



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Μελέτη της δράσης κλασμάτων και συστατικών της Μαστίχας σε ζωικό
μοντέλο Ιδιοπαθούς Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου (ΙΦΝΕ).**

Μηχανισμός δράσης



ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΛΙΩΡΑ ΑΝΔΡΙΑΝΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2011



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**Μελέτη της δράσης κλασμάτων και συστατικών της Μαστίχας σε ζωικό
μοντέλο Ιδιοπαθούς Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου (ΙΦΝΕ).**

Μηχανισμός δράσης

ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΛΙΩΡΑ ΑΝΔΡΙΑΝΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την επιβλέπουσα Λέκτορα κα. Ανδριάννα Καλιώρα για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε με την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα καθώς η βασική ιδέα της παρούσας έρευνας της ανήκει.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στη συγγραφή της ερευνητικής μου εργασίας. Τους ευχαριστώ, ακόμη, για τις θεωρητικές και εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέφεραν στη διάρκεια της φοίτησής μου οι οποίες συνέβαλαν ουσιαστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Ακόμη, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Αριστέα Γκιοζάρη για την ανεκτίμητη βοήθεια της κάθε φορά που τη χρειάστηκα και για τη συμπαράστασή της.

Επιπλέον, οφείλω ένα ευχαριστώ στη φαρμακευτική εταιρεία ELPEN για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού και τη φιλοξενία των πειραματόζωων. Ευχαριστώ τον κ. Απόστολο Παπαλόη, Δρ Βιολόγο και Διευθυντή του Ερευνητικού Τμήματος καθώς και το προσωπικό της εταιρείας για τη μεγάλη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς και την αδελφή μου για την υποστήριξη και την υπομονή τους σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ΣΚΟΠΟΣ	13
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	15
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ	17
1.1 Γενικά	17
1.2 Ιστορικά στοιχεία.....	18
1.3 Μοναδικότητα.....	19
1.4 Παραγωγή	20
1.5 Το μαστιχόδενδρο (μαστιχοφόρος σχίνος)	21
1.5.1 Γενικά	21
1.5.2 Συστηματική κατάταξη.....	21
1.5.3 Ρητινοφόροι αγωγοί.....	22
1.6 Η παραδοσιακή καλλιέργεια.....	22
1.7 Εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής	23
1.8 Εμπορική κατεργασία	24
1.9 Προϊόντα της μαστίχας	24
1.10 Φυσικές ιδιότητες	25
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	27
Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ	27
2.1 Μαστιχέλαιο	27
2.2 Τερπένια.....	27
2.2.1 Βιοσύνθεση.....	27
2.2.2 Ταξινόμηση.....	27
2.2.3 Τερπένια στη μαστίχα και τα κλάσματά της.....	28
2.3 Πολυφαινόλες	32
2.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	32
2.3.2 Πολυφαινόλες στη μαστίχα	32
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	33
ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ	33
3.1 Εισαγωγή	33
3.2 Δράση κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος.....	33
3.2.1 Πεπτικό έλκος.....	33
3.2.2 Λειτουργική δυσπεψία.....	34
3.2.3 Ελικοβακτήριο του πυλωρού	34
3.3 Αντιμικροβιακή δράση	35
3.4 Αντινεοπλασματική δράση	36
3.5 Καρδιοπροστατευτική δράση	38
3.6 Ηπατοπροστατευτική δράση.....	40
3.7 Δράση στη στοματική και οδοντική υγιεινή.....	40
3.8 Δράση στην epούλωση τραυμάτων του δέρματος.....	41
3.9 Δράση κατά της νόσου Crohn	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	43
ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ	43
4.1 Γενικά	43
4.2 Αντιοξειδωτική δράση	43
4.2.1 Μονοτερπένια- διτερπένια	43
4.2.2 Τριτερπένια	44
4.3 Αντιμικροβιακή δράση	44
4.3.1 Αιθέρια έλαια	44
4.3.2 Τριτερπένια	44
4.4 Αντιφλεγμονώδης δράση	45
4.4.1 Αιθέρια έλαια	45
4.4.2 Τριτερπένια	45
4.5 Αντινεοπλασματική δράση	45
4.5.1 Μονοτερπένια	45
4.5.2 Τριτερπένια	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	49
Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	49
5.1 Ορισμός	49
5.2 Επιδημιολογικά στοιχεία	49
5.3 Αιτιολογία και παθοφυσιολογία	50
5.3.1 Γενετικοί παράγοντες	50
5.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	50
5.3.3 Αυτοάνοσοι παράγοντες	50
5.3.4 Ανοσολογικοί παράγοντες	51
5.3.5 Λοιμώδεις παράγοντες	51
5.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και ιστολογικά ευρήματα	51
5.5 Κλινικά χαρακτηριστικά	52
5.5.1 Εντερικές εκδηλώσεις	53
5.5.2 Εξωεντερικές εκδηλώσεις	53
5.6 Διάγνωση	54
5.7 Θεραπεία	55
5.7.1 Φαρμακευτική- χειρουργική αντιμετώπιση	55
5.7.2 Διατροφική αντιμετώπιση	55
5.7.3 ΙΦΝΕ και οξειδωτικό στρες	56
5.7.4 ΙΦΝΕ και φλεγμονή	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	63
6.1 <i>In vivo</i> πειράματα	63
6.1.1 Τα πειραματόζωα και οι συνθήκες διαβίωσής τους	63
6.1.2 Κλασματοποίηση μαστίχας Χίου	63
6.1.3 Ποσοτική ανάλυση ολεανολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)	64
6.1.4 Πειραματικό ζωικό μοντέλο νόσου Crohn	65
6.1.5 Δοκιμή με μαστίχα ή συστατικά αυτής	66
6.1.6 Πειραματικές ομάδες	67
6.1.7 Αναισθησία-ευθανασία	68
6.1.8 Ομοιογενοποίηση ιστών	69
6.1.9 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford	69
6.1.10 Μέτρηση επιπέδων κυτταροκινών σε ιστό	70

6.1.11 Μέτρηση επιπέδων μαλοναλδεΐδης (MDA) σε ιστό.....	71
6.2 <i>In vitro</i> δοκιμή σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου	72
6.2.1 Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας.....	73
6.2.2 Ψύξη και απόψυξη κυττάρων	73
6.2.3 Καλλιέργεια ανθρώπινης σειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29	73
6.2.4 Διέγερση επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29	74
6.2.5 Μέτρηση επιπέδων γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)	74
6.2.6 Μέτρηση πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65	75
6.3 Στατιστική επεξεργασία.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
7.1 Ποσοτικοποίηση ολεανολικού οξέος.....	80
7.2 Το πειραματικό μοντέλο TNBS κολίτιδας.....	80
7.3 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn.....	81
7.4 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων	82
7.4.1 Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων.....	82
7.4.2 Επίπεδα IL-8 στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων.....	84
7.4.3 Επίπεδα MDA στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων	87
7.5 Η επίδραση της ινουλίνης στην TNBS κολίτιδα	90
7.6 Δοκιμή σε καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων εντέρου HT29	91
7.7 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και κυτταροτοξικότητας σε καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων εντέρου HT29.....	92
7.7.1 Επίπεδα LDH σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29.....	92
7.7.2 Επίπεδα IL-8 σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29.....	94
7.7.3 Επίπεδα NF-κΒ σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29.....	95
7.9 Συμπεράσματα	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα διαταραχών του γαστρεντερικού σωλήνα που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή και παρουσιάζουν περιόδους έξαρσης και ύφεσης. Περιλαμβάνει τη νόσο Crohn και την Ελκώδη κολίτιδα. Στην προσπάθεια αποφυγής των παρενεργειών που εμφανίζονται από τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής για τη νόσο, διερευνώνται οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες φυσικών προϊόντων. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν τη δράση της Μαστίχας Χίου στην κλινική εικόνα της νόσου Crohn. Η μαστίχα Χίου είναι φυσική αρωματική ρητίνη που εκκρίνεται από το μαστιχόδεντρο, το οποίο ευδοκιμεί αποκλειστικά στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου.

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε α) η κλινική αξιολόγηση της πρόσληψης μαστίχας Χίου και διαφόρων κλασμάτων της σε ζωικό μοντέλο που μιμείται τη νόσο Crohn και η αποσαφήνιση του πιο δραστικού από αυτά και β) η διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης της σε μοντέλο φλεγμονής επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου.

Για την πρώτη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 50 αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar που τυχαιοποιήθηκαν σε 10 ομάδες. Μετά την επαγωγή της νόσου, τους χορηγήθηκαν από του στόματος ισοδύναμες δόσεις σκόνης μαστίχας, ινουλίνης, όξινου κλάσματος μαστίχας, ουδέτερου κλάσματος μαστίχας, και ολεανολικού οξέος, ενός τριτερπενίου της που ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες στο όξινο κλάσμα για 3 μέρες. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς των εν λόγω συστατικών, μετρήθηκαν στον εντερικό ιστό και ορό των πειραματοζώων οι κυτταροκίνες IL-6, IL-8 και η μαλοναλδεΐδη. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, αιθανολικά εκχυλίσματα μαστίχας, κλασμάτων και συστατικών της δοκιμάστηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου HT29 τα οποία διεγέρθηκαν έπειτα με TNF- α . Σε αυτά αξιολογήθηκε η κυτταρική βλάβη (επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης, LDH) και η φλεγμονή (επίπεδα IL-8 και ενεργοποίηση NF- κ Bp65). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στους δείκτες στο κόλον και στον ορό των επίμυων από τη μαστίχα και τα συστατικά της ($p < 0,05$) αλλά όχι από την ινουλίνη και το ολεανολικό οξύ. Στα HT29 κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση των δεικτών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο ($p < 0,05$). Η επίδραση του ολεανολικού οξέως ήταν στατιστικά σημαντική μόνο σε μεγάλες δόσεις. Συμπερασματικά, η μαστίχα Χίου συμβάλλει στη ρύθμιση της φλεγμονής μόνο στη φυσική της μορφή καθώς κανένα από τα κλάσματά ή συστατικά της δεν επέδρασε σε μεγάλο βαθμό όταν χορηγήθηκε ξεχωριστά. Η αντιφλεγμονώδης ιδιότητα της μαστίχας μεσολαβείται από την απενεργοποίηση της NF- κ Bp65, μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη με πρωταγωνιστικό ρόλο στη νόσο Crohn η οποία ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες.

SUMMARY

Background: Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a heterogeneous group of disorders of the gastrointestinal tract which are characterized by chronic inflammation and present periods of elation and recession. It consists of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. In light of trying to avoid the serious side effects caused by the medication for the disease, the anti-inflammatory activity of natural products is now under research. Recent data show the beneficial effect of Chios Mastic gum at the clinical profile of Crohn's Disease. Chios Mastic gum is a natural aromatic resin exuded from the mastic tree which is almost exclusively grown at the south part of Chios Island.

Purpose of the present postmaster thesis was 1) the clinical evaluation of the consumption of mastic resin and several of its fractions/ components in an animal model which imitates Crohn's Disease and the declaration of the most active among them and 2) the clarification of the mechanism of action of mastic in a model of inflammation of colon epithelial cells.

Experimental design: In the first series of experiments 50 male Wistar rats were used which were randomly assigned into 10 groups. After the induction of the disease, for 3 days they were administered per os equivalent doses of mastic powder, inulin, acidic fraction, neutral fraction and oleanolic acid, a triterpene which is found in big proportion at the acidic fraction. For the evaluation of the effectiveness of the above components, cytokines (IL-6, IL-8) and malonaldehyde were measured in colon and serum of the animals. In the second series of experiments, ethanol solutions of mastic gum, fractions and components were tested at HT29 human colon epithelial cells which were afterwards aroused with TNF- α . Cell damage (% release of lactate dehydrogenase) and inflammation (levels of IL-8 and NF- κ B p65 activation) were assessed.

Results: Significant differences in colonic and serum indices occurred in mastic but not in inulin or oleanolic acid treated colitic rats ($p < 0,05$). In HT29 cells, a dose- dependent reduction of measured indices was observed ($p < 0,05$). Oleanolic acid was effective only when megadoses were tested.

Conclusion: Chios mastic gum contributes to the regulation of inflammation only in its natural form as none of its fractions or components was highly effective when given solely. Its anti-inflammatory property is mediated by deactivation of NF- κ B p65, an intracellular protein with key role in Crohn's disease which is activated by oxidative stress.

ΣΚΟΠΟΣ

1. Η κλινική αξιολόγηση της πρόσληψης μαστίχας Χίου και διαφόρων κλασμάτων/ συστατικών της σε ζωικό μοντέλο που μιμείται τη νόσο Crohn και η αποσαφήνιση του πιο δραστικού από αυτά.
2. Η διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης της μαστίχας Χίου σε κυτταρικό μοντέλο φλεγμονής εντερικών κυττάρων που μιμείται τη νόσο Crohn.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACF	aberrant crypt foci
ASCA	αντισώματα έναντι του σακχαρομύκητα <i>cerevisiae</i>
BHT	βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (butylated hydroxytoluene)
BSA	αλβουμίνη ορού (bovine serum albumin)
CDAI	δείκτης ενεργότητας της νόσου (Crohn's Disease Activity Index)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
DEN	διεθλνιτροσοαμίνη (diethylnitrosoamine)
DMAPP	πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (dimethylallyl pyrophosphate)
DMBA	7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)
DMSO	διμέθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide)
ELAM-1	ενδοθηλιακό μόριο σύνδεσης λευκοκυττάρων τύπου 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1)
GSH	γλουταθειόνη (glutathione)
HDL	λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (high density lipoprotein)
ICAM-1	διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (intracellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	ιντερφερόνη-γ (interferon-gamma)
IL-	ιντερλευκίνη- (interleukin-)
IPP	πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl pyrophosphate)
LDH	γαλακτική αφυδρογονάση, (lactate dehydrogenase)
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein)
LFA 1	αντιγόνο-1 λειτουργίας των λεμφοκυττάρων (lymphocyte function associated antigen-1)
LPS	λιποπολυσακχαρίδη (lipopolysaccharides)
MDA	μαλοναλδεΰδη (malondialdehyde)
NCS	εμβρυϊκός ορρός μόσχου
NF- κB	πυρηνικός παράγοντας-κB (nuclear factor kappa beta)
NO	μονοξείδιο του αζώτου
oxLDL	οξειδωμένη LDL (oxidized LDL)
P-ANCA	περιπυρηνικά αντιουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα
PBMC	μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells)

PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffer saline)
POH	περιλλυλ αλκοόλη (perillyl alcohol)
ROS	ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)
SOD	δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase)
TAP	ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (total antioxidant potential)
TGF-β	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (transforming growing factor-beta)
TNBS	2,4,6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (trinitrobenzene sulfonic acid)
TNF-α	παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-alpha)
VCAM-1	αγγειακό συνδετικό μόριο-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	ενδοθηλιακός αγγειακός παράγοντας ανάπτυξης (vascular endothelial growth factor)
VLA 4	very late antigen-4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

1.1 Γενικά

Η μαστίχα της Χίου είναι η ρητινώδης έκκριση του μαστιχόδενδρου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). Πρόκειται για φυσική, αρωματική ρητίνη, που εκκρίνεται σε μορφή δακρύων από τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του μαστιχόδενδρου, μέσω επιφανειακών τομών που προκαλούνται με αιχμηρά εργαλεία. Η μαστίχα εμφανίζεται σαν δάκρυ στα χαραγμένα σημεία και ρέει κατά σταγόνες στο χώμα. Αναγνωρίστηκε από τα αρχαία χρόνια, τόσο για το ιδιαίτερο άρωμα της, όσο και για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του νοτίου τμήματος του νησιού της Χίου, επιτρέπουν την καλλιέργειά της μόνο εκεί και εξηγούν τη μοναδικότητά της (www.gummastic.gr).



Εικόνα 1. Δάκρυα μαστίχας

Η μαστίχα Χίου από το 1997, έχει χαρακτηριστεί ως Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.), βάσει του υπ' αριθμό. 123/1997 Κανονισμού (L0224/24-1-97) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και έχει καταχωρηθεί στον σχετικό Κοινοτικό Κατάλογο των Προϊόντων Π.Ο.Π. Ως Π.Ο.Π χαρακτηρίζεται το προϊόν, του οποίου τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον, ενώ η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία του λαμβάνουν χώρα σε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή. Σύμφωνα με τον παραπάνω κανονισμό, η μαστίχα Χίου προστατεύεται από την πώληση οιασδήποτε ανταγωνιστικής απομίμησης που θα υπεξαιρούσε τη φήμη της Ονομασίας Προέλευσης (www.gummastic.gr).

1.2 Ιστορικά στοιχεία

Αναφορές για χρήση της μαστίχας υπάρχουν ήδη από την αρχαία Ελλάδα. Ο Ηρόδοτος (5^{ος} αιώνας π.Χ.) αναφέρει ότι οι αρχαίοι Έλληνες μασούσαν το αποξηραμένο ρητινώδες υγρό που ρέει από το φλοιό του μαστιχόδενδρου. Στην κλασική Ελλάδα, τα νέα κορίτσια μασούσαν μαστίχα ώστε να αποκτούν ευχάριστη αναπνοή. Από το 10^ο αιώνα π.Χ. η χρήση της διαδόθηκε ευρύτατα και οι επισκέπτες της Χίου αναφέρονταν στις καλλιέργειες των μαστιχόδενδρων. Αναφορές υπάρχουν από πολλούς ακόμη αρχαίους συγγραφείς οι οποίοι την αποκαλούν «σχινική ρητίνη». Ο Ιπποκράτης, πατέρας της ιατρικής συνιστά τη μαστίχα ως θεραπευτικό μέσο. Ο Διοσκουρίδης, «πατέρας της φαρμακολογίας» (1^{ος} αιώνας μ.Χ.) αναφέρει ότι βοηθάει μεταξύ άλλων στη δυσπεψία, στην αναπαραγωγή του αίματος και ως ηρεμιστικό φάρμακο ενώ το μαστιχέλαιο χρησιμεύει στις παθήσεις της μήτρας, τα καρκινώματα του στομάχου, τη στοματική υγιεινή, την τόνωση των φωνητικών χορδών. Τέλος, καθαρίζει το πρόσωπο και δίνει ωραίο χρώμα. Επιπλέον, σύμφωνα με τον Ηρόδοτο και το Διόδωρο από τη Σικελία, η μαστίχα αντιπροσώπευε ένα από τα κύρια συστατικά στο μίγμα ταρίχευσης μαζί με άλλα. Τέλος, σε αυτήν αναφέρονται και οι αρχαίοι συγγραφείς Θεόφραστος και Γαληνός αλλά και ο Πλίνιος που αναφέρει ότι η παραγωγή μαστίχας στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου είχε τόσο μεγάλη αξία που άξιζε τη νοθεία.

Μεταγενέστερα, αναφορές συναντάμε στην Αγία Γραφή. Παρότι δεν αναφέρεται η παραγωγή μαστίχας, το μαστιχόδενδρο (*Pistacia lentiscus*) αναφέρεται μια φορά με το όνομα «σχίνος» στο διδακτικό βιβλίο του προφήτη Δανιήλ. Και σε άλλες περιπτώσεις γίνονται αναφορές σε ονόματα φυτικών ειδών που φαίνεται πως ταυτίζονται με τη μαστίχα όπως είναι γνωστή σήμερα. Αργότερα, αρκετοί Έλληνες και Λατίνοι γιατροί, όπως ο Ριβάσιος, ο Σορανός, ο Εφέσιος, ο Etius Medicus, ο Scribonius Largus αναφέρουν τις χρήσεις και τις φαρμακευτικές ιδιότητες της μαστίχας. Έτσι, οι κυρίες της Ρώμης και αργότερα αυτές της Κωνσταντινούπολης χρησιμοποιούσαν οδοντογλυφίδες από ξύλο μαστιχόδενδρου γιατί είχε την ιδιότητα να λευκαίνει τα δόντια. Επίσης, αναφορά υπάρχει για παραγωγή μαστίχας στην Ιταλία η οποία όμως ήταν ελάχιστη συγκριτικά με αυτή της Χίου και ποιοτικά κατώτερη.

Κατά τη διάρκεια της βυζαντινής αυτοκρατορίας το εμπόριο της μαστίχας ήταν μονοπώλιο του Έλληνα αυτοκράτορα. Η οικονομία της Χίου ήταν ανθηρή εξ' αιτίας της μαστίχας η οποία απέδιδε στα αυτοκρατορικά ταμεία πολλά έσοδα. Λίγα χρόνια μετά την κατάληψη της Κωνσταντινούπολης από τους Φράγκους, το βυζαντινό σύστημα παραγωγής και διαχείρισης της μαστίχας κληρονομήθηκε από τους Γενοβέζους. Τότε ιδρύθηκε η «Μαόνα», μια

επιχείρηση που κρατούσε το μονοπώλιο της μαστίχας με υποχρέωση να δαπανά για την άμυνα του τόπου που κυριάρχησε στο νησί και επέζησε μέχρι το 1566 παρά τις επικίνδυνες διαθέσεις των Τούρκων. Κατά τη διάρκεια της Τουρκοκρατίας οι μαστιχοπαραγωγοί της Χίου είχαν ιδιαίτερα προνόμια. Τα χωριά που είχαν ως κύρια εργασία την καλλιέργεια της μαστίχας (Μαστιχόχωρα) ήταν αυτοδιοικούμενα χωρίς να έχουν σχέση με την κεντρική εξουσία του νησιού. Μάλιστα απέδιδαν τον «υπέρ του δημοσίου» φόρο της μαστίχας έναντι οποιουδήποτε άλλου φόρου σε ποσότητα ανάλογη με την παραγωγή.

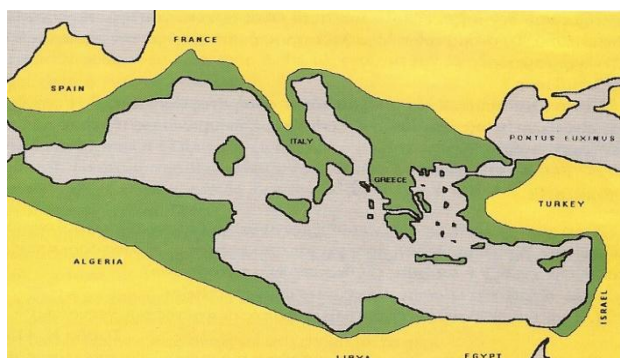
Στα χρόνια της νεότερης Ελλάδας η παραγωγή της μαστίχας από το 1910 ως το 1920 άρχισε να ελαττώνεται λόγω του βαλκανικού και Α΄ παγκοσμίου πολέμου. Αργότερα, κατά το Β΄ παγκόσμιο πόλεμο, με την εισαγωγή του «αμερικάνικου τρόπου ζωής», η μαστίχα άρχισε να αντικαθίσταται από μη φυσικά υποκατάστατα. Πάντως, η χρήση της εξακολουθεί να είναι εκτεταμένη στη σημερινή Ελλάδα στην ποτοποιία, ζαχαροπλαστική και στη βιομηχανία γενικότερα (Σαββίδης, 2000).

1.3 Μοναδικότητα

Παρόλο που η μαστίχα είναι γνωστή από αρχαιοτάτων χρόνων δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένο εάν καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στη Χίο. Έχουν αναφερθεί αποτυχημένες προσπάθειες να μεταφερθεί η καλλιέργεια του μαστιχόδενδρου στην Αττική και σε άλλα νησιά του Αιγαίου όπως τη Ρόδο και τη Λέσβο (Heildreich 1862; Pernot 1856). Θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην Αμοργό και την Αντίπαρο, όμως, λόγω έλλειψης πληροφοριών, συμπεραίνεται ότι οι προσπάθειες απέτυχαν και εγκαταλείφθηκαν. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκε να καλλιεργείται συστηματικά μέχρι σήμερα πουθενά αλλού είναι αρκετό για να πιστοποιηθεί ότι η πατρίδα του μαστιχόδενδρου είναι η Χίος.

Στο ίδιο το νησί της Χίου η καλλιέργεια είναι δυνατή μόνο στο νότιο τμήμα. Προσπάθειες να επεκταθεί η καλλιέργεια πέρα από αυτό το όριο απέτυχαν. Η αιτία αναζητείται στο ιδιαίτερο μικροκλίμα της. Η Χίος έχει μακρόστενο σχήμα, με ψηλά δασωμένα βουνά στο βόρειο τμήμα, που συγκρατούν την υγρασία και εξασθενούν τους βοριάδες. Έτσι, το νότιο, λοφώδες κομμάτι αποκτά ένα ιδιαίτερο κλίμα, ήπιο το χειμώνα και πολύ ξηρό το καλοκαίρι. Συχνά βρέχει σε όλο το νησί, εκτός από εκεί. Τα ξηρά, ζεστά καλοκαίρια των Μαστιχοχωριών επιτρέπουν στη μαστίχα να στεγνώσει. Αν η μαστίχα βραχεί πριν «ωριμάσει», καταστρέφεται. Επίσης, το έδαφος είναι σχετικά πετρώδες, ασβεστολιθικό με ποσοστό ασβεστίου που ποικίλει από 20-50% (Σαββίδης, 2000). Τέλος, η μοναδικότητα οφείλεται και

στον ευγονισμό. Από τα αρχαία χρόνια οι καλλιεργητές εντόπιζαν τα δένδρα που απέδιδαν περισσότερη και καλύτερη ρητίνη και τα πολλαπλασίαζαν, ώστε να δημιουργούν νέες φυτείες σχίνων με τα χαρακτηριστικά των μητρικών. Με το πέρασμα των αιώνων, δημιουργήθηκε ένα νέο είδος σχίνου, υπερπαραγωγικού σε μαστίχα. Άλλωστε, υπήρξε άριστη η διαχείρισή της ήδη από τους αρχαίους Χίους, που συστηματοποίησαν την καλλιέργεια των σχίνων, τυποποίησαν το προϊόν και το επέβαλαν στην αγορά. Και οι τέσσερις παραπάνω παράγοντες οδήγησαν στο να ταυτιστεί η μαστίχα με τη νότια Χίο, παρότι οι σχίνοι υπάρχουν σε όλη τη Μεσόγειο (www.gummastic.gr).



Εικόνα 2. Η εξάπλωση του είδους *Pistacia lentiscus* στη λεκάνη της Μεσογείου

1.4 Παραγωγή

Σύμφωνα με στοιχεία της Ενώσεως Μαστιχοπαραγωγών Χίου κατά τη χρονική περίοδο 1958- 1961 η μέση ετήσια παραγωγή ήταν 190 τόνοι. Για την περίοδο 1962- 1967 η παραγωγή ήταν 233.150 κιλά. Σήμερα η ετήσια παραγωγή ανέρχεται σε 160- 200τόνους με τάση μείωσής της τα επόμενα χρόνια λόγω έλλειψης εργατικών χεριών με τη μεταστροφή του πληθυσμού σε άλλες ασχολίες όπως η ναυτιλία και ο τουρισμός. Η μη επέκταση των φυτειών, η έλλειψη στοιχειώδους μηχανοποίησης, ο κατακλυσμός της αγοράς από μη φυσικά υποκατάστατα με πολύ φθηνότερο κόστος παραγωγής είναι κάποιοι ακόμη λόγοι.

Από οικονομική σκοπιά, η ακαθάριστη αξία παραγωγής της μαστίχας είναι 20-30% της συνολικής ακαθάριστης αξίας φυτικής παραγωγής της Χίου, η δε συμμετοχή της στο ΑΕΠ του πρωτογενή τομέα εκτιμάται ότι είναι της τάξης του 15-20%. Η μαστίχα και τα προϊόντα της εξάγονται σε όλο τον κόσμο και αποφέρουν στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών 4.000.000 δολάρια ετησίως. Η ετήσια παραγωγή είναι δυνατό να αυξηθεί αν καλλιεργηθεί ο μεγάλος αριθμός μαστιχόδενδρων που μένουν ακαλλιέργητα, κυρίως γιατί η επίπονη εργασία και οι παραδοσιακές μέθοδοι δεν εντυπωσιάζουν ιδιαίτερα νέους καλλιεργητές (Σαββίδης, 2000).

1.5 Το μαστιχόδενδρο (μαστιχοφόρος σχίνος)

1.5.1 Γενικά

Το μαστιχόδενδρο είναι ένας αειθαλής θάμνος, με ύψος 2-3 μέτρων που ενίοτε φτάνει τα 5 μέτρα. Τα άρρενα άτομα αποδίδουν περισσότερη και καλύτερη ποιότητα μαστίχας και αυτά κυρίως καλλιεργούνται. Το μαστιχόδενδρο αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς και η πλήρης ανάπτυξη επέρχεται στα 40-50 χρόνια. Ζει πάνω από εκατό χρόνια αλλά από το 70^ο έτος περίπου αρχίζει η παρακμή του. Η παραγωγή μαστίχας αρχίζει από τον 5^ο ή 6^ο χρόνο ενώ το μέγιστο της απόδοσης (320-1.000 γραμμάρια) εμφανίζεται από το 12^ο- 15^ο έτος της ηλικίας. (Σαββίδης, 2000). Η μέση ετήσια απόδοση ανά δένδρο είναι 150-180 γραμμάρια μαστίχας ενώ υπάρχουν και σπάνιες περιπτώσεις δένδρων που παράγουν δύο κιλά αλλά και δένδρα που βγάζουν μόνο 10 γραμμάρια. Στην αποδοτικότητα παίζει ακόμα ρόλο το πόσο μακριά είναι φυτεμένο το ένα δένδρο από το άλλο, η ποικιλία και το σκάψιμο, δηλαδή όταν τα χωράφια δεν σκάβονται, η απόδοση του δένδρου πέφτει (www.gummastic.gr).



Εικόνα 3. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*)

1.5.2 Συστηματική κατάταξη

Το μαστιχόδενδρο ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια *Anacardiaceae*. Η οικογένεια περιλαμβάνει 4 γένη, όλα μικρά δένδρα ή θάμνοι: *Rhus*, *Cotinus*, *Schinus*, *Pistacia*. Τα είδη του γένους *Pistacia* είναι (1) *P. terebinthus*, (2) *P. atlantica*, (3) *P. palestina*, (4) *P. vera*, (5) *P. chinensis* και (6) *P. lentiscus*. Το γένος *Pistacia* προέρχεται από την κεντρική Ασία, σημείο από το οποίο τα διάφορα είδη εξαπλώθηκαν γύρω από την Μεσόγειο. Πολλά είδη *Pistacia* παράγουν ρητίνη σε κάποιο βαθμό όμως μόνο δύο από αυτά, η *P. lentiscus* και η *P. atlantica*, είναι γνωστά από τα αρχαία χρόνια για την παραγωγή και εμπορία του προϊόντος (Σαββίδης, 2000).

1.5.3 Ρητινοφόροι αγωγοί

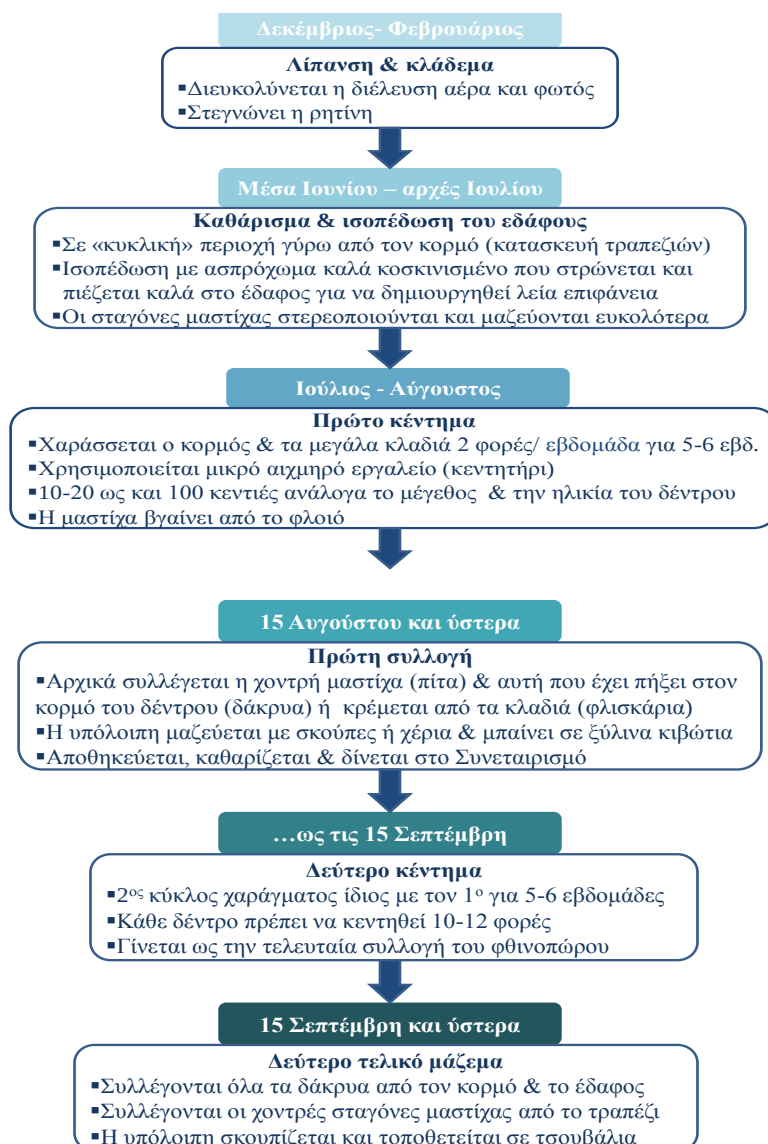
Η έκκριση της ρητίνης λαμβάνει χώρα σε εξειδικευμένες ανατομικές δομές, τους ρητινοφόρους αγωγούς. Οι ρητινοφόροι αγωγοί στην *Pistacia lentiscus* var. *Chia* βρίσκονται στο βλαστό, στα φύλλα και τη ρίζα. Εξωτερικά προστατεύονται από τόξα σκληρεγγυματικών ινών. Αυτές αποτελούνται από 3-4 σειρές κυττάρων και περιβάλλουν τον αγωγό μόνο από την περισσότερο ευάλωτη (εξωτερική) πλευρά. Τόσο στο βλαστό όσο και στη ρίζα υπάρχουν πολυάριθμα κύτταρα που περιέχουν άφθονα σκοτεινά κοκκία ή χυμοτόπια με τανίνες, τα οποία βρίσκονται κοντά και γύρω από τους ρητινοφόρους αγωγούς. Οι τελευταίοι συνεχίζονται και στα φύλλα και απαντώνται στον κεντρικό τους μίσχο αλλά και στους μικρότερους μίσχους των επιμέρους φυλλαρίων. Ακόμη και τα υποτυπώδη φύλλα (λέπια) που προστατεύουν τους οφθαλμούς (μπουμπούκια) διαθέτουν καλά ανεπτυγμένους αγωγούς οι οποίοι ενισχύουν τον προστατευτικό ρόλο των λεπίων στους τρυφερούς οφθαλμούς. Οι ρητινοφόροι αγωγοί στα λέπια παράγουν ρητίνη που λειτουργεί ως αποκρουστική ουσία σε πολλά έντομα. Επιπρόσθετος ρόλος τους εκεί είναι ότι συμβάλλουν στην απορρόφηση της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας που θα μπορούσε να προκαλέσει υπερθέρμανση και πήξιμο της ρητίνης, γεγονός που θα δημιουργούσε δυσκολία στη ροή της μέσα στον αγωγό.

