



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

***ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΖΩΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΙΦΝΕ ΣΤΗ ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ
ΚΑΙ ΣΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΤΟΥ TNF-alpha***



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΙΟΣ Γ. ΣΒΩΛΟΣ

A.M.: 20830

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΝΔΡΙΑΝΑ ΚΑΛΙΩΡΑ

ΡΩΞΑΝΗ ΤΕΝΤΑ

ΑΝΤΩΝΙΑ ΧΙΟΥ

-ΑΘΗΝΑ 2012-



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

***ΘΕΜΑ: «ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΖΩΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΙΦΝΕ ΣΤΗ
ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΤΟΥ TNF-alpha»***

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΙΟΣ Γ. ΣΒΩΛΟΣ

A.M.: 20830

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΝΔΡΙΑΝΑ ΚΑΛΙΩΡΑ

ΡΩΞΑΝΗ ΤΕΝΤΑ

ΑΝΤΩΝΙΑ ΧΙΟΥ

-ΑΘΗΝΑ 2012-

*Στους γονείς μου,
Γιώργο και Μαρία*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Λέκτορα κα. Ανδριάννα Καλιώρα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα καθώς η βασική ιδέα της παρούσας έρευνας της ανήκει. Ακόμη την ευχαριστώ για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας, τις γνώσεις που μου μετέδωσε ως καθηγήτριά μου στη διάρκεια της φοίτησής μου και για τη διόρθωση της γραπτής μου εργασίας.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω προσωπικά τη διδάκτορα κα. Αριστέα Γκιοξάρη για την ανεκτίμητη βοήθειά της κάθε φορά που τη χρειάστηκα, για τη συμπαράστασή της και για τις πολύτιμες συμβουλές της σχετικά με τη γραπτή μου εργασία.

Ευχαριστώ τις Επ. Καθηγήτριες Αντωνία Χίου και Ρωζάνη Τέντα για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους αλλά και για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Επιπλέον, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη φαρμακευτική εταιρεία ELPEN για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού και τη φιλοξενία των πειραματόζωνων. Ευχαριστώ τον κ. Απόστολο Παπαλόη, Δρ. Βιολόγο και Διευθυντή του Ερευνητικού τμήματος καθώς και το προσωπικό της εταιρείας για τη μεγάλη βοήθειά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων Καθηγητή κ. Βάιο Καραθάνο και τον επίκουρο καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο συνολικά για τις θεωρητικές και εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέδωσαν στη διάρκεια της φοίτησής μου και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη φιλική διάθεση και τη ζεστή ατμόσφαιρα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Γιώργο και Μαρία, για την υπομονή, την υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (ΙΦΝΕ) χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή του εντέρου και περιλαμβάνουν δύο κλινικές οντότητες άγνωστης αιτιολογίας: τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Η παθογένειά τους θεωρείται συνδυασμός γενετικών, ανοσολογικών, περιβαλλοντικών και ψυχολογικών παραγόντων.

Οι ποικίλες παρενέργειες που εμφανίζονται κατά τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής για τα νοσήματα αυτά έχουν ωθήσει τους ερευνητές στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων με αντιφλεγμονώδη δράση. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η Μαστίχα Χίου είναι ένα προϊόν που δρα θετικά στην κλινική εικόνα της νόσου του Crohn.

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής αποτέλεσε η δοκιμή ανταπόκρισης ζωικού προτύπου ΙΦΝΕ στη μαστίχα Χίου και στο μονοκλωνικό αντίσωμα του TNF-alpha και η σύγκρισή τους.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 32 θηλυκούς επίμυες τύπου Wistar που χωρίστηκαν με τυχαιοποιημένο τρόπο σε 4 ομάδες: (Α) υγιείς μάρτυρες, (Β) πρότυπο χημικής κολίτιδας επαγόμενης με TNBS (ΠΧΚ), (Γ) ΠΧΚ στο οποίο χορηγήθηκε 100mg/Kg ΣΒ μίγματος σκόνης μαστίχας και ινουλίνης (6:4) και (Δ) ΠΧΚ στο οποίο χορηγήθηκαν 5mg/Kg ΣΒ μονοκλωνικού αντισώματος του TNF-alpha, Remicade Infliximab. Το πείραμα διήρκεσε 5 ημέρες. Για την αξιολόγηση και σύγκριση της αποτελεσματικότητας των παραπάνω προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΰδης, της IL-6 και του ICAM-1 στον εντερικό ιστό των πειραματόζωων. Και στις τρεις μετρήσεις διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων τους στον εντερικό ιστό μετά την επίδραση της μαστίχας και της ινφλιξιμάμπης ($p < 0.05$).

Συνολικά, η ινφλιξιμάμπη βρέθηκε αποτελεσματικότερη της μαστίχας. Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική, με εξαίρεση τα επίπεδα του ICAM-1. Η δραστηριότητα της μαστίχας ήταν 53.5% και 54.7%-65.3% αυτής του βιολογικού παράγοντα στους δείκτες οξειδωτικού στρες και στους δείκτες φλεγμονής αντίστοιχα.

.

SUMMARY

Background: Inflammatory Bowel Disease (IBD) is characterized by chronic gastrointestinal inflammation and consists of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Its pathogenesis is considered to be a combination of genetic, immunological, environmental and psychological factors.

The various side effects of medication have intrigued research on the potential anti-inflammatory activity of natural products. Recent data show the beneficial effect of Chios Mastic on clinical indices of Crohn's Disease.

Objective: The purpose of this thesis was to compare the response of experimental TNBS colitis in mastic and anti TNF-alpha treatment.

Methods: The experiment was carried out in 32 female Wistar rats randomly assigned in 4 groups: (A) control, (B) TNBS induced experimental colitis, (C) experimental colitis rats supplemented with 100 mg mixture of mastic powder and inulin/kg BW/day (6:4) (D) experimental colitis rats which received 5 mg anti TNF-alpha agent, infliximab/kg BW/day. Animals were sacrificed after 3 days of treatment. To compare the response of TNBS colitis in mastic and in anti TNF-alpha treatment, MDA, IL-6 and ICAM-1 were measured in intestines applying sandwich ELISA and photometric assays.

Results: A statistically significant decrease was observed in intestinal levels of MDA, IL-6 and ICAM-1 in groups C and D ($p < 0.05$). The tendency that showed that infliximab is more effective than mastic was statistically significant only in the case of ICAM-1.

Conclusion: Overall, the activity of Chios mastic was 53.5% of the regulation in oxidative stress markers and 54.7%-65.3% of the regulation of inflammatory markers compared to infliximab. These results indicate that mastic or individual ingredients might play a critical role as an anti-inflammatory agent in future.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

5-ASA	5-αμινοσαλικυλικό οξύ (5-aminosalicylic acid)
ATI	αντίσωμα στην ινφλιξιμάμπη (antibody to infliximab)
BHT	βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (butylated hydroxytoluene)
BSA	αλβουμίνη ορού (bovine serum albumin)
CD	νόσος του Crohn (Crohn's disease),
CDAI	δείκτης ενεργότητας νόσου Crohn (Crohn's Disease Activity Index)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
DHA	δοκοσαεξανοϊκό οξύ (docosapentaenoic acid)
ELAM-1	ενδοθηλιακό μόριο σύνδεσης λευκοκυττάρων τύπου 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1)
EN	εντερική διατροφή (Enteral nutrition)
EPA	εικοσιπεντανοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid)
IBD	Inflammatory Bowel Disease (Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου)
ICAM-1	διακυτταρικό συνδετικό μόριο τύπου 1 (intracellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	ιντερφερόνη-γ (interferon-gamma)
IGF1	ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας τύπου 1 (insulin-like growth factor 1)
IL-	ιντερλευκίνη- (interleukin-)
ΙΦΝΕ	ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1	Macrophage adhesion ligand-1
Mad-CAM-1	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MDA	μηλονική διαλδεϋδη (malondialdehyde)

MPO	μυελο-υπεροξειδάση (myeloperoxidase)
NF-κB	πυρηνικός παράγοντας-κΒ (nuclear factor kappa beta)
PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffer saline)
p	p-value (επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας)
ΠΧΚ	Πρότυπο Χημικής Κολίτιδας
ROS	ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)
SOD	Superoxide dismutase
TGF-β	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (transforming growth factor beta)
TNBS	2, 4, 6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (trinitrobenzene sulfonic acid)
TNF-α	παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-alpha)
TPN	ολική παρεντερική διατροφή (total parenteral nutrition)
UC	ελκώδης κολίτιδα (ulcerative colitis)
VCAM-1	αγγειακό συνδετικό μόριο τύπου 1 (vascular cell adhesion molecule-1)

Περιεχόμενα	Σελίδα
<u>ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN	13
1.1 Ορισμός	13
1.2 Επιδημιολογία	14
1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες	15
1.4 Εκδηλώσεις-Κλινικά χαρακτηριστικά	18
1.5 Διατροφικά προβλήματα σε ασθενείς με νόσο του Crohn	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ-Α (TNF-α) ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN	21
2.1 Εισαγωγή	21
2.2 TNF-α και οξειδωτικό στρες	21
2.3 TNF-α και φλεγμονή	22
2.4 TNF-α και εντερική διαπερατότητα	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN	26
3.1 Κορτικοστεροειδή	26
3.2 Αμινοσαλικυλικά	27
3.3 Αντιβιοτικά	28
3.4 Ανοσοτροποποιητικά/Ανοσοκατασταλτικά	29
3.5 Κυκλοσπορίνες	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN	32

4.1 Ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΝΕΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝΑΤΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΝ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN	35
5.1 Αντισώματα κατά της IL-6 και της IL-12	35
5.2 Αντισώματα κατά της IFN-γ	36
5.3 Αντισώματα κατά των μορίων προσκόλλησης	36
5.3.1 Natalizumab	36
5.3.2 MLN-02	37
5.3.3 Alicaforfen	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN	39
6.1 Αντιοξειδωτικά	40
6.1.1 Γλουταθειόνη	40
6.1.2 Βιταμίνη Α, C και Ε	41
6.1.3 Χαλκός, Σελήνιο και Ψευδάργυρος	41
6.2 Πρεβιοτικά και Προβιοτικά	42
6.2.1 Προβιοτικά	42
6.2.2 Πρεβιοτικά	43
6.3 Εντερική/Ολική Παρεντερική Διατροφή	44
6.4 Άλλοι φυσικοί παράγοντες	46
6.4.1 Μαστίχα Χίου	46
6.4.2 Ω3 λιπαρά οξέα	46
6.4.3 Έλμινθες	47

<u>ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	48
7.1 Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζων	48
7.2 Πειραματικό ζωικό μοντέλο νόσου του Crohn	48
7.3 Δοκιμή με μαστίχα	50
7.4 Δοκιμή με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του TNF-alpha (ινφλιξιμάμπη)	50
7.5 Πειραματικές ομάδες	51
7.6 Αναισθησία-Ευθανασία	51
7.7 Ομοιογενοποίηση των ιστών	53
7.8 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford σε ιστό	53
7.9 Μέτρηση των επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό	54
7.10 Μέτρηση των επιπέδων Μηλονικής Διαλδεύδης (MDA) σε ιστό	56
7.11 Στατιστική Ανάλυση	57
<u>ΜΕΡΟΣ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
8.1 Το πειραματικό μοντέλο TNBS κολίτιδας	60
8.2 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου του Crohn	60
8.3 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον ιστό εντέρου των πειραματόζων	61
8.3.1 Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου των πειραματόζων	61
8.3.2 Επίπεδα ICAM-1 στον ιστό εντέρου των πειραματόζων	63
8.3.3 Επίπεδα μηλονικής διαλδεύδης (MDA) στον ιστό εντέρου των	65

πειραματόζων	65
8.3.4 Επίπεδα TNF-α στον ιστό εντέρου των πειραματόζων	66
8.3.5 Σύγκριση των ομάδων της μαστίχας και της ινφλιξιμάμπης	67
8.4 Συμπεράσματα	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN

1.1 Ορισμός

Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελούν νοσήματα που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή του εντέρου με περιόδους ύφεσης και έξαρσης (Knigge et al, 2002). Πρόκειται για δύο κλινικές οντότητες άγνωστης αιτιολογίας: τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά αλλά αποτελούν ξεχωριστά νοσήματα τόσο κλινικά όσο και ιστολογικά (Πίνακας 1). Η νόσος του Crohn προσβάλλει χαρακτηριστικά τον τελικό ειλεό και το δεξιό κόλον (Damjanov, 2009). Στο 30% των περιπτώσεων, ο ειλεός είναι το μοναδικό τμήμα του εντέρου που προσβάλλεται, αν και η νόσος μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμα έως τον πρωκτό (McPhee, 2006a). Η προσβολή του εντέρου είναι τμηματική καθώς αφήνει υγιή τμήματα μεταξύ των προσβεβλημένων περιοχών (Damjanov, 2009). Η φλεγμονή της νόσου είναι διατοιχωματική και συχνά επεκτείνεται στον ορογόνο χιτώνα με αποτέλεσμα τη διάτρηση, το σχηματισμό αποστημάτων και συριγγίων (Hedrickson et al, 2002).

Πίνακας 1. Διαφορές μεταξύ ελκώδους κολίτιδας και νόσου του Crohn (Damjanov, 2009)

<u>Χαρακτηριστικό</u>	<u>Ελκώδης Κολίτιδα</u>	<u>Νόσος Crohn</u>
<u>Διάρροια</u>	Αιματηρές	Μη αιματηρές
<u>Κοιλιακό άλγος</u>	Σπάνια, σε πολύ βαριές περιπτώσεις	Συχνό
<u>Εντόπιση/Φλεγμονή</u>	Αριστερό κόλον, κατά συνέχεια ιστού/Περιορίζεται στο βλεννογόνο	Δεξιό κόλον, κατά τόπους με ενδιάμεσες υγιείς περιοχές/Διατοιχωματική
<u>Προσβολή ειλεού</u>	Σπάνια, (παλίνδρομη ειλεΐτιδα – 10%)	Συχνή (80%)
<u>Αυλός</u>	Αύξηση διαμέτρου (διάταση). Μεγάκολο στο 10% (σπάνια επιπλοκή)	Στένωση (σημείο χορδής)
<u>Βλεννογόνος</u>	Εύθρυπτος, επιφανειακές εξελκώσεις	Γραμμοειδείς εξελκώσεις, εικόνα λιθόστρωτου
<u>Κοκκιώματα</u>	Όχι	Ναι (40%)

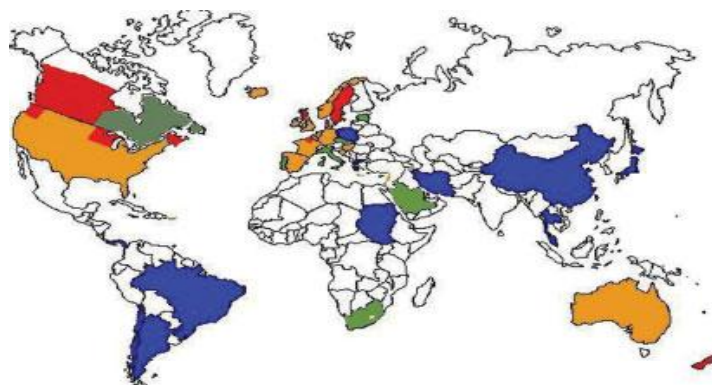
<u>Ορογόνος</u>	Λείος, δεν προσβάλλεται	Φλεγμαίνει
<u>Περιεδρικά Αποστήματα και Εντερικά Συρίγγια</u>	Όχι	Ναι (50%)

1.2 Επιδημιολογία

Η κατανόηση της επιδημιολογίας της νόσου του Crohn είναι πιθανόν να προσφέρει στο μέλλον στοιχεία σχετικά με την αιτιολογία και την παθογένεια της νόσου. Ο ακριβής καθορισμός της δυσχεραίνεται από την καθυστερημένη διάγνωση της νόσου (που συμβαίνει συχνά) και από την περιστασιακή λάθος ταξινόμηση των ασθενών (Binder et al, 2004). Τα νέα δεδομένα δηλώνουν αύξηση της επίπτωσης της νόσου τόσο σε αναπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες (Loftus et al, 2004).

Η νόσος του Crohn εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο ενώ είναι συχνότερη σε ορισμένες περιοχές με ποσοστά επίπτωσης των 4-20/100.000 άτομα ετησίως. Σχεδόν σε όλο τον κόσμο παρατηρούνται τάσεις αύξησης στην επίπτωση της νόσου κάθε χρόνο με την κλίση βορρά-νότου (αυξημένη επίπτωση στις βόρειες χώρες) να συνεχίζει να επικρατεί στην Ευρώπη (Binder et al, 2004). Διαφορετικές περιοχές της Νέας Ζηλανδίας, του Καναδά, της Σκωτίας, της Γαλλίας και της Σκανδιναβίας αποτελούν τις περιοχές με τη μέγιστη επίπτωση της νόσου. Παρότι κοινός παρονομαστής στις περιοχές αυτές είναι η ανάπτυξη και η ευημερία, δεν μπορούν να θεωρηθούν αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου. Η αύξηση της επίπτωσης της νόσου στην Ασία εξακολουθεί να είναι μικρή και πιθανά αντικατοπτρίζει τη μειωμένη διαγνωστική ικανότητα των τοπικών συστημάτων υγείας (Economou et al, 2008).

Η μέγιστη επίπτωση της νόσου απαντά στον Καναδά όπου σε κάποιες περιοχές αγγίζει το 20.2/100.000 άτομα. Ακολουθούν η Νέα Ζηλανδία, η Σκωτία και η Αγγλία/Ουαλία με 16.5, 11.7 και 5.9-11.1 περιπτώσεις/100.000 αντίστοιχα. Η τιμή αυτή για χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Δανία και η Σουηδία κυμαίνεται από 7-8.9/100.000 (Economou et al, 2008, Fedorak et al, 2008).



Εικόνα 1. Ο παγκόσμιος χάρτης της νόσου του Crohn (το κόκκινο αναφέρεται σε επίπτωση που ξεπερνά το $7/10^5$, το πορτοκαλί σε επίπτωση ίση με $4-7/10^5$, το πράσινο σε επίπτωση ίση με $1-4/10^5$ και το μπλε σε επίπτωση ίση με $<1/10^5$. Η απουσία χρώματος δηλώνει απουσία δεδομένων (Economou et al, 2008).

1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες

Η παθογένεια της νόσου του Crohn θεωρείται πως περιλαμβάνει διαταραχές και τροποποίηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος στον εντερικό βλεννογόνο. Η τροποποίηση αυτή οδηγεί σε βλάβες στα επιθηλιακά κύτταρα που ευθύνονται στα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, στα μακροφάγα και στα μονοκύτταρα. Ακόμη, υπάρχουν πολλές ενδείξεις για τον κρίσιμο ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας στην παθογένεια των ΙΦΝΕ (Ioannidis et al, 2011). Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της παθογένειας της νόσου του Crohn οδηγούνται στο συμπέρασμα πως μια ανεξέλεγκτη ανοσολογική απάντηση στον εντερικό αυλό οδηγεί στη φλεγμονή. Η ανεξέλεγκτη αυτή απάντηση θεωρείται αποτέλεσμα συνδυασμού **γενετικών, ανοσολογικών, περιβαλλοντικών και ψυχολογικών παραγόντων** (Neuman et al, 2007). Παρ' όλα αυτά οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση του βλεννογόνου και οδηγούν στη νόσο δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί.

Γενετικοί παράγοντες: Η εφαρμογή των μεθόδων της γενετικής και της γονιδιωματικής στη μελέτη της νόσου του Crohn οδήγησε σε μια σειρά από θεαματικά ευρήματα. Ο εντοπισμός συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένειά της θέτει μια νέα πρόκληση για την κατανόηση της αιτιολογικής αυτής νόσου. Οι γενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στοχεύουν στην εύρεση των περιοχών και ειδικότερα των γονιδίων που σχετίζονται με μη τυχαίο τρόπο με την εμφάνιση της νόσου. Έως σήμερα έχει γίνει αναφορά σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων στο πλαίσιο των μελετών που αφορούν τα ΙΦΝΕ. Τρία από αυτά συνδέονται ειδικά με

τη νόσο του Crohn: NOD2, ATG16L1 και IRGM (Behr, 2010, Heap et al, 2009). Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια που έχουν εξετασθεί (όπως PTPN22, ITLN1, IL12B, CDKAL1, CCR6, JAK2, C11 και MUC19) απαιτείται περαιτέρω μελέτη σχετικά με το αν τελικά συσχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου ή όχι (Vavrika et al, 2009).

