

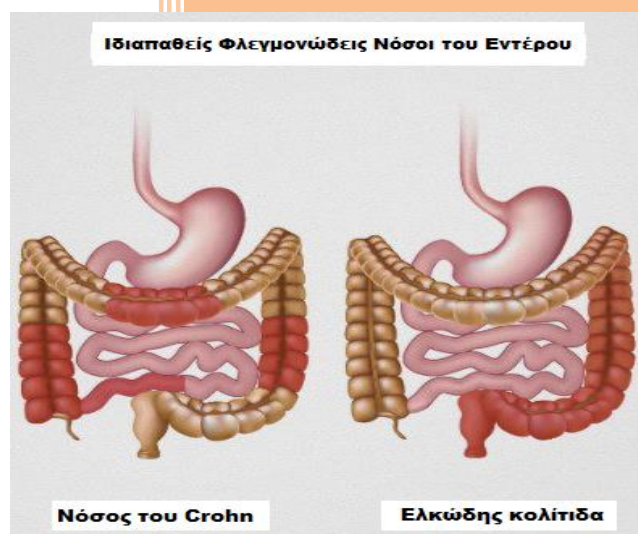


ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Επίδραση της κατανάλωσης μαστίχας στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ, με έμφαση σε μικροοργανισμούς με πιθανή προ-φλεγμονώδη δράση

Μεταπτυχιακή διατριβή
της
Αντωνίας Παπαναστασίου



ΑΘΗΝΑ, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Επίδραση της κατανάλωσης μαστίχας στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ, με έμφαση σε μικροοργανισμούς με πιθανή προ-φλεγμονώδη δράση

**Μεταπτυχιακή διατριβή
της
Αντωνίας Παπαναστασίου
Α.Μ. 4421531**

ΑΘΗΝΑ, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Κυριακού Αδαμαντίνη (Επιβλέπουσα)**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στη Μικροβιολογία, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής
- **Καλιώρα Ανδριάνα**, Επίκουρη Καθηγήτρια στη Διατροφή του Ανθρώπου και Τρόφιμα, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής
- **Μπεζιρτζόγλου Ευγενία**, Καθηγήτρια του Τμήματος Αγροτικής Ανάπτυξης Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης

Η Παπαναστασίου Αντωνία,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας στη Μικροβιολογία κας. Αδαμαντίνης Κυριακού. Θα ήθελα λοιπόν να της εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ανάθεση, επίβλεψη και διόρθωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, καθώς και για την αμέριστη βοήθεια και φιλική της τάση.

Εκφράζω, επίσης, ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια στη Διατροφή του Ανθρώπου και Τρόφιμα, κα. Ανδριάννα Καλιώρα και την Καθηγήτρια του Τμήματος Αγροτικής Ανάπτυξης Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης κα. Ευγενία Μπεζιρτζόγλου για την συμμετοχή τους στην επιτροπή, την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη στην διεκπεραίωση της διατριβής.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στις διδακτορικές ερευνήτριες κα. Ευδοκία Μήτσου και κα. Ευσταθία Παπαδά για την αμέριστη υποστήριξη, υπομονή, βοήθεια και κυρίως για τις συμβουλές τους καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου για την παροχή των σκευασμάτων, Μαστίχας Χίου και εικονικού φαρμάκου, αλλά και για την διασφάλιση της τυφλής διαδικασίας.

Ευχαριστώ την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα. Ευανθία Μάνθου και τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαίρετη συνεργασία και τις στιγμές που μοιραστήκαμε.

Ευχαριστώ, επίσης, την κα. Θεοδώρα Νίκου καθώς και την κα. Ελένη Καραλία για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη τις στιγμές που τις χρειάστηκα.

Κλείνοντας θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και του φίλους μου για την αστείρευτη αγάπη και υποστήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	5
Κατάλογος εικόνων	7
Κατάλογος πινάκων	8
Κατάλογος σχημάτων	9
Κατάλογος Συντομογραφιών	10
Περίληψη	12
Abstract	13
ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου.....	14
1.1 Διάγνωση- Συμπτώματα- Αιτιολογία- Θεραπεία	15
1.2 Παθολογία νόσων- Πρόγνωση- Απόκριση οργανισμού- Φαρμακευτική αγωγή.....	17
1.3 Βαρύτητα νόσων- Παράγοντες που επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου.....	18
1.4 Νόσος Crohn.....	20
1.5 Ελκώδης κολίτιδα	21
Κεφάλαιο 2. Εντερικός μικροβιόκοσμος.....	21
2.1 Βλεννογόνο και εντερικός μικροβιόκοσμος	22
2.2 Λειτουργίες μικροοργανισμών.....	24
Κεφάλαιο 3. Μικροοργανισμοί και νόσοι.....	25
3.1 Ευκαιριακά παθογόνα και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	27
3.2 Διαταραχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στις νόσους.....	30
3.3 Σχέση ανοσοποιητικού-μικροοργανισμών στις νόσους	33
Κεφάλαιο 4. Εναλλακτικές μορφές θεραπείας.....	35
4.1 Προβιοτικά, πρεβιοτικά, συνβιοτικά	35
4.2 Μαστίχα.....	36
4.2.1 Δράσεις.....	36
4.2.2 Χημική σύσταση- Δόση- Παρενέργειες	38
ΜΕΡΟΣ Β΄: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
Κεφάλαιο 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	41
5.1 Σκοπός της Εργασίας	41
5.2 Υλικά και Μέθοδοι	41
5.2.1 Σχεδιασμός της έρευνας	41
5.2.2 Χαρακτηριστικά εθελοντών και πρωτόκολλο της παρέμβασης	42
5.2.3 Δείγματα ασθενών.....	43
5.3 Πειραματική διαδικασία.....	43
5.3.1 Απομόνωση DNA από κόπρανα	43

5.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)	45
5.4 Στατιστική ανάλυση	47
ΜΕΡΟΣ Γ': ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
Κεφάλαιο 6. Αποτελέσματα	48
6.1 Γενικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων στην αρχή της παρέμβασης	48
6.2 Διατροφικές συνήθειες και φυσική δραστηριότητα των εθελοντών	49
6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης.....	50
6.4 Συγκρίσεις αρχή-τέλος με βάση την παρέμβαση.....	53
6.5 Δείκτης ποιότητας ζωής των ασθενών	57
ΜΕΡΟΣ Δ': ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
Κεφάλαιο 7. Συζήτηση	58
7.1 Δημογραφικά-ανθρωπομετρικά-διατροφικά χαρακτηριστικά	58
7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης.....	60
7.3 Συγκρίσεις αρχή-τέλος με βάση την παρέμβαση.....	62
7.4 Σύγκριση δείκτη ποιότητας ζωής	63
7.5 Περιορισμοί.....	63
Βιβλιογραφία	63

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης συχνότητας εμφάνισης νόσων	14
Εικόνα 2: Μορφολογία εντέρου ασθενών.....	15
Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε φυσιολογικές συνθήκες και σε ασθένεια	16
Εικόνα 4: Δίαιτα, μικροβιακή σύνθεση και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.....	19
Εικόνα 5: Αναπαράσταση της βιοποικιλότητας των βακτηρίων του ανθρώπινου εντέρου. Φυλογενετικό δέντρο των κυρίαρχων βακτηρίων.....	23
Εικόνα 6: Σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου υγιούς ανθρώπου	24
Εικόνα 7: Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-βακτηρίων σε υγιές άτομο και σε ασθενή με IBD.....	26
Εικόνα 8: Συχνότητα ειδών των μυκήτων σε προβεβλημένες και μη περιοχές και σε δείγματα περιττωμάτων ασθενών με CD και υγιών ανθρώπων	29
Εικόνα 9: Μικροβιόκοσμος, γενετικό περιβάλλον ξενιστή και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην παθογένεση της CD σε υγιείς και σε ασθενείς με IBD	31
Εικόνα 10: Μηχανισμοί άμυνας και ανοχής του ξενιστή στα βακτήρια του εντέρου	34
Εικόνα 11: Εκκριση ρητίνης από μαστιχόδεντρο και φυσικό δάκρυ μαστίχας	36

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με IBD, πιθανοί παθογόνοι μικροοργανισμοί και μικρόβια με πιθανή προστατευτική δράση	30
Πίνακας 2: Αλλαγές της μικροχλωρίδας που σχετίζεται με την IBD	33
Πίνακας 3: Ορισμένα από τα αρωματικά και θεραπευτικά συστατικά της μαστίχας.....	38
Πίνακας 4: Χημικά στοιχεία μαστίχας Χίου	39
Πίνακας 5: Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης.	46
Πίνακας 6: Δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.	48
Πίνακας 7: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.....	49
Πίνακας 8: Διατροφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.....	49
Πίνακας 9: Φυσική δραστηριότητα συμμετεχόντων.....	50
Πίνακας 10: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log ₁₀ copies/ml κοπράνων) και συχνότητα απομόνωσης (%) των υπό μελέτη μικροοργανισμών με βάση την ασθένεια στην αρχή της παρέμβασης.....	51
Πίνακας 11: Τιμές p των μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης, μετά από την επίδραση των συγχυτικών παραγόντων	52
Πίνακας 12: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log ₁₀ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών, στην αρχή της παρέμβασης στους εθελοντές που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο.....	53
Πίνακας 13: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log ₁₀ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στο τέλος της παρέμβασης, στους εθελοντές που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο.....	54
Πίνακας 14: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log ₁₀ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastiha».....	54
Πίνακας 15: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log ₁₀ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastic».....	55
Πίνακας 16: Δείκτης ποιότητας ζωής στην αρχή και στο τέλος των ασθενών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση	57
Πίνακας 17: Πίνακας σύγκρισης τιμών διατροφικών συστάσεων για μακροστοιχεία και τιμών διατροφικών χαρακτηριστικών του υπό μελέτη πληθυσμού.	59

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1: Συχνότητα εμφάνισης <i>E.coli</i> και <i>C.albicans</i> στο σύνολο του δείγματος στην αρχή της παρέμβασης	51
Σχήμα 2: Σχεδιάγραμμα ασθενών.	53
Σχήμα 3: Συχνότητα εμφάνισης του <i>C.albicans</i> στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης του συμπληρώματος «mastiha»	56
Σχήμα 4: Συχνότητα εμφάνισης του <i>E.coli</i> στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης του συμπληρώματος «mastic»	56
Σχήμα 5: Συχνότητα εμφάνισης <i>C.albicans</i> στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης του συμπληρώματος «mastic»	57

Κατάλογος Συντομογραφιών

Συντομογραφία	Περιγραφή
5-ASA	Ενώσεις του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος
AJs	Μοριακά σύμπλοκα με ενώσεις προσφύσεως (Adherens Junctions)
AIEC	Adherent-invasive <i>E. Coli</i>
ASCA	Αντισώματα έναντι του σακχαρομύκητα <i>cerevisiae</i> (<i>Anti-Saccharomyces cerevisiae</i>)
BMI (ΔΜΣ)	Body Mass Index (Δείκτης Μάζας Σώματος)
CD	Νόσος Crohn (Crohn's Disease)
CDAI	Δείκτης ενεργότητας νόσου Crohn (Crohn's Disease Activity Index)
CDI	Μόλυνση <i>Clostridium difficile</i> (<i>Clostridium difficile</i> infection)
CLRs	Υποδοχείς λεκτίνης τύπου C (C-type lectin receptors)
Ct	Threshold circle
DAI	Δείκτης ενεργότητας νόσου (Disease Activity Index)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DeoxyriboNucleic Acid)
dsDNA	double-stranded DNA
EN	Εντερική διατροφή των ασθενών (Enteral Nutrition)
EEN	Αποκλειστική εντερική διατροφή (Exclusive Enteral Nutrition)
FMT	Θεραπεία με μικροοργανισμούς κοπράνων (Fecal Microbial Therapy)
IBQ	Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease)
IBDQ	Ερωτηματολόγιο για φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire)
Ig	Ανοσοσφαιρίνη
IFN	Ιντερφερόνη
IL	Ιντερλευκίνη
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MIF	Παράγοντας αναστολής μετανάστευσης μακροφάγων (Macrophage Migration Inhibitory Factor)
MUFAs	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated Fatty Acids)
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κΒ (Nuclear Factor – kappa Beta)
NLRs	Υποδοχείς NOD-like (NOD-like Receptors)

NOD2	Περιοχή ολιγομερισμού που δεσμεύεται με νουκλεοτίδιο και περιέχει τη πρωτεΐνη 2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2)
NRI	Δείκτης διατροφικού κινδύνου (Nutritional Risk Index)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC	Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
pH	Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (potential of Hydrogen)
PSA	Πολυσακχαρίτης Α (PolySsaccharide A)
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids)
qPCR	Ποσοτική PCR (quantitative PCR)
PRRs	Υποδοχείς αναγνώρισης (Pattern Recognition Receptors)
rRNA	ΡΙβοσωμικό RNA (ribosomal RNA)
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)
SCFAs	Οργανικά οξέα μικρής αλυσού (Short-Chain Fatty Acids)
t	Χρόνος
Th	T- βοηθητικά κύτταρα
TJs	Στενοί δεσμοί (Tight Junctions)
TLRs	Υποδοχείς Toll-like (Toll-like Receptors)
TNF	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου (Tumor Necrosis Factor)
UC	Ελκώδης κολίτιδα (Ulcerative Colitis)
Αντι-TNF	Αντι-παράγοντας νέκρωσης όγκου (Anti-Tumour Necrosis Factor)
EM	Εντερικός Μικροβιόκοσμος
ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου
μ.ο.± S.D	Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση
N	Αριθμός ατόμων

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια ο επιπολασμός των Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου (ΙΦΝΕ) αυξάνεται. Οι σημαντικότερες ΙΦΝΕ είναι η νόσος του Crohn (CD) και η ελκώδης κολίτιδα (UC), οι οποίες είναι χρόνιες, πολυπαραγοντικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από ανοσοανεπάρκεια. Η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθείται ποικίλει αλλά πολύ συχνά παρατηρούνται σοβαρές παρενέργειες.

Τελευταία υπάρχει ενδιαφέρον για την χρήση φυσικών προϊόντων για την αντιμετώπισή τους όπως είναι η μαστίχα Χίου. Η φυσική, αυτή, αρωματική ρητίνη εκκρίνεται από το μαστιχόδεντρο (*Pistacia lentiscus* var *Chia*) και παράγεται στη Χίο. Η σύστασή της είναι πλούσια σε τερπενοειδή και φαινολικά συστατικά τα οποία της προσδίδουν μια σειρά από ευεργετικές δράσεις, ιδιαίτερα στον γαστρεντερικό σωλήνα.

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης μαστίχας στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ και πιο συγκεκριμένα σε μικροοργανισμούς του εντέρου που παρουσιάζουν προφλεγμονώδη δράση.

Η μελέτη αυτή αποτελεί μέρος διπλά τυφλής τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης και συμμετείχαν 25 εθελοντές, από τους οποίους ολοκλήρωσαν τη μελέτη οι 15. Οι εθελοντές αφού ενημερώθηκαν και υπέγραψαν Συμφωνητικό Συμμετοχής στη μελέτη, χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες και λάμβαναν ημερησίως δισκία 2.8g μαστίχας (700mg/δισκίο, 4 δισκία/μέρα) ή εικονικού φαρμάκου για χρονικό διάστημα τριών μηνών. Οι δύο παρεμβάσεις χαρακτηρίζονται ως «mastiha» και «mastic», χωρίς να είναι ακόμα γνωστή η σύστασή τους.

Πριν από την έναρξη αλλά και με την ολοκλήρωση της παρέμβασης καταγράφηκαν τα γενικά δημογραφικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, το ιατρικό ιστορικό των εθελοντών όπως επίσης και τα διατροφικά τους χαρακτηριστικά, με την χρήση κατάλληλων ερωτηματολογίων. Επίσης ζητήθηκε από τους ασθενείς να προσκομίσουν δείγματα κοπράνων στα οποία καταμετρήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί με μη-καλλιεργητικές τεχνικές (real-time PCR): Ολικά βακτήρια, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*.

Οι εθελοντές παρουσίασαν διαφορές στα διατροφικά χαρακτηριστικά και πιο συγκεκριμένα, στην πρόσληψη πρωτεΐνης, λίπους και διαιτητικών ινών, ως προς τις δυο νόσους. Επίσης ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ασθενών παρουσίασε διαφορές ως προς την ασθένεια. Για παράδειγμα στους ασθενείς με CD καταμετρήθηκαν υψηλότεροι πληθυσμοί της ομάδας του *E.coli* σε σχέση με τους ασθενείς με UC. Στους εθελοντές που ακολούθησαν την παρέμβαση «mastiha» παρατηρήθηκε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης του *C.albicans* στο τέλος της παρέμβασης σε σχέση με την έναρξη, ενώ στους εθελοντές που χορηγήθηκε το συμπλήρωμα διατροφής «mastic» μειώθηκε η συχνότητα εμφάνισης του *E.coli*.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκαν διαφορές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταξύ των ασθενών των δύο νόσων (CD, UC), όπως επίσης και μεταβολές μετά από την παρέμβαση («mastiha», «mastic»). Φαίνεται όμως πως απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ατόμων για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Λέξεις – κλειδιά: Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, Νόσος Crohn, Ελκώδης κολίτιδα, μαστίχα Χίου, εντερικός μικροβιόκοσμος

Abstract

Recently, more and more people are diagnosed with Inflammatory Bowel Diseases (IBD). The two major types of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis, which are chronic, multifactorial diseases characterized by immunodeficiency. The standard medication causes very often serious side effects, but lately a shift towards the use of natural products such as the mastiha of Chios, has appeared. This natural, aromatic resin is secreted by the tree *Pistacia lentiscus* var *Chia* and is produced in Chios. Its composition is rich in terpenoid and phenolic components and it is claimed that has a number of beneficial effects especially on the gastrointestinal tract.

Aim: to investigate the impact of mastiha consumption on the faecal microbiota of IBD subjects and more specifically on gut microorganisms with potential pro-inflammatory action.

In this study, which is part of a randomized double-blind clinical trial, 25 volunteers participated, but only 15 completed. The patients after been informed, signed a participation agreement, were randomly divided into two groups and received 2.8g of mastiha (700mg/tablet, 4 tablets/day) or placebo for a period of three months. The two groups of intervention were labeled as «mastiha» and «mastic», without to know the tablets' composition.

At the beginning and at the end of the intervention the subjects were anthropometrically evaluated, interviewed for their dietary characteristics and were asked to bring their faecal samples. The following microorganisms were quantified in the faecal samples before and after the intervention, using real-time PCR: Total bacteria, *Escherichia coli* group, *Fusobacterium nucleatum* and *Candida albicans*.

The CD and UC volunteers showed significant differences in their dietary characteristics regarding the protein, fat and dietary fibers intake. Also, significant differences in their faecal microbiota have been indicated, as for example CD patients were found to have higher *E.coli* levels than UC in their faecal microbiota.

At the end of «mastiha» intervention the incidence rate of *C. albicans* was decreased in the fecal samples, while the «mastic» treatment evoked a decrease in the *E. coli* incidence rate.

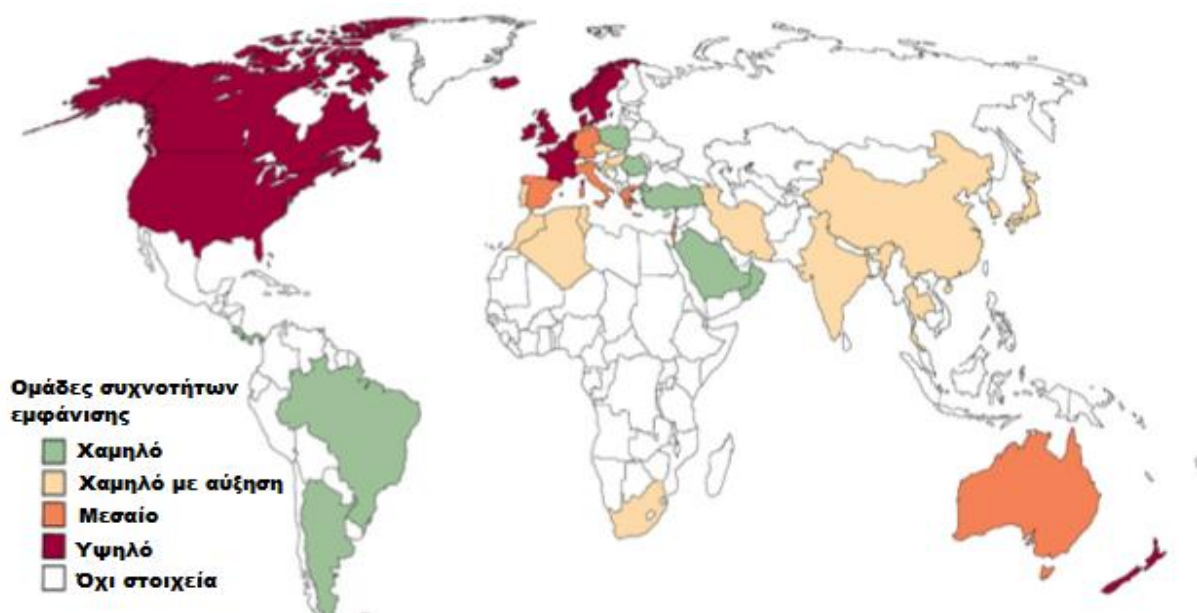
In conclusion, the faecal microbiota of subjects was differentiated in the abundance of certain microorganisms between patients of CD and UC. Also, the treatment («mastiha» or «mastic») seems to influence the incidence rate of *E.coli* and *C.albicans* but the small number of volunteers is an important limiting factor for the study.