Η διαδικασία έκκρισης της ρητίνης γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, σχηματίζονται τα επιμέρους συστατικά στο εσωτερικό του αγωγού. Φαίνεται πως η σύνθεσή τους γίνεται ξεχωριστά σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και πιθανώς στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια να συντίθενται διαφορετικά συστατικά. Ακόμη και η σύνθεση των τερπενίων, που θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο, φαίνεται πως συμβαίνει σε διαφορετικά όργανα του φυτού (βλαστός, φύλλα, ρίζα, άνθος, καρπός). Καθένα από τα παραπάνω όργανα παράγει ξεχωριστά τερπενικά συστατικά τα οποία έχουν το δικό τους αποκλειστικό φυσιολογικό ρόλο. Στο δεύτερο στάδιο της έκκρισης, ανοικοδομούνται τα κυτταρικά τοιχώματα των επιθηλιακών κυττάρων σταδιακά αρχίζοντας από τις στοιβάδες που βρίσκονται κοντά στο κυτταρόπλασμα. Τα διάφορα συστατικά των κυττάρων, τα υπολείμματα των κυτταρικών τοιχωμάτων, μεμβράνες, ακόμα και ολόκληρα κύτταρα δημιουργούν μια άμορφη μάζα η οποία αποτελεί το πρόδρομο υλικό της ρητίνης (Σαββίδης, 2000).

1.6 Η παραδοσιακή καλλιέργεια

Η μαστιχοπαραγωγή απαιτεί εργασία και φροντίδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός, ότι η παραγωγική διαδικασία έχει μείνει αναλλοίωτη στο

πέρασμα του χρόνου, γεγονός που συνδέει άρρηκτα τη μαστιχοπαραγωγή με την παράδοση (www.gummastic.gr). Η παραγωγή της μαστίχας γίνεται κατά τους μήνες Ιούνιο με Σεπτέμβριο ενώ, αν το επιτρέπουν οι καιρικές συνθήκες, η συλλογή παρατείνεται έως τον Οκτώβριο. Η συλλογή της, βάσει νόμου γίνεται από τις 15 Ιουλίου μέχρι τις 15 Οκτωβρίου, ώστε να επιτυγχάνεται η ομοιόμορφη παραγωγή της ρητίνης (πήξιμο).



Εικόνα 4. Τα στάδια της παραδοσιακής καλλιέργειας της μαστίχας Χίου (Σαββίδης, 2000)

1.7 Εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής

Τα τελευταία χρόνια (από το 1994) γίνονται προσπάθειες για τη συλλογή της μαστίχας με εναλλακτικές μεθόδους οι οποίες αποβλέπουν στο μικρότερο κόστος. Από τις πειραματικές αυτές προσπάθειες αναφέρονται η συλλογή ρητίνης σε υγρή μορφή, η χρήση της πάστας θειϊκού οξέως, η χρήση πλαστικών φύλλων και η εφαρμογή διαχυτήρων θειώδους νατρίου (Σαββίδης, 2000).

1.8 Εμπορική κατεργασία

Μετά την κατεργασία και ταξινόμηση της μαστίχας από τον παραγωγό παραδίδεται μέσω του Συνεταιρισμού στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Εκεί η διαδικασία αρχίζει με πολλαπλές πλύσεις, στέγνωμα και επακολουθεί ένα δεύτερο «τσίμπημα». Το τσίμπημα είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει το καθάρισμα των κόκκων της μαστίχας με μικρά μαχαίριδια, από τυχόν ξένα σώματα που έμειναν εγκλωβισμένα και γίνεται τις νυχτερινές κυρίως ώρες. Τελικά, ταξινομείται σε εμπορικές κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος των μεριδίων μαστίχας. Η αποθήκευση του προϊόντος γίνεται σε ψυχρό χώρο για την κατά το δυνατόν μεγαλύτερη κατακράτηση του μαστιχέλαιου (Σαββίδης, 2000).

1.9 Προϊόντα της μαστίχας

Σκόνη μαστίχας: Διακρίνεται σε διατροφική (με προσθήκη μαλτοδεξτρίνης) και μαγειρική. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη στην παρασκευή πολλών γλυκών, ζαχαρωτών και αρωματικών σκευασμάτων. Ιδιαίτερα προσφιλές είναι το γλυκό μαστίχα που σερβίρεται βυθισμένο σε ποτήρι νερού («υποβρύχιο»). Επίσης, χρησιμοποιείται στο λουστράρισμα της σοκολάτας, στα μπισκότα, στα παγωτά, στις καραμέλες κ.ά. Τη συναντάμε, επίσης, στην ποτοποιία για την παρασκευή λικέρ, ούζου και άλλων ποτών. Ακόμη, αποτελεί διατροφικό συμπλήρωμα σε περιπτώσεις έλλειψης ιχνοστοιχείων.

Τσίχλα: Με βάση τη μαστίχα παράγεται σήμερα σε σύγχρονο εργοστάσιο η τσίχλα ΕΛΜΑ, που περιέχει φυσική ρητίνη, ζάχαρη και μαλακτικές ουσίες. Η τσίχλα ΕΛΜΑ είναι η μοναδική στον κόσμο που παρασκευάζεται με φυσική πρώτη ύλη.

Μαστιχέλαιο: Παράγεται μέσω απόσταξης της φυσικής μαστίχας με ατμό. Είναι 100% φυσικό προϊόν και η απόδοση σε μαστιχέλαιο κυμαίνεται ανάλογα με την ποιότητα της μαστίχας από 1 ως 3%. 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. Χρησιμοποιείται και ως άρωμα στην παραγωγή τροφίμων (ζαχαρώδη, αρτοσκευάσματα κ.ά.).

Μαστιχόνερο: Είναι το υδατικό διάλυμα μαστίχας που παραλαμβάνεται από απλή απόσταξη της μαστίχας. Είναι φυσικά αρωματισμένο νερό που μεταφέρει το άρωμα της μαστίχας και όλες τις ευεργετικές της ιδιότητες. Χρησιμοποιείται για καθαρισμό και περιποίηση του προσώπου, στη μαγειρική, την αρτοποιία, τη ζαχαροπλαστική και την ποτοποιία.

Κολοφώνιο: Είναι η ρητινώδης ουσία που απομένει μετά την απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου από την μαστίχα. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή χειρουργικών νημάτων (ράμματα), τα οποία απορροφώνται από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται

επέμβαση κοπής τους. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων κλπ (Σαββίδης, 2000).

Μοσχολίβανο: Παρασκευάζεται από μαστίχα, κολοφώνιο μαστίχας και διογκωτικά τρίμματα. και εμπλουτίζεται με φυσικά αρώματα. Αναδίδει αρωματικούς ατμούς πολύ ανώτερους από τα σχετικά βαρυόσμε γνωστά λιβάνια. Χρησιμοποιείται κυρίως στην ορθόδοξη εκκλησία για θυμίαμα στους ναούς αλλά και σε μωαμεθανικούς λαούς.

Άγιο Μύρο: Σύμφωνα με τον «Κατάλογο των συστατικών του Αγίου Μύρου» που συνέταξε το Οικουμενικό Πατριαρχείο, τα συστατικά του, συμπεριλαμβανομένου και του ελαίου ανέρχονται σε 57. Η καθαρή μαστίχα, σε ποσότητα 20 λίτρων αποτελεί το τέταρτο κατά σειρά υλικό της ενομένης ύλης του. Η επιλογή της σχετίζεται με τα συστατικά και της ιδιότητές της που έχουν συμβολικό χαρακτήρα και ικανοποιούν κάποια θρησκευτικά κριτήρια (Σαββίδης, 2000).

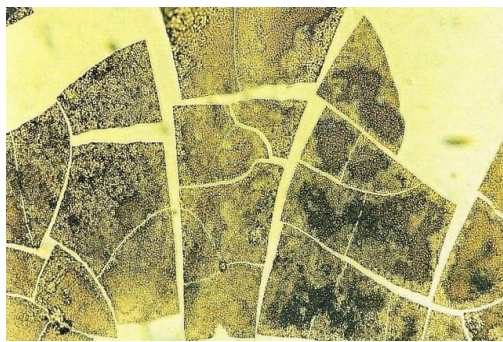


Εικόνα 6. Προϊόντα μαστίχας: σκόνη μαστίχας διατροφική (με μαλτοδεξτρίνης), σκόνη μαστίχας μαγειρική, τσίχλες μαστίχας, μαστιχέλαιο και Μαστιχόνερο

1.10 Φυσικές ιδιότητες

Κατά την έκκρισή της η μαστίχα έχει τη μορφή κολλώδους και διαυγούς υγρού και στερεοποιείται σε ακανόνιστα σχήματα μετά την πάροδο 15-20 ημερών, υπό την επίδραση των καιρικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή κατά την καλοκαιρινή περίοδο, δηλαδή την έντονη ξηρασία και ηλιοφάνεια. Η μορφή της, αφού στερεοποιηθεί, είναι κρυσταλλική, ενώ η πικράδα που έχει στην αρχή υποχωρεί αφήνοντας ένα ιδιαίτερο άρωμα που της προσδίδει μοναδικότητα. Η στερεοποίηση είναι το αποτέλεσμα μερικής εξάτμισης του αιθέριου ελαίου και πολυμερισμού των συστατικών της ρητίνης. Ταυτόχρονα, μειώνεται η κολλώδης ιδιότητα της, γεγονός το οποίο επιτρέπει την ευκολότερη συλλογή της. Η πυκνότητα της μαστίχας είναι 1.06 και ο βαθμός οξύτητας της 50-75.

Το χρώμα της είναι αρχικά υποκίτρινο. Με το πέρασμα του χρόνου χάνει το χρώμα αυτό και σε 12 με 18 μήνες γίνεται κιτρινωπή λόγω της οξείδωσης. Εξωτερικά δημιουργείται μια σκληρότερη κρούστα που προστατεύει τα εσωτερικά στρώματα από την περαιτέρω οξείδωση. Η σκληρότητα εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού της ρητίνης. Με τη σειρά του, ο πολυμερισμός επηρεάζεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, το χρόνο έκθεσης στη φύση, καθώς και από το μέγεθος που έχει το δάκρυ. Όταν η ροή είναι συνεχής, το δάκρυ είναι μεγάλο και σχετικά μαλακό λόγω της προστασίας της εσωτερικής μάζας από παράγοντες πολυμερισμού. Αντίθετα, η μη συνεχής ροή δίνει δάκρυ μικρό και μεγαλύτερης σκληρότητας, διότι πραγματοποιείται πιο γρήγορα πολυμερισμός. Η μαστίχα έχει ισχυρή κολλητική ικανότητα. Είναι διαλυτή στη βενζίνη, στον αιθέρα, στον οξικό αιθυλεστέρα, στην ακετόνη, στην αιθυλική αλκοόλη, στο χλωροφόρμιο, στο τερεβινθέλαιο και σε άλλους οργανικούς διαλύτες. Το σημείο τήξης είναι μεγαλύτερο από 96°C (Σαββίδης, 2000).



Εικόνα 7. Εξωτερική κρούστα κόκκων μαστίχας (μεγέθυνση x 100)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

2.1 Μαστιχέλαιο

Τη στιγμή της εκροής από το δέντρο, όταν η μαστίχα είναι σε υγρή κατάσταση, περιέχει 17-20% μαστιχέλαιο ενώ 3 μέρες μετά τη συλλογή το μαστιχέλαιο είναι περίπου 14%. Η μακροχρόνια παραμονή της συνεπάγεται τη σημαντική μείωση του μαστιχέλαιου, γεγονός που μπορεί να αποφευχθεί από την ψυχρή συντήρηση της μαστίχας (Σαββίδης, 2000).

2.2 Τερπένια

Τα αιθέρια έλαια και οι ρητίνες περιέχουν μεγάλη ποικιλία τερπενίων. Τα αιθέρια έλαια περιέχουν πτητικά, χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια, ενώ οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη-πτητικών τερπενίων, δηλαδή διάκριση γίνεται σε πρακτικό επίπεδο (Σαββίδης, 2000).

2.2.1 Βιοσύνθεση

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες που παράγονται από πολλά είδη φυτών αλλά και από κάποια έντομα όπως οι τερμίτες και οι πεταλούδες swallowtail (με ψαλιδωτή ουρά) (Eisner et al, 1965). Βιοσυντίθενται από μονάδες ισοπρενίου με χημική δομή C_5H_8 ($H_2C=C(CH_3)-CH=CH_2$: 2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) και γι' αυτό ονομάζονται και ισοπρενοειδή. Η βασική μοριακή δομή των τερπενίων είναι $(C_5H_8)_n$ όπου n ο αριθμός των ισοπρενικών μονάδων, οι οποίες μπορούν να ενωθούν σχηματίζοντας γραμμικές αλυσίδες ή δακτυλίους. Η βιοσύνθεσή τους ξεκινά από ενεργοποιημένες μορφές του ισοπρενίου: το πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθαλλύλιο (DMAPP). Το IPP παράγεται μέσω 2 μεταβολικών οδών: 1) της 2-μεθυλ-D ερυθριτολ-4φωσφορικής οδού, από την οποία προκύπτουν τα μονο-, δι-, σεστερ- και τετρα-τερπένια (Lichtenthaler, 1999; Rodriguez, 2002) και 2) της οδού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού οξέως (παράγονται σεσκι-, τρι- και πολυ-τερπένια) (Bruneton, 1999; Losa-Tavera, 1999).

2.2.2 Ταξινόμηση

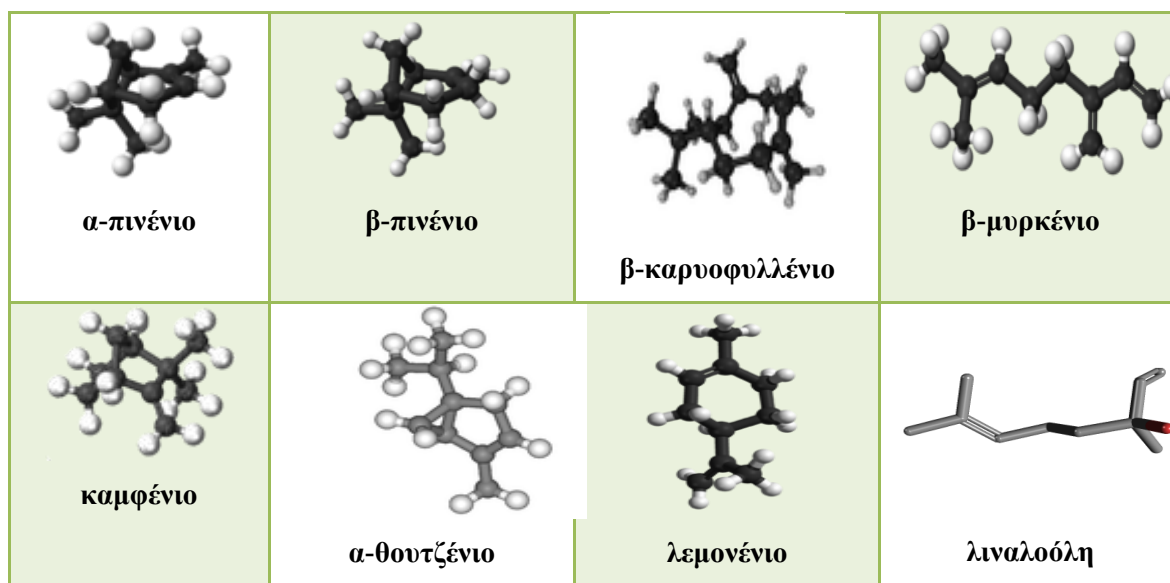
Καθώς προστίθενται μονάδες ισοπρενίου τα τερπένια που προκύπτουν ταξινομούνται βάσει του μεγέθους τους ως: ημιτερπένια (1 ισοπρενική ομάδα), μονοτερπένια (2 ισοπρενικές ομάδες), σεσκιτερπένια (3 ισοπρενικές ομάδες), διτερπένια (4 ισοπρενικές ομάδες), σεστερτερπένια (5 ισοπρενικές ομάδες), τριτερπένια (6 ισοπρενικές ομάδες), τετρατερπένια (8 ισοπρενικές ομάδες), πολυτερπένια (πολλές ισοπρενικές ομάδες).

2.2.3 Τερπένια στη μαστίχα και τα κλάσματά της

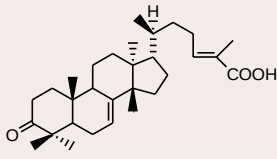
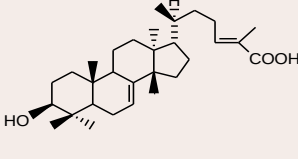
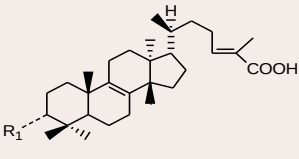
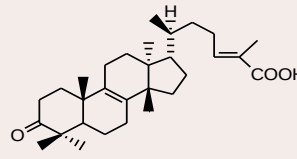
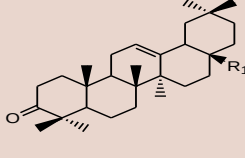
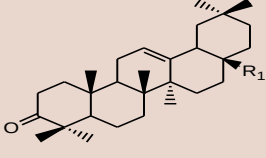
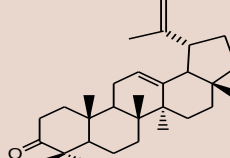
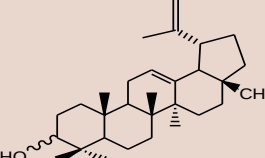
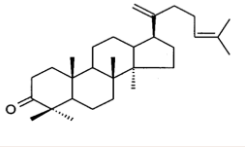
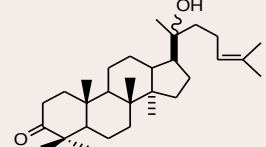
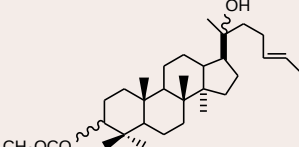
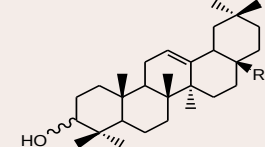
Ρητίνη	Μαστιχέλαιο	
1. μαστιχαδιενονικό οξύ	1. α-θουτζένιο	42. 2-ενδεκανόνη
2. ισο-μαστιχαδιενονικό οξύ	2. α-πινένιο	43. μυρτενάλη
3. ολεανονικό οξύ	3. φενχένιο	44. trans-σαμπινόλη
4. τιρουκαλλόλη	4. καμφένιο	45. trans-περιλλυλική αλκοόλη
5. (8R)-3β,8-διυδροξυ-πολυποδα-13E,17E,21-τριένιο	5. εξανάλη	46. trans-π-μενθα-2,8-διεν-1-όλη
6. β-αμυρόνη	6. β-πινένιο	47. οξικός
7. β-αμυρίνη	7. σαμπινένιο	χρυσανθενυλεστέρας
8. ολεανονική αλδεΐδη	8. βερμπενένιο	48. α-διυδρο-π-κυμεν-8-όλη
9. γερμανικόλη	9. μυρκένιο	49. α-χουμουλένιο
10. λουπεόλη	10. δ-3-καρένιο	50. καρβόνη
11. διπτεροκαπρόλη	11. α-φελλανδρένιο	51. σαντανόλη
12. 3-οξυ-28-νορολεαν-12-ένη	12. 1,4 κινεόλη	52. νεράλη
13. 3-οξυ-28-νορλουμ-20(29)-ένη	13. α-τερπινένιο	53. cis-περιλλυλική αλκοόλη
14. 3-οξυ-δαμμαρα-20(21),24-διένη	14. λεμονένιο	54. βερμπενόνη
15. (8R)-3-οξυ-8-υδροξυπολυποδα-13E,17E,21-τριένη	15. 1,8-κινεόλη	55. γ-μουουρολένιο
16. 28-υδροξυ-β-αμυρόνη	16. β-φελλανδρένιο	56. α-τερπινεόλη
17. (20S)-3β-ακετοξυ-20-υδροξυδαμμαρα-24-ένη	17. 2-πεντυλο-φουράνιο	57. βορνεόλη
18. 3β-υδροξυ-μαλαβαρικά-14(26),17E,21, τριένη	18. cis-οκιμένιο	58. πιπεριτόνη
19. μορονικό οξύ	19. εποξειδίο του οκιμενίου	59. ναφθαλένιο
20. ολεανολικό οξύ	20. γ-τερπινένιο και trans-οκιμένιο	60. α-μουουρολένιο
21. μαστιχαδιενολικό οξύ	21. 2-βινυλο-3,5-διμεθυλοφουράνιο	61. γερανιάλη
22. 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ	22. π-κυμένιο	62. α-διυδρο-κυμεν-8-όλη
23. 3-O-ακετυλ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ	23. τερπινολένιο και 2-οκτανόλη	63. cis-ανηθόλη
	24. οκτανάλη	64. μυρτενάλη
	25. ο-κυμένιο	65. trans-ανηθόλη
	26. 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη	66. trans-καρβεόλη
	27. 2-εννεανόνη	67. π-κυμεν-8-όλη
	28. εννεανάλη	68. 6,10-διμεθυλο-ενδεκα-5,9-διεν-2-όνη
	29. μεθυλο-ο-κρεσόλη	69. κουμινυλική αλκοόλη
	30. καμφοραλδεΐδη	70. οξείδιο του καρυοφυλλενίου
	31. περιλλένιο	71. ανησαλδεΐδη
	32. δευδρο-π-κυμένιο	72. μεθυλο-ευγενόλη
	33. α-κοπαένιο	73. νερολιδόλη
	34. καμφορά	74. cis-μεθυλο-ισοευγενόλη
	35. πινοκαμφορά	75. trans-μεθυλο-ισοευγενόλη
	36. λιναλοόλη	76. διμυρκένιο
	37. οξικός λιναλυλεστέρας	βερατραλδεΐδη
	38. δ-καδινένιο	
	39. οξικός βορνυλεστέρας	
	40. β-καρυοφυλλένιο	
	41. τερπινεν-4-όλη	

Πίνακας 1. Τερπένια στη ρητίνη και στο μαστιχέλαιο (Σαββίδης, 2000)

Η καθαρή ρητίνη φαίνεται σε πολλές μελέτες πως περιέχει σε μεγάλο ποσοστό ένα αδιάλυτο και κολλώδες πολυμερές το οποίο σύμφωνα με τη μελέτη των Paraschos et al (2006) φτάνει το 30%. Το πολυμερές κλάσμα της *Pistacia lentiscus*, όπως φάνηκε στη χρωματογραφική ανάλυση των Klaas Jan van der Host et al (1998), αποτελείται από 1,4-πολυ-β-μυρκένιο που έχει cis διαμόρφωση κατά περίπου 75%. Επιπλέον, εκτός από το β-μυρκένιο, απομονώθηκαν και άλλα μονοτερπένια όπως το λεμονένιο, το καμφένιο και το β-πινένιο. Από αυτά, το β-μυρκένιο είναι η μόνη ουσία με συζευγμένους διπλούς δεσμούς που έχουν τάση να πολυμερίζονται. Έτσι, οι ερευνητές συμπέραναν πως το δένδρο παράγει μεγάλες ποσότητες β-μυρκενίου το οποίο πολυμερίζεται όταν η ρητίνη «εξιδρώσει» από αυτό. Τα κυριότερα μονοτερπένια της μαστίχας εντοπίζονται στο μαστιχέλαιο και απεικονίζονται στην εικόνα 1. Στην εικόνα 2 απεικονίζονται τα κυριότερα τριτερπένια τα οποία ανιχνεύονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στη ρητίνη.



Εικόνα 1. Μοριακές δομές μονοτερπενίων της *Pistacia lentiscus*

			
Μαστιχαδιενονικό οξύ	Μαστιχαδιενολικό οξύ	3-Επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ $R_1 = OH,$	Ισομαστιχαδιενονικό οξύ
			
β-Αμυρόνη Nor-β-αμυρόνη 28-Υδροξυ-β-αμυρόνη	R_1 CH₃ H OH	R_1 CHO COOH COOH	Νορ-λουπεόλη
			
Δαμμαραδιενόνη	Υδροξυδαμμαρενόνη	3-Ακετοξυ-υδροξυδαμμαρενόνη CH_3OCO	β-Αμυρίνη Nor-β-αμυρίνη Ολεανολικό οξύ
			R_1 CH₃ H CHO

Εικόνα 2. Μοριακές δομές τριτερπενίων της *Pistacia lentiscus*

Επιπλέον, για περεταίρω μελέτη της σύστασης της μαστίχας γίνεται κλασματοποίηση του εκχυλίσματος, μετά την αφαίρεση των πολυμερών. Από την κλασματοποίηση προκύπτουν 2 κλάσματα: ένα όξινο το οποίο περιέχει κυρίως οξέα και ένα ουδέτερο κλάσμα που περιέχει κυρίως αλδεΐδες και αλκοόλες. Στη μελέτη των Parageorgiou et al (1996) περιγράφηκε η σύσταση του όξινου κλάσματος ενώ σε αυτή των Asimopoulou et al (2005) η σύσταση και των 2 κλασμάτων σε τερπένια, η οποία φαίνεται στους πίνακες 2 και 3.

Όξινο κλάσμα	Ουδέτερο κλάσμα
1. Methyl 11-Oxo-3β-hydroxy-28-norolean-17-en-6-oate 2. Methyl moronatea 3. Methyl oleanonatea 4. Methyl 3β-acetoxy-6β-hydroxy-olean-18-en-28-olate 5. Methyl 3β-acetoxy-6β-hydroxydihydro-isomasticadienolate 6. Methyl isomasticadienonatea 7. Methyl 3-epi-isomasticadienolatea 8. Methyl masticadienonatea 9. Methyl 3β-acetoxy-20,30-dehydro-12-lupen-28-oate 10. Methyl olean-12,18-dien-3-olate	1. Lupenone 2. 3β-Hydroxy-6β-hydroxymethyl-28-norolean-17-ene 3. 3β-Hydroxy-28-norolean-17-en-6-al 4. Tirucallola 5. 3-Methoxy-28-norolean-12-ene 6. Dammaradienonea 7. 28-Norolean-12-en-3-onea 8. β-Amyronea 9. Olean-18-en-3-one 10. 28-Norolean-17-en-3-onea 11. 28-Norolean-12,17-dien-3-one 12. 6-Methyl-28-norolean-17-en-3-one 13. 3-Methoxy-28-norolean-17-ene 14. 3β-Acetoxy-28-norolean-17-ene 15. 3-Oxo-28-norolean-17-en-6-al 16. 3β-Hydroxy-6-methyl-28-norolean-17-ene 17. Olean-18-en-3-ol 18. 3β-Hydroxy-dammarane-derivative 19. 20,24-Epoxy-25-hydroxy-dammaren-3-one 20. 3β-Hydroxy-epoxy-dammaranederivative 21. Hydroxydammaronea 22. 28-Nor-17-oleanen-3-ol 23. Oleanonic aldehydea 24. Isomasticadienolic aldehyde 25. 11-Oxo-β-amyrin acetate 26. Norlupenonea

Πίνακας 2. Τριτερπένια στο όξινο και ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης (παραδοσιακή συλλογή) (Papageorgiou et al, 1997; Asimopoulou et al, 2005)

Όξινο κλάσμα	Ουδέτερο κλάσμα
1. Methyl Oleanonate 2. Methyl 11-oxomasticadienonatea 3. Methyl isomasticadienonate 4. Methyl 3-epiisomasticadienolate 5. Methyl Masticadienonate 6. Methyl-3-acetoxy-3-epiisomasticadienolatea 7. Methyl isomastica-8,11(12)-dienolatea 8. Methyl-3-acetoxy-3-epimasticadienolatea	1. Dammaradienone 2. 3-Methoxy-28-norolean-12-ene 3. 28-Norolean-12-en-3-ola 4. β-Amyrin 5. β-Amyrone 6. 28-Nor-17-oleanen-3-one 7. Oleanonic aldehyde 8. 3β-Acetoxy-12-oleanenea 9. 3β-Acetoxy-isomasticadienolic aldehydea 10. 11-Oxo-β-amyrin acetate 11. Norlupenone

Πίνακας 3. Τριτερπένια στο όξινο και ουδέτερο κλάσμα της ρητίνης (συλλογή σε υγρή μορφή) (Asimopoulou et al, 2005)

2.3 Πολυφαινόλες

2.3.1 Δομικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων που ανιχνεύονται στο φυτικό βασίλειο και έχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Τα δομικά χαρακτηριστικά τους είναι το φαινολικό υδροξύλιο, ο αρωματικός πυρήνας (συχνά ετεροκυκλικός), το ετεροκυκλικό οξυγόνο και το συζευγμένο σάκχαρο (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικά ή γαλακτουρονικά οξέα). Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε ταννίνες που μπορούν να υδρολυθούν (εστέρες γαλλικού οξέος της γλυκόζης και άλλων σακχάρων) και φαινυλπροπανοειδή όπως οι λιγνίνες, τα φλαβονοειδή και οι συμπτυγμένες ταννίνες.

2.3.2 Πολυφαινόλες στη μαστίχα

Το πολυφαινολικό περιεχόμενο των φύλλων της *Pistacia lentiscus* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον τόσο από οικολογική όσο και από βιολογική σκοπιά. Αντιπροσωπεύει το 7,5% του ξηρού βάρους των φύλλων της (Romani et al, 2002). Μέχρι τώρα 2 ερευνητικές ομάδες το έχουν διερευνήσει και χρησιμοποιήσαν διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης για την ποσοτικοποίηση. Τα αποτελέσματα της πρώτης ομάδας (Romani et al, 2002) αναφέρονται στα φύλλα της μαστίχας. Σύμφωνα με αυτή, ανιχνεύθηκαν οι εξής πολυφαινόλες: γαλλικό οξύ, μονογαλλοϋλ-γλυκόζη, 5-Ο-γαλλοϋλ- κινινικό οξύ, 3,5-Ο-διγαλλοϋλ- κινινικό οξύ, κατεχίνη, 3,4,5-Ο-τριγαλλοϋλ-κινινικό οξύ, μυρισετίνη- γλυκουρονίδη, μυρισετίνη-3-Ο-ρουτινοσίδη, μυρισετίνη-3-Ο- ραμνοσίδη, κερκετίνη 3-Ο- ραμνοσίδη, δελφινιδίνη 3-Ο-γλυκοσίδη, κυανιδίνη 3-Ο-γλυκοσίδη. Στον πίνακα 4 αναφέρονται τα αποτελέσματα της δεύτερης ομάδας (Kalióra et al, 2004) που αφορούν τη ρητίνη.

Πολυφαινόλες	ng/g ξηρού βάρους
Τυροσόλη	375
π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	136
π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	107
Βανιλλικό οξύ	41
Γαλλικό οξύ	Ίχνη
Trans- κινναμικό οξύ	Ίχνη

Πίνακας 4. Πολυφαινόλες στην *Pistacia lentiscus* (Kalióra et al, 2004)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Ούσα γνωστή από αιώνες, η μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται ευρύτατα στη λεκάνη της Μεσογείου και τις χώρες της Μέσης Ανατολής τόσο σαν διατροφικό συμπλήρωμα όσο και σαν θεραπευτικό βότανο (Al-Said et al, 1986). Στη σύγχρονη εποχή, η επιστημονική κοινότητα με ορθές και επιστημονικά αποδεκτές μεθόδους, επιβεβαιώνει και τεκμηριώνει τις ευεργετικές δράσεις της μαστίχας Χίου. Αποδεικνύεται πλέον επιστημονικά ότι παρουσιάζει ευεργετική δράση κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος, έχει σημαντική αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική δράση ενώ παράλληλα συμβάλλει στη στοματική υγιεινή, την επούλωση τραυμάτων και την ανάπλαση της επιδερμίδας. Τέλος, πρόσφατα δεδομένα δίνουν ενδείξεις για τη δράση της μαστίχας κατά της νόσου Crohn.

