



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

Διπλωματική εργασία

**«Επίδραση της κατανάλωσης Μαστίχας στον εντερικό
μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ, με έμφαση σε βακτήρια –
παραγωγούς βουτυρικού οξέος»**

ΜΑΝΘΟΥ ΕΥΑΝΘΙΑ

ΑΜ 4421503



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κυριακού Αδαμαντίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Καλιώρα Ανδριάνα

Επίκουρη καθηγήτρια

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μπεζιρτζόγλου Ευγενία

Τακτική Καθηγήτρια

Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο

Η Μάνθου Ευανθία

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- ❖ Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

- ❖ Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Κυριακού Αδαμαντίνη, Καθηγήτρια του Τμήματος Διαιτολογίας –Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών για την δυνατότητα που μου προσέφερε να συμμετάσχω σε αυτή την ενδιαφέρουσα μελέτη, την επιστημονική υποστήριξή της και την υπομονή της κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ την κ. Καλιώρα, επίκουρη καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και την κ.Μπεζιρτζόγλου, καθηγήτρια του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μήτσου Ευδοκία για την εποικοδομητική συνεργασία κατά την διάρκεια της πτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που στηρίζει κάθε μου όνειρο, κάθε μου επιθυμία και κάθε μου βήμα.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1. Σύνοψη.....	16
1.2. Εντερικός μικροβιόκοσμος.....	17
1.2.1. Γενικά	17
1.2.2. Σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου	18
1.2.3. Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου	19
1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο	20
1.2.4.1. Η ηλικία	21
1.2.4.2. Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα.....	22
1.2.4.3. Η διατροφή.....	23
1.2.4.4. Φάρμακα	23
1.2.4.5. Υγιεινή	24
1.2.5. Εντερικός μικροβιόκοσμος και δυσβίωση	24
1.2.6. Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στο ανοσοποιητικό σύστημα	25
1.2.7. Δυσβίωση και Ασθένειες.....	27
1.3. Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου	28
1.3.1. Γενικά	28
1.3.2. Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και Δυσβίωση	29
1.3.3. Νόσος Crohn.....	31
1.3.3.1. Επιδημιολογία και Γενετική	31
1.3.3.2. Αιτιολογία.....	32
1.3.3.3. Συμπτώματα	32
1.3.3.4. Ανοσοποιητικές διαδικασίες.....	33
1.3.3.5. Θεραπεία.....	33
1.3.4. Ελκώδη κολίτιδα.....	35
1.3.4.1. Επιδημιολογία και γενετική	35
1.3.4.2. Αιτιολογία και Συμπτώματα	36

1.3.4.3.	Ανοσοποιητικές διαδικασίες	36
1.3.4.4.	Θεραπεία	37
1.4.	Προβιοτικά, πρεβιοτικά συμβιωτικά	37
1.5.	Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου	40
1.5.1.	Γενικά	40
1.5.2.	Παραγωγή και μεταφορά των SCFAs	40
1.5.3.	Ανοσοποιητικό σύστημα και SCFAs	41
1.5.4.	ΙΦΝΕ και SCFAs.....	42
1.6.	Μικροοργανισμοί και παραγωγή βουτυρικού	42
1.6.1.	Βουτυρικό.....	42
1.6.2.	Μικροοργανισμοί –Παραγωγοί βουτυρικού	43
1.6.3.	Μικροοργανισμοί-Παραγωγοί βουτυρικού και ΙΦΝΕ	43
1.7.	Μαστίχα και ΙΦΝΕ	45
1.7.1.	Γενικά	45
1.7.2.	Εφαρμογές και δράσεις της Μαστίχας	46
1.7.3.	Η δράση της Μαστίχας στις ΙΦΝΕ	48
2.	ΣΚΟΠΟΣ	49
3.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	50
3.1.	Κλινική δοκιμή.....	50
3.1.1.	Γενικά	50
3.1.2.	Πρωτόκολλο παρέμβασης.....	50
3.2.	Συλλογή δειγμάτων κοπράνων	51
3.3.	Απομόνωση ολικού DNA από δείγματα κοπράνων	51
3.3.1.	Μέθοδος απομόνωσης	51
3.3.2.	Αναλυτική πορεία.....	52
3.4.	Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)	52
3.5.	Στατιστική επεξεργασία	54
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
4.1.	Κοινωνικοδημογραφικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης	55
4.2.	Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης	56
4.3.	Διατροφικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης	56
4.4.	Μικροβιολογική εικόνα εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης	57
4.5.	Επίδραση συγχυτικών παραγόντων στο μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.....	58

4.6. Επίδραση της παρέμβασης στο μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών μετά την λήξη της παρέμβασης.....	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή : Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) περιλαμβάνουν την νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα και πιστεύεται ότι προκύπτουν από την δυσλειτουργική ανοσολογική απόκριση του ξενιστή έναντι των εντερικών μικροοργανισμών. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο και πυκνό οικοσύστημα που συμβάλει στην ομοιοστάση του ξενιστή. Αλλαγές στην σύνθεση και την λειτουργία του καταλήγουν σε κατάσταση δυσβίωσης και έχουν συσχετιστεί με τις ΙΦΝΕ. Η υποβαθμισμένη ποιότητα ζωής των ασθενών σε συνδυασμό με τις σοβαρές παρενέργειες που προκαλούνται από την μακροχρόνια φαρμακοθεραπεία αναδεικνύουν την ανάγκη για χρήση φυσικών προϊόντων στην θεραπευτική στρατηγική των ΙΦΝΕ. Η Μαστίχα Χίου είναι ένα τέτοιο φυσικό προϊόν και αν και οι μελέτες σχετικά με την επίδρασή της στις ΙΦΝΕ έχουν ξεκινήσει πολύ πρόσφατα, τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα.

Σκοπός : Η επίδραση της τρίμηνης πρόσληψης διατροφικού συμπληρώματος Μαστίχας Χίου (2,8 g) στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ενεργή ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα σε:

- ολικά βακτήρια,
- βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*,
- βακτήρια της ομάδας *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* (παράγουν βουτυρικό οξύ),
- βακτήρια του είδους *Faecalibacterium prausnitzii* (παράγει επίσης βουτυρικό οξύ).

Μεθοδολογία : Εθελοντές με ΙΦΝΕ που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στρατολογήθηκαν σε μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη. Η παρέμβαση περιελάμβανε την τρίμηνη χορήγηση 2 σκευασμάτων, με το ένα να περιέχει 2,8 g Μαστίχας Χίου και το άλλο να αποτελεί το εικονικό σκεύασμα. Για την παρούσα μελέτη αρχικά αναλύθηκαν δείγματα κοπράνων από 25 εθελοντές που διένυαν περίοδο έξαρσης, εκ των οποίων μόνο οι 15 ολοκλήρωσαν την παρέμβαση. Στα δείγματα αυτά διεξήχθη ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω μικροοργανισμών με Real-Time PCR. Τα ευρήματα αναλύθηκαν και αξιολογήθηκαν στατιστικά ως προς τις δυο νόσους (νόσο Crohn-ελκώδη κολίτιδα) στην έναρξη της παρέμβασης και ως προς τους δυο τύπους παρέμβασης (mastic-mastiha) στην λήξη της παρέμβασης.

Αποτελέσματα : Στην έναρξη της παρέμβασης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των μικροοργανισμών σε σχέση με τις δυο νόσους. Το γένος *Bifidobacterium* παρουσίασε αυξημένη τάση ανίχνευσης στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα

συγκριτικά με τη νόσο Crohn. Το *Faecalibacterium prausnitzii* ανιχνεύτηκε σε όλους τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, αλλά σε 13 από τους 16 ασθενείς της νόσου Crohn. Όλοι οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύτηκαν βρίσκονταν σε υψηλά επίπεδα. Οι δημογραφικοί και ανθρωπομετρικοί παράγοντες (φύλο, ηλικία, BMI) και οι διατροφικοί παράγοντες (% πρωτεΐνη, % λίπος, ίνες) που φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στις ΙΦΝΕ, δεν επηρεάζουν τα επίπεδα των μικροοργανισμών συγκριτικά των δυο νόσων. Μετά την λήξη της παρέμβασης δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των μικροοργανισμών συγκριτικά των δυο τύπων παρέμβασης. Επίσης, στον έναν από τους δυο εθελοντές με νόσο Crohn που στην αρχή της παρέμβασης δεν ανιχνεύτηκε το *Faecalibacterium prausnitzii*, μετά από χορήγηση mastiha ο μικροοργανισμός εμφανίστηκε σε υψηλά επίπεδα. Αντίθετα, ένας από τους εθελοντές της ελκώδους κολίτιδας έπαψε να εμφανίζει τον μικροοργανισμό μετά από την ίδια παρέμβαση.

Συμπεράσματα : Δεν παρουσιάστηκε υπεροχή κανενός από τα δυο σκευάσματα ως προς την επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου που εξετάστηκαν. Πιθανόν, απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών για να προκύψουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις.

Λέξεις-κλειδιά: Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου, Μαστίχα Χίου, εντερικός μικροβιόκοσμος, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale*.

ABSTRACT

Introduction : The Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases (IBD), are caused from the dysfunctional immune response of the host against the intestinal microorganisms. The human colon is colonized by a complex and dense microbial community that plays important role in the host homeostasis. Many studies link several alterations in the gut microbiota structure, a situation called dysbiosis, to IBD. The low quality of life of patients, together with the serious side effects caused by long-term pharmacotherapy, highlights the need for natural products in the treatment strategy of IBD such as Chios Mastiha. Studies on its impact on IBD have begun recently, but promising results have been reported.

Purpose : The effect of the consumption of a dietary supplement, containing 2,8 g Chios Mastiha, on the faecal microbiota of active IBD patients . More specifically on:

- total bacteria,
- *Bifidobacterium* spp.,
- *Roseburia* spp., -*Eubacterium rectale*, (butyrate producers),
- *Faecalibacterium prausnitzii*, (butyrate producer)

Methods: IBD volunteers, were recruited in a double-blind, randomized study and consumed the supplement daily for 3 months. The volunteers were randomly assigned in two groups (placebo and Mastiha 2.8g). The stool samples of 25 volunteers, who started the intervention during a period of exacerbation, were analyzed, but only 15 completed the intervention. The microorganisms were measured using Real-Time PCR. At the beginning of the intervention, data were analyzed regarding the type of IBD (Crohn's disease-ulcerative colitis) and at the end regarding the type of intervention (labeled mastic or mastiha).

Results: Before the intervention there were not observed any significant differences in the levels of microorganisms between the two diseases. A tendence for higher prevalence of the *Bifidobacterium* spp. was noticed in the faecal samples of the patients with ulcerative colitis compared to Crohn's disease. *Faecalibacterium prausnitzii* was detected in all patients with ulcerative colitis, but in 13 out of 16 Crohn's disease patients. All microorganisms were detected at high levels. Demographic and anthropometric factors (sex, age, BMI) as well as dietary factors (% protein, % fat, fibers) known to have a significant impact on IBD, do not

influence the levels of microorganisms in the faecal samples of both diseases. After the intervention, there were not observed any significant differences in microorganisms regarding the type of intervention. Also, in one of the two Crohn's volunteers faecal sample with no detected *Faecalibacterium prausnitzii* at the beginning, after the mastiha intervention it appeared at high levels. In contrast, in the faecal sample of a patient with ulcerative colitis, *F. prausnitzii* was disappeared after the intervention with the same label.

Conclusion: There were not detected any significant changes compared to the type of intervention. Eventually, a larger sample of volunteers may be required in order to trace significant differences.