Keywords: Idiopathic inflammatory bowel disease, Crohn disease, ulcerative colitis, mastiha, faecal microbiota

ΜΕΡΟΣ Α': ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

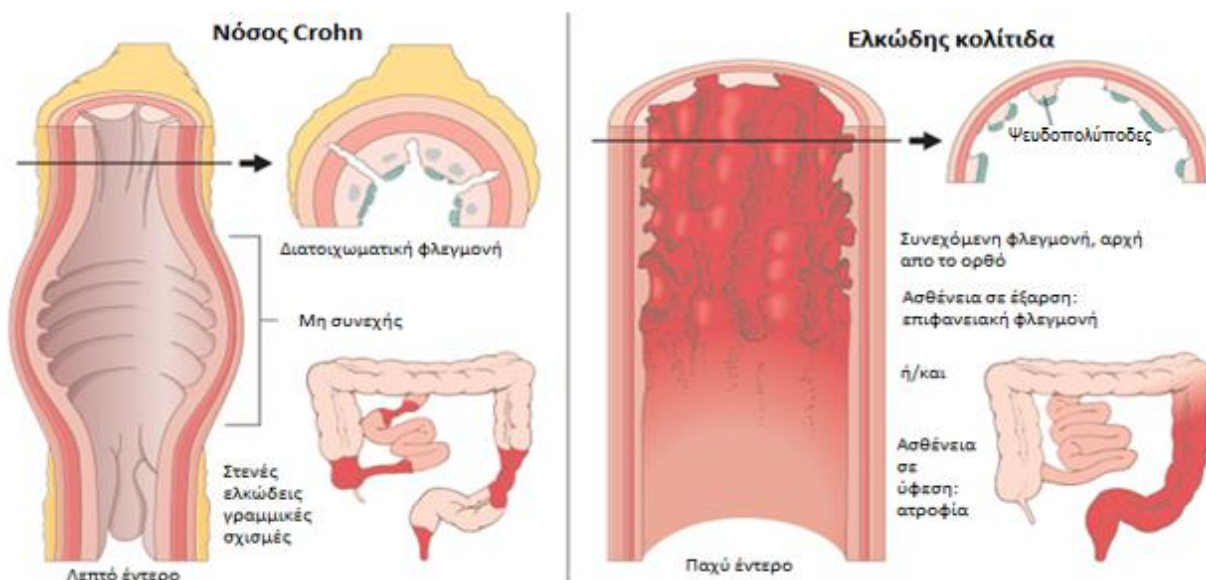
Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (νόσος του Crohn και ελκώδης κολίτιδα κυρίως) είναι χρόνιες ασθένειες που χαρακτηρίζονται από ανοσοανεπάρκεια. Τα τελευταία πενήντα χρόνια ο επιπολασμός τους παρουσιάζει σημαντική αύξηση. Στις αναπτυσσόμενες χώρες υπάρχει σταδιακή αύξηση των επεισοδίων της ελκώδους κολίτιδας (ulcerative colitis-UC) ενώ τα ποσοστά της νόσου Crohn (Crohn's disease-CD) παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα, αν και αυξάνονται. Η πλειοψηφία των περιστατικών συναντάται στη νότιο Ευρώπη, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Νότιο Αμερική (Εικόνα 1), (4,14,21,23,24).



Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης συχνότητας εμφάνισης νόσων (4).

Πρόκειται για πολυπαραγοντικές νόσους. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που εμπλέκονται είναι η διαταραγμένη φυσιολογία, ανοσολογία, μικροβιολογία και γενετική του ανθρώπου σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως διατροφή, αντιβιοτικά, κάπνισμα, γεωγραφική περιοχή, υγιεινή, συντηρητικά, το άγχος της καθημερινότητας και άλλα), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος προς μη φυσιολογικές αντιδράσεις και χρόνια φλεγμονή (βλάβες, εξοίδηση και αιμορραγία), (7). Έχει μελετηθεί και η συμβολή του ψυχολογικού παράγοντα, που πιθανά συντελεί στην οξεία υποτροπή της νόσου (1,9,17,23,24,25). Οι νόσοι αυτές μπορεί να ξεκινούν στην εφηβεία και υπάρχουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής (4). Η διαφορά τους είναι ενδοσκοπική, ιστολογική, ανοσολογική και ως προς

τη θέση εντοπισμού της φλεγμονής (2,17). Η ελκώδης κολίτιδα προσβάλλει την εσωτερική επιφάνεια του βλεννογόνου του παχέος εντέρου, ξεκινά από το απευθυσμένο και προχωρά προς το δεξιό μέρος του εντέρου (κόλον και ορθό) ενώ η νόσος Crohn μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε τμήμα του πεπτικού σωλήνα, συνεχόμενα είτε τμηματικά (από στόμα έως και πρωκτό), (Εικόνα 2), (1,21,23).



Εικόνα 2: Μορφολογία εντέρου ασθενών (35).

1.1 Διάγνωση- Συμπτώματα- Αιτιολογία- Θεραπεία

Διάγνωση μπορεί να γίνει μέσω οπτικής και απτικής εξέτασης των ασθενών, με εξετάσεις αίματος καθώς και με εξέταση κοπράνων (από όπου μπορεί να φανεί η ποικιλότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου). Αναφορικά με την συμπτωματολογία παρουσιάζεται κοιλιακό άλγος, σπασμός στο έντερο, κόπωση, διάρροιες (συχνά αιματηρές) με τελικό αποτέλεσμα την μείωση του βάρους. Άλλα συμπτώματα είναι: πυρετός, αναιμία, λιποθυμική τάση, δύσπνοια, εξάντληση, καθυστέρηση ανάπτυξης ή έλευσης της εφηβείας, σε άτομα μικρής ηλικίας. Οι νοσούντες παρουσιάζουν περιόδους εξάρσεων ή κρίσεις (επιδείνωση των συμπτωμάτων) και υφέσεις (περιόδους υποχώρησης). Η πιθανότητα εμφάνισης επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες ενώ η ίδια νόσος, ανάμεσα σε δύο άτομα με κοινά χαρακτηριστικά, πιθανώς να εμφανίζεται με παραλλαγμένη σοβαρότητα και συμπτωματολογία. Συνηθέστερα, το πρώτο επεισόδιο έξαρσης είναι και το πιο σοβαρό. Ο διαχωρισμός των δύο ασθενειών δεν είναι εύκολος λόγω της ομοιότητας των ενδείξεων (1,21,24,25). Παρά ταύτα, η ανίχνευση συγκεκριμένων ομάδων αντισωμάτων στον ορό, ίσως να αποτελούν χρήσιμο δείκτη στην διαφοροποίηση των ασθενειών (47).

Δύναται να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία της ζωής ενός ανθρώπου. Η συχνότερη έξαρση είναι γύρω στα 15-30 πρώτα έτη και μια δεύτερη κορύφωση μπορεί να υπάρξει γύρω στα 60-70 χρόνια. Αυτές οι φάσεις σχετίζονται με τις αλλαγές στην ποικιλία και την σταθερότητα των μικροοργανισμών του εντέρου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε φυσιολογικές συνθήκες και σε ασθένεια (14).

Προσβάλλουν και τα δύο φύλα ανά τον κόσμο. Η UC απαντάται πιο συχνά στους άνδρες ενώ η CD στις γυναίκες (1,2,4,17,21).

Δεν έχουν αποδειχθεί ποια είναι τα πιθανά αίτια πρόκλησης των ασθενειών. Μια πλειάδα παραγόντων όπως οι μεταβολές που μπορεί να προκληθούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, συμβάλλουν στην εκδήλωση, ύστερα από επαφή με συγκεκριμένο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Παρατηρούνται πιο συχνά σε άτομα με γενετική προδιάθεση (γενετικοί πολυμορφισμοί του ξενιστή), για την εμφάνιση της ασθένειας, καθώς από έρευνες έχει βρεθεί πως συγγενείς ασθενών βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση των νόσων. Σημαντικό ρόλο παίζει και ο εντερικός μικροβιόκοσμος (EM) του ανθρώπου (1). Μελέτες έχουν δείξει στον ειλέο ασθενών μεγάλες συγκεντρώσεις αερόβιων, δυνητικά αναερόβιων και Gram αρνητικών βακτηρίων, κυριότερα της οικογενείας *Enterobacteriaceae* (8). Αλλαγές στη σύνθεση και τη λειτουργία του μικροβιόκοσμου μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη διέγερση του ανοσοποιητικού, επιθηλιακές δυσλειτουργίες και ενισχυμένη περατότητα του βλεννογόνου. Επίσης η αυξημένη ικανότητα συμβιωτικών βακτηρίων να προσβάλλουν άλλα κύτταρα, ενισχύει την προσκόλληση τους στον βλεννογόνο και την υπεροχή τους με αποτέλεσμα να διεγείρεται το ανοσοποιητικό (5). Περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη

της νόσου είναι το κάπνισμα, η εγχείρηση σκωληκοειδούς απόφυσης και το αίσθημα άγχους ή κατάθλιψης, που δημιουργείται από την καθημερινότητα, στους ασθενείς (1,21,24).

Υπάρχει θεραπευτική αγωγή, προκειμένου οι πάσχοντες να έχουν μια πιο βιώσιμη καθημερινότητα, η οποία εξαρτάται από τη φύση, την έκταση της νόσου και την ένταση των εκδηλωμένων συμπτωμάτων. Η θεραπεία βασίζεται στη μείωση της έντασης των εξάρσεων, των τυχόν παρενεργειών, την παρατεταμένη περίοδο ύφεσης και τη χορήγηση σωστής διατροφής και υποστήριξης (1,24). Η μείωση της απόκρισης του ανοσοποιητικού με τη χρήση κορτικοστεροειδών επιτρέπει στον βλεννογόνο να θεραπευτεί, ύστερα από πιθανό τραύμα, και στο έντερο να επιστρέψει στην κανονική του λειτουργία ενώ τα στεροειδή χρησιμοποιούνται ως κύρια θεραπεία για την CD (17,21,23,25). Βραχυπρόθεσμη θεραπεία με αντιβιοτικά φαίνεται να μειώνει την εντερική φλεγμονή (2). Επιπρόσθετα, έχει φανεί πως η εντερική διατροφή των ασθενών (enteral nutrition-EN) καθώς και η αποκλειστική εντερική διατροφή (exclusive enteral nutrition-EEN) ίσως βοηθούν στην διατήρηση των περιόδων ύφεσης καθώς προκαλούνται αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο και στους μεταβολίτες τους, αν και πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες ακόμη (47).

1.2 Παθολογία νόσων- Πρόγνωση- Απόκριση οργανισμού- Φαρμακευτική αγωγή

Η παθολογία της CD χαρακτηρίζεται από την απόκριση των T βοηθητικών κυττάρων (Th) 1, η οποία ρυθμίζεται από υψηλά επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)-α, της ιντερφερόνης (IFN)-γ και των Th17 κυττάρων που διηθούν (εισέρχονται) τον ιστό. Αντίθετα, η παθολογία της UC χαρακτηρίζεται από την μη τυπική απόκριση των Th2 κυττάρων, η οποία ρυθμίζεται από υψηλά επίπεδα των κυττάρων Th17 (47). Εξίσου δύσκολη είναι και η πρόγνωση. Σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση μπορεί, μέσω των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου που σχετίζονται με τον βλεννογόνο, να γίνει μια αρχική πρόγνωση (2,5,34). Η ύπαρξη συγκεκριμένων βακτηρίων, όπως το *Fusobacterium nucleatum*, τόσο στην στοματική κοιλότητα όσο και στο έντερο ίσως αποτελούν ένα προγνωστικό δείκτη την ασθένεια (40).

Αναφορικά με την ανοσολογική απόκριση, όταν υπάρξει τραυματισμός του βλεννογόνου, είναι κρίσιμο να επιταχυνθεί η ίαση προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος παθογόνων και άλλων, ίσως, επιβλαβών, ως προς το ανοσοποιητικό, ερεθισμάτων. Ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων έγκειται στο να «μεταναστεύουν» στο σημείο τραυματισμού και να «προκαλούν» την ανάπλαση. Το επιθήλιο αρχίζει να επουλώνεται μέσω της ανασύστασης του τραυματισμένου βλεννογόνου και της αποκατάστασης της λειτουργίας του. Εάν συμβεί τραυματισμός και το ανοσοποιητικό δεν

αντιδράσει, τότε μπορεί να οδηγήσει σε CD. Άλλη θεωρία υποστηρίζει πως οποιοδήποτε ελάττωμα προκληθεί κατά την ρύθμιση του ανοσοποιητικού ενδέχεται να οδηγήσει στην διαιώνιση της υπάρχουσας φλεγμονής, και στις δύο νόσους (17,21).

Η φαρμακευτική αγωγή η οποία χορηγείται είναι το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ (5-ASA) (μεσαλαμίνη, βαλσαλαζίδη, ολσαλαζίνη και σουλφασαλαζίνη), που συμβάλλει στην ελάττωση των συμπτωμάτων, τα κορτικοστεροειδή (πρεδνιζόνη, μεθυλπρεδνιζολόνη και υδροκορτιζόνη), που συμβάλλουν στη μείωση της φλεγμονής αλλά χρειάζεται προσοχή στην μακροχρόνια χορήγησή τους καθώς μπορεί να παρουσιάσουν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως λοιμώξεις και σύνδρομο Cushing, τα ανοσοκατασταλτικά (αζαθειοπρίνη, 6-μερκαπτοπουρίνη και μεθοτρεξάτη), που καταστέλλουν τη δράση του ανοσοποιητικού άρα και την φλεγμονή, παρουσιάζουν όμως ανεπιθύμητες ενέργειες όπως λοιμώξεις και τα αντι-TNF φάρμακα (αντισώματα ή υποδοχείς οι οποίοι παράγονται από ζωντανά κύτταρα, όπως η ανταλιμουμάμπη και η ινφλιξιμάμπη), που πιθανόν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις. Συνιστάται μεγάλη προσοχή στην λήψη των φαρμάκων καθώς οι παρενέργειες τους ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα σοβαρές και επιβλαβείς (5,14,15,17,21,23,24,25). Επίσης τα τελευταία χρόνια έχει γίνει στροφή προς τις συμπληρωματικές και εναλλακτικές μορφές θεραπείας με τη χρήση φυτικών προϊόντων όπως είναι η μαστίχα της Χίου. Τα ευρήματα, ωστόσο, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ακόμη ως αξιόπιστα καθώς ο αριθμός των κλινικών δοκιμών είναι μικρός και υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στις μεθοδολογίες των ερευνών (28)

1.3 Βαρύτητα νόσων- Παράγοντες που επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου

Η βαρύτητα της νόσου μπορεί να χαρακτηριστεί ως ήπια (λιγότερες από 4 υδαρείς κενώσεις τη μέρα, ελάχιστη ή καθόλου αιμορραγία, απουσία συμπτωμάτων), μέτρια (λιγότερες από 6 υδαρείς κενώσεις, μέτρια αιμορραγία, ορισμένα συμπτώματα, δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία) και σοβαρή (περισσότερες από 6 υδαρείς κενώσεις, έντονη αιμορραγία, αρκετά συμπτώματα, μείωση του βάρους), (1,21,23).

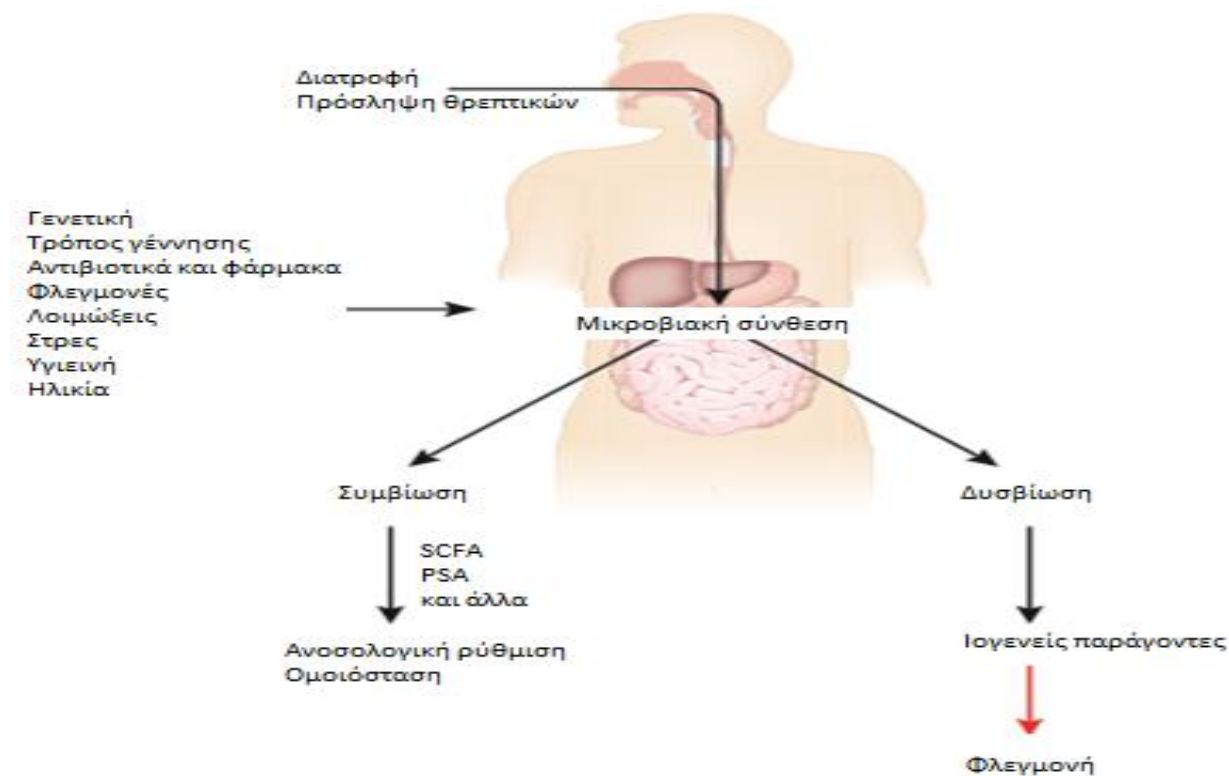
Δεν υπάρχουν ενδείξεις που να σχετίζουν το άγχος με την εμφάνιση της νόσου, αν και οι ασθενείς βιώνουν καθημερινά στρεσογόνες καταστάσεις λόγω των συμπτωμάτων, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η πεποίθηση πως εντείνει τα επεισόδια.

Το κάπνισμα φαίνεται να επηρεάζει. Ενδεχομένως να ασκεί κάποια προστατευτική δράση στην UC καθώς ασθενείς ξεκινούν να εμφανίζουν συμπτώματα μετά τη διακοπή του. Αντίθετα, στην

CD, εμφανίζεται ως προδιαθεσικός παράγοντας και για τον λόγο αυτό συνίσταται η άμεση διακοπή του (23,24,25).

Τα άτομα που πάσχουν από UC δεν παρουσιάζουν μεγαλύτερη θνησιμότητα από αυτή του γενικού πληθυσμού σε αντίθεση με τους ασθενείς με CD (4).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του ΕΜ είναι η διατροφή. Είναι γνωστό ότι τροφές φτωχές σε φυτικές ίνες επηρεάζουν αρνητικά τη σύσταση του ΕΜ και την παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών όπως τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου τα οποία παρουσιάζουν ανοσορρυθμιστική δράση. Η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων και πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην εξέλιξη των ασθενειών. Κατανάλωση τροφών με υψηλή διαιτητική πρόσληψη, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), ωμέγα-6 και κρέατος συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο CD και UC. Υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών και φρούτων σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης CD και υψηλή πρόσληψη λαχανικών με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης UC (47). Όσον αφορά τους ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, συνιστάται η ακολούθηση ενός υγιεινού, πλήρους και ισορροπημένου διατροφικού προγράμματος. Υπάρχει η άποψη (αν και δεν έχει τεκμηριωθεί) πως τρόφιμα τα οποία περιέχουν επεξεργασμένη ζάχαρη, είναι χαμηλά σε φυτικές ίνες, φρούτα και λαχανικά σχετίζονται με την αύξηση της εμφάνισης των νόσων ανεξαρτήτως της γεωγραφικής περιοχής. Συχνά παρατηρείται έλλειψη σε θρεπτικά στοιχεία λόγω της μειωμένης ικανότητας του εντέρου να τα απορροφήσει σωστά (2,7,14,17,19,21,23,25), (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Δίαιτα, μικροβιακή σύνθεση και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (19).

1.4 Νόσος Crohn

Η νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του τοιχώματος του πεπτικού σωλήνα. Είναι δυνατό να προσβληθεί οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, από τη στοματική κοιλότητα έως το απευθυσμένο, αλλά κυριότερα προσβάλλει τον άνω ειλεό και το κόλον (2,5,21). Χαρακτηριστικό γνώρισμα αποτελεί το βάθος διηθήσεως της φλεγμονώδους διεργασίας στο εντερικό τοίχωμα ενώ υπάρχει και πιθανότητα έκτασης της σε όλες τις στιβάδες του εντερικού τοιχώματος (23,25).

Μελέτες έχουν δείξει πως η μη λειτουργία των μονοπατιών αυτοφαγίας ενδεχόμενα σχετίζεται με τη νόσο (14). Γίνεται συμπτωματική όταν οι τραυματισμοί είναι εκτενείς ή ανήκουν στην ανώτερη επιφάνεια των κυττάρων, όταν σχετίζονται με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση ή όταν εμπλέκονται με στενώσεις, αποστήματα ή συρίγγια (4,23,25).

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η ανομοιόμορφη διατοιχωματική φλεγμονή (17). Τα συνηθέστερα συμπτώματα είναι: πόνος, διαρροϊκές κενώσεις, συχνή ανάγκη για τουαλέτα, μείωση της όρεξης, απώλεια βάρους, πυρετός, κόπωση, στοματικά έλκη και πρωκτικές σχισμές («ανοίγματα» του περιπρωκτικού δέρματος).

Σε άτομα υψηλής σοβαρότητας μπορούν να παρατηρηθούν επιπλοκές όπως: στένωση (περιορισμός τμήματος του εντέρου λόγω σχηματισμού ουλής), διάτρηση (μικρή οπή στο τοίχωμα του εντέρου από όπου μπορεί να γίνει έκχυση και να δημιουργηθεί λοίμωξη) ή δημιουργία συριγγίων (σχηματισμός επικοινωνίας ανάμεσα σε δύο μέρη του εντέρου, επιτρέποντας έτσι διαφυγή εντερικού περιεχομένου). Ενώ πιθανά συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου (4,21,23,24,25).

Χορηγούνται φάρμακα, η δράση των οποίων επικεντρώνεται στην καταστολή του ανοσοποιητικού και στη μείωση της έντασης των συμπτωμάτων. Αν τα άτομα βρίσκονται σε περίοδο έξαρσης χορηγούνται κορτιζονούχα δισκία είτε αντιμικροβιακοί παράγοντες. Αν δεν υπάρξει βελτίωση της κατάστασης τότε συνιστάται η αντι-TNF θεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση χρησιμοποιείται ως θεραπεία, εάν η φαρμακευτική αγωγή αποδειχθεί μη αποτελεσματική. Ωστόσο δεν αποτελεί ίαση καθώς, με το πέρασ του χρόνου, υπάρχει πιθανότητα προσβολής άλλου τμήματος του πεπτικού σωλήνα. Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να κρατήσει από εβδομάδες έως χρόνια. Οι επιφανειακές βλάβες, και ειδικότερα, τα αφθώδη έλκη, είναι τα πιο εύαλωτα στην επιβάρυνση από τη νόσο, τα βαθιά έλκη και τα συρίγγια ενδέχεται να επουλωθούν ενώ οι στενώσεις είναι οριστικές (16,17,21).

