δωματίου 500μl αίματος μεταφέρονται σε πλαστικό σωληνάριο (erpendorf) που περιέχεται 1ml διαλύματος για τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων(RBC lysis buffer) το οποίο αποτελείται από: δ/μα Tris HCl 10Mm, Ph:7,6, δ/μα MgCl₂ 5Mm και δ/μα NaCl 10mM. Ακολουθεί επώαση για 5min.

- Φυγοκέντρηση στους 25C για 1min στις 13.000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και αφήνουμε 10-20ml στον πυθμένα του erpendorf (λευκά αιμοσφαίρια), τα οποία επαναδιαλύουμε με 1ml H₂O και ήπιο πιπετάρισμα.
- Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση του διαλύματος στους 25C για 1min στις 13.000 rpm.
- Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο διάλυμα, στο ίζημα που παραμένει ποσότητας <5ml, προστίθενται 360ml ενζυμικού διαλύματος πρωτεϊνάσης K προκειμένου να αποδεσμευτεί το DNA από τις ιστόνες και να αδρανοποιηθούν οι νουκλεάσες. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και πιπετάρισμα για να διευκολυνθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.
- Το διάλυμα επωάζεται στους 65C για 30min προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεϊνάση K.
- Προσθέτουμε 220ml διαλύματος NaCl 6M και ανακινούμε ισχυρά με το χέρι για 10sec.
- Μετά τη φυγοκέντρηση για 10min σε 13.000 rpm, έχει σχηματιστεί αρκετά μεγάλο πρωτεϊνικό ίζημα στον πυθμένα του erpendorf τό οποίο και απομακρύνουμε.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf και φυγοκεντρούμε ξανά για 5 min στις 13.000rpm.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf με ~ 1ml διαλύματος αιθανόλης 95% και το αναποδογυρίζουμε για 2 min. Οι υδρόφοβες αζωτούχες βάσεις των νουκλεικών οξέων έλκονται από το υδρόφοβο τμήμα

της αλκοόλης και συγκεντρώνονται στην επιφάνεια επαφής του διαλύματος με την αιθανόλη. Το DNA εμφανίζεται ως αδιάλυτο λευκό νεφέλωμα.

- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 13.000rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε ξανά για 5min στις 13.000 rpm.
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 12h.
- Αναδυαλύνουμε το εκχυλισμένο DNA με 80μl διαλύματος ενυδάτωσης (10Mm Tris-Cl-0,5Mm EDTA) και το επωάζουμε στους 56C για 15min, προκειμένου να γίνει η ενυδάτωση και να ολοκληρωθεί η εναιώρηση του DNA. Εν συνεχεία, το αποθηκεύουμε στους -20C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

7.2 Τεχνική PCR και RFLP

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε ανίχνευση έξι γενετικών πολυμορφισμών.

Για τον G238C του TPMT χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ειδική για το αλληλόμορφο (allele specific), ενώ η ανίχνευση των γενετικών πολυμορφισμών G460A, A719G του TPMT καθώς και οι C3435T, G2677T, G2677A του γονιδίου ABCB1 πραγματοποιήθηκε με PCR και ανάλυση μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Τα προϊόντα της PCR και της πέψης διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα

αγαρόζης 2% ή 3% ανάλογα με το μέγεθός τους και ελήφθησαν εικόνες αυτών σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η PCR συνιστά μια πειραματική διαδικασία που επιτυγχάνει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό, με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, μέσω του θερμοάντοχου ενζύμου Taq-πολυμεράση. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η γνώση εκ των προτέρων της υπό διερεύνησης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ώστε να σχεδιαστούν οι εκκινητές (primers). Οι τελευταίοι είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-20 νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά στις αλυσίδες του δίκλωνου DNA, τα οποία οριοθετούν την νουκλεοτιδική αλληλουχία και δεσμεύονται στα άκρα του τμήματος του προς πολλαπλασιασμό γονιδίου ως «εναρκτήριες θέσεις» για την Taq πολυμεράση. Ο κάθε εκκινητής έχει συμπληρωματική αλληλουχία προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA αλλά και οι δύο έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m). Η αντίδραση περιλαμβάνει 25-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών σταδίων: 1. Αποδιάταξη του μήτρας DNA (denaturation of DNA template) 2. Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς ακολουθίες (primer annealing). 3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' (elongation). Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητού από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει $2n$ δίκλινα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler) που εναλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού

που έχουμε καθορίσει εκ των προτέρων. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Τα ένζυμα περιορισμού, είναι ενδονουκλεάσες, ειδικά ένζυμα που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις νουκλεοτιδίων, οι οποίες αποτελούνται από 4 έως 6 νουκλεοτίδια, γνωστά και ως «θέσεις αναγνώρισης» των ενζύμων αυτών. Για να μπορέσει η ενδονουκλεάση περιορισμού να διασπάσει και τις δύο έλικες του διπλού DNA, οι θέσεις πρέπει να είναι ως αντικατοπτρικές εικόνες ή αλλιώς παλίνδρομες (διαβάζονται το ίδιο από αριστερά προς τα δεξιά και το αντίστροφο). Εάν αλλάξει η ακολουθία αυτή κατά μία βάση, το ένζυμο δεν θα διασπάσει το DNA στη συγκεκριμένη θέση. Αυτές οι φυσικά εμφανιζόμενες διαφορές, που ονομάζονται πολυμορφισμοί στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων, σε ειδικές θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών, οδηγεί στη δημιουργία κλασμάτων DNA διαφορετικού μήκους. Αυτή η μεταβολή στον τύπο των θραυσμάτων ονομάζεται Πολυμορφισμός Μήκους Θραύσματος εκ Περιορισμού (RFLP). Η ανάλυση RFLP αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη γονιδιακή χαρτογράφηση, για την εντόπιση γονιδίων γενετικά κληρονομούμενων νόσων, για τον προσδιορισμού κινδύνου εμφάνισης μίας κληρονομούμενης ασθένειας, για το γενετικό αποτύπωμα και τέλος για τοτέστ πατρότητας. Μετά την επώαση με τα ένζυμα περιορισμού, το επωασμένο DNA μεταφέρεται σε πηκτή αγαρόζης 2% ή 3% με χρώση από βρωμιούχο αιθίδιο και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση.

7.3 Ανάλυση του πολυμορφισμού G238C (rs1800462) του γονιδίου TPMT.

Για την ανίχνευση του G238C ο οποίος όπως προαναφέρθηκε συνίσταται σε αντικατάσταση της γουανίνης από κυτοσίνη στην θέση 238 του εξονίου 5 της κωδικής αλληλουχίας, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική allele-specific PCR. Οι εκκινητές της αντίδρασης ήταν ο ευθύς εκκινητής άγριου τύπου (Forward primer wild type) 5'- GTATGATTTTATGCAGGTTTG- 3', ο ευθύς εκκινητής ειδικός για την μεταλλαγή (Forward primer mutant) 5'- GTATGATTTTATGCAGGTTTC- 3' και ο κοινός ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer common) 5'- TAAATAGGAACCATCGGACAC-3' (433).

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Η σύσταση, οι συγκεντρώσεις και οι τελικές ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR παρουσιάζονται στον πίνακα

6

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν allele-specific PCR

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5,	2.5μl

αντίδρασης Tag DNA πολυμεράσης (buffer)	25°C, 50mM KCl)	
dNTPs	0.5mM	0.5μl
Forward primer	0.5mM	2.5μl
Reverse primer	0.5mM	2.5μl
Taq Polymerase (Invitrogen)	3-5u/μl	0.125μl
Απεσταγμένο H ₂ O		15.9μl
Τελικός όγκος		25μl

Μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94° C για 5min, η PCR πραγματοποιήθηκε για 34 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος στους 94° C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 49° C για 30sec και επέκταση της νεοσυντιθεμενης αλύσου στους 72° C για 30sec. Μετά την ολοκλήρωση των 34 κύκλων ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72° C για 7min.

Το προϊόν της αντίδρασης είχε μήκος 254bp. Στην περίπτωση απουσίας της σημειακής μεταλλαγής είχαμε πρόσδεση του ευθύ εκκινητή άγριου τύπου, σε περίπτωση παρουσίας της σε ομοζυγωτία είχαμε πρόσδεση του ευθύ εκκινητή ειδικού για την μεταλλαγή ενώ σε περίπτωση παρουσίας της μεταλλαγής σε ετεροζυγωτία είχαμε πρόσδεση και των δύο ευθέων εκκινητών, και είχαμε προϊόν

μήκους 254bp τόσο στην αντίδραση του ευθέως εκκινητή άγριου τύπου όσο και στην αντίδραση ευθέως εκκινητή ειδικού για την μεταλλαγή.

7.4 Ανάλυση του πολυμορφισμού G460A (rs1800460) του γονιδίου TPMT.

Για τον πολυμορφισμό G460A στο εξόνιο 7,(rs1800460), ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση της αλανίνης στην θέση 154 με θρεονίνη (Ala154Thr), η αντίδραση PCR διενεργήθηκε με τη χρήση των εκκινητών forward: 5'-GGGACGCTGCTCATCTTCT-3' και reverse: 5'-GCCTTACACCCAGGTCTCTG-3' προκειμένου να πολλαπλασιαστεί μία περιοχή 338 bp του γονιδίου TPMT μέσα στην οποία εντοπίζεται η σημειακή μεταλλαγή. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις PCR γι' αυτόν τον πολυμορφισμό παρατίθενται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για G460A (rs1800460).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Tag DNA πολυμεράσης (buffer)	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
dNTPs	0.5mM	0.5μl
Forward primer	0.5mM	2.5μl

Reverse primer	0.5mM	2.5μl
Taq Polymerase (Invitrogen)	3-5u/μl	0.125μl
Απεσταγμένο H ₂ O		15.9μl
Τελικός όγκος		25μl

Η αρχική αποδιάταξη του DNA έγινε στους 94°C για 5 min. Ακολούθησαν οι 35 κύκλοι της αντίδρασης PCR. Τα στάδια κάθε κύκλου εμπεριείχαν με τη σειρά αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 55,9°C για 30 sec και επέκταση της νέας αλύσου στους 72°C για 30 sec. Τέλος μετά την αποπεράτωση των 35 κύκλων ακολούθησε το τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min. Εν συνεχεία, 20μl από το πολλαπλασιασμένο προϊόν της PCR επωάστηκε με 0,25 U από το περιοριστικό ένζυμο MwoI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) στους 60°C για 1h, σε αντίδραση όγκου 22,5μl με 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4) και ακολούθως διακοπή της αντίδρασης με πτώση θερμοκρασίας στους 4°C. Η ενδονουκλεάση MwoI αναγνωρίζει την παλινδρομική αλληλουχία

$$5' \dots GCNNNNN \nabla NNGC \dots 3'$$

$$3' \dots CGNN \blacktriangle NNNNNCG \dots 5'$$

όπου N οποιοδήποτε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Η πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού της αλληλουχίας του DNA που δεν φέρει την μεταλλαγή αποδίδει 2 θραύσματα στην ακολουθούσα ηλεκτροφόρηση μεγέθους 224 bp και 114 bp. Αντίθετα η παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής καταστρέφει την θέση σύνδεσης της ενδονουκλεάσης περιορισμού με αποτέλεσμα ένα μόνο προϊόν στην ηλεκτροφόρηση μεγέθους 338 bp.

7.5 Ανάλυση του πολυμορφισμού A719G (rs1142345) του γονιδίου TPMT.

Για τον πολυμορφισμό A719G στο εξόνιο 10, (rs1142345), ο οποίος οδηγεί σε αντικατάσταση της τυροσίνης στην θέση 240 από κυστεΐνη (Tyr240Cys), η αντίδραση PCR διενεργήθηκε με τη χρήση των εκκινητών forward: 5'-GAGACAGAGTTTCACCATCTTGG -3' και reverse: 5'-CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCT -3' προκειμένου να πολλαπλασιαστεί μία περιοχή 373 bp του γονιδίου TPMT μέσα στην οποία εντοπίζεται η σημειακή μεταλλαγή. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις PCR γι' αυτόν τον πολυμορφισμό παρατίθενται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για A719G (rs1142345).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Tag DNA πολυμεράσης (buffer)	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
dNTPs	0.5mM	0.5μl
Forward primer	0.5mM	2.5μl
Reverse primer	0.5mM	2.5μl
Taq Polymerase (Invitrogen)	3-5u/μl	0.125μl
Απεσταγμένο H ₂ O		15.9μl

Τελικός όγκος		25μl
---------------	--	------

Η αρχική αποδιάταξη του DNA έγινε στους 94°C για 5 min. Ακολούθησαν οι 35 κύκλοι της αντίδρασης PCR. Τα στάδια κάθε κύκλου εμπεριείχαν με τη σειρά αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινήτων στην αλληλουχία στόχο στους 53°C για 30 sec και επέκταση της νέας αλυσού στους 72°C για 30 sec. Τέλος μετά την αποπεράτωση των 35 κύκλων ακολούθησε το τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 7 min. Εν συνεχεία, 22μl από το πολλαπλασιασμένο προϊόν της PCR επωάστηκε με 0,5 U από το περιοριστικό ένζυμο Accl (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) στους 37°C για 1h, σε αντίδραση όγκου 25μl με 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4). Η ενδονουκλεάση Accl αναγνωρίζει την αλληλουχία , $5' \dots GTMKAC \dots 3'$
 $3' \dots CAKM TG \dots 5'$ όπου M αδενίνη ή κυτοσίνη και K γουανίνη ή θυμίνη. Αντικατάσταση της βάσης αδενίνης (A) από γουανίνη (G) στη νουκλεοτιδική θέση 719 του TPMT δημιουργεί μια θέση σύνδεσης της ενδονουκλεάσης περιορισμού που οδηγεί σε πέψη του προϊόντος PCR σε 2 θραύσματα μεγέθους 283 bp και 90 bp. Εάν δεν υπάρχει η μεταλλαγή, το ένζυμο δεν πέπτει το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζεται μόνο μια ζώνη που αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR μεγέθους 373bp.

7.6 Ανάλυση των πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A του γονιδίου ABCB1.

Μελετήθηκαν δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου ABCB1/MDR1. Ο C3435T (rs 1045642), στο εξόνιο 26 και ο οποίος δεν προκαλεί αλλαγή στην αλληλουχία της πρωτεΐνης (συνώνυμος) και ο G2677T/A (rs 2032582) στο εξόνιο 21, ο οποίος είναι τριαλληλικός πολυμορφισμός αντικατάστασης της της γουανίνης με θυμίνη ή αδενίνη, γεγονός που τροποποιεί την αλληλουχία της πρωτεΐνης προκαλώντας αντικατάσταση της αλανίνης στο κωδικόνιο 893 από σερίνη ή θρεονίνη (μη-συνώνυμος).

Για την ανίχνευση του πρώτου SNP χρησιμοποιήθηκαν ο ευθύς 5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3' και ο ανάστροφος εκκινητής : 5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'. Η PCR αντίδραση προγραμματίστηκε για 29 κύκλους, μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 58°C για 30sec και επέκταση της νέας αλύσου στους 72°C για 15 sec. Ακολούθησε το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διάρκειας 7 min στους 72°C. Ο όγκος αυτής της αντίδρασης ήταν 25μl και αναλυτικά τα συστατικά της απεικονίζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9 : Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για C3435T

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Tag DNA πολυμεράσης (buffer) χωρίς Mg ⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl ₂	2.0mM	1μl
dNTPs	0.5mM	1μl
Forward primer	0.5mM	2.5μl
Reverse primer	0.5mM	2.5μl
Taq Polymerase (Biotaq)	3-5u/μl	0.125μl
Απεσταγμένο H ₂ O		15.9μl
Τελικός όγκος		25μl

Η επώαση με 3U από το περιοριστικό ένζυμο Sau3AI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) έγινε στους 37°C για 2h, με όγκο αντίδρασης 10μl, εκ των οποίων 5μl προϊόντος PCR, 1X ρυθμιστικό διάλυμα (NEBuffer 4) και 0,1 μl BSA. Η ενδονουκλεάση Sau3AI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'...GATC...3' όταν υπάρχει η βάση κυτοσίνη (C) δηλαδή το αλληλόμορφο άγριου τύπου, οπότε και πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 197bp σε 2 θραύσματα 158 και 39bp αντίστοιχα. Αν στην

ίδια θέση η κυτοσίνη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη (έλασσον αλληλόμορφο), τότε το ένζυμο Sau3AI δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 197bp.

Τέλος, ο πολυμορφισμός G2677T/A του γονιδίου ABCB1 μελετήθηκε με τη χρήση τεχνικής PCR και ακολούθως RFLP με τα περιοριστικά ένζυμα BanI και BsrI για να ελεγχθεί η παρουσία της μεταλλαγής. (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Οι εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ήταν ο ευθύς με αλληλουχία F: 5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3' και ο ανάστροφος R: 5'-GTTTGACTCACCTTCCCAG-3' για τον πολυμορφισμό G2677A και F: 5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3' R: 5'ΤΤΑΓΤΤΤGACTCACCTTCCCG-3' για τον πολυμορφισμό G2677T. Σε τελικό όγκο 25μl χρησιμοποιήθηκαν 0.5μl dNTPs, 2μl από κάθε εκκινητή, 2.5μl ρυθμιστικού διαλύματος χωρίς Mg⁺⁺, 1μl MgCl₂ και 0.125μl Taq πολυμεράση (Biotaq).

Για να ελεγχθεί η παρουσία του πολυμορφισμού G2677T η PCR έγινε ως εξής: Τα αντιδραστήρια ετέθησαν στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5min, ακολούθησαν οι 30 κύκλοι της αντίδρασης. Καθένας από αυτούς περιελάμβανε 3 στάδια, την αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 58°C για 30sec και επέκταση της νέας αλυσού στους 72°C για 15sec. Το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διήρκεσε 7min σε θερμοκρασία 72°C. Εν συνεχεία 5μl από το τελικό προϊόν PCR επώαστηκαν με 5μl mastermix το οποίο περιείχε 3U BanI, 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer, και 0,1μl BSA για 2h στους 37°C με επακόλουθη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου για 20 λεπτά στους 65°C . Η

ενδονουκλεάση BanI αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \overset{\nabla}{\text{G}}\text{GYRCC} \dots 3'$ $3' \dots \text{CCRYG} \overset{\blacktriangle}{\text{G}} \dots 5'$, όπου R:

αδενίνη ή γουανίνη και Υ: κυτοσίνη ή θυμίνη όταν υπάρχει η βάση γουανίνη (G) δηλαδή το αλληλόμορφο άγριου τύπου, οπότε και πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 224bp σε 2 θραύσματα 198 και 26bp αντίστοιχα. Αν στην ίδια θέση η γουανίνη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη (έλασσον αλληλόμορφο), τότε το ένζυμο BspI δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 224bp.

Για να ελεγχθεί η παρουσία του πολυμορφισμού G2677A η PCR έγινε ως εξής: Τα αντιδραστήρια ετέθησαν στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου μετά την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 5min, ακολούθησαν οι 27 κύκλοι της αντίδρασης. Καθένας από αυτούς περιελάμβανε 3 στάδια, την αποδιάταξη του προϊόντος στους 94°C για 30sec, υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο στους 58°C για 30sec και επέκταση της νέας αλυσού στους 72°C για 15sec. Το τελικό στάδιο επιμήκυνσης διήρκησε 7min σε θερμοκρασία 72°C. Εν συνεχεία 20μl από το τελικό προϊόν PCR επωάστηκαν με 5μl mastermix το οποίο περιείχε 1U BspI, 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος NEBuffer για 1h στους 65°C. Η ενδονουκλεάση BspI

αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{ACTGGN}^* \dots 3'$
 $3' \dots \text{TGACCN} \dots 5'$, όπου N: οποιοδήποτε

νουκλεοτίδιο όταν υπάρχει η βάση αδενίνη (A) δηλαδή το έλασσον αλληλόμορφο, οπότε και πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 220bp σε 2 θραύσματα 206 και 14bp αντίστοιχα. Αν στην ίδια θέση υπάρχει η γουανίνη, δηλαδή το άγριου τύπου αλληλόμορφο, τότε το ένζυμο BspI δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 220bp.