Το γονίδιο NOD2 εκφράζεται στα μακροφάγα και είναι το πρώτο που συσχετίστηκε με τη νόσο. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μεταλλάξεις του NOD2 συμβάλλουν στην απώλεια του ελέγχου της ομοιόστασης στον εντερικό βλεννογόνο δεν έχουν περιγραφεί πλήρως. Έχει βρεθεί πως η IL-10 διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ανοσολογικής ισορροπίας στον γαστρεντερικό σωλήνα, ωστόσο είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν και άλλες, άγνωστες προς το παρόν, επιπτώσεις των μεταλλάξεων του NOD2. Το 30-50% των ασθενών με νόσο του Crohn στο δυτικό ημισφαίριο έχουν τη μετάλλαξη του NOD2 ενώ έχει βρεθεί πως τα άτομα με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα έχουν 20-40 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο (Hugot et al, 2001, Yamamoto et al, 2009). Τα γονίδια ATG16L1 και IRGM έχουν συσχετιστεί με την ηλικία έναρξης της νόσου, τη συριγγοποιό νόσο, δηλαδή την ύπαρξη συριγγίων ή όχι και την ύπαρξη βλαβών στον ειλέο του εντέρου (Tsianos et al, 2012).

Η συσχέτιση της εμφάνισης της νόσου με τη γενετική προδιάθεση γίνεται φανερή και από το γεγονός πως οι συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με νόσο του Crohn έχουν 12-15 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο σε σχέση με άτομα του γενικού πληθυσμού που έχουν την ίδια ηλικία. Ωστόσο καλό θα είναι να λαμβάνεται υπόψη και η επίδραση της έκθεσης σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για τη νόσο στα άτομα που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται όλο και περισσότερες μελέτες με μονοζυγωτικούς διδύμους με στόχο τον πλήρη προσδιορισμό της γενετικής αιτιολογίας της νόσου (Tsianos et al, 2012).

Ανοσολογικοί παράγοντες: Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου διατηρεί μια σταθερή και ελεγχόμενη κατάσταση φλεγμονής. Μελέτες δείχνουν πως η απώλεια του ελέγχου της παραπάνω κατάστασης αποτελεί σημαντικό μηχανισμό της ανοσοπαθογένειας της νόσου του Crohn. Εξάγεται, λοιπόν, το συμπέρασμα πως η εκδήλωση της νόσου είναι μια ανεξέλεγκτη ανοσολογική απόκριση σε συστατικά της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντερικού αυλού η οποία οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή του εντέρου και συμβαίνει σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Η «ακατάλληλη» αυτή απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος αποδίδεται σε ελαττώματα στον επιθηλιακό φραγμό, στη φυσική αλλά και την επίκτητη ανοσία (Shih et al, 2008, Torres et al, 2008).

Τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα είναι σημαντικοί παράγοντες ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και καταστέλλουν την ανεπιθύμητη φλεγμονώδη αντίδραση όπως αυτή σε αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού ή σε ενδογενή εντερικά βακτήρια. Στα άτομα που πάσχουν από νόσο του Crohn η ρυθμιστική ικανότητα των κυττάρων αυτών είναι ανεπαρκής. Τα κύτταρα αυτά στη συγκεκριμένη νόσο παράγουν κυρίως ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και ιντερλευκίνη 23 (IL-23) (Huibregtse et al, 2006).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Η ραγδαία αύξηση στην εμφάνιση της νόσου του Crohn τις τελευταίες δεκαετίες δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο από μεταβολές στο γενετικό υπόβαθρο συγκεκριμένων πληθυσμών. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητή η ύπαρξη ισχυρών περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου. Ευρωπαϊκές μελέτες που έχουν αξιολογήσει την επίπτωση της νόσου σε πληθυσμούς που έχουν μεταναστεύσει από περιοχές με χαμηλά ποσοστά της νόσου, έδειξαν πως οι μετανάστες παρουσιάζουν παρόμοιο ή μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο του Crohn με το γηγενή πληθυσμό. Τα αποτελέσματα αυτά συντείνουν στην απόδοση της εμφάνισης της νόσου σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και στο τρόπο ζωής (Nunes et al, 2011).

Η «υπόθεση υγιεινής» έχει προταθεί ως η πιθανή αιτία της μετάβασης από λοιμώδη σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα και υποθέτει πως η μετάβαση αυτή ευθύνεται στην ριζική αλλαγή από την χαμηλή στην υψηλή μικροβιακή έκθεση. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή η σχετική έλλειψη μικροβιακών αντιγόνων στα πρώτα χρόνια της ζωής πιθανόν να οδηγεί σε ένα αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα που δεν είναι σε θέση να χειριστεί σωστά λοιμώδεις παράγοντες. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται μια αναποτελεσματική απάντηση που παρατείνεται λόγω της ανικανότητάς της να εξαλείψει τους μικροβιακούς παράγοντες. Στην κατάσταση έλλειψης μικροβιακών αντιγόνων μπορούν να ενταχθούν η καλύτερη στέγαση, τα ασφαλέστερα τρόφιμα και νερό, οι βελτιωμένες συνθήκες υγιεινής, τα εμβόλια, η ευρεία χρήση αντιβιοτικών και η επιλεκτική διατροφή. Οι παράγοντες αυτοί έχουν μειώσει σημαντικά τις μολυσματικές ασθένειες, παράλληλα όμως πιθανολογείται η συμβολή τους στην αύξηση των αλλεργικών και αυτοάνοσων νοσημάτων (Danese et al, 2006).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου του Crohn είναι το κάπνισμα, η διατροφή, η λήψη φαρμάκων, η κοινωνική θέση, η εντερική χλωρίδα και η σκωληκοειδεκτομή. Ανάμεσά τους το κάπνισμα είναι το ισχυρότερο παράδειγμα αφού έχει φανεί πως, εκτός από παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, αυξάνει τη συχνότητα των υποτροπών, αυξάνει την πιθανότητα χειρουργικής επέμβασης και η διακοπή του βελτιώνει

την πορεία της νόσου (Nos et al, 2011). Άλλοι παράγοντες είναι η από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Μελέτες έχουν δείξει πως υπάρχει σαφής σύνδεση της λήψης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με τα ΙΦΝΕ και πως οι ασθενείς σε κλινική ύφεση έχουν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής εάν τα χρησιμοποιούν (Danese et al, 2006 και Kaser et al, 2010).

Ψυχολογικοί παράγοντες: Η νόσος του Crohn αρχικά θεωρήθηκε ένα ψυχοσωματικό νόσημα στο οποίο οι ψυχολογικοί παράγοντες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, η αύξηση της γνώσης γύρω από τους γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ανοσολογικούς παράγοντες της νόσου οδήγησε στη μείωση της βαρύτητας της ψυχολογικής πίεσης ως αιτία της νόσου. Πράγματι το άγχος απορρίπτεται ως αιτιολογικός παράγοντας από πολλούς ερευνητές καθώς πρόκειται για μια υποκειμενική παράμετρο. Τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη συμβολή της ψυχολογικής πίεσης στην αύξηση του κινδύνου υποτροπής της νόσου. Ακόμη, εργαστηριακές έρευνες έχουν υποδείξει πλήθος πιθανών μηχανισμών με τους οποίους το ψυχολογικό στρες μπορεί να επηρεάσει το γαστρεντερικό ανοσοποιητικό σύστημα και τη φλεγμονώδη απάντησή του (Mawdsley et al, 2005).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιου μηχανισμού αποτελούν οι κλινικές μελέτες που έδειξαν πως ασθενείς με κατάθλιψη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα c-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ορού (Danner et al, 2003) και πως στο αίμα φοιτητών ιατρικής παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές TNF- α , IFN- γ και IL-6 μία ημέρα πριν την εξέταση ενός μαθήματος σε σχέση με αρκετές εβδομάδες μετά την εξέταση (Maes et al, 1998).

1.4 Εκδηλώσεις-Κλινικά χαρακτηριστικά

Η νόσος του Crohn έχει τόσο εντερικές όσο και εξωεντερικές εκδηλώσεις. Όσον αφορά τις εντερικές εκδηλώσεις της νόσου εξαρτώνται από τη θέση, την έκταση και τη σοβαρότητα της προσβολής. Στην ειλεοκολική νόσο παρατηρείται μεταγευματικός κοιλιακός πόνος, ψηλαφητή φλεγμονώδης μάζα και ευαισθησία στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο. Στη γαστροδωδεκαδακτυλική νόσο παρατηρείται ναυτία, έμετος, κοιλιακός πόνος, δυσφαγία και πρώιμος κορεσμός. Η καθυστερημένη γαστρική εκκένωση και ο μεταγευματικός πόνος, όπως και οι περισσότερες εντερικές εκδηλώσεις της νόσου, οδηγούν σε μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη, γεγονός που αναλύεται στην επόμενη ενότητα. Όταν η προσβολή αφορά μεγάλο τμήμα του λεπτού εντέρου εκτός από τα παραπάνω παρουσιάζεται ανορεξία, πιθανή δυσανοχή στη λακτόζη και απώλεια βάρους. Όταν η προσβολή περιορίζεται στο κόλον παρατηρείται βλεννοαιματηρή διάρροια,

κοιλιακές συσπάσεις και πόνος που υποχωρούν μετά την κένωση. Όταν η νόσος προσβάλλει τον πρωκτό εμφανίζονται περιπρωκτικά συρίγγια, αποστήματα και ραγάδες του δακτυλίου. Τέλος, σε έναν ασθενή με νόσο του Crohn μπορεί να εμφανιστεί τοπική στένωση σε κάποιο σημείο του εντέρου και κατ' επέκταση μερική ή ολική απόφραξη (Hendrickson et al, 2002, Pulimood et al, 2011, Sawczenko et al, 2003).

Συχνές εξωεντερικές εκδηλώσεις της νόσου του Crohn αποτελούν η καθυστερημένη ανάπτυξη και σεξουαλική ωρίμανση στους παιδιατρικούς ασθενείς, ο πυρετός, οι αρθραλγίες και οι αρθρίτιδες. Άλλες εκδηλώσεις που σχετίζονται με το μυοσκελετικό σύστημα είναι η οστεοπόρωση, η οστεοπενία, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και η αξονική αρθροπάθεια. Δερματολογικά η νόσος μπορεί να προκαλέσει οξώδες ερύθημα, αφθώδη έλκη στη στοματική κοιλότητα και στοματίτιδα, σύνδρομο sweet και γαγγραινώδες πυόδερμα. Όσον αφορά τη λειτουργία των οφθαλμών ένας ασθενής με νόσο του Crohn μπορεί να εμφανίσει οφθαλμολογικές παθήσεις όπως η επισκληρίτιδα και η ιρίτιδα ενώ σχετικά με την ηπατοχολική λειτουργία λιπώδη διήθηση του ήπατος, χολολιθίαση και πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα. Τέλος, σπανιότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις είναι η παγκρεατίτιδα, η νεφρολιθίαση, η χρόνια βρογχίτιδα, η υπερομοκυστεϊναιμία και η αμυλοείδωση (Danese et al, 2005, Hendrickson et al, 2002, Larsen et al, 2010).

1.5 Διατροφικά προβλήματα σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Crohn

Πέρα από τις γαστρεντερικές διαταραχές η φυσική ιστορία της νόσου του Crohn περιλαμβάνει συχνά και εξωεντερικές επιπλοκές. Μεταξύ αυτών εντοπίζονται και προβλήματα που σχετίζονται με τη θρέψη των ασθενών. Πολύ συχνά είναι αναγκαία η παρέμβαση του ιατρού ή του διαιτολόγου για τη διόρθωση αυτών των προβλημάτων μέσω διαιτητικών συμβουλών, χορήγησης διατροφικών συμπληρωμάτων, εφαρμογής εντερικής ή/και παρεντερικής σίτισης (Kleinman et al, 2004).

Ο υποσιτισμός στη νόσο του Crohn μπορεί να συμβεί σε όλες του τις μορφές και να επηρεάσει την κλινική κατάσταση, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, την ανάπτυξη, την υγεία των οστών και γενικότερα την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Ο πρωτεϊνοθερμιδικός υποσιτισμός, οι ελλείψεις μικροθρεπτικών συστατικών και η κακή υγεία των οστών είναι συχνά αναφερόμενες επιπλοκές της νόσου ενώ σε παιδιατρικούς ασθενείς παρουσιάζεται επιπλέον ανεπαρκής ανάπτυξη και καθυστέρηση της εφηβείας. Οι

κύριοι συντελεστές όλων των παραπάνω επιπλοκών της νόσου είναι τόσο η μειωμένη πρόσληψη ενέργειας και μικροθρεπτικών συστατικών όσο και οι αυξημένες απώλειες (Gerasimidis et al, 2011).

Πίνακας 2. Αιτίες υποσιτισμού σε ασθενείς με νόσο του Crohn (Gerasimidis et al, 2011)

<u>Παράγοντας υποσιτισμού</u>	<u>Αιτιολογία</u>
<u>Μειωμένη πρόσληψη</u>	Μειωμένη όρεξη Φόβος για επιδείνωση των συμπτωμάτων
<u>Μειωμένη απορρόφηση</u>	Φλεγμονή του βλεννογόνου Εγχειρίσεις εντέρου
<u>Αυξημένες απώλειες</u>	Διάρροια-Στεατώρροια Εντερική αιμορραγία Ύπαρξη συριγγίων
<u>Αυξημένες ανάγκες</u>	Αυξημένες μεταβολικές ανάγκες Αυξημένη κατανάλωση αντιοξειδωτικών Πυρετός Τροποποιημένη οξείδωση λίπους και μυών
<u>Αλληλεπιδράσεις θρεπτικών συστατικών και φαρμάκων</u>	Στεροειδή-αναστολή του IGF1 Στεροειδή-μειωμένη εναπόθεση ασβεστίου στα οστά Μεθοτρεξάτη-διαταραγμένος μεταβολισμός φυλλικού οξέος Σουλφασαλαζίνη-παρεμπόδιση απορρόφησης φυλλικού οξέος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ-Α (TNF-α) ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN

2.1 Εισαγωγή

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) ανακαλύφθηκε το 1975 ως μια γλυκοπρωτεΐνη που είχε την ικανότητα να προκαλεί αιμορραγική νέκρωση των σαρκωμάτων που είχαν μεταμοσχευθεί σε ποντίκια. Έτσι ο TNF-α συσχετίστηκε με την νέκρωση των καρκινικών κυττάρων. Ο ανθρώπινος TNF-α κλωνοποιήθηκε το 1985 και έκτοτε έχει διερευνηθεί η εμπλοκή του σε ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών, λοιμωδών και καρκινικών καταστάσεων (Bradley et al, 2008).

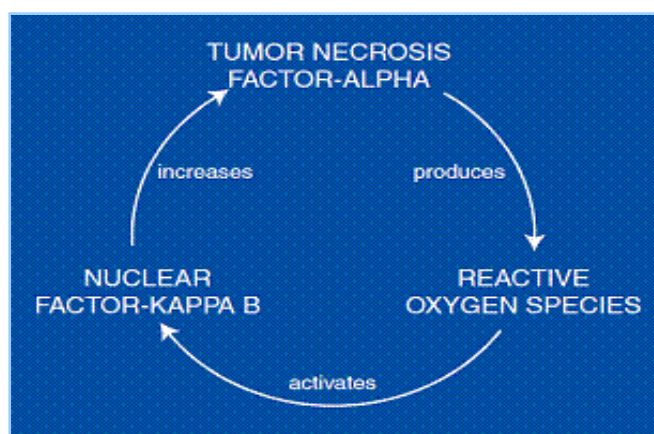
Έχει αποδειχθεί πως ο TNF-α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της φλεγμονής στη νόσο του Crohn αλλά και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα επίπεδά του στον εντερικό ιστό, στον ορό αλλά και στα κόπρανα των ατόμων που πάσχουν από νόσο του Crohn είναι σημαντικά αυξημένα (Ma et al, 2005). Η συλλογή κοπράνων από παιδιά με ενεργή νόσο, με νόσο σε ύφεση αλλά και από υγιή παιδιά (ομάδα ελέγχου) έδειξε πως η συγκέντρωση του TNF-α στα κόπρανα των ασθενών που βρίσκονται σε έξαρση είναι ιδιαίτερα αυξημένη (Nicholls et al, 1993). Ο κεντρικός ρόλος του TNF-α στην παθογένεση της νόσου του Crohn ενδυναμώνεται από τις κλινικές μελέτες που δείχνουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης των αντί-TNF-α βιολογικών παραγόντων στη θεραπεία των συμπτωμάτων της οξείας νόσου. Οι προτεινόμενες προφλεγμονώδεις δράσεις του TNF-α περιλαμβάνουν τη διέγερση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, μακροφάγων, την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, την ενεργοποίηση της απάντησης οξείας φάσης και την διέγερση των μεταλλοπρωτεϊνών και της σύνθεσης του κολλαγόνου (Ma et al, 2004).

2.2 TNF-α και οξειδωτικό στρες

Πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στη νόσο του Crohn και την επίδραση του TNF-α στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια που παραμένουν ανεξάρτητα για μικρό χρονικό διάστημα. Όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις βλάπτουν μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες και το DNA.

Στον εντερικό βλεννογόνο των ατόμων που πάσχουν από νόσο του Crohn παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Ακόμη στον εντερικό ιστό ατόμων με ΙΦΝΕ έχουν ανιχνευθεί αυξημένα επίπεδα προϊόντων οξείδωσης DNA και πρωτεϊνών και μειωμένα επίπεδα χαλκού και ψευδαργύρου. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα πως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στις πρωτεΐνες του εντερικού βλεννογόνου των ατόμων με νόσο του Crohn.

Η θεωρία που έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές και συνδέει το οξειδωτικό στρες με τον TNF-α αναφέρει πως οι ROS ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος ακολούθως αυξάνει την παραγωγή του TNF-α. Ο TNF-α με τη σειρά του παράγει ROS και έτσι κλίνει ο φαύλος κύκλος που απεικονίζεται στο σχήμα 1 (Head et al, 2003, Head et al, 2004).



Σχήμα 1. Ο πιθανός ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στη φλεγμονή (Head et al, 2003)

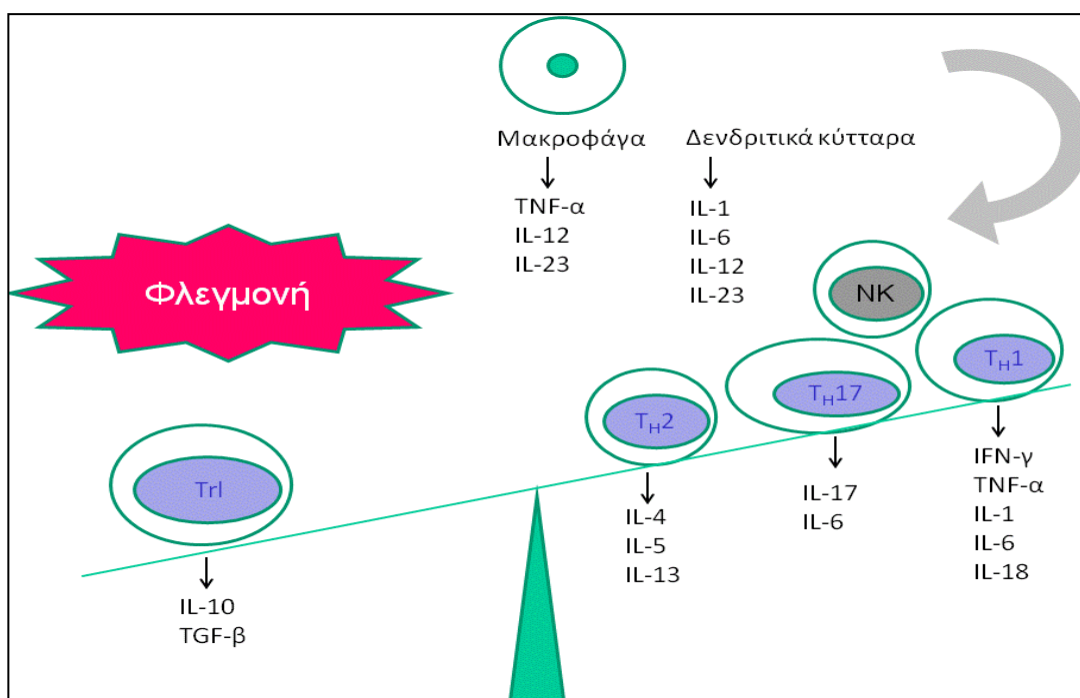
2.3 TNF-α και φλεγμονή

Η νόσος του Crohn είναι το αποτέλεσμα της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί σε ανισορροπία προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων και κατ' επέκταση σε φλεγμονή (Viscido et al, 2005). Στη διαδικασία δημιουργίας της τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αναγνωρίζουν ενδογενείς μικροοργανισμούς (φυσιολογική μικροχλωρίδα) ή ουσίες, αντιδρούν και παράγονται κυτταροκίνες, προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Bouma et al, 2003).

