



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**«Επίδραση της κατανάλωσης Μαστίχας στα επίπεδα λυσοζύμης και
ντεφενσίνης κοπράνων σε ασθενείς με ΙΦΝΕ»**

Διπλωματική εργασία

Πατρινού Μαρία



Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανδριάννα Καλιώρα, Επιβλέπουσα - Επίκουρη Καθηγήτρια

Γεώργιος Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

Κωνσταντίνος Τσίγκος, Καθηγητής

Αθήνα, 2019

Η Πατρινού Μαρία

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.

Αφιερωμένο στον Σωτήρη

***“Είναι χαρακτηριστικό του καλλιεργημένου μυαλού να μπορεί να απολαύσει
μια ιδέα χωρίς να την αποδεχθεί”***

Αριστοτέλης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Καλιώρα Ανδριάνα για τις συμβουλές της και για την καθοδήγηση της σε αυτό το βήμα με το οποίο ολοκληρώνεται η φοίτηση μου στο τμήμα Διαιτολογίας- Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών. Ένα μεγάλο ευχαριστώ για την κατανόηση της και την άριστη συνεργασία.

Εν συνεχεία, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα κ. Αμερικάνου Χαραλαμπία για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε στην διακπεραίωση του πειραματικού μέρους της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα και πιστεύουν τόσο σε εμένα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας Περιεχομένων.....	7
Περίληψη	10
Abstract	11
Κατάλογος εικόνων.....	12
Κατάλογος πινάκων.....	13
Κατάλογος σχημάτων.....	13
Κατάλογος Συντομογραφιών	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

1.1 Εισαγωγή.....	17
1.2 Εντερικός φραγμός-ο ρόλος του εντερικού επιθηλίου.....	19
1.2.1 Βλεννογόνιος εντερικός φραγμός.....	19
1.2.2 Επιθηλιακή διαπερατότητα και ΙΦΝΕ.....	21
1.2.3 Κύτταρα Paneth & κύτταρα Goblet στην ΙΦΝΕ.....	22
1.3 Αιτιοπαθογένεια.....	23
1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	24
1.3.1.1 Ατμοσφαιρική ρύπανση.....	24
1.3.1.2 Διατροφή.....	24
1.3.1.3 Θηλασμός.....	25
1.3.1.4 Κάπνισμα.....	26
1.3.1.5 Φάρμακα.....	28
1.3.1.6 Stress.....	28
1.3.1.7 Υπνος.....	29
1.3.1.8 Υδάτινη μόλυνση.....	30
1.3.2 Γενετικοί παράγοντες.....	30
1.3.2.1 Αυτοφαγία.....	33
1.3.2.2 mRNAs.....	36

1.3.3	Ανοσολογικοί παράγοντες.....	39
1.3.4	Μικροβίωμα εντέρου	
1.3.4.1		
	Γενικά.....	41
1.3.4.2	Εντερική δυσβίωση και ΙΦΝΕ.....	41
1.3.4.3	Μικροβίωμα και ΙΦΝΕ: Πέρα από τα βακτήρια.....	44
1.3.4.3.1	Mycobiota.....	44
1.3.4.3.2	Virome.....	45
1.4	Διάγνωση.....	48
1.5	Θεραπευτική προσέγγιση.....	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Βιοδείκτες και ΙΦΝΕ

2.1	Βιοδείκτες.....	52
2.2	Βιοδείκτες κοπράνων.....	52
2.3	Μέτρηση βιοδεικτών στα κόπρανα: πως, που, πότε.....	53
2.4	Λυσοζύμη.....	54
2.5	Ντεφενσίνη.....	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Μαστίχα Χίου

3.1	Γενικά στοιχεία.....	59
3.2	Ιστορική αναδρομή.....	60
3.3	Μαστίχα Χίου – Θεραπευτικές Ιδιότητες.....	60
3.3.1	Αντιβακτηριδιακές ιδιότητες.....	61
3.3.2	Αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες.....	61
3.3.3	Άλλες ιδιότητες.....	61
3.4	Μαστίχα Χίου και ΙΦΝΕ.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 –Πειραματικό Μέρος

4.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	63
4.2. Πειραματική διαδικασία.....	64
4.2.1 Πρωτόκολλο κλινικής δοκιμής.....	64
4.2.2 Λήψη ιατρικού ιστορικού.....	65
4.2.3 Αιμοληψία και λήψη δείγματος κοπράνων από τους εθελοντές.....	66
4.2.4 Follow – up αξιολόγησης εθελοντών.....	66
4.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	66
4.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός λυσοζύμης και ντεφενσίνης σε δείγμα κοπράνων.....	66
4.3.2 Αντιδραστήρια –όργανα.....	66
4.3.3 Αρχή της μεθόδου Sandwich ELISA.....	67
4.3.4 Στατιστική επεξεργασία.....	68
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Ελκώδης Κολίτιδα (**Ulcerative Colitis-UC**) και η νόσος του Crohn (**Crohn's Disease - CD**), είναι ανίατες χρόνιες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος. Οι δύο ασθένειες αναφέρονται συχνά ως Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ) λόγω των παρόμοιων συμπτωμάτων τους. Η αντιμετώπιση της ΙΦΝΕ βασίζεται επι του παρόντος στην αντικειμενική αξιολόγηση των εντερικών βλαβών. Η θεραπευτική προσέγγιση της ΙΦΝΕ που βασίζεται μόνο στα συμπτώματα συχνά οδηγεί σε σοβαρά λάθη. Τα γαστρεντερικά συμπτώματα που μπορεί να αναφέρει ένας ασθενής δεν αντανακλούν πλήρως την παρουσία ή την σοβαρότητα των γαστροεντερικών αλλοιώσεων. Περισσότερο από το 1/3 των ασθενών που βρίσκονται σε ύφεση είχαν ενδοσκοπικές βλάβες, ενώ ποσοστό μεγαλύτερο από 10% των συμπτωματικών ασθενών, η ενδοσκόπηση δεν έδειξε αλλοιώσεις. Τελευταία το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει στραφεί στις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της Μαστίχας Χίου. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης συμπληρώματος Μαστίχας Χίου σε ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn, στα επίπεδα δύο ενδυνάμει βιοδεικτών στη διαχείριση της ΙΦΝΕ, της λυσοζύμης και της ντεφενσίνης. Η 40 εθελοντές, χωρίστηκαν στην ομάδα ελέγχου, η οποία ελάμβανε εικονικό σκεύασμα, και την ομάδα παρέμβασης, η οποία ελάμβανε καθημερινά 2,8gr μαστίχας Χίου σε μορφή ταμπλέτας, για 3 μήνες. Οι εθελοντές προσκόμισαν δείγματα κοπράνων, στα οποία μετρήθηκαν τα επίπεδα λυσοζύμης και ντεφενσίνης με τη μέθοδο «sandwich» ELISA. Τα αποτελέσματα από την παρέμβαση δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα λυσοζύμης και ντεφενσίνης στα κόπρανα των εθελοντών με ενεργή νόσο του Crohn.

.Λέξεις-κλειδιά: Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, Νόσος του Crohn, Μαστίχα Χίου, λυσοζύμη, ντεφενσίνη

ABSTRACT

Ulcerative Colitis (UC) and **Crohn's Disease (CD)** are incurable chronic diseases of the gastrointestinal tract. These two diseases are often referred to as idiopathic inflammatory bowel diseases (IBDs) because of their similar symptoms. Treatment of IBD is currently based on the objective evaluation of intestinal lesions. A therapeutic approach of IBD that is based on symptoms only, often leads to serious mistakes. Gastrointestinal symptoms that may be reported by a patient do not fully reflect the presence or the severity of gastrointestinal lesions. More than 1/3 of the patients in remission had endoscopic lesions, while endoscopic examination did not reveal any lesions in more than 10% of symptomatic patients. Now, it is of utmost importance to determine the ideal biomarker (or combination of biomarkers) that can improve prognostic models' accuracy for both the diagnosis and the course of the disease, and can be a reliable marker for the identification of actual relapse. Recently, the interest of many researchers has shifted to the anti-microbial, anti-inflammatory and antioxidant properties of Chios mastic gum. The purpose of the present study is to investigate the effect of Chios mastic gum supplementation on the levels of two potential biomarkers in IBD treatment, lysozyme and defensin, among patients with active Crohn's disease. In total, 40 volunteers were assigned either in the control group, receiving the placebo, or in the intervention group, receiving daily 2.8 g Chios mastic gum in the form of tablet, for 3 months. The volunteers provided faecal samples, which were used to measure lysozyme and defensin levels with the "sandwich" ELISA method. The results of the intervention group did not demonstrate any statistically significant differences in lysozyme and defensin levels as measured using the faecal samples of the volunteers with Crohn's disease. In conclusion, despite the differences observed in the levels of lysozyme and defensin before and after the administration of Chios mastic gum supplement, the results were not statistically significant.

Keywords: Idiopathic inflammatory bowel disease, Crohn's disease, Chios mastic gum, lysozyme, defensin

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Ανατομική κατανομή της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας.

Εικόνα 2. Κλινικοί υπότυποι της ελκώδους κολίτιδας.

Εικόνα 3. Μηχανισμοί άμυνας του υγιούς εντερικού φραγμού του βλεννογόνου.

Εικόνα 4. Παθογένεση της ΙΦΝΕ.

Εικόνα 5. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που μεταβάλλουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΙΦΝΕ.

Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του exprosome, του μικροβιώματος, του επιγενετικού αποτυπώματος και της γενετικής προδιάθεσης σε έναν ασθενή με IBD, με τη πάροδο του χρόνου.

Εικόνα 7. Ενδοπλασματικό stress και αυτοφαγία.

Εικόνα 8. Ο ρόλος των miRNAs στη ρύθμιση των συνδέσεων του εντερικού επιθηλιακού ιστού και στην ΙΦΝΕ.

Εικόνα 9. Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα και έντερο.

Εικόνα 10. Επισκόπηση του δικτύου κυτοκινών που ρυθμίζει τις έμφυτες και τις προσαρμοστικές αλληλεπιδράσεις ανοσολογικού συστήματος – μικροβιώματος.

Εικόνα 11. Θεραπευτικές στρατηγικές αντιμετώπισης ΙΦΝΕ που περιλαμβάνουν την πρόληψη παραγωγής T-κυττάρων και ILC λεμφοκυττάρων ή την καταστολή τους.

Εικόνα 12. Το μοντέλο «ShaiMatsuzaki-Huang» .

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Μεταβολές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου σε ασθενείς με ΦΝΕ σε σύγκριση με υγιής ομάδες του πληθυσμού.

Πίνακας 2. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ενεργή νόσο Crohn. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως N (%) του συνολικού αριθμού των ασθενών.

Πίνακας 3. Σύγκριση επιπέδων λυσοζύμης πριν και μετά την παρέμβαση.

Πίνακας 4. Σύγκριση επιπέδων ντεφενσίνης πριν και μετά την παρέμβαση.

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής της ένταξης των ασθενών.

Κατάλογος Συντομογραφιών

5-ASA	Ενώσεις του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος (5-aminosalicylic acid)
AMPs	Αντιμικροβιακά πεπτίδια (Antimicrobial peptides)
ASCA	Αντισώματα έναντι του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Antibodies)
CC	Κολλαγονική κολίτιδα (collagenous colitis)
CD	Νόσος Crohn (Crohn's Disease)
CDAI	Δείκτης ενημερότητας νόσου Crohn (Crohn's Disease Activity Index)
CNVs	Παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων στο γονιδίωμα (Copy number variation)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DeoxyriboNucleic Acid)
EDCs	Χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (Endocrine Disrupting Chemicals)
ER	Ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum)
ESR	Ρυθμός καθίζησης ερυθροκυττάρων (erythrocyte sedimentation rate)
FC	Καλπροτεκτίνη κοπράνων (fecal calprotectin)
FL	Λακτοφερίνη κοπράνων (fecal lactoferrin)
FoxO1a	Γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης (Forkhead box protein O1)
FoxO3	Γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης (Forkhead box O3)
GWAS	Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος (genome-wide association study)
HC	Μύκητας <i>Histoplasma capsulatum</i>
HERV	Ανθρώπινος ενδογενής ρετροϊός (Human endogenous retroviruses)
HNP	Ανθρώπινες ουδετερόφιλικές ντεφενσίνες (Human neutrophil defensins)

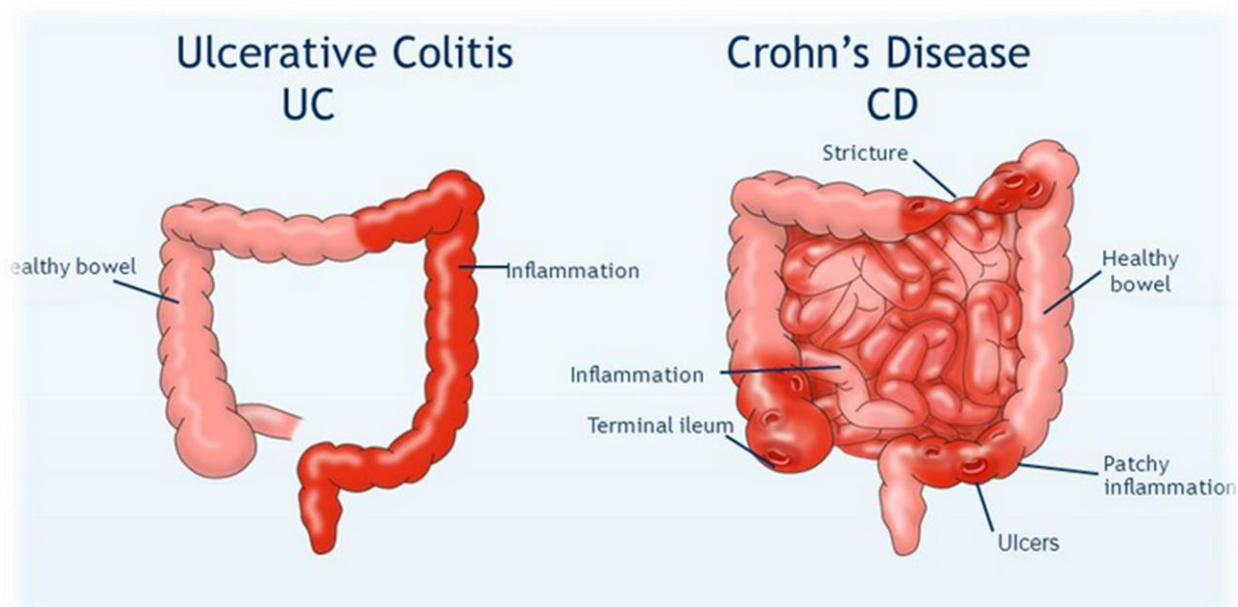
HPA	Αξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (hypothalamic pituitary adrenal axis)
IBD	Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease)
IECs	Μονοστιβάδα εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (intestinal epithelial cells)
IFN-γ	Ιντερφερόνη -γ (interferon- gamma)
IgA	Ανοσοσφαιρίνη A (immunoglobulin A)
IL-	Ιντερλευκίνη- (interleukin-)
IRGM	(Immunity-Related GTPase family M)
LC	Λεμφοκυτταρική κολίτιδα (lymphocytic colitis)
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein)
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharides)
MC	Μικροσκοπική κολίτιδα (microscopic colitis)
NF -κB	Πυρηνικός παράγοντας κ-B (nuclear factor kappa beta)
NO₂	Διοξείδιο του αζώτου (Nitrogen Dioxide)
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
NSAID	Μη στεροειδή αντι-φλεγμονώδη φάρμακα (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
OCPs	Αντισυλληπτικά χάπια (Oral contraceptives)
P-ANCA	Περιπυρηνικά αντι- ουδετεροφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα
PPAR-γ	Πυρηνικός υποδοχέας (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PTK6	Πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinase 6)
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids)
PXR	Πυρηνικός υποδοχέας (pregnane X receptor)
REM	Υπνος γρήγορων κινήσεων των ματιών (Rapid Eye Movement)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
RR	Σχετικός κίνδυνος (Relative Risk)
SCFAs	Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (Short-chain fatty acids)
SNPs	Πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single nucleotide polymorphisms)
SWS	Υπνος αργού κύματος (Slow-wave sleep)

Th-	T ρυθμιστικά κύτταρα (T helper cells)
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (tumor necrosis factor- alpha)
ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο Ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

1.1 Εισαγωγή

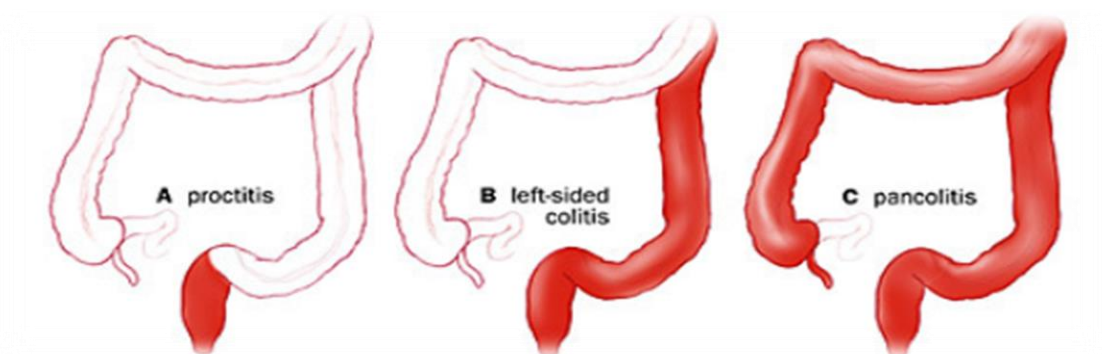
Ο όρος ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) περιλαμβάνει δύο τύπους εντερικής νόσου, την νόσο του Crohn (CD) και την ελκώδη κολίτιδα (UC), που διαφοροποιούνται ανάλογα με τη θέση και το βάθος διηθήσεως της φλεγμονώδους διεργασίας στο εντερικό τοίχωμα. Στην ελκώδη κολίτιδα (UC), η φλεγμονή εντοπίζεται αποκλειστικά και μόνο στο εσωτερικό τοίχωμα του παχέος εντέρου και τείνει να είναι συνεχής ενώ η νόσος του Crohn (CD) χαρακτηρίζεται από ασυνεχή κατανομή της φλεγμονής και μπορεί να εντοπιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του πεπτικού σωλήνα. Συχνά, η ελκώδη κολίτιδα επηρεάζει το ορθό (πρωκτίτιδα), επεκτείνεται στο σιγμοειδές (πρωκτοσιγμοειδίτιδα), πέρα από το σιγμοειδές (περιφερική ελκώδη κολίτιδα) ή περιλαμβάνει ολόκληρο το κόλον (πανκολίτιδα). Η νόσος του Crohn χαρακτηριστικά εντοπίζεται στον τελικό ειλεό, όμως είναι δυνατόν να εντοπίζεται και σε άλλα μέρη της γαστρεντερικής οδού. Και οι δύο ασθένειες ταξινομούνται κατά βαθμό (ήπια, μέτρια ή σοβαρή) και θέση. Η CD επίσης ταξινομείται σύμφωνα με το φαινότυπο, σε φλεγμονώδης, διεισδυτική ή μορφή με στενώσεις. [1,2]



Εικόνα 1. Ανατομική κατανομή της νόσου του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας.

Πάνω από 1 εκατομμύριο κάτοικοι στην Αμερική και 2,5 εκατομμύρια στην Ευρώπη εκτιμάται ότι πάσχουν από ΙΦΝΕ, με σημαντικό κόστος για την υγιεινομική περίθαλψη. Επιπλέον, η νόσος εμφανίζεται και σε χώρες που βιομηχανοποιήθηκαν πρόσφατα όπως η Ασία, η Νότια Αμερική και η Μέση Ανατολή με αποτέλεσμα να αποτελεί πλέον μια παγκόσμια ασθένεια με αυξανόμενη επικράτηση σε όλες τις ηπείρους [3]. Απο το 1960 έως το 2005 , περίοδος με αυξανόμενους ρυθμούς αστικοποίησης, σημειώθηκε , στις βιομηχανοποιημένες χώρες, άνοδος στον επιπολασμό της UC και της CD κατά 2,4% (95% CI 2.1–2.8%; $P < 0.001$) και 3.6% (95% CI 3.1–4.1%; $P < 0.001$) ετησίως ,αντίστοιχα. [4]

Τα συμπτώματα που συνοδεύουν συχνά έναν ασθενή που πάσχει από φλεγμονώδη νόσο του εντέρου όπως πόνος, διάρροια, εμετός κ.α μειώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής του ατόμου. Επίσης, ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (από 0,5% έως 20% ανα έτος) είναι μια σοβαρή επιπλοκή της ΙΦΝΕ, ειδικότερα στην περίπτωση της UC[5]. Στην UC, όπου παρατηρείται διάσπαση του εντερικού φραγμού, με αποτέλεσμα την πρόσβαση των περιεχομενων του αυλού στον υποβλεννογόνο, και κατ' επέκταση, αυξημένες ανοσολογικές αποκρίσεις με επαναλαμβανόμενα επεισόδια οξείας φλεγμονής, η χειρουργική αφαίρεση είναι η μόνη θεραπευτική επιλογή, όταν η χρόνια νόσος έχει γίνει πλέον ανθεκτική στις φαρμακευτικές αγωγές. Η χειρουργική παρέμβαση επίσης, χρησιμοποιείται για την πρόληψη της εξέλιξης της ελκώδους κολίτιδας σε καρκίνο του παχέος εντέρου.[6] Στην CD, όταν η υποκλινική φλεγμονή επιμένει, οδηγώντας προοδευτικά σε μη αναστρέψιμη βλάβη του εντέρου, απαιτείται επίσης χειρουργική παρέμβαση.[7]



Εικόνα 2. Κλινικοί υπότυποι της ελκώδους κολίτιδας.[8]

Η πρόγνωση της UC και της CD, εξαρτάται από την ανταπόκριση στην εκάστοτε θεραπευτική προσέγγιση καθώς και στο βαθμό που έχει επεκταθεί η νόσος. Η συνεχής παρακολούθηση για τυχόν ανάπτυξη δυσπλασίας αποτελεί υψίστης σημασίας για μακροχρόνιους ασθενείς με UC. Ο κίνδυνος για τον καρκίνο του παχέος εντέρου εκτιμάται ότι ανέρχεται στο 30% σε ασθενείς που είναι πάσχοντες για περισσότερο από 30 έτη. [2]

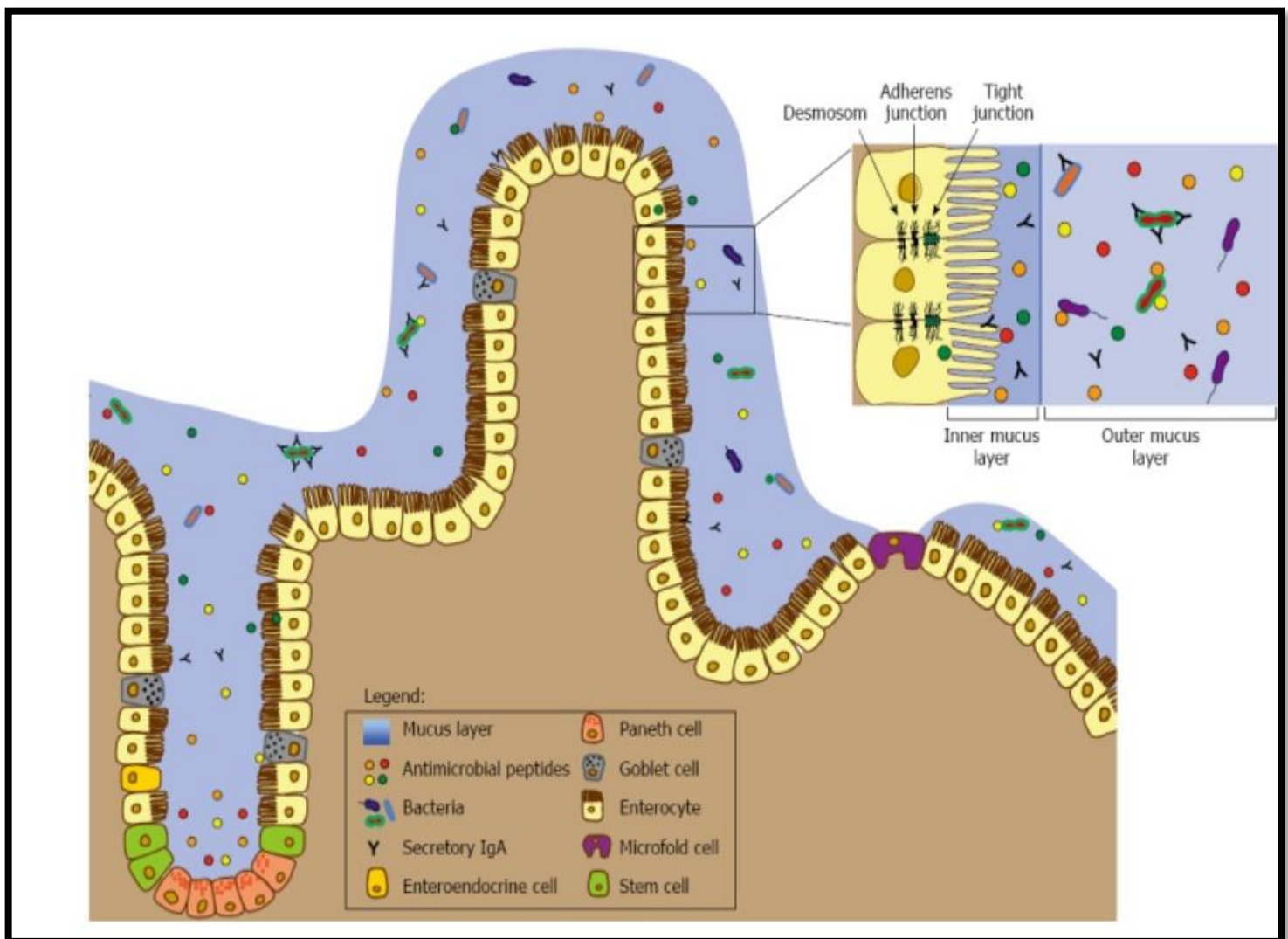
1.2 Εντερικός φραγμός- Ο ρόλος του εντερικού επιθηλίου στην ΙΦΝΕ

1.2.1 Βλεννογόνιος εντερικός φραγμός

Το τοίχωμα του εντέρου αποτελείται από τον βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, τον μυϊκό και τον ορογόνο χιτώνα. Ο βλεννογόνος χιτώνας αποτελείται από τις εντερικές λάχνες και το καλυπτήριο επιθήλιο, μια μονοστιβάδα επιθηλιακών κυττάρων (IECs), συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων *Paneth*, των κυττάρων *Goblet* και των νευροενδοκρινικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά, σχηματίζουν ένα φυσικό φραγμό μεταξύ των περιεχομένων του εντερικού αυλού και του εσωτερικού τοιχώματος. Στο λεπτό έντερο το επιθήλιο σχηματίζει λάχνες, πολλαπλές δηλαδή προεκβολές του μέσα στον αυλό, οι οποίες υφίστανται, για να διευκολύνουν την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών στο λεπτό έντερο. Στο παχύ έντερο, δεν υπάρχουν εντερικές λάχνες, εφόσον ο ρόλος του δεν αφορά την απορρόφηση των τροφών.