Πίνακας 10: Συστατικά και συγκεντρώσεις μίγματος PCR για G2677T/A

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	100ng	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Tag DNA πολυμεράσης (buffer) χωρίς Mg ⁺⁺	1X (10mM Tris-HCl pH 8.5, 25°C, 50mM KCl)	2.5μl
MgCl ₂	2.0mM	1μl
dNTPs	0.5mM	1μl
Forward primer	0.5mM	2.5μl
Reverse primer	0.5mM	2.5μl
Taq Polymerase (Biotaq)	3-5u/μl	0.125μl
Απεσταγμένο H ₂ O		15.9μl
Τελικός όγκος		25μl

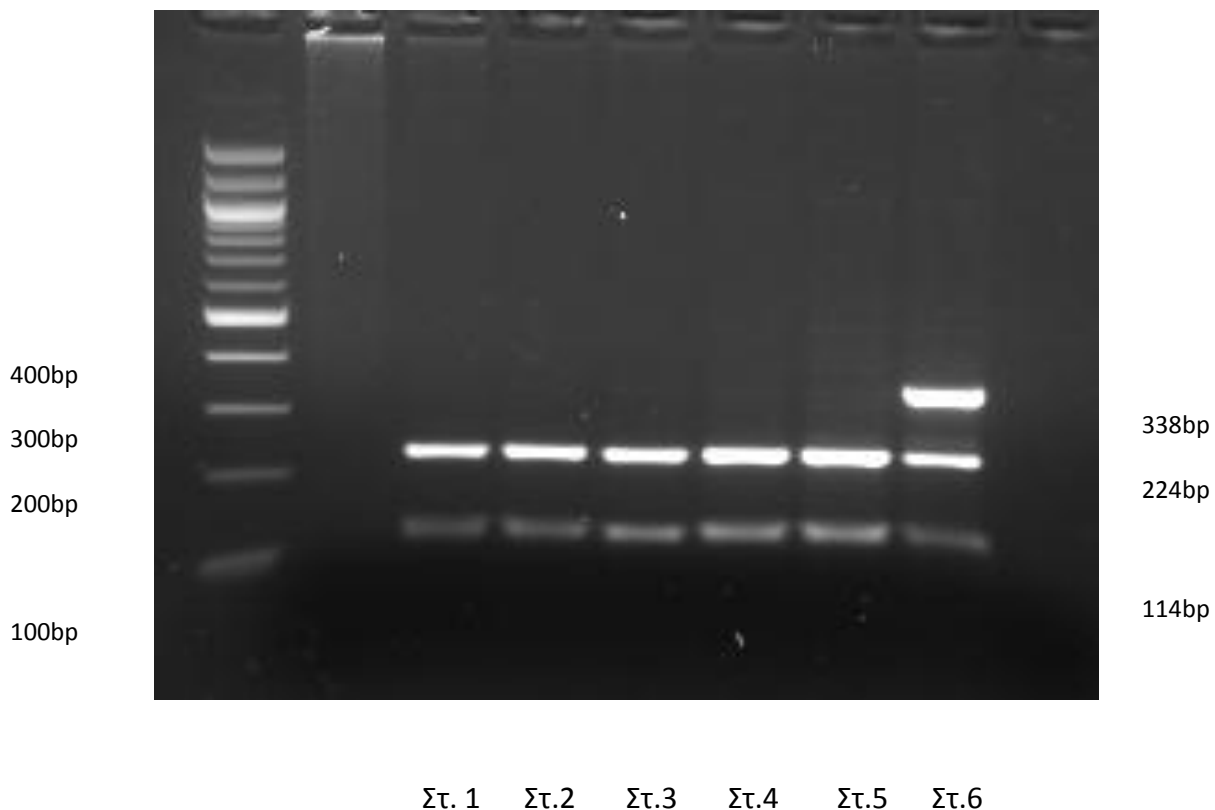
7.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA με κριτήριο το μήκος τους. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερος στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα δείγματα

DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο). Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται πιο αργά από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Χρησιμοποιώντας ένα γνωστού μεγέθους θραύσμα DNA (ladder) ως μέτρο σύγκρισης, δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού του μεγέθους των θραυσμάτων DNA που έχουν προκύψει από την αντίδραση PCR-RFLP, σε ζεύγη βάσεων (bp). Η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των ζωνών του μάρτυρα και των υπό μελέτη κλασμάτων DNA. Στην παρούσα μελέτη η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Για την παρασκευή του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris Borate EDTA) 0.5X και βρωμιούχο αιθίδιο. Το τελευταίο συνιστά μια φθορίζουσα στο υπεριώδες φως ουσία. Ο φθορισμός της ενισχύεται κατά 20 φορές περίπου μετά την πρόσδεσή της στο DNA με αποτέλεσμα να γίνονται ορατές οι ζώνες των θραυσμάτων DNA μετά τον διαχωρισμό τους από την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης. Αρχικά ηλεκτροφορήθηκαν όλα τα προϊόντα της αντίδρασης PCR προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της εκάστοτε αντίδρασης. Η εικόνα που ελήφθη στο υπεριώδες φως από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της allele-

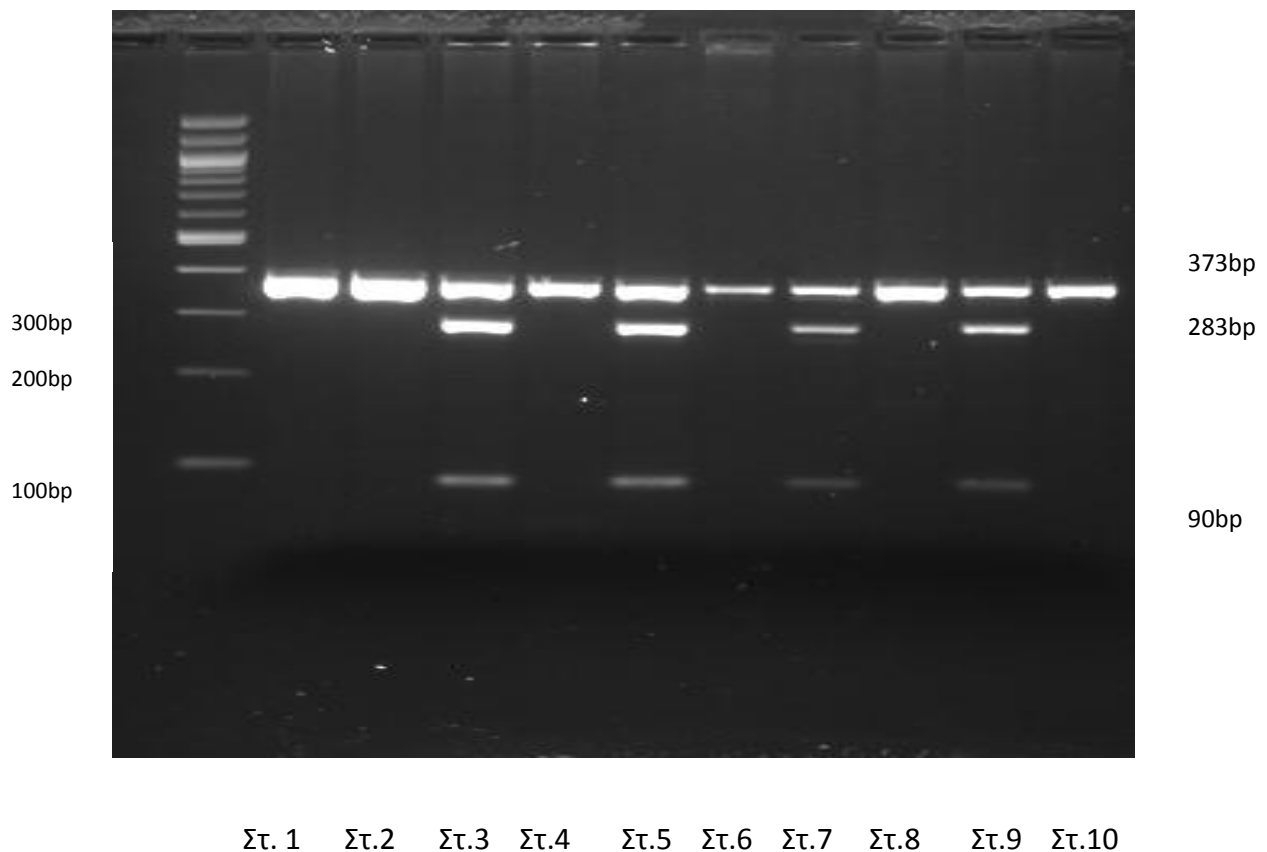
specific PCR για την γονοτύπηση του πολυμορφισμού G238C φαίνεται παρακάτω (εικόνα 14). Όσον αφορά στους υπόλοιπους πολυμορφισμούς, μετά το πέρας της επώασης με το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και 3% ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων της RFLP. Οι εικόνες των αντίστοιχων πολυμορφισμών φαίνονται παρακάτω:

Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP G460A (TPMT) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



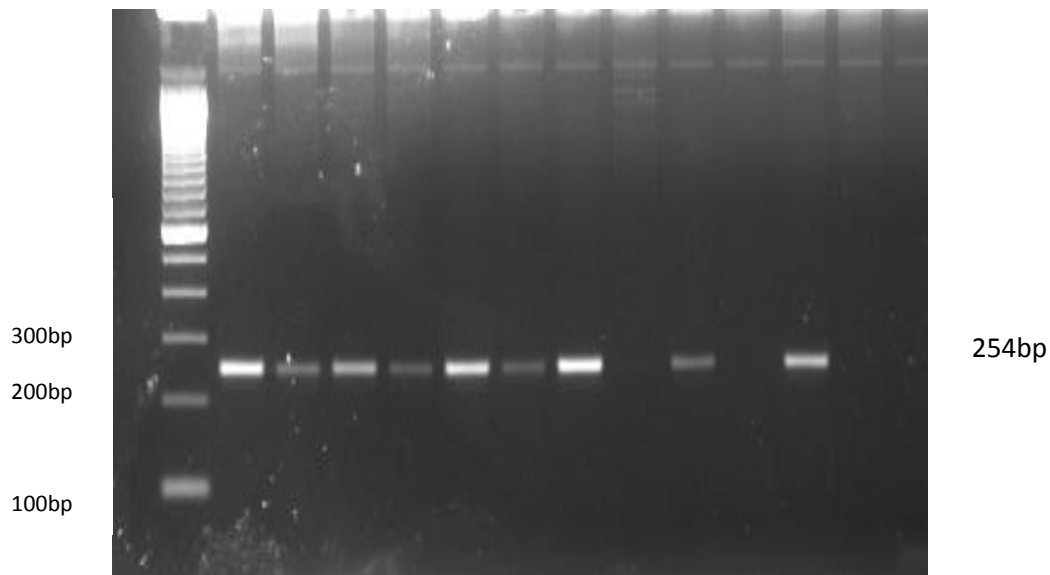
Η ενδονουκλεάση MwoI Η πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού MwoI της αλληλουχίας του DNA που δεν φέρει την μεταλλαγή αποδίδει 2 θραύσματα στην ακολουθούσα ηλεκτροφόρηση μεγέθους 224 bp και 114 bp, που αντιστοιχεί σε ομόζυγο wild type γονότυπο GG (Στήλες 1,2,3,4,5). Αντίθετα η παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής καταστρέφει την θέση σύνδεσης της ενδονουκλεάσης περιορισμού με αποτέλεσμα ένα μόνο προϊόν στην ηλεκτροφόρηση μεγέθους 338 bp, που αντιστοιχεί σε ετερόζυγο GA ή ομόζυγο AA γονότυπο (στήλη 6, ετερόζυγος mutant γονότυπος GA). Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 100bp

Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP A719G (TPMT) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Αντικατάσταση της βάσης αδενίνης (A) από γουανίνη (G) στη νουκλεοτιδική θέση 719 του TPMT δημιουργεί μια θέση σύνδεσης της ενδονουκλεάσης περιορισμού *Accl* που οδηγεί σε πέψη του προϊόντος PCR σε 2 θραύσματα μεγέθους 283 bp και 90 bp (ετερόζυγος mutant γονότυπος, στήλες 3, 5, 7 και 9). Εάν δεν υπάρχει η μεταλλαγή, το ένζυμο δεν πέπτει το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα στην ηλεκτροφόρηση να εμφανίζεται μόνο μια ζώνη που αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR μεγέθους 373bp (wild type γονότυπος, στήλες 1, 2, 4, 6, 8 και 10). Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 100bp.

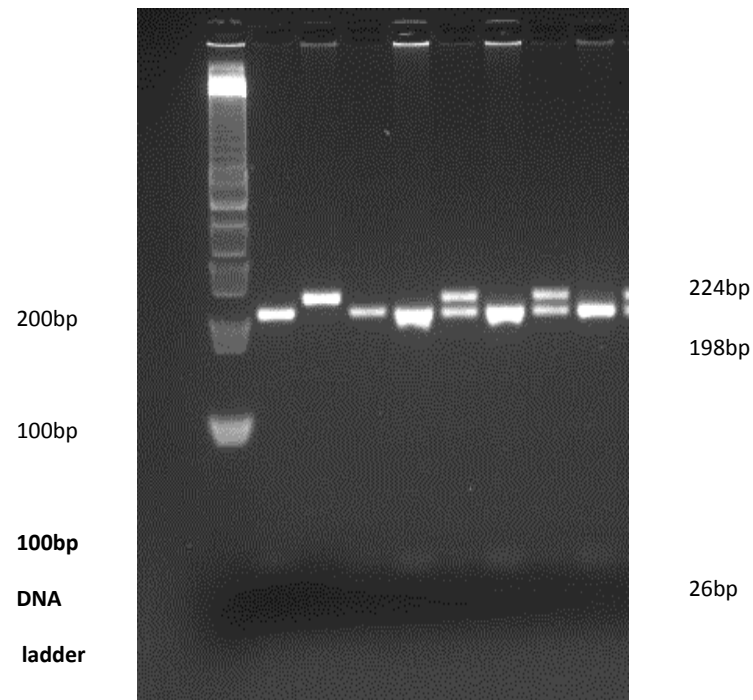
Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR (allele-specific) G238C (TPMT) σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Στ. 1A 1B 2A 2B 3A 3B 4A 4B 5A 5B 6A 6B

Το προϊόν της αντίδρασης είχε μήκος 254bp. Στην περίπτωση απουσίας της σημειακής μεταλλαγής είχαμε πρόσδεση του ευθύ εκκινητή άγριου τύπου (Στήλες 5A, 6A), σε περίπτωση παρουσίας της σε ομοζυγωτία είχαμε πρόσδεση του ευθύ εκκινητή ειδικού για την μεταλλαγή ενώ σε περίπτωση παρουσίας της μεταλλαγής σε ετεροζυγωτία είχαμε πρόσδεση και των δύο ευθέων εκκινητών, και είχαμε προϊόν μήκους 254bp τόσο στην αντίδραση του ευθέως εκκινητή άγριου τύπου όσο και στην αντίδραση ευθέως εκκινητή ειδικού για την μεταλλαγή (Στήλες 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B). Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 100bp.

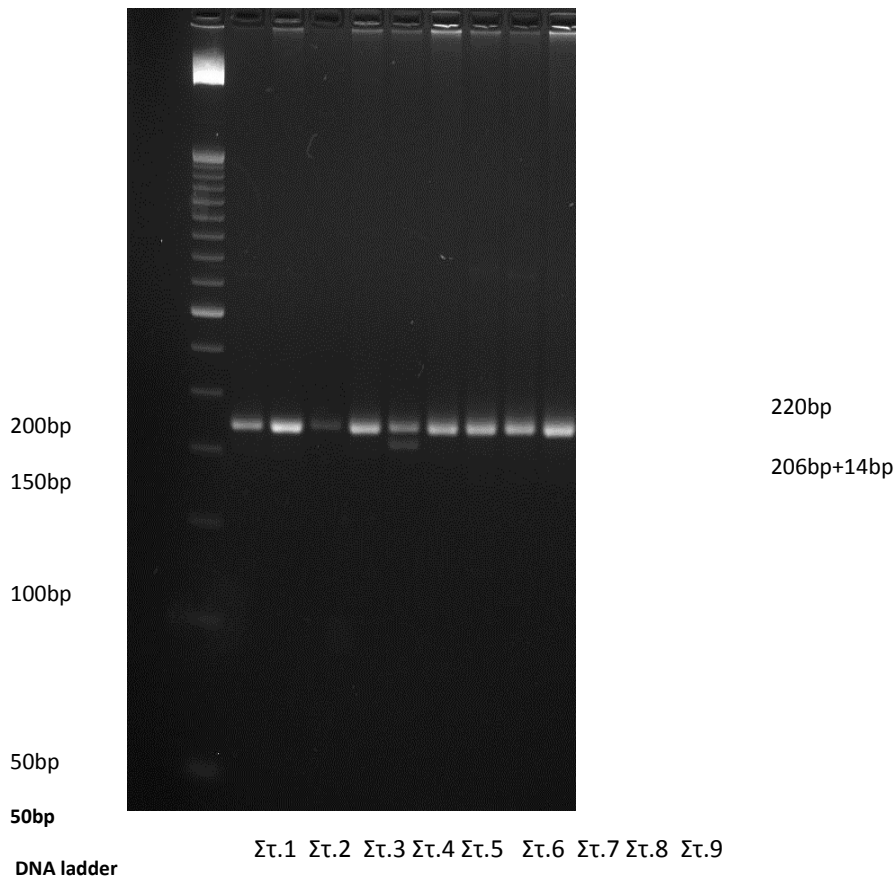
Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP G2677T (ABCB1/MDR1) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



Στ.1 Στ.2 Στ.3 Στ.4 Στ.5 Στ.6 Στ.7 Στ.8

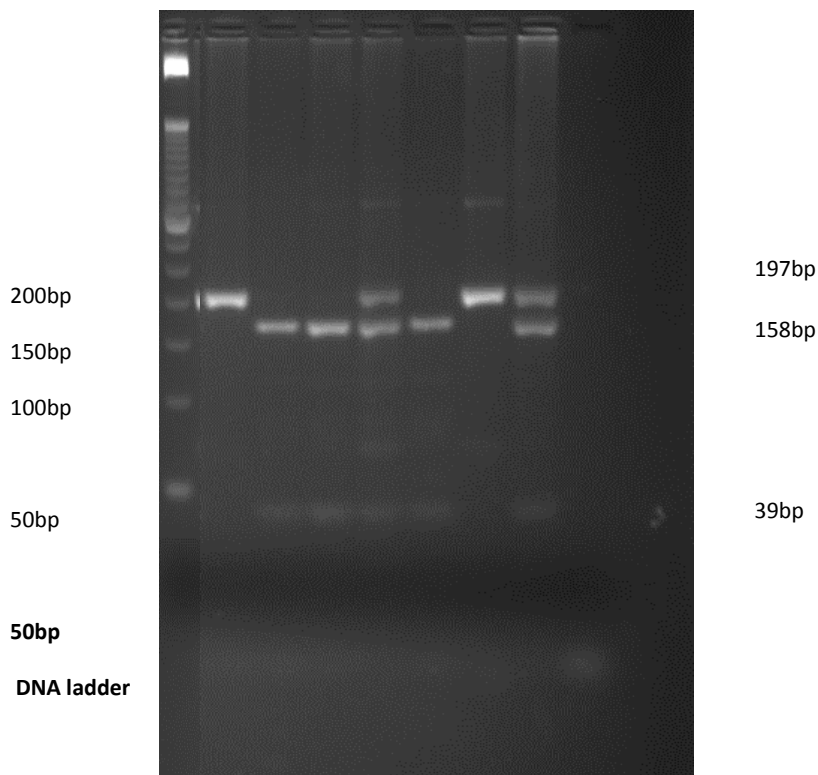
Η ενδονουκλεάση *Ban*I όταν στην αλληλουχία του γονιδίου υπάρχει η βάση γουανίνη (G) δηλαδή το αλληλόμορφο άγριου τύπου, πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 224bp σε 2 θραύσματα 198 και 26bp αντίστοιχα (wild type γονότυπος GG, στήλες 1, 3, 4, 6 και 8). Αν στην ίδια θέση η γουανίνη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη (έλασσον αλληλόμορφο), τότε το ένζυμο *Ban*I δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 224bp (ετερόζυγος mutant γονότυπος GT, στήλες 5 και 7, ή ομόζυγος mutant γονότυπος, στήλη 2). Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 100bp.

Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP G2677A (ABCB1/MDR1) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



Η ενδονουκλεάση BsrI, όταν υπάρχει η βάση αδενίνη (A) δηλαδή το έλασσον αλληλόμορφο, πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 220bp σε 2 θραύσματα 206 και 14bp αντίστοιχα (ετερόζυγος mutant γονότυπος GA, στήλη 5). Αν στην ίδια θέση υπάρχει η γουανίνη, δηλαδή το άγριου τύπου αλληλόμορφο, τότε το ένζυμο BsrI δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 220bp (wild type γονότυπος, στήλες 1,2,3, 4, 6-9). Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 50bp.

Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR-RFLP C3435T (ABCB1/MDR1) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



Στ. 1 Στ.2 Στ.3 Στ.4 Στ.5 Στ.6 Στ.7

Όταν υπάρχει η βάση κυτοσίνη (C) δηλαδή το αλληλόμορφο άγριου τύπου, η ενδονουκλεάση *Sau3AI* πέπτει το προϊόν της PCR μήκους 197bp σε 2 θραύσματα 158 και 39bp αντίστοιχα (wild type γονότυπος CC, στήλες 2, 3, 5). Αν στην ίδια θέση η κυτοσίνη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη (έλασσον αλληλόμορφο), τότε το ένζυμο *Sau3AI* δεν δύναται να δράσει στην εν λόγω αλληλουχία οπότε και διατηρείται το αρχικό προϊόν της PCR μήκους 197bp (ομόζυγος mutant γονότυπος TT, Στήλες 1 και 6). Οι στήλες 4 και 7 αντιστοιχούν σε ετερόζυγο mutant γονότυπο CT. Για τη σύγκριση του μεγέθους των κλασμάτων DNA του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός DNA ladder 50bp.

8. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων διενεργήθηκε με την χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS (SPSS Inc.Chicago, IL, USA). Η αξιολόγηση των δεδομένων που συλλέχθηκαν μετά τη συμπλήρωση των ειδικών ερωτηματολογίων έγινε με σύγκριση μεταξύ ασθενών και υγιών εθελοντών.

Για την ανάλυση των κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο χ^2 και το ακριβές τεστ του Fisher (Fisher's exact probability test), όταν οι συχνότητες ήταν μικρότερες του 5.

Υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος (odds ratio, OR) και το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval CI) ως εκτίμηση της συσχέτισης της παρουσίας των γενετικών πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η τιμή του p μικρότερη από 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Για τη σύγκριση της συχνότητας των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πέντε υπό μελέτη γενετικών πολυμορφισμών μεταξύ ασθενών-μαρτύρων καθώς και για τον έλεγχο αποκλίσεων από την ισορροπία Hardy- Weinberg Equilibrium χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 .

Ως δείκτης του σχετικού κινδύνου υπολογίστηκε ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων OR με 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Ο προσδιορισμός του επιπέδου σημαντικότητας των OR και του λόγου ετεροζυγώτες/ομοζυγώτες έγινε με το Fisher's exact test και την δυαδική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (binary logistic regression analysis).

VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των Κρητικής καταγωγής ασθενών με ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn που περιλήφθηκαν στην μελέτη φαίνονται στον Πίνακα

Πίνακας 11: Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών με Ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο που συμμετείχαν στην μελέτη.