Η φλεγμονή είναι η ταχύτατη προσαρμογή της ομοιοστασίας που εκφράζεται με αλλαγές στη σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος σαν απόκριση σε κάποιο βλαπτικό ερέθισμα όπως λοίμωξη, κάκωση ιστών ή νεοπλασία. Αποτελεί μια μορφή φυσικής ανοσίας που ονομάζεται και

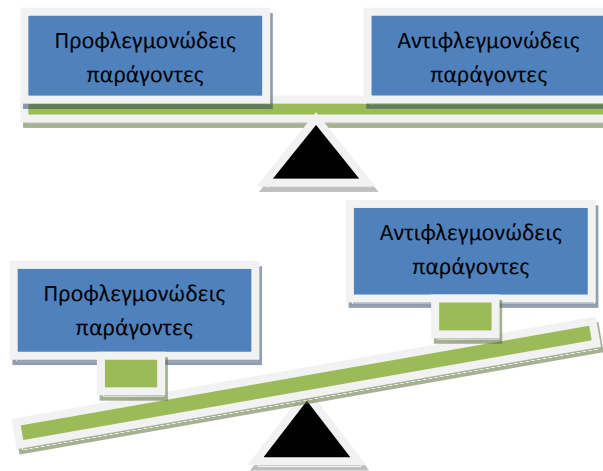
απόκριση οξείας φάσης. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές μιας σειράς εργαστηριακών παραμέτρων όπως η ταχύτητα καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η αύξηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και από ερυθρότητα, θερμότητα και οίδημα στη θέση επίδρασης του αντιγόνου (McPhee, 2006).

Αρχικά, τα CD4⁺ και CD8⁺ κυτταροτοξικά εντοπίζουν κάποιο αντιγόνο στον εντερικό βλεννογόνο, αντιδρούν και τα CD4⁺ κύτταρα διαφοροποιούνται σε T-βοηθητικά κύτταρα τα οποία εκφράζουν κυτταροκίνες. Τα τελευταία διαφοροποιούνται περαιτέρω σε βοηθητικά κύτταρα T_H1, T_H2 και T_H3. Τα T_H1 εκκρίνουν τους παράγοντες IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF-α και IFN-γ, τα T_H2 εκκρίνουν τους παράγοντες IL-4, IL-5 και IL-13 που είναι προφλεγμονώδεις. Αντίθετα, τα T_H3 εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και συγκεκριμένα IL-10 και TGF-β. Συνεπώς, τα T_H1 και T_H2 προάγουν τη φλεγμονή και τα T_H3 την αναστέλλουν.



Σχήμα 2. Διαφοροποίηση των T-κυττάρων και έκφραση των κυτταροκινών
(Sanchez-Muñoz et al, 2006)

Κατά τη φυσιολογική ανοσολογική απόκριση στον ανθρώπινο οργανισμό η ύπαρξη ή όχι φλεγμονής ρυθμίζεται από την ισορροπία των προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων και κατ' επέκταση των βοηθητικών και ρυθμιστικών T-κυττάρων. Έτσι όταν υπάρχει υπερέκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων διαταράσσεται αυτή η ισορροπία και η φλεγμονή γίνεται ανεξέλεγκτη. Αυτός είναι ο μηχανισμός που ακολουθείται στη νόσο του Crohn αφού εντοπίζεται υπερλειτουργία των T_H1 κυττάρων (Bouma et al, 2003, Korzenic et al, 2006).



Σχήμα 3. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων στη νόσο του Crohn.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως κατά τη φλεγμονή εκκρίνεται ο TNF-α. Παράγεται από τα μονοκύτταρα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα και έχει ως κύτταρα στόχο τα ουδετερόφιλα, τα B και T-λεμφοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων όπως η IL-6 και αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσης συμβάλλοντας καταλυτικά στη δημιουργία φλεγμονής (Sanchez-Munoz et al, 2008).

Τέλος, ο TNF-α προωθεί την έκφραση ενός αριθμού συνδετικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέτοια μόρια είναι το ενδοθηλιακό μόριο σύνδεσης των λευκοκυττάρων τύπου 1 (ELAM-1), το διακυτταρικό συνδετικό μόριο 1 (ICAM-1), το αγγειακό συνδετικό μόριο 1 (VCAM-1), οι σελεκτίνες και οι ιντεγκρίνες (Viscido et al, 2005).

2.4 TNF-α και εντερική διαπερατότητα στη νόσο του Crohn

Εκτός από την ανοσορυθμιστική δράση ο TNF-α επιδρά στην παθογένεση της νόσου του Crohn μέσω της διαταραχής του φραγμού του εντερικού επιθηλίου. Προκαλεί αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, επιτρέποντας τη διαπερατότητα των τοξικών αντιγόνων του αυλού και συμβάλλοντας στην εντερική φλεγμονή. Έχει διαπιστωθεί πως οι ασθενείς με νόσο του Crohn που λαμβάνουν θεραπεία με αντισώματα του TNF-α είχαν σημαντική μείωση στην εντερική διαπερατότητα μετά τη θεραπεία. Ακόμη έχει βρεθεί πως η ολική παρεντερική διατροφή, η στοιχειακή δίαιτα και η λήψη αντιβιοτικών είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία της νόσου μέσω της μείωσης του αντιγονικού φορτίου του εντερικού αυλού. Τα παραπάνω ενδυναμώνονται από

το γεγονός πως το επίπεδο της εντερικής διαπερατότητας σε ασθενείς με νόσο του Crohn επιδρά στην ανταπόκριση της νόσου στην εκάστοτε φαρμακευτική αγωγή αλλά και στην υποτροπή μετά τη θεραπεία (Ma et al, 2004, Mankertz et al, 2007, Weber et al, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN

Η νόσος του Crohn είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή άγνωστης αιτιολογίας. Η εξαιρετική πρόοδος που έχει γίνει τα τελευταία χρόνια ως προς την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της οδήγησε στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών. Πλήθος ερευνών έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια με στόχο την εύρεση νέων θεραπειών για τη νόσο, ωστόσο πολλά φάρμακα δεν έχουν εγκριθεί λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας ή λόγω των σοβαρών παρενεργειών τους. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια και συνεχίζουν να αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της διαχείρισης των ασθενών με νόσο του Crohn είναι τα κορτικοστεροειδή, τα αμινοσαλικυλικά, τα αντιβιοτικά, τα ανοσοκατασταλτικά και οι κυκλοσπορίνες (Gionchetti et al, 2006).

Ο στόχος της εκάστοτε θεραπείας στη νόσο του Crohn είναι η επίτευξη και η διατήρηση της ύφεσης. Η σύγχρονη προσέγγιση είναι επιθετική, προτείνει τη χρήση ισχυρότερων θεραπειών μόνο όταν οι ηπιότερες αποτυγχάνουν και πέρα από την εισαγωγή βιολογικών θεραπειών περιλαμβάνει την βελτίωση των παλαιότερων (Pithadia et al, 2011).

3.1 Κορτικοστεροειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (υδροκορτιζόνη και πρενδιζολόνη) αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα για την πρόκληση ύφεσης στα ΙΦΝΕ. Αυτό που προτιμάται είναι η πρενδιζολόνη και χορηγείται από το στόμα, το ορθό ή ενδοφλέβια σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης (Pithadia et al, 2011). Η ενδοφλέβια χορήγησή της χρησιμοποιείται συχνά όταν η από του στόματος θεραπεία δεν είναι αποτελεσματική, ωστόσο τα πλεονεκτήματά της κατά την οξεία φάση της νόσου παραμένουν ασαφή (Gionchetti et al, 2011). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με μεσαλαζίνη. Η ανταπόκριση των ασθενών με νόσο του Crohn στα συγκεκριμένα φάρμακα οδηγεί στην κατηγοριοποίησή τους σε τρεις ομάδες: αυτούς που ανταποκρίνονται (περίπου 30-40% των ασθενών), σε αυτούς που ανταποκρίνονται το πρώτο διάστημα της χορήγησης και στη συνέχεια η νόσος τους γίνεται ανθεκτική σε αυτά (περίπου 30-40% των ασθενών) και αυτούς που δεν ανταποκρίνονται καθόλου (περίπου 15-20% των ασθενών). Η αδυναμία ενός ασθενή να ανταποκριθεί στα κορτικοστεροειδή και η υποτροπή της νόσου παρά τη λήψη τους οδηγεί την ιατρική ομάδα να στραφεί προς εναλλακτικές θεραπείες που περιλαμβάνουν βιολογικούς παράγοντες και ανοσοκατασταλτικά.

Σε αντίθεση με την εξαιρετική ικανότητα που έχουν να προκαλούν ύφεση της νόσου, τα κορτικοστεροειδή δεν είναι αποτελεσματικά στη διατήρηση της ύφεσης (Pithadia et al, 2011). Κλινικές δοκιμές έδειξαν πως η λήψη τους δεν είναι αποτελεσματική για τη διατήρηση της ύφεσης για περισσότερο από 6 μήνες και πως δεν έχουν προστατευτικό ρόλο στο ενδεχόμενο μετεγχειρητικής υποτροπής της νόσου (Akobeng et al, 2007, Borowiec et al, 2011).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία τάση προς τον περιορισμό του διαστήματος και της δόσης κορτικοστεροειδών που χορηγούνται σε ασθενείς με νόσο του Crohn και αυτό λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους. Τα οφέλη της χορήγησής τους θα πρέπει πάντα να αξιολογούνται με γνώμονα τις παρενέργειες αυτές. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας ασθενών με ενεργή νόσο παρατηρήθηκαν έντονες παρενέργειες στο 55% των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 40 mg πρεδνιζολόνη/ημέρα και στο 33% των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με 9 mg βουδεσονίδη/ημέρα. Η εμφάνιση και η σοβαρότητα των περισσότερων ανεπιθύμητων ενεργειών εξαρτάται από την δόση και τη διάρκεια της θεραπείας, με τη συχνότητά τους να αυξάνεται μετά από 2-3 εβδομάδες χορήγησης. Περιλαμβάνουν δερματολογικές επιπτώσεις όπως ακμή, ψυχολογικές επιπτώσεις όπως αϋπνία και διαταραχές της διάθεσης, οφθαλμολογικές επιπτώσεις όπως καταρράκτης και γλαύκωμα και σοβαρές μεταβολικές επιπτώσεις όπως αρτηριακή υπέρταση, ινσουλινοαντίσταση, υπεργλυκαιμία, επίδραση στο μεταβολισμό των οστών, λοιμώξεις και μειωμένη ανάπτυξη. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί πως και η φλεγμονή επιδρά αρνητικά σε όλες τις παραπάνω φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και κατά συνέπεια η επαγωγή της ύφεσης μέσω σύντομης χρήσης κορτικοστεροειδών έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία (Irving et al, 2007).

3.2 Αμινοσαλικυλικά

Τα αμινοσαλικυλικά (σουλφασαλαζίνη, μεσαλαζίνη) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή για την επίτευξη και τη διατήρηση της ύφεσης στα ΙΦΝΕ. Η έως τώρα θεραπεία πρώτης γραμμής για την ήπια έως μέτρια ελκώδη κολίτιδα περιλαμβάνει μεσαλαζίνη (5-αμινοσαλικυλικό οξύ ή 5-ASA). Το παλαιότερο φάρμακο αυτής της κατηγορίας είναι η σουλφασαλαζίνη. Η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αυτών στη νόσο του Crohn είναι λιγότερο εντυπωσιακή. Η σουλφασαλαζίνη στην περίπτωση αυτή έχει αντικατασταθεί από άλλα φάρμακα όπως η μεσαλαζίνη, η ολσαλαζίνη και η βαλσαλαζίδη. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως τα δύο τελευταία φάρμακα είναι αποτελεσματικά στην επαγωγή της ύφεσης σε ασθενείς με νόσο του Crohn αν και απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις από αυτές που συνήθως

χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Στην υπόθεση σχετικά με τον τρόπο δράσης των φαρμάκων αυτών περιλαμβάνεται η αναστολή του NF-κΒ, του TNF-α και της IL-1 (Pithadia et al, 2011).

Ο ρόλος των φαρμάκων αυτών στη θεραπεία συντήρησης για τη νόσο του Crohn είναι αμφιλεγόμενος και δεν υπάρχει σαφές όφελος από τη συνέχιση της λήψης του μετά την επίτευξη της ύφεσης (Pithadia et al, 2011). Εξίσου αμφιλεγόμενα είναι τα στοιχεία γύρω από την υπόθεση πως τα συγκεκριμένα φάρμακα έχουν προστατευτική δράση για την καρκινογένεση που σχετίζεται με τα ΙΦΝΕ. Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως θεραπεία με 5-ASA για δύο χρόνια σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης αδενοκαρκινώματος σε ασθενείς με νόσο του Crohn (Akobeng et al, 2007).

Ιδιαίτερα αποτελεσματική είναι η τοπική θεραπεία με μεσαλαζίνη σε μορφή υπόθετου και κλύσματος στην έντονη φλεγμονή του πρωκτού, με ποσοστά ανταπόκρισης 75-90% (Pithadia et al, 2011).

Τα αμινοσαλικυλικά προκαλούν παρενέργειες στο 10-45% των ασθενών που τα λαμβάνει. Οι ανεπιθύμητες αυτές ενέργειες όπως ο πονοκέφαλος, η δυσπεψία, η ναυτία και το αίσθημα κόπωσης είναι δοσοεξαρτώμενες και μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με τη λήψη του φαρμάκου παράλληλα με τα γεύματα ή με τη μείωση της δόσης. Η σουλφασαλαζίνη μειώνει τον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων χωρίς όμως να επηρεάζει τη γυναικεία γονιμότητα. Επιπλέον, εμποδίζει την απορρόφηση του φυλλικού οξέος και για το λόγο αυτό συστήνεται συμπληρωματική χορήγηση. Τέλος, έχει βρεθεί πως η σουλφασαλαζίνη και οι μεταβολίτες της διαπερνούν τον πλακούντα, ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία πως μπορεί να βλάπτουν το έμβρυο (Gionchetti et al, 2011, Iacucci et al, 2009, Pithadia et al, 2011).

3.3 Αντιβιοτικά

Η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα του εντέρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου του Crohn. Έτσι, τα αντιβιοτικά έχουν μελετηθεί ως θεραπευτικό μέσο της νόσου. Η μετρονιδαζόλη και η σιπροφλοξασίνη είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα από αυτά. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους δεν έχει αποδειχθεί μέσω ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών. Άλλα αντιβιοτικά που έχουν μελετηθεί για τη θεραπεία της συγκεκριμένης νόσου είναι η κλαριθρομυκίνη και η αιθαμβουτόλη και τα αποτελέσματά τους δεν είναι ενθαρρυντικά (Goodgame et al, 2001, Sandborn et al, 2006). Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπεία των

IFNE προτείνει τη χρήση αντιβιοτικών μόνο για τη διαχείριση επιπλοκών (Feller et al, 2010). Όταν η προσβολή της νόσου του Crohn αφορά το παχύ έντερο και όχι τον ειλεό, η λήψη αντιβιοτικών είναι πιο ωφέλιμη. Οι επιπλοκές της νόσου που είναι πιθανόν να επωφεληθούν είναι τα ενδοκοιλιακά αποστήματα και οι φλεγμονώδεις μάζες, οι περιπρωκτικές εκδηλώσεις (συμπεριλαμβανομένων συριγγίων, περιεδρικών αποστημάτων), η βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό έντερο, οι λοιμώξεις από μικροοργανισμούς όπως το *Clostridium difficile* και οι μετεγχειρητικές επιπλοκές (Pithadia et al, 2011).

Μία συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και μετα-ανάλυση που εξέτασε την αποτελεσματικότητα 3μηνης θεραπείας με αντιβιοτικά σε ασθενείς με νόσο του Crohn, έδειξε πως αποτελεσματικά είναι η νιτροϊμιδαζόλη, η κλοφαζιμίνη και η σιπροφλοξασίνη. Αντιθέτως, βρέθηκαν λίγες ενδείξεις σχετικά με το όφελος της κλαριθρομυκίνης και των κλασικών φαρμάκων της φυματίωσης (Feller et al, 2010).

Η σιπροφλοξασίνη χρησιμοποιείται συχνά στη κλινική πράξη σε συνδυασμό με τη μετρονιδαζόλη. Σε μία μικρή κλινική δοκιμή η σιπροφλοξασίνη φάνηκε να είναι αποτελεσματικότερη από το εικονικό φάρμακο ως προς την πρόκληση ύφεσης και το ίδιο αποτελεσματική με τη μεσαλαζίνη. Αντίθετα, τα κορτικοστεροειδή αποδείχθηκαν αποτελεσματικότερα συγκριτικά με τα δύο αντιβιοτικά (Gionchetti et al, 2011).

3.4 Ανοσοκατασταλτικά/Ανοσοτροποποιητικά

Η αζαθειοπρίνη και η μερκαπτοπουρίνη είναι δύο ευρέως χρησιμοποιούμενοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες για τους ασθενείς με νόσο του Crohn που έχει βρεθεί πως αποτελούν αποτελεσματική θεραπεία για τη διατήρηση της ύφεσης, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τη χορήγηση κορτικοστεροειδών. Η χρήση τους δεν ενδείκνυται ως αρχική θεραπεία σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο και αυτό λόγω της σχετικά καθυστερημένης έναρξης της δράσης τους (περίπου 2-3 μήνες). Η αζαθειοπρίνη είναι πρόδρομη ένωση της μερκαπτοπουρίνης (Feldman et al, 2007).

Η χορήγηση 2.5mg αζαθειοπρίνης/kg σε μία κλινική μελέτη ήταν πιο αποτελεσματική από το εικονικό φάρμακο ως προς τη διατήρηση της ύφεσης για χρονικό διάστημα 15 μηνών. Μετά από 15 μήνες θεραπείας τα ποσοστά των ασθενών που λάμβαναν αζαθειοπρίνη και ήταν σε ύφεση άγγιζαν το 42% ενώ για το εικονικό φάρμακο το ίδιο ποσοστό ήταν 7%. Σε μία άλλη μελέτη όπου συμμετείχαν 83 ασθενείς με νόσο του Crohn που λάμβαναν αζαθειοπρίνη και βρίσκονταν

σε ύφεση για τουλάχιστον 42 μήνες έγινε διαχωρισμός έτσι ώστε 40 να παραμείνουν στη θεραπεία με αζαθειοπρίνη και 43 να μεταβούν σε εικονικό φάρμακο. Μετά από 18μηνη παρακολούθηση τρεις ασθενείς της πρώτης ομάδας και εννέα ασθενείς της δεύτερης υποτροπίασαν. Η χρήση της αζαθειοπρίνης μπορεί επίσης να είναι ωφέλιμη στην αποκοπή των ασθενών από τη συμβατική θεραπεία με κορτικοστεροειδή (Sandborn et al, 2006).

Η επούλωση του βλεννογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντική στη νόσο του Crohn. Τα ανοσοκατασταλτικά, όπως και οι βιολογικοί παράγοντες, σχετίζονται με υψηλά ποσοστά επούλωσης, σε αντίθεση με θεραπείες όπως τα κορτικοστεροειδή (Etchevers et al, 2008).

Οι ασθενείς που λαμβάνουν αζαθειοπρίνη έχουν κάποιες πιθανότητες να αντιμετωπίσουν και τις παρενέργειές της. Αυτές κατηγοριοποιούνται σε αλλεργικές ή ανεξάρτητες της δόσης και σε δοσοεξαρτώμενες ανεπιθύμητες ενέργειες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει ο πυρετός, τα εξανθήματα, η παγκρεατίτιδα και η ηπατίτιδα. Όλες αυτές οι ενέργειες είναι σπάνιες, δεν έχουν σχέση με τη δόση φαρμάκου που χορηγείται και εμφανίζονται στο 5-10% των ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο. Οι δοσοεξαρτώμενες ανεπιθύμητες ενέργειες της αζαθειοπρίνης είναι πολύ πιο συχνές. Η καταστολή του μυελού των οστών είναι η πιο συχνή από αυτές με αποτέλεσμα η λευκοπενία να εμφανίζεται στο 2-15% των ασθενών. Η καταστολή αυτή είναι αναστρέψιμη. Άλλες παρενέργειες είναι ο αυξημένος κίνδυνος λοιμώξεων, η τοξικότητα στο ήπαρ και η ανάπτυξη νεοπλασίας (Etchevers et al, 2008).

Ένα δεύτερης γραμμής ανοσοτροποποιητικό για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται ή δεν μπορούν να ανεχθούν την αζαθειοπρίνη είναι η μεθοτρεξάτη. Είναι αποτελεσματική όταν χορηγείται υποδόρια ή ενδομυϊκά και συνήθως χρειάζονται 8-16 εβδομάδες για να αρχίσει η δράση της (Feldman et al, 2007).

3.5 Κυκλοσπορίνες

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που παραδοσιακά χρησιμοποιείται στις μεταμοσχεύσεις οργάνων. Ωστόσο, τη δεκαετία του 1980 χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για τη θεραπεία ασθενών με ΙΦΝΕ. Σήμερα η κυκλοσπορίνη είναι χρήσιμη στη διαχείριση βαριά πασχόντων ασθενών με ελκώδη κολίτιδα οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στη λήψη κορτικοστεροειδών. Οι ασθενείς αυτοί συνήθως ανταποκρίνονται θεαματικά στη θεραπεία αυτή και με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η χειρουργική επέμβαση. Το 50-80% των ασθενών που

λαμβάνει κυκλοσπορίνη (ενδοφλέβια λήψη 2-4 mg/kg/ημέρα) καταφέρνει να βελτιώσει σημαντικά την κλινική του κατάσταση (κατά κανόνα μέσα σε 7 ημέρες).