Key words: Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases, Chios Mastiha, faecal microbiota, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale*.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Χωρική κατανομή και συγκέντρωση των βακτηριών κατά μήκος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα	19
Εικόνα 2. Οι αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μικροβιόκοσμου σε υγιές και μη υγιές περιβάλλον εντέρου	25
Εικόνα 3. Αριστερά: Διαβρώσεις και μικρά έλκη κατά την εμφάνιση της νόσου του Crown, Δεξιά: Βαθιά έλκη, πληγές και πρήξιμο κατά την εξέλιξη της νόσου του Crown.....	31
Εικόνα 4. Αριστερά: υγιές κόλον, Αριστερά: Χρόνια ελκώδη κολίτιδα.....	35

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης.....	54
Πίνακας 2 . Βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης	55
Πίνακας 3. Εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.....	56
Πίνακας 4. Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.....	56
Πίνακας 5. Διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.....	57
Πίνακας 6. Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών ($\log_{10}$ copies/ml κοπράνων) εντερικού μικροβιόκοσμου εθελοντών με ΙΦΝΕ στην έναρξη της παρέμβασης.....	57
Πίνακας 7. Συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού <i>F.prausnitzii</i> σε εθελοντές στην έναρξη της παρέμβασης.....	58
Πίνακας 8. Επίδραση δυο διαφορετικών μοντέλων συγχυτικών παραγόντων στους μικροοργανισμούς των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης μετά από ανάλυση Συνδυακύμανσης (ANCOVA).....	59
Πίνακας 9 . Μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών στους δυο τύπους παρέμβασης (mastiha, mastic) στην έναρξη και την λήξη της παρέμβασης.....	60
Πίνακας 10 . Ποσοτικές αλλαγές στους μικροοργανισμούς των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση μετά από λήψη mastiha.....	61
Πίνακας 11 . Ποσοτικές αλλαγές στους μικροοργανισμούς των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση μετά από λήψη mastic.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των εθελοντών που ολοκλήρωσαν της παρέμβαση και η κατανομή τους στην νόσο και στον τύπο παρέμβασης	60
---	----

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου
IBD	Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases
CD	Νόσος Crohn (Crohn's Disease)
UC	Ελκώδης κολίτιδα (Ulcerative colitis)
IFN-γ	Ιντερφερόνη-γ (Interferon-γ)
5-ASA	Ενώσεις του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος
BMI	Body Mass Index (Δείκτης Μάζας Σώματος)
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας -κΒ (Nuclear Factor – kappa Beta)
SCFAs	Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσού (Short-chain fatty acids)
IgA	Ανοσοσφαιρίνη Α
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
GPR43	G protein-coupled receptor 43
GPRs	SCFA-sensing G-protein-coupled receptors
CD4⁺ λεμφοκύτταρα	T- βοηθητικά κύτταρα
Th1/Th2	T-1 βοηθητικά κύτταρα/ T-2 βοηθητικά κύτταρα
Treg- λεμφοκύτταρα	T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα
PTGN	Πεπτιδογλυκάνη
TNF-α	Παράγοντας καρκινικής νέκρωσης άλφα (Tumor necrosis factor-alpha)
IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12,	Ιντερλευκίνη-1β, -6, -8, -12
CD8+ T κύτταρα	Κατασταλτικά κύτταρα

sIL-6R	υποδοχέας διαλυτής ιντερλευκίνης-6 (soluble Interleukin- 6 receptor)
gp130	Γλυκοπρωτεΐνη 130 (Glycoprotein 130)
IDO1	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
Aldh1A2	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
Foxp3	Σκαρφήνη (forkhead box P3)
ANCOVA	Ανάλυση Συνδιακύμανσης (Univariate analysis of Covariance)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σύνοψη

Ο ανθρώπινος μικροβιόκοσμος, που αποτελείται από το σύνολο των μικροβιακών στελεχών που αποικίζουν τις κοιλότητες και τους βλεννογόνους του ανθρώπινου οργανισμού, έχει αναχθεί τα τελευταία χρόνια σε σημαντικό αντικείμενο μελέτης. Η επίδραση της σύνθεσής του στην υγεία και τις διάφορες ασθένειες έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου, εστιάζοντας περισσότερο στον εντερικό μικροβιόκοσμο (1,2).

Το γαστρεντερικό σύστημα είναι ένα από τα πιο σύνθετα οικοσυστήματα και σε αυτό βρίσκεται το μεγαλύτερο ποσοστό του μικροβιακού φορτίου του οργανισμού. Τα κλινικά και επιστημονικά δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι οι μικροοργανισμοί του εντέρου και τα προϊόντα τους επηρεάζουν την ανοσοποιητική και μεταβολική λειτουργία, όπως επίσης ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων μέσω επιγενετικών μηχανισμών (3,4). Τα εντερικά βακτήρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τον ξενιστή συνεισφέροντας στην ομοιόσταση του οργανισμού. Αλλαγές στην σύνθεση και την λειτουργία των μικροοργανισμών του εντέρου καταλήγουν σε κατάσταση δυσβίωσης και έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, όπως οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) και ο καρκίνος του παχέος εντέρου, με αυτοάνοσες νόσους όπως ο διαβήτης Τύπου Ι, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η πολλαπλή σκλήρωση, το άσθμα, οι αλλεργίες, αλλά και με νοσογόνες καταστάσεις ή παθήσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και οι καρδιαγγειακές νόσοι. Πάρα ταύτα, είναι δύσκολο το εγχείρημα να αναγνωριστούν επακριβώς τα αίτια και η επίδραση της δυσβίωσης στην παθογένεια της κάθε νόσου (4, 5).

Οι ΙΦΝΕ παρουσιάζουν αυξημένο επιπολασμό κυρίως σε Δυτικές χώρες, όμως έχει παρατηρηθεί πρόσφατα η σταδιακή αύξηση της συχνότητάς τους και στις Ανατολικές χώρες. Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο εμφανίζονται 15-20 περιπτώσεις νέων ασθενών ανά 100.000 άτομα πληθυσμού (11, 13, 14). Τα έντονα συμπτώματα, η υποβαθμισμένη ποιότητα ζωής των ασθενών και το περιορισμένο προσδόκιμο ζωής έχουν κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα. Πολλές μελέτες πλέον, διεξάγονται αναφορικά με την επίδραση της δίαιτας στον μικροβιόκοσμο, την αποτελεσματικότητα των προβιοτικών, πρεβιοτικών ή/και συμβιωτικών, την επιτυχία της μεταμόσχευσης κοπράνων και την χρήση βελτιωμένων διαγνωστικών μεθόδων και μοντέλων. Οι αρχικοί στόχοι είναι η κατανόηση της

παθογένειας της νόσου και της σχέσης της με εξαρτώμενους παράγοντες και εν συνεχεία, η σωστή και έγκαιρη διάγνωση και η βελτίωση της ποιότητας ζωής μέσω του περιορισμού ή της θεραπείας των συμπτωμάτων με ταυτόχρονο περιορισμό της χρήσης φαρμάκων (5, 11, 13, 14). Η θεραπευτική στρατηγική για τις ΙΦΝΕ ανιχνεύει πλέον και την χρήση παραγόντων που προέρχονται από την φύση. Ο σκοπός είναι να αποφευχθούν οι συχνές παρενέργειες, αλλά και οι πρακτικοί περιορισμοί που προκύπτουν από την χρήση κλασικών θεραπειών (φάρμακα) και μεταγενέστερων μη εδραιωμένων θεραπειών (προβιοτικά /πρεβιοτικά). Η Μαστίχα Χίου είναι ένα φυσικό προϊόν, για το οποίο έχουν καταγραφεί ευεργετικές ιδιότητες σε ότι αφορά στις γαστρεντερικές διαταραχές. Οι μελέτες σχετικά με την επίδρασή της στις ΙΦΝΕ έχουν ξεκινήσει πολύ πρόσφατα, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (27, 28, 29).

1.2. Εντερικός μικροβιόκοσμος

1.2.1. Γενικά

Ο ανθρώπινος μικροβιόκοσμος εκτιμάται ότι αποτελείται από περίπου 10^{14} κύτταρα, δηλαδή 10 φορές περισσότερα κύτταρα από αυτά του ξενιστή, με τα γονίδια που κωδικοποιούνται να ξεπερνούν κατά 100 φορές τα γονίδια του ξενιστή. Το 90% αυτών των βακτηριακών κυττάρων εμφανίζεται στο παχύ έντερο. Οι λειτουργίες που επιτελεί το ανθρώπινο μικροβίωμα (το σύνολο των μικροβιακών γονιδίων που εκφράζονται στο σώμα του ξενιστή) και ειδικότερα, αυτό του γαστρεντερικού σωλήνα είναι ποικίλες, με αποτέλεσμα οι επιστήμονες να το χαρακτηρίζουν ως υπέρ-οργανισμό, ξεχασμένο όργανο ή το εκτεταμένο γονιδίωμά μας (1, 2, 4, 5, 6).

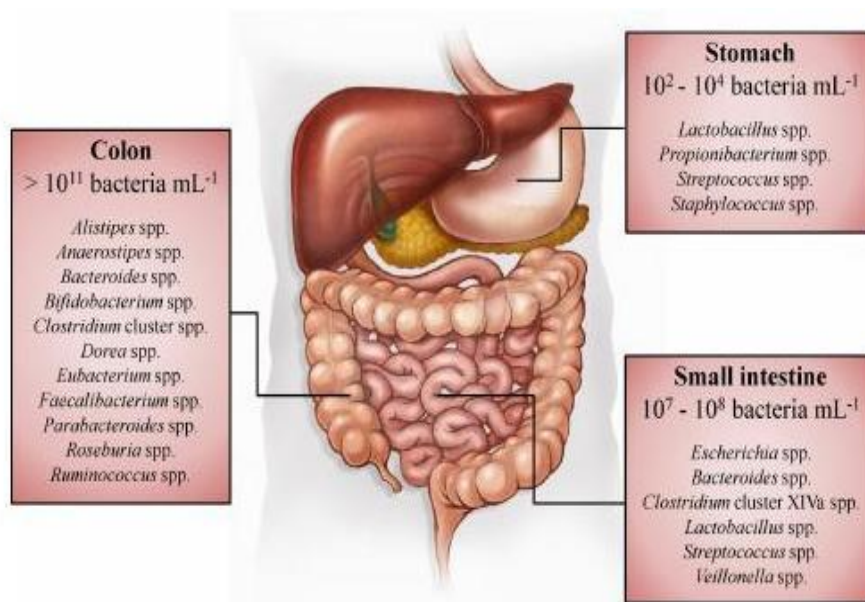
Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ένα μωσαϊκό μερικών εκατοντάδων διαφορετικών βακτηριακών ειδών, υπό-ειδών και βιοτύπων που εμπλέκονται στον ανθρώπινο μεταβολισμό, τη διατροφή, την φυσιολογία και την ανοσοποιητική λειτουργία (2, 6). Υπολογίζεται ότι περίπου 400-500 διαφορετικά είδη συνιστούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο, ενώ το 70% αυτών δεν μπορούν να καλλιεργηθούν και να ανιχνευτούν με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές (5). Η ανισορροπία ή δυσβίωση μεταξύ των ευεργετικών και επιβλαβών μικροοργανισμών συνδέεται με την πρόκληση ασθενειών ή εμφανίζεται ως συνέπεια αυτών (1,2).

1.2.2. Σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου

Παρά τον αριθμό των παραγόντων που επιδρούν, η σύνθεση των εντερικών μικροβίων παραμένει αρκετά σταθερή σε επίπεδο φύλου, καθώς σε όλα τα άτομα παρουσιάζονται βακτήρια των δύο φύλων Bacteroidetes και Firmicutes. Όμως, η σταθερότητα αυτή φθίνει σε επίπεδο είδους κάτι που εξηγείται από τον λειτουργικό πλεονασμό. Αυτό σημαίνει ότι δίδεται η δυνατότητα σε μια ομάδα μικροβίων να διενεργούν μια διαδικασία ταυτόχρονα με άλλες ομάδες υπό τις ίδιες συνθήκες, ώστε να διασφαλίζεται η σωστή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Πάρα ταύτα, υπάρχουν στελέχη που δεν αντικαθίστανται εύκολα και χαρακτηρίζουν τον μικροβιόκοσμο του κάθε ανθρώπου (2,5).

Τα βακτηριακά κύτταρα κατανέμονται άνισα κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, με το μεγαλύτερο φορτίο να απαντάται στο παχύ έντερο (10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο εντερικού ιστού). Ο στομάχος φέρει 10^3 - 10^4 , το δωδεκαδάκτυλο 10^5 - 10^6 και ο τελικός ειλεός 10^8 - 10^9 βακτήρια ανά γραμμάριο ιστού ή κοπράνων. Επίσης, η σύνθεση σε κάθε σημείο διαφέρει, καθώς στο λεπτό έντερο κυριαρχούν τα φύλα Firmicutes και Actinobacteria, ενώ το φύλο Bacteroidetes και η οικογένεια Lachnospiracae των Firmicutes είναι αφθονότερα στο κόλον (**Εικόνα 1**). Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στη βλεννογόνο στοιβάδα διαφέρουν από εκείνους στον εντερικό αυλό. Πιο συγκεκριμένα, τα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus* εμφανίζονται στα κόπρανα και είναι αντιπροσωπευτικά της σύνθεσης του αυλού, ενώ στο βλεννογόνο και στις επιθηλιακές κρύπτες ανιχνεύονται μόνο τα *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterococcus* (2, 5, 6).