Παράμετρος	CD	UC	Σύνολο
Αριθμός ασθενών (%)	111 (49.8)	112 (50.2)	223 (100)
Ενδιάμεση ηλικία (σε έτη, εύρος)	55 (20-90)	51.5 (16-87)	53 (16-90)
Φύλο (θήλεα, %)	57 (51.4)	40 (35.7)	97 (43.5)
Κάπνισμα (ναι, %)	44 (39.6)	32 (28.6)	76 (34)
Μέση διάρκεια νόσου (έτη, εύρος)	8 (1-30)	9.5 (1-40)	8.75 (1-40)
Κατάταξη Montreal για ελκώδη κολίτιδα			
Πρωκτίτιδα (E1, %)		16 (14.3)	
Αριστερή κολίτιδα (E2, %)		54 (48.2)	
Εκτεταμένη κολίτιδα (E3, %)		42 (37.5)	
Κατάταξη Montreal για νόσο Crohn			
Φλεγμονώδης (B1, %)	82 (73.9)		
Στενωτική (B2, %)	16 (14.4)		

Διαιτηραίνουσα (B3, %)	9 (8.1)		
Περιπρωκτική (p, %)	4 (3.6)		
Τελικός ειλεός (L1, N, %)	39 (34.8)		
Κόλον (L2, N, %)	37 (33)		
Ειλεός και κόλον (L3, N, %)	36 (32.1)		
Ανώτερο πεπτικό (L4, N, %)	4 (3.5)		
Χρήση θειοπουρινικών φαρμάκων (N, %)	60 (54.1)	31 (27.7)	91 (40.8)
Χειρουργική επέμβαση σχετιζόμενη με IBD (N, %)	27 (24.3)	7 (6.3)	34 (15.2)

CD: Νόσος Crohn, IBD: ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, UC: ελκώδης κολίτιδα.

9. Γενετική ανάλυση γονιδίου TPMT

9.1 Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου

Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου TPMT που ελέγχθηκαν G460A, A719G και G238C, τόσο στους ασθενείς με IBD όσο και στους υγιείς εθελοντές παρουσιάζονται στους πίνακες

Πίνακας 12: Συχνότητες γονοτύπων γονιδίου TPMT σε ασθενείς με IBD και υγιείς εθελοντές (χ^2 ή Fisher's exact test) .

ΓΟΝΙΔΙΟ TPMT

Συχνότητες γονοτύπων		IBD (223)	CTRS (119)	O.R.	95% C.I.	Τιμή P			
TPMT3B	GG	220	119	0.987	0.972-1.002	0.554			
	GA	3	0						
	AA	0	0						
TPMT3C	AA	219	119	0.982	0.965-1.00	0.302			
	AG	4	0						
	GG	0	0						
TPMT2	GG	219	119	0.982	0.965-1.000	0.302			
	GC	4	0						
	CC	0	0						
TPMT3A	GG/AA	217	118	0.981	0.955-1.009	0.429			
	GA/AG	6	1				3.202	0.390-26.385	0.429
	AA/GG	0	0						

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, CTRS: ομάδα ελέγχου, TPMT: θειοπουρινική μεθυλ-τρανσφεράση.

Πίνακας 13: Συχνότητες αλληλομόρφων γονιδίου TPMT σε ασθενείς με IBD και υγιείς εθελοντές (χ^2 ή Fisher's exact test).

ΓΟΝΙΔΙΟ TPMT

Συχνότητες αλληλομόρφων		IBD (446)	CTRS (238)	O.R.	95% C.I.	Τιμή P
G460A	G	437	237	0.984	0.969-0.999	0.177
	A	9	1	4.803	0.612-37.681	0.177
A719G	A	436	237	0.982	0.966-0.998	0.108
	G	10	1	5.336	0.687-41.435	0.108
G238C	G	442	238	0.991	0.982-1.000	0.304
	C	4	0	0	0	

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, CTRS: ομάδα ελέγχου, TPMT: θειοπουρινική μεθυλ-τρανσφεράση.

Οι γονότυποι *TPMT*2* και *TPMT*3C* βρέθηκαν σε 4 (1.8%) ασθενείς, ο γονότυπος *TPMT*3B* σε 3 (1.3%) και ο γονότυπος *TPMT*3A* σε 6 (2.7%) ασθενείς με IBD. Όσον αφορά στα αλληλόμορφα, το αλληλόμορφο με την μεταλλαγή G238C ανιχνεύτηκε σε 4 από τους 223 (1.8%) ασθενείς, ενώ 3 (1.3%) ήταν φορείς της μεταλλαγής G460A mutation, 4 (1.8%) ήταν φορείς της μεταλλαγής A719G και 6 (2.7%) έφεραν και τις 2 μεταλλαγές G460A και A719G mutation. Κανένα αλληλόμορφο δεν βρέθηκε σε ομοζυγωτία στους ασθενείς με IBD. Στους υγιείς εθελοντές, μόνο ένας από αυτούς (0.8%) έφερε και τις δύο μεταλλαγές G460A και A719G (γονότυπος *TPMT*3A*). Οι γονότυποι *TPMT*2*, *TPMT*3C* και *TPMT*3B* δεν ανιχνεύτηκαν στα υγιή άτομα. Δεν

υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων συχνοτήτων αλληλομόρφων από την εξίσωση Hardy-Weinberg.

9.2 Συσχέτιση παρουσίας πολυμορφισμών με εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών κατά την λήψη αζαθειοπρίνης.

Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και της εκδήλωσης παρενεργειών στους ασθενείς που έλαβαν αζαθειοπρίνη

Στην ομάδα μελέτης μας, 91 ασθενείς (40.8%) έλαβαν αζαθειοπρίνη. Ανεπιθύμητες ενέργειες που οδήγησαν σε μείωση δόσης ή διακοπή χορήγησης του φαρμάκου καταγράφηκαν σε 23 από τους 91 (25.3%). Σχεδόν όλοι τους δεν έφεραν κανένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (γονότυπος *TPMT*1*, Πίνακας 14). Μεταξύ αυτών, 3 ασθενείς έφεραν μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (γονότυπος *TPMT*3A* και *TPMT*3B*) και εκδήλωσαν μυελοκαταστολή, που καταγράφηκε ως μειωμένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων. Παρατηρήθηκε ωστόσο μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού G460A και της εκδήλωσης λευκοπενίας ($p=0.048$, $O.R=8.87$ 95% $CI: 0.97-81.11$) αν και η συσχέτιση ήταν σχετικά ασθενής (Pearson correlation $r=-0.245$) (Πίνακας 15) .

Πίνακας 14: Συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων του γονιδίου TPMT και της εκδήλωσης ανεπιθύμητων ενεργειών στους ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο που ελαβαν αζαθειοπρίνη (Fisher's exact test).

Είδος ανεπιθύμητης ενέργειας	Ασθενείς με IBD	Κατανομή γονοτύπων				
		TPMT1	TPMT2	TPMT3B	TPMT3C	TPMT3A
Λευκοπενία N (%)	13 (56.5)	10	0	1	0	2
Ηπατίτιδα N (%)	5 (21.7)	5	0	0	0	0
Παγκρεατίτιδα N (%)	3 (13.1)	3	0	0	0	0
Εξάνθημα N (%)	2 (8.7)	2	0	0	0	0
Σύνολο N (%)	23 (100)	20	0	1	0	2
				<u>(O.R.: 0.957,</u> <u>95% C.I.: 0.87-</u> <u>1.04, p: 0.25)</u>		<u>(O.R.: 5.91,</u> <u>95% C.I.: 0.56-</u> <u>62.21, p:</u> <u>0.15)</u>

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, TPMT: θειοπουρινική μεθυλ-
τρανσφεράση, O.R.: σχετικός κίνδυνος, C.I.: διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 15: Συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου TPMT και της εκδήλωσης ουδετεροπενίας στους ασθενείς με IBD (Fisher's exact test).

Ανεπιθύμητη ενέργεια σε αζαθειπρίνη	Συνολικά αλληλόμο ρφα σε IBD ασθενείς	Άγριου τύπου	Κατανομή πολυμορφισμών		
			G238C	G460A	A719G
Ουδετεροπενία	26	21	0	3	2
				(p=0.048, O.R=8.87 95% CI: 0.94- 83.17)	(O.R.: 2.957, 95% C.I.: 0.429- 20.39, p: 0.265)

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, TPMT: θειοπουρινική μεθυλ-
τρανσφεράση, O.R.: σχετικός κίνδυνος, C.I.: διάστημα εμπιστοσύνης.

10. Γενετική ανάλυση γονιδίου ABCB1/MDR1

Στους πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά στοιχεία σχετικά με τις συχνότητες των
γονοτύπων και των αλληλομόρφων του γονιδίου ABCB1.

Πίνακας 16: Συχνότητες γονοτύπων γονιδίου ABCB1 στους ασθενείς με IBD και στην ομάδα ελέγχου (binary logistic regression analysis).

		IBD (223)	CTRS(119)	O.R (95% C.I.)	CD (111)	O.R (95% C.I.)	UC (112)	O.R (95% C.I.)
C3435T	CC	50(22.4)	31(26.1)	1	26(23.4)	1	24(21.4)	1
	CT	125 (56,1)	56(47.1)	0.55 (0.29-1.02)	66(59.5)	0.62(0.31-1.22)	59(52.7)	0.53(0.25-1.12)
	TT	48 (21,5)	32(26.9)	0.81(0.63-1.81)	19(17.1)	1.42(0.54-3.71)	29(25.9)	0.48(0.18-1.25)
G2277T	GG	64(28.7)	26(31.3)	1	31(27.9)	1	33(29.5)	1
	GT	128(57.4)	72(69.6)	1.67(0.91-3.06)	64(57.7)	1.5 (0.76-2.94)	64(57.1)	1.93(0.94-3.96)
	TT	31(13.9)	21(18.1)	1.75(0.7-4.36)	16(14.4)	1.06(0.36-3.08)	15(13.4)	2.74(0.91-8.21)
G2277A	GG	214(96)	114(95.8)	1	108(97.3)	1	106(94.6)	1
	GA	9(4)	5(4.2)	1.08(0.34-3.47)	3(2.7)	1.46(0.33-6.54)	6(5.4)	0.84 (0.24-2.91)

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, CTRS: ομάδα ελέγχου, UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn, OR: σχετικός κίνδυνος, 95% C.I.: 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 17: Συχνότητες αλληλομόρφων γονιδίου ABCB1 στους ασθενείς με IBD και στην ομάδα ελέγχου (binary logistic regression analysis).

	IBD (446)	CTRS (238)	O.R. (95% C.I.)	CD (222)	O.R (95% C.I)	UC	O.R (95% C.I.)
C3435T	C	225 (50.4)	1 (49.2)	118 (53.2)	1 (47.8)	107 (47.8)	1
	T	221 (49.6)	1,05 (0.76- 1.44)	104 (46.8)	1,07(0,61- 1,71)	117 (52.5)	0,68(0,41-1,12)
G2277T	G	256 (57.4)	1 (52.1)	126 (56.8)	1 (56.8)	130 (58)	1
	T	190 (42.6)	1,23(0.9- 1,69)	96 (43.2)	1,15(0.71- 1,84)	94 (42)	<u>1,64(1-2,7)</u> <u>p=0,049</u>
G2277A	G	437 (98)	233 (97.9)	1 (98.6)	219 (98.6)	1 (97.3)	218
	A	9 (2)	5 (2.1) 1,04(0.34- 3,14)	3 (1.4)	1,5(0.35- 6,43)	6 (2.7)	0,76(0.22-2,57)

IBD: Ιδιοπαθής φλεγμονώδης εντερική νόσος, CTRS: ομάδα ελέγχου, UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn, OR: σχετικός κίνδυνος, 95% C.I.: 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

10.1 Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου

125 ασθενείς με IBD (56.1%) και 56 υγιείς εθελοντές (47.1%) βρέθηκαν ετερόζυγοι για την μεταλλαγή C3435T (O.R: 0,55, 95% C.I: 0,29-1,02), ενώ 48 ασθενείς (22.4%) και 32 υγιείς εθελοντές (26.9%) βρέθηκαν ομόζυγοι για την ίδια μεταλλαγή(O.R: 0.81, 95% C.I: 0,63-1,81). Όσον αφορά στο μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C (άγριου τύπου), στην παρούσα γενετική μελέτη εντοπίστηκαν 225 από συνολικά 446 αλληλόμορφα (50.4%) στους ασθενείς με IBD (118 σε ασθενείς με νόσο Crohn, 107 σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα) και 117 από συνολικά 238 αλληλόμορφα (49.2%) σε υγιείς εθελοντές.

Το αλληλόμορφο T που φέρει την μεταλλαγή ανιχνεύτηκε σε συχνότητα 49.6% στους ασθενείς με IBD (221 από τα 446 συνολικά αλληλόμορφα) και 50.8% στους υγιείς εθελοντές (121 από τα 238 συνολικά αλληλόμορφα) O.R : 1.05, 95% C.I. 0.76-1.44).

Όσον αφορά στην μεταλλαγή G2677T, 128 IBD ασθενείς (57.4%) και 72 υγιείς εθελοντές (69.6%) ήταν ετερόζυγοι, (O.R 1.67, 95% C.I. 0.91-3.06), ενώ 31 IBD ασθενείς (13.9%) και 21 υγιείς εθελοντές (18.1%) ήταν ομόζυγοι για την συγκεκριμένη μεταλλαγή (O.R 1.75, 95% C.I. 0.7-4.36).

Όσον αφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων, το μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο G ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 57.4%, (256 από συνολικά 446 αλληλόμορφα) στην ομάδα των ασθενών και σε παρόμοιο ποσοστό 52.1% (124 από συνολικά 238 αλληλόμορφα) στην ομάδα ελέγχου, ενώ βρέθηκαν 190

αλληλόμορφα φέροντα την μεταλλαγή T (42.6%) στην ομάδα των ασθενών και 114 (47.9%) στην ομάδα ελέγχου (O.R. (95% C.I.) 1.23 (0.9-1.69). Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με νόσο Crohn ανιχνεύτηκαν μεταλλαγμένα T αλληλόμορφα σε ποσοστό 43,2% (96 από συνολικά 222 αλληλόμορφα) O.R. (95% C.I.) 1.15 (0.7-1.84), ενώ στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, το μεταλλαγμένο T αλληλόμορφο ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 42% (94 από συνολικά 224 αλληλόμορφα) O.R. (95% C.I.) 1.64 (1-2.7) $p=0.049$.

Για την μεταλλαγή G2677A, η γενετική ανάλυση ανέδειξε 9 ετερόζυγους ασθενείς (4%) και 5 ετερόζυγους υγιείς εθελοντές (4.2%), (O.R. (95% C.I.) 1.08 (0.34-3.47), ενώ δεν είχαμε κανένα άτομα που να έφερε τον πολυμορφισμό σε ομοζυγωτία.

10.2 Οι πολυμορφισμοί C3435T και G2677A δεν σχετίζονται με την εκδήλωση νόσου.

Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των υπό μελέτη μεταλλαγμένων αλληλομόρφων C3435T και G2677A και την εκδήλωση της νόσου, ελκώδους κολίτιδος ή νόσου Crohn αλλά ούτε συνολικά με την εκδήλωση IBD. Επιπλέον, έγινε συσχέτιση της παρουσίας των πολυμορφισμών με τον φαινότυπο της νόσου. Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των αλληλομόρφων σε ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία και στην εντόπιση ή την έκφραση της νόσου Crohn καθώς και με την έκταση νόσου στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα.

10.3 Οριακή στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού G2677T με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας.

Ο πολυμορφισμός G2677T δεν συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την εκδήλωση ΙΦΝΕ καθώς και με την εκδήλωση νόσου Crohn. Ωστόσο, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T φαίνεται να παρουσιάζει οριακά στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας στους Κρήτες ασθενείς O.R. (95% C.I.) 1.64 (1-2.7) $p=0.049$.

10.4 Συσχέτιση πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A με ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή

Στην ομάδα ασθενών της μελέτης, 27 από τους 111 ασθενείς με νόσο Crohn (24.3%) και 7 από τους 112 ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (6.3%) υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση λόγω αποτυχίας της συντηρητικής αγωγής. Η χειρουργική αντιμετώπιση σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την νόσο Crohn στο δείγμα των ασθενών κρητικής καταγωγής O.R. (95% C.I.) 0.25 (0.11-0.56) $p=0.00$.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των υπό μελέτη πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A και της ανάγκης χειρουργικής επέμβασης για την νόσο, τόσο στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα όσο και στους

ασθενείς με νόσο Crohn. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το 59% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση ήταν φορείς και των 2 μεταλλαγμένων αλληλομόρφων 3435T και 2677T, είτε σε ετεροζυγωτία είτε σε ομοζυγωτία.

Πίνακας 18: Συσχέτιση γονοτύπων γονιδίου ABCB1 με διενέργεια χειρουργικής επέμβασης σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (binary logistic regression analysis).

	SURGERY TOTAL(%) (34)	O.R (95% C.I.)	SURGERY CD (27)%	O.R (95% C.I.)	SURGERY UC (7)%	O.R (95% C.I.)
C3435T	CC 9(26.5)	1	7(25.9)	1	2(28.6)	1
	CT 17 (50)	0.72 (0.27- 1.94)	13(48,1)	0.78(0.24- 2,49)	4(57.1)	0.29(0.03-2,6)
	TT 8 (23,5)	0.62(0.16-2,32)	7(25,9)	1.56(0.32- 7,48)	1(14.3)	0.09(0.03-2,7)
G2277T	GG 10(29,4)	1	9(33,3)	1	1(14,3)	1
	GT 17(50)	0,96(0.37-2,52)	12(44,4)	0,67(0.22- 1,99)	5(71,4)	6,14(0.43-87,2)
	TT 7(20,6)	2,01(0.51-7,8)	6(22,2)	1.02(0.21- 4,94)	1(14,3)	13,5(0.31- 58,31)
G2277A	GG 33(97,1)	1	27(100)		6(85,7)	1
	GA 1(2,9)	0,75(0.08-6,42)			1(14.3)	2,33(0.19- 28,23)

- Προσαρμοσμένα για ηλικία και φύλο.

UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn, OR: σχετικός κίνδυνος, 95% C.I.: 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 19: Συσχέτιση αλληλομόρφων γονιδίου ABCB1 με διενέργεια χειρουργικής επέμβασης σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (binary logistic regression analysis).

		SURGERY TOTAL(68)	O.R. (95% C.I.)	CD (54)	O.R (95% C.I)	UC (14)	O.R (95% C.I.)
C3435T	C	35 (51.5)	1	27 (50)	1	8 (57,1)	1
	T	33 (48.5)	0,77 (0.38-1.55)	27 (50)	1,2(0,55-2,65)	6 (42,9)	0,68(0,41-1,12)
G2277T	G	37 (54.4)	1	30 (55.6)	1	7 (50)	1
	T	31 (45.6)	1,38(0.68-2,8)	24 (44.2)	0,98(0.44-2,18)	7 (50)	1,64(1-2,7)
G2277A	G	67 (98,5)	1	54 (100)		13(92.9)	1
	A	1 (1,5)	0,63(0.07-5,23)			1(7,1)	0,35(0.03-4,18)

- Προσαρμοσμένα για ηλικία και φύλο.

UC: ελκώδης κολίτιδα, CD: νόσος Crohn, OR: σχετικός κίνδυνος, 95% C.I.: 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

VII ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μια ομάδα ασθενών και υγιών εθελοντών με κρητική καταγωγή, έναν καυκάσιο πληθυσμό γενετικά ομοιογενή, εξαιτίας γεωγραφικών περιορισμών.

11. TPMT

Από την γενετική ανάλυση προέκυψε ότι η συχνότητα των αλληλομόρφων του γονιδίου TPMT διαφέρει από εκείνη άλλων καυκάσιων πληθυσμών. Συνολικά, η συχνότητα των πολυμορφισμών στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης ήταν 7.6%, ποσοστό μικρότερο σε σχέση με προηγούμενες αναφορές (10-11%) (416, 454), με παρόμοια κατανομή των ποικίλων αλληλομόρφων στους ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο και στην ομάδα ελέγχου (455, 456).

Υπάρχουν λίγες μελέτες στην βιβλιογραφία σχετικά με την συχνότητα των μεταλλαγών του γονιδίου TPMT σε ασθενείς από την Νότια Ευρώπη. Οι συχνότητες των μεταλλαγών σε έναν ομοιογενή πληθυσμό ασθενών από την Σικελία με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο, αυτοάνοσες και αιματολογικές διαταραχές βρέθηκαν επίσης μικρότερες, ποσοστό 4,8%, σε σχέση με τις έως τώρα υπάρχουσες μελέτες (457-459).

Ωστόσο, οι διαφορετικές συχνότητες έχουν αναφερθεί στους πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων. Στην νότιο-δυτική Ασία, οι μεταλλαγές αναφέρονται σε ποσοστό μόλις 2% αλλά και 5% στην Κίνα (460).

Αντίστοιχα χαμηλά ποσοστά έχουν αναφερθεί σε ασθενείς από το Ιράν, με παρόμοιο επιπολασμό και των φαινοτύπων του *TPMT* (422).

Στους Καυκάσιους, το συχνότερο αλληλόμορφο, το *TPMT*3A* και τα 4 αλληλόμορφα που φέρουν τους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, τα *TPMT*2*, **3A*, **3B* and **3C*, ανιχνεύονται στο 80% με ενδιάμεση ή φτωχή ενεργότητα του ενζύμου *TPMT* (461-463).

Ο γονότυπος *TPMT*3A* απαντάται συχνότερα στους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (ποσοστό: 2-4.5%) καθώς και στους Λατινο-αμερικανούς (1.5-6.5%), ενώ στους Ασιάτες (0.3-1.2%) και στους Αφρικανούς (1.3-7.6%), ο *TPMT*3C* είναι ο συχνότερος γονότυπος (420, 464-466).

Στην παρούσα μελέτη, ο επιπολασμός των διαφόρων γονοτύπων του γονιδίου *TPMT* στους ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο ήταν 1.8% για τον *TPMT*2* και *TPMT*3C* και 2.7% για τον *TPMT*3A*, ενώ ο μη μεταλλαγμένος γονότυπος βρέθηκε σε ποσοστό 92.4%.

Μεταξύ των 15 ετεροζυγωτών εντός της ομάδας των ασθενών με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο, η συχνότητα των γονοτύπων του γονιδίου *TPMT* ήταν 26.6% για τον γονότυπο *TPMT*2* και *TPMT *3C*, 20% για τον γονότυπο *TPMT*3B* και 40% για τον γονότυπο *TPMT*3A*. Διαφαίνεται μια ξεκάθαρη επικράτηση του γονοτύπου *TPMT*3A* αλλά επίσης ο γονότυπος *TPMT*3B* απαντάται συχνότερα στην παρούσα ομάδα μελέτης σε σχέση με τις έως τώρα βιβλιογραφικές αναφορές (462, 467-468).

