

In vivo ευεργετικές δράσεις φυσικού προϊόντος στην υγεία του ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαρία Θ. Δαλάκογλου

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής
ΠΜΣ Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αθήνα, 2016

In vivo ευεργετικές δράσεις φυσικού προϊόντος στην υγεία του ανθρώπου

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μαρία Θ. Δαλάκογλου

Εξεταστική Επιτροπή:

Ανδριάννα Χ. Καλιώρα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ρωξάνη Τέντα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας-Φυσικοχημείας-Βιοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω κατά κύριο λόγο την επιβλέπουσά μου, κ. Καλιώρα, για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση, αλλά και την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην κ. Γκιοζάρη και την κ. Παπαδά για τη συνεισφορά και την βοήθειά τους στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους και στο γραπτό κείμενο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και τη βοήθεια του ώστε να διεξαχθεί η μελέτη αυτή.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδονται στην οικογένεια μου, για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσφέρουν καθημερινά.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
Λέξεις-Κλειδιά:.....	7
ABSTRACT.....	7
Keywords:.....	7
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Εισαγωγή.....	8
1.2. Η μαστίχα από την αρχαιότητα έως σήμερα.....	8
1.3. Μαστιχοφόρος Σχίνος (ή μαστιχόδενδρο).....	9
1.4. Η συγκομιδή της μαστίχας.....	11
1.5. Φυσικές ιδιότητες.....	12
1.6. Χημική σύσταση.....	13
1.6.1. Μαστιχέλαιο.....	13
1.6.2. Τερπένια.....	13
1.6.3.Πολυφαινόλες.....	15
1.7. Τα προϊόντα της μαστίχας.....	16
2. ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ.....	17
2.1. Αντιμικροβιακές Ιδιότητες.....	17
2.2. Αντιφλεγμονώδεις και Αντιοξειδωτικές ιδιότητες.....	18
2.3. Άλλες ιδιότητες.....	22
3. ΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	23
3.1. Ταξινόμηση τερπενίων.....	23
3.2. Ευεργετικές δράσεις μονοτερπενίων.....	24
3.3. Ευεργετικές δράσεις τριτερπενίων.....	27
4. IN VIVO ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	29
4.1. Η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών του πλάσματος να ανάγουν το FE(III) (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP).....	30
4.2. Μέτρηση της γλουταθειόνης (GSH).....	30
4.3. Μέτρηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSHPx).....	30
4.4. Μέτρηση της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GSr).....	31
4.5. Μέτρηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD).....	31
4.6. Μέτρηση της καταλάσης (CAT).....	31
4.7. Η δοκιμασία της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR).....	32
4.8. Μέτρηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (LPO).....	32
4.9 Μέτρηση της οξειδωσής της LDL.....	32
4.10 Μέθοδος της οξειδωτικής τροποποίησης του πλάσματος με την επίδραση θειικού χαλκού (total serum oxidizability assay).....	32

5. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	33
Σκοπός.....	34
ΜΕΡΟΣ Β : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	35
6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	35
6.1 Στρατολόγηση και προετοιμασία εθελοντών.....	35
6.2 Εργαστηριακές μετρήσεις.....	36
6.2.1 Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων.....	36
6.2.2 Αέρια χρωματογραφία μάζας (GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, GC-MS).....	36
6.2.3 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability).....	39
6.2.4 Επίπεδα oxLDL στον ορό.....	41
6.3 Στατιστική Ανάλυση.....	43
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
7.1 Χαρακτηρισμός του δείγματος.....	44
7.2 Ανίχνευση ολεανολικού και ουρσολικού οξέος.....	45
7.3 Αντιοξειδωτική δύναμη μαστίχας Χίου.....	47
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μαστίχα Χίου, αποτελεί ένα ελληνικό φυσικό προϊόν που χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα λόγω των ευεργετικών της επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vivo* και *in vitro* αποδίδονται στην υψηλή περιεκτικότητα του προϊόντος σε τερπενοειδή, ωστόσο αυτές δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα στον άνθρωπο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ανίχνευση συστατικών της μαστίχας Χίου στο πλάσμα υγιών εθελοντών καθώς και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δύναμης του ορού αίματος ύστερα από την πρόσληψη μαστίχας Χίου.

Στη μελέτη συμμετείχαν 17 υγιείς άνδρες εθελοντές, οι οποίοι έλαβαν αναλυτικές οδηγίες υιοθέτησης διατροφής χαμηλής σε αντιοξειδωτικά για 5 ημέρες πριν την έναρξη της δοκιμής. Έπειτα από 12ωρη νηστεία, όλοι οι εθελοντές έλαβαν από στόματος 10g φυσικής μαστίχας Χίου με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στους χρόνους 0 (αμέσως πριν την κατανάλωση μαστίχας), 0.5, 1, 2, 4, 6, και 24 ώρες μετά την κατανάλωση. Μετά από κάθε αιμοληψία έγινε απομόνωση ορού και πλάσματος, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Στα δείγματα του πλάσματος πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του ολεανολικού οξέος, ενός τριτερπενίου με ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (GC- MS). Στα δείγματα του ορού μετρήθηκαν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού με προσθήκη θεικού χαλκού (CuSO_4), καθώς και τα επίπεδα της oxLDL με την τεχνική της sandwich ELISA.

Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς ανιχνεύθηκε κατακόρυφη αύξηση του ολεανολικού και του ισομερούς ουρσολικού οξέος στο πλάσμα των εθελοντών, ήδη από την 1η ώρα μετά την κατανάλωση μαστίχας Χίου. Στατιστικά σημαντική βρέθηκε η αύξηση της αντίστασης του ορού στην οξείδωση από την 4η ώρα ($402.3\text{sec}\pm 65.0$, $p<0.05$), με μέγιστη αντίσταση στις 6 ώρες μετά την πρόσληψη μαστίχας Χίου ($524.6\text{sec}\pm 62.9$, $p<0.05$). Η αύξηση αυτή παρέμεινε στατιστικά σημαντική ακόμα και 24 ώρες μετά την πρόσληψη του προϊόντος ($424.2\text{sec}\pm 48.0$, $p<0.05$). Σε συμφωνία είναι και τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των επιπέδων της oxLDL στο πλάσμα τα οποία έδειξαν μέγιστη μείωση επίσης 6 ώρες μετά την πρόσληψη.

Συμπερασματικά, η μαστίχα Χίου έχει *in vivo* αντιοξειδωτική δράση. Η δράση αυτή πιθανότατα να οφείλεται στη διάθεση των τερπενοειδών συστατικών της μαστίχας, όπως το ολεανολικό οξύ, στην κυκλοφορία κατόπιν πρόσληψής της. Η μελέτη βιοδιαθεσιμότητας των φυτοχημικών της μαστίχας Χίου, καθώς και των μεταβολιτών τους, κρίνεται απαραίτητη για την περαιτέρω μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων του προϊόντος και την κατανόηση του μηχανισμού δράσης.

ABSTRACT

Chios mastic gum (CMG), is a Greek natural product known for beneficial effects in human health. CMG's strong antioxidant properties in vitro and in vivo are attributed to its high content in terpenoids, but these have not yet been investigated in humans.

The purpose of this study was the detection of CMG components in healthy volunteers and the evaluation of the antioxidant power in blood serum after the consumption of CMG.

Seventeen healthy male volunteers who received detailed instructions on adopting a low antioxidants diet for five days prior, participated in the study. After 12 hours of fasting, all volunteers received 10g of natural CMG suspended in water. Blood samples were received at 0 (just before CMG consumption), 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 hours after CMG consumption. Later, serum and plasma were isolated and stored at -80°C until analysis. Oleanolic acid, a triterpene with strong antioxidant properties, was detected in the plasma samples via gas chromatography-mass spectrometry (GC- MS). Serum samples were oxidized with copper sulfate (CuSO₄), to measure the total serum oxidizability and the levels of oxLDL were measured applying sandwich ELISA.

We detected a sharp increase of oleanolic and ursolic acid isomere in volunteers plasma, 1 hour after the consumption of CMG. A statistically significant increase was found in serum resistance to oxidation after 4 hours (402.3sec ± 65.0, p <0.05), with the maximum resistance found 6 hours after the consumption of CMG (524.6sec ± 62.9, p <0.05). This increase remained significant even 24 hours after the ingestion of the product (424.2sec ± 48.0, p <0.05). As for oxLDL levels, the results are in line, with the maximum reduction shown 6 hours after consumption.

In conclusion, CMG is a natural product with antioxidant properties in vivo as it appears to decrease oxidative stress markers. This effect probably is due to the presence of the terpenoid constituents of mastic, such as oleanolic acid in the blood stream. It is necessary to further study the bioavailability of the phytochemicals of CMG to better understand the biological properties and the underlying mechanisms.

Keywords: Chios mastic gum, clinical trial, oleanolic acid, oxidative stress

ΜΕΡΟΣ Α : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή

Η μαστίχα είναι μια ρητινώδης ουσία που προέρχεται από τον κορμό και τα κλαδιά του Μαστιχοφόρου Σχίνου (ή μαστιχόδενδρου) (Εικόνα 1), ενός φυτού που συναντάται κυρίως στο νότιο τμήμα της Χίου. Η έκκριση της προκαλείται από το χάραγμα του Σχίνου με τη βοήθεια ενός αιχμηρού εργαλείου που λέγεται κεντητήρι, ενώ η όλη διαδικασία αποκαλείται «κέντημα». Από αρχαιότατων χρόνων η μαστίχα Χίου είναι γνωστή για τα ξεχωριστά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της, αλλά και τις ευεργετικές της ιδιότητες.



Εικόνα 1. Τα μαστιχόδενδρα

1.2. Η μαστίχα από την αρχαιότητα έως σήμερα

Υπάρχει πλήθος αναφορών από ιστορικούς της αρχαιότητας στην μαστίχα της Χίου. Ο Ηρόδοτος πρώτος αναφέρθηκε στη μαστίχα Χίου τον 5^ο αιώνα π.Χ., λέγοντας ότι στην αρχαία Ελλάδα μασούσαν το ρητινώδες υγρό που έρρεε από το μαστιχόδενδρο (Σαββίδης, 2000). Ο «πατέρας της φαρμακολογίας» Διοσκουρίδης (40-90 μ.Χ.) αναφέρει τις ευεργετικές ιδιότητες της ρητίνης στη δυσπεψία, στην αναπαραγωγή του αίματος και στο χρόνιο βήχα ενώ για το μαστιχέλαιο αναφέρει ότι θεραπεύει τα εμφανιζόμενα καρκινώματα του στόμαχου, τις κοιλιακές

και δυσεντερικές παθήσεις, τις παθήσεις της μήτρας, τονίζοντας επίσης την καλλυντική και απολυμαντική χρήση του στο δέρμα του προσώπου. Σύμφωνα με κείμενα του Ηρόδοτου και του Διόδωρου από τη Σικελία, η μαστίχα ήταν ένα από τα υλικά ταρίχευσης του ανθρώπινου σώματος, ενώ στην Ρώμη και αργότερα στην Κωνσταντινούπολη χρησιμοποιούνταν οδοντογλυφίδες από ξύλο μασχιχόδενδρου για την υγιεινή του στόματος. Αν και δεν υπάρχουν αξιόπιστες πηγές για την παραγωγή και το εμπόριο του προϊόντος κατά τη Βυζαντινή εποχή (324-1204), η οικονομία της Χίου ήταν αρκετά ακμάζουσα. Οι Γενοβέζοι κατέλαβαν τη Χίο το 1346 μ.Χ. και ίδρυσαν μια εταιρεία, τη «Μαόνα», η οποία είχε ως στόχο να εκμεταλλευθεί εμπορικά την καλλιέργεια της μαστίχας, καθώς λόγω μονοπωλίου ήταν ιδιαίτερος επικερδής (Friedman and Figg, 2000). Αργότερα το 1566, η Χίος κατακτήθηκε από τους Οθωμανούς και πήρε το όνομα Sakiz Adasi δηλαδή το νησί της μαστίχας, ενδεικτικό της αναγνώρισης της μαστίχας Χίου ως ένα πολύτιμο κερδοφόρο προϊόν. Εκείνη την περίοδο η μαστίχα βρέθηκε σε όλες τις αγορές από την Ανατολή μέχρι τη Δύση και οι μαστιχοπαραγωγοί απήλυσαν ιδιαίτερα προνόμια όπως απαλλαγή από φόρους, κατάργηση παιδομαζώματος και δικαίωμα άσκησης της ορθόδοξης πίστης (Ierapetritis, 2010). Κατά τη διάρκεια του βαλκανικού και του Α΄ παγκοσμίου πολέμου (1910-1920), η παραγωγή μαστίχας μειώθηκε σημαντικά. Μετά το Β΄ παγκόσμιο πόλεμο, παρά την αντικατάσταση της από μη φυσικά υποκατάστατα, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως στη ζαχαροπλαστική, την ποτοποιία και τη βιομηχανία.

1.3. Μαστιχοφόρος Σχίνος (ή μαστιχόδενδρο)

Το μαστιχόδενδρο είναι ένας αειθαλής θάμνος ύψους 2-3 μέτρων που μερικές φορές φτάνει και τα 5 μέτρα (Σαββίδης, 2000). Ζει πάνω από 100 χρόνια, ωστόσο από το 70ο έτος περίπου αρχίζει η παρακμή του. Είναι δίοικο είδος, εμφανίζει δηλαδή αρσενικές και θηλυκές ταξιανθίες σε διαφορετικά άτομα. Καλλιεργούνται κυρίως άρρενα άτομα διότι αυτά αποδίδουν περισσότερη ποσότητα αλλά και καλύτερη ποιότητα μαστίχας. Όλα τα όργανα του μαστιχόδενδρου (βλαστός, φύλλα, ρίζες, άνθη, καρποί) διατρέχονται από ρητινοφόρους αγωγούς (σύστημα αγωγών). Η παραγωγή μαστίχας αρχίζει τον 5ο ή 6ο χρόνο, ενώ το μέγιστο της απόδοσης (130-200g) εμφανίζεται από το 12ο μέχρι το 15ο έτος της ηλικίας.

Όσον αφορά τη συστηματική κατάταξη το μαστιχόδενδρο ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae, η οποία αποτελείται από 4 γένη μικρών δένδρων ή θάμνων. Τα γένη αυτά είναι τα *Rhus*, *Cotinus*, *Schinus* και *Pistacia*. Το γένος *Pistacia* προέρχεται από την κεντρική Ασία, σημείο από το οποίο τα διάφορα είδη εξαπλώθηκαν γύρω από την Μεσόγειο και περιλαμβάνει 6 είδη : (α) *P. terebinthus*, (β) *P. atlantica*, (γ) *P. palestina*, (δ) *P. vera*, (ε) *P. chinensis* και (στ) *P. Lentiscus*, εκ των οποίων τα είδη *P. lentiscus* και *P. atlantica* είναι γνωστά από την αρχαιότητα.

Ο Poiret (1809) και ο De Candolle (1825), αναφέρουν ότι τα φυλλάρια του μαστιχόδενδρου είναι πλατειά, όμως υπάρχουν και άλλα είδη με πολύ στενότερα φυλλάρια. Έτσι εισάγεται η λέξη «κλώνος», που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις διάφορες μορφές μαστιχόδενδρων με βάση παρόμοια γνωρίσματα όπως το σχήμα των φύλλων και του βλαστού, τις μηχανικές ιδιότητες του φλοιού και την ποιότητα της μαστίχας (Browich K , 1987) . Έως τώρα έχουν αναφερθεί 5 κλώνοι που φέρουν τοπικά ονόματα: μαυρόσκοινος (ή λαγκαδιώτης), βότομος, βιγλιώτης (ή μαρουλόσκοινος ή μαρουλιώτης ή καλλιμασιώτης), κρεμεντινός και λιβανός.

Στο βλαστό, τα φύλλα και τη ρίζα του μαστιχόδενδρου απαντώνται οι ρητινοφόροι αγωγοί οι οποίοι προστατεύονται εξωτερικά από τόξα σκληροεγχυματικών ινών (Σαββίδης, 2000). Πιο συγκεκριμένα στο βλαστό και τη ρίζα οι ρητινοφόροι αγωγοί υπάρχουν στο φλοίομα και αποτελούνται από πολυάριθμα κύτταρα τα οποία περιέχουν άφθονα σκοτεινά κοκκία ή με φαινολικά συστατικά. Στα φύλλα (λέπια) που προστατεύουν τους οφθαλμούς (μπουμπούκια), οι ρητινοφόροι αγωγοί εμφανίζονται ήδη από τα πολύ νεαρά στάδια ανάπτυξής τους και βρίσκονται στον κεντρικό μίσχο και στους μικρότερους μίσχους των επιμέρους φυλλαρίων. Οι καλά ανεπτυγμένοι ρητινοφόροι αγωγοί των φύλλων, παράγουν ρητίνη η οποία δρά ως εντομοαπωθητικό, ενισχύοντας έτσι την προστασία που παρέχουν στα μπουμπούκια. Για την διευκόλυνση της ροής της ρητίνης μέσα στον αγωγό τα φύλλα περιέχουν κύτταρα με φαινολικές ενώσεις, οι οποίες απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία αποτρέποντας έτσι την υπερθέρμανση και το πήξιμο της ρητίνης.

Όλοι οι ρητινοφόροι αγωγοί του μαστιχόδενδρου σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο σύστημα , το οποίο συγκρατεί νερό στους ιστούς προστατεύοντάς το από την αφυδάτωση. Σε περίπτωση τραυματισμού του φυτού, παρατηρείται έκκριση ρητίνης και χυμού, εκ των οποίων ορισμένη ποσότητα του μίγματος εξατμίζεται ενώ η εναπομείνουσα ποσότητα βοηθάει στην επούλωση του τραύματος.

Η διαδικασία δημιουργίας ενός ρητινοφόρου αγωγού ξεκινά με τη διεύρυνση του μεσοκυττάριου χώρου ομάδας κυττάρων στο δευτερογενές φλοίομα. Η ανάπτυξη γίνεται σχιζογενώς, δηλαδή ο ιστός σχίζεται στην περιοχή των μεσοκυττάρων χώρων και εκκρίνεται ρητίνη σε δύο στάδια. Αρχικά, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των επιμέρους συστατικών των επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τους ρητινοφόρους αγωγούς και έπειτα διαλύεται το κυτταρικό τοίχωμα (λύση) οπότε και απελευθερώνονται τερπενικά συστατικά στο εσωτερικό του αγωγού. Τα συστατικά των κυττάρων, τα υπολείμματα των κυτταρικών τοιχωμάτων, ακόμα και ολόκληρα κύτταρα δημιουργούν μια άμορφη μάζα, η οποία αποτελεί το πρόδρομο υλικό της ρητίνης.

1.4. Η συγκομιδή της μαστίχας

Η μαστίχα παράγεται τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο, ενώ αν το επιτρέπουν οι συνθήκες, η παραγωγή συνεχίζεται και τον Οκτώβριο (Σαββίδης, 2000). Η συλλογή της γίνεται βάσει νόμου από τις 15 Ιουλίου μέχρι τις 15 Οκτωβρίου, ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη παραγωγή της ρητίνης.

Προκαταρκτικές εργασίες: Της συγκομιδής της μαστίχας προηγείται απομάκρυνση των φυτών γύρω από το δένδρο, καθαρισμός, ισοπέδωση με κοκκινισμένο ασπρόχωμα και πάτημα, ώστε να παραλαμβάνονται πιο εύκολα οι σταγόνες της μαστίχας. Απαραίτητο είναι το ασπρόχωμα να αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο δεν επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την καθαρότητα της μαστίχας, διότι σε άλλη περίπτωση η μαστίχα σκουραίνει και χάνει την εμπορική της αξία (μαυρομάστιχο).

Κέντημα (ρήγιασμα) (Εικόνα 2): Η παραλαβή της μαστίχας γίνεται με ένα ειδικό εργαλείο, το «κεντητήρι», που τραυματίζει τον φλοιό του βλαστού. Οι τομές (κεντήματα), λαμβάνουν χώρα από τις αρχές Ιουλίου μέχρι το τέλος Αυγούστου. Αναλόγως με το μέγεθος και την ηλικία του δένδρου αλλάζει και ο αριθμός των τομών. Το κέντημα γίνεται περίπου 2 φορές την εβδομάδα για 5-6 εβδομάδες. Η στερεοποίηση (πήξιμο) της μαστίχας διαρκεί 10-20 μέρες με συμμάχους τον αέρα και την χαμηλή θερμοκρασία.



Εικόνα 2. Κέντημα

Πρώτη συλλογή: Μετά τις 15 Αυγούστου και εφόσον έχουν γίνει 6-10 κεντήματα, γίνεται η πρώτη συλλογή, με ένα άλλο ειδικό εργαλείο το «τιμητήρι». Πρώτα συλλέγεται η χοντρή

μαστίχα και ακολουθούν η μαστίχα που έχει πήξει στον κορμό του δένδρου (δάκρυα) (Εικόνα 3), καθώς και αυτή που κρέμεται από τα κλαριά (φλισκάρια).

Δεύτερη συλλογή (κεντιά): Το τελικό μάζεμα γίνεται μετά τις 15 Σεπτεμβρίου, όπου συλλέγεται όλη η μαστίχα από τον κορμό και το έδαφος.

Καθαρισμός μαστίχας: Αρχικά, πραγματοποιείται κοσκίνισμα για την απομάκρυνση του χώματος και των ξερών φύλλων. Έπειτα, η μαστίχα πλένεται με κρύο νερό και σαπούνι και απλώνεται σε σκιερό μέρος για να στεγνώσει. Τέλος, οι κόκκοι της μαστίχας καθαρίζονται από τυχόν εναπομείναντα ξένα σώματα (τσιμπημα). Μετά από αρκετά διαδοχικά κοσκινίσματα η μαστίχα είναι έτοιμη για την τελική ταξινόμηση.



Εικόνα 3. Δάκρυα Μαστίχας

1.5. Φυσικές ιδιότητες

Όταν εκκρίνεται, η μαστίχα είναι παχύρρευστη, κολλώδης και διαυγής (Σαββίδης, 2000). Έπειτα από 15-20 μέρες, εφόσον παραμείνει στο έδαφος ή στο δένδρο, η μαστίχα στερεοποιείται λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη συλλογή της. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στην μερική εξάτμιση του αιθέριου ελαίου και στον πολυμερισμό των συστατικών της ρητίνης. Η πυκνότητα της μαστίχας είναι 1.06 και ο βαθμός οξύτητάς της 50-75.

