



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

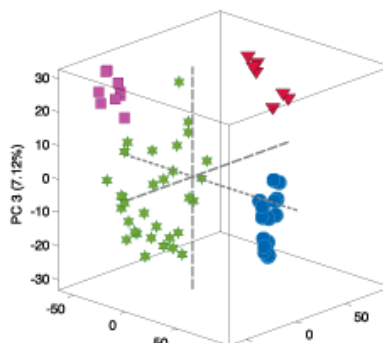
ΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**Μεταβολικό προφίλ κοπράνων σε ασθενείς με ΙΦΝΕ πριν και μετά από
παρέμβαση με μαστίχα Χίου**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ειρήνη Δημητροπούλου



Αθήνα, 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανδριάννα Καλιώρα (Επιβλέπουσα)

Επ. Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νικόλαος Καλογερόπουλος

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αντωνία Χίου

Αν. Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Ειρήνη Δημητροπούλου

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.

Στα παιδιά μου....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας και Φυτικοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και στα Εργαστήρια του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Με την ολοκλήρωσή της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν και συνέβαλαν στην περάτωση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου, κα Ανδριάννα Καλιώρα, για την ανάθεση του θέματος, την φιλική της διάθεση και την άριστη συνεργασία. Η επιστημονική καθοδήγηση, οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις της ήταν πολύτιμες.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, Καθηγητή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, καθώς και στην κα Αντωνία Χίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, που με τιμούν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής και συντελούν στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

Τον κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Β' του Ε.Ι.Ε, για την συμβολή του στην πραγματοποίηση του εργαστηριακού σκέλους της μελέτης καθώς και για τις συνεχείς υποδείξεις που μου παρείχε.

Τις διδακτορικές ερευνήτριες Ευσταθία Παπαδά και Χαρά Αμερικάνου για το άψογο κλίμα συνεργασίας, την βοήθεια και την διάθεση που επέδειξαν να με βοηθήσουν σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο.

Τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Χαράλαμπο Φωτάκη για το ενδιαφέρον, την προθυμία και την καθοριστική συμβολή του στην διεκπεραίωση της εν λόγω εργασίας.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Μώρο και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα Αριάννα Φιλντίση για την συνεργασία και την συνεισφορά τους στην πειραματική διαδικασία.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου που είναι πάντα δίπλα μου, γεμάτη αγάπη και κατανόηση.

Τέλος το σημαντικότερο ευχαριστώ το οφείλω στον σύζυγό μου, που στηρίζει τις επιλογές μου, συμμετέχει στις αγωνίες μου και στέκεται πλάι μου όσο κανείς άλλος...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου	20
1.1. Ορισμός	20
1.2. Επιδημιολογικά Στοιχεία	20
1.3. Αιτιολογία και Παθογένεια	25
1.3.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	25
1.3.2 Γενετικοί παράγοντες	29
1.3.3 Ανοσολογικοί παράγοντες	31
1.3.4 Μικροβιακοί παράγοντες	33
1.4. Κλινική Συμπτωματολογία στις ΙΦΝΕ	34
1.5. Μακροσκοπικά και Μικροσκοπικά Χαρακτηριστικά- Εξωτερικές Εκδηλώσεις	35
1.5.1 Ελκώδης Κολίτιδα	35
1.5.2 Νόσος Crohn	36
1.5.3 Εξωεντερικές εκδηλώσεις	37
1.6. Διάγνωση	37
1.6.1 Εργαστηριακοί Δείκτες	37
1.6.2 Απεικονιστικός έλεγχος	38
1.7. Θεραπεία	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα	41
2.1. Γενικά	41
2.2. Σύνθεση εντερικού μικροβιώματος	42
2.3. Συμβίωση και ανοσοποιητικό σύστημα	44
2.3.1 Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στο ανοσοποιητικό σύστημα	45
2.4. Μικροβίωμα και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	46
2.5. Μη βακτηριακό μικροβίωμα και ΙΦΝΕ	49
2.5.1 Ιοί και ΙΦΝΕ	49
2.5.2 Μύκητες και ΙΦΝΕ	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μεταβολομική και Αναλυτικές Τεχνικές	53
3.1. Εισαγωγή στην μεταβολομική	53
3.2. Η Μεταβολομική και ο ρόλος της στη διάγνωση ασθενειών	54
3.3. Αναλυτικές πλατφόρμες μεταβολομικής	55
3.4. Δυσβίωση, Μικροβιακοί μεταβολίτες και ΙΦΝΕ	58
3.5. Μεταβολομική και ΙΦΝΕ	60
3.5.1 Χαρακτηρισμός της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου	60
3.5.2 Διαφοροποίηση υποτύπων ΙΦΝΕ	62
3.5.3 Μεταβολίτες σχετιζόμενοι με τον βαθμό ενεργότητας της νόσου	63
3.6. Μεταβολομική και βιοδείκτες	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μαστίχα Χίου	68
4.1. Χαρακτηριστικά της μαστίχας Χίου	68
4.2. Ταυτοποίηση των χημικών συστατικών της μαστίχας Χίου	69
4.3. Ευεργετικές δράσεις της μαστίχας Χίου	71
4.3.1 Αντιμικροβιακή δράση	71
4.3.2 Αντιοξειδωτική – Καρδιοπροστατευτική δράση	72
4.3.3 Αντιφλεγμονώδης δράση	73
4.3.4 Χημειοπροστατευτική δράση	74
4.3.5 Άλλες δράσεις	74
4.4. Μαστίχα Χίου και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	81
6.1. Υλικά και αντιδραστήρια	81
6.1.1 Υλικά	81
6.1.2 Ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός	81
6.1.3 Λογισμικά προγράμματα	81
6.2. Κλινική παρέμβαση	82
6.2.1 Αντικείμενο της παρέμβασης	82

6.2.2 Πρωτόκολλο κλινικής δοκιμής	82
6.3. Μεταβολομική	86
6.3.1 Δειγματοχώρος μεταβολομικής μελέτης	86
6.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων	87
6.3.3 Λήψη Φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	88
6.3.4 Προετοιμασία και διαχείριση των φασματικών δεδομένων	88
6.4. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση – Χημειομετρία	90
6.4.1 Η πολυμεταβλητή ανάλυση στην μεταβολομική με χρήση ^1H NMR	92
6.4.2 Εσωτερική επικύρωση μοντέλου, (internal validation)	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	100
7.1. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση μεταβολομικής μελέτης	100
7.1.1 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε έξαρση – Συνολική παρέμβαση (μαστίχα και εικονικό σκεύασμα).	102
7.1.2 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε ύφεση – Συνολική παρέμβαση (μαστίχα και εικονικό σκεύασμα).	104
7.1.3 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε έξαρση – Παρέμβαση με μαστίχα Χίου.	105
7.1.4 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε ύφεση – παρέμβαση με μαστίχα Χίου.	107
7.1.5 Υποκατηγορίες ΙΦΝΕ σε ύφεση/έξαρση – Παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα (placebo).	111
7.2. Αποτίμηση φασμάτων NMR και ταυτοποίηση μεταβολιτών	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	123
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	150

Περίληψη

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελούν μια χρόνια υποτροπιάζουσα φλεγμονώδη διαταραχή του γαστρεντερικού σωλήνα τόσο με εντερικές όσο και με εξωεντερικές εκδηλώσεις. Περιλαμβάνουν τη νόσο Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Η αιτιολογία παραμένει άγνωστη θεωρώντας την ένα πολυπαραγοντικό νόσημα με περιβαλλοντικούς, γενετικούς, ανοσολογικούς και μικροβιακούς παράγοντες να συμβάλλουν στην αιτιοπαθογένεια της. Η αντιμετώπιση των εξάρσεων και η διατήρηση της ύφεσης απαιτούν φαρμακευτική αγωγή, ωστόσο η επιστημονική κοινότητα λόγω των παρενεργειών, της δυσκολίας συμμόρφωσης των ασθενών, της χρόνιας χρήσης φαρμακευτικών σκευασμάτων και της συχνής υποτροπής της νόσου αναζητά φυσικά προϊόντα με αντιφλεγμονώδη δράση ώστε να καλύψει αυτό το κενό.

Η Μαστίχα Χίου αποτελεί μια φυσική αρωματική ρητίνη που εκκρίνεται από τον κορμό και τα κλαδιά του μαστιχόδεντρου (*Pistacia lentiscus var Chia*). Είναι πλούσια σε φαινολικές και τερπενοειδείς ενώσεις που της προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές).

Η παρούσα διατριβή αφορά την διερεύνηση και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διατροφικού συμπληρώματος Μαστίχας Χίου στο μεταβολικό προφίλ 128 ενήλικων ασθενών με ΙΦΝΕ (εκ των οποίων 60 ασθενείς με ενεργή νόσο και 68 σε ύφεση) με τη χρήση μεταβολομικής.

Πρόκειται για μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη στην οποία οι ασθενείς λάμβαναν δια στόματος είτε διατροφικό συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου είτε εικονικό σκεύασμα. Η παρέμβαση με ταμπλέτες Μαστίχας Χίου διήρκεσε 3 μήνες σε ασθενείς με ενεργή νόσο και 6 μήνες σε ασθενείς σε ύφεση, ενώ η πρόσληψή τους ήταν καθημερινή.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προέκυψε ότι η λήψη μαστίχας Χίου στα επίπεδα που χορηγήθηκε κατά την κλινική παρέμβαση, είχε επίδραση στο μεταβολικό προφίλ ασθενών με ΙΦΝΕ μόνο στην ομάδα που αφορούσε ασθενείς σε ύφεση.

Αυξημένα επίπεδα θρυπτοφάνης και υπουρικού οξέος υποδεικνύουν την επαναφορά του μεταβολισμού σε φυσιολογικά επίπεδα που πιθανώς σχετίζεται με περαιτέρω ύφεση των ΙΦΝΕ και μπορούν εν μέρει να συνδεθούν με τα φυτοχημικά συστατικά της μαστίχας.

Το γεγονός αυτό αιτιολογείται σύμφωνα με το σχεδιασμό της μελέτης καθώς οι ασθενείς που βρίσκονται σε έξαρση πριν την παρέμβαση, έλαβαν το σκεύασμα για το μισό χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτούς που βρίσκονται σε ύφεση, δηλαδή για 3 μήνες έναντι 6 μηνών.

Συμπερασματικά τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν τη θετική επίδραση της μαστίχας στο μεταβολικό αποτύπωμα των κοπράνων.

Λέξεις κλειδιά: Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, μεταβολομική, κόπρανα, μαστίχα Χίου, κλινική παρέμβαση

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) refers to a chronic recurrent inflammatory disorder of the gastrointestinal tract, characterized by both intestinal and extraintestinal manifestations, including Ulcerative colitis and Crohn's disease. The etiology remains unknown. The disease is considered multifactorial, with genetic, immunological and environmental factors contributing to the pathogenesis. Flares and remission maintenance of the disease require pharmaceutical treatment. However, the scientific community, because of the side effects, the difficulty of compliance on chronic medication and the increased frequency of relapses of the disease, searches out for natural products with anti-inflammatory effect for disease remission maintenance.

The Chios Mastic (MX) is the natural aromatic resin secreted from the trunk and branches of the mastic tree (*Pistacia lentiscus* var *Chia*). It is rich in terpenes and polyphenols, which provide beneficial properties (antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial).

This dissertation concerns the investigation and evaluation of the effectiveness of a mastic dietary supplement in the metabolic profile of 128 adult IBD patients (60 of them with active disease and 68 in recession) implementing NMR based metabolomics.

Samples were taken from a randomized, double-blind, controlled study in which patients received orally either Chios Mastic supplement or a placebo. Intervention with mastic tablets lasted for 3 months (daily intake) in patients with active disease and 6 months in those with recession.

Results indicated that Chios mastic at the levels administered during clinical intervention influenced the metabolic profile of patients with IBD only in the group of patients with recession.

Increased levels of tryptophan and hippuric acid indicate the shift of the metabolism to normal levels possibly related to further recession of IBD which might be partly related to the phytochemical components of the mastic.

This is justified according to the design of the study, since patients with active disease prior to intervention received the supplement only for 3 months versus 6 months for those with recession.

In conclusion, the findings of the present study demonstrate a positive effect of mastic supplementation for IBD patients, as demonstrated from their metabolic profile using feces as biological matrix.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, metabolomics, feces, Chios mastic, clinical intervention

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Εξέλιξη της νόσου Crohn και ελκώδους κολίτιδας παγκοσμίως (Ananthakrishnan, 2015).....	21
Εικόνα 2: Ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ σε παγκόσμιο επίπεδο για το 2015 (Karlan, 2015).....	22
Εικόνα 3: Εύρος συχνότητας εμφάνισης και επιπολασμού της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου από το 1990, διαστρωματωμένο σε γεωγραφικές περιοχές (Ng et al., 2017).....	24
Εικόνα 4: Αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ (Sartor, 2006).....	25
Εικόνα 5: Περιβαλλοντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ. (Ananthakrishnan et al., 2018).....	29
Εικόνα 6: Γονίδια που εμπλέκονται στις ΙΦΝΕ. (We et al., 2014).....	31
Εικόνα 7: Η δράση των κυτοκινών στην παθογένεια των ΙΦΝΕ. (Neurath, et al., 2014).	33
Εικόνα 8: Μακροσκοπική εικόνα εντέρου στις ΙΦΝΕ. (Leppkes et al, 2014).....	36
Εικόνα 9: Θεραπευτική πυραμίδα των ΙΦΝΕ. (Aloi et al., 2014).....	40
Εικόνα 10: Μεταβολές στον αριθμό και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού. (Μεντής et al., 2013)	42
Εικόνα 11: Διαφορές στο ανθρώπινο μικροβίωμα (AM) του εντέρου μεταξύ βλεννογόνου, όπου τα βακτήρια είναι προσκολλημένα και του εντερικού αυλού (Μεντής et al., 2013).	43
Εικόνα 12: Μικροβίωμα, γενετικό περιβάλλον ξενιστή και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου Crohn. Αριστερά: υγιείς άνθρωποι, δεξιά: ασθενείς με ΙΦΝΕ (Chassaing et al., 2011).	46
Εικόνα 13: Οι μεταβολίτες συνδέονται στενά με τον φαινότυπο ενός βιολογικού συστήματος (Ivanisevic and Siuzdak, 2015).....	54
Εικόνα 14: Γενική αναπαράσταση των “omics” επιστημονικών πεδίων.	55
Εικόνα 15: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της εφαρμογής NMR.....	58
Εικόνα 16: Διάγραμμα ροής της μεταβολομικής μελέτης της παρούσας εργασίας.	86
Εικόνα 17: PCA μοντέλο στο σύνολο των δειγμάτων (N=93). $R^2X(cum)=0,73$, $Q^2(cum)=0,47$. Με πράσινο χρώμα είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε μετά.	100
Εικόνα 18: PCA μοντέλο στο σύνολο των δειγμάτων (N=90). $R^2X(cum)=0,313$, $Q^2(cum)=0,266$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά.	101
Εικόνα 19: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε έξαρση (N=48). $R^2X(cum)=0,314$, $Q^2(cum)=0,22$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά. Με τετράγωνο σχήμα αναπαρίστανται τα δείγματα ΙΦΝΕ (UC) ενώ με κύκλο τα ΙΦΝΕ (CD). Τα κενά σχήματα αφορούν τη χρήση εικονικού σκευάσματος ενώ τα γεμάτα αφορούν τη χρήση μαστίχας κατά την παρέμβαση. Το μοντέλο έχει μόνο μία έκτροπη τιμή (21A) που αφορά δείγμα πριν την παρέμβαση (γυναίκα 49 ετών με BMI 26,3).	102
Εικόνα 20: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε ύφεση (N=42). $R^2X(cum)=0,382$, $Q^2(cum)=0,278$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά. Με τετράγωνο σχήμα αναπαρίστανται τα δείγματα ΙΦΝΕ (UC) ενώ	

με κύκλο τα ΙΦΝΕ (CD). Τα κενά σχήματα αφορούν τη χρήση εικονικού σκευάσματος ενώ τα γεμάτα αφορούν τη χρήση μαστίχας κατά την παρέμβαση. Το μοντέλο δεν παρουσιάζει έκτροπες τιμές.	104
Εικόνα 21: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε έξαρση. N=20, $R^2X(Cum)=0,35$, $Q^2(cum) = 0,05$. Με πράσινο χρώμα (Α): πριν και με μπλε χρώμα (Β) μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου.	105
Εικόνα 22: OPLS-DA IBD, Active, Verum, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. N=20 $R^2X(Cum)=0,94$, $Q^2(cum) =0,45$ (πάνω) και μεταθετικός έλεγχος επικύρωσης (κάτω).	106
Εικόνα 23: PCA ΙΦΝΕ σε ύφεση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. N=28, $R^2X(Cum)=0,38$, $Q^2(cum) = 0,231$	107
Εικόνα 24: OPLS-DA για τα δείγματα ΙΦΝΕ σε ύφεση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. N=28 $R^2X(Cum)=0,88$, $Q^2(cum) =0,67$ (πάνω), μεταθετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης (μέση) και καμπύλη ROC (κάτω).	108
Εικόνα 25: (πάνω) PCA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα. N=28, $R^2X(cum)=0,36$, $Q^2(cum) = 0,21$, (μέση) OPLS-DA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. N=28 $R^2X(Cum)=0,86$, $Q^2(cum) =0,21$, και (κάτω) μεταθετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης.	112
Εικόνα 26: (πάνω) PCA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε ύφεση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. N=15, $R^2X(cum)=0,49$, $Q^2(cum) = 0,22$, (μέση) OPLS-DA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. N=15 $R^2X(Cum)=0,84$, $Q^2(cum) =0,53$, και (κάτω) μεταθετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης.	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εξωντερικές εκδηλώσεις στις ΙΦΝΕ	37
Πίνακας 2: Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με ΙΦΝΕ. Αριστερά: πιθανοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, δεξιά: μικρόβια με πιθανή προστατευτική δράση (Serban, 2015 με αναφορές εντός).	52
Πίνακας 3: Μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν τις ΙΦΝΕ με χρήση μεταβολομικής σε ανθρώπινα δείγματα.	66
Πίνακας 4: Αναλογία μαστιχέλαιου, πολυμερούς και επιμέρους κλασμάτων στη μαστίχα Χίου	70
Πίνακας 5: Αναλογία κύριων συστατικών στο όξινο κλάσμα	70
Πίνακας 6: Αναλογία κύριων συστατικών στο ουδέτερο κλάσμα.	71
Πίνακας 7: Βιολογικές δράσεις της μαστίχας Χίου και πιθανοί μηχανισμοί.	75
Πίνακας 8: Κριτήρια συμμετοχής ασθενών	83
Πίνακας 9: Αριθμός δειγμάτων ανά κατηγορία.	87
Πίνακας 10: Περιγραφή δειγμάτων έκτροπων τιμών.	101
Πίνακας 11: Αποτίμηση μεταβολιτών στο φάσμα NMR.	118
Πίνακας 12: Αποτελέσματα διερεύνησης μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst.	122

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Δομές κυριότερων SCFA (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό οξύ), BCFA(ισοβουτυρικό)	60
Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής κλινικής παρέμβασης με μαστίχα Χίου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.	85
Σχήμα 3: (αριστερά) Τυπικό φάσμα NMR. (δεξιά) Πίνακας φασματοσκοπικών δεδομένων, όπου N: αριθμός φασμάτων και K: ολοκληρώματα των τμηματοποιημένων φασματικών περιοχών (Φωτάκης, 2013).	89
Σχήμα 4: Εφαρμογή της μεθόδου spectral binning σε πρότυπο φάσμα 256K σημείων (Φωτάκης, 2013).	90
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση PLS μοντέλου (Φωτάκης, 2013).	93
Σχήμα 6: PLS-DA: Η μήτρα της εξαρτημένης μεταβλητής Y κωδικοποιεί τις τάξεις/κατηγορίες των δειγμάτων (Φωτάκης, 2013).	94
Σχήμα 7: Σύγκριση ανάμεσα στο PLS-DA (αριστερά) και στο OPLS-DA (δεξιά) (Φωτάκης, 2013).	94
Σχήμα 8: Στατιστικό μοντέλο OPLS-DA (αριστερά) και μεταθετικός έλεγχος (δεξιά) (Qiu, 2013).	97
Σχήμα 9: Διαχωρισμός μοντέλων και αξιολόγηση αποτελεσμάτων σύμφωνα με την καμπύλη ROC. Se είναι η ευαισθησία (sensitivity) και Sp η εξειδίκευση (specificity) του μοντέλου (Κρίτση, 2017).	98
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Κρίτση, 2017).	98
Σχήμα 11: Διάγραμμα S-Line για το μοντέλο διάκριση των δειγμάτων ΙΦΝΕ σε ύφεση πριν και μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου (πάνω) και μεγέθυνσή του στην περιοχή των αλειφατικών (μέση) και αρωματικών πρωτονίων (κάτω).	110
Σχήμα 12: Φάσμα 1D NOESY PRESAT του δείγματος 13A.	115
Σχήμα 13: Φάσμα 1D NOESY PRESAT (Δείγμα 13A) με αποτιμήσεις των κυριότερων μεταβολιτών που αποτιμήθηκαν.	117
Σχήμα 14: Σύγκριση φασμάτων με υπέρθεση 69 B (κόκκινο χρώμα) και 70 B (μαύρο χρώμα). Μεγέθυνση της αρωματικής (πάνω αριστερά) περιοχής. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την κορυφή του εσωτερικού προτύπου TSP στα 0 ppm.	120
Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση σημαντικότητας μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst.	122

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Σύντμηση	Όρος
ACCA	Antichitobioside Carbohydrate Antibody
ALCA	Antilaminaribioside Carbohydrate Antibody
ALP	Αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase)
ALT	Τρανσαμινάση της αλανίνης (Alanine Transaminase)
ASCA	Αντισώματα έναντι του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Anti- <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Antibodies)
AST	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (Aspartate Transaminase)
BCFA	Λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσού (Branched-Chain Fatty Acids)
CDAI	Δείκτης δραστηριότητας της νόσου Crohn (Crohn Disease Activity Index)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
GSH	Γλουταθειόνη (Glutathione)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN-γ	Ιντερφερόνη-γ (interferon- gamma)
IL-	Ιντερλευκίνη- (interleukin-)
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Low Density Lipoprotein)
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharides)
MCFAs	Λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας (Medium-Chain Fatty Acid)
MIF	Παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων

	(Macrophage Migration Inhibitory Factor)
NF-kB	Πυρηνικός παράγοντας κ-B (nuclear factor kappa beta)
NRI	Δείκτης διατροφικού κινδύνου (Nutritional Risk Index)
P-ANCA	Περιπυρηνικά αντι-ουδετεροφιλικά κυτταροπλασματικά αντισώματα (Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies)
PCA	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principle Component Analysis)
PGE2	Προσταγλαδίνη E2 (Prostaglandin E2)
SCFAs	Λιπαρά οξέα μικρής αλύσου (Short-Chain Fatty Acids)
TAP	Ολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό του πλάσματος (Total Antioxidant Potential)
Th-	T-ρυθμιστικά κύτταρα (T helper cell)
TLRs	Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-Like Receptors)
TNF-a	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (Tumor Necrosis Factor- alpha)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
γ-GT	γ- γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-Glutamyltransferase)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου

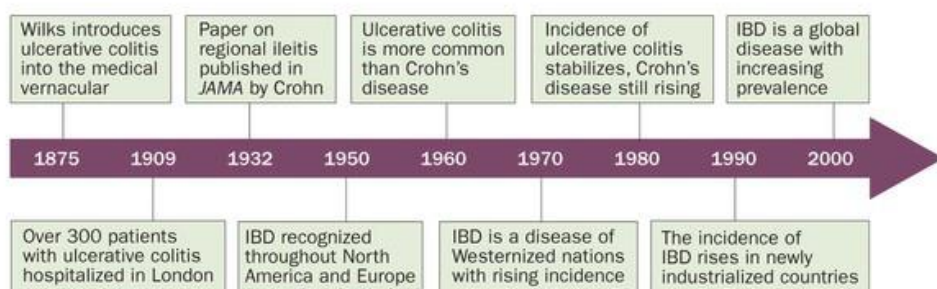
1.1. Ορισμός

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νόσων, πολυπαραγοντικής αιτιολογίας οι οποίες εκδηλώνονται σε ένα γενετικώς προδιατεθειμένο άτομο ως αποτέλεσμα υπέρμετρης ανοσοβιολογικής απόκρισης σε άγνωστο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Οι ΙΦΝΕ χαρακτηρίζονται από χρόνια υποτροπιάζουσα φλεγμονή του πεπτικού συστήματος.

Το σύνολο σχεδόν των ΙΦΝΕ χωρίζονται σε δύο μεγάλες νοσολογικές οντότητες, τη Νόσο Crohn (CD) και την ελκώδη κολίτιδα (UC), ενώ ένα μικρό ποσοστό κατατάσσεται στην αδιευκρίνιστη κολίτιδα (IC) (Baumgart et al., 2007).

1.2. Επιδημιολογικά Στοιχεία

Οι ΙΦΝΕ αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά κατά την διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης στις ευρωπαϊκές χώρες και χαρακτηρίζονται ως ασθένεια των ανεπτυγμένων χωρών ή ασθένεια της Δύσης (Εικόνα 1). Συλλογικά, κατά τη διάρκεια του 20ου αιώνα, η συχνότητα τόσο της ελκώδους κολίτιδας όσο και της νόσου Crohn αυξήθηκε σημαντικά στον δυτικό κόσμο με πληθώρα προηγούμενων μελετών να δείχνουν ότι η συχνότητα εμφάνισης ελκώδους κολίτιδας ήταν υψηλότερη από εκείνη της νόσου Crohn. Σε επόμενες μελέτες φάνηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου Crohn έφτασε και σε πολλές περιοχές του δυτικού κόσμου ξεπέρασε εκείνη της ελκώδους κολίτιδας. Αντίστοιχα επιδημιολογικά πρότυπα επικρατούν και στις αναπτυσσόμενες χώρες (Molodecky, 2012).



Εικόνα 1: Εξέλιξη της νόσου Crohn και ελκώδους κολίτιδας παγκοσμίως (Ananthakrishnan, 2015)

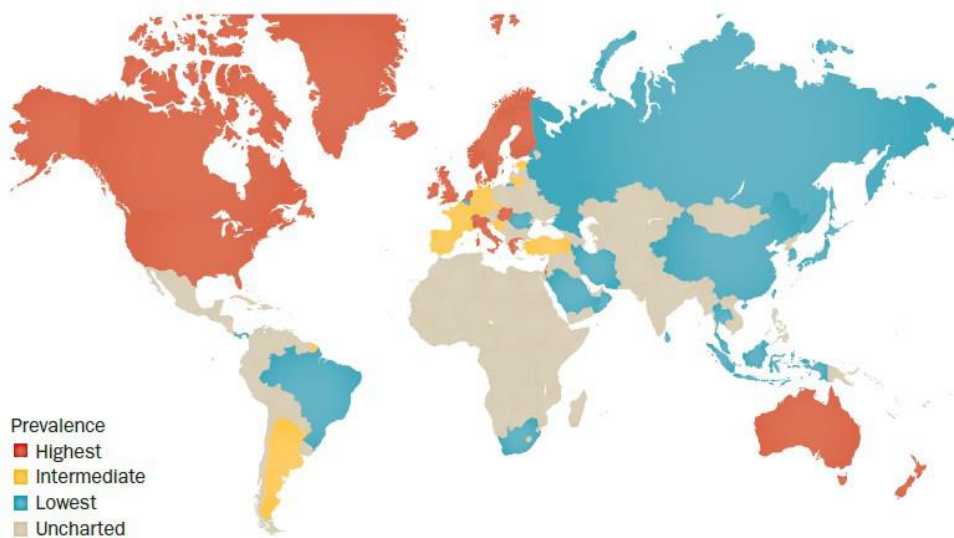
Η συχνότητα εμφάνισής τους στο Δυτικό κόσμο υπολογίζεται στη 1/1000 κατοίκους (Baumgart et al., 2011) με τη συχνότητα της νόσου Crohn να είναι μεγαλύτερη στη Β. Αμερική (20,2 ανά 100.000/κάτοικοι/έτος), ενώ αντίθετα η ελκώδης κολίτιδα εμφανίζεται συχνότερα στην Ευρώπη (24,3 ανά 100.000/κάτοικοι/ έτος) (Ponder and Long, 2013).

Όσον αφορά τις αναπτυσσόμενες χώρες τα επιδημιολογικά δεδομένα είναι λίγα ωστόσο ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ σε χώρες της Βορείου Αφρικής, της Άπω και της Μέσης Ανατολής φαίνεται να παρουσιάζει αύξηση (Εικόνα 2) λόγω της μεγαλύτερης βιομηχανοποίησής τους και της δυτικοποίησης του τρόπου ζωής (Ng et al., 2013). Ωστόσο η διακύμανση της συχνότητας εμφάνισης των ΙΦΝΕ μεταξύ αυτών των περιοχών θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει από διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου, διαφορετικά συστήματα συλλογής δεδομένων και διαφορετική δυνατότητα πρόσβασης στην υγειονομική περίθαλψη (Karlan, 2017). Συμπερασματικά, η γεωγραφική κατανομή των ΙΦΝΕ υποδεικνύει την επίδραση του περιβάλλοντος στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου (Molodecky et al., 2012).

Μελέτες σε μεταναστευτικούς πληθυσμούς δείχνουν ότι οι εθνικές και φυλετικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ μπορεί να σχετίζονται περισσότερο με τον τρόπο ζωής και την επίδραση του περιβάλλοντος και όχι τόσο με γενετικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, απόδημος πληθυσμός σε χώρες του δυτικού κόσμου φάνηκε να έχει χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ από τους αυτόχθονες, όμως οι απόγονοι αυτών έχουν παρόμοια υψηλή

συχνότητα εμφάνισης φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε σύγκριση με τα παιδιά του μόνιμου πληθυσμού (Benchimol et al., 2015).

Μέσα σε μια οριοθετημένη γεωγραφικά περιοχή τα ποσοστά επίπτωσης είναι ετερογενή. Η επίπτωση είναι μεγαλύτερη στις αστικές περιοχές παρά στις αγροτικές. Στην Κίνα για παράδειγμα, η διακύμανση της επίπτωσης μεταξύ των περιφερειών συσχετίστηκε με την πυκνότητα του πληθυσμού (Ng et al., 2016). Αυτή η συσχέτιση μπορεί να εξηγήσει γιατί σε μελέτη της Νότιας Κορέας φάνηκε σταθερή επίπτωση των ΙΦΝΕ, ενώ σε μελέτη που επικεντρώθηκε σε μια ιδιαίτερα πυκνοκατοικημένη περιοχή της Σεούλ έδειξε σημαντική αύξηση (Kim et al., 2015).



Εικόνα 2: Ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ σε παγκόσμιο επίπεδο για το 2015 (Karlan, 2015)

Σε μια συστηματική ανασκόπηση του 2017 (Siew et al., 2017) όπου παρέχεται μια σφαιρική εικόνα της επίπτωσης και του επιπολασμού των ΙΦΝΕ τον 21ο αιώνα σε παγκόσμιο επίπεδο, επιβεβαιώνονται όλα τα παραπάνω φαίνεται ωστόσο και μια ουσιαστική μετατόπιση στην επιδημιολογία των ΙΦΝΕ. Από το 1990, η επίπτωση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σταθεροποιήθηκε στον δυτικό κόσμο, αντιπροσωπεύοντας αλλαγές σε περιβαλλοντικές εκθέσεις. Για παράδειγμα, οι προσπάθειες δημόσιας υγείας στη δεκαετία του 1970 και του 1980 μείωσαν

τους ρυθμούς της έναρξης του καπνίσματος στους εφήβους (Services US Department of Health and Human Services, 2014)

Παρόλο που η εμφάνιση φαίνεται να σταθεροποιείται, ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ συνεχίζει να αυξάνεται. Στον 21ο αιώνα, ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ ξεπέρασε το 0,3% του συνολικού πληθυσμού στον Καναδά, τη Δανία, τη Γερμανία, την Ουγγαρία, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, τη Σουηδία, το Ηνωμένο Βασίλειο και τις ΗΠΑ (Shivashankar et al., 2017; Hein et al., 2014; Kurti et al., 2016; Busch et al., 2014; Studd et al., 2016). Για τον Καναδά, ένα μοντέλο πρόβλεψης εκτιμά ότι ο επιπολασμός των ΙΦΝΕ ήταν 0,6 % του πληθυσμού το 2015 και θα ανέλθει σε 0,9% μέχρι το 2025 (Coward et al., 2015). Αντιθέτως, οι αναπτυσσόμενες χώρες αντιμετωπίζουν αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης, ανάλογη με τις τάσεις που παρατηρήθηκαν στον δυτικό κόσμο κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα (Εικόνα 3).

Τέλος φαίνεται ότι στον δυτικό κόσμο η τάση εμφάνισης των ΙΦΝΕ είναι υψηλότερη στις βόρειες περιοχές σε σχέση με τις νότιες (Nerich et al., 2010). Αυτή η τάση συναντάται και στην Ασία αλλά αφορά μόνο στη νόσο της ελκώδους κολίτιδας. Όσον αφορά τη νόσο Crohn ισχύει το αντίθετο (Ng et al., 2016).

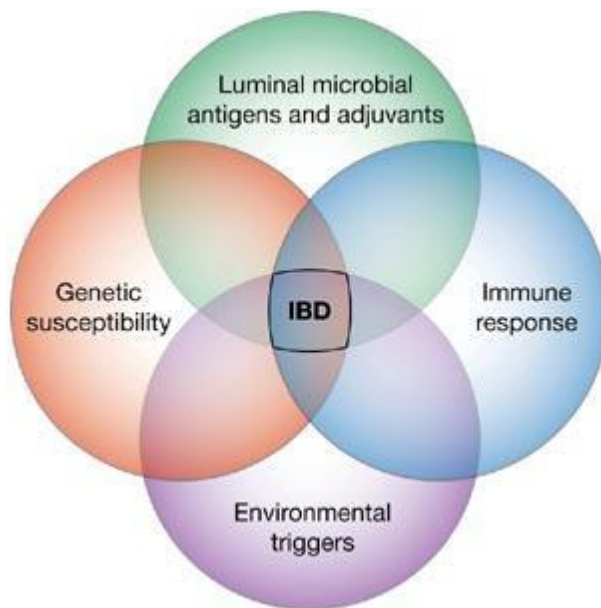
	Incidence per 100 000 person-years				Prevalence per 100 000			
	Crohn's disease		Ulcerative colitis		Crohn's disease		Ulcerative colitis	
	Lowest estimate	Highest estimate	Lowest estimate	Highest estimate	Lowest estimate	Highest estimate	Lowest estimate	Highest estimate
North America	6-30 (California, USA)	23-82 (Nova Scotia, Canada)	8-8 (Olmsted County, USA)	23-14 (Nova Scotia, Canada)	96-3 (California, USA)	318-5 (Nova Scotia, Canada)	139-8 (Quebec, Canada)	286-3 (Olmsted County, USA)
Eastern Europe	0-40 (Chisinau, Moldova)	14-6 (Veszprém, Hungary)	0-97 (Romania, Nationwide)	11-9 (Veszprém, Hungary)	1-51 (Romania, Nationwide)	200-0 (Hungary, Nationwide)	2-42 (Romania, Nationwide)	340-0 (Hungary, Nationwide)
Northern Europe	0-0 (Greenland, Nationwide)	11-4 (Funen, Denmark)	1-7 (Tartu, Estonia)	57-9 (Faroe Islands, Nationwide)	24-0 (Kuopio, Finland)	262-0 (Southeast, Norway)	90-8 (Leicestershire, UK)	505-0 (Southeast, Norway)
Southern Europe	0-95 (Vukovarsko-Srijemska, Croatia)	15-4 (Casteltermine, Italy)	3-3 (Zagreb, Croatia)	11-47 (Caceres, Spain)	4-5 (Vukovarsko-Srijemska, Croatia)	137-17 (Ciudad Real, Spain)	14-5 (Vukovarsko-Srijemska, Croatia)	133-9 (Zadar, Croatia)
Western Europe	1-85 (Guadeloupe and Martinique islands, France)	10-5 (Central, Netherlands)	1-9 (Puy-de-Dôme, France)	17-2 (Central, Netherlands)	28-2 (Tuzla, Bosnia and Herzegovina)	322-0 (Hesse, Germany)	43-1 (Tuzla, Bosnia and Herzegovina)	412-0 (Hesse, Germany)
Eastern Asia	0-06 (Kunming, China)	3-2 (South Korea, Nationwide)	0-42 (Xian, China)	4-6 (Seoul, South Korea)	1-05 (Taiwan, Nationwide)	18-6 (Japan, Nationwide)	4-59 (Taiwan, Nationwide)	57-3 (Japan, Nationwide)
South-eastern Asia	0-14 (Kinta Valley, Malaysia)	0-41 (Brunei, Nationwide)	0-15 (Manila, Philippines)	0-68 (Kinta Valley, Malaysia)	2-17 (Kinta Valley, Malaysia)	2-17 (Kinta Valley, Malaysia)	6-67 (Kinta Valley, Malaysia)	6-67 (Kinta Valley, Malaysia)
Southern Asia	0-09 (Colombo and Gampaha, Sri Lanka)	3-91 (Hyderabad, India)	0-69 (Colombo and Gampaha, Sri Lanka)	6-02 (Punjab, India)	1-2 (Colombo and Gampaha, Sri Lanka)	1-2 (Colombo and Gampaha, Sri Lanka)	5-3 (Colombo and Gampaha, Sri Lanka)	44-3 (Punjab, India)
Western Asia	0-94 (Riyadh, Saudi Arabia)	8-4 (Southern Israel, Israel)	0-77 (Trakya, Turkey)	6-5 (Southern Israel, Israel)	50-6 (Southern Israel, Israel)	53-1 (Beirut, Lebanon)	4-9 (Trakya, Turkey)	106-2 (Beirut, Lebanon)
South America	0-0 (District of Colón, Panama)	3-50 (São Paulo, Brazil)	0-19 (Piauí, Brazil)	6-76 (São Paulo, Brazil)	0-9 (São Paulo, Brazil)	41-4 (Southwest, Puerto Rico)	4-7 (São Paulo, Brazil)	44-3 (Barbados, Nationwide)
Oceania	12-96 (Geelong, Australia)*	29-3 (Geelong, Australia)*	7-33 (Geelong, Australia)*	17-4 (Geelong, Australia)*	155-2 (Canterbury, New Zealand)	197-3 (Barwon, Australia)	145-0 (Canterbury, New Zealand)	196-0 (Barwon, Australia)
Africa	5-87 (Constantine, Algeria)	5-87 (Constantine, Algeria)	3-29 (Constantine, Algeria)	3-29 (Constantine, Algeria)	19-02 (Constantine, Algeria)	19-02 (Constantine, Algeria)	10-57 (Constantine, Algeria)	10-57 (Constantine, Algeria)

*Geelong has the lowest and highest estimates because of reporting in time periods ranging from 2007 to 2013.

Εικόνα 3: Εύρος συχνότητας εμφάνισης και επιπολασμού της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου από το 1990, διαστρωματωμένο σε γεωγραφικές περιοχές (Ng et al., 2017).

1.3. Αιτιολογία και Παθογένεια

Η ακριβής αιτιολογία που οδηγεί στην εμφάνιση ΙΦΝΕ δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστή καθώς περισσότεροι του ενός παράγοντες εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια των συγκεκριμένων νοσημάτων (Εικόνα 4). Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται περιβαλλοντικοί, γενετικοί, ανοσολογικοί και μικροβιακοί (Ye et al., 2015).



Εικόνα 4: Αιτιοπαθογένεια των ΙΦΝΕ (Sartor, 2006)

1.3.1 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Όπως προαναφέρθηκε η επιδημιολογική εξέλιξη σχετίζεται με την δυτικοποίηση του τρόπου ζωής (Ananthakrishnan, 2015; Kaplan et al., 2016). Η αστικοποίηση των κοινωνιών συνδέεται με αλλαγές στη διατροφή, τη χρήση φαρμάκων, τη ρύπανση, οι οποίες εμπλέκονται ως δυνητικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση των ΙΦΝΕ (Εικόνα 5). Αν και η γενετική εν μέρει προσδιορίζει την εντερική μικροχλωρίδα, οι περιβαλλοντικές εκθέσεις συνεχίζουν να μεταβάλλουν τη σύνθεση, τη δομή και τη λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος, τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης των ΙΦΝΕ (Kahrstrom et al., 2016; Lynch et al., 2016)

- **Φάρμακα**

Διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια της νόσου. Τα αντισυλληπτικά αυξάνουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη τόσο της νόσου Crohn όσο και της ελκώδους κολίτιδας (Loftus Jr, 2004) ενώ τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs - NSAIDs) αυξάνουν τον κίνδυνο υποτροπής μέσω ελαττωμένης παραγωγής των βλεννογονικών προστατευτικών προστανοϊδών, αυξημένης προσκόλλησης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, διακοπής του βλεννογονικού φραγμού και μέσω ενεργοποίησης της εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης (Sartor, 2006).

Μελέτες επίσης έχουν δείξει μειωμένη ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος, μεταβολή στη σύνθεση αυτού και πολλές φορές μειωμένη ικανότητα επαναφοράς της εντερικής λειτουργίας στην πρότερη κατάσταση ύστερα από χρήση αντιβιοτικών (Dethlefsen et al., 2011). Ερευνητικές μελέτες επίσης κατέδειξαν την θετική συσχέτιση της χρήσης αντιβιοτικών κατά τα πρώτα χρόνια ζωής του ανθρώπου με την πιθανότητα εμφάνισης των ΙΦΝΕ σε επόμενα στάδια ζωής του (Ungaro et al., 2014).

- **Περιβάλλον**

Οι Kaplan et al. (2010) μελέτησαν τα επίπεδα μόλυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα συναρτήσει της συχνότητας εμφάνισης των ΙΦΝΕ. Φάνηκε ότι τα άτομα που κατοικούσαν σε περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του αζώτου (NO_2) είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να διαγνωστούν με τη νόσο Crohn πριν την ηλικία των 23 ετών σε σχέση με τα άτομα που διέμεναν σε περιοχές με μικρότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, άτομα που εκτίθενται σε υψηλές εκπομπές διοξειδίου του θείου (SO_2) ήταν πιο πιθανό να αναπτύξουν ελκώδη κολίτιδα από εκείνους σε περιοχές με χαμηλότερα επίπεδα SO_2 . Επόμενη μελέτη συσχέτισε την συνολική πυκνότητα των εκπεμπόμενων ρύπων στον ατμοσφαιρικό αέρα με τον ρυθμό εμφάνισης των ΙΦΝΕ επισημαίνοντας πως για κάθε αύξηση μίας λογαριθμικής μονάδας στην πυκνότητα των συνολικών εκπεμπόμενων ρύπων, ο ρυθμός εμφάνισης των ΙΦΝΕ (νόσος Crohn ή ελκώδης κολίτιδα) αυξάνεται κατά 40%. Ανάλυση μεμονωμένων ρύπων έδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις για

τα CO, NO₂, SO₂ και τα μικροσωματίδια με διάμετρο ίση ή μικρότερη των 2,5 μm (Particulate Matter Pollution (PM_{2.5})) (Ananthakrishnan et al., 2011).