Επιπρόσθετα, σε έναν ασθενή εντοπίστηκαν και οι δύο πολυμορφισμοί, G460A και G238C, γεγονός που δεν έχει παρατηρηθεί έως τώρα σε παρόμοιες μελέτες σε άλλους πληθυσμούς.

Συνεπώς, η γονοτυπική κατανομή στους κρητικής καταγωγής ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με εκείνη άλλων καυκάσιων πληθυσμών, αλλά με χαμηλότερη γενικά συχνότητα των αλληλομόρφων και ελαφρώς αυξημένη συχνότητα του γονοτύπου *TPMT*3B*.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κανένας ασθενής ή υγιής εθελοντής δεν βρέθηκε να φέρει σε ομοζυγωτία τα αλληλόμορφα που έφεραν απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται στο μικρό μέγεθος της ομάδας μελέτης. Είναι γνωστό ότι τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα σε ομοζυγωτία ανευρίσκονται σε 1 στα 300 άτομα. Επιπλέον, μόνο το 0,8% των υγιών εθελοντών έφεραν αλληλόμορφο με μεταλλαγή σε σχέση με το 7,6% των ασθενών. Ωστόσο, όταν εξεταστούν χωριστά οι μεμονωμένοι γονότυποι, οι συχνότητες τους δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου (πίνακες 12, 13). Έτσι δεν μπορεί να υποθεθεί μια πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών του γονιδίου *TPMT* με την παθογένεια της νόσου.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *TPMT* έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου οι οποίοι λαμβάνουν θειοπουρίνες και η εκδήλωση τους σχετίζεται με υψηλά επίπεδα 6-θειογουανιδικών νουκλεοτιδίων (6-TGN) στο αίμα καθώς και με μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου *TPMT* (376, 361, 362, 469).

Στους ασθενείς με μειωμένη ή μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα του ενζύμου ο μεταβολισμός των θειοπουρινικών φαρμάκων κατευθύνεται προς την παραγωγή 6-

θειογουανινικών νουκλεοτιδίων μέσω του μονοπατιού της υποξανθινικής φωσφορυβόζυλο-τρανσφεράσης (HPRT) προδιαθέτοντας έτσι σε εκδήλωση μυελοκαταστολής (360, 368).

Όσον αφορά στους ασθενείς με ενδιάμεση ενεργότητα του ενζύμου TPMT, μια μετα-ανάλυση στην οποία περιελήφθησαν 4306 ασθενείς από 47 μελέτες ανέδειξε σχετικό κίνδυνο εκδήλωσης λευκοπενίας ίσο με 4.09 (95% CI, 3.20– 5.48; P = 0.001) σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογική ενεργότητα ενζύμου (370). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μετα-ανάλυση αυτή περιέλαβε αναδρομικές και προοπτικές μελέτες με περιπτώσεις ήπιας παρά σοβαρής λευκοπενίας και με διαφορετικές μεθόδους ελέγχου του TPMT. Επιπλέον, ακόμη και εάν όλοι οι ασθενείς με ελλειματικό ένζυμο που λάβουν τυπικές δόσεις θειοπουρινών εκδηλώσουν μυελοκαταστολή, η ελλειματική λειτουργία του ενζύμου θα ευθύνεται μόνο για το ¼ των περιπτώσεων (371).

Στην ομάδα μελέτης της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού G460A και της εκδήλωσης ουδετεροπενίας, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς μας που λάμβαναν θειοπουρίνες παρακολούθηθηκαν τουλάχιστον για 15 μήνες. Εφόσον οι περισσότερες περιπτώσεις ανεπιθύμητων ενεργειών εκδηλώνονται συνήθως πρώιμα στην διάρκεια της θεραπείας, δεν είναι πιθανόν να χάθηκαν περιστατικά εκδήλωσης τοξικότητας.

Η παρουσία των υπόλοιπων πολυμορφισμών A719G και G238C δεν συσχετίστηκε με την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών. Οι Zabala-Fernández και συν ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα σε 232 ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο

που έλαβαν αζαθειοπρίνη και ο επιπολασμός των ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν 33.3% μεταξύ εκείνων που έφεραν αλληλόμορφα με μεταλλαγές (470).

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ομάδα των ασθενών μας περιελάμβανε και ασθενείς που έφεραν αλληλόμορφα με πολυμορφισμούς αλλά δεν έλαβαν θειοπουρίνες έως το τελικό σημείο της μελέτης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο λόγω της συνεχώς αυξανόμενης χρήσης των βιολογικών παραγόντων στην θεραπεία της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι ο γενετικός έλεγχος του ενζύμου TPMT πριν την χορήγηση θειοπουρινών είναι πιθανό να προβλέψει την εκδήλωση τοξικότητας σε ορισμένους ασθενείς, αλλά η συσχέτιση αυτή δεν είναι ιδιαίτερος ισχυρή. Η χρήση του ελέγχου ως εξέταση ρουτίνας βρίσκεται ακόμη υπό συζήτηση. Μια πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι ο έλεγχος του ενζύμου ζητείται από το 94% των δερματολόγων και το 60% των γαστρεντερολόγων (451), ενώ παγκοσμίως το 43% των γαστρεντερολόγων χρησιμοποιεί τον έλεγχο του ενζύμου TPMT στην αντιμετώπιση των ασθενών με ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (471).

Ο έλεγχος του ενζύμου έχει προταθεί να γίνεται ως εξέταση ρουτίνας πριν την χορήγηση θειοπουρινών (472).

Ωστόσο, σε μια συστηματική ανασκόπηση από τους Booth και συν για την εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας του γενετικού ελέγχου ως προς την ενζυματική ενεργότητα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ υπό αζαθειοπρίνη, δεν βρέθηκαν επαρκείς ενδείξεις για την υποστήριξη του γενετικού ελέγχου πριν την έναρξη θεραπείας (442).

11. ABCB1

Σύμφωνα με την σχετική υπάρχουσα βιβλιογραφία οι απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCB1/MDR1* σχετίζονται με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδος, νόσου Crohn ή ΙΦΝΕ, καθώς και ΙΦΝΕ ανθεκτική στην θεραπεία. Ωστόσο τα ευρήματα αυτά αμφισβητούνται. Επιπρόσθετα, δεν είναι ξεκάθαρο εάν ισχύουν σε όλους τους πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων και γεωγραφικών περιοχών (πίνακες 3 και 4).

Η εμπλοκή των γονιδίων ABC στην παθογένεια της ΙΦΝΕ έχει υποδηλωθεί τόσο από μελέτες σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Έχει προταθεί ότι ο ρόλος του επιθηλιακού φραγμού της γαστρεντερικής οδού είναι κρίσιμος για την έναρξη και διατήρηση της χρόνιας φλεγμονής, χαρακτηριστικό της ΙΦΝΕ, λόγω του ότι η ακεραιότητα του φραγμού διατηρεί την ανοσολογική ομοιόσταση του βλεννογόνου, αποτρέποντας την φλεγμονή (473).

Τα *mdr1a* knockout ποντίκια (*mdr1a*^{-/-}) είναι επιρρεπή στην εκδήλωση αυτόματης σοβαρής εντερικής φλεγμονής, σε στείρες συνθήκες, μια φλεγμονή ομοιάζουσα με ΙΦΝΕ (237).

Επιπρόσθετα, επί εδάφους μόνο διαταραχής του φραγμού και χωρίς δυσλειτουργία της ανοσολογικής απάντησης, τα ποντίκια αυτά μπορεί να εκδηλώσουν κολίτιδα με φυσιολογική εντερική χλωρίδα (238).

Επιπλέον η έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης φαίνεται ότι είναι μειωμένη στην ΙΦΝΕ εξαιτίας κακής αναδίπλωσης και αποδόμησης (232).

Σε μια πρόσφατη μελέτη για την ανίχνευση των επιδράσεων των συνώνυμων πολυμορφισμών και των απλοτύπων του γονιδίου *ABCB1*, αναπτύχθηκαν 4 κυτταρικές σειρές που εξέφραζαν ανασυνδυασμένη *p*-γλυκοπρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν σημαντικό ρόλο των πολυμορφισμών στην αλλαγή της λειτουργικότητας της *p*-γλυκοπρωτεΐνης και κατά συνέπεια την ανταπόκριση στην νόσο και την θεραπεία (222).

Σε πολλές μελέτες έγινε προσπάθεια συσχέτισης της παρουσίας των πολυμορφισμών με αλλαγή της φαρμακοκινητικής διαφόρων φαρμάκων ιδιαίτερα στην αντικαρκινική θεραπεία ή με την προδιάθεση σε νόσους όπως η ΙΦΝΕ αλλά τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα.

Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στις πολλαπλές λειτουργίες του γονιδίου *ABCB1*. Για παράδειγμα, ρυθμίζει την απορρόφηση φαρμάκων μέσω της πεπτικής οδού (από του στόματος χορηγούμενα φάρμακα), περιορίζει την κατανομή του φαρμάκου σε πολλούς εξωηπατικούς ιστούς, μεταφέρει φάρμακα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, μειώνει την συγκέντρωση φαρμάκων μέσω της νεφρικής οδού και του συστήματος ήπατος-χοληφόρων και μεσολαβεί στην εντεροηπατική κυκλοφορία. Επιπλέον, ένα αλληλόμορφο του γονιδίου *ABCB1* μπορεί να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα στην έκφραση του μεταφορέα σε διάφορους ιστούς (218, 227) και υπάρχουν διάφορα συστήματα συν-μεταφοράς φαρμάκων (474).

Έτσι η συμβολή του γονιδίου *ABCB1* στην φαρμακογενετική είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και εξαρτώμενη από τις ιδιότητες κάθε φαρμάκου αλλά και από τον κάθε ασθενή ο οποίος πιθανότατα λαμβάνει και άλλες θεραπείες ταυτόχρονα.

Στην παρούσα διατριβή, οι συχνότητες των αλληλομόρφων του γονιδίου *ABCB1* ήταν ισότιμες σε ασθενείς με ΙΦΝΕ και σε υγιείς εθελοντές. Οι πολυμορφισμοί βρέθηκαν σε παρόμοιες συχνότητες με αυτές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία σε πληθυσμούς άλλων εθνοτήτων (198).

Η παρουσία των αλληλομόρφων που φέρουν τους πολυμορφισμούς δεν σχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την εκδήλωση νόσου Crohn ή ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου γενικά.

Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές όπου δεν υπάρχει συσχέτιση της παρουσίας των πολυμορφισμών με την εκδήλωση ΙΦΝΕ.

Ωστόσο, το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού G2677T του γονιδίου *ABCB1/MDR1* συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας στους ασθενείς της μελέτης μας. Η συσχέτιση ήταν οριακά σημαντική, γεγονός που πιθανά οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος.

Όπως φαίνεται από τους πίνακες 3 και 4, υπάρχει διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με την εθνικότητα αλλά όχι με την γεωγραφική κατανομή. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από μελέτες στην Ιταλία και Ισπανία, αλλά αρνητική συσχέτιση έχει βρεθεί και από μελέτες σε πληθυσμούς της κεντρικής και της βόρειας Ευρώπης.

Σε 2 πρόσφατες σχετικά μελέτες σε Σέρβους ασθενείς με ΙΦΝΕ και σε Μαροκινούς, οι πολυμορφισμοί του *ABCB1* σχετίστηκαν με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας (266, 475).

Οι λόγοι για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τον ρόλο των πολυμορφισμών στην παθογένεια της ΙΦΝΕ στους διάφορους πληθυσμούς θα μπορούσαν να είναι το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος στις περισσότερες από

αυτές, αλλά και οι διαφορές στον σχεδιασμό των μελετών και στην επιλογή της ομάδας ελέγχου. Η σημασία επίσης της διαφορετικής εθνικότητας των ασθενών δεν πρέπει να παραγνωριστεί. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων διαφέρει στους διάφορους πληθυσμούς (268, 476). Έτσι, εφόσον οι παρατηρούμενες διαφορές στις συχνότητες μεταξύ ασθενών και μαρτύρων είναι μικρές, είναι πιθανό το ότι οι συχνότητες των μεταλλαγμένων αλληλίων στις ομάδες ελέγχου να καθορίζουν τα διαφορετικά αποτελέσματα των μελετών (265).

Στην παρούσα μελέτη οι συχνότητες των αλληλομόρφων στην ομάδα ελέγχου ήταν παρόμοιες με αυτές άλλων Ευρωπαϊκών μελετών (253, 265, 476).

Στην παρούσα μελέτη το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο 2677T σχετίστηκε με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας. Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο γιατί δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με την νόσο Crohn. Πιθανά, συνεργικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν την έκβαση. Ο πολυμορφισμός G2677T έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της αλανίνης από σερίνη και το αλληλόμορφο 2677T έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την λειτουργικότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης (213), αν και από άλλες μελέτες δεν φαίνεται καμιά επίδραση (228, 230, 477).

Παρά τα περιορισμένα και αντικρουόμενα δεδομένα, είναι επίσης πιθανό οι πολυμορφισμοί του γονιδίου ABCB1 να δρουν συνεργικά στην έκφραση του γονιδίου και την λειτουργικότητα της p-γλυκοπρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνεται από διάφορες μελέτες συσχέτισης των απλοτύπων TGT και TTT των πολυμορφισμών C3435T, G2677T και C1235T με την λειτουργία της P-gp (213, 478). Όσον αφορά την αντοχή στην χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή, έχουν αναφερθεί επίσης αντικρουόμενα αποτελέσματα από τις έως τώρα μελέτες, οι οποίες ελέγχουν είτε απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς είτε απλοτύπους του γονιδίου

ABCB1 για ανεπιθύμητες ενέργειες με ποικίλα υποστρώματα της p-γλυκοπρωτεΐνης σε πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων.

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της παρουσίας των αλληλομόρφων με την αποτυχία της φαρμακευτικής αγωγής και την ανάγκη χειρουργικής επέμβασης.

Ωστόσο, το 59% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση λόγω αποτυχίας της φαρμακευτικής αγωγής ήταν φορείς 2 μεταλλαγμένων αλληλομόρφων ,των 3435T και 2677T (είτε σε ομοζυγωτία είτε σε ετεροζυγωτία). Το εύρημα αυτό δεν ήταν στατιστικώς σημαντικό πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, η τάση αυτή υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο ενός απλότυπου και όχι ενός μεμονωμένου απλού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στην ανθεκτική στη θεραπεία ΙΦΝΕ.

Συμπερασματικά, η κατανόηση του γονιδίου ABCB1 είναι ελλιπής λόγω της μεγάλης γενετικής ποικιλότητας στους διάφορους πληθυσμούς, λόγω των διαφορετικών επιδράσεων ενός πολυμορφισμού στην έκφραση του γονιδίου στους διάφορους ιστούς, της παρουσίας μεταφορέων που δρουν συνεργικά, των πολλαπλών υποστρωμάτων της p-γλυκοπρωτεΐνης αλλά και την επίδραση της ίδιας της νόσου στην λειτουργία του μεταφορέα.

Η παρούσα γενετική ανάλυση έχει κάποιους περιορισμούς. Ο κυριότερος είναι το μικρό μέγεθος δείγματος. Ωστόσο η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα προσεκτικά επιλεγμένο δείγμα ασθενών και υγιών εθελοντών, με γενετική και εθνική ομοιογένεια, από το γεωγραφικά περιορισμένο νησί της Κρήτης και πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ενήλικες ασθενείς με ΙΦΝΕ (479-485).

Συνεπώς τα αποτελέσματα είναι απίθανο να επηρεάστηκαν από την επιλογή του δείγματος. Η Κρήτη αποτελεί μια «γεωγραφικά απομονωμένη» δεξαμενή γονιδίων, με 650,000 κατοίκους γενετικά, εθνικά, κοινωνικά και πολιτισμικά ομοιογενείς. Τέτοιες δεξαμενές γονιδίων μπορεί να δώσουν στοιχεία πιο αξιόπιστα από τους μεγάλους ηπειρωτικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, ελαχιστοποιείται ο «θόρυβος του παρασκηνίου» που συνίσταται σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων.

VIII ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε στους Κρήτες ασθενείς με ΙΦΝΕ γενετική ανάλυση απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών για τον καθορισμό της συμβολής τους στην παθογένεια της νόσου αλλά και στην ανταπόκριση στην θεραπεία και την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών. Η γενετική ανάλυση των πολυμορφισμών των γονιδίων TPMT και ABCB1, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ενήλικες ασθενείς με ΙΦΝΕ στον ελληνικό πληθυσμό.

- Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου TPMT (θειοπουρινική μεθυλ-τρανσφεράση) G460A, A719G και G238C ανιχνεύονται σε ενδιάμεση συχνότητα σε σχέση με πληθυσμούς διαφόρων εθνοτήτων, χαμηλότερη από αυτή σε άλλους καυκάσιους πληθυσμούς και υψηλότερη σε σχέση με πληθυσμούς γύρω από την μεσόγειο και την Ασία.
- Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού G460A και της εκδήλωσης ουδετεροπενίας στους ασθενείς με ΙΦΝΕ που λάμβαναν θειοπουρίνες, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Ωστόσο, η συσχέτιση δεν φαίνεται αρκετά ισχυρή ώστε να δικαιολογήσει την αναγκαιότητα προσδιορισμού του γονότυπου πριν την έναρξη της θεραπείας στην καθημερινή πρακτική.
- Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών C3435T και G2677A με την εκδήλωση της νόσου (ελκώδους κολίτιδας ή νόσου

Crohn) ή την ανθεκτική στην θεραπεία νόσο. Διαπιστώθηκε οριακή στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου που φέρει την μεταλλαγή 2677T του πολυμορφισμού G2677T με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας. Πιθανά, ανάλυση απλοτύπων σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών να οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα. Επιπρόσθετα θα πρέπει να διερευνηθεί ο ρόλος των μεταφραστικών ρυθμίσεων και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και συνεπώς η γενετική ανάλυση θα πρέπει να συνδυαστεί με ανάλυση έκφρασης της p-γλυκοπρωτεΐνης.

IX ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο γενετική ανάλυση του γονιδίου θειοπουρινική μεθυλ-τρανσφεράση (TPMT) είναι πολύ χρήσιμη για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών μετά την χορήγηση θειοπουρινικών φαρμάκων (αζαθειοπρίνη και 6-μερκαπτοπουρίνη) σε ασθενείς με Ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ). Επιπλέον, οι απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABCB1*, το οποίο κωδικοποιεί την ρ-γλυκοπρωτεΐνη, έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση ΙΦΝΕ (ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn) καθώς και με νόσο ανθεκτική στην θεραπεία, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο καθορισμός της επίπτωσης των απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του γονιδίου TPMT στον γενετικά ομοιογενή πληθυσμό των ασθενών με ΙΦΝΕ στην Κρήτη και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών μετά την λήψη θειοπουρινικών φαρμάκων. Επιπρόσθετα στην παρούσα μελέτη καθορίστηκε η συχνότητα των πολυμορφισμών του γονιδίου *ABCB1/MDR1* στους ίδιους ασθενείς και μελετήθηκε πιθανή συσχέτισή τους με την εκδήλωση ΙΦΝΕ (ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn) αλλά και με την ανθεκτική στην θεραπεία νόσο (ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης).

Μέθοδος: Συνολικά 223 ασθενείς με ΙΦΝΕ [111 ασθενείς με νόσο Crohn (NC) και 112 ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (EK)] ανασκοπήθηκαν όσον αφορά στον φαινότυπο της νόσου, την ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή και στην ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης. Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση για τους

συχνότερους απλούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου *TPMT*, *G460A*, *A719G* με εφαρμογή PCR και ανάλυση μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) καθώς και PCR ειδική για το αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό *G238C* στους 223 ασθενείς με ΙΦΝΕ και σε 119 υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Τα νοσοκομειακά αρχεία ανασκοπήθηκαν για την χρήση θειοπουρινικών φαρμάκων από τους ασθενείς αυτούς καθώς και για την εκδήλωση παρενεργειών αλλά και την ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης. Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση τόσο των ασθενών όσο και της ομάδας ελέγχου για την ανίχνευση των πολυμορφισμών *G2677T/A* και *C3435T* του γονιδίου *ABCB1/MDR1* με PCR και ανάλυση μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism).

Αποτελέσματα: η επίπτωση των γονοτύπων του γονιδίου *TPMT*, *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* και *TPMT*3C* ήταν 1.8%, 2.7%, 1.3% και 1.8% αντίστοιχα. Η μεταλλαγή *G238C* mutation ανιχνεύτηκε σε 4 από τους 223 (1.8%) ασθενείς, 3 (1.3%) ασθενείς έφεραν την μεταλλαγή *G460A*, 4 (1.8%) την μεταλλαγή *A719G* και 6 (2.7%) και την *G460A* και την *A719G* μεταλλαγή. Στην ομάδα ελέγχου, μόνον 1 ασθενής (0.8%) ήταν φορέας και των δύο μεταλλαγών, *G460A* και *A719G* mutation ενώ οι γονότυποι *TPMT*2*, *TPMT*3C* και *TPMT*3B* δεν ανιχνεύτηκαν. Δεν βρέθηκαν άτομα ομόζυγα για τις μεταλλαγές. Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του πολυμορφισμού *G460A* και της εκδήλωσης ουδετεροπενίας μετά την χορήγηση θειοπουρινικών φαρμάκων ($p=0.048$).

Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών *C3435T* και *G2677A* σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες ήταν παρόμοιες. Δεν υπήρξε

στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ανωτέρων πολυμορφισμών και της εκδήλωσης ΙΦΝΕ ή νόσου Crohn. Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αλληλομόρφου 2677T και της εκδήλωσης ελκώδους κολίτιδας.

($p=0.049$). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των πολυμορφισμών και του φαινότυπου της νόσου ή της ανθεκτικής στην θεραπεία νόσου. Ωστόσο, το 59% των 34 που δεν ανταποκρίθηκαν στην φαρμακευτική αγωγή και υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση ήταν φορείς των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων 3435T και 2677T.