Ένας υγιής εντερικός σωλήνας αποτελείται κυρίως από αυστηρά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι αερόβιοι και οι προαιρετικά αναερόβιοι εμφανίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό. Στο έντερο τελικά, ανιχνεύονται πάνω από 50 διαφορετικά βακτηριακά φύλα με κυρίαρχα τα Bacteroidetes και Firmicutes σε ποσοστό 90% και τα Actinobacteria να έρχονται τρίτα σε ποσοστό 3% (2,3).



Εικόνα 1. Χωρική κατανομή και συγκέντρωση των βακτηρίων κατά μήκος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (7)

1.2.3. Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, καθώς επιτελεί πολλές και διαφορετικές λειτουργίες. Η επίδραση των βακτηρίων δεν είναι έκδηλη, αλλά παρουσιάζεται με διάφορους τρόπους όπως η ζύμωση, η κινητικότητα του εντέρου, η παραγωγή βουτυρικού και άλλων οργανικών οξέων μικρής αλύσου, η παραγωγή βιταμινών, η αντίσταση στην αποίκιση των παθογόνων, οι μετατροπές χολικών οξέων και στεροειδών, ο μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών, η απορρόφηση ιχνοστοιχείων, η ενεργοποίηση και η καταστροφή τοξινών και μεταλλαξιογόνων ουσιών (5, 6, 8).

Όσον αφορά στο μεταβολισμό, ο εντερικός μικροβιόκοσμος παράγει βιταμίνες, συνθέτει τα απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα και πραγματοποιεί την βίο-μεταφορά της χολής, λειτουργίες τις οποίες ο οργανισμός δεν μπορεί να τις φέρει εις πέρας ή έχει περιορισμένη δυνατότητα. Επίσης, εμπλέκεται στον μεταβολισμό άπεπτων υδατανθράκων που περιλαμβάνουν το ανθεκτικό άμυλο, την κυτταρίνη, την ήμι-κυτταρίνη, τις πηκτίνες και τα κόμμεα, τον μεταβολισμό ολιγοσακχαριτών που διαφεύγουν της πέψης, μη απορροφήσιμων αλκοολών και σακχάρων. Συνεπώς, ανακτάται ενέργεια, αλλά και απορροφήσιμα υποστρώματα για τον ξενιστή και ενέργεια και θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων(2).

Η προστασία του ξενιστή αποτελεί σημαντική λειτουργία και διενεργείται μέσω της διαδικασίας των εμποδίων ή αλλιώς το φαινόμενο ανταγωνιστικής απόκλισης. Τα ωφέλιμα βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες και ανταγωνίζονται τους παθογόνους σε θρεπτικά συστατικά και στην προσκόλληση στο έντερο (2, 5). Πιο συγκεκριμένα, τα ωφέλιμα βακτήρια αποτρέπουν την προσκόλληση των παθογόνων στα αντίστοιχα σημεία προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα. Λόγω του αριθμού τους, καταναλώνουν όλες τις πηγές ενέργειας και θρεπτικών, περιορίζοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Επίσης, παράγουν ουσίες, όπως οι βακτηριοσίνες που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων(2, 5).

Παράλληλα, η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζεται από τις συνεχείς και δυναμικές αλληλεπιδράσεις των εντερικών βακτηρίων και των μεταβολιτών τους. Τα κύτταρα του επιθηλίου αναγνωρίζουν υποδοχείς και συνδέονται με μόρια σχετιζόμενα με τα βακτήρια. Αυτή η σύνδεση οδηγεί στην ανοσοαπόκριση και την απελευθέρωση πεπτιδίων, κυτταροκινών και λευκών αιμοσφαιρίων. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας μπορεί να περιλαμβάνει την προστατευτική απόκριση σε έναν ωφέλιμο εντερικό μικροοργανισμό, τη φλεγμονώδη αντίδραση σε έναν παθογόνο ή την απόπτωση κυττάρων του ξενιστή. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι τα εντερικά βακτήρια εκπαιδεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να αποκρίνεται αναλογικά σε όλα τα αντιγόνα, περιορίζοντας και εμποδίζοντας την εμφάνιση αλλεργιών(2, 5). Τέλος, ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου δίνει την δυνατότητα επικοινωνίας και πρόσβασης του εντέρου στον εγκέφαλο. Αντίστοιχα και ο εγκέφαλος ελέγχει λειτουργίες του εντέρου, όπως οι περισταλτικές κινήσεις, η παραγωγή βλεννογόνου και λειτουργίες του ανοσοποιητικού(2).

1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η εντερική μικροβιακή σύνθεση αρχικά καθορίζεται από την μητέρα, τα μικρόβια της οποίας μεταφέρονται στο νεογνό κατά τον τοκετό και μετέπειτα με τον θηλασμό, ενώ στη συνέχεια επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ο πιο σημαντικός από αυτούς είναι η διατροφή και ακολουθούν, η ηλικία, το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, η χορήγηση αντιβιοτικών, οι μολύνσεις και λοιμώξεις, το στρες, οι συνθήκες υγιεινής που επικρατούν στο περιβάλλον διαβίωσης και άλλοι παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να έχουν αλληλοεξαρτώμενη σχέση (9). Τελικά, ακόμα και δυο γενετικά πανομοιότυποι οργανισμοί, έχουν διαφορετική εντερική σύνθεση. Συνεπώς, η εντερική σύνθεση διαφέρει σε κάθε άτομο και αποτελεί το μικροβιακό αποτύπωμα του (2, 5, 9).

1.2.4.1. Η ηλικία

Το έντερο των νεογνών φαίνεται ότι είναι σχεδόν στείρο από μικροοργανισμούς κατά τα διάρκεια της κύησης μέχρι και λίγο πριν τον τοκετό. Κατά τον τοκετό, ξεκινά η μικροβιακή αποίκηση του εντέρου με την σύνθεση να ομοιάζει αυτής του γεννητικού σωλήνα της μητέρας, όταν ο τοκετός είναι φυσιολογικός. Στην καισαρική, η σύνθεση είναι πολύ διαφορετική, η ποικιλομορφία περιορισμένη, συγκριτικά με τον φυσιολογικό τοκετό και προκύπτει από τους μικροοργανισμούς του εκάστοτε περιβάλλοντος. Πολύ πρόσφατες μελέτες βέβαια, διαπιστώνουν ότι ο πλακούντας και το μηκόνιο έχουν το δικό τους μικροβιόκοσμο, οπότε τα έμβρυα εκτίθενται σε αυτόν όσο βρίσκονται ήδη στην μήτρα (5).

Η διατροφή της μητέρας παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση αυτού του μικροβιόκοσμου και οι αντιφλεγμονώδεις και μεταβολικοί παράγοντες που παράγονται από αυτόν επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα το έμβρυο. Κατά την εγκυμοσύνη, η σύνθεση στο πρώτο τρίμηνο είναι παρόμοια για τα υγιή άτομα, αλλά από το τρίτο τρίμηνο και μετά αλλάζει και εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των εγκύων. Από το τρίτο τρίμηνο παρατηρείται κυρίως αύξηση σε βακτήρια των φύλων *Proteobacteria* και *Actinobacteria*, ενώ το *Faecalibacterium prausnitzii*, που παράγει βουτυρικό με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μειώνεται. Οι διάφορες πρακτικές κατά την εγκυμοσύνη, όπως η χρήση αντιβιοτικών και αναστολέων της αντλίας πρωτονίων, αλλά και άλλοι παράγοντες, όπως η ηλικία της μητέρας, ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση, ο θηλασμός, επηρεάζουν την ανάπτυξη του βρεφικού μικροβιόκοσμου. Το μητρικό γάλα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου μιας και είναι το πρώτο τρόφιμο που εισέρχεται στον οργανισμό του νεογνού. Περιέχει αντισώματα IgA αλλά και άλλα μόρια που προστατεύουν το ευαίσθητο έντερο από λοιμώξεις (5).

Τον πρώτο χρόνο ζωής, η αρχική σύνθεση είναι απλή, παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις από άτομο σε άτομο, είναι όμως καθοριστική για την διαμόρφωση της σύνθεσης κατά την ενήλικη ζωή (5, 9). Μετά τα 2 χρόνια αρχίζει και σταθεροποιείται η σύνθεση και σε αυτή τη φάση επιτυγχάνεται η υψηλή ποικιλομορφία (4). Γενικά, ο μικροβιόκοσμος των παιδιών ομοιάζει αυτόν των υγιών ενηλίκων. Βέβαια, μελέτες έχουν δείξει κάποιες διαφορές. Τα παιδιά προ εφηβείας είχαν περισσότερα *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium* spp., και βακτήρια της οικογένειας *Lachnospiraceae*, ενώ οι ενήλικες περισσότερα *Bacteroides* spp.(43). Οι ηλικιωμένοι έχουν διαφορετική σύνθεση από τους νεότερους. Φαίνεται ότι ο κύριος

παράγοντας επίδρασης είναι οι διαιτητικές συνήθειες των ηλικιωμένων που επηρεάζουν και την υγεία τους (5).

1.2.4.2. Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα

Ένας άλλος παράγοντας, που πιθανά επιδρά στον εντερικό μικροβιόκοσμο, είναι το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Σε έρευνα με πειραματόζωα, μελετήθηκαν μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια γενετικά τροποποιημένα με έλλειψη στο μόριο σήμα MyD88 (που αναγνωρίζει μικροβιακά ερεθίσματα), κατάσταση που τα προστατεύει από την εμφάνιση διαβήτη τύπου Ι. Όταν τα ποντίκια αυτά μεταφερθούν σε περιβάλλον αξενικό, δηλαδή δεν διαθέτουν καθόλου εντερικό μικροβιόκοσμο και ζουν σε στείρες συνθήκες, τότε η προστασία αυτή παύει να ισχύει και αναπτύσσουν σοβαρό διαβήτη τύπου Ι. Στον εντερικό μικροβιόκοσμο των ποντικών αυτών κυριαρχούν τα βακτήρια του φύλου Bacteroidetes, τα οποία καταστέλλουν την εμφάνιση του διαβήτη πιθανόν μέσω της παραγωγής ενός ανοσορυθμιστικού προϊόντος. Είναι γνωστό ότι στο συγκεκριμένο φύλο υπάρχουν πολλά είδη που παράγουν μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (SCFAs), από τη ζύμωση των άπεπτων συστατικών που καταλήγουν στο παχύ έντερο (9).

Άλλη μελέτη έδειξε, ότι ποντίκια στα οποία απουσίαζε ο υποδοχέας GPR43 της G πρωτεΐνης εμφανίζουν διαφορετική ανοσολογική απόκριση από τα αντίστοιχα φυσιολογικά πειραματόζωα. Στον υποδοχέα αυτό συνδέονται τα SCFAs και κυρίως το οξικό και προπιονικό που είναι τα σημαντικότερα προϊόντα των μικροβιακών ζυμώσεων που γίνονται στο παχύ έντερο. Τα ποντίκια παρουσίασαν επιδείνωση της φλεγμονής σε μοντέλα επαγόμενης αρθρίτιδας, αλλεργίας και κολίτιδας. Τα SCFAs, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (κυρίως το βουτυρικό), συνδέονται επίσης με άλλους υποδοχείς GPRs (SCFA-sensing G-protein-coupled receptors), όπως τον GPR41 και εμποδίζουν την διακετυλάση της ιστόνης, την ενεργοποίηση της μεταγραφής του παράγοντα NF-κ B και επηρεάζουν τον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων και των λιπιδίων (4, 9). Τα SCFAs είναι κάποια από τα βακτηριακά προϊόντα που λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και ελέγχουν τη φλεγμονώδη απόκριση στο έντερο, αλλά και πέρα από αυτό(9).