Το επιθήλιο, αποτελεί ένα επιλεκτικά διαπερατό φράγμα, καθώς, παρόλο που επιτρέπει τη διέλευση νερού, ηλεκτρολυτών και θρεπτικών ουσιών, αποτρέπει την εισβολή ξένων αντιγόνων, μικροοργανισμών και των τοξινών τους, λόγω των πολύ στενών συνδέσεων (tight junctions) που σχηματίζουν μεταξύ τους τα επιθηλιακά κύτταρα. Η ομοιοστάση του εντερικού αυτού φραγμού, επιτυγχάνεται με την σωστή ισοροπία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής απόπτωσης- θανάτου των κυττάρων. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην διατήρηση της υγείας του εντερικού βλεννογόνου είναι η έκκριση ανοσοσφαιρίνης IgA, η εκκρινόμενη βλέννα, οι γαστρικές και παγκρεατικές εκκρίσεις, τα χολικά άλατα, οι περισταλτικές κινήσεις του εντέρου, η ωφέλιμη μικροχλωρίδα του εντέρου, η απόπτωση των εντεροκυττάρων κατά τη διαδικασία ανανέωσης του εντερικού επιθηλίου καθώς και τα CD8 ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί έμφυτοι μηχανισμοί για να προσφέρουν στον ξενιστή, άμεση προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Επιπλέον προστασία παρέχεται από το προστατευτικό στρώμα βλέννης που καλύπτει το επιθήλιο, η οποία εκτός από προστασία παρέχει και επαρκή ενυδάτωση της επιφάνειας του εντέρου. Στο παχύ έντερο, η στρώση βλέννας χωρίζεται σε δυο ξεχωριστά μέρη με διαφορετικές ιδιότητες. Το εσωτερικό στρώμα είναι πυκνό και σταθερά συνδεδεμένο με το επιθήλιο, ενώ το εξωτερικό στρώμα δεν είναι τόσο στενά συνδεδεμένο και μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα με μικροπιπέτα. [9,10]



Εικόνα 3. Μηχανισμοί άμυνας υγιούς εντερικού φραγμού του βλεννογόνου.[9]

Η ελασματοειδής ουσία (lamina propria) ή αλλιώς ινοσυνδετικό στρώμα, που βρίσκεται ακριβώς κάτω από το επιθήλιο, αποτελείται από ένα σύνολο ανοσοποιητικών κυττάρων, που στόχο έχουν την άμυνα έναντι παθογόνων μικροβίων, και του υπερβολικά μεγάλου αριθμού μικροβίων, που υπάρχουν φυσιολογικά στον εντερικό αυλό. Χαρακτηριστικό της φλεγμονής του εντέρου είναι η διείσδυση ανοσοκυττάρων όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, φυσικά φονικά κύτταρα (NK κύτταρα) στην ελασματοειδή ουσία. Η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων στο βλεννογόνο του εντέρου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του νεκρωτικού παράγοντα TNF-α, της ιντερλευκίνης -1, της ιντερφερόνης -γ και των κυτοκινών που προέρχονται από το μεταβολικό μονοπάτι Th17-IL23. Οποιαδήποτε διάσπαση στην αλληλεπίδραση των παραπάνω μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ΙΦΝΕ. [11]

1.2.2 Επιθηλιακή διαπερατότητα και ΙΦΝΕ

Ηδη από τις αρχές δεκαετίας του 1980, είχε παρατηρηθεί, αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου σε παιδιά με ενεργή νόσο CD, στο λεπτό έντερο. Πιο πρόσφατα, αυξημένη διαπερατότητα καταγράφηκε και σε ασθενείς με UC, καθώς και σε συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών, όπως επίσης η αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου, έχει συνδεθεί με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής σε ασθενείς με CD, συνηγορώντας στην υπόθεση, ότι ίσως είναι πρωταρχικός παράγοντας ανάπτυξης της νόσου και προηγείται κλινικά της ήδη υπάρχουσας φλεγμονής. Άλλες μελέτες, υποδεικνύουν, ότι η αύξηση της διαπερατότητας διαπιστώθηκε σε ένα μόνο ποσοστό ασθενών και όχι σε όλες τις περιπτώσεις, μια παρατήρηση που δείχνει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στις μεταβολές της διαπερατότητας.

Κρίνεται επίσης σημαντικό να σημειωθεί, πως στις μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας, οι ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί όπως η μαννιτόλη, το επισημασμένο αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ ή η χαμηλού μοριακού βάρους πολυαιθυλενογλυκόλη PEG 400, δεν μπορούν να δώσουν αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τη διαπερατότητα του εντέρου, σε βακτήρια και σε βακτηριακές τοξίνες. Η επιθηλιακή απόπτωση οδηγεί επίσης σε αυξημένη επιθηλιακή διαπερατότητα. [9]

1.2.3 Κύτταρα *Paneth* & κύτταρα *Goblet* στην *ΙΦΝΕ*

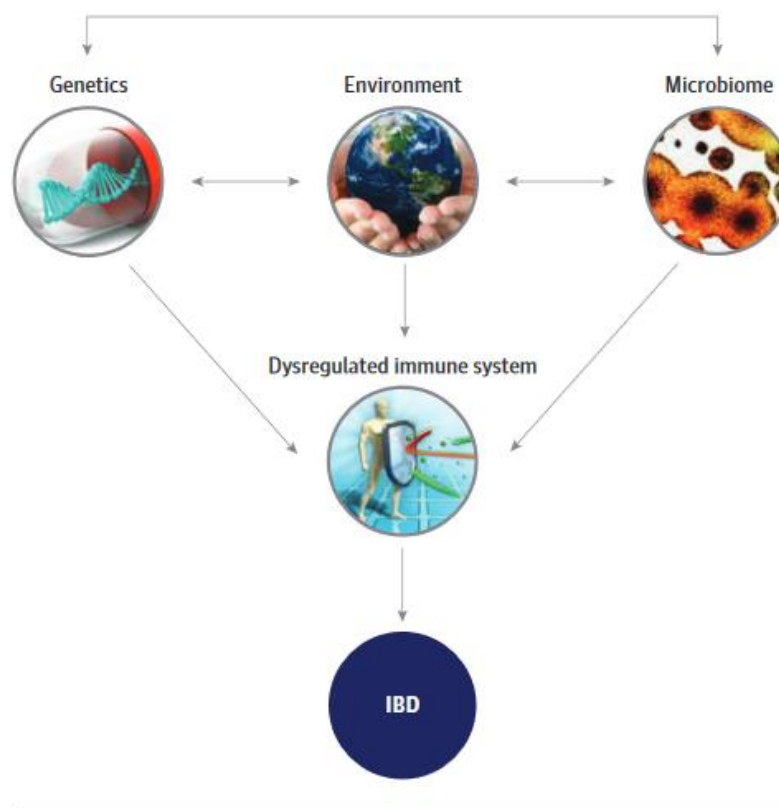
Η άμυνα εναντίον των βακτηριδίων που εισβάλουν στο εντερικό επιθήλιο, προέρχεται από δύο συγκεκριμένους τύπους επιθηλιακών κυττάρων, τα κύτταρα *Goblet* και τα κύτταρα *Paneth*. Τα καλυκοειδή κύτταρα (*Goblet cells*) είναι εκκριτικά, υποβλεννογόνια κύτταρα, τα οποία συνθέτουν, αποθηκεύουν και εκκρίνουν κοκκία βλέννης, συμβάλλοντας στη γαστρική προστασία και στη ρύθμιση της φλεγμονής. [12] Τα κύτταρα *Paneth*, είναι εξειδικευμένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, που εκκρίνουν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων της λυσοζύμης, γνωστή και ως μουραμιδάση, και της ντεφενσίνης, στον εντερικό αυλό. Αυτές οι αντιμικροβιακές πρωτεΐνες διασκορπίζονται στο προστατευτικό βλεννώδες στρώμα που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο, δημιουργώντας ένα χημικό φραγμό ανάμεσα στον ξενιστή και τα μικρόβια που κατοικούν στο έντερο. Αυτός ο φραγμός, δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς θρεπτικών ουσιών ή μικρών μορίων μεταξύ του ξενιστή και του μικροβιόκοσμου, ενώ παράλληλα προστατεύει από βακτηριακή εισβολή. Η τοποθεσία όμως των κυττάρων *Paneth*, τα καθιστά ευάλωτα, στην εισβολή παθογόνων βακτηρίων με την κατανάλωση τροφής, όπως στη *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, ένα διεισδυτικό παθογόνο βακτήριο, που προκαλεί γαστρεντερίτιδα, συνήθως με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή νερού. [12,13]

Μόλις πρόσφατα ανακαλύφθηκε, ότι τα κύτταρα *Paneth*, ανταποκρίνονται στην βακτηριακή εισβολή, με αναδρομολόγηση της λυσοζύμης μέσω του μηχανισμού της αυτοφαγίας, ένα εναλλακτικό σύστημα έκκρισης, που ονομάζεται εκκριτική αυτοφαγία. Η μόλυνση των κυττάρων *Paneth*, σε κυτταρικές σειρές ποντικών, από το βακτήριο *S Typhimurium*, προκαλεί θρυμματισμό του συμπλέγματος Golgi, με αποτέλεσμα να διαταρράσσεται η συμβατική κυτταρική έκκριση. Τα κύτταρα *Paneth*, σε πρόσφατο πείραμα, αντέδρασαν σε αυτή τη εισβολή, με το να συσκευάσουν την αντιβακτηριακή τους πρωτεΐνη, λυσοζύμη, σε κυστίδια που έχουν, διπλή μεμβράνη και πρωτεΐνη LC3, χαρακτηριστικά που εντοπίζονται στη μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων κατά το σχηματισμό τους στη διαδικασία της αυτοφαγίας. Ωστόσο, αντί να συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα, τα κυστίδια αυτά που περιέχουν λυσοζύμη, απελευθερώνονται στον εντερικό αυλό. Μελέτες κατέδειξαν πως άνθρωποι που φέρουν την Thr300→Ala300 (T300A) μετάλλαξη, σε ένα από τα πιο σημαντικά γονίδια της αυτοφαγίας, το γονίδιο ATG16L1, βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο CD. Αυτοί οι ασθενείς επίσης, υποκρύπτουν δυσλειτουργικά κύτταρα *Paneth*, τα οποία δε μπορούν να συσκευάσουν και να εκκρίνουν λυσοζύμη σωστά. [12]

Η γαστροπροστατευτική επομένως, λειτουργία της βλέννας, καλύπτει την επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου, και τα κύτταρα Paneth συμβάλουν στην άμυνα του οργανισμού παράγοντας αντιμικροβιακά πεπτιδία (AMPs) και πρωτεΐνες.[10]

1.3 Αιτιοπαθογένεια

Η αιτιολογία παθογένεσης της ΙΦΝΕ παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη, αν και περιβαλλοντικά αίτια όπως μολυσματικοί, ανοσολογικοί και ψυχολογικοί παράγοντες σε συνδυασμό με μια υπάρχουσα γενετική προδιάθεση, θα μπορούσαν σε μεγάλο βαθμό να αποτελέσουν την αιτία εκδήλωσης της νόσου.[14]



Εικόνα 4. Παθογένεση ΙΦΝΕ. [15]

1.3.1 Παράγοντες περιβάλλοντος

1.3.1.1 Ατμοσφαιρική ρύπανση

Η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι ένας από τους παράγοντες που έχουν αλλάξει δραματικά τα τελευταία χρόνια στις Ασιατικές χώρες, οι οποίες αντιμετωπίζουν πλέον αυξημένο ρυθμό εμφάνισης της ΙΦΝΕ. Φαίνεται πως νεαρά άτομα που κατοικούν σε περιοχές με αυξημένη συγκέντρωση διοξειδίου του αζώτου (NO₂), είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση CD. [16] Η σύντομη έκθεση σε υψηλά επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης, έχει ως αποτέλεσμα, την δημιουργία αυξημένης εντερικής διαπερατότητας και αυξημένης ανοσοαπόκρισης, στο λεπτό έντερο, ενώ η μακροχρόνια έκθεση φαίνεται πως οδηγεί σε αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και μεταβολών στο εντερικό μικροβίωμα όπως προκύπτει από εργαστηριακά πειράματα με ποντίκια. Έχει επίσης αναφερθεί, ότι το όζον και το νιτρώδες οξείδιο, μπορούν να εισχωρήσουν στην εντερική οδό μέσω της πρόσληψης νερού ή τροφής, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (IECs). Αναλύσεις μεμονωμένων ρύπων όπως οι CO₂, NO₂, SO₂, υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ΙΦΝΕ. [4]

1.3.1.2 Διατροφή

Η αύξηση της συχνότητας της νόσου στις βιομηχανοποιημένες, κυρίως, χώρες, συνηγορεί υπέρ της θεωρίας, ότι ορισμένοι διατροφικοί παράγοντες διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη παθογένεια της ΙΦΝΕ, και πιο συγκεκριμένα η λεγόμενη διατροφή «δυτικού τύπου» (Western diet). Η υψηλή κατανάλωση λιπαρών, ζάχαρης και αγελαδινού γάλακτος, έχει ενοχοποιηθεί για τη πιθανή επιβαρυντική τους δράση.

Η διατροφή μπορεί να συμβάλει στην υγεία του γαστρεντερικού συστήματος είτε μέσω της άμεσης επίδρασης της στην ομοιόσταση του εντέρου και του εντερικού φραγμού είτε έμμεσα διαφοροποιώντας την εντερική μικροχλωρίδα. Η υψηλή διατροφική πρόσληψη πρωτεΐνης και κόκκινου κρέατος, έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή παραγωγή βακτηριακών μεταβολιτών όπως αμμωνία, ινδόλες, φαινόλες και σουλφίδια τα οποία ενδεχομένως να είναι επιβλαβή για το έντερο. Αντίθετα, η βακτηριακή ζύμωση των μη εύπεπτων υδατανθράκων που περνούν από το έντερο, οδηγεί στη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) τα οποία αποτελούν το κύριο ενεργειακό νόμισμα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου και ενεργούν ως σηματοδοτικά μόρια με αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ανοσορρυθμιστική δράση,

συμβάλλοντας στη καλή λειτουργία του εντερικού φραγμού. Το λίπος της διατροφής επηρεάζει τη σύνθεση της εντερικής χλωρίδας του εντέρου μέσω της παραγωγής χολικών αλάτων.

Οι 3 βασικές κατηγορίες (εντερότυποι) στις οποίες διαχωρίζεται το εντερικό μικροβίωμα, *Bacteroides*, *Prevotella* και *Ruminococcus*, φαίνεται πως σχετίζονται με τις μακροχρόνιες διατροφικές συνήθειες. Η υψηλή κατανάλωση πρωτεϊνών και λιπών συνδέεται με την κυριαρχία του είδους *Bacteroides* ενώ δίαιτες πλούσιες σε υδατάνθρακες με τον εντερότυπο *Prevotella*. [17]

Στην μελέτη EPIC, μια μεγάλη προοπτική μελέτη κοορτής, στην οποία εκτός των άλλων, μελετήθηκε η υπόθεση της αντίστροφης συσχέτισης μεταξύ της πρόσληψης διαιτητικών ινών και της εμφάνισης CD ή UC, βρέθηκε πως δεν υπάρχει συσχετισμός, παρά τους πιθανούς βιολογικούς μηχανισμούς που υποστηρίζουν μια θετική επίδραση των φυτικών ινών στην υγεία του εντέρου, συμπεριλαμβανομένου του μειωμένου χρόνου διέλευσης της τροφής από το έντερο και κατ' επέκταση το μειωμένο χρόνο επαφής του εντερικού βλεννογόνου με δυνητικά επιβλαβείς ουσίες της τροφής. [18] Από την άλλη, δεδομένα από την Nurses Health μελέτη, στην οποία παρακολουθήθηκαν 170 776 γυναίκες, κατέδειξαν ότι η υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών από φρούτα και λαχανικά, και όχι από ολικής αλέσεως δημητριακά και όσπρια, μείωσε το κίνδυνο εμφάνισης CD κατά 40%. [15] Τα αποτελέσματα πρόσφατης συστηματικής ανασκόπησης 19 μελετών, (18 μελέτες ασθενών-μαρτύρων και 1 μελέτη κοορτής, 1340 ασθενείς με UC και 1269 με CD στο σύνολο) έδειξαν ότι η υψηλή πρόσληψη συνολικού λίπους, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και Ω6 λιπαρών οξέων, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης UC. Σε ότι αφορά τον κίνδυνο εμφάνισης CD, αυξημένες βρέθηκαν να είναι οι πιθανότητες να νοσήσουν άτομα με υψηλή πρόσληψη PUFA, Ω6 και κορεσμένων λιπών. [19]

1.3.1.3 Θηλασμός

Ο θηλασμός αποτελεί πρώιμη έκθεση ενός ατόμου σε έναν περιβαλλοντικό παράγοντα, που επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και το σχηματισμό του εντερικού του μικροβιώματος. Το ανθρώπινο γάλα περιέχει λακτοφερρίνη, μια πρωτεΐνη που αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, IgA αντισώματα που εμποδίζουν τη προσδεση βακτηρίων στο εντερικό επιθήλιο και αδρανοποιούν τις τοξίνες τους και μια ειδική πρωτεΐνη (lactadherin) που εμποδίζει τη σύνδεση του ροταιού στις ιντεγκρίνες, ομάδα μορίων

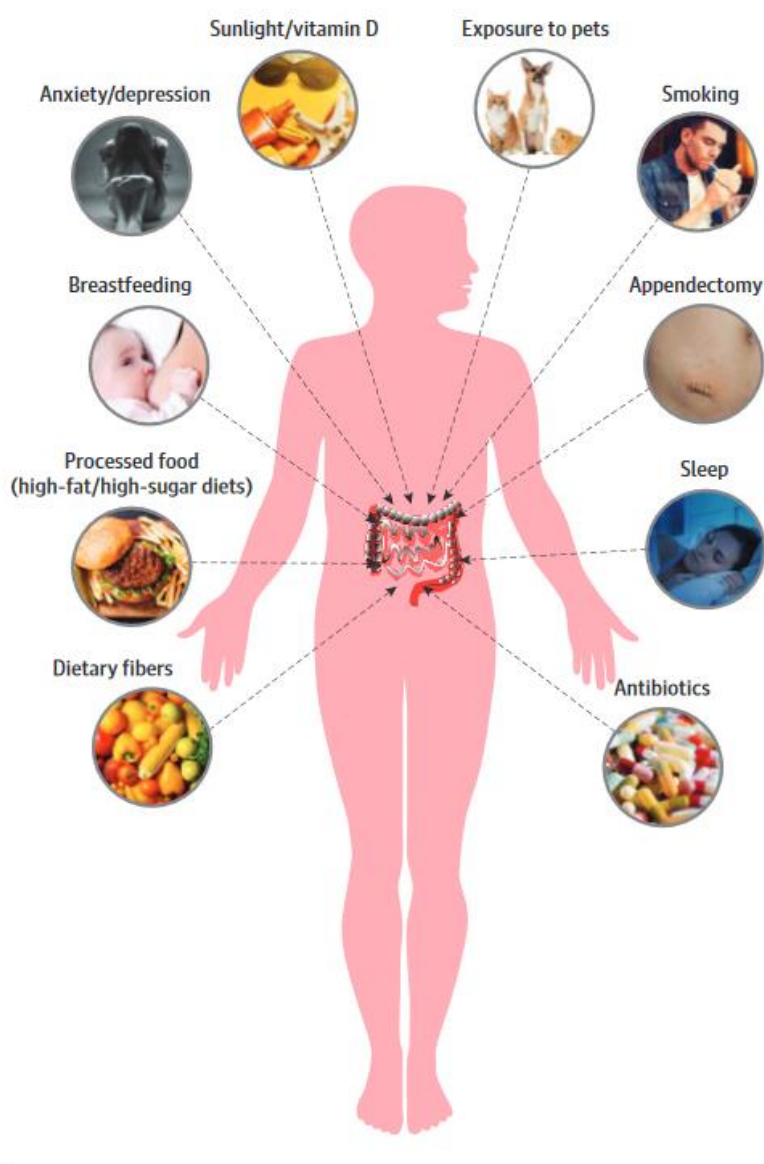
προσκόλλησης των κυττάρων. Τα κύτταρα – στόχοι του ροταιού, είναι τα ώριμα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου, στα οποία προκαλεί βλεννογονική ατροφία. [19] Πλήθος μελετών, έχει επιβεβαιώσει τις ισχυρές και μακροχρόνιες επιδράσεις του θηλασμού στην σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος.[4] Πτώση στα ποσοστά θηλασμού καταγράφεται μετά τη λήξη του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, και συμπίπτουν με την άνοδο της επίπτωσης της ΙΦΝΕ στις επόμενες δεκαετίες. Το 1922, το 90% των βρεφών στις ΗΠΑ, θηλάζονταν για 12 μήνες τουλάχιστον, ενώ στη δεκαετία του 1960 ο επιπολασμός του θηλασμού εκτιμάται ότι ήταν μόλις 18%.