Με την πάροδο του χρόνου παρατηρούνται μεταβολές και στο χρώμα της ρητίνης που ξεκινά από υποκίτρινο ή ωχρο πράσινο, και έπειτα από 12-18 μήνες μετατρέπεται σε κιτρινωπό, πιθανότατα λόγω οξείδωσης. Όσον αφορά στη γεύση, είναι αρχικά υπόπικρη, ενώ αργότερα η πικράδα εξαφανίζεται.

1.6. Χημική σύσταση

1.6.1. Μαστιχέλαιο

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μαστιχελαίου στη ρητίνη, παρατηρείται κατά την έκκριση της (17-20%), ενώ μόλις μετά από τρεις μέρες η συγκέντρωση μειώνεται στο 14% (Σαββίδης, 2000). Η ψύξη της μαστίχας μπορεί να καθυστερήσει την μείωση αυτή.

1.6.2. Τερπένια

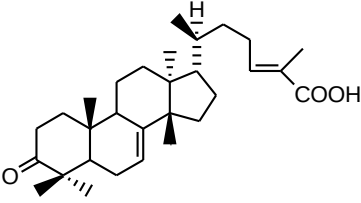
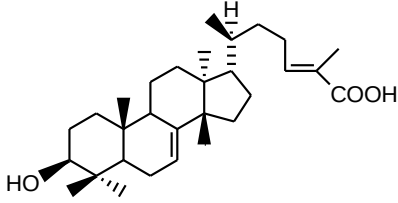
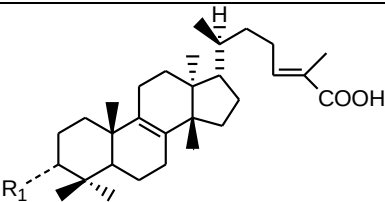
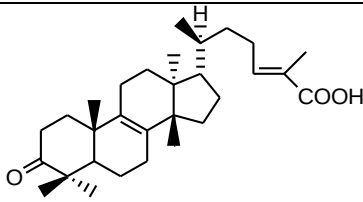
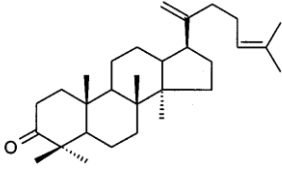
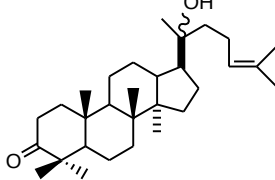
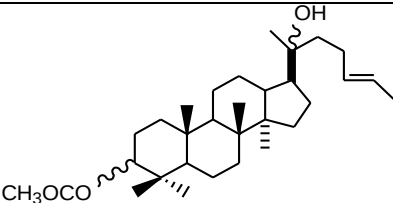
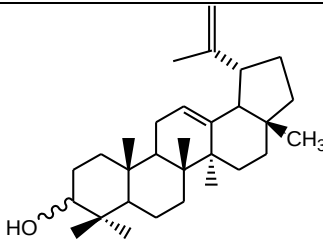
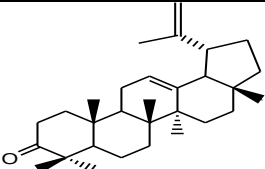
Τα αιθέρια έλαια και οι ρητίνες περιέχουν μεγάλη ποικιλία τερπενίων. Πιο συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια περιέχουν πτητικά και χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια, ενώ οι ρητίνες μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενίων.

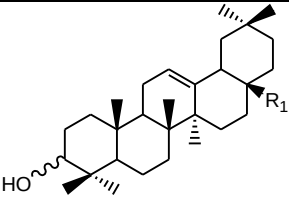
Τερπένια στη μαστίχα Χίου (Σχήμα 2): μαστιχαδιενονικό οξύ, ισο-μαστιχαδιενονικό οξύ, ολεανονικό οξύ, τιρουκαλλόλη, (8R)-3β,8-διυδροξυ-πολυποδα-13E,17E,21-τριένιο, β-αμυρόνη, β-αμυρίνη, ολεανονική αλδεΐδη, γερμανικόλη, λουπεόλη, διπτεροκαπρόλη, 3-οξυ-28-νορολεαν-12-έννη, 3-οξυ-28-νορλουμ-20(29)-έννη, 3-οξυ-δαμμαρα-20(21),24-διέννη, (8R)-3-οξυ-8-υδροξυπολυποδα-13E,17E,21-τριέννη, 28-υδροξυ-β-αμυρόνη, (20S)-3β-ακετοξυ-20-υδροξυδαμμαρ-24-έννη, 3β-υδροξυ-μαλαβαρικά-14(26),17E,21, τριέννη, μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ, μαστιχαδιενολικό οξύ, 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, 3-O-ακετυλ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ (Paraschos et al, 2007; Andrikopoulos et al, 2003; Papageorgiou et al, 1997).

Τερπένια στο μαστιχέλαιο: α-θουτζένιο, α-πινένιο, φενχένιο, καμφένιο, εξανάλη, β-πινένιο, σαμπινένιο, βερμπενένιο, μυρκένιο, δ-3-καρένιο, α-φελλανδρένιο, 1,4 κινεόλη, α-τερπινένιο, λεμονένιο, 1,8-κινεόλη, β-φελλανδρένιο, 2-πεντυλο-φουράνιο, cis-οκιμένιο, εποξειδίο του οκιμενίου, γ-τερπινένιο και trans-οκιμένιο, 2-βινυλο-3,5-διμεθυλοφουράνιο, π-κυμένιο, τερπινολένιο και 2-οκτανόλη, οκτανάλη, ο-κυμένιο, 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη, 2-εννεανόνη, εννεανάλη, μεθυλο-ο-κρεσόλη, καμφοραλδεΐδη, περιλλένιο, δευδρο-π-κυμένιο, α-κοπαένιο, καμφόρα, πινοκαμφόρα, λιναλοόλη, οξικός λιναλυλεστέρας, δ-καδινένιο, οξικός βορνυλεστέρας, β-καρυοφυλλένιο, τερπινεν-4-όλη, 2-ενδεκανόνη, μυρτενάλη, trans-σαμπινόλη, trans-περιλλυλική αλκοόλη, trans-π-μενθα-2,8-διεν-1-όλη, οξικός χρυσανθενυλεστέρας, α-διυδρο-π-κυμεν-8-όλη, α-χουμουλένιο, καρβόνη, σαντανόλη, νεράλη, cis-περιλλυλική αλκοόλη, βερμπενόνη, γ-μουουρολένιο, α-τερπινεόλη, βορνεόλη, πιπεριτόνη, ναφθαλένιο, α-μουουρολένιο, γερανιάλη, α-διυδρο-κυμεν-8-όλη, cis-ανηθόλη, μυρτενάλη, trans-ανηθόλη, trans-καρβεόλη, π-κυμεν-8-όλη, 6,10-διμεθυλο-ενδεκα-5,9-διεν-2-όνη, κουμινυλική αλκοόλη,

οξείδιο του καρνοφυλλενίου, ανησαλδεύδη, μεθυλο-ευγενόλη, νερολιδόλη, cis-μεθυλο-ισοευγενόλη, trans-μεθυλο-ισοευγενόλη, διμυρκένιο βερατραλδεύδη (Magiatis et al, 1999)

Η μεγάλη ποικιλία τερπενίων που απαντώνται στη μαστίχα Χίου, προϋποθέτει έναν τεράστιο αριθμό ενζύμων για τη βιοσύνθεση τους. Η βιοσύνθεση όλων αυτών των μορίων απαιτεί μεγάλα ποσά ηλιακής ενέργειας, γι αυτό και το μαστιχόδενδρο ευδοκίμει μόνο στο μεσογειακό οικοσύστημα.

 Μαστιχαδιενονικό οξύ	 Μαστιχαδιενολικό οξύ
 $R_1=OH$, 3-Επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ $R_1=OCOCH_3$, 3-Ο-Ακετυλο-2-επι-μαστιχαδιενολικό οξύ	 Ισομαστιχαδιενονικό οξύ
 Δαμμαραδιενόνη	 Υδροξυδαμμαρενόνη
 3-Ακετοξυ-υδροξυδαμμαρενόνη	 Λουπεόλη
	

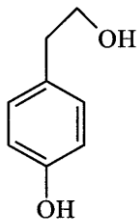
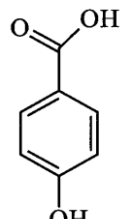
Nor-λουπεόλη	
	β -Αμυρίνη R1 $\rightarrow$ CH ₃ Nor- β -αμυρίνη R1 $\rightarrow$ H Ολεανολικό οξύ R1 $\rightarrow$ CHO

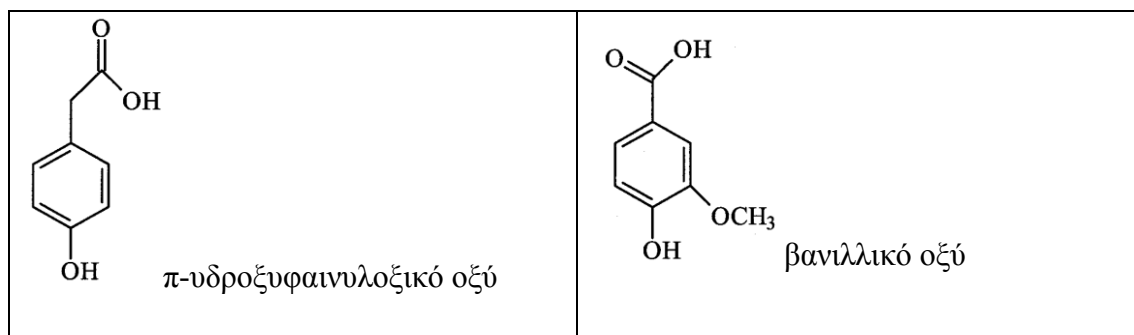
Σχήμα 1. Τριτερπένια της ρητίνης *Pistacia lentiscus*

1.6.3. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και η δομή τους μπορεί να είναι απλή, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, μέχρι εξαιρετικά πολύπλοκη, όπως είναι οι ταννίνες. Οι πολυφαινόλες είναι εν μέρει υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των τροφίμων. Η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και ποτών εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες.

Πολυφαινόλες στη μαστίχα Χίου: Το 2002, στα φύλλα του μαστιχόδενδρου προσδιορίζονται οι παρακάτω πολυφαινόλες: γαλλικό οξύ, 5-*O*-γαλλουΐλ-, 3,5-*O*-διγαλλουΐλ- και 3,4,5-*O*-τριγαλλουΐλ- κινινικό οξύ, (-) κατεχίνη, μυρισετίνη 3-*O*-ρουτινοσίδη και ραμνοσίδη, κερκετίνη 3-*O*-γλυκοσίδη, δελφινιδίνη 3-*O*-γλυκοσίδη και κυανιδίνη 3-*O*-γλυκοσίδη (Romani et al, 2002). Το 2004 προσδιορίζεται η παρουσία πολυφαινολών και στη ρητίνη με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας-μάζας (GC-MS) (Kaliora et al, 2004). Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται οι πολυφαινόλες τυροσόλη (375ng/g), π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (136ng/g), π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ (107ng/g) και βανιλλικό οξύ (41ng/g). Επίσης, υπάρχουν ίχνη γαλλικού οξέος και trans-κινναμικού οξέος.

 τυροσόλη	 π-υδροξυβενζοϊκό οξύ
---	---



Σχήμα 2. Πολυφαινόλες της ρητίνης

1.7. Τα προϊόντα της μαστίχας

Τσίχλα: Η τσίχλα ΕΛΜΑ, ήταν ανέκαθεν το πλέον αντιπροσωπευτικό προϊόν μαστίχας. Ως συνώνυμο της αυθεντικότητας, άντεξε στο πέρασμα του χρόνου, σηματοδοτώντας την προσήλωση στην παράδοση και στις αξίες της πρώτης Ελληνικής Μαστίχας (ΕΛ.ΜΑ).

Μαστιχέλαιο: Το Μαστιχέλαιο παράγεται μέσω απόσταξης της φυσικής μαστίχας με ατμό. Είναι 100% φυσικό προϊόν και περιέχει μία εξαιρετική ποικιλία θεραπευτικών & αρωματικών συστατικών. Μέσω της ίδιας διαδικασίας απόσταξης παράγεται επίσης το υδατικό διάλυμα μαστίχας (Μαστιχόνερο). Το μαστιχέλαιο, είναι ένα ρητινώδες υγρό, με υποκίτρινο χρώμα και χαρακτηριστική οσμή. Αποτελεί βασικό συστατικό σε προϊόντα υγείας και περιποίησης: αντισηπτικές κρέμες, αντιβακτηριδιακά διαλύματα, προϊόντα στοματικής υγιεινής και περιποίησης σώματος. (<http://www.gummastic.gr/>)

Μαστιχόνερο: Είναι ένα φυσικά αρωματισμένο νερό το οποίο μεταφέρει το αυθεντικό άρωμα μαστίχας και όλες τις ευεργετικές της ιδιότητες, καθώς μικρή ποσότητα μαστιχελαίου είναι διαλυμένη σε αυτό. Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, την ενυδάτωση και την περιποίηση του προσώπου, ενώ συνίσταται και για χρήση στη μαγειρική, στην ζαχαροπλαστική και την αρτοποιία και ποτοποιία.

Κολοφώνιο: Παραλαμβάνεται από τη μαστίχα μέσω απλής απόσταξης με νερό και χρησιμοποιείται για την παρασκευή χειρουργικών νημάτων τα οποία απορροφώνται από τον οργανισμό χωρίς να απαιτείται αφαίρεσή τους. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων κλπ.

2. ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Η σπουδαιότητα της μαστίχας από αρχαιοτάτων χρόνων οδήγησε τους σύγχρονους ερευνητές στην περαιτέρω έρευνα για τις διατροφοφαρμακευτικές της επιδράσεις. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, η μαστίχα έχει ευρέως μελετηθεί για τις πιθανές θεραπευτικές της ιδιότητες έναντι διαφόρων ασθενειών.

2.1. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Την δεκαετία του 1980, αναφέρθηκε για πρώτη φορά η μαστίχα Χίου ως πιθανός βοηθητικός παράγοντας για την θεραπεία του έλκους του δωδεκαδάκτυλου. Διπλά τυφλή κλινική μελέτη σε 38 ασθενείς με έλκος του δωδεκαδάκτυλου έδειξε ότι η από στόματος λήψη 1g μαστίχας/ ημέρα για δύο εβδομάδες, ήταν ικανή να ανακουφίσει από τα συμπτώματα του 80% από αυτούς. Επιπλέον, αποδείχθηκε και ενδοσκοπικά η επούλωση στο 70% των ασθενών που έλαβαν τη μαστίχα Χίου, έναντι μόλις 22% αυτών που έλαβαν εικονικό φάρμακο (Al-Habbal et al, 1984). Το βακτήριο *Helicobacter pylori* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της γαστρίτιδας, του γαστρικού και δωδεκαδακτυλικού έλκους ενώ μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του στομάχου και λέμφωμα. Όσον αφορά την επίδραση της μαστίχας Χίου στην μορφολογία του *H. Pylori*, φαίνεται ότι επάγει μορφολογικές ανωμαλίες, καθώς και τον κατακερματισμό των κυττάρων του (Marone et al, 2001). Πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι η μαστίχα Χίου αναστέλλει την φλεγμονή προκαλούμενη από το *H. Pylori*, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων *in vitro* (Choli-Papadopoulou et al, 2011). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται από κλινική μελέτη σε ασθενείς που πάσχουν από μόλυνση με *H. Pylori*. Πενήντα-δύο ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες εκ των οποίων η Α ομάδα έλαβε θεραπεία με χαμηλή δόση μαστίχας Χίου, η Β ομάδα υψηλή δόση μαστίχας, η Γ ομάδα παντοπραζόλη και χαμηλή δόση μαστίχας και η Δ ομάδα παντοπραζόλη, αμοξυκιλλίνη και κλαριθρομυκίνη για 10 μέρες. Παρατηρήθηκε εκρίζωση του *H. Pylori* σε 4/13 ασθενείς της ομάδας Α, 5/13 ασθενείς της ομάδας Β, και 10/13 ασθενείς της ομάδας Δ. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μαστίχα Χίου έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *H. Pylori* (Dabos et al, 2010). Ομοίως, φαίνεται ότι η πρόσληψη 0.75 mg μαστίχας ημερησίως για τρεις μήνες μπορεί να μειώσει τις αποικίες του *H. Pylori* στο στομάχι, ενώ ως πιο δραστικό συστατικό της μαστίχας αναδείχθηκε το ισομαστιχαδιενολικό οξύ (Paraschos et al, 2007). Στον αντίποδα, οι Louhglin et al, δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική μείωση του *H. Pylori* σε μολυσμένα ποντίκια μετά από χορήγηση μαστίχας (4g/ μέρα για 7 μέρες) (Louhglin et al, 2003). Σε πιλοτική μελέτη σε ανθρώπους φάνηκε ότι η πρόσληψη 1g μαστίχας Χίου 4 φορές την ημέρα για 14 ημέρες απέτυχε να εξαλείψει ή έστω να καταστείλει το *H. Pylori* σε ασθενείς (Bebb et al, 2003). Τα

αντικρουόμενα ευρήματα δεν έχουν εξηγηθεί. Ωστόσο, η πλειοψηφία των σύγχρονων μελετών φανερώνει, ότι η μαστίχα Χίου μπορεί να προλάβει ή/ και να εξαλείψει τα γαστροδωδεκαδακτυλικά έλκη.

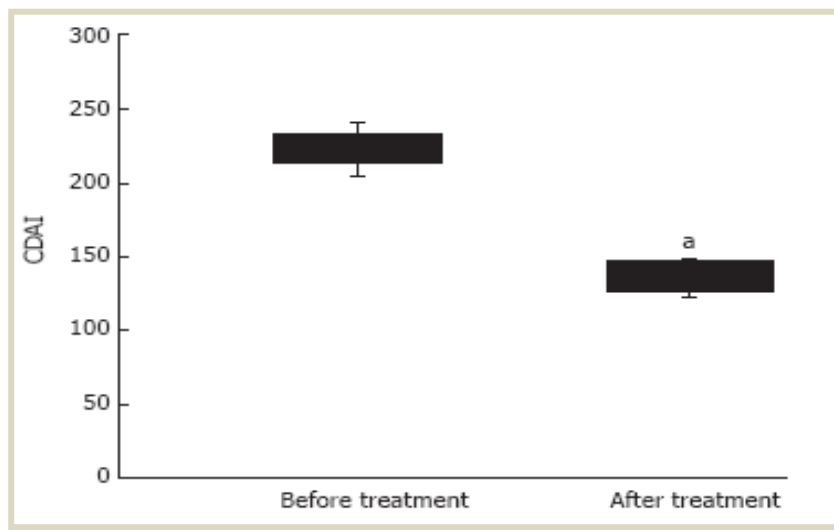
Μελέτες έχουν επίσης διεξαχθεί για τις ευεργετικές επιδράσεις της μαστίχας Χίου σε μια σειρά από μικροοργανισμούς. Σε αυτό το πλαίσιο, *in vitro* μελέτη, φανερώνει ότι το μαστιχέλαιο πιθανότατα λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε α-πινένιο,β-μυρκένιο και λεμονένιο αλλά και της συνεργιστικής δράσης των τερπενίων αυτών, μπορεί να καταπολεμήσει ποικιλία βακτηρίων που προσβάλλουν το πεπτικό σύστημα όπως τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Koutsoudaki et al, 2005).

Η μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως θεραπεία ενάντια στην κακοσμία του στόματος, οπότε σύγχρονες μελέτες επιχειρούν να αξιολογήσουν την συσχέτιση της μαστίχας με την στοματική υγιεινή. Έτσι, μελέτη με διαφορετικούς τύπους μαστίχας χίου (στερεής και υγρής μορφής) έδειξε ότι εμφανίζουν επιλεκτική αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των στοματικών βακτηρίων *Porphyromonas gingivalis* και *Prevotella melaninogenica* (Sakagami et al, 2009). Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση της μάσησης μαστίχας στην στοματική υγιεινή. Αποδείχθηκε ότι η μάσηση μαστίχας για 4 ώρες μπορεί να μειώσει σημαντικά τις βακτηριακές αποικίες στην στοματική κοιλότητα καθώς και τον σχηματισμό πλάκας στα δόντια (Takahashi et al, 2003). Μελέτη του 2006 έδειξε, ότι τοπική εφαρμογή μαστίχας Χίου μπορεί να εξαλείψει το *Porphyromonas gingivalis*, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ουλίτιδας και της στοματικής κακοσμίας (Sterer et al, 2006). Σε επόμενη μελέτη, παραλήφθηκαν δείγματα σίελου από συμμετέχοντες με προχωρημένη τερηδόνα, πριν και μετά την 15λεπτη μάσηση είτε μαστίχας Χίου, είτε εικονικού φαρμάκου (παραφίνη). Το βακτηριακό φορτίο, τα *Streptococcus mutans* και τα *Lactobacilli* αποδείχθηκαν σημαντικά μειωμένα στο σίελο των εθελοντών που μάσησαν μαστίχα Χίου, αναδεικνύοντας την πιθανή χρησιμότητά της στην πρόληψη και την καταπολέμηση της τερηδόνας (Askoy et al, 2007).