3.2 Δράση κατά των παθήσεων του πεπτικού συστήματος

3.2.1 Πεπτικό έλκος

Η πρώτη κλινική μελέτη έγινε το 1984 από τους Al-Habbal και συν στο Ιράκ. Συμμετείχαν 38 εθελοντές με συμπτώματα και ενδοσκοπική επιβεβαίωση έλκους του δωδεκαδακτύλου. Χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και στη μία τα άτομα κατανάλωσαν για 2 εβδομάδες μαστίχα σε δόση 1g/ ημέρα ενώ στην ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε ίση ποσότητα σκόνης placebo (λακτόζη). Στην ομάδα με τη μαστίχα τα άτομα ανακουφίστηκαν από τα συμπτώματα του έλκους στο 80% των περιπτώσεων μετά τις 2 εβδομάδες (vs. 50% στην ομάδα ελέγχου), ενώ η ενδοσκοπική εξέταση έδειξε ότι το έλκος στο 70% των περιπτώσεων είχε θεραπευτεί (vs. 22% στην ομάδα ελέγχου). Το 1986, σε μια δεύτερη κλινική μελέτη της ίδιας ομάδας η χορήγηση 2 g μαστίχας/ ημέρα επέφερε πλήρη ανακούφιση από τα συμπτώματα ενώ στα 5 από τα 6 άτομα, η θεραπεία επιβεβαιώθηκε και ενδοσκοπικά (Huwez et al, 1986). Σε καμιά από τις παραπάνω 2 κλινικές μελέτες δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες από τη μαστίχα. Την ίδια χρονιά, οι Al-Said et al σε μύες στους οποίους προκλήθηκε πειραματικά γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό έλκος, παρατήρησαν πως μια δόση 500 mg/kg σωματικού βάρους (ΣΒ) μειώνει την ένταση και την έκταση του σχηματισμένου έλκους στη γαστρική μεμβράνη των πειραματοζώων και παρουσιάζει αντιόξινη, αντιεκκριτική και κυτταροπροστατευτική δράση. Έτσι, φαίνεται πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του τοπικά σχηματισμένου έλκους.

3.2.2 Λειτουργική δυσπεψία

Με τον όρο «λειτουργική δυσπεψία» εννοούμε τη δυσπεψία που εμφανίζεται απουσία προσδιορισμένης κάκωσης στο άνω πεπτικό σύστημα. Στη μελέτη, των Dabos et al (2009), σε ασθενείς με λειτουργική δυσπεψία που έλαβαν 350mg μαστίχας 3 φορές/ημέρα τα συμπτώματα βελτιώθηκαν στο 77% έναντι 40% στην ομάδα ελέγχου που έλαβε placebo ($p<0,02$). Υπήρξε βελτίωση στο στομαχικό πόνο γενικά, στομαχικό πόνο όταν υπάρχει άγχος, στον αμβλύ πόνο στην άνω κοιλιακή χώρα και στο στομαχικό καύσο ($p<0,05$).

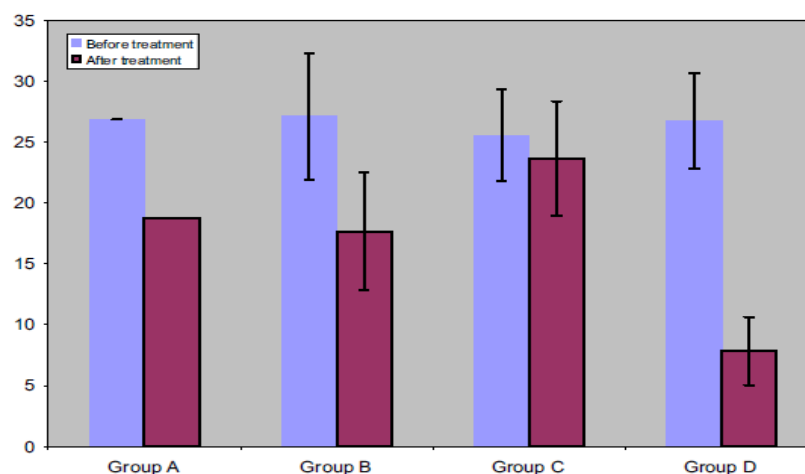
3.2.3 Ελικοβακτήριο του πυλωρού

Το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*- *H.pylori*) είναι ένα gram αρνητικό σπироειδές βακτήριο που αποικίζει το στομάχι και προκαλεί χρόνια ενεργή γαστρίτιδα και αποτελεί παράγοντα κινδύνου για πεπτικό έλκος, ατροφία, γαστρικό λέμφωμα και αδενοκαρκίνωμα (Lai et al, 2007; Eslick 2006). Η εκρίζωσή του είναι δύσκολη και συχνά παρατηρείται αντιμικροβιακή αντίσταση. Έτσι, γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης νέων ασφαλέστερων εναλλακτικών θεραπειών (Malfetrheiner et al, 2007).

Η πρώτη μελέτη έδειξε πως η μαστίχα εξουδετερώνει το *H.pylori* σε *in vitro* καλλιέργειες σε ελάχιστη δόση 60μl/ml στο 99.9% μέσα σε 24 ώρες (Huwez et al, 1998). Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν και οι Marone et al (2001) αλλά και οι Bona et al (2001) που παρατήρησαν και μορφολογικές αλλαγές στο βακτήριο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αργότερα, σε ποντίκια επιμολυσμένα με το *H.pylori* φάνηκε σημαντική μείωση στον αποικισμό χωρίς μείωση στο βαθμό και τη δραστηριότητα της γαστρίτιδας (Σγούρας και συν, 2002). Αυτό επιβεβαιώνεται από αντίστοιχη μελέτη σε ποντίκια με δόση 0,75 mg για 3 μήνες και προσδιορίζεται η συνέργεια όλων των τριτερπενίων του όξινου κλάσματος της μαστίχας για αυτή τη δράση (Paraschos et al, 2007). Αντίθετα, οι Louhglin et al (2003) δεν παρατήρησαν εξάλειψη του βακτηρίου μετά από 7 ημέρες σε επιμολυσμένα ποντίκια.

Στη συνέχεια, το 2002 σε κλινική μελέτη με 48 μολυσμένους εθελοντές (διάγνωση με δοκιμασία ουρίας αναπνοής) φάνηκε πως στην ομάδα που κατανάλωσε μαστίχα για 90 μέρες, η συγκέντρωση του βακτηρίου στην αναπνοή καθώς και η συνοδή γαστρίτιδα μειώθηκαν σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε τσίχλα placebo (Im-hwan et al, 2003). Αντίθετα, στην κλινική μελέτη των Bebb et al (2003), οι ασθενείς μετά από 7 μέρες χορήγησης μαστίχας, παρέμειναν θετικοί στο *H.pylori*.

Σε μια πιο πρόσφατη κλινική μελέτη του 2010, οι εθελοντές χωρίστηκαν σε 4 ομάδες και έλαβαν αντίστοιχα τις εξής θεραπείες: ομάδα Α: μονοθεραπεία με χαμηλή δόση μαστίχας (14 ημέρες), ομάδα Β: μονοθεραπεία με υψηλή δόση μαστίχας (14 ημέρες), ομάδα C: μαστίχα + παντοπραζόλη (αντιόξινο), ομάδα D: τριπλή θεραπεία με παντοπραζόλη, αμοξικιλίνη και κλαριθρομυκίνη (10 ημέρες). Φάνηκε ότι η μαστίχα έχει ήπια δράση κατά του *H.pylori*. Στην ομάδα Α επιτεύχθηκε εκρίζωση του *H.pylori* στο 30,8 % των ασθενών και στο 38,5% στην ομάδα Β. Έκπληξη προκάλεσε το 0% στην ομάδα Γ και η εξήγηση ίσως είναι η ταυτόχρονη χορήγηση αντιόξινου που δεν επέτρεψε στη μαστίχα να δράσει στο στομάχι καθώς είναι δραστική σε χαμηλό pH. Μάλιστα, όπως έχει αναφερθεί και από άλλους, το όξινο κλάσμα της είναι το δραστικότερο. Τέλος, για την ομάδα D με την κλασική θεραπεία το ποσοστό ήταν το μεγαλύτερο (76,9%) (Dabos et al, 2010).



Εικόνα 1. Δοκιμασία αναπνοής για την ανίχνευση *H.pylori* πραγματοποιήθηκε 4-14 ημέρες πριν τη θεραπεία. Επαναλήφθηκε 39 κατά μέσο όρο (33-61) μέρες μετά τη λήξη της. Μέσες τιμές για UBT φαίνονται στον πίνακα. Υπήρχε τάση στατιστικής σημαντικότητας στην ομάδα Α ($p=0,08$), και στην ομάδα Β ($p=0,064$). Στην ομάδα C δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=NS$). Υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ομάδα D ($p<0,001$) (Dabos et al, 2010)

3.3 Αντιμικροβιακή δράση

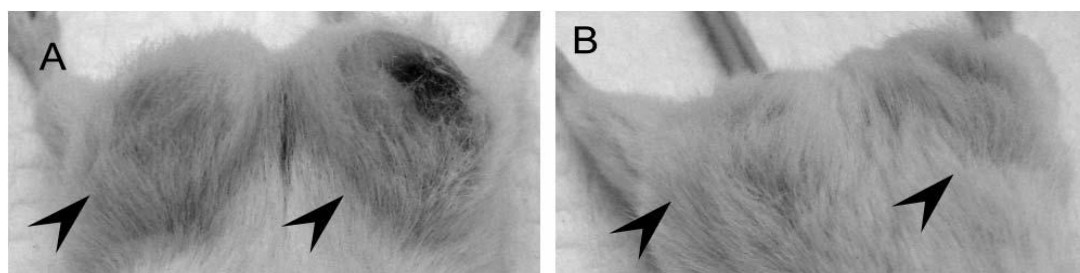
Σημαντική έρευνα έχει γίνει γύρω από την αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας η οποία εντοπίζεται, όπως και σε άλλα συστατικά φυτικής προέλευσης, στο αιθέριο έλαιό της, δηλαδή στο μαστιχέλαιο. Οι σχετικές μελέτες αιτιολογούν τη χρήση της μαστίχας σε φαρμακευτικά σκευάσματα και προϊόντα περιποίησης και προστασίας.

Η μελέτη των Tassou et al (1995) έδειξε ότι το μαστιχέλαιο ανέστειλε την ανάπτυξη και σε κάποιες περιπτώσεις την επιβίωση παθογόνων μικροβίων όπως οι: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fragi* και *Salmonella enteritis* σε επιμολυσμένα υποστρώματα και τρόφιμα. Ανάλογα αποτελέσματα είχαν και οι Iauk et al (1996) που ανέδειξαν δράση εκχυλισμάτων της μαστίχας με οργανικούς διαλύτες κατά βακτηρίων (*Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) και μυκήτων (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Torulopsis glabrata* και *Cryptococcus neoformans*). Αργότερα, οι Magiatis et al (1999) επιβεβαιώνουν την αντιμικροβιακή δράση του μαστιχέλαιου σε παθογόνους μύκητες και βακτήρια (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermis*) και την αποδίδουν στο α-πινένιο. Άλλοι μύκητες κατά των οποίων έχει καταγραφεί δράση της μαστίχας είναι οι: *Phythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* (Kordali et al, 2003). Ακόμη, ενδιαφέρον έχει το εύρημα των Daifas et al (2004) που την προτείνουν σαν φυσικό συντηρητικό σε αρτοσκευάσματα αφού έδειξαν πως το μαστιχέλαιο σε συγκέντρωση 0,3% κ/ό αναστέλλει την ανάπτυξη του *Clostridium botulinum* (υπεύθυνο για την ανάπτυξη αλλαντοξίνης σε τρόφιμα). Τέλος, η δράση του μαστιχέλαιου κατά των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis* σε σχετική μελέτη αποδόθηκε στο συνδυασμό των πολυάριθμων τερπενίων που περιέχει και όχι σε ένα συγκεκριμένο (Koutsoudaki et al, 2005).

3.4 Αντινεοπλασματική δράση

Οι μελέτες για την αντινεοπλασματική δράση της μαστίχας ξεκίνησαν μόλις την τελευταία δεκαετία. Η πρώτη (Balan et al, 2005) αναφέρει ότι το εξανικό εκχύλισμα της μαστίχας επάγει την απόπτωση της καρκινικής σειράς HCT116 του παχέος εντέρου. Σε μια δεύτερη μελέτη, οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι μετά από 3 μέρες καλλιέργειας με αιθανολικό εκχύλισμα μαστίχας, η παρουσία του δεν είναι απαραίτητη για να συνεχιστεί η απόπτωση των κυττάρων αυτών. Αυτό δείχνει ότι η μαστίχα διακόπτει την προσκόλληση των κυττάρων στο πλαίσιο ανάπτυξής τους και ο κυτταρικός θάνατος είναι αναπόφευκτος (Balan et al, 2007). Σε μια πιο πρόσφατη- και μάλιστα την πρώτη *in vivo*- μελέτη σε ποντίκια με ανοσοκαταστολή, προκλήθηκε καρκίνος του παχέος εντέρου και ύστερα υποβλήθηκαν σε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας. Το μέγεθος των όγκων μειώθηκε και αυτή η επίδραση, καθώς και η τοξικότητα εξαρτήθηκαν από τον τρόπο χορήγησης: για ένα μήνα με διαστήματα αποχής διάρκειας 2 ημερών κάθε 5 μέρες, το μέγεθος των όγκων μειώθηκε μεν σημαντικά (38%, $p < 0.05$), αλλά κανένα από τα ζώα δεν επιβίωσε. Αντίθετα,

όταν ο κύκλος χορήγησης-διακοπής ήταν 4 προς 3, οι όγκοι συρρικνώθηκαν κατά 35% ($p<0.05$) και όλα τα ζώα επιβίωσαν (Dimas et al, 2009).



Εικόνα 2. Μακροσκοπική παρατήρηση στο κόλον μυών. Όταν τα ζώα ανέπτυξαν όγκους ιδίου μεγέθους, ακολούθησε είτε πλήρης αποχή από οποιαδήποτε παρέμβαση (εικόνα Α) είτε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 200mg/Kg ΣΒ εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας (εικόνα Β). Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές ανάπτυξης των όγκων (Dimas et al, 2009)

Από την άλλη, σύμφωνα με τη μελέτη των Loutrari et al (2006) το μαστιχέλαιο έχει ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό και επιβίωση των K562 ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων και μειώνει την έκκριση αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε καρκινικά κύτταρα μελανώματος ποντικού. Επίσης μειώνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, σημείο κλειδί στην αγγειογένεση που σχετίζεται με τον καρκίνο. Επιπλέον, ανασταλτική δράση εμφανίζει η μαστίχα και στον καρκίνο του προστάτη. Μελέτες έχουν γίνει σε αρκετές καρκινικές σειρές από την ομάδα των He και συνεργατών όπου φάνηκε πως σε κάποιες από αυτές η μαστίχα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων επιδρώντας στη λειτουργία μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων και ο NF-κB (He et al, 2006; He et al, 2007a; He et al, 2007b). Επίσης, έχει αναφερθεί ευεργετική δράση και στον καρκίνο του ήπατος. Σε μια *in vivo* μελέτη σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε διαιθυλνιτροζαμίνη (DEN) ως καρκινογόνο, φάνηκε ότι η μαστίχα επηρέασε την έκφραση γονιδίων με αντικρουόμενη δράση στον καρκίνο του ήπατος με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό προνεοπλαστικών αλλοιώσεων (Doi et al, 2009). Τέλος, πειράματα έχουν διεξαχθεί και σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μαστιχέλαιου σε δόση 45 mg/kg ΣΒ 3 φορές την εβδομάδα για 3 εβδομάδες, μείωσε τους όγκους σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis (LLC) χωρίς τοξικότητα. Η δράση αυτή αποδόθηκε σε αυξημένη απόπτωση, μειωμένη αγγειογένεση, αναστολή της έκφρασης χημειοκινών (Magkouta et al, 2009). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η τελευταία μελέτη στην ίδια καρκινική σειρά (LLC) που επεκτάθηκε σε 3 ακόμη ανθρώπινες καρκινικές σειρές διαφορετικής προέλευσης για τη διερεύνηση κοινών μηχανισμών. Πραγματοποιήθηκε μελέτη RNA από τα παραπάνω

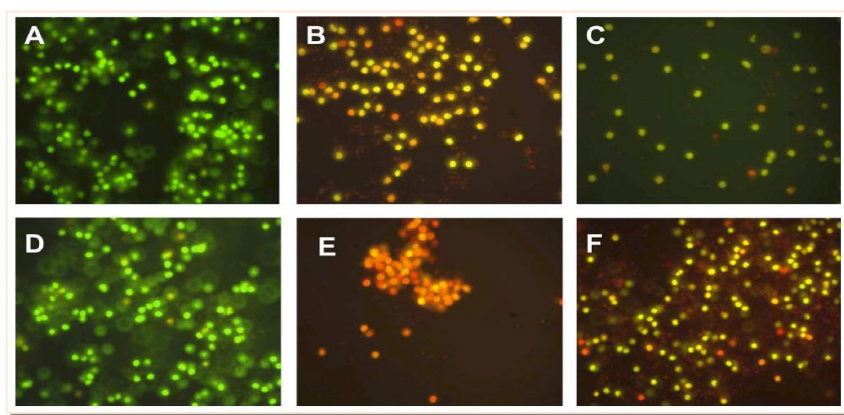
κύτταρα σε 5 διαφορετικές χρονικές στιγμές (5-48h), μετά από επίδραση μαστιχέλαιου ή DMSO. Με τη χρήση εξελιγμένων τεχνικών μικροσυστοιχίας γονιδίων και βιοπληροφορικής φάνηκε ότι το μαστιχέλαιο προκάλεσε μια χρονοεξαρτώμενη αλλαγή στην έκφραση 925 γονιδίων. Δημιουργήθηκε, έτσι, ένα δίκτυο λειτουργιών από τη genome wide ανάλυση που δείχνει ότι το μαστιχέλαιο επηρεάζει πολλές θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, τη μεταγωγή σήματος, τη ρύθμιση της μεταγραφής και άλλες πιο εξειδικευμένες λειτουργίες (Moulos et al, 2009).

3.5 Καρδιοπροστατευτική δράση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την προστατευτική δράση των φυτικών αντιοξειδωτικών κατά της αθηροσκλήρωσης και των καρδιακών παθήσεων. Ο λόγος για τον οποίο μελετώνται είναι ότι τα αντιοξειδωτικά, λόγω της δομής τους, αποτρέπουν την οξείδωση της LDL που είναι βασικός μεταφορέας της χοληστερόλης στους ιστούς μέσω του περιφερικού αίματος και υπεύθυνη για την εναπόθεση της χοληστερόλης στο ενδοθήλιο των αρτηριών. Έτσι, αφού εμποδίζεται ο σχηματισμός οξειδωμένης LDL (oxLDL), προλαμβάνεται ο σχηματισμός αθηρωματικών πλακών. Η μαστίχα Χίου, περιέχει κάποιες πολυφαινόλες, φυτοστερόλες και τριτερπένια, ουσίες που εμποδίζουν το σχηματισμό oxLDL (Goldstein et al, 1997). Για το λόγο αυτό, μελετάται η δράση της μαστίχας στην προστασία από καρδιακές παθήσεις.

Τα πρώτα δεδομένα προέρχονται από τους Andrikopoulos et al (2002) τα οποία δείχνουν πως η βιολογική δράση του σιέλου που προέρχεται από μάζηση τσίχλας μαστίχας (1-2 τεμάχια για 15-60 min) ήταν η πιο αποτελεσματική στην προστασία της LDL από την *in vitro* οξείδωση συγκριτικά με άλλες τσίχλες του εμπορίου. Μάλιστα, η δράση αυτή ήταν μεγαλύτερη από αυτή της βιταμίνης E, που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς, για σύγκριση. Σε επόμενη μελέτη η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε την επίδραση που έχουν διαφορετικές φυσικές ρητίνες, κόμμεα- γόμες ενάντια στην *in vitro* οξείδωση της LDL από ιόντα χαλκού. Φάνηκε πως η προσθήκη μαστίχας μείωσε την οξείδωση κατά 99,9% ενώ για τα υπόλοιπα φυσικά προϊόντα (P. terebinthus var. Chia resin, dammar resin, acacia gum, tragacanth gum, storax gum) το αποτέλεσμα ήταν μεταξύ 27% με 78,8%. Το εκχύλισμα μεθανόλης/νερού είναι το πιο αποτελεσματικό (Andrikopoulos et al, 2003). Η δράση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος (πολικού εκχυλίσματος) μελετήθηκε στη συνέχεια από τους Dedoussis et al (2004). Παρατήρησαν ότι η oxLDL προκαλεί κυτταροτοξικότητα στα PBMC σε χρόνο 48 h και νέκρωση σε 72 h. Τα παραπάνω αναστέλλονται από την προσθήκη του

μεθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας. Η δράση του είναι έμμεση στην oxLDL και άμεση στα PBMC καθώς αποκαθιστά τα επίπεδα GSH, ενός ενζύμου με σημαντική αντιοξειδωτική δράση και μειώνει τα επίπεδα του CD36 (υποδοχέα της oxLDL στα ενεργοποιημένα μακροφάγα) και σε επίπεδο μεταγραφής (mRNA με προσθήκη oxLDL σε 48h: 81%, σε 72h: 100%, με προσθήκη μεθανολικού εκχυλίσματος: 6%, $p < 0,05$) (εικόνα 4). Σε μια ακόμη *in vitro* μελέτη το ουδέτερο κλάσμα της μαστίχας και η τιρουκαλλόλη (πολυφαινόλη της μαστίχας) ανέστειλαν σημαντικά την έκφραση VCAM-1 και ICAM-1 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής διεγερμένα με TNF- α , εύρημα που δίνει νέα διάσταση στην αντιαθηρωματική δράση της μαστίχας (Loisou et al, 2009).



Εικόνα 4. Παρατήρηση από μικροσκόπιο φθορισμού των PBMC. Επωάστηκαν για 48 (A-C) και 72 (D-F) ώρες απουσία οποιασδήποτε παρέμβασης (A, D), παρουσία oxLDL (B, E), καθώς και παρουσία μεθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας. Πράσινο χρώμα: επιζώντα κύτταρα, κίτρινο χρώμα: αποπτωτικά κύτταρα, πορτοκαλί χρώμα: νεκρωτικά κύτταρα. (Dedoussis et al, 2004).

Η μοναδική κλινική μελέτη για αυτή τη δράση της μαστίχας είναι αυτή των Triantafyllou et al (2007). Άτομα με υψηλό λιπιδαιμικό προφίλ κατανάλωσαν για 18 μήνες εναιώρημα μαστίχας σε νερό καθημερινά σε ποσότητα 5 g και 700 mg (ομάδα υψηλής και χαμηλής δόσης αντίστοιχα). Στην ομάδα υψηλής δόσης, μετά από 18 μήνες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, στο λόγο HDL/ ολική χοληστερόλη, στις απολιποπρωτεΐνες A και B, μια γενικότερη, δηλαδή, βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ. Ακόμη, παρατηρήθηκε βελτίωση στην ηπατική λειτουργία καθώς μειώθηκαν και κάποια ηπατικά ένζυμα. Αντίθετα, στην ομάδα χαμηλής δόσης δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές, παρά μόνο μείωση της γλυκόζης αίματος στους άνδρες.

3.6 Ηπατοπροστατευτική δράση

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν δράση της μαστίχας και στην προστασία του ήπατος. Οι πρώτες πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα. Για πρώτη φορά το 2002 φαίνεται πως σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε τετραχλωράνθρακας (CCl₄), μια ισχυρά ηπατοτοξική ουσία, το υδατικό εκχύλισμα μαστίχας έδειξε σημαντική ηπατοπροστατευτική δράση μειώνοντας τη συγκέντρωση χολερυθρίνης και τη δράση τριών ηπατικών ενζύμων: αλκαλική φωσφατάση, ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (Janakat et al, 2002). Από τη μελέτη αυτή φαίνεται η δυνητική χρήση της μαστίχας για την αντιμετώπιση του ηπατικού ίκτερου σε ανθρώπους. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μελέτες των Ljubuncic et al. Σε μια πρώτη, *in vitro* μελέτη έδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμα της μαστίχας ανέστειλε την υπεροξειδωση λιπιδίων προκαλούμενη από ιόντα σιδήρου σε ηπατικά ομογενοποιημένα αρουραίων, χωρίς να είναι τοξική (Ljubuncic et al, 2005a). Όμως, σε επόμενη *in vivo* μελέτη έδειξαν ότι η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος σε αρουραίους με ηπατική βλάβη προκάλεσε περεταίρω φλεγμονή, ίνωση και εξάντληση της γλουταθειόνης χωρίς επίδραση στην υπεροξειδωση λιπιδίων. Αντίστοιχες ανεπιθύμητες ενέργειες υπήρξαν και στους υγιείς αρουραίους. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι το υδατικό εκχύλισμα ίσως περιέχει ουσίες με ηπατοτοξική ιδιότητα, διαφορετικές από αυτές με αντιοξειδωτική ιδιότητα. Έτσι, είναι απαραίτητα τα *in vivo* πειράματα για την αξιολόγηση της ασφάλειας φαρμακευτικών ουσιών προερχόμενες από φυτά (Ljubuncic et al, 2005b). Τέλος, στην κλινική μελέτη των Triantafyllou et al (2007) φάνηκε μείωση ηπατικών ενζύμων σε εθελοντές μετά από κατανάλωση εναιωρήματος μαστίχας. Να σημειωθεί ότι στην εν λόγω μελέτη, δεν είναι αρκετά σαφής η σύσταση του σκευάσματος που κατανάλωσαν οι εθελοντές ώστε να αποδοθεί η δράση της μαστίχας σε συγκεκριμένες ουσίες.

3.7 Δράση στη στοματική και οδοντική υγιεινή

Η χρήση της μαστίχας στην οδοντιατρική έρευνα είναι εκτεταμένη. Οι πρώτες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η μάσησή της επιφέρει εκγύμναση των ούλων, αίσθηση καθαρότητας στο στόμα και αντιμετώπιση της ξηροστομίας, συχνό φαινόμενο ειδικά σε ηλικιωμένα άτομα (Αναστασιάδου και συν, 2002). Ακόμη, μειώνει τη μικροβιακή πλάκα και προλαμβάνει την τερηδόνα, τις περιοδοντικές και άλλες παθήσεις της στοματικής κοιλότητας (Topitsoglou et al, 1984). Ανάλογα ευρήματα είχε και η μελέτη των Takahashi et al (2003) όπου φαίνεται αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης με μικρότερο βαθμό ερεθισμού των ούλων και των Sterer et al (2006) που δείχνει εξάλειψη του *Porphyromonas gingivalis* (αιτία κακοσμίας και περιοδοντικών παθήσεων). Τέλος, οι Askoy et al (2007) έδειξαν ότι μάσηση μαστίχας για

135min επέφερε μείωση κατά 62,5% των *Streptococcus mutans*, των πιο συχνών και επικίνδυνων βακτηρίων για την αποασβεστοποίηση του σμάλτου και επιφανειακών παθήσεων των δοντιών, δράση συγκρίσιμη με αυτή των αντιβιοτικών (vancomycin). Από τα παραπάνω φαίνεται πως δεν είναι τυχαία η χρήση της μαστίχας ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων οδοντοστοιχιών (Σαββίδης, 2000).

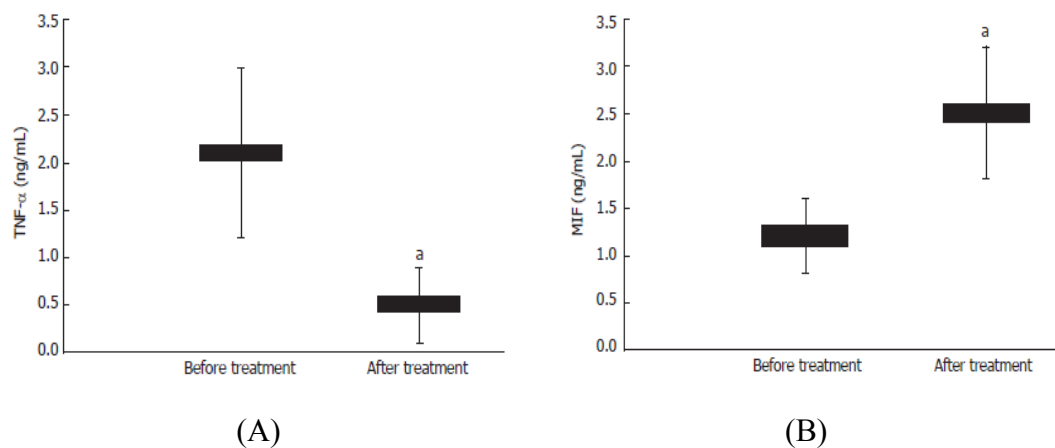
3.8 Δράση στην επούλωση τραυμάτων του δέρματος

Την τελευταία εικοσαετία έχει αναδειχθεί η ισχυρή συγκολλητική ιδιότητα της μαστίχας όταν χρησιμοποιείται σε μέσα επικάλυψης και επούλωσης τραυμάτων και τομών. Παράλληλα συμβάλλει στην αποτελεσματική ανάπλαση της επιδερμίδας και στην επούλωση του τραύματος χωρίς παρενέργειες στο δέρμα όπως άλλα κοινά συστατικά (www.gummastic.gr). Σε δερματολογικές μελέτες έχει φανεί πως η χρήση διαλύματος μαστίχας σαν ενισχυτικό μέσο σε αυτοκόλλητους επιδέσμους επέφερε πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα στις συγκολλητικές τους ιδιότητες σε σχέση με άλλα ενισχυτικά μέσα (Mikhail et al, 1986; Lesesne et al, 1992). Σε μια ανάλογη μελέτη το 1992, φαίνεται πως εκτός της παραπάνω δράσης της, η μαστίχα υπερτερεί στο ότι έχει πολύ χαμηλότερη πιθανότητα εμφάνισης δερματίτιδας, ερεθισμού ή αποχρωματισμού του δέρματος (Mikhail et al, 1989). Μάλιστα, το παραπάνω εύρημα επιβεβαιώθηκε από άλλη μελέτη (Yavuzer et al, 2005) όπου φαίνεται πως αυξάνει σημαντικά τη συγκολλητική ιδιότητα αυτοκόλλητων επιδέσμων όταν χρησιμοποιούνται ως τα μόνα μέσα επικάλυψης τραυμάτων και τομών.

3.9 Δράση κατά της νόσου Crohn

Η νόσος Crohn ανήκει στα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (ΙΦΝΕ) άγνωστης αιτιολογίας που μπορεί να επηρεάζουν όλο το μήκος της γαστρεντερικής οδού (Triantafillidis et al, 2000). Μέχρι σήμερα η μόνη ερευνητική ομάδα που μελέτησε τη δράση της μαστίχας στη νόσο είναι αυτή των Kaliora et al (2007). Συγκεκριμένα, στην πρώτη μελέτη τους, μια κλινική μελέτη, έδειξαν ότι η κλινική εικόνα ασθενών ήπιας ως μέτριας βαρύτητας, όπως αξιολογήθηκε από το δείκτη Crohn Disease Activity Index (CDAI), βελτιώθηκε μετά από χορήγηση μαστίχας για 4 εβδομάδες. Επίσης, βελτιώθηκε ο Δείκτης Διατροφικού Κινδύνου (Nutritional Risk Index). Πιο συγκεκριμένα, οι ευεργετικές αλλαγές σε βιοχημικό επίπεδο που αποδόθηκαν στη μαστίχα ήταν η μείωση δεικτών φλεγμονής 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 ($p < 0.05$). Τα παραπάνω καταδεικνύουν την αντιφλεγμονώδη δράση της μαστίχας (Kaliora et al,

2007a). Η ίδια ερευνητική ομάδα απομόνωσε από τους ίδιους ασθενείς περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα αίματος (PBMC) και έδειξε πως η πρόσληψη μαστίχας ανέστειλε την παραγωγή TNF- α και διέγειρε την παραγωγή ανασταλτικού παράγοντα μετανάστευσης μακροφάγων (MIF), το οποίο σημαίνει πως μειώθηκε η ταχεία μετακίνηση και χημειοταξία των μονοκυττάρων/ μακροφάγων. Τα παραπάνω δείχνουν την ανοσορυθμιστική δράση της μαστίχας στα PBMC ασθενών με τη νόσο (Kaliora et al, 2007b).



Εικόνα 5. Η έκκριση TNF- α μειώθηκε (A) και η έκκριση MIF αυξήθηκε (B) στα PBMC ασθενών με ενεργή νόσο Crohn (n=10) μετά από 4 εβδομάδες παρέμβασης με κάψουλες μαστίχας (2,2 g) ($p<0,05$). Οι οριζόντιες μπάρες μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (Kaliora et al, 2007b).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

4.1 Γενικά

Τα τερπένια ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των βιοενεργών συστατικών, δηλαδή μη θρεπτικών συστατικών των τροφίμων τα οποία ανευρίσκονται συνήθως σε πολύ μικρές ποσότητες. Μια από τις ιδιότητες αυτής της ομάδα είναι ότι προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες που εμπλέκεται σε πολλές ασθένειες (π.χ. καρκίνος, καρδιαγγειακά) (Grassman et al, 2005). Έτσι, τα τερπένια παρουσιάζουν δράση αντιοξειδωτική και αντινεοπλασματική ενώ πολλές μελέτες καταδεικνύουν και την αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή τους δράση. Περισσότερο έχουν μελετηθεί τα μονοτερπένια περιλλυλ-αλκοόλη, λεμονένιο, μενθόλη, γερανιόλη και α-πινένιο και από τα τριτερπένια τα ολεανολικό και το ισομερές ουρσολικό οξύ.