- **Κάπνισμα**

Πλήθος μελετών έχουν αναδείξει τον προστατευτικό ρόλο του καπνίσματος στην ελκώδη κολίτιδα (Yun et al., 2009) ενώ πρώην καπνιστές διατρέχουν έως και 70% μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο, η οποία είναι συνήθως σοβαρότερη, σε σχέση με αυτή όσων δεν κάπνισαν ποτέ στη ζωή τους (Cohen et al., 2010). Αντίθετα, το κάπνισμα είναι σοβαρός επιβαρυντικός παράγοντας για εμφάνιση νόσου του Crohn (Ladas et al., 2005). Οι καπνιστές με νόσο Crohn έχουν κατά κανόνα περισσότερες εξάρσεις νόσου, μεγαλύτερη πιθανότητα χειρουργείου και φτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με τους μη καπνιστές (Ladas et al., 2005).

- **Διατροφή**

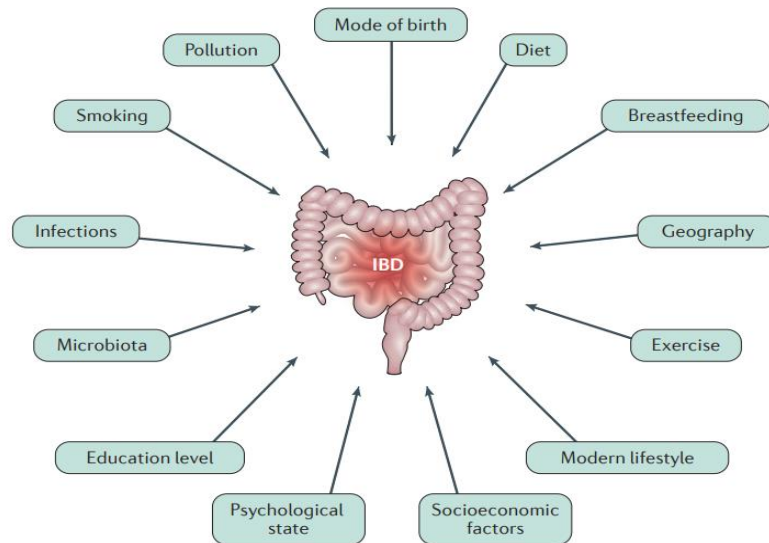
Σχετικά με τους διατροφικούς παράγοντες, φαίνεται ότι επηρεάζουν την έκφραση της νόσου. Σε προοπτική μελέτη διάρκειας 26 χρόνων, γυναίκες με υψηλή πρόσληψη διατροφικών ινών είχαν στατιστικά σημαντικώς λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν τη νόσο Crohn σε σχέση με εκείνες που δεν κατανάλωναν επαρκείς ποσότητες, όταν όμως η πηγή των ινών ήταν από φρούτα και σε μικρότερο βαθμό από τα λαχανικά. Αντίθετα, οι φυτικές ίνες των δημητριακών ολικής άλεσης δεν φάνηκε να έχουν καμία επίδραση στην τροποποίηση του κινδύνου (Ananthakrishnan et al., 2013). Η υψηλή πρόσληψη Ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο, ενώ αντίθετα η υψηλή πρόσληψη Ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ελκώδους κολίτιδας (Ananthakrishnan et al., 2014; Chan et al., 2014; De silva et al., 2010). Η πρόσληψη υδατανθράκων δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου σε αντίθεση με την πρόσληψη πρωτεϊνών οι οποίες έχουν συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Jantchou et al., 2010)

Εκτός από τα μακροθρεπτικά συστατικά, και ορισμένα μικροθρεπτικά μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα κινδύνου εμφάνισης των ΙΦΝΕ. Διάφορα μικροθρεπτικά συστατικά έχουν σημαντικό ρόλο ως συνένζυμα που εμπλέκονται στη διατήρηση του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου, επηρεάζουν τις εντερικές ανοσοαποκρίσεις ή την μικροβιακή σύνθεση του εντέρου.

Η υψηλή πρόσληψη ψευδαργύρου συνδέθηκε με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Crohn στις γυναίκες (Ananthakrishnan et al., 2015), ενώ τα χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου στον ορό συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο χειρουργικής επέμβασης και επιπλοκών τόσο για την νόσο Crohn όσο και για την ελκώδη κολίτιδα (Siva et al., 2017). Η βιταμίνη D αναγνωρίστηκε αρχικά για το ρόλο της στην υγεία των οστών, αλλά επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου Crohn. Γυναίκες με υψηλά επίπεδα βιταμίνης D στο πλάσμα είχαν σημαντικά μειωμένη πιθανότητα ανάπτυξης της όπως και μικρότερο κίνδυνο χειρουργικής επέμβασης (Ananthakrishnan et al., 2012). Είναι σημαντικό ότι όσοι εμφάνιζαν ανεπάρκεια σε βιταμίνη D αλλά στη συνέχεια πέτυχαν φυσιολογικά επίπεδα, είχαν σημαντικά χαμηλότερη πιθανότητα χειρουργικής επέμβασης από όσους παρέμεναν σε ανεπάρκεια βιταμίνης D. Τέλος, η συσχέτιση μεταξύ διαίτας και κινδύνου εμφάνισης της νόσου μπορεί να μην οφείλεται μόνο σε θρεπτικούς παράγοντες αλλά και σε πρόσθετα τροφίμων, όπως οι γαλακτωματοποιητές. Η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) και το polysorbate 80 (P80), αύξησαν τα επίπεδα της βιοδραστικής φλαγκελλίνης, μίας προ-φλεγμονώδους μικροβιακής ένωσης που σχετίζεται με αλλοιώσεις στην έκφραση γονιδίων και ανάπτυξη χημικής κολίτιδας (Chassaing, 2015)

- **Θηλασμός**

Πληθώρα μελετών έχει αποδείξει τη σημαντική επίδραση του θηλασμού στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος στο βρέφος. Μια μετα-ανάλυση κατέδειξε μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση τόσο με τη νόσο του Crohn όσο και με την ελκώδη κολίτιδα (Klement et al., 2004), ενώ μια συστηματική ανασκόπηση με επίκεντρο την παιδική ΙΦΝΕ έδειξε επίσης μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση με πρώιμη όμως εμφάνιση της νόσου (Barclay et al., 2009). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η μεγαλύτερη διάρκεια του θηλασμού από 3 έως 12 μήνες, συνδέεται με ισχυρότερη προστατευτική επίδραση και μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης των ΙΦΝΕ (Ng et al., 2015). Τέλος ο θηλασμός κατά την βρεφική ηλικία σχετίστηκε με αυξημένες πιθανότητες για αποφυγή χειρουργικής επέμβασης στη νόσο Crohn (Guo et al., 2014).



Εικόνα 5: Περιβαλλοντικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση των ΙΦΝΕ. (Ananthakrishnan et al., 2018)

1.3.2 Γενετικοί παράγοντες

Η επίδραση των γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου επιβεβαιώνεται από μελέτες σε μονοζυγωτικούς και διζυγωτικούς διδύμους όπου η πιθανότητα εμφάνισης ελκώδους κολίτιδας κυμαίνεται από 6 - 17% για τους πρώτους και 0– 5% για τους δεύτερους. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τους ασθενείς με νόσο Crohn κυμαίνονται μεταξύ 37-58% για τους μονοζυγωτικούς και 3,9- 12% για τους διζυγωτικούς, αναδεικνύοντας τη μεγαλύτερη γενετική επίδραση της νόσου Crohn σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα (Satsangi et al., 2003). Η συχνότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ σε οικογένειες με ένα τουλάχιστον πάσχον μέλος κυμαίνεται από 20 έως 30%, ενώ συγκεκριμένοι πληθυσμοί εμφανίζουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου. Για παράδειγμα ο κίνδυνος ανάπτυξης ΙΦΝΕ είναι τρεις φορές μεγαλύτερος μεταξύ συγγενών 1ου βαθμού σε άτομα εβραϊκής καταγωγής σε σύγκριση με τους συγγενείς ατόμων διαφορετικής καταγωγής (Farrell et al., 2002).

Οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τον κίνδυνο για ανάπτυξη ΙΦΝΕ εμπλέκονται στη ρύθμιση της εγγενούς και επίκτητης ανοσίας (IL-23R, IL-10, STAT, JAK2), στη ρύθμιση της

φλεγμονής (CCR6, MST1) και της αυτοφαγίας (ATG16L1, IRGM) (Van Limbergen et al., 2009). Επηρεάζουν επομένως τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και την απόκρισή του στα συμβιωτικά βακτήρια και ειδικότερα τη λειτουργία των κυττάρων Paneth και την παρουσίαση πεπτιδίων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας (Petnicki-Oscwieja et al., 2009). Ο αριθμός των γνωστών γενετικών τόπων ανέρχεται στους 163 (Jostins et al., 2012), με γενετικούς τύπους να έχουν συνδεθεί αποκλειστικά είτε με τη νόσο Crohn είτε με την ελκώδη κολίτιδα ενώ ένα ποσοστό 30% συσχετίζεται και με τις δύο νόσους (Εικόνα 6) (Khor et al., 2011; Thompson et al., 2011).

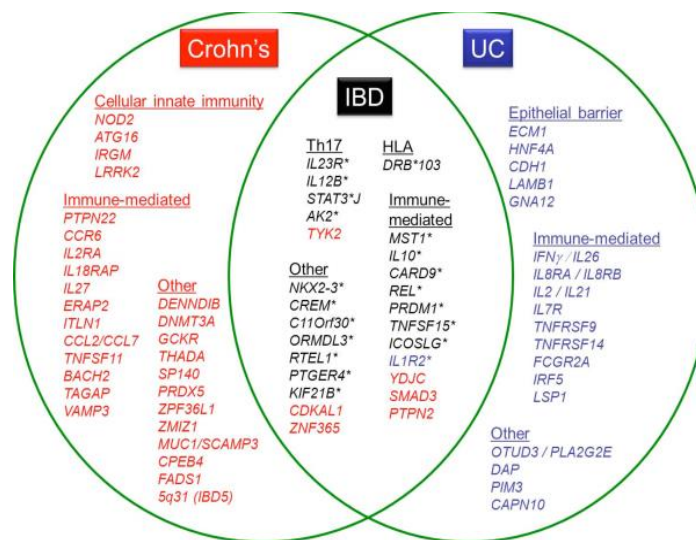
Το πρώτο γονίδιο που σχετίστηκε με τις ΙΦΝΕ και μελετήθηκε με GWAS ήταν το IL-23R του οποίου οι μεταλλάξεις αρχικά συσχετίστηκαν με την νόσο Crohn αλλά στην συνέχεια συνδέθηκαν και με την ελκώδη κολίτιδα (Duerr et al., 2006). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν εντοπίσει περιοχές (TYK2, JAK2, STAT3, ICOSLG και CCR) που κωδικοποιούν συστατικά του μονοπατιού IL-23/Th17 (Anderson et al., 2011).

Το πρώτο και πιο σχετικό γονίδιο ευαισθησίας για τη νόσο Crohn είναι το NOD2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16q21. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί την παραγωγή κυτταροκινών σε απόκριση στη φλεγμονή (Strober and Fuss, 2011). Τριάντα μη συντηρημένοι πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί σε αυτό το γονίδιο οι οποίοι λειτουργούν ως προγνωστικοί δείκτες για την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας, με την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού να αυξάνει τις πιθανότητες 2 με 3 φορές ενώ η ύπαρξη ενός επόμενου 20 με 40 φορές (Tsianos et al., 2012). Άλλα γονίδια που παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με τη νόσο Crohn είναι τα SMAD3, ERAP2, IL10, IL2RA, TYK2, FUT2, DNMT3A, DENND1B, BACH2 και TAGAP (Franke et al., 2010).

Η αυτοφαγία συμβάλλει άμεσα στη φυσική ανοσία και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ομοίωση. Δύο γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό της αυτοφαγίας φαίνεται να σχετίζονται με την πιθανότητα ανάπτυξης της νόσου. Το πρώτο είναι το γονίδιο ATG16L1, το οποίο εκφράζεται στα επιθηλιακά και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενώ το δεύτερο

αυτοφαγικό είναι το IRGM, το οποίο φαίνεται να είναι ανθεκτικό σε ενδοκυτταρικά παθογόνα όπως τα μυκοβακτηρίδια και το *Toxoplasma gondii* (Van Limbergen et al., 2009).

Τέλος, για την εμφάνιση ελκώδους κολίτιδας οι γενετικοί τόποι σχετίζονται κυρίως με ρυθμιστικές οδούς (π.χ IL-10, ARPC2) και με τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (π.χ.ECM1). Τα γονίδια βέβαια που βρέθηκαν να έχουν τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την ελκώδη κολίτιδα είναι τα IL23R, HLA, DLD/LAMB1, MST1, CARD9 και οι περιοχές 1q32, 1p36, 12q15, 21q22. (McGovern et al., 2010).



Εικόνα 6: Γονίδια που εμπλέκονται στις ΙΦΝΕ. (We et al., 2014)

1.3.3 Ανοσολογικοί παράγοντες

Πλήθος ερευνητικών δεδομένων αποδίδει την υπέρμετρη ανοσολογική απόκριση και την εγκατάσταση χρόνιας φλεγμονής, στα:

- ο μονοπάτια κυτταρικής διαφοροποίησης των ανώριμων Τ-κυττάρων, συγκεκριμένα στα CD4+.
- Όταν τα CD4+ Τ-κύτταρα έρθουν σε επαφή με ένα αντιγόνο, μετατρέπονται σε Τ-βοηθητικά κύτταρα και κατόπιν ενεργοποιούνται. Με βάση τις κυτοκίνες που παράγουν, τα προφλεγμονώδη CD4 κύτταρα κατατάσσονται σε τρεις κύριους ανοσολογικούς φαινοτύπους:
- ο α. Th1 βοηθητικά κύτταρα

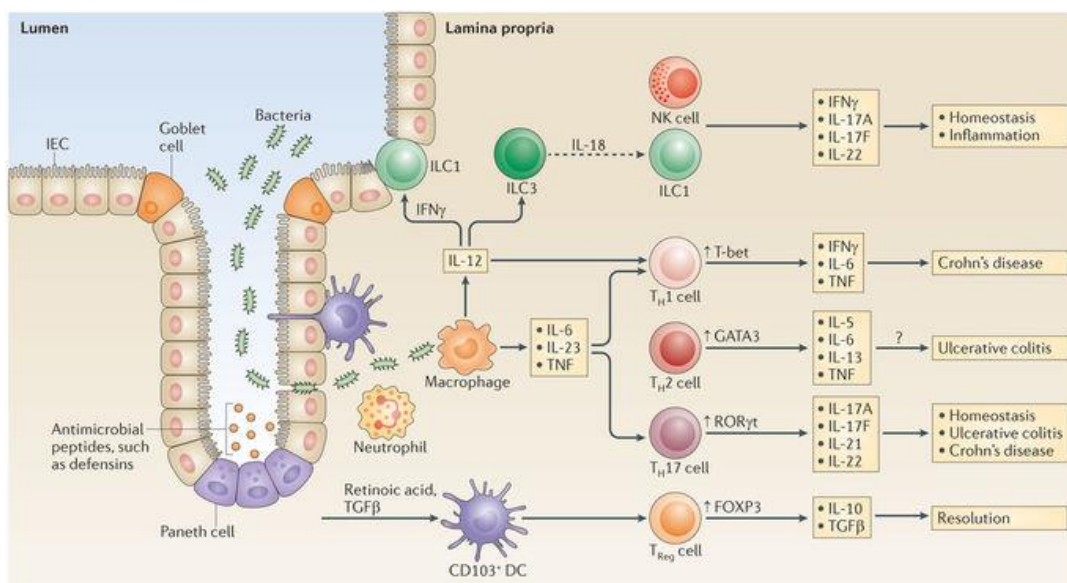
- ο β. Th2 βοηθητικά κύτταρα
- ο γ. Th17 βοηθητικά κύτταρα

Τα ενεργοποιημένα βοηθητικά κύτταρα Th1 εκφράζουν τις IL-2, IL-10 τον TNF-β και την ιντερφερόνη- γ (IFN-γ). Τα βοηθητικά Th2 εκκρίνουν τις IL-4, IL-5 IL-6 IL-9, IL-10 και IL-13. Οι παραπάνω κυτταροκίνες λειτουργούν ως προφλεγμονώδεις παράγοντες, δηλαδή επάγουν την φλεγμονή με σκοπό την χημειοταξία και την διήθηση του φλεγμαίνοντος ιστού από λευκοκύτταρα (Strober and Fuss, 2011).

Η νόσος Crohn έχει συσχετιστεί με κυτταροκίνες που παράγονται από τα Th1 κύτταρα, ενώ η ελκώδης κολίτιδα έχει συσχετιστεί με κυτταροκίνες που παράγονται από τα Th2 κύτταρα (Ardizzone and Porro, 2002).

Ένα νέο σχετικά φλεγμονώδες μονοπάτι που ρυθμίζεται από τα T-κύτταρα είναι τα Th17 βοηθητικά κύτταρα που φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια τόσο της νόσου Crohn όσο και της ελκώδους κολίτιδας. Τα Th17 βοηθητικά κύτταρα παράγουν ποικιλία κυτοκινών, οι πιο αξιοσημείωτες εκ των οποίων είναι οι IL-6 και IL-17. Η IL- 17 αποτελεί μία προφλεγμονώδη κυτοκίνη που όχι μόνο συμβάλλει στην ενεργοποίηση του T-κυττάρου, αλλά επάγει την παραγωγή ποικίλων κυττάρων όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να παράγουν με τη σειρά τους άλλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως είναι η IL-1, IL-6 TNF-α και χημειοκίνες (Εικόνα 7) (Kitani and Xu, 2008, Elson et al., 2007).

- μειωμένη αντίσταση και αυξημένη διαπερατότητα του βλεννογονικού φραγμού ως αποτέλεσμα της έκφρασης των πρωτεϊνών απόπτωσης Caspase-1 και της αναστολής έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 στα επιθηλιακά κύτταρα της βλεννογόνου η οποία οδηγεί στην νέκρωση τους και στην αύξηση της διαπερατότητας αυτής.
- τα επιθηλιακά κύτταρα των ασθενών με ΙΦΝΕ φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των TLR υποδοχέων σε σχέση με αυτά των υγιών, ενώ στα κύτταρα αυτά παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου NOD2 και διαταραχή της διαδικασίας αντιγονοπαρουσίασης (Berrendi et al., 2003).



Εικόνα 7: Η δράση των κυτοκινών στην παθογένεια των ΙΦΝΕ. (Neurath, et al., 2014).

1.3.4 Μικροβιακοί παράγοντες

Ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός επιστημονικών δεδομένων υποστηρίζει ότι η διαταραχή της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας θα μπορούσε να ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ΙΦΝΕ. Ωστόσο μέχρι στιγμής δεν έχει τεκμηριωθεί οριστικά κάποιος παθογόνος μικροοργανισμός που να σχετίζεται αιτιολογικά με τη νόσο (Sartor, 2008).

Βακτηριακοί παράγοντες όπως τα *Clostridium difficile*, *Mycobacterium paratuberculosis*, τα στελέχη *E. Coli* και AIEC, μύκητες όπως η *Candida albicans* και ιοί (Norovirus) απομονώνονται συχνότερα από τον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΝΕ σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Martinez-Medina et al., 2009; Ksiadzyna et al., 2009).

Ο πληθυσμός αρκετών προστατευτικών βακτηρίων που αποικίζουν τον εντερικό βλεννογόνο, όπως τα *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.* και *Lactobacillus sp.* είναι σημαντικά μειωμένος σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, ακόμα και σε όσους παρουσιάζουν ύφεση της νόσου (Sha S et al., 2013). Επίσης, στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται μείωση στην έκκριση μεταβολιτών που παράγονται από την εντερική μικροχλωρίδα, όπως το βουτυρικό οξύ, το οποίο αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού αυλού (Vigsnaes et al., 2011; Vigsnaes et al.,

2013). Παρόλα αυτά, η ΙΦΝΕ δεν έχει συσχετιστεί με έναν συγκεκριμένο τύπο εντερικής μικροχλωρίδας, αλλά τα χαρακτηριστικά της εξατομικεύονται σε κάθε ασθενή, όπως συμβαίνει και με τις εκδηλώσεις της νόσου (Wang et al., 2014).

1.4. Κλινική Συμπτωματολογία στις ΙΦΝΕ

Οι ΙΦΝΕ χαρακτηρίζονται από περιόδους έξαρσης και ύφεσης και η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από το βαθμό ενεργότητας της νόσου (Hendrickson et al., 2002). Το κυριότερο σύμπτωμα της ελκώδους κολίτιδας είναι το κοιλιακό άλγος και η διάρροια συνοδευμένη από αίμα ή/και βλέννα. Στα συμπτώματα περιλαμβάνονται ανορεξία, ναυτία, έμετος, πυρετός, αλλά και απώλεια βάρους. Σε αυτήν την περίπτωση η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών είναι αναπόφευκτη. Η συμπτωματολογία εμφανίζεται προοδευτικά μέσα σε διάστημα μερικών εβδομάδων ενώ η σοβαρότητα της νόσου κυμαίνεται από ήπια, όπου οι ασθενείς παρουσιάζουν τέσσερις ή λιγότερες κενώσεις την ημέρα με ή χωρίς πρόσμιξη αίματος, έως βαριά νόσο με δέκα ή περισσότερες κενώσεις την ημέρα και συνεχή αιμορραγία από τον ορθό (D'Haens et al., 2007).

Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η νόσος Crohn λόγω της ετερογένειας των συμπτωμάτων της οδηγεί πολλές φορές στην καθυστερημένη διάγνωσή της (Hendrickson et al., 2002). Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη θέση και έκταση των αλλοιώσεων, αλλά σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, διάρροια και απώλεια βάρους. Το κοιλιακό άλγος εμφανίζεται στο 70% των ασθενών και είναι αποτέλεσμα των στενώσεων που προκαλεί η νόσος ενώ πολλές φορές διαγιγνώσκεται λανθασμένα ως σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου. Σε ασθενείς με νόσο Crohn, η παρουσία αίματος στα κόπρανα είναι λιγότερο συχνή σε σχέση με τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (Lennard-Jones and Shivananda, 1997). Όταν η νόσος εντοπίζεται στον ειλεό, το κοιλιακό άλγος εμφανίζεται μεταγευματικά και για το λόγο αυτό οι ασθενείς μειώνουν τη θερμιδική πρόσληψη. Στην περίπτωση που η νόσος προσβάλλει το κόλον, τα κόπρανα συνοδεύονται από αίμα ή/και βλέννα, ενώ δυσασπορόφηση λακτόζης παρατηρείται όταν οι βλάβες παρουσιάζονται στο λεπτό έντερο. Και εδώ η έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι συνήθης, όπως

σιδηροπενία, ανεπάρκεια της βιταμίνης B12 και των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K μετά από εκτομή ή νόσο του ειλεού.

1.5. Μακροσκοπικά και Μικροσκοπικά Χαρακτηριστικά-Εξωτερικές Εκδηλώσεις

1.5.1 Ελκώδης Κολίτιδα

- ***Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά***

Η ελκώδης κολίτιδα χαρακτηρίζεται από συνεχή και συμμετρική περιοριζόμενη στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου φλεγμονή η οποία συνήθως ξεκινά στο τελικό τμήμα του ορθού και επεκτείνεται περιλαμβάνοντας τμήμα ή ακόμα και ολόκληρο το κόλον (Cecil, 2003). Ο βλεννογόνος εμφανίζεται ερυθρηματώδης με λεπτοκοκκώδη επιφάνεια ενώ σε μεγαλύτερου βαθμού φλεγμονή, εκδηλώνονται αιμορραγία, οίδημα και εξελκώσεις (Εικόνα 8). Κατά την ύφεση της νόσου, το παχύ έντερο έχει φυσιολογική εικόνα, αλλά σε ασθενείς που πάσχουν πολλά χρόνια, ο βλεννογόνος είναι ατροφικός και το κόλον γίνεται στενότερο και βραχύτερο (Harrison, 2005). Η παρουσία ψευδοπολύποδα στις φλεγμαίνουσες περιοχές είναι συχνή (Cecil, 2003).

- ***Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά***

Στην ελκώδη κολίτιδα ιστολογικές εξετάσεις αποκαλύπτουν ότι ο βλεννογόνος είναι διηθημένος από ουδετερόφιλα, έχει διάχυτη φλεγμονή και είναι εύθρυπτος λόγω των εξελκώσεων (Cecil, 2003). Γύρω από τις εντερικές κρύπτες παρατηρούνται πολλαπλά μικροαποστήματα και σε σοβαρές περιπτώσεις το παχύ έντερο μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη διάταση και λέπτυνση των τοιχωμάτων του, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «τοξικό megacolon». Ως συνέπεια, υπάρχει κίνδυνος να υποστεί ρήξη. Επίσης, σε ασθενείς που πάσχουν χρόνια από ελκώδη κολίτιδα, μπορεί να προκληθεί υπερπλασία του υποβλεννογόνιου χιτώνα, με αποτέλεσμα τη βράχυνση του παχέος εντέρου και την εξαφάνιση των κολικών κυψελών (Εικόνα 8).

1.5.2 Νόσος Crohn

- **Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά**

Στη νόσο Crohn μπορεί να προσβληθεί κάθε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμα μέχρι τον πρωκτό (Εικόνα 8). Το λεπτό έντερο προσβάλλεται στο 25-50% των περιπτώσεων. Το πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι ότι η εντερική προσβολή είναι ασυνεχής (Lockhart-Mummery and Morson, 1964).

Ο ορογόνος χιτώνας του εντέρου που πάσχει έχει μεγαλύτερο πάχος, είναι ινώδης και υπεραίμιος. Ο βλεννογόνος παρουσιάζει εστιακές εξελκώσεις με οίδημα ενώ συχνά αναπτύσσονται έλκη που διεισδύουν βαθιά στο τοίχωμα του εντέρου. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται τα συρίγγια που είναι χαρακτηριστικά της ασθένειας.

- **Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά**

Στη νόσο Crohn προσβάλλονται όλα τα στρώματα του εντερικού τοιχώματος από τη βλεννογόνο έως και τον ορογόνο υμένα (Εικόνα 8). Τα εντερικά τοιχώματα είναι εύθρυπτα λόγω των εξελκώσεων και διηθημένα από ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα με σχηματισμό κοκκιωμάτων (Cecil, 2003).



Εικόνα 8: Μακροσκοπική εικόνα εντέρου στις ΙΦΝΕ. (Leppkes et al, 2014)

1.5.3 Εξωεντερικές εκδηλώσεις

Οι ΙΦΝΕ, παρότι προσβάλουν κυρίως τον εντερικό σωλήνα, συσχετίζονται επίσης με εκδηλώσεις σε άλλα όργανα. Παρόλο που λιγότερο από το 10% των ασθενών παρουσιάζουν εξωεντερικές εκδηλώσεις κατά την πρωτοδιάγνωση της νόσου, το 25% των ασθενών εμφανίζει εξωεντερικές εκδηλώσεις τουλάχιστον μια φορά στη ζωή του (Monsen et al.,1990). Οι σημαντικότερες συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Εξωεντερικές εκδηλώσεις στις ΙΦΝΕ

Εξωεντερική εκδήλωση	Ποσοστό %
Στοματικές εξελκώσεις	20-30
Περιφερική πολυαρθρίτιδα	10-20
Οφθαλμικές εκδηλώσεις	2-13
Οζώδες ερύθημα	6-15
Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα	3-6
Γαγγραινώδες πυόδερμα	0,5-2
Νεφρολιθίαση (λίθοι ουρικού ή οξαλικού ασβεστίου)	30
Χολολιθίαση	25
Σκληρυντική χολαγγειίτιδα	4
Περιπρωκτικές φλεγμονές	15-35

1.6. Διάγνωση

1.6.1 Εργαστηριακοί Δείκτες

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν αύξηση των δεικτών φλεγμονής. Η CRP, που είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης, μπορεί να βρεθεί αυξημένη στην ΙΦΝΕ αλλά είναι καλύτερος

δείκτης εκτίμησης της κλινικής βαρύτητας του ασθενούς στην νόσο Crohn σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα (Rodgers and Cummins, 2007; Turner et al., 2007).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται συστηματική χρήση των δεικτών κοπράνων με τη λακτοφερίνη και την καλπροτεκτίνη να είναι οι πιο διαδεδομένοι δείκτες αυτής της κατηγορίας (Dignass et al., 2012; Van Assche et al., 2010). Η αύξηση αυτών των δεικτών είναι μη ειδική, καθώς δείχνει εντερική φλεγμονή οποιασδήποτε αιτιολογίας. Για τη νόσο Crohn έχουν προγνωστική αξία μεγαλύτερη από 90% για ενδοσκοπικά ενεργό νόσο (Sirponen et al., 2008). Νεότεροι δείκτες κοπράνων με παρόμοια ακρίβεια με τους δύο προαναφερθέντες είναι η ελαστάση κοπράνων και ο δείκτης S100A12 (Dignass et al., 2012).

Τα αντισώματα pANCA έχουν συσχετιστεί με την ελκώδη κολίτιδα και ανευρίσκονται θετικά στο 50-60% των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο (Sandborn, 2004). Τα pANCA έχουν μεγάλη ακρίβεια στη διαφοροδιάγνωση νόσου Crohn και ελκώδους κολίτιδας αλλά λόγω της χαμηλής τους ευαισθησίας δε χρησιμοποιούνται στη διάγνωση της ελκώδους κολίτιδας (Peeters et al., 2001; Joossens et al., 2002). Ένας αριθμός άλλων αντιμικροβιακών αντισωμάτων όπως τα ASCA, OmpC, cBir, ALCA, ACCA ανευρίσκονται κυρίως σε ασθενείς με νόσο του Crohn (Dotan et al., 2006; Papadakis et al., 2007) .

1.6.2 Απεικονιστικός έλεγχος

Οι απεικονιστικές τεχνικές χρησιμεύουν στην εντόπιση της πάσχουσας περιοχής, στην εκτίμηση της έκτασης της νόσου αλλά και στην ανίχνευση εξωεντερικών εκδηλώσεων.

- Η απλή ακτινογραφία κοιλίας δεν είναι διαγνωστική ούτε για την ελκώδη κολίτιδα ούτε για τη νόσο Crohn μπορεί όμως να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη απεικονίζοντας διατάσεις του παχέος ή λεπτού εντέρου και την πάχυνση της βλεννογόνου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.
- Το διακοιλιακό υπερηχογράφημα μπορεί να απεικονίσει φλεγμονή του λεπτού ή του παχέος εντέρου με ευαισθησία 80-90% (Dignass et al., 2012). Μειονεκτήματά του είναι η χαμηλή του εξειδίκευση στη διάγνωση των ΙΦΝΕ έναντι άλλων αιτιών εντερικής φλεγμονής και ότι η ακρίβειά του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ικανότητες του εξεταστή.

- Η αξονική τομογραφία (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) σε ασθενείς με ΙΦΝΕ μπορεί να θέσουν την υποψία της νόσου σε μη διαγνωσμένους ασθενείς και παράλληλα αποτελούν τις εξετάσεις επιλογής για τον έλεγχο του εντέρου και την ανεύρεση εξωεντερικών εκδηλώσεων και επιπλοκών (π.χ. αποστήματα, διάτρηση) της ΙΦΝΕ (Roggeveen et al., 2006)

Τέλος ενδοσκοπική εξέταση (κολονοσκοπική οπτικοποίηση) είναι απαραίτητη για τη διάγνωση της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου Crohn ενώ η βιοψία οδηγεί στην διάκριση τους.

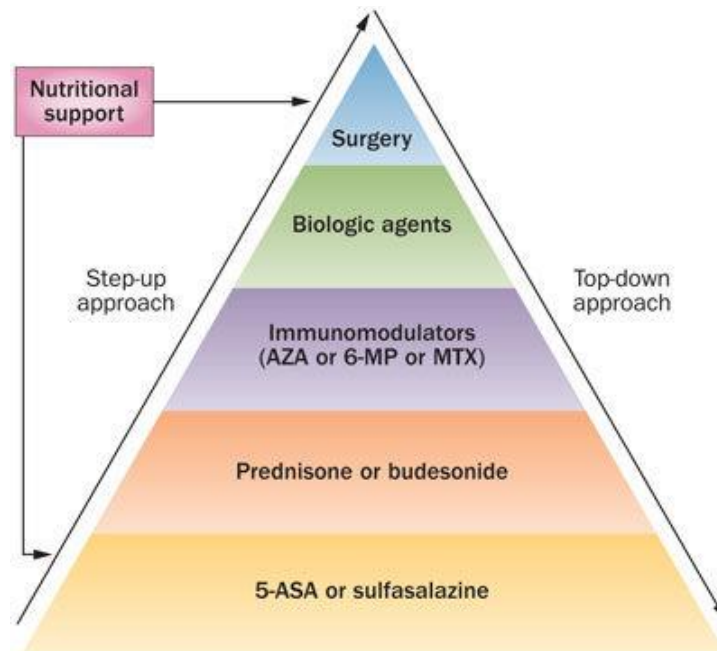
1.7. Θεραπεία

Πληθώρα φαρμακευτικών σκευασμάτων χρησιμοποιούνται για την επίτευξη και διατήρηση της ύφεσης στις ΙΦΝΕ (Εικόνα 9) χωρίς καμία να είναι ικανή να ελέγξει απόλυτα τα συμπτώματα και τις παρενέργειες της νόσου (Sales-Campos, 2015).

Σε αυτήν εντάσσονται αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτικά, αντιβιοτικά, θειοπουρίνες και ανταγωνιστές φυλλικού οξέος (Hendrickson et al., 2002). Φαρμακευτικά σκευάσματα 5-αμινοσαλικυλικού οξέος και βουδεσονίδη αποτελούν την πρώτη γραμμή θεραπείας για τις ΙΦΝΕ ήπιας έως μέτριας βαρύτητας (Büning and Lochs, 2006). Σε περίπτωση μη ανταπόκρισης στη θεραπεία χορηγούνται κορτικοστεροειδή, των οποίων η μακροχρόνια χορήγηση ενέχει κινδύνους για την υγεία των ασθενών (π.χ καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης στα παιδιά) (Hendrickson et al., 2002). Η αγωγή με αντιβιοτικά αποδεικνύεται αποτελεσματική όταν υπάρχει υποψία λοιμώδους αιτιολογίας υποτροπής της νόσου χορηγώντας κυρίως μετρονιδαζόλη και συπροφλοξασίνη (Nitzan et al., 2016). Σε ασθενείς που καθίστανται ανθεκτικοί στις προηγούμενες θεραπείες ή έχουν ανάγκη την μακροχρόνια χρήση κορτικοστεροειδών, θέση στην θεραπεία έχουν τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως η αζαθειοπρίνη, η κυκλοσπορίνη και η μεθοτρεξάτη (Dignass et al., 2010, Harrison, 2005, Hendrickson et al., 2002). Τελευταίας γραμμής θεραπεία αποτελεί η χρήση βιολογικού παράγοντα (Dignass et al., 2012) όπως το infliximab.

Η τοξική κολίτιδα, η σοβαρού βαθμού επιθηλιακή δυσπλασία και η εμφάνιση καρκίνου αποτελούν αποτελούν αιτίες χειρουργικής επέμβασης (Cecil et al., 2003). Στην ελκώδη κολίτιδα η

αφαίρεση του παχέος εντέρου οδηγεί στην απαλλαγή από την εντερική μορφή της νόσου (Harrison, 2005) ενώ στην νόσο Crohn η χειρουργική παρέμβαση θα πρέπει να περιορίζεται μόνο στην περίπτωση που κρίνεται αναγκαία κυρίως διότι στις περισσότερες περιπτώσεις υποτροπιάζει (Clynen et al., 2016).



Εικόνα 9: Θεραπευτική πυραμίδα των ΙΦΝΕ. (Aloi et al., 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα

2.1. Γενικά

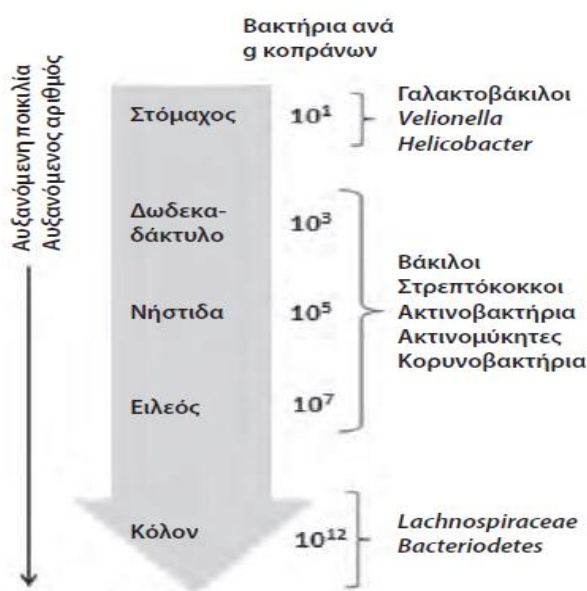
Η εντερική μικροχλωρίδα αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα που ανήκουν σε όλες τις μορφές της κυτταρικής ζωής (αρχαία, βακτήρια, ευκάρυα) αλλά και από ιούς (βακτηριοφάγοι) που αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα δημιουργώντας ένα από τα πιο πυκνά οικοσυστήματα.

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος των μικροβίων του εντέρου αποκάλυψε την πολυπλοκότητα του γαστρεντερικού μικροβιώματος, με χιλιάδες διαφορετικούς φυλότυπους που ανήκουν κατά κύριο λόγο στα φύλα των *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Μικρότεροι πληθυσμοί ανήκουν στα *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota* και *Fusobacteria*.

Περίπου 400–500 διαφορετικά είδη μικροβίων συνιστούν τη χλωρίδα του εντερικού ανθρώπινου μικροβιώματος. Η μικροβιακή κοινότητα ποικίλει κατά μήκος του πεπτικού συστήματος (Εικόνα 10). Η στοματική κοιλότητα περιέχει έναν από τους υψηλότερους αριθμούς βακτηρίων, περίπου ίσο με 10^{12} . Ο στόμαχος φέρει περίπου 10^3 – 10^4 βακτήρια, το δωδεκαδάκτυλο 10^5 – 10^6 και ο τελικός ειλεός 10^8 – 10^9 βακτήρια ανά γραμμάριο ιστού ή κοπράνων. Ωστόσο, ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων έχει βρεθεί στο παχύ έντερο, ίσο με 10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο εντερικού ιστού. Το εντερικό μικροβίωμα του παχέος εντέρου είναι πυκνότερο και πολυποίκιλο συγκριτικά με εκείνο του λεπτού εντέρου με δείγματα από το λεπτό έντερο να είναι εμπλουτισμένα στα φύλα *Firmicutes* και *Actinobacteria*, ενώ τα *Bacteroidetes* και τα *Lachnospiracae* των *Firmicutes* εντοπίζονται σε δείγματα του παχέος εντέρου και ιδιαίτερα στο κόλον.

Αν και υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα μικρόβια που αποικίζουν το έντερο, έχει βρεθεί ότι η εντερική μικροχλωρίδα των περισσότερων ατόμων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μία από τις τρεις ομάδες ή «εντερότυπους» ανάλογα με την επικράτηση των γενών: *Bacteriodes* (εντερότυπος 1), *Prevotella* (εντερότυπος 2) ή *Ruminococcus* (εντερότυπος 3) με επικράτηση του κάθε εντερότυπου να καθορίζεται κυρίως από διαιτητικούς παράγοντες. Επομένως, φαίνεται ότι στην εντερική χλωρίδα κάθε ατόμου υπάρχουν στελέχη βακτηρίων που χαρακτηρίζουν το μικροβίωμά του και τα οποία δεν αντικαθίστανται εύκολα.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαφοροποιείται ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τη διατροφή, τη χρήση φαρμάκων και ιδιαίτερα αντιβιοτικών, την επιμόλυνση με μικρόβια του περιβάλλοντος και άλλα. Μετά τον πρώτο χρόνο της ζωής, το εντερικό μικροβίωμα των παιδιών αρχίζει να ομοιάζει με εκείνο ενός νεαρού ενήλικα και τότε είναι η περίοδος κατά την οποία το μικροβίωμα έχει τη μεγαλύτερη επίδραση πάνω στο ανοσοποιητικό σύστημα του παιδιού. Οι κυριότεροι βακτηριακοί πληθυσμοί, σταθεροποιούνται μετά τα δύομισι πρώτα χρόνια της ζωής ενώ μεταβολές παρατηρούνται και μετά τα εξήντα έτη (Scaldaferri et al., 2013; Kostic et al., 2014).



Εικόνα 10: Μεταβολές στον αριθμό και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού. (Μεντής et al., 2013)

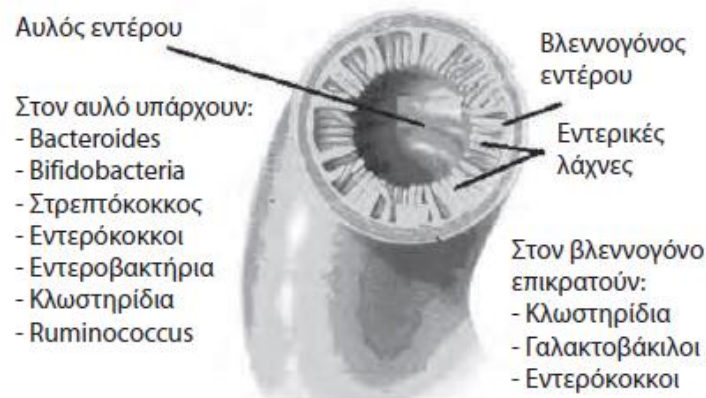
2.2. Σύνθεση εντερικού μικροβιώματος

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στη βλεννογόνο στοιβάδα διαφέρουν από εκείνους στον εντερικό αυλό (Εικόνα 11). Πιο συγκεκριμένα, τα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus* εμφανίζονται στα κόπρανα και είναι αντιπροσωπευτικά της σύνθεσης του αυλού, ενώ στο βλεννογόνο και στις επιθηλιακές κρύπτες

ανιχνεύονται τα *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterococcus* (Bull and Plummer 2014; Mentis et al., 2013).

Ένας υγιής εντερικός σωλήνας αποτελείται κυρίως από αυστηρά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι αερόβιοι και οι προαιρετικά αναερόβιοι εμφανίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό. Στο έντερο τελικά, ανιχνεύονται πάνω από 50 διαφορετικά βακτηριακά φύλα με κυρίαρχα τα *Bacteroidetes* και *Firmicutes* σε ποσοστό 90% και τα *Actinobacteria* να έρχονται τρίτα σε ποσοστό 3% (Bull and Plummer, 2014).

Πιο συγκεκριμένα 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 στη διατήρηση της ομοιόστασης της βλεννογόνου. Επίσης στο ίδιο φύλο ανήκουν γένη των *Streptococcaceae* και *Lactobacillales* ενώ στελέχη των *Actinomycinaeae*, *Corynebacteriaeae*, *Collinsella aerofaciens* ή *Propionibacteria* ανήκουν στα *Actinobacteria* (Wang et al., 2014; Sartor, 2008; Serban, 2015; Babickova, 2015; Yu et al., 2013).



Εικόνα 11: Διαφορές στο ανθρώπινο μικροβίωμα (ΑΜ) του εντέρου μεταξύ βλεννογόνου, όπου τα βακτήρια είναι προσκολλημένα και του εντερικού αυλού (Μεντής et al., 2013).