Πρόσφατη μετα-ανάλυση, συνδύασε τα αποτελέσματα 35 ανεξάρτητων μελετών, με σημαντική ετερογένεια μεταξύ τους, στις οποίες συμμετείχαν 7536 ασθενείς με CD, 7353 ασθενείς με UC και 330 222 μάρτυρες, και έδειξε πως ο θηλασμός σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης CD (OR 0.71, 95% CI 0.59-0.85) και UC (OR 0.78, 95% CI 0.67-0.91). Παρόλο που αυτή η προστατευτική επίδραση στην CD, παρατηρήθηκε σε όλες τις εθνικές ομάδες, το μέγεθος της προστασίας ήταν σημαντικά πιο αυξημένο στους Ασιάτες (OR 0.31, 95% CI 0.20-0.48) σε σύγκριση με τους Καυκάσιους (OR 0.78, 95% CI 0.66-0.93; $P = 0.0001$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε όσο – εξαρτώμενη σχέση, με την μεγαλύτερη μείωση του κινδύνου να σημειώνεται όταν ο θηλασμός ξεπερνούσε τη χρονική διάρκεια των 12 μηνών για την CD (OR 0.20, 95% CI 0.08-0.50) και την UC (OR 0.21, 95% CI 0.10-0.43) σε σύγκριση με τους 3 ή 6 μήνες διάρκειας θηλασμού.[20] Το ενδεχόμενο η επίδραση του θηλασμού να επιδεικνύει θετικό όφελος σε ασθενείς που έχουν αναπτύξει ήδη ΙΦΝΕ είναι λιγότερο καλά μελετημένο. Μια απλή αναφορά από ιατρικό κέντρο με 333 ασθενείς με CD και 270 ασθενείς με UC, έδειξε ότι το ιστορικό θηλασμού συσχετίστηκε με μειωμένες πιθανότητες χειρουργικής παρέμβασης σε ασθενείς με CD.[4]

1.3.1.4 Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ο περιβαλλοντικός παράγοντας που έχει διερευνηθεί περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο σε μελέτες κοορτής που σχετίζονται με την ΙΦΝΕ. Η αντικατάσταση της νικοτίνης, δεν μπορεί να ανταγωνιστεί και να εξισωθεί, με τα επακόλουθα οφέλη της διακοπής του καπνίσματος, υποδεικνύοντας έτσι ότι δεν είναι αυτή καθ' αυτή η νικοτίνη, που μεσολαβεί στην επιβαρυντική δράση του καπνίσματος στην ΙΦΝΕ. Τα στοιχεία δείχνουν πως το

κάπνισμα επιδρά στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, προκαλώντας αύξηση των *Firmicutes* και των *Actinobacteria* και μείωση των *Bacteroidetes* και των *Proteobacteria*. [16]



Εικόνα 5. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που μεταβάλλουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ΙΦΝΕ. [15]

Τα στοιχεία δείχνουν πως το κάπνισμα αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης CD στους τρέχοντες καπνιστές [HR = 1.90 (95%CI: 1.42-2.53)] και ο αυξημένος κίνδυνος σχετίζεται με τον αριθμό των ετών καπνιστικής συνήθειας (P trend < 0.0001). Η διακοπή του καπνίσματος φαίνεται πως μειώνει τον σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [HR = 1.35 (95%CI: 1.05-1.73)]. Το παθητικό κάπνισμα στην παιδική ηλικία δε θεωρείται πλέον παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης ΙΦΝΕ.[19]

1.3.1.5 Φάρμακα

Τα αντιβιοτικά επηρεάζουν την σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου.[16] Οι Card *et al*, βρήκαν ότι τα άτομα με ΙΦΝΕ είχαν λάβει περισσότερες αντιβιοτικές αγωγές από την ομάδα μαρτύρων, πολλά έτη πριν από τη διάγνωση της νόσου. [21] Πρόσφατη μετα- ανάλυση ανέφερε ότι η έκθεση σε αντιβιοτικά, συνδέεται σημαντικά με νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά CD (OR=1,74 , 95%CI:1,35-2,23) αλλά όχι UC (OR=1,08 , 95%CI: 0,91-1,27).[22] Σε μια άλλη μετα-ανάλυση που συνδύασε τα αποτελέσματα 14 μελετών ασθενών-μαρτύρων, και μελέτησε την επίδραση των αντισυλληπτικών χαπιών (OCPs) στην εμφάνιση ΙΦΝΕ, φάνηκε πως πράγματι η κατανάλωση τους σχετίστηκε θετικά με την εμφάνιση CD και UC. Ο σχετικός κίνδυνος (RR) για τις γυναίκες που λάμβαναν OCPs ήταν 1,46 (95% CI: 1,26-1,70, P <0,001, προσαρμοσμένα στον παράγοντα κάπνισμα) και 1,28 (95% CI: 1,06-1,54, P = 0,011) για την CD και την UC αντίστοιχα. Ο κίνδυνος εμφάνισης ήταν μεγαλύτερος με την παρατεταμένη χρήση των αντισυλληπτικών χαπιών, ενώ οι γυναίκες που διέκοπταν την χρήση τους, δε βρίσκονταν πλέον σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.[23] Επιπλέον, η συχνή χρήση (>15d/mo) μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών, φαίνεται πως αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης CD και UC στις γυναίκες, με σχετικό κίνδυνο RR=1,59 και 1,87, αντίστοιχα. Τέλος, οι στατίνες φαίνεται πως έχουν έναν προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη ΙΦΝΕ.[15]

1.3.1.6 Stress

Δεν υπάρχει πια η υπόνοια ότι η ΙΦΝΕ αντιπροσωπεύει μια ψυχοσωματική ασθένεια με τη κλασσική έννοια. Ωστόσο, ψυχοκοινωνικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν στον καθορισμό της σοβαρότητας της νόσου και στα στάδια έξαρσης/ύφεσης.[16] Υπάρχουν πολλά μεταβολικά μονοπάτια όπου το stress μπορεί να διαδραματίσει επιβλαβή ρόλο, συμπεριλαμβανομένων

της αύξησης της διαπερατότητας του εντέρου, διευκολύνοντας με αυτό το τρόπο την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) και το ανοσοποιητικό σύστημα, συνεργάζονται στενά μεταξύ τους όταν το σώμα αντιμετωπίζει μια αγχωτική κατάσταση. Το ανοσοποιητικό σύστημα, όταν διεγείρεται από ένα στρεσογόνο γεγονός, ενεργοποιεί τον άξονα HPA, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών, οι οποίες οδηγούν με τη σειρά τους στην παραγωγή ισχυρών αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως είναι τα γλυκοκορτικοστεροειδή. Διαταραχές μεταξύ του άξονα HPA και του ανοσοποιητικού συστήματος, θα μπορούσαν να συμβάλουν στην ανάπτυξη φλεγμονώδους περιβάλλοντος, ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι το stress προκαλεί αυξημένη φλεγμονή στο έντερο και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΙΦΝΕ.[19,24]

Το stress παρόλα αυτά, έχει μεγάλο αντίκτυπο στα συμπτώματα της νόσου. Σε μελέτη των Tocchi *et al*, καταγράφηκαν τα σημαντικότερα γεγονότα της ζωής που συνδέθηκαν με έντονο στρες, τους τελευταίους 12 μήνες, σε ποσοστό 44% σε ασθενείς με σοβαρή ΙΦΝΕ έναντι 11% ασθενών που βρίσκονταν σε κατάσταση ύφεσης. [52,53]

1.3.1.7 Υπνος

Εχει υποστηριχτεί η άποψη ότι οι διαταραχές του ύπνου δεν είναι απλώς ένα επακόλουθο της εντερικής νόσου αλλά πιθανώς να αποτελεί αιτία χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων όπως η ΙΦΝΕ. Ο ύπνος χωρίζεται σε δύο μέρη, τον ύπνο γρήγορων κινήσεων των ματιών ή αλλιώς ύπνος REM και τον ύπνο non REM. Ο ύπνος non REM, αντιπροσωπεύει το 80% του συνολικού χρόνου του ύπνου, και κατανέμεται σε 4 στάδια. Τα στάδια 3 και 4 του non REM ύπνου, τα βαθύτερα και πιο αποκαταστατικά στάδια του ύπνου, αναφέρονται συχνά ως ύπνος αργού κύματος (SWS) και συμβάλουν στην καλύτερη ενίσχυση και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι μεταβολές στο στάδιο του SWS, όπου εκτός των άλλων, θεωρείται και περίοδος «ανάπαυσης» του παχέος εντέρου, μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της συσταλτικότητας του εντέρου, με άμεση επίδραση στη φυσιολογία του γαστρεντερικού συστήματος καθώς και στην μειωμένη ακεραιότητα του εντερικού βλεννογόνου. Σε μελέτη όπου διαταράχθηκε ο ύπνος σε υγιείς νέους εθελοντές, φάνηκε πως αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της IL-1, του TNF-α παράγοντα, της IL-6 και των κύριων προφλεγμονωδών κυτοκινών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ΙΦΝΕ.[19]

Σε μελέτη όπου συμμετείχαν 1291 ασθενείς με CD, τα αποτελέσματα έδειξαν πως εκείνοι που εμφάνιζαν διαταραχές ύπνου, είχαν δύο φορές αυξημένο το κίνδυνο υποτροπιάσης και

έξαρσης της νόσου στους 6 μήνες. Παρόμοια συσχέτιση, δεν εμφάνισαν οι συμμετέχοντες ασθενείς με UC, αν και σε διαφορετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την επίδραση του ύπνου στην ανάπτυξη της νόσου, βρέθηκε πως η διάρκεια ύπνου <6 ωρών ή >9 ώρες, σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης UC. [15]

1.3.1.8 Υδάτινη μόλυνση

Η ρύπανση των υδάτων, φαίνεται πως μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο την εμφάνιση ΙΦΝΕ αλλά και την ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπευτική τους αγωγή. Ανταγωνιστές των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, έχουν βρεθεί σε πόσιμα συσκευασμένα εμφιαλωμένα νερά. Οι «χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές» ή αλλιώς EDCs, όπως το φθαλικό οξύ και οι εννευλοφαινόλες, μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση των γλυκοκορτικοστεροειδών, επηρεάζοντας το μεταβολισμό των στεροειδών ορμονών μέσω του υποδοχέα PXR. Οι EDCs ανταγωνίζονται διάφορους υποδοχείς πρωτεϊνών όπως τον υποδοχέα ανδρογόνων, τους PPAR-γ υποδοχείς, καθώς και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Έχει βρεθεί σε *in-vitro* μελέτες, ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοστεροειδών και οι PPAR-γ υποδοχείς, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεση της ΦΝΕ. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία σε *in vivo* μελέτες σχετικά με την επίδραση των EDCs στον κίνδυνο εμφάνισης και στην εξέλιξη της νόσου. [16,19]

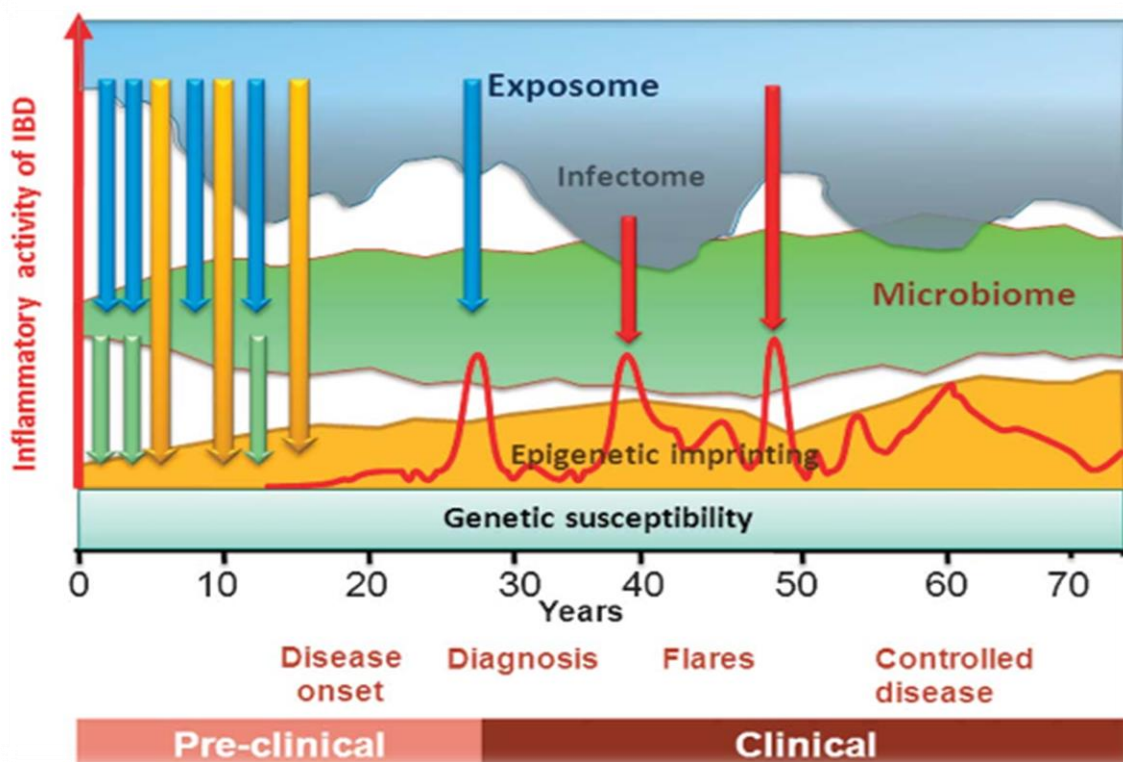
1.3.2 Γενετικοί παράγοντες

Επιδημιολογικά στοιχεία παρέχουν δεδομένα για το ρόλο των γονιδίων στην εξέλιξη της νόσου: 15% των ασθενών με CD έχει ένα συγγενικό μέλος που έχει αναπτύξει και αυτό ΙΦΝΕ ενώ μελέτες σε διδύμους αποδεικνύουν ότι ο ρυθμός εμφάνισης της νόσου CD κυμαίνεται σε ποσοστό 59% σε μονοζυγωτικούς διδύμους ενώ σε διζυγωτικούς διδύμους το ποσοστό ξεπερνά το 10%. [25] Όπως συμβαίνει και με πολλές άλλες σύνθετες ασθένειες, η γενετική βάση της ΙΦΝΕ φαίνεται να αντανακλά ένα συνδυασμό μικρών μεταβολών στο DNA, με τη μορφή πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) ή μέσω παραλλαγών του αριθμού αντιγράφων (CNVs), με αποτέλεσμα να μην προκαλεί άμεσα τη πάθηση αλλά να καθιστά τα άτομα πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη της νόσου. [26]

Οι αρχικές προσπάθειες για την ταυτοποίηση των προδιαθεσικών γενετικών τόπων που συνδέονται με την ανάπτυξη της CD, ήταν σχετικά απογοητευτικές καθώς οι πρώτες μελέτες γενετικής σύνδεσης βασίστηκαν στους χάρτες σύνδεσης (linkage mapping). Η περαιτέρω όμως ανάπτυξη των μελετών σάρωσης γονιδιώματος (GWAS) βοήθησε στην ταυτοποίηση 241 γενετικών προδιαθεσικών τόπων, όπως έχουν επιβεβαιωθεί από πιο πρόσφατη ανάλυση. Μέχρι το 1996, οι περιοχές χρωμοσμάτων που είχαν συσχετιστεί με την ανάπτυξη της ΙΦΝΕ εμφανίζονταν στα χρωμοσώματα 16, 3, 7 και 12 ενώ στη συνέχεια ενοχοποιήθηκαν με ταχείς ρυθμούς τα χρωμοσώματα 1 έως και 9. Το 2001, το πρώτο γονίδιο που αναγνωρίστηκε ότι αυξάνει αναμφίβολα τον κίνδυνο ανάπτυξης της ΙΦΝΕ ήταν το NOD2 ή αλλιώς CARD15, που εκφράζεται στο χρωμόσωμα 16. Το γονίδιο αυτό, ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ανοσοαπόκρισης και σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρει αύξηση της έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. [7] Το γονίδιο NOD2 διαδραματίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία καθώς είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των βακτηριακών πεπτιδογλυκανών, συμβάλλοντας στην άμυνα του ξενιστή εναντίον των ενδοκυττάρων παθογόνων βακτηρίων. [26] Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με NOD2 μεταλλάξεις, έχουν ανεπαρκή αντιβακτηριακή απόκριση, πιθανόν λόγω της μειωμένης παραγωγής της α-ντεφενσίνης ή λόγω απορρυθμισμένης αυτοφαγίας, οδηγώντας έτσι σε αυξημένα επίπεδα του NF-κΒ. [27] Ο πολυμορφισμός NOD2 3020insC είναι μια πολύ καλά μελετημένη γενετική παραλλαγή στην CD. Η μετάλλαξη αυτή έχει ως συνέπεια το σχηματισμό πρόωρου κωδικόνιου λήξης, με αποτέλεσμα την μειωμένη ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ μετά από βακτηριακή λοίμωξη. [26]

Οι περισσότερες μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος, έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση συσχετισμών μεταξύ ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) και του χρόνου εξέλιξης της νόσου, σε ένα υποψήφιο γονίδιο, ενώ πολύ λίγες μελέτες έχουν εστιάσει στο ποιοι γενετικοί δείκτες, μπορούν ενδεχομένως να προβλέψουν τον χρόνο μετατροπής της CD, από την αρχική της φάση σε προχωρημένη νόσο. [7,26,28]. Σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη, 161 ασθενείς με διαγνωσμένο φλεγμονώδη φαινότυπο, παρακολούθηθηκαν για 10 έτη ενώ ελήφθησαν δείγματα DNA και πραγματοποιήθηκε ανάλυση του γονότυπου τους. Η μελέτη επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μεταξύ ενός γενετικού τόπου στο χρωμόσωμα 1 κοντά στο γονίδιο CACNA1E με τον χρόνο εξέλιξης της CD από φλεγμονώδη σε διεισδυτική νόσο. Οι ερευνητές, βασισμένοι σε πρόσφατες μοριακές μελέτες, αναγνωρίζουν ότι οι γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονώδους ανταπόκρισης, της

ανοσολογικής ανταπόκρισης και άλλων σχετικών μεταβολικών μονοπατιών (συμπεριλαμβανομένου των microRNA και της αυτοφαγίας) παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΙΦΝΕ.[7]



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του exposome, του μικροβιώματος, του επιγενετικού αποτυπώματος και της γενετικής προδιάθεσης, σε έναν ασθενή με IBD, με τη πάροδο του χρόνου. Η γενετική προδιάθεση παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Αντίθετα, οι επιγενετικές αλλαγές, πραγματοποιούνται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του ατόμου και μπορούν να προκληθούν από συστατικά μικροβίων (πράσινα βέλη), ή άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κιτρινα βέλη). Περιβαλλοντικοί όμως παράγοντες όπως η διατροφή, η ρύπανση των υδάτων και τα πρόσθετα συντηρητικά των τροφίμων, μπορούν να αλλάξουν μόνο την σύνθεση της μικροχλωρίδας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει επιγενετικές αλλαγές. Σε έναν ξενιστή με επιρρεπή γενετικό υπόβαθρο, οι επιγενετικές αλλαγές και το περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν την αντιφλεγμονώδη αντίδραση στην IBD. Επιπλέον, άλλοι περιβαλλοντικοί και ψυχολογικοί παράγοντες, συμβάλλουν στην έξαρση και ύφεση της νόσου (κόκκινα βέλη). [50]

1.3.2.1 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία, μια ευκαριωτική κυτταρική απόκριση στην αστία, στην υποξία, στην τοξικότητα και σε άλλες συνθήκες stress, προάγει την επιβίωση των κυττάρων καθώς και την άμυνα του οργανισμού ρυθμίζοντας τη φλεγμονή. [29] Δεδομένης της σημασίας του μικροβιώματος στην ανάπτυξη ΙΦΝΕ, η αυτοφαγία συνδέεται έμμεσα, καθώς παίζει ρόλο στην εξάλειψη των παθογόνων μικροβίων, διαδικασία γνωστή και ως 'xenophagy'. [28]

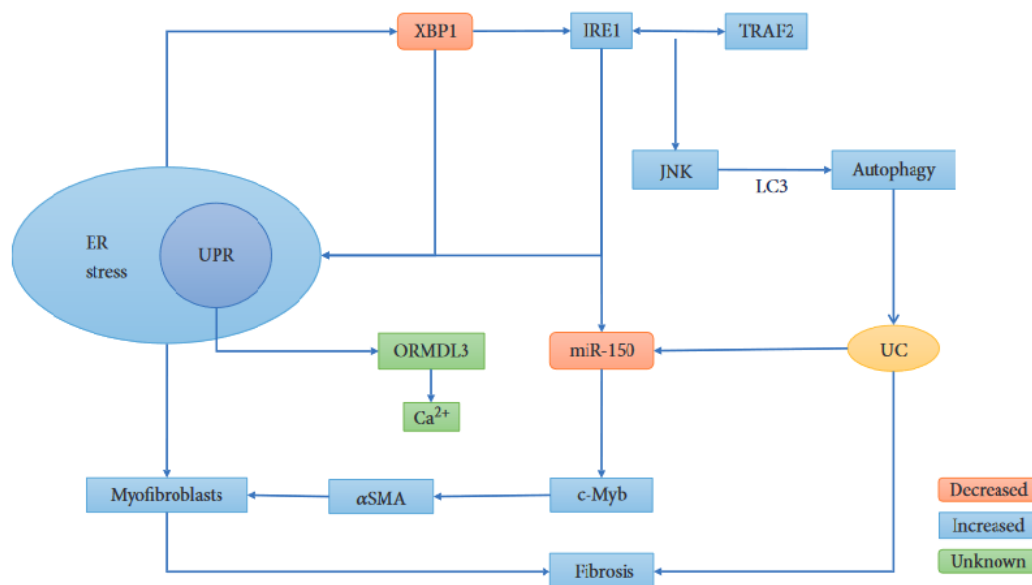
Ο ακριβής μηχανισμός συμβολής της ελαττωματικής αυτοφαγίας στην εμφάνιση CD μέχρι τώρα δεν έχει διευκρινιστεί, είναι πιθανό όμως να εμπλέκεται σε μηχανισμούς παθογένειας της νόσου όπως είναι η απορρυθμισμένη ανοσολογική απόκριση στα συμβιωτικά βακτήρια, η μείωση ακεραιότητας του εντερικού φραγμού ή η μειωμένη αντιμετώπιση παθογόνων βακτηρίων. [30] Για παράδειγμα, όταν η αυτοφαγία είναι ελαττωματική, το βακτήριο *Escherichia coli* δεν εξουδετερώνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TNF-α και η IL-6, στην εντερική οδό. Πολυμορφισμοί σε αρκετά γονίδια που σχετίζονται με την αυτοφαγία όπως τα γονίδια NOD2, ATG16L1 και IRGM, έχουν συνδεθεί με την παθογένεση της ΙΦΝΕ μέσω μελετών σάρωσης γονιδιώματος (GWAS). [10]

Η ανακάλυψη των γονιδίων της αυτοφαγίας και ειδικότερα του Atg16l1, βοήθησε στο να αναγνωριστεί ο σημαντικός ρόλος πως έχουν τα κύτταρα Paneth στην CD. Τα κύτταρα Paneth εμπλέκονται ενεργά στη διαδικασία προάσπισης του εντερικού βλεννογόνου παράγοντας αντιμικροβιακές πρωτεΐνες. Από τις πρώτες κίολας μελέτες που διεξήχθησαν σχετικά με το ρόλο της αυτοφαγίας στην εντερική φλεγμονή, έδειξαν ότι ποντίκια με μειωμένη έκφραση του γονιδίου Atg16l1, είχαν αναπτύξει μη φυσιολογικά κύτταρα Paneth, με μειωμένο αριθμό και μέγεθος των εκκριτικών κοκκίων. Παρόμοιες ανωμαλίες στα κύτταρα Paneth παρατηρήθηκαν και σε ασθενείς με CD που ήταν ομόζυγοι στο Atg16l1 T300A αλληλόμορφο. Επιπλέον, οι Kuballa et al, [31] έδειξαν από πειράματα σε κυτταρικές καλλιέργειες ότι το αλληλόμορφο Atg16l1 T300A συνδέεται με ελαττωματική αυτοφαγία ενάντια του παθογόνου βακτηριδίου, *Salmonella*.