4.2 Αντιοξειδωτική δράση

4.2.1 Μονοτερπένια- διτερπένια

Τα μονοτερπένια έχουν μελετηθεί κυρίως μέσω των αιθέριων ελαίων τα οποία έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα σε *in vitro* συστήματα (Grassman et al, 2005). Σε κάποιες περιπτώσεις, αυτό αποδίδεται στα φαινολικά μονοτερπένιά τους όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη (Aeschbach et al, 1994; Schwarz et al, 1996) ή στα φαινολικά διτερπένια όπως καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ (Hopia et al, 1996; Richheimer et al, 1996). Νεότερες μελέτες όμως, έδειξαν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα για αιθέρια έλαια χωρίς φαινολικό περιεχόμενο άρα αυτή η ικανότητα αποδίδεται σε άλλους δομικούς παράγοντες και όχι το υδροξύλιο. Συγκεκριμένα, τα μονοτερπένια και διτερπένια είναι δότες ατόμων υδρογόνου στις ρίζες λιποειδών αναστέλλοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Μελέτες οι οποίες έδειξαν την αντιοξειδωτική δράση μη φαινολικών μονο- και διτερπενίων στην οξείδωση της LDL είναι εκείνη των Choi et al (2000) που ανέφεραν αντιοξειδωτική δράση για το γ-τερπινένιο και το τερπινολένιο από το αιθέριο έλαιο του λεμονιού. Το εύρημα αυτό επαληθεύτηκε αργότερα από τους Grassman et al (2001) και τους Kim et al (2004) που αναφέρουν και το α-τερπινένιο. Αρκετοί ακόμη ερευνητές αναφέρουν την αντιοξειδωτική δράση των μονοτερπενίων και διτερπενίων στην *in vitro* οξείδωση της LDL (Grassmann et al, 2003; Takahashi et al, 2003; Teissedre et al, 2000). Ακόμη, σημαντικές αναφορές υπάρχουν για την αντιοξειδωτική ικανότητά τους σε εδώδιμα έλαια όπως το ηλιέλαιο, το λαρδί κ.ά (Abdalla et al, 1999; Dang et al, 2001; Schwarz et al, 1992; Youdim et al, 1999) γεγονός που αποδίδει στα τερπένια αυτά την ιδιότητα του φυσικού συντηρητικού τροφίμων.

4.2.2 Τριτερπένια

Η πρώτη (*in vivo*) μελέτη (Somova et al, 2003) όπου σε επίμυες με ιδιοπαθή υπέρταση χορηγήθηκαν 60 mg/kg ΣΒ ουρσολικού ή ολεανολικού οξέως για 6 εβδομάδες, έδειξε πως τα ανωτέρω τριτερπένια αύξησαν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα αίματος. Συγκεκριμένα, αύξησαν τα επίπεδα της GSH (10 % και 12% αντίστοιχα) και της SOD (22% και 12%). Παράλληλα αποτράπηκε η ανάπτυξη υπέρτασης λόγω διουρητικής και νατριουρητικής δράσης. Τέλος, παρατηρήθηκε μείωση του καρδιακού ρυθμού, αντιυπερλιπιδαιμική (LDL, τριγλυκερίδια) και υπογλυκαιμική δράση (κατά 50% και 20% αντίστοιχα). Περεταίρω μελέτες για το ολεανολικό δείχνουν ότι αυξάνει *in vitro* την έκκριση ινσουλίνης από τα INS-1 832/13 παγκρεατικά κύτταρα, εύρημα που συμφωνεί με την παραπάνω μελέτη (Teodoro et al, 2008), ενώ οι Senthil et al (2007) επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική, αντιυπερλιπιδαιμική και αντιαρρυθμική δράση του σε μια *in vivo* μελέτη σε επίμυες. Συγκεκριμένα, σε επίμυες στους οποίους προκάλεσαν ισχαιμία και τους χορήγησαν ολεανολικό οξύ (40 mg/kg ΣΒ) για 7 ημέρες, παρατήρησαν αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αίματος (GSH, SOD), αναστολή της αύξησης ηπατικών ενζύμων, της υπεροξειδωσης λιπιδίων, της διήθησης ουδετερόφιλων, της μείωσης καρδιακών ΑΤΡασών κ.ά. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και για το ουρσολικό οξύ.

4.3 Αντιμικροβιακή δράση

4.3.1 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια από διάφορα φυτά έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για διάφορες παθήσεις. Για το αναπνευστικό αναφέρθηκαν δράσεις έναντι των *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli* (Inouye et al, 2001a,b). Ακόμη, *in vitro* αντιμικροβιακές δράσεις έχουν αναφερθεί από τους Aligiannis et al (2001) για 5 είδη του γένους *Sideritis*, («τσάι του βουνού») και τους O'Bryan et al (2008), Ohno (2003), Kalemba (2003). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν *in vitro* δράση κατά της *Listeria innocua* που προκαλεί λιστερίωση και θάνατο (Viuda-Martos et al , 2010) και κατά του *H.pylori* (Chalova et al , 2010).

4.3.2 Τριτερπένια

Τριτερπένια από το φυτό ακακία είχαν κυτταροτοξικές δράσεις κατά του πρωτόζωου *P. Falciparum*, υπεύθυνο για την ελονοσία (Mutai et al, 2004; Mutai et al 2007). Επίσης, έχουν αναφερθεί δράσεις έναντι του βακτηρίου *H. pylori* (Lee et al, 2009) σε επίμυες αλλά και *in*

vitro στα βακτήρια: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexenari*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* (Tabopda et al, 2009). Τέλος, δράσεις έχουν παρατηρηθεί και σε μύκητες όπως: *Candida albicans*, *Candida krusei* και *Cryptococcus neoformans* (Mutai et al, 2009; Shai et al, 2008; Tabopda et al, 2009).

4.4 Αντιφλεγμονώδης δράση

4.4.1 Αιθέρια έλαια

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την αντιφλεγμονώδη δράση αιθέριων ελαίων φυτών όπως: *Cleistocalyx operculatus* (Dung et al, 2009), *Syzygium aromaticum* (γαρύφαλλο) (Rodrigues et al, 2008) τα οποία μειώνουν τα επίπεδα των κυτταροκινών TNF-α, IL-6, IL-1 στα μακροφάγα επίμυων. Ακόμη, σε μελέτες σε επίμυες με TNBS κολίτιδα, αιθέρια έλαια από ρίγανη (*Origanum vulgare* L.) και θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.) σε συστηματική χορήγηση επέφεραν μείωση των προαναφερθέντων κυτταροκινών και σε μεταγραφικό επίπεδο (Dundar et al, 2008; Bukovska et al, 2007).

4.4.2 Τριτερπένια

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι τα τριτερπένια έχουν αντιφλεγμονώδη δράση (Cho et al, 2006; Vasconcelos et al, 2008) καθώς αναστέλλουν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Τριτερπένια από το είδος *Rhus sylvestris* ανέστειλαν την έκκριση TNF-α, IL-6 σε μακροφάγα επίμυων ενεργοποιημένα από LPS, ουσία που προκαλεί ισχυρή φλεγμονή (Ding et al, 2009). Αντίστοιχα, σε επίμυες με TNBS κολίτιδα η συστηματική χορήγηση α- και β- αμυρίνης (πεντακυκλικά τριτερπένια) μείωσε την αγγειογένεση (μείωση VEGF) και την τοπική παραγωγή κυτταροκινών και των επιπέδων κυκλοξυγονάσης-2 (COX-2) μέσω της αναστολής των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και CREB (Vitor et al, 2009). Ακόμη, αναφορές υπάρχουν για την αντιφλεγμονώδη δράση του ολεανολικού οξέως και των παραγώγων του (Ginner et al, 2000; Huget et al, 2000; Ginner-Larza et al, 2001), από τα σημαντικότερα τριτερπένια των φυτών. Λειτουργεί σαν εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών και αναστολέας της σύνθεσης εικοσανοειδών από την COX-1, COX-2 (Roland et al, 2004). Επίσης, έχει ανασταλτική δράση στην παραγωγή NO, TNF-α, IL-12 στα ενεργοποιημένα από LPS/ IFN-γ μακροφάγα επίμυων (Rao et al, 2004).

4.5 Αντινεοπλασματική δράση

4.5.1 Μονοτερπένια

Σημαντική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί για το λεμονένιο και την περιλλυλ-αλκοόλη τα οποία εμφανίζουν μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα στον ορό θηλαστικών σε λήψη από το στόμα.

Ενδεικτικά αναφέρεται ο χρόνος ημίσειας ζωής για το λεμονένιο που είναι 12-24 ώρες τόσο για τους επίμυες όσο και για τον άνθρωπο (Kodama et al, 1974; Kodama et al, 1976; Phillips et al, 1995). Τα μονοτερπένια, αφ' ενός προλαμβάνουν το σχηματισμό και την εξέλιξη του καρκίνου (π.χ. μετατρέποντας καρκινογόνες ουσίες σε λιγότερο τοξικές ώστε να μη μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA- χημειοπροστατευτική δράση) και αφ' ετέρου υποστρέφουν υπάρχοντες κακοήθεις όγκους (χημειοθεραπευτική δράση) (Crowell, 1999).

Το λεμονένιο έχει χημειοπροστατευτική δράση σε πολλούς τύπους καρκίνου. Αναστέλλει την ανάπτυξη λεμφωμάτων σε p53-/- επίμυες που το λαμβάνουν από το στόμα (Hursting et al, 1995). Επίσης, αναστέλλει τον χημικά επαγόμενο καρκίνο του δέρματος (Elegbede et al, 1986), του ήπατος (Dietrich et al, 1991), του πνεύμονα και του στομάχου (Wattenberg et al, 1991) και τον επαγόμενο από το *ras* ογκογονίδιο (Gould et al, 1994). Επιπλέον, οι Kawamori et al (1996) ανέφεραν ότι οι «aberrant crypt foci» (ACF), αλλοιώσεις στις εντερικές κρύπτες που αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο στο κόλον, οι οποίες προκλήθηκαν από τη χορήγηση αζοξυμεθάνης, μειώθηκαν σημαντικά στο κόλον επίμυων όταν κατανάλωσαν νερό με 0.5% λεμονένιο. Αντίστοιχα αποτελέσματα σε επίμυες παρατήρησαν και οι Reddy et al (1997). Ακόμη, το λεμονένιο έχει χημειοπροστατευτική δράση στον καρκίνο του μαστού (Maltzman et al, 1991; Elegbede et al, 1993). Τέλος, το λεμονένιο σε κυτταρική σειρά λεμφώματος αύξησε το επίπεδο NO επάγοντας την κυτταρική απόπτωση (Manuele et al, 2010). Ένα ακόμη δραστικό μονοτερπένιο, η περιλλυλ-αλκοόλη (POH) έχει χημειοπροστατευτική δράση σε χημικά επαγόμενο καρκίνο του ήπατος σε επίμυες (Mills et al, 1995) αν και οι Low Baselli et al (2000) δεν παρατήρησαν κάτι τέτοιο. Ακόμη, έχει χημειοθεραπευτική δράση σε παγκρεατικούς όγκους σε επίμυες σε δόσεις που προκαλούν μικρή τοξικότητα (Stark et al, 1995). Αντίθετα, σε πιλοτική κλινική μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, η περιλλυλ-αλκοόλη απέτυχε να μειώσει το μέγεθος των όγκων αν και υπήρχε τάση αύξησης της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και του χρόνου ζωής των ασθενών (Matos et al, 2008). Επίσης, η δράση της επεκτείνεται και στον καρκίνο του μαστού. Σε επίμυες με DMBA καρκίνο, η ενσωμάτωσή της στη δίαιτα σε ποσοστό 2,5% επέφερε συρρίκνωση των όγκων (Haag et al, 1994). Αντίθετα, σε κλινική μελέτη σε γυναίκες που έλαβαν 1200 ή 1500 mg/m² περιλλυλ-αλκοόλης δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην εξέλιξη του καρκίνου (Bailey et al, 2008). Επιπλέον, η γερανιόλη, ένα επίσης δραστικό μονοτερπένιο δρα σε όγκους ήπατος, μελανώματος και λευχαιμίας επίμυων (Shoff et al, 1991; Yu et al, 1995) όταν χορηγείται πριν και μετά την έγχυση καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, η γερανιόλη και η

φαρνεσόλη είχαν ανασταλτική δράση σε παγκρεατικούς όγκους επίμυων και ανθρώπινων σε δόση 40 g/kg (Burke et al, 1996).

4.5.2 Τριτερπένια

Τα δεδομένα για τα τριτερπένια είναι λιγότερα σε σχέση με τα μονοτερπένια. Σε μελέτη σε επίμυες προκλήθηκαν βλάβες στις εντερικές κρύπτες («aberrant crypt foci») που αποτελούν παράγοντα για καρκίνο στο κόλον. Έπειτα χορηγήθηκαν ουρσολικό ή ολεανολικό οξύ ή μίγμα αυτών (65%-35%) για 5 φορές εβδομαδιαίως. Μετά από 2 εβδομάδες παρατηρήθηκε πλήρης απουσία των ACF (Furtado et al, 2008). Ακόμη, σε επίμυες με καρκίνο του οισοφάγου χορηγήθηκαν: ουρσολικό/ βετουλινικό/ ολεανολικό οξύ ή εκχύλισμα Ιαπωνικού βερίκοκου που περιέχει τριτερπένια (JAE) και φάνηκε πως όλα και κυρίως το JAE ενίσχυσαν τη συμβατική χημειοθεραπεία (Yamai et al, 2009). Ακόμη, το CDDO (cyano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oic), το πιο καλά μελετημένο συνθετικό ολεανονικό οξύ καθώς και τα παράγωγά του έχουν τόσο ανασταλτική δράση στην αύξηση των όγκων όσο και προαποπτωτική δράση, που φαίνεται πως είναι πιο ισχυρή (Petronelli et al, 2009). Έτσι, έχουν αντineοπλασματικές ιδιότητες που φαίνονται σε πολλές μελέτες (Chintharlapalli et al, 2005; Duan et al, 2009; Deeb et al, 2009; Gao et al, 2007; Liby et al, 2006; Hughes, 2008; Samudio et al, 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

5.1 Ορισμός

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) είναι ένας περιληπτικός όρος που περιγράφει μια ετερογενή ομάδα διαταραχών του γαστρεντερικού σωλήνα που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή. Οι κύριες μορφές της είναι η νόσος Crohn (Crohn disease, CD) και η ελκώδης κολίτιδα (Ulcerative Colitis, UC). Είναι και οι δυο χρόνιες, υποτροπιάζουσες και υφέσιμες εντερικές διαταραχές (Chapman- Kiddell et al, 2010). Παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες αλλά και αρκετές κλινικές και παθολογικές διαφορές. Σε μια μειονότητα περιπτώσεων που περιλαμβάνουν μόνο το κόλον, οι 2 μορφές είναι δυσδιάκριτες και κατηγοριοποιούνται ως «ακαθόριστη κολίτιδα» (Bouma et al, 2003).

5.2 Επιδημιολογικά στοιχεία

Για τον προσδιορισμό της επιδημιολογίας της νόσου υπάρχουν μεθοδολογικά προβλήματα διότι εξαρτάται από: το εκάστοτε σύστημα υγείας το οποίο διαφέρει ανάμεσα στις χώρες, την έναρξη της διάγνωσης της νόσου που μπορεί να καθυστερήσει ως και αρκετά χρόνια (ειδικά στην περίπτωση της CD) λόγω εξωεντερικών εκδηλώσεων, την ενημέρωση του κοινού σχετικά με τη νόσο ώστε να αναζητεί έγκαιρα ιατρική βοήθεια κ.ά (Karlinger et al, 2000). Παρόλα αυτά, οι εκτιμήσεις δείχνουν ότι περιστατικά ΙΦΝΕ σημειώνονται σε όλο τον κόσμο όμως είναι πιο συχνά σε περιοχές όπως οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο και οι Σκανδιναβικές χώρες με επιπολασμό 10-200 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους. Η επίπτωση (νέα περιστατικά ανά έτος) της ΙΦΝΕ είναι μεγαλύτερη σε ανεπτυγμένες, αστικές χώρες. Η επίπτωση της CD έχει αυξηθεί τις τελευταίες 4 δεκαετίες ενώ δεν παρατηρείται τέτοια τάση για την UC (Bouma et al, 2003). Σε χώρες που παλαιότερα είχε αναφερθεί πολύ χαμηλή επίπτωση της ΙΦΝΕ, όπως η Ιαπωνία, παρατηρείται αύξηση, γεγονός που ισχύει και για μετανάστες που μετακινήθηκαν από αναπτυσσόμενες σε ανεπτυγμένες χώρες (Jayanthi et al, 1992). Οι παραπάνω παρατηρήσεις δε θεωρούνται αποτέλεσμα της βελτίωσης στη διάγνωση και επισήμανση της ασθένειας (Loftus et al, 2004). Πρόσφατες μελέτες σε παιδιά και διδύμους δείχνουν μια αύξηση στην πολυεθνικότητα και μείωση στην οικογενή νόσο στην παιδιατρική ΙΦΝΕ καθώς και πτώση των επιπέδων ταύτισης της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους από 46% σε 13% (Halfvarson et al, 2003). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν αυξανόμενο ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας.

5.3 Αιτιολογία και παθοφυσιολογία

Η ΙΦΝΕ είναι αποτέλεσμα άτοπης και διαρκώς εξελισσόμενης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού του εντερικού βλεννογόνου λόγω της φυσιολογικής μικροχλωρίδας. Αυτή η έκτοπη απόκριση οφείλεται σε βλάβες τόσο στη λειτουργία του φραγμού του εντερικού επιθηλίου όσο και στο ανοσοποιητικό του βλεννογόνου. Γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί παράγοντες ευθύνονται για τα παραπάνω (Podolsky et al, 2002).

5.3.1 Γενετικοί παράγοντες

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΙΦΝΕ έχουν 4 με 20 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό ο οποίος σε απόλυτο αριθμό φτάνει το 7% (Orholm et al, 1991). Μεγαλύτερη είναι η ταύτιση της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους παρά σε διζυγωτικούς και ειδικότερα σε αυτούς με CD (Tysk et al, 1988). Τα παραπάνω δείχνουν τη συνεισφορά του γενετικού υπόβαθρου στην ΙΦΝΕ η οποία είναι μεγαλύτερη για τη CD παρά για τη UC. Η απουσία απλής μενδελιανής κληρονομικότητας υποδεικνύει τη συμμετοχή πολλών γονιδίων κάποια από τα οποία είναι κοινά για τις 2 μορφές της ΙΦΝΕ. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο της NOD2/CARD15 που εδράζει στο χρωμόσωμα 16, εκφράζεται στα μακροφάγα και λειτουργεί σαν υποδοχέας αναγνώρισης της βακτηριακής λιποπολυσακχαρίδης (Cuthbert et al, 2002).

5.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ανάμεσα στους αμέτρητους περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν μελετηθεί, υπάρχει σημαντική συμφωνία για τη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων που μπορεί να προκαλέσει ξέσπασμα της ασθένειας πιθανώς λόγω ενός αλλοιωμένου εντερικού φραγμού. Επίσης, η πρόωμη σκωληκοειδεκτομή φαίνεται πως μειώνει την επίπτωση της ελκώδους κολίτιδας (Andersson et al, 2001; Evans et al, 1997). Ακόμη, το κάπνισμα προστατεύει από την UC ενώ αυξάνει τον κίνδυνο για CD (Cosnes et al, 2001; Lindberg et al, 1988).

5.3.3 Αυτοάνοσοι παράγοντες

Μια καταστροφική φλεγμονώδης αντίδραση εναντίον φυσιολογικών αντιγόνων έχει προταθεί για την αιτιολογία της ΙΦΝΕ και ιδίως για τη CD. Έχουν ανιχνευθεί αντισώματα κατά των ουδετερόφιλων σε κάποιους ασθενείς με τη νόσο ή κατά της ανθρώπινης τροπομουσίνης κ.ά. Η έκθεση σε μικροβιακά πεπτίδια που έχουν κοινούς καθοριστικούς ανοσολογικούς παράγοντες με τα αυτο-αντιγόνα ίσως πυροδοτεί ανωμαλία στην ανοσολογική ανοχή στα ενδογενή αντιγόνα του εντέρου (Hendrickson et al, 2002).

5.3.4 Ανοσολογικοί παράγοντες

Το γαστρεντερικό σύστημα βρίσκεται φυσιολογικά σε ελεγχόμενη κατάσταση φλεγμονής. Οι λειτουργίες της ανοσίας και της φλεγμονής ρυθμίζονται με συνεχή «από κύτταρο σε κύτταρο» επικοινωνία (Cecil, 2003). Η ενεργοποίηση κυτταρικών πληθυσμών με κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση συνοδεύεται από την παραγωγή πληθώρας μη ειδικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Αυτοί περιλαμβάνουν κυτταροκίνες, χημοκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως και μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέως (π.χ. προσταγλανδίνες) και μεταβολίτες του οξυγόνου (π.χ. NO) (Swidsinski et al, 2002; Fiocchi et al, 1998). Αυτοί οι μεσολαβητές ευοδώνουν τη φλεγμονώδη διαδικασία και την καταστροφή των ιστών με αποτέλεσμα τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Podolsky et al, 2002).

5.3.5 Λοιμώδεις παράγοντες

Για την ΙΦΝΕ ενοχοποιούνται και λοιμώδεις παράγοντες, όμως κανένας δεν καλύπτει τα κριτήρια του Koch -κριτήρια, βάσει των οποίων διαπιστώνεται ότι μια ασθένεια προκαλείται από μικρόβια (Cecil, 2003). Τέτοιοι παράγοντες είναι π.χ. τα βακτήρια του γένους *Bacteroides* ή *Clostridium* (Sartor et al, 1997). Πιθανώς υπάρχει κάποιος παθογόνος μικροοργανισμός ο οποίος είναι δύσκολο να ανιχνευθεί με την υπάρχουσες τεχνικές. Παρόλα αυτά, αν υπάρχει κάποιο παθογόνο, γενετικοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν αν τελικά θα αναπτυχθεί η νόσος. Διαρκώς αυξανόμενα δεδομένα από μελέτες δείχνουν ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΙΦΝΕ. Σε άτομα που νοσούν έχουν απομονωθεί μεγάλοι πληθυσμοί ενδοκυτταρικών βακτηρίων και βακτηρίων που προσκολλώνται στην επιφάνεια του κολονικού επιθηλίου. Αυτά δείχνουν τη σημασία που έχει η αλλοίωση αυτής της μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη τελικά της νόσου (Darfeuille-Michaud et al, 1998; Swidsinski et al, 2002).

5.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και ιστολογικά ευρήματα

Η ελκώδης κολίτιδα χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδεις αλλοιώσεις του βλεννογόνου και του υποβλεννογόνιου χιτώνα του παχέος εντέρου, οι οποίες αρχίζουν από το ορθό και εκτείνονται κεντρικότερα σε συνεχή βάση. Ανάλογα με την έκτασή της, η ελκώδης κολίτιδα μπορεί να διαιρεθεί σε πρωκτίτιδα (προσβολή μόνο του ορθού), πρωκτοσιγμοειδίτιδα, αριστερή κολίτιδα (μέχρι τη σπληνική καμπή) και γενική κολίτιδα (παγκολίτιδα) (Cecil, 2003). Η φλεγμονή, η οποία αρχικά περιορίζεται στο βλεννογόνο, εκδηλώνεται με εξέλκωση, οίδημα και αιμορραγία κατά μήκος του παχέος εντέρου. Τα χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν οξεία και χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου από

πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μονοπύρρηνα κύτταρα, απουσία κρυπτών, παραμόρφωση αδένων του βλεννογόνου και εξάλειψη των βλεννογόνιων κυττάρων (Hendrickson et al, 2002).

Αντίθετα, η νόσος του Crohn μπορεί να προσβάλει κάθε τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος από τη στοματική κοιλότητα ως τον πρωκτό, συνήθως σε ασυνεχή βάση (τμηματικές αλλοιώσεις) και συχνά με φλεγμονή ολόκληρου του πάχους του εντερικού τοιχώματος (διατοιχωματική) (Cecil, 2003). Τα ιστολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν μικρά επιφανειακά έλκη πάνω από τις πλάκες Peyer (ανοσολογικός φραγμός που έχει τη μορφή διάχυτου λεμφικού ιστού, μονήρων λεμφοζιδίων και αγγείων λεμφοζιδίων οι οποίες βρίσκονται στον ειλεό) και εστιακή χρόνια φλεγμονή που συνοδεύεται συχνά από μη νεκρωτικά κοκκιώματα. Συχνότερα η νόσος προσβάλλει τον ειλεό του λεπτού εντέρου και το κόλον (Hendrickson et al; 2002).



Εικόνα 1. Ενδοσκοπική εικόνα (Α) φυσιολογικού βλεννογόνου παχέος εντέρου με φυσιολογική διαγραφή των αγγείων του, (Β) Ελκώδους κολίτιδας: διάχυτα προσβεβλημένος βλεννογόνος παχέος εντέρου με ερυθρότητα, οίδημα, κοκκίωση και επιφανειακά έλκη, (Γ) Νόσου Chron: έλκη διαφόρων μεγεθών με ενδιάμεσο φυσιολογικό βλεννογόνο παχέος εντέρου (Ζαμπέλας, 2007)

5.5 Κλινικά χαρακτηριστικά

Η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα έχουν τόσο εντερικές όσο και εξωεντερικές εκδηλώσεις. Οι τελευταίες σχετίζονται συνήθως με τη δραστηριότητα της εντερικής νόσου και μπορεί να προηγούνται ή να αναπτύσσονται παράλληλα με τα εντερικά συμπτώματα.

5.5.1 Εντερικές εκδηλώσεις

Το βασικότερο σύμπτωμα στην ελκώδη κολίτιδα είναι η παρουσία αίματος και βλέννας στα κόπρανα που συνοδεύεται από κοιλιακό πόνο. Παρατηρούνται επεισόδια υφέσεων και εξάρσεων και τα συμπτώματα καθορίζονται από την έκταση της νόσου. Σε περιορισμένη έκταση, ο πόνος εντοπίζεται στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο της κοιλιακής χώρας ενώ σε πιο εκτεταμένη νόσο σε όλη την περιοχή (παγκολίτιδα) μαζί με αφυδάτωση και πυρετό (Cecil, 2003). Σε σπανιότερες περιπτώσεις υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης τοξικού megacolon (Hendrickson et al; 2002).

Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η παρουσία της νόσου Crohn είναι συχνά δυσδιάκριτη οδηγώντας σε καθυστέρηση της διάγνωσης. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη θέση, την έκταση και τη σοβαρότητα της προσβολής. Στην ειλεοκολική νόσο, που είναι και η συχνότερη, παρατηρείται κοιλιακός πόνος μεταγευματικά, ευαισθησία στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο και ψηλαφητή φλεγμονώδη μάζα. Στη γαστροδωδεκαδακτυλική νόσο παρατηρείται πρώιμος κορεσμός, ναυτία, εμετός, κοιλιακός πόνος ή δυσφαγία ενώ ο μεταγευματικός πόνος και η καθυστέρηση στη γαστρική εκκένωση οδηγεί τους ασθενείς σε μειωμένη διατροφική πρόσληψη. Στην εκτεταμένη προσβολή του λεπτού εντέρου σημειώνεται επιπλέον ανορεξία, απώλεια βάρους και πιθανώς δυσανοχή στη λακτόζη. Τέλος, όταν η νόσος περιορίζεται στο κόλον, τα συμπτώματα μιμούνται την ελκώδη κολίτιδα, δηλαδή παρατηρείται βλεννοαιματηρή διάρροια με κοιλιακές συσπάσεις. Όχι σπάνια, η νόσος είναι περιπρωκτική και εκδηλώνεται με ραγάδες του δακτυλίου, αποστήματα, συρίγγια ή δερματικά στίγματα. Αυξανόμενες κοιλιακές συσπάσεις, διάταση, έμετος και βορβορυγμοί είναι σημάδια εκτεταμένης φλεγμονής που μπορεί να οδηγήσει σε τοπική στένωση και μερική ή ολική απόφραξη (Hendrickson et al; 2002).

5.5.2 Εξωεντερικές εκδηλώσεις

Συνήθης εξωεντερική εκδήλωση για τα παιδιά αποτελεί η καθυστέρηση της ανάπτυξης και της σεξουαλικής ωρίμανσης. Λόγοι για αυτό είναι π.χ. χρόνια υποθρεψία, δυσαπορρόφηση, χαμηλά επίπεδα αυξητικών παραγόντων κ.ά. Πολύ συχνή είναι η εμφάνιση αρθραλγίας και αρθρίτιδας η οποία προηγείται συχνά των εντερικών εκδηλώσεων. Ακόμη, παρατηρούνται ηπατοχολικές παθήσεις όπως πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, νεφρικές παθήσεις όπως νεφρολιθίαση. Τέλος, μακρόχρονη λήψη κορτικοστεροειδών μπορεί να επιφέρει

οφθαλμολογικές παθήσεις αλλά και οστεοπενία που δυσχεραίνεται από την έλλειψη βιταμίνης D, τη δυσαπορρόφηση ασβεστίου και την υποθρεψία (Hendrickson et al; 2002).

5.6 Διάγνωση

Πριν τη διάγνωση της ΙΦΝΕ θα πρέπει πρώτα να αποκλειστεί η ύπαρξη εντερικών παθογόνων, κάποια από τα οποία μιμούνται την ΙΦΝΕ (π.χ. *Shalmonella*, *Shigella*). Κάποιοι ασθενείς μπορεί αρχικά να έχουν παράλληλη μόλυνση όμως τα συμπτώματα δεν υποχωρούν μετά τη θεραπεία του παθογόνου ή επανέρχονται μετά από λίγες μέρες ή εβδομάδες. Όταν αποκλειστούν τέτοια παθογόνα, πραγματοποιούνται περαιτέρω δοκιμασίες για τη διάγνωση, οι οποίες συνοψίζονται μαζί με τα ευρήματά τους όταν υπάρχει ΙΦΝΕ στον πίνακα 1.

Δοκιμασία	Εύρημα
Ολική αιματολογική εκτίμηση	Μικροκυτταρική αναιμία, λευκοκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση
Αντιδρώντα οξείας φάσης	Αυξημένα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, άλφα-1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης και αυξημένη δημιουργία ιζήματος
Χημικές δοκιμασίες	Χαμηλά επίπεδα σιδήρου ορού, υποαλβουμιναιμία, αυξημένα ηπατικά ένζυμα
Ειδικές ορολογικές δοκιμασίες	pANCA, ASCA
Ανάλυση κοπράνων	Αποκλεισμός βακτηριακών παθογόνων και παρασίτων, μη ορατό αίμα, λευκοκύτταρα στα κόπρανα
Ενδοσκοπική αξιολόγηση	Οισοφαγο-γαστρο-δωδεκαδακτυλική ενδοσκοπική εξέταση με βιοψία, κολονοσκόπηση με βιοψία
Ραδιολογική αξιολόγηση	Εξέταση με ακτίνες –X του άνω γαστρεντερικού συστήματος και του λεπτού εντέρου, εντερόκλυση (άμεση ενστάλαξη χρωστικής στο λεπτό έντερο), βαριούχος υποκλυσμός

Πίνακας 1. Δοκιμασίες για τη διάγνωση των ΙΦΝΕ (Hendrickson et al; 2002).

Όσον αφορά τις ορολογικές δοκιμασίες, προσδιορίζονται 2 είδη αντισωμάτων: τα περιπυρηνικά αντι-ουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα (pANCA) στα οποία είναι θετικοί οι ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα στο 70% και τα αντισώματα έναντι του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) στα οποία είναι θετικοί οι ασθενείς με νόσο Chron σε ποσοστό πάνω από 50%. Η ενδοσκοπική εξέταση και οι βιοψίες βοηθούν στην αξιολόγηση της ενεργότητας της νόσου και το διαχωρισμό των 2 μορφών της (UC και CD) αν και σε λίγες περιπτώσεις που δεν ξεπερνούν το 10% τα χαρακτηριστικά της κολίτιδας είναι ιδιόμορφα οδηγώντας στη διάγνωση «ενδιάμεσης κολίτιδας» (Saxon et al; 1990, et al; Peeters et al; 2001, Vermeire et al; 2001, Rigaud et al; 1991).

5.7 Θεραπεία

Στόχοι της θεραπείας των ΙΦΝΕ είναι η επίτευξη ύφεσης της φλεγμονής και η διατήρησή της καθώς και η αποκατάσταση της θρέψης και η βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

5.7.1 Φαρμακευτική- χειρουργική αντιμετώπιση

Σε γενικές γραμμές όλοι οι επιστήμονες ακολουθούν έναν αλγόριθμο σταδιακής χορήγησης φαρμάκων για την αντιμετώπιση της ΙΦΝΕ. Σύμφωνα με αυτόν πιο ισχυρά φάρμακα προστίθενται στη θεραπεία όταν λιγότερο δραστικά φάρμακα δεν επιτυγχάνουν επαρκή ανταπόκριση του ασθενούς. Η φαρμακευτική θεραπεία στην οξεία φάση των ΙΦΝΕ στηρίζεται στη χορήγηση ισχυρών ανοσοκατασταλτικών σκευασμάτων όπως τα κορτικοστεροειδή, η κυκλοσπορίνη, αντισώματα έναντι του παράγοντα TNF κ.ά. με τα οποία επιτυγχάνεται συνήθως ύφεση της φλεγμονώδους διεργασίας και κλινική ύφεση των γαστρεντερικών και εξωεντερικών εκδηλώσεων των νόσων. Διατήρηση της ύφεσης επιδιώκεται με χορήγηση ανοσοκατασταλτικών και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων που κατά περίπτωση μπορεί να είναι σκευάσματα 5-αμινοσαλικυλικού οξέως (μεσαλαζίνη, ολσαλαζίνη, μπαλσαλαζίδη, σουλφασαλαζίνη) ή ισχυρότερα αλλά και τοξικότερα όπως η αζαθειοπρίνη, η κυκλοσπορίνη από το στόμα, η μεθοτρεξάτη κ.ά. Αντιβιοτικά (π.χ. κινολόνες) χορηγούνται σε συνδυασμό με τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα σε μικροβιακές επιπλοκές (π.χ. αποστήματα) ή συρίγγια (μετρονιδαζόλη).

Όταν η ελκώδης κολίτιδα δεν ανταποκρίνεται έγκαιρα στη θεραπεία ή υπάρχει σοβαρή επιπλοκή (διάτρηση, καρκίνος, τοξικό megacolon κ.ά) εκτελείται χειρουργική πρωκτοκολεκτομή, ενώ ειλεοστομία μόνο σε ασθενείς υψηλού χειρουργικού κινδύνου. Αντίστοιχα, στη νόσο Crohn χειρουργική αντιμετώπιση εφαρμόζεται μόνο σε επικίνδυνες για τη ζωή επιπλοκές (αποστήματα, διατρήσεις, συρίγγια) διότι πολύ συχνά παρατηρείται μετεγχειρητική υποτροπή μετά από λίγα έτη (Ζαμπέλας, 2007).