2.3. Συμβίωση και ανοσοποιητικό σύστημα

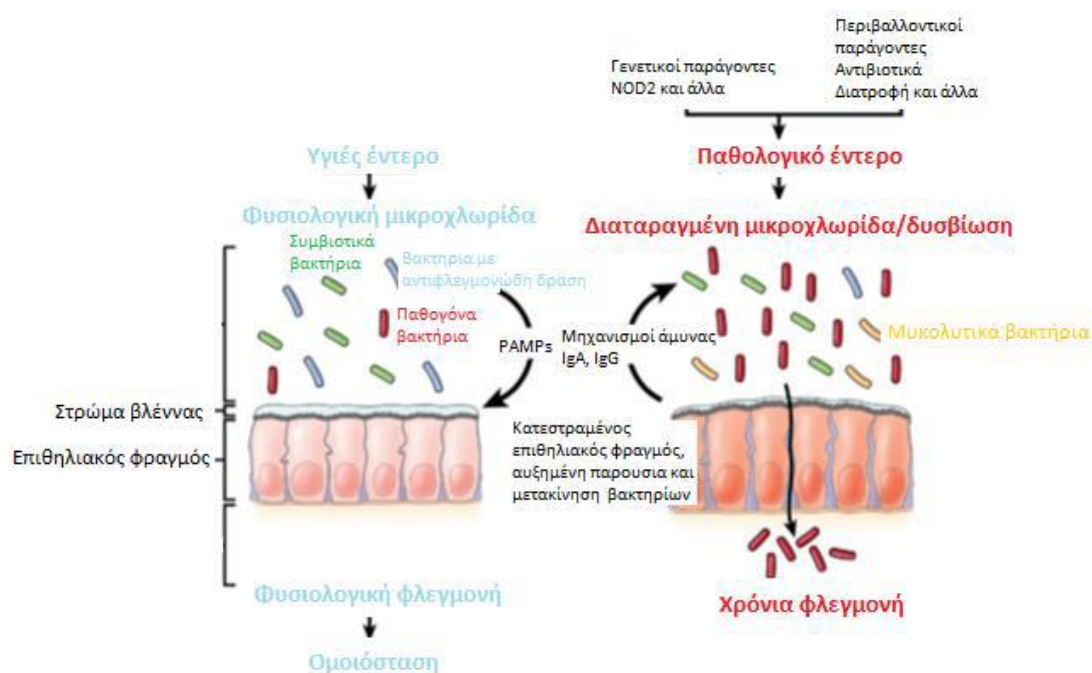
Η σχέση μεταξύ του εντερικού μικροβιώματος και του ξενιστή είναι συμβιωτική. Τόσο ο ξενιστής όσο και τα εντερικά βακτήρια έχουν κοινή ωφέλεια. Ο ξενιστής παρέχει στα εντερικά βακτήρια ένα σταθερό περιβάλλον (συγκεκριμένη θερμοκρασία και pH) καθώς και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό τους αλλά και την εκτέλεση των βασικών τους λειτουργιών. Τα μικρόβια του εντέρου με τη σειρά τους διευκολύνουν την απορρόφηση των τροφών που έχουν υποστεί πέψη (Ubeda et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνουν μέρος στην αποικοδόμηση των άπεπτων θρεπτικών συστατικών που καταλήγουν στο παχύ έντερο και στην απορρόφησή τους, και συμβάλουν στην κινητικότητα του εντέρου. Παράγουν διάφορα μεταβολικά προϊόντα, με κυριότερα τα οργανικά οξέα μικρής αλυσίδας όπως το βουτυρικό οξύ και βιταμίνες όπως η K και B. Ακόμη, βοηθούν στην απορρόφηση μετάλλων, ενώ βοηθούν στην καταστροφή τοξινών (Mentis et al., 2013; Sandra Macfarlane et al., 2009; Maria Jose Saez-Lara et al., 2015).

Τέλος, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα και στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου. Τα συμβιωτικά βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες και ανταγωνίζονται τους παθογόνους σε θρεπτικά συστατικά και στην προσκόλληση στο έντερο (Bull and Plummer, 2014; Mentis, 2013). Πιο συγκεκριμένα, αποτρέπουν την προσκόλληση των παθογόνων στα αντίστοιχα σημεία στα επιθηλιακά κύτταρα. Λόγω του πλήθους τους, κάνουν χρήση όλων των πηγών ενέργειας, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Επίσης, παράγουν ουσίες, όπως οι βακτηριοσίνες που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων (Bull and Plummer, 2014; Mentis, 2013). Κάποια στελέχη που ανήκουν στα γένη *Bacteroides* και *Clostridium* προάγουν την έκκριση των T κυττάρων και την ενεργοποίηση των πυρηνικών παραγόντων (NF-κB) με αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονής (Scaldaferri et al., 2013; Kostic et al., 2014; Chow et al., 2011).

2.3.1 Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στο ανοσοποιητικό σύστημα

Τέσσερις πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν πώς τα συστατικά της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας μπορούν να πυροδοτήσουν ή να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη φλεγμονής (Εικόνα 12).

- Τα μικρόβια μπορούν να επάγουν την εντερική φλεγμονή είτε προσκολλώντας είτε διεισδύοντας στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας έτσι την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και παράγοντας εντεροτοξίνες.
- Η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ συμβιωτικών και παθογόνων μικροβίων, που καλείται δυσβίωση, μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση της νόσου. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν μείωση στη βιοποικιλότητα των εντερικών βακτηρίων των ασθενών σε ποσοστό 30%-50%. Η μείωση ή απώλεια επίσης των συμβιωτικών μικροοργανισμών αποτελεί αφορμή για την υπερανάπτυξη των παθογόνων.
- Ο τρίτος και ο τέταρτος μηχανισμός με τον οποίο τα μικρόβια μπορούν να διαδραματίσουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της φλεγμονώδους νόσου αφορούν στον ίδιο τον ξενιστή. Βλάβη σε αυτά καθαυτά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή στην αλληλεπίδραση τους με τα Τ-λεμφοκύτταρα όπως επίσης και αλλοιώσεις του επιθηλιακού φραγμού μπορούν να οδηγήσουν σε υπέρμετρη ανοσολογική απόκριση, να πυροδοτήσουν την παραγωγή κυτοκινών, διαλυτών μεσολαβητών της φλεγμονής και άλλων παραγόντων καθιστώντας τη φλεγμονή χρόνια σε γενετικά προδιατεθειμένο άτομο, που δεν έχει την ικανότητα να καταστείλει τη φλεγμονή (Shih et al, 2008).



Εικόνα 12: Μικροβιόκοσμος, γενετικό περιβάλλον ξενιστή και περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου Crohn. Αριστερά: υγιείς άνθρωποι, δεξιά: ασθενείς με ΙΦΝΕ (Chassaing et al., 2011).

2.4. Μικροβίωμα και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Ένας βασικός ρόλος του εντερικού μικροβιώματος στην παθογένεση των ΙΦΝΕ έχει από καιρό υποστηριχθεί. Συγκεκριμένα, οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου έχουν συσχετισθεί με δυσβίωση, που ορίζεται ως η μείωση της μικροβιακής ποικιλομορφίας του εντέρου λόγω μεταβολής της ισορροπίας μεταξύ συμβιωτικών και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών (Sartor et al., 2012; Mosca et al., 2016). Πράγματι, η κλινική παρατήρηση ότι υπάρχει απόκριση στη θεραπεία της νόσου με αντιβιοτικά ενισχύει την υπόθεση ότι τα εντερικά βακτήρια συμβάλλουν στη φλεγμονώδη απόκριση (Khan et al., 2011; Wang et al., 2012). Άλλες παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι το εντερικό μικροβίωμα έχει καθοριστικό ρόλο στις ΙΦΝΕ περιλαμβάνουν την προδιάθεση για φλεγμονή σε περιοχές με σχετική παύση της κίνησης των κοπράνων (τερματικό ειλεό και ορθό), την αποτελεσματικότερη εκτροπή των κοπράνων ως θεραπεία για τη νόσο Crohn και την ταχέως αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ΙΦΝΕ παγκοσμίως

που συνδέεται με τον τρόπο ζωής, τις μεταβολές στη διατροφή και τις περιβαλλοντικές εκθέσεις (Kaplan et al., 2017; De Filippo et al., 2010). Αν και αυτές οι συσχετίσεις συνδέουν το εντερικό μικροβίωμα με τις ΙΦΝΕ, ο ακριβής ρόλος της δυσβίωσης είναι λιγότερο σαφής καθώς δεν είναι εύκολος ο προσδιορισμός της ως αιτία ή ως συνέπεια της φλεγμονής.

Σε γενικές γραμμές η εντερική μικροχλωρίδα των ασθενών με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν μειωμένη ποικιλομορφία βακτηρίων με αντιφλεγμονώδη δράση και αυξημένη με προφλεγμονώδη δράση έναντι του υγιούς πληθυσμού. Επίσης, παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός προσκολλημένων στο επιθήλιο βακτηρίων (Serban, 2015).

Μελέτες που έγιναν σε βιοψίες του βλεννογόνου νεοδιαγνωσμένων παιδιών με νόσο Crohn δείχνουν ότι η δυσβίωση μπορεί να προηγείται της κλινικής εκδήλωσης της νόσου (Gevers et al., 2014). Μια προοπτική μελέτη παιδιατρικών ασθενών με νόσο Crohn συμπέρανε επίσης ότι η δυσβίωση αντανακλά την παρουσία και τη σοβαρότητα της φλεγμονής. Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε μια ανεξάρτητη σύνδεση μεταξύ της δυσβίωσης με άλλους παράγοντες όπως είναι η διατροφή και η χρήση αντιβιοτικών (Lewis et al., 2015). Έτσι, ενώ οι μεταβολές στο εντερικό μικροβίωμα μπορεί να συμβούν νωρίς και ίσως να συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμβάλλουν περαιτέρω στη δυσβίωση προκαλώντας αλλαγές στις μεταβολικές διεργασίες του εντερικού μικροβιώματος.

Το γένος *Fusobacterium* ανήκει στα Gram αρνητικά αναερόβια βακτήρια και έχει παρατηρηθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο βλεννογόνο ασθενών με ελκώδη κολίτιδα με μελέτες να ενοχοποιούν στελέχη του στη διαδικασία καρκινογένεσης στο έντερο (Wagner et al., 2011).

Το φύλο *Firmicutes* και συγκεκριμένα το *Faecalibacterium prausnitzii* στην πλειονότητα των μελετών μειώνεται σε κόπρανα ασθενών με νόσο Crohn (Halfvarson et al., 2017), αν και μελέτες που εστίασαν σε βιοψίες του βλεννογόνου δεν έδειξαν αυτή τη σύνδεση (Hansen et al., 2012; Assa et al., 2016). Αντιστρόφως, βακτήρια του φύλου *Proteobacteria*, όπως τα *Enterobacteriaceae* (Baumgart et al., 2007), συμπεριλαμβανομένου του *Escherichia coli* (Sartor, 2008), είναι συνήθως αυξημένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σχέση με υγιή άτομα. Οι διαφορές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος εντοπίζονται και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας (Joossens et al., 2011)

γεγονός που υποδηλώνει ότι η δυσβίωση σχετίζεται κυρίως με την κατάσταση της νόσου και όχι με περιβαλλοντικούς ή γενετικούς παράγοντες.

Παρά την πληθώρα ερευνών που μελετούν το εντερικό μικροβίωμα σε σχέση με τις ΙΦΝΕ, ισχυρά στοιχεία για την ύπαρξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών οι οποίοι, υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές ή γενετικές επιδράσεις, μπορούν να οδηγήσουν στην παθογένεια των ΙΦΝΕ δεν υπάρχουν (Chow et al., 2011). Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, και συγκεκριμένα του στελέχους *adherent-invasive E. coli* (AIEC), έχουν συσχετισθεί με το βλεννογόνο του ειλεού ασθενών με νόσο Crohn και έχουν προταθεί ως δυνητικά παθογόνα (Boudeau et al., 1999). Η αύξηση του πληθυσμού του AIEC οφείλεται στην ανικανότητα του βλεννογόνου να ελέγξει τη μόλυνση λόγω μειωμένης έκκρισης αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Serban, 2015) με αποτέλεσμα να προσδένεται ισχυρά στο επιθήλιο του βλεννογόνου και να εισέρχεται εντός των κυττάρων όπου και πολλαπλασιάζεται. Η ικανότητα του πληθυσμού AIEC να αναστέλλει την παραγωγή της ιντερφερόνης- γ η οποία αποτελεί άμυνα του οργανισμού και να προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, από τα μακροφάγα, έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της φλεγμονής (Desilets et al., 2016). Το *Mycobacterium avium subsp.* αποικίζει τον βλεννογόνο του ειλεού, εισβάλλει στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας χρόνια κοκκιωματώδη εντερίτιδα σε πρόβατα και βοοειδή (Timms et al., 2016) ωστόσο, κλινικές μελέτες σε ανθρώπους δεν επιβεβαίωσαν αυτή την υπόθεση (Liverani et al., 2014). Ομοίως, έχει προταθεί μια συγκεκριμένη συσχέτιση μεταξύ του *Fusobacterium nucleatum*, της ελκώδους κολίτιδας και της ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου με βάση την απομόνωση ενός εξαιρετικά διηθητικού στελέχους από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, χωρίς όμως να είναι σε θέση να αποδειχθεί μια σαφής σχέση αιτίας-αποτελέσματος (Dharmani et al., 2011; Zeller et al., 2014).

Αν και είναι δελεαστικό να υποθέσουμε έναν υποκινητικό ρόλο της μικροβιακής παθογένειας στις ΙΦΝΕ, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μελέτες που παρατέθηκαν μέχρι τώρα περιγράφουν ενώσεις που δεν αποδεικνύουν την αιτιώδη συνάφεια. Η δυσβίωση στις ΙΦΝΕ θα μπορούσε, σε μεγάλο βαθμό, να αντανakλά την ανταπόκριση μίας σύνθετης μικροβιακής κοινότητας στο στρες λόγω της εντερικής φλεγμονής. Στην υγιή γαστρεντερική οδό υπάρχει διάχυση οξυγόνου από το

βλεννογόνο του ξενιστή στον αυλό του εντέρου (Glover et al., 2016; Albenberg et al., 2014). Κατά συνέπεια, τα βακτήρια που είναι προσκολλημένα στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου έχουν υψηλότερη ανοχή στο οξυγόνο και έκφραση καταλάσης σε σχέση με τα είδη που σχετίζονται με τα κόπρανα (Albenberg et al., 2014). Καθώς η φλεγμονή είναι μια οξειδωτική κατάσταση, μπορεί να αναμένεται ότι θα προωθήσει φύλα με ανοχή στο οξυγόνο όπως τα *Proteobacteria* και τα *Actinobacteria*. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εντερική φλεγμονή επάγει την παραγωγή μικρών μορίων που χρησιμεύουν ως δέκτες ηλεκτρονίων για προαιρετικά αναερόβια όπως τα *Enterobacteriaceae* (Lewis et al., 2015; Winter et al., 2013). Έτσι, μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με τη φλεγμονή μπορεί να λειτουργούν ως στρεσογόνοι παράγοντες και να προάγουν την ανάπτυξη δυσβίωσης.

2.5. Μη βακτηριακό μικροβίωμα και ΙΦΝΕ

2.5.1 Ιοί και ΙΦΝΕ

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες που διερευνούν τη σχέση μεταξύ της φλεγμονής και της μικροχλωρίδας του εντέρου επικεντρώνονται στα βακτήρια. Ωστόσο, το μικροβίωμα περιλαμβάνει επίσης μύκητες και ιούς με τον ρόλο αυτών των μικροοργανισμών στην υγεία και την ασθένεια να εκτιμάται όλο και περισσότερο. Μεταγονιδιωμιακές αναλύσεις σε τμήματα ιών που απομονώθηκαν από δείγματα κοπράνων έδειξαν ότι το ιικό μικροβίωμα του εντέρου αποτελείται κυρίως από βακτηριοφάγους (Minot et al., 2011). Έχουν περιγραφεί μεταβολές στη σύνθεση των βακτηριοφάγων που σχετίζονται με τις ΙΦΝΕ, κυρίως μια αύξηση των αλληλουχιών βακτηριοφάγου *Caudovirales* σε δείγματα από βιοψία ειλεού σε παιδιατρικούς ασθενείς με νόσο Crohn (Wagner et al., 2013; Norman et al., 2015). Είναι σημαντικό ότι αύξηση των βακτηριοφάγων *Caudovirales* συσχετίστηκε με μείωση της βακτηριακής ποικιλομορφίας. Μέσα από ποικίλες επιδράσεις τους στα βακτήρια, από τη λύση των κυττάρων έως τη μεταφορά γενετικού υλικού που κωδικοποιεί τοξίνες ή την αντίσταση στα αντιβιοτικά οι φάγοι μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή σύνθεση του εντέρου. Το κατά πόσο οι βακτηριοφάγοι έχουν άμεσο ρόλο στην παθογένεση των ΙΦΝΕ ή απλώς αντανακλούν την υποκείμενη δυσβίωση παραμένει να καθοριστεί (Magin et al., 2013).

2.5.2 Μύκητες και ΙΦΝΕ

Λόγω τεχνικών προκλήσεων όπως η δυσκολία ταυτοποίησης των μυκήτων σε κλινικές μελέτες, λίγες έχουν εξετάσει τον ρόλο των μυκήτων στις ΙΦΝΕ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα αντισώματα που στρέφονται κατά συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος του *Saccharomyces cerevisiae* που ενώ έχουν συσχετιστεί με τη νόσο Crohn από το 1988, η κλινική σημασία αυτού του ευρήματος παραμένει ασαφής (Nilsson et al., 2006; Underhill, 2014). Πλέον η ανάπτυξη εξειδικευμένων αναλυτικών μεθόδων επιτρέπει την πληρέστερη αξιολόγηση του μικροβιώματος των μυκήτων στην υγεία και την ασθένεια (Πίνακας 2).

Μελέτη σε δείγματα κοπράνων από παιδιά με νόσο Crohn σε σύγκριση με υγιή άτομα έδειξε συνολικά μια αφθονία μυκήτων, ωστόσο τα ίδια πέντε είδη αφορούσαν στην πλειονότητα των μυκήτων και στις δύο ομάδες (Lewis et al., 2015). Επιπλέον, η επιτυχημένη θεραπεία που συσχετίστηκε με μείωση της βακτηριακής δυσβίωσης δεν οδήγησε σε μείωση της κοινότητας των μυκήτων, θέτοντας σε αμφισβήτηση τον αιτιολογικό ρόλο των μυκήτων στη φλεγμονή. Από την άλλη πλευρά, μια μελέτη σε ενήλικες με ΙΦΝΕ έδειξε διαφορές στη σχετική αφθονία συγκεκριμένων μυκήτων μεταξύ ασθενών με ΙΦΝΕ και υγιών μαρτύρων (Sokol et al., 2016). Συγκεκριμένα, η μυκητιασική δυσβίωση στις ΙΦΝΕ συσχετίστηκε με αυξημένη αναλογία *Basidiomycota* και *Candida albicans* σε αντίθεση με μειωμένη αναλογία *Saccharomyces cerevisiae*.

Σε μεταγενέστερη μελέτη διαπιστώνεται ότι η συνολική μυκητιασική ποικιλομορφία ήταν υψηλότερη σε ασθενείς νοσούντες από ΙΦΝΕ σε σχέση με εκείνη των υγιών ατόμων, με αρκετά είδη να ανιχνεύονται μόνο στους ασθενείς με νόσο του Crohn ή μόνο σε δείγματα ελκώδους κολίτιδας (Ott et al., 2008). Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης διαφορετική μυκητιακή σύνθεση σε δείγματα κοπράνων και βλεννογόνου. Μελέτη παιδιατρικών περιστατικών απέδειξε στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ ασθενών με νόσο του Crohn και της υγιούς ομάδας ελέγχου. Ο λόγος *Basidiomycota* προς *Ascomycota* βρέθηκε να είναι αυξημένος στη νόσο Crohn σε σύγκριση με υγιή άτομα (Mukhopadhyay et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, σε αντίστοιχη μελέτη ενηλίκων με νόσο Crohn, δεν παρατηρήθηκε κανένα ευδιάκριτο πρότυπο σε σχέση με αυτές τις δύο φυλές μυκήτων (Liguori et al., 2016).

Η συμμετοχή των μυκήτων στην παθογένεση των ΙΦΝΕ είναι εύλογη, καθώς ένας αριθμός γονιδίων ευαισθησίας των ΙΦΝΕ σε ζωικά μοντέλα, αλλά και ανθρώπους, εμπλέκονται σε αντιμυκητιασικές ανοσοαποκρίσεις (για παράδειγμα CARD9, CLEC7A και RELA) (Richard et al., 2015). Οι μύες παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στη χημική κολίτιδα λόγω της αύξησης των δυνητικά παθογόνων μυκήτων (Iliev et al., 2012). Πιο πρόσφατα, ο αποικισμός με *S. cerevisiae* έχειδειχθεί ότι προάγει τον μεταβολισμό της πουρίνης σε μύες, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος, τα οποία έχουν προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες (Chiaro et al., 2017). Για παράδειγμα, η παρατεταμένη θεραπεία των μυών με τον αντιμυκητιασικό παράγοντα φλουконаζόλη οδηγεί σε μυκητιασική δυσβίωση που χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ειδών όπως τα *Aspergillus amstelodami*, *Epicoccum nigrum* και *Wallemia sebi*. Οι μύες που εμπλουτίζονται με αυτούς τους οργανισμούς εμφανίζουν εντονότερα συμπτώματα κολίτιδας (Wheeler et al., 2016). Συμπερασματικά, η κλινική εικόνα των ζωικών μοντέλων υποδεικνύει ότι οι μύκητες μπορεί να επηρεάσουν την υγεία και την ασθένεια του εντέρου, καταστέλλοντας την ανάπτυξη των δυνητικών παθογόνων και τροποποιώντας τον μεταβολισμό του ξενιστή. Ωστόσο, σχετικά με τις μελέτες στον άνθρωπο, η ύπαρξη αιτιώδους σχέσης παραμένει ασαφής.

Πίνακας 2: Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με ΙΦΝΕ. Αριστερά: πιθανοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, δεξιά: μικρόβια με πιθανή προστατευτική δράση (Serban, 2015 με αναφορές εντός).

Potentially Harmful	Potentially Protective
<i>Adherent-invasive Escherichia coli</i> ↑ in mucosa of ileal CD (also post-operative recurrence)⁷⁷, colonic CD and UC⁸⁰ <i>Fusobacterium</i>²⁶ ↑ in active UC pouchitis⁹⁴ <i>Fusobacterium varium</i>: ↑ in UC (adherence and invasion of colonic epithelial cells, increasing IL-8 and TNF-α secretion)⁹⁸ <i>Fusobacterium nucleatum</i>: ↑ in mucosa of IBD adults⁹⁹ and newly diagnosed CD children (with prognostic implication)²¹ <i>Campylobacter concisus</i> ↑ in pediatric CD^{52,58}, adult CD⁸⁶ and UC^{86,87} <i>Desulfovibrio</i> - Associated with less sulphated mucin and correlated with mucosal inflammation in UC¹⁰⁰ <i>Klebsiella</i> - Associated with CD¹⁰¹ <i>Enterohepatic Helicobacter</i> ↑ in mucosa in UC and CD¹⁰² <i>Ruminococcus gnavus</i>: controversial ↑ in faeces in CD (mucolytic properties)⁶⁵ ↓ in mucosa of newly diagnosed CD children²¹ <i>Clostridium difficile</i> ↑ risk of colonization/infection in IBD¹⁰³ - IBD children at diagnosis: significantly ↑ prevalence¹⁰⁴ - IBD children: 10 fold more common vs. celiac disease; correlated with IBD severity¹⁰⁵ <i>Veillonella</i> ↑ in mucosa of newly diagnosed CD children²¹ and associated with worse clinical outcome⁴² ↑ in post-surgical recurrence in CD⁹² <i>Cytomegalovirus</i> - Reactivation associated with worse outcome in IBD colitis¹⁰⁶ <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> - Proposed link with CD in the past, but doubtful lately¹¹	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i> ↓ in ileal mucosa in newly diagnosed pediatric CD²¹ and in faeces in adult CD^{45,65,68}, active IBD⁶⁴ and adult UC¹⁰⁷ ↓ in ileal mucosa in post-operative recurrence of CD⁶² ↓ in mucosa of healthy siblings of CD patients⁶⁶ ↓ levels associated with relapse after infliximab withdrawal in CD⁹⁷ <i>Clostridium clusters IV and XIVa</i>²⁶ ↓ in ileal mucosa in CD⁶¹ and in faeces in active CD and UC⁶⁴ <i>Roseburia</i>: ↓ in mucosa of adult CD and UC⁴⁵ and of newly diagnosed CD children²¹ <i>Roseburia hominis</i>: ↓ in faeces in UC¹⁰⁷ <i>Some Bacteroides species</i>²⁶ ↓ in mucosa in adult CD and UC⁶¹, active UC pouchitis⁹⁶ and newly diagnosed pediatric CD^{21,42,50} and UC⁵¹ <i>Odoribacter</i> (SCFAs production): ↓ in mucosa in pancolonic UC and ileal CD⁴⁵ <i>Bifidobacterium</i>²⁶ ↓ in CD (newly diagnosed children, in mucosa)²¹ and UC (in mucosa⁶⁰ and faeces⁶⁴) <i>BF. Adolescentis</i>: ↓ in faecal samples in CD⁶⁴ <i>Anaerostipes</i> (butyrate production) ↓ in current or former smokers^{26,45} <i>Dorea, Butyricoccus, Coriobacteriaceae</i> ↓ in patients receiving antibiotics^{26,45}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μεταβολομική και Αναλυτικές Τεχνικές

3.1. Εισαγωγή στην μεταβολομική

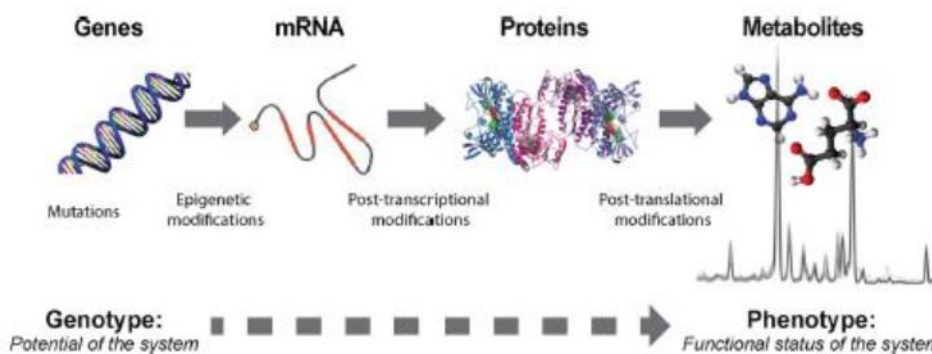
Η μεταβολομική αποτελεί μια αναδυόμενη και πολλά υποσχόμενη επιστήμη η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μια εξειδικευμένη μορφή της αναλυτικής (βιο)χημείας, ανήκει στην κατηγορία των omics (που αντιπροσωπεύουν τον συστηματικό και ταυτόχρονο προσδιορισμό χημικών ενώσεων) και αποτελεί μία ολοκληρωμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα (Zhang et al., 2012).

Ως μεταβολομική ή μεταβολική φαινοτύπιση, ορίζεται ο συστηματικός και ταυτόχρονος προσδιορισμός των μεταβολιτών σε ένα υπόστρωμα καθώς και των μεταβολών τους στο χρόνο ως αποτέλεσμα βιολογικών διεργασιών. Ένας δεύτερος ορισμός είναι η υψηλής απόδοσης ανάλυση της μεταβολικής φυσιολογίας ενός βιολογικού συστήματος μέσω της ταυτόχρονης ποσοτικοποίησης της σχετικής συγκέντρωσης ελεύθερων μικρών μεταβολιτών (Kanani et al., 2008). Ο όρος «υψηλής απόδοσης» δηλώνει την απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος για την εξαγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων.

Οι μεταβολίτες, είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία λαμβάνουν μέρος στις μεταβολικές αντιδράσεις, είτε ως αντιδρώντα είτε ως ενδιάμεση ή τελικά προϊόντα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα καθώς αποτελούν ιδανικούς δείκτες κατανόησης των φαινοτύπων διαφόρων ασθενειών παρέχοντας μια άμεση βιοχημική εικόνα του οργανισμού (Εικόνα 13). Πρόκειται για μόρια στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τα αμινοξέα, τα νουκλεϊνικά οξέα, τα οργανικά οξέα (Zhang et al., 2012) αλλά και τα ξενοβιοτικά.

Συνεπώς ως μεταβολότυπος (metabolome ή μεταβόλωμα) ορίζεται το σύνολο των μεταβολιτών που παράγονται από τα κύτταρα και εντοπίζονται στα βιολογικά δείγματα (Ivanisevic and Siuzdak, 2015; Patti, 2012). Κάθε τύπος κυττάρου ή βιολογικού δείγματος εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό μεταβολικό προφίλ δηλαδή ένα μεταβολότυπο. Ο μεταβολότυπος καθορίζει τον φαινότυπο των οργανισμών και σχετίζεται με την γενετική ποικιλομορφία τους (Nicholson, 2007).

Πλεονέκτημα της μεταβολομικής είναι η δυνατότητα εφαρμογής της σε βιολογικά συστήματα που δεν βρίσκονται σε συνθήκες δυναμικής ισορροπίας και δεν απαιτεί εκτεταμένη γνώση των αντιδράσεων (Kanani et al., 2008). Με δεδομένη τη σημασία του μεταβολισμού, είναι προφανής η σημασία της μεταβολομικής ανάλυσης για τη μελέτη της ρύθμισης της φυσιολογίας ενός βιολογικού συστήματος. Από την άλλη, το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε ποικίλους τομείς, όπως στην ιατρική, στη φυσιολογία, στη φαρμακολογία, στη τοξικολογία, στα τρόφιμα και στη διατροφή την καθιστά ολοένα και πιο αναγκαία.



Εικόνα 13: Οι μεταβολίτες συνδέονται στενά με τον φαινότυπο ενός βιολογικού συστήματος (Ivanisevic and Siuzdak, 2015).

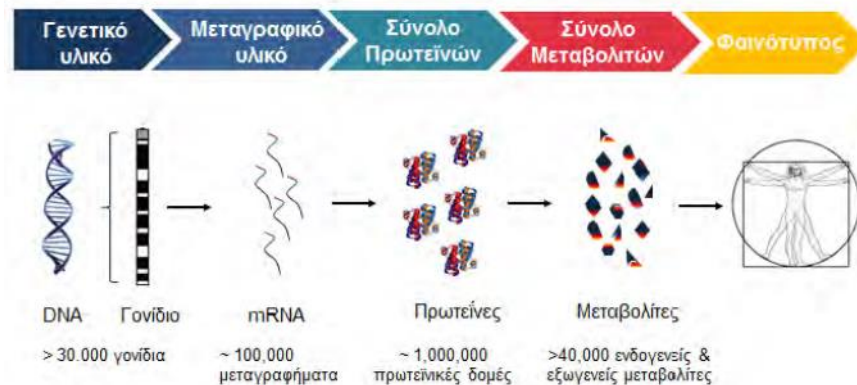
3.2. Η Μεταβολομική και ο ρόλος της στη διάγνωση ασθενειών

Η διαδεδομένη χρήση των μεταβολιτών ως διαγνωστικό εργαλείο στην κλινική πρακτική έχει εξασφαλίσει μια σειρά από πλεονεκτήματα καθώς μπορούν να προσδιοριστούν σε πληθώρα βιολογικών υγρών. Στα επιλεγμένα βιολογικά δείγματα περιλαμβάνονται το αίμα (πλάσμα ή ορός), ο σίελος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα εκχυλίσματα κοπράνων, το σπέρμα, το αρθρικό υγρό, το αμνιακό υγρό, τα χολικά υγρά, το μητρικό γάλα και το κυτταρόπλασμα (Patti, 2012).

Επίσης, η μεταβολομική επιτρέπει την παράλληλη μέτρηση των ενδογενών και εξωγενών μεταβολιτών στα δείγματα με αποτέλεσμα το μεταβολικό προφίλ που προκύπτει να μπορεί να προσφέρει μια εικόνα των αλλαγών τους όσον αφορά τις κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορες διαταραχές, όπως σε ασθένειες ή και σε φαρμακευτικές αγωγές. Αυτό καθιστά τους μεταβολίτες

εξαιρετικούς υποψήφιους για βιοδείκτες και ιδιαίτερα χρήσιμους για τον προσδιορισμό βιοχημικών μονοπατιών που οφείλονται σε ασθένειες ή στη θεραπεία τους (Smolinska et al., 2012a).

Συμπερασματικά, η επιστήμη της μεταβολομικής σε αντίθεση με άλλα “omics” (Εικόνα 14) αντιπροσωπεύει καλύτερα τον μοριακό φαινότυπο επειδή οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους, αντικατοπτρίζουν άμεσα την κατάσταση των κυττάρων/ ιστών.



Εικόνα 14: Γενική αναπαράσταση των “omics” επιστημονικών πεδίων.

3.3. Αναλυτικές πλατφόρμες μεταβολομικής

Μια τεχνική που χρησιμοποιείται σε μια μεταβολομική μελέτη θα πρέπει να είναι (α) μη εκλεκτική, (β) ευαίσθητη, (γ) υψηλής διακριτικής ανάλυσης, (δ) επαναλήψιμη, και (ε) ποσοτική. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση μικρού μοριακού βάρους μορίων είναι κυρίως: η φασματομετρία μάζας (MS) η οποία συνήθως απαντάται συζευγμένη είτε με υγρή (LC), ή/και με αέρια (GC) αλλά και με υψηλής πίεσης (UPLC) χρωματογραφία, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση συζευγμένη είτε με φασματομετρία μάζας (CE -MS) ή με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (CE -NMR). Παρότι αναλύσεις με τεχνικές όπως NMR, GC-MS, LC-MS και UPLC-MS προτιμώνται σε μεγάλης κλίμακας μελέτες η μεταβολομική δεν περιορίζεται στη χρήση μόνο αυτών των αναλυτικών τεχνικών (Zhang et al. 2012). Στις εναλλακτικές αναλυτικές μεθόδους

συμπεριλαμβάνονται αν και σε μικρότερο βαθμό η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδυαστικά με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), η φασματομετρία συστοιχίας φωτοδιδίων ή ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) (Villas-Boas, 2013).

Η χρήση μίας αναλυτικής τεχνικής για την ανίχνευση όλων των μεταβολιτών, καθώς αποτελούν πολύπλοκα μόρια με πολλαπλές ιδιότητες είναι αδύνατη. Έτσι, η συνδυασμένη χρήση αναλυτικών μεθόδων έχει οδηγήσει σε ιδανικά αποτελέσματα και είναι πολύ σημαντική για την αύξηση του εύρους των μεταβολιτών .

Τα στάδια μιας ολοκληρωμένης μεταβολομικής ανάλυσης για οποιαδήποτε από τις παραπάνω μεθόδους είναι (Zhang et al. 2012):

- συλλογή και απομόνωση του βιολογικού δείγματος και αναστολή ή τερματισμό της ενζυμικής δράσης
- απομόνωση ελεύθερων μεταβολιτών από το βιολογικό δείγμα
- παραγωγή των απομονωμένων μεταβολιτών στο δείγμα (για GC-MS)
- προετοιμασία δείγματος για ανάλυση (προσθήκη διαλυτών, εσωτερικού προτύπου, ρυθμιστικού διαλύματος, κ.ο.κ ανάλογα με το εργαστηριακό πρότυπο)
- αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των κορυφών που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες από τα φάσματα ή χρωματογραφήματα που προέκυψαν
- κανονικοποίηση φασμάτων ή χρωματογραφημάτων
- τμηματοποίηση φασμάτων και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση στα τελικά δεδομένα
- εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις ομαδοποιήσεις των δειγμάτων και των υπεύθυνων μεταβολιτών για τις διακρίσεις
- εξαγωγή συμπερασμάτων σε επίπεδο μεταβολικών μονοπατιών

Η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή ειδίκευσης είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

- **Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*)**

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1946 από τους Edward Purcell και Felix Bloch. Η εφαρμογή του NMR άρχισε να επεκτείνεται αρκετά κυρίως από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 και από τότε μέχρι σήμερα το NMR έχει αναπτυχθεί ταχύτατα με ποικίλες εφαρμογές κυρίως στην οργανική χημεία και βιοχημεία και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών τόσο φυτικών όσο και ζωικών προϊόντων (Smolinska et al., 2012b; Wishart, 2008).

Η φασματομετρία NMR είναι μη καταστρεπτική μέθοδος, είναι ταχύτατη αφού τα σύγχρονα όργανα επιτυγχάνουν την ανάλυση δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα, είναι ποσοτική και επαναλήψιμη και δεν απαιτεί χρονοβόρα στάδια προεπεξεργασίας δειγμάτων (Εικόνα 15). Επιπλέον, είναι η μόνη αναλυτική τεχνική ανίχνευσης η οποία δεν βασίζεται στον επιμέρους διαχωρισμό των αναλυτών (χρωματογραφία) και έτσι το δείγμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και για επιπλέον αναλύσεις (Zira et al., 2013).

Επιπρόσθετα χαρακτηριστικά της είναι ότι συμβάλλει στην αποτελεσματική ταυτοποίηση μιας ένωσης καθώς δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την δομή της αλλά και για το «χημικό» περιβάλλον των υπό εξέταση πυρήνων. Εξάλλου δεν χρειάζεται προηγούμενη γνώση σχετικά με τις ενώσεις που περιέχουν τα δείγματα οπότε δεν υπάρχει και ανάγκη ρύθμισης κατάλληλων αναλυτικών συνθηκών (Smolinska et al., 2012b). Δεν παύει όμως να είναι μια σχετικά μη ευαίσθητη τεχνική με υψηλό όριο ανίχνευσης (Smolinska et al., 2012b; Wishart, 2008).



Εικόνα 15: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της εφαρμογής NMR

3.4. Δυσβίωση, Μικροβιακοί μεταβολίτες και ΙΦΝΕ

Το έντερο φυσιολογικά βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς ελεγχόμενης φλεγμονής που επιτυγχάνεται με την ισορροπία μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών και εκείνων που αποτελούν τη φυσιολογική εντερική χλωρίδα. Η αλλαγή στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, αποκαλούμενη συχνά ως δυσβίωση ενεργοποιεί δραστικά κύτταρα και καταρράκτες απο διαλύτους μεσολαβητές της φλεγμονής που οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή, ιστική βλάβη και ίνωση σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο, που δεν έχει την ικανότητα να καταστείλει την φλεγμονή όπως παρατηρείται στις ΙΦΝΕ (Tomasello et al., 2014; De Cruz et al., 2012). Στην κλινική αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ υπάρχουν σημαντικές και εγγενείς προκλήσεις για να

διασαφηνιστεί αν η δυσβίωση συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου ή εάν αντίθετα, θα μπορούσε να είναι μια δευτερογενής αλλαγή που σχετίζεται με τη φλεγμονώδη διαδικασία.

Οι μεταβολές στη σύνθεση του μικροβιώματος αντανακλώνονται στις μεταβολικές δραστηριότητες του εντέρου. Με τη διαδικασία της αποικοδόμησης, τα εντερικά βακτήρια παράγουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες του εντέρου. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Short-Chain Fatty Acids, SCFAs) τα οποία λειτουργούν ευεργετικά καθώς αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ενώ ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών δημιουργεί μια ποικιλία μεταβολιτών όπως φαινολικές ενώσεις, λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλύσου, θειούχες ενώσεις, αμίνες και αμμωνία (Windey et al., 2012). Επιπλέον, η ανθρώπινη μικροχλωρίδα χαρακτηρίζεται από σημαντικό βαθμό λειτουργικού πλεονασμού, που σημαίνει ότι διαφορετικά βακτήρια μπορούν να εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες και να μεταβολίζουν το ίδιο υπόστρωμα, δημιουργώντας έτσι παρόμοιους μεταβολίτες (Mahowald et al., 2009). Επομένως, όχι μόνο η σύνθεση αλλά και η λειτουργική ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος είναι εξαιρετικά σημαντική όσον αφορά τα κλινικά σημεία στις ΙΦΝΕ.

Αρκετοί παραγόμενοι βακτηριακοί μεταβολίτες απορροφώνται μέσω του βλεννογόνου του παχέος εντέρου και εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία όπου μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω, στους λεγόμενους συν-μεταβολίτες του. Για παράδειγμα, η π-κρεζόλη, συναντάται συζευγμένη στο ήπαρ ή στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου σε θειική π-κρεζόλη η οποία συμβάλλει στην απέκκριση των ούρων (Evenepoel et al., 2009). Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες επιστρέφουν στο έντερο μέσω χολικής απέκκρισης όπου μεταβολίζονται εκ νέου από το εντερικό μικροβίωμα (Bajor et al., 2010). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μικροβίων-ξενιστών περιπλέκουν την ερμηνεία των προφίλ των μεταβολιτών και αυτός ο συν-μεταβολισμός εξηγεί ότι το αποτέλεσμα των αναλύσεων μεταβολομικής εξαρτάται από τη σωστή επιλογή βιολογικού δείγματος. Ο μικροβιακός μεταβολισμός αντικατοπτρίζεται καλύτερα σε προφίλ μεταβολιτών δείγματος

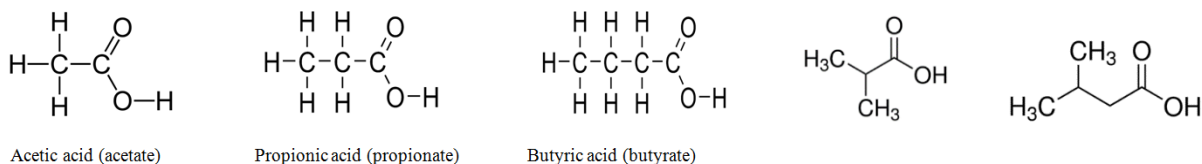
κοπράνων σε σχέση με τα προφίλ σε δείγματα αναπνοής, ούρων και ορού αίματος όπου αντανakλάται περισσότερο ο μεταβολισμός του ξενιστή οργανισμού (De Preter, 2013).

3.5. Μεταβολομική και ΙΦΝΕ

Αρκετές μελέτες έχουν ήδη εφαρμόσει τη μεταβολομική στη διάγνωση και τη θεραπεία στις ΙΦΝΕ. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στην αναγνώριση της νόσου Crohn ή ελκώδους κολίτιδας μέσω του μεταβολικού προφίλ της σε σύγκριση με έναν υγιή πληθυσμό ελέγχου. Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στη διαφοροποίηση των διαφόρων υποτύπων της νόσου ενώ αρκετές προσπάθησαν να εντοπίσουν διαφορές σχετιζόμενες με την ενεργότητα της νόσου ή το σημείο το οποίο προσβάλλει.

3.5.1 Χαρακτηρισμός της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου του εντέρου

Ανάλογα με το βιολογικό υγρό ή τον ιστό που αναλύθηκε και την αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των ασθενών με ΙΦΝΕ. Υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων και χαμηλότερα επίπεδα SCFA βρέθηκαν στα εκχυλίσματα κοπράνων ασθενών με ΙΦΝΕ σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό ελέγχου (Marchesi et al., 2007; Bjerrum et al., 2015). Στη μελέτη των Le Gall et al. (2011), παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή μείωση των επιπέδων SCFA και των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (Branched-Chain Fatty Acids, BCFA). Τα BCFA (ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό και 2-μεθυλοβουτυρικό) παράγονται μέσω οξείδωσης βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, αντίστοιχα (Smith and Macfarlane, 1997).