Επιπλέον, η αυτοφαγία έχει συνδεθεί με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), το οποίο φαίνεται πως προάγει την φλεγμονή στην ΙΦΝΕ. [28] Το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελεί σημείο σύνθεσης, αναδίπλωσης, μετάφρασης και τροποποίησης πρωτεϊνών καθώς και σύνθεσης διαφόρων λιπιδίων. Αποτελεί επίσης τη κύρια αποθήκη συγκέντρωσης

ασβεστίου.[32] Η διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών του ER, οδηγεί στην παρεμπόδιση της ορθής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και της εκκριτικής ικανότητας του ER καθώς επίσης και στη συσσώρευση μη ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών μέσα στον αυλό του, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια κατάσταση γνωστή και **ως στρες του ενδοπλασματικού δικτύου**. Το στρες αυτό, ενεργοποιεί ένα πολύπλοκο και πολύπλευρο ενδοκυτταρικό μηχανισμό σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου της αυτοφαγίας, που είναι σχεδιασμένος για την επαναφορά της ομοιόστασης του οργανιδίου. Η αδυναμία επαναφοράς της ομοιόστασης και των λειτουργιών του ER επάγει τον κυτταρικό θάνατο με την μορφή της απόπτωσης. Η αυτοφαγία μπορεί να απομακρύνει την ουβικιτίνη των λανθασμένα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών μειώνοντας το στρες του ER. Ωστόσο, η υπερβολική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας που προκαλείται από την αυξημένου βαθμού/διάρκεια του στρες φαίνεται πως οδηγεί τελικά στην απόπτωση του κυττάρου. [33] Το ER στρες στα επιθηλιακά κύτταρα, σχετίζεται με την αυξημένη ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, η οποία σε συνδυασμό με την εντερική δυσβίωση και την εξασθένηση του εντερικού φραγμού, εμπλέκεται στην παθογένεση εντερικών παθήσεων συμπεριλαμβανομένου της ΙΦΝΕ. [32]

Επιπλέον, υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ της αυτοφαγίας και της απόπτωσης. Γενικότερα, η αυτοφαγία εμποδίζει την απόπτωση του κυττάρου, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών, πρωτεάσες που παίζουν κεντρικό ρόλο στην μεταβίβαση των αποπτωτικών σημάτων. Ωστόσο, σε ειδικές περιπτώσεις η αυτοφαγία προάγει την επαγωγή της απόπτωσης ρυθμίζοντας πάλι τη δραστηριότητα της κασπάσης -8. Συμπερασματικά φαίνεται πως η αυτοφαγία έχει διττό ρόλο στο στρες του ER, καθώς ανάλογως το βαθμό του στρες, μπορεί να δράσει υπέρ της προ-επιβίωσης του κυττάρου ή υπέρ της απόπτωσης του. [33] Έρευνες υποδεικνύουν ότι τα microRNAs ρυθμίζουν την αυτοφαγία μέσω διαφορετικών οδών, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ΙΦΝΕ, παρέχοντας μια νέα προοπτική στην έρευνα αντιμετώπισης της νόσου. [7]



Εικόνα 7. Ενδοπλασματικό stress και αυτοφαγία.[29]

Οι Cheng S *et al*, σε ένα πρόσφατο πείραμα τους, χρησιμοποιώντας με επιτυχία τη μέθοδο μεταμόσχευσης κοπράνων στο έντερο νεογέννητων χοιριδίων και χοιριδίων μολυσμένων με E.Coli K88, διαπίστωσαν ότι το τελικό αποτέλεσμα αποκατάστασης των ελαττωματικών εντερικών λαχνων στα προσβεβλημένα χοιρίδια, αποδίδεται ενδεχομένως στη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στον εντερικό βλεννογόνο. Η παρέμβαση αλλαγής της μικροχλωρίδας στα χοιρίδια είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των επιπέδων των πρωτεϊνών FoxO1a και FoxO3, όπως επίσης των πρωτεϊνών GABARAPS, LC3 και Atg7 στο βλεννογόνο των ασθενών ποντικών. [34]

Οι Johanna Pott και Kevin J. Maloy αναφέρουν ότι η αυτοφαγία στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (IEC), περιορίζει την εντερική φλεγμονή, προστατεύοντας τα από την απόπτωση που προκαλείται από τον TNF παράγοντα. Πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με επιλεκτική έλλειψη του μηχανισμού αυτοφαγίας στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Atg16l1 VC Mice), στα οποία πραγματοποιήθηκε εγχυση του TNF-α παράγοντα, έδειξε πως τα ποντίκια αυτά είχαν υψηλότερα ποσοστά αποπτωτικών κυττάρων στο λεπτό έντερο σε σύγκριση με ποντίκια wild type. [30]

Οι Koichiro Tsuboi *et al* δημιούργησαν Atg7 cKO ποντίκια ,υπολλειπόμενα στο ειδικό γονίδιο που σχετίζεται με την αυτοφαγία (Atg7) στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, και

ανέφεραν επιδείνωση της πειραματικής κολίτιδας, αυξημένη βακτηριακή εισβολή στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, μειωμένη έκκριση προστατευτικής βλέννας και μειωμένη έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων.[31]

1.3.2.2 mi-RNAs

Τα μικρο- RNAs (mRNAs ή miRs) είναι μη κωδικοποιούμενα μόρια RNA, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η έκφραση τους ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου της μεθυλίωσης και της αποακετυλίωσης του DNA, καθώς και της τροποποίησης της κερατίνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μηχανισμούς όπως η φλεγμονή, οφειλόμενη στην υψηλή συγκέντρωση Th17 λεμφοκυττάρων, και η αυτοφαγία, μηχανισμοί που εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία της ΙΦΝΕ. Ορισμένες μελέτες έχουν ήδη επικεντρωθεί στο πως τα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν στόχο για τη θεραπεία της ΙΦΝΕ ενώ άλλες εξετάζουν τη χρήση miRNAs ως διαγνωστικά εργαλεία τόσο στην ανίχνευση της όσο και στη διαφοροποίηση των υποτύπων της μεταξύ τους.[11]

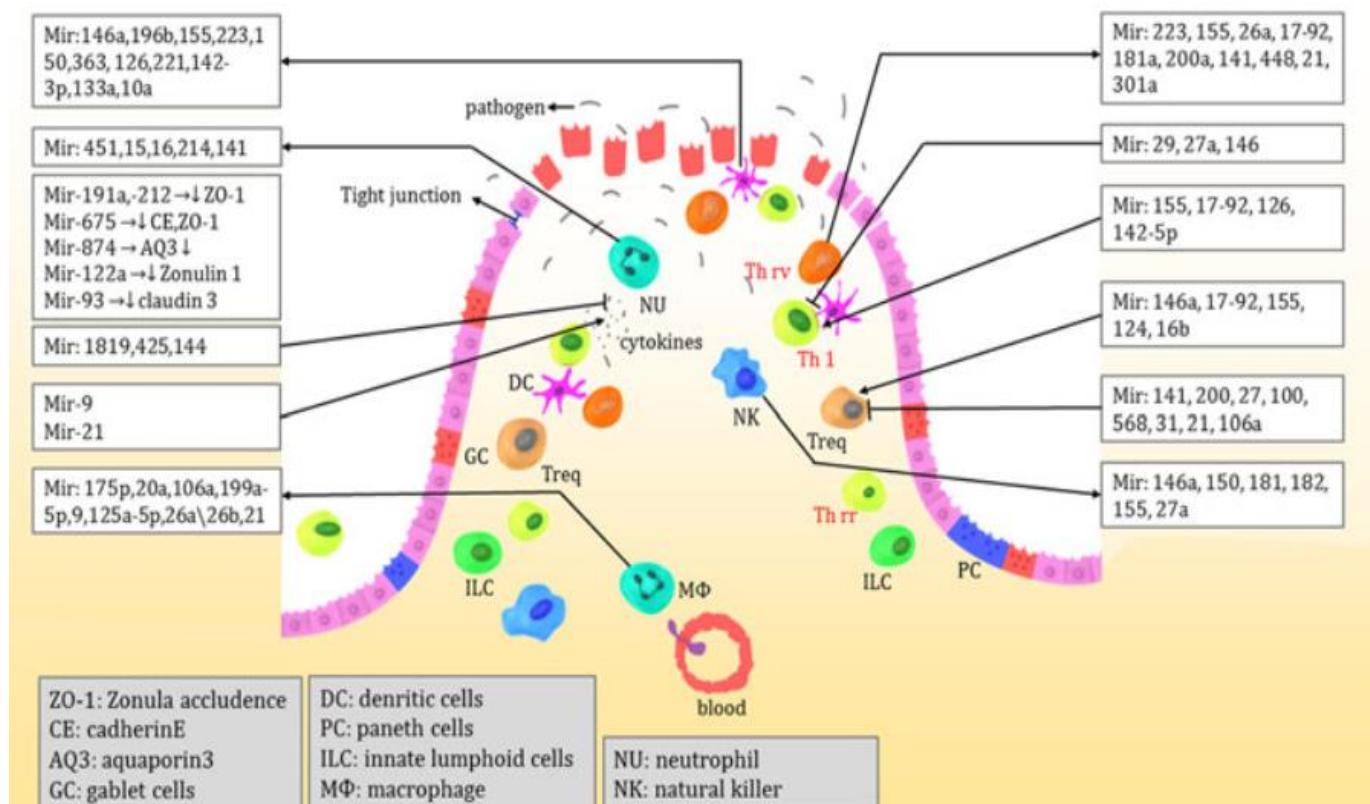
Πολλά miRNAs φαίνεται πως σχετίζονται με γονίδια της αυτοφαγίας ενώ πολλά ερευνητικά στοιχεία δείχνουν πως και η αυτοφαγία μπορεί να ρυθμίσει την ομοιοστασία των mRNAs μέσω της αποικοδόμησης του συμπλόκου miRISC, παράγοντας που εμπλέκεται στη σιώπηση γονιδίων. Η αυτοφαγία συμμετέχει στη ρύθμιση του συμπλέγματος miRISC-AGO2 σε επιθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα. Η πρωτεΐνη AGO2 ρυθμίζει 4 miRNAs: miR-148a, miR-15b, miR23a και let-7c, εκ των οποίων τα δυο τελευταία έχουν συνδεθεί με την ενεργό ελκώδη κολίτιδα.[35]

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι κάποια miRNAs όπως miR-21, miR-34C, miR-191a, miR-200b, miR-93, miR-150, miR-874, miR-122a, miR-675 κ.α συμβάλουν τόσο στην ενίσχυση όσο και στην μείωση της ακεραιότητας του **εντερικού φραγμού**. Τα miR-874 και miR-122a, εξασθενούν τον εντερικό φραγμό, μειώνοντας τα επίπεδα της ακουοπορίνης 3, η οποία εντοπίζεται στη πλαγιοβασική μεμβράνη των κυττάρων του παχέος και του λεπτού εντέρου και αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες για την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού. Το miR-122a, αυξάνει επίσης τα επίπεδα της ζωνουλίνης, μειώνοντας τα επίπεδα του υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR), στοχεύοντας στα μονοπάτια σηματοδότησης του. Η ζωνουλίνη είναι μια από τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στις συνδέσεις του εντερικού επιθηλίου, γνωστές και ως **δείκτες της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού**.

[11] Όταν η ζωνουλίνη συνδέεται με τους επιφανειακούς υποδοχείς της, τα ενδοκυτταρικά νημάτια ακτίνης πολυμερίζονται, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των σφιχτών συνδέσεων του επιθηλίου και την αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού. [36]

Το miR-21, είναι επίσης ένα mRNA που χαλαρώνει τις συνδέσεις του επιθηλίου μέσω του μονοπατιού PTEN/PI3K/Akt. Το miR-150 προκαλεί δυσλειτουργία στον εντερικό φραγμό, μειώνοντας τις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης c Mgc, ενός μεταγραφικού παράγοντα. Από την άλλη, το miR-93 φαίνεται από κάποιες μελέτες, πως ασκεί προστατευτική δράση μειώνοντας την έκφραση της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης 6 (PTK6), η οποία διαταράσσει τη στενή σύνδεση των δεσμών των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού φραγμού. Το miR-31 φαίνεται πως ενδεχομένως να μπορεί να αποτελέσει έναν πιθανό **δείκτη ταυτοποίησης** της ΙΦΝΕ, καθώς έχει βρεθεί πως σχετίζεται με τη νόσο Crohn, και μπορεί να διαχωρίσει τον φαινότυπο που προσβάλλει τον ειλέο από τον φαινότυπο που προσβάλλει το παχύ έντερο. Σε διαφορετική μελέτη, φάνηκε πως 11 διαφορετικά mRNAs συμπεριλαμβανομένων των miR-16, miR- 20a, miR-21, miR- 30e, miR-93, miR-106a, miR- 140, miR- 192, miR-195, miR-484 και miR-77b έχουν ευαισθησία μεταξύ 70% με 83% και εξειδίκευση μεταξύ 75% και 100% στη διάγνωση της CD. [11] Ωστόσο, τα δείγματα στις περισσότερες μελέτες δεν είναι επαρκή έτσι ώστε να θεωρηθούν κατάλληλα και να χρησιμοποιηθούν τα mRNAs στην κλινική εφαρμογή με απόλυτη αξιοπιστία. Απαιτείται ανάλυση μεγαλύτερων δειγμάτων.[35] Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένες ενώσεις όπως οι φαινολικές και η νικοτίνη, ασκούν τη προστατευτική τους δράση ενάντια στη **φλεγμονή** του εντέρου, στοχεύοντας κάποια mRNAs όπως το miR-126, miR- 124 και το miR- 145. [11]

Η ανάπτυξη δυσπλασίας σε ασθενείς με ΙΦΝΕ είναι συχνά δύσκολο να διαγνωστεί σε πρώιμα στάδια καθώς το φλεγμονώδες εντερικό επιθήλιο δυσχεραίνει την ανεύρεση τετοιων βλαβών. Η μη φυσιολογική έκφραση miRNAs, έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκίνου σχετιζόμενου με ΙΦΝΕ. Οι συνδυασμοί επίσης πολλών miRNAs δείχνουν πιθανή διαγνωστική αξία στην πρόβλεψη της πρόγνωσης της ΙΦΝΕ .[35] Οι *Kannan et al*, εξέτασαν το προφίλ έκφρασης miRs σε ασθενείς με UC και CD, και διαπίστωσαν ότι 5 miRNAs εκφράζονταν σημαντικά λιγότερο κατά την μετατροπή μη νεοπλασματικού ιστού σε δυσπλασία και στη συνέχεια νεοπλασίας, υποδεικνύοντας ότι η χαμηλή έκφραση των συγκεκριμένων miRs μπορεί να αποτελέσει προβλέπτικό δείκτη μιας κακής πρόγνωσης. [37]



Εικόνα 8. Ο ρόλος των miRNAs στη ρύθμιση των συνδέσεων του εντερικού επιθηλιακού ιστού και στην IBD. [35].

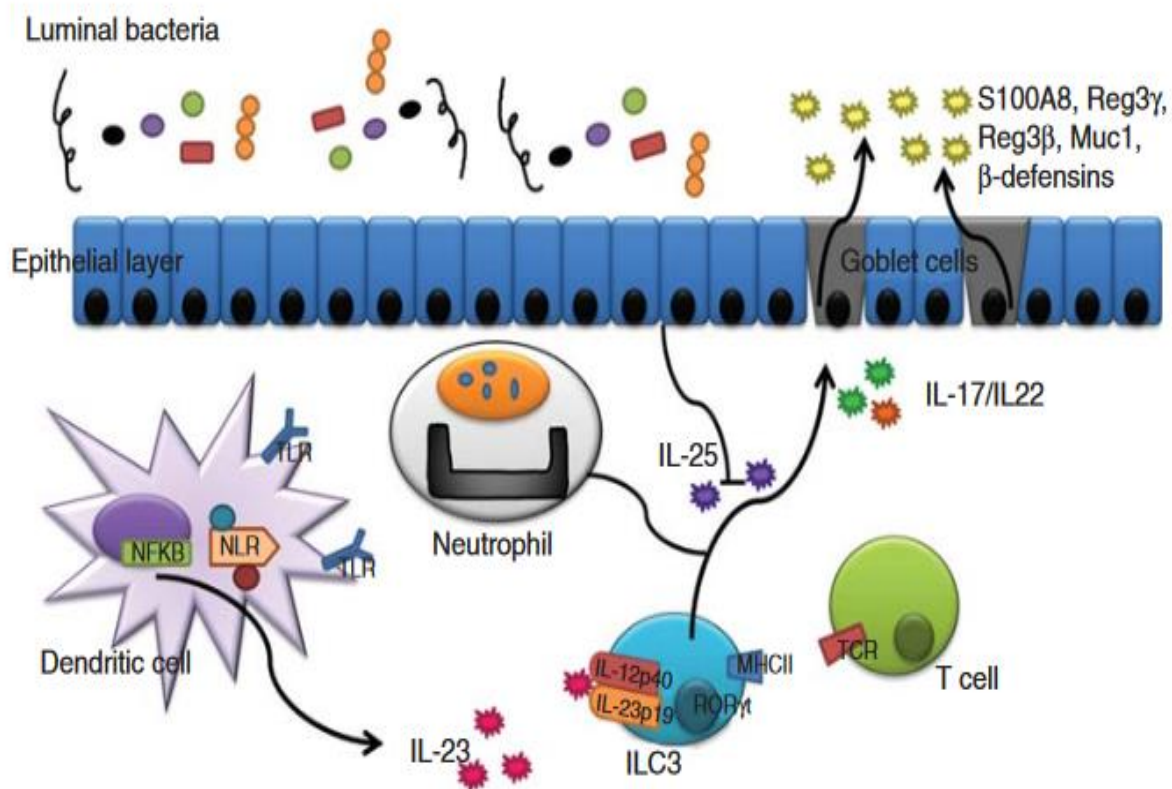
1.3.3 Ανοσολογικοί παράγοντες

Η δυσλειτουργία του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος παίζει βασικό ρόλο στην κλινική εξέλιξη της νόσου. Τα κύτταρα που συνθέτουν τον βλεννογόνο του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, εκτίθενται συνεχώς σε αντίξοες μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έκκριση των πεπτικών χυμών με διαφορετικό pH κατά τη διαδικασία πέψης των τροφών, η μεγάλη ποικιλία δραστικών ενζύμων και το πλήθος βακτηρίων που το αποικεί. [38]

Το μικροβίωμα του εντέρου διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ενώ το ανοσοποιητικό σύστημα με την σειρά του διαμορφώνει τη δομή και τη λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος. [39] Σήμερα, αναγνωρίζεται πλέον ότι το ανοσοποιητικό σύστημα, έχει εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να μπορεί να φιλοξενεί συμβιωτικές βακτηριακές κοινότητες αυξανόμενης πολυπλοκότητας, ενώ παράλληλα να διατηρεί την ικανότητα καταπολέμησης παθογόνων βακτηρίων.[40]

Στο ερεθισμένο γαστρεντερικό σύστημα των ασθενών με ΙΦΝΕ, πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μη, παράγουν έναν τεράστιο αριθμό κυτοκινών, οι οποίες συμβάλουν είτε στην ενίσχυση της φλεγμονής του εντερικού βλεννογόνου είτε στον περιορισμό της. Το προφίλ των φλεγμονωδών κυτοκινών που παράγονται σε ασθενείς με CD διαφέρει από εκείνο που παρατηρείται σε ασθενείς με UC, υποδεικνύοντας ότι οι επαγωγείς αυτών των ανοσολογικών αποκρίσεων είναι διαφορετικοί στις δύο αυτές παθήσεις. [41]

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερβολική παραγωγή ιντερλευκίνης (IL)- 17 εμπλέκεται στη πρόοδο της ΙΦΝΕ και ότι η αναστολή των Τ-βοηθητικών (Th)17 κυττάρων, τα οποία εκκρίνουν IL-17, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ανάπτυξης της οξείας κολίτιδας μειώνοντας τα επίπεδα της φλεγμονής. Κύτταρα που απελευθερώνουν κυτοκίνες που σχετίζονται με την IL-17 και Th17 βρέθηκαν επίσης αυξημένα σε φλεγμένων ιστούς από ασθενείς με ΙΦΝΕ σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς από την υγιή ομάδα της μελέτης.[42]



Εικόνα 9.Εμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα και έντερο. [43]

Η αναγνώριση των βακτηρίων ή των βακτηριακών προϊόντων στο ινοσυνδετικό στρώμα (lamina propria) στο έντερο, ξεκινάει με έναν καταρράκτη ενεργειών που περιλαμβάνουν διάφορους τύπους ανοσοκυττάρων. Η έκκριση IL-23 ως αποτέλεσμα απόκρισης στη διέγερση των υποδοχέων αναγνώρισης σημάτων PRR, ενεργοποιεί τα έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα (ILCs) για να παράγουν IL-17 και IL-22. Οι κυτοκίνες ανιχνεύονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία προάγουν την έκκριση αντιμικροβιακών πρωτεϊνών υπέρ της άμυνας του εντερικού ενδοθηλιακού φραγμού. Η έκκριση κυτοκινών από τα δένδριτικά κύτταρα (DC) οδηγεί στη προσέλκυση επιπλέον ουδετερόφιλων, έτσι ώστε να μεταναστεύσουν στο σημείο της φλεγμονής. [43]

1.3.4 Μικροβίωμα

1.3.4.1 Γενικά

Τα γονίδια του μικροβιώματος μας, απαρτίζουν ουσιαστικά ένα δεύτερο γονιδίωμα. Εκτιμάται ότι το έντερο μας, περιέχει πάνω από 1,000 περίπου είδη βακτηρίων των οποίων το γονιδίωμα, περιλαμβάνει 100 φορές περισσότερα γονίδια από αυτά που έχουν βρεθεί στα ανθρώπινα κύτταρα.

Τα φύλα *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* και *Verrucomicrobia* αποτελούν τα κυρίαρχα μέρη ενός υγιούς γαστρεντερικού μικροβιώματος. Το μικροβίωμα του εντέρου αναπτύσσεται από μια μικρή ποικιλία μικροβίων κατά τη διάρκεια της γέννησης, η οποία εξαρτάται από το πού και το πώς γεννηθήκαμε, εξελισσόμενη σε μια ποικιλόμορφη βακτηριακή κοινότητα με την εισαγωγή της τροφής στην ηλικία 9-12 μηνών. Κατόπιν, το μικροβίωμα του εντέρου παραμένει σχετικά σταθερό. Συνεχίζει να μεταβάλλεται, ανταποκρινόμενο σε διαφορες καταστάσεις όπως ασθένειες, αντιβιοτική αγωγή, πυρετός, στρες, τραυματισμοί και διατροφικές αλλαγές, κατόπιν όμως η εντερική χλωρίδα τείνει να επιστρέφει στη σταθερή δομή που είχε σχηματίσει εξ αρχής. [44]

1.3.4.2 Εντερική δυσβίωση και ΙΦΝΕ

Εξακολουθούν να μην υπάρχουν σαφή συμπεράσματα για κάποιο ειδικό παθογόνο μικρόβιο που να συνδέεται με την εμφάνιση της ΙΦΝΕ, πολλές όμως μελέτες τείνουν να ασπάζονται την άποψη ότι ένα μικροβίωμα με διαταραγμένη ισοροπία αποτελεί την κύρια αιτία ανάπτυξης της φλεγμονώδους αντίδρασης της νόσου.

Η Εντερική δυσβίωση, χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση των υποχρεωτικών αναερόβιων βακτηρίων όπως τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*, και απότομη αύξηση των προαιρετικών αναερόβιων βακτηρίων όπως τα ακτινοβακτήρια και τα πρωτεοβακτήρια π.χ *E.coli*. [45] Στην ΙΦΝΕ παρατηρείται μια ευρεία μεταβολή στην εντερική χλωρίδα κατά την οποία σημειώνεται μείωση της ποικιλομορφίας των μικροβίων, μείωση της συγκέντρωσης των φύλων *Bacteroidetes* και *Firmicutes* και αύξηση της συγκέντρωσης των *Gammaproteobacteria*. Ασθενείς με CD εμφάνισαν σαφώς μικρότερη ποικιλομορφία εντερικής χλωρίδας σε δείγματα κοπράνων, σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. [44]

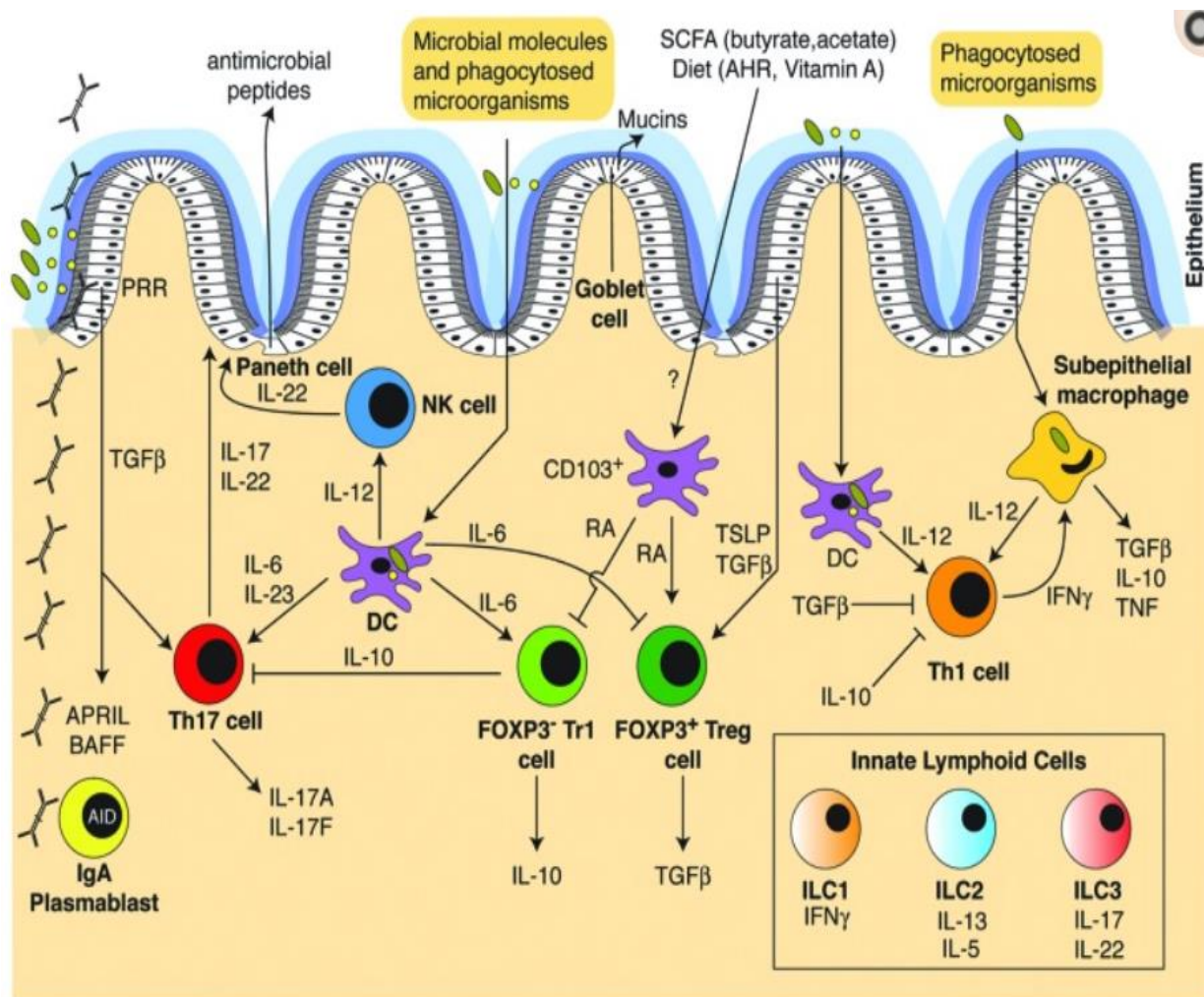
Εχει επιβεβαιωθεί ότι για τις μεταβολές αυτές δεν ευθύνεται η φαρμακολογική αγωγή που λαμβάνουν οι ασθενείς, αλλά εμφανίζονται πριν από την έναρξη της θεραπείας. Οι μικροβιακές μεταβολές είναι εμφανής και σε μη φλεγμαίνων περιοχές του παχέος εντέρου σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, υποδεικνύοντας ότι η φλεγμονή δεν αποτελεί απαραίτητα τη μόνη αιτία που αναπτύσσεται η εντερική δυσβίωση, αν και η φλεγμονώδης διαδικασία μπορεί να αλλάξει την εντερική μικροχλωρίδα. Επιπρόσθετα, με την εφαρμογή μεταγονιδιωμιατικής ανάλυσης στο μικροβίωμα ασθενών με ΙΦΝΕ, βρέθηκαν κατά μέσο όρο 25% λιγότερα γονίδια σε σύγκριση με το μικροβίωμα υγιών μαρτύρων. [46]