1.2.4.3. Η διατροφή

Η στενή σχέση διατροφής και εντερικού μικροβιόκοσμου επιβεβαιώνεται συνεχώς με τα δεδομένα των τελευταίων μελετών. Σε επίπεδο πειραματόζων, συγκρίθηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε ποντίκια, τα οποία αρχικά ακολουθούσαν δίαιτα χαμηλή σε λίπος και πλούσια σε φυτικούς πολυσακχαρίτες και στη συνέχεια άλλαξαν σε Δυτικού τύπου δίαιτα υψηλή σε λίπος και ζάχαρη, αλλά χαμηλή σε πολυσακχαρίτες. Από την πρώτη κιόλας ημέρα αλλαγής της διαίτας παρατηρήθηκαν επιδράσεις στην εντερική σύνθεση, τα μεταβολικά μονοπάτια και την έκφραση γονιδίων, όπως επίσης, αυξημένη εναπόθεση λίπους σε διάστημα δυο εβδομάδων. Πιο συγκεκριμένα, τα ποντίκια με την Δυτική τύπου δίαιτα παρουσίασαν αύξηση στα βακτήρια του φύλου Firmicutes και μείωση σε αυτά του φύλου Bacteroidetes.

Σε επίπεδο ανθρώπων, έχει παρατηρηθεί ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαφορετικών φυλογενετικών πληθυσμών. Παιδιά από την Αφρική που ακολουθούν δίαιτα υψηλή σε ίνες φάνηκε ότι έχουν υψηλά επίπεδα βακτηρίων του φύλου Bacteroidetes πολλά από αυτά υπεύθυνα για την υδρόλυση των σύνθετων φυτικών πολυσακχαριτών και χαμηλά επίπεδα σε βακτήρια του φύλου Firmicutes, συγκριτικά με παιδιά από την Ευρώπη. Επίσης, τα παιδιά από την Αφρική είχαν δυο βακτηριακά γένη, τα *Prevotella* και *Xylanibacter* που απουσίαζαν παντελώς από τα παιδιά της Ευρώπης (5, 9).

1.2.4.4. Φάρμακα

Μία από τις επιδράσεις της μη ορθής χρήσης φαρμάκων και ιδιαίτερα των αντιβιοτικών, είναι η απομάκρυνση ωφέλιμων βακτηρίων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φαρμάκων επηρεάζει την σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Σε μία εξ' αυτών βρέθηκε ότι μετά από 7 ημέρες χορήγησης κλινδαμυκίνης, μειώθηκε η ποικιλότητα των στελεχών του γένους *Bacteroides* στα κόπρανα, αυξήθηκε η ανθεκτικότητά του στο αντιβιοτικό, ενώ η σύνθεση του πληθυσμού *Bacteroides spp.* δεν επανήλθε μετά από 2 χρόνια. Σε πειραματόζωα μελετήθηκαν 2000 μεταβολίτες στα κόπρανα πριν και μετά από χορήγηση φαρμάκων και διαπιστώθηκε ποσοτική αλλαγή στο 88% αυτών. Ομοίως, σε ασθενείς παρατηρήθηκε μείωση της ποικιλότητας και της ποσότητας των στελεχών στα κόπρανα κατά τη διάρκεια και μετά από 5 ημέρες χορήγησης σιπροφλοξασίνης. Επίσης, λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *Clostridium difficile* έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούνται από την απομάκρυνση των ωφέλιμων βακτηρίων μετά από χορήγηση αντιβιοτικών σε νοσηλευόμενους ασθενείς (5).

1.2.4.5. Υγιεινή

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαφέρει στα άτομα που ζουν σε αναπτυγμένες χώρες από αυτά που διαμένουν σε αναπτυσσόμενες χώρες. Τα επιδημιολογικά δεδομένα προσθέτουν στην παραπάνω διαπίστωση την παρατήρηση μικρότερου επιπολασμού αλλεργικών συμπτωμάτων και άσθματος στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται μέσω της υπόθεσης της υγιεινής κατά την οποία η υπερβολική καθαριότητα μειώνει τα μολυσματικά ερεθίσματα που χρειάζεται το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναπτυχθεί. Η ύπαρξη μεγαλύτερων οικογενειών, η διαμονή του μεγαλύτερου μέρους του πληθυσμού σε αγροτικές περιοχές, οι λιγότερο καλές συνθήκες υγιεινής και περίθαλψης και η μικρότερη χρήση αντιβιοτικών στις αναπτυσσόμενες χώρες αποτελούν συνθήκες που στηρίζουν την παραπάνω υπόθεση(9).

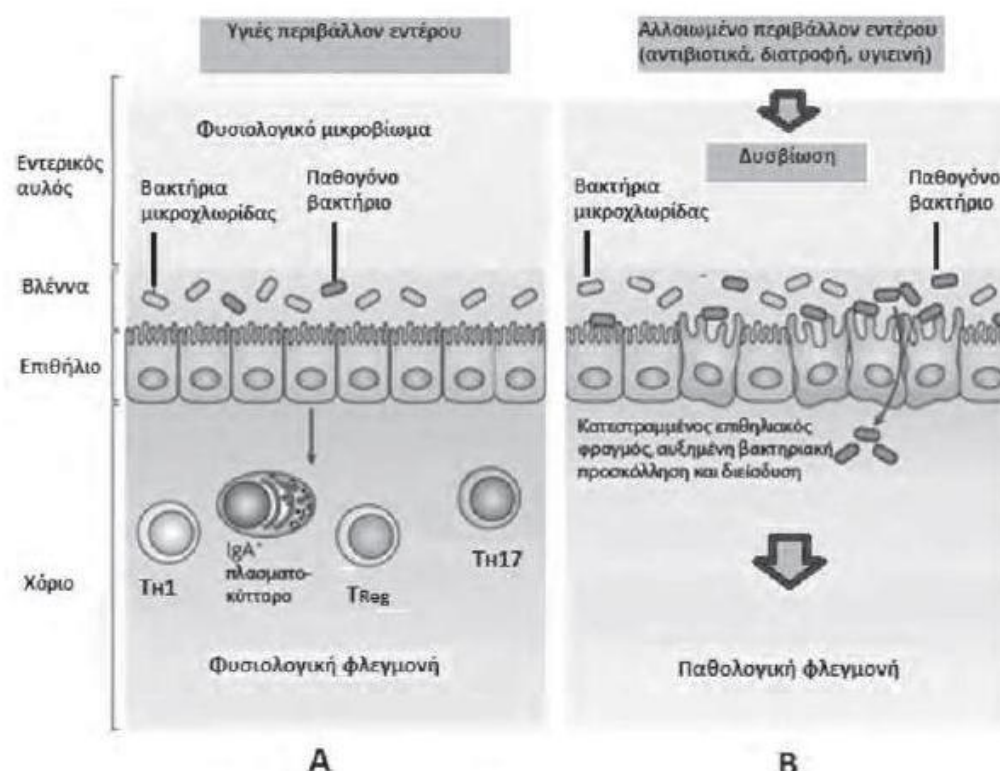
Από την άλλη μεριά, η υπόθεση επεκτείνεται με την υπόθεση του μικροβιόκοσμου, καθώς παρατηρούνται διαφορές στην δίαιτα των αναπτυγμένων και αναπτυσσόμενων κοινωνιών που με τη σειρά τους οδηγούν σε διαφορές στον εντερικό μικροβιόκοσμο (10).Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η Ιαπωνία που έχει υψηλή υγιεινή και επίπεδο αστικοποίησης, αλλά χαμηλά ποσοστά εμφάνισης άσθματος. Ενδεχομένως, οφείλεται στην αυξημένη κατανάλωση ρυζιού, ζυμωμένων προϊόντων και ψαριών (9).

1.2.5. Εντερικός μικροβιόκοσμος και δυσβίωση

Ο ξενιστής και ο εντερικός μικροβιόκοσμος αναπτύσσουν μια στενή σχέση συμβίωσης κατά την οποία και οι δύο ωφελούνται, αλλά με διαφορετικό τρόπο. Ο ξενιστής παρέχει όλα τα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και τον τόπο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Οι μικροοργανισμοί ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων και διευκολύνουν την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από την διαδικασία της πέψης (6).

Όταν η ομοιόσταση διαταραχθεί, τότε ο οργανισμός και τα ωφέλιμα βακτήρια λειτουργούν υπό συνθήκες δυσβίωσης που παρατηρούνται σε παθολογικές καταστάσεις. Η έννοια της δυσβίωσης αφορά στις αλλαγές στην ποσότητα, την ποιότητα, την χωρική κατανομή και την μεταβολική δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου που προκύπτει από την επιρροή των διαφόρων παραγόντων σε αυτήν όπως, ο σύγχρονος τρόπος ζωής και διατροφής, τα αντιβιοτικά κ.α. (**Εικόνα 2**). Κάποια από τα βακτήρια του μικροβιόκοσμου, φαίνεται να

σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις, κυρίως αυτά που εμπλέκονται στην αποικιοδόμηση των ανθεκτικών αμύλων και ινών. Τέτοια βακτήρια ανήκουν στα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Lactobacillus*. Από την άλλη μεριά, βακτηριακά στελέχη των γενών *Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterococcus* και *Peptostreptococcus*, φαίνεται να προάγουν την δυσβίωση όταν η ισορροπία στο έντερο έχει διαταραχθεί. Στην πραγματικότητα, κάποια από τα φυσικά απαντούμενα βακτήρια στο περιβάλλον του εντέρου εμπλέκονται στην αιτιολογία ή και την διατήρηση της φλεγμονής υπό συγκεκριμένες συνθήκες (6).



Εικόνα 2. Οι αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μικροβιόκοσμου σε υγιές και μη υγιές περιβάλλον εντέρου (5)

1.2.6. Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στο ανοσοποιητικό σύστημα

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος φαίνεται να επιδρά το ίδιο, καταλυτικά στην ανάπτυξη του έμφυτου και επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Από μελέτες σε πειραματόζωα, έχει βρεθεί ότι αξενικά ζώα (πειραματόζωα που δεν έχουν μικροβιόκοσμο) έχουν λιγότερα και μικρότερα βλαστικά κέντρα στους λεμφαδένες και μειωμένο αριθμό CD4⁺ T -λεμφοκυττάρων στο εντερικό επιθήλιο, όπως επίσης τα ποντίκια αυτά έχουν μειωμένη ικανότητα έκκρισης αντιμικροβιακών παραγόντων. Όταν τα ποντίκια αποικίστηκαν εκ νέου με το *Bacteroides*

fragilis, κάποιες από τις παραπάνω καταστάσεις αντιστράφηκαν. Πιο συγκεκριμένα, αποκαταστάθηκε η ανεπάρκεια των Τ λεμφοκυττάρων και η ανισορροπία του λόγου των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων Th1/Th2 των μυών. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμβάλλει στην ανάπτυξη του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος δεν έχουν αποσαφηνιστεί και είναι ακόμα αντικείμενο εκτενούς έρευνας. Από πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι πιθανά υπάρχουν διαλυτοί παράγοντες που παράγονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος και ενεργοποιούν πρωτογενή ανοσολογικά κύτταρα (5).

Πιο συγκεκριμένα, μέλη του φύλου *Bacteroidetes* συνθέτουν γλυκάνες χρησιμοποιώντας τις διαιτητικές ίνες. Το *Bacteroides fragilis* παράγει την γλυκάνη, πολυσακχαρίτη Α, με αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Η αποίκιση με το παραπάνω βακτήριο ή η χορήγηση του πολυσακχαρίτη προστατεύει τα αξενικά ζώα από την επαγωγή πειραματικής φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Ο πολυσακχαρίτης αυξάνει την ιντερλευκίνη 10 (IL-10) επάγοντας τα Treg-λεμφοκύτταρα. Εκτός των παραπάνω, η πεπτιδογλυκάνη (PTGN) είναι ένα άλλο μόριο, που εισάγεται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντερικών βακτηρίων και προωθεί την καταστροφή συγκεκριμένων παθογόνων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, η τρυπτοφάνη και τα μεταβολικά προϊόντα της, όπως η ινδόλη και παράγωγα αυτής (ινδόλη -2-προπιονικό και θειικό ινδοξύλιο) επιδρούν στον εντερικό φραγμό, το οξειδωτικό στρες, την νεφρική λειτουργία, την αγγειακή υγεία και έχουν αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές δράσεις. Εκτός των παραπάνω, η τρυπτοφάνη είναι πρόδρομος ένωση για την παραγωγή της σεροτονίνης που εμπλέκεται σε μια σειρά από νευροψυχιατρικές καταστάσεις. Είναι φανερό ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης μέσω του εντερικού μικροβιώματος μπορεί να επιδράσει σημαντικά στην λειτουργία του εγκεφάλου(4). Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα βακτήρια παράγουν μόρια που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις (9).