Σχήμα 1: Δομές κυριότερων SCFA (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό οξύ), BCFA(ισοβουτυρικό)

Σε προηγούμενη μελέτη (De Preter et al., 2015) του μεταβολικού προφίλ των κοπράνων με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS), παρατηρήθηκαν

υψηλότερα επίπεδα ινδόλης στους ασθενείς με ΙΦΝΕ. Σε αντίθεση με άλλες μελέτες που βασίζονται στη φασματοσκοπία NMR σε κόπρανα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα SCFA, αν και βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα εστέρων και λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (MCFAs) (De Preter et al., 2015) . Σε όλες σχεδόν τις προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αμινοξέων ή μεταβολιτών τους. Τα υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων και τα προϊόντα τους μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα της δυσανοχή στο λεπτό έντερο λόγω της φλεγμονής είτε αντίστροφα το αποτέλεσμα της έκκρισης αμινοξέων στο έντερο.

Μια διαφορετική εξήγηση είναι ο αυξημένος καταβολισμός πρωτεϊνών για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών που σχετίζονται με την αποκατάσταση του διαταραγμένου εντερικού βλεννογόνου ως αποτέλεσμα της φλεγμονής.

Πέρα από τη χρήση κοπράνων ως του καταλληλότερου βιολογικού δείγματος, χρησιμοποιούνται και δείγματα ούρων καθώς πολλοί μικροβιακοί μεταβολίτες εκκρίνονται στα ούρα, είτε απευθείας είτε ως αποτέλεσμα ενζυμικής επεξεργασίας. Ωστόσο, η διάκριση μεταξύ ασθενών με ΙΦΝΕ και υγιούς ομάδας ελέγχου δεν είναι ξεκάθαρη στην πλειοψηφία των μελετών όπου γίνεται χρήση ούρων ως υπόστρωμα μελέτης (Williams et al., 2009; Stephens et al., 2013; Schicho et al., 2012; Dawiskiba et al., 2014). Παρόλα αυτά, τα αμινοξέα και οι μεταβολίτες αυτών διακρίνονται ξεκάθαρα. Σε όλες σχεδόν τις μελέτες, βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ιππουρικών σε ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Williams et al., 2010). Ως συνέπεια, οι διαφορές στον συν-μεταβολίτη ιππουρικού οξέος μπορεί να αντανakλούν αλλαγές στον μικροβιακό μεταβολισμό του εντέρου ή/και μεταβολές στις μεταβολικές οδούς του ξενιστή.

Έσε σύγκριση με το προφίλ των ούρων και των κοπράνων, το προφίλ των μεταβολιτών στον ορό ή στο πλάσμα αίματος επηρεάζονται λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lenz et al., 2003), ενώ επικεντρώνονται κυρίως στον μεταβολισμό των λιπιδίων και σε ορισμένα προϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων (Schicho et al., 2012; Dawiskiba et al., 2014; Williams et al., 2012; Zhang et al., 2013; Ooi et al., 2011).

Τέλος, δείγματα από συμπύκνωμα αναπνοής χρησιμοποιήθηκαν σε μια πιλοτική μελέτη αποδεικνύοντας ότι τα παιδιά με ΙΦΝΕ έχουν ένα χαρακτηριστικό μεταβολικό προφίλ αναπνοής που μπορεί να τα διαχωρίσει από τα υγιή παιδιά (Patel et al., 2014).

3.5.2 Διαφοροποίηση υποτύπων ΙΦΝΕ

Ενώ στις περισσότερες μελέτες οι ασθενείς με ΙΦΝΕ μπορούν να διαφοροποιηθούν από την ομάδα ελέγχου, η διαφοροποίηση μεταξύ υποτύπων τις ΙΦΝΕ δεν είναι απλή. Το μεταβολικό προφίλ των κοπράνων (ανεξάρτητα από την εφαρμοζόμενη τεχνική) επέτρεψε τον διαχωρισμό των ασθενών με νόσο Crohn από τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Οι Marchesi et al. (2007) έδειξαν ότι οι σχετικές ποσότητες αμινοξέων και γλυκερόλης αυξήθηκαν ενώ τα επίπεδα βουτυρικού και οξικού οξέος μειώθηκαν στα δείγματα κοπράνων των ασθενών με νόσο Crohn, γεγονός που συνέβαλε στη διαφοροποίησή τους από τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Σε μελέτη των Bjerrum et al. (2015), διαπιστώθηκε επίσης διαφοροποίηση μεταξύ των ασθενών με νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα βάση του μεταβολικού προφίλ των κοπράνων, ωστόσο, μετά την απομάκρυνση των ασθενών που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση και θεραπεία με αντι-TNF-α παράγοντες, η διάκριση εξαλείφθηκε υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα αξιολόγησης των αποτελεσμάτων για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες.

Μόνο σε 2 μελέτες μεταβολομικής η χρήση της τεχνικής GC-MS ήταν σε θέση να διαχωρίσει δείγματα κοπράνων, ασθενών με νόσο Crohn έναντι δειγμάτων από ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Οι De Preter et al. (2015) ανίχνευσαν διαφορετικά επίπεδα μεταβολιτών, πιο συγκεκριμένα παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα λιπαρών οξέων μεσαίας αλύσου (π.χ πεντανοϊκό, εξανοϊκό, επτανοϊκό και οκτανοϊκό) σε ασθενείς με νόσο Crohn σε σύγκριση με ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, ενώ οι Walton et al. (2013) διαπίστωσαν αυξημένη ποσότητα ινδόλης, εστερικών και αλκοολικών παραγώγων των SCFA στους ασθενείς με την νόσο Crohn σε σύγκριση με αυτούς με ελκώδη κολίτιδα. Ο προσδιορισμός μεταβολιτών σε δείγματα ούρων επέτρεψε τη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο υποτύπων σε μία μόνο μελέτη από τις τέσσερις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία (Williams et al., 2009; Stephens et al., 2013; Schicho et al., 2012; Dawiskiba et al., 2014). Βέβαια στη μελέτη του Stephens et al. (2013) η διαφοροποίηση υφίστατο όταν

συνυπολόγισαν στην ομάδα των ασθενών με ΙΦΝΕ εκείνους με εντερική εκτομή. Τέλος, το μεταβολικό προφίλ ορού αίματος, κατέληξε στην διάκριση μεταξύ της νόσου Crohn και της ελκώδους κολίτιδας σε μόνο δύο μελέτες. Στη μελέτη του Williams et al. (2009), οι υπότυποι διέφεραν από άποψη μεταβολιτών που σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπιδίων και της χολίνης, ενώ οι Ooi et al. (2011) διέκριναν τη νόσο Crohn από την ελκώδη κολίτιδα σύμφωνα με τα αμινοξέα και ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος.

3.5.3 Μεταβολίτες σχετιζόμενοι με τον βαθμό ενεργότητας της νόσου

Αρκετές μελέτες έχουν εφαρμόσει μια μεταβολομική προσέγγιση για να ερευνήσουν τη συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της νόσου και των επιπέδων ενός μεταβολίτη. Οι De Preter et al. (2015) συνέκριναν το μεταβολικό προφίλ κοπράνων σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια έξαρση της νόσου Crohn έναντι ασθενών σε ύφεση. Φάνηκαν διαφορές στο προφίλ μεταξύ ασθενών σε ύφεση και μέτριας έξαρσης της νόσου σε 12 μεταβολίτες (εξανοϊκό, *p*-κρεσόλη, επτανοϊκό, 1-βουτανόλη, βουτανοϊκό οξύ, φουράνιο, 3-μεθυλο-1-ινδόλιο, πεντανοϊκό, ακετοφαινόνη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, ακετόνη, προπάνιο). Μετά από διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες, τα επίπεδα εξανοϊκού οξέος παρέμειναν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα και συσχετίστηκαν αντιστρόφως με το δείκτη Harvey-Bradshaw Index (De Preter et al., 2015). Σχετικά με την ελκώδη κολίτιδα, η δραστηριότητα της νόσου βασίστηκε στον δείκτη δραστηριότητας της νόσου (UCDAI) και μελετήθηκαν ασθενείς σε ύφεση ή με ήπια έξαρση και ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή έξαρση. Τα επίπεδα 10 μεταβολιτών (στυρένιο ή στυρόλιο, ακετονιτρίλιο, 1,2,3-τριμεθυλοβενζόλιο, 2,4-διθειοπεντάνιο, 2-μεθυλοπεντανάλη ή εξανάλη, βενζόλιο, εθυλοβενζόλιο, ακετοφαινόνη, 2-μεθυλ-1,3-βουταδιένιο, 1-μεθυλ-2-(1-μεθυλαιθυλ)-βενζόλιο) αυξήθηκαν στη μέτρια έως σοβαρή νόσο, ενώ τα επίπεδα 3 μεταβολιτών (κυκλοπεντάνιο, 1-μεθοξυ-4-τολουόλιο, πεντανάλη) ήταν χαμηλότερα σε αυτή την ομάδα ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς σε ύφεση. Αντίστοιχα μετά από διόρθωση, τα επίπεδα στυρενίου παρέμειναν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στη μέτρια έως σοβαρή νόσο και συσχετίστηκαν θετικά με τη UCDAI. Στη μελέτη των Dawiskiba et al. (2014), κατέληξαν σε έναν καλό διαχωρισμό μεταξύ των ασθενών με ΙΦΝΕ σε έξαρση και των ασθενών με ΙΦΝΕ σε ύφεση. Οι μεταβολίτες που οδήγησαν στη διάκριση των ομάδων ήταν οι N-

ακετυλιωμένες ενώσεις, η φαινυλαλανίνη (αυξημένη στον ορό), λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) (μειωμένες στον ορό), γλυκίνη (αυξημένη στα ούρα) καθώς και ακετοξικό οξύ .

Άλλες μελέτες απέτυχαν να διακρίνουν διαφορές στις ΙΦΝΕ μεταξύ έξαρσης και ύφεσης (Bjerrum et al., 2010; Patel et al., 2014). Αυτή η απόκλιση υπογραμμίζει το γεγονός ότι οι ΙΦΝΕ είναι μια ετερογενής ομάδα νόσων με μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων και ενεργότητας.

Λίγες μελέτες προσπάθησαν να παράγουν μοντέλα για τη διαφοροποίηση των ασθενών με ΙΒΔ βάσει του σημείου στο οποίο εντοπίζεται η φλεγμονή. Οι Preter et al. (2015) προσπάθησαν να διακρίνουν τα προφίλ ανάλογα με τη θέση της νόσου στις ΙΦΝΕ, αλλά μετά από διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε μεμονωμένους μεταβολίτες. Επίσης, στη μελέτη των Stephens et al. (2013), η διαστρωμάτωση σε σχέση με το σημείο της νόσου δεν παρήγαγε μοντέλα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση της νόσου Crohn από τη ελκώδη κολίτιδα. Ωστόσο, οι Williams et al. (2010) έδειξαν ότι οι ασθενείς με νόσο Crohn όπου έχουν υποστεί αφαίρεση του παχέος εντέρου είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ιππουρικού σε σύγκριση με ασθενείς νοσούντες από ελκώδη κολίτιδα. Συγκεντρωτικά, οι μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν τις ΙΦΝΕ με χρήση μεταβολομικής σε ανθρώπινα δείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

3.6. Μεταβολομική και βιοδείκτες

Η μεταβολομική μπορεί να παράσχει νέες οπτικές για την παθογένεια μίας νόσου και στοχεύει στην ανακάλυψη βιοδεικτών. Ωστόσο θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά κάποιες σημαντικές παράμετροι. Το γεγονός ότι διαφορετικά βιολογικά δείγματα , τα οποία αποκτούνται μη επεμβατικά από τους ασθενείς, μπορούν να εφαρμοσθούν σε πλήθος διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα. Όμως τα ληφθέντα μεταβολικά δεδομένα αντιπροσωπεύουν μια μεταβολική υπογραφή ενός συγκεκριμένου δείγματος με μια συγκεκριμένη βιομάζα που λαμβάνεται σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο (Hicks et al., 2015). Είναι βέβαιο ότι το προφίλ του μεταβολίτη, που σχετίζεται με τη νόσο ή όχι, μεταβάλλεται με την

πάροδο του χρόνου καθώς διάφοροι παράγοντες έχουν αποδειχθεί ότι το επηρεάζουν. Έτσι το μεταβολικό προφίλ πριν ή μετά τη διάγνωση μπορεί να αποκαλύψει μια διαφορετική υπογραφή σε σύγκριση με αυτή που αποκτήθηκε ύστερα από θεραπεία ή παρέμβαση. Οι συγχυτικοί παράγοντες είναι αρκετοί επομένως για την εφαρμογή της μεταβολομικής ως κλινικού διαγνωστικού εργαλείου, απαιτείται διερεύνηση και λεπτομερής στατιστική ανάλυση για να διασφαλιστεί η σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Hicks et al., 2015).

Πίνακας 3: Μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν τις ΙΦΝΕ με χρήση μεταβολομικής σε ανθρώπινα δείγματα.						
Μεταβολίτης	Μεταβολή	Νόσος	Υπόστρωμα	Πλατφόρμα	Σχέση	Αναφορά
Ιππουρικό οξύ, θεική ρ-κρεσόλη	↓	CD	Ούρα	¹ H NMR	Προϊόντα μεταβολισμού AM. Μεταβολή στους CD	Williams et al., 2009
Φορμικό οξύ	↑					
Βουτυρικό οξύ, Οξικό οξύ, μεθυλαμίνη, τριμεθυλαμίνη (SCFAs)	↓	CD>UC	Εκχύλισμα κοπράνων	¹ H NMR	Τα SCFAs παράγονται από το Clostridium coccoides και Clostridium leptum, τα οποία είναι ελαττωμένα στους ασθενείς με ΙΦΝΕ	Marchesi et al., 2007
Ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, χολίνη, γλυκερολφωσφορυλοχολίνη Μυοινοσιτόλη, γαλακτικό	↓	CD & UC	Βλενογόνο ς παχέος εντέρου	¹ H NMR	Μειωμένος μεταβολισμός υδατανθράκων και πρωτεϊνών προκαλεί απώλεια βλενογόννου. Αδυναμία χρήσης της γλυκόζης από το βλενογόνο του παχέος εντέρου στους ασθενείς με ΙΦΝΕ	Balasubramanian et al., 2009

οξύ, ηλεκτρικό (σουκινικό) οξύ						
Γλυκόζη	↑					
Ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη	↑	UC	Βιοψίες παχέος εντέρου	¹ H NMR	Ανισορροπία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στο χόριο (βασική μεμβράνη) και των κυττάρων του παχέος εντέρου	Bjerrum et al., 2015
Γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, ταυρίνη, ασπαραγινικό οξύ	↑		Βιοψίες παχέος εντέρου, περιφερικά λεμφοκύτταρα			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μαστίχα Χίου

4.1. Χαρακτηριστικά της μαστίχας Χίου

Η μαστίχα είναι ένα μοναδικό προϊόν της «Χίας γης» σε παγκόσμια κλίμακα και συγκεκριμένα του νότιου τμήματος της. Αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του μαστιχόδεντρου (ή σχίνου), του επιστημονικά ονομαζόμενου φυτού *Pistacia lentiscus* var. *Chia*, της οικογένειας *Anacardiaceae*. Ο συνδυασμός της ποικιλίας του δέντρου, του εδάφους, του μικροκλίματος και του ανάγλυφου της περιοχής, αποτελούν το «μυστικό» για την αποκλειστικότητα της Χίου. Η μαστίχα εκκρίνεται από επιφανειακές τομές που πραγματοποιούνται στον κορμό και στα κλαδιά του μαστιχόδεντρου και στάζει υπό την μορφή «δακρύων», τα οποία αφού στεγνώσουν και στερεοποιηθούν, δίνουν αυτό το μοναδικό αποτέλεσμα (Σαββίδης, 2000).

Σε αυτή την ρητίνη απαντάται μια εξαιρετική ποικιλία από θεραπευτικά και αρωματικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, περιέχονται πτητικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το αιθέριο έλαιο (το μαστιχέλαιο), τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια και ένας μεγάλος αριθμός από άλλα δραστικά συστατικά (Andrikopoulos et al., 2003) Αυτός ο μοναδικός συνδυασμός 80 και πλέον συστατικών δικαιολογεί τις πολλαπλές χρήσεις της μαστίχας Χίου, τόσο στον τομέα των τροφίμων, όσο και στον τομέα της υγείας και της προσωπικής περιποίησης, σε παγκόσμια κλίμακα.

Σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς δραστηριοτήτων του σύγχρονου κόσμου. Στη φαρμακευτική βρίσκει εφαρμογή ως πρόσθετο σε αλοιφές για εγκαύματα, κρυοπαγήματα και δερματικές παθήσεις. Στη χειρουργική χρησιμοποιείται για την κατασκευή χειρουργικών ραμμάτων τα οποία απορροφώνται από τον οργανισμό. Στην οδοντιατρική και ορθοδοντική εμφανίζεται ως συστατικό για το σφράγισμα των δοντιών, ενώ η ευγενόλη που βρίσκεται στο μαστιχέλαιο χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό. Ένας ακόμη κλάδος όπου βρίσκεται πολλές εφαρμογές η μαστίχα και το μαστιχέλαιο είναι ο κλάδος των καλλυντικών. Αποτελεί συστατικό αρκετών αρωμάτων, ενώ χρησιμοποιείται και ως σταθεροποιητής αυτών. Το μαστιχέλαιο, λόγω του ουρσολικού οξέος και του ισομερούς του, ολεανολικού οξέος, χρησιμοποιείται στην παρασκευή πολλών καλλυντικών που προορίζονται για την ενίσχυση της τριχοφυΐας και την προστασία από ερεθισμούς του τριχωτού της κεφαλής, όπως και για την αύξηση της ελαστικότητας του δέρματος. Επιπλέον η μαστίχα και το μαστιχέλαιο βρίσκουν

εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, αφού αποτελούν πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται ευρέως στη μαγειρική, τη ζαχαροπλαστική, την αρτοποιία και την ποτοποιία.

Τέλος η μαστίχα της Χίου από το 1997 αποτελεί προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) βάσει του κανονισμού της Ευρωπαϊκής Ένωσης (www.mastic.gr)

4.2. Ταυτοποίηση των χημικών συστατικών της μαστίχας Χίου

Αν και η χημική σύσταση της μαστίχας Χίου είναι σε γενικές γραμμές γνωστή από μελέτες προηγούμενων ετών (Xynos et al., 2018; Koutsoudaki et al., 2005; Kaliora et al., 2004; Magiatis et al., 1999), εντούτοις είναι ενδεικτικό του γενικότερου ενδιαφέροντος που υπάρχει για το μοναδικό αυτό προϊόν όταν ακόμα και πρόσφατα, το 2013, ανακοινώνεται η ταυτοποίηση καινούργιου συστατικού, του μαστιχινοϊκού οξέος Α, από ερευνητές στην Ιαπωνία (Gao et al., 2013).

Το 25% περίπου της ολικής μαστίχας αποτελείται από αδιάλυτο στο νερό κολλώδες πολυμερές το οποίο σχηματίζεται από πολύ-β-μυρκένιο και το οποίο μειώνει σε σημαντικό βαθμό τη βιοδιαθεσιμότητα των πιο δραστικών συστατικών (Van den Berg et al., 1998). Το υπόλοιπο της μαστίχας, χωρίς το πολυμερές, μπορεί να διαχωριστεί στα δύο βασικά κλάσματα: το όξινο και το ουδέτερο και το αιθέριο έλαιο. Το όξινο κλάσμα περιέχει τα βασικά τριτερπενικά οξέα, δηλαδή ολεανονικό οξύ, μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ κ.α. Το ουδέτερο κλάσμα περιέχει τα ουδέτερα τριτερπενικά παράγωγα όπως η βουτυσπερμόλη, η τιρουκαλόλη, η καρυοφυλένη, η ολεανονική αλδεΐδη κ.α. Η ανάλυση της καταδεικνύει κυρίως τερπένια όμως σημαντική είναι και η ανίχνευση πολυφαινολών όπως της τυροσόλης, π-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος, π-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος, βανιλλικού οξέος, γαλλικού οξέος και trans-κινναμικού οξέος (Kaliora et al., 2004). Τέλος τα σημαντικότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου βρέθηκαν να είναι τα: α-πινένιο, β- μυρκένιο, β-πινένιο, λιμονένιο και β-καριοφυλένιο (Koutsoudaki et al., 2005) (Πίνακες 5,6,7).

Πίνακας 4: Αναλογία μαστιχέλαιου, πολυμερούς και επιμέρους κλασμάτων στη μαστίχα Χίου

Περιεκτικότητα συστατικών φυσικής μαστίχας Χίου	
Αιθέριο έλαιο	3%
Πολυμερές	25%
Ολικό εκχύλισμα	72%
Όξινο κλάσμα	39%
Ουδέτερο κλάσμα	28%
Άλλες ουσίες	5%

Πίνακας 5: Αναλογία κύριων συστατικών στο όξινο κλάσμα

	% όξινου κλάσματος	% ολικής μαστίχας
Μαστιχαδιενονικό οξύ	30	11,7
Ισομαστιχαδιενονικό οξύ	30	11,7
Ολεανονικό οξύ	15	5,85
Μορονικό οξύ	10	3,9
Μαστιχαδιενολικό οξύ	3	1,17
Ισομαστιχαδιενολικό οξύ	3	1,17
Ολεανολικό οξύ	2	0,78

Πίνακας 6: Αναλογία κύριων συστατικών στο ουδέτερο κλάσμα.

	% ουδέτερου κλάσματος	% ολικής μαστίχας
Λουπενόνη	0,7	0,1
Τιρουκαλόλη	0,5	0,06
28-νορολεαν-17-εν-3-ονη	53,4	6,
Ολεανονική αλδεΰδη	15,2	2,0
28-νορολεαν-12-εν-3-ονη	3,1	0,4
β-αμυρόνη	3,6	0,5
Δαμμαραδιενόνη	2,	0,3
Ισομαστιχαδιενονάλη	1,1	0,1

4.3. Ευεργετικές δράσεις της μαστίχας Χίου

4.3.1 Αντιμικροβιακή δράση

Πλήθος επιστημονικών μελετών υποστηρίζει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες της μαστίχας Χίου και του αιθέριου ελαίου της τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα. Οι πρώτες από αυτές αφορούσαν στην αντιβακτηριακή δράση του μαστιχέλαιου κατά του *Helicobacter pylori*, του βακτηρίου το οποίο συνδέεται με τη γαστρίτιδα, το πεπτικό έλκος και το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (Huwez et al., 1998; Marone et al., 2001). Σε μελέτη αναφέρεται ότι το εκχύλισμα της μαστίχας, μετά από απομάκρυνση του πολυ-β-μυρκένιου, είναι ικανό να μειώσει τα επίπεδα αποίκησης του βακτηρίου *H. pylori* κατά 30 φορές σε πειραματόζωα, μετά την χορήγηση της για διάστημα 3 μηνών (Paraschos et al., 2007). Η συγκεκριμένη δράση αποδόθηκε στην παρουσία τριτερπενικών οξέων της όξινης φάσης του εκχυλίσματος. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως οι αραβινογαλακτάνες που περιέχονται στη μαστίχα παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων από το *Helicobacter pylori* τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Kottakis et al., 2009).

Ακόμα, η αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας αφορά και άλλα βακτήρια, εκτός από το *H. Pylori*. Επόμενη μελέτη εξέτασε την δράση 3 διαφορετικών ελαίων και της μαστίχας έναντι στελεχών βακτηρίων και μυκήτων. Η αποτελεσματικότητα της μαστίχας έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*, με κύριο δραστικό συστατικό το trans-καρυοφυλλένιο που περιέχεται στο αιθέριο έλαιο αυτής ήταν σημαντική (Magiatis et al., 1999). Επιπλέον μελέτες επιβεβαιώνουν την αντιμικροβιακή της δράση έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fragi* και *Salmonella enteritidis*, με πιθανό δοσοεξαρτώμενο μηχανισμό (Nycha, 1995). Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ο προστατευτικός ρόλος της μαστίχας στη στοματική κοιλότητα καθώς αναφέρεται η αποτελεσματικότητά της έναντι του στελέχους *Porphyromonas gingivalis* που ενοχοποιείται για τη δυσάρεστη αναπνοή (Sterer, 2006). Τα παραπάνω δεδομένα εμπλουτίστηκαν με μελέτες που εμφανίζουν τη μαστίχα να μειώνει τα επίπεδα των βακτηρίων που ευθύνονται για τη δημιουργία πέτρας μόλις από τα πρώτα 15 min μάζησης (Aksoy et al., 2007). Τέλος σε μία σειρά θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μελετήθηκαν 12 από τα συστατικά του μαστιχέλαιου καθώς και το ίδιο το μαστιχέλαιο ως προς την ικανότητα δημιουργίας ζωνών αναστολής της ανάπτυξης. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν πως η αντιμικροβιακή δράση του μαστιχέλαιου είναι ισχυρότερη από τα επιμέρους συστατικά, καταμαρτυρώντας έτσι τη συνεργιστική τους δράση (Koutsoudaki et al., 2005). Συγκεντρωτικά οι δράσεις της μαστίχας Χίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

4.3.2 Αντιοξειδωτική – Καρδιοπροστατευτική δράση

Επιπρόσθετα η μαστίχα Χίου εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντιαθηρωματικές ιδιότητες. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε αναφορικά με τη δράση διαφόρων εκχυλισμάτων της μαστίχας στην προστασία έναντι της οξείδωσης της LDL σε ανθρώπινα κύτταρα, το μεθανολικό/υδατικό κλάσμα ήταν πιο αποτελεσματικό, αλλά και πιο δραστικό από τα επιμέρους συστατικά που μελετήθηκαν, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος (Andrikopoulos et al., 2003). Μάλιστα, η ικανότητα αυτή είναι δοσοεξαρτώμενη και μπορεί να φτάσει σε ποσοστό το 99,9% με χορήγηση εκχυλίσματος μαστίχας 50mg. Η συγκεκριμένη ιδιότητα

αποδίδεται στο κλάσμα των τερπενίων και λιγότερο σε εκείνο των πολυφαινολών. Ο μηχανισμός δράσης εντοπίζεται στη επαγωγή της σύνθεσης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης (GSH) και στην αναστολή έκφρασης του υποδοχέα CD36 της οξειδωμένης LDL στα μακροφάγα (Dedoussis et al., 2004).

Η καρδιοπροστατευτική δράση της μαστίχας έχει αποδειχθεί σε *in vivo* μελέτες σε ζωικά πρότυπα. Σε έρευνα έγινε σύγκριση της επίδρασης του ολικού εκχυλίσματος μαστίχας και του ουδέτερου κλάσματος της σε φυσιολογικά και υπερλιπιδαιμικά ποντίκια, τα οποία υπέστησαν καρδιακή ισχαιμία. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των συμπτωμάτων εμφράγματος στα φυσιολογικά μοντέλα και προστατευτική δράση και των δύο ειδών εκχυλισμάτων μαστίχας. Όσον αφορά τα υπερλιπιδαιμικά ζωικά μοντέλα, καμία από τις δύο θεραπείες δεν ήταν αποτελεσματική στη μείωση των ισχαιμικών επεισοδίων, αλλά και οι δύο παρουσίασαν αντιαθηρωματική και υπολιπιδαιμική δραστηριότητα (Andreadou et al., 2016).

4.3.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση του μαστιχέλαιου επιβεβαιώθηκε ύστερα από χορήγηση μαστιχέλαιου με μορφή κάψουλας σε ασθενείς με ενεργό νόσο Crohn για διάστημα ενός μήνα. Από την έρευνα προέκυψε ότι μειώνονται τα επίπεδα του παράγοντα Νέκρωσης Όγκου-α (TNF-alpha) και του παράγοντα παρεμπόδισης της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF) (Kaliora et al. 2007A). Επιπλέον, η μαστίχα μειώνει την ενεργότητα και τα επίπεδα της Ιντερλευκίνης- 6 (IL-6) και της C-Αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) στο πλάσμα των ασθενών (Kaliora et al., 2007B). Από μελέτη της δράσης της μαστίχας σε ενδοθηλιακά κύτταρα αποδείχθηκε μείωση της φλεγμονώδους απόκρισής τους μέσω παρεμπόδισης της ενεργοποίησης του γενικού μεταγραφικού παράγοντα Nuclear Factor-κΒ (NF-κΒ) (Loizou et al., 2009) ο οποίος ενεργοποιημένος προκαλεί υπερέκφραση γονιδίων. Ανάμεσα στα γονίδια τα οποία ελέγχονται από τον παράγοντα είναι γονίδια που σχετίζονται με την λειτουργία της απόπτωσης, του κυτταρικού κύκλου, της προσκόλλησης, της αγγειογένεσης και της μετανάστευσης (Vasudevan et al., 2004; Kim and Lee, 2004).

4.3.4 Χημειοπροστατευτική δράση

Από τις πιο σημαντικές δράσεις του μαστιχέλαιου, που τα τελευταία χρόνια προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον μελέτης, είναι η χημειοπροστατευτική. Σε μελέτη της δράσης εκχυλίσματος μαστίχας σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα εντέρου (κόλον) HCT116, βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επάγει την απόπτωση μέσα από μονοπάτια κασπασών (Balan et al., 2007). Σε άλλη έρευνα η δράση του εκχυλίσματος προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του mRNA της μασπίνης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η μασπίνη αποτελεί έναν αναστολέα των σερίνο-πρωτεασών που μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου *in vivo* (He et al., 2007). Το λεμονένιο, το οποίο αποτελεί συστατικό του μαστιχέλαιου σε ποσοστό 1% περίπου, έχει χημειοπροστατευτική δράση έναντι πολλών ειδών καρκίνου. Αναστέλλει την ανάπτυξη νεοπλασμάτων σε επιμύες (Hursting et al., 1995), σε χημειοεπαγόμενους όγκους (Wattenberg, 1989), αλλά και σε καρκίνους του δέρματος (Elegbede et al., 1986), ήπατος (Dietrich, 1991) και του στομάχου (Uedo et al., 1999; Yano et al., 1999). Σε μελέτη σταδίου I σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου, βρέθηκε ότι το λεμονένιο παρεμπόδιζε την εξέλιξη της ασθένειας σε αρκετούς ασθενείς για χρονικό διάστημα από έξι μήνες έως ένα έτος (Vigushin et al., 1998). Επίσης, σε επιδημιολογική μελέτη αναφέρθηκε ότι τα άτομα που παρουσίαζαν επιθηλιακά καρκινώματα διατηρούσαν δίαιτα φτωχή σε εσπεριδοειδή (που αποτελούν την κύρια πηγή D-λεμονενίου) σε σχέση με υγιή άτομα και μάλιστα κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Hakim et al., 2000).

4.3.5 Άλλες δράσεις

Η μαστίχα Χίου παρουσιάζει επίσης ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος της μαστίχας έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT), της αμινοτρανσφεράσης της ασπαρτάμης (AST) και μειώνει τα επίπεδα της χολερυθρίνης στον ορό επιμύων στους οποίους προκλήθηκε ηπατοτοξικότητα με τη χορήγηση τετραχλωράνθρακα (Janakat et al., 2002). Η μαστίχα σε μορφή σκόνης είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων των ALT, ALP και της

γ-γλουταμυλτρανσφερασης (γ-GT) του πλάσματος σε ασθενείς υπογραμμίζοντας την ευεργετική της δράση στο ήπαρ (Triantafyllou et al., 2007).

Πίνακας 7: Βιολογικές δράσεις της μαστίχας Χίου και πιθανοί μηχανισμοί.

Βιολογικές δράσεις	Μορφή	Μηχανισμός	Βιβλιογραφία
1.Αντιοξειδωτική/αντιαθηρογόνος	Μεθανολικό εκχύλισμα μαστίχας	Οξείδωση LDL	Andrikopoulos et al, 2003
	Τριτερπενοειδικό κλάσμα	GSH↑ CD36↓	Dedoussis et al, 2004
	Μαστιχέλαιο (καμφένιο)	LPL ενεργοποίηση?	Vallianou et al, 2011
	Ολική μαστίχα	-	Triantafyllou et al, 2007
	Ολική μαστίχα	-	Georgiadis et al, 2014
2.Αντι-διαβητική	Ολεανονικό οξύ και άλλες ενώσεις	PPAR-γ ενεργοποίηση	Petersen et al, 2011
	Ολική μαστίχα	-	Triantafyllou et al,

			2007
	Ολική μαστίχα	-	Georgiadis et al, 2014
3.Αντι-φλεγμονώδης	Ολική μαστίχα	NO↓, PGE2↓	Zhou et al, 2009
	Ολική μαστίχα	PKC εξαρτώμενες NADPH οξειδάσες ↓	Triantafyllou et al, 2011
	Εκχύλισμα μαστίχας και τιρουκαλόλη	VCAM↓, ICAM↓ NFkB- P65φωσφορυλίωση ↓	Loizou et al, 2009
	Ολική μαστίχα	CD activity index↓ IL-6 ↓, CRP↓ TNF-α↓, MIF ↓	Kalliora et al, 2007A, Kalliora et al, 2007B
	Ολική μαστίχα	IL-6↓ TNF-α↓ ICAM-1↓ NF-kB p65↓	Papalois et al, 2012 Gioxari et al, 2011
4.Χημειοπροστατευτική	Μαστιχέλαιο	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓ Απόπτωση	Moulos et al, 2009

	Μαστιχέλαιο	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓ Απόπτωση NF-κΒ↓ VEGF↓ Απελευθέρωση χημοκινών↓	Margouta et al, 2009
	Μαστιχέλαιο	MMP2↓, Ακτίνη↓ VCAM↓, ICAM↓	Loutrari et al, 2011
	Εξανικό εκχύλισμα μαστίχας	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ↓ Απόπτωση	Balan et al, 2005 Dimas et al, 2009
	Αιθανολικό εκχύλισμα μαστίχας	Caspases -3,-8,-9↓	Balan et al, 2007

4.4. Μαστίχα Χίου και φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Όπως προαναφέρθηκε πλήθος μελετών υποστηρίζουν την αντι-φλεγμονώδη δράση της μαστίχας Χίου. Συγκεκριμένα, η μαστίχα δεν επιτρέπει στα ενεργοποιημένα μακροφάγα την παραγωγή προ-φλεγμονωδών ουσιών όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και τη προσταγλανδίνη E2 (PGE2) κυρίως μέσω της αναστολής έκφρασης των πρωτεϊνών τους (Zhou et al., 2009).

Τόσο το εκχύλισμα ολικής μαστίχας όσο και η τιρουκαλλόλη αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό της έκφραση των μορίων προσκόλλησης VCAM-1 και ICAM-1 από ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί διέγερση από τον παράγοντα TNF-α και αποτρέπουν την διείσδυση λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη δέσμευση μακροφάγων και μειώνουν τη φωσφορυλίωση του NF-kB (Loizou et al., 2009).

Μια άλλη πλευρά της αφορά στην ευεργετική της επίδραση στην κλινική εικόνα και στα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής στο πλάσμα ασθενών με ενεργό νόσο Crohn.

Η χορήγηση μαστίχας (6 κάψουλες/ημέρα, 0,37g/κάψουλα) για 4 εβδομάδες σε ασθενείς με ενεργό νόσο Crohn, ήπιας και μέτριας βαρύτητας, οδήγησε σε σημαντική μείωση του δείκτη δραστηριότητας της νόσου (CDAI), των επιπέδων πλάσματος της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και των επιπέδων της CRP, ενώ υπήρξε οριακή βελτίωση του δείκτη διατροφικού κινδύνου (NRI,) και σημαντική αύξηση του ολικού αντι-οξειδωτικού δυναμικού του πλάσματος (TAP). Η βελτίωση του CDAI αποδόθηκε εν μέρει στην μείωση των επιπέδων της IL-6, η οποία είναι μια από τις κύριες κυτταροκίνες που επάγουν την ηπατική παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης και η οποία συνδέεται με την μείωση των επιπέδων της CRP (Kaliora et al., 2007A).

Σε άλλη μελέτη της ίδιας ομάδας μετά από χορήγηση μαστίχας σε ασθενείς με ενεργό νόσο Crohn παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και αύξηση των επιπέδων του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF) (Kaliora et al., 2007B).

Ανάλογα ευρήματα έχουν καταγραφεί και σε μελέτες που έγιναν σε μοντέλα χημικής κολίτιδας όπου η χορήγηση μαστίχας είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση δεικτών φλεγμονής με τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Ο μηχανισμός δράσης αφορά στην αναστολή του μονοπατιού που πυροδοτεί ο NF-kB. Πιο συγκεκριμένα η μαστίχα παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-KB με αποτέλεσμα την μείωση έκκρισης κυτταροκινών (IL-6, IL-8) οι οποίες οδηγούν σε μείωση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης όπως του ICAM-1 μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την συσσώρευση νέων φλεγμονωδών κυττάρων (Papalois et al., 2012; Gioxari et al., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία εστιάζει στη μελέτη της επίδρασης της μαστίχας Χίου σε ασθενείς με Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) με εφαρμογή μεταβολομικής σε δείγματα κοπράνων. Η εργασία αφορά τμήμα κλινικής μελέτης παρέμβασης που εξετάζει τα αποτελέσματα και τους μηχανισμούς της επίδρασης της μαστίχας Χίου σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn. Η παρέμβαση αυτή είχε σχεδιαστεί με βάση τα ευρήματα πιλοτικής μελέτης για την ευεργετική επίδραση στην κλινική εικόνα και στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής στο πλάσμα ασθενών με ενεργή νόσο Crohn. Εξ' άλλου πλήθος μελετών έχει εστιάσει στην αντι-φλεγμονώδη δράση της μαστίχας Χίου.

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, μεταβολομικές προσεγγίσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με ΙΦΝΕ κυρίως σε υποστρώματα αίματος και ούρων και λιγότερο σε βιολογικά δείγματα κοπράνων. Οι περισσότερες από αυτές εστιάζουν στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την νόσο ενώ καμία παρόμοια προσέγγιση δεν αφορά τη μελέτη διατροφικής παρέμβασης με φυσικό συμπλήρωμα διατροφής.

Το κύριο ερευνητικό ερώτημα που επιχειρεί να απαντήσει η παρούσα εργασία είναι το ακόλουθο:

- Επηρεάζει η παρέμβαση με μαστίχα Χίου το μεταβολικό προφίλ στα κόπρανα ασθενών με ΙΦΝΕ;

Δηλαδή, είναι ικανό το μεταβολικό αποτύπωμα όπως αυτό προκύπτει στα κόπρανα των ασθενών να τους διαφοροποιήσει ανάλογα με το αν έχουν λάβει παρέμβαση με μαστίχα Χίου; Από το ερώτημα αυτό ανακύπτουν και επιμέρους ερευνητικά ερωτήματα. Συγκεκριμένα:

- Είναι η επίδραση αυτή στο μεταβολικό προφίλ διαφορετική από αυτή των ασθενών που έλαβαν εικονικό σκεύασμα;
- Η επίδραση αυτή σχετίζεται με το χρόνο της παρέμβασης (3 και 6 μήνες), στους ασθενείς σε έξαρση και ύφεση αντίστοιχα και αν ναι με ποιόν τρόπο;
- Επηρεάζεται το μεταβολικό προφίλ σε σχέση με το εάν οι ασθενείς με ΙΦΝΕ βρίσκονταν σε ύφεση ή έξαρση;

- Ποιοι είναι οι κύριοι μεταβολίτες που ευθύνονται για τη διάκριση των ασθενών πριν και μετά την παρέμβαση και σε ποια κύρια μεταβολικά μονοπάτια εμπλέκονται;

Απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά θα αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω και σε βάθος μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών μέσα από τους οποίους οι βιοδραστικές ενώσεις της μαστίχας Χίου μπορούν να επιδράσουν σε φλεγμονώδη παθολογική κατάσταση. Παράλληλα, τα δεδομένα της μελέτης αυτής μπορούν να συζευχθούν με τα αποτελέσματα άλλων στοχευμένων ή ολιστικών αναλύσεων (π.χ. πρωτεομική, γονιδιωματική) συμπληρώνοντας τη γνώση από τη γενετική προδιάθεση στο φαινότυπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1. Υλικά και αντιδραστήρια

6.1.1 Υλικά

- D₂O
- H₃PO₄, Na₂HPO₄
- Eppendorf

6.1.2 Ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αναλυτικός ζυγός METTLER AT261 DeltaRange Electronic Analytical SemiMicro Balance, LabX, Canada
- Πιπέτα Labopette 100-1000μl, Hirschmann Laborgerate GmbH & Co., Germany
- Σωληνίσκοι NMR υψηλής ακρίβειας (high precision), 5mm , NORELL, USA.
- Φασματογράφος NMR VARIAN 600MHz, με αισθητήρα (probe) 1H {15N - 31P} 5 mm PFG AUTOX ID, VARIAN Inc., USA
- Φυγόκεντρος Centrifuge CL30, Thermo Scientific , UK
- Φασματογράφος NMR Varian 600MHz με αισθητήρα (probe) 1H {15N - 31P} 5 mm PFG AUTOX ID, VARIAN Inc., USA

6.1.3 Λογισμικά προγράμματα

- Mnova 10.0.0. για την απεικόνιση, επεξεργασία, ανάλυση και αναφορά των 1D και 2D NMR δεδομένων, της εταιρείας Mestrelab Research, Chemistry Software Solutions, Ισπανία.
- SIMCA για την πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων και συγκεκριμένα για τις PCA, PLS-DA και OPLS-DA.
- Chenomx για την ταυτοποίηση των φασμάτων NMR.

6.2. Κλινική παρέμβαση

6.2.1 Αντικείμενο της παρέμβασης

Η παρούσα διατριβή αποτέλεσε μέρος μιας κλινικής μελέτης φάσης II που διεξήχθη στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο και αφορά τη διερεύνηση και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διατροφικού συμπληρώματος Μαστίχας Χίου στο μεταβολικό προφίλ ασθενών με ΙΦΝΕ. Πρόκειται για μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη στην οποία οι ασθενείς λάμβαναν δια στόματος είτε διατροφικό συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου ή εικονικό σκεύασμα.

Η Μαστίχα Χίου έχει αναγνωριστεί πρόσφατα από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ως φυσικό φάρμακο και κατατάχθηκε στη κατηγορία των φυτικών φαρμάκων για προβλήματα διάρροιας, ήπιων διαταραχών δυσπεψίας, καθώς και για την φλεγμονή και την επούλωση του δερματικών πληγών (EMA / HMPC / 46758/2015).

6.2.2 Πρωτόκολλο κλινικής δοκιμής

Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε λαμβάνοντας έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.

- ***Προκαταρτικό στάδιο***

Η στρατολόγηση των εθελοντών έγινε σε προκαταρτικό στάδιο από έμπειρο γαστρεντερολόγο ο οποίος τους παρείχε μια αναλυτική ενημέρωση σχετικά με τον σκοπό της μελέτης, το πρωτόκολλο, τα πιθανά οφέλη και κινδύνους από τη συμμετοχή τους. Στη συνέχεια αξιολογούσε την καταλληλότητα συμμετοχής τους με βάση συγκεκριμένα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού (Πίνακας 9).

Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω ελέγχου και από την εκτίμηση του δείκτη ενεργότητας Harvey- Bradshaw, (HBI) για τη νόσο Crohn και το Partial Mayo Score (PMS) για την ελκώδη κολίτιδα, επιλέχθηκαν εθελοντές με ήπια έως μέτρια ενεργότητα της νόσου, καθώς και ασθενείς σε ύφεση. Οι ασθενείς που συμμετείχαν έδωσαν γραπτή συγκατάθεση εθελοντικής συμμετοχής και συμμόρφωσης στο πρωτόκολλο.