1.5 Ελκώδης κολίτιδα

Η ελκώδης κολίτιδα αποτελεί μια πάθηση η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή της εσωτερικής επιφάνειας του κόλον (παχύ έντερο) ή του ορθού, με παλινδρομικό μοτίβο, και απουσία μικροοργανισμών και παρασίτων από τα κόπρανα. Ερεθίζεται ο βλεννογόνος με αποτέλεσμα σε κάποια σημεία να διασπαστεί και να αιμορραγήσει, δημιουργώντας έτσι έλκη. Λόγω της εκδηλούμενης φλεγμονής, δεν γίνεται σωστή απορρόφηση νερού. Επιπρόσθετα, παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες βλέννας, με πύον, το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη ενεργητικότητα του εντέρου, με τη μορφή διάρροιας. Με κυριότερα αποτελέσματα την έντονη ανάγκη για αφόδευση, αιματηρές διάρροιες καθώς και την κόπωση (2,4,17,21,22,23). Στην πλειονότητα της παραμένει εντοπισμένη στην έκταση της αρχικής προσβολής. Ενδεχόμενα, με το πέρασ του χρόνου, να επεκταθεί και σε άλλα σημεία (23).

Η ένταση εξαρτάται από το τμήμα του προσβεβλημένου εντέρου και την έκταση της φλεγμονής, ενώ παρουσιάζονται ποικίλα συμπτώματα στις περιόδους έξαρσης. Υπάρχει περίπτωση να παρατηρηθούν ελάχιστα συμπτώματα χωρίς ιδιαίτερη εκδήλωση έως και εξαιρετικά σοβαρά και αιφνίδια συμπτώματα κολίτιδας τα οποία μπορεί να αποβούν μοιραία για την ίδια τη ζωή του ασθενούς, εάν δεν υποχωρήσουν με θεραπεία ή με κολεκτομή. Οι βλάβες είναι διάχυτες και επιφανειακές. Βαθιά έλκη παρατηρούνται μόνο σε σοβαρές περιπτώσεις.

Σε άτομα σοβαρής βαρύτητας μπορούν να παρατηρηθούν επιπλοκές, όπως: διάταση (υπάρχει κίνδυνος ακόμη και ρήξης), διάτρηση του εντέρου ή έντονη αιμορραγία. Πιθανόν να συμβάλλει στην αύξηση της εμφάνισης του καρκίνου παχέος εντέρου.

Η προσβολή του κατώτερου τμήματος του εντέρου μπορεί να αντιμετωπισθεί με χορήγηση φαρμάκων με τη μορφή υπόθετου ή υποκλυσμού. Η χειρουργική αφαίρεση του κατώτερου τμήματος του εντέρου λαμβάνεται ως ίαση. Το χειρουργείο κρίνεται ως απαραίτητο, εάν η φαρμακευτική αγωγή δεν φέρει κανένα αποτέλεσμα και εάν το πρόβλημα κριθεί ως επείγον (οξεία κολίτιδα όπου η συμπτωματολογία είναι πολύ έντονη και σοβαρή). Η πιθανότητα επανεμφάνισης σχετίζεται με το κατά πόσο έχει θεραπευθεί ο βλεννογόνος του εντέρου (4,17,21,22,23).

Κεφάλαιο 2. Εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα που ανήκουν σε όλες τις μορφές της κυτταρικής ζωής (αρχαία, βακτήρια, ευκάρυα) αλλά και από ιούς (βακτηριοφάγοι, ιοί ζωικών κυττάρων) που αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα και δημιουργούν ένα από τα πιο πυκνά

οικοσυστήματα (10^{11} - 10^{12} κύτταρα/γραμμάριο περιεχομένου του εντέρου). Βρίσκονται σε διαρκή επικοινωνία με τον ανθρώπινο οργανισμό και λαμβάνουν μέρος σε σημαντικές διεργασίες, τις οποίες δεν μπορεί να τις τελέσει μόνος του. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, την κατάσταση του ανοσοποιητικού, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τη διατροφή, τη χρήση αντιβιοτικών, την επαφή με μικρόβια του περιβάλλοντος και άλλα. Μετά τα δύο πρώτα έτη της ζωής του ανθρώπου οι μικροοργανισμοί σταθεροποιούνται και χαρακτηρίζουν το κάθε άτομο ενώ μεταβολές παρατηρούνται και μετά τα εξήντα έτη (2,4,14,26).

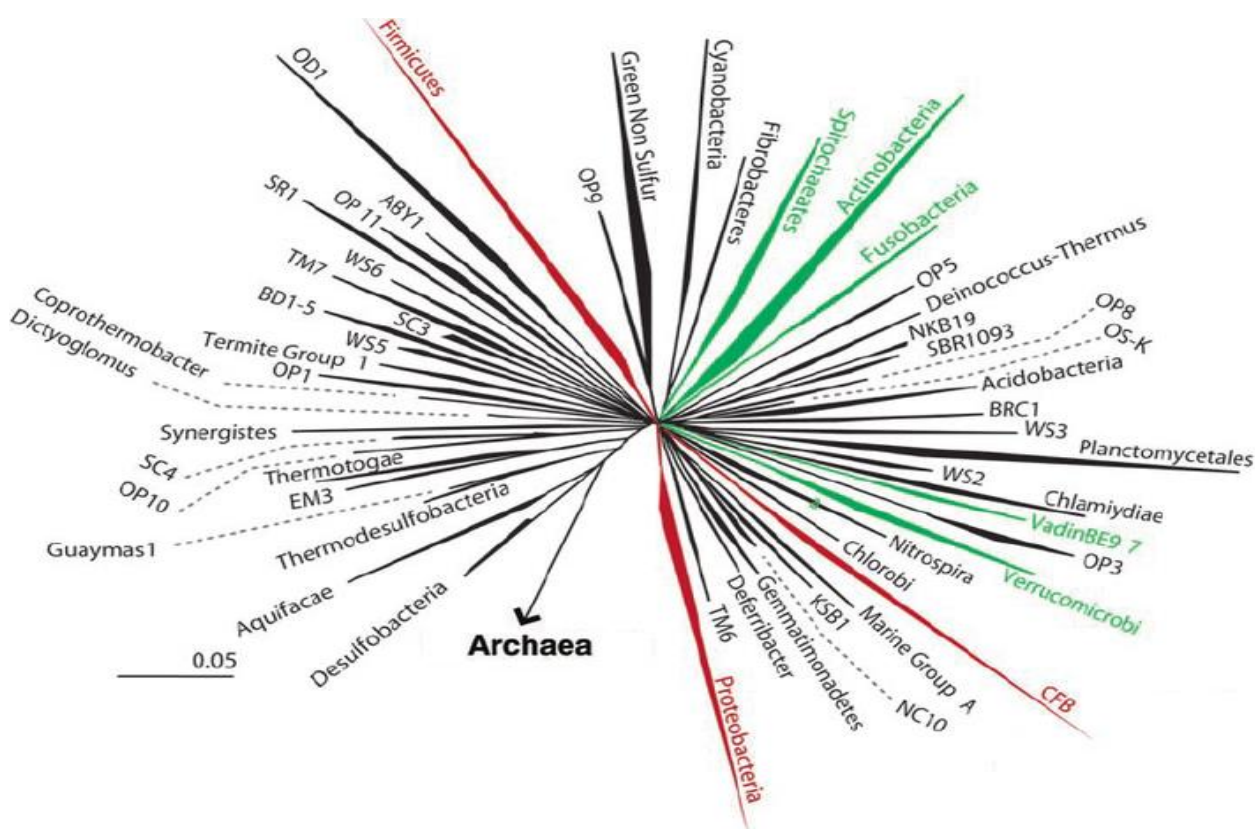
Υπάρχει μια σχέση «αλληλοβοήθειας» και ανοχής μεταξύ βακτηρίων εντέρου. Ο ξενιστής παρέχει στους μικροοργανισμούς ένα σταθερό περιβάλλον (συγκεκριμένη θερμοκρασία και pH) καθώς και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται προκειμένου να μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να τελέσουν τις λειτουργίες τους (5,6,17). Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την εντερική ανοχή περιλαμβάνουν μηχανισμούς που ελαχιστοποιούν την έκθεση και την αναγνώριση των μικροοργανισμών του εντέρου από το ανοσοποιητικό, αλλά και μηχανισμούς που καταστέλλουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις μέσω ενδοκυτταρικών αλλά και δια-κυτταρικών οδών (όπως η ρύθμιση και η ανταπόκριση των PRRs), (13,26,27).

2.1 Βλεννογόνος και εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο βλεννογόνος του εντέρου βρίσκεται στην επιφάνεια ανάμεσα στον μικροβιόκοσμο και στους γαστρεντερικούς λεμφοειδείς ιστούς. Λειτουργεί ως μέσο επικοινωνίας και ως φυσικό εμπόδιο μεταξύ των μικροοργανισμών, των μεταβολικών τους προϊόντων και των αντιγόνων, προκειμένου να μην υπάρξει επαφή με τα κύτταρα του οργανισμού και επιτραπεί η ανεξέλεγκτη είσοδος τους. Επίσης επιτρέπει την εκλεκτική απορρόφηση θρεπτικών. Η ακεραιότητα του φραγμού αυτού επηρεάζεται από διάφορα στοιχεία όπως είναι η άμεση ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, η επιθηλιακή παρακυτταρική διαπερατότητα, η ακεραιότητα των επιθηλιακών κυττάρων και η παραγωγή βλέννας. Η διαπερατότητα του ρυθμίζεται από την ύπαρξη στενών δεσμών (tight junctions-TJs), μεγάλα μοριακά σύμπλοκα που μαζί με ενώσεις προσφύσεως (adherens junctions-AJs), συνδέουν τα επιθηλιακά κύτταρα μεταξύ τους και σφραγίζονται έτσι τα μεσοκυττάρια διαστήματα της επιφανείας του αυλού, ρυθμίζοντας το μοριακό πέρασμα μέσω των παρακυτταρικών διαστημάτων. Επίσης, τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν το στρώμα βλέννας που καλύπτει όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, του οποίου ο ρόλος είναι να προστατεύει περαιτέρω την επιφάνεια του βλεννογόνου από επιβλαβή μόρια και μικροοργανισμούς, και να ενισχύεται έτσι, το σύνολο του φραγμού (45). Η επικοινωνία που υφίσταται είναι σημαντική προκειμένου να διατηρείται η ομοιόσταση του οργανισμού. Επίσης, βοηθά το ανοσοποιητικό

σύστημα στον διαχωρισμό των μικροβιακών παθογόνων από τους συμβιωτικούς οργανισμούς. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμπλέκονται σε μονοπάτια παραγωγής και απελευθέρωσης μορίων με αντιμικροβιακή δράση, όπως είναι οι χημειοκίνες (6,14,15,45).

Στους ενήλικες ένα μεγάλο μέρος του όγκου του παχέος εντέρου αποτελείται από βακτήρια, αρχαία και ευκάρυα. Το 99% των βακτηρίων (που είναι και η επικρατέστερη ομάδα) ανήκει σε μια από τις 4 μεγάλες υποδιαιρέσεις (Φύλα): *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* και *Actinobacteria*. Τα κυριότερα υποχρεωτικά αναερόβια γένη είναι τα *Bacteroides* (κάποια παρουσιάζουν προφλεγμονώδη δράση), *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* και *Clostridium*. Στα προαιρετικά αερόβια ανήκουν κυρίως τα εντεροβακτήρια, όπως το *Escherichia coli* (*E. coli*), ενώ υπάρχουν και οι εντερόκοκκοι. Από το φύλο *Firmicutes* οι ομάδες των *Clostridium XIV* και *IV* (*C.septum* και *C.coccoides* αντίστοιχα) παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του βλεννογόνου. Επίσης στο ίδιο φύλο ανήκουν γένη των *Streptococcaceae* και *Lactobacillales* ενώ στελέχη των *Actinomycinaeae*, *Corynebacteriaeae*, *Collinsella aerofaciens* ή *Propionibacteria* ανήκουν στα Ακτινοβακτήρια (3,5,7,9,10,11,12,27). Επιπρόσθετα, έχουν ανιχνευτεί στελέχη που ανήκουν στα γένη *Cytophaga* και *Flavobacterium* (Εικόνα 5). Τα αρχαία που υπάρχουν στον πεπτικό σωλήνα, όπως το *Methanobrevibacter smithii*, συνεργάζονται με τα βακτήρια, χρησιμοποιώντας για τις λειτουργίες τους το H_2 , που παράγεται κατά την διαδικασία της ζύμωσης (17,26,27).



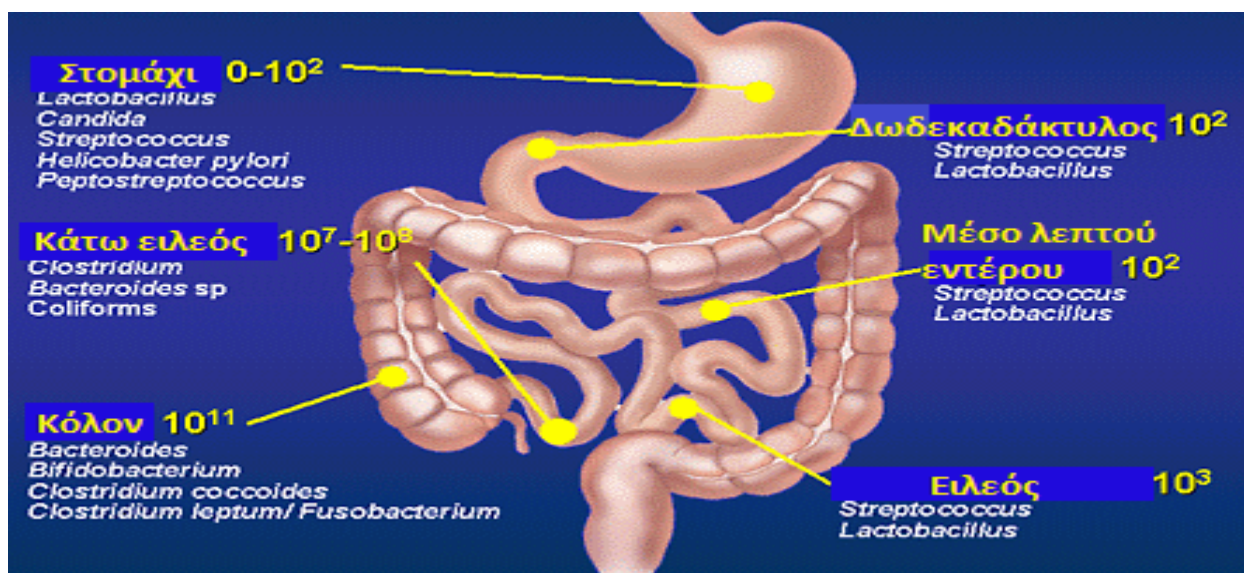
Εικόνα 5: Αναπαράσταση της βιοποικιλότητας των βακτηρίων του ανθρώπινου εντέρου. Φυλογενετικό δέντρο των κυρίαρχων βακτηρίων (27).

2.2 Λειτουργίες μικροοργανισμών

Ο ΕΜ παίρνει μέρος στη ζύμωση των άπεπτων θρεπτικών συστατικών που καταλήγουν στο παχύ έντερο, στην απορρόφηση θρεπτικών, στην κινητικότητα του εντέρου ενώ παράγει διάφορα μεταβολικά προϊόντα, με κυριότερα τα οργανικά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFA) όπως το βουτυρικό (αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου) και παράγει βιταμίνες όπως η Κ. Ακόμη, μεταβολίζει ξενοβιοτικά συστατικά, βοηθά στην απορρόφηση μετάλλων, μετέχει στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού ενώ βοηθά στην καταστροφή τοξινών και μεταλλαξιογόνων παραγώγων.

Οι μικροοργανισμοί συμμετέχουν στην παθητική άμυνα του ξενιστή ενάντια στους παθογόνους, λόγω του ανταγωνισμού που εμφανίζουν τόσο σε επίπεδο θέσεων προσκόλλησης όσο και θρεπτικών συστατικών. Κάποια στελέχη από τα γένη *Bacteroides* και *Clostridium* προάγουν την εξάπλωση των Τ κυττάρων με αποτέλεσμα να μειώνουν τη φλεγμονή και, τέλος, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί βοηθούν την εξασθένηση της φλεγμονής μέσω της ρύθμισης ενεργοποίησης πυρηνικών παραγόντων (NF-kB), (2,14,26,27).

Στελέχη, όμως, του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να είναι ευκαιριακά παθογόνα και να οδηγήσουν στην εμφάνιση λοιμώξεων αλλά και να εμφανίσουν καρκινογόνο δράση μετατρέποντας προ-καρκινικές ενώσεις σε καρκινογόνα συστατικά. Επίσης κάποια από αυτά πιθανά να ευθύνονται για αντιδράσεις υπερευαισθησίας του ξενιστή (4,6).



Εικόνα 6: Σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου υγιούς ανθρώπου (11).

Τα συμβιωτικά βακτήρια ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια αντίδρασης που περιλαμβάνουν επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα και Β κύτταρα του

πλάσματος τα οποία επιτρέπουν την συνύπαρξη με πιθανά τοξικά μικροβιακά προϊόντα. Οι παραπάνω μηχανισμοί εξαρτώνται από την υπολειτουργία των βακτηριακών υποδοχέων, προάγοντας συγκεκριμένα μόρια που σταματούν την ανοσολογική απόκριση και διεγείρουν τα προστατευτικά μόρια που μεσολαβούν στην λειτουργία του φραγμού του βλεννογόνου. Η βακτηριακή αναγνώριση εξαρτάται από την διαμεμβρανική αναγνώριση των υποδοχέων που περιλαμβάνουν τους ομόλογους υποδοχείς Toll-like receptors (TLRs) και NOD-like receptors (NLRs), (υποδοχείς μονοπατιών στην αναγνώριση των βακτηρίων), (6,7,8,12,13,14,26,27). Έχει φανεί πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού του TLR5 αποτελεί πιθανό μηχανισμό με τον οποίο τα προσκολλημένα παθογόνα στελέχη του *E.coli* (AIEC) επιδεινώνουν τη φλεγμονή και επάγουν τη κολίτιδα (45).

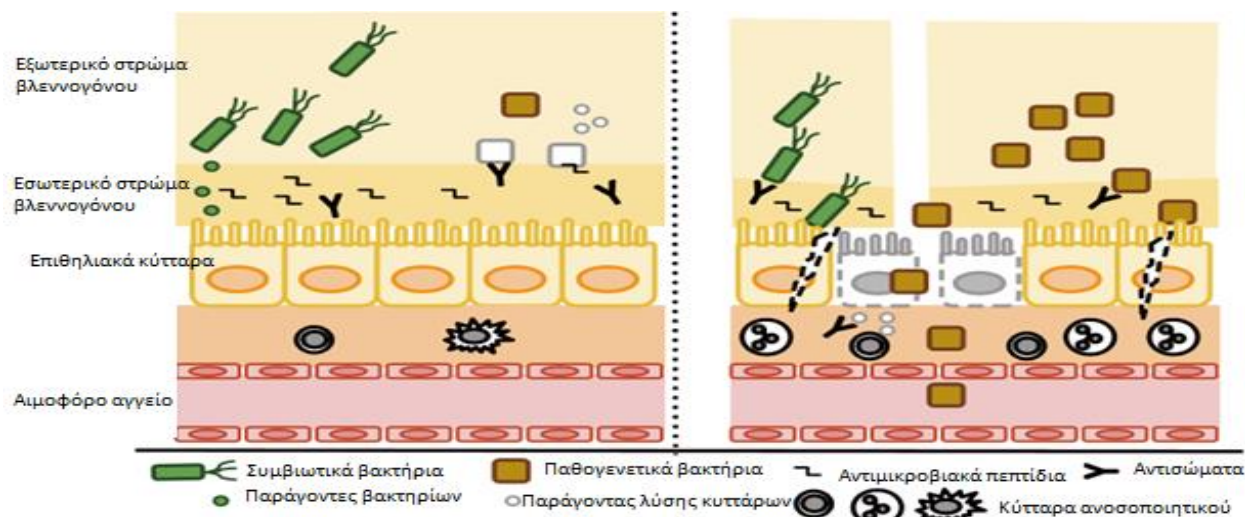
Κεφάλαιο 3. Μικροοργανισμοί και νόσοι

Η αιτία εμφάνισης των συγκεκριμένων φλεγμονωδών νοσημάτων δεν έχει αποδειχτεί. Ωστόσο, θεωρείται πως παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση, περιλαμβάνουν διαταραχή της ισορροπίας του πληθυσμού του εντερικού μικροβιόκοσμου, των μεταβολιτών τους, της ευαισθησίας καθώς και της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

Η πλειοψηφία των ερευνών καταδεικνύει την άμεση σύνδεση του ξενιστή με τον εντερικό μικροβιόκοσμο καθώς:

1. Μελέτες, σε πειραματόζωα, επιβεβαιώνουν συμμετοχή μικροοργανισμών στη διαδικασία παθογένεσης. Πολλά βακτήρια έχουν συσχετιστεί με τις νόσους, οι οποίες συμβαίνουν σε περιοχές όπου συναντάται η μεγαλύτερη συγκέντρωση μικροβίων
2. υπάρχει αυξημένη εισβολή και μετατόπιση μικροοργανισμών λόγω μειωμένης λειτουργίας του εντερικού φραγμού, κατά την περίοδο των εξάρσεων
3. πειράματα, που περιλαμβάνουν εκτροπή κοπράνων (fecal stream diversion), απέτρεψαν την επαναδημιουργία της CD στον τελικό ειλεό, αλλά είχαν ως επακόλουθο, την έκχυση εντερικών περιεχομένων σε τμήματα τα οποία είχαν παρακαμφθεί, συμβάλλοντας πιθανόν, στην εμφάνιση ξανά της νόσου
4. οι συσχετιζόμενοι, με τις ασθένειες, μικροοργανισμοί, χαρακτηρίζονται από αλλαγές στη βιοποικιλότητά τους, εντός του εντέρου
5. έχει βρεθεί ενισχυμένη δράση του *E.coli*, καθώς φέρει παράγοντες, οι οποίοι αυξάνουν την ικανότητα του να προσκολλάται σε νέες εσοχές και έτσι να προκαλεί ασθένεια, ιδιαίτερα στην CD

6. οι διαταραγμένοι μεταβολίτες (λόγου χάρη ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός του βουτυρικού οξέος) συμβάλλουν στην παθογένεση
7. διάφορα προβιοτικά προϊόντα ίσως είναι κατάλληλα για να προωθήσουν την μείωση της έντασης των συμπτωμάτων και να συμβάλλουν με θετικό τρόπο στην μη επαναδημιουργία της UC
8. ενεργοποιούνται ορολογικές και αντιδράσεις T κυττάρων εναντίον μικροβιακών αντιγόνων σε ασθενείς
9. ορισμένα αντιβιοτικά πιθανότατα να βοηθούν και να διατηρούν την καταστολή των νόσων
10. διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή ή ο τρόπος ζωής επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση του ΕΜ με αποτέλεσμα να συμβάλλουν έτσι στην εκδήλωση της ασθένειας και τέλος,
11. η υπαιτιότητα συγκεκριμένων γενετικών θέσεων που σχετίζονται με τη μη φυσιολογική αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (όπως η NOD2, η διαφοροποίηση T-λεμφοκυττάρων, η αυτοφαγία και η διατήρηση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού) σχετίζονται στενά με την νόσο και αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες προκειμένου να ρυθμιστεί η εντερική ομοιόσταση (42). Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας NOD2 αναγνωρίζει συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και προκαλεί ανοσολογική αντίδραση. Μετάλλαξη σε αυτή τη θέση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων μικροοργανισμών στο επιθήλιο. Έτσι, επάγεται μικρότερη παραγωγή αντιφλεγμονωδών ουσιών. Η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων επηρεάζει τόσο τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων του εντέρου όσο και την προδιάθεση του ξενιστή για τη δημιουργία φλεγμονής, σχετίζονται κυρίως με την επικοινωνία μεταξύ ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και των μικροοργανισμών (Εικόνα 7), (2,4,6,7,13,15,26).