2.2. Αντιφλεγμονώδεις και Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Ασθενείς με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους όπως η κυστική ίνωση, το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο ερυθηματώδης λύκος, η ψωρίαση και η νόσος Crohn, έχουν αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης, ο οποίος δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο από τους κλασσικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Πρόσφατα ερευνήθηκε κατά πόσο μπορεί η μαστίχα Χίου να επηρεάσει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Zhou et al, 2009; Mahmoudi et al, 2010). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η στερεή όσο και η υγρή μαστίχα Χίου ανέστειλαν την

παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και η προσταγλαδίνη (PGE₂) από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα (Triantafyllou et al, 2011), κυρίως μέσω της κυτταροτοξικής δράσης της (Braca et al, 2011). Επιπλέον η μαστίχα μπορεί να αναστείλει την πρωτεϊνική κινάση C, οπότε εξασθενεί η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) από τις NADPH οξειδάσες (Triantafyllou et al, 2011), ευρήματα που αναδεικνύουν τον αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικό ρόλο της μαστίχας. Λόγω της αντιφλεγμονώδους ιδιότητάς της, η μαστίχα Χίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει ή να βελτιώσει τα συμπτώματα αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η νόσος Crohn (CD). Η νόσος Crohn είναι μια χρόνια υποτροπιάζουσα φλεγμονώδης νόσος του εντέρου με άγνωστη αιτιολογία και ανήκει στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ). Παρόλο που η παθογένεση της νόσου είναι ελάχιστα κατανοητή, λοίμωξη, περιβαλλοντικοί παράγοντες, κληρονομικότητα και ανοσολογικές ανωμαλίες έχουν προταθεί ως αιτίες. Στην πρώτη πιλοτική μελέτη που διεξήχθη, φαίνεται ότι η ημερήσια πρόσληψη 2.2g μαστίχας Χίου για ένα μήνα βελτιώνει την κλινική εικόνα ασθενών με νόσο Crohn ήπιας έως μέτριας βαρύτητας (Σχήμα 3). Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή, η στατιστικά σημαντική μείωση δεικτών φλεγμονής ($p < 0.05$), όπως της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), σε συνδυασμό με την αύξηση στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος ($p < 0.05$), καταδεικνύουν τον ευεργετικό ρόλο της μαστίχας στην ΙΦΝΕ. Επίσης, βελτιώθηκε ο δείκτης διατροφικού κινδύνου (NRI), ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την εκτίμηση της διατροφικής κατάστασης (Kaliora et al, 2007a). Η επίδραση της ρητίνης στα απομονωμένα από τους παραπάνω ασθενείς PBMC επιβεβαιώνει τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του προϊόντος (Kaliora et al, 2007b). Η πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε, ότι η χορήγηση 100 mg/kg σκόνης μαστίχας σε αρουραίους με κολίτιδα, μείωσε όλες τις υπεύθυνες για την φλεγμονή κυτοκίνες. Συνεπώς η μαστίχα Χίου θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό ρόλο στη νόσο Crohn, ρυθμίζοντας την οξειδωτική/ αντιοξειδωτική ισορροπία και την φλεγμονή (Gioxari et al, 2011).



Σχήμα 3. Η ενεργότητα της νόσου (CDAI) πριν και μετά από αγωγή με μαστίχα σε 10 ασθενείς με νόσο Crohn. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης (4 εβδομάδες), οι εθελοντές λάμβαναν 2.2g μαστίχας ημερησίως σε μορφή κάψουλας. Οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση). ^a $p < 0.05$. Kaliora et al, 2007a

Σε μελέτη τους οι Qiao et al , απέδειξαν ότι η μαστίχα Χίου μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία φλεγμονωδών νοσημάτων, αφού χορήγησή της σε ποντίκια με αλλεργικό άσθμα μείωσε τα ηωσινόφιλα στους αεραγωγούς, κατέστειλε την υπερ-αποκριτικότητα των αεραγωγών, μείωσε τις χημειοκίνες καθώς και τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες (Qiao et al, 2011).

Λόγω των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της, η μαστίχα Χίου έχει εκτενώς ερευνηθεί για τυχόν καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος συνδέονται με την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου (Anderson et al, 1987). Η LDL είναι ο κύριος μεταφορέας της χοληστερόλης στους ιστούς και ευθύνεται για την εναπόθεση της στον ενδοθηλιακό ιστό, οδηγώντας στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, η οποία είναι ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (Goldstein and Brown, 1992). Υπο παθολογικές συνθήκες υπερλιπιδαιμίας, οξειδωτικό στρες ή/και γενετικές διαταραχές, οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, μετατρέπονται στην οξειδωμένη τους μορφή (oxLDL), και η μεταφορά της χοληστερόλης εκτρέπεται από το φυσιολογικό μονοπάτι προς υπερβολική συσσώρευση στα μακροφάγα του αγγειακού τοιχώματος (Miller et al, 2010). Το γεγονός αυτό προκαλεί διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τη μετανάστευση μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) και αύξηση της διαπερατότητας για τις λιποπρωτεΐνες. Τα PBMC διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, παράγοντας πρωτεΐνες που προκαλούν βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οξείδωση της LDL (Steinberg et al, 1989). Τα

πρώτα *in vitro* δεδομένα φανερώνουν, ότι η μαστίχα μπορεί να παρεμποδίσει την οξείδωση της LDL από 75,3% έως 99,9% με τρόπο δόσοεξαρτώμενο, ενώ αποτελεσματικότερο των διαφορετικών εκχυλισμάτων μαστίχας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνο της μεθανόλης/νερού (Andrikopoulos et al, 2003). Σε επόμενη μελέτη που χρησιμοποιεί το μεθανολικό εκχύλισμα μαστίχας *ex vivo*, παρατηρείται ότι η έκθεση των PBMC σε oxLDL προκαλεί κυτταροτοξικότητα ($60.1 \pm 2.0\%$ επιβίωση), αλλά αυτή αποτρέπεται μετά από προσθήκη εκχυλίσματος μαστίχας ($90.0 \pm 2.4\%$ επιβίωση). Επίσης, η μείωση νέκρωσης των κυττάρων από 73.5% σε 4.04% σηματοδοτεί την αντιοξειδωτική προστασία της ρητίνης. Συγκεκριμένα, η μαστίχα μειώνει την έκφραση του CD36 υποδοχέα της oxLDL στα ενεργοποιημένα μακροφάγα (από $50.3 \pm 2.4\%$ σε $19.3 \pm 3.2\%$), ενώ παράλληλα αναστέλλει τη μείωση των επιπέδων GSH ($p < 0.05$), ενός ενζύμου με κύρια αντιοξειδωτική δράση (Dedoussis et al, 2004). Το 2007, οι Triantafyllou et al, διενεργούν 18μηνη παρέμβαση με μαστίχα Χίου στην οποία συμμετέχουν 133 εθελοντές με υψηλό λιπιδαιμικό προφίλ. Ύστερα από ημερήσια κατανάλωση 5g μαστίχας με τη μορφή εναιωρήματος, οι αιματολογικές εξετάσεις έδειξαν στατιστικά σημαντικές μειώσεις στην ολική χοληστερόλη, στην LDL, στην αναλογία ολικής χοληστερόλης/HDL, καθώς και στις απολιποπρωτεΐνες A-1 και -B ορού ($p < 0.05$). Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι, όταν η πρόσληψη μαστίχας ισούται με 700mg μαστίχας ημερησίως ($N=85$) δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές. Σε μελέτη του 2011, οι Vallianou et al διερεύνησαν την υπολιπιδαιμική δράση του μαστιχελαίου. Η χορήγηση του σε αρουραίους με υπερλιπιδαιμία οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της σύνθεσης χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων ορού. Δοκιμάζοντας τα συστατικά του μαστιχελαίου, φάνηκε ότι το καμφένιο σχετίζεται με την υπολιπιδαιμική του δράση. Η μέγιστη ευεργετική δόση των 30μg/g σωματικού βάρους, οδήγησε σε μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 54,5%, της LDL κατά 54% και των τριγλυκεριδίων κατά 34,5% (Vallianou et al, 2011). Η πιο σύγχρονη μελέτη δείχνει, ότι μετά από οκτώ εβδομάδες λήψης μαστίχας Χίου, η ολική χοληστερόλη μειώθηκε κατά 11,5 mg/dl ($p < 0,05$). Η επίδραση ήταν ισχυρότερη σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς ($BMI > 25$), με μέση μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 13,5 mg / dl ($p < 0.05$) (Kartalis et al, 2015).

Την τελευταία δεκαετία, παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της μαστίχας, του μαστιχέλαιου, και των εκχυλισμάτων τους, έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Η χρόνια φλεγμονή έχει αναγνωριστεί ο παράγοντας κινδύνου για πολλές μορφές καρκίνου στο άνθρωπο. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι ότι η φλεγμονή επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Ενώ τα υψηλά επίπεδα των ελεύθερων ριζών μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου και του DNA, το μονοξειδίο του αζώτου σε χαμηλά επίπεδα παίζει σημαντικό θετικό ρόλο στην

σηματοδότηση των κυττάρων και την απόπτωση. Οι δράσεις της μαστίχας Χίου αφορούν στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της αγγειογένεσης και της φλεγμονώδους απόκρισης. Οι πρώτες μελέτες για την αντινεοπλασματική δράση της μαστίχας πραγματοποιήθηκαν το 2005 και φανερώνουν ότι το εξανικό εκχύλισμα μαστίχας προκαλεί απόπτωση των HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Balan et al, 2005). Επόμενη μελέτη της ίδιας ομάδας σε ποντίκια με καρκίνο του παχέος εντέρου, έδειξε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα μαστίχας Χίου μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου κατά 35%, απουσία τοξικότητας (παρενεργειών) μετά από 35 ημέρες, ενώ επάγει και τον κυτταρικό θάνατο των HCT116. Ωστόσο, από τις μελέτες αυτές δεν αναδείχθηκε ποιο συστατικό (ή συστατικά) του εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας Χίου σχετίζεται με την αναστολή ανάπτυξης του όγκου. Όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη, φαίνεται ότι ο υποδοχέας ανδρογόνων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του. Η χορήγηση μαστίχας Χίου αναστέλλει την έκφραση και τη λειτουργία του υποδοχέα ανδρογόνων (He et al, 2006). Η ίδια ομάδα ανέδειξε έναν ακόμη μηχανισμό δράσης της μαστίχας ενάντια στον καρκίνο του προστάτη. Φαίνεται λοιπόν, πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των PC-3 κυττάρων μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο εξέλιξης μέσω καταστολής της δραστηριότητας του NF-κΒ (He et al, 2007). Σε άλλη μελέτη, εκτιμήθηκε η συνδυαστική δράση της μαστίχας Χίου με το αντικαρκινικό φάρμακο γεμισιταβίνη και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός των δύο μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για τον καρκίνο του παγκρέατος (Huang et al, 2010). Τέλος, φαίνεται ότι και το μαστιχέλαιο καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγει την απόπτωση τους (Moulos et al, 2009; Magkouta et al, 2009).

2.3. Άλλες ιδιότητες

Η διαιτητική τοξικότητα της μαστίχας Χίου σε διάφορες δόσεις (0%, 0.22%, 0.67%, 2%) μελετήθηκε σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους. Έπειτα από 13 εβδομάδες, το σωματικό βάρος ήταν σημαντικά μειωμένο στην ομάδα αρουραίων που έλαβε την υψηλή δόση. Όσον αφορά άλλες βιοχημικές παραμέτρους παρατηρήθηκε αύξηση των ολικών πρωτεϊνών, της λευκωματίνης και της ολικής χοληστερόλης και στα δυο φύλα, ενώ της γ-GTP μόνο στους θηλυκούς. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι χορήγηση μαστίχας σε ποσοστό έως 0.67% δεν προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις (Kang et al, 2007).

Η λειτουργική δυσπεψία είναι μια πάθηση με πολύ υψηλό επιπολασμό σε ολόκληρο τον κόσμο, επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Ανάμεσα στους πιθανούς εμπλεκόμενους μηχανισμούς είναι η ασυνήθης γαστρική κένωση, η σπλαχνική υπερευαισθησία και σήματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Προς το παρόν, οι φαρμακευτικές θεραπείες της

δυσπεψίας είναι περιορισμένες με αποτέλεσμα οι μελέτες να στρέφονται σε άλλες μεθόδους για τη θεραπεία της, όπως τη χρήση βότανων. Η επίδραση της μαστίχας Χίου στη δυσπεψία έχει αποδειχθεί ευεργετική, αφού μπορεί να μειώσει τη συμπτωματολογία της. Μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση μαστίχας Χίου σε ασθενείς με δυσπεψία, οδηγεί σε σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου στο 77% των εθελοντών, σε σύγκριση με βελτίωση συμπτωμάτων του 40% των εθελοντών που έλαβαν εικονικό φάρμακο (Dabos et al, 2010).

Κλείνοντας, η μαστίχα χρησιμοποιείται και στον κλάδο της ιατρικής. Το 1986 παρατηρήθηκε, ότι ο συνδυασμός βενζοΐνης με ένα παρασκεύασμα που περιέχει μαστίχα Χίου (Matisol) αυξάνει την συγκολλητική δύναμη των χειρουργικών ταινιών (Mikhail et al, 1986). Πιο πρόσφατη μελέτη όμως έδειξε, ότι η προσθήκη ή μη μαστίχας Χίου σε χειρουργικές ταινίες δεν παρέχει καμία επιπρόσθετη βοήθεια όταν χρησιμοποιούνται ράμματα. Επομένως η χρήση μαστίχας ήταν απαραίτητη την εποχή που οι χειρουργικές ταινίες ήταν το μόνο μέσο για το κλείσιμο του τραύματος (Yavuzer et al, 2005).

3. ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Όπως αναφέρθηκε, η μαστίχα και το μαστιχέλαιο περιέχουν πληθώρα τερπενίων. Οι περισσότερες έρευνες ασχολούνται με τα μονο- και τριτερπένια, τα οποία φαίνεται να έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντινεοπλασματικές, αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Από τα μονοτερπένια τα πιο γνωστά είναι η γερανιόλη, η περιλλυλ-αλκοόλη, το λεμονένιο, η μινθόλη και το α-πινένιο, ενώ από τα τριτερπένια το ολεανολικό και το ισομερές ουρσολικό οξύ.

3.1 Ταξινόμηση τερπενίων

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα στο μόριό τους (Πίνακας 1).

Αριθμός C	Τερπένιο	Αριθμός C	Τερπένιο
5	ημιτερπένιο	25	επιπεντατερπένιο
10	μονοτερπένιο	30	τριτερπένιο
15	επιτριτοτερπένιο	40	τετατερπένιο
20	διτερπένιο	(5) _n	πολυτερπένιο

Πινάκας 1. Ταξινόμηση Τερπενίων

Με πολυμερισμό του ισοπρενίου σε κατάλληλες συνθήκες μπορεί να πραγματοποιηθεί χημική σύνθεση των τερπενίων. Για το λόγο αυτό τα τερπένια ονομάζονται και ισοπρενοειδή. Η βιοσύνθεσή τους απαιτεί τη μεταβολική οδό του μεβalonικού οξέος ή εναλλακτικά, την οδό φωσφογλυκεριναλδεΐδης/πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού του μεβalonικού, αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις σύνθεσης όλων των τερπενίων (Taiz and Zeiger, 2006).

3.2. Ευεργετικές δράσεις μονοτερπενίων

Η φλεγμονή είναι μια πολύπλοκη βιολογική απόκριση των ιστών ενάντια σε επιθετικούς παράγοντες όπως, παθογόνα, ερεθιστικούς παράγοντες ή κατεστραμμένα κύτταρα. Χωρίζεται σε οξεία ή χρόνια φλεγμονή, και περιλαμβάνει ένα καταρράκτη χημικών αντιδράσεων που αφορά το τοπικό αγγειακό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που βρίσκονται στον τραυματισμένο ιστό. Οξεία φλεγμονή είναι η αρχική απόκριση και χαρακτηρίζεται από αυξημένη κίνηση του πλάσματος και των κυττάρων του ανοσοποιητικού, π.χ. ουδετερόφιλα και μακροφάγα, από το αίμα προς τον τραυματισμένο ιστό. Η χρόνια φλεγμονή αφορά μια προοδευτική αλλαγή των κυττάρων που υπάρχουν στο σημείο της φλεγμονής, και χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη καταστροφή και επούλωση του τραυματισμένου ιστού (Ferrero-Miliani et al, 2006).

Τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία των δερματικών παθήσεων. Δύο από τα βασικά συστατικά των αιθέριων ελαίων, η 1,8-κινεόλη και το λιμονένιο φαίνεται να έχουν ανασταλτική δράση έναντι στο ένζυμο 5-λιποξυγενάση, το οποίο μετατρέπει τα απαραίτητα λιπαρά οξέα σε λευκοτριένια, τις προφλεγμονώδεις ενώσεις των

κυττάρων του μυελού των οστών (Frum et al, 2006). Πολλές μελέτες αφορούν την αντιφλεγμονώδη δράση της 1,8-κινεόλης. Στα ζωικά μοντέλα η επαγωγή φλεγμονώδους νόσου του εντέρου γίνεται με χρήση τρινιτροβενζολοσουλφονικού οξέος (TNBS). Αρσενικοί αρουραίοι έλαβαν 200 και 400 mg/kg 1,8-κινεόλης είτε πριν (24 ώρες, 2 ώρες), είτε μετά (2 ώρες, 24 ώρες) την επαγωγή κολίτιδας με το TNBS. Η χορήγηση του TNBS οδηγεί σε εκτεταμένη φλεγμονή που σχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας της μυελουπεροξειδάσης (MPO), ενός δείκτη της ουδετεροφιλικής διήθησης. Μόνο τα ζώα που έλαβαν την 1,8-κινεόλη πριν την χορήγηση TNBS έδειξαν σημαντική μείωση της φλεγμονής καθώς και μείωση του βάρους του φλεγμονώδους ιστού (Rachmilewitz et al, 1989). Επιπρόσθετα, σε νεότερη μελέτη, η χορήγηση 1,8-κινεόλης μείωσε σημαντικά και την δραστηριότητα της MPO, υποδεικνύοντας τον πιθανό προληπτικό της ρόλο στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Santos et al, 2004). Η 1,8-κινεόλη είχε ευεργετικά, βλεννολυτικά αποτελέσματα όταν χορηγήθηκε σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα σε μια διπλά τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική δοκιμή (Juergens et al, 2003). Σε προηγούμενη μελέτη της ίδιας ομάδας, καταγράφηκε η δόσοεξαρτώμενη και ανασταλτική επίδραση της 1,8-κινεόλης στον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α), στην ιντερλευκίνη 1 β (IL-1 β), στην λευκοτριένη B₄ (LTB₄) και την θρομβοξάνη B₂, δείχνοντας ότι θα μπορούσε να είναι κατάλληλη για την θεραπεία φλεγμονών του αεραγωγού και άλλων διαταραχών σχετιζόμενων με τα στεροειδή (Juergens et al, 1998). Επιπλέον, ο Juergen και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν την αντιφλεγμονώδη δράση του μονοτερπενίου L-μενθόλης και του αιθέριου ελαίου μέντας σε ανθρώπινα μονοκύτταρα *In vivo*. Διαπίστωσαν ότι, η L-μενθόλη μείωσε σημαντικά τους φλεγμονώδεις παράγοντες LTB₄ ($64,4 \pm 10\%$), PGE₂ ($-56,6 \pm 8\%$), και IL-1 β ($-64,2 \pm 7\%$), ενώ το αιθέριο έλαιο μέντας παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα στον LTB₄ και την IL-1 β . Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την πιθανή θεραπευτική δράση της L-μενθόλης ενάντια σε χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως το βρογχικό άσθμα, η ελκώδης κολίτιδα και η αλλεργική ρινίτιδα (Juergens et al, 1998).

Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν, ότι οι απόγονοι μητέρων με διαβήτη κύησης έχουν επτά φορές περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν επιπλοκές στην υγεία τους στη μετέπειτα ζωή τους. Μελέτη σε αρουραίους έδειξε ότι, η χορήγηση συμπληρώματος μονοτερπενίου θυμοκινόνης στις μητέρες με διαβήτη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού, παρέχει στο νεογνό προστατευτική επίδραση στη μετέπειτα ζωή του, μέσω διατήρησης αποτελεσματικής ανοσοαπόκρισης των T λεμφοκυττάρων (Badr et al, 2011)

Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν αναδείξει τις χημειοπροστατευτικές δράσεις της περιλλυλ-αλκοόλης και του λεμονένιου έναντι σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του παγκρέατος και του δέρματος (Chen et al, 2015). Επιπλέον,

αρκετές μελέτες έχουν εμφανίσει την περιλλυλ-αλκοόλη ως ισχυρό χημειοθεραπευτικό παράγοντα κατά του καρκίνου του παγκρέατος, του μαστού, του ήπατος και του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, μια δίαιτα που περιείχε 2-4% περιλλυλ-αλκοόλη (1.2 - 2.4 g / kg ανά ημέρα) οδήγησε σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης του όγκου σε χάμστερ στα οποία είχαν εγχυθεί με παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, ενώ στο 20% των ζώων παρατηρήθηκε πλήρης οπισθοχώρηση της νόσου (Stark et al, 1995). Σε μελέτη τους το 2007, οι Wiseman et al, εξέτασαν την πιθανή ευεργετική δράση χορήγησης συνδυασμού περιλλυλ-αλκοόλης και γερανιόλης σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος και διαπίστωσαν ότι, όταν δίνονται σε συνδυασμό αυτές οι δύο ενώσεις παρουσιάζουν συνεργιστική επιπρόσθετη αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων (Wiseman et al, 2007).

Το λεμονένιο, ένα μονοτερπένιο που συναντάμε στα εσπεριδοειδή, φαίνεται να παρουσιάζει χημειοπροστατευτικές και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες, έναντι διαφορετικών τύπων όγκων σε ζωικά μοντέλα και κλινικές δοκιμές (de Cássia da Silveira e Sá et al, 2013). Το 2010, οι Yoon et al, διεξήγαγαν μελέτη με σκοπό να επαληθεύσουν τις βιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις του λεμονενίου έναντι στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και μεσολαβητών της φλεγμονής σε RAW 264.7 μακροφάγα. Διαπίστωσαν, ότι το λεμονένιο έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση αφού ανέστειλε την προκαλούμενη από τη φλεγμονή παραγωγή NO και PGE₂, ενώ κατάφερε να μειώσει την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF-α, IL-1β, και IL-6 με τρόπο δόσοεξαρτώμενο (Yoon et al, 2010) .

Το α-πινένιο, ένα μονοτερπένιο που απομονώνεται από το αιθέριο έλαιο του πεύκου, εμφανίζει επίσης αντικαρκινικές ιδιότητες. Σε πρόσφατη μελέτη, το α-πινένιο κατάφερε να αναστείλει την κυτταρική ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων *in vitro*, ενώ όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια με όγκο προκαλούμενο από μόσχευμα *in vivo*, το μέγεθος και το βάρος του όγκου τους μετά από δύο εβδομάδες χορήγησης ήταν σαφώς μικρότερο, σε σχέση με την ομάδα που έλαβε εικονικό φάρμακο. Επίσης, η ιστολογική εξέταση έδειξε πολύ περισσότερα νεκρά και αργά-αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα στην ομάδα που έλαβε τη θεραπεία με α-πινένιο (Chen et al, 2015).