5.7.2 Διατροφική αντιμετώπιση

Η υποστήριξη της θρέψης αποτελεί σημαντικό τομέα της θεραπείας των ασθενών με ΙΦΝΕ. Ωστόσο, ως αρχική θεραπεία έχει ρόλο μόνο στη νόσο Crohn του λεπτού εντέρου στην οποία είναι εφικτή η επίτευξη ύφεσης με μεγάλης διάρκειας (τουλάχιστον 4 εβδομάδες) ολική παρεντερική σίτιση (Cecil, 2003). Η εντερική διατροφή με στοιχειακές δίαιτες, που τα συστατικά τους απορροφώνται εξ' ολοκλήρου στο εγγύς λεπτό έντερο προκαλώντας ανάπαυση στο λοιπό εντερικό σωλήνα, φαίνεται πως είναι ωφέλιμες στην επίτευξη ύφεσης σε ήπιας και μέτριας βαρύτητας περιπτώσεις νόσου Crohn (Silk et al, 1998).

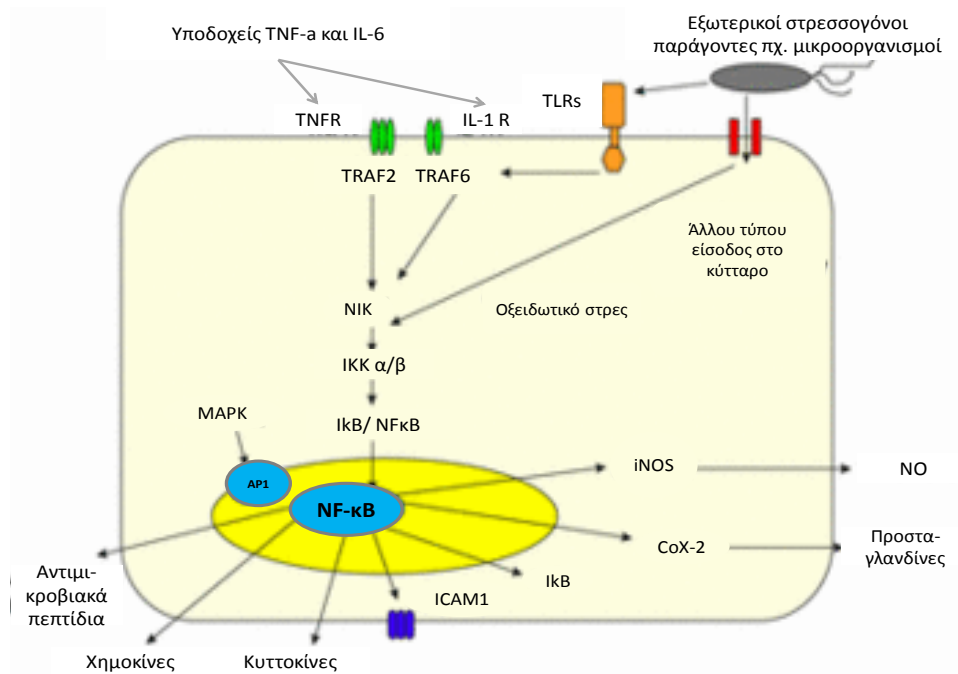
Τα άτομα με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν συχνά κακή κατάσταση θρέψης λόγω της φλεγμονής του βλεννογόνου του εντέρου αλλά και λόγω της ταχύτερης μετακίνησης του γαστρεντερικού περιεχομένου κατά μήκος της πεπτικής οδού σε σχέση με το κανονικό. Έτσι, συστήνεται η αύξηση της πρόσληψης σιδήρου, πέρα από τις συστάσεις για τον υγιή πληθυσμό, λόγω αυξημένων απωλειών από το αίμα στα κόπρανα και τη μειωμένη απορρόφησή του. Το ίδιο ισχύει για το ασβέστιο και το μαγνήσιο, που εκτός των άλλων αποβάλλονται στα κόπρανα με τη μορφή σαπώνων δεσμευμένα από τα λιπαρά οξέα που δεν έχουν απορροφηθεί. Ακόμη, κρίνεται σκόπιμη η μείωση του περιεχομένου λίπους της τροφής λόγω στεατόρροιας (αυξημένη παρουσία λίπους στα κόπρανα) και αύξηση του περιεχομένου της διατροφής σε πρωτεΐνη λόγω δυσαπορρόφησης των αμινοξέων για να βελτιωθεί/ μετριαστεί η υποαλβουμιναιμία (Συντώσης, 2005). Σε ασθενείς με εκτεταμένη νόσο του ειλεού, καθίσταται αδύνατη η απορρόφηση της βιταμίνης B12 και έτσι είναι απαραίτητη η συμπληρωματική χορήγηση, ενώ σε άτομα που λαμβάνουν κορτικοστεροειδή πρέπει να χορηγούνται συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D. Οι ασθενείς με εκτεταμένη προσβολή του λεπτού εντέρου αναπτύσσουν δυσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών (A,D,E και K), σιδηροπενία, έλλειψη φυλλικού οξέως και, αν έχουν σημαντική διάρροια, έλλειψη ψευδαργύρου. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη η συμπληρωματική χορήγηση των εν λόγω συστατικών (Cecil, 2003). Επίσης, συστήνεται μια αυξημένη πρόσληψη υγρών λόγω των απωλειών για την επανυδάτωση όπως και αύξηση της συνολικής κατανάλωσης τροφής για την κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων (Συντώσης, 2005). Τέλος, τα τελευταία χρόνια νέα δεδομένα από κλινικές μελέτες έρχονται στο φως για τη χορήγηση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών που ασκούν τροφική δράση στο έντερο ή ρυθμίζουν την ανοσία όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (MCTs) (Sagar et al, 1995), τα ω-3 λιπαρά οξέα (Belluzzi et al, 2004), η γλουταμίνη (Wall- Alonso et al, 2003) και τα προβιοτικά (Plein et al, 1993; Rembacken et al, 1999).

5.7.3 ΙΦΝΕ και οξειδωτικό στρες

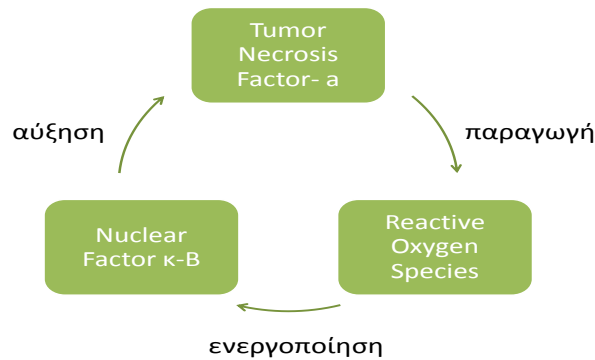
Με τον όρο οξειδωτικό στρες εννοούμε την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αποτοξικώσει τα δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα ή να επιδιορθώσει την προκαλούμενη από αυτά βλάβη. Το οξειδωτικό στρες είναι ένας βασικός μηχανισμός καταστροφής των ιστών λόγω ελευθέρων ριζών (ROS) οι οποίες απελευθερώνονται από φλεγμονώδη κύτταρα που εκχέονται από

λεμφαγγεία και αιμοφόρα αγγεία στο βλεννογόνο του χορίου. Αυτό μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων προσκόλλησης και ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, οι ROS και τα μόρια προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των ΙΦΝΕ. Υπερβολικά επίπεδα ελευθέρων ριζών επιτίθενται και καταστρέφουν την πλειοψηφία των κυτταρικών συστατικών όπως μεμβράνες, λιπίδια, πρωτεΐνες, ένζυμα και DNA προκαλώντας απόπτωση (Tanida et al 2011). Επιπλέον, στα ΙΦΝΕ προκαλούν αύξηση της διαπερατότητας του βλεννογόνου με συνέπεια διάβρωση του εντερικού επιθηλίου (Riedle et al 1997).

Για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός διαθέτει ένα σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας που αποτελείται από αντιοξειδωτικά ένζυμα (GSH, SOD και καταλάσες), ενδογενή μόρια εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών (ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες) και το ουρικό οξύ (Grassmann, 2005). Στα ΙΦΝΕ η ύπαρξη φλεγμονής δημιουργεί αυξημένες ανάγκες σε αντιοξειδωτικά, γεγονός που οδηγεί σε επιδείνωση του οξειδωτικού στρες. Ένας μηχανισμός που προτείνεται σήμερα για τη σύνδεση των ROS και του TNF- α , σημαντικού μεσολαβητή της φλεγμονής στα ΙΦΝΕ, δίνεται στις εικόνες 2 και 3. Βάσει αυτού, οι ROS ενεργοποιούν τον NF- κ B που στη συνέχεια επάγει την παραγωγή του TNF- α δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο.



Εικόνα 2. Αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικού στρες, TNF- α και NF- κ B στο κύτταρο.



Εικόνα 3. Ο πιθανός ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στη φλεγμονή (Head et al, 2003)

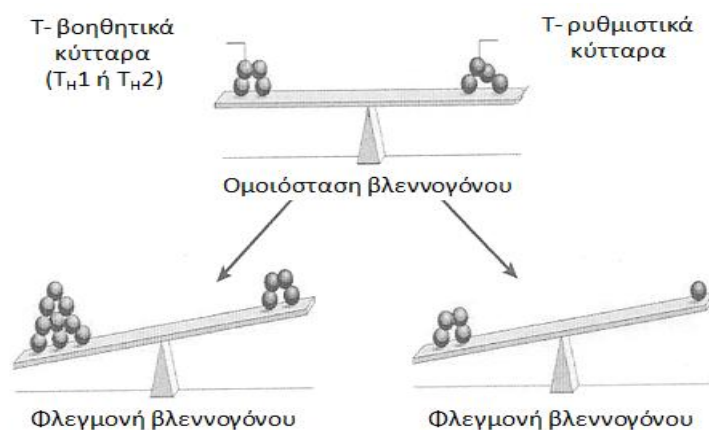
Η άμεση μέτρηση των ROS στα κύτταρα και τους ιστούς είναι δύσκολη λόγω της μικρής ημίσειας ζωής τους στον οργανισμό (Rumley et al, 1997). Στη νόσο Crohn για τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες στον ορό και τον εντερικό ιστό έχει καθιερωθεί η μαλοναλδεΰδη (MDA), δείκτης που αποτυπώνει τα υπεροξειδωμένα λιπίδια (Kruidenier et al, 2003). Έμμεση ποσοτικοποίηση των ROS από βιοψίες στο κόλον ατόμων με ΙΦΝΕ έδειξαν ότι τα επίπεδά τους σε αυτούς τους ιστούς είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αυτά από άτομα με φυσιολογικό βλεννογόνο και σχετίζονται θετικά με την ύπαρξη ΙΦΝΕ (Sedghi et al, 1997, Naito et al 2003). Παρομοίως, οι D'Odorico et al το 2001 παρατήρησαν βλάβες στο DNA ασθενών και μειωμένα επίπεδα βιταμινών A και E (αντιοξειδωτικές). Τα παραπάνω δείχνουν την ισχυρή συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με την κλινική εικόνα της νόσου (Tanida et al 2011) και την πιθανή θεραπευτική δράση της χορήγησης αντιοξειδωτικών.

5.7.4 ΙΦΝΕ και φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι μέρος της σύνθετης βιολογικής απόκρισης των ιστικών αγγείων σε βλαβερά ερεθίσματα όπως παθογόνα, κακώσεις, κατεστραμμένα κύτταρα. Αποτελεί την προσπάθεια του οργανισμού να απομακρύνει αυτά τα ερεθίσματα και να ξεκινήσει τη διαδικασία επούλωσης. Η αρχική απόκριση του σώματος (*οξεία φλεγμονή*) επιτυγχάνεται από αυξημένη μετακίνηση πλάσματος και λευκοκυττάρων από το αίμα στους τραυματισμένους ιστούς. Ακολουθεί ένας καταρράκτης βιοχημικών αντιδράσεων που κάνουν την απόκριση να πολλαπλασιαστεί και να ωριμάσει περιλαμβάνοντας το τοπικό αγγειακό σύστημα, το ανοσοποιητικό και πολλά είδη κυττάρων στους ιστούς που φλεγμαίνουν. Παρατεταμένη φλεγμονή, γνωστή ως *χρόνια φλεγμονή*, οδηγεί σε σταδιακή αλλαγή του τύπου των κυττάρων

που παρίστανται στο σημείο της φλεγμονής και χαρακτηρίζεται από παράλληλη καταστροφή και επούλωση του ιστού από τη φλεγμονώδη διαδικασία (Ferrero-Miliani et al; 2007).

Όσον αφορά τα είδη των κυττάρων που εμπλέκονται στη φλεγμονή στα ΙΦΝΕ, εξέχοντα ρόλο παίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Δρουν προστατευτικά καθώς αναγνωρίζουν μικροοργανισμούς ή/ και ουσίες που αυτοί παράγουν και στις οποίες εκτίθεται ο εντερικός βλεννογόνος και αντιδρούν παράγοντας χημοκίνες, κυτταροκίνες και άλλους προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Έτσι, προσελκύονται λευκοκύτταρα επάγοντας τη φλεγμονή. Λειτουργούν επομένως ως φραγμός της δυνητικά διεγερτικής μικροχλωρίδας του εντέρου (Bouma et al; 2003). Τα Β κύτταρα επίσης πιθανώς δρουν προστατευτικά στη φλεγμονή, χωρίς όμως αυτό να έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Ακόμη, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα επάγουν τη φλεγμονή ενεργοποιώντας τόσο τα Τ-βοηθητικά όσο και τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα. Τα μακροφάγα, ως ένα είδος αντιγονοπαρουσιαστικών, επάγουν επίσης τη φλεγμονή. Η ισορροπία μεταξύ Τ-βοηθητικών και Τ-ρυθμιστικών είναι το καθοριστικό σημείο στη ρύθμιση της φλεγμονής φυσιολογικά. Στα ΙΦΝΕ, η φλεγμονή δημιουργείται είτε λόγω υπερβολικής διέγερσης Τ-βοηθητικών κυττάρων είτε λόγω ελλιπούς παρουσίας Τ-ρυθμιστικών (Bouma et al; 2003) (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Πάνω: ισορροπία μεταξύ Τ-βοηθητικών/ Τ-ρυθμιστικών κυττάρων. Κάτω αριστερά: υπερέκκριση Τ-βοηθητικών, φυσιολογικά Τ-ρυθμιστικά. Κάτω δεξιά: φυσιολογικά Τ-βοηθητικά, μειωμένα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα (Bouma et al; 2003).

Η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος ξεκινά από τα CD4⁺ Τ-κύτταρα και τα CD8⁺ κυτταροτοξικά εντοπίζουν κάποιο αντιγόνο στο βλεννογόνο του εντέρου. Τα CD4⁺ διαφοροποιούνται σε Τ-βοηθητικά κύτταρα που εκφράζουν κυτταροκίνες. Τα CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα δεν φαίνεται να έχουν ουσιαστικό ρόλο στην ΙΦΝΕ, αφού η

απουσία τους σε πειραματόζωα δεν προκαλεί φλεγμονή (Strober et al, 2002). Ύστερα, τα T-βοηθητικά διαφοροποιούνται σε ενεργοποιημένα βοηθητικά κύτταρα T_H1 και T_H2 . Τα T_H1 εκκρίνουν τις IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, τον TNF- α και την IFN- γ και τα T_H2 εκκρίνουν τις IL-4, IL-5 και IL-13. Οι παραπάνω κυτταροκίνες λειτουργούν ως προφλεγμονώδεις παράγοντες, δηλαδή επάγουν τη φλεγμονή. Τα CD4+ λεμφοκύτταρα κατηγοριοποιούνται ως T_H1 ή T_H2 ανάλογα με το προφίλ κυτταροκινών τις οποίες παράγουν. Γενικά, τα T_H1 επάγουν την κυτταρική ανοσολογική απόκριση και τα T_H2 τη χυμική ανοσολογική απόκριση (Hendrickson et al, 2002). Για την αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης και άρα της φλεγμονής, από την άλλη, υπάρχουν τα ρυθμιστικά κύτταρα, όπως τα T_H3 που προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των CD4+. Τα T_H3 εκκρίνουν IL-10 και TGF- β . Φαίνεται ότι τα T_H1 κύτταρα αναστέλλουν τα T_H3 , ενώ τα T_H2 τα διεγείρουν (εικόνα 6).

Ρόλος του ενδοθηλίου και των κυτταροκινών

Το αγγειακό ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Στις περιοχές φλεγμονής, η παρουσία κυτταροκινών (π.χ. TNF- α , IL-1, IL-6) ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία εκφράζουν υποδοχείς της επιφάνειάς τους που διευκολύνουν τη μεταφορά λευκοκυττάρων στον εξωαγγειακό χώρο (Russo et al, 2002). Έτσι, επάγεται η σύνθεση μορίων προσκόλλησης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ως σήμερα γνωστά είναι: α) το μόριο σύνδεσης των λευκοκυττάρων του ενδοθηλίου τύπου 1 (ELAM-1), β) το διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (ICAM-1) και γ) το αγγειακό συνδετικό μόριο-1 (VCAM-1).

Η είσοδος των λευκοκυττάρων στα σημεία φλεγμονής γίνεται χημειοτακτικά και περιλαμβάνει 3 στάδια: 1) προσέλκυση, 2) προσκόλληση και 3) διείσδυσή τους στον υπενδοθηλιακό χώρο. Η προσκόλληση γίνεται με τη βοήθεια ιντεγκρινών (διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί υποδοχείς). Κάποιες από αυτές είναι η LFA 1 (lymphocyte function associated antigen) για τη σύνδεση των T-λεμφοκυττάρων με το ICAM-1 και η VLA-4 (very late antigen-4) για τη σύνδεση τόσο T όσο και μονοπύρηνων λευκοκυττάρων με το VCAM (Cepinskas et al, 2003). Σχετικά με τις κυτταροκίνες, κάποιες έχουν κεντρικό ρόλο όπως οι IL-12, IL-18, IL-23 και η παραγωγή τους έχει συνέπεια την παραγωγή άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-8 και TNF- α). Οι τελευταίες, καθώς και κάποια μόρια προσκόλλησης (ICAM-1, ELAM-1) ρυθμίζονται ως προς την έκφραση των γονιδίων τους από τον μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα NF- κ B. Το βασικότερο ερέθισμα για την ενεργοποίησή του είναι το ενδοαγγειακό οξειδωτικό στρες, όπως αναφέρθηκε και

νωρίτερα, ενώ ανασταλτική δράση παίζει το NO το οποίο έμμεσα μειώνει την προσέλκυση λευκοκυττάρων και άρα τη φλεγμονώδη απόκριση (Davis et al 2004).

Ο TNF-α παράγεται από τα μονοπύρρηνα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα. Κύρια κύτταρα-στόχοι του είναι τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά, τα T- και B-λεμφοκύτταρα. Ο TNF-α επάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης από τον NF-κΒ. Επίσης, ασκεί προφλεγμονώδη δράση αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλοντας τη απόπτωση (Sanchez-Muñoz et al, 2008). Σε ασθενείς με ενεργό ΙΦΝΕ ο TNF-α είναι αυξημένος και αποτελεί σημείο κλειδί στην παθογένειά της (Baert et al, 1999). Η IL-6 παράγεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους (μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και T-λεμφοκύτταρα) και έχει πλειοτροπικές δράσεις στα διάφορα οργανικά συστήματα (Podolsky et al, 2002). Αυξάνει τις πρωτεΐνες οξείας φάσης στο ήπαρ και επάγει τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων. Οι πηγές της IL-8 στον εντερικό βλεννογόνο είναι τα μακροφάγα, τα επιθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες. Είναι ισχυρός ενεργοποιητής ουδετερόφιλων και χημειοταξίας (Rogler et al, 1998). Στην εικόνα 5 φαίνεται ο διαχωρισμός μεταξύ των 2 τύπων ΙΦΝΕ ως προς τα είδη των κυτταροκινών που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς.

	Νόσος Crohn	Ελκώδης κολίτιδα
IL-6	+	+
IL-8	+	+
TNF-α	+	+
IL-12	+	-
IFN-γ	+	-
IL-15	+	-
IL-18	+	-
IL-5	-	+

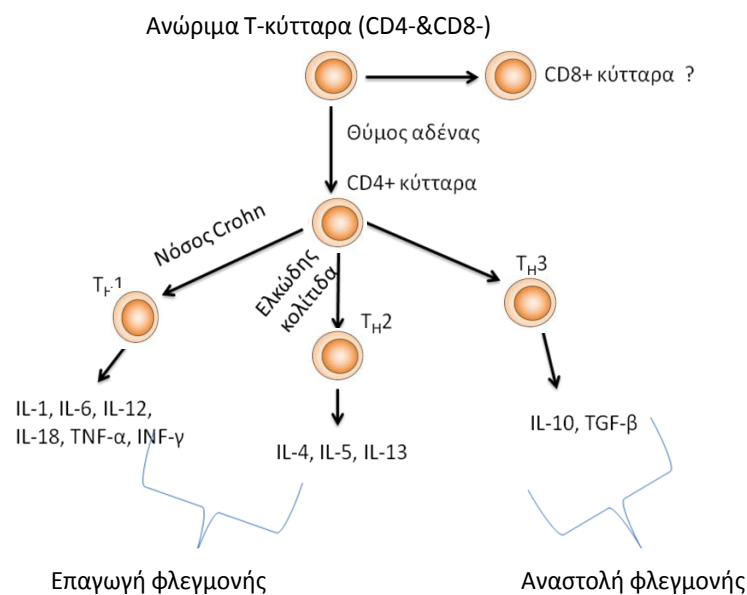
Εικόνα 5. Προφίλ κυτταροκινών στα 2 είδη ΙΦΝΕ (Hendrickson et al, 2002)

(* τα επίπεδα IL-8 σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα υψηλότερα σε σχέση με τη νόσο Crohn)

5.7.5 Ζωικά μοντέλα ΙΦΝΕ

Σημαντική πρόοδος έχει γίνει στη μελέτη των ΙΦΝΕ από την ανακάλυψη και ανάλυση πληθώρας μοντέλων εντερικής φλεγμονής σε ποντίκια που προσομοιάζει αυτής των ΙΦΝΕ (Strober et al; 2002). Τα μοντέλα αυτά εμπίπτουν σε μια από τις 4 κατηγορίες: 1) κολίτιδα που προκαλείται άμεσα ως αποτέλεσμα φυσικής γενετικής ανωμαλίας, 2) κολίτιδα που

προκαλείται άμεσα είτε από τη στόχευση σε συγκεκριμένα γονίδια είτε από την εισαγωγή νέων γονιδίων (διαγονιδιακά ζώα), 3) κολίτιδα προκαλούμενη από «απτίνες» ή άλλες χημικές ουσίες και 4) κολίτιδα προκαλούμενη από τη μεταφορά T- λεμφοκυττάρων, τα οποία επάγουν την εντερική φλεγμονή, σε ξενιστές με μειωμένα ενδογενή ρυθμιστικά κύτταρα δηλαδή ξενιστές με ανοσοανεπάρκεια (Strober et al; 2002). Στην παρούσα εργασία η επαγωγή της ΙΦΝΕ σε ζωικό μοντέλο έγινε με την 3^η μέθοδο. Έρευνες προηγούμενων ετών σε ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι η φλεγμονή του βλεννογόνου στη νόσο Chron είναι αποτέλεσμα παραγωγής T_H1 κυττάρων ενώ η ελκώδης κολίτιδα από εκείνη των T_H2 (εικ. 6).



Εικόνα 6. Διαφοροποίηση T-κυττάρων και έκκριση κυτταροκινών (Korzenik et al, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 *In vivo* πειράματα

6.1.1 Τα πειραματόζωα και οι συνθήκες διαβίωσής τους

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιούνται υγιείς, άρρενες επίμυες τύπου Wistar (εικόνα 1). Προέρχονται από εγκεκριμένη μονάδα παροχής πειραματόζωων. Είναι ενήλικες (3 μηνών) με ώριμο πεπτικό σύστημα και σύνηθες μικροβιακό φορτίο. Για 2 εβδομάδες μετά την παραλαβή τους στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις ακολουθεί περίοδος εγκλιματισμού. Για τη διαβίωσή τους χρησιμοποιούνται ανοξείδωτα κελιά υπό ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50%) διατηρώντας κύκλο φωτός-σκότους 12:12 ώρες. Διατρέφονται με τυποποιημένη τροφή εργαστηρίου συγκεκριμένης σύστασης μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών (Vergerio Mangimi srl, Italy). Η πρόσβαση σε τροφή και νερό είναι ελεύθερη. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων υπήρξε έγκριση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχίας Αθηνών και έγιναν σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης 86/609/EEC και την Ελληνική Νομοθεσία (ν. 160, Α-64, Μάιος, 1991).



Εικόνα 1. Επίμυς τύπου Wistar

6.1.2 Κλασματοποίηση μαστίχας Χίου

Η μαστίχα κλασματοποιείται σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα για μελέτη της δράσης των επιμέρους συστατικών της ως εξής:

Αντιδραστήρια και όργανα:

- Διαλύτες HPLC καθαρότητας: μεθανόλη (CH_3OH), οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) και διαιθυλαιθέρας ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$)
- 5% Na_2CO_3 , 1N HCl , Na_2SO_4

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100mL και 500mL, ογκομετρική φιάλη του 1L, ποτήρι ζέσεως των 250mL και 500mL, σφαιρική φιάλη των 250mL και 500mL
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (Heidolph Laborota 4000 efficiency), ψυγείο (2-4°C)

Αναλυτική πορεία:

Συνολικά 100g ρητίνης διαχωρίζονται σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα σύμφωνα με τους Paraschos et al (2007). Συγκεκριμένα, στα 100g μαστίχας προστίθενται 300mL μεθανόλης και 100mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολούθως αναδεύονται ισχυρά για περίπου 15 min. Αφού παραμείνουν 2 ημέρες σε ηρεμία, το υπερκείμενο εκχύλισμα παραλαμβάνεται μετά από διήθηση, ενώ το στερεό υπόλειμμα το οποίο περιέχει σε μεγάλο βαθμό β-πολυμερή απομακρύνεται. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση σε 200mL 5% Na₂CO₃ και 700mL διαιθυλαιθέρα. Στην οργανική φάση επαναλαμβάνονται τρεις εκπλύσεις με 200mL Na₂CO₃ 5%, εκ των οποίων οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na₂SO₄ και εξατμίζονται μέχρι ξηρού. Η σκόνη που παραλαμβάνεται αποτελεί το ουδέτερο κλάσμα μαστίχας. Οι υδατικές φάσεις των παραπάνω εκπλύσεων προστίθενται σε αυτή του πρώτου διαχωρισμού. Ακολουθεί οξίνισή τους με 600mL HCl 1N και πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με 350mL διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na₂SO₄ και εξατμίζονται μέχρι ξηρού. Η σκόνη που παραλαμβάνεται αποτελεί το όξινο κλάσμα μαστίχας. Όλα τα κλάσματα συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης.

6.1.3 Ποσοτική ανάλυση ολεανολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)

Αντιδραστήρια και όργανα:

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

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών επιτυγχάνεται εξ' αιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης ή το υλικό κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα παραγωγοποιημένου δείγματος ίση με 1 μL εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο σε λόγο σχάσης 1:20. Το δείγμα διαχωρίζεται με τη χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0,25 mm x 250 μ). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο με ρυθμό έκχυσης 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 φαίνεται στον πίνακα 1:

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

Πίνακας 1. Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου GC / MS

Για τον προσδιορισμό του ολεανολικού οξέος χρησιμοποιείται η μέθοδος selective ion monitoring (SIM) GC/ MS (αέρια χρωματογραφία/ φασματομετρία μάζας). Ο προσδιορισμός βασίζεται στην παρουσία ιόντων για το συστατικό σε χρόνο κατακράτησης $\pm 0,05$ του χρόνου κατακράτησης του αντίστοιχου προτύπου. Το ιόν στο οποίο βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός συμβολίζεται με T ενώ τα ιόντα που καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας του συστατικού στο δείγμα συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται είναι τα 203, 320, 482. Η 3-(4-υδρόξυφαινυλ)-1-προπανόλη χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο στο χαρακτηριστικό ιόν m/ Z 206 και τα προσδιοριστικά 191 και 179. Η ένωση αυτή δεν περιέχεται στα υπό ανάλυση δείγματα και η κορυφή της είναι ευδιάκριτη και ικανή να διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά.

6.1.4 Πειραματικό ζωικό μοντέλο νόσου Crohn

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Κεταμίνη, ξυλαζίνη, τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS), φυσιολογικός ορρός, αιθανόλη 50% σε φυσιολογικό ορό
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: φλεβοκαθετήρες (Brown Vasofix 17G), σύριγγες του 1mL, χειρουργικές λαβίδες Adson
- Ποτήρι ζέσεως των 250ml, ογκομετρικός κύλινδρος των 100mL

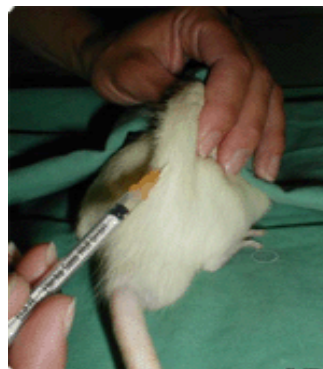
- Αναλυτικός ζυγός τριών δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτική πορεία:

Κατά την έναρξη των πειραμάτων, καταγράφεται το σωματικό βάρος (ΣΒ) όλων των ζώων (ημέρα 0). Ακολουθεί ακινητοποίηση των επίμυων με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 2Α ώστε να είναι δυνατή η ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης-ξυλαζίνης σε φυσιολογικό ορρό για ελαφρά αναισθησία (80mg/Kg ΣΒ και 16mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα). Η δράση του αναισθητικού επιβεβαιώνεται ασκώντας πίεση στα άκρα με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας, διαφορετικά χορηγείται αναισθητικό συμπληρωματικά. Στη συνέχεια, το ζωικό μοντέλο νόσου Crohn αναπτύσσεται με ενδοκολονική χορήγηση διαλύματος TNBS (100mg/Kg ΣΒ) σε 0,25mL 50% αιθανόλη. Για το σκοπό αυτό, οι επίμυες ακινητοποιούνται (εικόνα 2Β) και η παραπάνω ουσία χορηγείται με φλεβοκαθετήρα. Τα 2/3 του όγκου εγχύονται κατά την είσοδο του φλεβοκαθετήρα στο κόλον και το 1/3 κατά την έξοδο. Οι επίμυες διατηρούνται σε κατακόρυφη θέση για 2 min για την αποφυγή διαρροής.



(Α)



(Β)

Εικόνα 2. Ακινητοποίηση επίμυων. Α) Ενδομυϊκή αναισθησία, Β) Ενδοκολονική έγχυση TNBS

6.1.5 Δοκιμή με μαστίχα ή συστατικά αυτής

Αντιδραστήρια-όργανα

- Σκόνη μαστίχας (60% ρητίνη, 40% ινουλίνη), όξινο και ουδέτερο κλάσμα, ολεανολικό οξύ, ινουλίνη
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: καθετήρες (Nelaton CH08), σύριγγες του 1mL και των 5mL
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης, erpendorfs των 1,5mL
- Ποτήρι ζέσεως των 250mL

- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Νερό βρύσης

Αναλυτική πορεία

Η σκόνη μαστίχας, το όξινο και το ουδέτερο κλάσμα, το ολεανολικό οξύ, καθώς και η ινουλίνη δίνονται βάσει του ΣΒ κάθε ζώου. Αφού έχει επιτευχθεί επαγωγή της νόσου, η χορήγησή τους ξεκινάει 24h αργότερα (ημέρα 1) και γίνεται μέσω γαστρο-οισοφαγικού καθετήρα. Για να γίνει αυτό, είναι σημαντικό ο επίμυς να είναι ακινητοποιημένος (εικόνα 3). Ακολούθως, ο καθετήρας τοποθετείται στον οισοφάγο και οι ουσίες προς εξέταση δίνονται με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Συγκεκριμένα, γίνονται 3 εκπλύσεις (3x1,5mL) μέχρι την απομάκρυνση όλου του προϊόντος από τον καθετήρα.



Εικόνα 3. Ακινητοποίηση επίμυ για γαστρο-οισοφαγική διασωλήνωση

6.1.6 Πειραματικές ομάδες

Συνολικά 50 επίμυες τυχαιοποιούνται σε 10 ομάδες (5x10) (ημέρα 0). Η ομάδα Α αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες και η ομάδα Β το πειραματικό ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn. Οι ομάδες Γ-Ι λαμβάνουν σκόνη μαστίχας, το ουδέτερο και το όξινο κλάσμα, το ολεανολικό οξύ και την ινουλίνη μία φορά ημερησίως. Η χορήγηση των παραπάνω γίνεται από του στόματος (mg/Kg ΣΒ), ενώ η υδροκορτιζόνη χορηγείται υποδόρια (25μg/Kg ΣΒ).