Συνεπώς, τα μικρόβια πιθανά να επιδρούν με διαφορετικούς τρόπους στο έμφυτο και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα στείρα μικροβίων ποντίκια δεν έχουν ανεπτυγμένα λεμφοκύτταρα και παρουσιάζουν διαταραχές στα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Επίσης, δεν αναπτύσσουν τις ασθένειες των υγείων ποντικών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν μπορούν να αναπτύξουν επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις λόγω της ελαττωματικής λειτουργίας του επίκτητου ανοσοποιητικού μέσω απουσίας των μικροβίων. Από την άλλη, συστατικά του έμφυτου ανοσοποιητικού δείχνουν υπερκινητοποίηση, όπως συμβαίνει με τα μακροφάγα που βρίσκονται σε αυξημένη συγκέντρωση στα στείρα ποντίκια(9).

1.2.7. Δυσβίωση και Ασθένειες

Δεδομένα από μελέτες υποδεικνύουν ότι στα άτομα που εμφανίζονται ατοπικές ασθένειες όπως, αλλεργίες, άσθμα και ατοπικό έκζεμα τροποποιείται η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Μία από τις μελέτες στην οποία εξετάστηκαν 76 παιδιά με υψηλό ρίσκο ατοπικών ασθενειών έδειξε ότι υπήρχαν μεγάλες διαφορές στον μικροβιόκοσμο αυτών που εμφάνισαν και αυτών που δεν εμφάνισαν ασθένεια. Οι διαφορές αυτές προηγούνταν της εμφάνισης της ασθένειας (2, 9). Μελέτες επιβεβαιώνουν την επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην καρκινογένεση μέσω της δίαιτας ή μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης του στο βλεννογόνο του εντέρου. Από παλαιότερα δεδομένα, έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο παρατηρείται αύξηση των βακτηρίων του γένους *Clostridium*, καθώς και εμπλουτισμός του εντέρου με βακτήρια του γένους *Bacteroides* και *Bifidobacterium*. Αντίθετα, ασθενείς με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου έχουν αυξημένη συγκέντρωση σε βακτήρια όπως *Lactobacillus* spp. και *Eubacterium aerofaciens*. Τελευταία, παρατηρείται η παρουσία εντερικών βακτηρίων στην λιθογόνο χολή που προκαλεί την αυξημένη εντερική διαπερατότητα κατά την απόφραξη της χοληδόχου κύστης και τον σχηματισμό λίθων. Τα περισσότερα βακτήρια ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae, ενώ έχουν απομονωθεί και στελέχη εντεροκόκκων και στρεπτοκόκκων. Σε κίρρωτικούς ασθενείς έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα των βακτηρίων της οικογένειας Bifidobacteraceae (5).

Το μεταβολικό σύνδρομο περιλαμβάνει την παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου II και φαίνεται ότι και στις δυο περιπτώσεις εμπλέκεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος. Η πρώτη ένδειξη της επίδρασης των εντερικών βακτηρίων στην παχυσαρκία προήλθε από μελέτες σε παχύσαρκα ποντίκια με μετάλλαξη στο γονίδιο της λεπτίνης. Τα ποντίκια αυτά είχαν διαφορετική εντερική σύνθεση, σε σχέση με τα ποντίκια που δεν είχαν υποστεί μετάλλαξη. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν διαφορές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου παχύσαρκων ατόμων και των ατόμων με φυσιολογικό βάρος, όπως επίσης και η αλλαγή στη σύνθεση μετά από απώλεια βάρους (2). Από πρόσφατα δεδομένα έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο μικροβιόκοσμος της παχυσαρκίας ενισχύει την ικανότητα του ξενιστή να αντλεί περισσότερες θερμίδες από την τροφή και επιδρά στα επιθηλιακά κύτταρα με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποθηκεύεται περισσότερη ενέργεια και να μην καταναλώνεται (10). Όσον αφορά στον διαβήτη τύπου II, οι διαφορές μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου είναι πολύ μικρές, αλλά παρατηρείται μείωση στα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό στους ασθενείς. Φαίνεται

λοιπόν ότι στην παθοφυσιολογία του διαβήτη τύπου II εμπλέκεται μια γενική δυσβίωση παρά συγκεκριμένα μικροβιακά είδη (2).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε ζωικά πρότυπα ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος αλληλεπιδρά με όργανα εκτός του γαστρεντερικού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μειωμένη καρδιακή απόδοση, διαταραχή του υποθαλάμου-υποφυσίου –επινεφρίδιου άξονα, μείωση της αντίληψης του άλγους και ρύθμιση της όρεξης σε στείρα μικροβίων ζώα, σε σχέση με τα κανονικά ποντίκια. Επίσης, έχει υπάρξει αμφιλεγόμενη συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου με αυτοιστικές διαταραχές. Αυτό πιθανά προκύπτει από διαταραχές στη σύνθεση είτε διαφορές στα προϊόντα ζύμωσης, όπως τα SCFAs και η αμμωνία ή στην αυξημένη παραγωγή νευροτοξινών (5).

1.3. Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

1.3.1. Γενικά

Οι Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου (ΙΦΝΕ) περιλαμβάνουν την νόσο του Crohn (CD) και την ελκώδη κολίτιδα (UC). Οι νόσοι αυτοί μπορεί να οριστούν ως νόσοι διαταραγμένης φυσιολογίας, μικροβιολογίας, ανοσολογίας και γενετικής και χαρακτηρίζονται από την χρόνια φλεγμονή στο γαστρεντερικό σωλήνα. Οι διαφορές των δυο επιμέρους νόσων οφείλονται στον χωρικό εντοπισμό και τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής στον γαστρεντερικό σωλήνα(2, 8). Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι οι νόσοι αυτοί επηρεάζουν 2,2 εκατομμύρια ανθρώπους στην Ευρώπη και 5 εκατομμύρια παγκοσμίως. Μέχρι πρότινος, οι ΙΦΝΕ σχετιζόντουσαν με τον Δυτικού τύπου τρόπο ζωής, καθώς ο επιπολασμός τους αυξήθηκε ραγδαία τα τελευταία 50 χρόνια στις ανεπτυγμένες χώρες, με μεγαλύτερη εμφάνιση στην Βόρεια Αμερική και την Βόρεια Ευρώπη. Πάρα ταύτα, παρατηρείται πλέον αργή, αλλά σταθερή αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της σε παγκόσμιο επίπεδο (11).

Τον Αύγουστο του 2011 ολοκληρώθηκε μια πανευρωπαϊκή μελέτη της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας των εταιριών της νόσου Crohn και της ελκώδους κολίτιδας σε πάνω από 6000 ασθενείς για τις επιπτώσεις των ΙΦΝΕ στην ζωή, τις σχέσεις και την καριέρα. Τα στατιστικά δεδομένα δείχνουν ότι το 85% αυτών εισήχθησαν στο νοσοκομείο τα τελευταία 5 χρόνια, ενώ το 40% υποβλήθηκε σε τουλάχιστον μια χειρουργική επέμβαση. Η επίδραση στην ποιότητα ζωής είναι δραματική, καθώς το 60% των ασθενών δηλώνει ότι νιώθει κράμπες και κοιλιακούς πόνους πάνω από 4 ημέρες της εβδομάδας κατά την περίοδο έξαρσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα των υπηρεσιών υγείας να διαγνώσει τις νόσους. Το 18% των

ασθενών διαγνώστηκαν με τη νόσο μετά από 5 χρόνια, ενώ το 60% χρειαζόταν άμεση περίθαλψη πριν την διάγνωση. Όσον αφορά στη θεραπεία, η χρήση φαρμακευτικής αγωγής προκαλεί ανησυχίες στους περισσότερους ασθενείς, καθώς το 42% βιώνουν τα συμπτώματα κυρίως από τα κορτικοστεροειδή. Όμως, η βιολογική θεραπεία εγκαθίσταται όλο και περισσότερο ως επιλογή. Τέλος, τα δεδομένα υποδεικνύουν σοβαρές αρνητικές επιδράσεις στις διαπροσωπικές σχέσεις, στην εκπαίδευση και στην εργασία (11).

Ο χαρακτηρισμός των ΙΦΝΕ ως παγκόσμια ασθένεια, αλλά και οι δραματικές επιπτώσεις αυτών στην υγεία, την ποιότητα ζωής, την εκπαίδευση και την παραγωγικότητα έχουν αφυπνίσει την επιστημονική κοινότητα, η οποία διεξάγει πολλές μελέτες προκειμένου να αποσαφηνίσει την αιτιολογία, τον μηχανισμό και τους παράγοντες που επηρεάζουν την νόσο (5, 11, 14).

1.3.2. Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και Δυσβίωση

Την τελευταία δεκαετία, η επιστημονική πρόοδος στα πεδία της μικροβιολογίας, ανοσολογίας και της γενετικής έχουν βοηθήσει στο να φτάσουμε λίγο πιο κοντά στην κατανόηση των μονοπατιών που λαμβάνουν μέρος στις ΙΦΝΕ. Η παθοφυσιολογία δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα, όμως υποθέτεται ότι οι ΙΦΝΕ προκύπτουν από μια επίμονη ανοσολογική απόκριση ενάντια στα εντερικά μικρόβια και τους μεταβολίτες τους. Αυτή η ανοσολογική απόκριση πυροδοτείται από την γενετική προδιάθεση και από ουσιαστικές αλλαγές στην λειτουργία του εντερικού φραγμού (2, 9, 12). Υπάρχουν πολλοί γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ. Τα άτομα που έχουν πολλούς από τους γενετικούς τόπους είναι ευαίσθητα σε γαστρεντερική φλεγμονή, καθώς δεν μπορούν να ρυθμίσουν τις μικροβιακές κοινότητες που αποικίζουν το βλεννογόνο του εντέρου (2, 5).

Η δυσβίωση, δηλαδή η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ευεργετικών και των βλαβερών βακτηρίων αποτελεί τον γνωστότερο προτεινόμενο μηχανισμό καθώς παρατηρείται ότι η μικροβιακή ποικιλότητα των ασθενών είναι 30-50% μικρότερη από αυτή των υγιών ατόμων. Επίσης, τα δεδομένα δείχνουν ότι η αυξημένη ή μειωμένη ρύθμιση της αφθονίας κάποιων μικροβίων συσχετίζεται με την δραστηριότητα της νόσου. Τα άτομα με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν διαφορές στη σύσταση των αναερόβιων βακτηρίων, όπως αυτά που ανήκουν στο φύλο *Bacteroidetes* και σε μια υποομάδα των *Firmicutes*. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση των στελεχών του φύλου *Firmicutes*, όπως τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* και το *F. prausnitzii*, όπως επίσης και στα *Bifidobacteria*. Το *F. prausnitzii* ανήκει στη βασικότερη ομάδα

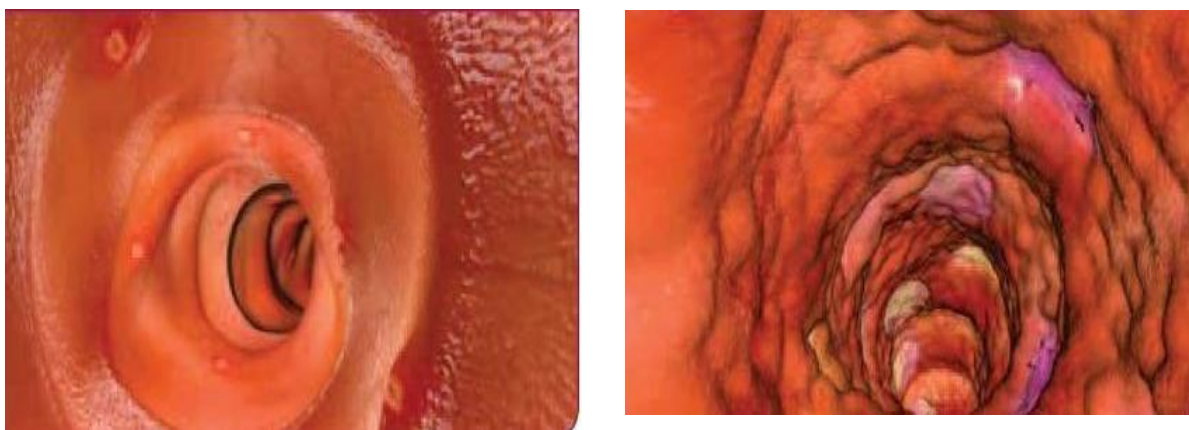
που εμπλέκεται στην παραγωγή SCFAs, ειδικότερα του βουτυρικού, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστηριότητα της νόσου. Από την άλλη μεριά, σύμφωνα με μια πολυκεντρική μελέτη παρατήρησης, ασθενείς με νόσο του Crohn παρουσίασαν αφθονία των μικροοργανισμών που ανήκουν στις οικογένειες Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Veillonellaceae, και Fusobacteriaceae, αλλά μειωμένη αφθονία σε αυτούς των οικογενειών Erysipelotrichales, Bacteroidales, και Clostridiales σε βιοψίες. Όμως, οι οικογένειες Enterobacteriaceae και Fusobacteriaceae είναι οι κύριες μικροβιακές ομάδες παραγωγής λιπαρών οξέων μικρής αλυσού (12).