Πίνακας 8: Κριτήρια συμμετοχής ασθενών

Κριτήρια ένταξης	Κριτήρια αποκλεισμού
Φύλο: Άνδρες και Γυναίκες	Θετική καλλιέργεια κοπράνων για εντερικά παθογόνα ή τοξίνης <i>Clostridium difficile</i>
Ηλικία: 18-67 ετών	Αντιβιοτική θεραπεία 2 μήνες πριν ή κατά την διάρκεια έναρξης της μελέτης
Διαγνωσμένη ΙΦΝΕ με κολονοσκόπηση και ιστολογική εξέταση	Χειρουργείο στο έντερο ≤ 3 μήνες πριν την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της μελέτης Σύνδρομο βραχέος εντέρου Παρουσία ενδοκοιλιακού αποστήματος ή συριγγίου Ειλεοστομία, κολοστομία
Για τους ασθενείς σε έξαρση Ενεργή νόσος; όπως ορίζεται από το δείκτη Harvey & Bradshaw ≥ 5 σε ασθενείς με νόσο Crohn και από το δείκτη Partial Mayo Score ≥ 2 σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα Για τους ασθενείς σε ύφεση Ανενεργή νόσος > 3 μήνες; όπως ορίζεται από το δείκτη Harvey & Bradshaw ≤ 4 σε ασθενείς με νόσο Crohn και από το δείκτη Partial Mayo Score (0-1) σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα	Εντερική ή Παρεντερική σίτιση Κατάχρηση αλκοόλ Χρήση ναρκωτικών ουσιών, συμπληρωμάτων διατροφής Χορτοφαγική ή μακροβιοτική διατροφή
Για τους ασθενείς σε έξαρση Σταθερή θεραπεία με κορτικοστεροειδή το λιγότερο 2 εβδομάδες πριν την έναρξη της μελέτης, με μεσαλαμίνη για 4 εβδομάδες και ανοσοκατασταλτικά για 8 εβδομάδες Για τους ασθενείς σε ύφεση Σταθερή θεραπεία με αζαθειοπρίνη και μεσαλαμίνη	Παρουσία κακοήθειας, καρδιαγγειακής νόσου ή πεπτικού έλκους 1 χρόνο πριν ή κατά τη διάρκεια της μελέτης
Σταθερή θεραπεία κατά τη διάρκεια της μελέτης	Εγκυμοσύνη, γαλουχία

- **Τελική επιλογή εθελοντών**

Ο αριθμός των κατάλληλων για συμμετοχή ασθενών ήταν 128, η κατάσταση υγείας των οποίων εκτιμήθηκε ύστερα από λήψη πλήρους ιατρικού ιστορικού, το οποίο περιελάμβανε λεπτομερή δημογραφικά στοιχεία, σωματικές παραμέτρους, στοιχεία για κάπνισμα, αλκοόλ, αλλεργίες και ένα αναλυτικό ιστορικό της νόσου (ενεργότητα, διάρκεια, ηλικία έναρξης συμπτωμάτων, ηλικία διάγνωσης, εξωεντερικές εκδηλώσεις, θεραπεία, χειρουργική επέμβαση). Έγινε μέτρηση της αρτηριακής πίεσης και των καρδιακών παλμών των ασθενών με ψηφιακό πιεσόμετρο (Omron M6 HEM 7321). Ακολούθησε αιμοληψία 20mL αίματος, από τα οποία πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση αίματος, βιοχημικές εξετάσεις και αξιολόγηση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Επίσης πραγματοποιήθηκε λήψη διατροφικού ιστορικού με τη χρήση ανάκλησης εικοσιτετράωρου και αξιολογήθηκε η συμμόρφωση με το Μεσογειακό πρότυπο διατροφής με τη χρήση του ερωτηματολογίου MedDiet Score. Επιπλέον οι ασθενείς συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο ποιότητας ζωής και συγκεκριμένα του Inflammatory Bowel Disease Questionnaire. Τέλος τους δόθηκαν οδηγίες για την ορθή λήψη των σκευασμάτων και ειδικοί περιέκτες συλλογής κοπράνων.

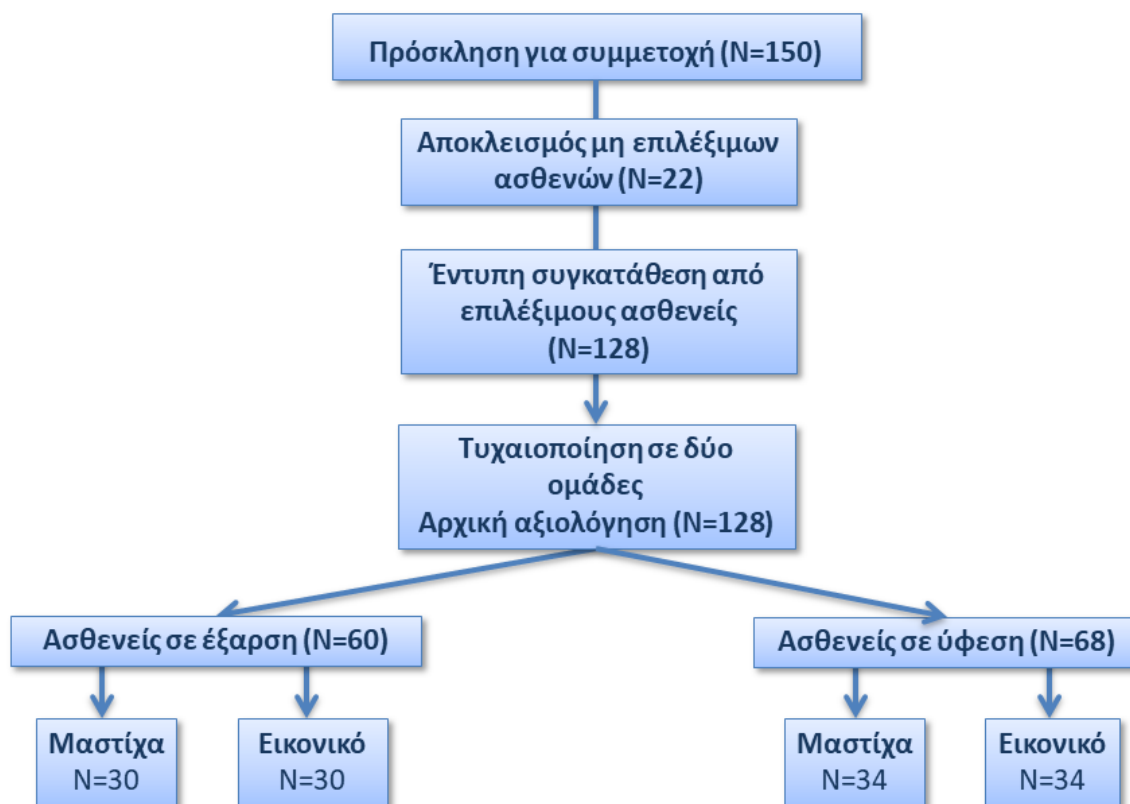
- **Στάδιο Παρέμβασης**

Οι 128 συμμετέχοντες ταξινομήθηκαν τυχαιοποιημένα ως εξής 60 ασθενείς (Σχήμα 3) σε έξαρση διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες ($n= 30/\text{ομάδα}$), με την ομάδα παρέμβασης να λαμβάνει συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου σε δοσολογία των 2,8 γραμμαρίων ημερησίως με την μορφή ταμπλέτας και την ομάδα ελέγχου εικονικό σκεύασμα ημερησίως. Αντίστοιχα διαχωρίστηκαν και οι 68 ασθενείς σε ύφεση.

Η παρέμβαση με ταμπλέτες Μαστίχας Χίου διήρκεσε 3 μήνες σε ασθενείς με ενεργή νόσο και σε ασθενείς με ανενεργή νόσο για 6 μήνες, ενώ η πρόσληψή τους ήταν καθημερινή. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν κανονικώς την επιβαλλόμενη φαρμακευτική αγωγή.

Όλα τα σκευάσματα παρασκευάστηκαν από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, τα οποία προμήθευε στη μελέτη με κωδικοποιημένη ονομασία. Τα δύο είδη ταμπλετών ήταν πανομοιότυπα με ίδια εικόνα, ίδιο μέγεθος, άρωμα, ίδια υφή και ίδια γεύση και η σύσταση του

σκευάσματος μαστίχας ήταν: 70% μαστίχα, 14% μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, 8% άνυδρο διβασικό φωσφορικό ασβέστιο, 6% γλυκολικό νατρίουχο άμυλο, 2% στεατικό μαγνήσιο.



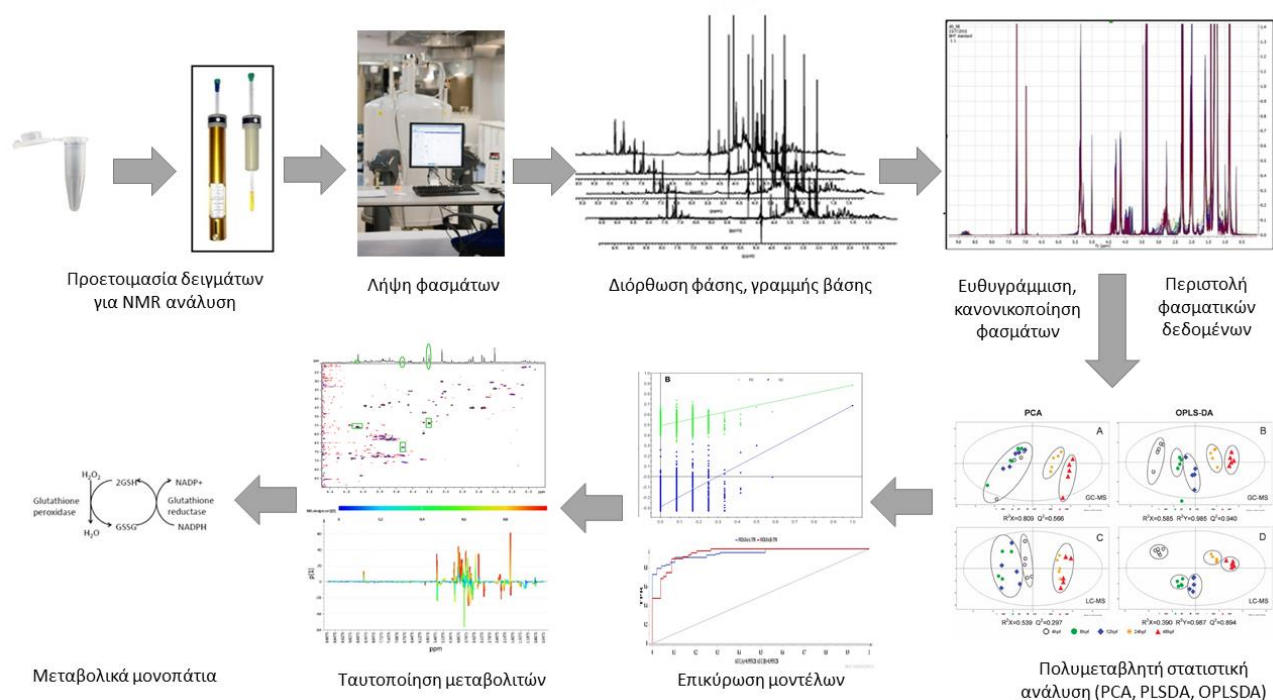
Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής κλινικής παρέμβασης με μαστίχα Χίου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ.

- **Επανελέγχοι**

Κατά την διάρκεια της έρευνας πραγματοποιήθηκαν αρκετές επισκέψεις των ασθενών στους χώρους του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου για τακτικό επανέλεγχο όπως και εβδομαδιαία τηλεφωνική παρακολούθηση για να ελεγχθεί η καθημερινή κατανάλωση των ταμπλετών, πιθανές παρενέργειες, η γενική κατάσταση της υγείας τους, πιθανή τροποποίηση της φαρμακευτικής τους αγωγής, καθώς και για να απαντηθούν ερωτήματα, απορίες και προβληματισμοί των ασθενών. Στο τέλος της παρέμβασης έγινε επανάληψη της αρχικής αξιολόγησης.

6.3. Μεταβολομική

Η πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται στην Εικόνα 16 με τα κυριότερα βήματα να περιγράφονται εκτενώς στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 16: Διάγραμμα ροής της μεταβολομικής μελέτης της παρούσας εργασίας.

6.3.1 Δειγματοχώρος μεταβολομικής μελέτης

Τα δείγματα ελήφθησαν σε εξειδικευμένο περιέκτη (IDK - Stool sample preparation system filled with extraction buffer for use in ELISA) της εταιρείας Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany, στα πλαίσια της κλινικής παρέμβασης που αναφέρθηκε παραπάνω.

Τα δείγματα κοπράνων ελήφθησαν από τους διαγνωσμένους ασθενείς με ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα, ο δειγματοχώρος αποτελείται στο σύνολο από N=128 δείγματα που κατανέμονται σύμφωνα με το Σχήμα 3. Από το σύνολο του δειγματοχώρου, στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν 94

δείγματα (Πίνακας 9). Τα υπόλοιπα 34 δείγματα έδειξαν στοιχεία υποβάθμισης στα φάσματα NMR και αποκλείστηκαν από την περαιτέρω διαδικασία. Αναλυτική περιγραφή ανά κωδικό δείγματος παρουσιάζεται στον Πίνακα Π1 του παραρτήματος.

Πίνακας 9: Αριθμός δειγμάτων ανά κατηγορία.

Κατηγορία	N	Παρέμβαση	N	Παρέμβαση	N
ΙΦΝΕ έξαρση	50	Μαστίχα Χίου 3 μήνες	20	Εικονικό σκεύασμα 3 μήνες	30
ΙΦΝΕ ύφεση	44	Μαστίχα Χίου 6 μήνες	28	Εικονικό σκεύασμα 6 μήνες	16

6.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τη μεταβολομική μελέτη παραλήφθηκαν τα δείγματα κοπράνων ως έτοιμα εκχυλίσματα χρησιμοποιώντας το μέσο εκχύλισης του περιέκτη συλλογής IDK. Η μεθοδολογία αυτή ήταν αναγκαία λόγω της ταυτόχρονης ανοσοδιαγνωστικής μελέτης των δειγμάτων με ELISA.

Από κάθε εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε αρχικός όγκος 300μL σε erpendorf. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν από τους -80 °C απευθείας για εξάχνωση μέχρι ξηρού σε συσκευή λυοφιλίωσης (κρυοξήρανσης) LABCONCO CentriVar Concentrator και CentriVar Cold Trap 800-522-7658 με αριθμό καταλόγου 7811030.

Στη συνέχεια τα δείγματα ανασυστάθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.2 με δευτεριωμένο νερό (D₂O). Στο δείγμα προστέθηκε διάλυμα πρότυπου αντιδραστηρίου μετά νατρίου άλατος 3-(τριμεθυλσυλνυλ)προπιονικού-2,2,3,3 d₄ οξέος (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt -TSP-d₄) σε τελική συγκέντρωση 0,5mM. Ο τελικός όγκος ήταν 600 μL.

Ακολούθησαν, ανάμιξη με vortex για 1 min, φυγοκέντρωση για 10 min, σε 12.000 rpm στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε νέα erpendorf και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C). Πριν τη μέτρηση τα δείγματα αποψύχονταν σταδιακά πρώτα στους 4 °C και μετά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min πριν τη μεταφορά τους σε σωληνίσκους NMR NOREL UP 5mm και την τοποθέτησή τους στον φασματογράφο NMR.

6.3.3 Λήψη Φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Varian 600 MHz του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Δοκιμάστηκαν οι ακολουθίες 1D NOE και CPMG με την ακολουθία PRESAT για την καταστολή των σημάτων του νερού. Τελικώς με κριτήρια την αναλογία σήματος/θορύβου (signal to noise), καθώς και το χρόνο λήψης φάσματος επιλέχθηκε η ακολουθία 1D NOE-PRESAT με τις ακόλουθες παραμέτρους, αριθμός σαρώσεων (number of scans) 128, χρόνος καταστολής (presaturation time) 1 sec, ισχύς καταστολής (presaturation power) 14 db (106 Hz), χρόνος μίξης (mixing time) 200 ms, εύρος φάσματος (spectral width) 7184 Hz, σημεία (complex points) 32000, χρόνος εφησυχασμού (relaxation delay) 1 sec, παράθυρο (Receiver Gain) 30, χρόνος λήψης (acquisition time) 4,45 sec.

6.3.4 Προετοιμασία και διαχείριση των φασματικών δεδομένων

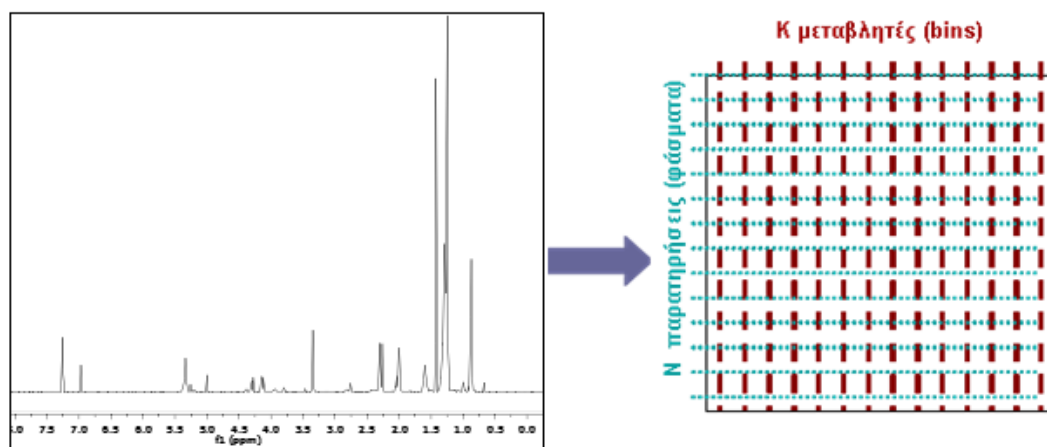
- *Προεπεξεργασία φασμάτων*

Κατόπιν της λήψης NMR φασμάτων πραγματοποιήθηκε διόρθωση ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης και κανονικοποίηση με βάση την κορυφή συντονισμού της ένωσης αναφοράς με εσωτερικό πρότυπο TSP. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Mnova 10.0.0. για την απεικόνιση, επεξεργασία, ανάλυση και αναφορά των 1D και 2D NMR δεδομένων, της εταιρείας Mestrelab Research, Chemistry Software Solutions, Ισπανία.

Ένα συχνό πρόβλημα στις μεταβολομικές μελέτες είναι η διακύμανση της τιμής του pH μεταξύ των δειγμάτων που αναλύονται με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της χημικής μετατόπισης των φασματικών κορυφών. Έτσι, εφαρμόζονται μαθηματικοί αλγόριθμοι που στοχεύουν στην αντιστάθμιση αυτών των διαφορών επιτυγχάνοντας την ευθυγράμμιση των κορυφών συντονισμού του εκάστοτε μεταβολίτη μεταξύ των φασμάτων. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν εξειδικευμένοι αλγόριθμοι ευθυγράμμισης του λογισμικού προγράμματος mNova 10.0.

- **Περιστολή Πειραματικών Δεδομένων (data reduction)**

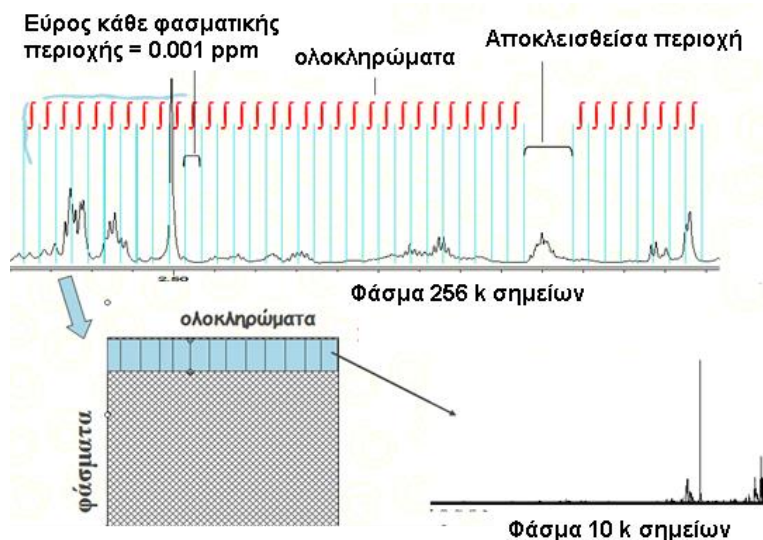
Κατόπιν της χρήσης μίας ολιστικής αναλυτικής προσέγγισης όπως η φασματοσκοπία NMR, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση στο ολικό μεταβολικό αποτύπωμα των εξεταζόμενων δειγμάτων, ο εξαγόμενος όγκος των δεδομένων είναι πολύ μεγάλος. Προκειμένου να αξιοποιηθούν τα δεδομένα απαιτείται περιστολή τους (data reduction) με τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές (spectral binning), ολοκλήρωση των επιμέρους τμημάτων και κατασκευή μιας μήτρας δεδομένων όπου η κάθε γραμμή περιλαμβάνει τα υπολογισθέντα ολοκληρώματα για το κάθε φάσμα (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: (αριστερά) Τυπικό φάσμα NMR. (δεξιά) Πίνακας φασματοσκοπικών δεδομένων, όπου N : αριθμός φασμάτων και K : ολοκληρώματα των τμηματοποιημένων φασματικών περιοχών (Φωτάκης, 2013).

Στην περιστολή πειραματικών δεδομένων (data reduction) πραγματοποιείται η τμηματοποίηση ενός φάσματος σε μικρότερες φασματικές περιοχές ορισμένου εύρους, έπειτα λαμβάνεται το ολοκλήρωμά τους (bin) σύμφωνα με την ορισμένη συγκέντρωση του πρότυπου αναφοράς (στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το TSP). Με αυτόν τον τρόπο από ένα φάσμα το οποίο έχει υποστεί δειγματοληψία, έστω, σε 256K σημεία, εξάγεται ένας Πίνακας περίπου 10K δεδομένων, στον οποίο οι γραμμές αντιστοιχούν στα φάσματα και οι στήλες στα ολοκληρώματα των φασματικών περιοχών (bins). Στόχος της τμηματοποίησης του φάσματος (Σχήμα 4) είναι η νέα μήτρα των δεδομένων να εσωκλείει το σύνολο της χημικής πληροφορίας

που ενυπάρχει στα φασματοσκοπικά δεδομένα. Ο εξαγόμενος πίνακας δεδομένων χρησιμοποιείται περαιτέρω για την ευθυγράμμιση των φασμάτων με χρήση κατάλληλων μαθηματικών αλγορίθμων. Περιοχές χαμηλού ενδιαφέροντος όπως φασματική περιοχή της ένωσης αναφοράς και του διαλύτη, καθώς και φασματικές περιοχές με μηδενική πληροφορία (γραμμή βάσης) μπορούν να εξαιρεθούν από την ανάλυση.



Σχήμα 4: Εφαρμογή της μεθόδου spectral binning σε πρότυπο φάσμα 256K σημείων (Φωτάκης, 2013).

6.4. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση – Χημειομετρία

Τα αναλυτικά πειράματα περιλαμβάνουν μετρήσεις που διεξάγονται ώστε να εξαχθούν πληροφορίες για φυσικά συστήματα. Τα ποσοτικά δεδομένα (quantitative data) που προκύπτουν από τις μετρήσεις αυτές είναι αριθμοί που εκφράζονται σε διάφορες φυσικές μονάδες και συχνά είναι δύσκολο να συσχετισθούν άμεσα με το επιστημονικό πρόβλημα λόγω μεγάλου μεγέθους. Σε αυτό ακριβώς το στάδιο διαχείρισης δεδομένων επεμβαίνει ο κλάδος της Χημειομετρίας (Chemometrics) για να μελετήσει την ύπαρξη συσχέτισης.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί ορισμοί της Χημειομετρίας, αλλά αυτός που προτάθηκε από τον Massart (2003), είναι ο πλέον επικρατέστερος: Χημειομετρία είναι ο κλάδος της Χημείας, που

ασχολείται με την εφαρμογή μεθοδολογιών της στατιστικής, των μαθηματικών, και της τυπικής λογικής (formal logic) στη Χημεία με στόχο: α) το σχεδιασμό ή επιλογή των βέλτιστων πορειών (διαδικασιών) μετρήσεων και πειραμάτων, β) την εξαγωγή της μέγιστης σχετικής χημικής πληροφορίας από την ανάλυση χημικών δεδομένων, γ) την απόκτηση γνώσεων για χημικά συστήματα (Goodacre, 2007).

Στη μεταβολομική προσέγγιση προκύπτει συνήθως μεγάλος όγκος πειραματικών δεδομένων, όπου χρησιμοποιώντας χημειομετρικές μεθόδους αναζητείται ο διαχωρισμός της πληροφορίας από το θόρυβο, ώστε να ταυτοποιηθούν λεπτές διαφορές σε διάφορες καταστάσεις και να αποτυπωθούν με τη δημιουργία στατιστικών μοντέλων συγκεκριμένων χαρακτηριστικών. Από αυτή την άποψη, στοχευμένες και μη στοχευμένες χημειομετρικές μέθοδοι (π.χ. PCA και PLS-DA) εφαρμόζονται στα φασματικά δεδομένα αξιοποιώντας την ποσοτική πληροφορία (ημι ή σχετική ποσοτικοποίηση) των φασμάτων, ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ των διαφόρων ομάδων (Bharti, 2012).

Η πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων είναι ένα υποσύνολο της στατιστικής ανάλυσης και περιλαμβάνει μεθοδολογίες που εφαρμόζονται σε μεγάλο αριθμό δεδομένων για την ομαδοποίηση δειγμάτων που εμφανίζουν κοινά αναλυτικά χαρακτηριστικά. Η χρήση μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης παρέχει μια επισκόπηση όλων των μεταβλητών ταυτόχρονα, που επιτρέπει την αξιολόγηση των συσχετισμών μεταξύ των ομάδων, και των ακραίων τιμών, και παρέχει σταθμισμένους μέσους όρους που αναδεικνύουν τη συστηματική διακύμανση (systematic variation), ενώ μειώνει τις επιπτώσεις του θορύβου.

Μέθοδοι όπως η Ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες (Principal Component Analysis, PCA) και η Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Regression, PLS) εφαρμόζονται προκειμένου να επιτευχθεί α) μια σφαιρική θεώρηση των δεδομένων, β) η ταξινόμηση και διάκριση των δειγμάτων και γ) εξαγωγή μοντέλου παλινδρόμησης.

Επισημώς, η PCA είναι μια μονοδιάστατη τεχνική ελάττωσης, που επιτρέπει σε κάποιον να σχεδιάσει εύκολα, να απεικονίσει και να ομαδοποιήσει πολλαπλά δεδομένα, βασιζόμενα σε γραμμικούς συνδυασμούς (γνωστό ως κύριους άξονες) των κοινών χαρακτηριστικών τους. Ως

τεχνική ομαδοποίησης, η PCA χρησιμοποιείται συνηθέστερα για να προσδιορίσει εάν ένα δείγμα είναι διαφορετικό από το άλλο, ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στη διαφορά αυτή, και εάν αυτές οι μεταβλητές συνεισφέρουν με τον ίδιο τρόπο (δηλαδή συσχετίζονται) ή ανεξάρτητα (δηλαδή ασυσχέτιστα) η μία από την άλλη (Wishart, 2008b).

Σε αντίθεση με το PCA, η PLS-DA είναι μια επιβλεπόμενη τεχνική ταξινόμησης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει το διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων με τις παρατηρήσεις, με την περιστροφή των συνιστωσών PCA με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται ένας μέγιστος διαχωρισμός μεταξύ των κατηγοριών. Οι βασικές αρχές πίσω από το PLS-DA είναι παρόμοιες με εκείνη της PCA, αλλά στην PLS-DA χρησιμοποιείται ένα δεύτερο κομμάτι πληροφοριών, δηλαδή, το με σήμανση σετ κατηγοριοποιημένων ταυτοτήτων (Wishart, 2008b).

Παρόλο που οι τεχνικές όπως η PCA και η PLS-DA, από μόνες τους, δεν επιτρέπουν την άμεση αναγνώριση ή ποσοτικοποίηση των ενώσεων, εξακολουθούν να επιτρέπουν τη διεξαγωγή μιας αμερόληπτης (ή μη-στοχευμένης), χημικά αναλυτικής σύγκρισης μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων (Wishart, 2008b).

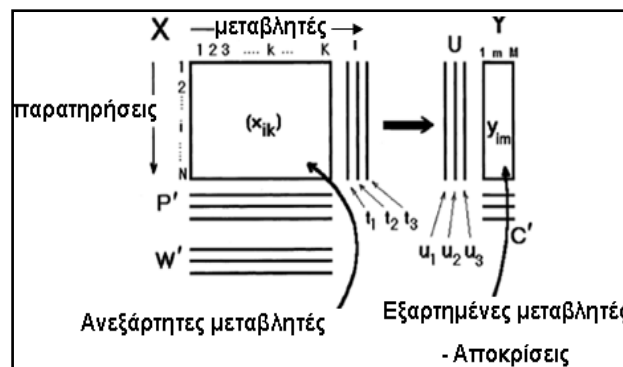
6.4.1 Η πολυμεταβλητή ανάλυση στην μεταβολομική με χρήση ^1H NMR

Αρκετές φορές το NMR αποτύπωμα (NMR fingerprint) αφορά στο πολύπλοκο υπόστρωμα ενός βιολογικού δείγματος και περιέχει ένα μεγάλο αριθμό πληροφοριών που δυσχεραίνει ή καθιστά αδύνατη την ερμηνεία του. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η εφαρμογή τεχνικών ανίχνευσης πρότυπων για την αξιολόγηση των δεδομένων. Η πρώτη εφαρμογή της χημειομετρίας σε δεδομένα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού αναφέρεται το 1983 από τον Johnels και τους συνεργάτες του (Johnels et al, 1983). Η εφαρμογή της χημειομετρικής ανάλυσης σε δεδομένα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στα φάσματα πεδίου συχνότητας (frequency domain data) έχει πλέον εδραιωθεί.

- **Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least-Squares, PLS)**

Η επιβλεπόμενη παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) στοχεύει στην οικοδόμηση ενός γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης που προβλέπει ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό από το μετρούμενο πολυπαραμετρικό σήμα. Μάλιστα, η PLS χρησιμοποιείται όταν αναζητείται μια ποσοτική σχέση ανάμεσα σε δύο πίνακες δεδομένων X και Y . Συγκεκριμένα, αναζητούνται συνιστώσες του Πίνακα X , ανεξάρτητες μεταβλητές που προβλέπουν – (predictors) με τον καταλληλότερο τρόπο τον Y (εξαρτημένες μεταβλητές ή αποκρίσεις -responses).

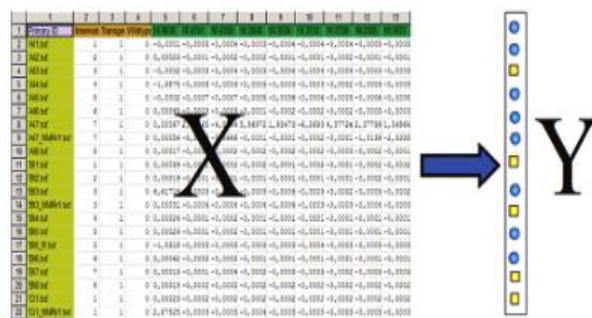
Το PLS μοντέλο που θα εξαχθεί εκπαιδεύεται από ένα σύνολο N παρατηρήσεων με ανεξάρτητες μεταβλητές και εξαρτημένες μεταβλητές (Σχήμα 5). Με την εφαρμογή της μεθόδου εξάγεται τον Πίνακα T ως γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών με αντίστοιχα βάρη, με τους πίνακες P' και C' να περιλαμβάνουν τα αντίστοιχα φορτία και τους πίνακες E και F περιλαμβάνουν τα υπόλοιπα (residuals) της παλινδρόμησης που συνήθως εκφράζουν το θόρυβο.



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση PLS μοντέλου (Φωτάκης, 2013).

- **Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική (διακριτική) ανάλυση PLS-DA (Partial least Square regression- Discriminant Analysis)**

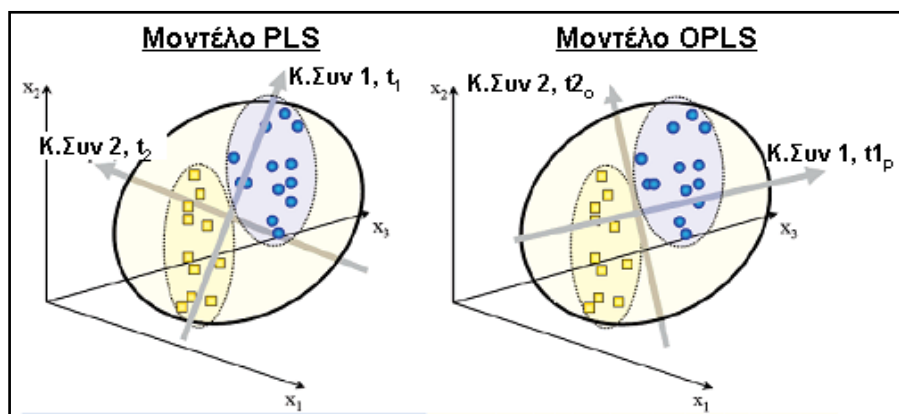
Η PLS-DA συνιστά μια παραλλαγή της PLS που ενσωματώνει και τη διαχωριστική ανάλυση (Discriminant analysis). Ειδικότερα, στη PLS-DA ο Πίνακας των εξαρτημένων μεταβλητών ή αποκρίσεων Y είναι ποιοτικός, έχει τη μορφή διανύσματος-στήλης και για την δημιουργία του χρησιμοποιείται μια εικονική παράμετρος (dummy parameter) που κωδικοποιεί τις τάξεις/κατηγορίες των δειγμάτων (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: PLS-DA: Η μήτρα της εξαρτημένης μεταβλητής Y κωδικοποιεί τις τάξεις/κατηγορίες των δειγμάτων (Φωτάκης, 2013).

- **Μέθοδος ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση (Orthogonal Partial Least Square regression Discriminant Analysis, OPLS-DA)**

Η μέθοδος OPLS είναι μια πρόσφατη τροποποίηση/επέκταση της PLS που καταφέρνει να συνδυάσει τις δυνατότητες της μεθόδου PLS-DA και της ταξινόμησης SIMCA. Το πλεονέκτημά της OPLS έγκειται στη δυνατότητά της να διαχωρίζει τη συστηματική διακύμανση στο X σε δύο τμήματα, το ένα σχετίζεται γραμμικά με το Y και το άλλο δε σχετίζεται (ορθογώνιο) στο Y . Η μέθοδος OPLS-DA χρησιμοποιείται ανάλογα προς την PLS-DA για τη διάκριση των δειγμάτων και την ταξινόμησή τους σε ομάδες.



Σχήμα 7: Σύγκριση ανάμεσα στο PLS-DA (αριστερά) και στο OPLS-DA (δεξιά) (Φωτάκης, 2013).

Το Σχήμα 7 περιγράφει γεωμετρικά τη διαφορά ανάμεσα σε μοντέλα PLS-DA και OPLS-DA. Στο αριστερό τμήμα, οι PLS συνιστώσες t_1 και t_2 δε διακρίνουν τη διαφοροποίηση ανάμεσα στις ομάδες από την εντός των ομάδων διακύμανση με συνεπακόλουθο οι αντίστοιχες συνιστώσες φορτίων PLS να αναμιγνύουν τους δύο τύπους διακύμανσης και να μην είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των διαγραμμάτων φορτίου που υποδηλώνουν ποιες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην ταξινόμηση των δειγμάτων σε διαφορετικές κλάσεις. Αντίθετα στο δεξί τμήμα οι συνιστώσες φορτίων OPLS διαχωρίζουν τους δύο τύπους διαφοροποιήσεων. Η κύρια συνιστώσα πρόβλεψης (t_{1p}) πλαισιώνει τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα (between-class). Η ορθογώνια συνιστώσα (t_{2o}) πλαισιώνει την εντός διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων (within-class).

6.4.2 Εσωτερική επικύρωση μοντέλου, (internal validation)

Υπάρχουν συγκεκριμένες τεχνικές που διασφαλίζουν πως το παραγόμενο μοντέλο από τη χημειομετρία δεν προβλέπει με τυχαίο τρόπο και παρουσιάζει ελάχιστη διαβλητότητα (bias) και φυσικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι σύμφωνα με βασικές αρχές τις χημείας / βιολογίας.

Ένα αξιόπιστο μοντέλο θα πρέπει να παρουσιάζει τιμές R^2X (cum) > 0.5 για τον έλεγχο προσαρμοστικότητας (goodness of fit) και Q^2 (cum) > 0.5 για την ικανότητα πρόβλεψης (predictive ability). Παράλληλα, η διαφορά ανάμεσα στα δύο μεγέθη πρέπει να είναι: R^2X (cum) - Q^2 (cum) < 0.2-0.3 . Σημειώνεται ότι η ικανότητα προσαρμογής, R^2X , κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1 , το 0 δείχνει καθόλου προσαρμογή και το 1 τέλεια προσαρμογή.

Συνοπτικά αναφέρεται ότι:

- το R^2X είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα. Το R^2X δείχνει επίσης την ικανότητα προσαρμογής του μοντέλου (goodness of fit) δηλαδή του πόσο καλά μπορούν να αναπαραχθούν μαθηματικά τα δεδομένα του συνόλου εκμάθησης (training set).

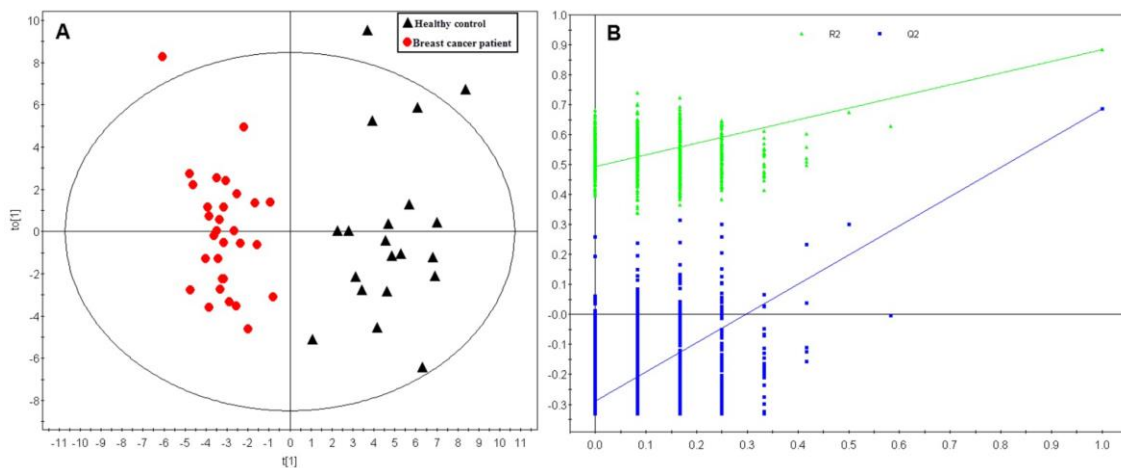
- το $R^2X(\text{cum})$ είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες (όρος που περιγράφει το στατιστικό μοντέλο που προκύπτει).
- η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου (goodness of prediction) καθορίζεται από τον παράγοντα Q^2X με την τεχνική της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation, CV).
- το Q^2 είναι ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης, που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των X , που προβλέπει την κύρια συνιστώσα. Αν το Q^2 για τις μεταβλητές X είναι μεγαλύτερο από κάποιο όριο σημαντικότητας, η συνιστώσα αυτή είναι σημαντική. ο το $Q^2(\text{cum})$ είναι το συνολικό Q^2 για όλες τις εξαχθείσες συνιστώσες.

Η εσωτερική επικύρωση (Internal Validation) συμπεριλαμβάνει τη διασταυρωμένη επικύρωση (Cross validation Q^2), αποτελεί μια εκτίμηση της δυνατότητας πρόβλεψης του μοντέλου και συνεπικουρεί στην επιλογή του αριθμού των κύριων συνιστωσών. Η εφαρμογή της μεθόδου οδηγεί στο διαχωρισμό του δειγματοχώρου σε τμήματα, αφαιρείται το πρώτο τμήμα από τα δεδομένα και επαναυπολογίζονται οι συνιστώσες του μοντέλου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ένα από τα επτά υποσύνολα των δεδομένων. Οι προβλέψεις συγκρίνονται με τον αρχικό δειγματοχώρο και υπολογίζεται το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων.

Το διάγραμμα CV είναι ένα διάγραμμα φορτίων των ανυσμάτων στα διασταυρωμένα επικυρωμένα φορτία που είναι ανάλογα του διαγράμματος φορτίων των συνηθισμένων ανυσμάτων και που τονίζει την ευαισθησία του μοντέλου στην εξαίρεση μιας παρατήρησης από το δειγματοχώρο.

- **Μεταθετικός έλεγχος ή έλεγχος τυχαιότητας (permutation testing)**

Μια επιπρόσθετη διαδικασία επικύρωσης των επιβλεπόμενων τεχνικών (PLS-DA, OPLS-DA) αποτελεί ο Μεταθετικός Έλεγχος. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται στατιστικά η εγκυρότητα του μοντέλου και επαληθεύεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη ο μεταθετικός έλεγχος, πραγματοποιήθηκε με 555 τυχαίες μεταθέσεις με σκοπό να αξιολογηθεί η προβλεψιμότητα της ταξινόμησης. Σε κάθε μεταθετικό έλεγχο ελέγχονται οι τομές R^2 και Q^2 .

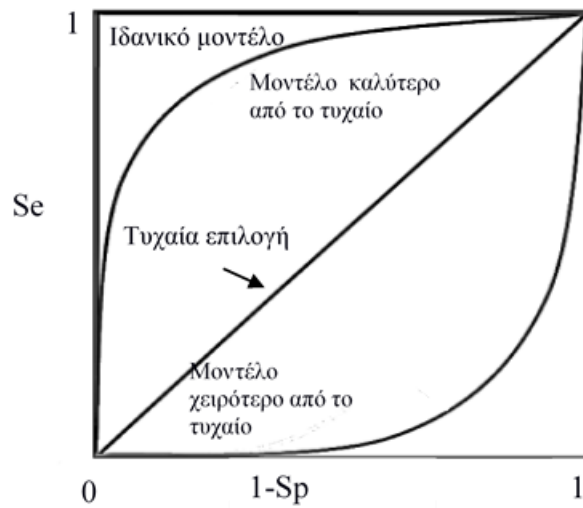


Σχήμα 8: Στατιστικό μοντέλο OPLS-DA (αριστερά) και μεταθετικός έλεγχος (δεξιά) (Qiu, 2013).

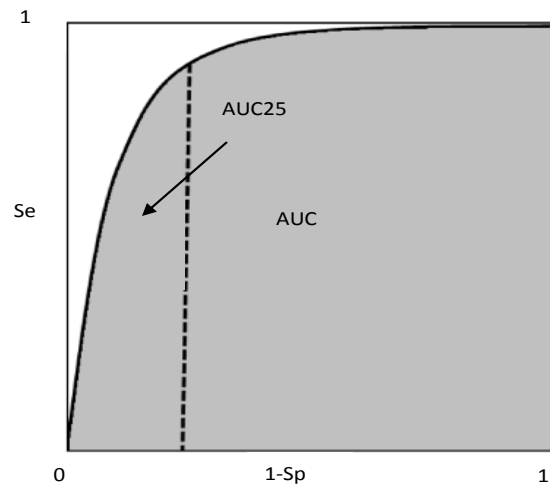
Συνήθως όταν η προβλεψιμότητα του μοντέλου είναι χαμηλότερη του 0,5 τότε η χρήση του μεταθετικού ελέγχου είναι απαραίτητη προκειμένου να αποδειχθεί ότι η τιμή Q^2 παραμένει σταθερή σε όλες τις μεταθέσεις και να θεωρηθεί ένα μοντέλο έγκυρο (Triba, 2015).