Όσον αφορά τη θέση της κυκλοσπορίνης στη θεραπεία της νόσου του Crohn ειδικότερα, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των συριγγίων που προκύπτουν ως επιπλοκές της νόσου. Έχει παρατηρηθεί πως στην περίπτωση αυτή η ανταπόκριση στη θεραπεία (ενδοφλέβια χορήγηση κυκλοσπορίνης) είναι ταχύτατη. Ωστόσο, τα αυξημένα ποσοστά υποτροπών υποδεικνύουν την ανάγκη χρήσης άλλης θεραπευτικής αγωγής με στόχο τη διατήρηση της επούλωσης των συριγγίων (Pithadia et al, 2011). Κλινική μελέτη έδειξε πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς που λάμβαναν χαμηλή δόση κορτικοστεροειδών και κυκλοσπορίνη και ασθενείς που λάμβαναν μόνο χαμηλή δόση κορτικοστεροειδών (Akobeng et al, 2007). Συνεπώς, η κλινική αξία της κυκλοσπορίνης εντοπίζεται στη λήψη της για σύντομο χρονικό διάστημα και δεν υπάρχουν ενδείξεις για χρήση ως συντηρητική θεραπεία από ασθενής με νόσο του Crohn (Pithadia et al, 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN

4.1 Ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α)

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδοθεί στον TNF-α ένας κυρίαρχος ρόλος στην παθογένεση της νόσου του Crohn αλλά και ποικίλες προφλεγμονώδεις δράσεις γενικότερα. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη χρησιμότητα των ανταγωνιστών του στη θεραπεία της φλεγμονής. Πολλές μελέτες αναφέρουν την αποτελεσματικότητα του πιο συχνά χρησιμοποιούμενου από αυτούς ανταγωνιστή, το infliximab, στην πρόκληση και διατήρηση της ύφεσης, στη μείωση της χρήσης κορτικοστεροειδών και στην επούλωση των συριγγίων του εντερικού βλεννογόνου. Τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα οδήγησαν στην ανάπτυξη και άλλων παραγόντων με τον ίδιο τρόπο δράσης, δηλαδή παραγόντων που δρουν κατά του TNF-α. Έτσι, λοιπόν, έχουν αναπτυχθεί και ερευνάται η δράση άλλων 5 τέτοιων παραγόντων (Adalimumab, Certolizumab pegol, CDP870, CDP571, Etanercept και Onercept). Η αποτελεσματικότητα των παραγόντων αυτών διαφέρει και πιο συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι το Adalimumab είναι αποτελεσματικότερο από το CDP571 στην πρόκληση ύφεσης σε ασθενείς με ενεργό νόσο του Crohn. Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα του Certolizumab pegol και του CDP571 σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα CRP. Τέλος, από κλινικές δοκιμές έχει φανεί και η αναποτελεσματικότητα του Onercept αλλά και του Etanercept όταν χορηγήθηκε σε δόσεις που χρησιμοποιούνται επιτυχώς για ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Sands, 2006).

Το Infliximab είναι το μέλος αυτής της ομάδας με την πιο ευρεία χρήση σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Μελέτες έχουν δείξει πως η αποτελεσματικότερη δοσολογία είναι 5mg/kg ωστόσο μία νεότερη μελέτη αναφέρει πως σε περίπτωση μη ανταπόκρισης του ασθενούς στην παραπάνω δοσολογία μπορεί να γίνει αύξηση της δόσης στα 10mg/kg (Sandborn et al, 1999). Η διακοπή του καπνίσματος και η παράλληλη χορήγηση αζαθειοπρίνης αυξάνει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Κάποιες φορές ασθενείς που λαμβάνουν το Infliximab για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να αναπτύξουν αντισώματα σε αυτό (Antibody To Infliximab, ATI). Αυτό συμβαίνει σε μικρό ποσοστό ασθενών ενώ η προφυλακτική χορήγηση κορτικοστεροειδών πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου μειώνει σημαντικά αυτή τη πιθανότητα (Rutgeerts et al, 1999).

Σημαντικό προτέρημα των βιολογικών παραγόντων σε σχέση με τις συμβατικές θεραπείες είναι πως εκτός από την επαγωγή κλινικής ύφεσης οδηγούν και στην επούλωση του βλεννογόνου. Αυτό συνεπάγεται και εξασφάλιση μακροπρόθεσμων θετικών ενεργειών για τους ασθενείς με νόσο του Crohn όπως μείωση στις ημέρες νοσηλείας και στις χειρουργικές επεμβάσεις. Πριν από

τη χρήση των φαρμάκων αυτών η επούλωση του βλεννογόνου δεν αποτελούσε πρωταρχικό σκοπό αφού οι περισσότερες θεραπείες δεν τροποποιούσαν τη νόσο και δεν είχαν τη δυνατότητα να θεραπεύουν τις βλάβες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα κορτικοστεροειδή που παρά την επίτευξη ύφεσης δεν οδηγούν και σε διόρθωση των εντερικών βλαβών. Στην περίπτωση των ανοσοκατασταλτικών παρατηρείται μέτρια και αργή επούλωση του βλεννογόνου. Σε μία μελέτη που συμμετείχαν ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn, μόνο στο 16.5% αυτών που λάμβαναν υψηλές δόσεις αζαθειοπρίνης παρατηρήθηκε επούλωση. Τέλος, τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα φαίνεται πως δεν μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης συριγγίου ή υποβολής σε χειρουργική επέμβαση (Feagan et al, 2012).

Σχετικά με τους ανταγωνιστές του TNF-α και το χρόνο που πρέπει να χορηγούνται υπάρχουν δύο αντικρουόμενες απόψεις. Η πρώτη (γνωστή ως “top down” θεραπεία) περιλαμβάνει την πρόωρη και επιθετική εισαγωγή ανοσοκατασταλτικών και ανταγωνιστών του TNF-α. Η δεύτερη είναι η κλασσική προσέγγιση αυτού του ζητήματος (γνωστή ως “step-up” θεραπεία) που περιλαμβάνει την έναρξη της θεραπείας με αμινοσαλικυλικά και αντιβιοτικά. Η χρήση κορτικοστεροειδών είναι η δεύτερη επιλογή αν τα παραπάνω αποτύχουν να προκαλέσουν ύφεση της νόσου. Τέλος, χρήση ανοσοκατασταλτικών και ανταγωνιστών του TNF-α γίνεται μόνο στην περίπτωση αποτυχίας όλων των προηγούμενων θεραπειών να προκαλέσουν ή να διατηρήσουν την ύφεση (Hanauer, 2009, Shergill et al, 2008).



Σχήμα 4. “Step up” εναντίον “Top down” προσέγγιση στη θεραπεία της νόσου του Crohn (Lowenberg et al, 2006).

Παράλληλα με όλα τα οφέλη που περιγράφονται παραπάνω οι θεραπείες που ανταγωνίζονται τον TNF-α περιλαμβάνουν και κάποιους κινδύνους. Η σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια των

φαρμάκων αυτών είναι ο αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης ιών, μυκήτων ή βακτηρίων (φυματίωση, λιστερίωση, ιστοπλάσμωση). Έρευνες που αφορούν την ασφάλεια της χρήσης του Infliximab από ασθενείς με νόσο του Crohn και ρευματοειδή αρθρίτιδα παρουσιάζουν αρκετές περιπτώσεις φυματίωσης. Άλλες παρενέργειες της χρήσης των ανταγωνιστών του TNF-α είναι η επανενεργοποίηση του ιού της ηπατίτιδας Β, ηπατικές διαταραχές όπως χολοκυστίτιδα, χολολιθίαση, μη λοιμώδης ηπατίτιδα και ίκτερος, αλλεργικές αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση του φαρμάκου, κακοήθειες όπως λέμφωμα και επιδείνωση της συμφορητικής ανεπάρκειας (Smolen et al, 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΝΕΟΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΩΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΝ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN

Μέχρι σήμερα οι περισσότεροι ασθενείς με ΙΦΝΕ αντιμετωπίζονται με φάρμακα που έχουν κατά κύριο λόγο αντιφλεγμονώδη δράση ή/και αναστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Αν και οι βιολογικοί παράγοντες κατά του TNF-α αποτελούν μια αποτελεσματική θεραπεία, το 30% των ασθενών με νόσο του Crohn δεν ανταποκρίνεται στη λήψη τους ενώ το 50% των ατόμων που ανταποκρίνονται αρχικά παύει να ελέγχεται μετά το πρώτο έτος λήψης του φαρμάκου. Την τελευταία δεκαετία η πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας των νοσημάτων αυτών αλλά και στην βιοτεχνολογία έχουν συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων βιολογικών παραγόντων, εκτός από τους ανταγωνιστές του TNF-α. Για πολλά από τα φάρμακα αυτά τα έως τώρα δεδομένα είναι ενθαρρυντικά και φαίνεται να έχουν κλινικό όφελος για τους ασθενείς, ενώ άλλα βρίσκονται ακόμα υπό αξιολόγηση (Triantafillidis et al, 2011).

5.1 Αντισώματα κατά της IL-6 και της IL-12

Η IL-6 είναι μία κυτταροκίνη με προφλεγμονώδη αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση. Εκκρίνεται από τα T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα και πυροδοτεί την ανοσολογική αντίδραση οδηγώντας σε φλεγμονή. Αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς μεσολαβητές της απάντησης οξείας φάσης και για το λόγο αυτό ερευνάται η θέση του στην παθογένεια της νόσου του Crohn (Rutgeerts et al, 2009). Δεν υπάρχουν πολλά κλινικά δεδομένα σχετικά με τον αποκλεισμό αυτής της οδού της φλεγμονής για τη θεραπεία της νόσου του Crohn, ωστόσο το Tocilizumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της IL-6 έχει ήδη δοκιμαστεί και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Σε μία μελέτη που συμμετείχαν 36 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn βρέθηκε πως στους ασθενείς που λάμβαναν 8mg/kg Tocilizumab κάθε 2 εβδομάδες υπήρξε ανταπόκριση της νόσου και επιτεύχθηκε ύφεση. Όταν το φάρμακο χορηγήθηκε κάθε 4 εβδομάδες τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά (Ito et al, 2004). Επιπλέον, η χορήγησή του σε ζωικά πρότυπα κολίτιδας μείωσε τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον βλεννογόνο των ζώων (Rutgeerts et al, 2009) και έχει ήδη αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά του στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Triantafillidis et al, 2011).

Μια ακόμη σημαντική κυτταροκίνη στη νόσο του Crohn είναι η IL-12 καθώς στα άτομα που νοσούν τα επίπεδά της είναι αυξημένα και αυτό οδηγεί σε διέγερση της παραγωγής του TNF-α και της IFN-γ (Sands et al, 2006). Το μονοκλωνικό αντίσωμα ABT-874 κατά της IL-12 μειώνει

την έκκριση της IL-12 στα άτομα με φλεγμονή. Σε μια μελέτη που συμμετείχαν 79 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn όσοι λάμβαναν 3mg/kg ABT-874 κατόρθωσαν να περιορίσουν την ενεργότητα της νόσου και επιτεύχθηκε η ύφεση (Mannon et al, 2004). Δύο ακόμη αναστολείς της IL-12 που μελετώνται είναι ο STA-5326 (Burakoff et al, 2006) και ο Ustekinumab (Toedter et al, 2009).

5.2 Αντισώματα κατά της IFN-γ

Η IFN-γ αποτελεί έναν ακόμα θεραπευτικό στόχο στη νόσο του Crohn. Το fontolizumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της IFN-γ αξιολογήθηκε μέσω μίας μελέτης με 133 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή νόσο του Crohn. Το φάρμακο ήταν καλά ανεκτό από τους ασθενείς. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε ομάδες και έλαβαν εικονικό φάρμακο, 4mg fontolizumab/kg ή 10mg fontolizumab/kg. Κάποιοι ασθενείς έλαβαν 1 δόση φαρμάκου την ημέρα 0 ενώ κάποιοι άλλοι 2 δόσεις, την ημέρα 0 και 28. Την 28^η ημέρα δεν υπήρχε κλινική ανταπόκριση από καμία ομάδα ασθενών ενώ την 56^η ημέρα τα υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης (69%) παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που έλαβαν 2 δόσεις 4mg/kg. Τέλος, βρέθηκε πως οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν ήταν αυτοί που παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα CRP πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου (Hommes et al, 2006).

5.3 Αντισώματα κατά των μορίων προσκόλλησης

Πολλά μόρια προσκόλλησης συμπεριλαμβανομένων της E-σελεκτίνης, του ICAM-1, του ICAM-2, του VCAM-1 και του Mad-CAM-1 ενισχύουν τη φλεγμονή. Τα μόρια αυτά αποτελούν ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με στόχο τη μείωση της φλεγμονής, την πρόληψη της υποτροπής και το μακροχρόνιο έλεγχο των ΙΦΝΕ (Triantafillidis et al, 2011).

5.3.1 Natalizumab

Το natalizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει στην αναστολή του VCAM-1/α4β1 και του Mad CAM-1/α4β και κατά συνέπεια αναστέλλει την προσκόλληση των λευκοκυττάρων από τα αιμοφόρα αγγεία στο σημείο της φλεγμονής. Έχει εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών με μέτρια έως σοβαρή νόσο του Crohn και αποτελεί εναλλακτική θεραπεία

για ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στους ανταγωνιστές του TNF-α. Ακόμη αποτελεί θεραπεία εκλογής για ασθενείς που πάσχουν από πολλαπλή σκλήρυνση (Sands et al, 2011, Triantafillidis et al, 2011).

Στην πιο σημαντική τυχαιοποιημένη μελέτη για την αποτελεσματικότητα του natalizumab συμμετείχαν 509 ασθενείς και έλαβαν 300mg φάρμακο ή εικονικό φάρμακο τις εβδομάδες 0, 4 και 8. Το natalizumab οδήγησε σε ανταπόκριση και επίτευξη ύφεσης της νόσου την 8^η εβδομάδα που διατηρήθηκε μέχρι τη 12^η εβδομάδα. Το γεγονός πως τα ποσοστά ανταπόκρισης και ύφεσης ήταν μεγαλύτερα για το natalizumab απ' ό,τι για το εικονικό φάρμακο την 4^η, 8^η και 12^η εβδομάδα αποδεικνύει την συνεχή και έγκαιρη δράση του. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί αποτελεσματικό φάρμακο πρώτης γραμμής για ασθενείς με αυξημένη CRP και ενεργή νόσο του Crohn. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ωστόσο κατά την εξέλιξη της νόσου ένας ασθενής κατέληξε εξαιτίας προϊούσας πολυεστιακής λευκοεγκεφαλοπάθειας (Targan et al, 2007).

5.3.2 MLN-02

Το MLN-02 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της α4β7 ιντεγκρίνης και αναστέλλει την προσκόλληση και διήθηση των λευκοκυττάρων στον βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα. Σε μία πρόσφατη μελέτη ασθενείς με ενεργό νόσο του Crohn τυχαιοποιήθηκαν και χωρίστηκαν σε ομάδες ώστε να λάβουν 2mg MLN-02/kg, 0.5mg MLN-02/kg και εικονικό φάρμακο την 1^η και την 29^η ημέρα. Τα ποσοστά της κλινικής ανταπόκρισης την 57^η ημέρα ήταν 53%, 49% και 41% αντίστοιχα για τις 3 ομάδες. Τα ίδια ποσοστά για την κλινική ύφεση της νόσου τη 57^η ημέρα ήταν 37%, 30% και 21%. Είναι, λοιπόν, εμφανής η δόσοεξαρτώμενη ευεργετική δράση του φαρμάκου στην κλινική ύφεση (Feagan et al, 2008).

5.3.3 Alicaforsen

Ο ICAM-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και ειδικότερα στη μη φυσιολογική διήθηση του εντερικού τοιχώματος από φλεγμονώδη κύτταρα. Το Alicaforsen αποτελεί έναν αναστολέα του μορίου αυτού και αναπτύχθηκε ειδικά για να αναστέλλει την έκφρασή του, άρα και τη διήθηση των λευκοκυττάρων στον φλεγμένον ιστό. Αποτελεί καλά ανεκτό φάρμακο για τους ασθενείς με ΙΦΝΕ όμως τα αποτελέσματα των μελετών που εξετάζουν την

αποτελεσματικότητά του δεν είναι ενθαρρυντικά. Η συστηματική χορήγησή του σε ασθενείς με νόσο του Crohn δεν είχε σημαντικά αποτελέσματα. Σε ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα φάνηκε να έχει κάποια τοπική δράση όταν τους χορηγήθηκε με υποκλυσμό (Philpott et al, 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN

Τα φάρμακα που αποτελούν τη βάση της θεραπείας της νόσου του Crohn, όπως τα κορτικοστεροειδή και τα ανοσοτροποποιητικά, δεν εξασφαλίζουν πάντα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Φυσικά θρεπτικά συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση της φλεγμονώδους απάντησης σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Crohn (Ioannidis et al, 2011).

Η διατροφική θεραπεία της νόσου του Crohn εκτός από συγκεκριμένα τρόφιμα και θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνει την εντερική (EN) και την ολική παρεντερική διατροφή (TPN). Οι δίαιτες αυτές περιλαμβάνουν τις απλούστερες μορφές των θρεπτικών συστατικών (αμινοξέα, απλούς υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα) και έτσι απαιτούν ελάχιστη (EN) ή/και καθόλου πέψη πριν την απορρόφηση (TPN) αντίστοιχα (Smith et al, 2008). Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος στοιχειακών διαιτών με στόχο τον έλεγχο της δραστηριότητας της νόσου και η σημασία της τόσο για ενήλικους όσο και για παιδιατρικούς ασθενείς είναι γνωστή (Ioannidis et al, 2011).

Οι πιθανοί μηχανισμοί της ευεργετικής δράσης διαφόρων συστατικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της κλινικής πορείας της νόσου συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Μηχανισμός δράσης της διατροφικής θεραπευτικής αγωγής (Ioannidis et al, 2011)

Μείωση του αντιγονικού φορτίου στον αυλό του εντέρου
Διαφοροποίηση στην ανοσολογική απάντηση του εντέρου
Βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού
Αύξηση της πρόσληψης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (ω -3 και ω -6 λιπαρά οξέα)
Αποκατάσταση της βλάβης στον φραγμό του εντερικού βλεννογόνου
Ρύθμιση/Ενίσχυση της εντερικής μικροχλωρίδας
Ρύθμιση της κινητικότητας του εντέρου
Ρύθμιση των χολικών και παγκρεατικών εκκρίσεων

6.1 Αντιοξειδωτικά

6.1.1 Γλουταθειόνη

Η Γλουταθειόνη είναι ένα ενδοκυτταρικό πεπτίδιο με πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν την δράση της ως αντιοξειδωτικό αλλά και τη σημασία της στην προώθηση διαφόρων ενδοκυττάρων μηνυμάτων. Αναλυτικότερα οι δράσεις της γλουταθειόνης στον ανθρώπινο οργανισμό περιλαμβάνουν την εμπόδιση της οξείδωσης της θειικής ομάδας των πρωτεϊνών και του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών από αυτές (που συμβαίνει λόγω του οξειδωτικού στρες), την εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, τη διατήρηση της κυστεΐνης, την επίδραση στη σύνθεση του DNA και στην ανοσολογική λειτουργία. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει, λοιπόν, πως η γλουταθειόνη μπορεί να προστατεύσει από την κυτταρική απόπτωση που προάγεται από το οξειδωτικό στρες (Lu et al, 1999).

Πολλές κλινικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Crohn, έχουν συνδεθεί με μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και κατ' επέκταση αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες (Sido et al, 1998). Η ουσία αυτή και η μείωση που προκαλεί στην οξείδωση επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ, άρα την έκφραση κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης. Συνεπώς ένας τρόπος αποφυγής της κυτταρικής καταστροφής από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι η αποκατάσταση των ενδοκυττάρων επιπέδων της γλουταθειόνης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συμπληρωματική χορήγηση πρόδρομων ουσιών της όπως η γλουταμίνη και η κυστεΐνη. Κρίσιμος παράγοντας της ενδοκυττάριας σύνθεσης γλουταθειόνης είναι η διαιτητική πρόσληψη κυστεΐνης αφού πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι αύξησή της οδηγεί σε αποκατάσταση των επιπέδων της αποθηκευμένης γλουταθειόνης.

Η χορήγηση *Lactobacillus fermentum*, ένα προβιοτικό που συμβάλλει στη παραγωγή γλουταθειόνης, σε αρουραίους με TNBS κολίτιδα αύξησε τα επίπεδα γλουταθειόνης, βελτίωσε τη φλεγμονή του παχέος εντέρου και μείωσε τα επίπεδα δεικτών όπως ο TNF-α. Ακόμη, στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου ατόμων με νόσο του Crohn βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και ενζύμων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεσή της, είτε το τμήμα του βλεννογόνου ήταν προσβεβλημένο από τη νόσο είτε όχι. Έχει διαπιστωθεί επίσης πως τα επίπεδά της σχετίζονται άμεσα με τη δυσθρεψία, συνεπώς η αποκατάσταση των επιπέδων της θα πρέπει να αποτελεί στόχο της διατροφικής θεραπείας των ασθενών (Ioannidis et al, 2011).