Συμπέρασμα: Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε μικρότερη επίπτωση των αλληλομόρφων του γονιδίου TPMT και υψηλότερη συχνότητα του γονοτύπου TPMT3B στους Κρήτες ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σχέση με άλλους Καυκάσιους πληθυσμούς. Η παρουσία της μεταλλαγής G460A συσχετίστηκε με την εκδήλωση ουδετεροπενίας. Επιπλέον, διαπιστώθηκε συσχέτιση του αλληλομόρφου 2677T με την εκδήλωση ελκώδους κολίτιδας, ενώ δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των πολυμορφισμών C3435T και G2677T/A με την εκδήλωση ΙΦΝΕ, νόσου Crohn, με τον φαινότυπο της νόσου ή την ανθεκτική στην θεραπεία νόσο.

X ABSTRACT

Introduction: There is evidence that genotyping for Thiopurine methyl-transferase (TPMT) gene variants is useful for the prediction of response to thiopurine analogues (azathioprine and 6-mercaptopurine) in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Polymorphisms of the *ABCB1* gene (coding for p-glycoprotein 170) have been associated with inflammatory bowel disease (IBD) and resistance to treatment but the reported results are conflicting. The aim of the present study was to determine the prevalence of TPMT gene polymorphisms in a genetic homogenous population of IBD patients in Crete and to correlate results with adverse reactions to thiopurine drugs and to determine the frequency and role of ABCB1 gene polymorphisms in Cretan IBD patients and study any possible association with susceptibility to Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease), as well as resistance to medical treatment (need for surgical intervention).

Methods: A total of 223 consecutive IBD patients [111 Crohn's disease (CD) and 112 ulcerative colitis (UC)] were reviewed for disease phenotype, response to treatment and need for colectomy. Genotyping for the commonest TPMT variants, *TPMT*3A*, *TPMT*3C*, *TPMT*3B* using PCR-RFLP method as well as allele-specific PCR for *TPMT*2* was performed in 223 consecutive IBD patients and 119 age and sex matched healthy controls. The hospital medical records were reviewed for thiopurine use in these patients and related adverse events. All patients and the

control group were genotyped for *ABCB1* gene polymorphisms (G2677T/A and C3435T) by using the PCR-RFLPs method.

Results: The prevalence of TPMT variants *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B* and *TPMT*3C* was 1.8%, 2.7%, 1.3% and 1.8% respectively. G238C mutation was detected in 4 out of 223 (1.8%) patients, 3 (1.3%) patients were carriers of G460A mutation, 4 (1.8%) of A719G mutation and 6 (2.7%) of both G460A and A719G mutation. In healthy controls only one (0.8%) carried both the G460A and A719G mutation whereas *TPMT*2*, *TPMT*3C* and *TPMT*3B* were not detected. None of the genotypes was homozygous. A statistically significant correlation between the presence of G460A mutation and the development of leucopenia after thiopurines administration was observed ($p=0.048$).

Allele and genotype frequencies of G2677T/A and C3435T polymorphisms were found to be similar in IBD patients and healthy controls. There was no statistically significant correlation between any of the mutant variants studied and IBD or CD. A statistically significant correlation between the presence of 2677T mutation and UC was observed ($p=0.049$). No association of G2677T/A or C3435T with clinical phenotype, or resistance to treatment was also found. However, 59% of 34/223 patients who did not respond to therapy and required surgery, were found to carry both the C3434T and the G2677T alleles.

Conclusion: This study showed lower frequency of total TPMT variants and higher frequency of *TPMT*3B* in Cretan IBD patients compared to other Caucasian populations. The presence of G460A mutation is associated with the development of leucopenia. Furthermore, our study showed correlation of the G2677T

polymorphism and UC, while failed to demonstrate any correlation between the C3435T and G2677A polymorphisms of ABCB1/MDR1 and the development of IBD, CD, disease phenotype or response to treatment. There was a trend towards association of the combined carriage of G2677T and C3435T mutations with disease refractory to treatment.

XI ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease pathophysiology/diagnosis/management, Vol 2 9th edition Saunders 2010, p. 1982-1983
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009 Nov 19;361(21):2066-78.
3. Martland GT, Shepherd NA Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity. *Histopathology* 2007 Jan;50(1):83-96}
4. Burrill B Crohn M.D.; Gordon D. Oppenheimer M.D., regional Ileitis, a pathologic and clinical entity. *jama* 1932;99(16):1323-1329.
5. DeDombal F.T., Ulcerative colitis: definition, diagnosis, natural history and local complication, *Postgrad. med. J* (September 1968) 44, 684-692
6. Marvin J. Stone. Samuel Wilks: the "grand old man" of British medicine. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2010 Jul; 23(3): 263–265.
7. Jacques Cosnes, Corinne Gower–Rousseau, Philippe Seksik, Antoine Cortot. Epidemiology and Natural History of Inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785–1794
8. Natalie A. Molodecky, Gilaad G. Kaplan. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology* Volume 6, Issue 5 May 2010.
9. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012 Jan;142(1):46-54
10. Burisch J, Pedersen N et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-Epicom inception cohort *Gut* 2014 Apr;63(4):588-97.
11. Tsianos EV, Masalas CN, Merkouropoulos M, Dalekos GN, Logan RF. Incidence of inflammatory bowel disease in north west Greece: rarity of Crohn's disease in an area where ulcerative colitis is common. *Gut.* 1994 Mar;35(3):369-72.
12. Manousos ON, Giannadaki E, Mouzas IA, Tzardi M, Koutroubakis I, Skordilis P, Vassilakis S, Kouroumalis E, Vlachonikolis IG. Ulcerative colitis is as common in Crete as in northern Europe: a 5-year prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996 Sep;8(9):893-8.

13. Ladas SD, Mallas E, Giorgiotis K, Karamanolis G, Trigonis D, Markadas A, Sipsa V, Raptis SA. Incidence of ulcerative colitis in Central Greece: a prospective study. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 28;11(12):1785-7
14. Tsianos EV, Katsanos KH, Christodoulou D, Dimoliatis I, Kogevinas A, Logan RF; Northwest Greece Inflammatory Bowel Disease Study Group. Continuing low incidence of Crohn's disease in Northwest Greece. *Dig Liver Dis*. 2003 Feb;35(2):99-103.
15. Manousos ON, Koutroubakis I, Potamianos S, Roussomoustakaki M, Gourtsoyiannis N, Vlachonikolis IG. A prospective epidemiologic study of Crohn's disease in Heraklion, Crete. Incidence over a 5-year period. *Scand J Gastroenterol*. 1996 Jun;31(6):599-603.
16. Ponder A., Long M.D., A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease, *Clinical epidemiology* 2013;5 237-247.
17. Malmborg P, Grahnquist L, Lindholm J, Montgomery S, Hildebrand H. Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Northern Stockholm County 2002-2007. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Jul;57(1):29-34.
18. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:993-1002.
19. Perminow G, Brackmann S, Lyckander LG, et al. A characterization in childhood inflammatory bowel disease, a new population-based inception cohort from South-Eastern Norway, 2005-2007, showing increased incidence in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44:446-456.
20. Lehtinen P, Ashorn M, Iltanen S, et al. Incidence trends of pediatric inflammatory bowel disease in Finland, 1987-2003, a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1778-1783.
21. Barreiro-de Acosta M, Alvarez Castro A, Souto R, Inglesias M, Lorenzo A, Dominguez-Munoz JE. Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2011;5:566-569.
22. Stepaniuk P, Bernstein CN, Targownik LE, Singh H. Characterization of inflammatory bowel disease in elderly patients: A review of epidemiology, current practices and outcomes of current management strategies. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Aug-Sep;29(6):327-33.
23. Feuerstein JD, Cheifetz AS, Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management *Mayo Clin Proc*. 2014 Nov;89(11):1553-63
24. Stuart Bloom, George Webster Oxford Handbook of Gastroenterology and Hepatology, Oxford University press 2006.
25. Tadataka Yamada, David H. Alpers, Neil Kaplowitz, Loren Laine, Chung Owyang, Don W. Powell Textbook of Gastroenterology, Volume two, Fourth edition, Lippincott Williams and Wilkins 2003.
26. Marchioni Beery R, Kane S. Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2014;7:111-132.

27. Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, Chan FK, Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Aug;27(8):1266-80.
28. Da Silva BC, Lyra AC, Rocha R, Santana GO. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(28):9458-9467.
29. Selby W. The natural history of ulcerative colitis. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1997 Mar;11(1):53-64.
30. Waterman M, Knight J, Dinani A, Xu W, Stempak JM, Croitoru K, Nguyen GC, Cohen Z, McLeod RS, Greenberg GR, Steinhart AH, Silverberg MS. Predictors of Outcome in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Sep;21(9):2097-105.
31. Höie O, Wolters F, Riis L, Aamodt G, Solberg C, Bernklev T, Odes S, Mouzas IA, Beltrami M, Langholz E, Stockbrügger R, Vatn M, Moum B; European Collaborative Study Group of Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am J Gastroenterol*. 2007 Aug;102(8):1692-701. Epub 2007 Jun 6.
32. Etchevers MJ, Aceituno M, García-Bosch O, Ordás I, Sans M, Ricart E, Panés J. Risk factors and characteristics of extent progression in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Sep;15(9):1320-5.
33. Jess T, Gamborg M, Munkholm P, Sørensen TI. Overall and cause-specific mortality in ulcerative colitis: meta-analysis of population-based inception cohort studies. *Am J Gastroenterol*. 2007 Mar;102(3):609-17.
34. Cottone M, Scimeca D, Mocciaro F, Civitavecchia G, Perricone G, Orlando A. Clinical course of ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*. 2008 Jul;40 Suppl 2:S247-52.
35. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(44):16389-16397.
36. MS Silverberg, J Satsangi, T Ahmad, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19(Suppl A):5A-36A.
37. Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history, and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci* 1993;38:1137-46.
38. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Elgjo K. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1564-9.
39. J Satsangi, M S Silverberg, S Vermeire, J-F Colombel. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-753.
40. Mark A. Samaan, MBBS, Mahmoud H. Mosli, MD, William J. Sandborn, MD, Brian G. Feagan, MD, Geert R. D'Haens, MD, PhD, Elena Dubcenco, MD, Kenneth A. Baker, PhD and Barrett G. Levesque, MD, A Systematic Review of the Measurement of Endoscopic Healing in Ulcerative Colitis Clinical Trials: Recommendations and Implications for Future Research *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1465-1471.

41. Simon P L Travis, Dan Schnell, Piotr Krzeski, Maria T Abreu, Douglas G Altman, Jean-Fre' de' ric Colombel, Brian G Feagan, Stephen B Hanauer, Marc Le' mann, Gary R Lichtenstein, Phillippe R Marteau, Walter Reinisch, Bruce E Sands, Bruce R Yacyshyn, Christian A Bernhardt, Jean-Yves Mary, William J Sandborn Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) *Gut* 2012;61:535-542.
42. Hugh James Freeman Long-term natural history of Crohn's disease *World J Gastroenterol.* 2009 Mar 21; 15(11): 1315–1318.
43. Shervin Rabizadeh, MD, MBA and Marla Dubinsky, MD. Update in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013 Nov; 39(4): 10.1016/j.rdc.2013.03.010.
44. S. Vermeire, G. Van Assche and P. Rutgeerts Review article: altering the natural history of Crohn's disease – evidence for and against current therapies *Aliment Pharmacol Ther* 25, 3–12
45. Hugh James Freeman Natural history and long-term clinical course of Crohn's Disease *World J Gastroenterol* 2014 January 7; 20(1): 31-36.
46. Daniel C Baumgart, William J Sandborn Crohn's disease *Lancet* 2012; 380: 1590–1605
47. Best WR, Bectel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976 Mar; 70(3):439-44
48. Thia K, Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Persson T, Persson A, Sandborn WJ. Short CDAI: development and validation of a shortened and simplified Crohn's disease activity index. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jan;17(1):105-11.
49. Maria Paula Henao, MD, Meenakshi Bewtra, MD, MPH, PhD, Mark T Osterman, MD, MSCE, Faten N Abera, MD, MSCE, Frank I Scott, MD, MSCE, Gary R Lichtenstein, MD, Jennifer Kraschnewski, MD, MPH, and James D Lewis, MD, MSCE. Measurement of Inflammatory Bowel Disease Symptoms: Reliability of an Abbreviated Approach to Data Collection. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Oct; 21(10): 2262–2271.
50. R. SOSTEGNI, M. DAPERNO, N. SCAGLIONE, A. LAVAGNA, R. ROCCA & A. PERA Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 (Suppl. 2): 11–17.
51. Beaugerie L, Sokol H. Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course. *World J Gastroenterol* 2012; 18(29): 3806-3813.
52. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinkas L, Mantzaris G, Travis S, Stange E. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) J Crohns Colitis.* 2010 Feb; 4(1):7-27.
53. Axel Dignass, Rami Eliakim, Fernando Magro, Christian Maaser, Yehuda Chowers, Karel Geboes, Gerassimos Mantzaris, Walter Reinisch, Jean-Frederic Colombel, Severine Vermeire, Simon Travis, James O. Lindsay, Gert Van Assche. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of

- ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* (2012) 6, 965–990.
54. Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2016;113(5):72-82.
 55. Corica D, Romano C Renal Involvement in Inflammatory Bowel Diseases *J Crohns Colitis*. 2016 Feb;10(2):226-35.
 56. Stephan R, Vavricka, Michael Scharl, Martin Gubler and Gerhard Rogler *Biologics for Extraintestinal Manifestations of IBD Current Drug Targets*, 2014, 15, 1064-1073).
 57. Stephan R, Vavricka, MD, Alain Schoepfer, MD, Michael Scharl, MD, Peter L. Lakatos, MD, Alexander Navarini, MD and Gerhard Rogler, MD *Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease *Inflamm Bowel Dis** 2015;21:1982–1992).
 58. Silvio Danese, Stefano Semeraro, Alfredo Papa et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 14; 11(46): 7227–7236.
 59. Veloso FT, Carvalho J, Magro F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol*. 1996;23:29–34.
 60. Das KM. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease: new insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1–13.)
 61. Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2006;12(30):4819-4831.
 62. Chapman RW, Varghese Z, Gaul R, Patel G, Kokion N, Sherlock S. Association of primary sclerosing cholangitis with HLA-B8. *Gut*. 1983;24:38–41.
 63. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996 May;38(5):738-41.
 64. Derijks, L.J.J., Wong, D.R., Hommes, D.W. van Bodegraven A.A *Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease *Clin Pharmacokinet** (2018) Sep;57(9):1075-1106
 65. Sprakes MB, Ford AC, Warren L, et al. Efficacy, tolerability, and predictors of response to infliximab therapy for Crohn's disease: a large single centre experience. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 143–153. [PubMed]
 66. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1541–1549. [PubMed]
 67. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, et al. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 644–659; quiz 660.
 68. Gisbert JP, Panes J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 760–767.

69. Billioud V, Sandborn WJ, Peyrin-Biroulet L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 674–684.
70. Flamant M, Roblin X. Inflammatory bowel disease: towards a personalized medicine. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2018;11:1756283X17745029.
71. Greenberger NJ, Blumberg RS, Burakoff R. *Current Diagnosis and treatment, gastroenterology, hepatology and endoscopy*. McGraw-Hill. 2009.
72. Rogler, Gerhard (2013). The history and philosophy of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases*, 31(3-4):270-277.
73. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):307-17.
74. D.A. Watts, J. Satsangi, The genetic jigsaw of Inflammatory Bowel Disease, *Gut* 2002, 50(suppl III:iii31-iii36).
75. Denise K. Bonen, Judy H. Cho, The genetics of Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterology* 2003;124:521-536).
76. Hugot JP .Genetic origin of IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Feb;10 Suppl 1:S11-5
77. Parkes M, Jewell D. Ulcerative colitis and Crohns disease: molecular genetics and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2001 Nov 19;2001:1-18.)
78. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:89-116.)
79. Jimmy Z. Liu, BSc, PhD Student, Carl A. Anderson. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 28 (2014) 373–386.
80. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 13 Spec No 2004;1: R161–8
81. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004;13:763–70.
82. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
83. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
84. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:845–57
85. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R161-8. Epub 2004 Feb 5).
86. N. Risch, K. Merikangas. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273 (1996), pp. 1516-1517).
87. J.P.A. Ioannidis. Genetic associations: false or true? *Trends Mol. Med.*, 9 (4) (2003), pp. 135-138.)

88. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-894.
89. R.H. Duerr, K.D. Taylor, S.R. Brant, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314 (5804) (2006), pp. 1461-1463.
90. J. Hampe, A. Franke, P. Rosenstiel, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.*, 39 (2) (2007), pp. 207-211.
91. J. Van Limbergen, D.C. Wilson, J. Satsangi. The genetics of Crohn's disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 10 (2009), pp. 89-116
92. J.Z. Liu, C.A. Anderson. Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 28 (3) (2014), pp. 373-386
93. J.C. Barrett, J.C. Lee, C.W. Lees, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat. Genet.*, 41 (12) (2009), pp. 1330-1334.
94. Franke, T. Balschun, T.H. Karlsen, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility *Nat. Genet.*, 40 (11) (2008), pp. 1319-1323.
95. M.S. Silverberg, J.H. Cho, J.D. Rioux, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat. Genet.*, 41 (2) (2009), pp. 216-220.
96. J. Satsangi, K.I. Welsh, M. Bunce, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 347 (1996), pp. 1212-1217.
97. Zhernakova, C.C. van Diemen, C. Wijmenga. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat. Rev. Genet.*, 10 (1) (2009), pp. 43-55.
98. P. Goyette, G. Boucher, D. Mallon, et al. High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nat. Genet.*, 47 (2) (2015), pp. 172-179.
99. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009 Oct 8; 461(7265):747-53.
100. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-124
101. Dernot McGovern M.D., PhD, Subra Kugathasan M.D. and Judy Cho M.D. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2015 October; 149(5): 1163-1176.

102. Weronica E. Ek, Mauro D'Amato, Jonas Halfvarson. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology* (2014) 27, 294-303.
103. Jimmy Z Liu, Suzanne van Sommeren, Hailiang Huang, Siew C Ng, Rudi Alberts, Atsushi Takahashi, Stephan Ripke, James C Lee et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015 September ; 47(9): 979–986.
104. Katrina M.de Lange, Jeffrey C.Barrett. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *Journal of Autoimmunity* Volume 64, November 2015, Pages 91-100.
105. D.Q. Shih, L.Y. Kwan, V. Chavez, et al. Microbial induction of inflammatory bowel disease associated gene TL1A (TNFSF15) in antigen presenting cells. *Eur. J. Immunol.*, 39 (11) (2009), pp. 3239-3250,
106. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 1193-1198.
107. Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, Boucher G, Ripke S, Ellinghaus D, Burt N, Fennell T, Kirby A, Latiano A, Goyette P, Green T, Halfvarson J, Haritunians T, Korn JM, Kuruvilla F, Lagacé C, Neale B, Lo KS, Schumm P, Törkvist L, Dubinsky MC, Brant SR, Silverberg MS, Duerr RH, Altshuler D, Gabriel S, Lettre G, Franke A, D'Amato M, McGovern DP, Cho JH, Rioux JD, Xavier RJ, Daly MJ. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2011; 43: 1066-1073
108. Krasimira Aleksandrova, Beatriz Romero-Mosquera and Vicent Hernandez. Diet, Gut Microbiome and Epigenetics: Emerging Links with Inflammatory Bowel Diseases and Prospects for Management and Prevention. *Nutrients.* 2017 Sep; 9(9): 962.
109. Scarpa M, Stylianou E. Epigenetics: Concepts and relevance to IBD pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Oct; 18(10):1982-96.
110. Beaudet A.L. Epigenetics and complex human disease: Is there a role in IBD? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008;46:E2.
111. Dabritz J., Menheniott T.R. Linking immunity, epigenetics, and cancer in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2014;20:1638–1654.
112. Murphy TM, Mullins N, Ryan M, et al. Genetic variation in DNMT3B and increased global DNA methylation is associated with suicide attempts in psychiatric patients. *Genes Brain Behav* 2013;12:125–32
113. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:551. doi:10.3389/fimmu.2015.00551.
114. Nimmo E. R., Prendergast J. G., Aldhous M. C., et al. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2012;18(5):889–899. doi: 10.1002/ibd.21912

115. Leung C.-H., Lam W., Ma D.-L. Butyrate mediates nucleotide-binding and oligomerisation domain (NOD) 2-dependent mucosal immune responses against peptidoglycan. *Eur J Immunol.* 2009;39:3529–3537
116. Takahashi K., Sugi Y., Hosono A. Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *J Immunol.* 2009;183:6522–6529.
117. (1)Wu F, et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(10):1729–1738.
118. Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(1):187–193.
119. Faulk C., Dolinoy D.C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics.* 2011;6:791–797),
120. De Santis M., Selmi C. The therapeutic potential of epigenetics in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:92–101
121. Stylianou E. EPIGENETICS: THE FINE TUNER IN IBD? Current opinion in gastroenterology. 2013;29(4):370-377.
122. Tsaprouni LG, Yang T-P, Bell J, et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics.* 2014;9(10):1382-1396. doi:10.4161/15592294.2014.969637.
123. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol.* 2012;863:359-76. doi: 10.1007/978-1-61779-612-8_23.
124. Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Human Molecular Genetics.* 2011;20(9):1687-1696.
125. Elovsá Salvo-Romero, Carmen Alonso-Cotoner, Cristina Pardo-Camacho, Maite Casado-Bedmar and Marva Vicario. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)* Vol. 107, N.º 11, pp. 686-696, 2015.
126. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011;32:256-64. DOI: 10.1016/j. it.2011.04.003
127. Shorter RG, Huizenga KA, Spencer RJ. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis.* 1972 Nov; 17(11):1024-32
128. Capaldo CT, Powell DN, Kalman D. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany).* 2017;95(9):927-934.
129. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:100-113.
130. Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 11–24.