Περαιτέρω υποστήριξη της θεωρίας, προέρχεται από το γεγονός ότι θεραπεία με αντιβιοτικά πράγματι παρέχει κλινικό όφελος στους ασθενείς, μειώνοντας τα συμπτώματα της νόσου, υποδεικνύοντας ότι τα εντερικά βακτήρια συμβάλουν στην ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης και στην διαταραγμένη ανοσολογική απόκριση. Άλλες ενδείξεις που υποστηρίζουν το ρόλο του μικροβιώματος στην ΙΦΝΕ είναι η προδιάθεση ανάπτυξης φλεγμονής σε ανατομικές περιοχές με στασιμότητα των μαζών των κοπράνων όπως ο τελικός ειλεός και το ορθό και η ταχέως αυξανόμενη επίπτωση της νόσου, σε παγκόσμια κλίμακα, σχετιζόμενη με την βιομηχανοποίηση και την αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες. [47]

Όλα τα παραπάνω υποστηρίζουν τη θεωρία ότι η εντερική δυσβίωση συμβάλει στη παθογένεση της ΙΦΝΕ και δεν είναι απλώς αποτέλεσμα της φλεγμονής του εντερικού ιστού.[46] Η εντερική δυσβίωση μπορεί να οδηγήσει σε μια ανισσοροπία στην παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών, οι οποίοι με τη σειρά τους συνδέονται με την παθογένεση της ΙΦΝΕ. Για παράδειγμα, το *F. bacterium* παράγει λιπαρά οξέας βραχείας αλύσου (SCFA) (κυρίως οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ), ουσίες που χρησιμοποιούνται ως σημαντικές πηγές ενέργειας από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Τα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού, η συγκέντρωση των οποίων φαίνεται να βρίσκεται μειωμένη σε δείγματα κοπράνων από ασθενείς με ΙΦΝΕ.[48]

Αν και φαίνεται δελεαστικό να ενοχοποιείται το μικροβίωμα όσον αφορά τη παθογένεια της ΙΦΝΕ, στη πραγματικότητα αρκετοί υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να προκύπτουν από κλινικές μελέτες και να επιβαρύνουν τη θεωρία αυτή. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι η εντερική δυσβίωση θα μπορούσε, σε μεγάλο βαθμό, να αντανάκλα την ανταπόκριση μιας σύνθετης μικροβιακής κοινότητας στο στρες που συνεπάγεται η φλεγμονή στο έντερο. Στο υγιές γαστρεντερικό σύστημα, λόγω της διάχυσης οξυγόνου από το

βλεννογόνο του ξενιστή στον αυλό του εντέρου, τα βακτήρια που έχουν προσκολληθεί στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου, διαθέτουν υψηλότερη ανοχή στο οξύ και μεγαλύτερη έκφραση της καταλάσης, σε σύγκριση με τα βακτήρια που σχετίζονται με τα κόπρανα. Καθώς λοιπόν η φλεγμονή είναι μια οξειδωτική κατάσταση, ενδεχομένως να αναμένεται πως θα προάγει την ανάπτυξη των προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων. [47]



Εικόνα 10. Επισκόπηση του δικτύου κυτοκινών που ρυθμίζει τις έμφυτες και τις προσαρμοστικές αλληλεπιδράσεις ανοσολογικού συστήματος – μικροβιώματος. [49]

1.3.4.3 Μικροβίωμα και ΙΦΝΕ: Πέρα από τα βακτήρια

Πολύ ενδιαφέρον είναι και ο ρόλος των ιών και των μυκήτων στο μικροβίωμα του εντέρου. Οι συγκεντρώσεις των *Caudovirales* (ιοί) και *Basidiomycota*, *Ascomycota*, και *Candida albicans* (μύκητες) έχει βρεθεί πως αυξάνονται σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. [44]

1.3.4.3.1 Μικροβίωμα μυκήτων - *Mycobiota*

Παρόλο που οι μύκητες αντιπροσωπεύουν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της τάξης του <0,1% του συνολου των μικροβίων στον ανθρώπινο οργανισμό, η μυκητιακή «κοινότητα» που ονομάζεται *Mycobiota*, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει ενεργά τόσο στη διατήρηση της υγείας του γαστρεντερικού συστήματος όσο και στην ανάπτυξη παθήσεων που σχετίζονται με αυτό. Συγκεκριμένα, η μυκητιασική δυσβίωση στην ΙΦΝΕ, σχετίστηκε με αυξημένη αναλογία των ειδών του γένους *Basidiomycota/Ascomycota*, υψηλές συγκεντρώσεις των ειδών *C. albicans*, *Aspergillus clavatus*, και *Cryptococcus* και μειωμένες συγκεντρώσεις του είδους *S. Cerevisiae*. [50]

Ο ορολογικός έλεγχος των αντισωμάτων (ASCA) έναντι της μαννάνης του Σακχαρομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*), χρησιμοποιείται στην εργαστηριακή διάκριση μεταξύ της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου του Crohn. Τα αντισώματα ASCA βρίσκονται σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ορό ασθενών με νόσο του Crohn (60%) σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα. Η σύνδεση μεταξύ της CD και του μύκητα *C. Albicans* προκύπτει από κάποια ενδεικτικά ευρήματα, που υποστηρίζουν ότι η παραγωγή των αντισωμάτων οφείλεται στο συγκεκριμένο είδος μύκητα. [51]

Πολλές μελέτες δείχνουν υπερανάπτυξη του είδους *C.albicans* σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, σε σύγκριση με τον υγιή πλυθισμό. Πειράματα στο εργαστήριο, έδειξαν ,οτι η επαγωγή φλεγμονής στο παχύ έντερο ποντικών μέσω του εστέρα δεξτράνης με θειικό νάτριο (DSS) προκάλεσε αύξηση των αποικιών της *C. Candida*, που συνοδεύτηκε με την παραγωγή αντισωμάτων ASCA. [52]Επιπλέον, το πως συσχετίζονται μεταξύ τους βακτήρια και μύκητες, αποτελεί σημαντικό τομέα ανάπτυξης και μελέτης, καθώς η αμοιβαία ή μη, συνεργασία μεταξύ τους, φαίνεται πως επηρεάζει τους μηχανισμούς που υποκρύπτονται στην ανάπτυξη της ΙΦΝΕ. Για παράδειγμα, το άμυλο, μπορεί να διασπαστεί υπο τη δράση του μύκητα

Candida, σε μόρια γλυκόζης, η οποία αποτελεί την πρώτη ύλη που χρησιμοποιούν τα βακτήρια *Prevotella* και *Ruminococcus* για ζύμωση .

Η θεραπευτική προσέγγιση της νόσου, με κορτικοστεροειδή και ανοσοκατασταλτικά, οδηγεί και αυτή με τη σειρά της στην έξαρση και ανάπτυξη μυκητιασικής δυσβίωσης, με αποτέλεσμα τη περαιτέρω επιδείνωση της υπάρχουσας φλεγμονής και την εμφάνιση σοβαρών λοιμώξεων, με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα θνησιμότητας και θνητότητας. Η ιστοπλάσμωση, προκαλείται από το μύκητα *Histoplasma capsulatum* (HC) και αποτελεί τη πιο κοινή επιπλοκή μυκητιασικής μόλυνσης της anti-TNF θεραπείας. Και παρόλο που μόλις το 5% του προσβεβλημένου υγιή πλυσμού, θα εμφανίσει συμπτώματα, και οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις τίθενται υπο έλεγχο από το ανοσοποιητικό σύστημα του πάσχοντα, στην ΙΦΝΕ, η καθυστερημένη διάγνωση λόγω παρόμοιων εντερικών εκδηλώσεων, αυξάνει το ποσοστό θνησιμότητας σε ένα ποσοστό 20%. [50]

1.3.4.3.2 Μικροβίωμα Ιών - Virome

Αν και οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τους ιούς στην ΙΦΝΕ, είναι σχετικά λίγες, φαίνεται πως και οι ιοί ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο, ως μέρος του εντερικού μικροβιώματος, στις παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος. Τα επίπεδα των γενετικών αλληλουχιών του ανθρώπινου ενδογενή ρετροϊού (HERV), που σχετίζονται με τη φλεγμονή και μπορούν να ενεργοποιηθούν από εξωγενή ιική μόλυνση, φάνηκε να είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Οι μηχανισμοί όμως, μέσω των οποίων οι ιοί μπορούν να επηρεάσουν τη πορεία της νόσου παραμένουν άγνωστοι. Οι περισσότερες υποθέσεις σχετίζονται με το πως οι ιοί μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή ποικιλία του εντέρου και να αλληλεπιδράσουν με τα βακτηριακά στελέχη, παρά με τη θεωρία ότι ενδεχομένως να αποτελούν μεμονωμένο παράγοντα ανάπτυξης φλεγμονώδους διεργασίας στο έντερο. Οι ιοί με το όνομα βακτηριοφάγοι, δρούν ως αντιβακτηριακοί παράγοντες, και είναι από τις λίγες περιπτώσεις ιών που έχουν μελετηθεί εκτενώς στην παθοφυσιολογία της ΙΦΝΕ. Αλλαγές στη συγκέντρωση των εντερικών βακτηριοφάγων συνεπάγεται δραματικές αλλαγές στην εντερική μικροχλωρίδα. Πρόσφατες μελέτες επιδεικνύουν την σημαντική εξάπλωση των βακτηριοφάγων *Caudovirales* ως τη πρώτη και κύρια αλλαγή στο μικροβίωμα των ιών, σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, ενώ έχουν παράλληλα αναγνωριστεί πέντε βακτηριοφάγοι που σχετίζονται με την νόσο : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* και *Streptococcus*. [50]

Μία πρόσφατη μεταγονιδιωματική ανάλυση δεδομένων RNA-seq που ελήφθησαν από τον εντερικό βλεννογόνο πρώιμα διαγνωσθέντων ασθενών με UC και CD που δεν είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία ,και δεδομένων RNA-seq υγιή πληθυσμού, αποκάλυψε συγκεκριμένες αλλαγές στο μικροβίωμα ιών. Οι ασθενείς με UC εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της οικογένειας *Herpadnaviridae*, έναντι των ασθενών με CD και της ομάδας ελέγχου, ενώ το είδος *Hepeviridae* υπήρχε σε αφθονία στους ασθενείς με CD. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου στην UC, χαρακτηρίζεται από χαμηλότερα επίπεδα των ιών *Polydnaviridae* και *Tymoviridae*, ενώ ο βλεννογόνος των ασθενών με CD παρουσίασε μειωμένη συγκέντρωση των *Virgaviridae*. [53]

Πίνακας 1. Μεταβολές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου σε ασθενείς με ΦΝΕ σε σύγκριση με υγιείς ομάδες του πληθυσμού.

	Μειωμένα σε IBD	Αυξημένα σε IBD
Μικροβιακή σύνθεση	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>
	<i>Groups IV and XIVA Clostridium</i>	<i>Escherichia coli</i> , adherent/invasive
	<i>Roseburia</i> species	<i>Ruminococcus gnavusa</i>
	<i>Suterella</i> species	<i>Pasteurellaceae</i>
	<i>Bacteroides</i>	<i>Veillonellaceae</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Caudovirales Clavispora lusitaniae</i> <i>Kluyveromyces marxianus Candida albicans Candida tropicalis</i> <i>Cyberlindnera jadinii</i>
Μικροβιακή λειτουργία	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου(SCFAs), βιοσύνθεση αμινοξέων	μεταφορά αμινοξέων και θειικού άλατος, οξειδωτικό stress, εκκρίση τοξινών

Πηγή [44]

1.4 Διάγνωση

Μέθοδος εκλογής (gold standard method) δεν υπάρχει για τη διάγνωση της ΙΦΝΕ. Η πρώτη ένδειξη, είναι συμπτώματα όπως επίμονη διάρροια, αίμα ή βλέννα στα κόπρανα, πυρετός και κοιλιακός πόνος. Εν συνεχεία ,η διάγνωση επιβεβαιώνεται με την κλινική διερεύνηση, και τον συνδυασμό ενδοσκοπικών, ιστολογικών, ακτινολογικών και βιοχημικών εξετάσεων.

Η εντερόκλυση είναι η πλέον ενδεδειγμένη ακτινολογική μέθοδος για τη διάγνωση της CD στο λεπτό έντερο.Η ενδοσκόπηση διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην διάγνωση και την αξιολόγηση των ασθενών με συμπτώματα της ΙΦΝΕ. Η γαστροσκόπηση, η κολονοσκόπηση και η σιγμοειδοσκόπηση, χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες στην διάγνωση και διαχείριση της πάθησης. Η τεχνολογία επέτρεψε την εισαγωγή καινούργιων ενδοσκοπικών εργαλείων όπως τον ενδοσκοπικό υπέρηχο, την ενδοσκοπική κάψουλα και τη γαστροσκόπηση με μπαλόνι, επεκτείνοντας τον ρόλο της ενδοσκόπησης στην ΙΦΝΕ.[54]

Ο κίνδυνος διάτρησης του εντέρου σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο εντέρου σε έξαρση, πρέπει να ζυγίζεται έναντι της διαγνωστικής αξίας της ενδοσκόπησης, με τις μελέτες απεικόνισης να αποτελούν μια καλή εναλλακτική μέθοδο. Εκτός από την διάγνωση, η ιστοπαθολογία είναι απαραίτητη έτσι ώστε να αποκλειστούν άλλες αιτιολογίες των συμπτωμάτων όπως η λοίμωξη (ειδικά η εντερική φυματίωση) και οι κακοήθειες. [55] Επίσης, υπάρχουν δείκτες στο αίμα και στα κόπρανα που χρησιμοποιούνται στην διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών, και μπορούν να δείξουν αναιμία ή άλλες γενικές ενδείξεις φλεγμονής. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), ο ρυθμός καθίζησης ερυθροκυττάρων (ESR), τα επίπεδα βιταμίνης D, τα αντισώματα εναντια του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) και τα αντιουδετεροφιλικά κυτταροπλασματικά αντισώματα (p-ANCA). Το μειονέκτημα αυτών των δεικτών είναι η κυμαινόμενη ευαισθησία και ειδικότητα καθώς τα επίπεδα τους μπορούν να αυξηθούν και σε άλλες αυτοάνοσες φλεγμονώδεις νόσους και μολυσματικές διεργασίες. [56]

Η καλπροτεκτίνη κοπράνων (FC), μια πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου που παράγεται κυρώς από τα ουδετερόφιλα, αποτελεί αξιόπιστο βιοδείκτη της ανίχνευσης αλλά και της παρακολούθησης της νόσου. Απελευθερώνεται στα πρώιμα στάδια της φλεγμονώδους διαδικασίας και η συγκέντρωση της στα κόπρανα είναι ανάλογη με την παρουσία ουδετερόφιλων στον εντερικό αυλό. Οι μετρήσεις όμως καλπροτεκτίνης κοπράνων, δεν πρέπει να ερμηνεύονται μεμονωμένα από το κλινικό πλαίσιο στο οποίο εκτελούνται. [57] Παρόλο που

οι τιμές της καλπροτεκτινης κοπράνων αυξάνονται και σε άλλες φλεγμονώδεις εντερικές διαταραχές, όπως η εντεροπάθεια προκαλούμενη από τη λήψη NSAID, κακοήθειες που εντοπίζονται στο έντερο, λοιμώδη γαστρεντερίτιδα, εκκολπωματική νόσο κ.α μπορεί να διαφοροποιήσει την ΙΦΝΕ από το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου. [55] Οι δείκτες κοπράνων λακτοφερρίνης και καλπροτεκτίνης είναι χρήσιμοι και για τον προσδιορισμό της μετεγχειρητικής επανεμφάνισης της νόσου. [2] Στην αγορά κυκλοφορεί ήδη test καλπροτεκτίνης (FC), το οποίο που δίνει την επιλογή σε έναν ασθενή ο οποίος βρίσκεται σε ύφεση, να παρακολουθεί την νόσο του μετρώντας τα επίπεδα καλπροτεκτίνης, και κατ' επέκταση, τον βαθμό επούλωσης του βλεννογόνου, από το σπίτι. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο test ανίχνευσης FC αντίστοιχα, στο σπίτι και στο εργαστήριο, βρέθηκε να είναι καλή.[58]

1.5 Θεραπευτική προσέγγιση της ΙΦΝΕ

Υπάρχουν 2 βασικές κατηγορίες φαρμακευτικής αντιμετώπισης της ΙΦΝΕ : (1) αντιφλεγμονώδοι ή ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες, (2) βιολογικοί παράγοντες.

Τα **αντιφλεγμονώδη φάρμακα**, όπως τα 5-αμινοσαλικυλικά (5-ASAs) χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας. Είναι αποτελεσματικά στη διατήρηση της ύφεσης της νόσου, και επίσης μειώνουν τυχόν ανάπτυξη όγκου, αναστέλλοντας την PG σύνθεση, μειώνοντας τα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτκινών, παρεμποδίζοντας τη προσέλκυση ουδετερόφιλων και ενεργοποιώντας τα μαστοκύτταρα μέσω της αναστολής του NF-kB στα ανοσοκύτταρα. Δυστυχώς οι 5-ASAs, έχουν μικρή αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με CD. Η αζαθειοπρίνη (Azathioprine), η μεθοτρεξάτη (methotrexate) και η κυκλοσπορίνη –Α (cyclosporine –A) είναι κλασσικά ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ασθενών με ΙΦΝΕ. Η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ύφεσης σε ασθενείς με UC , η κυκλοσπορίνη- Α προτείνεται για την επαγωγή κατάστασης ύφεσης στην UC, ενώ η αζαθειοπρίνη έχει αποτελεσματικότητα τόσο στην CD όσο σε ασθενείς με UC. [42]

Με την τεράστια εξέλιξη που έχει παρατηρηθεί στον τομέα της CD, η θεραπευτική προσέγγιση εστιάζει πλέον, στην υποστήριξη ανάπτυξης και καθιέρωσης της προληπτικής φροντίδας έναντι της θεραπείας και στον εντοπισμό ασθενών υψηλού κινδύνου, προλαμβάνοντας έτσι την εξέλιξη της νόσου πριν την εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών. [59] Τα **κορτικοστεροειδή**, είναι πολύ αποτελεσματικοί παράγοντες για την πρόκληση ύφεσης σε ενεργή ΙΦΝΕ, δεν συμβάλουν όμως αποτελεσματικά στην διατήρηση της. Ασθενείς με πολύ σοβαρή UC, που

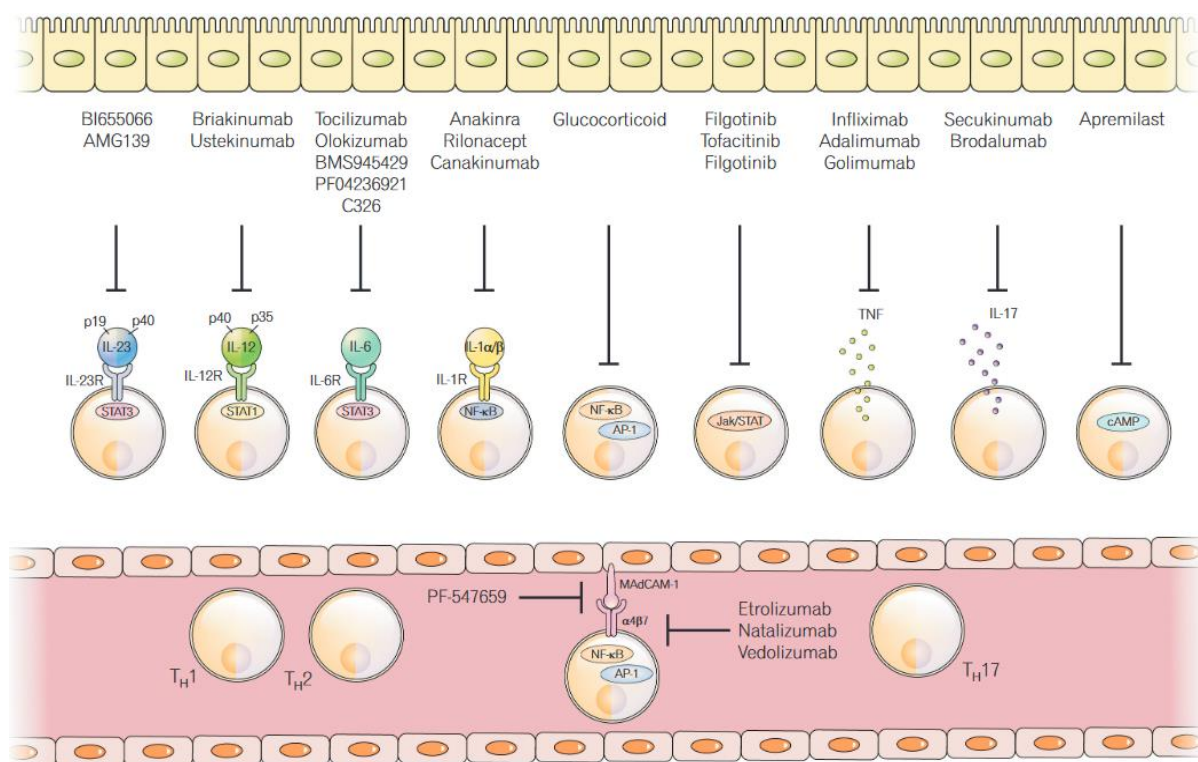
γίνονται δεκτοί στη μονάδα εντατικής θεραπείας, λαμβάνουν ενδοφλέβια κορτικοστεροειδή. [55]

Ως επαγωγική θεραπεία για την CD, τα κορτικοστεροειδή χρησιμοποιούνται πολύ συχνά έναντι της **εντερικής διατροφής** (EN). Πρόσφατη μεταανάλυση όμως έδειξε, ότι δεν υπάρχουν αρκετά σημαντικά στοιχεία από μελέτες που να υποδυκνείουν ότι η θεραπεία με κορτικοστεροειδή μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική από την EN για την πρόκληση κλινικής ύφεσης σε ενήλικες με ενεργό CD. Όταν οι παρενέργειες από τα κορτικοστεροειδή δεν είναι καλά ανεκτές ή πρέπει να αποφευχθούν, η εντερική διατροφή θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη σε παιδιατρικούς ασθενείς με CD ή σε ενήλικες οι οποίοι μπορούν να συμμορφωθούν με την παρουσία ρινογαστρικού σωλήνα. Άλλη εναλλακτική εντερικής υποστήριξης είναι η λήψη υπερθερμιδικών σκευασμάτων, τα οποία μπορούν να καταναλωθούν ευχάριστα. [60]

Από την άλλη, η ανακάλυψη ότι η εντερική «δυσβίωση» έχει έναν πιθανό παθογενετικό ρόλο στην ΙΦΝΕ, έδωσε πρόσφορο έδαφος στην ανάπτυξη θεραπειών που στοχεύουν στην αποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας. Τα **προβιοτικά**, τα οποία αποτελούνται από μη παθογόνους ζωντανούς μικροοργανισμούς, έχουν θετικό αντίκτυπο στην ισοροπία των μικροβίων στο έντερο, βελτιώνουν την απορρόφηση μικροθρεπτικών συστατικών όπως το ασβέστιο και ο σίδηρος, με αποτέλεσμα να προσφέρουν σημαντικό όφελος στην αντιμετώπιση της νόσου. Πρόσφατη μετα-ανάλυση που δημοσιεύτηκε το 2017, μελετώντας 27 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές, έδειξε ότι τα προβιοτικά, μπορούν συνολικά να έχουν σημαντική επίδραση στη νόσο του Crohn και στην ελκώδη κολίτιδα. Ο συνδυασμός των *VSL#3* και *S. Boulardii* προβιοτικών, φαίνεται να είναι ο πιο αποτελεσματικός στην CD ($p=0,057$) αλλά και σε παιδιά ηλικίας 2-21 ετών με ΙΦΝΕ. Ο *Lactobacillus GG*, αποτελεί ένα προβιοτικό σταθερό κατά την επίδραση των οξέων του στομάχου, αλλά και της χολής, όπου προσκωλλάται στα επιθηλιακά κύτταρα και αποτρέπει τη σύνδεση παθογόνων μικροοργανισμών στον εντερικό βλεννογόνο ενώ το *VSL 3* προβιοτικό ελέγχει τη φλεγμονή και αυξάνει την περίοδο ύφεσης, μειώνοντας τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α), ιντερφερόνης γ , της συνθάσης νιτρικού οξειδίου και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες 2 & 9. Συγκεκριμένα, το μίγμα που προήλθε από το είδος *Lactobacillus* και *VSL#3* βρέθηκε να έχει σημαντική επίδραση στην αντιμετώπιση της ΙΦΝΕ ($p < 0,01$). [48]

Πρόσφατα, έχει εμφανιστεί μια νέα μέθοδος η οποία στηρίχθηκε επίσης στην ανάπτυξη των γνώσεων της επιστημονικής κοινότητας τις τελευταίες δεκαετίες, σχετικά με τον όρο «εντερική δυσβίωση». Η **μεταμόσχευση κοπράνων**, είναι μια διαδικασία κατά την οποία

συλλέγονται τα κόπρανα από έναν υγιή δότη και τοποθετούνται στο γαστρεντερικό σύστημα του ασθενή, με τελικό σκοπό την αποκατάσταση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου. Η μέθοδος της μεταμόσχευσης κοπράνων αποτελεί προς το παρόν πειραματική θεραπεία της ΙΦΝΕ, και έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα με επιτυχία για τη θεραπεία λοίμωξης από *Clostridium defficile*, ανθεκτικό βακτήριο στις συμβατικές αντιβιοτικές θεραπείες. [45]



Εικόνα 11. Θεραπευτικές στρατηγικές αντιμετώπισης ΙΦΝΕ που περιλαμβάνουν την πρόληψη παραγωγής T-κυττάρων και ILC λεμφοκυττάρων ή την καταστολή τους. [42]

Πολλά νέα υποσχόμενα, υπο δοκιμή, φάρμακα βρίσκονται σε εξέλιξη. Το Risankizumab είναι ένα εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, που στοχεύει την p19 υπομονάδα της ιντερλευκίνης 23. Η επίδραση του φαρμάκου δοκιμάστηκε σε τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II σε ασθενείς με μέτρια, ως σοβαρού βαθμού CD, με έναρξη 200 ή 600mg σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο. Την 12^η εβδομάδα της μελέτης, τα συγκεντρωτικά δεδομένα και για τις δύο δόσεις, έδειξαν βελτίωση της κλινικής ύφεσης με το Risankizumab. Αυτή η δοκιμή και τα αποτελέσματα της υποδεικνύει ότι η επιλεκτική στόχευση της IL23 αποτελεί ένα νέο μονοπατι διαχείρισης της CD.[45] Το Tofacitinib, ένας JAK αναστολέας, ενώ απέδειξε αποτελεσματικότητα στην UC, τα αποτελέσματα δυο δοκιμών φάσης II, δεν μπόρεσαν να δείξουν το ίδιο όφελος σε ασθενείς με CD.[59]

2.1 Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες είναι μετρήσιμες ουσίες στα σωματικά υγρά όπως ο ορός του αίματος, τα κόπρανα, τα ασκητικά υγρά κ.α. Ο ιδανικός βιοδείκτης για την ΙΦΝΕ, πρέπει να έχει υψηλή διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση, και να διαθέτει ακριβή, και με καλή επαναληψιμότητα, αποτελέσματα, τα οποία να ερμηνεύονται εύκολα από τους κλινικούς ιατρούς. Η εφαρμογή αυτών των βιοδεικτών στην διάγνωση της ΙΦΝΕ, αποτελεί μια φθηνότερη, λιγότερο επίπονη και λιγότερο επεμβατική μέθοδο σε σύγκριση με τις ενδοσκοπικές προσεγγίσεις. Στην εμφάνιση φλεγμονής του εντερικού βλεννογόνου, πολλά αντιγόνα από την διατροφή ή από συμβιούντα βακτήρια στον οργανισμό, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντισωμάτων. Τα ορολογικά αντισώματα ταξινομούνται σε δύο –υποκατηγορίες, τα λεγόμενα αυτοαντισώματα που στοχεύουν ενάντι των δικών τους συστατικών λόγω αυτοάνοσης απάντησης, και τα αντισώματα που στοχεύουν σε εξωγενή αντιγόνα. [3]

2.2 Βιοδείκτες κοπράνων

Οι δείκτες κοπράνων έχουν εμφανιστεί τα 30 τελευταία χρόνια, αποτελούν μη επεμβατικούς και αξιόπιστους τρόπους ανίχνευσης της φλεγμονής και χρησιμοποιούνται πλέον στη καθημερινή κλινική πρακτική για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της ΙΦΝΕ.