Ομάδες	Χημική κολίτιδα	Σκόνη μαστίχας	Ινουλίνη	Όξινο κλάσμα	Ουδέτερο κλάσμα	Ολεανολικό οξύ
A	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-
Γ	+	x	-	-	-	-
Δ	+	-	40% x	-	-	-
E	+	-	-	α	-	-
Στ	+	-	-	2α	-	-
Z	+	-	-	-	β	-
H	+	-	-	-	2β	-
Θ	+	-	-	-	-	γ
I	+	-	-	-	-	2γ

Πίνακας 2. Πειραματικές ομάδες

6.1.7 Αναισθησία-ευθανασία

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Κεταμίνη, ξυλαζίνη, δολεθάλη, φυσιολογικός ορρός, υγρό άζωτο (-196°C), 10% φορμαλίνη σε φυσιολογικό ορρό
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: σύριγγες του 1mL, γάζες, χειρουργικές λαβίδες Adson, οφθαλμικά κυρτά ψαλίδια, νυστέρια μίας χρήσης (No21)
- Eppendorfs των 1,5mL
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, υπερκατάψυξη (-80°C)

Αναλυτική πορεία:

Την τελευταία μέρα των πειραμάτων καταγράφεται το ΣΒ όλων των ζώων και γίνεται αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης-ξυλαζίνης (100mg/Kg ΣΒ και 20mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορρό. Η δράση του αναισθητικού επιβεβαιώνεται ασκώντας πίεση στα άκρα με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας. Ύστερα, πραγματοποιείται τομή στην περιτοναϊκή κοιλότητα για την αφαίρεση 6cm του παχέος εντέρου με αφετηρία τον πρωκτό. Αφού διανοιχθεί ο αυλός και απομακρυνθούν τα κόπρανα με βαμβακοφόρο στελεό, το έντερο διαχωρίζεται κατά μήκος σε δύο τμήματα. Το ένα τμήμα φυλάσσεται σε υγρό άζωτο (-196°C) για την μέτρηση των κυτταροκινών και του οξειδωτικού στρες, ενώ το άλλο σε φορμαλίνη (10%) για μικροσκοπική εξέταση. Ακολουθεί ευθανασία χορηγώντας δολεθάλη απευθείας στη δεξιά κοιλία της καρδιάς (0,6mg/Kg ΣΒ). Στο τέλος όλων των

ευθανασιών, τα δείγματα ιστών, εκτός εκείνων προς ιστοπαθολογική ανάλυση, φυλάσσονται σε υπερκατάψυξη (-80°C).



Εικόνα 4. Α) Αναισθησία επίμυ, Β) Ευθανασία

6.1.8 Ομοιογενοποίηση ιστών

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 20mM και PH 7,4, 0,5M βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (BHT) σε ακετονιτρίλιο, φυσιολογικός ορρός
- Κωνικές φιάλες των 50mL και 100mL, δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 5mL με αντίστοιχα πάματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, eppendorfs των 1,5mL, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL και 100-1000μL)
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ομογενοποιητής (ULTRA-TURAX, IKA-Labortechnik), vortex, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία:

Οι ιστοί ζυγίζονται σε ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, πλένονται με φυσιολογικό ορρό και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με PBS (1mL/2g ιστού) και BHT (10μL/mL ομογενοποιημένου ιστού). Το BHT χρησιμοποιείται για αναστολή της αυτοοξειδωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια της ομοιογενοποίησης. Η τελευταία πραγματοποιείται σε ομογενοποιητή και διαρκεί περίπου 30 sec. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντρωση (3000rcf στους 4°C) για 15 min ώστε να παραληφθεί το εκχύλισμα ιστών. Αμέσως μετά προσδιορίζεται η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα με την αντίδραση Bradford.

6.1.9 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)
- Αντιδραστήριο Bradford, πρότυπο διάλυμα 1mg/mL αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA) σε PBS 20mM και PH 7,4
- Κυψελίδες των 1,5mL, eppendorfs των 1,5mL, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL)
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, vortex
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής «Coomassie Brilliant Blue G-250» με πρωτεΐνες δημιουργώντας ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Αυτό εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm.

Αναλυτική πορεία:

Δείγματα ιστού: Τα ομοιογενοποιημένα εκχυλίσματα ιστών αραιώνονται σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1 προς 10. Σε κατάλληλο όγκο από κάθε δείγμα προστίθενται 500μL αντιδραστηρίου Bradford και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000μL. Τα δείγματα αναδεύονται αφού αναδευθούν ήπια σε vortex, παραμένουν σε ηρεμία για 5min μέχρι τη φωτομέτρησή τους (595nm).

Καμπύλη αναφοράς: Αρχικά προετοιμάζονται τουλάχιστον πέντε διαφορετικά διαλύματα BSA συγκέντρωσης 1 έως 10μg/mL. Στην ίδια κυψελίδα προστίθενται 500μL αντιδραστηρίου Bradford και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000μL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και παραμονή 5min σε κατάσταση ηρεμίας. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm και η γραμμική ευθεία που προκύπτει αποδίδει εξίσωση τύπου $y = ax + \beta$ ($R^2 \approx 1$). Το «y» αντιπροσωπεύει την τιμή απορρόφησης και το «x» τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης εκφρασμένης σε μg/mL.

6.1.10 Μέτρηση επιπέδων κυτταροκινών σε ιστό

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)
- Εξειδικευμένα Elisa Kits για TNF-α, IL-6, IL-8, ICAM-1, IL-10
- Αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου των 5mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7,4
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Η προς μέτρηση κυτταροκίνη προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Capture antibody) και έπειτα προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (Detection antibody) της προσδεμένης κυτταροκίνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Η μέγιστη απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης παρατηρείται στα 450nm.

Αναλυτική πορεία:

Για τη μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών στα δείγματα ιστού χρησιμοποιείται ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, στο τρυβλίο όπου γίνονται οι μετρήσεις προστίθενται 100μL μονοκλωνικού αντισώματος και επωάζεται για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (3x400μL), ενώ παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις του τρυβλίου προστίθενται 100μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Επαναλαμβάνεται το ξέπλυμα 3 φορές μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς.

6.1.11 Μέτρηση επιπέδων μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)

- Εξειδικευμένο MDA Kit
- Δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου (5mL, 10mL) με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), κυψελίδες των 1,5mL
- Υδατόλουτρο, απλή φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5417C)

Αρχή της μεθόδου:

Η δοκιμασία στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστήριου N-methyl-2-phenylindole με τη μαλοναλδεΰδη (MDA), όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 586nm.

Αναλυτική πορεία:

Για τη μέτρηση των επιπέδων της MDA στα δείγματα ιστού χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου προστίθενται 200μL δείγματος και 650μL αντιδραστήριου (N-methyl-2-phenylindole σε ακετονιτρίλιο). Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και προστίθενται 150μL HCl (12N). Μετά από ισχυρή ανάδευση, τα δείγματα επωάζονται στους 45°C για 60 min. Με το τέλος της επώασης γίνεται φυγοκέντρηση (15.000rcf, 15 min) και παραλαμβάνεται η υπερκείμενη στιβάδα. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 586nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pmols/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς.

6.2 In vitro δοκιμή σε επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Ανθρώπινη κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29
- Εμβρυϊκός ορός μόσχου (NCS), διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), καλλιεργητικό υλικό RPMI –1640, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, χρωστική κυανού του τρυπανίου (Trypan blue), ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7,4, διάλυμα Trypsin-EDTA.
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ή 50mL (sterilised falcon tubes), αποστειρωμένες πιπέτες των 5 ή 10mL, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, και 100-1000μL), πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 24 βοθρίων επιφάνειας 1.9cm² και καλλιεργητικές φλάσκες

- Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂), ψυγείο (2-4°C), καταψύκτης (-20°C), υπερκατάψυξη (-80°C), υγρό άζωτο (-196°C), θάλαμοι κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV, αιμοκυττόμετρο, υδατόλουτρο, φωτονικό μικροσκόπιο, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)

Αναλυτική πορεία:

6.2.1 Μέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας

Ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται με αιμοκυττόμετρο. Στο κυτταρικό αιώρημα προστίθεται διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου 2%, σε αναλογία εννέα προς ένα, αντίστοιχα, ώστε η τελική συγκέντρωση της χρωστικής να είναι 0,2%. Έπειτα γίνεται επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο αιμοκυττόμετρο και μετρώνται. Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφτεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας σύμφωνα με τη σχέση: «Ποσοστό βιώσιμων = 100 x νεκρά κύτταρα (κυανά) / μετρηθέντα κύτταρα».

6.2.2 Ψύξη και απόψυξη κυττάρων

Καλλιέργεια των κυττάρων σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρείται στα 700 × g για 5min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε κρύο καλλιεργητικό υλικό που αποτελείται από υλικό medium με 50% NCS και 10% DMSO. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5 × 10⁶ κύτταρα/mL. Από το εναιώρημα των κυττάρων φέρεται 1mL σε ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια των 2mL, τα οποία καταψύχονται σταδιακά μέχρι να μεταφερθούν τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου (-196°C). Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται φέροντας το κρυοάντοχο σωληνάριο, από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται περίπου δέκα φορές με θρεπτικό υλικό (37°C) και φυγοκεντρείται για 5 min στα 700 × g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αιωρείται σε 5mL θρεπτικού υλικού, φέρεται σε φιάλες καλλιέργειας και τοποθετείται στον κλίβανο (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂).

6.2.3 Καλλιέργεια ανθρώπινης σειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29

Τα HT29 είναι κυτταρική σειρά προερχόμενη από το παχύ έντερο ανθρώπου που εκφράζει όλα τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ώριμων εντεροκυττάρων. Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιεργητικό υλικό DMEM 90% με προσθήκη 10% αδρανοποιημένου με θερμότητα NCS, 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ στους 37°C. Με οπτική μικροσκοπία καθορίζεται η ημέρα ανάπτυξης

συνοχής-συρροής των κυττάρων, δηλαδή του σχηματισμού συνεχόμενου μονόστιβου επιθηλίου, που καλύπτει την επιφάνεια εργασίας. Ο χρόνος που απαιτείται για διπλασιασμό είναι 48 h. Για τη μέτρηση των κυττάρων απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα, πλένουμε κι επιδρούμε με διάλυμα Trypsin-EDTA (2-3mL) παρατηρώντας στο μικροσκόπιο μέχρι να αποκολληθεί η στιβάδα από τη φλάσκα (συνήθως μεταξύ 5 και 15 min). Τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με PBS για να απομακρυνθεί το διάλυμα Trypsin-EDTA και ακολούθως μετρούνται με τη χρήση αιμοκυττομέτρου στο μικροσκόπιο. Αφού μετρηθούν, μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία 24 βοθρίων.

6.2.4 Διέγερση επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29

Σε καλλιέργειες των HT29 (10^5 κύτταρα/βοθρίο) σε πολυστυρενικά τρυβλία 24 βοθρίων επιδρούμε με TNF- α (50ng/mL) για την επαγωγή της φλεγμονής και στο υπερκείμενο μετρούμε τα επίπεδα της IL-8 (όπως περιγράφεται παραπάνω). Για τον έλεγχο της δράσης των συστατικών της μαστίχας, τα κύτταρα προεπωάζονται με τα συστατικά της μαστίχας πριν από την έκθεσή τους στον προφλεγμονώδη παράγοντα κι ακολούθως μετρούνται στο υπερκείμενο τα επίπεδα της IL-8.

6.2.5 Μέτρηση επιπέδων γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Για τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών της μαστίχας στη βιωσιμότητα των HT29, μετρώνται τα επίπεδα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate dehydrogenase, LDH) στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των HT29, με εξειδικευμένο kit.

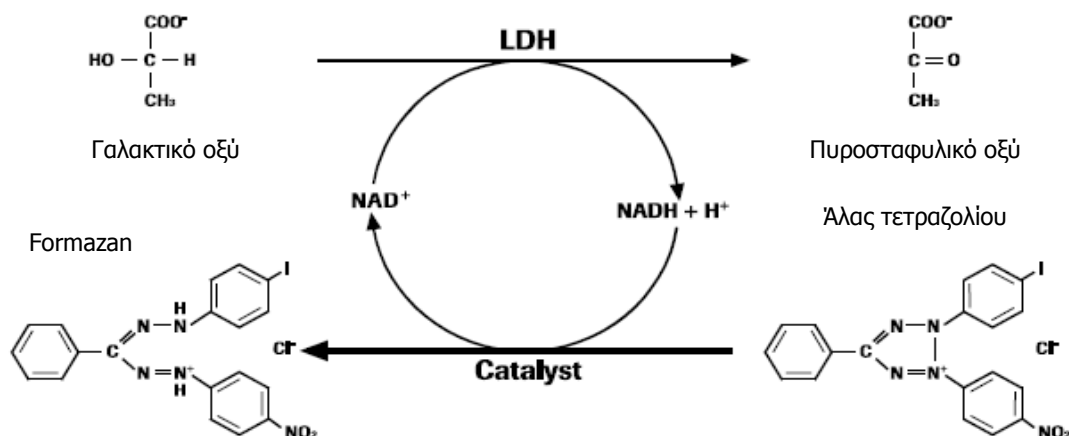
Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)
- Εξειδικευμένο LDH Kit
- Δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου (5mL, 10mL) με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων

Αρχή της μεθόδου:

Αρχικά, όπως φαίνεται στο σχήμα 3, το γαλακτικό οξύ οξειδώνεται σε πυροσταφυλικό οξύ με καταλύτη LDH και ταυτόχρονη αναγωγή του NAD^+ σε $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$. Ύστερα, η διαφοράση καταλύει τη μεταφορά H/H^+ από το NADH/H στο κίτρινο άλας τετραζολίου που

ανάγεται προς το κυανούν ίζημα formazan. Η συγκέντρωση της formazan υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 490nm



Σχήμα 3. Αντίδραση LDH

Αναλυτική πορεία:

Τα υπερκείμενα (100μL) συλλέγονται και μεταφέρονται σε τρυβλίο 96 βοθρίων. Μίγμα άλατος τετραζολίου και γαλακτικού οξέος (1:45) όγκου 100μL προστίθεται στο βοθρίο και ακολουθεί επώαση στους 15-25°C σε σκοτάδι. Μετά από 30min μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 490nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με εφαρμογή του τύπου:

«Κυτταροτοξικότητα (%) = $[(A_{490\text{nm}} \text{ δείγμα} - A_{490\text{nm}} \text{ low control}) / (A_{490\text{nm}} \text{ high control} - A_{490\text{nm}} \text{ low control})] * 100$ », όπου

«low control» η τιμή που αντιστοιχεί σε βοθρίο στο οποίο προστίθεται το υπερκείμενο καλλιέργειας που δεν έχει επιδράσει κανένας διεγέρτης και

«high control» η τιμή που αντιστοιχεί σε βοθρίο στο οποίο προστίθεται το υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων που προηγούμενα λύνονται με 1% Triton X-100.

6.2.6 Μέτρηση πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN), συσκευή υπερήχων (BANDELIN electronic)
- Εξειδικευμένο Elisa Kit

- Αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες προπυλενίου των 5mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4, απεσταγμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Αφού πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων, η Phospho-NF-κB p65 πρωτεΐνη προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Phospho-NF-κB p65 Mouse mAb) και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (NF-κB p65 Rabbit mAb) της προσδεμένης πρωτεΐνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη anti-ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 450nm.

Αναλυτική πορεία:

✓ Λύση των κυττάρων

Στα κύτταρα προστίθεται παγωμένο διάλυμα PBS και αφού αυτό απομακρυνθεί, τοποθετείται 0,5mL διαλύματος λύσης των κυττάρων (cell lysis buffer) μαζί με 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά σε πάγο και τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τη βοήθεια υπέρηχων τα κύτταρα λύνονται και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες απομονώνεται, μεταφέρεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80 °C.

✓ Ενεργοποίηση NF-κB

Για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του (NF-κB) μετρούνται τα επίπεδα της πρόδρομης πρωτεΐνης (NF-κB) p65. Τα επίπεδα της p65 μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, 100μL δείγματος αραιώνονται με Sample Diluent 1:1 και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για κάποια δευτερόλεπτα. Ακολούθως, 100 μL αραιωμένου δείγματος ή standard προστίθενται στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο όπου έχει ήδη προσδεθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 37 °C ή για 12 ώρες στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (4x200μL). Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος

και επωάζεται για 1 ώρα στους 37 °C. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 4 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 4 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (TMB). Επωάζεται στους 37°C για 10 λεπτά ή 30 λεπτά στους 25°C. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H₂SO₄ 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς.

6.3 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 16.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα test είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Tukey test (για περισσότερες από 7 ομάδες). Η τιμή p-value ≤ 0.05 καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

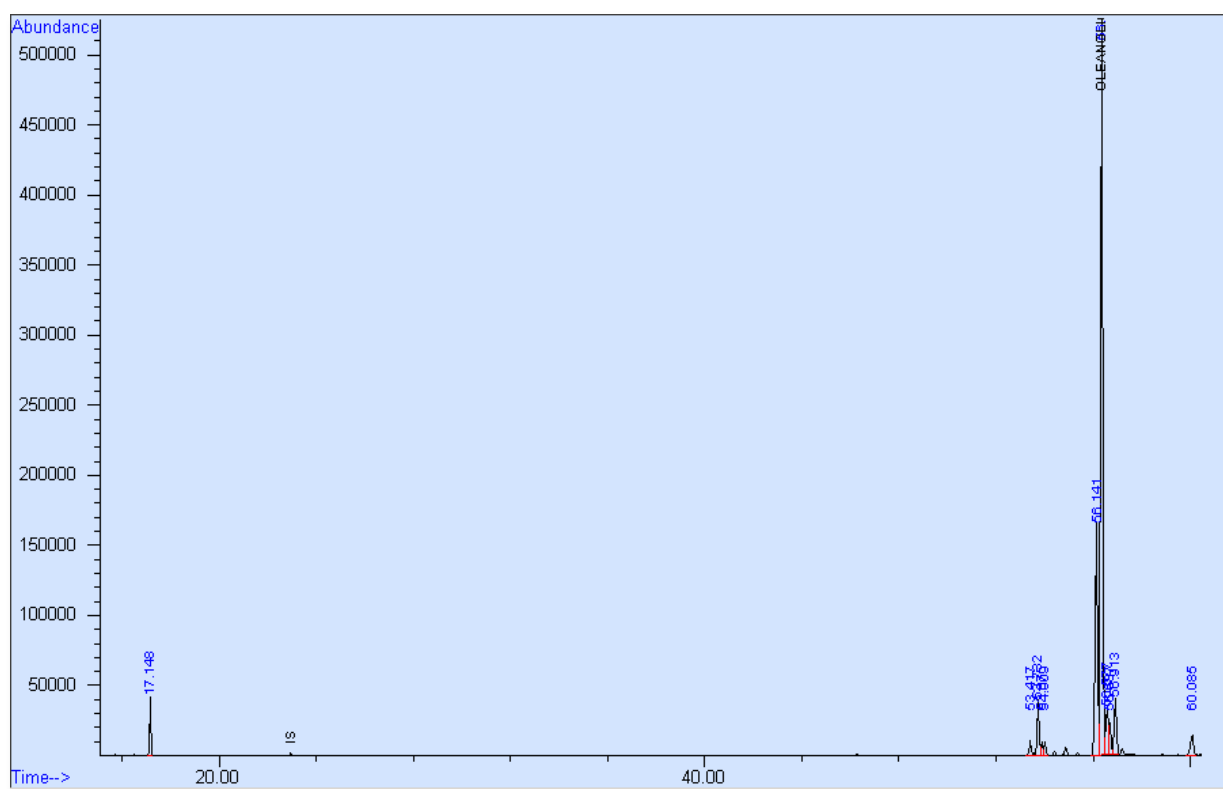
Η Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου (ΙΦΝΕ) περιλαμβάνει τη νόσο Crohn (Crohn's disease, CD) και την ελκώδη κολίτιδα (ulcerative colitis, UC). Η αιτιολογία της αναζητείται στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών, γενετικών και ανοσολογικών παραγόντων. Το οξειδωτικό στρες, δηλαδή η ανισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και προ-οξειδωτικών συστημάτων και μορίων του οργανισμού βρίσκεται στη βάση της δημιουργίας της (Hoffmann et al, 2002). Η ανεξέλεγκτη απόκριση του ανοσοποιητικού του ξενιστή επάγει το οξειδωτικό στρες και την παραγωγή ελευθέρων ριζών από φλεγμονώδη κύτταρα στον εντερικό βλεννογόνο. Η απόκριση αυτή πυροδοτεί βλάβη στο βλεννογόνο και επάγει τη δημιουργία φλεγμονής (Tanida et al, 2011). Παρουσία κάποιου αντιγόνου, κύτταρα του ανοσοποιητικού προκαλούν την παραγωγή κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες είναι τοπικοί μεσολαβητές πολλών βιολογικών διαδικασιών όπως φλεγμονωδών και ανοσολογικών (Hendrickson et al, 2002) με κεντρικό ρόλο στα ΙΦΝΕ. Η παραγωγή αυτών και κάποιων μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, ELAM-1) ρυθμίζεται γονιδιακά από τον μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα NF-κΒ. Το βασικότερο ερέθισμα για την ενεργοποίησή του είναι το ενδοαγγειακό οξειδωτικό στρες (Davis et al, 2004).

Σε προηγούμενη πιλοτική κλινική μελέτη η κλινική εικόνα ασθενών με ήπια ως μέτρια νόσο Crohn βελτιώθηκε μετά από χορήγηση 2,2 g μαστίχας/ ημέρα για 4 εβδομάδες ($p<0,05$) λόγω της μείωσης δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον ορρό και στα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ($p<0,05$) (Kaliora et al, 2007a, Kaliora et al, 2007b). Σε συνέχεια αυτού, στο παρόν πείραμα χορηγήθηκαν σε ζωικό μοντέλο χημικής κολίτιδας μαστίχα είτε κλάσματα είτε συστατικά αυτής. Η μαστίχα κλασματοποιήθηκε και απομονώθηκαν όξινο κλάσμα που περιέχει τριτερπένια μεγάλου μοριακού βάρους και ουδέτερο κλάσμα που περιέχει τριτερπένια, μονοτερπένια και πολυφαινόλες χαμηλού μοριακού βάρους (Parageorgiou et al, 1997; Asimopoulou et al, 2005). Έτσι, στις ομάδες των επίμυων χορηγήθηκε μαστίχα, ινουλίνη, όξινο κλάσμα μαστίχας, ουδέτερο κλάσμα και, τέλος, ολεανολικό οξύ που είναι ένα τριτερπένιο της μαστίχας. Επειδή σε προηγούμενο πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων IL-6, IL-8 και MDA στον ιστό των πειραματόζωων στην ομάδα που χορηγήθηκε μαστίχα ίση προς 100mg/Kg ΣΒ σε σχέση με την ομάδα ασθενών ($p<0,05$) (Gioxari et al, 2011), χρησιμοποιήθηκε η ίδια δόση

στο παρόν πείραμα. Οι δόσεις των 2 κλασμάτων (όξινο και ουδέτερο) που χορηγήθηκαν αντιστοιχούν στην περιεκτικότητα αυτών στη χρησιμοποιούμενη δόση μαστίχας. Ακόμη, σχετικά με το ολεανολικό οξύ, αυτό δόθηκε σε ποσότητα που αντιστοιχεί στην περιεκτικότητά του στο όξινο κλάσμα της χορηγούμενης δόσης μαστίχας. Αυτή προέκυψε από ανάλυση με χρωματογραφία μάζας (GC-MS) για λόγους ακρίβειας.

7.1 Ποσοτικοποίηση ολεανολικού οξέος

Από την ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mmass Spectrometry, GC-MS) λαμβάνεται το παρακάτω χρωματογράφημα. Το ολεανολικό οξύ εκλύεται σε χρόνο 56,141sec και αποτελεί το 30% του όξινο κλάσματος.



ευρήματα τα οποία μιμούνται επαρκώς την ΙΦΝΕ σε αυτούς. Ανάμεσα σε αυτά τα χημικά επαγόμενα ζωικά μοντέλα, η χρήση του TNBS που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη βιοχημικών οδών και αναπτύχθηκε από τους Morris et al (1989). Το TNBS μοντέλο δημιουργεί κλινική εικόνα που μοιάζει αρκετά με εκείνη της νόσου Crohn στους ανθρώπους καθώς παρατηρούνται και εκεί αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών που προκύπτουν από την Th1 ανοσολογική απόκριση όπως ο TNF-α και χαμηλά επίπεδα κυτταροκινών από Th2 όπως η IL-10.

7.3 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn

Την ημέρα 2 καταγράφεται ο θάνατος ενός επίμυ στην ομάδα Β. Αφού επιτεύχθηκε η χημική κολίτιδα, την ημέρα 1 και κατά την πάροδο των ημερών, τα κόπρανα των πειραματόζωων εμφανίζονται διαρκώς και πιο υδαρή. Μόνο στις ομάδες Θ και Ι φαίνεται να είναι πιο σκληρά. Τις ημέρες 2 και 3 το τρίχωμά τους φαίνεται ανασηκωμένο και οι επίμυες συγκεντρώνονται στις γωνίες των κλουβιών, ενδείξεις πόνου στα πειραματόζωα. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αλλαγή στο σωματικό βάρος τους από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 5 της ευθανασίας. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- ❖ ΟΜΑΔΑ Α: υγιή
- ❖ ΟΜΑΔΑ Β: χημική κολίτιδα
- ❖ ΟΜΑΔΑ Γ: χημική κολίτιδα+ 100mg/Kg ΣΒ μίγμ. σκόνης μαστίχας-ινουλίνης (6:4)
- ❖ ΟΜΑΔΑ Δ: χημική κολίτιδα+ ινουλίνη 40mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Ε: χημική κολίτιδα+ όξινο κλάσμα 24mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Στ: χημική κολίτιδα+ όξινο κλάσμα 48mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Ζ: χημική κολίτιδα+ ουδέτερο κλάσμα 24mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Η: χημική κολίτιδα+ ουδέτερο κλάσμα 48mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Θ: χημική κολίτιδα+ ολεανολικό οξύ 7mg/Kg ΣΒ
- ❖ ΟΜΑΔΑ Ι: χημική κολίτιδα+ ολεανολικό οξύ 14mg/Kg Σ

7.4 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων

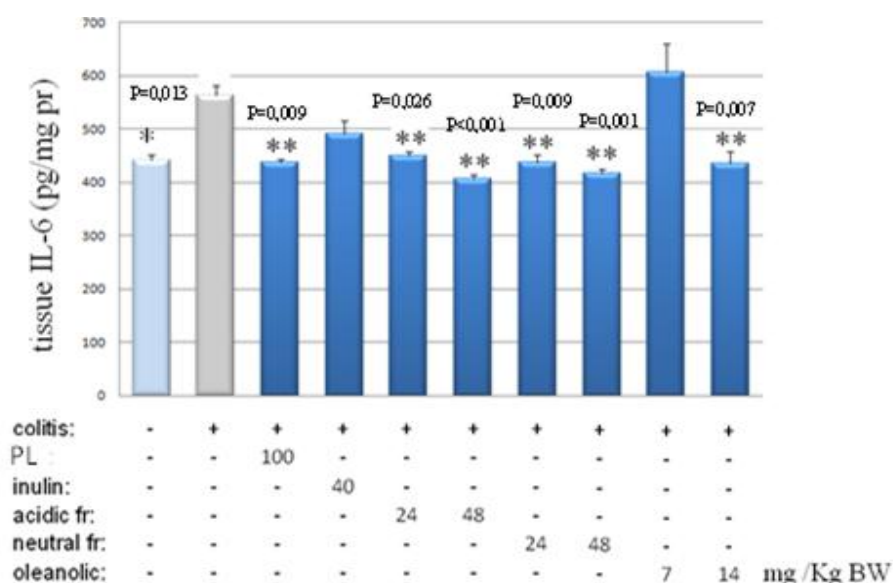
Τα επίπεδα κυτταροκινών μετρήθηκαν με τη μέθοδο sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), μια ανοσοενζυμική, μη-ισοτοπική μέθοδο προσδιορισμού με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία. Με αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε κυτταροκίνες με αλληλεπικαλυπτόμενες βιολογικές δράσεις καθώς χρησιμοποιούνται αντισώματα που κατευθύνονται έναντι δύο ή περισσότερων διαφορετικών επιτόπων. Επειδή η παραγωγή κυτταροκινών από διεγερμένους κυτταρικούς πληθυσμούς είναι παροδική, απαιτείται άμεση τοποθέτηση σε βαθιά κατάψυξη των βιολογικών δειγμάτων για αποφυγή καταστροφής των ιστών ή αιμόλυσης. Άλλωστε, ο χρόνος βιολογικής ημίσειας ζωής των κυτταροκινών είναι εξαιρετικά μικρός (περίπου 3') καθώς και η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα (picomols).

7.4.1 Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων

Μια από τις κυτταροκίνες με κεντρικό ρόλο στη νόσο Crohn είναι η IL-6. Παράγεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους (μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και T-λεμφοκύτταρα) και έχει πλειοτροπικές δράσεις στα διάφορα οργανικά συστήματα (Podolsky et al, 2002). Αυξάνει τις πρωτεΐνες οξείας φάσης στο ήπαρ και επάγει τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων. Έχει δε αντι-αποπτωτική δράση στα T-λεμφοκύτταρα επιτείνοντας έτσι τη φλεγμονή. Είναι αυξημένη σε καταστάσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής όπως στα ΙΦΝΕ τόσο στον ορό όσο και σε βιοψίες βλεννογόνου. Τα επίπεδα της IL-6 σχετίζονται ισχυρά και θετικά με την κλινική, ενδοσκοπική και ιστοπαθολογική σοβαρότητα της νόσου (Mudter et al, 2007). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της IL-6, στον ιστό των πειραματοζώων για το παρόν πείραμα και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με την ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

Ομάδα	IL-6	p-value
A	442,10 ± 9,20	0,013
B	563,96 ± 17,96	-
Γ	438,19 ± 5,57	0,009
Δ	491,71 ± 24,64	0,417
E	450,35 ± 7,38	0,026
Στ	406,94 ± 8,36	<0,001
Z	438,23 ± 14,15	0,009
H	417,09 ± 7,15	0,001
Θ	605,86 ± 54,70	0,941
I	435,42 ± 23,71	0,007

Πίνακας 1. Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα)



Σχήμα 2. Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου, σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στα επίπεδα της IL-6 στον ιστό μεταξύ της ομάδας των υγιών και της ομάδας των ασθενών όπου ήταν αυξημένα. Αυτό αποδεικνύει την επιτυχή επαγωγή χημικής κολίτιδας μέσω του TNBS. Το ίδιο ισχύει για όλους τους δείκτες που μετρήθηκαν στον εντερικό ιστό και στον ορό. Μετά από τη χορήγηση των διαφόρων συστατικών, τα επίπεδα της IL-6 στον ιστό ήταν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) μειωμένα στις ομάδες της μαστίχας (ομάδα Γ), του όξινου κλάσματος

(ομάδες E, Στ) και του ουδέτερου κλάσματος (ομάδες Z, H) και του ολεανολικού οξέος (μόνο στη διπλάσια δόση-14mg/Kg ΣΒ, ομάδα I) (**). Τα επίπεδά της στον ορό των πειραματοζώων δεν ανιχνεύθηκαν είτε γιατί ήταν σε συγκεντρώσεις κάτω των ορίων ανίχνευσης, είτε γιατί είχε αποδομηθεί. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας Β και Δ ($p=0,417$) στα επίπεδα IL-6 στον εντερικό ιστό στην οποία χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη αλλά ούτε και μεταξύ της ομάδας Β και Θ όπου χορηγήθηκε χαμηλή δόση ολεανολικού οξέως ($p=0,941$).

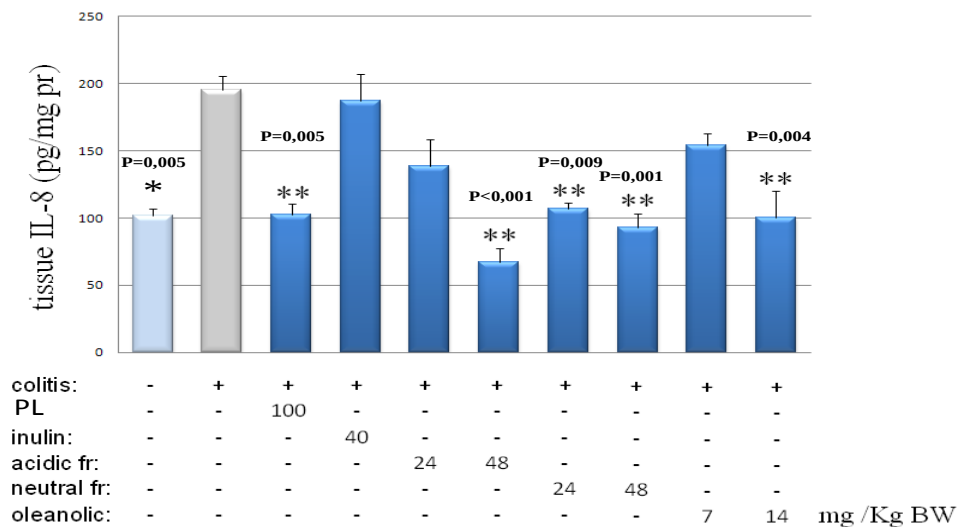
Η μείωση της IL-6 στο κόλον των επίμυων είναι σημαντική καθώς η IL-6 έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην πειραματική κολίτιδα σε πολλά μοντέλα πειραματοζώων (Atreya et al, 2000; Mudter et al, 2002; Yammamoto et al, 2000). Τα ευρήματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη κλινική μελέτη όπου η λήψη μαστίχας για 4 εβδομάδες σε ασθενείς με ήπιας ως μέτριας βαρύτητας νόσο επέφερε μείωση στα επίπεδα της IL-6 (Kaliora et al, 2007a). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και στα PBMC (Kaliora et al, 2007b). Η IL-6 διεγείρει τη χημειοταξία ουδετερόφιλων και σχετίζεται με τη νέκρωση και την καταστροφή του ιστού. Επομένως, λαμβάνοντας αυτά υπόψη, συμπεραίνει κανείς ότι η μαστίχα πιθανώς μπορεί να βελτιώσει την ιστολογική εικόνα του εντέρου στη νόσο Crohn μειώνοντας την παραγωγή IL-6. Ακόμη, πρέπει να αναφερθεί ότι η έκφραση του γονιδίου της IL-6 αυξάνεται από την παρουσία οξειδωτικού στρες (Cho et al, 2005). Έτσι, η μείωση των επιπέδων της IL-6 είναι πιθανώς αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής της δράσης.