Μία πολύ πρόσφατη μελέτη των Pascal et al. με μεγάλο δείγμα εθελοντών, παρατήρησε ότι η δυσβίωση στην νόσο του Crohn είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα. Στην πρώτη νόσο παρατηρήθηκαν αλλαγές σε 18 γένη έναντι των τριών στην δεύτερη νόσο. Φαίνεται ότι στην νόσο Crohn είναι πιθανότερη η απώλεια ευεργετικών μικροοργανισμών παρά η εμφάνιση παθογόνων. Άλλο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στην μικροβιακή σύνθεση και ποικιλότητα σε ασθενείς με υποτροπή και σε ασθενείς με ύφεση και για τις δύο νόσους. Επίσης, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα γένη *Faecalibacterium*, ένα άγνωστο γένος της οικογένειας Peptostreptococcaceae, *Anaerostipes*, *Methanobrevibacter* και ένα άγνωστο γένος της οικογένειας Christensenellaceae βρίσκονταν σε αφθονία σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα αλλά και στους υγιείς εθελοντές και απουσίαζαν από ασθενείς με νόσο του Crohn. Αντίθετα, τα γένη *Fusobacterium* και *Escherichia* βρίσκονταν σε αφθονία σε ασθενείς με νόσο Crohn, ενώ απουσίαζαν σχεδόν σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και υγιείς εθελοντές. Το γένος *Collinsella*, εμφανιζόταν κυρίως σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Με αυτά τα 8 γένη προσπάθησαν να αναπτύξουν έναν αλγόριθμο για τον διαχωρισμό των δύο νόσων. Ο αλγόριθμος παρουσίασε αυξημένη ακρίβεια στο να διαγνώσει τους ασθενείς από τους υγιείς, μεγάλη ευαισθησία σε ασθενείς με νόσο του Crohn και σημαντική δυνατότητα να διαχωρίσει τους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα σε σχέση με τους ασθενείς με νόσο Crohn (13).

Δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα εάν οι αλλαγές στον μικροβιόκοσμο είναι αιτία ή συνέπεια των ΙΦΝΕ (5). Φαίνεται από μελέτες ότι μερικά από τα εντερικά βακτήρια είναι αυτά που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και αλλαγές σε αυτά οδηγούν σε ελλιπή ανοσορύθμιση, ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και προαγωγή φλεγμονής. Όμως, δεν έχουν προκύψει σαφή συμπεράσματα για μικροβιακούς βιοδείκτες, καθώς τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα(2, 12) .

1.3.3. Νόσος Crohn

Η νόσος Crohn σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, από την στοματική κοιλότητα μέχρι και τον πρωκτό, αλλά εντοπίζεται συνήθως, στο τέλος του λεπτού εντέρου, στην αρχή του παχέος εντέρου και τον πρωκτό. Η φλεγμονή εκτείνεται σε όλο το πάχος του εντερικού τοιχώματος. Η νόσος εμφανίζεται στα πρώτα στάδια ως έλκος από διαβρώσεις στην εντερική κοιλότητα και στη συνέχεια εξελίσσεται σε βαθιά έλκη διαφόρων μεγεθών, πληγές και πρήξιμο (**Εικόνα 3**) (6, 11).



Εικόνα 3. Αριστερά : Διαβρώσεις και μικρά έλκη κατά την εμφάνιση της νόσου του Crohn, Δεξιά: Βαθιά έλκη, πληγές και πρήξιμο κατά την εξέλιξη της νόσου του Crohn (11).

1.3.3.1. Επιδημιολογία και Γενετική

Εμφανίζεται σε όλα τα στάδια ζωής, αν και είναι πιο συχνή σε ηλικίες 15-29 χρόνων. Εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες απ'ότι στους άνδρες και στις αστικές περιοχές. Σε κάθε 100,000 άτομα περίπου 4-214 των ατόμων θα έχουν τη νόσο, ενώ ένα εύρος 0,03-16 νέων περιπτώσεων διαγιγνώσκεται κάθε χρόνο σε 100,000 άτομα. Δεδομένα από πολλές μελέτες σε δίδυμα και μελέτες με εθνικές και μεταναστευτικές ομάδες καταδεικνύουν σημαντική πολυγονιδιακή γενετική προδιάθεση. Στα μονοζυγωτικά δίδυμα υπάρχει 44% συμφωνία, ενώ στα διζυγωτικά μόνο 4%. Το 4,5-16% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό για την ασθένεια. Όταν ένα άτομο έχει νοσήσει, τότε η πιθανότητα να νοσήσει συγγενής πρώτου βαθμού είναι 10 φορές μεγαλύτερη. Επίσης, φαίνεται ότι η πιθανότητα να νοσήσει κάποιος είναι μεγαλύτερη, όταν είναι Εβραϊκής καταγωγής (6, 11).

1.3.3.2. Αιτιολογία

Η αιτία για την εμφάνιση της νόσου είναι άγνωστη, αν και πιστεύεται ότι οι αλληλεπιδράσεις περιβαλλοντικών, γενετικών παραγόντων και του εντερικού μικροβιόκοσμου παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε ανώμαλη ανοσολογική απόκριση, αύξηση της απορρόφησης βακτηριακών προϊόντων στο σώμα, κυτταρική καταστροφή και εντερικές πληγές. Πιο συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι οι καπνιστές έχουν διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν την νόσο, σε σχέση με τους μη καπνίζοντες. Επίσης, τα αντιβιοτικά, τα αντισυλληπτικά, μη στεροειδή-αντιφλεγμονώδη φάρμακα, η δίαιτα, μολύνσεις και η υγιεινή θεωρούνται παράγοντες κινδύνου, χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί ο ρόλος τους. Όσον αφορά στη δίαιτα, έχει παρατηρηθεί ότι δίαιτα υψηλή σε επεξεργασμένα σάκχαρα και χαμηλή σε ίνες, φρούτα και λαχανικά συσχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (6, 11).

Κάποιες μελέτες, υποστηρίζουν την θεωρία, ότι η αιτιολογία της νόσου προέρχεται από την ανικανότητα να απομακρυνθούν οι παθογόνοι στο έντερο. Η νόσος πολλές φορές ομοιάζει με την φυματίωση του ειλεού, την μόλυνση από *Yersinia enterocolitica* και μολύνσεις από ορθοπρωκτικά χλαμύδια. Σποραδικά συμβάντα διασποράς της νόσου επίσης, σε συγγενείς και φίλους ενισχύουν την θεωρία της μεταφοράς κάποιου περιβαλλοντικού παράγοντα, όπως μολυσματικά βακτήρια. Μερικά από τα βακτήρια που έχουν ενοχοποιηθεί είναι τα *Helicobacter*, *Mycobacteria*, *Chlamydia*, *Pseudomonas maltophilia*, *Mycobacterium kanasii*, *M.paratuberculosis*, *Mycoplasmas* και *Listeria monocytogenes*. Τα δεδομένα όμως δεν είναι επαρκή για να διεξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα (6).

1.3.3.3. Συμπτώματα

Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι ο κοιλιακός πόνος και η επίμονη διάρροια. Η απώλεια βάρους, η μείωση της όρεξης, ο πυρετός, οι νυχτερινές εφιδρώσεις, τα στοματικά έλκη και η πρωκτική αιμορραγία είναι επίσης, συμπτώματα που εμφανίζονται σε ασθενείς. Εκτός των παραπάνω, παρουσιάζονται και συμπτώματα που δεν είναι άμεσα σχετιζόμενα με τη νόσο όπως κούραση, αναιμία, υποσιτισμός, δερματικές πληγές, πρήξιμο οφθαλμών και συκωτιού. Κατά την παιδική ηλικία μπορεί να καθυστερήσει η ανάπτυξη και η ήβη. Οι περισσότεροι ασθενείς βιώνουν δυο περιόδους, αυτή της έξαρσης, όπου η νόσος είναι ενεργή και αυτή της ύφεσης, όπου είναι λιγότερο ενεργή. Οι συνεχόμενες υποτροπές μπορεί να προκαλέσουν

ίνωση ή τραυματισμό ιστών. Εάν η ίνωση προκαλέσει στένωση του εντερικού σωλήνα τέτοια ώστε να φράξει το έντερο είναι αναγκαίο το χειρουργείο. Τα βαθιά έλκη που σχηματίζονται μπορεί να προκαλέσουν απόστημα. Τα αποστήματα πιθανά να σχηματίσουν συρίγγια. Για να θεραπευτούν οι παραπάνω δομές μπορεί να χρειαστεί χειρουργείο, όμως η νόσος μπορεί να επανέλθει συνοδευόμενη με απώλεια της λειτουργίας του εντέρου (11).

1.3.3.4. Ανοσοποιητικές διαδικασίες

Η νόσος του Crohn (CD) σχετίζεται κυρίως με κυτταροκίνες των βοηθητικών κυττάρων T1 όπως είναι ο παράγοντας TNF-α, η ιντερλευκίνη- 12 (IL-12), και η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). Όταν ο βλεννογόνος τραυματιστεί τα επιθηλιακά κύτταρα μεταφέρονται στο σημείο τραυματισμού για να το επουλώσουν και να αποκαταστήσουν την λειτουργία του βλεννογόνου. Παρόλο που δεν θεωρείται αυτοάνοση ασθένεια, τα πρόσφατα στοιχεία δείχνουν παράλογη ανοσολογική απόκριση σε οξύ τραυματισμό των ασθενών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν χαμηλή συσσώρευση ουδετερόφιλων και χαμηλότερη παραγωγή IL-8 και IL-1β. Μία άλλη θεωρία κάνει λόγο για ελάττωμα στην ανοσορύθμιση, με αποτέλεσμα την διαιώνιση της φλεγμονής. Στην νόσο επίσης (αντίστοιχα και στην ελκώδη κολίτιδα), ενεργοποιούνται τα CD4 βοηθητικά T κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ φυσιολογικά τα επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούν τα CD8+ κατασταλτικά T κύτταρα. Στους ασθενείς παρατηρείται αντοχή στην απόπτωση των T κυττάρων που αποδίδεται στην IL-6. Τα μακροφάγα και μονοκύτταρα μπορεί να απελευθερώνουν sIL-6R (υποδοχέας διαλυτής ιντερλευκίνης-6) που συνδέεται με την IL-6, παρακινεί το gp130 στην επιφάνεια των κυττάρων και προκαλεί μια σειρά από αντί-αποπτωτικές εκφράσεις γονιδίων. Επίσης, τα κύτταρα του βλεννογόνου των ασθενών έχουν ικανότητα να ενώνονται με τα λευκοκύτταρα σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αυτό υποδηλώνει ότι κύτταρα που δεν εμπλέκονται στο ανοσολογική απόκριση εμπλέκονται στον προφλεγμονώδη μηχανισμό της χρόνιας φλεγμονής (6).

1.3.3.5. Θεραπεία

Οι πιο παραδοσιακές θεραπευτικές στρατηγικές αποσκοπούν στην θεραπεία των συμπτωμάτων κατά τις εξάρσεις. Όμως η προσοχή εστιάζεται πλέον και στην θεραπεία της εντερικής επένδυσης. Σε συγκεκριμένους ασθενείς χρειάζεται παρέμβαση με επιθετικές θεραπείες για να μην υποστούν μη αντιστρεπτή καταστροφή του εντέρου, αλλά και άλλες επιπλοκές (11).