Εικόνα 7: Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-βακτηρίων. Αριστερά: υγιές άτομο, δεξιά: ασθενής με IBD (9).

3.1 Ευκαιριακά παθογόνα και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Παρά το πλήθος των ερευνών, δεν έχει αποδειχθεί ακόμη, η παθογόνος ικανότητα συγκεκριμένων μικροοργανισμών που να τα συνδέει με τις φλεγμονώδεις νόσους. Έχουν, όμως, αναγνωριστεί βακτήρια, μύκητες και ιοί που πιθανά σχετίζονται καθώς σε περιόδους εξάρσεων υπάρχουν σε αυξημένους πληθυσμούς και έρχονται σε επαφή με τον βλεννογόνο. Παθογόνα μπορούν να προκαλέσουν εντερική φλεγμονή σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα με διάσπαση του φραγμού βλεννογόνου και επακόλουθη αύξηση της μετατόπισης των αντιγόνων του αυλού, της μίμησης των ίδιων των αντιγόνων του οργανισμού, και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του βλεννογόνου από τη διαφοροποίηση των παραγόντων μεταγραφής: όπως του NF-kB (41). Πιο συγκεκριμένα, το *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) αποικίζει τον βλεννογόνο του ειλεού σε ασθενείς με CD, εισβάλλει στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας βλάβες στους ιστούς, φλεγμονή και συσχετίζεται με τη νόσο.

Το *Escherichia coli* αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα προαιρετικά αερόβια βακτήρια του κόλον. Έχει βρεθεί σε μεγάλα ποσοστά περιττωμάτων και βλέννας ασθενών με IBD (46). Το *E. coli* LF82 έχει απομονωθεί από τον ειλέο ασθενών με CD, ενώ πολλές μελέτες καταδεικνύουν υψηλή επικράτηση του βακτηρίου adherent-invasive *E. coli* (AIEC), σε προσβεβλημένες περιοχές (κυρίτερα στον βλεννογόνο του ειλεού σε ασθενείς με CD) με αποτέλεσμα να ενισχύεται η άποψη ότι συμβάλλει στην παθογένεση. Παρά τον «επιθετικό» τους φαινότυπο παρουσιάζουν έλλειψη των δομικών στοιχείων που συνδέονται με την παθογένεια και ανιχνεύονται στα αντίστοιχα παθογόνα στελέχη και διαθέτουν ποικιλία αντιγόνων και φυλοτύπων, γεγονός που δυσκολεύει τη σύνδεση κάποιου συγκεκριμένου στελέχους με την έξαρση της ασθένειας (44). Η αύξηση του πληθυσμού του AIEC οφείλεται στην μη ικανότητα του βλεννογόνου να ελέγξει την μόλυνση λόγω μειωμένης έκκρισης αντιμικροβιακών πεπτιδίων (3,6,7,15,26). Το AIEC προσδένεται ισχυρά στο επιθήλιο του βλεννογόνου και εισέρχεται εντός των κυττάρων όπου και πολλαπλασιάζονται. Σημαντική αποτελεί η ικανότητά τους να μπλοκάρουν την παραγωγή της ιντερφερόνης-γ₁ η οποία αποτελεί άμυνα του οργανισμού (44). Επίσης, προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, από τα μολυσμένα μακροφάγα, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στον περαιτέρω αποικισμό ή την έναρξη της φλεγμονής. Από την επαφή του AIEC με τα επιθηλιακά κύτταρα προάγεται η φλεγμονή και προκαλείται μετακίνηση λευκοκινών και δενδριτικών κυττάρων σε διαφορετικές θέσεις. Με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται το επιθηλιακό στρώμα επιτρέποντας στα βακτήρια να διαπεράσουν τον εντερικό φραγμό και να διεισδύσουν στο γαστρεντερικό επιθήλιο (7). Οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης παραμένουν ακόμη άγνωστοι.

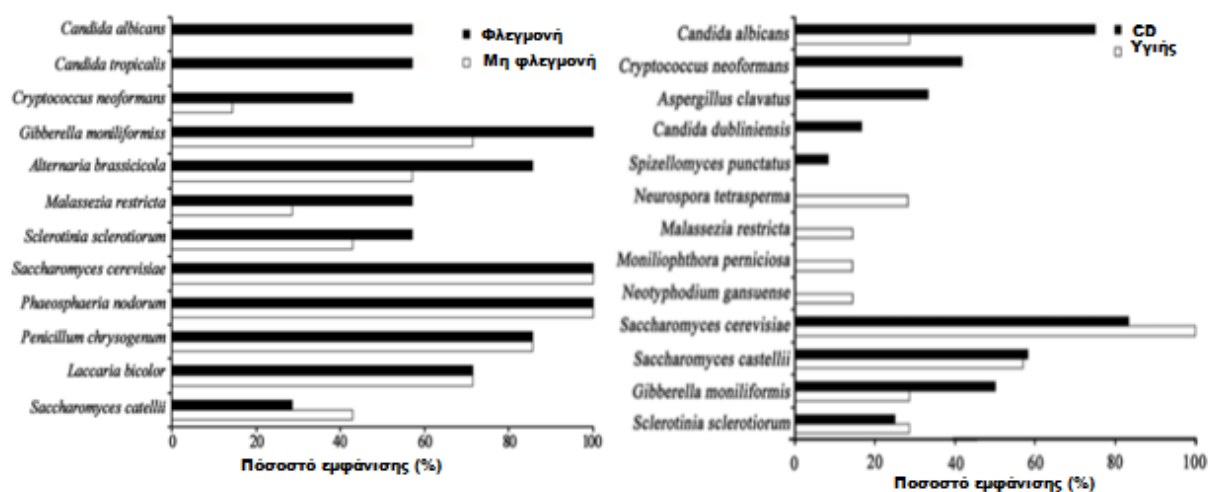
Το γένος *Fusobacterium* ανήκει στα Gram αρνητικά αναερόβια βακτήρια, που δεν δημιουργεί σπόρια, και αποικίζει την στοματική κοιλότητα. Μπορεί να βρεθεί προσκολλημένο και στο επιθήλιο. Έχει παρατηρηθεί σε μεγάλες ποσότητες στον βλεννογόνο ασθενών με UC και σχετίζεται θετικά με την παθολογία των νόσων, είτε λόγω της επιθετικής του ικανότητας, είτε γιατί έχουν βρεθεί μια σειρά παθογόνων χαρακτηριστικών που αφορούν το έντερο. Μελέτη έχει δείξει πως τα συμπτώματα από την προσβολή του *Fusobacterium* στο έντερο είναι κυρίως το αποτέλεσμα της δράσης των άλλων παθογόνων που συναθροίζονται μαζί του (40). Επίσης προάγει την έκκριση της προφλεγμονώδους χημειοκίνης IL-8, στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του στόματος (2,40). Στελέχη του *F. nucleatum* εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης στο έντερο, σύμφωνα με το μοντέλο οδηγών – επιβατών μικροοργανισμών που έχει προταθεί για την περιγραφή του φαινομένου της δυσβίωσης που δημιουργείται (43).

Επιπρόσθετα, συχνά παρατηρείται μόλυνση από *Clostridium difficile* (CDI), ενώ λόγω της σχετικής ομοιότητας των συμπτωμάτων είναι δύσκολος ο διαχωρισμός μεταξύ της ασθένειας που προκαλείται από το CDI και των φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου. Λόγω του CDI πιθανά να ξεκινά η εντερική προφλεγμονώδης αντίδραση με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται ή να επιδεινώνονται οι συγκεκριμένες εντερικές ασθένειες. Επίσης, έχει βρεθεί η δράση διαφόρων εντεροπαθογόνων ειδών του γένους *Helicobacter* όπως τα *H.hepaticus*, *H.bilis* και άλλα (15).

Επιπρόσθετα, από ανοσολογικό έλεγχο έχουν παρατηρηθεί θετικές αντιδράσεις και για βακτήρια όπως το *Pseudomonas fluorescense* (6,7,8,11,12,14,17). Μελέτες καταδεικνύουν μια σειρά εξωγενών μικροοργανισμών που ίσως σχετίζονται όπως η *Yersinia enterocolitica* και *Y.pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* και το θερμόφιλο *Campylobacter* (7,12,14,15).

Υπάρχει και η θεωρία της πιθανής συμμετοχής μυκήτων στην παθογένεση, και ιδιαίτερα για την CD, παρά το γεγονός ότι καλύπτουν μόνο ένα μικρό τμήμα της μικροβιοκόσμου (10^6 g^{-1} κοπράνων ενώ τα βακτήρια καταλαμβάνουν 10^{12} g^{-1}). Anti-*Saccharomyces cerevisiae* αντισώματα (ASCAs) που χρησιμοποιούνται ως δείκτης για την CD παράγονται και από τη *Candida albicans*, η οποία μπορεί να απομονωθεί σε μεγάλα ποσοστά από το έντερο ασθενών. Μεγάλες συγκεντρώσεις *C. albicans*, *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicicola*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus clavatus* και *C. neoformans* υπάρχουν στα κόπρανα και τον βλεννογόνο του εντέρου των νοσούντων, ενώ τα συμπτώματα και η φλεγμονή υποχωρούν μετά από αντιμυκητιασική θεραπεία (4,6,7,14,18). Η μυκητιακή βιοποικιλότητα σχετίζεται αντίστροφα με την βακτηριακή στο γαστρεντερικό σωλήνα. Πιο συγκεκριμένα υπάρχει μεγάλη αύξηση της στις προσβεβλημένες περιοχές. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη σύσταση και τη

βιοποικιλότητα των μυκήτων σε ασθενείς και υγιείς. Διαφορές εντοπίστηκαν επίσης στο μυκητιακό περιεχόμενο του εντέρου και μεταξύ των δύο φλεγμονωδών νόσων (CD, UC), (18).



Εικόνα 8: Αριστερά: Συχνότητα των ειδών των μυκήτων σε προβεβλημένες και μη περιοχές, δεξιά: Συχνότητα ειδών μυκήτων σε δείγματα περιττωμάτων ασθενών με CD και υγιών ανθρώπων (18).

Οι περισσότεροι μύκητες, που εντοπίστηκαν, ανήκουν στις τάξεις των *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina* και *Basidiomycota*. Στις φλεγμονώδεις περιοχές, όπου προκύπτει ανταγωνισμός με τους βακτηριακούς πληθυσμούς, εντοπίστηκε μεγάλη συγκέντρωση *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicicola* και *Cryptococcus neoformans*. Οι *Saccharomyces cerevisiae* και *S. castellii* ανιχνεύθηκαν σε μικρότερους αριθμούς στις πάσχουσες περιοχές σε σχέση με τις μη πάσχουσες. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η αύξηση αυτή του αριθμού τους είναι αποτέλεσμα της βακτηριακής δυσβίωσης λόγω της ασθένειας. Έτσι, προκαλείται ανισορροπία του μικροβιακού οικοσυστήματος που μπορεί να οδηγήσει στις φλεγμονώδεις νόσους (6,7,8,11,12,14,17,18).

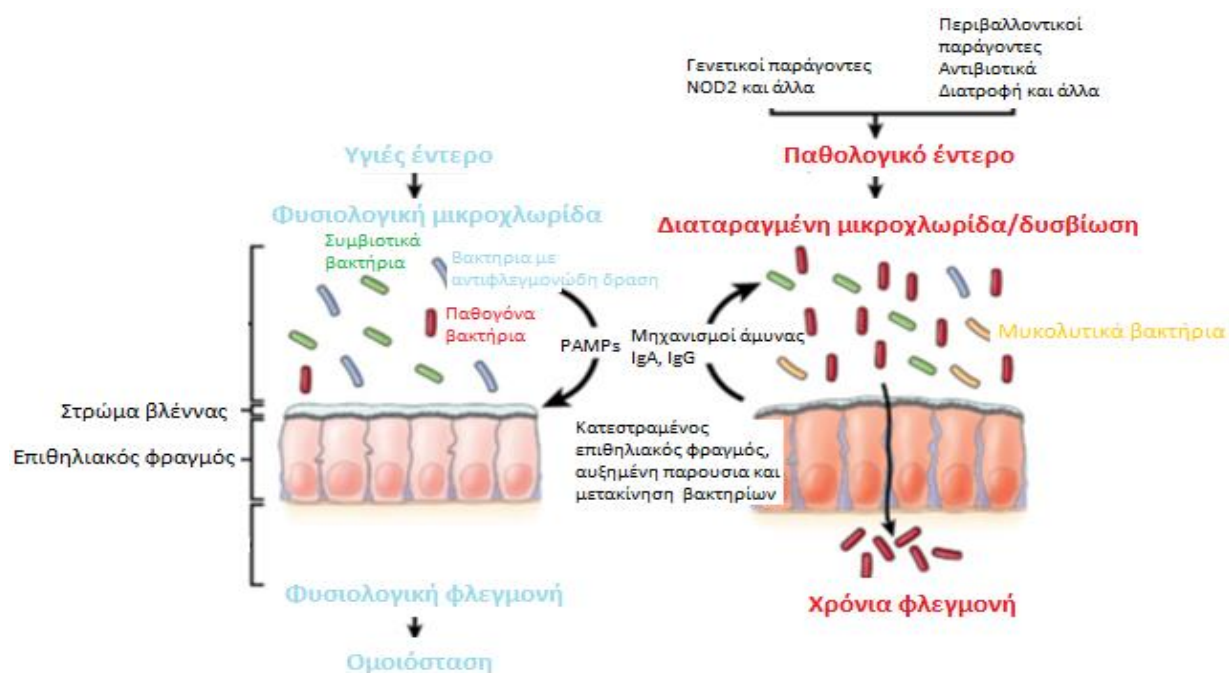
Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με IBD. Αριστερά: πιθανοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, δεξιά: μικρόβια με πιθανή προστατευτική δράση (7).

Πιθανά παθογόνος δράση	Πιθανά προστατευτική δράση
<i>Adherent-invasive Escherichia coli</i> ↑ βλεννογόνο ειλεού CD και σε κόλον CD και UC <i>Fusobacterium</i> ↑ σε ενεργή θυλακίτιδα UC <i>Fusobacterium varium</i>: ↑ UC (προσκόλληση και εισβολή των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου) <i>Fusobacterium nucleatum</i>: ↑ σε βλεννογόνο ενηλίκων IBD και νεοδιαγνωσθέντα παιδιά με CD <i>Campylobacter concisus</i> ↑ σε παιδιατρικό CD, ενηλίκων CD και UC <i>Desulfovibrio</i> - Συνδέεται με μειωμένη ύπαρξη θείου στη βλέννα και συσχετίζεται με φλεγμονή του βλεννογόνου στη UC <i>Klebsiella</i> - Συνδέεται με CD <i>Enterohepatic Helicobacter</i> ↑ σε βλεννογόνο σε UC και CD <i>Ruminococcus gnavus</i>: αμφιλεγόμενο ↑ στα κόπρανα σε CD (βλεννολυτικές ιδιότητες) ↓ στον βλεννογόνο νεοδιαγνωσθέντων παιδιών CD <i>Clostridium difficile</i> ↑ κίνδυνος αποικισμού / λοίμωξης στην IBD - Παιδιά με IBD στη διάγνωση: σημαντικά ↑ επικράτηση - Παιδιά με IBD: 10 φορές συνηθέστερα έναντι κοιλιακής νόσου. Συσχετίζεται με την σοβαρότητα της IBD <i>Veillonella</i> ↑ στην βλεννογόνο νεοδιαγνωσθέντων παιδιών με CD και σχετίζεται με τη χειρότερη έκβαση της κλινικής έκβασης ↑ στην μετεγχειρητική επανεμφάνιση της CD <i>Cytomegalovirus</i> - Επανεμφάνιση που σχετίζεται με χειρότερη έκβαση στην κολίτιδα IBD <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> - Προτεινόμενη σύνδεση με CD (αμφίβολη)	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i> ↓ σε βλεννογόνο ειλεού σε νεοδιαγνωσθέντα παιδιά με CD και στα κόπρανα ενηλίκων με CD και UC ↓ σε βλεννογόνο ειλεού σε μετεγχειρητική επανεμφάνιση CD ↓ σε βλεννογόνο υγιών αδελφών ασθενών με CD ↓ επίπεδα που σχετίζονται με υποτροπή μετά από infliximab σε CD <i>Clostridium clusters IV and XIVa</i> ↓ σε βλεννογόνο ειλεού σε CD και σε κόπρανα σε ενεργή CD και UC <i>Roseburia</i>: ↓ σε βλεννογόνο ενηλίκων με CD και UC και νεοδιαγνωσθέντων παιδιών με CD <i>Roseburia hominis</i>: ↓ σε κόπρανα σε UC Ορισμένα είδη <i>Bacteroides</i>: ↓ σε βλεννογόνο σε ενήλικες με CD και UC και νεοδιαγνωσθέντα παιδιά <i>Odoribacter</i> (παραγωγή SCFAs): ↓ σε βλεννογόνο σε κόλον UC και ειλεό CD <i>Bifidobacterium</i> ↓ σε CD (νεοδιαγνωσμένα παιδιά, στον βλεννογόνο) και UC (στο βλεννογόνο και στα κόπρανα) <i>BF</i>. Εφήβων: ↓ σε δείγματα κοπράνων σε CD <i>Anaerostipes</i> (παραγωγή βουτυρικού οξέος) ↓ σε καπνιστές <i>Dorea, Butyricicoccus, Coriobacteriaceae</i> ↓ σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά

3.2 Διαταραχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στις νόσους

Ένας από τους ρόλους του ανοσοποιητικού είναι να ελέγχει τους υπάρχοντες μικροοργανισμούς και όταν ο αριθμός τους ξεπερνάει συγκεκριμένα όρια να ενεργοποιεί αντιμικροβιακούς μηχανισμούς (όπως παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων ή βλέννας, να γίνεται έλεγχος της μικροβιακής εισόδου και προσκόλλησης από την ανοσοσφαιρίνη A-IgA και άλλοι) προκειμένου να μην διαταραχθεί η ομοιόσταση (6,13).

Η συσχέτιση του διαταραγμένου μικροβιόκοσμου με τις νόσους έχει περιγραφεί μέσω ανάλυσης δειγμάτων κοπράνων με κλασσικές καλλιεργητικές τεχνικές, δειγμάτων από το βλεννογόνο του παχέος εντέρου, τμήματα προσβεβλημένων και μη ιστών καθώς και μικροοργανισμούς που έχουν ταυτοποιηθεί σε περιόδους ύφεσης και κρίσεων. Ασθενείς, σε σχέση με υγιείς εθελοντές, παρουσιάζουν λιγότερα βακτήρια με αντιφλεγμονώδεις δράσεις και περισσότερα με προφλεγμονώδεις. Επίσης, παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων στο επιθήλιο (Εικόνα 9), (6,7,8,26).



Εικόνα 9: Μικροβιόκοσμος, γενετικό περιβάλλον ξενιστή και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην παθογένεση της CD. Αριστερά: υγιείς άνθρωποι, δεξιά: ασθενείς με IBD (6).

Τα βακτήρια εισβάλλουν στα έλκη του βλεννογόνου και στα συρίγγια, στις περιόδους έξαρσης. Έχει εντοπισθεί γενετικό τους υλικό στα κοκκιώματα ενώ τα ίδια μπορούν να μετακινηθούν στον χώρο. Με τον τρόπο αυτό, διεγείρονται οι παθογενετικές ανοσολογικές αντιδράσεις, λόγω των αντιγόνων, με αποτέλεσμα να προκαλείται και να διαιωνίζεται η εντερική φλεγμονή σε άτομα με γενετική προδιάθεση (5).

Επίσης παρατηρούνται μεταβολές στον εντερικό μικροβιόκοσμο, με σημαντικότερη τη μείωση της βιοποικιλότητας των φύλων *Bacteroidetes* και *Firmicutes* (όπως μείωση του πληθυσμού του *Faecalibacterium prausnitzii* το οποίο εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες) τόσο στα περιττώματα όσο και στον βλεννογόνο των ασθενών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και την έναρξη της φλεγμονής (10). Οι πληθυσμοί των προστατευτικών βακτηρίων όπως των *Bacteroides* sp, *Eubacterium* sp., *Bifidobacterium* spp. και *Lactobacillus* sp., μειώνονται. Χαμηλά επίπεδα αυτών των

μικροοργανισμών έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή των ασθενειών. Διαφορές στον εντερικό μικροβιόκοσμο εμφανίζονται και μεταξύ των νόσων.

Παρατηρούνται διαφορές και στους μεταβολίτες των μικροβίων οι οποίοι ενδεχομένως να συμβάλλουν στην παθογένεση. Λόγου χάρη, το βουτυρικό οξύ μπορεί να παρέμβει στο μονοπάτι σηματοδότησης των προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Το βουτυρικό οξύ παράγεται από βακτήρια που ανήκουν στο *Clostridium cluster IV* (3). Έχει σημαντικό ρόλο καθώς μειώνει το pH, βοηθά στην αύξηση των συμβιωτικών βακτηρίων, συμμετέχει στην διατήρηση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού, έχει ρόλο στην ανοσολογική ρύθμιση, στις αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις καθώς και στη μείωση της πιθανότητας καρκινογένεσης (7,11). Επίσης, από μικροσκοπικές και ιστολογικές εξετάσεις κολονικού επιθηλίου ασθενών, έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις βλεννολυτικών βακτηρίων όπως τα *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques* και *Prevotella* εντερότυποι (7,8,14,15). Στη CD, έχει βρεθεί πως υπάρχουν αυξημένοι πληθυσμοί *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Enterobacteriaceae* και μειωμένοι *Bifidobacteria*, *Eubacteria* και *Lactobacilli* (17).