7.4.2 Επίπεδα IL-8 στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων

Η IL-8 παράγεται από μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες. Είναι ισχυρός ενεργοποιητής ουδετερόφιλων και χημειοταξίας (Rogler et al, 1998). Τα επίπεδά της στο κόλον έχουν βρεθεί σε πολλές μελέτες αυξημένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Sher et al, 1995; Mitsuyama et al, 1994; Mazzucchelli et al, 1994; Daig et al, 1996; Nielsen et al, 1996) και σχετίζονται με τη μακροσκοπική εικόνα της φλεγμονής τοπικά (Mazzucchelli et al, 1994; Daig et al, 1996) και με τα επίπεδα ουδετερόφιλων στο βλεννογόνο. Έτσι έχει προταθεί ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στη διήθηση του εντερικού τοιχώματος από ουδετερόφιλα στα ΙΦΝΕ (Rogler et al, 1998). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της IL-8 στον ιστό εντέρου των πειραματοζώων για το παρόν πείραμα και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με την ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

Ομάδα	IL-8	p-value
A	101,96 ± 4,86	0,005
B	195,43 ± 10,40	-
Γ	102,68 ± 7,88	0,005
Δ	187,46 ± 19,58	1,000
E	138,37 ± 19,83	0,407
Στ	67,34 ± 10,11	<0,001
Z	106,71 ± 4,63	0,009
H	93,24 ± 9,80	0,001
Θ	154,43 ± 8,43	0,901
I	100,56 ± 19,42	0,004

Πίνακας 2. Επίπεδα IL-8 στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα)



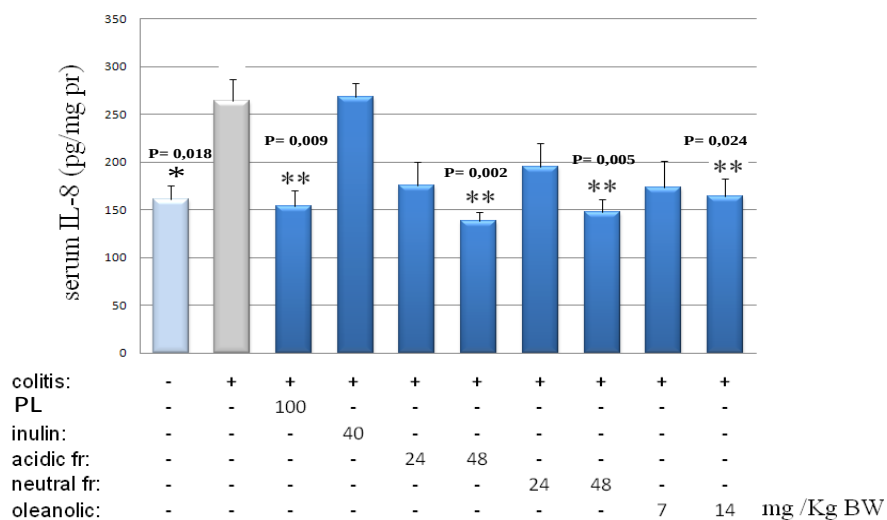
Σχήμα 3. Επίπεδα IL-8 στον ιστό εντέρου, σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Στο παρόν πείραμα βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα IL-8 στον εντερικό ιστό ($p < 0,05$) στις ομάδες της μαστίχας (ομάδα Γ) και του ουδέτερου κλάσματος (ομάδες Z, H) καθώς και του όξινου και του ολεανολικού οξέος σε δόσεις διπλάσιες από αυτές που αντιστοιχούν στα 100mg μαστίχας (48mg/Kg ΣΒ και 14mg/Kg ΣΒ αντίστοιχα, ομάδες Στ, I (**)). Και πάλι καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας

B και Δ ($p=1,000$) στα επίπεδα IL-8 στον εντερικό ιστό στην οποία χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη. Επίσης, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρξαν και μεταξύ της ομάδας B και E όπου χορηγήθηκε χαμηλή δόση όξινου κλάσματος ($p=0,407$) αλλά και μεταξύ B και Θ όπου χορηγήθηκε χαμηλή δόση ολεανολικού οξέως ($p=0,901$). Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της IL-8 στον ορό των πειραματοζώων και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με την ομάδα B (χημική κολίτιδα).

Ομάδα	IL-8	p-value
A	160,89 ± 14,57	0,018
B	264,51 ± 22,59	-
Γ	154,23 ± 16,35	0,009
Δ	268,37 ± 14,64	1,000
E	175,98 ± 24,06	0,071
Στ	138,25 ± 9,30	0,002
Z	195,15 ± 24,92	0,295
H	147,68 ± 13,61	0,005
Θ	173,11 ± 28,21	0,056
I	163,78 ± 18,77	0,024

Πίνακας 3. Επίπεδα IL-8 στον ορό (Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα).



Σχήμα 4. Επίπεδα IL-8 στον ορό, σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Στον ορό των πειραματοζώων βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα IL-8 στις ομάδες που έλαβαν μαστίχα (ομάδα Γ) και διπλάσιες δόσεις όξινου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ, ομάδα Στ), ουδέτερου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ, ομάδα Η) και ολεανολικού οξέως (14mg/Kg ΣΒ αντίστοιχα, ομάδα Ι) (**). Και πάλι καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας Β και Δ ($p=1,000$) στα επίπεδα IL-8 στον ορό στην οποία χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη. Επίσης, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρξαν και μεταξύ της ομάδας Β και Ε (χαμηλή δόση όξινου κλάσματος, $p=0,071$), μεταξύ Β και Ζ (χαμηλή δόση ουδέτερου κλάσματος, $p=0,295$) αλλά και μεταξύ της ομάδας Β και Θ (χαμηλή δόση ολεανολικού οξέως, $p=0,056$).

Η σημασία της μείωσης της IL-8 τόσο στον ιστό όσο και ορό των πειραματοζώων είναι μεγάλη καθώς αυτή προκαλεί σε μεγάλο βαθμό συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων. Τα αυξημένα επίπεδά της στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΝΕ προσελκύουν ουδετερόφιλα από την κυκλοφορία στο φλεγμαίνοντα ιστό. Επομένως, η αναστολή της παραγωγής IL-8 πιστεύεται ότι μπορεί να αποτελέσει μια καινούρια προσέγγιση στη θεραπεία της ΙΦΝΕ.

7.4.3 Επίπεδα MDA στον ιστό εντέρου και στον ορό των πειραματοζώων

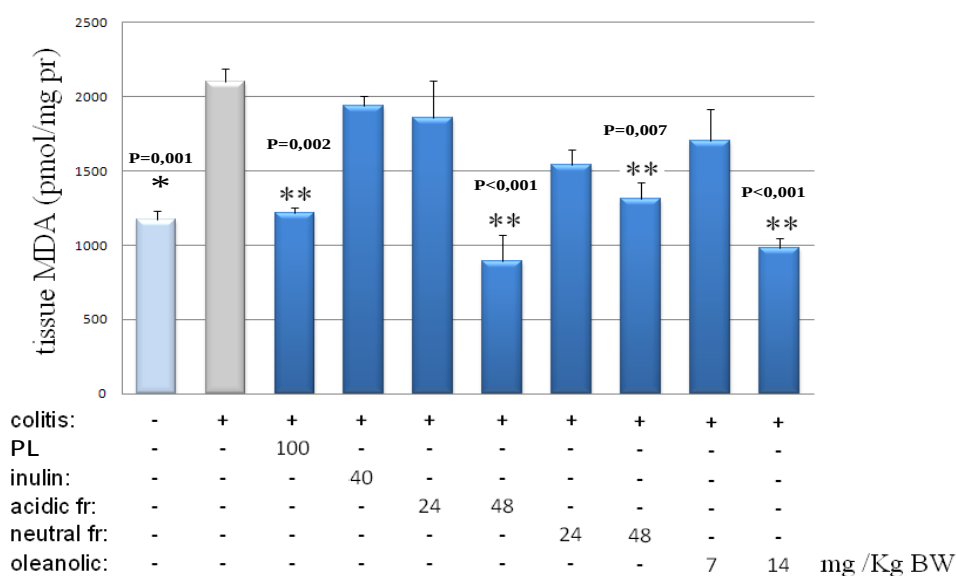
Στα ΙΦΝΕ παρατηρείται διήθηση του εντερικού ιστού από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα έχουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση και αναδόμηση του τραυματισμένου ιστού και επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) σε αυτόν. Οι ελεύθερες ρίζες συμπεριλαμβάνοντας τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και νιτρικού οξέος επάγουν την κυτταρική βλάβη όπως την υπεροξειδωτική των μεμβρανικών λιπιδίων και τη βλάβη του DNA. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τα άτομα με ΙΦΝΕ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ROS στον κολονικό ιστό (Shanahan et al, 2001). Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους φλεγμαίνοντες ιστούς, μετρείται η υπεροξειδωτική των λιπιδίων και η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για την αξιολόγηση των υπεροξειδωμένων λιπιδίων στη νόσο Crohn χρησιμοποιείται ως δείκτης η μαλοναλδεΰδη (MDA) (Kruidenier et al, 2003). Από άλλες μελέτες σε πειραματόζωα αλλά και κλινικές μελέτες φαίνεται ότι τα επίπεδα MDA είναι αυξημένα στο έντερο ασθενών με ΙΦΝΕ ενώ παράλληλα τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η SOD είναι μειωμένα (Girgin et al, 2000; Verspaget et al 1988). Τα αυξημένα επίπεδα ROS επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών με αποτέλεσμα ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και

αντιοξειδωτικών παραγόντων. Με αυτό τον τρόπο η φλεγμονή πυροδοτείται συνεχώς δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο.

Στο παρόν πείραμα, μετρήθηκαν τα επίπεδα της MDA για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της MDA, στον ιστό των πειραματοζώων και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με την ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

Ομάδα	MDA	p-value
A	1173,09 ± 58,15	0,001
B	2103,67 ± 86,42	-
Γ	1219,63 ± 34,04	0,002
Δ	1940,55 ± 63,22	0,997
Ε	1854,06 ± 256,92	0,951
Στ	890,29 ± 179,69	<0,001
Z	1541,10 ± 101,15	0,139
H	1312,33 ± 112,44	0,007
Θ	1701,80 ± 214,41	0,556
I	987,57 ± 68,69	<0,001

Πίνακας 4. Επίπεδα MDA στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα)



Σχήμα 5. Επίπεδα MDA στον ιστό, σύγκριση μεταξύ των ομάδων

Τα επίπεδά της MDA βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ($p < 0,05$) στις ομάδες που έλαβαν μαστίχα (ομάδα Γ) και διπλάσιες δόσεις όξινου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ, ομάδα Στ), ουδέτερου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ, ομάδα Η) και ολεανολικού οξέως (14mg/Kg ΣΒ αντίστοιχα, ομάδα Ι) (**). Και πάλι καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας Β και Δ ($p = 0,997$) στα επίπεδα MDA στον εντερικό ιστό στην οποία χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη. Επίσης, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρξαν και μεταξύ της ομάδας Β και Ε (χαμηλή δόση όξινου κλάσματος, $p = 0,951$), μεταξύ Β και Ζ (χαμηλή δόση ουδέτερου κλάσματος, $p = 0,139$) αλλά και μεταξύ της ομάδας Β και Θ (χαμηλή δόση ολεανολικού οξέως, $p = 0,556$). Τα επίπεδά της MDA στον ορό των πειραματοζώων δεν ανιχνεύθηκαν.

Το γεγονός ότι η μαστίχα επέφερε μείωση στα επίπεδα της MDA στον εντερικό ιστό των πειραματοζώων άρα στην υπεροξείδωση λιπιδίων, δίνει ενδείξεις ότι η δραστηριότητά της ως εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών είναι ο πιθανός μηχανισμός δράσης της. Άλλωστε, η αντιοξειδωτική δράση της μαστίχας έχει δείχθει και σε προηγούμενες μελέτες όπου ανέστειλε την οξείδωση της LDL (Andrikopoulos et al, 2003), μείωσε την κυτταροτοξικότητα οφειλόμενη σε οξειδωμένη LDL σε μονοκύτταρα (Dedoussis et al, 2004) και μείωσε *in vivo* την υπεροξείδωση λιπιδίων σε ασθενείς με ενεργό νόσο Crohn (Kaliora et al, 2007a, Kaliora et al, 2007b). Οι αντιοξειδωτικές δράσεις της μαστίχας αποδίδονται στο υψηλό περιεχόμενό της περισσότερο σε τερπένια και λιγότερο σε πολυφαινόλες. Στην κλινική μελέτη τους οι Kaliora et al (2007a) δείχνουν ότι η πρόσληψη μαστίχας είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAP). Το πλάσμα αποτελεί ένα ετερογενές μίγμα αντιοξειδωτικών. Επομένως, η αύξηση της TAP προϋποθέτει ότι τα αντιοξειδωτικά της μαστίχας απορροφώνται σε ικανοποιητικό βαθμό με αποτέλεσμα βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση *in vivo*. Το κατά πόσο απορροφώνται τα τριτερπένια και οι πολυφαινόλες της μαστίχας ή δρουν απευθείας στον εκτιθέμενο εντερικό ιστό παραμένει άγνωστο. Οι γνώσεις μας για την απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων είναι περιορισμένες και οι λίγες μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι κάποιες απορροφώνται ικανοποιητικά ενώ άλλες ελάχιστα (Manach et al, 2005). Αυτές που απορροφώνται σε μικρό βαθμό είναι πιθανότερο η συγκέντρωσή τους να είναι υψηλότερη στον αυλό του εντέρου παρά στο πλάσμα ή σε άλλους ιστούς. Έτσι, είναι πιθανότερο να δρουν απευθείας στο γαστρεντερικό σωλήνα. Ακόμη λιγότερο γνωστή είναι η απορρόφηση των τριτερπενίων. Για παράδειγμα, το γλυκιρρετινικό οξύ, το δραστικό τριτερπένιο της γλυκυρριζίνης, φαίνεται πως είναι δραστικό σε πειραματικό μοντέλο

γαστρικών αλλοιώσεων (Yano et al, 1989) αλλά έχει επίσης ανιχνευθεί και στον ορό των πειραματοζώων (Hou et al, 2005). Τα παραπάνω δείχνουν ότι δεν είναι ξεκάθαρο αν η μαστίχα έχει αντιοξειδωτική δράση λόγω των τερπενίων ή λόγω των πολυφαινολών της αν και οι Kaliora et al (2004) έδειξαν ότι περιέχει φαινολικά συστατικά με γνωστή δράση κατά των ελευθέρων ριζών.

7.5 Η επίδραση της ινουλίνης στην TNBS κολίτιδα

Στο παρόν πείραμα δοκιμάστηκε επίσης και η επίδραση της ινουλίνης στην ποσότητα που αναλογούσε στο μίγμα μαστίχας/ ινουλίνης (6:4). Πρόκειται για έναν πρεβιοτικό υδατάνθρακα που συναντάμε σε πολλά φρούτα και λαχανικά οποίος δεν υπόκειται πέψη από τα ένζυμα του εντέρου και του παγκρέατος με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμος στο έντερο για ζύμωση από τα βακτήρια του εντέρου. Η ινουλίνη έχει θεραπευτικές ιδιότητες στα ΙΦΝΕ. Σε 3 κλινικές μελέτες με ασθενείς με ενεργό ΙΦΝΕ χορηγήθηκε ινουλίνη για 2-3 εβδομάδες και παρατηρήθηκε κάποιου βαθμού βελτίωση της κλινικής εικόνας της νόσου. Πρόκειται βέβαια για μελέτες με μικρό αριθμό ατόμων και μικρό διάστημα παρέμβασης (Casellas et al, 2007; Lindsay et al, 2006; Welters et al, 2002). Πρεβιοτικά τύπου ινουλίνης έχουν δείξει θεραπευτικές δράσεις και σε πειραματικά μοντέλα χημικής κολίτιδας (Leenen and Dieleman, 2007). Οι Ito et al (2009) έδειξαν ότι μικρής αλύσου φρουκτάνες παρόμοιες με την ινουλίνη σε δόση 60g/Kg ΣΒ για 7 μέρες ασκούν προφυλακτική δράση σε TNBS κολίτιδα πιθανώς αναστέλλοντας την αλλόθεση ενδοτοξινών και βακτηρίων στο έντερο. Επομένως, στο παρόν πείραμα χορηγήθηκε ινουλίνη ξεχωριστά στους επίμυες για να διασφαλιστεί ότι η ενδεχόμενη βελτίωση της φλεγμονής θα οφείλεται μόνο στη μαστίχα και όχι στην ινουλίνη. Πράγματι, η ομάδα που έλαβε μόνο ινουλίνη δεν είχε βελτίωση σε κανέναν από τους δείκτες φλεγμονής. Άλλωστε στην παρούσα μελέτη αφενός δόθηκε σε ποσότητα 40mg/Kg, σχετικά μικρή για να εμφανίζει κάποια δράση συγκριτικά με τη μελέτη των Ito et al, αφετέρου δόθηκε κατόπιν της επαγωγής της νόσου, θεραπευτικά και όχι ως μέτρο προφύλαξης από αυτή.

Σε συμφωνία με τα παρόντα ευρήματα έρχονται και άλλες μελέτες που έδειξαν μείωση σε δείκτες φλεγμονής από άλλα φυσικά προϊόντα ή συστατικά αυτών σε ζωικά μοντέλα TNBS πειραματικής κολίτιδας. Σε κάποιες από αυτές δεν έχει διερευνηθεί το δραστικό συστατικό του φυτού και πιθανώς πρόκειται για συνεργιστική δράση. Μείωση της MDA και της IL-6 παρατηρήθηκε από χορήγηση εκχυλίσματος *Ginkgo Biloba* για 4 εβδομάδες (Zhou et al, 2006) και *Hypericum perforatum* (Dost et al, 2008). Αιθέρια έλαια από ρίγανη (*Origanum*

vulgare L.) και θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.) σε συστηματική χορήγηση επέφεραν μείωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και σε μεταγραφικό επίπεδο (Dundar et al, 2008; Bukovska et al, 2007). Επίσης, οι Sun et al (2008) έδειξαν ότι το παραδοσιακό κινέζικο βότανο Si-Ni-San καθώς και το δραστικό συστατικό του, η γλυκυριζίνη, μείωσαν τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών αλλά το ολικό βότανο είχε μεγαλύτερη δραστηριότητα, κάτι που παρατηρήθηκε και για τη μαστίχα και το υπό διερεύνηση δραστικό συστατικό της, ολεανολικό οξύ. Άλλες μελέτες έδειξαν μείωση στη φλεγμονή της TNBS κολίτιδας χορηγώντας συγκεκριμένα δραστικά συστατικά. Η βορνεόλη, συστατικό του αιθέριου ελαίου του φυτού *Salvia officinalis*, σε 5 μέρες μείωσε την έκκριση IL-6 και IL-1 (Juhas et al, 2008) καθώς και το αιθέριο έλαιο της μαύρης κουμίνης (*Nigella sativa*) σε 3 μέρες (Isik et al, 2010). Η κροκετίνη, ένα καροτενοειδές, σε δόση 50mg/kg ΣΒ ανά ημέρα για 8 ημέρες μείωσε την παραγωγή MDA, γεγονός που μεσολαβήθηκε από τη μείωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Kazi et al, 2009). Το ίδιο παρατήρησαν και οι Lubbad et al (2009) μετά από χορήγηση διαλύματος κουρκουμίνης, μιας πολυφαινόλης προερχόμενης από το φυτό *Curcuma longa*, σε δόση 100 mg/kg ΣΒ ανά ημέρα για 8 ημέρες. Η μεσολάβηση του NF-κΒ επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες με άλλα δραστικά συστατικά όπως: η ρεσβερατρόλη (Martin et al, 2006), οι α- και β- αμυρίνη (Vitor et al, 2009), η επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλικού (Abboud et al, 2007).

7.6 Δοκιμή σε καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων εντέρου HT29

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν και *in vitro* πειράματα όπου δοκιμάστηκαν αιθανολικά εκχυλίσματα μαστίχας είτε κλασμάτων είτε συστατικών αυτής σε ανθρώπινη καρκινική σειρά επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29. Έπειτα τα κύτταρα διεγέρθηκαν με TNF-α. Για τις συγκρίσεις, δημιουργήθηκε και ένα θετικό δείγμα ελέγχου (όχι μαστίχα ή συστατικά της, διέγερση με TNF-α) και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου (όχι μαστίχα ή συστατικά της, όχι διέγερση με TNF-α). Στον πίνακα 5 δίνονται αναλυτικά οι κυτταρικές καλλιέργειες των HT29 και οι δόσεις των εκχυλισμάτων, κλασμάτων και συστατικών που δοκιμάστηκαν.

Ομάδες ελέγχου	Όξινο κλάσμα	Ουδέτερο κλάσμα	Ολική μαστίχα	Ολεανολικό οξύ
Θετικό control (διέγερση με 50 ng/mL TNF-α)	2 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL	0,6 ng/mL
	4 ng/mL	4 ng/mL	10 ng/mL	1,2 ng/mL
Αρνητικό control (όχι διέγερση με TNF-α)	8 ng/mL	8 ng/mL	20 ng/mL	2,4 ng/mL
	16 ng/mL	16 ng/mL	40 ng/mL	4,8 ng/mL
	32 ng/mL	32 ng/mL	80 ng/mL	9,6 ng/mL
	60 ng/mL	60 ng/mL	150 ng/mL	18 ng/mL

Πίνακας 5. Πειραματικές ομάδες καλλιέργειας κυττάρων HT29.

7.7 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και κυτταροτοξικότητας σε καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων εντέρου HT29

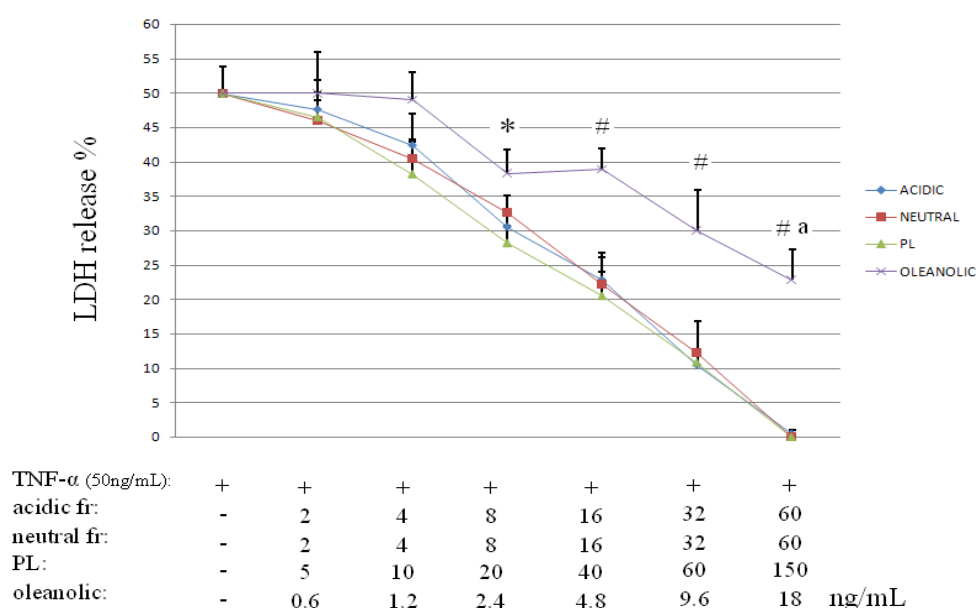
Για την αξιολόγηση της φλεγμονής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα IL-8, του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ καθώς και της LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν. Παρουσιάζονται τα επίπεδα τους στα κύτταρα και η σύγκριση μεταξύ κάθε δείγματος με το θετικό δείγμα ελέγχου.

7.7.1 Επίπεδα LDH σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29

Δείγμα	LDH	p-value
Θετικό control	50,00 ± 4,00	-
Όξινο κλάσμα 2ng/mL	47,50 ± 2,50	1,000
Όξινο κλάσμα 4ng/mL	42,50 ± 0,50	0,997
Όξινο κλάσμα 8ng/mL	30,50 ± 2,50	0,084
Όξινο κλάσμα 16ng/mL	23,00 ± 4,00	0,003
Όξινο κλάσμα 32ng/mL	10,00 ± 2,00	<0,001
Όξινο κλάσμα 60ng/mL	0,50 ± 0,50	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 2ng/mL	46,00 ± 3,00	1,000
Ουδέτερο κλάσμα 4ng/mL	40,50 ± 6,50	0,958
Ουδέτερο κλάσμα 8ng/mL	32,50 ± 2,50	0,180
Ουδέτερο κλάσμα 16ng/ mL	22,00 ± 4,00	0,002
Ουδέτερο κλάσμα 22ng/mL	12,50 ± 4,50	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 60ng/mL	0,00 ± 0,00	<0,001
Ολική μαστίχα 5ng/mL	46,50 ± 5,50	1,000
Ολική μαστίχα 10ng/mL	38,50 ± 0,50	0,817
Ολική μαστίχα 20ng/mL	28,50 ± 2,50	0,036
Ολική μαστίχα 40ng/mL	20,50 ± 3,50	0,001
Ολική μαστίχα 80ng/mL	11,00 ± 1,00	<0,001

Ολική μαστίχα 150ng/mL	0,00 ± 0,00	<0,001
Ολεανολικό οξύ 0,6 ng/mL	50,00 ± 6,00	1,000
Ολεανολικό οξύ 1,2 ng/mL	49,00 ± 4,00	1,000
Ολεανολικό οξύ 2,4ng/mL	38,50 ± 3,50	0,817
Ολεανολικό οξύ 4,8 ng/mL	39,00 ± 3,00	0,864
Ολεανολικό οξύ 9,6 ng/mL	30,00 ± 6,00	0,068
Ολεανολικό οξύ 18 ng/mL	22,50 ± 4,50	0,002

Πίνακας 6. Επίπεδα LDH στα κύτταρα HT29 (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα). Σύγκριση με ομάδα 1.



Σχήμα 6. Επίπεδα LDH στα κύτταρα HT29. Σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Επεξήγηση συμβόλων: στατιστικά σημαντική διαφορά με το θετικό control

*: μόνο η μαστίχα, #: όλα εκτός από το ολεανολικό οξύ, #a: όλα

Στο θετικό δείγμα ελέγχου παρατηρείται 50% κυτταροτοξικότητα. Δηλαδή παρουσία του παράγοντα TNF-α τα αποπτωτικά κύτταρα φτάνουν στο 50%. Αυτό σημαίνει ότι η φλεγμονώδης διέγερση των κυττάρων ήταν επιτυχής και προσομοιάζει στην κατάσταση φλεγμονής στον εντερικό ιστό ασθενών με ΙΦΝΕ. Το ίδιο παρατηρείται και για τους δείκτες IL-8, όσο και της NF-κBp65 συγκρίνοντας το θετικό με το αρνητικό δείγμα ελέγχου. Στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταροτοξικότητας παρατηρήθηκε από την προσθήκη όξινου κλάσματος μαστίχας σε δόσεις 16, 32 και 60 ng/ml και όχι από τις χαμηλές δόσεις των 2, 4 και 8 ng/ml ($p=1,000$, $p=0,997$, $p=0,084$ αντίστοιχα). Από την προσθήκη ουδέτερου κλάσματος παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε δόσεις 16, 32 και 60 ng/ml και όχι από τις χαμηλές δόσεις των 2, 4 και 8 ng/ml ($p=1,000$, $p=0,958$, $p=0,180$ αντίστοιχα). Η

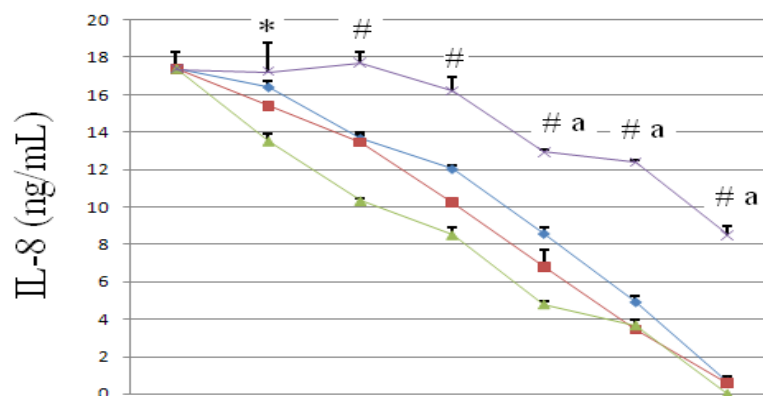
μαστίχα επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση σε δόσεις 20, 40, 80, 150 ng/ml, και όχι σε δόση των 5 και 10 ng/ml ($p=1,000$, $p=0,817$ αντίστοιχα). Τέλος, το ολεανολικό οξύ μείωσε την κυτταροτοξικότητα μόνο στη δόση των 18 ng/ml και σε μικρότερες δόσεις 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 9,6 ng/ml ($p=1,000$, $p=1,000$, $p=0,817$, $p=0,864$, $p=0,068$ αντίστοιχα). Επώαση των κυττάρων με μαστίχα ή συστατικά μειώνει δοσοεξαρτώμενα την απελευθέρωση LDH.

7.7.2 Επίπεδα IL-8 σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29

Στον πίνακα 7 δίνονται τα επίπεδα NF-κΒ που ρυθμίζει την έκφρασή της IL-8 (ουσιαστικά μετράμε την πρωτεΐνη NF-κΒp65) και η σύγκρισή τους με το θετικό δείγμα ελέγχου.

Δείγμα	IL-8	p-value
Αρνητικό control	0,00 ± 0,00	<0,001
Θετικό control	17,38 ± 0,91	-
Όξινο κλάσμα 2ng/mL	16,40 ± 0,31	0,999
Όξινο κλάσμα 4ng/mL	13,65 ± 0,36	0,003
Όξινο κλάσμα 8ng/mL	12,02 ± 0,19	<0,001
Όξινο κλάσμα 16ng/mL	8,56 ± 0,37	<0,001
Όξινο κλάσμα 32ng/mL	4,90 ± 0,33	<0,001
Όξινο κλάσμα 60ng/mL	0,64 ± 0,27	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 2ng/mL	15,39 ± 0,24	0,512
Ουδέτερο κλάσμα 4ng/mL	13,46 ± 0,37	0,002
Ουδέτερο κλάσμα 8ng/mL	10,23 ± 0,10	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 16ng/ mL	6,80 ± 0,90	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 22ng/mL	3,43 ± 0,18	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 60ng/mL	0,56 ± 0,17	<0,001
Ολική μαστίχα 5ng/mL	13,51 ± 0,41	0,002
Ολική μαστίχα 10ng/mL	10,31 ± 0,15	<0,001
Ολική μαστίχα 20ng/mL	8,49 ± 0,42	<0,001
Ολική μαστίχα 40ng/mL	4,78 ± 0,17	<0,001
Ολική μαστίχα 80ng/mL	3,66 ± 0,28	<0,001
Ολική μαστίχα 150ng/mL	0,00 ± 0,00	<0,001
Ολεανολικό οξύ 0,6 ng/mL	17,23 ± 1,58	1,000
Ολεανολικό οξύ 1,2 ng/mL	17,70 ± 0,56	1,000
Ολεανολικό οξύ 2,4ng/mL	16,19 ± 0,73	0,989
Ολεανολικό οξύ 4,8 ng/mL	12,94 ± 0,00	<0,001
Ολεανολικό οξύ 9,6 ng/mL	12,39 ± 0,12	<0,001
Ολεανολικό οξύ 18 ng/mL	8,48 ± 0,50	<0,001

Πίνακας 7. Επίπεδα IL-8 στα κύτταρα HT29 (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα).



TNF- α (50ng/mL):	+	+	+	+	+	+	+
acidic fr:	-	2	4	8	16	32	60
neutral fr:	-	2	4	8	16	32	60
PL:	-	5	10	20	40	60	150
oleanolic:	-	0.6	1.2	2.4	4.8	9.6	18

Σχήμα 7. Επίπεδα IL-8 στα κύτταρα HT29. Σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Επεξήγηση συμβόλων: στατιστικά σημαντική διαφορά με το θετικό control

*: μόνο η μαστίχα, #: όλα εκτός από το ολεανολικό οξύ, #a: όλα

Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της IL-8 σε όλα τα δείγματα κυττάρων όπου προστέθηκε μαστίχα ή συστατικά αυτής σε σύγκριση με το θετικό δείγμα ελέγχου. Εξαίρεση αποτέλεσαν η χαμηλή δόση όξινου κλάσματος ($p=0,999$), η χαμηλή δόση ουδέτερου κλάσματος ($p=0,512$), και οι 3 χαμηλότερες δόσεις ολεανολικού οξέως ($p=1,000$, $p=1,000$, $p=0,989$ αντίστοιχα). Δηλαδή το ολεανολικό οξύ ήταν δραστικό στη μείωση της φλεγμονής μόνο σε μεγάλες δόσεις. Σημειωτέο ότι η μαστίχα μείωσε τα επίπεδα της IL-8 σε όλες τις δόσεις.

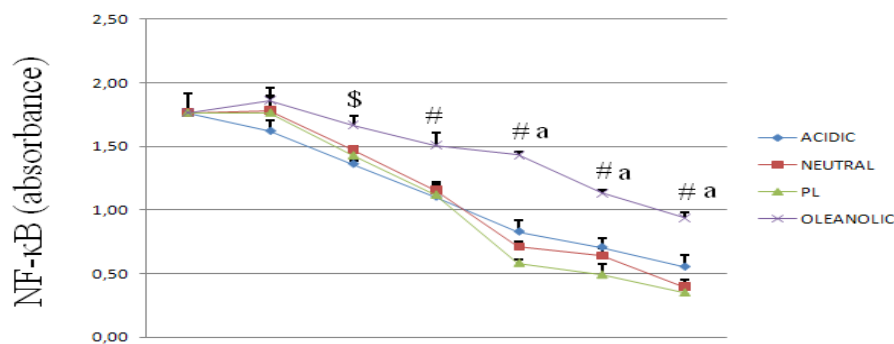
7.7.3 Επίπεδα NF- κ B σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου HT29

Στον πίνακα 8 δίνονται τα επίπεδα NF- κ B που ρυθμίζει την έκφραση της IL-8 (ουσιαστικά μετράμε την πρόδρομη πρωτεΐνη NF- κ Bp65) και η σύγκρισή τους με το θετικό δείγμα ελέγχου.