Η μινθόλη από την άλλη, έχει αντιβακτηριδιακή δράση αφού μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη gram-, gram+ βακτηρίων και ζυμών (Al-Bayati et al, 2009; Işcan et al, 2002; Quintas et al, 2015). Επίσης κλινικές δοκιμές υποστηρίζουν τη χρήση της μινθόλης ως αντιμικροβιακό συστατικό σε στοματικά διαλύματα. (Van Leeuwen et al, 2014).

Τέλος, τα μονοτερπένια ως βιοδραστικά συστατικά των αιθέριων ελαίων, φαίνεται να έχουν αντιοξειδωτική δράση αφού είναι ικανά να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Schwarz et al, 1996; Choi et al, 2000).

3.3 Ευεργετικές δράσεις τριτερπενίων

Στο δυτικό κόσμο, οι άνθρωποι καταναλώνουν κατά μέσο όρο 250 mg τριτερπενίων τη μέρα, τα οποία στο μεγαλύτερο βαθμό προέρχονται από φυτικά έλαια, δημητριακά, φρούτα και λαχανικά. Την τελευταία δεκαετία υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις ιδιότητες των τερπενίων, ιδιαίτερα της ικανότητας τους να μειώνουν τη χοληστερόλη. (Mohammad Saleem, 2009)

Το ουρσολικό οξύ είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης των φυτών, βρίσκεται συνήθως στον φλοιό του κορμού, στα φύλλα και τις φλούδα των φρούτων (π.χ. μήλο, ρίγανη, θυμάρι) και επιδεικνύει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα αφού μπορεί να «καθαρίσει» τις ελεύθερες ρίζες και τα ανιόντα υπεροξειδίου (Ramachandran and Prasad, 2008). Η πρώτη μελέτη που αφορά την επίδραση του ουρσολικού οξέος στο καρδιαγγειακό σύστημα, διεξήχθη το 2003 από τους Somona et al, και αποκάλυψε ότι η χορήγησή του μπορεί να μειώσει τον καρδιακό ρυθμό σε υπέρτασικούς αρουραίους κατά 32% (Somona et al, 2003). Μελέτη του 2007, ερεύνησε την χορήγηση ουρσολικού οξέος σε αρουραίους με τεχνητά επαγόμενο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Διαπίστωσαν ότι το ουρσολικό οξύ είναι ικανό να αποτρέψει τις μεταβολές αλλά και να αποκαταστήσει την ενζυμική δραστηριότητα σε φυσιολογικά επίπεδα, αποδίδοντας του έτσι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Senthil et al, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μελετήθηκαν περαιτέρω σε δύο νεότερες μελέτες, στις οποίες το ουρσολικό οξύ ήταν σε θέση να σταθεροποιήσει τα επίπεδα πολλών δεικτών και συστατικών του αίματος, ενώ επιπλέον εμφάνισε αντι-αποπρωτικές ιδιότητες στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα (Radhiga et al, 2012; Radhiga et al, 2012). Οι επιδράσεις του ουρσολικού οξέος στην αθηροσκλήρωση αποτελούν αντικείμενο αντικρουόμενων απόψεων στον επιστημονικό κόσμο. Κάποιες μελέτες δείχνουν δυνητικά ωφέλιμα αποτελέσματα, ενώ άλλες δυνητικά αρνητικές συνέπειες (Tannock, 2011). Για παράδειγμα, οι Ullevig et al, ανέφεραν την αναστολή της δυσλειτουργίας των μονοκυττάρων και την επιβράδυνση της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης σε διαβητικά ποντίκια, ενώ οι Messner et al διαπίστωσαν μια διέγερση του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας μετά από χορήγηση ουρσολικού οξέος σε ποντίκια (Ullevig et al, 2011; Messner et al, 2011). Τέλος, ο Kim et al, ανέδειξαν ότι το ουρσολικό οξύ είναι ικανό να κάνει τα αιμοπετάλια πιο επιρρεπή στη συσσωμάτωση, οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή από άτομα με προδιάθεση για καρδιαγγειακά επεισόδια (Kim et al, 2014).

Η λουπεόλη είναι ένα τριτερπένιο που εμφανίζεται σε λαχανικά (λάχανο, πιπεριά, αγγούρι, ντομάτα), φρούτα (ελιά, σύκο, μάνγκο, φράουλα) και φαρμακευτικά φυτά. Μελέτες σε ποντίκια και αρουραίους έδειξαν, ότι η λουπεόλη και τα παράγωγα της (λινελαϊκό, οξικό και παλμιτικό) παρουσιάζουν υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση από το φάρμακο ινδομεθακίνη που χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση της φλεγμονής (Sudhahar et al, 2008 ; Lima et al,

2007). Σε μελέτη των Vasconcelos et al, ελέγχθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση της λουπεόλης σε ποντίκια με βρογχικό άσθμα. Είναι γνωστό ότι το άσθμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών που συνδέεται με την ανοσοαπόκριση των Th2 κυττάρων. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, η χορήγηση λουπεόλης προκαλεί σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων αλλά και των ηωσινόφιλων κυττάρων του βρογχο-κυψελιδικού υγρού. Επίσης, κατάφερε να μειώσει την παραγωγή βλέννας και την γενική φλεγμονή στους πνεύμονες (Vasconcelos et al, 2008). Συνεχίζοντας με τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των τριτερπενίων, φαίνεται ότι πρόσληψη μίγματος α- και β-αμυρίνης 1:1 για 7 μέρες σε ποσότητα ίση προς 3mg/Kg ΣΒ ημερησίως, μειώνει τα επίπεδα της IL-1 ($p < 0.05$) και τείνει να αυξάνει αυτά της αντιφλεγμονώδους IL-10 στο κόλον μυών με TNBS κολίτιδα (Vitor et al, 2009).

Τα τριτερπένια είναι ιδιαίτερα δημοφιλή και για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, κυρίως λόγω της επιλεκτικής τοξικής δράσης τους ενάντια στα καρκινικά κύτταρα ενώ παράλληλα παραμένουν αβλαβή για τα φυσιολογικά κύτταρα (Zhang, et al, 2014). Τα τριτερπένια σαπωνίνες απαντώνται σε μια μεγάλη ποικιλία φυτών (π.χ. σόγια, φασόλια, μπιζέλια, τσάι, σπανάκι) και εμφανίζουν ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων αποχρεμπτικές, αντιφλεγμονώδεις, γαστροπροστατευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Πρόσφατη επισκόπηση αναδεικνύει ότι οι σαπωνίνες χαρακτηρίζονται επίσης και από ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών ιδιοτήτων. Μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό και να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ πολλές από αυτές έχουν αντιφλεγμονώδεις και κυτταροπροστατευτικές δράσεις στα φυσιολογικά κύτταρα (Koczurkiewicz et al, 2015).

Το ολεανολικό οξύ βρίσκεται σε αφθονία στο τζίνσενγκ, καθώς και στην ελιά από την οποία πήρε και το όνομά του. Το χαρακτηρίζει μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων όπως αντιφλεγμονώδεις, καρδιο- , ηπατο- και γαστρο- προστατευτικές, αντικαρκινικές, αντικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αντιπαρασιτικές, αναλγητικές και επουλωτικές (Shanmugam et al, 2014). Έτσι, το ολεανολικό οξύ φαίνεται να αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης από τα INS-1 832/13 παγκρεατικά κύτταρα ($p < 0.05$) (Teodoro et al, 2008). Μελέτη σε μύες με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, έδειξε ότι η χορήγηση ολεανολικού οξέος (100 mg/kg/day) για 2 βδομάδες, ήταν ικανή να αναστρέψει την υπεργλυκαιμία κατά 60%. Ενδιαφέρον είναι ότι η μείωση διατηρήθηκε και μετά την παύση χορήγησης ολεανολικού στον επανέλεγχο μετά από τέσσερις εβδομάδες (Zeng et al, 2012). Όσον αφορά τις αντικαρκινικές ιδιότητες του ολεανολικού οξέος, αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν την αντι-πολλαπλασιαστική του δράση έναντι στον καρκίνο του μαστού (Allouche et al, 2011; Gu et al, 2012). Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες εστιάζουν στα συνθετικά παράγωγα του ολεανολικού οξέος (CDDO, CDDO-Me, CDDO-Im, CDDO-EA,

CDDO-TFEA), τα οποία φαίνεται να έχουν επίσης αντικαρκινικές ιδιότητες. Το γλοιοβλάστωμα και το νευροβλάστωμα είναι κύριοι όγκοι του εγκεφάλου που αποκρίνονται λίγο, ή καθόλου σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Μελέτη αναδεικνύει ότι τα παράγωγα ολεανολικού CDDO, CDDO-Me και CDDO-Im μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των κυττάρων γλοιο- και νευρο- βλαστώματος (Gao et al, 2007). Σημαντική είναι η συνεισφορά των παραγώγων του ολεανολικού και ενάντια στον καρκίνο του παγκρέατος, αφού χορήγηση 7,5 mg/κιλό CDDO-Me ημερησίως για 4 εβδομάδες, κατάφερε να μειώσει σημαντικά τον όγκο του καρκίνου σε ποντίκια με ξενομόσχευμα (Jutooru et al, 2010). Τέλος, μελέτη του 2011 έδειξε ότι χορήγηση CDDO και CDDO-Me απέτρεψε την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη σε ποντίκια (Gao et al, 2011).

4. IN VIVO ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το ανθρώπινο σώμα έχει ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας (ενζυμικό και μη), το οποίο δύναται να εξουδετερώσει τις βλαβερές συνέπειες των ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, δεσμεύοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να «ζευγαρώσουν» το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μορφών νεοπλασίας (Kinnula and Crapo, 2004), των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Singh and Jialal, 2006), της αθηροσκλήρωσης (Upston et al, 2003), της νόσου Αλτσχάιμερ (Smith et al, 2000), της γνωσιακής έκπτωσης (Guidi et al, 2006), της νόσου Πάρκινσον (Bolton et al, 2000), της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος (Arteel, 2003), των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (Ramakrishna et al, 1997), και συνολικά της γήρανσης (Hyun et al, 2006). Η προστασία ενάντια στις ελεύθερες ρίζες μπορεί να ενισχυθεί με άφθονη πρόσληψη διαιτητικών αντιοξειδωτικών. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις, ότι οι τροφές που περιέχουν αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι μείζονος σημασίας για την πρόληψη των ανωτέρω ασθενειών. Οι σύγχρονοι επιστήμονες συμφωνούν ότι ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός μακροπρόθεσμα, έναντι της πρόσληψης μεμονωμένων ουσιών. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής λειτουργώντας προληπτικά ή/ και αναβλητικά στην έναρξη των εκφυλιστικών παθήσεων. Επιπλέον, θα μπορούσαν δυνητικά να συμβάλλουν στην μείωση του κόστους υγειονομικής περίθαλψης. Η in

νίνο χορήγηση αντιοξειδωτικών, είτε ως συστατικά τροφίμων είτε μεμονωμένα, γίνεται συνήθως σε ζωικά πρότυπα καθώς αυτά έχουν το πλεονέκτημα της διαθεσιμότητας του ίδιου τους του ιστού προς ανάλυση.

4.1 Η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας των αντιοξειδωτικών του πλάσματος να ανάγουν το FE(III) (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)

Αποτελεί μια από τις πιο ταχείες δοκιμές και είναι πολύ χρήσιμη για αναλύσεις ρουτίνας (Umesh et al, 2010). Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται με μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης που προκαλείται από το σχηματισμό ιόντων δισθενούς σιδήρου από το αντιδραστήριο FRAP που περιέχει TPTZ (2,4,6-τριπυρίδυλο-s-τριαζίνη) και $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 593 nm.

4.2 Μέτρηση της γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική θειόλη που παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάλυση, στον μεταβολισμό και σε ένα σύστημα μεταφοράς στους νεφρούς που περιλαμβάνει την επαναπορρόφηση των αμινοξέων. Προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες, τα υπεροξείδια και άλλες τοξικές ενώσεις (Sapakal et al, 2008). Ανεπάρκεια της GSH στον οφθαλμικό φακό οδηγεί στο σχηματισμό καταρράκτη.

4.3 Μέτρηση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSHPx)

Η GSHPx είναι ένα σεληνοένζυμο, τα 2/3 του οποίου εμφανίζονται στο κυτοσόλιο και το 1/3 στα μιτοχόνδρια (ήπαρ). Καταλύει την αντίδραση των υδροϋπεροξειδίων με την γλουταθειόνη, ώστε να σχηματιστεί δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG) και το προϊόν αναγωγής του υδροϋπεροξειδίου. Η GSHPx εμφανίζεται σε όλους τους ιστούς, ως τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα: την κυτταρική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, την εξωκυτταρική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, το φωσφολιπιδικό υδροϋπεροξειδίο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και τη γαστρεντερική υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξετάζεται κυρίως σε ασθενείς με οξειδωτικό στρες οποιασδήποτε αιτιολογίας, αφού η χαμηλή της δραστηριότητα αποτελεί μια από τις πρώτες ενδείξεις της διαταραχής της οξειδωτικής/ αντιοξειδωτικής ισορροπίας (Paglia and Valentin, 1967; Yang et al, 1984).

4.4 Μέτρηση της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GSt)

Η GSt θεωρείται ότι παίζει φυσιολογικό ρόλο στην έναρξη της αποτοξίνωσης των αλκυλιωτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακολογικών δραστικών ενώσεων. Αυτά τα ένζυμα, καταλύουν την αντίδραση τέτοιων ενώσεων με την -SH ομάδα της γλουταθειόνης, εξουδετερώνοντας έτσι τις ηλεκτρονιόφιλες περιοχές τους και καθιστώντας τα προϊόντα αυτά πιο υδατοδιαλυτά. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως περιγράφει από τον Jocelyn το 1972. Το μίγμα της αντίδρασης (1ml) αποτελείται από 0.1 N φωσφορικού καλίου (pH 6.5), 1 nM/L GSt, 1 M/L l-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο ως υπόστρωμα και την κατάλληλη ποσότητα κυτοσολίου (6 mg πρωτεΐνης/ ml). Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 5 min και η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του υποστρώματος. Τέλος μετράται η απορρόφηση φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.

4.5 Μέτρηση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Αυτή η μέθοδος περιγράφηκε από τους McCord και Fridovich (1969) και μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δύναμης ενός δείγματος, η οποία εκτιμάται στο λύμα ερυθροκυττάρων. Σε 50 μ L του λύματος προστίθενται 75 mM ρυθμιστικού διαλύματος (Tris-HCL, pH 8,2), 30 mM EDTA και 2 mM πυρογαλλόλης. Η αύξηση στην απορρόφηση καταγράφεται στα 420 nm για 3 min με φασματοφωτόμετρο. Η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας είναι η καταστολή κατά 50% του ρυθμού αυτοοξειδωσης της πυρογαλλόλης, όπως προσδιορίζεται από την αλλαγή στον λόγο απορρόφηση/ λεπτό στα 420 nm. Η δραστηριότητα της SOD εκφράζεται ως μονάδες/mg πρωτεΐνης.

4.6 Μέτρηση της καταλάσης (CAT)

Η δραστηριότητα της καταλάσης μπορεί να προσδιοριστεί σε λύμα ερυθροκυττάρων με τη μέθοδο Aebi (Aebi, 1984). Πενήντα μικρόλιτρα λύματος προστίθενται σε μια κυψελίδα που περιέχει 2 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7.0) και 1 mL H₂O₂ (30 mM). Η δραστηριότητα μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 240 nm για 1 min. Μια μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ισούται με αποικοδόμηση 1 mmol H₂O₂/min και εκφράζεται ως μονάδες/ mg πρωτεΐνης.

4.7 Η δοκιμασία της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR)

Η πανταχού παρούσα γλουταθειόνη (GSH), που είναι η πιο συχνά ευρισκόμενη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα εμζυμικών αντιδράσεων. Μια σημαντική λειτουργία της είναι να χρησιμεύει ως αναγωγικό στις οξειδοαναγωγές, μια λειτουργία που οδηγεί στο σχηματισμό δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG). Ένα σύστημα ικανό να μειώνει την GSSG ανακαλύφθηκε στο ήπαρ, με το ένζυμο GR να εμπλέκεται άμεσα στη μείωση.

4.8 Μέτρηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (LPO)

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μια αυτοκαταλυτική διαδικασία και ένα συνηθισμένο επακόλουθο του κυτταρικού θανάτου. Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκαλέσει ιστικές βλάβες στη φλεγμονή, τον καρκίνο καθώς και τοξικότητα των ξενοβιοτικών και γήρανση. Η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) είναι ένα από τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, σχηματίζεται κατά την οξειδωτική τους τροποποίηση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και έτσι θεωρείται ένας αξιόπιστος δείκτης.

4.9 Μέτρηση της οξείδωσης της LDL

Η απομονωμένη LDL επώαζεται με διάλυμα 5 mM CuSO₄ στους 37 °C. Η οξείδωση η επαγόμενη από το Cu²⁺ τερματίζεται με την προσθήκη βουτυλιωμένου υδρόξυτουολίου (BHT 6 μM). Στο τέλος της επώασης, ο βαθμός οξείδωσης της LDL προσδιορίζεται με μέτρηση της παραχθείσας ποσότητας λιπιδικών υπεροξειδίων και από τον φωτομετρικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARs) στα 532 nm, χρησιμοποιώντας τη μηλονική διαλδεϋδη (MDA) ως πρότυπη ουσία (Buege and Aust, 1978; El-Saadani et al, 1989).

4.10 Μέθοδος της οξειδωτικής τροποποίησης του πλάσματος με την επίδραση θεικού χαλκού (total serum oxidizability assay)

Τα δείγματα ορού οξειδώνονται με θεικό χαλκό, όπως περιγράφεται από τους Aurrekoetxea et al (2010). Αρχικά, τα δείγματα ορού αραιώνονται κατάλληλα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος και στον χρόνο 0 προστίθενται ο θεικός χαλκός σε τελική συγκέντρωση 16μM. Τα δείγματα ορού με τον θεικό χαλκό επώαζονται στους 37°C για 3 έως 8 h (αναλόγως τους αντιοξειδωτικού περιεχομένου στον ορό) και καταγράφεται η απορρόφηση κάθε 3 min. Το αποτέλεσμα της οξείδωσης των λιπιδίων του ορού είναι ο σχηματισμός συζυγών διενίων

υπεροξειδίου που απορροφούν στα 245nm. Στο τέλος, η διαφορά στην απορρόφηση μετράται συναρτήσει του χρόνου και συγκεκριμένα του χρόνου "lag-time", δηλαδή του χρόνου αντίστασης στην οξειδωση πριν αυτή λάβει χώρα σύμφωνα με τους Esterbauer and Jurgens, (1993).

5. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Η τροφή περιλαμβάνει εκτός από τα θρεπτικά συστατικά, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, βιταμίνες, μέταλλα τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας στον οργανισμό, και άλλες ουσίες όπως φαινολικά συστατικά, τερπένια και άπεπτους πολυσακχαρίτες. Επειδή αυτές οι ενώσεις δεν συμμετέχουν στον μεταβολισμό, παραμένουν ως επί το πλείστον αμετάβλητες, οπότε διαθέτουν πολλές και διαφορετικές λειτουργίες. Οι περισσότερες μη θρεπτικές ουσίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση ή/και δυνατότητα διαμόρφωσης των λειτουργιών των πρωτεϊνών, σε διαφορετικό όμως βαθμό (Kanazawa, 2008). Η αντιοξειδωτική δράση αναφέρεται στην ικανότητα τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και συνδέεται στενά με τη μείωση των εκφυλιστικών παθήσεων όπως οι νεοπλασίες, η αθηροσκλήρωση και ο διαβήτης. Επίσης, με την πρόληψη ασθενειών σχετίζεται και η δυνατότητα ρύθμισης των λειτουργιών των πρωτεϊνών που περιλαμβάνει διαμόρφωση της δραστηριότητας των ενζύμων, των μεταφορέων, των υποδοχέων και πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος. Ωστόσο, οι μη θρεπτικές ουσίες, δεν είναι απαραίτητες στο μεταβολισμό της ενέργειας, οπότε ως επί το πλείστον εκκρίνονται και πάλι στον εντερικό αυλό όπου απορροφώνται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησής τους τα περισσότερα μη θρεπτικά συστατικά υποβάλλονται σε σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ ήθεικές ενώσεις, γεγονός που τα καθιστά υδατοδιαλυτά, με αποτέλεσμα να αποβάλλονται μέσω του εντερικού αυλού. Ως εκ τούτου, μια πολύ μικρή ποσότητα συζευγμένων ουσιών ανιχνεύεται στο αίμα, με τη συγκέντρωσή τους να είναι συνήθως μικρότερη από 1 mM (Hollman et al, 1997; Manach et al, 2005). Η τύχη των μη-θρεπτικών ουσιών στο έντερο μας βοηθά να προσδιορίσουμε εκείνες που εμφανίζουν ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία. Έχουν έως σήμερα ταυτοποιηθεί επτά κύριες κατηγορίες: 1. ενώσεις που διατηρούν μερικώς τη βιοδραστηριότητά τους μετά τη σύζευξη όπως η κερκετίνη που διατηρεί τη δομή κατεχόλης και δεν χάνει τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (Kanazawa et al, 2006), 2. ενώσεις ανθεκτικές στη σύζευξη, 3. ενώσεις που παραμένουν αμετάβλητες αφού περάσουν τη διαδικασία της εντερικής απορρόφησης, με παράδειγμα τη νομπιλετίνη που ανήκει στις φλαβονόνες των εσπεριδοειδών. Εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και αντικαρκινική δράση καθώς έχει μια μεθυλική ομάδα στην ομάδα υδροξυλίου της η οποία απαγορεύει την πρόσβαση στα ένζυμα σύζευξης (Kohno et al, 2001; Murakami et al, 2007). 4. ενώσεις που μετασχηματίζονται στη βιοδιαθέσιμη μορφή

τους στο έντερο, όπως η ισοφλαβόνη νταϊντζεΐνη που μετατρέπεται σε εκουόλη από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Η εκουόλη έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα από την αρχική ισοφλαβόνη (Fujioaka et al, 2004), 5. ενώσεις οι οποίες γίνονται βιοδραστικές από ενδογενή ένζυμα αποσύζευξης, 6. ενώσεις που παρουσιάζουν βιοδραστικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και 7. ενώσεις που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα χωρίς να απορροφηθούν, όπως οι άπεπτοι πολυσακχαρίτες, β-γλυκάνες.