Οι πληθυσμοί κάποιων μυκήτων συμμετέχουν στον εντερικό μικροβιόκοσμο καθώς εξελίχθηκαν και συνυπάρχουν μέσω συμβιωτικής σχέσης, με το ανοσοποιητικό σύστημα. Το μεγαλύτερο μέρος τους αποτελείται από αερόβια ή δυνητικά αναερόβια στελέχη ενώ ανιχνεύεται γενετικό υλικό τους σε περιττώματα ασθενών. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένοι αριθμοί *Candida spp.*, *Gibberella spp.*, *Alternaria spp.*, *Cryptococcus spp.*, και *Aspergillus spp.* (7). Εντέλει, παρατηρείται μειωμένη ποικιλία και αφθονία βακτηρίων στους ασθενείς καθώς και στα μεταβολικά τους προϊόντα (Πίνακας 2), (4).

Πίνακας 2: Αλλαγές της μικροχλωρίδας που σχετίζεται με την IBD (14).

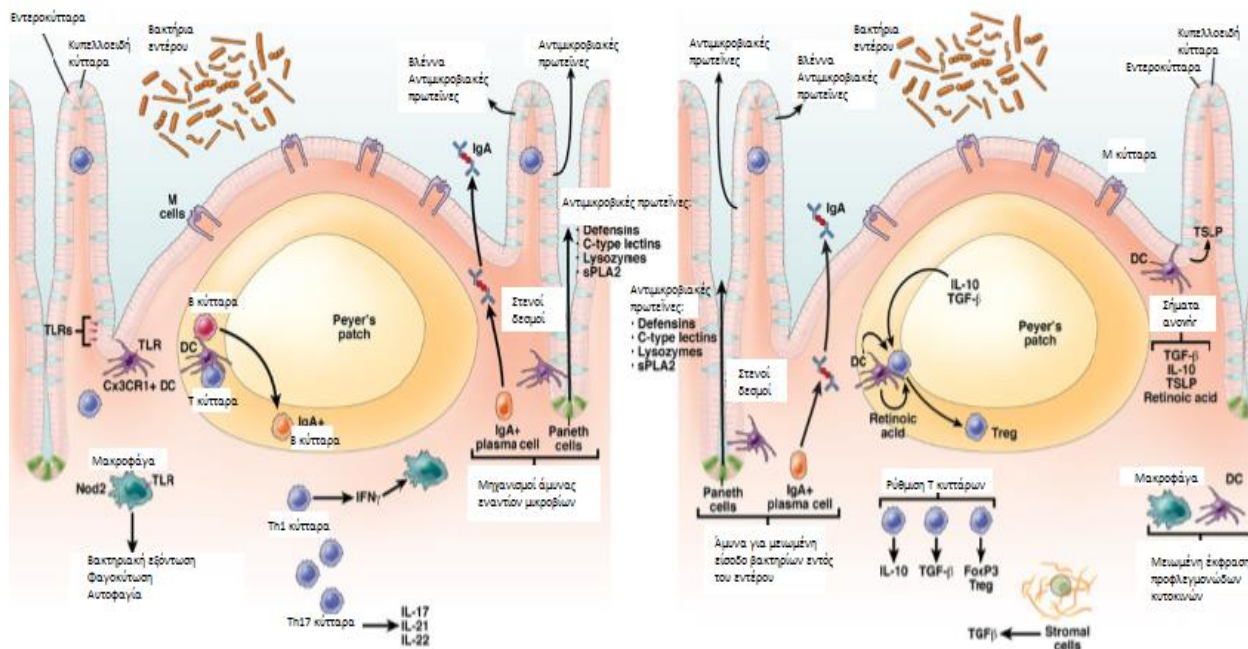
Μικροβιακή σύνθεση: • ↓ βιοποικιλότητας, • ↓ <i>Bacteroidetes</i>, <i>Firmicutes</i>, <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Ramnicocaceae</i>, <i>Clostridium</i> και <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> • Παρουσία <i>E.coli</i>, AIEC, <i>Fusobacterium</i>	Μικροβιακή λειτουργία: • ↓ SFCA-βουτυρικό οξύ, μεταβολισμού προπανοϊκού και βουτανοϊκού οξέος, βιοσύνθεσης αμινοξέων • ↑ μετατόπισης αμινοξέων και θειικού άλατος, οξυδωτικού στρες και έκκρισης τοξινών
--	--

Το σύνθητες μοτίβο που απαντάται στους ασθενείς, άρα, είναι η παροδικά μειωμένη σταθερότητα και ποικιλία των μικροοργανισμών σε συνδυασμό με την μικρότερη συγκέντρωση θετικών και τον αυξημένο αριθμό αρνητικών Gram βακτηρίων (10,12).

3.3 Σχέση ανοσοποιητικού-μικροοργανισμών στις νόσους

Πιθανό μηχανισμό παθογένεσης αποτελεί η μη φυσιολογική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στις διαταραχές του εντερικού μικροβιόκοσμου, ιδιαίτερα σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η χρόνια εντερική φλεγμονή του πεπτικού σωλήνα ενδέχεται να οδηγήσει σε εντερικές βλάβες με τα αντίστοιχα συμπτώματα. Τα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε συνεχή έκθεση με τους μικροοργανισμούς, αναγνωρίζοντας διάφορα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία ίσως αποτελούν πηγές έναρξης για τις νόσους. Οι υποδοχείς αναγνώρισης (pattern recognition receptors-PRRs, των οποίων ο ρόλος έγκειται στο να ανιχνεύουν εντόνως διατηρημένες μοριακές δομές ή μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με την παρουσία παθογόνων-PAMPs) των εντερικών κυττάρων περιλαμβάνουν υποδοχείς Toll-like receptors-TLRs, NOD-like receptors-NLRs και C-type lectin receptors-CLRs, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για το σύστημα αναγνώρισης ενδογενών και εξωγενών μικροοργανισμών. Επίσης μετέχουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση του ανοσοποιητικού. Η πλειοψηφία των πιθανά υπαίτιων γενετικών περιοχών σχετίζεται με τους PRRs. Όταν γίνει η αναγνώριση, ενεργοποιούνται τα μονοπάτια σηματοδότησης των κυτταροκινών και των χημειοκινών, οι μηχανισμοί εξόντωσης των μικροβίων (όπως οι αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, η φαγοκύττωση-από τα μακροφάγα με τη χρήση ενεργών ριζών οξυγόνου ή αζώτου, η αυτοφαγία-για την απομάκρυνση συστατικών όπως τα διάφορα οργανίδια και άλλα), αρχίζει η πρωτεϊνική αντίδραση και η διέγερση των T και B κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί ότι κάποιοι πολυμορφισμοί του NOD2, αυξάνουν τον κίνδυνο για CD (καθώς φέρουν μεγαλύτερο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων στο βλεννογόνο και μειωμένη

μεταγραφή αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών και ιντερλευκινών), ενώ συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των TLRs σχετίζονται με τις φλεγμονώδεις νόσους. Οι CLRs μετέχουν στην αναγνώριση των μυκήτων που ανήκουν στο έντερο και επηρεάζουν την ανοσοποιητική δράση του εντερικού βλεννογόνου στην κολίτιδα (Εικόνα 10), (2,4,7,8,13,45).



Εικόνα 10: Μηχανισμοί άμυνας και ανοχής του ξενιστή στα βακτήρια του εντέρου (13).

Για την UC υπάρχει, επίσης, η θεωρία ότι μπορεί να εμπλέκεται ο βακτηριακός μεταβολισμός των θειικών, ως μια από τις αιτιολογίες για την διατήρηση της συμπτωματολογίας. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί αυξημένος αριθμός βακτηρίων του γένους *Desulfovibrio* (θειο-αναγωγικά-βακτήρια). Τα συγκεκριμένα βακτήρια μετέχουν στην παραγωγή σουλφιδίου (τοξικό για τα κύτταρα) από τα θειικά άλατα του εντέρου. Το σουλφίδιο αναστέλλει την οξείδωση του βουτυρικού οξέος και τον μηχανισμό της φαγοκύτωσης (17).

Κεφάλαιο 4. Εναλλακτικές μορφές θεραπείας

Οι ασθενείς κάνουν μεγάλη χρήση των εναλλακτικών μορφών θεραπείας (ομάδα διαφορετικών ιατρικών συστημάτων, πρακτικών και προϊόντων τα οποία δεν έγκειται στις μεθόδους της συμβατικής δυτικής ιατρικής), όπως είναι η χρήση προβιοτικών, μαστίχας και άλλα (28).

4.1 Προβιοτικά, πρεβιοτικά, συνβιοτικά

Τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση της ισορροπίας του εντερικού μικροβιόκοσμου. Τα προβιοτικά αποτελούνται από μη παθογόνους ζωντανούς μικροοργανισμούς (στελέχη κυρίως από τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*), που έχουν θετική επίδραση στην υγεία του ξενιστή (2,7,15). Συμβάλλουν στη σωστή ρύθμιση της παραγωγής της βλέννας, αναστέλλουν την προσκόλληση των παθογόνων, επιδιορθώνουν τη δυσβίωση, βελτιώνουν την λειτουργία του εντερικού φραγμού, μειώνουν την παραγωγή υποδοχέων, εξισορροπούν τα T κύτταρα και αλλάζουν την γονιδιακή έκφραση. Για αυτούς τους λόγους χρησιμοποιούνται και ως βοήθεια στην θεραπεία των νόσων και έχουν δράση στην διατήρηση των περιόδων ύφεσης. Έχει φανεί πως τα προβιοτικά έχουν σημαντικότερη επίδραση στην UC αλλά όχι στην CD (41).

Τα πρεβιοτικά είναι άπεπτα συστατικά τροφίμων που χρησιμοποιούνται εκλεκτικά από συγκεκριμένα βακτήρια με ευεργετική δράση, συμβάλλοντας έτσι στην υγεία του ξενιστή. Έχουν ως αποτέλεσμα την γρηγορότερη έλευση της ύφεσης καθώς και την διατήρησή της (αύξηση του αριθμού των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* και του *Faecalibacterium prausnitzii*). Υπάρχουν ελάχιστες, όμως, θετικές ενδείξεις για το κατά πόσο βοηθούν στις συγκεκριμένες νόσους (41).

Τα συνβιοτικά είναι ο συνδυασμός προβιοτικών και πρεβιοτικών. Συμβάλλουν στην μείωση των συμπτωμάτων (αύξηση των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, μείωση της υφιστάμενης φλεγμονής και εμπλουτισμός του εντερικού μικροβιόκοσμου).

Άλλη μορφή θεραπείας είναι η μεταμόσχευση κοπράνων από υγιείς δότες (Fecal Microbial Therapy-FMT). Κόπρανα υγιούς ατόμου, τα οποία περιέχουν συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς τοποθετούνται εντός του ασθενή, με θεραπευτική πρόθεση, προκειμένου να διορθωθεί η δυσβίωση μέσω της ύπαρξης των κατάλληλων βακτηρίων εντός του εντέρου (2,7,10,12,15,21). Είναι πολύ λίγα τα διαθέσιμα στοιχεία για το FMT στις IBD. Οι ασθενείς με UC μπορούν να επωφεληθούν καθώς μια μικροβιακή διαταραχή της συγκεκριμένης ασθένειας

μπορεί να εξομαλυνθεί πιο εύκολα εν συγκρίσει με τη CD, αν και φαίνεται να απαιτούνται πολλαπλές εγχύσεις (41).

4.2 Μαστίχα

Pistacia lentiscus ποικιλίας *Chia* είναι η επιστημονική ονομασία του αιθαλή θάμνου που παράγει τη μαστίχα της Χίου. Ανήκει στην οικογένεια *Anacardiaceae*. Καλλιεργείται για την αρωματική του ρητίνη (μαστίχα) η οποία χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του αιθέριου ελαίου, το μαστιχέλαιο. Η ρητίνη εκκρίνεται, σε σχήμα δακρύων, ως ένα κολλώδες διαυγές υγρό (30,31,33).



Εικόνα 11: Αριστερά: έκκριση ρητίνης από μαστιχόδεντρο, δεξιά: φυσικό δάκρυ μαστίχας (32).

4.2.1 Δράσεις

Από την αρχαιότητα, υπάρχουν αναφορές σχετικά με την χρήση της, για τις θεραπευτικές της ιδιότητες στο στομάχι, το έντερο και το συκώτι, όπως και στην καθημερινή ζωή. Από μελέτες έχει βρεθεί πως έχει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επίσης παρουσιάζει συγκολλητική δράση, βοηθάει στην ανάπλαση της επιδερμίδας, τη σύνθεση κολλαγόνου, συμβάλλει στην γρήγορη επούλωση τραυμάτων καθώς και την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης. Αναφορικά με τις γαστρεντερολογικές διαταραχές, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν, την θετική συσχέτιση της ρητίνης με την επούλωση των ελκών (πιο συγκεκριμένα εναντίον του *Helicobacter pylori* (αμφιλεγόμενο όμως καθώς υπάρχουν μελέτες που δεν δείχνουν

κάποια επίδραση της μαστίχας) και την ηπατοπροστατευτική της δράση σε ποντίκια. Ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της είναι το ολεανοϊκό οξύ (τριτερπένιο με αντοξειδωτική, αντιυπερτασική και αντιυπερλιπιδαιμική δράση που μετέχει στην έκκριση αντιφλεγμονώδων και αντιογκογόνων συστατικών). Η μαστίχα έχει θετική δράση στην διατροφική κατάσταση ασθενών με ενεργή ελκώδη κολίτιδα καθώς και στον δείκτη δράσης της νόσου (CDAI) σε ασθενείς με ενεργή CD, ίσως μέσω της μείωσης της παραγωγής προφλεγμονώδων ουσιών. Σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ενεργή CD χορηγήθηκαν κάψουλες μαστίχας (6 κάψουλες ανά μέρα) για τέσσερις εβδομάδες. Μετά το πέρας της, βρέθηκε πως μειώθηκε σημαντικά το CDAI, μέσω της μείωσης της προφλεγμονώδους ιντερλευκίνης IL-6. Επίσης αυξήθηκε ο δείκτης Nutritional Risk Index-NRI, που δείχνει την θρεπτική κατάσταση των συμμετεχόντων. Έτσι, επιτεύχθηκε η αύξηση του βάρους καθώς μειώθηκε το ποσοστό των υδαρών κενώσεων και αυξήθηκε η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (29,30,31,33).

Άλλες ιδιότητες που την χαρακτηρίζουν είναι πως βοηθά στη μείωση της χοληστερόλης άρα και στη μείωση καρδιακών προσβολών και υψηλής αρτηριακής πίεσης. Επιπρόσθετα συμβάλλει στη μείωση των τριγλυκεριδίων και των συνολικών επιπέδων λιπιδίων του οργανισμού (30,31). Προκαλεί περιορισμό βακτηρίων και μυκήτων που μπορεί να δημιουργήσουν πεπτικά έλκη και σχηματισμό πλακών στο στόμα και στο σάλιο. Από μελέτη φάνηκε πως το σύνολο των βακτηριακών αποικιών της στοματικής κοιλότητας μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια των τεσσάρων ωρών μασήματος τσίχλας που περιείχε μαστίχα (31). Φαίνεται ακόμη πως ανακουφίζει ή μετέχει στη μείωση των συμπτωμάτων των αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω της αναστολής της παραγωγής προ-φλεγμονωδών ουσιών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, παραγωγής κυτταροκινών από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ενεργή CD και καταστολής της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών σε μοντέλο άσθματος σε ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν παράγοντες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α- προφλεγμονώδης κυτοκίνη), ο παράγοντας αναστολής μετανάστευσης μακροφάγων (MIF-κυτταροκίνη με λειτουργίες όπως η παρεμπόδιση μετανάστευσης μακροφάγων και της φλεγμονώδους δραστηριότητας) και άλλες ουσίες του αίματος πριν και μετά από παρέμβαση με χορήγηση μαστίχας. Ύστερα από τέσσερις εβδομάδες χορήγησης παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης TNF-α, ενώ η έκκριση MIF βρέθηκε αυξημένη που σημαίνει ότι παρεμποδίστηκε η τυχαία μετανάστευση των μακροφάγων. Επίσης το βάρος αυξήθηκε, ενώ μειώθηκαν οι υδαρείς κενώσεις και αυξήθηκε και η απορρόφηση των θρεπτικών. Αυτά υποδεικνύουν πως η μαστίχα δρα στην ανοσοδιαμόρφωση των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος και δρα ως αναστολέας του TNF-α και διεγέρτης του MIF. Έτσι, επιτυγχάνεται ο περιορισμός της διαφοροποίησης των μακροφάγων στη θέση της φλεγμονής και ελέγχεται περαιτέρω η ενεργοποίηση της φλεγμονής.

Άρα υπάρχει ενδεχόμενη ρυθμιστική σχέση ανάμεσα στη μαστίχα της Χίου με στην ανοσολογική λειτουργία του οργανισμού κατά την CD (31,33,36). Επιπρόσθετα, σε κλινική δοκιμή σε ποντίκια όπου έγινε αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας συγκεκριμένων αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ενώσεων για τις παραμέτρους της UC χρησιμοποιήθηκε μαστίχα και συνδυασμός των ενώσεων της τοκοφερόλης, μέσω τροφής. Από την αξιολόγηση του δείκτη δράσης της νόσου (disease activity index- DAI) βρέθηκε πως η χρήση συμπληρώματος με μαστίχα καθυστέρησε την έναρξη και εξέλιξη της νόσου ενώ βοήθησε στην πρόληψη της απώλειας βάρους. Άρα φαίνεται ότι το αποτέλεσμα ήταν η μερική προστασία έναντι της οξείας κολίτιδας (39).

4.2.2 Χημική σύσταση- Δόση- Παρενέργειες

Η χημική σύσταση της δεν έχει αναλυθεί ακόμη πλήρως μα πιστεύεται πως περιέχει πάνω από εβδομήντα ουσίες με πολυάριθμες φαρμακευτικές ιδιότητες.

Πίνακας 3: Ορισμένα από τα αρωματικά και θεραπευτικά συστατικά της μαστίχας (32).

✓ Μαστιχαδιενονικό οξύ	✓ 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ
✓ Ισομαστιχαδιενονικό οξύ	✓ 3-ακετοξυ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ
✓ Ολεανονικό οξύ	✓ 3-ακετοξυ-3-επι-μαστιχαδιενολικό οξύ
✓ Μορονικό οξύ	✓ Διπτεροκαρπόλη
✓ Μαστιχαδιενολικό οξύ	✓ Λουπεόλη
✓ Ισομαστιχαδιενολικό οξύ	✓ β-αμυρίνη
✓ Τιρουκαλλόλη	✓ β-αμυρόνη
✓ Βουτυροσπερμόλη	✓ Γερμανικόλη
✓ Ολεανονική αλδεΰδη	✓ 28-υδροξυ-β-αμυρόνη
✓ Ολεανολική αλδεΰδη	✓ 3-οξο-28-νορλουπ-20(29)-ένιο
✓ Μπετουλονάλλη	✓ 20(5)-3β-ακετοξυ-20-υδροξυδαμμαρ-24-ένιο
✓ 6,7-εποξυ-3(15)-καρυοφυλλένιο	✓ 3-οξο-δαμμαρα-20(21),24-διένιο
✓ Μαστιχαδιενονάλη	✓ 3β-υδροξυ-μαλαμπαρικατριένιο
✓ Ισομαστιχαδιενονάλη	✓ 3-οξο-μαλαμπαρικατριένιο
✓ 18-αΗ-ολεανικό οξύ	✓ (8R)-3-οξο-8-υδροξυπολυποδα-13E,17E,21-τριένιο
✓ Ολεανολικό οξύ	✓ 3-οξο-28-νορολεαν-12-ένιο
	✓ 3β-υδροξυ-28-νορολεαν-12-ένιο

Η ρητίνη περιλαμβάνει: αιθέριο έλαιο (μαστιχέλαιο) 1-3%, φυσικό κλάσμα 25%, όξινο κλάσμα (όξινα συστατικά των τερπενίων) 39%, ουδέτερο κλάσμα (ουδέτερα συστατικά όπως οι τιτερπενικές αλδεΰδες και αλκόολες) σε ποσοστό 28% και άλλες ουσίες 3-5%. Πιο συγκεκριμένα:

μαστιχολικό οξύ 0,5%, α-μαστιχονικό οξύ 20%, β-μαστιχονικό οξύ 18%, α-ρητίνη μαστίχας 30% και β-ρητίνη μαστίχας 20%. Η μαστίχα αποτελείται, ουσιαστικά δηλαδή, από τη ρητίνη, το μαστιχέλαιο, ιχνοστοιχεία και μια πλειάδα ακόμη ενώσεων.

Πίνακας 4: Χημικά στοιχεία μαστίχας Χίου (32).

ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ~3%	ΡΗΤΙΝΗ		ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΆΛΛΕΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ
	Ρεσίνες	Ρητινικά οξέα		
Πινένιο Μυρκένιο Διπινένιο Βορνεόλη Θυμόλη Κινεόλη Θουγκόνη	Α'μαστιχορεζίνη 30% Β'μαστιχορεζίνη 20% Μαστιχολικό οξύ κ.α	α, β μαστιχονικό 4% α μαστιχονικό 20% β μαστιχονικό 18%	Ca 300 ppm Mg 20 ppm P 10 ppm Zn 1.2 ppm κ.α	Χώμα Χλωροφύλλη κ.α

Έχει διάφορες πτητικές και μη ενώσεις, με τη μορφή διτερπενίων ως ρητινικά οξέα (σε αυτά αποδίδεται και η αντιμικροβιακή της δράση). Το μαστιχέλαιο αποτελείται από μονοτερπένια (παρουσιάζει αντιμικροβιακή και χημειοπροστατευτική δράση κατά του καρκίνου) και δεκάδες χημικές ενώσεις οι οποίες δεν έχουν προσδιοριστεί. Δρά εναντίον διαφόρων μικροοργανισμών όπως οι *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* και άλλοι. Ορισμένα συστατικά του με αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι η βερμπενόνη, α-τερπινεόλη και η λιναλόλη. Βρέθηκε επίσης ότι διαφορετικά βακτήρια (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* και *Prevotella melaninogenica*) των οποίων εξετάστηκε η ευαισθησία σε αυτές τις ενώσεις, αντέδρασαν με διαφορετικό τρόπο. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα πως οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μαστιχέλαιου προέρχονται από την συνεργιστική δράση των ενώσεων του. Επίσης έχει αντιμυκητιακές και αντιϊκές ιδιότητες ενώ συμβάλλει θετικά και κατά του σακχαρώδη διαβήτη. Χρησιμοποιείται για την ανακούφιση από τα συμπτώματα και την θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως η φλεγμονή από το *Helicobacter pylori* (που χαρακτηρίζεται και ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ελκών του πεπτικού σωλήνα), για τη λειτουργική δυσπεψία και την καρκινογένεση (μέσω της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και την αναστολή της ανάπτυξης όγκων), (30,31,32,33,38). Έρευνα σε ζωικά πρότυπα έδειξε πως έδειξε πως η χορήγηση μαστιχέλαιου καθυστέρησε την εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου και βοήθησε στην πρόληψη της απώλειας βάρους. Άρα, το μαστιχέλαιο ενδεχόμενα να παρέχει κάποια προστασία έναντι στην οξεία κολίτιδα.