6.1.2 Βιταμίνη Α, C και Ε

Στον όρο βιταμίνη Ε περιλαμβάνεται μία ομάδα από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες, μεταξύ των οποίων η τοκοφερόλη-α έχει τη μεγαλύτερη βιολογική δράση. Η παρουσία της σε λιποπρωτεΐνες και σε κυτταρικές μεμβράνες λειτουργεί σαν ισχυρό αντιοξειδωτικό και προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες. Αυτό το πετυχαίνει αδρανοποιώντας τις ρίζες αυτές και κατ' επέκταση εμποδίζοντας την καταστροφική αλυσιδωτή αντίδραση που προκαλούν. Η ισορροπία των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων είναι καθοριστική για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και η βιταμίνη Ε ως αντιοξειδωτικό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητάς του. Έχει βρεθεί πως μειώνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και επηρεάζει τη διήθηση των ιστών από τα λευκά αιμοσφαίρια (Ioannidis et al, 2011).

Η βιταμίνη C είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του μεταβολισμού στον ανθρώπινο οργανισμό, ο οποίος δεν έχει τη δυνατότητα να τη συνθέτει. Μεταξύ των βιολογικών δράσεων της βρίσκεται και η ικανότητά της να εξουδετερώνει τις δραστικές ελεύθερες ρίζες (Carr et al, 1999). Η βιταμίνη C δρα επίσης στην αναδημιουργία της βιταμίνης Ε και της γλουταθειόνης από τις οξειδωμένες τους μορφές (Packer et al, 2001).

Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα βιταμίνης C και Ε. Ακόμη, έχει βρεθεί πως σε ασθενείς με μέτρια ως ήπια νόσο του Crohn, που έχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες και χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών βιταμινών, η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης C και Ε μείωσε σημαντικά το οξειδωτικό στρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Ioannidis et al, 2011).

Η βιταμίνη Α είναι ένα μικροθρεπτικό συστατικό με αντιοξειδωτική δράση που ρυθμίζει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί πως η ανεπάρκειά της προκαλεί φλεγμονή στο παχύ έντερο και ενισχύει την υπάρχουσα κολίτιδα, ενώ η λήψη συμπληρωμάτων τη βελτιώνει (Reifen et al, 2002).

6.1.3 Χαλκός, Σελήνιο και Ψευδάργυρος

Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί τρία σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδική δισμουτάση χρησιμοποιεί τα μέταλλα ψευδάργυρο, χαλκό και μαγνήσιο ως συνένζυμα για την μετατροπή

του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε νερό από τα άλλα δύο ένζυμα. Το σελήνιο είναι ένα βασικό μικροθρεπτικό συστατικό που δρα ως ενεργό κέντρο στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Συνεπώς, η έλλειψή του συνδέεται άμεσα με την κατακόρυφη μείωση της δραστηριότητάς της και κατά συνέπεια με την αύξηση του οξειδωτικού στρες.

In vitro μελέτες έχουν δείξει πως τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, κάτι που δε φάνηκε στα αποτελέσματα βιοψιών εντερικού βλεννογόνου. Ακόμη, σε αρουραίους με TNBS κολίτιδα φάνηκε πως η πλούσια δίαιτα σε σελήνιο οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του μετάλλου στο εντερικό ιστό κάτι που προστάτευσε την αρχιτεκτονική του βλεννογόνου και μείωσε τη διήθηση των ουδετερόφιλων. Τέλος, στο σύνολο των ασθενών με ενεργή νόσο του Crohn (και ιδιαίτερα σε ασθενείς με δυσθρεψία) έχουν βρεθεί μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών μετάλλων, γεγονός που ενθαρρύνει ακόμη περισσότερο τη συμπληρωματική χορήγησή ιχνοστοιχείων (Ioannidis et al, 2011).

6.2 Πρεβιοτικά και Προβιοτικά

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως τα εντερικά βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των ΙΦΝΕ. Η επικρατέστερη θεωρία γύρω από αυτό είναι πως το ανοσοποιητικό σύστημα ατόμων με γενετική προδιάθεση αναγνωρίζει ως αντιγόνο τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας. Η υπόθεση αυτή ενδυναμώνεται από διάφορες παρατηρήσεις όπως: τα αντιβιοτικά ευρέου φάσματος περιορίζουν τη χρόνια φλεγμονή, οι περιοχές με τη μεγαλύτερη πυκνότητα σε εντερικά βακτήρια είναι αυτές που εμφανίζουν φλεγμονή και η χειρουργική εκτροπή της ροής των κοπράνων αποτρέπει την έξαρση της νόσου. Δύο παράγοντες που επιδρούν στο είδος αλλά και την πυκνότητα της εντερικής μικροχλωρίδας είναι τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά της διατροφής (Geier et al, 2007).

6.2.1 Προβιοτικά

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε τρόφιμα και διατροφικά συμπληρώματα και συμβάλλουν στην καλή γαστρεντερική λειτουργία αυτού που τα καταναλώνει. Συνήθως είναι στελέχη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* που είναι ανθεκτικά στα

οξέα του στομάχου και τα χολικά άλατα, μπορούν να αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και είναι ασφαλή για την κατανάλωση από τον άνθρωπο. Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν δείξει παρόμοια ευεργετική δράση είναι η *E. Coli Nissle 1917* και ο *Saccharomyces boulardii*. Οι ευεργετικές τους ιδιότητες σχετίζονται με την ενίσχυση της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού, την τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, την παρεμπόδιση προσκόλλησης παθογόνων βακτηρίων στο επιθήλιο και την τροποποίηση την ανοσολογικής απάντησης. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της IL-10 και της μείωσης του TNF-α και της INF-γ που προκαλούν (Ewaschuk et al, 2006, Ioannidis et al, 2011).

Όσον αφορά, συγκεκριμένα τη νόσο του Crohn η χρήση των προβιοτικών στην πρόληψη και αντιμετώπιση της έξαρσης είναι λιγότερο τεκμηριωμένη συγκριτικά με την ελκώδη κολίτιδα. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένες μελέτες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Ewaschuk et al, 2006). Η επίδραση των προβιοτικών στη διατήρηση της ύφεσης αναφέρεται σε μία μελέτη όπου το 37.5% των ασθενών που λάμβαναν μόνο μεσαλαμίνη υποτροπίασε ενώ το ίδιο ποσοστό για του ασθενείς που λάμβαναν μεσαλαμίνη και *Saccharomyces boulardii* ήταν 6.3% (Guslandi et al, 2000). Τέλος, στην κλινική μελέτη των McCarthy et al επισημαίνεται πως η από του στόματος χορήγηση του *Lactobacillus salivarius* UCC118 μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα της νόσου σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο του Crohn (McCarthy et al, 2001).

6.2.2 Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά είναι συστατικά των τροφίμων που δεν πέπτονται και οδηγούν στην εκλεκτική διέγερση της ανάπτυξης ενός βακτηρίου ή μιας ομάδας βακτηρίων της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου. Η συμπληρωματική χορήγηση πρεβιοτικών συμβάλλει στην καλή υγεία και σωστή ανάπτυξη του εντερικού βλεννογόνου, στην ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού, στην ισορροπία των υγρών και των ηλεκτρολυτών του σώματος, στην ενίσχυση της άμυνας κατά των παθογόνων μικροοργανισμών, στη διαφοροποίηση των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου καθώς και στην τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης. Επιπλέον, τα πρεβιοτικά συνδέονται με την αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας κατά τη μερική ή πλήρη ζύμωσή τους από τα εντερικά βακτήρια. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρεβιοτικά είναι η ινουλίνη και η ολιγοφρουκτόζη που είναι φυτικοί υδατάνθρακες και καλούνται φρουκτάνες. Ένα άλλο πρεβιοτικό που ενεργεί και ως αντιοξειδωτικό είναι η πηκτίνη και συμβάλλει και αυτή στην αποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας. Η ημερήσια

πρόσληψη πρεβιοτικών στις δυτικές κοινωνίες κυμαίνεται από 3 έως 13 g ημερησίως (Ioannidis et al, 2011).

Τα πρεβιοτικά έχουν δοκιμαστεί κυρίως σε μοντέλα πειραματικής κολίτιδας, ωστόσο σε μια μικρή μελέτη 15 ασθενών με ενεργή νόσο του Crohn αναφέρεται πως η λήψη 15 g φρουκτοολιγοσακχαριτών για 21 ημέρες μείωσε τη δραστηριότητα της νόσου, και αύξησε τα *Bifidobacterium* του εντέρου (Lindsay et al, 2006)

6.3 Εντερική/Ολική Παρεντερική Διατροφή

Η διατροφική θεραπεία στα ΙΦΝΕ περιλαμβάνει τις διαιτητικές τροποποιήσεις που αποφασίζονται από την ιατρική ομάδα και αυτές που κάνει ο ασθενής μόνος του. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης της διατροφής ως θεραπεία αναφέρονται στην ανάπαυση του εντέρου, στην παροχή θρεπτικών συστατικών, στην τροποποίηση της μικροχλωρίδας και στον έλεγχο των αντιγονικών ερεθισμάτων από τη διατροφή. Τα θρεπτικά συστατικά της διατροφής ως δομικά συστατικά των κυττάρων αλλά και ως αντιγόνα μπορούν να επηρεάσουν την φλεγμονώδη απάντηση, τον ανασχηματισμό των φλεγμόντων ιστών και τις κυτταρικές λειτουργίες στον εντερικό βλεννογόνο (Rajendran et al, 2010). Εξαιτίας της μειωμένης διαιτητικής πρόσληψης, της δυσασπορρόφησης και των μεταβολικών διαταραχών η δυσθρεψία είναι συχνή σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Η θεραπεία αυτών των ασθενών περιλαμβάνει την διατροφική υποστήριξη (εντερική ή παρεντερική διατροφή) όταν η κατάσταση το απαιτεί (Hebuterne et al, 2009).

Οι στοιχειακές δίαιτες χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με νόσο του Crohn που βρίσκονται σε έξαρση με στόχο την ενίσχυση της διατροφικής τους κατάστασης και τη μείωση της φλεγμονής. Στις δίαιτες αυτές πιστεύεται πως μειώνεται η έκθεση του βλεννογόνου στα αντιγόνα της τροφής εξαιτίας της υγρής κατάστασης αλλά και της γρήγορης διέλευσής της από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η εντερική διατροφή προσφέρει μερική ανάπαυση του εντέρου, ωστόσο η συμμόρφωση σε αυτή δεν είναι πάντα η επιθυμητή (Rajendran et al, 2010). Τα περισσότερα σκευάσματα στοιχειακών διαιτών δεν είναι εύγευστα και συχνά δίνονται μέσω ρινογαστρικού καθετήρα. Αντίθετα, τα πόσιμα διατροφικά σκευάσματα που περιέχουν πολυμερή είναι πιο εύγευστα. Αρκετές μελέτες και μετα-αναλύσεις δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα των στοιχειακών και των πολυμερών διαιτών (Ferguson et al, 1998, King et al, 1997). Οι δίαιτες αυτές συμβάλλουν στην ύφεση με πιο οικονομικό τρόπο αλλά και με

λιγότερες παρενέργειες όταν συγκριθούν με την παρεντερική διατροφή. Μελέτες έχουν δείξει πως τόσο σε παιδιατρικούς όσο και σε ενήλικες ασθενείς με ενεργό νόσο του Crohn η εντερική διατροφή με πολυμερή ή στοιχειακά σκευάσματα είναι εξίσου αποτελεσματική με τη λήψη κορτικοστεροειδών (Borelli et al, 2006, Gorard et al, 1993). Ωστόσο μια ανασκόπηση 4 κλινικών δοκιμών (που έλαβε υπόψη 130 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn που λαμβάνουν εντερική διατροφή και 123 που λάμβαναν κορτικοστεροειδή) είχε αντίθετα αποτελέσματα και κατέληξε στο συμπέρασμα πως τα κορτικοστεροειδή είναι αποτελεσματικότερα (Zachos et al, 2007). Η θεραπεία με εντερική διατροφή διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε παιδιατρικούς ασθενείς όπου τα κορτικοστεροειδή αποφεύγονται καθώς μπορεί να προκαλέσουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Το γεγονός πως ο αποκλεισμός όλων των τροφίμων για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι πολύ δύσκολος κάνει την εντερική διατροφή βραχυπρόθεσμη λύση και δυστυχώς η σταδιακή επιστροφή στην κανονική διατροφή συχνά οδηγεί σε υποτροπή της νόσου (Rajendran et al, 2010).

Η ολική παρεντερική διατροφή στοχεύει στην ανάπαυση του εντέρου, στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών σε μετεγχειρητικούς ασθενείς και στη διόρθωση του υποσιτισμού. Ακόμη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία στην οξεία νόσο του Crohn αφού η ανάπαυση του εντέρου εκμηδενίζει τα αντιγόνα της τροφής στον εντερικό αυλό, τις εκκρίσεις του γαστρεντερικού σωλήνα αλλά και τις περισταλτικές κινήσεις οδηγώντας έτσι σε ανακούφιση των συμπτωμάτων (Campos, et al. 2002). Έχει βρεθεί πως η παρεντερική διατροφή προκαλεί ύφεση στη νόσο του Crohn ωστόσο δεν παύει να είναι μια δαπανηρή και επεμβατική μέθοδος με αρκετές παρενέργειες (Rajendran et al, 2010). Στην κλινική μελέτη των Muler et al. 30 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn και σημαντικές επιπλοκές έλαβαν ολική παρεντερική διατροφή για 3 εβδομάδες στο νοσοκομείο και για άλλες 9 εβδομάδες κατ' οίκον, χωρίς να επιτρέπεται η λήψη οποιουδήποτε φαρμάκου. Από αυτούς οι 25 απέφυγαν την χειρουργική επέμβαση, επέστρεψαν στην εργασία τους και δεν χρειάστηκαν κάποια φαρμακευτική αγωγή (Muler et al, 1983). Σε μια προοπτική μελέτη 51 ασθενείς με ενεργή και ανθεκτική στη φαρμακευτική αγωγή νόσο του Crohn χωρίστηκαν σε ομάδες και υποβλήθηκαν σε ολική παρεντερική διατροφή, σε εντερική διατροφή μέσω ρινογαστρικού καθετήρα και σε μερική παρεντερική διατροφή. Κλινική ύφεση επιτεύχθηκε στο 71%, 58% και 60% της πρώτης, δεύτερης και τρίτης ομάδας αντίστοιχα (Greenberg et al, 1988). Τέλος, πιθανή ένδειξη για ολική παρεντερική διατροφή αποτελεί και η περιπρωκτική προσβολή στη νόσο του Crohn. Στην περίπτωση αυτή όπου η θεραπεία είναι συντηρητική λόγω των συχνών υποτροπών, η έγκαιρη έναρξη παρεντερικής διατροφής των

υποσιτισμένων ασθενών προωθεί την ανάπαυση του εντέρου και πιθανόν να επιταχύνει την επούλωση του βλεννογόνου στην περιοχή του πρωκτού (Teixeira et al, 1998).

6.4 Άλλοι φυσικοί παράγοντες

6.4.1 Μαστίχα Χίου

Σε μία πιλοτική μελέτη που συμμετείχαν ασθενείς με ήπιας έως μέτριας βαρύτητας νόσο του Crohn η ημερήσια χορήγηση 2.2 g μαστίχας Χίου από του στόματος οδήγησε στη βελτίωση της κλινικής εικόνας. Επιπλέον, η χορήγηση της μαστίχας Χίου μείωσε στατιστικά σημαντικά δείκτες φλεγμονής όπως η IL-6 και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP). Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος των ασθενών μετά από τη λήψη της μαστίχας για ένα μήνα και η δράση της ως αναστολέα του TNF-α αποτελούν ενδείξεις της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης του συγκεκριμένου προϊόντος (Kaliora et al, 2007).

6.4.2 Ω3 λιπαρά οξέα

Η σύσταση της διαίτας των ασθενών με νόσο του Crohn σε λίπος αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στη διαιτητική διαχείριση των ατόμων αυτών τα τελευταία χρόνια. Η χορήγηση συμπληρωμάτων που περιέχουν ιχθυέλαια και είναι πλούσια σε ω3 λιπαρά οξέα έχει προταθεί για την αντιμετώπιση πολλών διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος. Το EPA (εικοσιπεντανοϊκό οξύ) και το DHA (δοκοσαεξανοϊκό οξύ) είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που ανήκουν στην κατηγορία των ω3, είναι οι σημαντικότερες πηγές τέτοιων λιπαρών οξέων και φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την αναίτια πρόκληση φλεγμονής (MacDonald et al, 2006). Σε μία κλινική μελέτη όπου συμμετείχαν ασθενείς με νόσο του Crohn βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα ω3 λιπαρών στον ορό τους και αυξημένη αναλογία ω6:ω3 λιπαρών οξέων σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ακόμη, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της αναλογίας ω6:ω3 λιπαρών οξέων με τον Δείκτη Δραστηριότητας της Νόσου του Crohn (CDAI) (Kuroki et al, 1997). Αξιοσημείωτα είναι και κάποια ευρήματα που θέλουν τα ω3 λιπαρά οξέα να σχετίζονται με τις απαιτήσεις των ασθενών με νόσο του Crohn σε στεροειδή. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως ασθενείς στους οποίους χορηγούνται τέτοια συμπληρώματα δεν χρειάζονται ή χρειάζονται σε χαμηλότερες δόσεις κορτικοστεροειδή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που λαμβάνει εικονικό φάρμακο (Maclean et al, 2005).

Πολλές είναι, όμως, οι κλινικές μελέτες που δεν έχουν το ίδιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Έτσι, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση 4g ω3 λιπαρών οξέων ημερησίως για 58 εβδομάδες σε ασθενείς με νόσο του Crohn δεν ήταν πιο αποτελεσματική από τη χορήγηση εικονικού φαρμάκου ως προς την πρόληψη της υποτροπής της νόσου (Feagan et al, 2008). Είναι, λοιπόν, κατανοητό πως οι αποδείξεις για τα κλινικά οφέλη της συμπληρωματικής χορήγησης ω3 λιπαρών οξέων σε ασθενείς με νόσο του Crohn είναι ελλιπείς.

6.4.3 Έλμινθες

Στις δυτικές κοινωνίες οι σύγχρονες πρακτικές υγιεινής εξασφαλίζουν την προστασία από παρασιτικούς έλμινθες. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι άνθρωποι που προστατεύονται από τέτοιου είδους μολύνσεις έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποια διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά συνέπεια οι άνθρωποι που ζουν σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες πιθανόν να προστατεύονται από την εμφάνιση ΙΦΝΕ μέσω αυτού του μηχανισμού. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν πως επίμυες των οποίων το γαστρεντερικό σύστημα έχει αποικηθεί από έλμινθες προστατεύονται από την ανάπτυξη χημικής κολίτιδας. Όλα τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με την υπόθεση της υγιεινής που έχει περιγραφεί για την παθογένεση των ΙΦΝΕ. Φαίνεται, λοιπόν, πως η έκθεση σε έλμινθες μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ή ακόμη και στη βελτίωση αυτών των νοσημάτων. Σε μία μικρή κλινική μελέτη χορηγήθηκαν σε 29 ασθενείς με ενεργή νόσο του Crohn 2500 ζωντανοί *Trichuris suis* έλμινθες ανά 3 εβδομάδες για 24 εβδομάδες (Triantafillidis et al, 2011). Την 24η εβδομάδα το 79.3% (23 άτομα) των ασθενών ανταποκρίθηκαν και βελτιώθηκε η κλινική τους κατάσταση χωρίς να προκύψει καμία αρνητική επίδραση από τη χορήγηση των *Trichuris suis* (Summers et al, 2005).

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

7.1 Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζωων

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 32 υγιείς, και θηλυκοί επίμυες τύπου Wistar, ηλικίας 2-2.5 μηνών που προήλθαν από εγκεκριμένη μονάδα παροχής πειραματόζωων. Είχαν ώριμο



πεπτικό σωλήνα και σύνηθες μικροβιακό φορτίο. Η παραλαβή τους στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις ακολουθήθηκε από μία περίοδο εγκλιματισμού για 2 εβδομάδες. Οι επίμυες διαβίωναν σε ανοξείδωτα κελιά (8 επίμυες ανά κελί) υπό ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50%) διατηρώντας κύκλο φωτός-σκότους 12:12 ώρες. Η συνήθης διατροφή τους (ΣΔ) ήταν τυποποιημένη τροφή εργαστηρίου με συγκεκριμένη σύσταση μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών. Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη. Η μελέτη έχει εγκριθεί από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Περιφέρειας Αττικής και όλοι οι χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τις διατάξεις του ΠΔ160/91.