Δείγμα	NF- κ B	p-value
Αρνητικό control	0,183 $\pm$ 0,00	<0,001
Θετικό control	1,765 $\pm$ 0,00	-
Όξινο κλάσμα 2ng/mL	1,621 $\pm$ 0,00	0,964
Όξινο κλάσμα 4ng/mL	1,362 $\pm$ 0,00	0,004

Όξινο κλάσμα 8ng/mL	1,104 ± 0,00	<0,001
Όξινο κλάσμα 16ng/mL	0,831 ± 0,00	<0,001
Όξινο κλάσμα 32ng/mL	0,708 ± 0,00	<0,001
Όξινο κλάσμα 60ng/mL	0,555 ± 0,00	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 2ng/mL	1,782 ± 0,00	1,000
Ουδέτερο κλάσμα 4ng/mL	1,471 ± 0,00	0,092
Ουδέτερο κλάσμα 8ng/mL	1,158 ± 0,00	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 16ng/ mL	0,712 ± 0,00	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 22ng/mL	0,641 ± 0,00	<0,001
Ουδέτερο κλάσμα 60ng/mL	0,397 ± 0,00	<0,001
Ολική μαστίχα 5ng/mL	1,765 ± 0,00	1,000
Ολική μαστίχα 10ng/mL	1,429 ± 0,00	0,029
Ολική μαστίχα 20ng/mL	1,121 ± 0,00	<0,001
Ολική μαστίχα 40ng/mL	0,585 ± 0,00	<0,001
Ολική μαστίχα 80ng/mL	0,494 ± 0,00	<0,001
Ολική μαστίχα 150ng/mL	0,353 ± 0,00	<0,001
Ολεανολικό οξύ 0,6 ng/mL	1,863 ± 0,00	1,000
Ολεανολικό οξύ 1,2 ng/mL	1,666 ± 0,00	1,000
Ολεανολικό οξύ 2,4ng/mL	1,509 ± 0,00	0,235
Ολεανολικό οξύ 4,8 ng/mL	1,432 ± 0,00	0,031
Ολεανολικό οξύ 9,6 ng/mL	1,134± 0,00	<0,001
Ολεανολικό οξύ 18 ng/mL	0,939 ± 0,00	<0,001

Πίνακας 8. Επίπεδα NF-κΒ στα κύτταρα HT29 (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα).



TNF-α (50ng/mL):	+	+	+	+	+	+	+
acidic fr:	-	2	4	8	16	32	60
neutral fr:	-	2	4	8	16	32	60
PL:	-	5	10	20	40	60	150
oleanolic:	-	0.6	1.2	2.4	4.8	9.6	18
							ng/mL

Σχήμα 8. Επίπεδα NF-κΒ στα κύτταρα HT29. Σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

Επεξήγηση συμβόλων: στατιστικά σημαντική διαφορά με το θετικό control

*: μόνο η μαστίχα, \$: όλα εκτός από το ολεανολικό οξύ και το ουδέτερο κλάσμα

#: όλα εκτός από το ολεανολικό οξύ, #a: όλα

Στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε μεταξύ του αρνητικού δείγματος ελέγχου και του θετικού δείγματος ελέγχου ($p < 0,001$). Αυτό υποδηλώνει ότι στα κύτταρα που προστέθηκε παράγοντας φλεγμονής, υπήρξε ενεργοποίηση και παραγωγή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ ο οποίος συμμετέχει στο μονοπάτι της φλεγμονής. Αντίθετα, στα υγιή κύτταρα δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Στατιστικά σημαντική μείωση του NF-κΒ παρατηρήθηκε από την προσθήκη όξινου κλάσματος μαστίχας σε δόσεις 4,8, 16, 32 και 60 ng/ml και όχι για τη χαμηλή δόση των 2 ng/ml ($p = 0,964$). Για το ουδέτερο κλάσμα, μείωση παρατηρήθηκε στις δόσεις 8, 16, 32 και 60 ng/ml και όχι για τις χαμηλές δόσεις των 2 ng/ml ($p = 1,000$) και 4 ng/ml ($p = 0,092$). Η μαστίχα επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση σε δόσεις 10, 20, 40, 80, 150 ng/ml, εκτός δηλαδή από τη δόση των 5 ng/ml ($p = 1,000$). Τέλος, το ολεανολικό οξύ επέφερε μείωση στις δόσεις των 4,8, 9,6 και 18 ng/ml και όχι στις δόσεις 0,6, 1,2, 2,4 ng/ml ($p = 1,000$, $p = 1,000$, $p = 0,235$ αντίστοιχα).

Ακόμη, η μαστίχα έχει δοκιμαστεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της. Σε μια *in vitro* μελέτη το ουδέτερο κλάσμα της και η τιρουκαλλόλη (πολυφαινόλη της μαστίχας) ανέστειλαν σημαντικά την έκφραση VCAM-1 και ICAM-1 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής διεγερμένα με TNF- α , γεγονός που επιβεβαιώνει την αντιαθηρωματική δράση της (Loisou et al, 2009). Ακόμη, το υδατικό εκχύλισμα της μαστίχας ανέστειλε την υπεροξειδωση λιπιδίων προκαλούμενη από ιόντα σιδήρου σε ηπατικά ομοιογενοποιημένα αρουραίων (Ljubuncic et al, 2005a). Στο παρόν πείραμα η μαστίχα για πρώτη φορά δοκιμάστηκε στην κυτταρική σειρά HT29. Και άλλα φυτικά προϊόντα ή συστατικά αυτών έχουν στο παρελθόν δοκιμαστεί στην εν λόγω κυτταρική σειρά με αντίστοιχα αποτελέσματα. Η μολουγκίνη, το δραστικό συστατικό του φυτού *Rubia cordifolia*, που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην κινέζικη ιατρική, μείωσε μεταξύ άλλων την IL-8 η οποία παράχθηκε μετά από διέγερση των κυττάρων με TNF- α , όπως και στο παρόν πείραμα. Μάλιστα αυτό μεσολαβήθηκε από τη μείωση του NF-κΒ (Kim et al, 2009). Ακόμη, το εκχύλισμα *Ling Zhi* το οποίο προέρχεται επίσης από ένα κινέζικο βότανο (*Ganoderma lucidum*), μείωσε την παραγωγή IL-8 σε δόσεις 500 και 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hong et al, 2004). Τέλος, αντιφλεγμονώδη δράση στα HT29 έχουν δείξει και ανθοκυανιδίνες από μαύρη σόγια σε άλλους δείκτες φλεγμονής (Kim et al, 2008).

7.9 Συμπεράσματα

Συνολικά τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με την κλινική μελέτη των Kaliora et al (2007), οι οποίοι παρατήρησαν μείωση των CDAI, IL-6 και CRP στο πλάσμα ασθενών με ήπια έως μέτρια ενεργή νόσο του Crohn, που λάμβαναν κάψουλες μαστίχας για 4 εβδομάδες. Επίσης, τόσο τα *in vivo* όσο και τα *in vitro* πειράματα δεν έδωσαν ενδείξεις για το ποιο κλάσμα της μαστίχας ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της φλεγμονής. Ακόμη, δεν επιβεβαιώθηκε πως το ολεανολικό οξύ είναι το δραστικό συστατικό της μαστίχας, παρότι αποτελεί το 30% του όξινου κλάσματος. Αντιθέτως, σε κάποιους δείκτες φάνηκε πως η επίδρασή του ήταν εμφανής όταν χορηγήθηκε σε μεγάλες δόσεις συγκριτικά με την αντίστοιχη περιεκτικότητά του στην χορηγούμενη δόση μαστίχας (100mg/kg). Επίσης, η επίδραση της μαστίχας στη μείωση κάποιων δεικτών φλεγμονής ήταν εμφανής ακόμη και σε μικρές δόσεις. Ακόμη, από τα *in vitro* πειράματα συμπεραίνεται πως ο μηχανισμός δράσης της μαστίχας στη μείωση των δεικτών φλεγμονής περιλαμβάνει την αλλαγή στην έκφραση γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από τον NF-κΒ. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως το σύνολο των επιμέρους συστατικών της μαστίχας συμβάλλει στην αντιφλεγμονώδη δράση της, ίσως δηλαδή ασκούν συνεργιστική δράση. Επίσης, τα έως τώρα δεδομένα δίνουν ενδείξεις για την ανάδειξη της μαστίχας ως ενός φυσικού προϊόντος με διατροφοφαρμακευτικές δράσεις. Τέλος, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή περεταίρω μελετών όπου θα δοκιμάζονται περισσότερα συστατικά της μαστίχας, τερπένια ή πολυφαινόλες για την αντιφλεγμονώδη δράση τους στα ΙΦΝΕ. Η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών προϊόντων αποτελεί μια ελκυστική και μη τοξική εναλλακτική για την αντιμετώπιση της φλεγμονής. Η ανάγκη για κάτι τέτοιο προκύπτει αν αναλογιστούμε αφενός τη χαμηλή συμμόρφωση στη φαρμακευτική θεραπεία της νόσου, αφετέρου τις παρενέργειες που εμφανίζονται π.χ. η εξασθένηση του ανοσοποιητικού λόγω της χρήσης ισχυρών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abboud PA, Hake PW, Burroughs TJ et al. Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. *Eur J Pharmacol.* 2008; 28:579:411-7.
- Abdalla A.E., Roozen J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem*, 1999; 64: 323-29.
- Aeschbach R., Loliger J., Scott B.C. et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*, 1994; 32: 31–36.
- Aksoy A., Duran N., Toroglu S. et al. Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients. *Angle Orthod*, 2007; 77: 124-28.
- Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1984; 11: 541–4.
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. *J Agric Food Chem*, 2001 Feb; 49:811-5.
- Al-Said MS, Ageel AM, Parmar NS et al. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol* 1986; 15:271-8.
- Andersson RE, Olaison G, Tysk C et al. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 2001; 344:808-14.
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN et al. Biological activity of saliva against in vitro LDL oxidation after chewing commercial chewing gums. *Int J Food Sci.* n. 3, vol. 14-2002.
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN et al. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytotherapy Res.* 2003; 17:501-7.
- Assimopoulou A. N. and Papageorgiou V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia Biomed Chromatogr*, 2005; 19: 285–311
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000;6:583–588.
- Baert F.J. and Rutgeerts P.R. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis*, 1999; 14: 47-51.
- Bailey H.H., Attia S., Love R.R., et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Chemother Pharmacol*, 2008; 62: 149-57.
- 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.
- Bebb, J. R., Bailey-Flitter N., Ala Aldeen D. et al. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52:522–523.
- Belluzzi A. Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004; 8(5):225-9.
- Bona Serafino G, Letizia Bono, Laura Daghetta et al. Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* gum mastic against *Helicobacter pylori* *Am J Gastroenterol*, 2001, Vol.96, 9, p.S49.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3:521-33.
- Bruneton, J. (1999). “Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants,” 2nd ed. Lavoisier Publishing, Paris.
- Bukovská A., Cikos S., Juhás S., et al. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators Inflamm*, 2007; 2007: 23296
- Burke YD, Stark MJ, Roach SL et al. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*, 1997; 32:151-6.
- Casellas F, Borruel N, Torrejón A, et al. Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:1061-1067.
- Cecil. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Στο: Παθολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας 5η έκδοση, 2003: 420-25.
- Cepinskas G., Savickiene J. et al. “PMN transendothelial migration decreases Nuclear NFkappaB in IL-1 beta activated endothelial cells: role of PECAM-1. *J Cell Biol* 2003; 161: 641-51.
- Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *J Sci Food Agric*. 2010; 15; 90:870-6.
- Chapman-Kiddell Christine A., Davies Peter S.W., Gillen Lynda et al. Radford-Smith. Role of Diet in the Development of Inflammatory Bowel Disease *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:137–151
- Chintharlapalli S, Papineni S, Konopleva M. et al. Safe, 2-Cyano-3, 12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid and related compounds inhibit growth of colon cancer cells through peroxisome proliferator activated receptor gamma-dependent and -independent pathways. *Mol Pharmacol* 2005; 68:119–128.
- Cho IJ, Lee AK, Lee SJ et al. Repression by oxidative stress of iNOS and cytokine gene induction in macrophages results from AP-1 and NF-kappaB inhibition mediated by B cell translocation gene-1 activation. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1523-1536.

- Cho, J. Y.; Yoo, E. S.; Cha, B. C. et al. The inhibitory effect of triterpenoid glycosides originating from *Sanguisorba officinalis* on tissue factor activity and the production of TNF- α . *Planta Medica*, 2006; 72:1279-84.
- 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, 4156–4161.
- Cosnes J., Beaugerie L., Carbornnel F. et al. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, 2001; 120:1093-9.
- Crowell PL. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology. *J Nutr*, 1999; 129: 775S–778S.
- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002; 122:867-74.
- Dabos K., Sfika E., Lisa J. et al. Is Chios mastic gum effective in the treatment of functional dyspepsia? A prospective randomized double-blind placebo controlled trial *J Ethnopharmacol*, 2010; 127: 205–209.
- Dabos K.J., Sfika E., Vlatla L.J. et al. The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: A randomized pilot study *Phytomedicine*, 2010; 17: 296–299.
- Daferera D, Pappas C, Tarantilis P.A. et al. Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy *Food Chem*, 2002; 77:511–515.
- Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B et al. Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int J Food Microbiol*, 2004; 1; 94: 313-22.
- Daig, R., Andus, T., Aschenbrenner, E. et al. Increased interleukin-8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1996; 38:216.
- Dang M.N., Takacsova M., Nguyen D.V., et al. Antioxidant activity of essential oils from various spices. *Nahrung*, 2001; 45: 64-6.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1405-13.
- Davis M., Grumbach et al. "Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappa B binding". *J Biol Chem*, 2004, 279: 163-8.
- Deeb D, Gao X, Jiang H et al. Oleanane Triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells by independently targeting pro-survival Akt and mTOR. *Prostate* 2009; 69:851–860.
- Dietrich, D. R. & Swenberg, J. A. et al. The presence of α 2u-globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Res.* 1991; 51: 3512–3517.
- 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.

- Ding Y., Nguyen H.T., Kim S.I., et al. The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of *Rhus sylvestris*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009; 19: 3607-10.
- D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2001;36:1289-94.
- Doi Kenichiro, Wei Min, Kitano Mitsuaki et al. Enhancement of preneoplastic lesion yield by Chios Mastic Gum in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 234: 135–142.
- Dost T, Ozkayran H, Gokalp F et al. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Dig Dis Sci*. 2009;54:1214-21.
- Duan Z, Ames RY, Ryan M et al. CDDO-Me, a synthetic triterpenoid, inhibits expression of IL-6 and Stat3 phosphorylation in multi-drug resistant ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009; 63:681–689.
- Dundar E., Olgun E.G., Isiksoy S., et al. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Exp Toxicol Pathol*, 2008; 59: 399-408.
- Dung N.T., Bajpai V.K., Yoon J.I., et al. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Food Chem Toxicol*, 2009 Feb; 47: 449-53
- Eisner, T., Meinwald Y.C. The defensive secretions of a caterpillar (*Papilio*). *Science*, 1965; 150: 1733-1735.
- Elegbede JA, Maltzman TH, Elson CE et al. Effects of anticarcinogenic monoterpenes on phase II hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis*. 1993 Jun; 14(6):1221-3.
- Elegbede, J. A., Elson, C. E., Tanner, M. A. et al. Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. *J. Natl. Cancer Inst*. 1986a; 76: 323–325.
- Eslick, J.D. *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic and experimental evidence. *World J Gastroenterol*, 2006; 12, 2991–2999.
- Evans JM, McMahon AD, Murray FE et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40:619-22.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS et al. "Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation". *Clin. Exp. Immunol*. 2007; 147: 227–35.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.
- Furtado R.A., Rodrigues E.P., Araújo F.R., et al. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rat colon. *Toxicol Pathol*, 2008; 36: 576-80.
- Gao X, Dee D, Jiang H et al. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Act, NF-kappaB and Notch1 signaling. *J Neurooncol* 2007; 84:147–157.

- Giner-Larza EM, Manez S, Recoil MC et al. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol*, 2001; 428: 137–143.
- Ginner RM, Villella ML, Recoil MC et al. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *Eur J Pharmacol*, 2000; 389: 243–252.
- Gioxari A., Kaliora A. Papalois A. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effect of Pistacia Lentiscus in TNBS colitis. *J Med Food*, 2011 in press.
- Girgin F, Karaoglu O, Erkuş M et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health A* 2000;59:641-52.
- Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*, 1997; 46: 897–930.
- Gould, M. N., Moore, C. J., Zhang, R. et al. Limonene chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct in situ transfer of v-Ha-ras. *Cancer Res*. 1994; 54: 3540–3543.
- Grassmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vit Horm*, 2005; 72: 505-35.
- Grassmann J., Hippeli S., Vollmann R., et al. Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *J Agric Food Chem*, 2003; 51(26): 7576–82.
- Grassmann J., Schneider D., Weiser D., et al. Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein. *Arzneimitt Forsch/Drug Res*, 2001; 51(10): 799–805.
- Groff James L., επιστημονική επιμέλεια: Συντώσης Λάμπρος. Διατροφή και μεταβολισμός Ι. Στο: Το πεπτικό σύστημα: μηχανισμοί θρέψης του σώματος, προεκτάσεις, 2005: 24-25.
- Haag, J. D. & Gould, M. N. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994; 34: 477–483.
- Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 2003; 124:1767–1773.
- Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*, 2002; 4; 359:1541-9.
- 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.
- He M.L., Yuan H.Q., Jiang A.L., et al. Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer*, 2006; 106: 2547-55.
- Head A.K. and Jurenka S.J. Inflammatory bowel disease Part I: ulcerative colitis-Pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003, Volume 8, number 3.
- Hendrickson B.A., Gokhale R., Cho J.H. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol*, 2002; 15: 79-95.

- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA et al. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology*, 2002-2003; 70(3):121-30
- Hong KJ, Dunn DM, Shen CL et al. Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells. *Phytother Res*. 2004;18:768-70.
- Hopia, A. I., Huang, S.W., Schwarz, K. et al. Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J Agric Food Chem*, 1996; 44, 2030–2036.
- Hou YC, Ching H, Chao PD et al. Effects of glucose, fructose and 5-hydroxymethyl- 2-furaldehyde on the presystemic metabolism and absorption of glycyrrhizin in rabbits. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 247-251.
- Hughes DT, Martel PM, Kinlaw WB et al. The synthetic triterpenoid CDDO-Im inhibits fatty acid synthase expression and has antiproliferative and proapoptotic effects in human liposarcoma cells. *Cancer Invest* 2008; 26:118–127.
- Huguet AI, Recoil MC, Manez S et al. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally-acting irritants and other agents. *Eur J Pharmacol*, 2000; 410: 69–81.
- Hursting, S. D., Perkins, S. N., Haines, D. C. et al. Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer Res*, 1995; 55: 3949–3953.
- Huwez FU, Al-Habbal MJ. Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Gastroenterol Jpn* 1986; 21: 273–4.
- Huwez FU, Thirlwell D, Cockayne A et al. Mastic Gum Kills *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med*. 1998; 24: 339:1946.
- Iauk L., Ragusa S., Rapisarda A. et al. In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: a preliminary report. *J Chemother* 1996; 8:207-9.
- Im-hwan Roh, Seung-woo Nam, Na-? Myung et al. Effects of Mastic Gum on *Helicobacter pylori* Gastritis South Korea Society of Gastroenterology (2003).
- Inouye S., Takizawa T. and Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother*, 2001a; 47: 565-73.
- Inouye S., Yamaguchi H. and Takizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother*, 2001b; 7: 251-54.
- Isik F, Tunali Akbay T, Yarat A et al. Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2011;56:721-30.
- Ito H, Takazoe M, Fukuda Y et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2004; 126:989-96.

- Ito H, Tanabe H, Kawagishi H et al. Short-chain inulin-like fructans reduce endotoxin and bacterial translocations and attenuate development of TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2009; 54:2100-8.
- Janakat, S., Al-Merie, H. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *J Ethnopharmacol*, 2002; 83, 135–138.
- Jayanthi V, Probert CS, Pinder D, et al. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Q J Med*. 1992;82:125–138.
- Juhás S, Cikos S, Czikková S et al. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biol (Praha)*. 2008;54:1-7.
- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003; 10:813-29.
- Kaliora A.C., Mylona A., Chiou A., et al. Detection and identification of simple phenols in *Pistacia lentiscus* resin. *Lig Chromatogr R T*, 2004; 27: 289-300.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafyllidis J.K., et al. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol*, 2007b; 13: 6031-36.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafyllidis J.K., et al. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 2007a; 13: 748-53.
- Karlinger K., Györke T., Makö E., et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 2000; 35: 154-67.
- Kawamori, T., Tanaka, T., Hirose, Y. et al. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 369–372.
- Kazi HA, Qian Z. Crocetin reduces TNBS-induced experimental colitis in mice by downregulation of NFkB. *Saudi J Gastroenterol*. 2009;15:181-7.
- Kim JM, Kim JS, Yoo H et al. Effects of black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*. 2008;24;56:8427-33.
- Kim KJ, Lee JS, Kwak MK et al. Anti-inflammatory action of mollugin and its synthetic derivatives in HT-29 human colonic epithelial cells is mediated through inhibition of NF-kappaB activation. *Eur J Pharmacol*. 2009;10;622:52-7.
- Kim, H.J., Chen, F., Wu, C., et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52, 2849–2854
- Klaas Jan van der Berg, Jerre van den Horst, Jaap J. Boon et al. Cis-1,4-poly- β -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated *Tetrahedron Letters*, 1998; 39: 2645-2648

- Kodama, R., Yano, T., Furukawa, K. et al. Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene). IV. Isolation and characterization of new metabolites and species differences in metabolism. *Xenobiotica* 1976; 6: 377–389
- Kordali S., Cakir A., Zengin H. et al. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey *Fitoterapia*, 2003; 74: 164–167
- 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.
- Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C.B., et al. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*, 2003; 201: 28-36.
- Lai, L.H., Sung, J.J. *Helicobacter pylori* and benign upperdigestive diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2007; 21:261–279.
- Lee J.H., Lee D.U. and Jeong C.S. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem Toxicol*, 2009 (in press).
- Leenen CH, Dieleman LA. Inulin and oligofructose in chronic inflammatory bowel disease. *J Nutr*
- Lesesne CB. The postoperative use of wound adhesives. Gum mastic versus benzoin, USP. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992; 18(11):990.
- Liby K, Voong N, Williams CR, Risingsong R, Royce DB, Honda T, et al. The synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolidine suppresses STAT phosphorylation and induces apoptosis in myeloma and lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4288–4293.
- Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999; 50: 47–65.
- Lindberg E, Tysk C, Andersson K et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1988; 29:352-7.
- Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ, et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructooligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 2006;55:348-355.
- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I. et al. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *J Ethnopharmacol*, 2005a; 99: 43–47.
- Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U. et al. The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J Ethnopharmacol*, 2005b; 100: 198–204.
- Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*.2004; 126:1504–1517.
- Loizou S, Paraschos S, Mitakou S et al. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009; 234:553-61.
- 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; 51:367–371.

- Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A et al. Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. *chia* inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutr Cancer*. 2006; 55:86-93.
- Löw-Baselli A., Huber W.W., Käfer M., et al. Failure to demonstrate chemoprevention by the monoterpene perillyl alcohol during early rat hepatocarcinogenesis: a cautionary note. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 1869-77.
- Loza-Tavera, H. Monoterpenes in essential oils: Biosynthesis and properties. *Adv Exp Med Biol*, 1999; 464: 49–62.
- Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem*. 2009;322:127-35.
- Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Med*. 1999; 65(8):749-52.
- Magkouta S, Stathopoulos GT, Psallidas I et al. Protective effects of mastic oil from *Pistacia lentiscus* variation *chia* against experimental growth of lewis lung carcinoma. *Nutr Cancer*. 2009; 61(5):640-8.
- Malfettheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Masstricht III consensus report. *Gut*, 2007; 56: 772–781.
- Maltzman TH, Christou M, Gould MN et al. Effects of monoterpenoids on in vivo DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis*. 199; 12:2081-7.
- Manach C, Williamson G, Morand C et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 230S-242S.
- Manuele MG, Barreiro Arcos ML, Davicino R, et al. Limonene exerts antiproliferative effects and increases nitric oxide levels on a lymphoma cell line by dual mechanism of the ERK pathway: relationship with oxidative stress. *Cancer Invest*. 2010; 28: 135-45.
- Marone P, Bono L, Leone E et al. Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *J Chemotherapy* 2001; 13: 611–4.
- Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M et al. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*. 2006;147:873-85.
- Matos J.M., Schmidt C.M., Thomas H.J., et al. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *J Surg Res*, 2008; 147: 194-99.
- Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., et al. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am. J. Pathol*. 1994;144:997.
- Mikhail GR, Selak L, Salo S et al. The efficacy of adhesives in the application of wound dressings. *J Burn Care Rehabil*. 1989; 10:216-9.

- Mikhail GR, Selak L, Salo S. Reinforcement of surgical adhesive strips. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12:904-5, 908.
- Mills J.J., Chari R.S., Boyer I.J., et al. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res*, 1995; 55: 979-83.
- Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., et al. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 96:432.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
- Moulos P, Papadodima O, Chatziioannou A 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; 15; 2:68.
- Mudter J, Wirtz S, Galle PR et al. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L⁻ CD4⁺ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology.* 2002;70:170–176.
- Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1016-23.
- Mutai C., Bii C., Vagias C., et al. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol*, 2009; 123: 143-8.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C. et al. 2004. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry* 65, 1159– 1164.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., et al. Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity. *Molecules*, 2007; 12: 1035–1044.
- Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;41:18–26
- Nielsen, O.H., Brynskov, J., Vainer, B. Increased mucosal concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), sE-selectin, and interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 1996; 41:
- Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2003; 8: 207-15.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84-8.
- Papageorgiou V.P., Akola-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.

- 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: 551–559.
- Peeters M, Joossens S, Vermeire S et al. Diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:730–4.
- Petronelli A., Pannitteri G., Testa U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs *Anti-Cancer Drugs* 2009, 20:880–892
- Phillips, L. R., Malspeis, L. & Supko, J. G. Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. *Drug Metab. Dispos*, 1995; 23: 676–680.
- Plein K, Hotz J. Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. *Z Gastroenterol*. 1993 Feb;31(2):129-34.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347:417–429.
- Podolsky K. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 2002; 347:417-429
- Rao RK, Baker RD, Baker SS et al. Oxidant-induced disruption of the intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol*. 1997; 273: G812–G823.
- Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res*. 2008; 22:957-62.
- Reddy B.S., Wang C.X., Samaha H., et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res*, 1997; 57: 420-25.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM et al. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999; 21;354:635-9.
- Richheimer, S. L., Bernart, M.W., King, G. A. et al. Antioxidant activity of lipid soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996; 73:507–514.
- Riedle B, Kerjaschk D. Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol*. 1997;151:215–231.
- Rigaud D, Cosnes J, Le Quintrec Y et al. Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet. *Gut* 1991; 32:1492-7.
- Rodríguez-Concepción, M., and Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*. 2002; 130: 1079–1089.
- Rodrigues T.G., Fernandes A., Sousa J.P.B., et al. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. *Nat Prod Res*, 2009; 23: 319-26.
- Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg*. 1998;22:382-9.
- Roland K, Hamburger M. Quantitative analysis of anti-inflammatory and radical scavenging triterpenoid esters in evening primrose oil. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 3319–3324.

- Romani A., Pinelli P., Galardi C., et al. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal*, 2002; 13: 79-86.
- Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*, 1998; 35: 181–200.
- Russo G., Leopold J. et al. “Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis” *Vascul Pharmacol*, 2002; 38: 259-69.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005; 8; 353:2462-76.
- Sagar P, Macfie J. Pouchitis, colitis and deficiencies of fuel. *Clin Nutr* 1995; 14:13-6.
- Samudio I, Kurinna S, Ruvolo P, et al. Inhibition of mitochondrial metabolism by methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-diene-28-oate induces apoptotic or autophagic cell death in chronic myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, 2008; 7:1130–1139.
- Sanchez-Muñoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2008; 21; 14: 4280-4288.
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med*, 2004; 26;350:876-85.
- Sartor, R. B. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997; 11:17–23.
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, et al. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 86:202-10.
- Schwarz K., Ternes W. and Schmauderer E. Antioxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1992; 195: 104-07.
- Schwarz, K., Ernst, H., and Ternes, W. Evaluation of antioxidant constituents of thyme. *J. Sci. Food Agric*, 1996; 70: 217–223.
- Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, et al. Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 1993; 34: 1191–1197.
- Senthil S., Sridevi M., and Pugalendi K.V. Cardioprotective Effect of Oleanolic Acid on Isoproterenol-Induced Myocardial Ischemia in Rats *Toxicol Pathol*, 2007; 35 :418–423.
- Shai L.J., McGaw L.J., Aderogba M.A., et al. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol*, 2008; 119: 238-44.
- Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:609.
- Sher, M.E., D'Angelo, A.J., Stein, T.A. et al. Cytokines in Crohn's colitis. *Am. J. Surg*. 1995; 169:133
- Shoff, S. M., Grummer, M., Yatvin, M. B. et al. Concentrationdependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res*, 1991; 51: 37–42.
- Silk BDA. Role of nutritional therapy in IBD. In Falk, ed, *Advances in Inflammatory Bowel Diseases*. Falk Symposium 106, 1998, pp 89-99.

- Somova L.O., Nadar A., Rammanan P., et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension *Phytomedicine*, 2003; 10:115-21.
- Stark, M. J., Burke, Y. D., McKinzie, J. H., et al. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett*, 1995; 96: 15–21.
- Strober W., Fuss I.J., Blumberg R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 495-549.
- Sun Y, Cai TT, Shen Y et al. Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, and its active ingredient glycyrrhizin ameliorate experimental colitis through regulating cytokine balance. *Int Immunopharmacol*. 2009;1437-43.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44-54.
- Tabopda TK, Ngoupayo J, Khan Tanoli SA, et al. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Med*, 2009; 75:522-7.
- Takahashi K, Fukazawa M, Motohira H et al. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J Periodontol*. 2003; 74:501-5.
- Takahashi, Y., Inaba, N., Kuwahara, S. et al. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low density lipoprotein in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2003; 67: 195–197.
- Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T et al. Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; 48:112-6.
- Tassou C.C., Nychas G.J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia Lentiscus* var. *Chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in model food system *Int Biodeter Biodegrad*, 1995; 36: 411-420.
- Teissedre, P. L., Waterhouse, A. L. Inhibition of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric Food Chem*, 2000; 48: 3801–3805.
- 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, Chaviaras N, Sargentanis TN et al. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111:43-9.
- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990-6.
- Vasconcelos, J. F., Teixeira, M. M., Barbosa-Filho J. M. et al. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8: 1216-21.

- Vermeire S, Joossens S, Peeters M, et al. Comparative study of ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2001; 120:827-33.
- Verspaget HW, Peña AS, Weterman IT et al. Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut* 1988;29:223-8.
- Viuda-Martos M, El Gendy AE, Sendra E et al. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Listeria Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. *J Agric Food Chem.* 2010 Jul 28.
- Wall- Alonso E, Sullivan MM, Byrne TA. Gastrointestinal and pancreatic disease. In: Matarese LE, Gottsslich MM (eds), *Contemporary Nutrition Support Practice, a clinican guide*. WB Saunders Company, 2nd ed, 2003, pp 412-444.
- Wattenberg, L. W. & Coccia, J. B. Inhibition of 4-(methylnitrosoamino)- 1-butanone carcinogenesis in mice by d-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis*, 1991; 12: 115–117.
- Wattenberg, L. W., Sparnins, V. L. & Barany, G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res*, 1989; 49: 2689–2694.
- Welters CF, Heineman E, Thunnissen FB, et al. Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2002;45:621-627.
- Yamai H., Sawada N., Yoshida T., et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int J Cancer*, 2009; 125: 952-60.
- Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell mediated murine colitis. *J Immunol.* 2000;164: 4878–4882.
- Yano S, Harada M, Watanabe K et al. Antiulcer activities of glycyrrhetic acid derivatives in experimental gastric lesion models. *Chem Pharm Bull*, 1989; 37: 2500-2504.
- Yavuzer R, Kelly C, Durrani N et al. Reinforcement of subcuticular continuous suture closure with surgical adhesive strips and gum mastic: Is there any additional strength provided? *Am J Surg.* 2005; 189:315-8.
- Youdim K.A., Dorman H.J. and Deans S.G. The antioxidant effectiveness of thyme oil, α-tocopherol and ascorbyl palmitate an evening primrose oil oxidation. *J Essent Oil Res*, 1999; 11: 643-48
- Yu, S. G., Hildebrandt, L. A. & Elson, C. E. Geranial, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J. Nutr*, 1995; 125: 2763–2767.
- Zhou YH, Yu JP, Liu YF et al. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-α, NF-κB, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm.* 2006;2006:92642.

- Αναστασιάδου Β., Αξιολόγηση του βαθμού της ξηροστομίας σε ασθενείς της τρίτης ηλικίας με ολικές οδοντοστοιχίες Περιοδικό Στόμα, 2002, σελ. 30
- Αναστασιάδου Β., Σιόβας Σ. Μελέτη των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων διαφόρων τύπων μαστίχας μετά από μάσησή τους από άτομα διαφορετικής ηλικίας με διαφορετικές οδοντικές καταστάσεις Στοματολογία 2002, 59 (1): 39-49
- Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (EMX) www.gummastic.gr
- Ζαμπέλας. Διαταραχές του κατώτερου γαστρεντερικού συστήματος. Στο: Κλινική διαιτολογία και διατροφή με στοιχεία παθολογίας. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 2003: 639.
- O'Bryan C.A., Crandall P.G., Chalova V.I., et al. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. J Food Sci, 2008; 73: 264-67.
- Σαββίδης Θ. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). ISBN: 960-343-528-7, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε., 2000.
- Σγούρας Δ., Μεντής Α. «Αντιβακτηριακή δράση της μαστίχας έναντι του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού» Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα ερευνητικού προγράμματος (2002).