131. Roda G, Sartini A, Zambon E et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4264–71.
132. Papo N, Shai Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* 2003; 24: 1693–703
133. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000; 76: 473–8.
134. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* (2000) 343:338–44.
135. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* (2004) 4:499–511.
136. Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, et al. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* (2007) 117:3909–21.
137. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, vanLoo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* (2007) 446:557–61.
138. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* (2001) 276:4812–8.
139. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* (2003) 52:1591–7.
140. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* (2003) 278:5509–12.
141. Schreiber S, Rosenstiel IP, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* (2005) 6:376–88.
142. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* (2004) 14:2217–27.
143. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* (2003) 125:47–57.
144. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* (2005) 77:460–5.
145. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* (2007) 13:338–55.
146. Koslowski MJ, Kubler I, Chamaillard M, Schaeffeler E, Reinisch W, Wang G, et al. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* (2009) 4:e4496.

147. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* (2004) 53:1658–64.
148. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* (2006) 281:2005–11.
149. Noda T, Yoshimori T. Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *Int Immunol* 2009; 21: 1199-1204
150. Benjamin JL, Sumpter R, Levine B, Hooper LV. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell host & microbe*. 2013;13(6):723-734.
151. Vaishnav S, Yamamoto M, Severson KM, et al. The antibacterial lectin RegIII α promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* (New York, NY). 2011;334(6053):255-258.
152. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125:47–57.
153. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol*. 2000;1:113–18.
154. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006;313:1126–30.
155. Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, et al. Degranulation of Paneth cells via Toll-like receptor 9. *Am. J. Pathol*. 2004;165:373–81.
156. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207-211
157. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008; 456: 259-263
158. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genet*. 2008;40:1107–12.
159. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN- γ -inducible LRG-47. *Science*. 2003;302:654–59.
160. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006;313:1438–41.
161. Henry SC, Daniell X, Indaram M, Whitesides JF, Sempowski GD, et al. Impaired macrophage function underscores susceptibility to Salmonella in mice lacking Irgm1 (LRG-47) *J. Immunol*. 2007;179:6963–72.

162. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhães JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nuñez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11: 55-62
163. Mankertz J., Schulzke J.-D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007;23(4):379–383.
164. Jäger S., Stange E. F., Wehkamp J. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2013;398(1):1–12.
165. Söderholm J. D., Peterson K. H., Olaison G., et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1999;117(1):65–72.
166. Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61–72.
167. Tanaka H., Takechi M., Kiyonari H., Shioi G., Tamura A., Tsukita S. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*. 2015;64(10):1529–1538.
168. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(5):1165-1179.
169. Pullan R.D., Thomas G.A., Rhodes M. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut*. 1994;35:353–359.
170. Courth L.F., Ostaff M.J., Mailänder-Sánchez D. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112:14000–14005.
171. Wehkamp J., Koslowski M., Wang G. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol*. 2008;1:S67–S74.
172. Fava F. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol*. 2011;17:557.
173. Vivinus-Nébot M., Frin-Mathy G., Bziouche H. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*. 2014;63:744–752.
174. Hollander D., Vadheim C.M., Brettholz E. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med*. 1986;105:883–885.
175. May G.R., Sutherland L.R., Meddings J.B. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1993;104:1627–1632.
176. Munkholm P., Langholz E., Hollander D. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut*. 1994;35:68–72.

177. Peeters M., Geypens B., Claus D. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1997;113:802–807.
178. Russell R., Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:525–539.
179. Fries W., Renda M.C., Lo Presti M.A. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:2730–2736.
180. Irvine E.J., Marshall J.K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 2000;119:1740–1744.
181. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res*. 2001;42:1007-17.
182. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:285-307.
183. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*. 1970 Apr;30(4):1174-84.
184. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994 May 20;77(4):491-502.
185. Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut*. 2003 May;52(5):759-66
186. Rosenberg, M.F.; Callaghan, R.; Ford, R.C. and Higgins, C.F. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**(16), 10685-10694.
187. Ingolf Cascorbi. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 112 (2006) 457–473.
188. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7735–8.
189. Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, et al. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 1997;3:1275–9.
190. Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein

- contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3900–5.
191. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:695–8.
 192. Zhao JY, Ikeguchi M, Eckersberg T, et al. Modulation of multidrug resistance gene expression by dexamethasone in cultured hepatoma cells. *Endocrinology* 1993;133:521–8.
 193. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;8:161-70
 194. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, et al. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 1994;83:2451–8.
 195. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jan;75(1):13-33.
 196. Miller DS, Bauer B, Hartz AM. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2008 Jun;60(2):196-209.
 197. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008 July 38(7-8): 802-32.
 198. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Mar;21(3):152-61.
 199. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Nov 18;54(10):1295-310.
 200. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and p-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.* 13(1995)129-134.
 201. Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and p-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv. Rev* 1997;27:161-70.
 202. Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur.J.Pharm.Sci.*2000;12:3-12.
 203. Benet LZ, Cummins CL. The drug efflux alliance: biochemical aspects *Adv.Drug.Deliv.Rev.*2001;50(suppl.1):S3-11.
 204. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001;31:469-97.

205. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4538-42.
206. Miklos Bodor, Edward J. Kelly, and Rodney J. Ho. Characterization of the Human MDR1 Gene. *The AAPS Journal* 2005; 7 (1) Article 1.
207. Wang B, Ngoi S, Wang J, Chong SS, Lee CG. The promoter region of the MDR1 gene is largely invariant, but different single nucleotide polymorphism haplotypes affect MDR1 promoter activity differently in different cell lines. *Mol Pharmacol*. 2006 Jul; 70(1):267-76.)
208. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J*. 2005 Feb 16; 7(1):E1-5.
209. GD Leschziner, T Andrew , M Pirmohamed and MR Johnson. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *The Pharmacogenomics Journal* (2007) 7, 154–179.
210. Wang Z, Wang J, Tantoso E, Wang B, Tai AY, Ooi LL *et al*. Signatures of recent positive selection at the ATP-binding cassette drug transporter superfamily gene loci. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 1367–1380.
211. Tang K, Wong LP, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 783–797,
212. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ *et al*. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 481–494,
213. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI *et al*. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 189–199.)
214. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS *et al*. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 437–450.
215. Wu H, Kang H, Liu Y, et al. Roles of ABCB1 gene polymorphisms and haplotype in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(9):1449–1462.
216. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315(5811):525-528, 2007.
217. Wang Z, Wang B, Tang K, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Hum Mol Genet* 14(14):2075-2087, 2005.

218. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28; 97(7):3473-8.
219. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schäffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*. 2001 Jun; 11(4):293-8.
220. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Apr; 71(4):297-303.
221. Taheri M, Mahjoubi F, Omranipour R. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet Mol Res*. 2010 Jan 12;9(1):34-40.
222. Fung KL, Pan J, Ohnuma S, Lund PE, Pixley JN, Kimchi-Sarfaty C et al. MDR1 synonymous polymorphisms alter transporter specificity and protein stability in a stable epithelial monolayer. *Cancer Res*. 2014 Jan 15;74(2):598-608.
223. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Oct;15(10):693-704.
224. Morita N, Yasumori T, Nakayama K. Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol*. 2003 Jun 1;65(11):1843-52.
225. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Mar; 59(3):365-70.
226. Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K *et al*. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 451–457.
227. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu SH, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S *et al*. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 381–385.
228. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B *et al*. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-

- glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002; **72**: 572–583.
229. Uwai Y, Masuda S, Goto M, Motohashi H, Saito H, Okuda M *et al*. Common single nucleotide polymorphisms of the MDR1 gene have no influence on its mRNA expression level of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized patients. *J Hum Genet* 2004; **49**: 40–45.
230. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y *et al*. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **297**: 1137–1143.
231. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1794**: 860–871.
232. Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet.* 2001 Mar 1;10(5):445-56.
233. MacLean C, Moenning U, Reichel A, Fricker G. Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats. *Drug Metab Dispos.* 2008 Jul; 36(7):1249-54.
234. Iizasa H, Genda N, Kitano T, Tomita M, Nishihara K, Hayashi M, Nakamura K, Kobayashi S, Nakashima E. Altered expression and function of P-glycoprotein in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharm Sci.* 2003 Mar; 92(3):569-76.
235. Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, Straumann A, Terracciano L, Hammann F, Lehmann F, Beglinger C, Drewe J. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein expression in patients with newly diagnosed and therapy-refractory ulcerative colitis compared with healthy controls. *Digestion.* 2008; 78(2-3):154-62.
- ²³⁶ Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.* 1996 Oct; 14(2):199-202.
237. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5733-44.
238. Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Jul;289(1):G153-62.

239. Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Apr; 14(5):273-87.
240. Neudeck BL, Loeb JM, Faith NG, Czuprynski CJ. Intestinal P glycoprotein acts as a natural defense mechanism against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 2004 Jul; 72(7):3849-54.
241. Siccardi D, Mumy KL, Wall DM, Bien JD, McCormick BA. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Jun; 294(6):G1392-400.
242. Lu K, Mahbub R, Fox JG. Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora. *ILAR J*. 2015; 56(2):218-27.
243. Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*. 2013 Jan 17; 152(1-2):39-50
244. Elke Cario. P-glycoprotein multidrug transporter in inflammatory bowel diseases: More questions than answers. *World J Gastroenterol*. 2017 Mar 7; 23(9): 1513–1520.
245. Yacyshyn B, Maksymowych W, Bowen-Yacyshyn MB. Differences in P-glycoprotein-170 expression and activity between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol*. 1999 Aug;60(8):677-87.
246. Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):26-40.
247. Buyse M, Radeva G, Bado A, Farinotti R. Intestinal inflammation induces adaptation of P-glycoprotein expression and activity. *Biochem Pharmacol*. 2005 Jun 15;69(12):1745-54.
248. Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, Dijkstra G, Roskams TA, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jun;13(6):710-20.
249. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):26-33.

250. Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T, Ravenhill G, Duerr RH, Achkar JP, Karban AS, Cho JH. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1282-92.
251. Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S. Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations. *Gastroenterology.* 2003 Dec;125(6):1919-20.
252. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID, Satsangi J. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2005 Feb;128(2):288-96.
253. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun.* 2004;5:530-539.
254. Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D'Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC et al. Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:1129-1138.
255. Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A et al. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 May;13(5):516-23.)
256. Urcelay E, Mendoza JL, Martín MC, Mas A, Martínez A, Taxonera C et al. MDR1 gene: susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:33-37
257. Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM et al. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Apr;12(4):263-71.
258. Fischer S, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I et al. ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol.* 2007 Jun;42(6):726-33.
259. Oostenbrug LE, Dijkstra G, Nolte IM, van Dullemen HM, Oosterom E, Faber KN et al. Absence of association between the multidrug resistance (MDR1) gene and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Oct;41(10):1174-82.
260. Huebner C, Browning BL, Petermann I, Han DY, Philpott M, Barclay M et al. Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Dec;15(12):1784-93.

261. Juyal G, Midha V, Amre D, Sood A, Seidman E, Thelma BK. Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Jan;19(1):77-85.
262. Farnood A, Naderi N, Moghaddam SJ, Noorinayer B, Firouzi F, Aghazadeh R, daryani NE, Zali MR. The frequency of C3435T MDR1 gene polymorphism in Iranian patients with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Sep;22(9):999-1003. Epub 2007 Jan 23.
263. Østergaard M, Ernst A, Labouriau R, Dagiliené E, Krarup HB, Christensen M et al. Cyclooxygenase-2, multidrug resistance 1, and breast cancer resistance protein gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(1):65-73.
264. Dudarewicz M, Barańska M, Rychlik-Sych M, Trzciński R, Dziki A, Skrętkowicz J. C3435T polymorphism of the ABCB1/MDR1 gene encoding P-glycoprotein in patients with inflammatory bowel disease in a Polish population. *Pharmacol Rep*. 2012;64(2):343-50.
265. Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, Cota M, Krznicaric Z, Vucelic B. MDR1 polymorphisms are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatian IBD patients. *BMC Gastroenterol*. 2013 Mar 27;13:57.
266. Mijac D, Vukovic-Petrovic I, Mijac V, Perovic V, Milic N, Djuranovic S, Bojic D, Popovic D, Culafic D, Krstic M, Jankovic G, Pravica V, Markovic M. MDR1 gene polymorphisms are associated with ulcerative colitis in a cohort of Serbian patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2018 Mar 15;13(3):e0194536.
267. Borecki K, Zawada I, Pawinska-Matecka A, Salkic NN, Karakiewicz B, Adler G. ABCB1 3435C>T and 2677G>T/A polymorphisms in Polish and Bosnian patients with Crohn's disease - A preliminary report. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017 Nov 20;17(4):323-327.
268. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2006 ;12(23):3636-44.
269. Zhao J-J, Wang D, Yao H, Sun D-W, Li H-Y. CTLA-4 and MDR1 polymorphisms increase the risk for ulcerative colitis: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2015;21(34):10025-10040.
270. Zintzaras E. Is there evidence to claim or deny association between variants of the multidrug resistance gene (MDR1 or ABCB1) and inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Mar;18(3):562-72.
271. Wang J, Guo X, Yu S, Zhang J, Song J, Ji M et al. MDR1 C3435T polymorphism and inflammatory bowel disease risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(4):2679-85
272. Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 137–140

273. Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, Kerb R, Brinkmann U, Jaillon P et al. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 58: 809–812.
274. Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001; 18: 1400–1404.
275. Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I et al. MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 610–616.
276. Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmüller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72(5):584–94.
277. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A, Swiss HIV Cohort Study. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet*. 2002 Jan 5; 359(9300):30-6.
278. Yi SY, Hong KS, Lim HS, Chung JY, Oh DS, Kim JR, Jung HR, Cho JY, Yu KS, Jang IJ, Shin SG. A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Nov;76(5):418-27.
279. Pauli-Magnus C, Feiner J, Brett C, Lin E, Kroetz DL. No effect of MDR1 C3435T variant on loperamide disposition and central nervous system effects. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 487–498.
280. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM, Pahkla R, Roots I. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fund Clin Pharmacol* 2003; 17: 463–469.
281. Plasschaert SL, Groninger E, Boezen M, Kema I, de Vries EG, Uges D et al. Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 220–229.
282. Dickens D, Owen A, Alfirevic A, Pirmohamed M. ABCB1 single nucleotide polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, and 3435C>T) do not affect transport activity of human P-glycoprotein. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Jun;23(6):314-23.
283. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K et al. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1730–1732.
284. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78: 1182–1187.
285. Mai I, Perloff ES, Bauer S, Goldammer M, Johne A, Filler G et al. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58: 548–553.

286. Min DI, Ellingrod VL. C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 400–404.
287. Anglicheau D, Le CD, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005; 5: 595–603.
288. Hesselink DA, van GT, van Schaik RH, Balk AH, van dH I, van DT et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 545–556.
289. Kuzuya T, Kobayashi T, Moriyama N, Nagasaka T, Yokoyama I, Uchida K et al. Amlodipine, but not MDR1 polymorphisms, alters the pharmacokinetics of cyclosporine A in Japanese recipients. *Transplantation* 2003; 76: 865–868.
290. Ieiri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012; 27(1):85–105.
291. Daphne Bertholee, Jan Gerard Maring, Andre' B. P. van Kuilenburg. Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Clin Pharmacokinet* (2017) 56:317–337.
292. Oshiro C, Marsh S, McLeod H. Taxane pathway. *Pharmacogenet Genom*. 2009;19(12):979–83.
293. Iuliiis F, Salerno G, Taglieri L, Scarpa S. Are pharmacogenomics biomarkers an effective tool to predict taxane toxicity and outcome in breast cancer patients? Literature review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76(4):679–90.
294. Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, et al. Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci*. 2008;99(4):816–23.
295. Jamieson D, Lee J, Cresti N, Jackson R. Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(4):667–74.
296. Thompson P, Wheeler HE, Delaney SM, Lorier R, Broeckel U, Devidas M, et al. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of daunorubicin in children: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;74(4):831–8.
297. Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K et al. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 741–757.

298. Polillo M, Galimberti S, Barate` C, et al. Pharmacogenetics of BCR/ABL inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):22811–29.
299. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008;112(5):2024–7.
300. Gurney H, Wong M, Balleine RL, et al. Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(1):33–40 (pii: 6100201).
301. Petain A, Kattygnarath D, Azard J, Innovative Therapies with Children with Cancer European Consortium, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of imatinib in children and adults. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):7102–9.
302. Takahashi N, Miura M, Scott SA, et al. Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Hum Genet.* 2010;55(11):731–7.
303. Tirona R. G., Kim R. B., “Pharmacogenomics. The Search for Individualized Therapies,” ed. by Licinio J., Wong M.-L., Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, 2002, pp. 179–213.
304. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull.* 2002 Nov;25(11):1391-400.
305. De Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2011;17(9):1095-1108.
306. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med.* 2001 May;7(5):584-90.
307. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res.* 1997 Dec;14(12):1655-8
308. Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Nov;263(2):840-5.
309. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem.* 1992 Dec 5;267(34):24248-52.

310. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, Patel K, Wolf DC, Safdi M, Colombel JF et al.: Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2006, **63**:433-442 (quiz 464).
311. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994; **35**: 360-2.
312. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med* 1995; **332**: 292-7.
313. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1841-5.
314. Pearson DC, May GR, Fick G, et al. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; **2**: CD000067.
315. Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, et al. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1627-32.
316. Hawthorne AB, Logan RF, Hawkey CJ, et al. Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *BMJ* 1992; **305**: 20-2.
317. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*. 2001;121:255-260.
318. Reinisch W, Gasché C, Wyatt J, Moser G, Lochs H, Vogelsang H, Gangl A. Steroid dependency in Crohn's disease. *Lancet*. 1995;345:859.
319. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol*. 2003;178:339-346.
320. Gómez-Gómez GJ, Masedo Á, Yela C, Martínez-Montiel M del P, Casís B. Current stage in inflammatory bowel disease: What is next? *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2015;21(40):11282-11303.
321. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993;268:6077-6080.
322. Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Cherikuri A, O'Toole D, Mahmud N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology*. 2000;118:279-288.
323. Farrell RJ, Menconi MJ, Keates AC, Kelly CP. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and cyclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:1021-1031.

324. Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem*. 2012;19:1946–2025.
325. Syed SB, Coumar MS. P-Glycoprotein Mediated Multidrug Resistance Reversal by Phytochemicals: A Review of SAR & Future Perspective for Drug Design. *Curr Top Med Chem*. 2016;16:2484–2508.
326. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Incà R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44:171–179.
327. Yang QF, Chen BL, Zhang QS, Zhu ZH, Hu B, He Y, Gao X, Wang YM, Hu PJ, Chen MH, Zeng ZR. Contribution of MDR1 gene polymorphisms on IBD predisposition and response to glucocorticoids in IBD in a Chinese population. *J Dig Dis*. 2015 Jan;16(1):22-30.
328. Carvalho AT, Fróes RS, Esberard BC, Santos JC, Rapozo DC, Grinman AB, Simão TA, Nicolau Neto P, Luiz RR, Carneiro AJ, Souza HS, Ribeiro-Pinto LF. Multidrug resistance 1 gene polymorphisms may determine Crohn's disease behavior in patients from Rio de Janeiro *Clinics (Sao Paulo)*. 2014; 69(5):327-34.
329. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Tiret E, Gendre J-P. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005; **54**: 237–41.
330. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 2009; 374: 1617–25.
331. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 940–87.
332. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55(Suppl. 1): i16–35.
333. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 132–42.

334. Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(6):CD000545.
335. Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1):CD000067.
336. Kader HA, Raynor SC, Young R, et al. Introduction of 6-mercaptopurine in Crohn's disease patients during the perioperative period: a preliminary evaluation of recurrence of disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25: 93–7.
337. D'Haens G. Prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1: 476–81.
338. Cuillerier E, Lémann M, Bouhnik Y, Allez M, Rambaud JC, Modigliani R. Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a retrospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1291–6.
339. Travis S. Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1277–9.
340. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, Ardizzone S, et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2089–96.
341. Timmer A, McDonald JWD, Macdonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD000478.
342. Schwab M, Schäffeler E, Marx C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 429–36.
343. Ansari A, Hassan C, Duley J, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1743–50.

344. Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, et al. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 2004; 14: 181–7.
345. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 904–15.
346. Chalmers AH, Knight PR, Atkinson MR. 6-Thiopurines as substrates and inhibitors of purine oxidases: a pathway for conversion of azathioprine into 6-thiouric acid without release of 6-mercaptopurine. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1969; 47: 263-73.
347. Tidd DM, Paterson AR. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* 1974; 34: 738-46.
348. Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* 1999; 16: 342-349.
349. Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, *et al.* Genetic-polymorphism of thiopurine S-methyltransferase. Clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 279-290.
350. Shufeng Zhou. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. *Current Clinical Pharmacology*, 2006, 1, 119-128
351. Zimm S, Collins JM, Riccardi R, et al. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med* 1983; 308: 1005–9.
352. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, et al. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55: 1423–31.
353. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Engels LGJB, et al. Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 311–8.
354. Pozler O, Chládek J, Malý J, et al. Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 623–8.
355. Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 358–63.

356. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; 34: 1081–5.
357. Bergan S, Bentdal O, Sjødal G, Brun A, Rugstad HE, Stokke O. Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 502–9.
358. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med* 1989; 111: 641–9.
359. Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 813–21.
360. Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1783–800.
361. Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41: 18–25.
362. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990; 336: 225–9.
363. Schütz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M. Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 199–205.
364. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996; 39: 401–6.
365. Roblin X, Peyrin-Biroulet L, Phelip JM, Nancey S, Flourie B. 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10⁸ erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 3115–22.
366. Richard M, Weinshilboum and Susan L. Sladek. Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet.* 1980 Sep; 32(5): 651–662.
367. Gardiner SJ, Geary RB, Barclay ML, Begg EJ. Two cases of thiopurine methyltransferase (TPMT) deficiency--a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 473–6.
368. Zelinkova Z, Derijks LJJ, Stokkers PCF, et al. Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 44–9.

369. Campbell S, Kingstone K, Ghosh S. Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients maintained on low-dose azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 389–98.
370. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics* 2010; 11: 177–88.
371. Dewit O, Moreels T, Baert F, et al. Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin Biochem* 2011; 44: 1062–6.
372. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000; 118: 1025–30.
373. Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, et al. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 2003; 52: 140–2.
374. Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr* 1998; 87: 108–11.
375. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 1991; 119: 985–9.
376. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000 Apr; 118(4):705-13.
377. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1518–27.
378. de Jong DJ, Derijks LJJ, Naber AHJ, Hooymans PM, Mulder CJJ. Safety of thiopurines in the treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003; 239: 69–72.
379. Goldstein E, Marion J, Wheeler S, Present D. 6-Mercaptopurine (6-MP): does it increase or decrease the risks of colon cancer in Crohn's disease (CD)? *Gastroenterology* 1998; 114(Suppl. 1): A986.
380. Gold DM, Levine JJ, Weinstein TA, Kessler B, Pettei MJ. Prolonged medical therapy for severe pediatric ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 732–5.
381. Bastida G, Nos P, Aguas M, et al. Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 775–82.

382. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**: 331–42.
383. Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, Weinshilboum RM. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 1992; **2**: 148–59.
384. Hande S, Wilson-Rich N, Bousvaros A, *et al.* 5-aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 251–7.
385. Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 274–81.
386. Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW, *et al.* 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin Chem* 2007; **53**: 1306–14.
387. Goldenberg BA, Rawsthorne P, Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 1744–8.
388. Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen N, Oellerich M. Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 220–6.
389. Leong RW, Geary RB, Sparrow MP. Thiopurine hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: the role for adding allopurinol. *Expert Opin Drug Saf* 2008; **7**: 607–16.
390. Geary RB, Day AS, Barclay ML, Leong RWL, Sparrow MP. Azathioprine and allopurinol: a two-edged interaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25**: 653–5.
391. Bermejo F, López-Sanromán A, Algaba A, *et al.* Mercaptopurine rescue after azathioprine-induced liver injury in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 120–4.
392. Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, Almer SHC. Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; **29**: 654–61.
393. Gisbert JP, Luna M, González-Lama Y, *et al.* Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**: 1106–14.

394. Naber AH, Van Haelst U, Yap SH. Nodular regenerative hyperplasia of the liver: an important cause of portal hypertension in non-cirrhotic patients. *J Hepatol* 1991; **12**: 94–9.
395. Daniel F, Cadranet J-F, Seksik P, *et al.* Azathioprine induced nodular regenerative hyperplasia in IBD patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; **29**: 600–3.
396. Vernier-Massouille G, Cosnes J, Lemann M, *et al.* Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut* 2007; **56**: 1404–9.
397. Seksik P, Mary J-Y, Beaugier L, *et al.* Incidence of nodular regenerative hyperplasia in inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine. *Inflamm Bowel Dis* 2011; **17**: 565–72.
398. de Boer NKH, Mulder CJJ, van Bodegraven AA. Myelotoxicity and hepatotoxicity during azathioprine therapy. *Neth J Med* 2005; **63**: 444–6.
399. Buster EHCJ, van Vuuren HJ, Zondervan PE, Metselaar HJ, Tilanus HW, de Man RA. Thiopurine-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphism in a liver transplant recipient developing nodular regenerative hyperplasia on low-dose azathioprine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; **20**: 68–72.
400. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, *et al.* 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; **125**: 298–303.
401. Tanis AA. Azathioprine in inflammatory bowel disease, a safe alternative? *Mediators Inflamm* 1998; **7**: 141–4.
402. Haber CJ, Meltzer SJ, Present DH, Korelitz BI. Nature and course of pancreatitis caused by 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1986; **91**: 982–6.
403. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; **50**: 485–9.
404. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, *et al.* Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **28**: 973–83.
405. Domènech E, Nos P, Papo M, López-San Román A, Garcia-Planella E, Gassull MA. 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease and previous digestive intolerance of azathioprine. *Scand J Gastroenterol* 2005; **40**: 52–5.

406. McGovern DPB, Travis SPL, Duley J, Shobowale-Bakre EM, Dalton HR. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology* 2002; **122**: 838–9.
407. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Jan;35(1):15-36
408. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55: 15-20.
409. Mircheva J, Legendre C, Soria-Royer C, Thervet E, Beaune P, Kreis H. Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1995; 60: 639-42.
410. Jang JJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Lee MS, Koo HH, et al. Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:638–641.
411. Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J. Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:68–74.
412. Lee EJ, Kalow W. Thiopurine S-methyltransferase activity in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54:28–33.
413. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol*. 1996; 15:17–30.
414. Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug Metab Dispos*. 1995; 23:398–405.
415. Appell ML, Berg J, Duley J, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23:242-8.
416. Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2-*24) *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:887–893.
417. Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Nov; 15(11):801-15.
418. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet*. 1996; 58:694–702.

419. Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet.* 1999; 8:371–376.
420. Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet.* 1999; 8:367–370.
421. McLeod HL, Pritchard SC, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw MM, Powrie RH, et al. Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics.* 1999; 9:773–776.
422. Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics.* 1999; 9:37–42. [PubMed: 10208641]
423. Oliveira E, Quental S, Alves S, Amorim A, Prata MJ. Do the distribution patterns of polymorphisms at the thiopurine S-methyltransferase locus in sub-Saharan populations need revision? Hints from Cabinda and Mozambique. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63:703–706.
424. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:949–953.
425. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:6444–6449.
426. Chingiz Asadov, Gunay Aliyeva and Kamala Mustafayeva. Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 15, 23-30
427. Tai HL, Fessing MY, Bonten EJ, Yanishevsky Y, d'Azzo A, Krynetski EY, Evans WE. Enhanced proteasomal degradation of mutant human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) in mammalian cells: mechanism for TPMT protein deficiency inherited by TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B or TPMT*3C. *Pharmacogenetics.* 1999 Oct;9(5):641-50.
428. Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics.* 2003 Sep;13(9):555-64.
429. Dong XW, Zheng Q, Zhu MM, Tong JL, Ran ZH. Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and thiopurine toxicity in treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(25):3187–3195.
430. Liu YP, Wu HY, Yang X, et al. Association between thiopurine S-methyltransferase polymorphisms and thiopurine-induced adverse drug reactions in

- patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121745.
431. Newman WG, Payne K, Tricker K, et al. A pragmatic randomized controlled trial of thiopurinemethyltransferase genotyping prior to azathioprine treatment: the TARGET study. *Pharmacogenomics*. 2011;12(6):815–826.
432. Coenen MJ, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, et al. Identification of patients with variants in TPMT and dose reduction reduces hematologic events during thiopurine treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015;149(4):907–917.e7.
433. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med*. 1997 Apr 15; 126(8):608-14.
434. Kotur N, Dokmanovic L, Janic D, Stankovic B, Krstovski N, Tosic N, Katsila T, Patrinos GP, Zukic B, Pavlovic S. TPMT gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics*. 2015; 16(15):1701-12.
435. Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, Beaune P, Lorient MA. Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring *Pharmacogenomics*. 2014 Apr; 15(6):745-57.
436. Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr; 77(4):704-14.
437. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravindranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY, Relling MV.. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 15; 19(8):2293-301.
438. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine methyltransferase and treatment outcome in the UK acute lymphoblastic leukaemia trial ALL2003. *Br J Haematol*. 2015 Aug; 170(4):550-8.
439. Hindorf U, Appell ML. Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J Crohns Colitis*. 2012 Jul; 6(6):655-9.
440. Schmiegelow K, Al-Modhwahi I, Andersen MK, Behrendtz M, Forestier E, Hasle H, Heyman M, Kristinsson J, Nersting J, Nygaard R, Svendsen AL, Vettenranta K, Weinshilboum R, Methotrexate/6-mercaptopurine maintenance therapy influences the risk of a second malignant neoplasm after childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology. Blood*. 2009 Jun 11; 113(24):6077-84.

441. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Söderhäll S, Vettenranta K, Weinshilboum R, Wesenberg F, Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology. Leukemia*. 2009 Mar; 23(3):557-64.
442. Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R, Karsh J. Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2011 Jun 21; 154(12):814-23, W-295-8.
443. Levinsen M, Rosthøj S, Nygaard U, Heldrup J, Harila-Saari A, Jonsson OG, Bechensteen AG, Abrahamsson J, Lausen B, Frandsen TL, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Myelotoxicity after high-dose methotrexate in childhood acute leukemia is influenced by 6-mercaptopurine dosing but not by intermediate thiopurine methyltransferase activity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Jan; 75(1):59-66.
444. Tamm R, Mägi R, Tremmel R, Winter S, Mihailov E, Smid A, Möricke A, Klein K, Schrappe M, Stanulla M, Houlston R, Weinshilboum R, Mlinarič Raščan I, Metspalu A, Milani L, Schwab M, Schaeffeler E. Polymorphic variation in TPMT is the principal determinant of TPMT phenotype: A meta-analysis of three genome-wide association studies. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 May; 101(5):684-695.
445. Ford L, Prout C, Gaffney D, Berg J. Whose TPMT activity is it anyway? *Ann Clin Biochem*. 2004 Nov; 41(Pt 6):498-500.
446. Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Nov; 52(5):539-46.
447. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*. 2004 Jul; 14(7):407-17.
448. Lau J, Ioannidis JP, Terrin N, Schmid CH, Olkin I. BMJ. The case of the misleading funnel plot. *BMJ* 2006 Sep 16; 333(7568):597-600.
449. Almoguera B, Vazquez L, Connolly JJ, Bradfield J, Sleiman P, Keating B, Hakonarson H. Imputation of TPMT defective alleles for the identification of patients with high-risk phenotypes. *Front Genet*. 2014; 5():96.
450. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurinemethyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(4):324–325.
451. Fargher EA, Tricker K, Newman W, et al. Current use of pharmacogenetic testing: a national survey of thiopurine methyltransferase testing prior to azathioprine prescription. *J Clin Pharm Ther*. 2007;32(2):187–195.
452. Abaji R, Krajcinovic M. Thiopurine S-methyltransferase polymorphisms in acute lymphoblastic leukemia, inflammatory bowel disease and autoimmune

- disorders: influence on treatment response. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2017;10:143-156.
453. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215
454. Carvalho ATP, Esberard BC, Fróes RSB, Rapozo DC, Grinman AB, Simão TA, et al. Thiopurine-methyltransferase variants in inflammatory bowel disease: prevalence and toxicity in Brazilian patients. *World J Gastroenterol* 2014; 20:3327–3334.
455. Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, Schmiegelow K. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:65–68.
456. Corominas H, Domenech M, Gonzalez D, Diaz C, Roca M, García-González MA, et al. Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2313–2317.
457. Angela Di Salvo, Carmelo Fabiano, Vincenza Mannara, Mariangela Dimarco, Ambrogio Orlando, Marco Affronti, Fabio Salvatore Macaluso, Mario Cottone. Frequency of thiopurine methyltransferase mutation in patients of Mediterranean area with inflammatory bowel disease and autoimmune disorders. *Digestive and Liver Disease* , Volume 48 , Issue 12 , 1506 – 1509.
458. Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, Mantzaris G, Syriopoulou VP, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Anagnou NP, Roma-Giannikou E. Thiopurine S-methyltransferase genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease Greek patients. *J Clin Pharm Ther*. 2010 Feb;35(1):93-7.
459. Hakooz N, Arafat T, Payne D, Ollier W, Pushpakom S, Andrews J, Newman W. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in the Jordanian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010 Oct;66(10):999-1003.
460. Di Salvo A, Fabiano C, Mannara V, Dimarco M, Orlando A, Affronti M, et al. Frequency of thiopurine methyltransferase mutation in patients of Mediterranean area with inflammatory bowel disease and autoimmune disorders. *Dig Liver Dis* 2016; 48:1506–1509.
461. Bahrehmand F, Kiani A, Vaisi-Raygani A, Bashiri H, Zobeiri M, Tanhapour M, et al. Pharmacogenetics of drug metabolizing enzyme: thiopurine methyl transferase phenotypes and multidrug resistance 1 gene polymorphism in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; 62:102–109.
462. Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:183–188.
463. Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine S-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem* 2008; 54:1637–1647.

464. Albayrak M, Konysova U, Kaya Z, Gursel T, Guntekin S, Percin EF, Kocak U. Thiopurine methyltransferase polymorphisms and mercaptopurine tolerance in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68:1155–1159.
465. Alvarez LL, Venegas SM, Larrondo LM, Becerra BN, Castro LA, Quera PR. Thiopurine S methyltransferase gene polymorphism in Chilean blood donors. *Rev Med Chil* 2009; 137:185–192.
466. Alves S, Rocha J, Amorim A, Prata MJ. Tracing the origin of the most common thiopurine methyltransferase (TPMT) variants: preliminary data from the patterns of haplotypic association with two CA repeats. *Ann Hum Genet* 2004; 68:313–323.
467. Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, de Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40:388–393.
468. Zeglam HB, Benhamer A, Aboud A, Rtemi H, Mattardi M, Saleh SS, et al. Polymorphisms of the thiopurine S-methyltransferase gene among the Libyan population. *Libyan J Med* 2015; 10:27053.
469. Schutz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M. Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:199–205.
470. Zabala-Fernandez W, Barreiro-de Acosta M, Echarri A, Carpio D, Lorenzo A, Castro J, et al. A pharmacogenetics study of TPMT and ITPA genes detects a relationship with side effects and clinical response in patients with inflammatory bowel disease receiving azathioprine. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20:247–253.
471. Roblin X, Oussalah A, Chevaux JB, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:2480–2487.
472. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol* 2010; 63:288–295.
473. Pastorelli L, De Salvo C, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front Immunol*. 2013 Sep 17;4:280
474. Zhou L, Schmidt K, Nelson FR, Zelesky V, Troutman MD, Feng B. The effect of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein on the brain penetration of flavopiridol, imatinib mesylate (Gleevec), prazosin, and 2-methoxy-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyloxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propanoic acid (PF-407288) in mice. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(5):946–955.
475. Senhaji N, Kassogue Y, Fahimi M, Serbati N, Badre W, Nadifi S. Genetic Polymorphisms of Multidrug Resistance Gene-1 (MDR1/ABCB1) and Glutathione S-

- Transferase Gene and the Risk of Inflammatory Bowel Disease among Moroccan Patients. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:248060.
476. Milojkovic M, Stojnev S, Jovanovic I, Ljubisavljevic S, Stefanovic V, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacol Rep.* 2011;63: 808–814.
477. Kimchi-Sarfaty C, Gribar JJ, Gottesman MM. Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol Pharmacol.* 2002;62: 1–6.
478. Salama NN, Yang Z, Bui T, Ho RJ. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci.* 2006;95: 2293–2308.
479. Gbandi E, Goulas A, Sevastianos V, Hadziyannis S, Panderi A, Koskinas J, Papatheodoridis G, Vasiliadis T, Agapakis D, Protopapas A, Ioannidou P, Zacharakis G, Sinakos E, Koutsounas S, Germanidis G. Common ABCB1 polymorphisms in Greek patients with chronic hepatitis C infection: A comparison with hyperlipidemic patients and the general population. *Pharmacol Rep.* 2016 Apr;68(2):476-82.
480. Alexiou GA, Xourgia X, Vartholomatos E, Tsiouris S, Kalef-Ezra JA, Fotopoulos AD, Kyritsis AP. Comparison of (99m)tc-tetrofosmin and (99m)tc-sestamibi uptake in glioma cell lines: the role of p-glycoprotein expression. *Int J Mol Imaging.* 2014;2014:471032.
481. Vasilopoulos Y, Sarri C, Zafiriou E, Patsatsi A, Stamatis C, Ntoumou E, Fassos I, Tsalta A, Karra A, Roussaki-Schulze A, Sotiriadis D, Mamuris Z, Sarafidou T. A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics J.* 2014 Dec;14(6):523-5.
482. Doxani C, Voulgarelis M, Zintzaras E. MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis. *Biomarkers.* 2013 Aug;18(5):425-35.
483. Vlachogeorgos GS, Manali ED, Blana E, Legaki S, Karagiannidis N, Polychronopoulos VS, Roussos C. Placental isoform glutathione S-transferase and P-glycoprotein expression in advanced nonsmall cell lung cancer: association with response to treatment and survival. *Cancer.* 2008 Dec 25;114(6):519-26.
484. Papazisis G, Goulas A, Sarrigiannidis A, Bargiota S, Antoniadis D, Raikos N, Basgiouraki E, Bozikas VP, Garyfallos G. ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms and treatment response of psychotic patients in a naturalistic setting. *Hum Psychopharmacol.* 2018 Jan;33(1).
485. Agapakis D, Panderi A, Gbandi E, Savopoulos C, Kouvelas D, Hatzitolios AI, Goulas A. The ABCB1 2677G>T/A polymorphism is associated with baseline blood HDL-cholesterol levels in newly diagnosed hyperlipidemic patients. *Hellenic J Cardiol.* 2018 Mar - Apr;59(2):122-126.

Prevalence of thiopurine S-methyltransferase gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease from the island of Crete, Greece

Constantina Coucoutsis^{a,c}, George Emmanouil^a, George Goulielmos^b, Ourania Sfakianaki^a, Ioannis E. Koutroubakis^c and Elias A. Kouroumalis^{a,c}

Background There is evidence that genotyping for the thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) gene variants is useful for the prediction of response to thiopurine analogs (azathioprine and 6-mercaptopurine) in patients with inflammatory bowel disease (IBD). The aim of the present study was to determine the prevalence of *TPMT* gene polymorphisms in a genetic homogenous population of IBD patients in Crete and to correlate the results with adverse reactions to thiopurine drugs.

Patients and methods Genotyping for the most common *TPMT* variants *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3C*, and *TPMT*3B* was performed using the PCR-restriction fragment length polymorphism method in 223 consecutive IBD patients and 119 age-matched and sex-matched healthy controls. The hospital medical records were reviewed for thiopurine use in these patients and related adverse events.

Results The prevalence of *TPMT* variants *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B*, and *TPMT*3C* was 1.8, 2.7, 1.3, and 1.8%, respectively. The G238C mutation was detected in four (1.8%) out of 223 patients, three (1.3%) patients were carriers of the G460A mutation, four (1.8%) of the A719G mutation, and six (2.7%) of both G460A and A719G mutations. In healthy controls, only one (0.8%) carried both the G460A and the A719G mutation, whereas *TPMT*2*, *TPMT*3C*, and *TPMT*3B* were not detected. None of the genotypes was homozygous. A statistically significant correlation between the presence of the G460A mutation and the development of leucopenia after the administration of thiopurines was observed ($P=0.048$).

Conclusion This study showed a lower frequency of total *TPMT* variants and a higher frequency of *TPMT*3B* in Cretan IBD patients compared with other Caucasian populations. The presence of the G460A mutation is associated with the development of leukopenia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 29:1284–1289

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) treatment has to be individualized, reduced, or discontinued in 15–30% of patients because of variations in the therapy response or various adverse drug reactions [1,2].

The most frequent thiopurine cytotoxicity is bone marrow suppression with neutropenia and/or pancytopenia, observed in up to 10% of patients, and can be life-threatening. Generally, it is a dose-related adverse drug reaction, which mainly occurs at the onset of treatment or during the maintenance treatment [3].

There is evidence that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding the metabolic pathways of thiopurines are involved in the development of drug reactions. The gene that encodes thiopurine S-methyltransferase

(*TPMT*) is located on chromosome 6 (6p22.3) and includes 10 exons.

To date, three wild-type alleles and 38 mutant alleles of this gene have been identified [4], and most of them have been associated with decreased enzyme activity [5]. Four genotypes, namely *TPMT*2*, **3A*, **3B*, and **3C*, have been investigated intensively. *TPMT*3A* is actually a haplotype that contains two nonsynonymous SNPs: **3B* and **3C* [4–8].

The distribution of these mutations is different in different ethnic populations. *TPMT*3A* seems to be the main genotype in Caucasians (3.2–5.7%) and *TPMT*3C* (0.2–0.5%) is the most common mutant variant in African and Asian populations along with *TPMT*2* (0.2–0.5%), whereas *TPMT*3B* is generally rare. Heterozygotes for a variant *TPMT* allele (4–11%) have intermediate enzymatic activity, but homozygosity is rare (one in 300 persons) and is related to very low or absent enzymic activity [9].

However, *TPMT* status does not always predict all thiopurine-related adverse events and *TPMT* testing before the administration of thiopurines is not as yet an established practice, with varying recommendations in USA and Europe [10–13].

There are no Greek data on the prevalence of *TPMT* SNPs in either adult IBD patients or healthy individuals to date.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2017, 29:1284–1289

Keywords: adverse reactions, inflammatory bowel disease, single nucleotide polymorphisms, thiopurine analogs, thiopurine methyltransferase gene

^aLaboratory of Gastroenterology, ^bSection of Molecular Pathology and Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Crete and ^cDepartment of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Correspondence to Constantina Coucoutsis, MD, Laboratory of Gastroenterology, Faculty of Internal Medicine, University of Crete, Voutes, 71003 Crete, Greece

Tel: +30 697 799 1042; fax: +30 289 102 5099; e-mail: ccoucoutsis@gmail.com

Received 29 March 2017 **Accepted** 23 May 2017

The aim of this study therefore was two-fold: first, to determine the frequency of *TPMT* gene polymorphisms in a genetically homogenous population of IBD patients in the island of Crete in comparison with other populations and, second, to examine whether the presence of *TPMT* SNPs is associated with adverse events of thiopurine drugs to a degree that might justify the pretreatment genotyping in our practice.

Patients and methods

Study design and patient characteristics

The study was carried out at the Department of Gastroenterology of the University Hospital of Heraklion, Crete. All 223 consecutive patients with IBD [126 men, and 97 women; 113 with Crohn's disease (CD), 110 with ulcerative colitis (UC)] attending the outpatient clinic between March 2010 and March 2011 were prospectively enrolled in the study. A group of 119 healthy individuals, age and sex matched to IBD patients, was used as controls. No exclusion criteria were applied.

A questionnaire was filled by every patient on inclusion with detailed demographic and clinical characteristics. Medication use, presence of adverse events, and response to treatment were retrospectively retrieved from medical files for those diagnosed in previous years, in addition to their prospective follow-up. Patients were examined and monitored every 3 months in the outpatient clinic for the duration of the follow-up. The diagnosis of IBD was made on the basis of established diagnostic criteria on clinical, radiological, endoscopic, and histological characteristics. The location and behavior of disease were defined according to the Montreal classification [14].

Data on response to treatment, adverse effects, and need for surgery were collected prospectively during a follow-up period of 4 years (48 months): from March 2011 until March 2015 (median: 35 months, range: 15–48 months). In particular, patients on thiopurines received a follow-up of at least 15 months.