Εικόνα 2. Επίμυες τύπου Wistar σε ανοξείδωτο κελί

7.2 Πειραματικό ζωικό πρότυπο νόσου του Crohn

Αντιδραστήρια:

Σεβοφλουράνιο (8%), τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS), φυσιολογικός ορός, αιθανόλη 50% σε φυσιολογικό ορό

Όργανα:

Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: φλεβοκαθετήρες (Brown Vasofix 17G), σύριγγες όγκου 1mL, χειρουργικές λαβίδες Adson

Κλωβός εισπνευστικής αναισθησίας

Ποτήρι ζέσεως όγκου 250ml, ογκομετρικός κύλινδρος όγκου 100mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτική πορεία:

Την ημέρα έναρξης των πειραμάτων (ημέρα 0), καταγράφεται το σωματικό βάρος (ΣΒ) όλων των ζώων. Ακολούθως, πραγματοποιείται εισπνευστική αναισθησία. Για το σκοπό αυτό οι επίμυες τοποθετούνται για 1 min σε κλωβό με σεβοφλουράνιο 8%. Έτσι προκαλείται ελαφριά νάρκωση και μυοχάλαση που επιτρέπει τόσο τους χειρισμούς όσο και την γρήγορη ανάνηψη. Έπειτα, το ζωικό πρότυπο νόσου Crohn αναπτύσσεται με ενδοκολονική χορήγηση διαλύματος TNBS (100mg/Kg ΣΒ) σε 0.25mL 50% αιθανόλη. Συγκεκριμένα, οι επίμυες ακινητοποιούνται και η παραπάνω ουσία δίνεται με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Τα 2/3 του όγκου εγχύονται κατά την είσοδο του φλεβοκαθετήρα στο κόλον και το 1/3 κατά την έξοδο. Οι επίμυες διατηρούνται σε κατακόρυφη θέση για 2 min για την αποφυγή διαρροής.



Εικόνα 3. Ενδοκολονική χορήγηση διαλύματος TNBS

7.3 Δοκιμή με μαστίχα

Αντιδραστήρια:

Σκόνη μαστίχας εμπορίου (60% μαστίχα και 40% ινουλίνη), ινουλίνη (>99% καθαρότητα)

Νερό βρύσης

Όργανα:

Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: καθετήρες (Nelaton CH08), σύριγγες όγκου 1mL και 5mL

Πλαστικές πιπέττες Pasteur μιας χρήσης, erpendorfs όγκου 1.5mL

Ποτήρι ζέσεως όγκου 250mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτική πορεία:

Η σκόνη μαστίχας χορηγείται 24 h μετά την επαγωγή της νόσου με TNBS με οισοφαγική διασωλήνωση και σε ποσότητα ίση με 100mg/kg ΣΒ. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ακινητοποίηση του επίμυ. Στη συνέχεια, ο καθετήρας τοποθετείται στον οισοφάγο και οι ουσίες δίνονται με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Συνολικά γίνονται 3 εκπλύσεις με νερό (3x1.5mL) μέχρι την απομάκρυνση όλου του προϊόντος από τον καθετήρα.

7.4 Δοκιμή με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του TNF-alpha (ινφλιξιμάμπη)

Αντιδραστήρια:

Remicade Infliximab (100mg κόνις για πυκνό διάλυμα για παρασκευή διαλύματος προς έγχυση)

Φυσιολογικός ορός (water for injection)

Όργανα:

Σύριγγες όγκου 1mL

Αναλυτική πορεία:

Η ινφλιξιμάμπη χορηγείται 24 h μετά την επαγωγή της νόσου με TNBS και σε ποσότητα ίση με 5mg/kg ΣΒ. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ακινητοποίηση του επίμυ. Στη συνέχεια, η ινφλιξιμάμπη χορηγείται με υποδόρια ένεση.

7.5 Πειραματικές ομάδες

Συνολικά 32 επίμυες χωρίζονται με τυχαιοποιημένο τρόπο σε 4 ομάδες, από τις οποίες η ομάδα Α αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες, η ομάδες Β, Γ και Δ το πειραματικό ζωικό πρότυπο της νόσου του Crohn. Στους επίμυες της ομάδας Β δεν χορηγείται καμία ουσία, στην ομάδα Γ χορηγείται σκόνη μαστίχας ενώ σε αυτούς της ομάδας Δ χορηγείται το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του TNF-α, η ινφλιξιμάμπη. Η σκόνη μαστίχας και η ινφλιξιμάμπη χορηγούνται μία φορά ημερησίως. Η παρέμβαση διαρκεί 3 μέρες.

Πίνακας 4. Ομάδες επίμυων

Ομάδες	TNBS κολίτιδα	Σκόνη μαστίχας	Ινφλιξιμάμπη
A	-	-	-
B	+	-	-
Γ	+	+	-
Δ	+	-	+

7.6 Αναισθησία-Ευθανασία

Αντιδραστήρια:

Κεταμίνη, ξυλαζίνη, νατριούχος πεντοβαρβιτάλη, φυσιολογικός ορός, υγρό άζωτο (-196°C)

Όργανα:

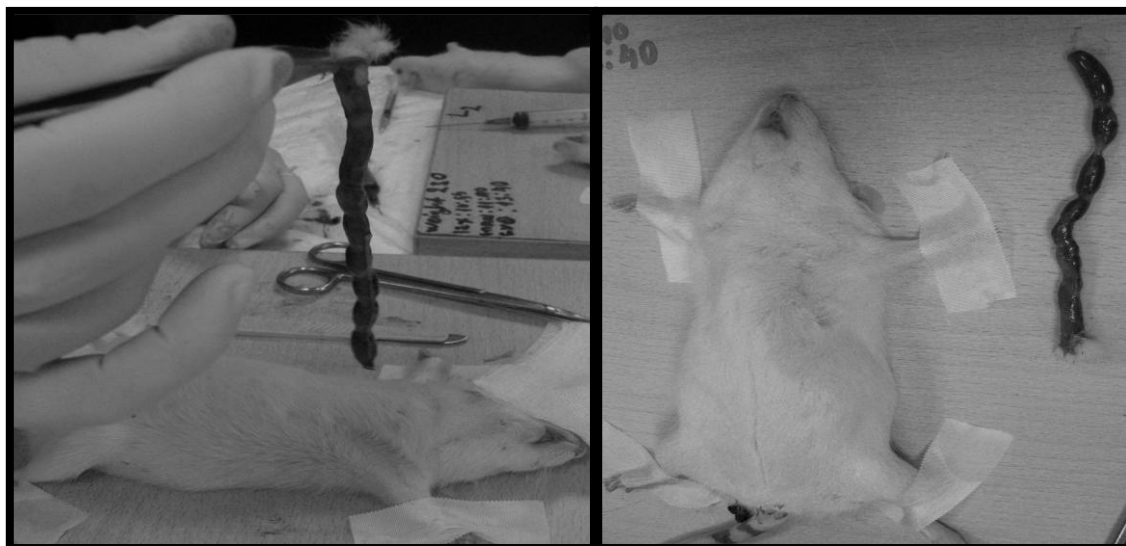
Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: σύριγγες όγκου 1mL, γάζες, χειρουργικές λαβίδες Adson, οφθαλμικά κυρτά ψαλίδια, νυστέρια μίας χρήσης (No21)

Eppendorfs όγκου 1.5mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, υπερκατάψυξη (-80°C), υγρό άζωτο (-196°C)

Αναλυτική πορεία:

Στο τέλος των πειραμάτων γίνεται καταγραφή του ΣΒ όλων των ζώων και ακολουθεί αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης/ξυλαζίνης (100mg/Kg ΣΒ και 20mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Η δράση του αναισθητικού επιβεβαιώνεται ασκώντας πίεση στα άκρα με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας. Ακολουθώς, πραγματοποιείται τομή περιπρωκτικά και αφαιρούνται 5-6cm του παχέος εντέρου με αφετηρία τον πρωκτό. Μετά από διάνοιξη του αυλού για απομάκρυνση των κοπράνων με βαμβακοφόρο στειλεό, ο ιστός φυλάσσεται σε υγρό άζωτο (-196°C) για μέτρηση παραγόντων φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Ακολουθεί ευθανασία με ενδοκαρδιακή έγχυση νατριούχου πεντοβαρβιτάλης.



Εικόνα 4. Αφαίρεση παχέος εντέρου με αφετηρία τον πρωκτό

7.7 Ομοιογενοποίηση των ιστών

Αντιδραστήρια:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 20mM και PH 7.4, 0.5M βουτυλο-υδροξυτολουόλιο (BHT) σε ακετονιτρίλιο, φυσιολογικός ορός, απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Όργανα:

Κωνικές φιάλες όγκου 50mL και 100mL, δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου όγκου 5 ή 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, erpendorfs όγκου 1.5mL, αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL και 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ομοιογενοποιητής (ULTRA-TURAX, IKA-Labortechnik), vortex, ψυχόμενη φυγόκεντρος (erpendorf centrifuge 5810R)

Αναλυτική πορεία:

Οι ιστοί ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, πλένονται με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με PBS (1mL/2g ιστού) και BHT (10μL/mL ομοιογενοποιημένου ιστού). Το BHT χρησιμοποιείται για την αναστολή της αυτόξειδωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια της ομοιογενοποίησης. Η τελευταία πραγματοποιείται σε ομοιογενοποιητή και διαρκεί περίπου 0.5 min. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντρωση (3000rcf στους 4°C) για 15min, ώστε να παραληφθεί το εκχύλισμα ιστών. Αμέσως μετά προσδιορίζεται η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford.

7.8 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford σε ιστό

Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο Bradford, ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4, πυκνό διάλυμα 1mg/mL αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA) σε PBS 20mM και PH 7.4

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Όργανα:

Φωτόμετρο Elisa (BioTek PowerWave XS2)

Eppendorfs όγκου 1.5mL, αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων

Αρχή της μεθόδου:

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

Αναλυτική πορεία:

Δείγματα ιστού: Τα ομοιογενοποιημένα εκχυλίσματα ιστών αραιώνονται με διάλυμα PBS σε αναλογία 1/20. Ακολούθως, όγκος ίσος προς 5μL από κάθε δείγμα προστίθεται σε 250μL αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αναδεύονται ήπια και παραμένουν σε ηρεμία για 5min μέχρι τη φωτομέτρησή τους στα 595nm.

Καμπύλη αναφοράς: Από το πυκνό διάλυμα 1mg/mL αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA) προετοιμάζονται δείγματα με περιεκτικότητα 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 και 1.4 μg/ml. Όγκος ίσος προς 5μL από κάθε δείγμα προστίθεται σε 250μL αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm και η προκύπτουσα γραμμική ευθεία αποδίδει εξίσωση τύπου $y = ax + \beta$ ($R^2 \approx 1$). Το «y» αντιπροσωπεύει την τιμή απορρόφησης και το «x» τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης εκφρασμένης σε μg/mL.

7.9 Μέτρηση των επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό

Αντιδραστήρια:

Εξειδικευμένα Elisa Kit για TNF-α, IL-6 και ICAM-1

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

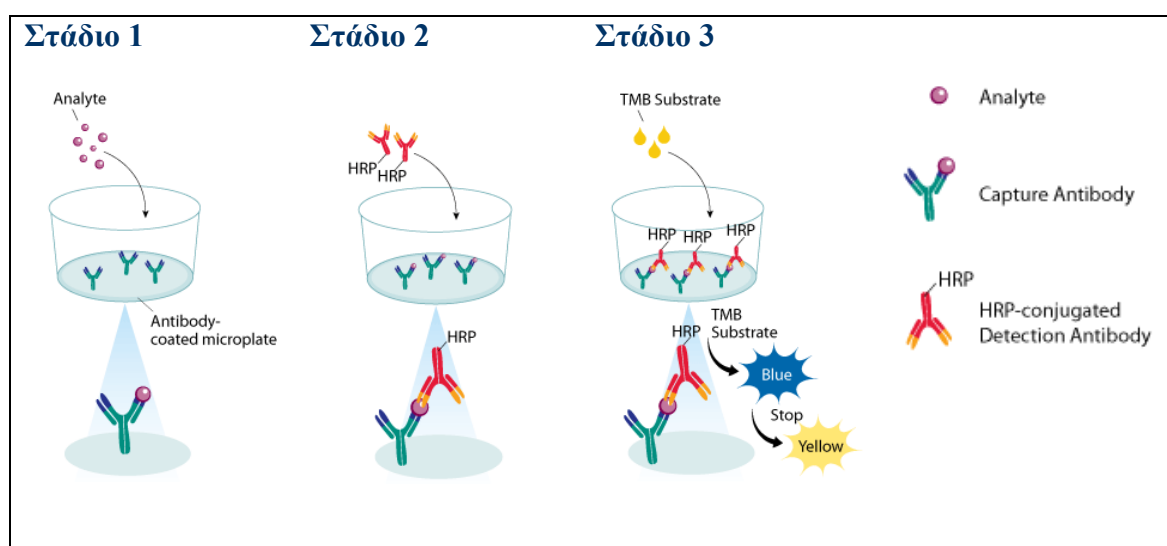
Όργανα:

Φωτόμετρο Elisa (BioTek PowerWave XS2)

Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου όγκου 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, erpendorfs όγκου 1.5mL, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων.

Αρχή της μεθόδου:

Ο παράγοντας προς μέτρηση προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Capture antibody) και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (Detection antibody) του προσδεσμένου παράγοντα στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωμομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων που λαμβάνουν χώρα για τη μέτρηση των επιπέδων των παραγόντων φλεγμονής.

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα του παράγοντα φλεγμονής στα δείγματα ιστού μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζεται το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100μL μονοκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο επωάζεται για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με

το διάλυμα πλύσης (3x400μL), ενώ παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standards, τα controls και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο προστίθενται 100μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 3 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Το τρυβλίο επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα στον ιστό εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς.

7.10 Μέτρηση των επιπέδων Μηλονικής Διαλδεΐδης (MDA) σε ιστό

Αντιδραστήρια:

Εξειδικευμένο MDA Kit

Όργανα:

Φωτόμετρο Elisa (BioTek PowerWave XS2)

Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 5mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων.

Υδατόλουτρο, απλή φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5417C), vortex.

Αρχή της μεθόδου:

Η δοκιμασία στηρίζεται στην αντίδραση του αντιδραστηρίου N-methyl-2-phenylindole με τη μηλονική διαλδεΐδη (MDA), όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής απορροφά στα 586nm.

Αναλυτική πορεία:

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

7.11 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS Statistics, version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Bonferroni test. Η τιμή $p\text{-value} < 0.05$ καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

ΜΕΡΟΣ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου (ΙΦΝΕ) περιλαμβάνουν τη νόσο του Crohn (Crohn's disease, CD) και την ελκώδη κολίτιδα (ulcerative colitis, UC). Η παθογένειά τους αναζητείται στο συνδυασμό γενετικών περιβαλλοντικών, ανοσολογικών και ψυχολογικών παραγόντων.

Στη βάση της δημιουργίας της νόσου του Crohn βρίσκεται το οξειδωτικό στρες. Όλο και περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν αυξημένη οξειδωτική βλάβη τόσο στον εντερικό βλεννογόνο όσο και στο περιφερικό αίμα ασθενών με νόσο του Crohn. Επιπλέον στα άτομα αυτά είναι μειωμένοι οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί παράγοντες (όπως η GSH). Η ανισορροπία αυτή ανάμεσα στα προ-οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά μόρια συνεπάγεται την περίσσεια των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στους ασθενείς με νόσο του Crohn. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ. Αυτό έχει ως συνέπεια την αναίτια παραγωγή κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης αφού γονιδιακά ρυθμίζονται από τον NF-κΒ. Τα μόρια αυτά αποτελούν μεσολαβητές πολλών ανοσολογικών και φλεγμονωδών διαδικασιών με κεντρικό ρόλο στα ΙΦΝΕ (Hendrickson et al, 2002, Iborra et al, 2011, Kruidenier et al, 2002).

Τα παραπάνω εξηγούν το γεγονός πως προκύπτουν όλο και περισσότερες μελέτες σχετικά με την αντιοξειδωτική και κατ' επέκταση αντιφλεγμονώδη δράση φυσικών προϊόντων στη νόσο του Crohn. Ο λόγος αυτός σε συνδυασμό με τις ποικίλες παρενέργειες και τη χαμηλή συμμόρφωση της νόσου στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση φυσικών συστατικών που δρουν ευεργετικά στην κλινική εικόνα της νόσου. Οι Bukovska et al (2007) έδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση της λήψης ελαίου σόγιας που περιείχε αιθέριο έλαιο θυμαριού και ρίγανης σε ποντίκια με TNBS κολίτιδα. Στο συγκεκριμένο πείραμα φάνηκε πως η λήψη του ελαίου μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της IL-6, της IL-1β, επιτάχυνε την ανάκτηση του σωματικού βάρους και μείωσε τη μακροσκοπική βλάβη στον ιστό του παχέος εντέρου. Οι Wu et al (2009) εξέτασαν την δράση του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από βατόμουρα σε αντίστοιχο ζωικό πρότυπο. Οι ερευνητές έδειξαν πως το συγκεκριμένο εκχύλισμα σε δοσολογία ίση με 40 mg/Kg σωματικού βάρους μείωσε τα επίπεδα της MPO, της IL-12, της TNF-α και της IFN-γ στον εντερικό ιστό των πειραματόζωων. Σε άλλα πειράματα παρόμοιου σχεδιασμού, με παρόμοια αποτελέσματα εξετάστηκε η αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος κανέλλας (Kwon et al, 2011) και του εκχυλίσματος του άγριου δενδρολίβανου που φύεται στη Βραζιλία

(*Baccharis dracunculifolia*) σε ζωικό πρότυπο που προσομοιάζει τη νόσο του Crohn (Cestari et al, 2011).

Στο πλαίσιο αυτό οι Kaliora et al (2007) μελέτησαν την επίδραση της χορήγησης 2.2g μαστίχας/ημέρα στην κλινική εικόνα ασθενών με ήπια ως μέτρια νόσο του Crohn. Οι ερευνητές μέσω της συγκεκριμένης πιλοτικής κλινικής μελέτης έδειξαν πως η μαστίχα βελτίωσε τη κλινική κατάσταση των ασθενών μειώνοντας δείκτες φλεγμονής και οξείδωσης στον ορό των ασθενών όπως η CRP και η IL-6. Σε συνέχεια της μελέτης αυτής οι Gioxari et al (2011) παρατήρησαν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση των επιπέδων του TNF- α , της IL-6, της IL-8, της MDA και του ICAM-1 στον εντερικό ιστό πειραματόζων με TNBS κολίτιδα όταν τους χορήγησαν 100mg/Kg ΣΒ μαστίχα. Στον παρόν πείραμα, σε συνέχεια των παραπάνω, χορηγήθηκαν σε ζωικό μοντέλο χημικής κολίτιδας είτε μαστίχα είτε ινφλιξιμάμπη, με σκοπό τη σύγκριση της δράσης τους. Η ποσότητα μαστίχας που χορηγήθηκε είναι η ίδια (100mg/Kg ΣΒ) με αυτή του πειράματος των Gioxari et al (2011) αφού αποδείχθηκε αποτελεσματική.

Η ινφλιξιμάμπη είναι ένας βιολογικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση της νόσου του Crohn. Πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του TNF- α . Μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητά του στην πρόκληση και διατήρηση της ύφεσης, στη μείωση της χρήσης κορτικοστεροειδών και στην επούλωση των συριγγίων του εντερικού βλεννογόνου. Η ποσότητα που χορηγήθηκε στους επίμυες είναι 5mg/Kg ΣΒ που συνήθως εφαρμόζεται τόσο σε ζωικά πρότυπα κολίτιδας όσο και στους ασθενείς με νόσο του Crohn (Fries et al, 2008, Sandborn et al, 1999).



Εικόνα 6. Remicade Infliximab, φαρμακευτικό σκεύασμα ινφλιξιμάμπης

8.1 Το πειραματικό μοντέλο TNBS κολίτιδας

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλά ζωικά πρότυπα χημικής κολίτιδας με στόχο τη διερεύνηση και τον εντοπισμό της ανοσοπαθογένειας των ΙΦΝΕ. Τα πρότυπα αυτά ποτέ δεν προσομοιάζουν επακριβώς με την ασθένεια στους ανθρώπου, ωστόσο είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην αξιολόγηση νέων αντιφλεγμονωδών και θεραπευτικών μέσων. Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τέτοια μοντέλα είναι η χρήση του TNBS που πραγματοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία και αναπτύχθηκε από τους Morris et al, 1989. Μιμείται επαρκώς ανοσολογικά, ιστολογικά και κλινικά ευρήματα της νόσου του Crohn καθώς η εντερική φλεγμονή που προκαλεί μεσολαβείται από την Th1 ανοσολογική απόκριση. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IFN- γ , ο TNF- α , η IL-6 και η IL-12 (Velde et al, 2006). Ιστολογικά περιλαμβάνει τη διήθηση του βλεννογόνου από πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα του συνδετικού ιστού και ινοβλάστες (Morris et al, 1989). Συνήθως προκαλείται με ενδοκολονική έγχυση διαλύματος TNBS σε αιθανόλη (Velde et al, 2006).