Η φαρμακευτική αγωγή είναι πολύ συχνή. Τα φάρμακα που βασίζονται στο αμινοσαλικυλικό οξύ χρησιμοποιούνται για χρόνια, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματικά στην CD σε σχέση με την UC. Τα στεροειδή είναι αποτελεσματικά, όμως η μακροχρόνια χρήση τους προκαλεί πολλές παρενέργειες, μερικές εξ'αυτών ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η καταστολή αδρεναλίνης. Επίσης, χρησιμοποιούνται ευρέως φάσματος αντιβιοτικά για τις βακτηριακές λοιμώξεις που εμφανίζονται στους ασθενείς. Οι διάφορες κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί δεν μπορούν να αποδείξουν την αποτελεσματικότητά τους και τα οφέλη τους. Πολύ γνωστά αντιβιοτικά που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιούνται πρακτικά είναι τα metronidazole και ciprofloxacin, μόνα τους ή σε συνδυασμό. Τα δεδομένα δεν παρουσιάζουν ξεκάθαρα οφέλη, καθώς και ο αριθμός των κλινικών μελετών, αλλά και ο αριθμός των εθελοντών που πήραν μέρος είναι μικρός. Βασικό μειονέκτημα των αντιβιοτικών είναι ότι πολλοί ασθενείς δεν είναι ανεκτικοί σε αυτά μακροπρόθεσμα. Σε υψηλές δόσεις της metronidazole παρατηρήθηκε περιφερική νευροπάθεια στους 11 από τους 13 παιδιατρικούς ασθενείς. Οι περισσότερες μελέτες για αντιβιοτικά δεν προσδιορίζουν την επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Είναι σαφές ότι μακροχρόνια θεραπεία μπορεί να προκαλέσει δυσβίωση, δηλαδή αύξηση παθογόνων και απώλεια ωφέλιμων βακτηρίων. Επίσης, εκτιμάται ότι σχεδόν το 50% των ασθενών θα χρειαστεί εγχείριση στα 10 χρόνια διάγνωσης και το 70% κάποια στιγμή στη ζωής τους. Η εγχείριση δεν θεραπεύει την ασθένεια, απλά περιορίζει τα συμπτώματα και χρησιμοποιείται μόνο όταν έχουν αποτύχει όλες οι άλλες εναλλακτικές θεραπείες (6).

Η χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών είναι ένα πεδίο αρκετά καινούργιο που μελετάται. Έχουν διεξαχθεί αρκετές κλινικές μελέτες με ασθενείς της νόσου Crohn και τα αποτελέσματα ποικίλουν. Καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζονται κατά την χορήγηση συμβιωτικών, αλλά οι κλινικές μελέτες είναι ελάχιστες και έχουν μικρή στατιστική δύναμη (6). Η μεταμόσχευση κοπράνων εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1989 σε ασθενείς με νόσο Crohn με θετικά αποτελέσματα. Πιο πρόσφατες μελέτες επίσης, επιβεβαιώνουν την βελτίωση των συμπτωμάτων, αλλά αναφέρουν και πρόκληση βακτηριαϊμίας *E.coli* και υποτροπή λίγους μήνες μετά την μεταμόσχευση. Σαν διαδικασία βρίσκεται στα αρχικά στάδια με πολλούς περιορισμούς να απασχολούν τους επιστήμονες. Πλέον υπάρχουν και αρκετές ομάδες που χρησιμοποιούν την εντερική διατροφή για την θεραπεία της νόσου του Crohn και παρατηρείται γρήγορη επαγωγή ύφεσης, κυρίως σε παιδιά με τη νόσο (14).

1.3.4. Ελκώδη κολίτιδα

Η ελκώδης κολίτιδα διαφοροποιείται από την νόσο Crohn σε ενδοσκοπικό και ιστολογικό επίπεδο, αλλά και στην τοποθεσία της νόσου. Χαρακτηρίζεται από χρόνια επεισοδιακή φλεγμονή που επηρεάζει μόνο την επιφανειακή επένδυση του παχέος εντέρου και το ορθό. Δύναται να περιορίζεται στο τελικό τμήμα του κόλον, οπότε μιλάμε για πρωκτίτιδα, είτε στην αριστερή πλευρά του κόλον και ονομάζεται κολίτιδα αριστερής πλευράς ή να επεκτείνεται κατά μήκος του κόλον προκαλώντας την εκτεταμένη κολίτιδα. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η αιμορραγική διάρροια απουσία βακτηρίου, παρασίτων ή ωών σε καλλιέργεια κοπράνων (Εικόνα 4) (6, 11).



Εικόνα 4. Αριστερά: υγιές κόλον, Αριστερά: Χρόνια ελκώδη κολίτιδα (11)

1.3.4.1. Επιδημιολογία και γενετική

Η ελκώδης κολίτιδα δύναται να εμφανιστεί σε όλα τα στάδια ζωής, αν και στατιστικά διαγιγνώσκεται κυρίως σε νέους, αλλά και άτομα ηλικιών 60-80 χρόνων. Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί, υπάρχουν 8 έως 246 άτομα με τη νόσο σε κάθε 100,000 άτομα και 1 έως 20 νέες περιπτώσεις ανά 100,000 άτομα τον χρόνο. Η εβραϊκή καταγωγή αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Επίσης, εάν ένα άτομο παρουσιάσει την ασθένεια, η πιθανότητα να την εμφανίσει και ένας συγγενής πρώτου βαθμού είναι δυο φορές μεγαλύτερη (6, 11).

1.3.4.2. Αιτιολογία και Συμπτώματα

Οι ασθενείς βιώνουν περιόδους έξαρσης και ύφεσης. Οι περίοδοι έξαρσης μπορεί να είναι ξαφνικές και σοβαρές και πολύ συχνά τα άτομα χρειάζονται νοσηλεία. Όταν η νόσος δεν μπορεί να ελεγχθεί, η επέμβαση για την απομάκρυνση του κόλον είναι μια λύση. Επίσης, οι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου, ειδικά αυτοί στους οποίους η νόσος είναι εκτεταμένη και η φλεγμονή αθεράπευτη (11).

Παρόμοια με τη νόσο του Crohn, οι αιτίες εμφάνισης της ελκώδους κολίτιδας προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων και των εντερικών βακτηρίων. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι τα αντιβιοτικά, τα αντισυλληπτικά, μη στεροειδή-αντιφλεγμονώδη φάρμακα, η δίαιτα, μολύνσεις και η υγιεινή. Φαίνεται ότι η δίαιτα παίζει σημαντικό ρόλο στην δράση και την κλινική εικόνα της νόσου. Τα δημητριακά, το μπέικον, οι ντομάτες, η μπανάνα, τα εσπεριδοειδή, τα γαλακτοκομικά και το γάλα, το μοσχάρι και το χοιρινό, η καφεΐνη φαίνεται να διατηρούν τη νόσο ενεργή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι το κάπνισμα έχει προστατευτική επίδραση, καθώς τα άτομα που διέκοψαν το κάπνισμα έχουν υψηλό ρίσκο εμφάνισης της νόσου, σε σχέση με αυτούς που δεν κάπνιζαν ποτέ. Όπως αναφέρθηκε και για την νόσο του Crohn, υπάρχουν αντίστοιχα μελέτες που υποστηρίζουν ότι πιθανή αιτία της ελκώδους κολίτιδας είναι συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια από τα γένη *Shigella*, *Salmonella* και *Yersinia*. Η νόσος μοιάζει με την κατάσταση που προκαλούν οι μολύνσεις από τα παθογόνα στελέχη των γενών *Campylobacter* και *Shigella*. Έχουν ενοχοποιηθεί και παθογόνα στελέχη του *E.coli* με πολλές μελέτες να διχάζονται. Τα δεδομένα όμως είναι ανεπαρκή, ώστε να στηριχθεί η αιτιολογία της νόσου σε αυτά (6, 11).

1.3.4.3. Ανοσοποιητικές διαδικασίες

Η ελκώδης κολίτιδα φαίνεται να διαφέρει από τη νόσο Crohn και σε ανοσολογικό επίπεδο. Τα T2 βοηθητικά κύτταρα ενεργοποιούνται, σε αντίθεση με τη νόσο του Crohn όπου ενεργοποιούνται τα T1. Οι προ-φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές μάλλον είναι διαφορετικοί, αν και ενεργοποιούνται τα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα κα σε αυτή την περίπτωση. Τα CD4+ T λεμφοκύτταρα παράγουν IL-1α, IL-1β, IL-5, IL-8, IL-10, TNF-α και IFN-γ αλλά όχι IL-4. Τα προϊόντα των φυσιολογικών εντερικών βακτηρίων, όπως πεπτιδογλυκάνες, ολιγοπεπτίδια κ.α. φαίνεται να διαιωνίζουν την φλεγμονή. Προκαλούν βαθμίδες κατά μήκος του επιθηλίου, ενισχύουν την μεταφορά των ουδετερόφιλων στο επιθήλιο και την διάσχιση του εντερικού φραγμού (6).

1.3.4.4. Θεραπεία

Η θεραπεία στοχεύει στην επαγωγή και διατήρηση της περιόδου ύφεσης. Η φαρμακευτική αγωγή διαμορφώνεται μεμονωμένα για κάθε ασθενή. Για την θεραπεία της ήπιας ή μέτριας ελκώδους κολίτιδας χρησιμοποιούνται τα προϊόντα με 5-ASA. Τα συμπτώματα από την χορήγηση αυτών είναι ναυτία, εμετός, πυρετός, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ανεπάρκεια φολικού οξέος και στειρότητα. Το δεύτερο επίπεδο θεραπείας είναι τα στεροειδή, όταν η νόσος είναι πιο σοβαρή. Άλλη θεραπεία είναι το χειρουργείο, όμως το 45% των ασθενών υποφέρουν αργότερα από θυλακίτιδα, οπότε αποφεύγεται. Οι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες από την άλλη, χρησιμοποιούνται για την διατήρηση της ύφεσης. Τα προβιοτικά και πρεβιοτικά, όπως προαναφέρθηκε είναι μια πιθανή στρατηγική θεραπείας, αλλά η έρευνα δεν έχει αποδώσει ακόμα σαφή αποτελέσματα (6). Η μεταμόσχευση κοπράνων έχει διαφορετική αποτελεσματικότητα στην ελκώδη κολίτιδα. Υπάρχουν κλινικές μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε επιδείνωση των συμπτωμάτων και αδυναμία πρόκλησης ύφεσης. Αντίθετα, υπάρχουν κλινικές μελέτες που παρουσιάζεται αυξημένο ποσοστό ύφεσης (14).

1.4. Προβιοτικά, πρεβιοτικά συμβιωτικά

Η επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου και των μεταβολιτών του στο ανοσοποιητικό σύστημα υποδεικνύει και κατευθύνει την επιστημονική κοινότητα στην μελέτη νέων θεραπειών, στις οποίες εμπεριέχεται η χορήγηση προβιοτικών, πρεβιοτικών ή συμβιωτικών. Η εξατομικευμένη διαίτα με ταυτόχρονη χορήγηση των παραπάνω φαντάζει ιδανική στρατηγική για την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, δεδομένων των ποικίλων παρενεργειών των φαρμάκων (8).

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα και προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Οι ευεργετικές ιδιότητες αντανακλώνται στη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, την αυξημένη αντοχή στην μόλυνση, την πέψη της λακτόζης και την πιθανή προστασία από τον καρκίνο (6). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών είναι η παραγωγή SCFAs και γαλακτικού, τα οποία παρεμποδίζουν την εγκατάσταση των παθογόνων και έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η αύξηση του χρόνου διέλευσης του εντερικού περιεχομένου που επηρεάζει την προσκόλληση των μικροοργανισμών στον εντερικό βλεννογόνο και την απορρόφηση του νερού από το έντερο. Άλλος μηχανισμός είναι η μειωμένη παραγωγή επιβλαβών ουσιών που συμμετέχουν στην

παθογένεια των ΙΦΝΕ(15). Από την άλλη μεριά, τα πρεβιοτικά είναι άπεπτα συστατικά τροφίμων τα οποία διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη και/ή αυξάνουν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων βακτηρίων στο έντερο, ενώ τα συμβιωτικά είναι ο συνδυασμός των προβιοτικών και πρεβιοτικών παραγόντων (6).