- **Καμπύλες ROC (Receiver Operating Characteristic) ή καμπύλες λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη.**

Η καμπύλη του Δέκτη Λειτουργικών Χαρακτηριστικών (Receiver Operating Characteristic-curve) αποτελεί ένα εργαλείο αξιολόγησης των παραγόμενων στατιστικών μοντέλων. Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα καμπύλης ROC. Όπως παρατηρείται από την καμπύλη ROC, η διαγώνιος αντιπροσωπεύει την τυχαία επιλογή (random selection). Επίσης, παρατηρείται ότι ένα ιδανικό μοντέλο (ideal model) προκαλεί μία ευθεία κάθετη γραμμή στον άξονα $\psi\psi'$ μέχρι να επιλεγθούν όλα τα δραστικά μόρια. Αν η καμπύλη ROC βρίσκεται ανάμεσα στην ιδανική και στην τυχαία επιλογή τότε το μοντέλο που έχει δημιουργηθεί είναι καλύτερο από το τυχαίο. Αν όμως βρίσκεται κοντά στον άξονα 1-Sp είναι χειρότερο από το τυχαίο.



Σχήμα 9: Διαχωρισμός μοντέλων και αξιολόγηση αποτελεσμάτων σύμφωνα με την καμπύλη ROC. Se είναι η ευαισθησία (*sensitivity*) και Sp η εξειδίκευση (*specificity*) του μοντέλου (Κρίτση, 2017).



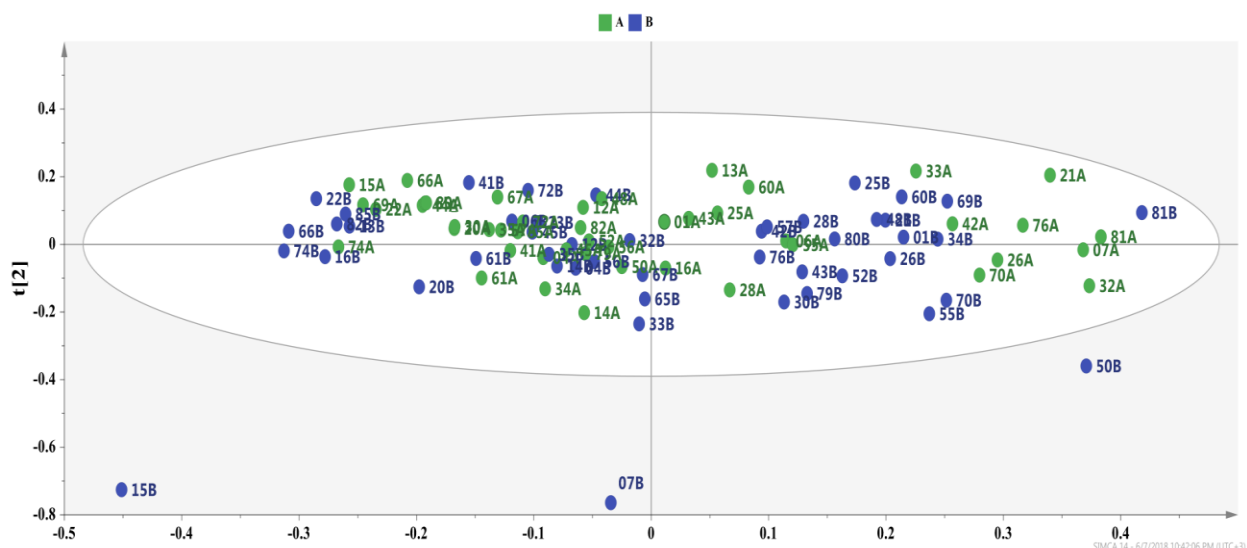
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Κρίτση, 2017).

Η κλίση της καμπύλης ROC βοηθάει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το μοντέλο που έχει δημιουργηθεί. Δηλαδή, αν η κλίση της καμπύλης είναι απότομη στην αρχή, δείχνει ότι έχουν επιλεγεί αρκετές δραστικές ενώσεις κατά την έναρξη της σάρωσης, γεγονός το οποίο πιστοποιεί ότι το μοντέλο είναι επιτυχές. Στην περίπτωση αξιολόγησης πολλών καμπυλών μπορεί να μετρηθεί η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the ROC curve). Η AUC παίρνει τιμές από 0 (ταξινόμηση των μη δραστικών ενώσεων) έως 1 (ταξινόμηση των δραστικών ενώσεων). Αν η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη "AUC" είναι μεγαλύτερη από 0,5 τότε το μοντέλο θεωρείται κατάλληλο (Σχήμα 10). Συνολικά, η καμπύλη ROC αποτελεί μία εύκολα ερμηνεύσιμη μέθοδο επικύρωσης (Κρίτση, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση μεταβολομικής μελέτης

Στην Εικόνα 17 παρουσιάζεται το σύνολο του δειγματοχώρου σε μια ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Γίνεται αντιληπτό ότι αφενός το πλήθος των διαφορετικών κατηγοριοποιήσεων (υγιείς και ασθενείς με ΙΦΝΕ, ασθενείς σε ύφεση ή σε έξαρση, πριν και μετά την παρέμβαση) αφετέρου το πλήθος των παραμέτρων που αντικατοπτρίζονται στη μεταβολομική μελέτη δεν καθιστούν κάποια εμφανή διάκριση.

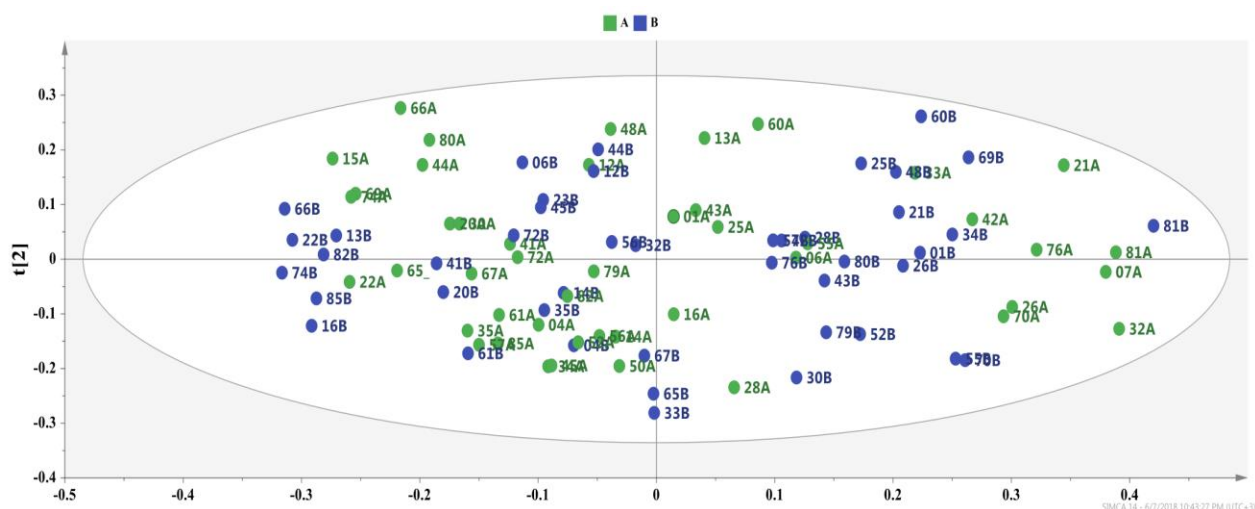


Εικόνα 17: PCA μοντέλο στο σύνολο των δειγμάτων ($N=93$). $R^2X(cum)=0,73$, $Q^2(cum)=0,47$. Με πράσινο χρώμα είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε μετά.

Στο μοντέλο της Εικόνας 17 διακρίνονται 3 δείγματα (07B, 15B και 50B) που αποτελούν έκτροπες τιμές και ανήκουν σε δείγματα ασθενών μετά την παρέμβαση. Τα κύρια χαρακτηριστικά των δειγμάτων αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και δεν παρουσιάζουν κάποια ομοιογένεια ως προς μια συγκεκριμένη παράμετρο που να δικαιολογεί τη διαφοροποίησή τους στο στατιστικό μοντέλο. Ως εκ τούτου η αιτία της διαφοροποίησής τους έγκειται είτε σε άγνωστη (μη καταγεγραμμένη) αιτία είτε σε πειραματικό σφάλμα.

Πίνακας 10: Περιγραφή δειγμάτων έκτροπων τιμών.

Δείγμα	Κατηγορία	Τύπος	Παρέμβαση	Φύλο	Ηλικία	BMI	Αγωγή
07B	ΙΦΝΕ (CD)	Έξαρση	Εικονικό 3 μήνες	Άνδρας	63	21,6	Καμία
15B	ΙΦΝΕ (CD)	Ύφεση	Μαστίχα 6 μήνες	Άνδρας	51	21,2	MYCOPHENOLATE MOFETIL
50B	ΙΦΝΕ (UC)	Ύφεση	Εικονικό 6 μήνες	Άνδρας	35	21,1	Καμία



Εικόνα 18: PCA μοντέλο στο σύνολο των δειγμάτων ($N=90$). $R^2X(cum)=0,313$, $Q^2(cum)=0,266$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά.

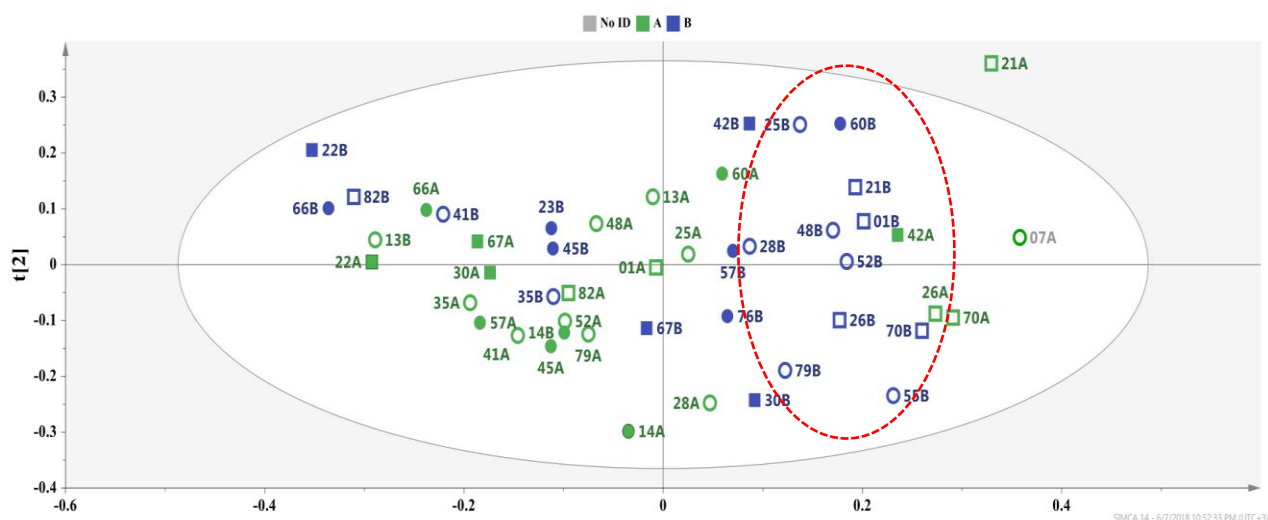
Στη συνέχεια τα παραπάνω 3 δείγματα εξαιρούνται από τον δειγματοχώρο και υπολογίζεται εκ νέου η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Εικόνα 18). Σε μια πρώτη αξιολόγηση δεν φαίνεται κάποια ξεκάθαρη διάκριση των δειγμάτων πριν και μετά την παρέμβαση. Ωστόσο αυτό είναι αναμενόμενο διότι δεν υπάρχει ομοιογένεια των δειγμάτων πριν και μετά την παρέμβαση. Για παράδειγμα, στα δείγματα μετά την παρέμβαση συγκαταλέγονται τόσο αυτά που προέρχονται από ασθενείς που έλαβαν συμπλήρωμα μαστίχας για 3 μήνες, για 6 μήνες αλλά και από ασθενείς

που έλαβαν το εικονικό σκεύασμα. Παρόλα αυτά, το μοντέλο της Εικόνας 18 αποτελεί ένα βασικό εργαλείο για να ανιχνεύσει κανείς τάσεις διάκρισης επιμέρους ομάδων.

Ο έλεγχος των κατανομών των δειγμάτων ανά κατηγορία με χρήση PCA δίνεται στο Παράρτημα (Εικόνες Π1, Π3). Από τον έλεγχο αυτό προέκυψε ότι σε όλες τις υπό μελέτη κατηγορίες τα δείγματα κατανέμονται σε όλο το εύρος των μοντέλων.

7.1.1 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε έξαρση – Συνολική παρέμβαση (μαστίχα και εικονικό σκεύασμα).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η PCA σε δείγματα ασθενών με ΙΦΝΕ σε έξαρση πριν και μετά την παρέμβαση (Εικόνα 19). Σημειώνεται ότι η παρέμβαση στους ασθενείς σε έξαρση είχε διάρκεια 3 μήνες.

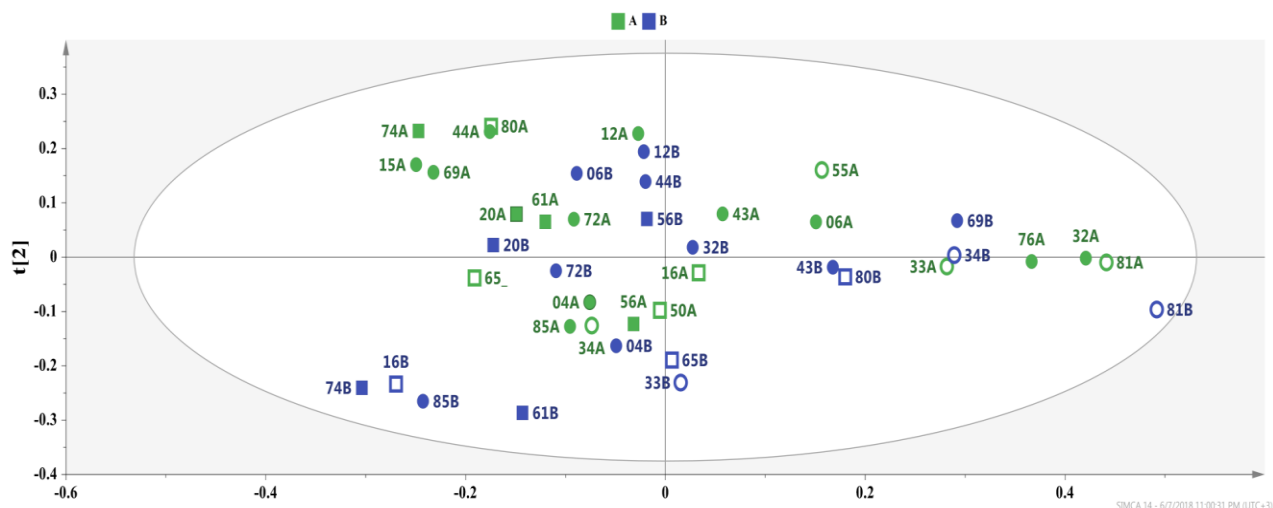


Εικόνα 19: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε έξαρση (N=48). $R^2X(cum)=0,314$, $Q^2(cum)=0,22$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά. Με τετράγωνο σχήμα αναπαρίστανται τα δείγματα ΙΦΝΕ (UC) ενώ με κύκλο τα ΙΦΝΕ (CD). Τα κενά σχήματα αφορούν τη χρήση εικονικού σκευάσματος ενώ τα γεμάτα αφορούν τη χρήση μαστίχας κατά την παρέμβαση. Το μοντέλο έχει μόνο μία έκτροπη τιμή (21A) που αφορά δείγμα πριν την παρέμβαση (γυναίκα 49 ετών με BMI 26,3).

Από την Εικόνα 19 παρατηρούμε μια τάση συγκέντρωσης των δειγμάτων πριν την παρέμβαση στο 3^ο κυρίως τεταρτημόριο ενώ τα δείγματα μετά την παρέμβαση συγκεντρώνονται κυρίως στο 1^ο και 4^ο τεταρτημόριο. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι από τα δείγματα μετά την παρέμβαση (μπλε χρώματος τετράγωνα και κύκλοι), αυτά που είναι με εικονικό σκεύασμα (κενά σχήματα) συγκεντρώνονται δεξιότερα στο 1^ο και 4^ο τεταρτημόριο (κόκκινος κύλος) σε σχέση με αυτά της παρέμβασης με μαστίχα. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα 82B (γυναίκα, 24 ετών με BMI 19,5, ενεργή UC και εικονικό σκεύασμα). Μια επιπρόσθετη παρατήρηση είναι ότι η παραλλακτικότητα των δειγμάτων (διαφορετικός μεταβολισμός των ατόμων) φαίνεται να έχει ισχυρότερη επίδραση από την παρέμβαση. Έτσι για παράδειγμα ορισμένα δείγματα όπως τα 22 A και B και τα 60 A και B ενώ έχουν λάβει 3μηνη παρέμβαση με μαστίχα Χίου εντούτοις η επίδραση της παρέμβασης φαίνεται να είναι μικρή στο μεταβολικό αποτύπωμα των κοπράνων τοποθετώντας τα A και B δείγματα πολύ κοντά μεταξύ τους (στο ίδιο τεταρτημόριο) ενώ την ίδια στιγμή τα 22 A και B είναι τοποθετούνται αντιδιαμετρικά σχεδόν με τα 60 A και B.

7.1.2 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε ύφεση – Συνολική παρέμβαση (μαστίχα και εικονικό σκεύασμα).

Ακολούθως, εφαρμόστηκε η PCA σε δείγματα ασθενών με ΙΦΝΕ σε ύφεση πριν και μετά την παρέμβαση (Εικόνα 20). Σημειώνεται ότι η παρέμβαση στους ασθενείς σε ύφεση είχε διάρκεια 6 μήνες σε αντίθεση με την τρίμηνη διάρκεια των ασθενών σε έξαρση.



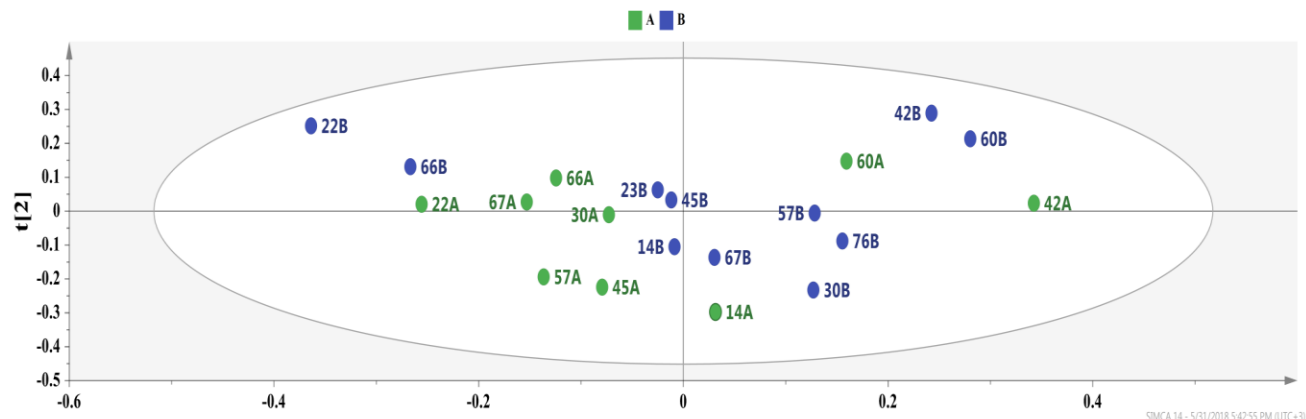
Εικόνα 20: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε ύφεση ($N=42$). $R^2X(cum)=0,382$, $Q^2(cum)=0,278$. Με πράσινο χρώμα (A) είναι τα δείγματα πριν την παρέμβαση και με μπλε (B) μετά. Με τετράγωνο σχήμα αναπαρίστανται τα δείγματα ΙΦΝΕ (UC) ενώ με κύκλο τα ΙΦΝΕ (CD). Τα κενά σχήματα αφορούν τη χρήση εικονικού σκευάσματος ενώ τα γεμάτα αφορούν τη χρήση μαστίχας κατά την παρέμβαση. Το μοντέλο δεν παρουσιάζει έκτροπες τιμές.

Σε μια πρώτη ανάγνωση, δεν παρατηρούνται έντονες τάσεις συγκέντρωσης και διάκρισης των δειγμάτων με βάση την επίδραση της παρέμβασης. Ωστόσο, τα δείγματα ΙΦΝΕ μετά την παρέμβαση με μαστίχα φαίνεται να συγκεντρώνονται κοντά στο 2^ο και 3^ο κυρίως τεταρτημόριο και σχετικά κοντά στον PC1 εκτός των δειγμάτων 43 και 69 που βρίσκονται δεξιά στο 1^ο και 4^ο τεταρτημόριο κοντά στον άξονα PC2. Όπως και προηγουμένως, η επίδραση της παραλλακτικότητας είναι μεγάλη εφόσον παρατηρούνται ζεύγη δειγμάτων του ίδιου ασθενούς πριν και μετά την παρέμβαση (π.χ. 20 A και B, 43 A και B, 81 A και B).

7.1.3 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε έξαρση – Παρέμβαση με μαστίχα Χίου.

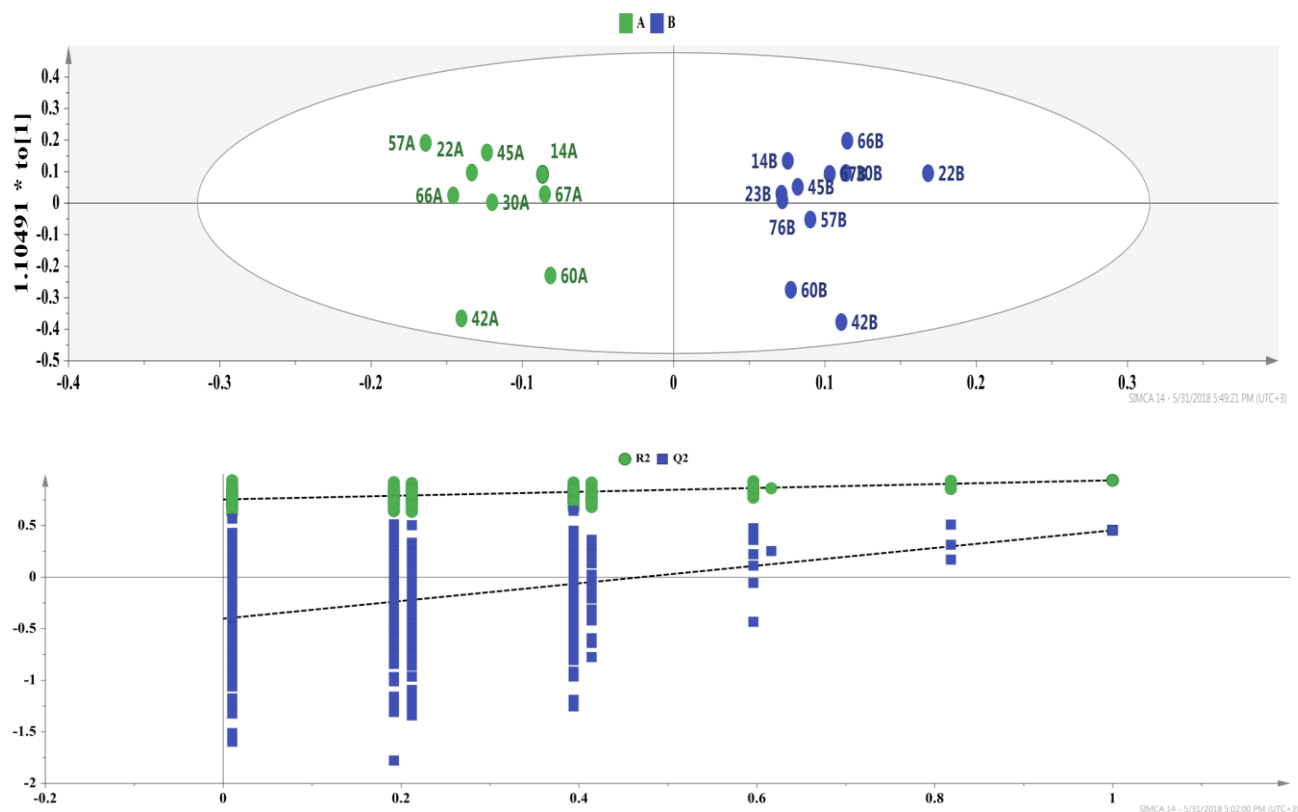
Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η μελέτη των δειγμάτων των ασθενών ΙΦΝΕ πριν και μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου ανάλογα με το εάν βρίσκονταν σε έξαρση ή ύφεση. Στην Εικόνα 21 παρουσιάζεται η ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα δείγματα ΙΦΝΕ σε έξαρση πριν και μετά τη παρέμβαση (ΙΦΝΕ, έξαρση, μαστίχα).

Ενώ φαίνεται να υπάρχει μια μικρή τάση συγκέντρωσης των δειγμάτων πριν την παρέμβαση (Α) ως προς την PC1 κύρια συνιστώσα εντούτοις τόσο τα δείγματα 42Α και 60Α πριν την παρέμβαση όσο και τα 22Β και 66Β φαίνεται να μην ακολουθούν την τάση αυτή. Ως εκ τούτου τόσο η προσαρμοστικότητα είναι χαμηλή με το $R^2_X(\text{Cum}) < 0.5$ όπως και η ικανότητα πρόβλεψης είναι επίσης πολύ χαμηλή $Q^2(\text{Cum}) < 0.5$ για το παραγόμενο μοντέλο.



Εικόνα 21: PCA στα δείγματα ΙΦΝΕ σε έξαρση. $N=20$, $R^2_X(\text{Cum})=0,35$, $Q^2(\text{Cum}) = 0,05$. Με πράσινο χρώμα (Α): πριν και με μπλε χρώμα (Β) μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου.

Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, δεν επιχειρήθηκε ο αποκλεισμός των τεσσάρων προαναφερθέντων δειγμάτων και έλεγχος του νέου μοντέλου. Ωστόσο επιχειρήθηκε η δημιουργία μοντέλου (Εικόνα 22) με τη μέθοδο ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση (OPLS-DA).



Εικόνα 22: OPLS-DA IBD, Active, Verum, A: πριν και B μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. N=20
 $R^2X(\text{Cum})=0,94$, $Q^2(\text{cum})=0,45$ (πάνω) και μεταθετικός έλεγχος επικύρωσης (κάτω).

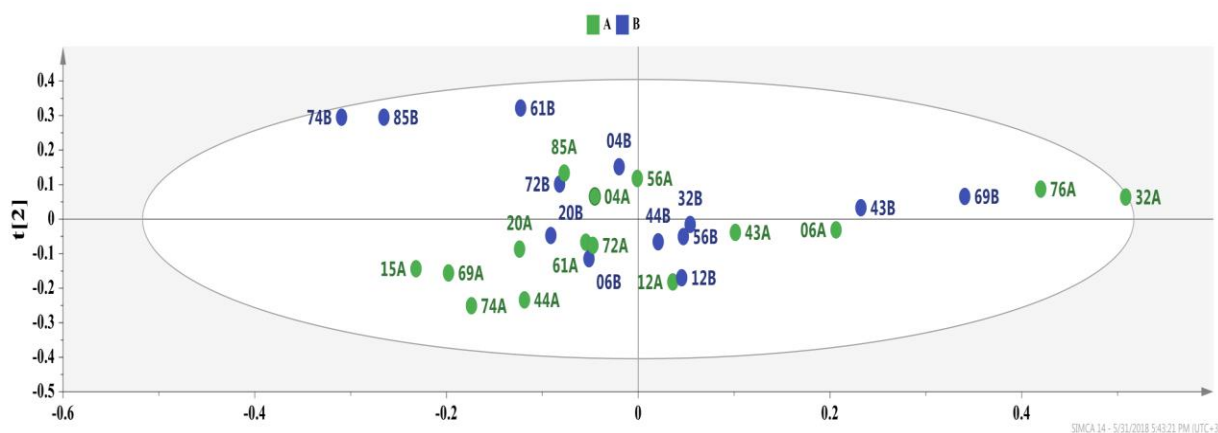
Όσον αφορά τον έλεγχο προσαρμοστικότητας του μοντέλου, μπορεί μεν να είναι υψηλό το $R^2X(\text{cum}) > 0,5$, ωστόσο η ικανότητα πρόβλεψης είναι χαμηλή $Q^2(\text{cum}) < 0,5$ και η διαφορά τους είναι μεγαλύτερη του 0,2 για το παραγόμενο μοντέλο. Επιπρόσθετα, από τον μεταθετικό έλεγχο που διενεργήθηκε, δεν διασφαλίζεται στατιστικά η εγκυρότητα του μοντέλου ούτε επαληθεύεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων.

7.1.4 Υποκατηγορία ΙΦΝΕ σε ύφεση – παρέμβαση με μαστίχα Χίου.

Ανάλογα επιχειρήθηκε η μελέτη των δειγμάτων των ασθενών ΙΦΝΕ σε ύφεση πριν και μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται η ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα δείγματα αυτά (ΙΦΝΕ, ύφεση, μαστίχα).

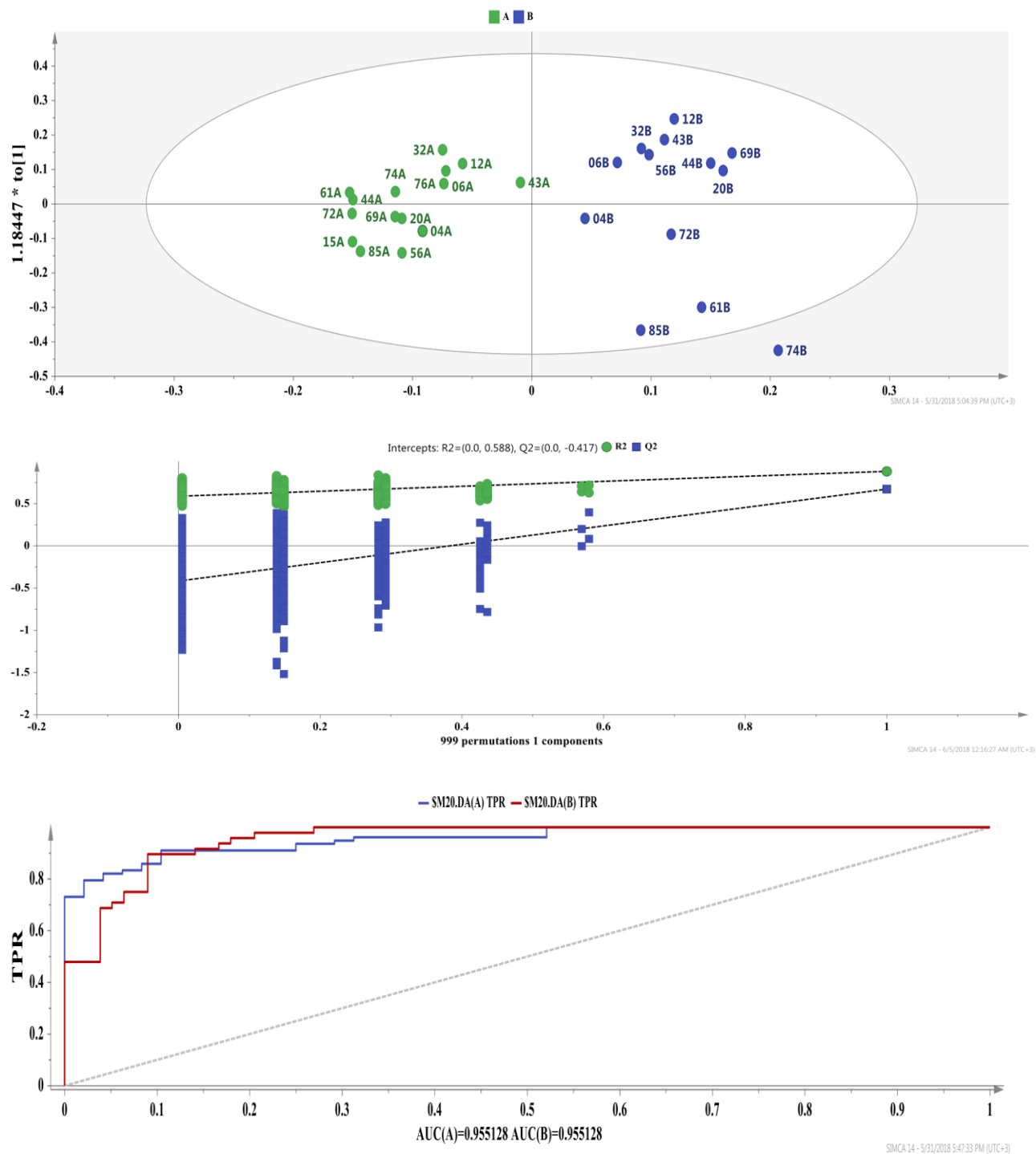
Με μια πρώτη παρατήρηση της PCA φαίνεται να υπάρχει μια μικρή τάση συγκέντρωσης των δειγμάτων πριν την παρέμβαση (Α) στο 2^ο και 3^ο τεταρτημόριο ενώ εκείνων μετά την παρέμβαση στο 2^ο και 4^ο τεταρτημόριο. Αρκετά δείγματα ωστόσο φαίνεται να μην ακολουθούν την τάση αυτή. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, δεν επιχειρήθηκε ούτε αυτή τη φορά αποκλεισμός των δειγμάτων αυτών και έλεγχος νέου μοντέλου.

Ο έλεγχος προσαρμοστικότητας είναι χαμηλός με το $R^2X(cum) < 0.5$ όπως και η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου $Q^2(cum) < 0.5$, η διαφορά τους $R^2X(cum)-Q^2(cum)$ όμως είναι < 2 .



Εικόνα 23: PCA ΙΦΝΕ σε ύφεση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. $N=28$, $R^2X(Cum)=0,38$, $Q^2(cum) = 0,231$.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η δημιουργία μοντέλου με τη μέθοδο ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση (OPLS-DA). Στην Εικόνα 24 παρουσιάζεται το μοντέλο OPLS-DA

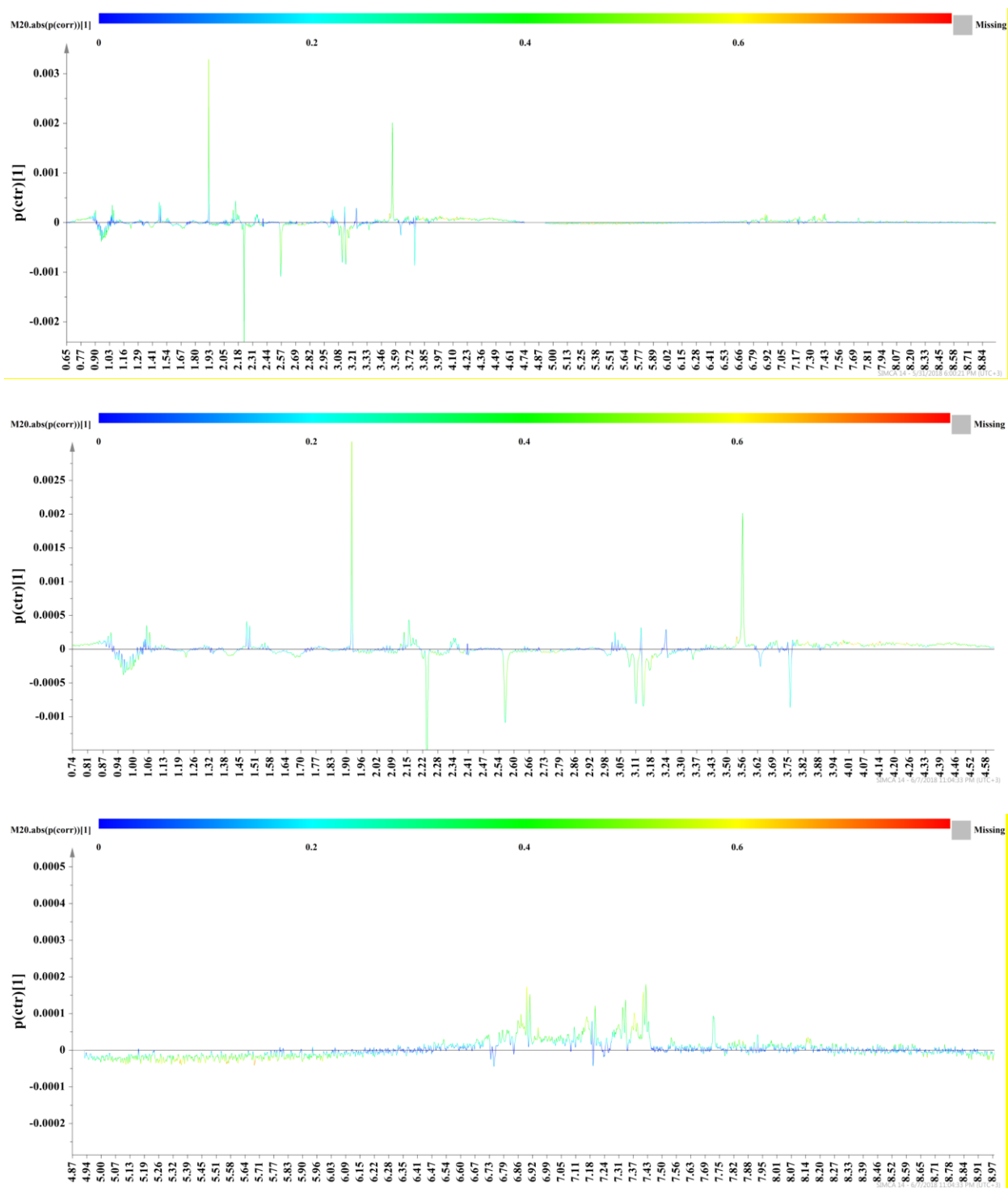


Εικόνα 24: OPLS-DA για τα δείγματα ΙΦΝΕ σε ύφεση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. $N=28$ $R^2X(\text{Cum})=0,88$, $Q^2(\text{cum})=0,67$ (πάνω), μεταθετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης (μέση) και καμπύλη ROC (κάτω).

Η προσαρμοστικότητα του μοντέλου είναι ικανοποιητική, το R^2_{cum} είναι 0,88 ($>0,5$) από τη διάκριση που παρατηρείται, αλλά και η ικανότητα πρόβλεψης Q^2_{cum} είναι μεγαλύτερη του 0,5 και η διαφορά τους είναι ίση με 0,21. Τα στατιστικά αυτά αποτελέσματα συντείνουν ότι το παραγόμενο μοντέλο είναι έγκυρο. Επιπρόσθετα, ο μεταθετικός έλεγχος που διενεργήθηκε, διασφαλίζεται στατιστικά η εγκυρότητα του μοντέλου και επαληθεύει την ομαδοποίηση των δειγμάτων.

Η καμπύλη ROC για τις δύο ομάδες παρουσιάζεται στο κάτω τμήμα της Εικόνας 24. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) τόσο για την ομάδα πριν την παρέμβαση (ομάδα Α) όσο και για την ομάδα μετά την παρέμβαση (ομάδα Β) είναι κοντά στη μονάδα (0,955 και στις δύο περιπτώσεις) δίνοντας ένα άριστο ποσοστό ορθώς θετικών τιμών στην ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

Εφόσον το μοντέλο είναι επικυρωμένο, παρήχθη το διάγραμμα S (S-line plot) (Σχήμα 12), ένα διάγραμμα που ουσιαστικά αναπαριστάνει ένα φάσμα πρωτονίου NMR αναδεικνύοντας τις φασματικές γραμμές που είναι υπεύθυνες για τη διάκριση των δειγμάτων. Το διάγραμμα ακολουθεί έναν χρωματικό κώδικα (μπλε προς κόκκινο) ανάλογα με τη συνεισφορά των φασματικών γραμμών στη διάκριση των δύο ομάδων των δειγμάτων.



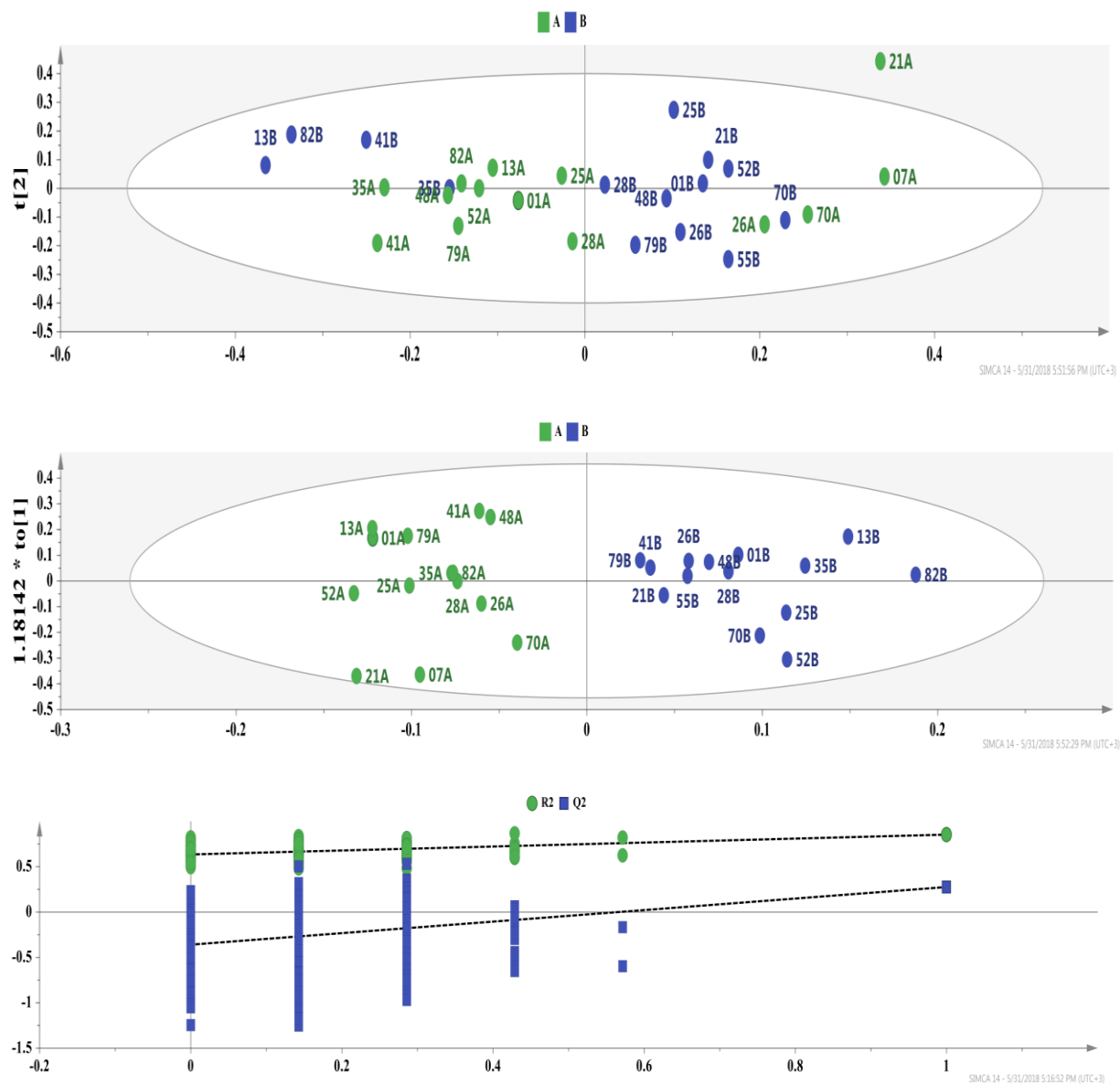
Σχήμα 11: Διάγραμμα S-Line για το μοντέλο διάκριση των δειγμάτων ΙΦΝΕ σε ύφεση πριν και μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου (πάνω) και μεγέθυσή του στην περιοχή των αλειφατικών (μέση) και αρωματικών πρωτονίων (κάτω).