8.2 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου του Crohn

Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο σωματικό βάρος των πειραματόζωων από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 4 της ευθανασίας δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Οι πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- ❖ ΟΜΑΔΑ Α: υγιείς
- ❖ ΟΜΑΔΑ Β: χημική κολίτιδα
- ❖ ΟΜΑΔΑ Γ: χημική κολίτιδα + 100 mg/Kg ΣΒ μίγμα σκόνης μαστίχας και ινουλίνης (6:4)
- ❖ ΟΜΑΔΑ Δ: χημική κολίτιδα + 5mg/Kg ΣΒ ινφλιξιμάμπη

8.3 Επίπεδα δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στον ιστό εντέρου των πειραματόζωων

Τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής στο συγκεκριμένο πείραμα εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Πρόκειται για μία εξαιρετικά ευαίσθητη ανοσοενζυμική μέθοδο που ανιχνεύει και προσδιορίζει ποσοτικά με μεγάλη εξειδίκευση τη συγκέντρωση διαλυτών πρωτεϊνών, κυτταροκινών και άλλων μορίων όπως η IL-6, ο ICAM-1 και ο TNF- α . Τα επίπεδα του δείκτη οξείδωσης MDA εκτιμήθηκε με τη χρήση εξειδικευμένου MDA kit που βασίζεται σε μία χρωμομετρική αντίδραση. Επειδή η παραγωγή των παραγόντων που μετρήθηκαν είναι παροδική, απαιτείται άμεση τοποθέτηση σε βαθιά κατάψυξη (χρήση υγρού αζώτου, -196°C). Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η οξείδωση και κατ' επέκταση η καταστροφή των ιστών.



Εικόνα 7. Πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων

8.3.1 Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου των πειραματόζωων

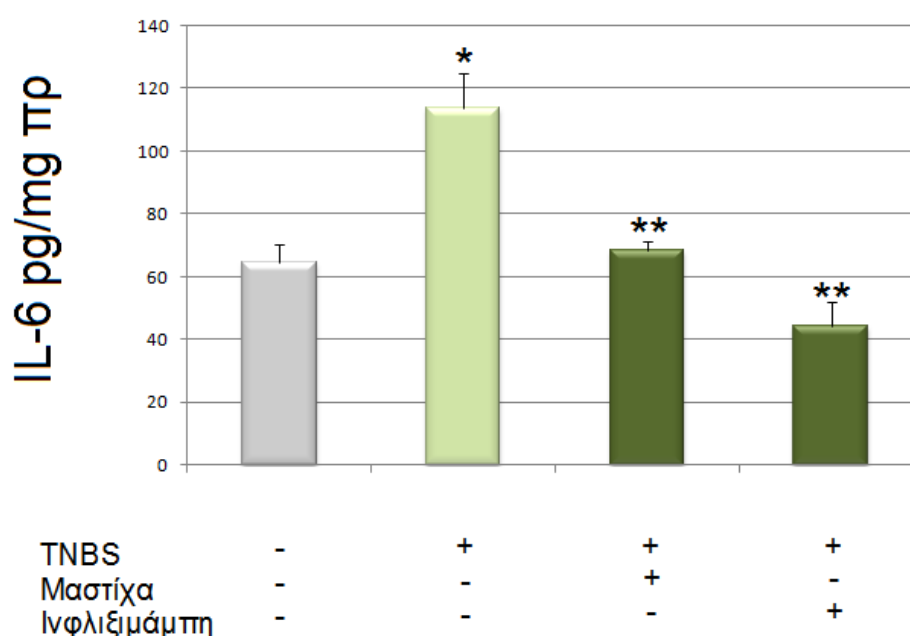
Η IL-6 είναι μία κυτταροκίνη με κεντρικό ρόλο στη νόσο του Crohn. Παράγεται από ένα αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων των ενεργοποιημένων μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων (Podolsky et al, 2002). Συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό κρίσιμων λειτουργιών όπως η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων και η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των B-κύτταρων. Ενεργοποιεί την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ και συμβάλλει στη δημιουργία φλεγμονής (Xing et al, 1998). Τα επίπεδα της IL-6 συσχετίζονται με πολλά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου του Crohn (Sanchez-Muñoz et al, 2008). Οι Yamamoto et al (2000) όταν χορήγησαν μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της IL-6 σε ζωικό πρότυπο κολίτιδας παρατήρησαν πως μείωσε το mRNA προφλεγμονωδών κυτταροκινών

όπως η IFN- γ , ο TNF- α και η IL-1 β ενώ παράλληλα κατέστειλε την έκφραση πολλών μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο του παχέος εντέρου. Ακόμα, το αντίσωμα έδρασε ευεργετικά στη φλεγμονή μειώνοντας την παραγωγή και αυξάνοντας την απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της IL-6 στον εντερικό ιστό των πειραματόζωων του παρόντος πειράματος αλλά και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με την ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

Πίνακας 5. Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα)

Ομάδα	IL-6 (pg/mg πρ)	p-value
A	64.59 $\pm$ 5.56	<0.001
B	113.67 $\pm$ 11.14	-
Γ	68.26 $\pm$ 3.14	0.001
Δ	44.18 $\pm$ 7.88	<0.001



Σχήμα 5. Επίπεδα IL-6 στον ιστό εντέρου, σύγκριση μεταξύ των ομάδων

Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στα επίπεδα της IL-6 στον εντερικό ιστό μεταξύ της ομάδας των υγιών επίμυων και της ομάδας των ασθενών όπου ήταν αυξημένα (*). Αυτό αποδεικνύει την επιτυχή επαγωγή χημικής κολίτιδας μέσω της ενδοκολονικής χορήγησης του TNBS. Το ίδιο ισχύει για όλους τους δείκτες που μετρήθηκαν στον εντερικό ιστό εκτός του TNF- α . Μετά τη χορήγηση μαστίχας και ινφλιξιμάμπης τα επίπεδα της IL-6 στον ιστό ήταν στατιστικά σημαντικά ($p \leq 0.001$) μειωμένα στις ομάδες Γ και Δ αντίστοιχα (**).

Τα ευρήματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη κλινική μελέτη όπου η λήψη μαστίχας για 4 εβδομάδες μείωσε τα επίπεδα της IL-6 σε ασθενείς με ήπια ως μέτρια νόσο του Crohn (Kaliora et al, 2007a). Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα του πειράματος των Gioixari et al (2011) σχετικά με την IL-6. Λαμβάνοντας κανείς υπόψη τα παραπάνω συμπεραίνει πως η μαστίχα μπορεί να βελτιώσει την ιστολογική εικόνα του εντέρου στη νόσο του Crohn μειώνοντας τα επίπεδα της IL-6.

8.3.2 Επίπεδα ICAM-1 στον ιστό εντέρου των πειραματόζωων

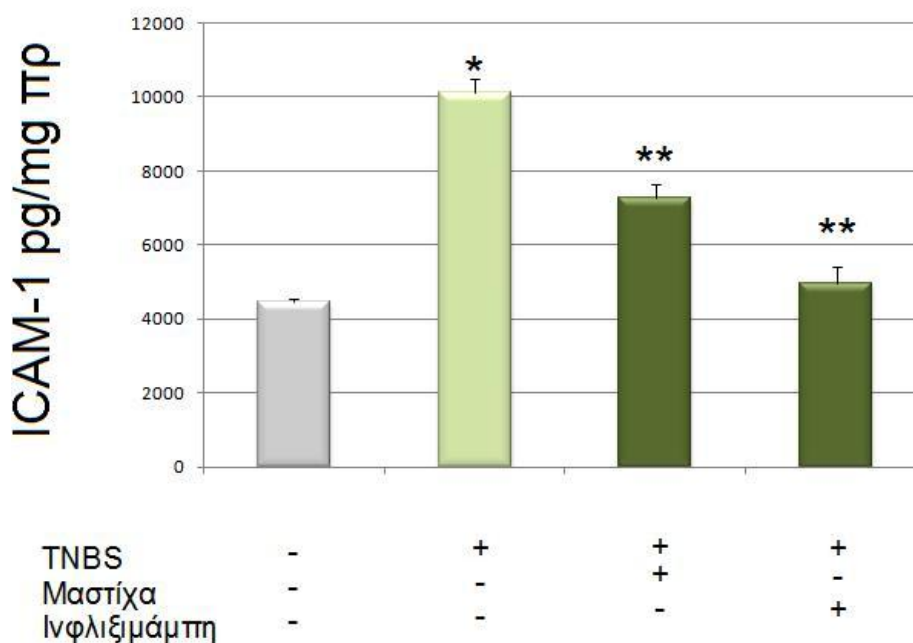
Το διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (ICAM-1) παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμβάλλει στη σύνδεση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν τη σημασία των πολυμορφισμών του ICAM-1 στα ΙΦΝΕ. Ο ICAM-1 συνδέει τα λευκοκύτταρα στον εντερικό ιστό μέσω του LFA-1 και του Mac-1. Η έκκρισή του αποτελεί απάντηση στην προφλεγμονώδη διέγερση από μόρια όπως ο TNF- α και η IFN- γ (Braun et al, 2001, Yacyshyn et al, 2005).

Στον ορό ασθενών με νόσο του Crohn έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα του ICAM-1 (Liu et al, 1997, Goke et al, 1997). Τα τελευταία χρόνια γίνονται ολοένα και περισσότερες προσπάθειες για την ανάπτυξη φαρμάκων που θα αναστέλλουν την έκφραση του ICAM-1, άρα και τη διήθηση των λευκοκυττάρων στον φλεγμένοντα ιστό (Philpott et al, 2008).

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του ICAM-1 στον εντερικό ιστό των πειραματόζωων του παρόντος πειράματος αλλά και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με τη ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

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

Ομάδα	ICAM-1 (pg/mg πρ)	p-value
A	4483.07±73.64	<0.001
B	10103.79±411.97	-
Γ	7282.92±367.21	<0.001
Δ	4954.04±464.7	<0.001



Σχήμα 6. Επίπεδα ICAM-1 στον ιστό εντέρου, σύγκριση μεταξύ των ομάδων

Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στα επίπεδα του ICAM-1 στον εντερικό ιστό μεταξύ της ομάδας των υγιών επίμυων και της ομάδας των ασθενών όπου ήταν αυξημένα (*). Μετά τη χορήγηση μαστίχας και ινφλιξιμάμπης τα επίπεδα του ICAM-1 στον ιστό ήταν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) μειωμένα στις ομάδες Γ και Δ αντίστοιχα (**).

Τα ευρήματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του πειράματος των Giochari et al (2011) όπου η χορήγηση μαστίχας μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του ICAM-1 στους επίμυες. Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται πως η ευεργετική

δράση της μαστίχας στο ζωικό πρότυπο ΙΦΝΕ στηρίζεται και στη μείωση των επιπέδων ICAM-1 και κατ' επέκταση της διήθησης του εντερικού βλεννογόνου από λευκοκύτταρα.

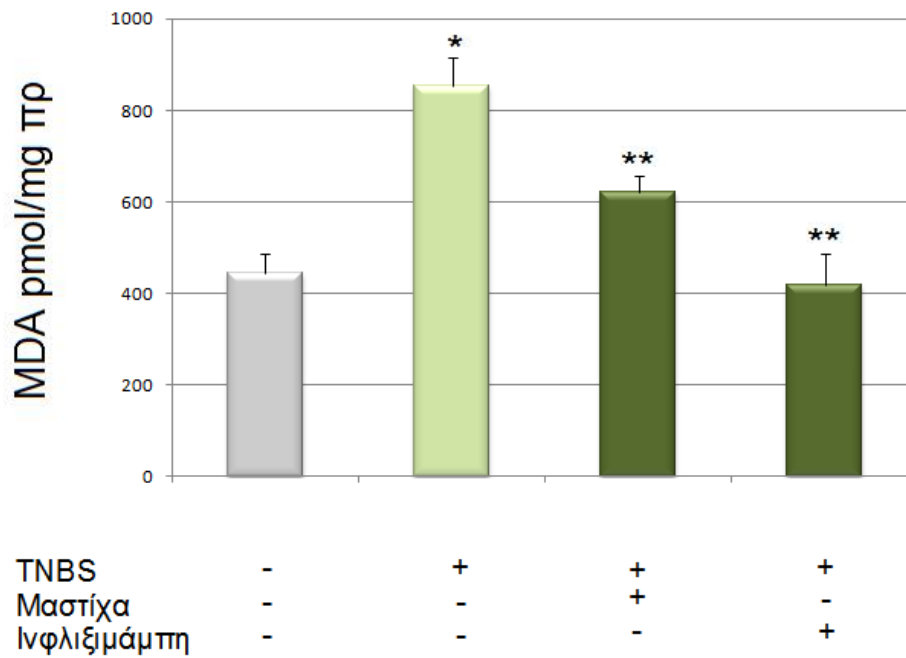
8.3.3 Επίπεδα μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) στον ιστό εντέρου των πειραματόζων

Το οξειδωτικό στρες και η υπεροξείδωση των λιπιδίων που επιφέρει διαταράσσουν την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και ενεργοποιούν διάφορους μεσολαβητές της φλεγμονής οδηγώντας σε ιστική βλάβη. Τα επίπεδα της MDA χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτης οξειδωτικής βλάβης και ως δείκτης υπεροξείδωσης των λιπιδίων από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Έχει αποδειχθεί πως στα άτομα που πάσχουν από ΙΦΝΕ αλλά και στα ζωικά πρότυπα των νοσημάτων αυτών τα επίπεδα της MDA στον εντερικό αυλό είναι αυξημένα. Παράλληλα έχει βρεθεί πως τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η SOD είναι μειωμένα (Girgin et al, 2000, Verspaget et al, 1988). Η ανισορροπία αυτή ανάμεσα στους προ-οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, που χαρακτηρίζει τη νόσο του Crohn, πυροδοτεί τη φλεγμονή (Head et al, 2003).

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του MDA στον εντερικό ιστό των πειραματόζων του παρόντος πειράματος αλλά και η σύγκριση μεταξύ κάθε ομάδας με τη ομάδα Β (χημική κολίτιδα).

Πίνακας 7. Επίπεδα MDA στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα)

Ομάδα	MDA(pmol/mg πρ)	p-value
A	445.19 $\pm$ 43.37	<0.001
B	853.25 $\pm$ 63.74	-
Γ	619.96 $\pm$ 36.97	0.031
Δ	418.49 $\pm$ 67.38	<0.001



Σχήμα 7. Επίπεδα MDA στον ιστό εντέρου, σύγκριση μεταξύ των ομάδων

Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στα επίπεδα του MDA στον εντερικό ιστό μεταξύ της ομάδας των υγιών επίμυων και της ομάδας των ασθενών όπου ήταν αυξημένα (*). Μετά τη χορήγηση μαστίχας και ινφλιξιμάμπης τα επίπεδα του MDA στον ιστό ήταν στατιστικά σημαντικά ($p < 0.001$) μειωμένα στις ομάδες Γ και Δ αντίστοιχα (**).

Το γεγονός πως η χορήγηση μαστίχας οδήγησε στη μείωση των επιπέδων της MDA στον ιστό πειραματόζων υποδεικνύει πως η επίδρασή της στα ΙΦΝΕ συνδέεται στενά με την αντιοξειδωτική της δράση. Η δράση αυτή της μαστίχας έχει διαπιστωθεί από τους Kaliora et al (2007) όταν η χορήγησή της αύξησε στατιστικά σημαντικά τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ασθενών με ήπια ως μέτρια νόσο του Crohn. Η αντιοξειδωτική δράση της μαστίχας φάνηκε και στις μελέτες των Dedoussis et al (2004) και Andrikopoulos et al (2003) όπου μείωσε την κυτταροτοξικότητα οφειλόμενη στην οξειδωμένη LDL σε μονοκύτταρα κύτταρα και ανέστειλε την οξείδωση της LDL αντίστοιχα.

8.3.4 Επίπεδα TNF-α στον ιστό εντέρου των πειραματόζων

Ο TNF-α διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της φλεγμονής στη νόσο του Crohn αλλά και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα επίπεδά του στον εντερικό ιστό, στον ορό

αλλά και στα κόπρανα των ατόμων που πάσχουν από νόσο του Crohn είναι σημαντικά αυξημένα (Ma et al, 2005, Nicholls et al, 1993)

Οι προτεινόμενες προφλεγμονώδεις δράσεις του TNF-α περιλαμβάνουν τη διέγερση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, μακροφάγων, την αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ενεργοποίηση της απάντησης οξείας φάσης (Ma et al, 2004).

Πίνακας 8. Επίπεδα TNF-α στον ιστό εντέρου (Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα)

Ομάδα	TNF-α(pg/mg πρ)	p-value
A	54.23 $\pm$ 6.6	1.000
B	63.98 $\pm$ 9.73	-

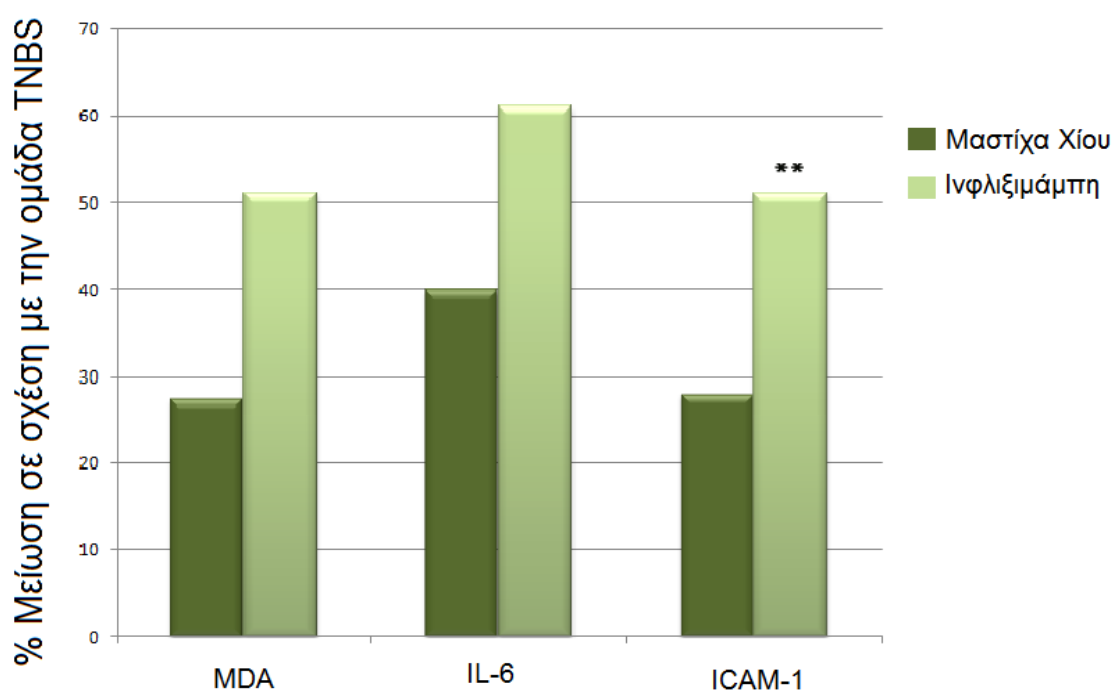
Η μέτρηση των επιπέδων του TNF-α στον εντερικό ιστό των πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτή η έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας αφορά τόσο στις ομάδες παρέμβασης όσο και στη διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των υγιών και των ασθενών επίμυων όπως φαίνεται και στον πίνακα 8.

8.3.5 Σύγκριση των ομάδων της μαστίχας και της ινφλιξιμάμπης

Στον πίνακα 9 και στο σχήμα 8 φαίνεται η ποσοστιαία μείωση των επιπέδων της MDA, της IL-6 και του ICAM-1 στις ομάδες παρέμβασης (Γ και Δ) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (B). Σε κάθε περίπτωση φαίνεται η τάση πως η ινφλιξιμάμπη είναι αποτελεσματικότερη της μαστίχας στη μείωση των δεικτών φλεγμονής και οξειδωσης της TNBS κολίτιδας.

Πίνακας 9. Μείωση των επιπέδων MDA, IL-6 και ICAM-1 σε σχέση με την ομάδα της TNBS κολίτιδας.

% μείωση στις ομάδες παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα της TNBS κολίτιδας	MDA	IL-6	ICAM-1
Μαστίχα	27.3%	39.9%	27.9%
Ινφλιξιμάμπη	51%	61.1%	51%



Σχήμα 8. Μείωση των επιπέδων MDA, IL-6 και ICAM-1 σε σχέση με την ομάδα της TNBS κολίτιδας, σύγκριση μεταξύ των ομάδων της Μαστίχας και της Ινφλιξιμάμπης

Στον πίνακα 10 φαίνεται η αποτελεσματικότητα της μαστίχας στο ζωικό πρότυπο χημικής κολίτιδας εκφρασμένη ως ποσοστό της αποτελεσματικότητας της ινφλιξιμάμπης. Παρατηρούμε, λοιπόν, πως στους δείκτες MDA, IL-6 και ICAM-1 η χορήγηση μαστίχας προκάλεσε μείωση ίση με το 53.5%, 65.3% και 54.7% της αντίστοιχης μείωσης που προκάλεσε η χορήγηση ινφλιξιμάμπης.