Informed consent was obtained from all patients enrolled in this study and the study protocol was approved by the Scientific and Ethical Committee of the University Hospital of Heraklion.

All chemicals were analytical grade from Sigma-Aldrich (Gillingham, UK).

DNA extraction and genotyping

Whole-blood samples (500 μ l) from all IBD patients and controls were obtained in EDTA-containing tubes and genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the salting-out method as described previously [15]. The extracted DNA was kept at -20°C until tested.

The conditions for PCR are presented in Table 1. The *TPMT* gene polymorphisms were detected by restriction fragment length polymorphism analysis after PCR was performed, except for the *TPMT**2 (G238C) polymorphism, for which allele-specific PCR was performed [16,17]. Undigested and digested PCR products were monitored in 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Table 2 presents data on the primers and enzymes used for each polymorphism. Both genotypes (*TPMT**) and

Table 1. Materials and concentrations used for PCR mixture for restriction fragment length polymorphisms and allele-specific PCR

Reagents	Concentration	Quantity (μ l)
DNA	100 ng	1
Taq DNA polymerase reaction buffer without Mg^{++}	$1 \times$ (10 mmol/l Tris-HCl pH 8.5, 25 $^{\circ}\text{C}$, 50 mmol/l KCl)	2.5
MgCl_2	2.5 mmol/l	2
dNTPs	0.5 mmol/l	0.25
Forward primer	0.5 mmol/l	1
Reverse primer	0.5 mmol/l	1
Taq polymerase (IMBB FORTH-Greece)	3–5 U/ μ l	0.4
Distilled water	–	16.1
Final volume	–	25

FORTH, Foundation for Research and Technology; IMBB, Institute of Molecular Biology and Biotechnology.

Individual alleles (G460A, G238C, and A719A) were reported.

Statistics

Demographic and clinical data analysis as well as comparisons between IBD patients and healthy controls were carried out using the SPSS24.0 software (IBM Corp., Armonk, New York, USA). Allele and genotype frequencies were compared between groups using the χ^2 or Fisher's exact test where appropriate. Two-sided *P* values, odds ratios (ORs), and 95% confidence intervals (CIs) were also calculated. Significance was set at *P* value less than 0.05.

The results were tested for Hardy–Weinberg equation using the Genepop (Genepop web, version 4.2; Laboratory of Genetics and Environment, Montpellier, France) software.

Results

The demographic and clinical characteristics of the Cretan CD and UC patients included in the study are shown in Table 3.

TPMT allele and genotype frequencies in the study population including IBD patients and healthy controls are shown in Tables 4 and 5.

Genotypes *TPMT**2 and *TPMT**3C were found in four (1.8%) patients, *TPMT**3B in three (1.3%) patients, and *TPMT**3A in six (2.7%) IBD patients. In terms of the individual alleles, the G238C mutation was detected in four (1.8%) out of 223 patients; three (1.3%) were carriers of the G460A mutation, four (1.8%) were carriers of the A719G mutation, and six (2.7%) carried both the G460A and the A719G mutation. In healthy individuals, only one (0.8%) carried both the G460A and the A719G mutation (*TPMT**3A genotype). *TPMT**2, *TPMT**3C, and *TPMT**3B were not detected in the healthy controls. None of the genotypes detected was homozygous. There was no significant difference among the observed and the predicted allele frequencies by the Hardy–Weinberg equation.

The potential role of genotype to specific phenotype was also studied. There was no statistically significant correlation between the presence of *TPMT* SNPs and either UC or CD, or the disease behavior and disease localization (data not shown).

Table 2. Primers and enzymes used for restriction fragment length polymorphism analysis genotyping

<i>TPMT</i> gene SNPs	Primers	Methods	Enzymes
G460A	Forward: 5'-GGGACGCTGCTCATCTTCT-3' Reverse: 5'-GCCTTACACCCAGGTCTCTG-3'	RFLPs	MwoI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA)
A719G	Forward: 5'-GAGACAGAGTTTCACCATCTTTGG-3' Reverse: 5'-CAGGCTTTAGCATAATTTCAATTCT-3'	RFLPs	AccI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA)
G238C	Forward WT: 5'-GTATGATTTTATGCAGGTTTG-3' Forward M: 5'-GTATGATTTTATGCAGGTTTC-3' Reverse C: 5'-TAAATAGGAACCATCGGACAC-3'	Allele-specific PCR	–

RFLP, restriction fragment length polymorphism; SNP, single nucleotide polymorphism; *TPMT*, thiopurine S-methyltransferase.

Table 3. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease patients included in the study

Diagnosis	CD	UC	Total IBD
<i>n</i> (%)	111 (49.8)	112 (50.2)	223 (100)
Age [median (range)] (years)	55 (20–90)	51.5 (16–87)	53 (16–90)
Sex: female [<i>n</i> (%)]	57 (51.4)	40 (35.7)	97 (43.5)
Smoking: yes [<i>n</i> (%)]	44 (39.6)	32 (28.6)	76 (34)
Disease duration [median (range)] (years)	8 (1–30)	9.5 (1–40)	8.75 (1–40)
Montreal classification for UC [<i>n</i> (%)]			
Proctitis (E1)	–	16 (14.3)	–
Left-sided colitis (E2)	–	54 (48.2)	–
Extensive colitis (E3)	–	42 (37.5)	–
Montreal classification for CD [<i>n</i> (%)]			
Inflammatory (B1)	82 (73.9)	–	–
Stricturing	16 (14.4)	–	–
Penetrating	9 (8.1)	–	–
Perianal (p)	4 (3.6)	–	–
Ileum (L1)	39 (34.8)	–	–
Colon (L2)	37 (33)	–	–
Ileocolon (L3)	36 (32.1)	–	–
Upper GI (L4)	4 (3.5)	–	–
Use of thiopurines	60 (54.1)	31 (27.7)	91 (40.8)
History of surgery for IBD	27 (24.3)	7 (6.3)	34 (15.2)

CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.

Table 4. Thiopurine S-methyltransferase genotype frequencies in inflammatory bowel disease patients and healthy controls (χ^2 -test or Fisher's exact test)

<i>TPMT</i> gene genotype frequencies	IBD (<i>N</i> =223)	HC (<i>N</i> =119)	OR	95% CI	<i>P</i> value
<i>TPMT3B</i>					
GG	220	119	0.987	0.972–1.002	0.554
GA	3	0	0	0	–
AA	0	0	–	–	–
<i>TPMT3C</i>					
AA	219	119	0.982	0.965–1.00	0.302
AG	4	0	0	0	–
GG	0	0	–	–	–
<i>TPMT2</i>					
GG	219	119	0.982	0.965–1.000	0.302
GC	4	0	0	0	–
CC	0	0	–	–	–
<i>TPMT3A</i>					
GG/AA	217	118	0.981	0.955–1.009	0.429
GA/AG	6	1	3.202	0.390–26.385	0.429
AA/GG	0	0	–	–	–

CI, confidence interval; HC, healthy control; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; *TPMT*, thiopurine S-methyltransferase.

We investigated the association between the presence of SNPs and adverse reaction to azathioprine (AZA).

In our study group, 91 (40.8%) IBD patients were treated with AZA. Adverse reactions resulting in dose reduction or discontinuation of the medication were recorded in 23/91

Table 5. thiopurine S-methyltransferase allele frequencies in inflammatory bowel disease patients and healthy controls (χ^2 -test or Fisher's exact test)

<i>TPMT</i> gene allele frequencies	IBD (<i>N</i> =446)	HC (<i>N</i> =238)	OR	95% CI	<i>P</i> value
<i>G460A</i>					
G	437	237	0.984	0.969–0.999	0.177
A	9	1	4.803	0.612–37.681	0.177
<i>A719G</i>					
A	436	237	0.982	0.966–0.998	0.108
G	10	1	5.336	0.687–41.435	0.108
<i>G238C</i>					
G	442	238	0.991	0.982–1.000	0.304
C	4	0	0	0	–

CI, confidence interval; HC, healthy control; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; *TPMT*, thiopurine S-methyltransferase.

(25.3%), nearly all with a wild type (*TPMT**1, Table 6). Among these, three carriers of mutant alleles (*TPMT**3A genotype and *TPMT**3B genotype) were found to have bone marrow suppression (low white blood cell count). There was, however, a statistically significant correlation (OR=8.87, 95% CI: 0.97–81.11, *P*=0.048) between the presence of the G460A SNP and neutropenia, although the strength of the correlation was relatively weak (Pearson's correlation *r*=–0.172) (Table 7).

Discussion

Studies on genetics in different populations might be influenced by heterogeneity of the population. By contrast, studies on relatively uniform populations might better represent the real situation. The present study was carried out in a population of IBD patients and healthy individuals in the island of Crete, Greece, a Caucasian population with a genetically homogenous profile, because of geographic boundaries. Our data suggest that the prevalence of *TPMT* variants in Cretan IBD patients differs from that in other Caucasian populations. The overall prevalence of *TPMT* variants was 7.6%, which is relatively lower compared with previous reports (10–11%) [5,18], with a similar distribution of *TPMT* variant alleles in healthy individuals and in IBD patients [19,20]. Few studies exist on the frequency of the *TPMT* mutation in patients from Southern Europe. The frequency of the *TPMT* mutation in a homogeneous Sicilian cohort of patients with IBD, autoimmune, and hematological disorders was also low at 4.8% [21].

However, considerable differences have been reported among other ethnic groups. Mutation prevalence is only 2% in South West Asians and 5% in Chinese [22]. Equally

Table 6. Association between thiopurine S-methyltransferase genotype and adverse reaction to azathioprine in inflammatory bowel disease patients (Fisher's exact test)

Adverse event to azathioprine	IBD patients [n (%)]	Genotype distribution				
		<i>TPMT1</i>	<i>TPMT2</i>	<i>TPMT3B</i>	<i>TPMT3C</i>	<i>TPMT3A</i>
Neutropenia	13 (56.5)	10	0	1	0	2
Hepatitis	5 (21.7)	5	0	0	0	0
Pancreatitis	3 (13.1)	3	0	0	0	0
Rash	2 (8.7)	2	0	0	0	0
Total	23 (100)	20	0	1 (OR = 0.957, 95% CI: 0.87–1.04, P = 0.25)		2 (OR = 5.91, 95% CI: 0.56–62.21, P = 0.15)

CI, confidence interval; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio; *TPMT*, thiopurine S-methyltransferase.

Table 7. Association between thiopurine S-methyltransferase alleles and neutropenia in inflammatory bowel disease patients (Fisher's exact test)

ADVR azathioprine	Total alleles in IBD patients	Allele distribution			
		Wild type	G238C	G460A	A719G
Neutropenia	26	21	0	3 (OR = 8.87, 95% CI: 0.94–83.17, P = 0.048)	2 (OR: 2.957, 95% CI: 0.429–20.39, P = 0.265)

ADVR, adverse reaction; CI, confidence interval; IBD, inflammatory bowel disease; OR, odds ratio.

low *TPMT* variants were found in Iranian patients as judged by the low prevalence of *TPMT* phenotypes [23]. In Caucasians, the most frequent mutant allele is *TPMT*3A* and four *TPMT* mutant alleles, namely, *TPMT*2*, **3A*, **3B*, and **3C*, were detected in more than 80% of individuals with intermediate or poor metabolism [17,24,25]. The *TPMT*3A* genotype is the most common variant in Europeans (2–4.5%) and Latin Americans (1.5–6.5%), whereas in Asian (0.3–1.2%) and African (1.3–7.6%) groups, *TPMT*3C* is the most frequent genotype [26–32].

In the present study, the prevalence of *TPMT* variant genotypes in IBD patients was 1.8% for *TPMT*2* and *TPMT*3C* and 2.7% for *TPMT*3A*, whereas the prevalence of the wild-type genotype was 92.4%. Among the 15 heterozygotes within the group of IBD patients, the frequency of *TPMT* genotypes was 26.6% for *TPMT*2* and *TPMT*3C*, 20% for *TPMT*3B*, and 40% for *TPMT*3A*. There seems to be a clear predominance of the *TPMT*3A* genotype, but also the *TPMT*3B* variant occurs more frequently in our study population compared with reports from the literature [9,17,26,33,34]. Furthermore, one individual was a carrier of both G460A and G238C mutations, which has not been observed in similar studies in other populations. Therefore, *TPMT* genotype scattering in Cretan IBD patients has a generally similar pattern as in other Caucasian populations, but with a lower frequency of total variants and a slightly higher frequency of *TPMT*3B*.

It should be noted that none of the patients or healthy individuals was found to be homozygous for any of the *TPMT* variants. This might be because of the fact that our study population was too small to comprise a homozygous mutant subject. It is known that the frequency of homozygous genotypes of any of mutant variants is one individual in 300. Moreover, only 0.8% of the healthy individuals had any variant compared with a total overall frequency of 7.6% among the patients. However, when the individual genotypes were examined, the frequency of genotypes was not different between patients and controls

(Tables 4 and 5). Therefore, no link with a possible association with pathogenesis can be hypothesized.

Genetic polymorphisms of *TPMT* have been associated with adverse events among IBD patients treated with thiopurines and it is strongly linked to high 6-thioguanine blood levels and low *TPMT* activity [35–38]. Patients with reduced or undetectable *TPMT* activity show a preferential metabolism toward 6-thioguanine through the HPRT pathway and consequently are predisposed to bone marrow suppression [39,40].

For patients with intermediate *TPMT* activity, a meta-analysis, including 4306 patients from 47 studies, showed an OR of 4.09 (95% CI: 3.20–5.48; $P = 0.001$) for developing leukopenia compared with normal *TPMT* activity [41]. Yet, this meta-analysis included heterogeneous retrospective and prospective studies, with mostly mild rather than severe leukopenia, and different *TPMT* testing methods. Furthermore, even if nearly all the *TPMT*-deficient patients treated with a standard dosage of thiopurine show myelosuppression, *TPMT* deficiency accounts for a quarter of all the cases of myelosuppression under thiopurine treatment [42].

In our study group, we observed a statistically significant correlation between the presence of the G460A mutation and the development of low white blood cell count, in agreement with reports published previously. It should be stressed that our patients on thiopurines received a follow-up of at least 15 months. As most of the adverse effects of thiopurine are relatively early events, it is unlikely that we missed any toxicity. The presence of the A719G mutation was not associated significantly with leukopenia. Zabala-Fernández *et al.* [43] reported similar results in 232 IBD patients who were treated with AZA and the prevalence of adverse events was 33.3% among *TPMT* variants. *TPMT*3A* polymorphisms were not associated with clinical response in our study, in agreement with a recent report [44].

It should be noted here that in our group of patients, we detected patients with *TPMT* variants who had not received AZA until the end point of our study. This is

comprehensible as AZA use will probably decline as biologic drugs are now available in larger populations. Our findings indicate that the use of TPMT testing before the use of thiopurines might predict toxicity in some patients, but the correlation is not particularly strong. Its use is still debatable. A recent survey reported that 94% of dermatologists and 60% of gastroenterologists requested TPMT testing [45], whereas, worldwide, testing is used by 43% of gastroenterologists in the management of IBD [46]. Others are not recommending TPMT testing before therapy on the basis that decades of experience had shown AZA to be a safe drug in the treatment of IBD [47].

However, TPMT testing before the prescription of thiopurine drugs has been suggested to be routine clinical practice [48]. However, a systematic review performed by Booth *et al.* [49] to assess the sensitivity and the specificity of TPMT genotyping for TPMT enzymatic activity among IBD patients treated with AZA found no sufficient evidence to support the effectiveness of TPMT testing for IBD.

There are limitations to our study. The main limitations include a relatively small sample size, the fact that this was a single-center study, and a part of the study was retrospective. Accordingly, the findings need to be replicated in a larger prospective study.

Conclusion

In this study, the first one on TPMT SNPs in adult Greek IBD patients, TPMT allele scattering had a generally similar pattern to those determined for other Caucasian populations, but the total frequency of variants was intermediate, being lower than that in other Caucasian populations and higher than that in Sicilian and Chinese populations. In our study group, we observed a statistically significant correlation between the presence of the G460A mutation and the development of low white blood cell count in agreement with previous reports, but we believe that the link is not strong enough to justify pretreatment genotyping in our practice.

Acknowledgements

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Söderkvist P, Ström M, Hjortswang H, *et al.* Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55:1423–1431.
- Bouhnik Y, Lemann M, Mary JY, Scemama G, Tai R, Matuchansky C, *et al.* Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet* 1996; 347:215–219.
- Hlavaty T, Batovsky M, Balakova D, Pavl I, Celec P, Gregus M, *et al.* The impact of thiopurine-S-methyltransferase genotype on the adverse drug reactions to azathioprine in patients with inflammatory bowel diseases. *Bratisl Lek Listy* 2013; 114:199–205.
- Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, *et al.* Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23:242–248.
- Ujije S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2–*24). *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:887–893.

- Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, *et al.* Characterization of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol* 2008; 76:404–415.
- Kham SKY, Soh CK, Aw DCW, Yeoh AEJ. TPMT*26 (208F->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68:120–123.
- Appell ML, Wennerstrand P, Peterson C, Hertervig E, Mårtensson L-G. Characterization of a novel sequence variant, TPMT*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20:700–707.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 1999; 8:371–376.
- Kopylov U, Ben-Horin S, Seidman E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014; 27:304–312.
- Burnett HF, Tanoshima R, Chandranipapongse W, Madadi P, Ito S, Ungar WJ. Testing for thiopurine methyltransferase status for safe and effective thiopurine administration: a systematic review of clinical guidance documents. *Pharmacogenomics J* 2014; 14:493–502.
- Dignass A, van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *J Crohns Colitis* 2010; 4:28–62.
- Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130:935–939.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55:749–753.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
- Zhang JP, Zhou SF, Chen X, Huang M. Determination of intra-ethnic differences in the polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase in Chinese. *Clin Chim Acta* 2006; 365 (1–2): 337–341.
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126:608–614.
- Carvalho ATP, Esberard BC, Fróes RSB, Rapozo DC, Grinman AB, Simão TA, *et al.* Thiopurine-methyltransferase variants in inflammatory bowel disease: prevalence and toxicity in Brazilian patients. *World J Gastroenterol* 2014; 20:3327–3334.
- Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, Schmiegelow K. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:65–68.
- Corominas H, Domenech M, Gonzalez D, Diaz C, Roca M, García-González MA, *et al.* Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2313–2317.
- Di Salvo A, Fabiano C, Mannara V, Dimarco M, Orlando A, Affronti M, *et al.* Frequency of thiopurine methyltransferase mutation in patients of Mediterranean area with inflammatory bowel disease and autoimmune disorders. *Dig Liver Dis* 2016; 48:1506–1509.
- Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; 9:37–42.
- Bahreman F, Kiani A, Vaisi-Raygani A, Bashiri H, Zobeiri M, Tanhapour M, *et al.* Pharmacogenetics of drug metabolizing enzyme: thiopurine methyl transferase phenotypes and multidrug resistance 1 gene polymorphism in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; 62:102–109.
- Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:183–188.
- Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine S-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem* 2008; 54:1637–1647.
- Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 1999; 8:367–370.

- 27 Albayrak M, Konyssova U, Kaya Z, Gursel T, Guntekin S, Percin EF, Kocak U. Thiopurine methyltransferase polymorphisms and mercaptopurine tolerance in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68:1155–1159.
- 28 Alvarez LL, Venegas SM, Larrondo LM, Becerra BN, Castro LA, Quera PR. Thiopurine S methyltransferase gene polymorphism in Chilean blood donors. *Rev Med Chil* 2009; 137:185–192.
- 29 Alves S, Rocha J, Amorim A, Prata MJ. Tracing the origin of the most common thiopurine methyltransferase (TPMT) variants: preliminary data from the patterns of haplotypic association with two CA repeats. *Ann Hum Genet* 2004; 68:313–323.
- 30 Bahari A, Hashemi M, Bari Z, Moazeni-Roodi A, Kaykhaei MA, Narouie B. Frequency of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in southeast Iranian population. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2010; 29:237–244.
- 31 Isaza C, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003; 25:423–429.
- 32 Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, de Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40:388–393.
- 33 Zeglam HB, Benhamer A, Aboud A, Rtemi H, Mattardi M, Saleh SS, *et al.* Polymorphisms of the thiopurine S-methyltransferase gene among the Libyan population. *Libyan J Med* 2015; 10:27053.
- 34 Kurzawski IM, Gawronska-Szklarz B, Drozdziak M. Frequency distribution of thiopurine S-methyltransferase alleles in a polish population. *Ther Drug Monit* 2004; 26:541–545.
- 35 Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118:705–713.
- 36 Lennard L, van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41:18–25.
- 37 Lennard L, Lilleyman JS, van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990; 336:225–229.
- 38 Schutz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M. Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34:199–205.
- 39 Gisbert JP, Gomollon F. Thiopurine induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1783–1800.
- 40 Zelikova Z, Derijks LJJ, Stokkers PCF, Vogels EW, van Kampen AH, Curvers WL, *et al.* Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine S-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:44–49.
- 41 Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics* 2010; 11:177–188.
- 42 Dewit O, Moreels T, Baert F, Peeters H, Reenaers C, de Vos M, *et al.* Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin Biochem* 2011; 44:1062–1066.
- 43 Zabala-Fernandez W, Barreiro-de Acosta M, Echarri A, Carpio D, Lorenzo A, Castro J, *et al.* A pharmacogenetics study of TPMT and ITPA genes detects a relationship with side effects and clinical response in patients with inflammatory bowel disease receiving azathioprine. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20:247–253.
- 44 Al-Judaibi B, Schwarz UI, Huda N, Dresser GK, Gregor JC, Ponich T, *et al.* Genetic predictors of azathioprine toxicity and clinical response in patients with inflammatory bowel disease. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2016; 23:e26–e36.
- 45 Fargher EA, Tricker K, Newman W, Elliott R, Roberts SA, Shaffer JL, *et al.* Current use of pharmacogenetic testing: a national survey of thiopurine methyltransferase testing prior to azathioprine prescription. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32:187–195.
- 46 Roblin X, Ouassalah A, Chevaux JB, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:2480–2487.
- 47 Cartier MJ, Lobo AJ, Travis SPL. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 (Suppl 5): v1–v16.
- 48 Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol* 2010; 63:288–295.
- 49 Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, *et al.* Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann Intern Med* 2011; 154:814–823.