Δόση μαστίχας από το στόμα 500 mg/kg είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των γαστρικών εκκρίσεων, την προστασία των κυττάρων και την μείωση της έντασης της βλάβης του

γαστρικού βλεννογόνου. Άλλα πρωτόκολλα δοσολογίας τα οποία έχουν φανεί πως έχουν αποτέλεσμα σε ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές είναι η από στόματος χρήση σκόνης μαστίχας : 0,5g δύο φορές/ημέρα για 2-3 εβδομάδες, 0,5-1g πριν το πρωινό και 1g πριν τον ύπνο για 2-4 εβδομάδες ή 0,35g x 3,05g για 2 εβδομάδες. Αναφορικά με παρενέργειες έχουν αναφερθεί σπάνια άμεση τοξικότητα, ερεθισμός του δέρματος και φωτοτοξικότητα σε ανθρώπους και ζώα (37,38,56).

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κεφάλαιο 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Σκοπός της Εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν:

- ο έλεγχος για την παρουσία κάποιων μικροοργανισμών με πιθανή προφλεγμονώδη δράση στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ,
- η μελέτη της επίδρασης της μαστίχας στους ίδιους μικροοργανισμούς, σε ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα, που πήραν μέρος σε μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, με πρόσληψη συμπληρώματος φυσικής μαστίχας.

Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί: *Escherichia coli* subgroup, *Fusobacterium nucleatum* και η ζύμη *Candida albicans*.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Σχεδιασμός της έρευνας

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αποτελεί μέρος μιας διπλά τυφλής τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής με χρήση Μαστίχας Χίου, σε ενήλικες ασθενείς με Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσους του Εντέρου (ΙΦΝΕ) .

Κατασκευάστηκαν δύο συμπληρώματα (μαστίχα Χίου και placebo) από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου και ήταν κωδικοποιημένα – επισημασμένα ως «mastic» και «mastiha», ενώ είχαν το ίδιο σχήμα, μέγεθος, γεύση και άρωμα. Η σύσταση των ταμπλετών placebo ήταν: 70% άμυλο, 14% μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, 8% άνυδρο διβασικό φωσφορικό ασβέστιο, 6% γλυκολικό νατρίουχο άμυλο, 2% στεατικό μαγνήσιο. Κάθε ασθενής λάμβανε τέσσερις ταμπλέτες ημερησίως 2.8g (700mg/δισκίο, 4 δισκία/μέρα) για χρονικό διάστημα τριών μηνών. Για λόγους ευκολίας και ομοιομορφίας της μελέτης, η πρόσληψη των ταμπλετών από τους ασθενείς συστήθηκε να γίνεται σε δύο δόσεις: 2 ταμπλέτες το πρωί και 2 ταμπλέτες το βράδυ, τουλάχιστον 2 ώρες μακριά από τη λήψη γεύματος.

Η μελέτη γίνεται σε συνεργασία του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου με το Νοσοκομείο ΙΑΣΩ GENERAL.

Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και διεξήχθη όπως ορίζουν η Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής και η ελληνική νομοθεσία. Διευκρινίζεται ότι τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1989) της World Medical Association και ότι οι συμμετέχοντες είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της μελέτης και εγγράφως συναινέσει για τη συμμετοχή τους σε αυτή. Ακόμη, το πρωτόκολλο καταχωρήθηκε στο ClinicalTrials.gov με αριθμό NCT02796339.

5.2.2 Χαρακτηριστικά εθελοντών και πρωτόκολλο της παρέμβασης

Προκειμένου να γίνει η στρατολόγηση των εθελοντών καθορίστηκαν συγκεκριμένα κριτήρια ένταξης τα οποία ήταν οι εθελοντές να είναι ηλικίας 18-65, να έχουν διαγνωσμένη ΙΦΝΕ (CD,UC) και να βρίσκονται σε περίοδο έξαρσης. Τα κριτήρια αποκλεισμού της μελέτης ήταν τα εξής: μη σταθερή φαρμακευτική αγωγή, εντερική ή παρεντερική διατροφή, κατάχρηση φαρμάκων ή αλκοόλ, χρήση κανναβινοειδών & μη ναρκωτικών ουσιών, λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, ομοιοπαθητική, χορτοφαγία ή μακροβιοτική δίαιτα πριν & κατά την διάρκεια της μελέτης, καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, ιστορικό απόφραξης μυοκαρδίου, στηθάγχη, εγκεφαλικό επεισόδιο, ψυχιατρικές διαταραχές, εγκυμοσύνη, θηλασμός, πεπτικό έλκος ή καρκίνος του γαστρεντερικού.

Οι ασθενείς προσκλήθηκαν μέσω ανακοινώσεων στο Σύλλογο Ασθενών με Νόσο Crohn κι Ελκώδη Κολίτιδα. Όσοι πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στη μελέτη.

Το πλήρες ιστορικό των εθελοντών περιλάμβανε κοινωνικό-δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως ηλικία, φύλο, οικογενειακή κατάσταση, εκτίμηση επιπέδου φυσικής δραστηριότητας, κάπνισμα και άλλα. Έγιναν ανθρωπομετρικές μετρήσεις, ύψος και βάρος, των συμμετεχόντων προκειμένου να υπολογιστεί και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI). Εκτιμήθηκαν οι διατροφικές συνήθειες των ασθενών, με τη χρήση ανάκλησης 24ώρου, καθώς και η ποιότητα ζωής (μέσω ειδικού ερωτηματολογίου-Inflammatory Bowel Disease Questionnaire).

Επίσης από τους εθελοντές έγινε λήψη αίματος για την μέτρηση διαφόρων βιοχημικών δεικτών.

Οι εθελοντές εκπαιδεύτηκαν από τους υπεύθυνους της μελέτης στη χρήση ειδικών δειγματοληπτών (OMNIgene® GUT της DNA Genotek Inc. Ontario, Canada) για τη συλλογή κοπράνων πριν από την έναρξη της παρέμβασης και μετά το τέλος της (t=0,3).

5.2.3 Δείγματα ασθενών

Στη μελέτη πήραν μέρος 25 εθελοντές. Λήφθηκαν συνολικά 40 δείγματα. Στην έναρξη της παρέμβασης λήφθηκαν 9 δείγματα ασθενών με UC (4 δισκίο «mastiha» και 5 «mastic»), 16 με CD (11 δισκίο «mastiha» και 5 «mastic»). Στον χρόνο 3 (μετά την 3μηνη λήψη συμπληρώματος) έδωσαν 15 άτομα δείγμα κοπράνων εκ των οποίων τα 5 ανήκαν σε ασθενείς με UC (1 δισκίο «mastiha» και 4 «mastic»), τα 10 σε CD (7 δισκίο «mastiha» και 1 «mastic»).

Τα δείγματα λήφθηκαν από τους ίδιους τους ασθενείς με ειδικό συλλέκτη τον OMNIgene® GUT της DNA Genotek Inc. (Ontario, Canada), (OMR-200). Ο συγκεκριμένος συλλέκτης αποτελεί ένα σύστημα εύκολης συλλογής και σταθεροποίησης του μικροβιακού DNA από περιττώματα προκειμένου να γίνει ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού προφίλ του εντέρου. Βασικά χαρακτηριστικά του είναι η αυτο-συλλογή υψηλής ποιότητας δείγματος στο σπίτι, η ταχεία ομογενοποίηση και σταθεροποίηση στο σημείο συλλογής καθώς και το ότι το σταθεροποιημένο DNA μπορεί να μεταφερθεί και να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60 ημέρες (δεν απαιτείται ψυκτική αλυσίδα). Ο συλλέκτης εμπεριέχει κατ' εκτίμηση 520 ± 101 mg κοπράνων (διάμεσος) και η απόδοση του DNA ανά 250 μl δείγματος είναι $1,91 \pm 1,28$ μg (διάμεσος), σύμφωνα με τον κατασκευαστή (49). Μετά την μεταφορά των συλλεκτών στο εργαστήριο τοποθετήθηκαν σε ψύξη (4°C) και εν συνεχεία, αφού χωρίστηκαν σε δύο αποστειρωμένους σωλήνες των 2 ml, αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες βαθιάς ψύξης (-80°C).

5.3 Πειραματική διαδικασία

5.3.1 Απομόνωση DNA από κόπρανα

Το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από τα δείγματα των κοπράνων των ασθενών ήταν το Repeated Bead Beating Plus Column (RBB+C), (48) αφού αρχικά τροποποιήθηκε για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (50). Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα (QIAamp® DNA Mini Kit; QIAGEN

GmbH, Germany) και μηχανικής λύσης. Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του DNA ελέγχονται φωτομετρικά στο μηχάνημα IMPLEN P330 με την χρήση του προγράμματος για dsDNA (double-stranded DNA).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

A) Λύση των κυττάρων.

1. Μεταφορά 200μl δείγματος σε αποστειρωμένους σωλήνες 2ml που περιείχαν σφαιρίδια λύσης δύο διαφορετικών μεγεθών (0,3g των 0,1mm και 0,1g των 0,5mm). Προσθήκη 1ml διαλύματος λύσης.
2. Ομογενοποίηση του δείγματος με το Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA).
3. Επώαση στους 95°C για 15 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 λεπτά στις 20000xg και μεταφορά υπερκειμένου σε ένα νέο σωληνάριο.
5. Προσθήκη 300μL διαλύματος λύσης στο σωλήνα της λύσης, Επανάληψη των βημάτων 2–4, και ενοποίηση των υπερκειμένων.

B) Καταβύθιση νουκλεϊκών οξέων.

6. Προσθήκη 260μL οξικού αμμωνίου 10M και επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 λεπτά στα 16.000×g.
8. Μεταφορά υπερκειμένου σε δύο σωληνάρια για φυγοκέντρηση, προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά στα 16.000×g, αφαίρεση υπερκειμένου, ξέπλυμα με διάλυμα αιθανόλης 70%, απομάκρυνση υπερκειμένου και ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 100μL ρυθμιστικού TE (Tris-EDTA), ενοποίηση των περιεχομένων των δύο αποστειρωμένων σωλήνων του κάθε δείγματος.

Γ) Απομάκρυνση RNA, πρωτεϊνών και καθαρισμός:

11. Προσθήκη 2μL DNase-free RNase (10mg/mL) και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά.
12. Προσθήκη 15μL πρωτεΐνης K και 200μL ρυθμιστικού διαλύματος AL (από το κιτ QIAamp® DNA Mini Kit) και επώαση σε 70°C για 10 λεπτά.

13. Προσθήκη 200μL απόλυτης αιθανόλης. Μεταφορά σε στήλη QIAamp και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου βάσει οδηγιών κατασκευαστή.
14. Απομάκρυνση του υγρού που έχει περάσει από τη στήλη, προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW1 (Qiagen) και φυγοκέντρηση βάσει οδηγιών κατασκευαστή σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Απομάκρυνση του υγρού που έχει περάσει από τη στήλη, προσθήκη 500μL Buffer AW2 (Qiagen) και φυγοκέντρηση βάσει οδηγιών κατασκευαστή.
16. Απομάκρυνση του υγρού και ξήρανση της στήλης με φυγοκέντρηση βάσει οδηγιών κατασκευαστή.
17. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος AE (Qiagen) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Έκλυση του DNA με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου βάσει οδηγιών κατασκευαστή.

Μετά την απομόνωση του DNA γίνεται φωτομέτρηση προκειμένου να προσδιοριστεί η καθαρότητα και η ποσότητα νουκλεϊκού οξέος σε κάθε δείγμα.

Στη συνέχεια έγινε μεταφορά του διαλύματος που περιέχει το DNA σε τρία σωληνάρια και αποθήκευση στους -80°C .

5.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)

Μέσω της ποσοτικής PCR (qPCR) και της χρήσης κατάλληλων εκκινητών έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός ($\log_{10}$ copies/ml) των ολικών βακτηρίων (51), καθώς και μικροοργανισμών με ιδιαίτερο βιβλιογραφικό ενδιαφέρον στη περίπτωση των ΙΦΝΕ όπως τα *Escherichia coli* subgroup (52), *Fusobacterium nucleatum* (53,54) και *Candida albicans* (55).

Αυτό πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων εκκινητικών μορίων (primers), που στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των μικροοργανισμών που στοχεύουμε σε κάθε αντίδραση (Πίνακας 5), με ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Για τον προσδιορισμό της ζύμης (ευκαρυωτικό) *Candida albicans*, ο μοριακός προσδιορισμός βασίστηκε στο γονίδιο 18S rRNA.

Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) με χρήση του μίγματος αντιδράσεων KAPA SYBR® Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems Inc., USA), το οποίο στηρίζεται στη τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green. Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται 10μl του kit, 0,4μl του κάθε εκκινητή, 0,25μl BSA (Bovine serum Albumin, για αποφυγή της προσκόλλησης του μίγματος της αντίδρασης στα γυάλινα τριχοειδή), 5μl από το DNA-στόχο (αραιώσεις πρότυπου στελέχους ή δείγματα κοπράνων) και 3,95μl PCR-grade ύδατος. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση), την ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι), την ανάλυση melting curves και τη ψύξη του οργάνου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (ενίσχυση του προϊόντος) προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης για την κάθε υπό εξέταση μικροβιακή ομάδα.

Πίνακας 5: Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης.

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμο- κρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παρα- πομπή
Ολικά βακτήρια	Forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	60°C	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	51
	Reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT				
<i>Escherichia coli</i> subgroup	Forward	GTTAATACCTTTGCTCATTGA	61°C	340	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52
	Reverse	ACCAGGGTATCTAATCCTGTT				
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Forward	CTTAGGAATGAGACAGAGATG	56°C	120	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586T	53
	Reverse	TGATGGTAACATACGAAAGG				54
<i>Candida albicans</i>	ITS1	TTTATCAACTTGTCACACCAGA	60°C	273	<i>Candida albicans</i> DSM 11225	55
	ITS2	ATCCCGCCTTACCACTACCG				

Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται βάσει της τιμής του Ct (threshold circle), η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης καθώς είναι η μόνη φάση (log-linear phase) όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να φτάσει ένα δείγμα στο δεδομένο επίπεδο φθορισμού (μικρότερο Ct) τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων ή της ζύμης C.

albicans σε κάθε δείγμα κοπράνων γίνεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική σχέση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA ή 18S rRNA στο πρότυπο μικροβιακό στέλεχος προς τις αντίστοιχες τιμές Ct. Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή των καμπύλων αναφοράς επιτυγχάνεται με τη χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), με αποδεκτό εύρος απόδοσης το 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S rRNA ή 18S rRNA γονιδίου/ml δείγματος» ($\log_{10}\text{copies/ml}$ δείγματος).

5.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 23. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο έλεγχος κανονικότητας των παραμέτρων έγινε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Από τα περιγραφικά στατιστικά μέσα, για τη σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν η μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (για τα παραμετρικά) ή η διάμεσος (για τα μη παραμετρικά) των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S rRNA ή 18S rRNA γονιδίου/ml δείγματος ($\log_{10}\text{copies/ml}$ δείγματος). Έγινε έλεγχος μεταξύ των δειγμάτων στον χρόνο 0 και 3 με τη χρήση του ελέγχου t (independent samples T test-για τα παραμετρικά) ή του ελέγχου Mann Whitney (για τα μη παραμετρικά). Επιπρόσθετα, εντός της κάθε ομάδας έγινε σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών με τη χρήση του ελέγχου t για εξαρτημένα δείγματα (paired-samples T test). Τέλος, ελέγχθηκε το κατά πόσο διάφοροι παράγοντες (όπως η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και άλλα) επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο με τη χρήση ανάλυσης συνδιακύμανσης (Univariate analysis of Covariance). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p < 0,05$).

ΜΕΡΟΣ Γ': ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 6. Αποτελέσματα

Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη δειγμάτων κοπράνων ασθενών με νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα. Οι εθελοντές έδωσαν δείγματα κατά την είσοδο τους στην μελέτη (χρόνος 0) καθώς και ύστερα από 3 μήνες μετά την παρέμβαση (χρόνος 3).

6.1 Γενικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων στην αρχή της παρέμβασης

Λήφθηκαν υπόψιν και μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες οι οποίοι ενδεχόμενα να επηρεάζουν τη σύσταση των μικροοργανισμών του εντέρου. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών και στον Πίνακα 7 τα ανθρωπομετρικά.

Πίνακας 6: Δημογραφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων.

	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	<i>p</i>
Φύλο (άντρες/γυναίκες)	15/10	6/10	4/5	0,734
Ηλικία (χρόνια)^α	40,96±14,89	41,00±15,77	40,89±14,11	0,986
Κάπνισμα (αριθμός καπνιστών)	7	6	1	0,158

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ασθενών των δύο νόσων δύο σε κανένα από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος ηλικίας στη CD εμφανίζεται οριακά υψηλότερος σε σύγκριση με τη UC, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να θεωρείται στατιστικά σημαντική ($p=0,986$). Ούτε το φύλο ($p=0,734$), ούτε το κάπνισμα ($p=0,158$) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 7: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων^α.

	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p
Βάρος (kg)	67,00 (56,00-80,50)	64,50 (57,00-78,00)	70,00 (54,00-100,50)	0,496
Ύψος (m)	1,71±0,11	1,70±0,13	1,72±0,08	0,695
BMI (kg/m²)	20,70 (19,50-28,30)	20,55 (19,10-28,40)	21,90 (19,50-34,10)	0,692

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D. για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά ή ως τεταρτημόρια: διάμεσος (25^ο τεταρτημόριο-75^ο τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά.

Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των δύο ομάδων φάνηκαν, και στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών (Πίνακας 7). Το βάρος ($p=0,496$), το ύψος ($p=0,659$) και το BMI ($p=0,692$) εμφανίζονται υψηλότερα στη UC. Αυτές οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

6.2 Διατροφικές συνήθειες και φυσική δραστηριότητα των εθελοντών

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα διατροφικά στοιχεία των συμμετεχόντων, τα ποσοστά πρόσληψης διαφόρων μακροστοιχείων και η κατανάλωση θερμίδων, όπως υπολογίστηκαν από τη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων.

Πίνακας 8: Διατροφικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων^α.

	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p
Ενέργεια (kcal)	1809,84±743,49	1723,12±516,84	1964,02±1056,25	0,449
Υδατάνθρακες (g)	215,67±83,58	211,48±76,64	223,12±99,22	0,746
% πρόσληψη	48,13±7,91	48,75±8,36	47,04±7,37	0,614
Πρωτεΐνη(g)	73,03 (54,93-98,58)	64,78 (51,78-87,18)	88,87 (69,85-170,96)	0,036
% πρόσληψη	17,38 (13,91-22,59)	16,36 (12,60-18,09)	24,24 (18,26-32,75)	0,003
Λίπος (g)	67,50±35,90	68,74±26,24	65,29±50,66	0,823
% πρόσληψη	33,15±9,04	36,00±8,51	28,08±8,00	0,032
Διαιτητικές ίνες(g)	12,99±7,01	14,73±6,79	9,88±6,63	0,097

“Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D. για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά ή ως τεταρτημόρια: διάμεσος (25° τεταρτημόριο-75° τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά.

Για την πρόσληψη διαιτητικών ινών ($p=0,097$) φαίνεται πως υπάρχει μια τάση να είναι υψηλότερη στη CD. Το ποσοστό πρόσληψης λίπους ($p=0,032$) είναι σημαντικά υψηλότερο στη CD ενώ η πρόσληψη πρωτεΐνης ($p=0,036$) και το ποσοστό πρόσληψης της ($p=0,003$) εμφανίζονται ως στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στη UC.

Στον Πίνακα 9 φαίνονται τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας των συμμετεχόντων όπως καθορίστηκαν από τις απαντήσεις των ερωτηματολογίων.

Πίνακας 9: Φυσική δραστηριότητα συμμετεχόντων.

	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	<i>p</i>
Καθιστική	18	10	8	0,245
Ελαφριά	4	4	0	
Μέτρια	3	2	1	

Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων ούτε στα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας ($p= 0,245$).

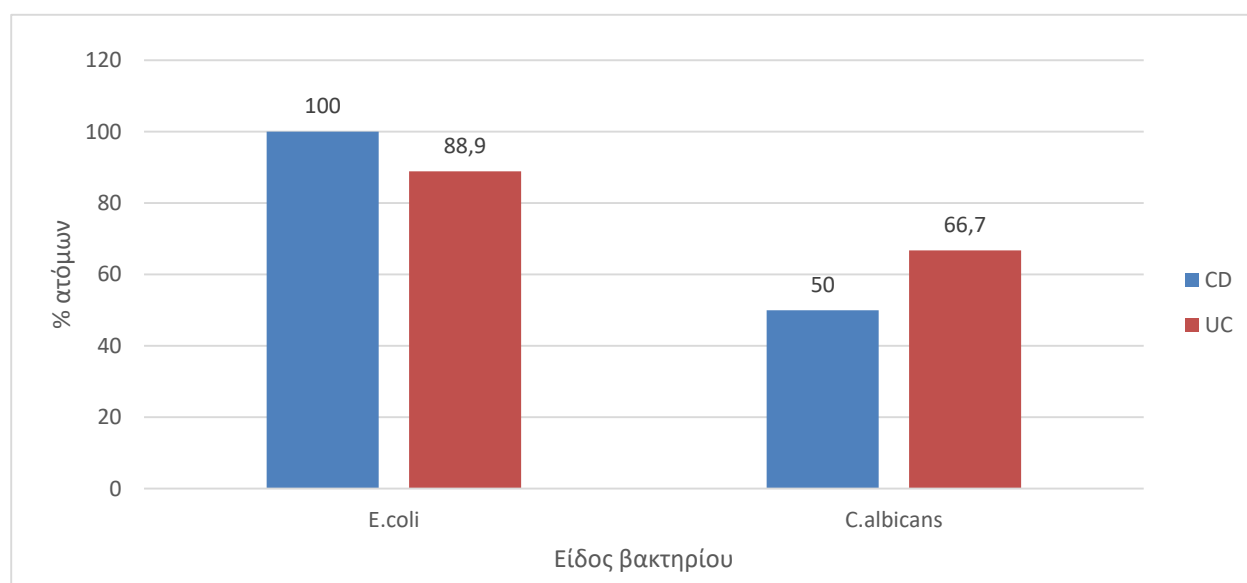
6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπό μελέτη μικροοργανισμών του εντέρου κατά την είσοδο των εθελοντών στην παρέμβαση (χρόνος 0). Στο *E.coli* και το *C.albicans* υπολογίστηκε και η συχνότητα εμφάνισης τους στον πληθυσμό καθώς αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι, με βάση τη βιβλιογραφία (5,8,14,15,18), δεν εντοπίζονται σε όλους τους ασθενείς μα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νόσων.