Τα μη θρεπτικά συστατικά κυκλοφορούν στο αίμα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και έπειτα απεκκρίνονται με τα ούρα. Ο χρόνος ημιζωής τους κυμαίνεται μεταξύ 2 και 23 ωρών, διάστημα πολύ μικρό σε σύγκριση με τα θρεπτικά συστατικά οπότε δεν συσσωρεύονται και ως εκ τούτου δεν έχουν παρενέργειες.

Αρκετές μελέτες βιοδιαθεσιμότητας έχουν γίνει για πληθώρα προϊόντων, οπότε καταδεικνύεται η σημαντικότητά της. Σε πρόσφατη μελέτη των Kanellos et al, φάνηκε ότι 17 από τα 25 φυτοχημικά που περιέχει η κορινθιακή σταφίδα είναι βιοδιαθέσιμα στο αίμα υγιών εθελοντών (Kanellos et al, 2013). Τα τριτερπένια είναι μεγάλα μόρια και η διείσδυσή τους στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να είναι δύσκολη. Ωστόσο, μελέτη φανερώνει ότι περνούν στα κύτταρα και συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες στο ήπαρ. Επιπλέον, η χρόνια πρόσληψη προϊόντων πλούσιων σε τριτερπένια αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα και τη συσσώρευσή τους στο αίμα και τους ιστούς (Yin et al, 2012).

Σκοπός

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση συστατικών της μαστίχας Χίου στο πλάσμα υγιών εθελοντών καθώς και η διερεύνηση δεικτών αντιοξειδωτικής δύναμης στον ορό υγιών εθελοντών μετά από πρόσληψη εναιωρήματος μαστίχας Χίου.

ΜΕΡΟΣ Β : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 Στρατολόγηση και προετοιμασία εθελοντών

Στη μελέτη συμμετείχαν 17 υγιείς άνδρες εθελοντές. Τα κριτήρια ένταξης των εθελοντών στη μελέτη ήταν: α) να έχουν ηλικία μεταξύ 20-40 ετών και β) να έχουν φυσιολογικό Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ : $18.5-24.9 \text{ kg/m}^2$). Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν : α) ΔΜΣ > 26 kg/m^2 , β) η κατάχρηση αλκοόλ ή ναρκωτικών ουσιών , γ) η λήψη φαρμακευτικής αγωγής ή συμπληρωμάτων βιταμινών και ανόργανων στοιχείων , δ) Η χορτοφαγική ή μακροβιοτική διατροφή πριν ή/και κατά τη διάρκεια της μελέτης και ε) η ύπαρξη ασθένειας του πεπτικού όπως ΙΦΝΕ, πεπτικό έλκος και καρκίνος πεπτικού. Από όλους τους εθελοντές ελήφθη γραπτή συγκατάθεση για την εθελοντική συμμετοχή τους στην παρέμβαση (Παράρτημα Ι).

Αιματολογικές εξετάσεις

Πριν την έναρξη της μελέτης όλοι οι εθελοντές έκαναν πλήρεις αιματολογικές εξετάσεις για να διαπιστωθεί εάν είναι υγιείς.

Διατροφικές συστάσεις

Όλοι οι εθελοντές έλαβαν αναλυτικές οδηγίες ώστε να ακολουθήσουν διατροφή χαμηλή σε αντιοξειδωτικά για 5 ημέρες πριν την έναρξη της μελέτης (Παράρτημα ΙΙ).

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Στην αρχή της παρέμβασης έγινε σε όλους τους συμμετέχοντες μέτρηση ανθρωπομετρικών στοιχείων με καταγραφή ύψους (cm) και σωματικού βάρους (kg) ενώ εκτιμήθηκε και η σύσταση του σώματος με τη συσκευή tanita SC-330S.

Πρωτόκολλο Παρέμβασης

Κατόπιν ραντεβού οι εθελοντές έφθασαν, συνήθως σε ομάδες των δύο ατόμων, νωρίς το πρωί στο εργαστήριο διατροφής έπειτα από 12ωρη νηστεία. Ακολούθησε η λήψη από στόματος 10 γραμμαρίων φυσικής μαστίχας Χίου με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Στη συνέχεια, έγινε

συλλογή δειγμάτων αίματος σε χρόνους 0 (πριν την κατανάλωση μαστίχας), 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 ωρών και συλλογή δειγμάτων ούρων σε χρόνους 0, 4, 6 και 24 ωρών μετά την πρόσληψη της Μαστίχας. Κατά την διάρκεια της 6ωρης παρέμβασης οι εθελοντές παρέμειναν νηστικοί, ενώ έως την 24ωρη μέτρηση ακολούθησαν την προτεινόμενη διατροφή χαμηλή σε αντιοξειδωτικά.

6.2 Εργαστηριακές μετρήσεις

6.2.1 Προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων

Κατά την εκάστοτε αιμοληψία το δείγμα που παρελήφθη από τους εθελοντές, τοποθετήθηκε σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκια (vacutainer tubes), δύο από τους οποίους περιείχαν αντιπηκτικό. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο συσκευή (4°C, 3000 rpm, 10'), ώστε να διαχωριστεί το δείγμα στα επιμέρους κλάσματά του. Μετά την φυγοκέντρωση, παρελήφθη από τα vacutainer tubes που περιείχαν αντιπηκτικό το κλάσμα του πλάσματος και μοιράστηκε σε 7 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες (eppendorf tubes). Απο τα vacutainer tubes που δεν περιείχαν αντιπηκτικό παρελήφθη το κλάσμα του ορού (7x eppendorfs). Τέλος, όλα τα eppendorfs αποθηκεύτηκαν στον καταψύκτη (-80°C) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους συμμετέχοντες της μελέτης, καθώς και για όλες τις χρονικές στιγμές.

6.2.2 Αέρια χρωματογραφία μάζας (GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, GC-MS)

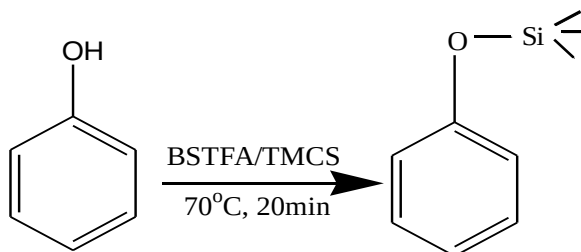
Προετοιμασία και παραγωγοποίηση του Δείγματος

Αντιδραστήρια-Όργανα

Οξικός αιθυλεστέρας, 0.1M HCl , 3-4-υδροξυφαινυλ-1-προπανόλη (εσωτερικό πρότυπο), BSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide], αναδευτήρας Vortex, φυγόκεντρος, φυγοκεντρικός εξατμιστήρας Speedvac, υδρόλουτρο

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας των προς προσδιορισμό συστατικών μέσω της δημιουργίας τριμεθυλσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Σχηματισμός τριμέθυλσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS

Αναλυτική πορεία

Σε σωληνάκι 10 ml τοποθετήσαμε : 1) 500μl πλάσμα, 2) 3 ml οξικό αιθυλεστέρα, 3) 50 μl 0.1M HCl. Ακολούθησε ανατάραξη με vortex για 1 min και φυγοκέντρηση 3000g/10min. Έπειτα μεταφέρουμε την υπερκείμενη φάση σε γυάλινο σωληνάκι και προσθέτουμε 50μL εσωτερικό πρότυπο (I.S.). Μετά από ανακίνηση σε vortex το τοποθετούμε στο speedvac στους 40 °C. Πριν εξατμιστεί εξ' ολοκλήρου μεταφέρουμε το δείγμα σε φιαλίδια GC και ξεπλένουμε το προηγούμενο σωληνάκι με 300 μL οξικού αιθυλεστέρα. Εξατμίζουμε έως ξηρού. Το ξηρό υπόλειμμα παραγωγοποιείται με προσθήκη BSTFA-TMCS (250μL). Ακολουθεί ανακίνηση με vortex και επώαση για 20 min στους 70°C. Στη συνέχεια τα δείγματα αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και αναλύονται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.

Αέρια χρωματογραφία μάζας (GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, GC-MS)

Αντιδραστήρια και όργανα

Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (GC-MS), Αέριο ήλιο, Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0,25 mm x 250 μ).

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, το υλικό επικάλυψης του εσωτερικού της στήλης και τη ροή του φέροντος αερίου.

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα 1μL παραγωγοποιημένου δείγματος εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο με λόγο σχάσης (split ratio) 1:20. Το δείγμα διαχωρίζεται με χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 MS (5% φαινυλο- 95% μεθυλοσιλοξάνιο, 30mm x 0,25mm x 250μm). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται υπερκαθαρό ήλιο (99,999%) με ροή 0,6 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς ρυθμίζεται στους 280°C και 300°C αντίστοιχα. Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίζεται ως εξής :

Πίνακας 2. Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου GC / MS

Αρχική	70 °C για 5 λεπτά
1 ^η άνοδος	15 °C / min μέχρι 130 °C
2 ^η άνοδος	4 °C / min μέχρι 160 °C παραμονή σε 160 °C για 15min
3 ^η άνοδος	10 °C / min μέχρι 300 °C
Τελική	παραμονή σε 300 °C για 15min

Για τον προσδιορισμό του ολεανολικού οξέος, χρησιμοποιείται η μέθοδος selective ion monitoring (SIM) GC/MS, που βασίζεται στη παρακολούθηση 2 ή 3 ιόντων σε χρόνο κατακράτησης $\pm 0,05$, του χρόνου κατακράτησης του αντίστοιχου προτύπου. Το ιόν στο οποίο βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός (target ion) συμβολίζεται με T ενώ τα ιόντα που καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας κάθε πολικής φαινόλης στο δείγμα (qualifier ions) συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται (T, Q1, Q2) για το ολεανολικό οξύ έχουν m/z 203, 320, 482.

Η ποσοτικοποίηση με χρήση εσωτερικού προτύπου γίνεται με βάση μία σειρά 9 πρότυπων διαλυμάτων του ολεανολικού οξέος, που περιέχουν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα δείγματα.

6.2.3 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability)

Για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, αναλυτικός ζυγός, vacutainer tube και ογκομετρική φιάλη για την παρασκευή διαλυμάτων, αποσταγμένο νερό, συσκευή Vortex για την ανάδευση και ομογενοποίηση των δειγμάτων και των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και φωτόμετρο ELISA reader (*Biotek PowerWave XS2*). Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και ο οποίος διατηρήθηκε σε καταψύκτη (-80 °C).

Αρχή της μεθόδου για το πρωτόκολλο οξείδωσης ορού

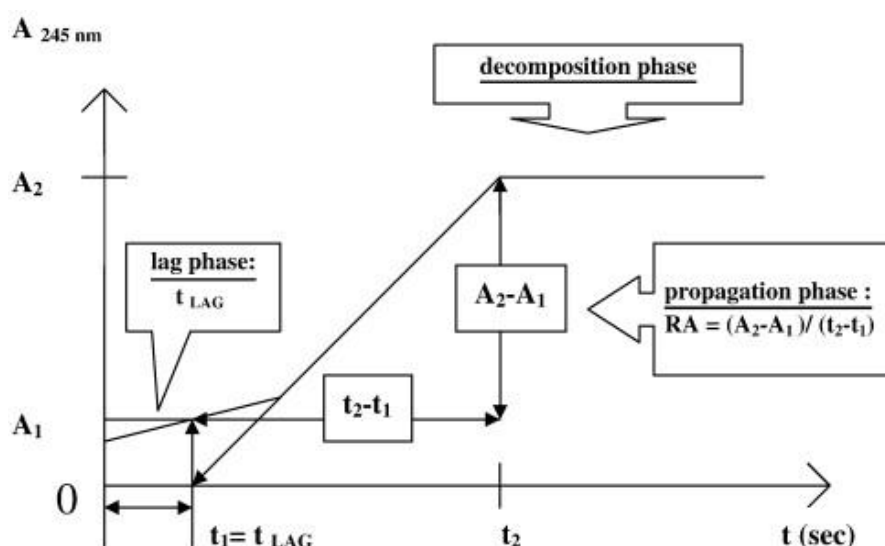
Με το διάλυμα του θεικού χαλκού (CuSO_4) προκαλείται οξείδωση της LDL κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξειδία. Η ανίχνευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime).

Αναλυτική πορεία

Παρασκευάζεται stock διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20mM, για το οποίο ζυγίζονται 0,0125g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (MW=249,68) και διαλύονται σε 2,5mL αποσταγμένο H_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, παρασκευάζεται working διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 200μM, για το οποίο αραιώνεται 1:100 το stock διάλυμα CuSO_4 με αποσταγμένο H_2O . Δηλαδή, λαμβάνονται 20μL και αραιώνονται με αποσταγμένο H_2O έως όγκο 2000μL. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα PBS buffer, για το οποίο αναδιαλύονται σε 1000 mL αποσταγμένου νερού 9g χλωριούχου νατρίου (NaCl), 0,9076g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2408g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ρυθμίζεται το pH στο 7,4. Παρασκευάζεται διάλυμα ορού αραιωμένο 1:12 με PBS buffer. Δηλαδή, λαμβάνονται 5μL ορού και αραιώνονται με PBS έως όγκο 60μL σε eppendorfs των 2mL. Έπειτα, παρασκευάζεται μίγμα CuSO_4 και PBS, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 16μM. Για την πλάκα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία περιείχε 96 θέσεις και απορροφά στο υπεριώδες (ultraviolet, UV) φάσμα ακτινοβολιών,

λήφθηκαν 23mL PBS και προστέθηκαν 2mL CuSO₄. Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 20μL αραιωμένου ορού. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230μL μίγματος PBS-CuSO₄, η πλάκα εισάγεται στο ELISA reader και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245nm για 4h ανά 2min. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού διεξήχθη για όλες τις χρονικές στιγμές που ελήφθη αίμα από τους εθελοντές (0h, 0.5h, 1h, 2h ,4h, 6h, 24h).

Η καμπύλη που προκύπτει μετά από το πρωτόκολλο οξείδωσης ορού είναι της μορφής που φαίνεται στην Εικόνα 4. Καταγράφεται φωτομετρικά η απορρόφηση των παραγόμενων συζυγών διενίων (conjugated diene lipid hydroperoxides, CD) στα 245nm. Η χρονική πορεία της οξείδωσης της LDL παρουσιάζει αρχικά μία φάση κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση (lag-phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των αντιοξειδωτικών του δείγματος, ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, λόγω του σχηματισμού CD (propagation phase) όταν εξαντληθούν τα αντιοξειδωτικά. Η αντίσταση της LDL στην οξείδωση υπολογίζεται σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Η χρονική υστέρηση καθορίζεται γραφικά ως το σημείο τομής των εφαπτομένων των τμημάτων της καμπύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (σημείο στο οποίο άρχισε να αυξάνεται η απορρόφηση). Η μέτρηση περιλαμβάνει την εύρεση του lag time σε δείγματα ορού σε όλες τις χρονικές στιγμές για κάθε εθελοντή. Εάν παρουσιασθεί αύξηση του χρόνου επαγωγής σε σχέση με το χρόνο 0 αμέσως μετά τη λήψη μαστίχας Χίου, ορίζουμε την αναστολή στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL, λόγω της αύξησης των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών.



Εικόνα 4. Κινητική της επαγόμενης από το χαλκό οξείδωσης των λιπιδίων του ορού in vitro. Η τιμή t_{LAG} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών του ορού. Η τιμή RA αντιπροσωπεύει τη μετατροπή των PUFAs σε υδροϋπεροξειδία λίπους (συζευγμένα διένια). A=απορρόφηση, t=χρόνος.

6.2.4 Επίπεδα oxLDL στον ορό

Για τη μέτρηση των επιπέδων της oxLDL στον ορό των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε εξειδικευμένο sandwich Enzyme Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) Kit. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, vacutainer tubes και ογκομετρική φιάλη για την παρασκευή διαλυμάτων, erpendorfs, απιονισμένο νερό, συσκευή Vortex για την ανάδευση και την ομοιογενοποίηση των δειγμάτων και των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και φωτόμετρο ELISA reader (Biotek PowerWave XS2). Τα προαναφερθέντα σετ αντιδραστηρίων διατηρήθηκαν σε ψυγείο (-4 °C). Για την πραγματοποίηση των ανωτέρω μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από τους εθελοντές, όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ο οποίος διατηρήθηκε σε καταψύκτη (-80 °C).

Αρχή της μεθόδου για το πρωτόκολλο της sandwich ELISA

Η τεχνική της sandwich ELISA χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων που δεσμεύονται μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων, ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο (π.χ. αντίσωμα πρόσδεσης και ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο θέσεις σύνδεσης (αντιγονικά επιτόπια) στις οποίες μπορούν να προσδεθούν τα αντισώματα, εφόσον για την εν λόγω τεχνική χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που δρουν ως “sandwich”. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση και την ανίχνευση των αντιγόνων μπορούν να είναι είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως τα αντισώματα πρόσδεσης (capture antibody), με τα οποία είναι ήδη επιστρωμένες οι θέσεις των πλακών (coated plate wells). Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η επαρκής ανίχνευση (detection antibody) και ποσοτικοποίηση ακόμα και μικρών ποσοτήτων του αντιγόνου. Μετά τη δέσμευση του αντιγόνου από τα δύο αντισώματα, που χρησιμοποιούνται ανάλογα με το προς μέτρηση αντιγόνο, ακολουθεί πλύση, ώστε να απομακρυνθεί ότι δεν δεσμεύθηκε από αυτά. Ακολουθεί, συνήθως, η προσθήκη ενός ανιχνευτή (detector) για τη δημιουργία συμπλόκου αντίσωμα-αντιγόνο και ανιχνευτή. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος και προστίθεται κατάλληλο υπόστρωμα με το οποίο λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Η ένταση του χρωματισμένου προϊόντος που προκύπτει είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού μορίου που βρίσκεται στο δείγμα που μετρήθηκε και απορροφά, συνήθως, στα 450nm. Πλεονέκτημα της ανάλυσης αποτελεί το

γεγονός ότι το προς ανάλυση δείγμα δεν απαιτείται να καθαριστεί προηγουμένως και η τεχνική παρουσιάζει υψηλού βαθμού ευαισθησία (Εικόνα 5).

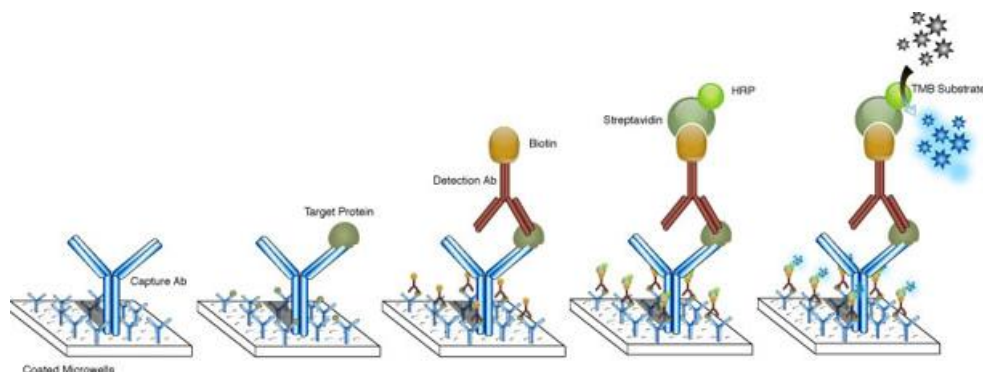
Αναλυτική πορεία

Αφού προετοιμασθούν όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και τα πρότυπα, σύμφωνα με τις υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρείας, τοποθετείται στις, ήδη επιστρωμένες με το αντίσωμα σύλληψης, θέσεις των πλακών κατάλληλη ποσότητα διαλύτη και δείγματος (αραιωμένου ή μη) ή προτύπου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Στη συνέχεια, η πλάκα επώαζεται για 1-2h. Κατόπιν, οι θέσεις της πλάκας πλένονται, ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντιγόνου που δε δεσμεύθηκε. Οι οδηγίες πλύσης μπορούν να ποικίλουν, κυρίως όσον αφορά στον αριθμό των επαναλήψεων που απαιτούνται για την ολοκλήρωση ενός πλυσίματος και του όγκου καθαριστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται. Μετά την τελευταία επανάληψη πλύσης, απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθεται στις θέσεις της πλάκας το αντίσωμα-ανιχνευτής. Εφόσον προστεθεί το αντίσωμα-ανιχνευτής, ακολουθεί επώαση για 1-2h. Μετά το πέρας της επώασης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και οι θέσεις πλένονται εκ νέου επαναλαμβάνοντας τις οδηγίες πλυσίματος που υποδεικνύει ο εκάστοτε κατασκευαστής. Και πάλι, μετά την τελευταία επανάληψη πλύσης, απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού δευτερογενούς αντισώματος-ανιχνευτή που δεσμεύεται με μη ειδικό τρόπο σε μια θέση σύνδεσης του αντισώματος-ανιχνευτή που προστέθηκε νωρίτερα στη διαδικασία. Ακολουθεί επώαση για 30min-1h. Μετά την επώαση απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος. Έπειτα, προστίθεται το υπόστρωμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έναρξη της χρωματομετρικής αντίδρασης, καθώς η χρωμοφόρος ομάδα του αντιδρά με τον ανιχνευτή. Ακολουθεί επώαση για 10-30min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, προστίθεται το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης, χωρίς να επηρεαστεί το χρώμα στις θέσεις της πλάκας. Η οπτική πυκνότητα του χρώματος των επιμέρους θέσεων της πλάκας προσδιορίζεται φωτομετρικά με τη συσκευή ELISA reader ρυθμισμένη στα 450nm.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από το μητρικό διάλυμα (stock solution). Έτσι, επιτυγχάνονται συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, που με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο, δίνουν συγκεκριμένες τιμές

απορρόφησης. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $y=f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της oxLDL, στις κατάλληλες μονάδες μέτρησης, και y η απορρόφηση στα 450nm.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της sandwich ELISA. (1) Οι θέσεις της πλάκας καλύπτονται με το αντίσωμα σύλληψης. (2) Προστίθεται το δείγμα και το υπάρχον αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα σύλληψης. (3) Προστίθεται το αντίσωμα-ανιχνευτής και δεσμεύει το αντιγόνο. (4) Προστίθεται το δευτερογενές ενζυμικό αντίσωμα (ανιχνευτής) και δεσμεύεται στο αντίσωμα-ανιχνευτή. (5) Προστίθεται το υπόστρωμα και η χρωμοφόρος ομάδα του αντιδρά με τον ανιχνευτή δίνοντας χρωματομετρική αντίδραση.