Οι δείκτες που προέρχονται από τα κόπρανα υπερτερούν έναντι άλλων δεικτών. Καταρχήν, τα δείγματα κοπράνων συλλέγονται εύκολα και είναι μια μέθοδος αποδεκτή από τους ασθενείς. Τα χαρακτηριστικά αυτά, καθιστούν δυνατή την επαναληψη της δειγματοληψίας σε σύντομο χρονικό διάστημα όποτε κρίνεται αναγκαίο. Επιπρόσθετα, τα κόπρανα βρίσκονται σε άμεση επαφή με το έντερο, γεγονός που εξασφαλίζει ότι η συγκέντρωση των δεικτών τους αντικατοπτρίζει της έκταση και τη σοβαρότητα της φλεγμονής του εντέρου. Ο εντερικός βλεννογόνος που έχει φλεγμονή, περιέχει μια αφθονία από ουδετερόφιλα και δείκτες φλεγμονής κοπράνων που εκκρίνονται από αυτά, όπως η καλπροτεκτίνη και η λακτοφερίνη, οι οποίοι παρέχουν μια ακριβή εικόνα αξιολόγησης της εντερικής φλεγμονής.

Η καλπροτεκτίνη κοπράνων (FC) καθώς και η λακτοφερίνη (FL) είναι οι πιο καλά χρησιμοποιημένοι και μελετημένοι δείκτες στην ΙΦΝΕ και έχουν ταυτοποιηθεί από τον *Fagerhol* το 1980 και τον *Guerrant*, το 1992 αντίστοιχα.[61] Η καλπροτεκτίνη κοπράνων

αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για τη διαφοροποίηση του συνδρόμου του ευερέθιστου εντέρου (σπαστική κολίτιδα, IBS) από τα φλεγμονώδη νοσήματα εντέρου (IBD). Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση των *Van Reethen et al.* όπου συμπεριληφθηκαν και ενήλικες (670) και παιδιά (371) με υποψία για ΙΦΝΕ, έδειξε συνολική ευαισθησία και εξειδίκευση της FC στη διαφοροποίηση σε ποσοστό 93% και 96% στους ενήλικες και 96% και 76% στα παιδιά αντίστοιχα.[62] Στη συνέχεια, προστέθηκαν και άλλοι δυνητικά νέοι δείκτες κοπράνων της ΙΦΝΕ στη μελέτη της αντιμετώπισης και παρακολούθησης της φλεγμονής, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, η αιμοσφαιρίνη, η λυσοζύμη, οι M2-PK, η μυελουπεροξειδάση, η πολυμορφοπυρηνική ελαστάση, η νεοπτερίνη κ.α [63]

2.3 Μέτρηση βιοδεικτών στα κόπρανα: Πώς, Που, Πότε

Οι δείκτες κοπράνων μπορούν να μετρηθούν είτε με τις κλασσικές ποσοτικές μεθόδους όπως η ELISA, ή τις ποιοτικές μεθόδους, όπως η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος, γνωστή και ως γρήγορο τεστ πλευρικής ροής. Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν αξιόπιστα διαγνωστικά τεστ που γίνονται στο σπίτι, κάποια από τα οποία δεν χρειάζονται επιπλέον συσκευές ενώ άλλα απαιτούν την εφαρμογή smartphone έτσι ώστε να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείκτη. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας, η οποία υπογραμμίζει την ανάγκη λήψης και ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων. Παρά τη διακύμανση αυτή, η αξιοπιστία των πρωινών δειγμάτων φαίνεται να ισοδυναμεί με την αξιοπιστία διαφορετικών δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας. [61]

2.4 Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη, γνωστή και ως μουραμιδάση, στη πραγματικότητα είναι ένας γενικός όρος ο οποίος περιλαμβάνει μια ευρεία ομάδα ενζύμων ,88 λυσοζύμες στο σύνολο, οι οποίες μπορούν και λειτουργούν ως ένα μη εξειδικευμένο μόριο ανοσίας του οργανισμού έναντι των βακτηριακών επιδρομών. Κύριος στόχος, είναι η καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης των β-1,4 δεσμών μεταξύ του ακέτυλο-μουραμικού οξέος και της ακετυλογλυκοζαμίνης, που βρίσκονται στο στρώμα μεμβρανών από πεπτιδογλυκάνες, των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων. Η λυσοζύμη είναι ένα αρχαίο ένζυμο, του οποίου η προέλευση χρονολογείται στα 400 – 600 εκατομμύρια έτη πίσω και ανακαλύφθηκε συμπτωματικά το 1921 από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ. [62,64]

Οι λυσοζύμες, ταξινομούνται σε 6 κατηγορίες:

1. Λυσοζύμη τύπου κοτόπουλου (chicken-type, c-τύπου ή HEW, Hen Egg White λυσοζύμη) η οποία υπάρχει στο ασπράδι του αυγού του κοτόπουλου.
2. Λυσοζύμη τύπου χήνας (goose-type, g- τύπου λυσοζύμη), οποία υπάρχει στο ασπράδι του αυγού της χήνας.
3. Φυτική λυσοζύμη.
4. Βακτηριακή λυσοζύμη.
5. Λυσοζύμη τύπου φάγου (phage-type ή bacteriophage T4 λυσοζύμη).
6. Λυσοζύμη τύπου ασπόνδυλων (invertebrate-type, i- τύπου λυσοζύμη). [65]

Η έκκριση λυσοζύμης είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΙΦΝΕ και ιδιαίτερα σε ασθενείς με UC. Μερικές μελέτες διαπίστωσαν ότι η λυσοζύμη των κοπράνων, σχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις της δραστηριότητας της νόσου όπως με τον δείκτη δραστηριότητας της νόσου του Crohn (CDAI) και της κλινικής ταξινόμησης της δραστηριότητας της ελκώδους κολίτιδας (Truelove-Witts). Από την άλλη, οι συγκεντρώσεις λυσοζύμης κοπράνων σε ασθενείς με διάρροια μη οφειλόμενη σε ΙΦΝΕ, βρέθηκαν επίσης αυξημένες, μειώνοντας έτσι τη χρησιμότητα της λυσοζύμης κοπράνων σύμφωνα με τα τρέχοντα στοιχεία. [63]

Στην κολίτιδα που προκαλείται στην νόσο Crohn, η λυσοζύμη βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στα μεταπλαστικά κύτταρα Paneth (αριστερό κόλον), στις κρύπτες, καθώς και στο χόριο του εντερικού βλεννογόνου (propria mucosae). Η αυξημένη παραγωγή λυσοζύμης στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, μπορεί να σχετίζεται με μια ενισχυμένη προστασία του βλεννογόνου έναντι των παθογόνων βακτηρίων που πολλαπλασιάζονται στο μικροπεριβάλλον του παχέος εντέρου. [38]

Οι *Sugi et al*, (1996) μελέτησαν τα επίπεδα λυσοζύμης σε 41 ασθενείς (91 δείγματα) με UC, και 34 ασθενείς (105 δείγματα) με CD και βρήκαν ότι οι συγκεντρώσεις λυσοζύμης αυξήθηκαν σημαντικά στη ενεργή φάση σε σύγκριση με τα στάδια ύφεσης της νόσου τόσο στην UC όσο και στην CD.[66] Οι *Van der Sluys Veer A et al*,(1998) επιβαιβεώνουν τα παραπάνω ευρήματα, μελετώντας τα επίπεδα λυσοζύμης σε 112 ασθενείς με CD, σε 46 ασθενείς με UC και 40 μάρτυρες όπου η συγκέντρωση της λυσοζύμης (μέσος όρος $\pm$ SEM) βρέθηκε σημαντικά ($p<0,001$) υψηλότερη στους ασθενείς με CD (75 ± 14 $\mu\text{g/g}$) και στους ασθενείς με UC ($238 \pm 33 \mu\text{g/g}$) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση λυσοζύμης στους μάρτυρες (6 ± 1 $\mu\text{g/g}$).

Βρέθηκε όμως ασθενής συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης λυσοζύμης κοπράνων και του δείκτη CDAI ($r=0.32$ $P=0,001$) και AI ($r=0.38$ $P<0.0005$) σε ασθενείς με CD, καθώς και σε ασθενείς με UC στο σύστημα Truelove & Witts ($r=0,47$ $P0,001$).).[67] Μέσω ηλεκτροφοριστικής κλασματοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού σε δείγματα ανθρωπίνου ορού, χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη, τα επίπεδα λυσοζύμης στους υγιείς εθελοντές βρέθηκαν στα 238 ± 20 nM, στους ασθενείς με ΙΦΝΕ στα 792 ± 70 nM πριν από θεραπευτική παρέμβαση και στα 243 ± 22 nM μετά από θεραπευτική αγωγή. [68] Η έκφραση της λυσοζύμης διερευνήθηκε σε βιοψίες που πάρθηκαν από το αριστερό κόλον, σε ασθενείς με μικροσκοπική κολίτιδα (MC) ,κολλαγονική κολίτιδα (CC) ή λεμφοκυτταρική κολίτιδα (LC) σε σχέση με ασθενείς που πάσχουν από ΙΦΝΕ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπεραντιδραστική ανοσοαντίδραση εμφάνιστηκε μόνο στους αδένες παχέος εντέρου σε ασθενείς με CC , ενώ μόνο λίγες περιπτώσεις ασθενών με CD σε έξαρση, εμφάνισαν έντονη έκφραση της λυσοζύμης στις κρύπτες του αριστερού παχέος εντέρου από το σύνολο των ασθενών με ΙΦΝΕ.[69]

2.5 Ντεφενσίνη

Οι ανθρώπινες ντεφενσίνες (defensins) ανήκουν στα φυσικά αντιμικροβιακά πεπτίδια και εκφράζονται κυρίως απο ουδετερόφιλα και επιθηλιακά κύτταρα. Ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: α-ντεφενσίνες (α-defensins) και β-ντεφενσίνες (β-defensins), με μια πρόσφατη τρίτη υποκατηγορία, τις θ-ντεφενσίνες (θ –defensins), οι οποίες έχουν απομονωθεί μόνο στα λευκοκύτταρα του πιθήκου *rhesus macaque*. [70] Οι ντεφενσίνες αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1989 από τους *Quallette et al*, ως μια μεγάλη οικογένεια πεπτιδίων 29-45 αμινοξέων, που εκφράζονται στα κύτταρα Paneth του ειλεού. Στην γαστρεντερική οδό, οι α – ντεφενσίνες παράγονται αποκλειστικά από τα κύτταρα Paneth του λεπτού εντέρου, ενώ οι β – ντεφενσίνες παράγονται κατά κύριο λόγο στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 6 υπότυποι ανθρώπινης α- ντεφενσίνης, εκ των οποίων οι 1-4 είναι επίσης γνωστές ως ανθρώπινα ουδετερόφιλικές ντεφενσίνες (HNP) ενώ οι άλλες δύο εντερικές α-ντεφενσίνες, (Defs 5 & 6) παράγονται από τα κύτταρα Paneth του λεπτού εντέρου. [71]

1) Ανθρώπινες α-ντεφενσίνες (Human Neutrophil Peptide, HNP)

Ονομάζονται έτσι διότι παράγονται κυρίως από τα ουδετερόφιλα. Δεδομένου ότι τα ουδετερόφιλα που έχουν βασικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία του οργανισμού, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των φαγοκυττάρων, τα HNP είναι ευρέως διαδεσμένη κατηγορία αντιμικροβιακών πεπτιδίων. [71,72] Ο παράγοντας μεταγραφής 4 (TCF4), είναι ένα γονίδιο που ρυθμίζει την έκφραση των α-Dfs. Γενετικές μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή TCF4, φάνηκε πως σχετίζονται με την CD.[72]

Μέχρι σήμερα, οι πιο ισχυροί συσχετισμοί μεταξύ των αντιμικροβιακών πεπτιδίων και της ΙΦΝΕ, αφορούν τις α-ντεφενσίνες στο λεπτό έντερο ασθενών με CD. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση των Defs 5 & 6 στο βλεννογόνο του ειλεού σε ασθενείς με CD. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη, οι συγκεντρώσεις των Defs 1-3 στο πλάσμα αίματος καυκάσιων ασθενών με ενεργό νόσο CD, βρέθηκαν σημαντικά πιο υψηλές σε σύγκριση με ασθενείς σε ύφεση ή με τους ιγίης εθελοντές. Η αύξηση αυτή όμως, φάνηκε μόνο σε ασθενείς όπου η νόσος εντοπιζόταν στο τμήμα του ειλεού και όχι σε αυτούς όπου η νόσος εντοπιζόταν αποκλειστικά στο παχύ έντερο. [71] Δύο προηγούμενες Ιαπωνικές μελέτες, που μελέτησαν τη συγκέντρωση των Defs1-3 στο πλάσμα ασθενών με CD, ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα.[73,74] Αν και η αντιμικροβιακή δράση της HNP-4 ντεφενσίνης είναι ισχυρότερη από τις HNP1-3, η επίδραση της στην ΙΦΝΕ δεν έχει μελετηθεί ακόμη.[72]

2) Ανθρώπινη α-ντεφενσίνη 5 (HD-5) και α-ντεφενσίνη 6 (HD-6)

Οι Ανθρώπινες α-ντεφενσίνες 5 (HD-5) και α-ντεφενσίνες 6 (HD-6) παράγονται αποκλειστικά στα Paneth κύτταρα του λεπτού εντέρου. Οι αντιμικροβιακές αυτές πρωτεΐνες δεν εκφράζονται στο παχύ έντερο δεδομένου ότι δεν υπάρχουν κύτταρα Paneth στο κόλον. Η HD-5 διαθέτει πολλούς μηχανισμούς και δρά ενάντια σε όλα τα βακτηριακά είδη. [72] Οι *J. Wehkamp et al* ερεύνησαν την έκφραση των εντερικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη CD. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η έκφραση των Defs 5&6, δεν επηρεάζεται στην UC

ή σε ασθενείς με CD παχέος εντέρου, η έκφραση τους όμως βρέθηκε μειωμένη σημαντικά τόσο σε επίπεδο έκφρασης mRNA όσο και πρωτεΐνης, σε ασθενείς με CD τελικού ειλεού.[75]

3) Η α-ντεφενσίνη ποντικού (Cryptdin)

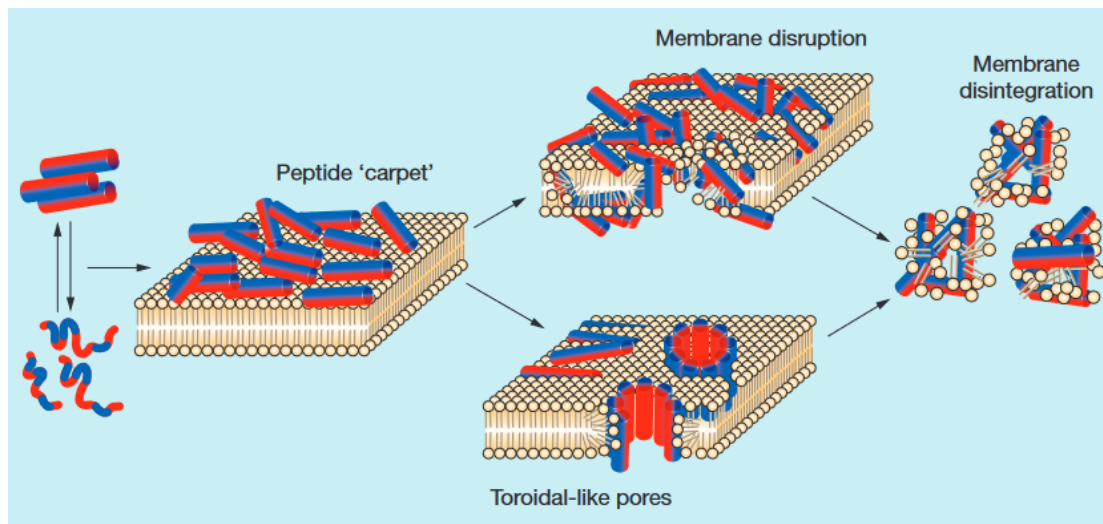
Η α-ντεφενσίνη που παράγεται από τα κύτταρα Paneth των ποντικών δεν έχει βρεθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 6 Cryptdins, με την cryptdin-4 να έχει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση.[72]

4) Ανθρώπινη β-ντεφενσίνη 1 (hBD-1)

Η πρωτεΐνη hBD-1 κωδικοποιείται από το γονίδιο DEFB1 και η έκφραση του γονιδίου DEFB1 ρυθμίζεται από τον υποδοχέα PPAR-γ. [72]

5) Ανθρώπινη β-ντεφενσίνη (hBD-2, hBD-3, hBD-4)

Σε αντίθεση με την hBD-1 που εκφράζεται με σταθερούς ρυθμούς, οι hBD-2, hBD-3 και η hBD-4, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης και μεγαλύτερη απόκριση στα εξωτερικά ερεθίσματα. Εκφράζονται σε πολύ μικρή ποσότητα στο παχύ έντερο ενός υγιή ατόμου. Η έκκριση τους επιταχύνεται υπο τη παρουσία κυτοκινών και διαφορών τύπων βακτηρίων.[72] Ενώ τα κύτταρα Paneth προσφέρουν πληθώρα λειτουργιών, μια από τις βασικότερες λειτουργίες τους είναι η αποθήκευση και η απελευθέρωση των ντεφενσινών. Διάφορα συστατικά του μικροβιακού τοιχώματος έχει φανεί πως πυροδοτούν την αποκοκκίωση των κυττάρων Paneth. Μεταξύ αυτών είναι, ο λιποσακχαρίτης LPS, το λιπίδιο A (τοξικό τμήμα LPS) και το μουραμυλ-διπεπτίδιο. Η απελευθέρωση ντεφενσίνης μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης και μέσω σηματοδοτικών μορίων τα οποία δεν σχετίζονται άμεσα με την διατάραξη της εντερικής μικροχλωρίδας. [70] Για παράδειγμα, βρέθηκε πως τα κύτταρα Paneth σε έκθεση τους στην προφλεγμονώδη κυτοκίνη IFN-γ, υπέστησαν άμεση και πλήρη αποκοκκίωση. [76] Οι ντεφενσίνες θεωρείται ότι ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση, διασπώντας την ακεραιότητα της μικροβιακής μεμβράνης, πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού γνωστός και ως «ShaiMatsuzaki-Huang model». Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι ντεφενσίνες εξαιτίας του θετικού τους φορτίου, αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των φωσφολιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης των μικροβιακών κυττάρων στόχων.[77]



Εικόνα 12. Το μοντέλο «ShaiMatsuzaki-Huang» [82].