Πίνακας 10: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log₁₀copies/ml κοπράνων) και συχνότητα απομόνωσης (%) των υπό μελέτη μικροοργανισμών με βάση την ασθένεια στην αρχή της παρέμβασης (t=0 μήνες)^a.

	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	<i>p</i>
Ολικά βακτήρια	10,78 (10,18-11,04)	10,89 (10,04-11,13)	10,55 (10,28-10,87)	0,282
<i>E.coli</i>	7,43 (5,68-8,12)	7,68 (6,68-9,12)	7,11 (5,22-7,45)	0,058
%απομόνωση (no. θετικών)	96 (24)	100 (16)	88,8 (8)	0,174
<i>F.nucleatum</i>	4,86±0,67	4,86±0,73	4,86±0,58	0,095
<i>C.albicans</i>	3,28±1,23	2,84±1,43	3,78±0,71	0,155
%απομόνωση (no. θετικών)	56 (14)	50 (8)	66,7 (6)	0,420

^aΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D. για τις παραμετρικές τιμές ή ως τεταρτημόρια: διάμεσος (25° τεταρτημόριο-75° τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικές τιμές.



Σχήμα 1: Συχνότητα εμφάνισης *E.coli* και *C.albicans* στο σύνολο του δείγματος στην αρχή της παρέμβασης (t=0 μήνες), (N=25).

Από τα υπό μελέτη βακτήρια σε σύγκριση με τη νόσο στο χρόνο 0 φάνηκε πως μόνο στο *E.coli* subgroup, υπάρχει μια τάση, να είναι υψηλότερος ο πληθυσμός του στη CD ($p=0,058$). Στο *F.nucleatum* ($p=0,095$) παρατηρείται μια τάση να είναι υψηλότερα στη UC σε σχέση με τη CD.

Σχετικά με τις συχνότητες εμφάνισης στον πληθυσμό (Σχήμα 1) για το *E.coli* στη CD βρέθηκε σε όλα τα άτομα του δείγματος ενώ στη UC στα 8 από τα 9 άτομα ($p=0,174$).

Στον Πίνακα 11 αναγράφονται οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας των μικροοργανισμών, κατά των χρόνων 0, και πως αυτές μεταβλήθηκαν αφού λήφθηκε υπόψιν αρχικά η επίδραση των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (ηλικία, φύλο, BMI) και εν συνεχεία υπολογίστηκε και η επίδραση των διατροφικών χαρακτηριστικών [% πρωτεΐνη, % διαιτητικό λίπος, ποσότητα φυτικών ινών (g)].

Πίνακας 11: Τιμές p των μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης ($t=0$ μήνες), μετά από την επίδραση των συγχυτικών παραγόντων^a.

	Αρχικό p	Διορθωμένο p (ανθρωπομετρικά)	Διορθωμένο p (ανθρωπομετρικά και διατροφικά)
Ολικά βακτήρια	0,282	0,397	0,491
<i>E.coli</i>	0,058	0,091	0,049
<i>F.nuclaetum</i>	0,095	0,003	0,009
<i>C.albicans</i>	0,155	0,198	0,099

^aΟι τιμές είναι: αρχικά, ύστερα από διόρθωση με βάση τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και ύστερα από διόρθωση λαμβάνοντας υπόψιν την επίδραση και των ανθρωπομετρικών και των διατροφικών χαρακτηριστικών.

Τα επίπεδα των ολικών βακτηρίων συνεχίζουν να μην διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών των δύο νόσων, λαμβάνοντας υπόψιν τους συγκεκριμένους συγχυτικούς παράγοντες, .

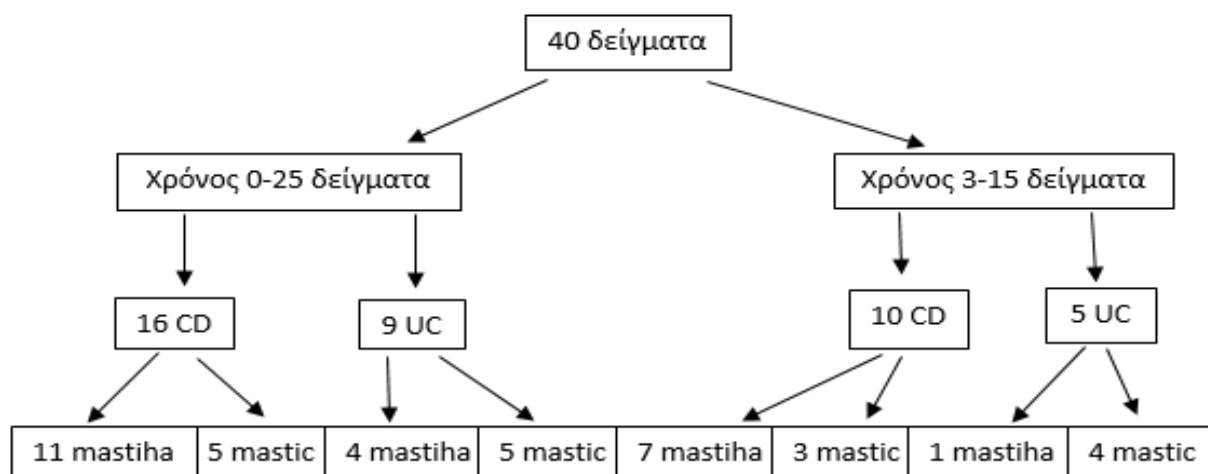
Για το *E.coli* η ομάδα των ασθενών της CD εμφάνισε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τα επίπεδα των ασθενών της UC, μετά από διόρθωση ως προς το σύνολο των συγχυτικών παραγόντων που εξετάστηκαν ($p=0,049$) .

Στην περίπτωση του *F.nucleatum*, η ομάδα των ασθενών της UC εμφάνισε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τα επίπεδα των ασθενών της CD, μετά από διόρθωση ως προς την ηλικία, φύλο και BMI ($p=0,003$), αλλά και ως προς το σύνολο των συγχυτικών παραγόντων που εξετάστηκαν ($p=0,009$) .

Για το *C.albicans*, η ομάδα των ασθενών της CD εμφάνισε τάση για χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τα επίπεδα των ασθενών της UC, μετά από διόρθωση ως προς το σύνολο των συγχυτικών παραγόντων που εξετάστηκαν ($p=0,099$) .

6.4 Συγκρίσεις αρχή-τέλος με βάση την παρέμβαση

Στο Σχήμα 2 φαίνεται σχηματικά ο ακριβής αριθμός δειγμάτων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.



Σχήμα 2: Σχεδιάγραμμα ασθενών.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί των υπό εξέταση μικροοργανισμών στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών, στην αρχή, με βάση την παρέμβαση.

Πίνακας 12: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; $\log_{10}$ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών, στην αρχή της παρέμβασης ($t=0$ μήνες), στους εθελοντές ($N=15$) που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο^α.

	mastiha (N=8)	mastic (N=7)	<i>p</i>
Ολικά βακτήρια	10,60±0,64	10,54±0,50	0,835
<i>E.coli</i>	7,53±1,72	6,35±2,87	0,354
<i>F.nuclaetum</i>	4,71±0,50	3,21±0,57	0,094
<i>C.albicans</i>	2,50±1,00	3,12±1,18	0,396

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο *F. nucleatum* ($p=0,094$) φαίνεται πως υπάρχει μια τάση να είναι υψηλότερος ο πληθυσμός στην παρέμβαση «mastiha».

Πίνακας 13: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; $\log_{10}$ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στο τέλος της παρέμβασης ($t=3$ μήνες), στους εθελοντές ($N=15$) που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο^α.

	mastiha (N=8)	mastic (N=7)	p
Ολικά βακτήρια	10,23±0,80	10,56±0,59	0,377
<i>E.coli</i>	6,76±1,93	6,46±2,71	0,815
<i>F.nucleatum</i>	4,54±1,81	4,81±0,61	0,599
<i>C.albicans</i>	3,41±0,93	3,27±1,23	0,854

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών στο τέλος της παρέμβασης.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastiha» στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Πίνακας 14: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; $\log_{10}$ copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην αρχή ($t=0$ μήνες) και στο τέλος της παρέμβασης ($t=3$ μήνες) στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastiha» ($N=8$)^α.

	t=0	t=3	p
Ολικά βακτήρια	10,60±0,64	10,23±0,79	0,236
<i>E.coli</i>	7,53±1,72	6,76±1,93	0,338
<i>F.nucleatum</i>	4,71±0,50	4,54±1,81	0,652
<i>C.albicans</i>	2,50±1,00	3,41±0,93	0,403

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών στην παρέμβαση «mastiha» στο τέλος, σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης.

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastic» στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Πίνακας 15: Ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log₁₀copies/ml κοπράνων) των υπό εξέταση μικροοργανισμών στην αρχή (t=0 μήνες) και στο τέλος της παρέμβασης (t=3 μήνες) στην ομάδα των εθελοντών που λάμβαναν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastic» (N=7)^α.

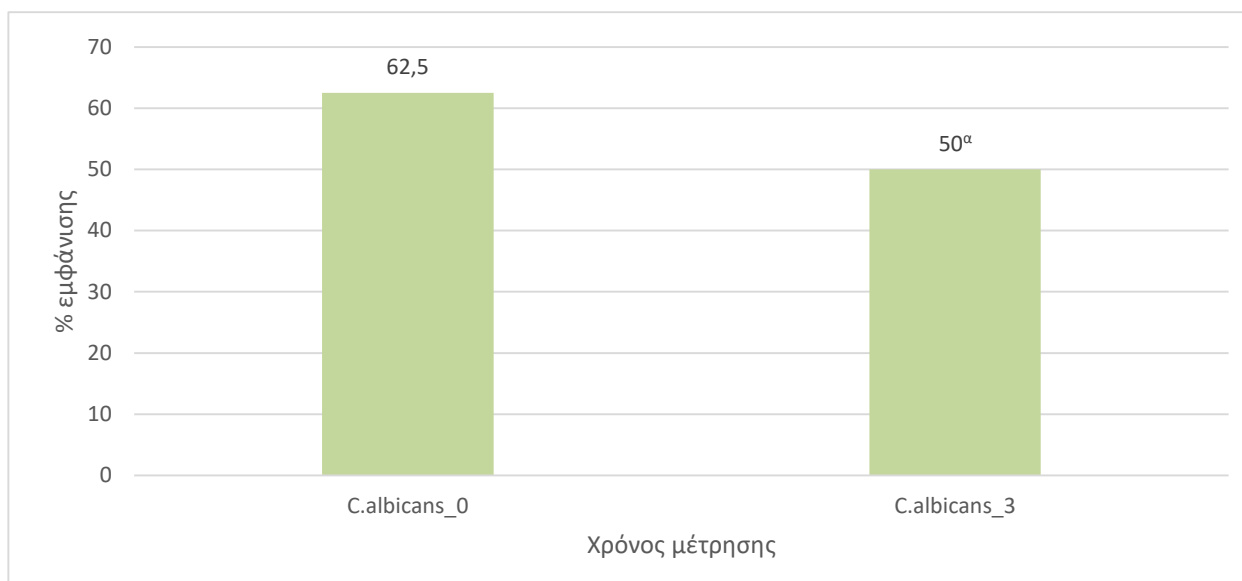
	t=0	t=3	p
Ολικά βακτήρια	10,54±0,50	10,56±0,56	0,924
<i>E.coli</i>	6,55±3,16	6,46±2,71	0,895
<i>F.nuclaetum</i>	5,21±0,57	4,81±0,60	0,225
<i>C.albicans</i>	3,01±1,65	3,05±1,41	0,972

^αΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών στην παρέμβαση «mastic» στο τέλος, σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης.

Όλα τα άτομα που πήραν το διατροφικό συμπλήρωμα «mastiha», εμφάνισαν *E.coli* στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Στο Σχήμα 3 απεικονίζεται η συχνότητα εντοπισμού του *C.albicans* στην ομάδα παρέμβασης «mastiha», στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

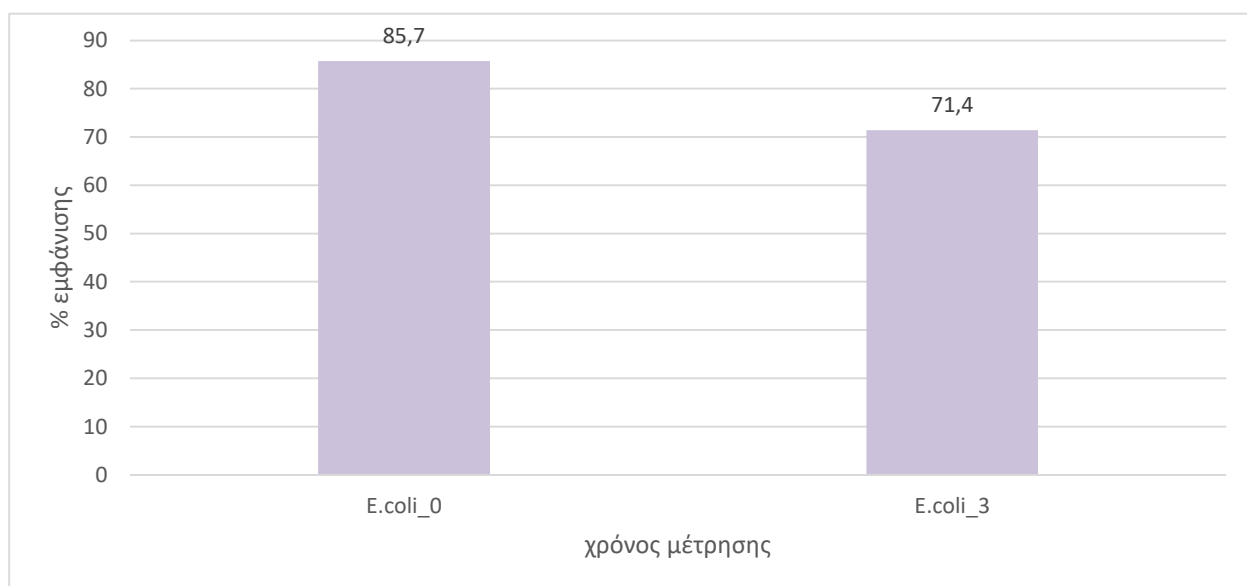


Σχήμα 3: Συχνότητα εμφάνισης του *C.albicans* στην αρχή (t=0 μήνες) και στο τέλος της παρέμβασης (t=3 μήνες) του συμπληρώματος «mastiha» (N=8).

^aστατιστικά σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με τον χρόνο 0 ($p=0,028$) .

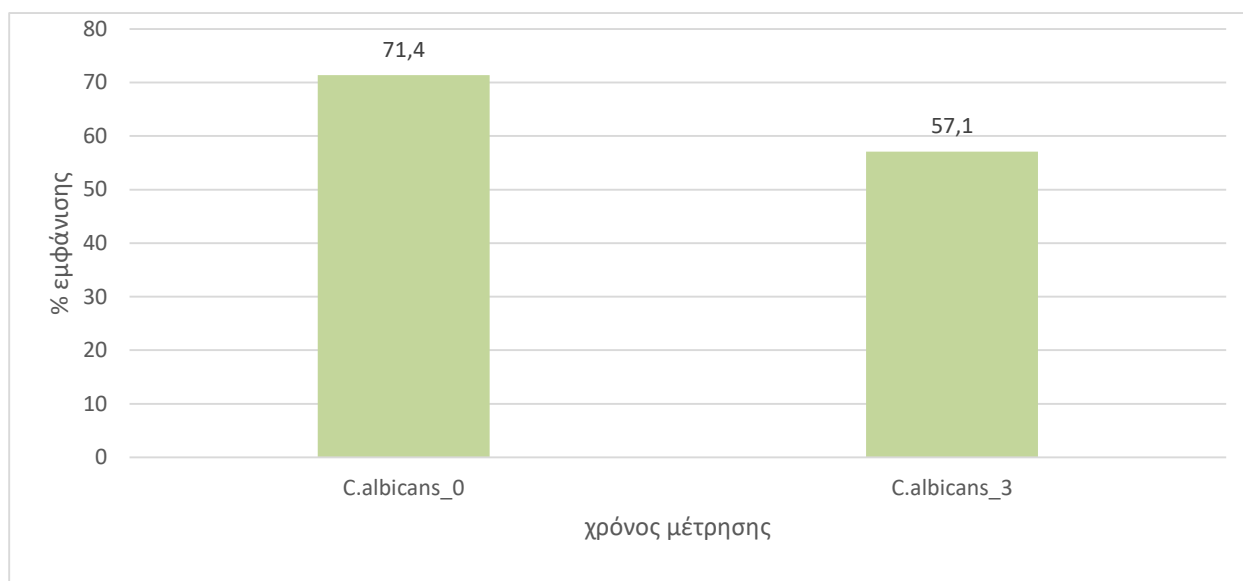
Η συχνότητα εμφάνισης του *C.albicans* στην συγκεκριμένη ομάδα παρέμβασης μειώθηκε σημαντικά μετά το τέλος της παρέμβασης ($p=0,028$) .

Στο Σχήμα 4 απεικονίζεται η συχνότητα εντοπισμού του *E.coli* στην ομάδα παρέμβασης «mastic», στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.



Σχήμα 4: Συχνότητα εμφάνισης του *E.coli* στην αρχή (t=0 μήνες) και στο τέλος της παρέμβασης (t=3 μήνες) του συμπληρώματος «mastic» (N=7).

Η συχνότητα εμφάνισης του *E.coli* στην συγκεκριμένη ομάδα παρέμβασης τείνει να μειωθεί μετά το τέλος της παρέμβασης ($p=0,088$).



Σχήμα 5: Συχνότητα εμφάνισης *C.albicans* στην αρχή (t=0 μήνες) και στο τέλος της παρέμβασης (t=3 μήνες) του συμπληρώματος «mastic» (N=7).

Για τα άτομα που πήραν το συμπλήρωμα «mastic» η συχνότητα του *C.albicans* δεν εμφάνισε σημαντικές διαφοροποιήσεις στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης (71,4% vs. 57,1%, $p=0,809$), (Σχήμα 5).

6.5 Δείκτης ποιότητας ζωής των ασθενών

Στον Πίνακα 16 γίνεται σύγκριση του δείκτη ποιότητας ζωής, όπως καταγράφηκε από τις απαντήσεις των εθελοντών, κατά την είσοδο τους στην κάθε παρέμβαση και μετά το πέρας της.

Πίνακας 16: Δείκτης ποιότητας ζωής στην αρχή (IBDQ- t=0 μήνες) και στο τέλος (IBDQ_3- t=3 μήνες) των ασθενών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση (N=15)^a.

	mastiha (N=8)	p	mastic (N=7)	p
IBDQ	140,25±15,35	0,248	146,00±31,64	0,903
IBDQ_3	150,63±35,69		148,00±34,84	

^aΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον δείκτη ποιότητας ζωής στις δύο ομάδες παρέμβασης.

ΜΕΡΟΣ Δ': ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 7. Συζήτηση

Ο επιπολασμός των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί και η έρευνα για την εύρεση νέων θεραπειών με λιγότερες παρενέργειες γίνεται επιτακτική. Η μαστίχα είναι ένα συστατικό που από την αρχαιότητα χρησιμοποιείται για τη βελτίωση των συμπτωμάτων των παθήσεων του γαστρεντερικού σωλήνα και τα τελευταία χρόνια γίνεται μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για την καλύτερη εκμετάλλευση της σε συγκεκριμένες ασθένειες. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μέρος ευρύτερης έρευνας, στόχος της οποίας είναι να μελετήσει την επίδραση της κατανάλωσης της μαστίχας στη συμπτωματολογία και στους δείκτες των συγκεκριμένων νοσημάτων. Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι να μελετήσει την επίδραση της κατανάλωσης μαστίχας, από ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα, σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς του εντέρου, οι οποίοι έχουν συνδεθεί με τις νόσους αυτές και ενδεχόμενα έχουν προφλεγμονώδη δράση.

Μελετήθηκαν δείγματα κοπράνων εθελοντών που συμμετείχαν στην παρέμβαση, οι οποίοι έχουν ενεργή CD και UC, και διαχωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Στη μία χορηγήθηκε συμπλήρωμα διατροφής που περιείχε μαστίχα και στην άλλη ομάδα χορηγήθηκε εικονικό συμπλήρωμα διατροφής. Ο χρόνος της παρέμβασης ήταν τρεις μήνες. Τα δείγματα που μελετήθηκαν λήφθηκαν στην αρχή της παρέμβασης και μετά το τέλος της.

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο real-time PCR, με τη χρήση ειδικών μορίων εκκινητών για την κάθε κατηγορία μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν στατιστικά με κατάλληλο πρόγραμμα προκειμένου να μπορέσει να γίνει ανάλυση των ευρημάτων για να εξαχθούν τα συμπεράσματα της μελέτης.

7.1 Δημογραφικά-ανθρωπομετρικά-διατροφικά χαρακτηριστικά

Αναφορικά με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (κάπνισμα, ηλικία και φύλο) παρά το γεγονός πως φάνηκαν διαφορές ανάμεσα στις δύο νόσους αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Από τη βιβλιογραφία έχει φανεί πως το κάπνισμα αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για τη CD και προστατευτικό για τη UC, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί (23,24,25). Για το φύλο έχει φανεί πως υπάρχει η τάση η CD να εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες και η UC σε άντρες (4,17,21).

Ούτε στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών (βάρος, ύψος και BMI) υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Για τα διατροφικά χαρακτηριστικά (κατανάλωση ενέργειας, υδατάνθρακες, % κατανάλωσης υδατανθράκων, πρωτεΐνη, % κατανάλωσης πρωτεΐνης, λίπος, % κατανάλωσης λίπους και διαιτητικές ίνες) οι ασθενείς με CD καταναλώνουν σημαντικά λιγότερη πρωτεΐνη ($p=0,036$), μικρότερα ποσοστά πρωτεΐνης ($p=0,003$) και μεγαλύτερα ποσοστά λίπους ($p=0,032$) σε σχέση με τους ασθενείς της UC. Για τις διαιτητικές ίνες, υπάρχει η τάση ($p=0,097$), οι εθελοντές της CD να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες. Η πλειοψηφία των τιμών των διατροφικών χαρακτηριστικών των ασθενών υπολογίζονται εντός των ορίων των συστάσεων για την ημερήσια διατροφική πρόσληψη ενός ενήλικα όπως αυτές ορίζονται από τον Εθνικό Διατροφικό Οδηγό για Ενήλικες (59). Παρατηρείται μια απόκλιση στα ποσοστά πρωτεΐνης καθώς οι εθελοντές καταναλώνουν περισσότερη πρωτεΐνη από τη σύσταση και στις διαιτητικές ίνες όπου καταναλώνουν λιγότερα γραμμάρια από ότι συνίσταται (Πίνακας 17). Η κατανάλωση λιγότερων γραμμαρίων φυτικών ινών και περισσότερης πρωτεΐνης, όμως, είναι δικαιολογημένη καθώς υπάρχει η πεποίθηση πως η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μπορεί να εντείνει τις διαρροϊκές κενώσεις ενώ η πρωτεΐνη μπορεί να αυξήσει τον βαθμό στερεότητας των κοπράνων.