Από το διάγραμμα S-Line προκύπτει ότι οι κορυφές στα περίπου 1,90 (s), 3,56 (s) , 6,86 (d), 6,90 (d) 7,20 (d), 7,30 (d), 7,43 (t), 7,75 (s) και 8,20 (t) ppm είναι αυτές που χαρακτηρίζουν τα δείγματα που τοποθετούνται στο πρώτο και τέταρτο τεταρτημόριο (δείγματα μετά την παρέμβαση στο μοντέλο), ενώ οι κορυφές στα περίπου 2,22 (s), 2,56 (s), 3,11-3,18 (q), 3,77 (s) και 6,73 (d) ppm είναι αυτές που χαρακτηρίζουν τα δείγματα που τοποθετούνται στο δεύτερο και τρίτο τεταρτημόριο (δείγματα πριν την παρέμβαση). Από αυτές, οι κορυφές που είναι χρωματισμένες με πιο έντονο κίτρινο ή πορτοκαλί χρώμα συνεισφέρουν περισσότερο στη διάκριση των ομάδων σε σχέση με αυτές που είναι χρωματισμένες με μπλε ή γαλάζιο χρώμα.

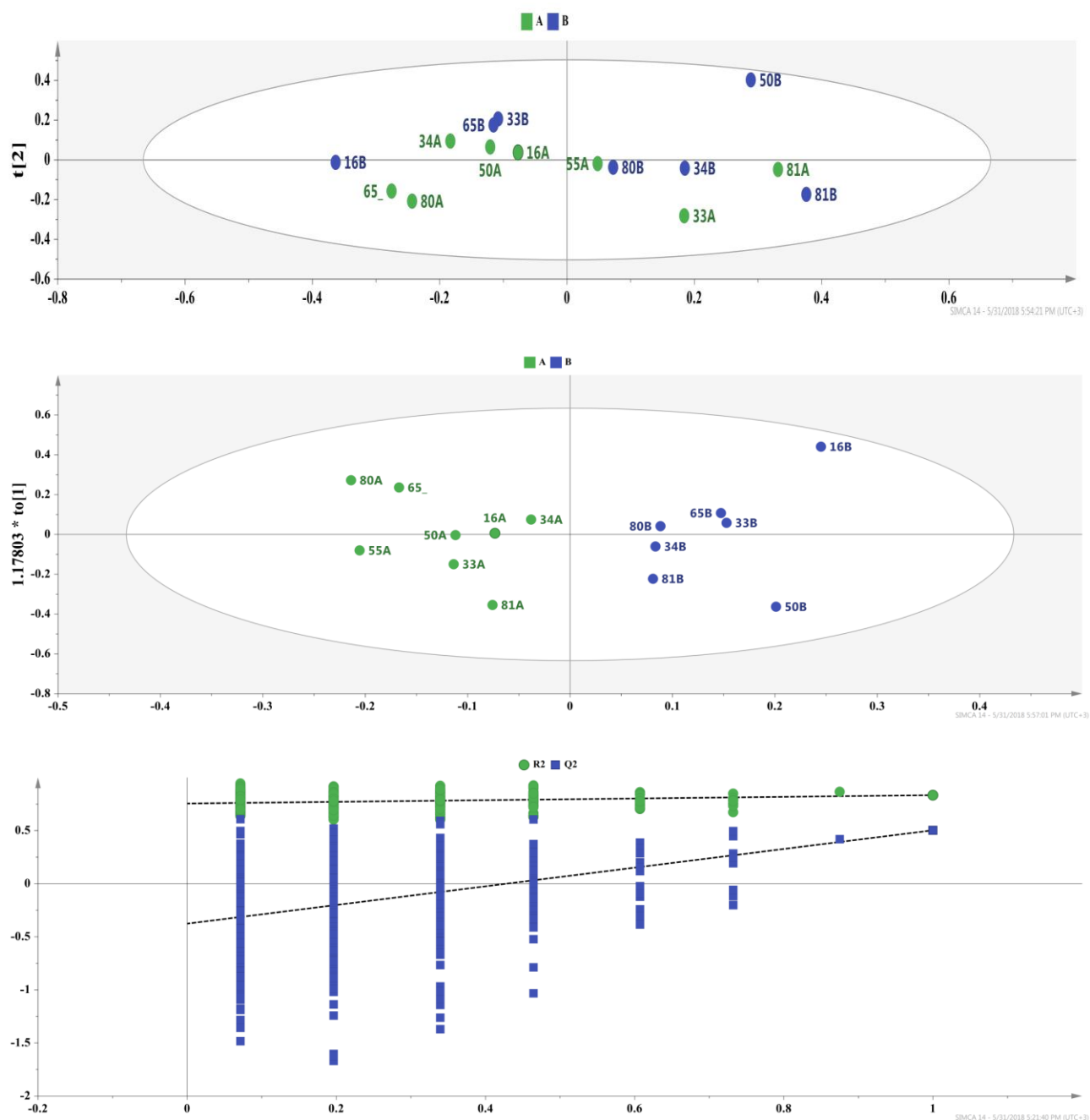
Από το διάγραμμα S προκύπτει η πληροφορία για τις κορυφές των μεταβολιτών που συνεισφέρουν στην διάκριση του στατιστικού μοντέλου.

7.1.5 Υποκατηγορίες ΙΦΝΕ σε ύφεση/έξαρση – Παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα (placebo).

Προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η διάκριση που επιτεύχθηκε στους ασθενείς με ΙΦΝΕ πριν και μετά την παρέμβαση οφείλεται πράγματι στη χορήγηση της μαστίχας Χίου μελετήθηκαν οι υποκατηγορίες των ασθενών με ΙΦΝΕ τόσο σε έξαρση όσο και σε ύφεση που έλαβαν κατά την παρέμβαση εικονικό σκεύασμα (placebo).



Εικόνα 25: (πάνω) PCA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα. $N=28$, $R2X(cum)=0,36$, $Q2(cum) = 0,21$, (μέση) OPLS-DA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, Α: πριν και Β μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. $N=28$ $R2X(Cum)=0,86$, $Q2(cum) =0,21$, και (κάτω) μεταθετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης.



Εικόνα 26: (πάνω) PCA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε ύφεση, A: πριν και B μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. $N=15$, $R2X(cum)=0,49$, $Q2(cum)=0,22$, (μέση) OPLS-DA δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση, A: πριν και B μετά την παρέμβαση με εικονικό φάρμακο. $N=15$ $R2X(Cum)=0,84$, $Q2(cum)=0,53$, και (κάτω) μεταθρετικός έλεγχος για τον έλεγχο επικύρωσης.

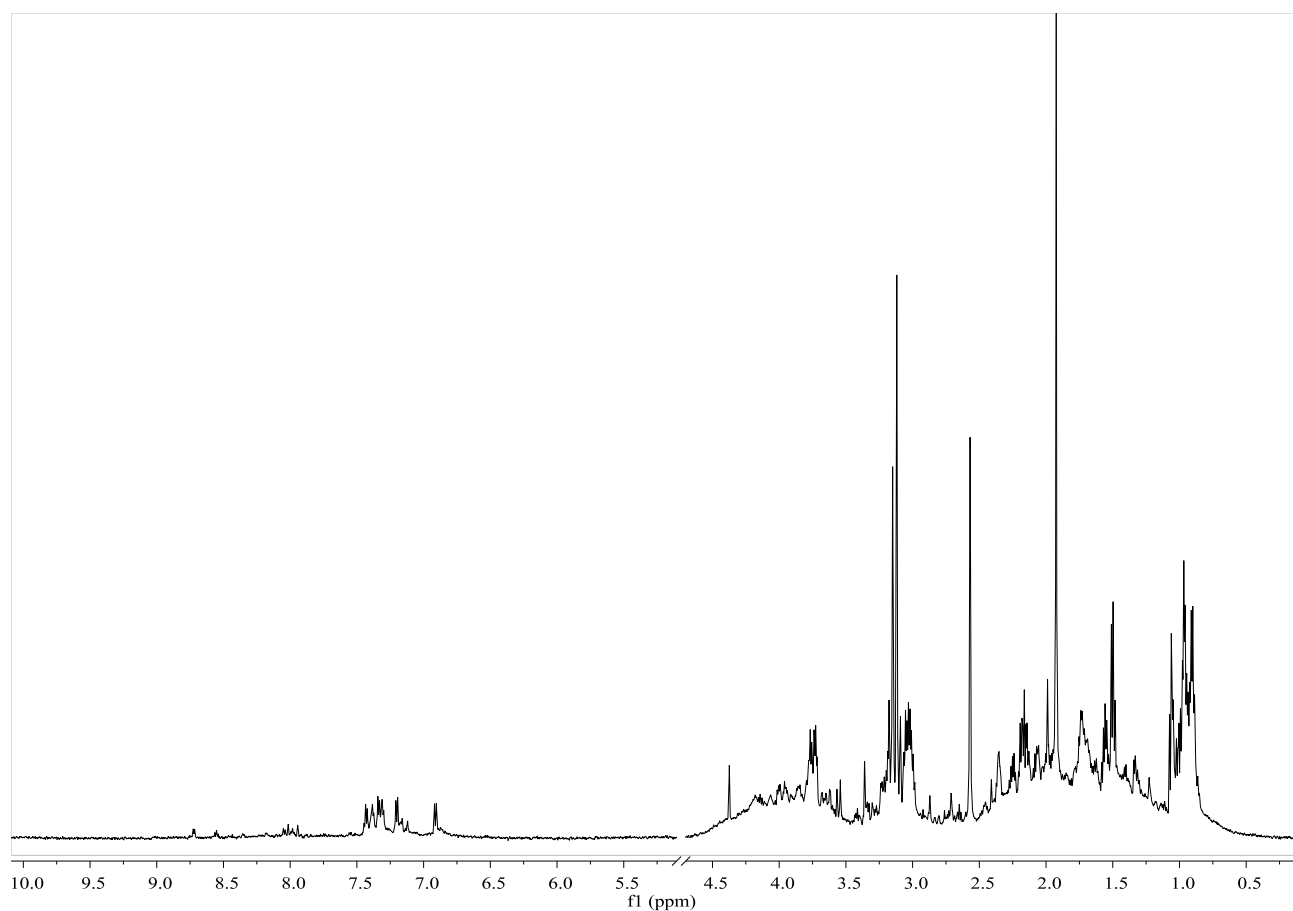
Από τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης των δειγμάτων ΙΦΝΕ σε έξαρση (Εικόνα 25), πριν και μετά την παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα, δεν προκύπτει κάποιο επικυρωμένο μοντέλο (PCA, OPLS-DA), αφού τόσο η προσαρμοστικότητα είναι χαμηλή με το $R^2X(cum) < 0.5$ όσο και η ικανότητα πρόβλεψης $Q^2(cum) < 0.5$ για το παραγόμενο μοντέλο PCA ενώ στην περίπτωση του OPLS-DA είναι μεν η προσαρμοστικότητα ικανοποιητική (0,86) ωστόσο η ικανότητα πρόβλεψης είναι πολύ χαμηλή (0,21).

Από τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης των δειγμάτων ΙΦΝΕ σε ύφεση, πριν και μετά την παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα (Εικόνα 26), η τιμή για την προσαρμοστικότητα είναι οριακά χαμηλή με το $R^2X(cum) = 0,40$ όπως και η ικανότητα πρόβλεψης $Q^2(cum) = 0,22$ για το παραγόμενο μοντέλο PCA. Στην περίπτωση του OPLS-DA η προσαρμοστικότητα και η ικανότητα πρόβλεψης είναι ικανοποιητικές (0,84 και 0,53 αντίστοιχα) ωστόσο η διαφορά των μεταξύ των τιμών είναι $0,31 > 0,2$.

Συνεπώς για καμία από τις παραπάνω κατηγορίες δεν παράχθηκε κάποιο επικυρωμένο στατιστικά μοντέλο διάκρισης σε αντίθεση με το στατιστικώς σημαντικό μοντέλο της 6μηνης παρέμβασης με Μαστίχα Χίου που υποδεικνύει την επίδρασή της στο μεταβολικό αποτύπωμα σε σχέση με το εικονικό σκεύασμα.

7.2. Αποτίμηση φασμάτων NMR και ταυτοποίηση μεταβολιτών

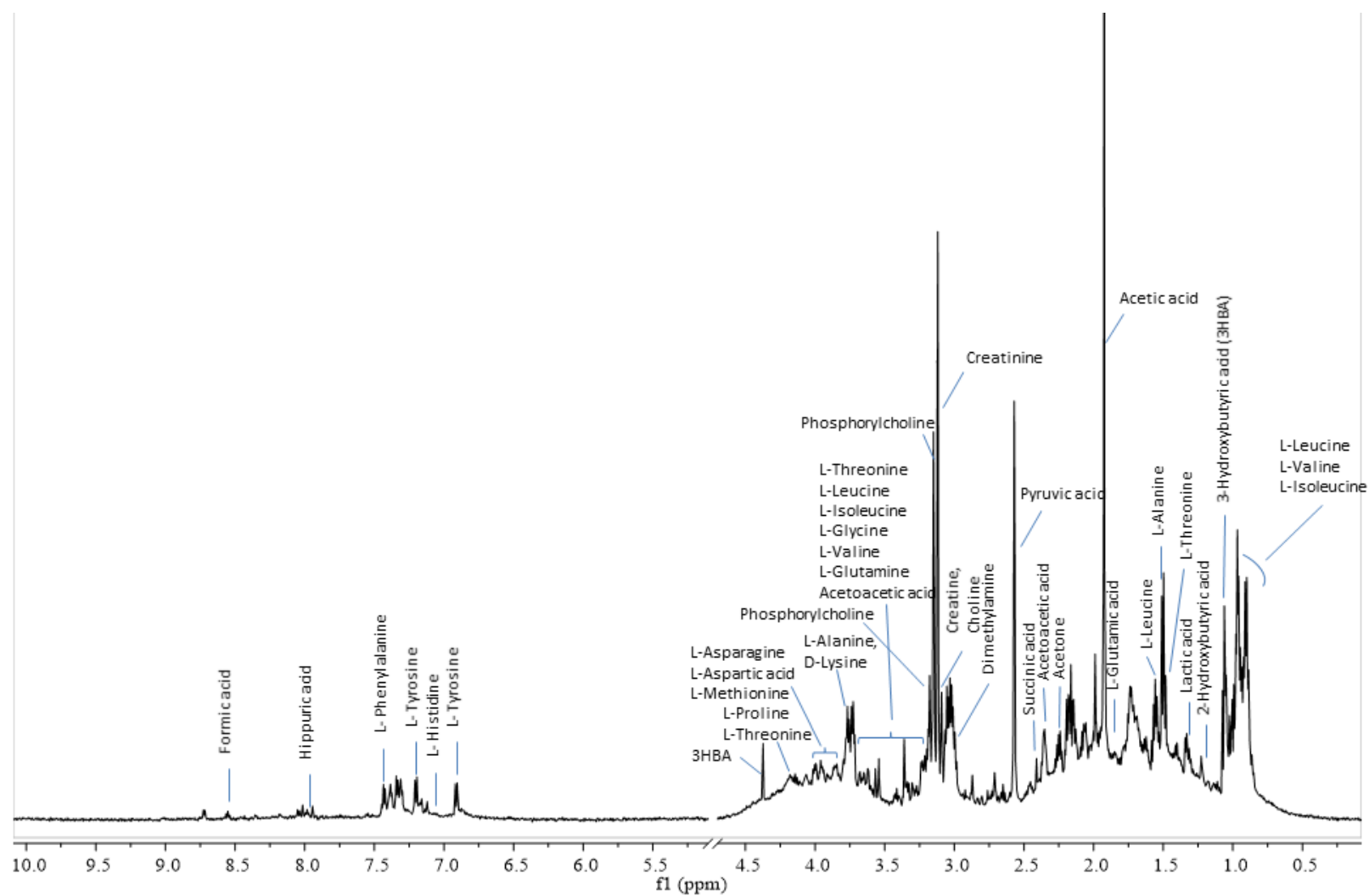
Έχοντας καταλήξει σε στατιστικό μοντέλο διάκρισης των δειγμάτων, το επόμενο βήμα είναι η ταυτοποίηση των φασματικών κορυφών του φάσματος 1D NOESY PRESAT NMR. Ένα ενδεικτικό φάσμα δίνεται στο Σχήμα 13. Υπάρχει φασματική πληροφορία τόσο στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων (0,5-3,5 ppm) όσο και στην περιοχή των αρωματικών και ετεροαρωματικών (6,5 – 9,0 ppm) πρωτονίων. Οι ευρείες κορυφές στο επίπεδο της γραμμής βάσης στην αλειφατική περιοχή οφείλονται στην παρουσία πρωτεϊνών στα δείγματα. Παρόλα αυτά, η έντασή τους δεν είναι τέτοια που να απαγορεύει την αποτίμηση των κυριότερων μεταβολιτών.



Σχήμα 12: Φάσμα 1D NOESY PRESAT του δείγματος 13A.

Η αποτίμηση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση (α) της βιβλιογραφίας, (β) βάσεων δεδομένων NMR όπως η HMDB (Human Metabolome Database, www.hmdb.ca), (γ) ενός εξειδικευμένου και αυτοματοποιημένου λογισμικού προγράμματος (Filntisi et al., 2017) που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης του ΙΒΦΧΒ/ΕΙΕ, (δ) του εμπορικού λογισμικού ChenomX και (ε) δισδιάστατων πειραμάτων NMR.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποτιμήθηκαν 37 κύριοι μεταβολίτες στα φάσματα NMR (Σχήμα 14 και Πίνακας 12) που περιλαμβάνουν κυρίως αμινοξέα, μικρού μοριακού βάρους οργανικά οξέα, δευτεροταγείς αμίνες, αλκοόλες, κ.α. . Όλοι οι μεταβολίτες έχουν βρεθεί και σε προηγούμενες μελέτες σε δείγματα κοπράνων όπως προέκυψε από έλεγχο στη βάση μεταβολιτών HMDB. Εκτός από την D-Λυσίνη που έχει ανιχνευθεί μόνο σε κόπρανα, οι υπόλοιποι είναι μεταβολίτες που συναντώνται και σε άλλα βιολογικά υποστρώματα όπως ο ορός και το πλάσμα αίματος, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, κ.ο.κ.



Σχήμα 13: Φάσμα 1D NOESYPRESAT (Δείγμα 13A) με αποτιμήσεις των κυριότερων μεταβολιτών που αποτιμήθηκαν.

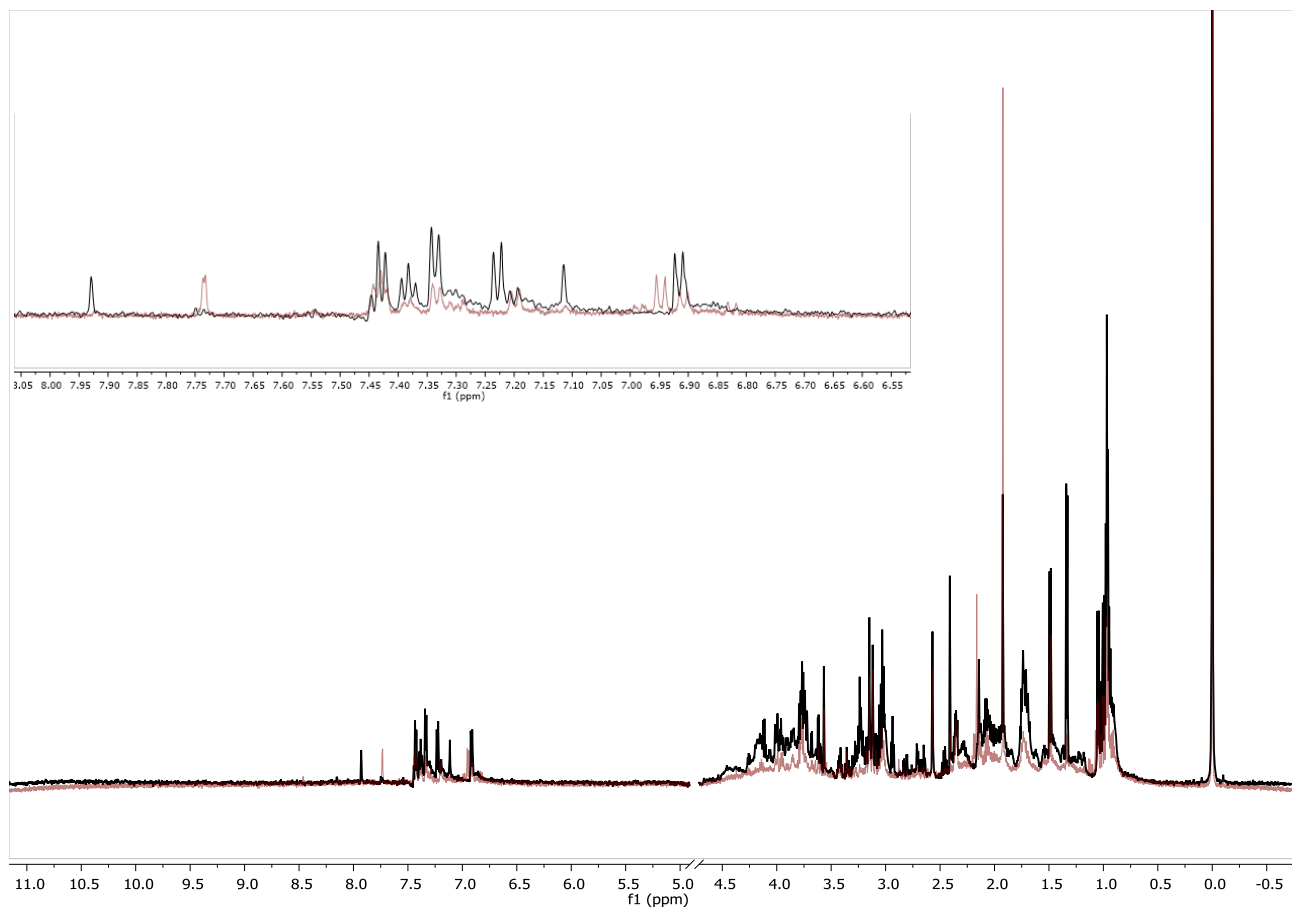
Πίνακας 11: Αποτίμηση μεταβολιτών στο φάσμα NMR.

Αριθμός	Μεταβολίτης	Χαρακτηριστικές κορυφές φάσματος ppm (πολλαπλότητα)
1	L-Γαλακτικό οξύ	1.27 (d)
2	L-Αλανίνη	1.49 (d), 3.76 (q)
3	L-Βαλίνη	0.94 (d), 0.99 (d), 2.20 (m)
4	L-Λευκίνη	0.89 (t), 1.61 (m), 3.64 (m)
5	L-Ισολευκίνη	0.96 (d), 1.01 (d), 3.68 (d), 1.29 (m), 1.46 (m), 1.99 (m)
6	L-Φαινυλαλανίνη	7.28 (d), 7.31 (m), 7.37 (m)
7	Μυρμηκικό (φορμικό) οξύ	8.55 (s)
8	L-Ιστιδίνη	7.05 (s)
9	L-Τυροσίνη	6.91 (d), 7.20 (d)
10	Χολίνη	3.09 (s)
11	Φωσφορυλοχολίνη	3.15 (s)
12	Ακετόνη	2.22 (s)
13	Οξικό οξύ	1.92 (s)
14	Ακετοξικό οξύ	2.38 (s), 3.50 (s)
15	Μεθυλαμίνη	2.48 (s)
16	Διμεθυλαμίνη	2.99 (s)
17	Κρεατίνη	3.03 (s)
18	Κρεατινίνη	3.11 (s)

19	Γλυκίνη	3.64 (s)
20	Μεθανόλη	3.36 (s)
21	Βεταΐνη	3.15 (s)
22	3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	1.38 (d), 2.42 (dd), 2.51 (dd), 4.26 (m)
23	2- Υδροξυβουτυρικό οξύ	1.24 (t)
24	Ισοβουτυρικό οξύ	1.22 (d)
25	L-Γλουταμίνη	2.58 (m), 3.87 (t), 2.20 (m)
26	L-Γλουταμινικό οξύ	2.21 (m), 1.94 (m), 2.01 (m)
27	L-Ασπαραγινικό οξύ	2.69 (dd), 2.82 (dd)
28	L-Ασπαραγίνη	2.94 (m), 2.87 (m)
29	L-Θρεονίνη	4.14 (m), 1.22 (d)
30	D-Λυσίνη	1.72 (quin), 3.01 (t), 3.77 (t), 1.46 (m), 1.93 (m)
31	L-Μεθειονίνη	2.71 (t), 3.95 (dd)
32	Ιπουρικό οξύ	7.59 (tt), 7.79 (dd), 3.91 (d)
33	L-Προλίνη	3.46 (dt), 3.55 (dt), 4.25 (dd), 2.11 (m), 2.20 (m)
34	Ηλεκτρικό (σουκινικό) οξύ	2.47 (s)
35	Πυροσταφυλικό (πυρουβικό) οξύ	2.57 (s)
36	Αιθανολαμίνη	3.18 (d), 3.84 (d)
37	D-Μαννόζη	5.31 (d)

Οι κυριότερες διαφορές μεταξύ των φασμάτων διαφορετικών δειγμάτων οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των επιμέρους μεταβολιτών. Έτσι για παράδειγμα, στο Σχήμα 15

παρουσιάζεται η σύγκριση μέσω υπέρθεσης των φασμάτων των δειγμάτων 69 B και 70 B, δηλαδή και τα δύο μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου και εικονικό σκεύασμα αντίστοιχα.



Σχήμα 14: Σύγκριση φασμάτων με υπέρθεση 69 B (κόκκινο χρώμα) και 70 B (μαύρο χρώμα). Μεγέθυνση της αρωματικής (πάνω αριστερά) περιοχής. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί με βάση την κορυφή του εσωτερικού προτύπου TSP στα 0 ppm.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 15, οι διαφορές μεταξύ των φασματικών κορυφών είναι εμφανέστερες στην αλειφατική σε σχέση με την αρωματική περιοχή και οφείλονται στο διαφορετικό μεταβολικό προφίλ του ίδιου ασθενούς μετά από 3 μήνες που πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δειγματοληψία. Προφανώς οι διαφορές στο μεταβολικό προφίλ δειγμάτων που

προέρχονται από παρέμβαση με εικονικό σκεύασμα οφείλονται σε άλλους παράγοντες όπως για παράδειγμα η διατροφή.

- **Μεταβολίτες και παρέμβαση με μαστίχα Χίου**

Από την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση της προηγούμενης ενότητας, προέκυψε ότι τα παραγόμενα μοντέλα για τους ασθενείς ΙΦΝΕ σε ύφεση πριν και μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου ήταν τα μόνα που επικυρώθηκαν με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Από το διάγραμμα S του Σχήματος 12, στο οποίο παρουσιάζονται οι σημαντικές για τη διάκριση του μοντέλου κορυφές, και με βάση την αποτίμηση των φασματικών κορυφών των φασμάτων πριν και μετά την παρέμβαση, προκύπτει ότι οι πιθανώς κύριοι υπεύθυνοι μεταβολίτες για τη διάκριση των ομάδων πριν και μετά την παρέμβαση είναι οι L- προλίνη, D- λυσίνη, L- τυροσίνη, L- φαινυλαλανίνη, L-θρεονίνη, L- Ιστιδίνη, πυροσταφυλικό οξύ, διμεθυλαμίνη, κρεατίνη, βεταίνη, 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, χολίνη και το ιππουρικό οξύ.

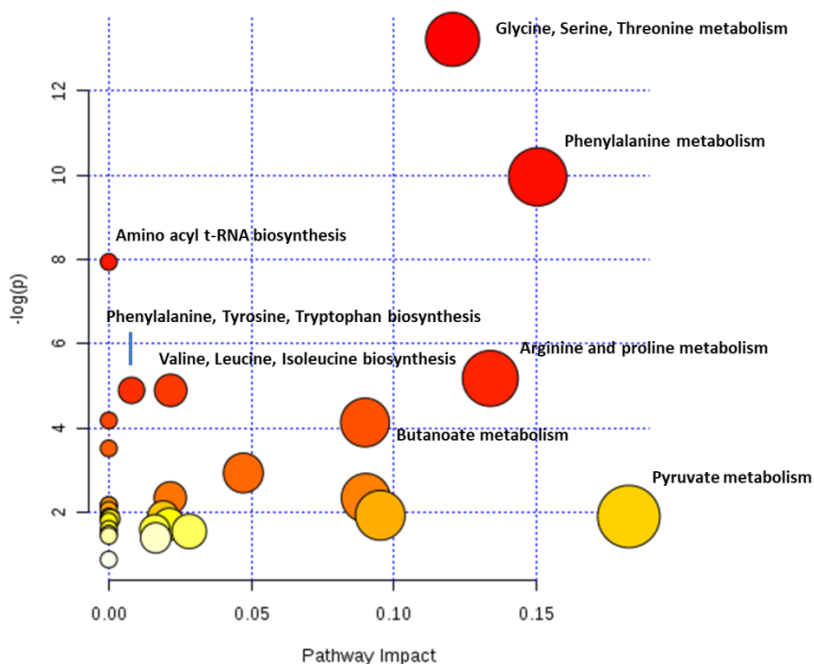
Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η υπολογιστική πλατφόρμα MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) για τη διερεύνηση των μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με τους παραπάνω μεταβολίτες. Το λογισμικό χρησιμοποιεί ανάλυση εμπλουτισμού με ταυτόχρονη ανάλυση τοπολογίας μονοπατιών. Η βασική υπόθεση σε μια ανάλυση τοπολογίας μονοπατιού (Pathway Topology Based Analysis) είναι ότι οι αλληλεπιδράσεις που περιέχονται στην τοπολογία του μονοπατιού είναι σημαντικές για τη μελέτη του συσχετισμού των αλλαγών που συμβαίνουν μεταξύ των μερών ενός μονοπατιού. Το MetaboAnalyst χρησιμοποιεί υψηλής ποιότητας μεταβολικά μονοπάτια από την KEGG. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζονται τα περισσότερο σχετικά μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με τους υπό διερεύνηση μεταβολίτες.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με τη στατιστική τους αξιολόγηση από τον οποίο προκύπτουν 9 στατιστικώς σημαντικά μονοπάτια ($p < 0,05$) (σημειώνονται στον Πίνακα με έντονη γραφή) τα οποία μεταξύ άλλων εμπλέκουν τον μεταβολισμό των αμινοξέων της γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης και φαινυλαλανίνης καθώς και τον μεταβολισμό βουτανοειδών και τη

σύνθεση και αποικοδόμηση κετονών. Κατηγοριοποίηση των ανωτέρω μονοπατιών παρουσιάζεται γραφικά στο Σχήμα 15.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα διερεύνησης μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst.

Μεταβολικό μονοπάτι	Σύνολο	Hits	Raw p	Impact
Glycine, serine and threonine metabolism	48	5	1.82E-06	0.12069
Phenylalanine metabolism	45	4	4.74E-05	0.15056
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	75	4	0.0003563	0
Arginine and proline metabolism	77	3	0.0056244	0.13394
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	27	2	0.0074642	0.008
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	27	2	0.0074642	0.02173
Nitrogen metabolism	39	2	0.015242	0
Butanoate metabolism	40	2	0.016	0.08996
Synthesis and degradation of ketone bodies	6	1	0.029573	0
Tyrosine metabolism	76	2	0.052917	0.04724
Taurine and hypotaurine metabolism	20	1	0.095485	0.02158
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	0.095485	0.09024



Σχήμα 15: Σχηματική αναπαράσταση σημαντικότητας μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στο Θεωρητικό μέρος της εργασίας (Κεφάλαιο 3) έχουν δημοσιευτεί αρκετές μελέτες μεταβολομικής που επιχειρούν να συνδέσουν την παθολογική κατάσταση της ΙΦΝΕ με το εντερικό μικροβίωμα και τις εν γένει μεταβολικές δραστηριότητες του εντέρου. Αρκετοί παραγόμενοι βακτηριακοί μεταβολίτες απορροφώνται μέσω του βλεννογόνου του παχέος εντέρου και εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία όπου μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες επιστρέφουν στο έντερο μέσω χολικής απέκκρισης όπου μεταβολίζονται εκ νέου από το εντερικό μικροβίωμα (Bajor et al., 2010). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μικροβίων-ξενιστών περιπλέκουν την ερμηνεία του προφίλ των μεταβολιτών και αυτός ο συν-μεταβολισμός εξηγεί ότι το αποτέλεσμα των αναλύσεων μεταβολομικής εξαρτάται από τη σωστή επιλογή βιολογικού δείγματος. Ο μικροβιακός μεταβολισμός αντικατοπτρίζεται καλύτερα σε προφίλ μεταβολιτών δείγματος κοπράνων σε σχέση με τα προφίλ σε δείγματα αναπνοής, ούρων και ορού αίματος όπου αντανάκλαται περισσότερο ο μεταβολισμός του ξενιστή οργανισμού (De Preter and Verbeke, 2013).

Οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ασθενών με ΙΦΝΕ στην παρούσα εργασία βρίσκονται σε ταύτιση με αυτούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Οι περισσότεροι μεταβολίτες αφορούσαν αμινοξέα (αλειφατικά, αρωματικά, διακλαδισμένα-BCAA), οργανικά οξέα, ενώ επιπρόσθετα, προσδιορίστηκαν παράγωγα λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας-SCFA όπως παράγωγα βουτυρικού οξέος (2-υδροξυβουτυρικό και 3-υδροξυβουτυρικό). Σε ότι αφορά τα αμινοξέα, σε όλες σχεδόν τις προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αμινοξέων ή μεταβολιτών τους. Τα υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων και των προϊόντων τους μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα της δυσαπορρόφησης στο λεπτό έντερο λόγω της φλεγμονής είτε αντίστροφα το αποτέλεσμα της έκκρισης αμινοξέων στο έντερο.

Στις μελέτες των Marchesi et al. (2007) και Bjerrum et al. (2015), υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων και χαμηλότερα επίπεδα λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFA) βρέθηκαν στα εκχυλίσματα κοπράνων ασθενών με ΙΦΝΕ σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό ελέγχου. Η μείωση των SCFA στους ασθενείς έναντι του υγιούς πληθυσμού έχει περιγραφεί συχνά τα τελευταία

χρόνια. Μειωμένα επίπεδα SCFA στα κόπρανα έχουν συνδεθεί με μείωση των βακτηριακών στελεχών που παράγουν βουτυρικό οξύ (Joossens et al., 2011; Machiels et al., 2014). Τα SCFA λειτουργούν ευεργετικά καθώς αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Cummings, 1981). Για τη δημιουργία λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), κύρια συνεισφορά έχουν τα μεταβολικά μονοπάτια των υδατανθράκων.

Συγκεκριμένα, το βουτυρικό οξύ, χαρακτηριστικό SCFA, εκτός από πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που ενισχύουν την προστασία των επιθηλιακών φραγμών (Hamer et al., 2008). Στη μελέτη των Le Gall et al. (2011), χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από κόπρανα και φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή μείωση των επιπέδων SCFA και των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσού (BCFA). Τα BCFA (ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό και 2-μεθυλοβουτυρικό) παράγονται μέσω οξείδωσης βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, αντίστοιχα (Smith and Macfarlane, 1997).

Ταυτόχρονα, ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών δημιουργεί μια ποικιλία μεταβολιτών όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσού, οι θειούχες ενώσεις και οι αμίνες (Smith et al., 1996; Windey et al., 2012). Πράγματι, αμίνες όπως η χολίνη, η φωσφορυλοχολίνη, η μεθυλαμίνη και η διμεθυλαμίνη ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία στα δείγματα των ασθενών με ΙΦΝΕ. Ιδιαίτερα η χολίνη, έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους πιο σημαντικούς μεταβολικούς βιοδείκτες, μαζί με την καρνοσίνη και τη ριβόζη, που σχετίζονται με τα επίπεδα της φλεγμονής στη νόσο Crohn (Kolho et al., 2017).

Η D-λυσίνη που ανιχνεύθηκε σε κόπρανα ασθενών με ΙΦΝΕ, έχει προσδιοριστεί μόνο σε κόπρανα από νεογνά και σε κανένα άλλο βιολογικό υπόστρωμα σύμφωνα με τα δεδομένα της βάσης HMDB. Συγκεκριμένα, η D-λυσίνη έχει προσδιοριστεί στο παρελθόν (Poroyko et al., 2011) με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) σε λυοφυλιωμένα δείγματα κοπράνων από βρέφη (0-1 ετών) που είχαν σιτιστεί με εμπορική φόρμουλα γάλακτος. Η μελέτη κατέδειξε ότι η διατροφή του νεογνού με εμπορική φόρμουλα είναι ικανή να δημιουργήσει εντεροκολίτιδες στο «ανώριμο νεογνικό έντερο» σε σχέση με το μητρικό γάλα που επιδρά προστατευτικά.

Ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης αποτελεί η ταυτοποίηση του αμινοξέος βεταΐνη που προέρχεται είτε από τη διατροφή είτε από οδείδωση της χολίνης. Η ανεπάρκεια σε βεταΐνη έχει συσχετιστεί με μεταβολικό σύνδρομο, διαταραχές των λιπιδίων, διαβήτη και άλλες ασθένειες (Lever and Slow, 2010). Η βεταΐνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ηπατικών και γαστρεντερικών διαταραχών (Martindale, The Extra Pharmacopoeia). Ενδιαφέρουσα είναι η συσχέτιση της βεταΐνης με τις ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα, έχει προσδιοριστεί σε παιδιά και εφήβους 6 έως 18 ετών με διαγνωσμένη νόσο Crohn ή ελκώδους κολίτιδας (Kolho et al., 2017).

Η παρέμβαση με μαστίχα Χίου βρέθηκε να επηρεάζει μεταβολίτες που σχετίζονται με το μεταβολισμό των αμινοξέων και ιδιαίτερα της γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης, φαινυλαλανίνης, αργινίνης και προλίνης, τη βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA, καθώς και τον μεταβολισμό βουτανονιδίων και τη βιοσύνθεση και αποικοδόμηση κετονών. Από την εφαρμογή της πλατφόρμας MetaboAnalyst προέκυψαν στατιστικώς σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια που φαίνεται να εμπλέκονται στις μεταβολικές διεργασίες κατά την παρέμβαση.

Ως υπόθεση εργασίας, η αποδεδειγμένη αντιφλεγμονώδης δράση των φυτοχημικών συστατικών της μαστίχας, και ιδιαίτερα των τερπενικών αναλόγων της, αναμένεται να έχει αρνητική επίδραση στις συγκεντρώσεις των μεταβολικών δεικτών της φλεγμονής, όπως αυτοί έχουν προσδιοριστεί από πλήθος μελετών.

Αυξημένα επίπεδα του αρωματικού αμινοξέος θρυπτοφάνη μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου υποδεικνύει την επαναφορά του μεταβολισμού σε φυσιολογικά επίπεδα, που πιθανώς σχετίζεται με περαιτέρω ύφεση των ΙΦΝΕ. Προηγούμενη μελέτη έχει συσχετίσει την αύξηση του μεταβολισμού της θρυπτοφάνης σε κυνουρενικό οξύ με αποτέλεσμα την αναμενόμενη μείωση των συγκεντρώσεων θρυπτοφάνης σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Kolho et al., 2017), αν και σε κάποιες περιπτώσεις αυτό δεν παρατηρείται λόγω της εντερικής δυσαπορρόφησης (Bosch et al., 2018).

Από τα πλέον ενδιαφέροντα ευρήματα αποτελεί η ταυτοποίηση του υπουρικού οξέος ως χαρακτηριστικός μεταβολίτης των δειγμάτων μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου. Το υπουρικό οξύ οφείλεται σε βακτηριακό μεταβολισμό. Συγκεκριμένα, το υπουρικό έχει συνδεθεί με την παρουσία βακτηρίων του είδους Clostridia στο έντερο (Storr et al., 2013), η σχετική αφθονία των

οποίων έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα της εντερικής φλεγμονής (Kolho et al., 2017) και ο πληθυσμός τους είναι μειωμένος σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (Rajilić-Stojanović et al., 2013). Στη νόσο Crohn τα χαμηλά επίπεδα του ιππουρικού οξέος προκύπτουν από διαφοροποιημένο μικροβιακό μεταβολισμό (Williams et al. 2010).

Τα αυξημένα επίπεδά του μετά την παρέμβαση με μαστίχα Χίου μπορεί εν μέρει να συνδεθεί με τα φυτοχημικά συστατικά της μαστίχας, αφού αύξησή του στα ούρα έχει σχετιστεί με την αυξημένη κατανάλωση φαινολικών συστατικών από το τσάι, το κρασί και οι χυμοί φρούτων.

Παρόλα αυτά, επειδή η συγκέντρωση του ιππουρικού σχετίζεται και με τον δείκτη μάζας σώματος, ενδιαφέρον θα είχε και η συσχέτισή του με διατροφικούς δείκτες, κάτι όμως που ξεφεύγει από τους στόχους της παρούσας εργασίας.

- **Περιορισμοί**

Η παρούσα μελέτη, πέρα από τα χρήσιμα συμπεράσματα ανέδειξε και περιορισμούς με βάση τους οποίους θα πρέπει να σχεδιαστεί οποιαδήποτε περαιτέρω μελέτη. Συγκεκριμένα, πέρα από την χρήση κοπράνων ως του καταλληλότερου βιολογικού δείγματος, ενδιαφέρον θα είχε η σύζευξη των αποτελεσμάτων μεταβολομικής και από δείγματα ούρων καθώς πολλοί μικροβιακοί μεταβολίτες εκκρίνονται στα ούρα, είτε απευθείας είτε ως αποτέλεσμα ενζυμικής επεξεργασίας. Παράλληλα, σύγκριση των αποτελεσμάτων θα είχε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί και σε δείγματα ορού και πλάσματος αίματος, υποστρώματα που παρουσιάζουν εντελώς διαφορετικό μεταβολικό προφίλ από το αντίστοιχο των κοπράνων και των ούρων, κυρίως επειδή το αίμα και τα ούρα αντανakλούν μεταβολικές αλλαγές του ξενιστή παρά της μικροβιακής δραστηριότητας στο έντερο. Σε σύγκριση με το προφίλ των ούρων και των κοπράνων, το προφίλ των μεταβολιτών στον ορό ή στο πλάσμα αίματος επηρεάζονται λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lenz et al., 2003), ενώ επικεντρώνονται κυρίως στον μεταβολισμό των λιπιδίων και σε ορισμένα προϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων (Schicho et al., 2012; Dawiskiba et al., 2014; Williams et al., 2012; Zhang et al., 2013; Ooi et al., 2011).