Στις περισσότερες ντεφενσίνες, φαίνεται ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της δραστηρότητας τους. Η DEF6, για παράδειγμα, παρουσία αναγωγικού παράγοντα, γίνεται πιο υδρόφοβη, με αποτέλεσμα να προάγει την αναστολή του βακτηρίου *Bifidobacterium adolescentis* σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι η μη – αναγωγική της μορφή. [70]

3.1 Γενικά στοιχεία

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη ευρωπαϊκή μονογραφία (01/2008:1876) η μαστίχα είναι το αποξηραμένο ρητινώδες εξίδρωμα που βγαίνει από τον κορμό και τα κλαδιά του σχίνου (*Pistacia lentiscus*), με ελάχιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου 10ml/Kg. Η μαστίχα χαρακτηρίζεται πιο σωστά ως βάλαμο, το οποίο προέρχεται από τα μαστιχόδεντρα, την καλλιεργημένη μορφή του σχίνου. Η μαστίχα έχει επίσης συμπεριληφθεί ως μονογραφία στο ολιστικό παραδοσιακό σύστημα της Ινδίας γνωστό ως Αγιουβέρδα, αναφερόμενη ως 'Rumimastangi'. Το μαστιχόδεντρο – επιστημονικά **Pistacia Lentiscus L.** (οικογένεια Anacardaceae), είναι θάμνος αειθαλής, ύψους 2-3 μέτρων, και μπορεί να καλλιεργηθεί σε ζώνες που περιβάλλουν τις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου, της Πορτογαλίας και της τροπικής Αφρικής. Στο νησί της Χίου και μόνο στα νότια χωριά της, τα λεγόμενα Μαστιχοχώρια, ευδοκίμει και καλλιεργείται μία ιδιαίτερη ποικιλία σχίνου, ο **μαστιχοφόρος σχίνος** (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*), από τον οποίο εξάγεται ένα μοναδικό προϊόν, η Μαστίχα Χίου, με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (Π.Ο.Π) (317707/14-01-1994), βάσει του υπ' αριθμ. 123/1997 Κανονισμού (L0224/24-1-97) της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ένα πλήρως ανεπτυγμένο δέντρο *Pistacia lentiscus* var. *Chia* παράγει 1Kg ρητίνης ετησίως. Τα χημικά συστατικά της μαστίχας διακρίνονται σε:

- Φυσικά πολυμερή
- Τριτερπένια (τετρακυκλικού τύπου με σκελετό δαμαρενυλίου και πεντακυκλικού τύπου με σκελετό ολεανενίου όπως το μαστιχικό οξύ, ελενολικό οξύ κτλ)
- Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, 20% οξυγονωμένα μονοτερπένια και σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες
- Πολυφαινόλες, Φυτοστερόλες [78]

3.2 Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη επίσημη αναφορά στη Μαστίχα ανήκει στον Ηρόδοτο. Από τα αρχαία χρόνια, Έλληνες γιατροί όπως ο Ιπποκράτης αποκαλύπτουν τα μυστικά της Μαστίχας, η οποία ταξιδεύει στην Καλχηδόνα, την Αίγυπτο και την Αραβία, ως σπάνιο δώρο της ελληνικής φύσης. Ο αυτοκράτορας Ηλιογάβαλος αναμειγνύει πρώτος Μαστίχα με κρασί και δημιουργεί το “μαστιχίον οίνον”. Οι γυναίκες της εποχής χρησιμοποιούν οδοντογλυφίδες από ξύλο Μαστιχόδεντρου σαν λευκαντικό. Η συνήθεια διατηρείται και το Μεσαίωνα. Το 1346-1566 μ.Χ η Γενοβέζικη Κυριαρχία συστηματοποιεί το εμπόριο Μαστίχας στη Χίο. Έτσι, η Μαστίχα Χίου ταξιδεύει και γίνεται γνωστή σε δεκάδες τόπους της Ανατολής και της Δύσης. Τα Μαστιχοχώρια είναι αυτοδιοικούμενα και διανύουν μεγάλη άνθηση. Οι καλύτερες ποιότητες Μαστίχας που παράγονται, αποστέλλονται υποχρεωτικά από τον Εμίνη του μαστιχιού στην Κωνσταντινούπολη για τις 300 γυναίκες του χαρεμιού του Σουλτάνου. Η χρήση του μεγαλύτερου μέρους της παραγωγής μαστίχας για τον Σουλτάνο, είναι ο σημαντικότερος λόγος που το νησί κατείχε περισσότερα προνόμια, ξεκινώντας το 1567μ.Χ με χαμηλότερο συντελεστή φόρου. Η καταστροφή της Χίου από τους Οθωμανούς το 1822 μ.Χ προκάλεσε την πλήρη καταστροφή του νησιού, με εκμηδένιση της παραγωγή μαστίχας που έκανε δεκαετίες να ανακτηθεί. Μετά την απελευθέρωση της Χίου από τον ελληνικό στόλο το 1912, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην παραγωγή της μαστίχας εκ νέου. Γι αυτό το σκοπό, ψηφίστηκε νόμος και ιδρύθηκε ο αποκλειστικός φορέας διαχείρισης Μαστίχας Χίου, η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (CGMGA), το 1938, [79,80]

3.3 Μαστίχα Χίου – Θεραπευτικές Ιδιότητες

Οι αρχαίοι Έλληνες ιατροί (Ιπποκράτης, Διοσκουρίδης, Γαληνός) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στις ιδιότητες της Μαστίχας Χίου και την συνιστούσαν για την χαρακτηριστική της γεύση και τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Στοιχεία δείχνουν πως η Μαστίχα Χίου ήταν η πρώτη φυσική τσίχλα του Αρχαίου κόσμου, που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των δοντιών και το φρεσκάρισμα της αναπνοής.[78] Ο Διοσκουρίδης, έκανε εκτεταμένες αναφορές στην μαστίχα και στις πολυάριθμες θεραπευτικές της ιδιότητες: στην πήξη του αίματος, στη καταπολέμηση του χρονίου βήχα, στους πόνους στο στομάχι. [81] Στο διάσημο έργο του «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» ανέφερε το “mastichinon elaion (oleum)”, πιθανός ένα παρασκεύασμα από

την ανάμιξη μαστίχας και ελαιόλαδου και τις θερμαντικές, στυπτικές και μαλακτικές του ιδιότητες και επέμενε ότι το καλύτερο “mastichinon elaiion (oleum)” παραγόταν στη Χίο. [80]

3.3.1 Αντιβακτηριδιακές ιδιότητες

Τα αποτελέσματα δύο τυφλών τυχαιοποιημένων μελετών, έδειξαν ότι η 4ωρη μάσηση μαστίχας Χίου, μείωσε σημαντικά τον συνολικό αριθμό βακτηριακών αποικιών στο στόμα σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, καθώς επίσης η ομάδα που έλαβε τη μαστίχα είχε σημαντικά μειωμένους του δείκτες οδοντικής μικροβιακής πλάκας. [81]

3.3.2 Αντι- φλεγμονώδεις ιδιότητες

Οι επιβεβαιωμένες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της, αποδεικνύονται με τη μείωση των επιπέδων της IL-5, IL-13 και μειώνοντας τη παραγωγή TNF-α, ICAM-1, IL-6 και IL-8. [82]

3.3.3 Άλλες ιδιότητες

Η μαστίχα Χίου, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης με επιτυχία σε πειράματα επιδεικνύοντας ισχυρά προστατευτικά αποτελέσματα κατά της επαγόμενης, από μπλεομυκίνη, πνευμονική ίνωσης σε ποντίκια [83], καθώς και νεφροπροστατευτική δράση, αναστέλλοντας την συσσωμάτωση και προσκόλληση των κρύσταλλων οξαλικού ασβεστίου στα νεφρικά κύτταρα. [84]

Σε μια πρόσφατη τυχαιοποιημένη,ελεγχόμενη, διπλή τυφλή μελέτη, όπου 60 ασθενείς με ΙΦΝΕ έλαβαν είτε 2,8γρ συμπληρώματος Μαστίχας Χίου είτε εικονικό σκεύασμα για 3 μήνες, με σταθερή ή όχι θεραπεία για τη νόσο, φάνηκε πως η χορήγηση του συμπληρώματος επέδρασε θετικά στους βειδείκτες οξειδωτικού stress σε ασθενείς με CD σε έξαρση, μειώνοντας τα επίπεδα της οξειδωμένης LDL (oxLDL) καθώς και των λόγων oxLDL/LDL και oxLDL/HDL.[85]

3.4 Μαστίχα Χίου και ΙΦΝΕ

Μελέτη σε ζωικά πρότυπα, έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση με μαστιχέλαιο καθυστέρησε τόσο την έναρξη όσο και την εξέλιξη της νόσου IBD σε ποντίκια όπου προκλήθηκε οξεία κολίτιδα καταναλώνοντας DSS προστιθέμενο στο νερό, για 7-10 ημέρες. Το αποτέλεσμα ήταν πιο έντονο στα ποντίκια που έλαβαν τη χαμηλή δόση μαστιχέλαιου (0,02%) σε σχέση με την υψηλή δόση (0,20%). Ο συνδυασμός ρητίνης μαστίχας και μαστιχέλαιου, είχε παρόμοια αποτελέσματα με τη μεμονωμένη χρήση μαστιχέλαιου.[72]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Πειραματικό μέρος

4.1 Σκοπός μελέτης

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αποτελεί τμήμα μιας διπλής τυφλής, τυχαιοποιημένης κλινικής δοκιμής που πραγματοποιήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, στην οποία ασθενείς με IBD έλαβαν φυσικό συμπλήρωμα με μαστίχα Χίου με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των βιοδραστικών ενώσεων του εν λόγω προϊόντος, στην διαχείριση της IBD. Συνολικά, 60 ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn έλαβαν μέρος στη μελέτη, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες μέσω τυχαιοποίησης, με την ομάδα της παρέμβασης να λαμβάνει ημερησίως 2,8 γραμμάρια συμπληρώματος με Μαστίχα Χίου σε μορφή ταμπλέτας και την ομάδα ελέγχου εικονικό σκεύασμα με πανομοιότυπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά..

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

- Η αξιολόγηση της **τρίμηνης παρέμβασης με συμπλήρωμα** Μαστίχας Χίου σε χρονικό διάστημα 3 μηνών, έναντι εικονικού σκευάσματος, **σε ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn, στα επίπεδα** λυσοζύμης και ντεφενσίνης.

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

4.2.1 Πρωτόκολλο κλινικής δοκιμής

Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα στην ομάδα παρέμβασης, η οποία λάμβανε το συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου σε δοσολογία των 2,8gr ημερησίως (4 ταμπλέτες x 700mg μαστίχας) και στην ομάδα ελέγχου η οποία λάμβανε ημερησίως την ίδια ποσότητα σε ταμπλέτες με το εικονικό σκεύασμα. Η δόση αυτή επιλέχθηκε με βάση πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη που αφορούσε τη βιοδιαθεσιμότητα του συμπληρώματος Μαστίχας Χίου, σε υγιείς άνδρες, όπου δόση της τάξεως των 10gr Μαστίχας Χίου / ημέρα, ήταν καλά ανεκτή χωρίς να προκληθούν παρενέργειες (Parada et al, 2018). Η διάρκεια της παρέμβασης διήρκησε 3 μήνες. Με τη χρήση του δείκτη ενεργότητας της νόσου Harvey-Bradshaw (HBI), επιλέχθηκαν άνδρες και γυναίκες με νόσο Crohn σε ήπια έως μέτρια έξαρση της νόσου. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της Μαστίχας Χίου στη διαχείριση της νόσου Crohn στην εν λόγω εργασία, προσδιορίζεται με αξιολόγηση των τιμών λυσοζύμης και β-ντεφενσίνης κοπράνων, πριν και μετά την παρέμβαση.

Τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη ήταν:

1. Φύλο Γυναίκα – Αντρας
2. Ηλικία εθελοντών: 18-76 ετών
3. Διαγνωσμένη και επιβεβαιωμένη νόσος Crohn μέσω ενδοσκοπικής διαδικασίας με σταθερή ιστολογία και κλινική πορεία
4. Ενεργή νόσο (μέτρια) η οποία ορίζεται ως:
 $5 \leq \text{HBI} \leq 14$ στην Νόσο Crohn
5. Σταθερή θεραπεία με στεροειδή για 2 εβδομάδες πριν από την έναρξη της δοκιμής, μεσαλαμίνη και τα ανάλογα της για 4 εβδομάδες και ανοσοκατασταλτικά για διάστημα 8 εβδομάδων
6. Σταθερή φαρμακευτική αγωγή κατά τη διάρκεια της δοκιμής

Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν τα εξής:

1. Θετική καλλιέργεια κοπράνων για εντερικά παθογόνα βακτήρια ή τοξίνες που έχουν απελευθερωθεί από το *Clostridium difficile*.
2. Αντιβιοτική αγωγή κατά τη διάρκεια της θεραπείας και 2 μήνες πριν από την εξέταση
3. Χειρουργική επέμβαση στο έντερο ≤ 3 μήνες πριν από τον έλεγχο. Προγραμματισμένο χειρουργείο ή νοσηλεία κατά τη διάρκεια της μελέτης. Σύνδρομο βραχέος εντέρου με σημαντική κλινική εικόνα. Παρουσία ενδοκοιλιακού αποστήματος ή συριγγίου με κλινικές ή ακτινολογικές ενδείξεις ενός σχετικού αποστήματος. Ειλεοστομία. Κολοστομία.
4. Εντερική ή παρεντερική διατροφή. Κατανάλωση αλκοόλ ή χρήση ναρκωτικών ουσιών. Λήψη συμπληρωματων βιταμινών ή ιχνοστοιχείων. Ακολούθηση μακροβιοτικής ή χορτοφαγικής διατροφής πριν και κατά τη διάρκεια της κλινικής δοκιμής.
5. Οποιαδήποτε κακοήθεια μέσα στο έτος που προηγείται της κλινικής παρακολούθησης. Καρδιαγγειακή νόσος. Πεπτικό έλκος.
6. Εγκυμοσύνη. Γαλουχία.

4.2.2 Λήψη ιατρικού ιστορικού

Η λήψη ιατρικού ιστορικού, το οποίο συμπεριλάμβανε και γενικές πληροφορίες σχετικά με τον εθελοντή (- καπνιστικές συνήθειες, αλλεργικές αντιδράσεις κτλ), καθώς επίσης, πρόσφερε απαραίτητα δεδομένα που αφορούν την πάθηση, πραγματοποιήθηκε από γαστρεντερολόγο. Ο δείκτης ενεργότητας της νόσου υπολογίστηκε με τον δείκτη HBI για τους ασθενείς με νόσο του Crohn (CD) (Harvey & Bradshaw, 1980).

4.2.3 Αιμοληψία και λήψη δείγματος κοπράνων από τους εθελοντές

Για την απομόνωση ορού και πλάσματος, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος των ασθενών (20ml) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την διεξαγωγή περαιτέρω ανάλυσης. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς, παρέδωσαν δείγματα κοπράνων τα οποία κρατήθηκαν έως 9 ημέρες στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους.

4.2.4 Follow – up αξιολόγησης εθελοντών

Ο έλεγχος της συμμόρφωσης των ασθενών σχετικά με την κατανάλωση του διατροφικού συμπληρώματος και η ανίχνευση τυχόν παρενεργειών πραγματοποιήθηκε με τηλεφωνική επικοινωνία με τους ασθενείς ανά 2 εβδομάδες. Η συμμόρφωση των ασθενών αξιολογήθηκε με βάση το ημερολόγιο ημερήσιας καταγραφής κατανάλωσης των ταμπλετών που περιείχαν τη Μαστίχα Χίου, το οποίο συμπλήρωναν οι ασθενείς και παρέδιδαν κάθε μήνα. Με τη λήξη της διατροφικής παρέμβασης, όλοι οι παραμετροί που ελήφθησαν υπόψη στην στρατολόγηση των εθελοντών, επαναξιολογήθηκαν.

4.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός λυσοζύμης και ντεφενσίνης σε δείγμα κοπράνων

Ο τρόπος προσδιορισμού της λυσοζύμης και της ντεφενσίνης στα δείγματα κοπράνων έγινε με τη μέθοδο «sandwich» ELISA, με εξειδικευμένα για την καθεμία Elisa sandwich Kit και εφαρμόστηκε το αντίστοιχο πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρίας. Η τελική μέτρηση απορρόφησης ήταν στα 450nm στο φωτόμετρο ELISA και τα επίπεδα των δεικτών προσδιορίστηκαν με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

4.3.2 Αντιδραστήρια –όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA
- ElisaKit
- Αυτόματες πιπέτες και tips(1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), erpendorfs των 1.5mL και 2mL, falcons των 50mL
- Απιονισμένο ή δυσαπιονισμένο νερό
- Vortex
- Φυγόκεντρος

4.3.3 Αρχή της μεθόδου Sandwich ELISA

Η ELISA είναι μία μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία στοχεύοντας στην ανίχνευση αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων που δεσμεύονται μεταξύ δύο αντισωμάτων, ειδικών για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Το αντιγόνο το οποίο πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο θέσεις σύνδεσης (αντιγονικά επιτόπια) στις οποίες μπορούν να προσδεθούν τα αντισώματα, καθώς τα δύο διαφορετικά αντισώματα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιούνται κατά την πρόσδεση και την ανίχνευση των αντιγόνων είναι είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά. Τα μονοκλωνικά αντισώματα επιτυγχάνουν επαρκή ανίχνευση καθώς και ποσοτικοποίηση ιδιαίτερα μικρών ποσοτήτων αντιγόνου καθώς αναγνωρίζουν μία θέση σύνδεσης με το αντιγόνο. Από την άλλη, ως αντισώματα πρόσδεσης χρησιμοποιούνται τα πολυκλωνικά αντισώματα. Το πρώτο αντίσωμα είναι ακινητοποιημένο σε στερεή αδρανή επιφάνεια. Η προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος οδηγεί στη δέσμευση του προς ανίχνευση αντιγόνου, άγνωστης συγκέντρωσης, στο πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, αφού πραγματοποιηθεί αντίδραση του πρώτου αντισώματος με το εξεταζόμενο αντιγόνο, λαμβάνει χώρα έκπλυση ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δεν δεσμεύτηκε. Έπειτα, διάλυμα δεύτερου αντισώματος προστίθεται έναντι του αντιγόνου. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένζυμο, το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ένα άχρωμο υπόστρωμα και να δώσει έγχρωμο προϊόν. Μετά τη δέσμευση του αντιγόνου από τα δύο αντισώματα ακολουθεί έκπλυση, ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δε δεσμεύθηκε από αυτά. Εν συνεχεία, προστίθεται ανιχνευτής για τη δημιουργία συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου και ανιχνευτή. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλύσης και προστίθεται ειδικό υπόστρωμα και ακολουθεί χρωματομετρική αντίδραση. Η ένταση του χρώματος του παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη της ποσότητας του προς προσδιορισμού αντιγόνου στο αρχικό δείγμα. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450 nm. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς το προς ανάλυση δείγμα δεν χρειάζεται να καθαριστεί προηγουμένως και επιπλέον η τεχνική παρουσιάζει υψηλού βαθμού ευαισθησία.

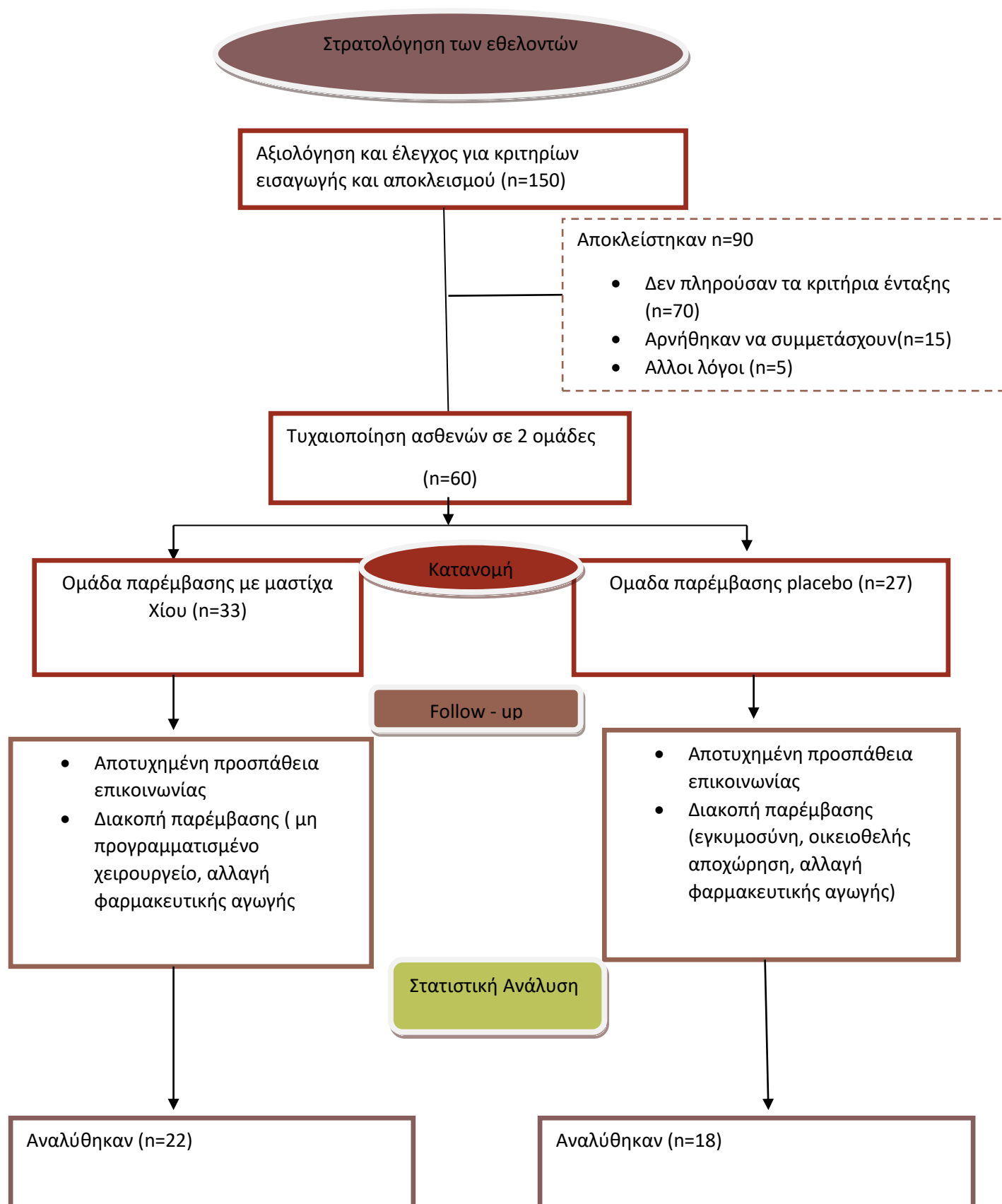
Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Οι θέσεις του τριβλύου, ξεπλένονται αρχικά με το διάλυμα πλύσης (5x250μl), το οποίο είναι επικαλυμένο, με ένα υψηλής συγγένειας για την λυσοζύμη και την ντεφενσίνη, μονοκλωνικό αντίσωμα.
2. Προστίθενται 100μl από τα δείγματα των ασθενών στα βοηθία του τριβλύου. Το τριβλύο καλύπτεται και επωάζεται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με παράλληλη ανάδευση του τριβλύου σε οριζόντιο αναδευτήρα.
3. Μετά το πέρας των 60 λεπτών, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (5x250μl).
4. Στη συνέχεια, 100μl από το αραιωμένο προϊόν σύζευξης, προστίθεται σε κάθε βοηθίο και το τριβλύο επωάζεται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με παράλληλη ανάδευση του τριβλύου σε οριζόντιο αναδευτήρα.
5. Μετά το πέρας των 60 λεπτών, το υπερκείμενο απομακρύνεται και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (5x250μl).
6. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl υποστρώματος σε κάθε βοηθίο και το τριβλύο επωάζεται για 10-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου σχηματιστεί έγχρωμη ένωση.
7. Τέλος, προστίθενται 100μl διαλύματος τερματισμού και το τριβλύο τοποθετείται αμέσως στο φωτόμετρο ELISA όπου μετράται η απορρόφηση στα 450nm.
8. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

4.3.4 Στατιστική επεξεργασία

Το στατιστικό πακέτο SPSS (22.0) αποτέλεσε το στατιστικό εργαλείο ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Για τον έλεγχο της κανονικότητας εφαρμόστηκε το test Kolmogorov-Smirnov. Για τη σύγκριση των μέσων όρων ανάμεσα σε δύο ανεξάρτητες ομάδες χρησιμοποιήθηκε το Independent sample t-test για τις παραμέτρους που ακολουθούν κανονική κατανομή και το Mann-Whitney test για όσες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τη σύγκριση των μέσων όρων της ίδιας μεταβλητής μετά από την παρέμβαση χρησιμοποιήθηκαν το pairedsample t-test για τις παραμέτρους που ακολουθούν κανονική κατανομή και το Wilcoxon test για όσες δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Όλες οι τιμές δίδονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ SD). Τέλος, ως επίπεδο σημαντικότητας, ορίστηκε το $p=0.05$.

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Διάγραμμα ροής της ένταξης των ασθενών



Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής της ένταξης των ασθενών

Στην στρατολόγηση των εθελοντών συμμετείχαν μόνο ασθενείς με διαγνωσμένη ΙΦΝΕ σε περίοδο υποτροπής. Η στρατολόγηση των ασθενών πραγματοποιήθηκε στο διάστημα μεταξύ Μαΐου του 2016 και Ιουνίου του 2017. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν γραπτή συγκατάθεση ότι επιθυμούν να λάβουν μέρος στη μελέτη. Η ενεργότητα της νόσου αξιολογήθηκε με βάση το δείκτη ενεργότητας Harvey-Bradshaw, με τιμές ≥ 5 και ≤ 16 , στην περίπτωση της νόσου Crohn, και ο δείκτης partial Mayo score (PMS) με τιμές ≥ 2 και ≤ 6 , για την ελκώδη κολίτιδα. Από το σύνολο των 150 εθελοντών που δήλωσαν ενδιαφέρον για να συμμετάσχουν στη μελέτη, αποκλείστηκαν τα 90 άτομα και συμπεριλήφθησαν στη μελέτη 60 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια. Οι εθελοντές έπειτα, τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, 33 άτομα στην ομάδα παρέμβασης με μαστίχα Χίου, συμπλήρωμα σε μορφή κάψουλας 2,8gr ημερησίως, και 27 άτομα στην ομάδα ελέγχου που έλαβε εικονικό σκεύασμα (placebo) σε μορφή ταμπλέτας. Η τυχαιοποίηση που πραγματοποιήθηκε είναι «διπλή-τυφλή» με σκοπό να μην μπορούν τα αποτελέσματα να επηρεαστούν από το ερευνητικό προσωπικό ή τους ασθενείς. Η παρέμβαση διήρκεσε 3 μήνες. Και οι δύο ομάδες συνέχισαν να λαμβάνουν την φαρμακευτική τους αγωγή, η οποία έπρεπε να μείνει σταθερή κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Η αλλαγή φαρμακευτικής αγωγής, η εγκυμοσύνη, ένα μη προγραμματισμένο χειρουργείο, η οικειοθελής αποχώρηση και η αδυναμία επικοινωνίας με τον ασθενή κατά τη διάρκεια και έπειτα της μελέτης, αποτέλεσαν τους λόγους που στην τελική ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεριλήφθηκαν τελικά 22 ασθενείς από την ομάδα παρέμβασης και 18 ασθενείς από την ομάδα ελέγχου. Οι επισκέψεις για την παρακολούθηση των ασθενών (follow-up) ολοκληρώθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2017. Επιπλέον, όλοι οι ασθενείς έλαβαν ανεξαιρέτως, διατροφικές οδηγίες από διαιτολόγους και κατά τη διάρκεια της εβδομαδιαίας τηλεφωνικής επικοινωνίας μπορούσαν να αναφέρουν τυχόν παρενέργειες, τη πιθανή τροποποίηση της φαρμακευτικής τους αγωγής ή να λύσουν οποιοδήποτε προβληματισμό έχουν.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 40 άτομα, από τα οποία 18 γυναίκες και 22 άνδρες με νόσο του Crohn σε έξαρση. Από αυτά στην ομάδα της παρέμβασης συμπεριλήφθηκαν 11 άντρες και 11 γυναίκες και στην ομάδα ελέγχου 11 άντρες και 7 γυναίκες. Τα άτομα στην ομάδα παρέμβασης είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ηλικία ($36,0 \pm 10,7$ έτη) έναντι της ομάδας ελέγχου ($48,1 \pm 17,6$ έτη). Εκτός από τα έτη ηλικίας, οι μέσοι όροι στις υπόλοιπες παράμετροι όπως η οικογενειακή κατάσταση, η εκπαίδευση και οι καπνιστικές συνήθειες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων υποδεικνύοντας έτσι μια ομοιογένεια των δύο ομάδων.