6.3 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS for Windows, version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Για τις μεταβλητές που παρουσίαζαν κανονική κατανομή (normal distribution) πραγματοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος της σύγκρισης των μέσων όρων δύο ανεξάρτητων μεταβλητών (Independent Samples T-Test), ώστε να συγκριθούν οι διαφορές των μέσων τιμών όλων των δεικτών που αξιολογήθηκαν. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P<0,05$. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικό σφάλμα.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Χαρακτηρισμός του δείγματος

Πριν την έναρξη της δοκιμής με τη μαστίχα, έγινε καταγραφή των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών του πληθυσμού που στρατολογήθηκε ($n=17$), καθώς και πλήρης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**, όλοι οι εθελοντές ήταν νορμοβαρείς με φυσιολογικές τιμές αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων (**Πίνακας 4 και 5**).

Πίνακας 3. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά. Οι τιμές αναφέρονται σε μέσο όρο $\pm$ τυπική απόκλιση.

Παράμετρος	Μέσος όρος
Ηλικία (χρόνια)	27.1 $\pm$ 6.2
Ύψος (cm)	179.6 $\pm$ 5.8
Βάρος (kg)	81.1 $\pm$ 8.2
BMI (kg/m ²)	25.2 $\pm$ 2.9
Λίπος (%)	17.7 $\pm$ 5.9
Λίπος (kg)	14.5 $\pm$ 5.7
Μυϊκή Μάζα (kg)	61.5 $\pm$ 3.6
Σκελετική Μάζα (kg)	3.2 $\pm$ 0.2
Ολικό νερό σώματος (kg)	46.3 $\pm$ 3.9
Ολικό νερό σώματος (%)	57.7 $\pm$ 4.6

Πίνακας 4. Πλήρης αιματολογικός έλεγχος. Οι τιμές αναφέρονται σε μέσο όρο $\pm$ τυπική απόκλιση.

Παράμετρος	Μέσος όρος	Φυσιολογικό εύρος
RBC (/μL)	5026923.1 $\pm$ 372500.2	4600000 - 6200000
WBC (/μL)	7492.3 $\pm$ 251113	5000 - 10000
HGB (g/dl)	15.7 $\pm$ 1.1	13.5 - 18.0
HCT (%)	45.5 $\pm$ 2.9	40 - 54
MCV (fl)	90.6 $\pm$ 2.9	76 - 96
MCHC (g/dl)	34.6 $\pm$ 0.8	32 - 36
MCH (pg/RBC)	31.3 $\pm$ 0.9	27 - 32
RDW (%)	13.9 $\pm$ 0.7	11 - 16
NEUT (%)	54.5 $\pm$ 7.0	40 - 75

EO(%)	3.2± 2.6	1 - 6
LYM(%)	36.7± 7.7	20 - 45
MONO(%)	5.5± 2.9	2 - 8
PLT(/μL)	247230.8± 72779.5	150000 - 350000
MPV (fl)	6.9± 1.4	7.0 - 11.0
PDW (%)	17.9± 0.8	8.0-18.0

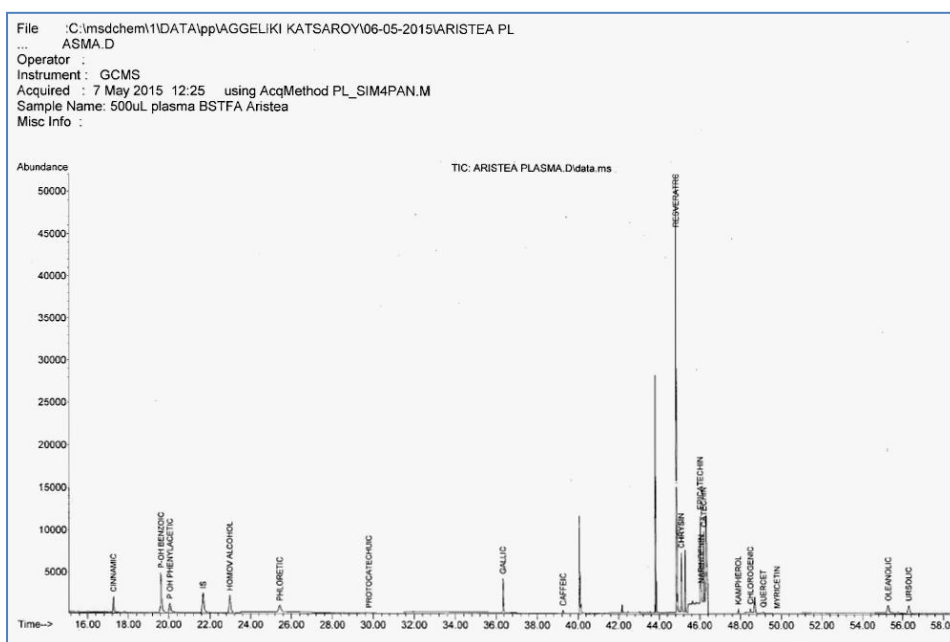
Πίνακας 5. Βιοχημικοί Δείκτες. Οι τιμές αναφέρονται σε μέσο όρο ± τυπική απόκλιση.

Παράμετρος	Μέσος όρος	Φυσιολογικό εύρος
Γλυκόζη (mg/dl)	94.4± 10.3	65 - 110
Ουρία (mg/dl)	36.5± 6.5	10 - 50
Κρεατινίνη (mg/dl)	1.0± 0.1	0.5-1.5
Ολική Χοληστερόλη (mg/dl)	184.8± 33.9	< 200
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	93.2± 52.5	40 - 160
HDL χοληστερόλη (mg%)	52.3± 11.4	> 30
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	113.9± 28.7	< 130
HIGH RISK RATE	3.7± 1.1	2.7-4.0

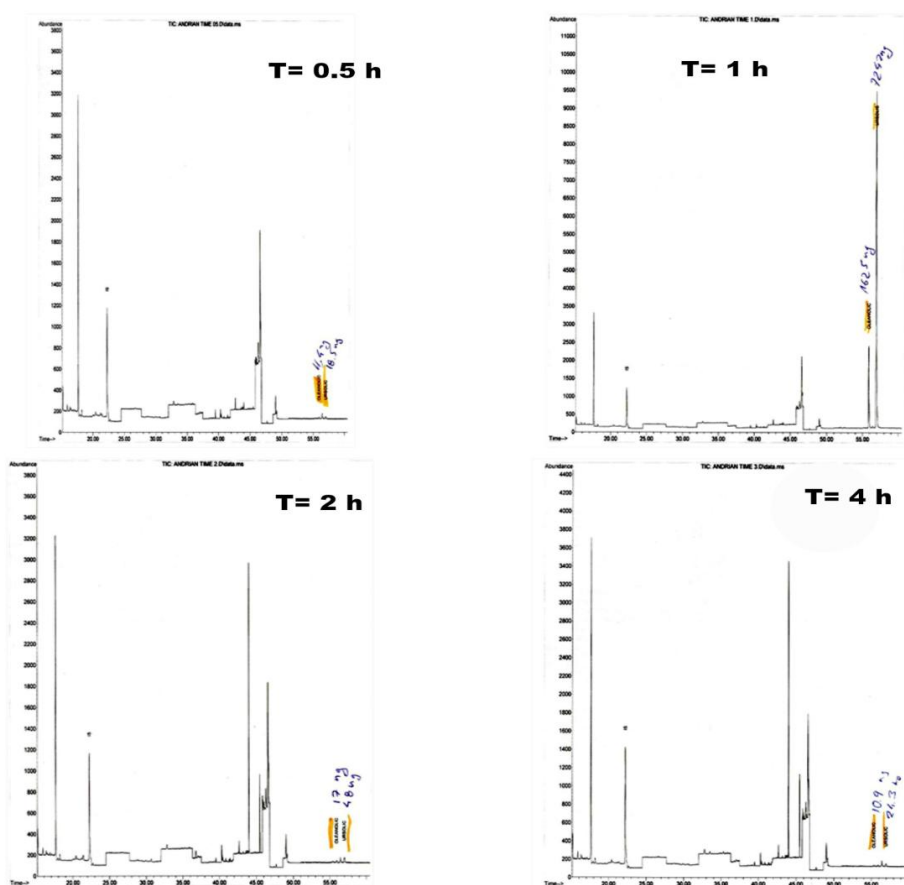
7.2 Ανίχνευση ολεανολικού και ουρσολικού οξέος

Το ολεανολικό και το ισομερές ουρσολικό οξύ ανιχνεύθηκαν ποιοτικά στο πλάσμα των εθελοντών με τη χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC- MS) με ανάλυση SIM. Στο **Γράφημα 1** φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα από τη GC-MS ανάλυση, στο χρόνο 0, όπου οι κορυφές των δύο τριτερπενικών οξέων είναι χαμηλές. Ωστόσο, 1h μετά την πρόσληψη μαστίχας παρατηρείται αύξηση των κορυφών και επομένως αύξηση της διάθεσης του ολεανολικού και του ουρσολικού οξέος στο πλάσμα (**Γράφημα 2**).

Γράφημα 1. Τυπικό γράφημα ποιοτικού προσδιορισμού από εθελοντή, αμέσως μετά την κατανάλωση εναιωρήματος σκόνης μαστίχας ($T=0$).



Γράφημα 2. Προσδιορισμός ολεανολικού και ουρσολικού οξέος 0.5, 1, 2, και 4h μετά τη λήψη μαστίχας Χίου.



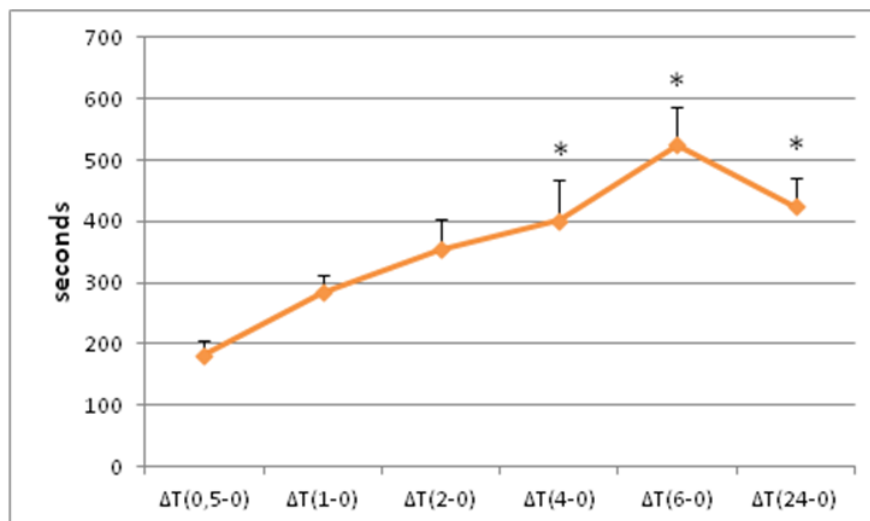
7.3 Αντιοξειδωτική δύναμη μαστίχας Χίου

Στην παρούσα μελέτη, η αντιοξειδωτική δύναμη αξιολογήθηκε με το χρόνο αντίστασης του ορού στην οξείδωση (lag time, tLAG), και πιο συγκεκριμένα με τη διαφορά του tLAG της εκάστοτε χρονικής στιγμής από το tLAG του χρόνου 0, δηλαδή πριν από την χορήγηση εναιωρήματος μαστίχας Χίου (10g). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας (**Πίνακας 6, Γράφημα 3**), είναι ενθαρρυντικά καθώς παρατηρήθηκε τάση αύξησης της αντίστασης του ορού στη οξείδωση ήδη από τη χρονική στιγμή 0.5h, δηλαδή 30 λεπτά μετά την πρόσληψη της μαστίχας. Η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική στο χρόνο 4h (402.3sec±65.0), έφτασε στο μέγιστο στις 6h (524.6sec±62.9) και παρέμεινε στατιστικά σημαντική έως και 24h μετά από την πρόσληψη της μαστίχας (424.2sec±48.0).

Πίνακας 6. Η αντίσταση του ορού στην οξείδωση, εκφρασμένη ως ΔT, δηλαδή ως διαφορά του lag time της εκάστοτε χρονικής στιγμής από το χρόνο 0, σε sec. Ο «*» δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) από το χρόνο 0. Οι τιμές αναφέρονται σε μέσο όρο ± τυπική απόκλιση.

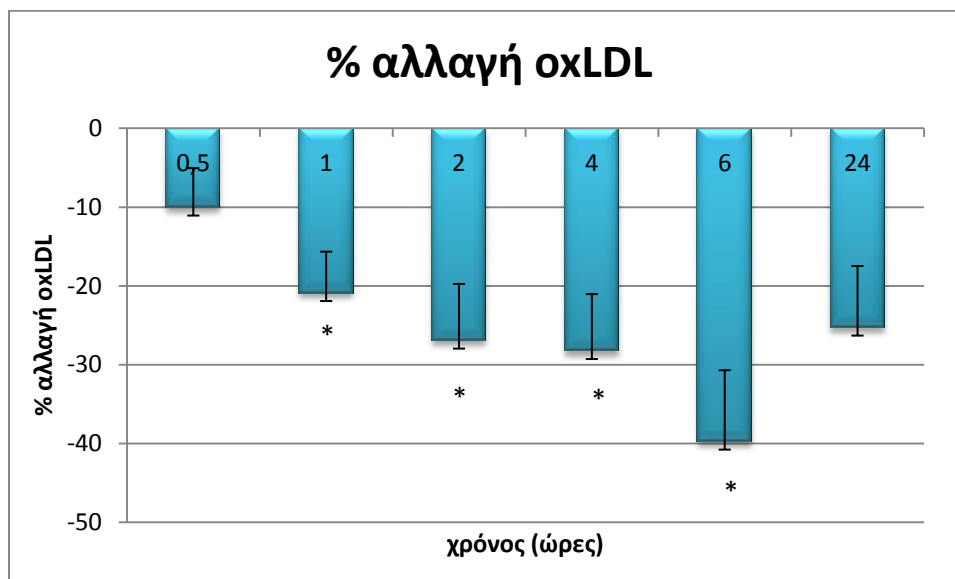
	MEAN (sec)	S.E.	p-value
ΔT(0.5-0)	182.9	23.7	-
ΔT(1-0)	284.4	29.5	0.684
ΔT(2-0)	355.0	48.7	0.137
ΔT(4-0)	402.3*	65.0	0.024
ΔT(6-0)	524.6*	62.9	0.000
ΔT(24-0)	424.2*	48.0	0.009

Γράφημα 3. Η διαφορά (ΔT) του lag time της εκάστοτε χρονικής στιγμής από το χρόνο 0, σε sec. Ο «*» δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$) από το χρόνο 0.



Η αντιοξειδωτική δύναμη αξιολογήθηκε και με την μέτρηση των επιπέδων oxLDL στον ορό των εθελοντών. Στο **Γράφημα 4** φαίνεται η μείωση των επιπέδων της oxLDL, εκφρασμένη ως % αλλαγή oxLDL, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ήδη από το χρόνο 1h έως και το χρόνο 6h μετά την πρόσληψη μαστίχας.

Γράφημα 4. Η % αλλαγή της oxLDL στον ορό των εθελοντών στους χρόνους 0.5h, 1h, 2h, 4h και 24h από το χρόνο 0. Ο «*» δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) από το χρόνο 0.



8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

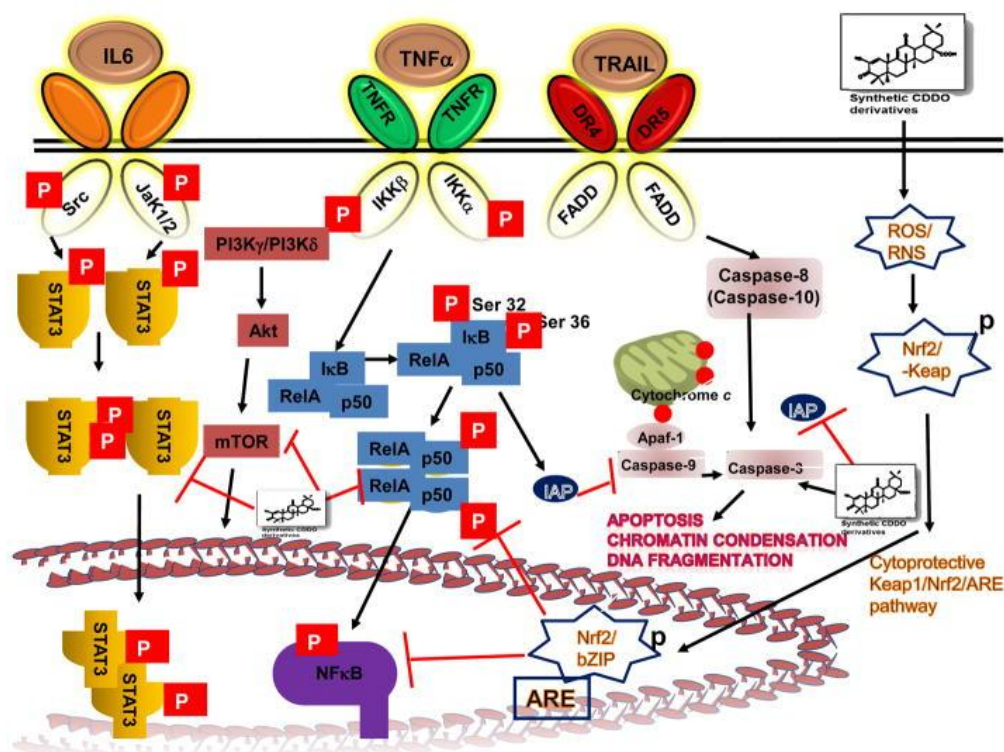
Η μαστίχα Χίου περιέχει πάνω από 70 φυτοχημικά συστατικά με πολυάριθμες και πολυποίκιλες ευεργετικές δράσεις (Πίνακας 7). Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές επικεντρώνονται στη μελέτη μεμονωμένων συστατικών της μαστίχας με στόχο τον προσδιορισμό του βιοδραστικού τους ρόλου.

Πίνακας 7. Ενδεικτικές ευεργετικές ιδιότητες μαστίχας Χίου

ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
Αντιβακτηριακή δράση	Εξάλειψη βακτηρίων και μυκήτων υπεύθυνων για πεπτικά έλκη, οδοντική πλάκα και δυσσομία στόματος.
Αντιφλεγμονώδης δράση	Μείωση ή βελτίωση συμπτωμάτων αυτοάνοσων νοσημάτων, με αναστολή της παραγωγής προφλεγμονωδών ουσιών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, της παραγωγής κυτοκινών από τα μονοκύτταρα σε ασθενείς με νόσο Crohn, και καταστολή παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών σε μύες με άσθμα.
Αντιοξειδωτική– Καρδιοπροστατευτική δράση	Προστασία καρδιαγγειακού με μείωση της Chol, της LDL και των TAG σε μύες. Προστασία της LDL από την οξείδωση στον άνθρωπο.
Χημειοπροστατευτική– Χημειοθεραπευτική δράση	Επαγωγή της απόπτωσης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα in vitro και εκτεταμένη αναστολή ανάπτυξης ανθρώπινου όγκου μεταμοσχευμένου σε μύες με ανοσοανεπάρκεια.
Άλλες δράσεις	Βελτίωση συμπτωμάτων σε ασθενείς με δυσπεψία.

Το ολεανολικό οξύ, ένα από τα συστατικά της μαστίχας, είναι μια βιολογικά ενεργή πεντακυκλική τριτερπενοειδής ένωση που έχει απομονωθεί από περισσότερα από 1620 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών τροφίμων και φαρμακευτικών φυτών. Συχνά, το ολεανολικό και το ισομερές του, ουρσολικό οξύ βρίσκονται σε συνδυασμό και έχουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες (Shanmugam et al, 2012; Yadav et al, 2010). Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το ολεανολικό, ξεχωρίζει ανάμεσα στα άλλα τριτερπένια για τις μοναδικές βιολογικές του δράσεις όπως: αντιφλεγμονώδεις, καρδιο-, ηπατο- και γαστροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντι-ιικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αντιπαρασιτικές, αναλγητικές και επουλωτικές. Οι επιστήμονες έχουν προβεί και στη μελέτη των σύνθετων παραγώγων του ολεανολικού οξέος, με σκοπό να σχεδιαστούν νέα φάρμακα που θα αποτελέσουν μια νέα προσέγγιση στην προληπτική ιατρική (Liby et al, 2012) (Εικόνα 6).

Εικόνα 6. Μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τη φλεγμονή και παρεμποδίζονται από τα συνθετικά παράγωγα του ολεανολικού οξέος. Περιλαμβάνουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος NF-κB, STAT3, TRAIL και τους καταρράκτες ενεργοποίησης Keap1/Nrf2/ARE (Shanmugam et al, 2014).



Στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός του ολεανολικού οξέος στο πλάσμα των εθελοντών ήδη 1h μετά την πρόσληψη, καθιστά τη μαστίχα Χίου ως ένα προϊόν με πιθανή βιολογική δράση. Ταυτόχρονα, πυροδοτεί το ενδιαφέρον μελέτης της βιοδιαθεσιμότητας του ολεανολικού οξέος, καθώς και των άλλων φυτοχημικών της μαστίχας στον ανθρώπινο οργανισμό.