Πίνακας 17: Πίνακας σύγκρισης τιμών διατροφικών συστάσεων για μακροστοιχεία και τιμών διατροφικών χαρακτηριστικών του υπό μελέτη πληθυσμού.

	Συστάσεις για ενήλικες ^α	Τιμές δείγματος ^β
Ενέργεια (kcal)	1600(♀)-2000(♂)	1800,84±743,49
Υδατάνθρακες (%)	45-60	48,13±7,91
Λίπος (%)	30-35	33,15±9,04
Πρωτεΐνη (%)	<15	17,38 (13,91-22,59)
Διαιτητικές ίνες (g)	25-30	12,99±7,01

^αΟι τιμές είναι οι συστάσεις όπως καθορίζονται από τον Εθνικό Διατροφικό Οδηγό για υγιείς Ενήλικες, με χαμηλή φυσική δραστηριότητα.

^βΟι τιμές εκφράζονται ως μ.ο.± S.D. για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά ή ως τεταρτημόρια: διάμεσος (25° τεταρτημόριο-75° τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά στην αρχή της παρέμβασης.

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως χαμηλότερη πρόσληψη διαιτητικών ινών επηρεάζει το προφίλ του εντερικού μικροβιόκοσμου με αποτέλεσμα να παράγονται μικρότερα ποσοστά προϊόντων, με προστατευτική δράση, τα οποία ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα όπως τα αμινοξέα μικρής αλύσου (SCFA). Άρα η μικρότερη κατανάλωση διαιτητικών ινών αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης φλεγμονής και ιδιαίτερα κολίτιδας (19). Αυξημένη κατανάλωση ζωικού λίπους, ζωικών πρωτεϊνών και υδατανθράκων έχει φανεί πως συμβάλλουν στην παθογένεση καθώς μεταβάλλουν τον μικροβιόκοσμο, αυξάνουν την διαπερατότητα του βλεννογόνου και προωθούν τη φλεγμονή (7,47). Σε μελέτη που έγινε σε παιδιά της Αφρικής που ακολουθούσαν διατροφή πλούσια σε διαιτητικές ίνες, σε σύγκριση με παιδιά από την Ευρώπη παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά *Bacteroidetes* και μειωμένα *Firmicutes* (19). Η *Candida* έχει συσχετιστεί θετικά με την κατανάλωση υδατανθράκων (7,47). Υψηλό επίπεδο πρόσληψης φρούτων και ινών σχετίζεται με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης CD και υψηλή κατανάλωση ινών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης UC (47).

7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών στην αρχή της παρέμβασης

Τόσο κατά την είσοδο των ασθενών στη μελέτη όσο και μετά το πέρας της διατροφικής παρέμβασης, στα δείγματα των κοπράνων, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών βακτηρίων, του *Escherichia coli* subgroup, του *Fusobacterium nucleatum* και του *Candida albicans*. Από τους υπό μελέτη πληθυσμούς βρέθηκε ότι οι ασθενείς με CD είχαν τάση για υψηλότερο πληθυσμό *E.coli* ($p=0,058$). Παρουσιάζει όμως ενδιαφέρον ότι μετά από την επίδραση του συνόλου των συγχυτικών παραγόντων που εξετάστηκαν η διαφορά αυτή γίνεται σημαντική ($p=0,049$). Αποτέλεσμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο τα ανθρωπομετρικά (βάρος, ύψος και BMI), όσο και τα διατροφικά χαρακτηριστικά [% πρωτεΐνη, % διαιτητικό λίπος, ποσότητα φυτικών ινών (g)] επηρεάζουν τον μικροβιακό πληθυσμό του *E.coli*.

Στο *F.nucleatum* φάνηκε μια τάση να είναι υψηλότερος ο πληθυσμός στη UC ($p=0,095$), μετά όμως από διόρθωση ως προς την ηλικία, φύλο και BMI η ομάδα των ασθενών της UC εμφάνισε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα, σε σύγκριση με τα επίπεδα των ασθενών της CD ($p=0,003$), αλλά και μετά από διόρθωση ως προς το σύνολο των συγχυτικών παραγόντων που εξετάστηκαν ($p=0,009$).

Στα υπόλοιπα βακτήρια καθώς και στις συχνότητες εμφάνισης των *E.coli* και *C.albicans* δεν παρατηρήθηκαν διαφορές .

Σε μελέτη που έγινε σε ασθενείς με CD (ενεργή και μη), με UC (ενεργή και μη) και με υγιείς, χρησιμοποιώντας RT-qPCR, επίσης, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο νόσων. Βρέθηκε, όμως, πως η συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων, των ασθενών, ήταν αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς και ότι οι ασθενείς με τις ενεργούς νόσους είχαν υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης ολικών βακτηρίων σε σχέση με τους ασθενείς με τις μη ενεργούς νόσους (57).

Το *E.coli* είναι ένας από τους μικροοργανισμούς που έχουν συσχετιστεί ισχυρά με τις νόσους λόγω της ικανότητας κάποιων στελεχών του να προσκολλάται και να εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα και να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται εντός των μακροφάγων (44). Για το *E.coli* έχει βρεθεί πως υπάρχει σε μεγαλύτερα ποσοστά σε τμήματα του ειλεού ασθενών με CD (36,4%) σε σχέση με τους υγιείς (6,2%) και εντοπίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά σε ασθενείς με CD από ότι σε ασθενείς με UC δείχνοντας έτσι μια πιο ειδική σχέση μεταξύ του βακτηρίου και της CD (14,15). Σε παιδιατρική μελέτη ασθενών με ΙΦΝΕ βρέθηκε *E.coli* στο 75% των δειγμάτων βλεννογόνου σε ασθενείς με CD και στο 100% των δειγμάτων σε ασθενείς με UC, με τη χρήση καλλιεργητικών τεχνικών (8). Σε έρευνα που έγινε για τα *E.coli* που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΙΦΝΕ βρέθηκε πως οι απομονώσεις αποτελούνται από έναν ετερογενή πληθυσμό διαφόρων στελεχών *E.coli* με διαφορετικό γενετικό προφίλ, ότι η συσχέτιση των απομονωμένων βακτηρίων με την επιφάνεια του βλεννογόνου σχετίζονται άμεσα με τις διαταραχές των νόσων. Επίσης, η επαγωγή της νόσου από τα στελέχη *E.coli* είναι πολυπαραγοντική και μπορεί να οφείλεται σε μια ποικιλία γονιδιακών προϊόντων. Η προδιάθεση του ασθενή σε συνδυασμό με την μεταβολή του μικροπεριβάλλοντος του εντέρου και τον αποικισμό από το συγκεκριμένο βακτήριο ενδεχόμενα να επάγουν μια αυτοάνοση αντίδραση η οποία οδηγεί στα συμπτώματα των νόσων (58).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται έρευνες γύρω από το *Fusobacterium* spp. και έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένοι οι πληθυσμοί τους σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σύγκριση με υγιείς. Ειδικότερα σε ασθενείς με UC έχουν βρεθεί αρκετά υψηλά ποσοστά, στον βλεννογόνο του κόλον, σε σχέση με τους υγιείς (14,15). Σε μελέτη κοορτής που έγινε σε 59 ασθενείς το *F.nucleatum* απομονώθηκε πιο συχνά από ασθενείς με νόσο Crohn (50%) σε σχέση με τους υγιείς (17,6%) και βρέθηκε πως τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς είχαν μεγαλύτερη παθογενετική ικανότητα σε σχέση με τα στελέχη των υγιών. Από τη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε πως ύστερα από μόλυνση με το συγκεκριμένο βακτήριο προκλήθηκε αυξημένη έκκριση βλέννας και υπολειτουργία στην έκφραση γονιδίων, όπως το TNFα, με αποτέλεσμα να δρα κατά του φραγμού του βλεννογόνου (40).

Σε μελέτη που έγινε σε ασθενείς με CD και σε υγιείς ανθρώπους βρέθηκε πως η ποικιλότητα και τα νούμερα των μυκήτων ήταν πολύ διαφορετικά. Πιο συγκεκριμένα το *C.albicans* βρέθηκε σε αφθονία σε περιοχές με φλεγμονή μόνο. Εντοπίστηκε σε ποσοστό 75% σε ασθενείς με CD και σε

28,6% σε μη νοσούντες (18). Έχει βρεθεί πως 50% περίπου των ασθενών με CD έχουν θετική ορολογική απόκριση για το *C.albicans* (5). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης καθώς στα δείγματα των ασθενών με CD εντοπίστηκε *C.albicans* στο 50% του πληθυσμού.

7.3 Συγκρίσεις αρχή-τέλος με βάση την παρέμβαση

Η παρέμβαση από την οποία παραλάβαμε τα δείγματα κοπράνων είναι μέρος μίας ευρύτερης διπλά τυφλής τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης, με χορήγηση μαστίχας ή εικονικού συμπληρώματος, χωρίς να γνωρίζουν οι ερευνητές τη σύσταση των χορηγούμενων δισκίων. Οι εθελοντές έπαιρναν συμπλήρωμα με την επισήμανση «mastiha» ή «mastic». Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στο τέλος της παρέμβασης «mastiha» σε σχέση με την έναρξη, δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές. Η συχνότητα εμφάνισης του *E.coli* δεν μεταβλήθηκε μετά την ίδια παρέμβαση, καθώς όσα άτομα είχαν στην αρχή της παρέμβασης «mastiha» είχαν και στο τέλος. Αντίθετα η συχνότητα εμφάνισης του *C.albicans* σημείωσε σημαντική μείωση ύστερα από τη λήψη του συμπληρώματος ($p=0,028$).

Όσο αφορά την παρέμβαση «mastic» δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν μετά την παρέμβαση, σε σχέση με τα επίπεδα που καταμετρήθηκαν στην έναρξη. Όσο για τη συχνότητα εμφάνισης του *E.coli* παρατηρήθηκε τάση μείωσης στο τέλος της παρέμβασης, σε σχέση με την έναρξη ($p=0,088$).

Και στις δύο ομάδες των διαφορετικών συμπληρωμάτων φάνηκε μείωση στην συχνότητα εμφάνισης είτε του *C.albicans* (για το συμπλήρωμα διατροφής «mastiha») είτε τάση για μείωση του *E.coli* (για το συμπλήρωμα διατροφής «mastic»). Στην περίπτωση του εικονικού φαρμάκου αυτό ενδεχόμενα να αποδίδεται στην αυξημένη πεποίθηση των ασθενών πως με την λήψη του συμπληρώματος που διαθέτει μαστίχα μπορεί να βελτιωθούν τα συμπτώματα της νόσου. Έχει βρεθεί πως το εικονικό φάρμακο έχει πραγματικές ψυχολογικές και βιολογικές επιδράσεις στους ασθενείς με ΙΦΝΕ οι οποίες συνεισφέρουν στο πλαίσιο της θεραπείας (60).

Έχει βρεθεί σε μελέτες πως η μαστίχα βοηθά στις νόσους και πιο συγκεκριμένα στη CD. Σε έρευνα με ασθενείς με ενεργή CD που χορηγήθηκε συμπλήρωμα μαστίχας, μειώθηκε η τυχαία μετανάστευση των χημειοκινών και η διαφοροποίηση των μακροφάγων, με αποτέλεσμα να ελεγχθεί, εν μέρει, η φλεγμονώδης αντίδραση. Με αυτόν τον τρόπο, η μαστίχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού στην νόσο του Crohn (36,37). Επίσης, σε άλλη μελέτη σε ασθενείς με ενεργή CD, χορηγήθηκε μαστίχα για 4 εβδομάδες και μειώθηκε ο δείκτης

ενεργότητας της νόσου (CDAI) ενώ βελτιώθηκε η διατροφική τους κατάσταση καθώς αυξήθηκε το βάρος και μειώθηκαν οι υδαρείς κενώσεις (29).

7.4 Σύγκριση δείκτη ποιότητας ζωής

Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στον δείκτη ποιότητας ζωής των εθελοντών που πήραν μέρος και στις δύο παρεμβάσεις. Πιθανόν ο αριθμός των εθελοντών είναι μικρός για να αναδειχθούν σημαντικές μεταβολές.

7.5 Περιορισμοί

Αναφορικά με τους περιορισμούς της μελέτης θα πρέπει να τονισθεί πως για τον υπολογισμό της πρόσληψης ενέργειας και μακροθρεπτικών χρησιμοποιήθηκε ανάκληση 24ώρου. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει μειονεκτήματα καθώς οι πληροφορίες οι οποίες έχουν ληφθεί ενδέχεται να μην είναι αντιπροσωπευτικές για τη συνήθη πρόσληψη του εθελοντή, καθώς εξετάζεται μόνο μια μέρα. Επίσης, εξαρτάται από τη μνήμη του ερωτούμενου και έτσι μπορεί να υπάρχει υπέρ- ή υπό-καταγραφή συγκεκριμένων πληροφοριών.

Ο πληθυσμός που μελετήθηκε αποτελείται από μικρό αριθμό ατόμων με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα που εξήχθησαν ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτικά του γενικότερου πληθυσμού. Επιπρόσθετα, λόγω του μικρού αριθμού ατόμων δεν ήταν δυνατόν να γίνουν και άλλες συσχετίσεις οι οποίες θα ήταν χρήσιμες ως πληροφορίες σχετικά με την επίδραση άλλων συγχυτικών παραγόντων στις ασθένειες.

Συμπερασματικά, στη συγκεκριμένη μελέτη και αφού συν-υπολογίστηκαν οι συγχυτικοί παράγοντες, φάνηκαν διαφορές μεταξύ των εθελοντών που είχαν CD ή UC στην πρόσληψη πρωτεΐνης, λίπους και στις διαιτητικές ίνες. Κατά την είσοδο των ασθενών στη μελέτη εντοπίστηκε υψηλότερη συγκέντρωση *E.coli* στους ασθενείς με CD. Στη σύγκριση της αρχής και του τέλους της παρέμβασης των εθελοντών που πήραν το συμπλήρωμα διατροφής «mastic» το ποσοστό εμφάνισης στον πληθυσμό του *C.albicans* μειώθηκε. Στους εθελοντές που πήραν το συμπλήρωμα διατροφής «mastic» μειώθηκε το ποσοστό εμφάνισης στον πληθυσμό του *E.coli*.

Βιβλιογραφία

1. Saez-Lara, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J. and Gil, A. (2015). The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Research International*, 2015, pp.1-15.
2. Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., Bruno, G., Petito, V., Laterza, L., Cammarota, G., Gaetani, E., Sgambato, A. and Gasbarrini, A. (2013). Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility. *BioMed Research International*, 2013, pp.1-9.
3. Wang, Z. et al, (2014). Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), p.14805.
4. Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P. and Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6), pp.1785-1794.e4.
5. Sartor, R. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 134(2), pp.577-594.
6. Chassaing, B. and Darfeuille-Michaud, A. (2011). The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6), pp.1720-1728.e3.
7. Serban, D. (2015). Microbiota in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis and Therapy: Is It All About Diet?. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(6), pp.760-779.
8. Conte, M., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O. and Cucchiara, S. (2006). Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 55(12), pp.1760-1767.
9. Babickova, J. (2015). Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), p.11321.
10. Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M. and Lochs, H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(1), pp.44-54.
11. Balfour Sartor, R. (2007). Bacteria in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 41(Supplement 1), pp.S37-S43.

12. Yu, C. and Huang, Q. (2013). Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 14(10), pp.513-517.
13. Abraham, C. and Medzhitov, R. (2011). Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 140(6), pp.1729-1737.
14. Kostic, A., Xavier, R. and Gevers, D. (2014). The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*, 146(6), pp.1489-1499.
15. Hold, G. (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years?. *World Journal of Gastroenterology*, 20(5), p.1192.
16. Wright, E., Kamm, M., Teo, S., Inouye, M., Wagner, J. and Kirkwood, C. (2015). Recent Advances in Characterizing the Gastrointestinal Microbiome in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, p.1.
17. Macfarlane, S., Steed, H. and Macfarlane, G. (2009). Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(1), pp.25-54.
18. Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N. and Li, J. (2013). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated With Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, p.1-11.
19. Maslowski, K. and Mackay, C. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology*, 12(1), pp.5-9.
20. Casén, C., Vebø, H., Sekelja, M., Hegge, F., Karlsson, M., Cierniejewska, E., Dzankovic, S., Frøyland, C., Nestestog, R., Engstrand, L., Munkholm, P., Nielsen, O., Rogler, G., Simrén, M., Öhman, L., Vatn, M. and Rudi, K. (2015). Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(1), pp.71-83.
21. Ευρωπαϊκή ομάδα ασθενών με ΙΦΝΕ. Κατανοώντας τα Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου. pp. 1-57.
22. Μπολάνης Κ. Ι., Δαούση Ι. Ελκώδης Κολίτιδα (Μετάφραση από την Αγγλική έκδοση του NACC) pp.1-21.
23. Ελληνικό Ίδρυμα Γαστρεντερολογίας και Διατροφής (ΕΛ.Ι.ΓΑΣΤ.), (2008). Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου. pp. 1-28.
24. Χαραλάμπους Π. (2009). Νόσος Crohn και ψυχολογικά προβλήματα. e-Περιοδικό Επιστήμης & Τεχνολογίας (e-Journal of Science & Technology, e-JST), pp.51-56.

25. Μπολάνης Κ. Ι., Δαούση Ι. Νόσος Crohn (Μετάφραση από την Αγγλική έκδοση του NACC) pp.1-18.
26. Chow J., Lee M., Shen Y., Khosravi A., Mazmanian S. (2011). Host–Bacterial Symbiosis in Health and Disease. US National Library of Medicine, 107: 243–274.
27. Backhed, F. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), pp.1915-1920.
28. Langhorst, J., Wulfert, H., Lauche, R., Klose, P., Cramer, H., Dobos, G. and Korzenik, J. (2014). Systematic Review of Complementary and Alternative Medicine Treatments in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(1), pp.86-106.
29. Kaliora, A. (2007). Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(5), p.a
30. Chadzopulu A., Koukouliata A., Theodosopoulou E., Adraniotis J. (2011). Unique Mastic Resin from Chios . *Prog Health Sci* 2011, Vol 1, No 1. p. 131-136.
31. Dimas K., Pantazis P., Ramanutzam R. (2012). Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties. *In vivo* 26: 777-786 (2012)
32. Καραμούζος Ε., Οι φαρμακευτικές ιδιότητες και η ευεργετική επίδραση της μαστίχας Χίου στη στοματική υγιεινή
33. Βουνάκη Γ., Τουρλιώτη Ν. (2013). Η μαστίχα Χίου, ένα παραδοσιακό τρόφιμο: εφαρμογές στη διατροφή και την βιο-ιατρική. pp. 1-152.
34. Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F. and Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, pp.gutjnl-2016-313235.
35. www.google.com
36. Kaliora, A. et al (2007). Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World Journal of Gastroenterology*, 13(45), p.6031.
37. Kang, J., Wanibuchi, H., Salim, E., Kinoshita, A. and Fukushima, S. (2007). Evaluation of the toxicity of mastic gum with 13 weeks dietary administration to F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(3), pp.494-501.

38. Koutsoudaki, C., Krsek, M. and Rodger, A. (2005). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), pp.7681-7685.
39. Kim, H. and Neophytou, C. (2009). Natural anti-inflammatory compounds for the management and adjuvant therapy of inflammatory bowel disease and its drug delivery system. *Archives of Pharmacal Research*, 32(7), pp.997-1004.
40. Allen-Vercoe, E., Strauss, J. and Chadee, K. (2011). *Fusobacterium nucleatum*. *Gut Microbes*, 2(5), pp.294-298.
41. Gallo, A., Passaro, G., Gasbarrini, A., Landolfi, R. and Montalto, M. (2016). Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(32), p.7186.
42. Basson, A., Trotter, A., Rodriguez-Palacios, A. and Cominelli, F. (2016). Mucosal Interactions between Genetics, Diet, and Microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*, 7.
43. Bashir, A., Miskeen, A., Hazari, Y., Asrafuzzaman, S. and Fazili, K. (2015). *Fusobacterium nucleatum*, inflammation, and immunity: the fire within human gut. *Tumor Biology*, 37(3), pp.2805-2810.
44. Desilets, M., Deng, X., Rao, C., Ensminger, A., Krause, D., Sherman, P. and Gray-Owen, S. (2016). Genome-based Definition of an Inflammatory Bowel Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Pathovar. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(1), pp.1-12.
45. Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J., Vecchi, M. and Pizarro, T. (2013). Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Frontiers in Immunology*, 4.
46. Thomazini, C., Samegima, D., Rodrigues, M., Victoria, C. and Rodrigues, J. (2011). High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(6), pp.475-479.
47. Ahmed I., Roy B., Khan S., Septer S. and Umar S. (2016). Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*, 4(2), p.20.
48. Yu Z., Morrison M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36:808-812.
49. <http://www.dnagenotek.com/US/products/OMR200.html>

50. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods*. 2010;81: 127-134.
51. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148: 257-266.
52. Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 2003; 149: 269-277.
53. Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75: 3250-3257.
54. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *Braz J Microbiol*. 2015;46: 1135-1140.
55. Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, Al-Mohsen I, Almodavar E, Gutierrez MI, Bhatia K. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol*. 2005; 54: 243-248.
56. Chinou I. (2015). Assessment report on *Pistacia lentiscus* L., resin (mastix). European medicines agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
57. Vrakas, S., Mountzouris, K., Michalopoulos, G., Karamanolis, G., Papatheodoridis, G., Tzathas, C. and Gazouli, M. (2017). Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*, 12(1), p.e0170034.
58. Vejborg, R., Hancock, V., Petersen, A., Krogfelt, K. and Klemm, P. (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics*, 12(1).
59. Μπενέτου Β. et al.(2014). Εθνικός Διατροφικός Οδηγός για Ενήλικες, επιστημονική τεκμηρίωση
60. Lu, C. L., & Chang, F. Y. Placebo effect in patients with irritable bowel syndrome. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2011; 26(s3), 116-118.