Πίνακας 2. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ενεργή νόσο Crohn. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως N (%) του συνολικού αριθμού των ασθενών.

	CD (N=40)		
	Placebo(18)	Ομάδα παρέμβασης με Μαστίχα(22)	P
Φύλο			
Γυναίκες	7 (38.9)	11 (50)	0.482 ⁺
Ανδρες	11 (61.1)	11 (50)	
Ηλικία(σε έτη), Μ.Ο (τυπική απόκλιση)	48,1 (17.6)	36,0 (10.7)	0.011[‡]
Οικογενειακή κατάσταση			
Ελευθερος/η ή /Χωρισμένος/η	9 (50)	11 (50)	1.000 ⁺
Συζευγμενος/η	9 (50)	11 (50)	
Εκπαίδευση (σε έτη)			
1-9	2 (11.1)	2 (9.1)	0.884 ⁺⁺
10-12	3 (16.7)	6 (27.3)	
>12	13 (72.2)	14 (63.6)	
Καπνιστικές συνήθειες			
Οχι	11 (61.1)	15 (68.2)	0.641 ⁺
Ναι	7 (38.9)	7 (31.8)	

Επίδραση της παρέμβασης με μαστίχα Χίου στους βιοδείκτες κοπράνων λυσοζύμη & ντεφενσίνη:

Η βαρύτητα της φλεγμονής, που αξιολογήθηκε από τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλεγμονωδών δεικτών, β-ντεφενσίνης και λυσοζύμης στα κόπρανα, με τη μέθοδο προσδιορισμού ELISA, αξιολογήθηκαν πριν την έναρξη και μετά το τέλος της παρέμβασης. Τα επίπεδα της ντεφενσίνης στους ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn πριν από την κατανάλωση 2,8gr Μαστίχας Χίου ήταν 35,9ng/g ενώ μετά το τέλος της παρέμβασης τα επίπεδα ήταν 8,9ng/g. Από τη σύγκριση, δε φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Στην ομάδα ελέγχου τα επίπεδα ντεφενσίνης πριν την παρέμβαση με εικονικό σκέυασμα ήταν 36,8ng/g ενώ μετά το τέλος της παρέμβασης ήταν 49,4ng/g, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Δεν είχαμε καμμία στατιστικά σημαντική μεταβολή κατά τη διάρκεια της παρέμβασης στις δύο ομάδες. Παρομοίως, συγκρίναμε τα επίπεδα λυσοζύμης των εθελοντών με ενεργή νόσο Crohn πριν και μετά τη παρέμβαση. Από τη σύγκριση δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$) στις τιμές, στις δύο ομάδες. Τα επίπεδα λυσοζύμης στους εθελοντές που έλαβαν το συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου, πριν την παρέμβαση ήταν 15,1μg/g και 9,8μg/g μετά το τέλος της παρέμβασης. Στην ομάδα ελέγχου που έλαβε το εικονικό σκέυασμα, τα επίπεδα λυσοζύμης πριν την παρέμβαση ήταν 8,9μg/g ενώ ατ επίπεδα στο τέλος ήταν 10,0μg/g. Τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώνονται με στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν μετά τη παρέμβαση εμφανίζονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3. Σύγκριση επιπέδων λυσοζύμης πριν και μετά την παρέμβαση.

	Baseline (N=40)	Follow-up (N=40)	%dmean		
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p ¹	p ²
Lysozyme (μg/g)					
<i>Placebo</i>	8,9 (2,2)	10,0 (13,5)	21,5 (152,1)	0,61	0,56
<i>Mastiha</i>	15,1 (10,2)	9,8 (11,2)	-12,7 (70,3)	0,209	
<i>p³</i>	0,478	0,104			

Πίνακας 4. Σύγκριση επιπέδων ντεφενσίνης πριν και μετά την παρέμβαση.

	Baseline	Follow-up	%dmean		
	(N=40)	(N=40)			
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	p ¹	p ²
Defensin (ng/g)					
<i>Placebo</i>	36,8 (25,8)	49,4 (39,9)	456,9 (1076,9)	0,524	0,403
<i>Mastiha</i>	35,9 (42,2)	8,9 (4,3)	4,8 (130,5)	0,221	
<i>p³</i>	0,837	0,242			

4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη μας τα επίπεδα λυσοζύμης σε ασθενείς με CD σε έξαρση, βρέθηκαν να κυμαίνονται στα 8,9 μg/g (+/-2,2) στην ομάδα ελέγχου (placebo) και 15,1 μg/g (+/-10,2) στη ομάδα που έλαβε το συμπλήρωμα με Μαστίχα Χίου.

Συμφωνα με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, οι τιμές λυσοζύμης κοπράνων σε ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn, είναι αυξημένες σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Οι *Van der Sluys Veer A et al*, σε μελέτη που πραγματοποίησαν το 1998, σε 112 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn, βρήκαν τιμές λυσοζύμης στα δείγματα κοπράνων στα 75μg/g (+/- 14), ενώ στην ομάδα μαρτύρων οι τιμές ήταν στατιστικά χαμηλότερες, με μέση τιμή τα 6 μg/g (+/-1). [67] Σε μια άλλη μελέτη των *Hemrika MH et al*, (1989), όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μονάδες μέτρησης, τα επίπεδα λυσοζύμης κοπράνων σε υγιή πληθυσμό κυμαίνονταν από 0-6 mg/l και διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα επίπεδα λυσοζύμης κοπράνων σε ασθενείς με IBD, στους οποίους οι τιμές κυμάνθηκαν στα 6 με 104 mg/l .[86] Σε μελέτη, που δημοσιεύτηκε το 1992, οι *Dubrow R et al* βρήκαν σε 39 υγιή άτομα επίπεδα λυσοζύμης κοπράνων με μέσο όρο τα 12.5 μg/g (+/- 2.6) έναντι των τιμών λυσοζύμης 13.3 μg/g (+/- 2.8) σε 23 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο, χωρίς τα ευρήματα να επιβεβαιώνονται στατιστικά.[87]

Υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός μελετών στη βιβλιογραφία , αναφερόμενες στις τιμές λυσοζύμης κοπράνων είτε σε υγιής είτε σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, με αποτέλεσμα τα στοιχεία να μην επαρκούν για την ασφαλή και τεκμηριωμένη σύγκριση. Ο μικρός αριθμός των συμμετεχόντων της μελέτης, διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή λυσοζύμης και ενδεχόμενοι περιορισμοί των παραπάνω μελετών να επηρεάζουν την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Η ανθρώπινη β-ντεφενσίνη-2 (HBD-2) ήταν η πρώτη ανθρώπινη αντιμικροβιακή πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε. [88] Οι συγκεντρώσεις ντεφενσίνης στη συγκεκριμένη μελέτη σε ασθενείς με CD σε έξαρση, βρέθηκαν να κυμαίνονται στα 36,8ng/g(+/-25,8) στην ομάδα ελέγχου (placebo) και 35,9ng/g (+/-42,2) στην ομάδα που έλαβε την παρέμβαση με Μαστίχα Χίου, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία.

Σε μελέτη των *Kolho KL et al*, οι οποίοι διερευνώντας τα επίπεδα HBD-2 κοπράνων σε παιδιατρικούς ασθενείς με IBD σε έξαρση, σε σύγκριση με παιδιατρικούς ασθενείς μη πάσχοντες από τη νόσο, δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές των δύο αυτών ομάδων, με μέσο όρο τιμών ντεφενσίνης στους ασθενείς με IBD 31.7 ng/mL (+/-0-932). [89] Οι τιμές αυτές συγκλίνουν με τις τιμές που βρέθηκαν στα δείγματα της μελέτης μας.

Πρόσφατα αποτελέσματα μελετών αποδεικνύουν ότι η HBD-2 υπερεκφράζεται στην ενεργό φλεγμονή του εντέρου, και ιδιαίτερα τα αποτελέσματα αφορούν ασθενείς που πάσχουν από UC. Αυτό αναφέρθηκε και στη μελέτη των *J Langhorst et al*, 2007, όπου οι τιμές σε 22 ασθενείς με ενεργό UC κυμάνθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα (104.9 ng/g (+/-62.9)) έναντι των τιμών HBD-2 (31.0 ng/g (+/-15.4) στην ομάδα 23 υγιών εθελοντών ($p < 0.0005$). Στην μελέτη των *Wehkamp J et al*, 2003, τα επίπεδα έκφρασης mRNA της HBD-2 παρουσίασαν σημαντική αύξηση μόνο σε ασθενείς που έπασχαν από UC σε έξαρση και όχι σε ασθενείς με ενεργό CD.[94] Από την άλλη, ο *Aldhous et al*, υποστηρίζουν ότι αυξημένη έκφραση HBD-2 mRNA είναι παρόμοια τόσο σε ασθενείς με UC όσο και σε ασθενείς με CD, εάν είναι ελεγχόμενη η θέση λήψης της βιοψίας. [90] Ωστόσο, ενδιαφέροντα είναι και τα αποτελέσματα των *Langhorst J et al*, 2009, που επιβεβαιώνουν τα παραπάνω, καθώς οι τιμές HBD-2 που βρήκαν σε δείγματα κοπράνων ήταν υψηλές στην ομάδα ασθενών ($n=30$) με ενεργή UC με μέση τιμή 106.9 ng/g (+/-s.d. 91.5) και χαμηλότερες στην ομάδα ελέγχου με υγιής εθελοντές ($n=24$), 29.9 ng/g (+/-16.1). [91]

Συμπερασματικά, οι τιμές HBD-2 των ασθενών με ενεργή CD που εντάχθηκαν στη κλινική δοκιμή, δεν μπορούν να συγκριθούν με ανάλογα δεδομένα από παρόμοιες μελέτες, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για ασθενείς με CD. Η απορρυθμισμένη απόκριση της HBD-2 στους ασθενείς με ΙΦΝΕ, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για να αποσαφηνιστεί αν οι τιμές αυξάνονται και στις δύο κύριες κατηγορίες της IBD ή μόνο στην UC, όπως επίσης το κατά πόσο οι αλλαγές αυτές, οφείλονται στη τοπική βακτηριακή μικροχλωρίδα ή αποτελούν μέρος της απορρυθμισμένης ανοσίας που συμβάλλει στην παθόγνευση της ΙΦΝΕ.

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3, συγκρίναμε τη συγκέντρωση λυσοζύμης των εθελοντών πριν και μετά τη παρέμβαση, τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στην ομάδα που έλαβε το συμπλήρωμα Μαστίχας Χίου. Από την σύγκριση, δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Το ίδιο παρατηρήσαμε και για τις τιμές β-ντεφενσίνης. Παρόλα αυτά, οι παρατηρούμενες μεταβολές στα επίπεδα των μεταβλητών που διερευνήσαμε, υποστηρίζουν τον ενεργό ρόλο του φυτικού συμπληρώματος στη διαχείριση μιας πάθησης με σοβαρές παρενέργειες και δύσκολη συμμόρφωση των ασθενών στην συμβατική θεραπευτική αγωγή.

Η παρέμβαση που πραγματοποιήθηκε λόγω του μικρού αριθμού εθελοντών, δεν κατάφερε να μας δώσει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τις μεταβλητές που διερευνήθηκαν. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από την παρούσα κλινική δοκιμή είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και σηματοδοτούν την ανάγκη και άλλων επιστημονικών ερευνών προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε έχει πολλά πλεονεκτήματα όσον αφορά τον σχεδιασμό της όπως η τυχαιοποίηση και η τυφλοποίηση του δείγματος, ο placebo – control σχεδιασμός της, καθώς και ο αυστηρός έλεγχος των εθελοντών με σκοπό τη διασφάλιση της συμμόρφωσης τους στην κατανάλωση του σκευασμάτων σε ημερήσια βάση. Αναφορικά με τους περιορισμούς της μελέτης, έναν βασικό περιορισμό αποτέλεσε ο μικρός αριθμός ατόμων που συμμετείχε καθώς και η μελέτη δύο νέων βιοδεικτών, για τους οποίους δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στη βιβλιογραφία. Τα παραπάνω συνέβαλαν στο να μην μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα με βάση το γενικό πληθυσμό.

Ανακεφαλαιώνοντας, η Μαστίχα Χίου είναι ένα προσιτό, οικονομικό και πλούσιο σε ευεργετικά συστατικά, προϊόν, που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της ΙΦΝΕ, επικουρικά της φαρμακευτικής αγωγής. Η απάντηση στο αν το φυτικό αυτό σκεύασμα μπορεί να βελτιώσει την κλινική εικόνα και να μειώσει την φλεγμονή σε ασθενείς με ήπια έως και μέτρια δραστηριότητα της νόσου ΙΦΝΕ, θα δοθεί με τη πραγματοποίηση μεγαλύτερων κλινικών δοκιμών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andrzej Wędrychowicz et al. Advances in nutritional therapy in inflammatory bowel diseases: Review World J Gastroenterol 2016 January 21; 22(3): 1045-1066
2. McDowell C¹, Bhimji SS². Bowel, Inflammatory Disease (IBD). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-. 2018 Aug 25.
3. Guangxi Zhou et al, ASCA, ANCA, ALCA and Many More: Are They Useful in the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease? Dig Dis 2016;34:90–97
4. Ananthakrishnan AN et al, Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018 Jan;15(1):39-49.
5. Fabiana Andrea Moura et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? Redox Biology 6(2015) 617-639
6. Sarvestani SK et al, Cancer-predicting transcriptomic and epigenetic signatures revealed for ulcerative colitis in patient-derived epithelial organoids. Oncotarget. 2018 Jun 19;9(47):28717-28730.
7. Pernat Drobež C, DNA polymorphisms predict time to progression from uncomplicated to complicated Crohn's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2018 Apr;30(4):447-455.
8. https://www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/_pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf
9. Lena Antoni et al, Intestinal barrier in inflammatory bowel disease World J Gastroenterol. 2014 Feb 7; 20(5): 1165–1179.
10. Ouellette AJ, Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity. Cell Mol Life Sci. 2011 Jul;68(13):2215-29.
11. Moein S et al, MiRNAs and inflammatory bowel disease: An interesting new story. J Cell Physiol. 2018 Nov 11
12. Bel S¹, Hooper LV, Secretory autophagy of lysozyme in Paneth cells. Autophagy. 2018;14(4):719-721.
13. Delorme-Axford E¹, Klionsky DJ, Secretory autophagy holds the key to lysozyme secretion during bacterial infection of the intestine. Autophagy. 2018;14(3):365-367.
14. Guangxi Zhou et al, ASCA, ANCA, ALCA and Many More: Are They Useful in the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease? Dig Dis 2016;34:90–97

15. Shouval DS^{1,2,3}, Rufo PA³ , The Role of Environmental Factors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *JAMA Pediatr.* 2017 Oct 1;171(10):999-1005.
16. Rogler G¹, Vavricka S. Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Feb;21(2):400-8.
17. Sigall-Boneh R et al, Research Gaps in Diet and Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. A Topical Review by D-ECCO Working Group [Dietitians of ECCO]. *J Crohns Colitis.* 2017 Dec 4;11(12):1407-1419.
18. Vibeke Andersen et al, Fibre intake and the development of inflammatory bowel disease: A European prospective multi-centre cohort study (EPIC-IBD) *J Crohns Colitis.* 2018 Jan; 12(2): 129–136.
19. Ayokunle T Abegunde et al, Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review *World J Gastroenterol.* 2016 Jul 21; 22(27): 6296–6317.
20. Xu L et al, Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Nov;46(9):780-789.
21. Card T, Logan RF, Rodrigues LC, et al. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut.* 2004;53:246–250
22. Ungaro R, Bernstein CN, Garry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, Van Kruiningen H, Colombel JF, Atreja A. 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.
23. Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:2394–2400.
24. Bernstein CN, The Brain-Gut Axis and Stress in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017 Dec;46(4):839-846
25. Shu-Ling Wang et al, Impact of Paneth Cell Autophagy on Inflammatory Bowel Disease, *Front Immunol.* 2018; 9: 693.
26. Ferguson LR¹, Barnett MP, Why Are Omics Technologies Important to Understanding the Role of Nutrition in Inflammatory Bowel Diseases? *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 21;17(10).
27. Teodora-Ecaterina M Manuc, et al, Recent insights into the molecular pathogenesis of Crohn's disease: a review of emerging therapeutic targets *Clin Exp Gastroenterol.* 2016; 9: 59–70.

28. Verstockt B et al, Genome-wide association studies in Crohn's disease: Past, present and future. *Clin Transl Immunology*. 2018 Jan 31;7(1):e1001.
29. Shiyuan Wang et al, The Role of Autophagy and Related MicroRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice* Volume 2018, Article ID 7565076, 10 page
30. Johanna Pott and Kevin J. Maloy, Epithelial autophagy controls chronic colitis by reducing TNF-induced apoptosis, *AUTOPHAGY* 2018, Vol. 14, No. 8, 1460–1461
31. Tsuboi K et al, Autophagy Protects against Colitis by the Maintenance of Normal Gut Microflora and Secretion of Mucus. *J Biol Chem*. 2015 Aug 14;290(33):20511-26.
32. Ma X et al, Intestinal Epithelial Cell Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: An Update Review. *Front Immunol*. 2017 Oct 25;8:1271.
33. Song S et al, Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol*. 2017 Nov;232(11):2977-2984.
34. Cheng S et al, Fecal Microbiota Transplantation Beneficially Regulates Intestinal Mucosal Autophagy and Alleviates Gut Barrier Injury. *mSystems*. 2018 Oct 9;3(5). pii: e00137-18.
35. Bo Cao et al, Role of MiRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2017 Jun;62(6):1426-1438.
36. Ignazio Brusca, Chapter One - Overview of Biomarkers for Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease *Advances in Clinical Chemistry* Volume 68, 2015, Pages 1-55
37. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, et al. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Hum Mutat* 2012;33:551–560.
38. CARLOS A. RUBIO Increased Production of Lysozyme Associated with Bacterial Proliferation in Barrett's Esophagitis, Chronic Gastritis, Gluten-induced Atrophic Duodenitis (Celiac Disease), Lymphocytic Colitis, Collagenous Colitis, Ulcerative Colitis and Crohn's Colitis *ANTICANCER RESEARCH* 35: 6365-6372 (2015)
39. Atsushi Nishida et al, Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease *Clinical Journal of Gastroenterology* (2018) 11:1–10
40. Wehkamp J et al, Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Jul;9(4):215-23.
41. Gerolamo Bevivino & Giovanni Monteleone, Advances in understanding the role of cytokines in inflammatory bowel disease *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Sep;12(9):907-915.

42. Seung Hoon Lee et al, Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease *Intest Res* 2018;16(1):26-42
43. Tocchi A, Lepre L, Liotta G, et al. Familial and psychological risk factors of ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 1997;29:395–398.
44. Tao Zuo^{1,2} and Siew C. Ng¹ , The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2247.
45. Sunkara T¹ et al, Fecal microbiota transplant - a new frontier in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res.* 2018 Aug 31;11:321-328.
46. Harris KG¹, Chang EB , The intestinal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: new insights into complex disease. *Clin Sci (Lond).* 2018 Sep 18;132(18):2013-2028.
47. Josephine Ni, et al, Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Oct; 14(10): 573–584.
48. Ganji-Arjenaki M¹, Rafieian-Kopaei M¹. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J Cell Physiol.* 2018 Mar;233(3):2091-2103.
49. Geuking MB¹ et al, The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes.* 2014 May-Jun;5(3):411-8.
50. Chu Y et al, Specific changes of enteric mycobiota and virome in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2018 Jan;19(1):2-7.
51. Mukherjee PK et al, Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015 Feb;12(2):77-87.
52. Gerard R et al, An immunological link between *Candida albicans* colonization and Crohn's disease. *Crit Rev Microbiol.* 2015 Jun;41(2):135-9.
53. Ungaro F et al, Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut Microbes.* 2018 Sep 25:1-10
54. Clayton M Spiceland and Nilesch Lodhia, Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment *World J Gastroenterol.* 2018 Sep 21; 24(35): 4014–4020.
55. Su HJ et al, Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc.* 2018 Jul 24.

56. . Gursimran Kochhar et al. Utility of Biomarkers in the Management of Inflammatory Bowel Disease Curr Treat Options Gastro
57. Guardiola J et al, Recommendations of the Spanish Working Group on Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU) on the utility of the determination of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol. 2018 Oct;41(8):514-529.
58. Wei SC et al, Experience of patients with inflammatory bowel disease in using a home fecal calprotectin test as an objective reported outcome for self-monitoring. Intest Res. 2018 Oct 10.
59. Eustace GJ et al, Therapy for Crohn's Disease: a Review of Recent Developments. Curr Gastroenterol Rep. 2018 Apr 5;20(5):19.
60. Narula N et al, Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2018 Apr 1;4:CD000542.
61. Ministro P¹, Martins D¹ , Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Apr;11(4):317-328.
62. Di Ruscio M et al, Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin?Inflamm Bowel Dis. 2017 Dec 19;24(1):78-92
63. Dai C et al, Fecal markers in the management of inflammatory bowel disease. Postgrad Med. 2018 Sep;130(7):597-606.
64. Rubio CA¹ Increased Production of Lysozyme Associated with Bacterial Proliferation in Barrett's Esophagitis, Chronic Gastritis, Gluten-induced Atrophic Duodenitis (Celiac Disease), Lymphocytic Colitis, Collagenous Colitis, Ulcerative Colitis and Crohn's Colitis. Anticancer Res. 2015 Dec;35(12):6365-72.
65. SonomiHikima et al, Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species Gene Volume 316, 16 October 2003, Pages 187-195
66. Sugi K et al, Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. Am J Gastroenterol. 1996 May;91(5):927-34.
67. Van der Sluys Veer A¹ et al, Fecal lysozyme in assessment of disease activity in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1998 Mar;43(3):590-5.

68. Wang Q et al, Electrophoretic Approach for the Simultaneous Deposition and Functionalization of Reduced Graphene Oxide Nanosheets with Diazonium Compounds: Application for Lysozyme Sensing in Serum ACS Appl Mater Interfaces. 2017 Apr 12;9(14):12823-12831.
69. Rubio CA¹. Lysozyme expression in microscopic colitis. J Clin Pathol. 2011 Jun;64(6):510-5.
70. Sankaran-Walters S et al, Guardians of the Gut: Enteric Defensins. Front Microbiol. 2017 Apr 19;8:647.
71. Cerrillo E et al, Alpha-defensins (α -Defs) in Crohn's disease: decrease of ileal α -Def 5 via permanent methylation and increase in plasma α -Def 1-3 concentrations offering biomarker utility. Clin Exp Immunol. 2018 Apr;192(1):120-128. doi: 10.1111/cei.13085. Epub 2018 Jan 10.
72. Jung Mogg Kim Antimicrobial Proteins in Intestine and Inflammatory Bowel Diseases Intestinal Res. 2014 Jan; 12(1): 20–33
73. Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, Mizuta Y, Nakazato M, et al. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. Inflamm res 2009; 58:192-197
74. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, et al. Human Neutrophil Peptides 1–3 Are Useful Biomarkers in Patients with Active Ulcerative Colitis. Inflamm Bowel Dis 2009; 15:909-917
75. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. PNAS 2005;102(50):18129-18134.
76. Farin H. F., Karthaus W. R., Kujala P., Rakhshandehroo M., Schwank G., Vries R. G., et al. . (2014). Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma. J. Exp. Med. 211, 1393–1405. 10.1084/jem.20130753
77. Wehkamp J et al, Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2005 Sep;2(9):406-15.
78. https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-report/draft-assessment-report-pistacia-lentiscus-l-resin-mastix_en.pdf
79. <https://www.mastishop.com/giati-mastiha/>

80. Paraschos S et al, Chios gum mastic: A review of its biological activities. *Curr Med Chem*. 2012;19(14):2292-302.
81. Dimas KS¹ et al, Review: Chios mastic gum: a plant-produced resin exhibiting numerous diverse pharmaceutical and biomedical properties. *In Vivo*. 2012 Sep-Oct;26(5):777-85.
82. Rahman H et al, Drug-Herb Interactions in the Elderly Patient with IBD: a Growing Concern. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2017 Dec;15(4):618-636
83. Abidi A et al, Protective Effect of Pistacia lentiscus Oil Against Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Oxidative Stress in Rat. *Nutr Cancer*. 2017 Apr;69(3):490-497.
84. Cheraft-Bahloul N et al, Protective Effects of Pistacia lentiscus L. fruit extract against calcium oxalate monohydrate induced proximal tubular injury. *J Ethnopharmacol*. 2017 Sep 14;209:248-254.
85. Papada E et al, Antioxidative Efficacy of a Pistacia Lentiscus Supplement and Its Effect on the Plasma Amino Acid Profile in Inflammatory Bowel Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. 2018 Nov 16;10(11)
86. Hemrika MH, et al, Clinical relevance of lysozyme in the faeces. *Neth J Med*. 1989 Apr;34(3-4):174-81.
87. Dubrow R et al, Fecal lysozyme: an unreliable marker for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 1992 May;87(5):617-21.
88. J Langhorst et al, Activated innate immune system in irritable bowel syndrome? *Gut*. 2007 Sep; 56(9): 1325–1326.
89. Kolho KL et al, Fecal calprotectin, MMP-9, and human beta-defensin-2 levels in pediatric inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2014 Jan;29(1):43-50.
90. Aldhous MC, Noble CL, Satsangi J. Dysregulation of human b-defensin-2 protein in inflammatory bowel disease. *PLoS One*4(7), e6285 (2009).
91. Langhorst J et al, Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2009 Feb;104(2):404-10.