Οι μελέτες βιοδιαθεσιμότητας αποσκοπούν στην ταυτοποίηση των συστατικών στον ορό και τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Από την άλλη, η «μεταβολομική» αναφέρεται στην «ποιοτική και ποσοτική ανάλυση όλων των μικρών μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα, σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, υπό συγκεκριμένες συνθήκες» (Yuliana et al, 2011). Εκτιμάται ότι τα φύλλα των φυτών περιέχουν κατά μέσο όρο 30.000 φυτοχημικά (Verpoorte et al, 2010). Επίσης, πάνω από 200.000 διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί (Hartmann, 2007). Θεωρώντας ότι υπάρχουν πάνω από 300.000-350.000 είδη φυτών, μόνο ένα μικρό μέρος των χημικών δομών του φυτικού βασιλείου έχει προσδιοριστεί (Miller, 2011). Στις μελέτες μεταβολομικής γίνεται χρήση μίας ή περισσότερων αναλυτικών τεχνικών. Οι πιο συχνά απαντώμενες είναι οι συζευγμένες τεχνικές με φασματομετρία μαζών (LC-MS, GC-MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Spratlin et al, 2009; Gika et al, 2014). Οι δύο αυτές φασματοσκοπικές

τεχνικές επιτρέπουν την ανάλυση πλήθους μικρών μορίων που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα, συμπεριλαμβανομένων της ταυτοποίησης και του ποσοτικού προσδιορισμού των μεταβολιτών, ωστόσο κάθε μία έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της. Όσον αφορά τη φασματοσκοπία NMR, τα πλεονεκτήματα της περιλαμβάνουν τον ελάχιστο απαιτούμενο χρόνο προετοιμασίας του δείγματος, τη μη εξάρτηση από αναλυτή διαχωρισμού και το γεγονός ότι δεν καταστρέφει τα δείγματα οπότε μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω έρευνα με άλλες μεθόδους. Η χαμηλή ευαισθησία αποτελεί τον σημαντικότερο περιορισμό της NMR (Bu et al, 2012 ; Putri et al, 2013). Οι συζευγμένες τεχνικές με φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούνται ευρέως, κυρίως λόγω της υψηλής ευαισθησίας αλλά και της επαναληψιμότητάς τους. Μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών αποτελούν: 1. Η χρονοβόρος προετοιμασία του δείγματος 2. Η καταστροφή του δείγματος 3. η γνώση που απαιτείται για το δείγμα 4. Το υψηλό κόστος επανάληψης της διαδικασίας και 5. Ο ακριβός εξοπλισμός (Tang and Wang, 2006). Μολονότι η φασματομετρία μάζας απαιτεί την καταστροφή του δείγματος, μόνο μικρές ποσότητες (μL) απαιτούνται για την ανάλυση. Η αέρια χρωματογραφία μάζας (GC-MS), τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και αποτελεί «χρυσή» μέθοδο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών και θερμικά σταθερών ουσιών, απαιτεί τη θέρμανση του δείγματος εωσότου φθάσει στην αέρια φάση, και ως εκ τούτου, οι μη πτητικές ουσίες δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας και απαιτείται η ανάλυση μέσω σύνθεσης πτητικών παραγώγων (παραγωγοποίηση) των ουσιών αυτών. Σε αντίθεση με την τεχνική GC-MS, η υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι κατάλληλη για την ανάλυση μη πτητικών ή/ και θερμικά ασταθών ενώσεων (Putri et al, 2013; Lenz et al, 2007). Έχει παρατηρηθεί ότι οι βιοδείκτες που προκύπτουν από τις τεχνικές NMR και MS είναι διαφορετικοί, γεγονός που υποδηλώνει τον συμπληρωματικό χαρακτήρα των δύο τεχνικών (Wilson et al, 2005). Οπότε, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η απόκτηση σφαιρικής εικόνας για το σύνολο των μεταβολιτών ενός δείγματος, μπορεί να επιτευχθεί μόνο με συνδυασμό των παραπάνω αναλυτικών τεχνικών.

Στη μελέτη των Kanellos et al, παρατηρήθηκε ότι 17 από τα 25 φυτοχημικά της κορινθιακής σταφίδας ήταν βιοδιαθέσιμα στο πλάσμα υγιών εθελοντών, με το ολεανολικό οξύ να παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση 4h μετά την κατανάλωση της σταφίδας. Επιπλέον, 1h μετά την κατανάλωση κορινθιακής σταφίδας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της αντίστασης του ορού στην οξειδωση συγκρινόμενη με το χρόνο 0 (Kanellos et al, 2011). Παρομοίως, οι Kountouri et al. το 2007 έδειξαν ότι η κατανάλωση ελιάς οδήγησε σε αυξημένη συγκέντρωση των φυτοχημικών της (τυροσόλη, p-υδροξύ-φαινυλοξικό οξύ, υδροξύ-τυροσόλη) στο πλάσμα των εθελοντών μετά από 1h, εξαιρουμένου του p- υδοξύ-βενζοϊκού οξέος, του

οποίου η συγκέντρωση παρουσίασε μέγιστο 2h μετά την κατανάλωση του γεύματος. Η μέγιστη αντίσταση του ορού στην οξείδωση παρατηρήθηκε μετά από 3h.

Στην παρούσα μελέτη, το ολεανολικό οξύ παρουσίασε κατακόρυφη αύξηση στο πλάσμα των εθελοντών 1h μετά από την πρόσληψη 10g μαστίχας Χίου. Ήδη από την 1h, περιορίστηκε σημαντικά και η oxLDL, με μέγιστη μείωση στις 6h από την πρόσληψη. Στον ίδιο χρόνο παρατηρήθηκε και μέγιστη αντίσταση του ορού στην οξειδωτική τροποποίηση με χρήση χαλκού. Μάλιστα, η αντίσταση στην οξείδωση παρέμεινε σημαντική ακόμη και 24h μετά από την πρόσληψη. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η μείωση της οξειδωτικής τροποποίησης είναι επακόλουθο της δράσης των τερπενίων αλλά και των φαινολικών συστατικών που έχουν προσδιοριστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στη μαστίχα Χίου και εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση. Το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Ovesná et al, 2006; Sultana and Ata, 2008) οι οποίες δεν σχετίζονται μόνο με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών αλλά οδηγούν και σε αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και η γλουταθειόνη (Wang et al, 2010).

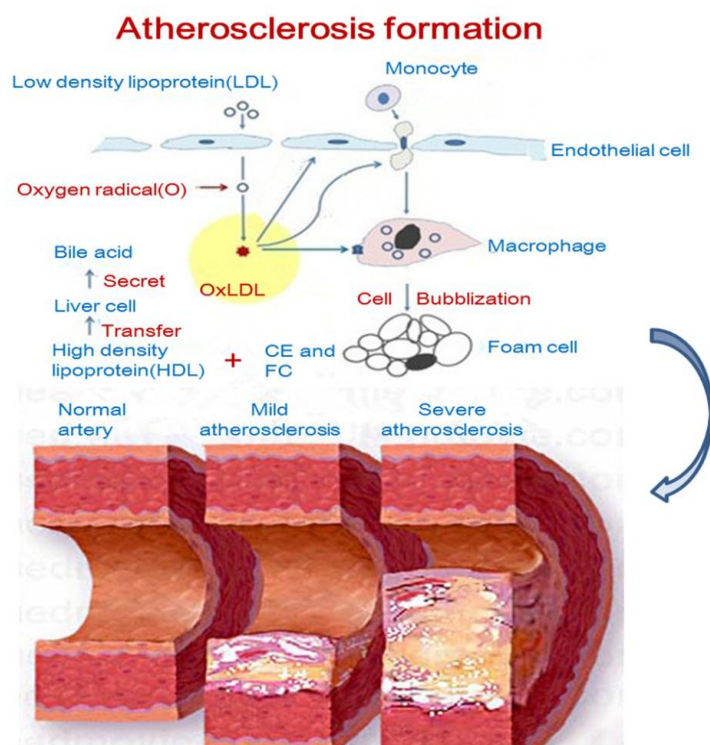
Το οξειδωτικό στρες αντικατοπτρίζει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας της αντιοξειδωτικής άμυνας να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Είναι γνωστό, ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με πολλές οξείες και χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές, οι νευροεκφυλιστικές και οι πνευμονικές παθήσεις.

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πάθηση και αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας (Steinberg et al, 2010). Η εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης μπορεί να προκαλέσει οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο και αγγειακές ασθένειες (Hansson et al, 2005; Libby et al, 2011). Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στην LDL με αποτέλεσμα την οξείδωση της προς oxLDL, γεγονός που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και εξέλιξη της εναπόθεσης αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 7). Σε προηγούμενες μελέτες, η μαστίχα Χίου δύναται να μειώσει την ολική χοληστερόλη και την LDL αίματος, να παρεμποδίσει την οξείδωση της LDL *in vitro* και να αναστείλει τη μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης, ενός ενζύμου με κύρια αντιοξειδωτική δράση (Andrikopoulos et al, 2003; Dedoussis et al, 2004; Vallianou et al, 2011; Kartalis et al, 2015).

Σε συνέχεια των προηγούμενων ευρημάτων, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν τις αντιοξειδωτικές δράσεις της μαστίχας σε υγιείς εθελοντές, μειώνοντας την

oxLDL και περιορίζοντας την οξειδωτική τροποποίηση του ορού, γεγονότα που πιθανά να σημαίνουν ότι η μαστίχα Χίου προστατεύει και από τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης.

Εικόνα 7. Η διαδικασία σχηματισμού oxLDL και ο ρόλος της στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Zhang et al, 2015)



Τα φυτά χρησιμοποιούνταν για τις ευεργετικές τους δράσεις από την αυγή του πολιτισμού, ενώ ένα 80% του πληθυσμού των ασιατικών και αφρικανικών χωρών εξακολουθεί να εξαρτάται από τα φυτικά φάρμακα (World Health Organization, 2008). Στις δυτικές χώρες, τα φυτικά φάρμακα είχαν αντικατασταθεί από σύγχρονα φάρμακα, ωστόσο τα τελευταία χρόνια η δημοτικότητά τους αυξήθηκε εκ νέου ιδιαίτερα για την ανακούφιση από ήπια συμπτώματα. Η δυνητική χρήση των φυτών και των ουσιών τους ως φάρμακα, εγείρει ορισμένα ζητήματα ασφαλείας όπως η ταυτοποίηση των βιοδραστικών ουσιών τους, οι μέθοδοι παρασκευής τους, το δοσολογικό σχήμα, η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση τους με άλλα βότανα ή συμβατικά φάρμακα, καθώς και η διαβεβαίωση ότι είναι γνήσια χωρίς τοξίνες ή ρύπους. Η έλλειψη σαφών κατευθυντήριων γραμμών ασφαλείας για τα φυτικά φάρμακα έχει ως αποτέλεσμα αναφορές για τοξικές επιδράσεις, όπως στην περίπτωση ενός προϊόντος από πράσινο τσάι για απώλεια βάρους το οποίο αποσύρθηκε από την αγορά διότι προκαλούσε ηπατοτοξικότητα πιθανότατα λόγω υψηλής συγκέντρωσης επιγαλλοκατεχίνης (Gilbert, 2011; Licata et al, 2012). Οπότε, για τη χρήση των φυτών ως φαρμάκων απαιτούνται μέθοδοι που να παράσχουν αποδείξεις της κλινικής αποτελεσματικότητας αλλά και ισχυρά εργαλεία ανάλυσης που να καθορίζουν τα βιοδραστικά συστατικά των φυτικών προϊόντων.

Η διαιτητική τοξικότητα της μαστίχας Χίου μελετήθηκε σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους οι οποίοι έλαβαν 0%, 0.22%, 0.67% και 2% μαστίχας για 13 εβδομάδες. Το σωματικό βάρος μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα που έλαβε την υψηλή δόση. Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι χορήγηση μαστίχας σε ποσοστό έως 0.67% δεν προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις (Kang et al, 2007). Επιπλέον, οι Dimas et al. ανέδειξαν ότι το σχήμα χορήγησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση τοξικότητας. Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας σε δόση ίση προς 200mg/Kg ΣΒ είναι αρκετή προκειμένου να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων σε μύες με καρκίνο του παχέος εντέρου. Όταν το παραπάνω εκχύλισμα δίνεται για 35 μέρες με διαστήματα αποχής διάρκειας 2 ημερών κάθε 5 μέρες, το μέγεθος των όγκων μειώνεται μεν σημαντικά (38%, $p<0.05$), αλλά κανένα από τα ζώα δεν επιβιώνει. Αντίθετα, όταν ο κύκλος χορήγησης-διακοπής είναι 4 προς 3, οι όγκοι συρρικνώνονται κατά 35% ($p<0.05$) και όλα τα ζώα επιβιώνουν (Dimas et al, 2009). Ακολούθως, δύο πρόσφατες μελέτες των Vlastos et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το μαστιχόνερο (1, 2 και 5% κ.ό.) και το μαστιχέλαιο (0.01, 0.05 and 0.10 % κ.ό.) δεν προκαλούν γενοτοξικότητα σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. (Vlastos et al, 2013; Vlastos et al, 2015).

Συμπερασματικά, η μαστίχα Χίου αποτελεί ένα φυσικό προϊόν με ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει την αντιοξειδωτική της δύναμη, η οποία πιθανόν να οφείλεται στα φυτοχημικά της, όπως το ολεανολικό οξύ που προσδιορίστηκε στο πλάσμα των εθελοντών 1h μετά την κατανάλωση της. Περαιτέρω μελέτες βιοδιαθεσιμότητας είναι απαραίτητες για να προσδιοριστούν όλα τα μεταβολικά μονοπάτια και να κατανοηθεί ο μεταβολισμός των φυτοχημικών της μαστίχας Χίου στον άνθρωπο, ώστε να επιβεβαιωθεί η αντιοξειδωτική της δύναμη, ο μηχανισμός δράσης της και η ασφαλής-ευεργετική χρήση της.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H., Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105, 121–126.
- Aksoy A., Duran N. and Koksai F., In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and *mutans streptococci*. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 476-481.
- Aksoy A., Duran N., Toroglu S., et al. Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients. *Angle Orthodontist.* 2007; 77: 124-28.
- Alam N.M., Bristi N.J., Rafiquzzaman M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2013; 21, 143–152.
- Al-Bayati F.A., Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2009; 12, 8–20.
- Al-Habbal, M. J., Al-Habbal, Z., Huwez, F. U., A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *J. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1984; 11 (5), 541-4.
- Allouche Y., Warleta F., Campos M., Sanchez-Quesada C., Uceda M., Beltran G., Gaforio J.J. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J Agric Food Chem.* 2011; 59:121–130.
- Al-Said M. S., Ageel A. M., Parmar N. S., Tariq M., Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J. Ethnopharmacol.* 1986; 15 (3), 271-8.
- Andrikopoulos N.K., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N., et al., Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res.* 2003; 17(5): 501-07.
- Arteel G.E., Oxidants and antioxidants in alcohol induced liver disease. *Gastroenterol.* 2003; 124, 778–790.
- Aurrekoetxea I., Ruiz-Sanz JI., del Agua A.R. et al., Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010; 94:1279–1286.
- Aviram M. Review on human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res.* 2000; 33: 85-97.
- Badr, G., Alwasel, S., Ebaid, H., Mohany, M., Alhazza I., Perinatal supplementation with thymoquinone improves diabetic complications and T cell immune responses in rat offspring. *Cell. Immunol.* 2011; 267, 133–140.
- Balan K.V., Demetzos C., Prince J., et al. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. *In Vivo.* 2005; 19: 93-102.
- Balan K.V., Prince J., Han Z., et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine*, 2007; 14: 263-72.
- Basu A., Rhone M., and Lyons T. J., Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews.* 2010; vol. 68, no. 3, pp. 168–177.
- Bebb JR, Bailey-Flitte N, Ala'Aldeen D and Atherton JC: Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother* 52: 522-523, 2003.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2000; 13, 135– 160.
- Braca A., Dal Piaz F., Marzocco S., Autore G., Vassallo A. and De Tommasi N., Triterpene derivatives as inhibitors of protein involved in the inflammatory process: molecules interfering with phospholipase A(2), cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Curr Drug Targets.* 2011; 12: 302-321.
- Browich K., *Pistacia lentiscus* cv. Chia (Anacardiaceae) on Chios Island. *Pl Syst Evol* 1987; 155: 189-195.
- Bu Q., Huang Y.N., Yan G.Y., Cen X.B., Zhao Y.L.: Comb. Chem. High Throughput Screen. ¹H NMR-based metabolomics in brain nucleus accumbens and striatum following repeated cocaine treatment in rats. 2012; 15, 266.
- Buege, J.A., Aust, S.D., Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52, 302–310.
- Chandrasekara A., Shahidi F., Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58, 6706-6714.

- Chen T.C., Fonseca C., Schönthal A. H. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2015; 5(5):1580-1593.
- Chen W., Liu Y., Li M., Mao J., Zhang L., Huang R., Jin X., Ye L.. Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *J Pharmacol Sci.* 2015; 127, 332-338
- Choi H.S., Song H.S., Ukeda H., et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(9): 4156-61.
- Choli-Papadopoulou T., Kottakis F., Papadopoulos G. and Pendas S., Helicobacter pylori neutrophil activating protein as target for new drugs against H. pylori inflammation. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 2585-2591.
- Crowell P. L., Ayoubi A. S., and Burke Y. D., “Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer,” in *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment*, vol. 401 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 131–136, Springer, New York, NY, USA, 1996.
- Dabos KJ., Sfika E., Vlatas L.J., Frantzi D., Amygdalos G.I. and Giannikopoulos G., Is Chios mastic gum effective in the treatment of functional dyspepsia? A prospective randomised double-blind placebo controlled trial. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127: 205-209.
- de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade L.N., de Sousa D.P., A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. *Molecules.* 2013; 18, 1227-1254.
- Dedoussis G.V.Z., Kaliora A.C., Psarras S., Chiou A., Mylona A., Papadopoulos N.G., Andrikopoulos N.K. Pistacia lentiscus L. polar extract inhibits oxidized low-density lipoprotein mediated apoptosis and necrosis of peripheral blood mononuclear cells. 2003.
- Dimas K., Hatziantoniou S., Wyche J.H., et al., A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo.* 2009; 23: 63-8.
- El-Saadani, M., Esterbauer, H., El-Sayed, M., Goher, M., Nassar, A.Y., Juergens, G.A., Spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J. Lipid Res.* 1989; 30, 627–630.
- Esterbauer H., Jurgens G., Mechanistic and genetic aspects of susceptibility of LDL to oxidation. *Curr Opin Lipidol.* 1993; 4:114–124.
- Ferrero-Miliani L., Nielsen O.H., Andersen P.S., Girardin, S.E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147, 227–235.
- Friedman J.B. and Mossler Figg K., 2000. Trade, travel and exploration in middle ages.
- Frum Y., Viljoen A.M., In vitro 5-lipoxygenase activity of three indigenous South African aromatic plants used in traditional healing and the stereospecific activity of limonene in the 5-lipoxygenase assay. *J. Essent. Oil Res.* 2006; 18, 85–88.
- Fujioka M., Uehara M., Wu J., Aldercreutz H., Suzuki K., Kanazawa K., et al. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition.* 2004; 134, 2623e2627.
- Gao X., Deeb D., Jiang H., Liu Y., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF- κ B and Notch1 signaling. *J Neurooncol.* 2007; 84:147–157.
- Gao X., Deeb D., Liu Y., Arbab A.S., Divine G.W., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. Prevention of prostate cancer with oleanane synthetic triterpenoid CDDO-Me in the TRAMP mouse model of prostate cancer. *Cancers (Basel).* 2011; 3:3353–3369.
- Gika H.G., Theodoridis G.A., Plumb R.S., Wilson I.D., Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014; 87, 12.
- Gilbert N. (2011) Regulations: Herbal medicine rule book. *Nature* 480: S98–S99
- Gioxari A., Kaliora A.C., Papalois A., Agrogiannis G., Triantafyllidis J.K., and Andrikopoulos N.K. Pistacia lentiscus Resin Regulates Intestinal Damage and Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *J Med Food* 14 (0) 2011; 1–9.
- Goldstein J.L., Brown M.S., Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J.* 1992; 13: 34-36.