Ένα επιπρόσθετος περιορισμός αφορά τη χρήση της τεχνικής NMR που όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, χαρακτηρίζεται μεν από πολλά πλεονεκτήματα, όπως η επαναληψιμότητά

της, ωστόσο δεν είναι ικανή να ανιχνεύσει ενώσεις σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (χαμηλά επίπεδα micromolar ή και nanomolar). Σε περίπτωση που μια μελέτη πρέπει να εστιάσει σε τυχόν μεταβολίτες των δραστικών συστατικών του συμπληρώματος της παρέμβασης ή σε μεταβολίτες που εκφράζονται λόγω της παρουσίας των βιοδραστικών αυτών συστατικών θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με χρήση φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometry) συζευγμένη με υγρή ή αέρια χρωματογραφία.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην ενότητα των αποτελεσμάτων, το γεγονός ότι σε αρκετά από τα παραχθέντα στατιστικά μοντέλα παρατηρήθηκε η επίδραση της παραλλακτικότητας ως συγχυτικός παράγοντας υποστηρίζεται και από το ότι διαφορετικά βακτήρια της ανθρώπινης μικροχλωρίδας μπορούν να εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες και να μεταβολίζουν το ίδιο υπόστρωμα, δημιουργώντας έτσι παρόμοιους μεταβολίτες (Mahowald et al., 2009). Επομένως, όχι μόνο η σύνθεση αλλά και η λειτουργική ικανότητα του εντερικού μικροβιώματος είναι εξαιρετικά σημαντική όσον αφορά τις ΙΦΝΕ.

- **Συμπεράσματα**

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ήδη αρκετές δημοσιευμένες μελέτες μεταβολομικής στην διάγνωση και τη θεραπεία στις ΙΦΝΕ. Οι περισσότερες εστιάζουν στη νόσο Crohn ή στην ελκώδη κολίτιδα σε σύγκριση με έναν υγιή πληθυσμό ελέγχου προτείνοντας στατιστικά μοντέλα διάκρισης αλλά και στην αιτιολόγηση μηχανισμών παθογένειας με βάση εμπλεκόμενα μεταβολικά μονοπάτια. Άλλες μελέτες επικεντρώνονται στην διαφοροποίηση των υποτύπων της νόσου, ενώ αρκετές προσπαθούν να εντοπίσουν διαφορές σχετιζόμενες με την ενεργότητα της νόσου. Λίγες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση μεταβολομικής σε υπόστρωμα κοπράνων για μελέτη ΙΦΝΕ και ελάχιστες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε επίπεδο κλινικής παρέμβασης και βάση την αναζήτηση που πραγματοποιήθηκε, καμία σε επίπεδο λήψης συμπληρώματος διατροφής. Η καινοτομία της παρούσας εργασίας έγκειται ακριβώς στο επίπεδο της μελέτης της παρέμβασης σε βιολογικό υπόστρωμα κοπράνων με ένα φυσικό προϊόν, τη μαστίχα Χίου.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προέκυψε ότι η λήψη μαστίχας Χίου στα επίπεδα που χορηγήθηκε κατά την κλινική παρέμβαση, είχε επίδραση στο μεταβολικό προφίλ ασθενών με ΙΦΝΕ μόνον όμως στην ομάδα που αφορούσε ασθενείς σε ύφεση. Το γεγονός αυτό αιτιολογείται από τον σχεδιασμό της μελέτης, καθώς οι ασθενείς που βρίσκονται σε έξαρση πριν την παρέμβαση, λαμβάνουν το σκεύασμα για το μισό χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτούς που βρίσκονται σε ύφεση, δηλαδή για 3 μήνες έναντι 6 μηνών για τους ασθενείς σε ύφεση.

Παρόλο που κρίνεται αναγκαία η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής με αποτελέσματα στοχευμένων αναλύσεων/μετρήσεων πρωτεϊνικών δεικτών φλεγμονής πριν και μετά την παρέμβαση, καθώς και αντίστοιχων παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών, εντούτοις, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν τη θετική επίδραση της μαστίχας στο μεταβολικό αποτύπωμα των κοπράνων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aksoy A., Duran N., Toroglu S., Koksai F. Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients. *Angle Orthodontist* 2007;77:124-128
- Albenberg L. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota in humans and mice. *Gastroenterology* 2014;147:1055–1063
- Aloi M., Nuti F., Stronati L., Cucchiara S. Advances in the medical management of paediatric IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014;11:99–108
- Ananthakrishnan A, Bernstein C., Iliopoulos D., Macpherson A., Neurath M., Raja A., Vavricka S., Fiocchi C. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018; 15:39–49
- Ananthakrishnan A. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013;145:970–977
- Ananthakrishnan A. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2015;12(4):205-17.
- Ananthakrishnan A. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012;142:482–489
- Ananthakrishnan A. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2014;63:776–784
- Ananthakrishnan A. Zinc intake and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Int. J. Epidemiol.* 2015;44:1995–2005
- Ananthakrishnan A., McGinley L., Binion G., Saeian A. Air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflammation Bowel Disease* 2011;17:1138–1145
- Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetics* 2011;43:246–52.
- Andreadou I. "Pistacia lentiscus L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. *Phytomedicine* 2016;23(11):1220-6.

- Andrikopoulos N.K., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res* 2003;17:501-07.
- Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002;252:475-96.
- Assa A. Mucosa-associated ileal microbiota in new-onset pediatric crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 2016;22:1533–1539
- Babickova J. Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2015;21(40):11321
- Bajor A, Gillberg PG, Abrahamsson H. Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 645–664
- Balan K.V., Prince J., Han Z., Dimas K., Cladaras M., Wyche J.H., Sitaras N.M., Pantazis P. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. *Phytotherapy* 2007;14:263-272
- Balasubramanian K, Kumar S, Singh RR. Metabolism of the colonic mucosa in patients with inflammatory bowel diseases: an in vitro proton magnetic resonance spectroscopy study. *Magn Reson Imaging* 2009;27:79–86
- Barclay R. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J. Pediatr.* 2009;155:421–426
- Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z. IBD around the world: Comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: Proceedings of the world digestive health-- inflammatory bowel disease task force meeting. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:639-644
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-1640
- Baumgart M. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.* 2007;1:403–418

Benchimol EI, Manuel DG. Asthma, type 1 and type 2 diabetes mellitus, and inflammatory bowel disease amongst South Asian immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *PLoS One* 2015;10:e0123599.

Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP. CARD15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840 -846

Bjerrum JT, Nielsen OH, Hao F, Tang H, Nicholson JK, Wang Y, Olsen J. Metabonomics in ulcerative colitis: diagnostics, biomarker identification, and insight into the pathophysiology. *J Proteome Res* 2010;9:954–962

Bjerrum JT, Wang Y, Hao F, Coskun M, Ludwig C, Gunther U, Nielsen OH. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. *Metabolomics* 2015;11:122–133

Bosch, Sofiede Meij, Tim G.J.de Boer, Nanne. Altered Tryptophan Levels in Patients With Inflammatory Bowel Disease Owing to Colonic Leakage, Metabolism, or Malabsorption? *Gastroenterology* 2018; 154 (6):1855 -1856

Boudeau J., Glasser A. L., Masseret E., Joly B., Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 1999;67:4499–4509

Bull M., Plummer N. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Human Gut Microbiome Medicine* 2014;13:6

Buning C, Lochs H. Conventional therapy for Crohn's disease. *World journal of gastroenterology* 2006;12(30):4794-806

Busch K, Ludvigsson JF, Ekstrom-Smedby K, Ekbom A, Askling J, Neovius M. Nationwide prevalence of inflammatory bowel disease in Sweden: a population-based register study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:57–68

Cecil. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Στο: Παθολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις 5η έκδοση, 2003: 420-25

Chan S. Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014;39:834–842

Chassaing B., Darfeuille-Michaud A. The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1720-1728

Chassaing B. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 2015;519:92–96

Chiaro T. R. A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice. *Sci. Transl Med.* 2017;9:9044

Cleynen I., Boucher G., Jostins L., Schumm L. P., Zeissig S., Ahmad T., Brant S. R. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *The Lancet* 2016;387(10014):156-167

Cohen RD, Yu AP, Wu EQ, Xie J, Mulani PM, Chao J. Systematic review: the costs of ulcerative colitis in Western countries. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:693-707

Cosnes J, Cattan S, Blain A. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2002; 8:244-250.

Coward S, Clement F, Williamson T. The rising burden of inflammatory bowel disease in North America from 2015 to 2025: a predictive model. *Am J Gastroenterol* 2015; 110 (suppl 1):1959

Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia Coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-421

Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, Zabek A, Jawien E, Pawelka D, Banasik M, Mastalerz- Migas A, Balcerzak W, Kaliszewski K, Skora J, Barc P, Korta K, Pormanczuk K, Szyber P, Litarski A, Mlynarz P. Serum and urine metabolomics fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2014;20:163–174

De Cruz P, Prideaux L, Wagner J, Ng SC, Mc- Sweeney C, Kirkwood C, Morrison M, Kamm MA. Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:372–390

De Filippo C. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2010;107: 14691–14696

De Preter V, Machiels K, Joossens M, Arijis I, Matthys C, Vermeire S, Rutgeerts P, Verbeke K. Faecal metabolite profiling identifies medium- chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut* 2015;64:447–458

- De Preter V, Verbeke K. Metabolomics as a diagnostic tool in gastroenterology. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2013;4:97–107
- De Silva P. S. An association between dietary arachidonic acid, measured in adipose tissue, and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2010;139:1912–1917
- Dedoussis G. V., Kaliora A. C., Psarras S., Chiou A., Mylona A., Papadopoulos N. G., Andrikopoulos N.K. Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* 2004;174(2):293-303
- Desilets M., Deng X., Rao C., Ensminger A., Krause D., Sherman P., Gray-Owen S. Genome-based Definition of an Inflammatory Bowel Disease-associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Pathovar. *Inflammatory Bowel Diseases* 2016;22(1):1-12
- Dethlefsen L., Relman D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2011;108:4554–4561
- D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132:763-786
- Dharmani P., Strauss J., Ambrose C., Allen-Vercoe E., Chadee, K. *Fusobacterium nucleatum* infection of colonic cells stimulates MUC2 mucin and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 2011;79:2597–2607
- Dietrich D.R., Swenberg J.A. The presence of $\alpha(2u)$ -globulin is necessary for dlimonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Research* 1991;51:3512-3521
- Dignass A, Eliakim R, Magro F. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & Colitis* 2012;6:965 -990
- Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lemann M, Soderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's & colitis* 2010;4(1):28-62
- Dotan I, Fishman S, Dgani Y, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 131: 366-378
- Duerr RH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461– 1463

- Elegbede J.A., Elson C.E., Tanner M.A. Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. *Journal of the National Cancer Institute* 1986;76:323-325
- Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB and Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 2359-2370
- Evenepoel P, Meijers BK, Bammens BR, Verbeke K. Uremic toxins originating from colonic microbial metabolism. *Kidney Int Suppl* 2009;114:12–19
- Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002;359:331-40
- Filntisi A., Fotakis C., Asvestas P., Matsopoulos G., Zoumpoulakis P., Cavouras D., Automated metabolite identification from biological fluid 1H NMR spectra. *Metabolomics* 2017;13:146
- Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:1118–25
- Gao J, Li G, Huang H, Zhang K, Wang J. A new tetracyclic triterpenoid compound from Mastich. *J Asian Nat Prod Res* 2013;15(4):400-403
- Gevers D. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014;15:382–392
- Gioxari A, Kaliora A, Papalois A, Agrogiannis G, Triantafillidis J, Andrikopoulos. Pistacia lentiscus resin regulates intestinal damage and inflammation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Med Food* 2011;14(11):1403-1411
- Glover L. E., Lee J. S., Colgan S. P. Oxygen metabolism and barrier regulation in the intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* 2016;126:3680–3688
- Goodacre R., Broadhurst D., Smilde A. K., Kristal B. S., Baker J. D., Beger R., Bessant C., Connor S., Capuani G., Craig A., Ebbels T. , Kell Do. B., Manetti C., Newton J., Paternostro G., Somorjai R., Sjöström M., Trygg J., Wulfer F. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* 2007;3:231–241
- Guo A. Y. Early life environment and natural history of inflammatory bowel diseases. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:216

- Hakim I.A., Harris R.B., Ritenbaugh C. Citrus peel use is associated with reduced risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Nutrition and Cancer* 2000;37:161-168
- Halfvarson J. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat. Microbiol.* 2017;2:17004
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:104–119
- Hansen R. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2012;107:1913–1922
- Harrison: Εισαγωγή στο ανοσιακό σύστημα. Στο: Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 16η έκδοση. Ελληνική έκδοση 2005
- He M.L. Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(4):567-72
- Hein R, Koster I, Bollschweiler E, Schubert I. Prevalence of inflammatory bowel disease: estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. *Scand J Gastroenterol* 2014;49:1325–35
- Hendrickson B.A., Gokhale R., Cho J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol* 2002;15:79-95
- Hicks LC, Ralphs SJ, Williams HR. Metabonomics and diagnostics. *Methods Mol Biol* 2015;1277:233–244
- Hursting S.D., Perkins S.N., Haines D.C., Ward J.M., Phang J.M. Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer Research* 1995;55:3949-3953
- Huwez F.U., Thirlwell D., Cockayne A., Ala'Aldeen D.A.A. Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. *New England Journal of Medicine* 1998;339:1946
- Iliev I. D. et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 2012;336:1314–1317
- Ivanisevic J., Siuzdak G. The Role of Metabolomics in Brain Metabolism Research. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10:391–395

- Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca. J Ethnopharm 2002;83:135-138
- Jantchou, P., Morois, S., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C. & Carbonnel, F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study. Am. J. Gastroenterol. 2010;105:2195–2201
- Johnels D., Edlund U., Grahn H., Hellberg S., Sjöström M., Wold S., Clementi S., Dunn III W. J. Clustering of aryl carbon-13 nuclear magnetic resonance substituent chemical shifts. A multivariate data analysis using principal components. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1983;2:863
- Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. Gut 2011;60:631–637
- Joossens S, Reinisch W, Vermeire S. The value of serologic markers in indeterminate colitis: A prospective follow-up study. Gastroenterology 2002;122:1242 -1247
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature 2012; 491491:119 -124
- Kahrstrom C. T., Pariente N., Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. Nature 2016;535:47
- Kaliora A. C, Mylona A, Chiou A, Petsios D. G, Andrikopoulos N. K. Detection and identification of simple phenolics in Pistacia lentiscus resin. J Liq Chromatogr & Rel Technol 2004;27:289-300
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V.Z., Andrikopoulos N.K. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. World Journal of Gastroenterology (2007B);13:6031-6036
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., Dedoussis G.V.Z., Andrikopoulos N.K. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. World Journal of Gastroenterology (2007A);13:748-753
- Kanani H, Chrysanthopoulos P., Klapa M. Standardizing GC-MS Metabolomics. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2008;71(2):191–201
- Kaplan GG, Ng SC. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2017;152:313–21

- Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;12:720–727
- Kaplan GG. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105:2412–2419
- Kaplan GG., Ng S.C. Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2016;1:307–316
- Khan K. J. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol.* 2011;106:661–673
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307-317
- Kim HJ, Hann HJ, Hong SN, et al. Incidence and natural course of inflammatory bowel disease in Korea, 2006–2012: a nationwide population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:623–30
- Kim M. K., Lee C.-H. A Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p16INK4A, Induces Apoptosis in the Human Cancer Cells. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004;32:72-77
- Kitani A., Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunology* 2008;1:43-46
- Klement E., Cohen R. V., Boxman J., Joseph A., Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;80:1342–1352
- Kolho KL., Pessia A., Jaakkola T., De Vos WM., Velagapudi V. Faecal and Serum Metabolomics in Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2017;11(3):321-334
- Kostic, A., Xavier, R. and Gevers, D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* 2014;146(6):1489-1499
- Kottakis F., Befani C., Asiminas A., Kontou M., Koliakos G., Choli-Papadopoulou T. The C-terminal region of HPNAP activates neutrophils and promotes their adhesion to endothelial cells. *Helicobacter* 2009;14:177-179
- Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7681–7685

- Ksiadzyna D, Semianow-Wejchert J, Nawrot U, Włodarczyk K, Paradowski L. Serum concentration of interleukin 10, anti-mannan *Candida* antibodies and the fungal colonization of the gastrointestinal tract in patients with ulcerative colitis. *Adv Med Sci.* 2009;54:170-176
- Kucharzik T, Maaser C, Luger A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W. Recent understanding of IBD pathogenesis: Implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006;18:1068-83
- Kurti Z, Vegh Z, Golovics PA. Nationwide prevalence and drug treatment practices of inflammatory bowel diseases in Hungary: a population-based study based on the National Health Insurance Fund database. *Dig Liver Dis* 2016;48:1302–07
- Ladas SD, Mallas E, Giorgiotis K, Karamanolis G, Trigonis D, Markadas A, Sipsa V, Raptis SA. Incidence of ulcerative colitis in Central Greece: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2005;11:1785-7
- Le Gall G, Noor SO, Ridgway K, Scovell L, Jamieson C, Johnson IT, Colquhoun IJ, Kemsley EK, Narbad A. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Proteome Res* 2011;10: 4208–4218
- Lennard-Jones JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of europe. Ec-IBD study group. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9:353-359
- Lenz EM., Bright J., Wilson ID., Morgan SR., Nash AF. A 1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2003;33:1103–1115
- Lever M., Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem.* 2010;43(9):732-44
- Lewis J. D. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn’s disease. *Cell Host Microbe* 2015;18:489–500
- Liguori G. Fungal dysbiosis in mucosa associated microbiota of Crohn’s disease patients. *J. Crohns Colitis* 2016;10:296–305
- Lin-Jing Li, Chen Gong, Mei-Hua Zhao, and Bai-Sui Feng. Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(48):18177–18188

Liverani E., Scaioli E., Cardamone C., Dal Monte P., Belluzzi, A. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? World J. Gastroenterol. 2014;20:13060–13070

Lockhart-Mummery HE, Morson BC. Crohn's disease of the large intestine. Gut. 1964; 5:493-509

Loizou S., Paraschos S., Mitakou S., Chrousos G.P., Lekakis I., Moutsatsou P. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. Experimental biology and medicine 2009;234:553-561

Lynch S. V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. N. Engl. J. Med. 2016;375:2369–2379

Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. Crit Rev Clin Lab Sci. 2009;46(1):25-54

Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis I., Eeckhaut V., Ballet V., Claes K., Van Immerseel .F, Verbeke K., Ferrante M., Verhaegen ., Rutgeerts P., Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species roseburia hominis and faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. Gut 2014;63:1275–1283

Magiatis P. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. Planta Med 1999;65(8):749-52

Magin W.S., Van Kruiningen H.J., Colombel J F. Immunohistochemical search for viral and bacterial antigens in Crohn's disease. J. Crohns Colitis 2013;7:161–166

Mahmoud N., Rombeau J., Ross HM., Fry RD. Colon and rectum. In Townsend JR CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, editors. Sabiston Textbook of Surgery.17th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004;1401-1482

Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H., Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A., Shah N., Wang C., Magrini V., Wilson RK, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B., Crock LW, Russell A., Verberkmoes NC, Hettich RL, Gordon JI. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc Natl Acad Sci 2009;106:5859–5864

Marchesi JR, Holmes E., Khan F., Kochhar S., Scanlan P., Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. J Proteome Res 2007;6:546–551

- Marone P., Bono L., Leone E., Bona S., Carretto E., Perversi L. Bactericidal activity of Pistacia lentiscus mastic gum against Helicobacter pylori. Journal of Chemotherapy 2001;13:611-614
- Martín R. Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. BMC Microbiology 2015;15:67
- Martín R., Miquel S., Chain F., Natividad JM, Jury J., Lu J., Sokol H., Theodorou V., Bercik P., Verdu EF, Langella P., Bermúdez-Humarán LG. Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. BMC Microbiol. 2015;15:67
- Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 30th Ed, p1341
- Martinez-Medina M., Aldeguer X., Lopez-Siles M. Molecular diversity of Escherichia Coli in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. Coli (AIEC) in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2009;15:872 -882
- Massart D. L. Projection methods in chemistry. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 2003;65:97-112
- McGovern DPB, Gardet A., Törkvist L., Goyette P., Essers J., Taylor KD. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. Nat Genet 2010;4:332–7
- Mentis A.F.A., Gypas F., Mentis A.F. Human enteric microbiome. Its role in health and disease. Archives of Hellenic Medicine 2013;30(3):272–288
- Minot S. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. Genome Res. 2011;21:1616–1625
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 2012;142:46-54
- Monsen U., Sorstad J., Hellers G., Johansson C. Extracolonic diagnoses in ulcerative colitis: An epidemiological study. Am J Gastroenterol. 1990; 85:711-716
- Mosca, A., Leclerc M., Hugot J.P. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? Front. Microbiol. 2016;7:455
- Mukhopadhyai I. The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. Microbes Infect. 2015;17:304–310

- Nerich V., Monnet E., Weill A. Fine-scale geographic variations of inflammatory bowel disease in France: correlation with socioeconomic and house equipment variables. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:813–821
- Neurath F. Markus. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology.* 2014;14:329–342
- Ng S., Kaplan GG, Tang W. Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease from 13 countries in Asia-Pacific: results from the Asia-Pacific Crohn's and Colitis epidemiologic study 2011–2013. *Gastroenterol* 2016;150: S21
- Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; 62:630–649
- Ng S.C. et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* 2015;64:1063–1071
- Nicholson J.K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol. Syst. Biol.* 2007;2:52.
- Nitzan O. et al. Role of Antibiotics for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* 2016;1078–1087
- Norman J. M. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 2015;160:447–460
- Nycha. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia Zentiscus* var. *chia*) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model Food System *International Biodeterioration & Biodegradation* 1995;41:420
- Ooi M., Nishiumi S., Yoshie T., Shiomi Y., Kohashi M., Fukunaga K., Nakamura S., Matsumoto T., Hatano N., Shinohara M., Irino Y, Takenawa T., Azuma T., Yoshida M. GC/MS based profiling of amino acids and TCA cycle- related molecules in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2011;60:831–840
- Ott S. J. et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scand. J. Gastroenterol.* 2008;43:831–841
- Papadakis KA, Yang H., Ippoliti A. Anti-flagellin (CBIR1) phenotypic and genetic Crohn's disease associations. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:524–530

- Papageorgiou V. P, Bakola-Christianopoulou M., Apazidou K., Psarros E. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr.* 1997;769:263-273
- Papalois A., Gioxari A., Kaliora A., Lymperopoulou A., Agrogiannis G., Papada E., et al. Chios mastic fractions in experimental colitis: implication of the nuclear factor kB pathway in HT29 cells. *J Med Food* 2012;15(11):974-983
- Paraschos S., Magiatis P., Mitakou S., Petraki K., Kalliaropoulos A., Maragkoudakis P., Mentis A., Sgouras D., Skaltsounis A.L. In vitro and in vivo activities of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:551-559
- Patel N., Alkhouri N., Eng K., Cikach F., Mahajan L., Yan C., Grove D., Rome ES, Lopez R., Dweik RA. Metabolomic analysis of breath volatile organic compounds reveals unique breathprints in children with inflammatory bowel disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40:498–507
- Patti G., Yanes O., Siuzdak G. Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Focus on Metabolism* 2012;13(4):263–69
- Peeters M., Joossens S., Vermeire S., Vlietinck R., Bossuyt X., Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-*Saccharomyces Cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:730 -734
- Petnicki-Ocwieja T., Hrnčir T., Liu YJ. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:15813-15818
- Ponder A., Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol.* 2013;5: 237-247
- Poroyko V., Morowitz M., Bell T., Ulanov A., Wang M., Donovan S., Bao N., Gu S., Hong L., Alverdy JC, Bergelson J., Liu DC. Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutr Hosp.* 2011;26(6):1283-95
- Qiu Y., Zhou B., Su M., Baxter S., Zheng X., Zhao X., Yen Y., Jia W. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):8047-61
- Rajilić-Stojanović M., Shanahan F., Guarner F., De Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:481–8

- Richard, M. L., Lamas, B., Liguori, G., Hoffmann, T. W. & Sokol, H. Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 656–665 (2015)
- Rodgers AD, Cummins AG. CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:2063-2068
- Roggeveen MJ, Tismanetsky M., Shapiro R. Best cases from the afip: Ulcerative colitis. *Radiographics.* 2006;26:947-951
- Saez-Lara M., Gomez-Llorente C., Plaza-Diaz J., Gil A. 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;2015
- Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Gil A2. 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 Res Int.* 2015;2015:505878
- Sales-Campos H., Basso P. J., Alves V. B. F., Fonseca M. T. C., Bonfá G., Nardini V., Cardoso C. R. B. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2015;48(2),96-107
- Sandborn WJ. Serologic markers in inflammatory bowel disease: State of the art. *Reviews in Gastroenterological Disorders* 2004;4:167-174
- Sartor B. Bacteria in Crohns Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2007; 41:37-43
- Sartor RB. Gut microbiota: diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:561–562
- Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134:577-594
- Sartor RB. Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2008;105:16413–16414
- Sartor RB., Mazmanian S. K. Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 2012;115:21–21

Satsangi J., Morecroft J., Shah NB, Nimmo E. Genetics of inflammatory bowel disease: Scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:3-18

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. Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility. *BioMed Research International* 2013;1-9

Schicho R., Shaykhutdinov R., Ngo J., Nazyrova A., Schneider C., Panaccione R., Kaplan GG, Vogel HJ, Storr M. Quantitative metabolomics profiling of serum, plasma, and urine by (1)H NMR spectroscopy discriminates between patients with inflammatory bowel disease and healthy individuals. *J Proteome Res* 2012; 11: 3344–3357

Serban D. Microbiota in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis and Therapy: Is It All About Diet?. *Nutrition in Clinical Practice* 2015;30(6):760-779

Services US Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking—50 years of progress. Rockville, MD: National Library of Medicine, 2014

Sha S., Xu B., Wang X. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:245-251

Shih D., Targan S. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14(3):390–400

Shivashankar R., Tremaine WJ, Harmsen WS, Loftus EV. Incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota from 1970 through 2010. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017;15:857–63

Sipponen T., Savilahti E., Kolho KL, Nuutinen H., Turunen U., Farkkila M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: Correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14 :40-46

Siva S., Rubin DT., Gulotta G., Wroblewski K., Pekow, J. Zinc deficiency is associated with poor clinical outcomes in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2017;23:152–157

Smith EA, Macfarlane GT. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* 1997;3:327–337

Smolinska A., Blanchet L., Buydens L.M.C., Wijmenga S.S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal. Chim. Acta* 2012;750:82–97

Sokol H. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2016;66:1039–1048

Stephens NS, Siffledeen J., Su X., Murdoch TB, Fedorak RN, Slupsky CM. Urinary NMR metabolomics profiles discriminate inflammatory bowel disease from healthy. *J Crohns Colitis* 2013;7:42–48

Sterer N. Antimicrobial effect of mastic gum methanolic extract against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Medicinal Food* 2006;9:290-292

Storr M, Vogel HJ, Schicho R. Metabolomics: is it useful for inflammatory bowel diseases? *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:378–83

Strober W, Fuss IJ. Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1756–1767

Strober W., Fuss I., Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514–521

Studd C., Cameron G., Beswick L. Never underestimate inflammatory bowel disease: high prevalence rates and confirmation of high incidence rates in Australia. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31:81–86

Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17: 831 -848

Timms V. J., Daskalopoulos G., Mitchell H. M., Neilan, B. A. The association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 2016;11:e0148731

Tomasello G., Tralongo P., Damiani P., Sinagra E., Di Trapani B., Zeenny MN, Hussein IH, Jurjus A., Leone A. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: changes in response of colocytes. *World J Gastroenterol* 2014;20:18121–18130

Triantafyllou A., Chaviaras N., Sergeantanis TN, Protopapa E., Tsaknis J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol* 2007;111:43-49

Triba MN, Le Moyec L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., Rutledge DN, Savarin P. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Mol Biosyst*. 2015;11(1):9-13

- Tsianos E., Katsanos K., Tsianos V. World J Gastroenterol. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2012;18(2):105–118
- Turner D., Otley AR, Mack D. Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: A prospective multicenter study. Gastroenterology 2007;133:423-432
- Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. Trends Immunol. 2012;33(9):459-66
- Uedo N., Tatsuta M., Iishi H., Baba M., Sakai N., Yano H., Otani T. Inhibition by Dlimonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. Cancer Letters 1999;137:131-136
- Underhill D. M., Iliiev I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. Nat. Rev. Immunol. 2014;14:405–416
- Ungaro R. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. Am. J. Gastroenterol. 2014;109:1728–1738
- Van Assche G., Dignass A., Panes J. The second european evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. Journal of Crohn's & Colitis 2010;4:7-27
- Van der Berg K.J., Van der Horst J., Boon J.J., Sudmeijer O.O. Cis-1,4-poly- β - myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. Tetrahedron Lett. 1998;39:2645-2648
- Van Limbergen J., Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. Annu Rev Genomics Hum Genet 2009;10:89–116
- Vasudevan K.M., Gurumurthy S., Rangnekar V.M. Suppression of PTEN Expression by NF- κ B Prevents Apoptosis. Molecular and Cellular Biology 2004;24:1007-1021
- Vigsnaes LK, Holck J, Meyer AS, Licht TR. In vitro fermentation of sugar beet arabino-oligosaccharides by fecal microbiota obtained from patients with ulcerative colitis to selectively stimulate the growth of bifidobacterium spp. and lactobacillus spp. Appl Environ Microbiol. 2011;77: 8336-8344
- Vigsnaes LK, Van den Abbeele P, Sulek K. Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of lab to colonize mucus. Sci Rep. 2013;3:1110

- Vigushin D.M., Poon G.K., Boddy A., English J., Halbert G.W., Pagonis C., Jarman M., Coombes R.C. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1998;42:111-117
- Villas-Boas S.G. Analytical Techniques & Applications of Metabolomics in Systems Medicine and Systems Biotechnology. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2013;4:e201301001
- Wagner J. et al. Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm. Bowel Dis.* 2013;19:1598–1608
- Wagner J. et al. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease: a longitudinal follow-up study. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17:1825–1826
- Walton C., Fowler DP, Turner C., Jia W., Whitehead RN, Griffiths L., Dawson C., Waring RH, Ramsden DB, Cole JA, Cauchi M., Bessant C., Hunter JO. Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:2069–2078
- Wang ZK, Yang YS, Chen Y., Yuan J., Sun G., Peng LH. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:14805-14820
- Wang S.L., Wang Z.R., Yang C.Q. Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* 2012;4:1051–1056
- Wattenberg L.W., Sparnins V.L., Barany G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Research* 1989;49:2689-2692
- We Ek, D'Amato M., Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014;27(4):294-303.
- Wheeler, M. L. et al. Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2016;19:865–873
- Williams HR, Cox IJ, Walker DG, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD, Marshall SE, Orchard TR. Differences in gut microbial metabolism are responsible for reduced hippurate synthesis in Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2010;10:108
- Williams HR, Cox IJ, Walker DG, North BV, Patel VM, Marshall SE, Jewell DP, Ghosh S, Thomas HJ, Teare JP, Jakobovits S, Zeki S, Welsh KI, Taylor-Robinson SD, Orchard TR. Characterization of

inflammatory bowel disease with urinary metabolic profiling. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1435–1444

Williams HR, Willsmore JD, Cox IJ, Walker DG, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD, Orchard TR. Serum metabolic profiling in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2012;57:2157–2165

Wills ES, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, Pierik MJ, Penders J. Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation. *PLoS One* 2014;9:e90981

Windey K., De Preter V., Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res* 2012;56: 184–196

Winter S.E., Lopez C.A., Baumler A. J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep.* 2013;14:319–327

Wishart D.S. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2008;27:228–237

Xynos N., Termentzi A., Fokialakis N., Skaltsounis L., Aligiannis N. Supercritical CO₂ extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC–MS. *The Journal of Supercritical Fluids* 2018;133(1): 349-356

Yano H., Tatsuta M., Iishi H., Baba M., Sakai N., Uedo N. Attenuation by d-limonene of sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine in wistar rats. *International Journal of Cancer* 1999;82:665-668

Ye Y., Pang Z., Chen W., Ju S., Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015;8(12):22529-42

Yu C., Huang Q. Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases* 2013;14(10):513-517

Yun J., Xu CT, Pan BR. Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World J Gastroenterol* 2009;15:788-803

Zeller G. et al. Potential of fecal microbiota for early stage detection of colorectal cancer. *Mol. Syst. Biol.* 2014;10:766

Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang, X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J. Proteomics* 2012;75:1079–1088

Zhang Y., Lin L., Xu Y., Lin Y., Jin Y., Zheng C. ¹H NMR-based spectroscopy detects metabolic alterations in serum of patients with early- stage ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433: 547–551

Zhou L., Satoh K., Watanabe S., Nakamura W., Maki J., Hatano H., Takekawa F., Shimada C., Sakagami H. Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In vivo* 2009;23:583-9

Zira A., Kostidis S., Theocharis S., Sigala F., Engelsen S.B., Andreadou I., Mikros E. ¹H NMR-based metabonomics approach in a rat model of acute liver injury and regeneration induced by CCl₄ administration. *Toxicology* 2013;303:115–124

Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Ελλάδας, www.gummastic.gr.

Κρίση Ε. Υπολογιστικά Εργαλεία για την Αναζήτηση Νέων Βιοδραστικών Ενώσεων σε επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους. (Διδακτορική διατριβή, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, 2017)

Σαββίδης Θ. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). ISBN: 960-343-528-7, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε., 2000

Φωτάκης Χ. (2013). Μεταβολομική μελέτη και σύγκριση αποσταγμάτων με φυτικοχημικές και αναλυτικές μεθόδους. (Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, 2013)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1. Αναλυτική περιγραφή του συνολικού δειγματοχώρου της μελέτης

A/A	Φύλο	Παρέμβαση	Διάρκεια (m)	Ηλικία	Τύπος νόσου	Κατάσταση	Λήψη συμπληρωμάτων
M01	F	PLACEBO	3	42	UC	RELAPSE	NO
M04	M	VERUM	6	24	CD	REMISSION	MODULEN
M06	M	VERUM	6	22	CD	REMISSION	MAGNESIUM
M07	M	PLACEBO	3	63	CD	RELAPSE	NO
M12	M	VERUM	6	48	CD	REMISSION	NO
M13	F	PLACEBO	3	59	CD	RELAPSE	PROBIOTICS (ADDED AT FOLLOW-UP)
M14	M	VERUM	3	20	CD	RELAPSE	NO
M15	M	VERUM	6	51	CD	REMISSION	MYCOPHENOLATE MOFETIL
M16	M	PLACEBO	6	36	UC	REMISSION	PROBIOTICS (ADDED AT FOLLOW-UP)
M20	F	VERUM	6	33	UC	REMISSION	NO
M21	F	PLACEBO	3	49	UC	RELAPSE	MULTIVITAMINS
M22	F	VERUM	3	31	UC	RELAPSE	NO
M23	F	VERUM	3	30	CD	RELAPSE	PROBIOTICS

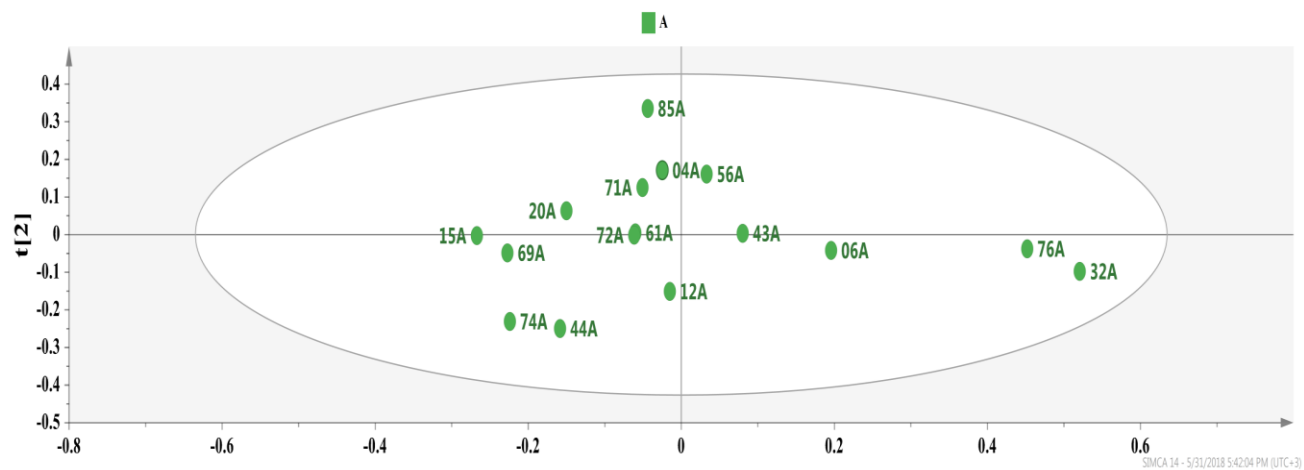
M25	F	PLACEBO	3	39	CD	RELAPSE	NO
M26	M	PLACEBO	3	64	UC	RELAPSE	PANTOPRAZOLE, CLOPIDOGREL, RAMIPRIL, SIMVASTATIN, FUROSEMIDE, CALCIUM, RISEDRONIC ACID
M28	M	PLACEBO	3	36	CD	RELAPSE	NO
M30	M	VERUM	3	62	UC	RELAPSE	NO
M32	M	VERUM	6	26	CD	REMISSION	FOLIC ACID
M33	F	PLACEBO	6	51	CD	REMISSION	Ω-3 STARTED ON 05/16
M34	F	PLACEBO	6	49	CD	REMISSION	NORGESIC SPONTANEOUSLY, AMOROLFINE, URONIX
M35	M	PLACEBO	3	58	CD	RELAPSE	NO
M41	F	PLACEBO	3	67	CD	RELAPSE	NO
M42	F	VERUM	3	38	UC	RELAPSE	NO
M43	M	VERUM	6	23	CD	REMISSION	NO
M44	F	VERUM	6	47	CD	REMISSION	N/A
M45	F	VERUM	3	34	CD	RELAPSE	NO

M48	M	PLACEBO	3	23	CD	RELAPSE	NO
M49	F	PLACEBO	3	74	CD	RELAPSE	MEBEVERINE
M50	M	PLACEBO	6	35	UC	REMISSION	NO
M51	M	PLACEBO	6	57	CD	REMISSION	NO
M52	F	PLACEBO	3	48	CD	RELAPSE	NO
M54	M	PLACEBO	3	18	UC	RELAPSE	NO
M55	F	PLACEBO	3	26	CD	RELAPSE	NO
M56	F	VERUM	6	34	UC	REMISSION	NO
M57	F	VERUM	3	40	CD	RELAPSE	NO
M60	F	VERUM	3	31	CD	RELAPSE	NO
M61	M	VERUM	6	39	UC	REMISSION	KEFIR FOR 2 MONTHS (APRIL+MAY/2016)
M65	F	PLACEBO	6	24	UC	REMISSION	NO
M66	M	VERUM	3	33	CD	RELAPSE	VITAMIN D
M67	M	VERUM	3	20	UC	RELAPSE	NO
M69	M	VERUM	6	39	CD	REMISSION	NO
M70	F	PLACEBO	3	19	UC	RELAPSE	NO
M72	M	VERUM	6	21	CD	REMISSION	SELENIUM BEFORE ENROLLMENT IN THE TRIAL AND

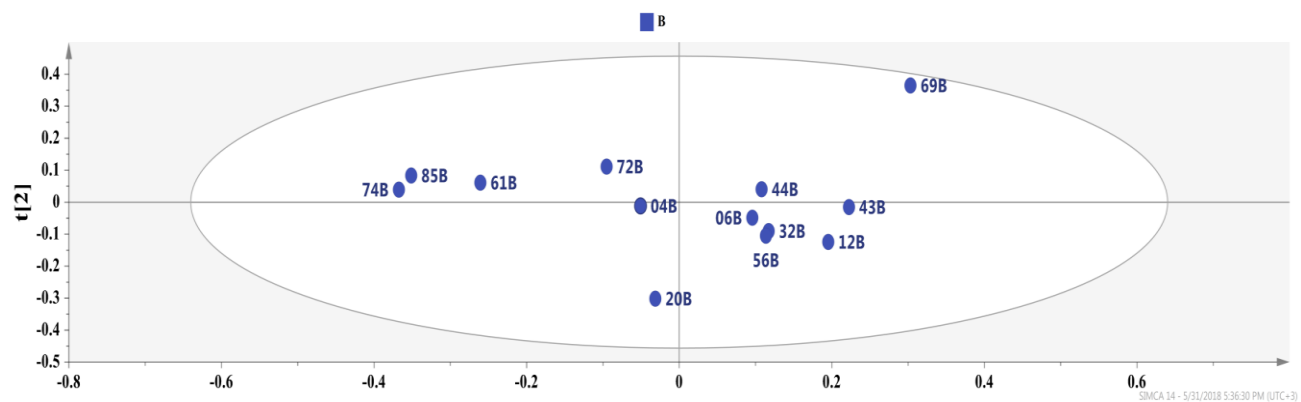
							STOPPED ON 15/06
M74	M	VERUM	6	40	UC	REMISSION	NO
M76	M	VERUM	3	44	CD	RELAPSE	FOSAMAX (1/WEEK), VITAMIN D (2/DAY)
M79	F	PLACEBO	3	65	CD	RELAPSE	URSODEOXYCHOL IC ACID FOR SCLEROSING CHOLANGITIS
M80	F	PLACEBO	6	54	UC	REMISSION	NO
M81	F	PLACEBO	6	28	CD	REMISSION	VOSIFLON 16/08- 23/08/16
M82	F	PLACEBO	3	24	UC	RELAPSE	NO
M85	M	VERUM	6	34	CD	REMISSION	NO
M87	F	PLACEBO	3	50	UC	RELAPSE	N/A
M89	F	PLACEBO	6	27	UC	REMISSION	MULTIVITAMINS (from 10/2015)
M91	F	PLACEBO	6	27	CD	REMISSION	FOLIC ACID
M93	M	VERUM	3	37	CD	RELAPSE	NO
M96	M	PLACEBO	6	25	CD	REMISSION	MULTIVITAMIN
M97	M	VERUM	3	18	CD	RELAPSE	URSODEOXYCHOL

							IC ACID
M98	F	PLACEBO	6	51	CD	REMISSION	NO
M10 3	F	PLACEBO	6	56	UC	REMISSION	NO
M10 4	F	VERUM	3	48	UC	RELAPSE	HYDROCHLOROTH IAZIDE, AMLODIPINE
M10 6	F	PLACEBO	6	39	UC	REMISSION	B12 INJECTIONS
M10 7	M	PLACEBO	6	32	UC	REMISSION	NO
M10 9	M	PLACEBO	3	18	CD	RELAPSE	NO
M11 0	F	VERUM	3	48	CD	RELAPSE	FOLIC ACID, CALCIUM, VITAMIN D
M11 1	M	PLACEBO	6	56	CD	REMISSION	NO
M11 4	F	VERUM	3	37	CD	RELAPSE	NO
M11 5	M	PLACEBO	6	22	CD	REMISSION	FOLIC ACID, Mg, ELECTROLYTES
M11 7	F	VERUM	6	35	CD	REMISSION	NO

M11 8	F	VERUM	6	34	UC	REMISSION	NO
M11 9	F	VERUM	6	42	CD	REMISSION	NO
M12 0	M	VERUM	3	34	CD	RELAPSE	MODULEN (TWICE/WEEK)
M12 1	M	PLACEBO	6	43	UC	REMISSION	NO
M12 3	M	VERUM	3	40	UC	RELAPSE	FLUOXETINE
M12 4	M	PLACEBO	6	33	CD	REMISSION	NO
M12 6	M	VERUM	3	25	CD	RELAPSE	NO
M12 8	M	VERUM	3	34	UC	RELAPSE	NO
M12 9	M	VERUM	3	28	UC	RELAPSE	NO



Εικόνα Π1: Verum Inactive Baseline



Εικόνα Π2: Verum Inactive 6 months

Εικόνες Π3-Π9: Αποτελέσματα αυτόματης ταυτοποίησης μεταβολιτών στο φάσμα ^1H NMR του δείγματος 69B.