Πίνακας 10. Έκφραση της δραστικότητας της μαστίχας ως ποσοστό της δραστικότητας της ινφλιξιμάμπης.

Δείκτες φλεγμονής και οξειδωσης	Δράση μαστίχας ως ποσοστό της δράσης της ινφλιξιμάμπης
MDA	53.5%
IL-6	65.3%
ICAM-1	54.7%

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η μαστίχα οδηγεί σε μείωση της φλεγμονής στη νόσο του Crohn και στο ζωικό πρότυπό της διερευνήθηκε για πρώτη φορά από τους Papalois et al (2012). Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* μοντέλο φλεγμονής, όπου διεγερμένα μακροφάγα επιδρούν σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου, διερεύνησαν το μηχανισμό δράσης της μαστίχας στο επιθήλιο. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος οδηγούν στην υπόθεση πως η μαστίχα αναστέλλει το μονοπάτι που πυροδοτείται από τον NF-κΒ και απενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση της IL-8 και του ICAM-1. Η απενεργοποίηση του NF-κΒ οδηγεί στην έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων, την αναστολή της ιστικής βλάβης και την προστασία του εντερικού φραγμού.

Ο NF-κΒ είναι μια διμερής πρωτεΐνη που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, IL-8 και TNF-α) και συνδετικών μορίων (ELAM-1, ICAM-1). Σχηματίζεται από την ένωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών της οικογένειας Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p52 p50). Στην ανενεργή του μορφή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με μία ρυθμιστική πρωτεΐνη, την IκΒ. Η ενεργοποίησή του προκαλείται από παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή (TNF-α). Ο NF-κΒ λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για τουλάχιστον 200 γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Atreya et al, 2008, Johnson, 2007).

Η έκφραση και η ενεργοποίηση του NF-κΒ είναι αυξημένη στον εντερικό αυλό ασθενών με ενεργή ΙΦΝΕ. Ειδικότερα, σε μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από τον εντερικό ιστό ασθενών με ΙΦΝΕ βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του NF-κΒ p65 (Neurath et al, 1996). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός πως η ποσότητα των ενεργοποιημένων NF-κΒ σχετίζεται σημαντικά με τη σοβαρότητα της νόσου (Rogler et al, 1998).

Η προσθήκη φυσικών προϊόντων όπως η μαστίχα στη θεραπεία των ΙΦΝΕ είναι μια ελκυστική πρόταση για το μέλλον, ιδιαίτερα αν αναλογιστούμε την πληθώρα των αρνητικών συνεπειών της λήψης φαρμακευτικής αγωγής. Η πλήρης αντικατάσταση της τελευταίας από φυσικά προϊόντα σίγουρα δεν είναι δυνατή, ωστόσο η παράλληλη χορήγηση με στόχο τον καλύτερο έλεγχο της φλεγμονής και τη μείωση της δοσολογίας των φαρμάκων αποτελεί μια ελκυστική προοπτική. Η μείωση της δοσολογία των φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι αυτή που θα οδηγήσει και στη μείωση των αρνητικών ενεργειών τους.

Συγκεκριμένα, η ινφλιξιμάμπη είναι ένας βιολογικός παράγοντας με αρκετές παρενέργειες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ηπατικές διαταραχές όπως η χολοκυστίτιδα, η χολολιθίαση, η μη λοιμώδης ηπατίτιδα και ο ίκτερος, οι αλλεργικές αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση του φαρμάκου, οι κακοήθειες όπως το λέμφωμα και η επιδείνωση της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας (Smolen et al, 2011). Ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα για τους ασθενείς που λαμβάνουν φάρμακα που παρεμβαίνουν στο ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι ο αυξημένο κίνδυνος ανάπτυξης ευκαιριακών λοιμώξεων (Ferkolj, 2009). Τέλος, πρόσφατα στοιχεία αναφέρουν τον πιθανό ρόλο των βιολογικών παραγόντων όπως η ινφλιξιμάμπη και το adalimumab στην πρόκληση νεφρικής ανεπάρκειας (Oikonomou et al, 2011).

8.4 Συμπεράσματα

Συνολικά τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με την κλινική μελέτη των Kaliora et al (2007), οι οποίοι παρατήρησαν μείωση των CDAI, IL-6 και CRP στο πλάσμα ασθενών με ήπια έως μέτρια νόσο του Crohn μετά τη λήψη 2,2 gr μαστίχας ημερησίως για 4 εβδομάδες. Παράλληλα τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Gioxari et al (2011), οι οποίοι έδειξαν πως η χορήγηση 100mg/Kg ΣΒ μαστίχας για 3 ημέρες σε επίμυες με TNBS κολίτιδα οδήγησε σε μείωση των TNF-α, IL-6, IL-8, ICAM-1 και MDA. Στο παρόν πείραμα η επίδραση τόσο της μαστίχας όσο και της ινφλιξιμάμπης στη μείωση της φλεγμονής ήταν εμφανής στις μετρήσεις της IL-6, του ICAM-1 και της MDA. Και για τους 3 δείκτες η διαφορά των ομάδων παρέμβασης με την ομάδα των ασθενών ήταν στατιστικά σημαντική. Φάνηκε, επίσης, πως η δράση της μαστίχας αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% της δράσης της ινφλιξιμάμπης. Τα παραπάνω οδηγούν στην ένδειξη πως η μαστίχα ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση στη νόσο του Crohn μέσω του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα της. Τα ευρήματα των έως τώρα μελετών που αφορούν στη μαστίχα δίνουν ενδείξεις για την ανάδειξή της ως ένα φυσικό προϊόν με διατροφοφαρμακευτικές ιδιότητες. Η χρήση φυσικών προϊόντων με αντιοξειδωτική

και αντιφλεγμονώδη δράση συμπληρωματικά της φαρμακευτικής θεραπείας αποτελεί μια ιδιαιτέρως ελκυστική πρόταση για τον καλύτερο έλεγχο και τον περιορισμό της φλεγμονώδους διαδικασίας. Θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο εάν τα προϊόντα αυτά μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με στόχο τη μείωση των φαρμακευτικών δόσεων που χρησιμοποιούνται. Προς επίρρωση των παραπάνω θα πρέπει να αναλογιστούμε τις έντονες παρενέργειες και τη χαμηλή συμμόρφωση της νόσου του Crohn στην φαρμακευτική της θεραπεία. Τέλος, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών όπου θα δοκιμάζεται η συνδυαστική χορήγηση της μαστίχας και της ινφλιξιμάμπης αλλά και μελετών που θα αφορούν στα επίπεδα τοξικότητας της μαστίχας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akobeng AK. Review article: the evidence base for interventions used to maintain remission in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 2008, 28, 373-374.
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-κB in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*. 2008, 263, 591-596.
- Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN et al. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytotherapy research*. 2003, 17, 501–507.
- Behr M. The path to Crohn's disease: is mucosal pathology a secondary event? *Inflammatory bowel diseases*. 2010, 16, 896–902.
- Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology*. 2004, 18, 463-479.
- Borowiec A, Fedorak R. Predicting, treating and preventing postoperative recurrence of Crohn's disease: The state of the field. *Canadian journal of gastroenterology*. 2011, 25, 140-146.
- Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M et al. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2006, 4, 744-753.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Immunology*. 2003, 3, 521-533.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology*. 2008, 214, 149–160.
- Braun C, Zahn R, Martin K et al. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with inflammatory bowel disease, regardless of the p-ANCA status. *Clinical immunology*. 2001, 101, 357-360.
- Bukovska A, Cikos S, Juhas S et al. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of inflammation*. 2007, 2007.
- Buning C, Lochs H. Conventional therapy for Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2006, 12, 4794-4806.

- Burakoff R, Barish CF, Riff D et al. A phase 1/2A trial of STA-5326, an oral interleukin-12/23 inhibitor, in patients with active moderate to severe Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006, 12, 558-565.
- Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG et al. Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. *Revista do Hospital das Clínicas*. 2002, 57, 187-198.
- Carr A, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 1999, 69, 1086–1107.
- Cestari SH, Bastos JK, Di Stasi LC. Intestinal anti-Inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*. 2011, 2011.
- Damjanov I., Μουτσόπουλος Χ. Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου Στο: *Παθοφυσιολογία*. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 2009: 397-399.
- Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*. 2006, 12, 4807-4812.
- Danese S, Semeraro S, Papa A et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease *World J Gastroenterol* 2005, 11, 7227-7236.
- Danner M, Kasl SV, Abramson JL et al. Association between depression and elevated C-reactive protein. *Psychosomatic medicine*. 2003, 65, 347–356.
- Dedoussis GV, Kaliora AC, Psarras S et al. Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*. 2004, 174, 293-303.
- Economou M, Pappas G. New global map of Crohn's disease: genetic, environmental and socioeconomic correlations. *Inflammatory bowel diseases*. 2008, 14, 709-720.
- Etchevers MJ, Aceituno M, Sans M. Are we giving azathioprine too late? The case for early immunomodulation in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008, 14, 5512-5518.

- Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*. 2006, 12, 5941-5950.
- Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of active Crohn's disease with MLN0002, a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *Clinical gastroenterology and hepatology*. 2008, 6, 1370–1377.
- Feagan BG, Le'mann M, Befrits R et al. Recommendations for the treatment of Crohn's disease with tumor necrosis factor antagonists: an expert consensus report. *Inflammatory bowel diseases*. 2012, 18,152–160.
- Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U et al. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: the EPIC randomized controlled trials. *The journal of the American Medical Association*. 2008, 299, 1690-1697.
- Fedorak R, Wong K, Bridges R. Canadian Digestive Health Foundation Public Impact Series. Inflammatory bowel disease in Canada: Incidence, prevalence, and direct and indirect economic impact. *Canadian journal of gastroenterology*. 2010, 24, 651-655.
- Feldman PA, Wolfson D, Barkin JS. Medical management of Crohn's disease. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2007, 20, 269–281.
- Feller M, Huwiler K, Schoepfer A et al. Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clinical infectious diseases*. 2010, 50, 473–480.
- Ferguson A, Glen M, Ghosh S. Crohn's disease: nutrition and nutritional therapy. *Bailliere's clinical gastroenterology*. 1998, 12, 93-114.
- Ferkolj I. How to improve the safety of biologic therapy in Crohn's disease. *Journal of physiology and pharmacology*. 2009, 60, 67-70.
- Fries W, Muja C et al. Infliximab and etanercept are equally effective in reducing enterocyte apoptosis in experimental colitis. *International journal of medical sciences*. 2008, 5, 169-180.
- Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International journal of food microbiology*. 2007, 115, 1–11.

- Gerasimidis K, McGrogan P, Edwards CA. The aetiology and impact of malnutrition in paediatric inflammatory bowel disease. *Journal of human nutrition and dietetics*. 2011, 24, 313–326.
- Gionchetti P, Calabrese C, Tambasco R et al. Role of conventional therapies in the era of biological treatment in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2011, 17, 1797-1806.
- Girgin F, Karaoglu O, Erkus M et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. 2000, 59, 641-652.
- Göke M, Hoffmann JC, Evers J et al. Elevated serum concentrations of soluble selectin and immunoglobulin type adhesion molecules in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*. 1997, 32, 480-486.
- Goodgame RW, Kimball K, Akram S et al. Randomized controlled trial of clarithromycin and ethambutol in the treatment of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 2001, 15, 1861-1866.
- Gorard DA, Hunt JB, Payne-James JJ et al. Initial response and subsequent course of Crohn's disease treated with elemental diet or prednisolone. *Gut*. 1993; 34: 1198-1202.
- Greenberg GR, Fleming CR, Jeejeebhoy KN et al. Controlled trial of bowel rest and nutritional support in the management of Crohn's disease. *Gut*. 1988, 29, 1309-1315.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M et al. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 2000, 45, 1462-1464.
- Hanauer SB. Positioning biologic agents in the treatment of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009, 15, 1570–1582.
- Head KA, Jurenka JS. Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis-Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alternative medicine review*. 2003, 8, 247-283
- Head KA, Jurenka JS. Inflammatory Bowel Disease Part II: Crohn's Disease-Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alternative medicine review*. 2004, 9, 360-401.

- Heap G, van Heel DA. The genetics of chronic inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics*. 2009, 18, 101-106.
- Hébuterne X, Filippi J, Al-Jaouni R et al. Nutritional consequences and nutrition therapy in Crohn's disease. *Gastroenterologie Clinique et biologique*. 2009, 33, 235-244.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clinical microbiology reviews*. 2002, 15, 79-94.
- Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut*. 2006, 55, 1131–1137.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001, 411, 599-603.
- Huibregtse IL, van Lent AU, van Deventer SJ. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut*. 2007, 56, 584–592.
- Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: A trendy topic once again? *Canadian journal of gastroenterology*. 2010, 24, 127-133.
- Iborra M, Moret I, Rausell F et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochemical society transactions*. 2011, 39, 1102–1106.
- Ioannidis O, Varnalidis I, Paraskevas G et al. Nutritional modulation of the inflammatory bowel response. *Digestion*. 2011, 84, 89–101.
- Irving PM, Geary RB, Sparrow MP et al. Review article: appropriate use of corticosteroids in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 2007, 26, 313-329.
- Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004, 126, 989–996.
- Johnson IT. Phytochemicals and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007, 66, 207-215.
- Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK et al. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2007, 13, 748-753.

- Kaser A, Zeissig S, Blumber RS. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Digestive diseases*. 2010, 28, 395–405.
- Kleinman RE, Baldassano RN, Caplan A et al. Nutrition support for pediatric patients with inflammatory bowel disease: a clinical report of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology And Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2004, 39, 430.
- Knigge KL. Inflammatory Bowel Disease. *Clinical cornerstone*. 2002, 4, 49-60.
- Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Drug discovery*. 2006, 5, 197-209.
- Kruidenier L, Verspaget HW. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 2002, 16, 1997–2015.
- Kuroki F, Iida M, Matsumoto T et al. Serum n3 polyunsaturated fatty acids are depleted in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 1997, 42, 1137-1141.
- Kwon HK, Hwang JS, Lee CG et al. Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. *World journal of gastroenterology*. 2011, 17, 976-986.
- Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OE. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Epidemiology, diagnosis, and management. *Annals of Medicine*. 2010, 42, 97–114.
- Lindsay JO, Whelan K, Stagg AJ et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2006, 55, 348–355.
- Liu ZX, Hiwatashi N, Noguchi M et al. Increased expression of costimulatory molecules on peripheral blood monocytes in patients with Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1997, 32,1241-1246.
- Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004, 126, 1504-1517.

- Lowenberg M, Peppelenbosch M, Hommes D. Biological therapy in the management of recent-onset Crohn's disease: why, when and how? *Drugs*. 2006, 66, 1431-1439.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999, 13, 1169–1183.
- Ma T, Boivin M, Ye D et al. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver Physiology*. 2005, 288, G422-430.
- Macdonald A. Omega-3 fatty acids as adjunctive therapy in Crohn's disease. *Gastroenterology Nursing*. 2006, 29, 295-301.
- MacLean C, Mojica W, Newberry SJ et al. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2005, 82, 611–619.
- Maes M, Song C, Lin A et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*. 1998, 10, 313-318.
- Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Current opinion in gastroenterology*. 2007, 23, 379–383.
- Mannon P, Fuss I, Mayer L et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2004, 351, 2069-2079.
- Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005, 54, 1481–1491.
- McCarthy J, O'Mahony L, Dunne C et al. An open trial of a novel probiotic as an alternative to steroids in mild/moderately active Crohn's disease. *Gut*. 2001, 49, 2447.
- McPhee S., Μουτσόπουλος Χ. Ανοσολογία Στο: Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2006 b: 71.
- McPhee S., Μουτσόπουλος Χ. Φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου Στο: Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2006 a: 487-492.

- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989, 96, 795-803.
- Müller JM, Keller HW, Erasmi H et al. Total parenteral nutrition as the sole therapy in Crohn's disease--a prospective study. *The British journal of surgery*. 1983, 70, 40-43.
- Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translation research*. 2007, 149, 173-86.
- Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH et al. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine*. 1996, 2, 998-1004.
- Nicholls S, Stephens S, Braegger CP et al. Cytokines in stools of children with inflammatory bowel disease or infective diarrhoea. *Journal of clinical pathology*. 1993, 46, 757-760.
- Nos P, Domènech E. Management of Crohn's disease in smokers: Is an alternative approach necessary? *World journal of gastroenterology*. 2011, 17, 3567-3574.
- Nunes T, Fiorino G, Danese S et al. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: Is it genes or environment? *World journal of gastroenterology*. 2011, 17, 2715-2722.
- Oikonomou AK, Kapsoritakis NA, Stefanidis I et al. Drug-induced nephrotoxicity in inflammatory bowel disease. *Nephron clinical practice*. 2011, 119, c89-c96.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *The journal of nutrition*. 2001, 131, S369-S373.
- Papalois A, Gioxari A, Kaliora A et al. Chios Mastic fractions in experimental colitis. Implication of the NFkappaB pathway in cultured HT29 cells. On press.
- Philpott JR, Miner PB Jr. Antisense inhibition of ICAM-1 expression as therapy provides insight into basic inflammatory pathways through early experiences in IBD. *Expert opinion on biological therapy*. 2008, 8, 1627-1632.
- Pithadia A, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) *Pharmacological Reports*, 2011, 63, 629-642.
- Podolsky K. Inflammatory Bowel Disease. *The New England journal of medicine*. 2002, 347, 417-429.

- Pulimood AB, Amarapurkar DN, Ghoshal U et al. Differentiation of Crohn's disease from intestinal tuberculosis in India in 2010. *World journal of gastroenterology*. 2011, 17, 433-443.
- Rajendran N, Kumar D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2010, 16, 1442-1448.
- Reifen R, Nur T, Ghebermeskel K et al. Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor kappa B and collagen formation. *The Journal of nutrition*. 2002, 132, 2743–2747.
- Rogler G, Brand K, Vogl D et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998, 115, 357–369.
- Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999, 117, 761-769.
- Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2009, 136, 1182–1197.
- Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho J. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008, 14, 4280-4288.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Lichtenstein GR. Medical management of mild to moderate Crohn's disease: evidence-based treatment algorithms for induction and maintenance of remission. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 2007, 26, 987-1003.
- Sandborn WJ, Hanauer BS. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: A review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflammatory bowel diseases*. 1999, 5, 119-133.
- Sands EB. Medical therapy of Crohn's disease: a review of recent innovations. *Advanced studies in medicine*. 2006, 6, S737-S749.
- Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Archives of disease in childhood*. 2003, 88, 995–1000.

- Shergill AK, Terdiman JP. Controversies in the treatment of Crohn's disease: The case for an accelerated step-up treatment approach. *World journal of gastroenterology*. 2008, 14, 2670-2677.
- Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Current gastroenterology reports*. 2008, 10, 568–575.
- Sido B, Hack V, Hochlehnert A et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998, 42, 485–492.
- Smith PA. Nutritional therapy for active Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2008, 14, 4420-4423.
- Smolen JS, Emery P. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis research and therapy*. 2011, 13, S2.
- Summers RW, Elliott DE, Urban JF Jr et al. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2005, 54, 87–90.
- Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN et al. Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the encore trial. *Gastroenterology*. 2007, 132, 1672–1683.
- Teixeira MG, Habr-Gama A, Takiguti C et al. Colonic Crohn's disease: results of treatment. *Revista do hospital das clinicas*. 1998, 53, 61-67.
- Toedter GP, Blank M, Lang Y et al. Relationship of C-reactive protein with clinical response after therapy with ustekinumab in Crohn's disease. *American journal of gastroenterology*. 2009, 104, 2768–2773.
- Torres MI, Ríos A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World journal of gastroenterology*. 2008, 14, 1972-1980.
- Triantafillidis J, Merikas E, Georgopoulos F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug design, development and therapy*. 2011, 5, 185–210.
- Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*. 2012, 18, 105-118.
- Vavricka SR, Rogler G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss medical weekly*. 2009, 139, 527-534.

- Velde AA, Verstege MI, Hommes DW Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2006, 12, 995–999.
- Verspaget HW, Peña AS, Weterman IT et al. Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut*. 1988, 29, 223-228.
- Viscido A, Aratari A, Maccioni F et al. Inflammatory bowel diseases: clinical update of practical guidelines. *Nuclear Medicine Communications*. 2005, 26, 649–655.
- Weber CR, Turner JR. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut*. 2007, 56, 6–8.
- Wu LH, Xu ZL, Dong D et al. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011,2011.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The journal of clinical investigation*. 1998, 101, 311–320.
- Yacyshyn BR, Schievella A, Sewell KL et al. Gene polymorphisms and serological markers of patients with active Crohn's disease in a clinical trial of antisense to ICAM-1. *Clinical and experimental immunology*. 2005, 141, 141–147.
- Yamamoto S, Ma X. Role of Nod2 in the development of Crohn's disease. *Microbes and infection*. 2009, 11, 912–918.
- Yamamoto S, Yoshizaki K, Kishimoto T. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *Journal of immunology*. 2000, 164, 4878-4882.
- Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews*. 2007, 24.