- Gu G., Barone I., Gelsomino L., Giordano C., Bonofiglio D., Statti G., Menichini F., Catalano S., Ando S., Oldenlandia diffusa extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ERalpha/Sp1-mediated p53 activation. *J Cell Physiol.* 2012; 227:3363–3372.
- Guidi I., Galimberti D., Lonati S., Novembrino C., Bamonti F., Tirittico M., Fenoglio C., Venturelli E., Baron P., Bresolin N., Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2006; 27, 262–269.
- Hansson G.K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
- Hartmann T., From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 2007; 22–24, 2831–2846.
- He M.L., Chen W.W., Zhang P.J., et al. Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2007b; 28: 567-72.
- He M.L., Li A., Xu C.S., et al. Mechanisms of antiprostata cancer by gum mastic: NF-kappaB signal as target. *Acta Pharmacol Sin.* 2007a; 28: 446-52.
- Hollman P. C. H., van Trijp J. M. P., Buysman M. N. C. P., v.d. Gaag M. S., Mengelers M. J. B., de Vries J. H. M., et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 1997; 418(1-2):152-6.
- Huang X.Y., Wang H.C., Yuan Z., Li A., He M.L., Ai K.X., Zheng Q. and Qin H.L., Gemcitabine combined with gum mastic causes potent growth inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31: 741-745.
- Huwez F.U. and Al-Habbal M.J. Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Gastroenterol Jpn.* 1986; 21: 273-74.
- Huwez F.U., Thirlwell D., Cockayne A., et al. Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1946.
- Hyun D.H., Hernandez J.O., Mattson M.P., de Cabo R., The plasma membrane redox system in aging. *Aging Res. Rev.* 2006; 5, 209– 220.
- Ierapetritis D. The Geography of the Chios Mastic Trade from the 17th through to the 19th Century. *Ethnobotany research and applications.* 2010; 8:153-167.
- Işcan G., Kirimer N., Kürkcüoğlu M., Başer K.H., Demirci F., Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 3943–3946.
- J.G. Salway, *Ιατρική Βιοχημεία με μια ματιά*, 2^η Έκδοση. Blackwell Publishing, 2006. σ. 49.
- Jocelyn, P.C., 1972. *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press, London, pp. 10.
- Juergens U.R., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen R.R., Vetter H., Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respir. Med.* 2003; 97, 250–256.
- Juergens U.R., Stober M.V. The anti-inflammatory activity of l-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: A novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *Eur. J. Med. Res.* 1998; 3, 539–545.
- Juergens U.R., Stober, M., Vetter H., Steroid-like inhibition of monocyte arachidonic acid metabolism and IL-1 β production by 1,8-cineole. *Atemwege Lungenkrankheiten.* 1998; 24, 3–11.
- Jutooru I., Chadalapaka G., Abdelrahim M., Basha M.R., Samudio I., Konopleva M., Andreeff M., Safe S., Methyl 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate decreases specificity protein transcription factors and inhibits pancreatic tumor growth: role of microRNA-27a. *Mol Pharmacol.* 2010; 78:226–236.
- Kaliora A.C., Mylona A., Chiou A., Petsios D.G., Andrikopoulos N.K. Detection and identification of simple phenolics in *Pistacia lentiscus* resin. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* 2004, 27: 289-300.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V. and Andrikopoulos N.K., Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol.* 2007 b.; 13: 6031-6036.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V.Z., Andrikopoulos N.K., Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2007a; 13(5): 748-753

- Kanazawa K. (2008). Finding bioavailable phytochemicals which express a beneficial effect on the health. In F. Shahidi, C.-T. Ho, T. Shibamoto, & K. Kanazawa (Eds.), Food factors in health
- Kanazawa, K., Uehara, M., Yanagitani, H., & Hashimoto, T., Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2cells. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006; 455, 197e203.
- Kanellos P.T., Kaliora A.C., Gioxari A., Christopoulou G.O., Kalogeropoulos N., Karathanos V.T., Absorption and bioavailability of antioxidant phytochemicals and increase of serum oxidation resistance in healthy subjects following supplementation with raisins. Plant Foods Hum Nutr. 2013; 68(4):411-5.
- Kang J.S., Wanibuchi H., Salim E.I., Kinoshita A. and Fukushima S., Evaluation of the toxicity of mastic gum with 13 weeks dietary administration to F344 rats. Food Chem Toxicol. 2007; 45: 494-501.
- Kartalis A., Didagelos M., Georgiadis I., Benetos G., Smyrnioudis N., et al, Effects of Chios mastic gum on cholesterol and glucose levels of healthy volunteers: A prospective, randomized, placebo-controlled, pilot study (CHIOS-MASTIHA). Eur J Prev Cardiol. 2015.
- Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W., Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. Food Chem. 2006; 95, 466-473.
- Kim M., Han C.H., Lee M.Y., Enhancement of platelet aggregation by ursolic acid and oleanolic acid. Biomol. Ther. 2014; 22, 254-259.
- Kinnula V.L., Crapo J.D., Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Free Radic. Biol. Med. 2004; 36, 718-744.
- Koczurkiewicz P., Czyż J., Podolak I., Wójcik K., Galanty A., Janeczko Z. and Michalik M. Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells — mini-review of in vitro studies. Acta Biochim Pol. 2015; 62(3):383-93.
- Koczurkiewicz P., Czyż J., Podolak I., Wójcik K., Galanty A., Janeczko Z., Michalik M. Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells - mini-review of in vitro studies. Acta Biochim Pol. 2015; 62(3):383-93..
- Kohno H., Yoshitani S., Tsukio Y., Murakami A., Koshimizu K., Yano M., et al. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Life Sciences. 2001; 69, 901e913.
- Koutsoudaki C., Krsek M. and Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of Pistacia lentiscus Var. chia. J Agric Food Chem. 2005; 53: 7681-85.
- Lenz E.M., Wilson I.D.: Analytical strategies in metabonomics. J. Proteome Res. 2007; 6, 443.
- Libby P., Ridker P.M. and Hansson G.K., Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature 2011; 473: 317-325.
- Liby K.T., Sporn M.B., Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease. Pharmacol Rev. 2012; 64:972 1003.
- Licata A., Macaluso F.S., Craxi A., Herbal hepatotoxicity: a hidden epidemic. Intern Emerg Med. 2012; 13-22.
- Lima L.M., Perazzo F.F., Tavares Carvalho J.C., Bastos J.K., Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from Zanthoxylum riedelianum (Rutaceae) leaves and stem bark. J Pharm Pharmacol 2007; 59:1151-1158.
- Loughlin M.F., Ala'Aldeen D.A. and Jenks P.J. Monotherapy with mastic does not eradicate Helicobacter pylori infection from mice. J Antimicrob Chemother, 2003; 51: 367-71.
- Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., Chinou I.B. and Mitaku S., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. Planta Med. 1999; 65: 749-752.
- Magkouta S., Stathopoulos G.T., Psallidas I., Papapetropoulos A., Kollis F.N., Roussos C., Loutrari H., Protective effects of mastic oil from Pistacia lentiscus variation chia against experimental growth of lewis lung carcinoma. Nutr Cancer. 2009; 61(5):640-8.
- Mahmoudi M., Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.F., Hafezi S., Nabavi S.M. and Eslami S.H., Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. Eur Rev Med Pharmacol Sc. 2010; 14: 765-976.

- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.1. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81(Suppl. 1), 230S-242S.
- Marone P., Bono L., Leone E., Bona S., Carretto E. and Perversi L.J., Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy*. 2001; 13: 611-614.
- McCord J., Fridovich I., Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprin. *J. Biol. Chem*. 1969; 244, 6049–6055.
- Messner B., Zeller I., Ploner C., Frotschnig S., Ringer T., Steinacher-Nigish A., Ritsch A., Laufer G., Huck C., Bernhard D., Ursolic acid causes DNA-damage, P53 mediated, mitochondria- and caspase-dependent human endothelial cell apoptosis, and accelerates atherosclerotic plaque formation in vivo. *Atherosclerosis*. 2011; 219, 402
- Mikhail G.R., Selak L. and Salo S., Reinforcement of surgical adhesive strips. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986; 12: 904-905, 908.
- Miller J. S., The Discovery of Medicines from Plants: A Current Biological Perspective. *Econ. Bot*. 2011; 65, 396–407.
- Miller Y.I., Choi S.H., Fang L. and Tsimikas S., Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem*. 2010; 51: 229-251.
- Mohammad Saleem, Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene *Cancer Lett*. 2009; 285(2): 109–115
- Moulos P., Papadodima O., Chatziioannou A., Loutrari H., Roussos C., et al.: A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics*. 2009; 2:68.
- Murakami A., & Ohigashi H., Targeting NOX, INOS, and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer*. 2007; 121: 2357–2363.
- Muthu K., Shanmugam, Xiaoyun D., Kumar A.P., Benny K.H. Tan, Sethia G. and Bishayee A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence *Cancer Lett*. 2014; 346(2): 206–216.
- Paglia D.E., Valentin W.N., Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*. 1967; 70, 158–169.
- Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K., et al. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr A*. 1997; 769: 263-73.
- Paraschos S., Magiatis P., Mitakou S., et al. In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51: 551-59.
- Putri S.P., Yamamoto S., Tsugawa H., Fukusaki E.: *J. Biosci. Bioeng. Current metabolomics: technological advances*. 2013; 116, 9.
- Qiao J., Li A., Jin X. and Wang J., Mastic alleviates allergic inflammation in asthmatic model mice by inhibiting recruitment of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; 45: 95-100.
- Quintas V., Prada-López, I., Prados-Frutos, J.C., Tomás I., In situ antimicrobial activity on oral biofilm: Essential oils vs. 0.2% chlorhexidine. *Clin. Oral Investig*. 2015; 19, 97–107.
- Rachmilewitz D., Simonm P.L., Schwartz L.W., Griswold D.E., Fondacaro J.D., Wasserman M.A., Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology*. 1989; 97, 326–337
- Radhiga T., Rajamanickam C., Senthil S., Pugalendi K.V., Effect of ursolic acid on cardiac marker enzymes, lipid profile and macroscopic enzyme mapping assay in isoproterenol-induced myocardial ischemic rats. *Food Chem. Toxicol*. 2012; 50, 3971–3977.
- Radhiga T., Rajamanickam C., Sundaresan A., Ezhumalai M., Pugalendi K.V., Effect of ursolic acid treatment on apoptosis and DNA damage in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Biochimie*. 2012; 94, 1135–1142.
- Ramachandran S., Prasad N.R.. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem Biol Interact*. 2008; 176(2-3):99-107.

- Ramakrishna B.S., Varghese R., Jayakumar S., Mathan M., Balasubramanian K.A., Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1997; 12, 490–494.
- Sakagami H., Kishino K., Kobayashi M., Hashimoto K., Iida S., Shimetani A., Nakamura Y., Takahashi K., Ikarashi T., Fukamachi H., Satoh K., Nakashima H., Shimizu T., Takeda K., Watanabe S. and Nakamura W. Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In Vivo.* 2009; 23: 215–223.
- Santos F.A., Silva R.M., Campos A.R., Araújo R.P., Júnior R.C.P.L., Rao V.S.N., 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42, 579–584.
- Sapakal V.D., Shikalgar T.S., Ghadge R.V., Adnaik R.S., Naikwade N.S., Magdum C.S., In vivo screening of antioxidant profile: a review. *J. Herbal Med. Toxicol.* 2008; 2 (2), 1–8.
- Schwarz K., Ernst H. and Ternes W. Evaluation of antioxidant constituents of thyme. *J Sci Food Agric*, 1996; 70:217–23.
- Senthil S., Sridevi M., Pugalendi K.V., Protective effect of ursolic acid against myocardial ischemia induced by isoproterenol in rats. *Toxicol. Mech. Methods.* 2007; 17, 57–65.
- Shanmugam M.K., Dai X., Kumar A.P., Tan B.K., Sethi G., Bishayee A. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85:1579–1587.
- Singh U., Jialal I., Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 2006; 13, 129–142.
- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G., Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1502, 139–144.
- Spencer J.P.E. and Crozier A. (eds.) In: *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function. Oxidative Stress and Disease*, Vol. 30, edited by Packer L and Cadenas H. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- Spratlin J. L., Serkova N. J., Eckhardt S.G., Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15, 431.
- Stark M.J., Burke Y.D., McKinzie J.H., Ayoubi A.S. and Crowell P.L. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett.* 1995; 96: 15–21
- Steinberg D. and Witztum J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 2311–2316.
- Sterer N. Antimicrobial effect of mastic gum methanolic extract against *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Food*, 2006; 9: 290–92.
- Sudhakar V., Ashok Kumar S., Varalakshmi P., Sujatha V. Protective effect of lupeol and lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. *Mol Cell Biochem* 2008; 317:11–20.
- Sumner M.D., Elliott-Eller M., Weidner G., Daubenmier J.J., Chew M.H., Marlin R., Raisin C.J., and Ornish D. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 810–814.
- Taiz L. and Zeiger E. *Plant Physiology*. ISBN: 087-893-856-7, published by Sinauer Associates Inc., 2006 (4th edition).
- Takahashi K., Fukazawa M., Motohira H., Ochiai K., Nishikawa H. and Miyata T.: A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J Periodontol.* 2003; 74: 501–505.
- Tang H.R., Wang Y.L. (2006). *Metabonomics: a revolution in progress*. *Prog Biochem Biophys* 33: 401–417.
- Tannock L.R. Ursolic acid on atherosclerosis: Apples and apples, or apples and oranges? *Atherosclerosis.* 2011; 219, 397–398.
- Teodoro T., Zhang L., Alexander T., et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 2008; 582: 1375–80.
- Topitsoglou-Themeli V., Dagalis P. and Lambrou D.A. Chios mastic chewing gum and oral hygiene. I. The possibility of reducing or preventing microbial plaque formation. *Hell Stomatol Crohn*, 1984; 28: 166–70.
- Triantafyllou A., Bikineyeva A., Dikalova A., Nazarewicz R., Lerakis S. and Dikalov S. Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutr J.* 2011; 10: 64.

- Triantafyllou A., Chaviaras N., Sergeantanis T.N., Protopapa E. and Tsaknis J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111: 43-9.
- Ullevig S.L., Zhao Q., Zamora D., Asmis R., Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2011; 219, 409–416.
- Umesh B., Jagtap S.N., Panaskar, Bapat, V.A., Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2010; 65, 99–104.
- Upston J.M., Kritharides L., Stocker R., The role of vitamin E in atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* 2003, 42, 405–422.
- Vallianou I., Peroulis N., Pantazis P. and Hadzopoulou-Cladaras M., Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity. *PLoS One.* 2011; 6: e20516.
- Van Leeuwen M.P., Slot D.E., van der Weijden G.A., The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Dent. Hyg.* 2014; 12, 160–167.
- Vasconcelos J.F., Teixeira M.M., Barbosa-Filho J.M., Lúcio A.S., Almeida J.R., de Queiroz L.P. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:1216–1221.
- Verpoorte R., Choi Y.H., Kim H.K., NMR-based metabolomic analysis of plants. *Phytochem. Anal.* 2010; 21, 2–3.
- Vitor C.E., Figueiredo C.P., Hara D.B., et al. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol.* 2009; 157: 1034-44.
- Vlastos D, Drosopoulou E, Efthimiou I, Gavrilidis M, Panagaki D, Mpatziou K, et al. Genotoxic and Antigenotoxic Assessment of Chios Mastic Oil by the *In Vitro* Micronucleus Test on Human Lymphocytes and the *In Vivo* Wing Somatic Test on *Drosophila*. *PLoS ONE.* 2015; 10(6): e0130498.
- Vlastos D, Mademtoglou D, Drosopoulou E, Efthimiou I, Chartomatsidou T, Pandelidou C, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of Chios mastic water by the in vitro micronucleus test on human lymphocytes and the in vivo wing somatic test on *Drosophila*. *PLoS One.* 2013; 8(7): e69494.
- Wang X., Ye X., Liu R., Chen H.L., Bai H., Liang X., Zhang X.D., Wang Z., Li W.I., Hai C.X., Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem.-Biol. Interact.* 2010; 184, 328–337.
- Wilson I.D., Plumb R., Granger J., Major H., Williams R., Lenz E.M. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *J Chromatogr. B.* 2005; 817, 67 .
- Wiseman D.A., Werner, S.R., Crowell P.L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320, 1163–1170.
- World Health Organization (2008) Traditional medicine: fact sheet N° 134. Available:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Accessed 2012 Oct 19
- Yadav V.R., Prasad S., Sung B., Kannappan R., Aggarwal B.B. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins (Basel).* 2010; 2:2428–2466.
- Yang G., Chen J., Wen Z., Ge K., Zhu L., Chen X., The role of selenium in Keshan disease. *Adv. Nutr. Res.* 1984; 6, 203–220.
- Yavuzer R., Kelly C., Durrani N., Mittal V., Jackson I.T. and Remine S. Reinforcement of subcuticular continuous suture closure with surgical adhesive strips and gum mastic: Is there any additional strength provided? *Am J Surg.* 2005; 189: 315-318.
- Yin M.C., Lin M.C., Mong M.C., Lin C.Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J Agric Food Chem.* 2012; 60:7697–7701.
- Yoon W.J., Lee N.H., Hyun C.G. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J. Oleo Sci.* 2010; 59, 415–421.
- Yuliana N. D., Khatib A., Choi Y.H., Verpoorte R., Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytother. Res.* 2011; 25, 157–169.

- Zeng X.Y., Wang Y.P., Cantley J., Iseli T.J., Molero J.C., Hegarty B.D., Kraegen E.W., Ye Y., Ye M.. Oleanolic acid reduces hyperglycemia beyond treatment period with Akt/FoxO1-induced suppression of hepatic gluconeogenesis in type-2 diabetic mice. PLoS One. 2012; 7:1–12.
- Zhang J., Wang D., He S., The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases Int. J. Mol. Sci. 2015; 16, 26087–26124.
- Zhang W., Men X., Lei P. Review on antitumor effect of triterpene acid compounds. J Can Res Ther. 2014; 10:1419
- Zhou L., Satoh K., Takahashi K., Watanabe S., Nakamura W., Maki J., Hatano H., Takekawa F., Shimada C. and Sakagami H. Reevaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. In Vivo. 2009; 23: 583-589.
- Ένωση μαστιχοπαραγωγών Χίου <http://www.gummastic.gr/>
- Σαββίδης Θ. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). ISBN: 960-343-528-7, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε., 2000.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΓΡΑΠΤΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ



Code _____
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΣΕ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω την εθελοντική συμμετοχή μου στη μελέτη βιοδιαθεσιμότητας με τίτλο «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ».

Η μελέτη θα διεξαχθεί στις εγκαταστάσεις του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Σκοπός της είναι η επιστημονική τεκμηρίωση της πραγματικής απορρόφησης και διαθεσιμότητας των συστατικών της Μαστίχας Χίου στην κυκλοφορία του αίματος υγιών εθελοντών.

Βεβαιώνω ότι έχω ενημερωθεί προφορικά για το πειραματικό πρωτόκολλο στο οποίο θα συμμετέχω εάν υπογράψω το παρόν συμφωνητικό. Συγκεκριμένα, γνωρίζω ότι **έχω την υποχρέωση να:**

1. Συμπληρώσω ερωτηματολόγιο που θα περιλαμβάνει:
 - δημογραφικά στοιχεία
 - κατάσταση υγείας (ιατρικό ιστορικό ατομικό και οικογενειακό)
 - καπνιστικές συνήθειες
 - διατροφικές συνήθειες
 - φυσική δραστηριότητα.
2. Υποβληθώ σε μετρήσεις ανθρωπομετρικών παραμέτρων, δηλαδή ύψους και σωματικού βάρους.
3. Υποβληθώ σε λήψη αίματος για έλεγχο ρουτίνας.
4. Ακολουθήσω δίαιτα χαμηλή σε φυτοχημικά για 1 (μία) εβδομάδα πριν την ημέρα του πειράματος με βάση οδηγίες που θα μου δοθούν.
5. Καταναλώσω 10 γραμμάρια φυσικής Μαστίχας Χίου που θα μου χορηγηθεί συγκεκριμένη ημέρα και ώρα που θα συμφωνήσω με το προσωπικό της μελέτης.
6. Υποβληθώ σε λήψη αίματος.
7. Συλλέξω και παραδώσω προς εργαστηριακό έλεγχο ούρα.
8. Επαναλάβω τα βήματα 4-7 μετά από 2 εβδομάδες από την κατανάλωση Μαστίχας Χίου με μόνη διαφορά την κατανάλωση μαστιχελαίου.

Η διάρκεια της κλινικής δοκιμής θα είναι συνολικά ένας μήνας χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο οι εθελοντές θα κληθούν για ορισμένες επισκέψεις στις εγκαταστάσεις του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κατόπιν ραντεβού.

Γνωρίζω ότι όλες οι παραπάνω μετρήσεις θα γίνουν υπό την επίβλεψη Ιατρού και Διαιτολόγου-Διατροφολόγου και ότι δεν προκαλούν καμία ενόχληση ούτε ενέχουν οποιονδήποτε κίνδυνο για την υγεία μου.

- **Είμαι σύμφωνος/η** να ακολουθήσω τα στάδια 1-8.
- **Κατανοώ** ότι οποιαδήποτε ερωτήματα που αφορούν στη διαδικασία θα απαντηθούν πλήρως από την Επιστημονικά Υπεύθυνη Επικοινωνία Καθηγήτρια κ. Ανδριάννα Χ. Καλιώρα.
- **Κατανοώ** ότι οποιαδήποτε πληροφορία αφορά σε εμένα και τα αποτελέσματα των εξετάσεών μου θα παραμείνουν απόρρητα ως προς το όνομά μου, δηλαδή δεν θα δημοσιευθούν ονομαστικά σε δημοσίευση που πιθανά προκύψει από τη μελέτη.

Εγώ ο υπογραφόμενος δίνω με ελεύθερη βούληση τη συναίνεσή μου για την **αυστηρά εθελοντική** συμμετοχή μου στη μελέτη αυτή υπό την επίβλεψη της Επικοινωνίας Καθηγήτριας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κ. Ανδριάννας Χ. Καλιώρα.

Όνοματεπώνυμο Εθελοντή _____
Διεύθυνση _____ ☐ _____
Τηλ. ☎ _____ Fax _____ E-mail _____

Ημερομηνία ____/____/____

Υπογραφή Εθελοντή

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΧΑΜΗΛΗ ΣΕ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

Παρακαλείσθε να προσαρμόσετε το διαιτολόγιό σας σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα για 5 ημέρες πριν την διεξαγωγή του πειράματος κατανάλωσης Μαστίχας Χίου για τη μελέτη της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας των βιοδραστικών συστατικών της.

Ομάδα τροφίμων	Τρόφιμα που ΕΠΙΤΡΕΠΟΝΤΑΙ	Τρόφιμα που ΑΠΑΓΟΡΕΥΟΝΤΑΙ
Γάλα και προϊόντα του	Γάλα, γιαούρτι, τυριά	Γιαούρτι με φρούτα (αποξηραμένα ή φρέσκα) ή μέλι
Φρούτα	-	Όλα τα φρούτα (αποξηραμένα ή φρέσκα) καθώς και χυμοί τους (φρέσκοι ή εμπορίου)
Λαχανικά	-	Όλα τα λαχανικά (ωμά ή μαγειρεμένα) καθώς και οι σάλτσες ντομάτας και χυμοί άλλων λαχανικών
Δημητριακά-Ψωμί-Ζυμαρικά	Δημητριακά πρωινού σκέτα, μπάρες δημητριακών σκέτες, ρύζι, πατάτες, χυλοπίτες, μακαρόνια, ψωμί όλων των ειδών, φρυγανιές, παξιμάδια, κουλούρι Θεσσαλονίκης, κράκερς	Δημητριακά πρωινού ή μπάρες δημητριακών με σοκολάτα ή φρούτα, έτοιμα ζυμαρικά (τύπου tortellini) γεμιστά με λαχανικά, όσπρια
Κρέας και προϊόντα του	Κρέας (χοιρινό, μοσχαρίσιο κτλ), πουλερικά, ψάρια, αυγά, αλλαντικά	-
Λίπη και έλαια	Μαργαρίνη, βούτυρο, μαγιονέζα, ξηροί καρποί και ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο κτλ με μέτρο	-
Γλυκά	Γλυκίσματα/μπισκότα/κέικ, κρουασάν και τσουρέκι χωρίς κακάο, σοκολάτα ή φρούτα (φρέσκα ή αποξηραμένα)	Σοκολάτα, Γλυκίσματα, μπισκότα/κέικ/κρουασάν και τσουρέκι με κακάο, σοκολάτα ή φρούτα (αποξηραμένα ή φρέσκα)
Ροφήματα- Ποτά	Νερό, αναψυκτικά τύπου cola με μέτρο, καφές σε συχνότητα έως 1 την ημέρα	Καφές, κρασί, μπύρα, κακάο, τσάι και άλλα αφεψήματα βοτάνων, αλκοολούχα ποτά, χυμοί φρούτων (φρέσκοι ή εμπορίου)
Καρυκεύματα	Αλάτι, πιπέρι και μπαχαρικά και ξύδι με μέτρο	Όλα τα μυρωδικά