Όσον αφορά στα προβιοτικά, σε *in vitro* μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση μίγματος των στελεχών *L. acidophilus* X37, *L. paracasei* Z11, *L. casei* CRL431, LGG, *B. longum* Q46, *B. bifidum* Z9, *B. breve* 20091 και *B. bifidum*20082a προκάλεσε μείωση των επιπέδων της ιντερλευκίνης IL-12 και του TNF-α σε υπερκείμενα καλλιιεργειών δενδριτικών κυττάρων (8). Σε μια πρόσφατη μελέτη των Martín et al., μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης *F. prausnitzii* σε ποντίκια στα οποία επάχθηκε χαμηλή-ήπια φλεγμονή. Το βακτήριο αυτό βρίσκεται σε αφθονία στο έντερο και παρατηρείται μείωση των επιπέδων του σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική επίδραση, καθώς τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το βακτήριο ή ακόμη και το υπερκείμενο της καλλιέργειας του, παρουσίασαν σημαντική μείωση της εντερικής διαπερατότητας, των επιπέδων των κυτταροκινών IL-6, IFN-γ, IL-4 σε δείγματα κόλον και IL-6, IL-26 στο πλάσμα και της σεροτονίνης (3). Έχουν διεξαχθεί κλινικές μελέτες με προβιοτικά, αλλά για φλεγμονώδεις νόσους ο αριθμός αυτός είναι μικρός και οι ίδιες οι μελέτες είναι μικρής κλίμακας. Στις διάφορες μελέτες για την νόσο του Crohn, έχει χρησιμοποιηθεί το κοινό προβιοτικό, ο *Lactobacillus rhamnosus* GG, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, όσον αφορά στην επίδρασή του στην σοβαρότητα της νόσου και τον ρυθμό υποτροπής. Οι *E. Coli* Nissle 1917 και *Saccharomyces boulardii* έχουν επίσης μελετηθεί, αλλά τα δεδομένα είτε δεν δείχνουν καμία θετική επίδραση ή δεν είναι επαρκή λόγω μεθοδολογικών κενών ή μικρού αριθμού εθελοντών. Για την ελκώδη κολίτιδα, οι μελέτες είναι περισσότερες και η ποικιλία των βακτηρίων που έχουν μελετηθεί μεγαλύτερη. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν σε κάποιες περιπτώσεις σχεδόν ισότιμη επίδραση με την φαρμακευτική χορήγηση των παραγόντων 5-ASA στην διατήρηση της ύφεσης. Όμως τα δεδομένα ακόμα είναι ανεπαρκή (6, 9).

Η παρατήρηση της αποτελεσματικότητας των συμβιωτικών καλλιιεργειών σε διάφορες μελέτες έναντι των προβιοτικών μόνων τους έχει οδηγήσει την επιστημονική σκέψη στην χορήγηση μόνο πρεβιοτικών. Οι κλινικές μελέτες όμως που έχουν διεξαχθεί με πρεβιοτικά είναι ανίσχυρες και λίγες. Για τα συμβιωτικά υπάρχουν ελάχιστες κλινικές μελέτες σε ΙΦΝΕ. Στην πρώτη, ενώ παρουσιάστηκαν θετικά αποτελέσματα ο αριθμός των εθελοντών ήταν πολύ μικρός. Στην δεύτερη, ο σκοπός ήταν η παρατήρηση της ικανότητας επιβίωσης των

συμβιωτικών στο έντερο και όχι των αντιφλεγμονωδών χαρακτηριστικών που πιθανά διέθεταν (6, 8).

Οι ενδοιασμοί για την χορήγηση προβιοτικών ως θεραπεία είναι πολλοί. Τα προβιοτικά χρειάζονται διαιτητικές ίνες για τον μεταβολισμό τους, όπως επίσης, η ανεκτικότητα των ατόμων στην εισαγωγή νέων βακτηρίων στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο ποικίλει. Τα δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρα για το κατά πόσο τα προβιοτικά επιβιώνουν κατά την μεταφορά τους στο στομάχι, αλλά και το ποια μικρόβια επιβιώνουν πιο εύκολα και εάν χρειάζεται συνεχής διαιτητική υποστήριξη τους (6, 9). Από την άλλη μεριά, τα πρεβιοτικά πλεονεκτούν έναντι των προβιοτικών, γιατί δεν χρειάζεται να ανταγωνιστούν τα ήδη υπάρχοντα βακτήρια. Αντιθέτως, στοχεύουν σε βακτήρια που φυσιολογικά υπάρχουν στο έντερο. Βέβαια, εάν τα βακτήρια στόχοι απουσιάζουν από το έντερο, η δράση των πρεβιοτικών δεν είναι αποτελεσματική τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα. Η αποτυχία των συμβιωτικών και προβιοτικών μπορεί να οφείλεται στο ότι η επιλογή τους γίνεται σύμφωνα με την βιοδιαθεσιμότητα, την ικανότητα επιβίωσης και προσκόλλησης και όχι με κριτήρια που αφορούν στην ρυθμιστική ικανότητα των ανοσολογικών αποκρίσεων (6). Τέλος, ενώ έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες με χορήγηση μικροοργανισμών όπως, των *Bifidobacterium* ή *Lactobacillus rhamnosus* GG ως προβιοτικά λόγω των πιθανών θετικών επιδράσεων, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα από άλλες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το γένος *Bifidobacterium* δεν μειώνεται στα κόπρανα αλλά και στο βλεννογόνο του ειλεού και του κόλον, αντίθετα η συγκέντρωση των *Bifidobacterium* και των *Lactobacillus* των ασθενών με ενεργή ελκώδη κολίτιδα αυξάνεται. Σε περιόδους ύφεσης και οι δυο μικροοργανισμοί είναι σε μειωμένα επίπεδα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ο *F. prausnitzii* είναι σε αυξημένα επίπεδα σε παιδιατρικούς ασθενείς με νόσο του Crohn στην αρχή της νόσου, αλλά όχι σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Σε άλλη μελέτη έχει παρατηρηθεί αύξηση του παραπάνω μικροοργανισμού σε νόσο του Crohn που εντοπίζεται στο κόλον και μείωση όταν εντοπίζεται η νόσος στον ειλεό. Οι παραπάνω διαπιστώσεις πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή χορήγησης προβιοτικών στην θεραπεία των ΙΦΝΕ (16, 17, 18).

1.5. Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου

1.5.1. Γενικά

Η μελέτη του εντερικού μικροβιόκοσμου οδήγησε την προσοχή στην επίδραση των μεταβολιτών των βακτηρίων στην ανοσολογική απόκριση υπό συνθήκες ασθένειας και φλεγμονής στο εντερικό σύστημα. Η δράση, η ποικιλία και η σύνθεση των μεταβολικών μορίων δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως, αλλά η ύπαρξή τους φαίνεται να είναι καίρια για την ρύθμιση της εντερικής ομοιόστασης και την ανταπόκριση του ανοσοποιητικού σε καταστάσεις δυσβίωσης. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) είναι οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν υψηλό ενδιαφέρον τελευταία, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι βελτιώνουν την ασθένεια σε ζωικά μοντέλα κολίτιδας, αλλά και άλλων νόσων, όπως το αλλεργικό άσθμα. Ειδικά για τις ΙΦΝΕ, οι αλλαγές σε μονοπάτια ζύμωσης των μορίων αυτών έχουν συσχετιστεί με καταστάσεις δυσβίωσης (19).

1.5.2. Παραγωγή και μεταφορά των SCFAs

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου είναι τα κύρια προϊόντα της ζύμωσης των άπεπτων διαιτητικών ινών, αλλά και πρωτεϊνών και πεπτιδίων από τα εντερικά βακτήρια. Τα λιπαρά οξέα που ανήκουν σε αυτή την ομάδα περιέχουν λιγότερο από έξι μόρια ανθράκων στην ανθρακική τους αλυσίδα και περιλαμβάνουν το φορμικό οξύ (C1), το οξικό οξύ (C2), το προπιονικό οξύ (C3), το βουτυρικό οξύ (C4) και το βαλερικό οξύ (C5). Τα αφθονότερα από αυτά στο έντερο είναι το οξικό, προπιονικό και βουτυρικό, καθώς αποτελούν το 95% των συνολικών SCFAs και η αναλογία τους στο έντερο είναι 3:1:1 αντίστοιχα. Η συγκέντρωσή τους ποικίλει στα διάφορα τμήματα του εντέρου. Το οξικό και προπιονικό βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο λεπτό, αλλά και το παχύ έντερο, ενώ το βουτυρικό κυρίως στο κόλον και το τυφλό. Τα μονοπάτια για την παραγωγή προπιονικού και βουτυρικού οξέος είναι πιο διατηρημένα και εξειδικευμένα σε επίπεδο βακτηρίων, ενώ τα μονοπάτια παραγωγής οξικού κατανέμονται ευρέως στις διάφορες βακτηριακές ομάδες (19).

Τα SCFAs απορροφούνται από το έντερο και είτε χρησιμοποιούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα ή μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος ή σε άλλα όργανα. Η εισαγωγή τους στα κύτταρα μπορεί να ολοκληρωθεί με παθητική διάχυση, μεταφορά μέσω ειδικών μεταφορέων συζευγμένων με Na⁺ ή με πρωτόνια και με την ενεργοποίηση των GPCR (19).

1.5.3. Ανοσοποιητικό σύστημα και SCFAs

Τα SCFAs ρυθμίζουν λειτουργίες διαφόρων συστημάτων του οργανισμού με βασικό ρόλο στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, εμποδίζοντας την διακετυλάση της ιστόνης και ενεργοποιώντας τους υποδοχείς συζευγμένους με G πρωτεΐνες. Τα μόρια συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής ,επιδρώντας στις αυτοανοσολογικές αποκρίσεις. Τα επιστημονικά δεδομένα επιβεβαιώνουν την ρύθμιση της δράσης όλων σχεδόν των κυττάρων του ανοσοποιητικού από τα SCFAs, επάγοντας αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (19).

Όσον αφορά στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, τα SCFAs επάγουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ στα επιθηλιακά κύτταρα και επηρεάζουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Κατά την φλεγμονή, παρακινούν την μεταφορά των ουδετερόφιλων μέσω της ενεργοποίησης του GPR43. Επίσης, εμποδίζουν τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF-α. Εκτός των παραπάνω, επιδρούν στα δενδριτικά κύτταρα, στην έκκριση των κυτταροκινών, αλλά και στην αλληλεπίδρασή τους με τα T κύτταρα. Πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι το βουτυρικό διευκόλυνε την διαφοροποίηση των απλών T κυττάρων σε Tregs και εμπόδισε την διαφοροποίηση των T απλών κυττάρων σε κύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη- γ μέσω επαγωγής των ενζύμων IDO1 (συμμετέχει στον καταβολισμό της τρυπτοφάνης) και Aldh1A2 (καταλύει τη σύνθεση του ρετινοϊκού οξέος από την ρετιναλδεύδη). Το προπιονικό προκάλεσε την μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών CD40, PD-L2 και CD86, οπότε την μειωμένη ικανότητα λειτουργίας των T2 κυττάρων. Το βουτυρικό ρυθμίζει την λειτουργία και των μακροφάγων, καθώς εμποδίζει την δράση των NO,IL-6 και IL-12, αλλά όχι των TNF-α ή MCP-1(19).

Στο επίκτητο ανοσοποιητικό, φαίνεται να αυξάνουν τον αριθμό των Tregs και την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Tregs κύτταρα. Το βουτυρικό υπέρ-ρυθμίζει την ακυλίωση της ιστόνης H3 και ενισχύει την διαφοροποίηση των Tregs. Από αυτά τα δεδομένα φαίνεται ότι τα λιπαρά οξέα ενισχύουν την έκφραση του Foxp3 (κύριου ρυθμιστή του μονοπατιού ανάπτυξης και λειτουργίας των ρυθμιστικών T κυττάρων) από τα T κύτταρα του κόλον. Επίσης, αυξάνουν την παραγωγή IL-10 στα T κύτταρα και ενισχύουν την έκκριση IgA από τα B κύτταρα (19).

1.5.4. ΙΦΝΕ και SCFAs

Σε γνωστή μελέτη διαπιστώθηκε ότι παιδιά από διάφορες χώρες της Ευρώπης εμφάνιζαν χαμηλότερη ποικιλία εντερικών βακτηρίων, απουσία βακτηρίων για πέψη ινών και μειωμένη παραγωγή SCFA σε σχέση με παιδιά της Αφρικής. Επίσης, τα επιστημονικά δεδομένα καταδεικνύουν ως χαρακτηριστικό της δυσβίωσης, την μείωση των βακτηρίων

Roseburia hominis και *Faecalibacterium prausnitzii*, που παράγουν βουτυρικό. Ο εντερικός φραγμός είναι ζωτικής σημασίας για την παρεμπόδιση της φλεγμονής στις ΙΦΝΕ. Σε αυτή την κατάσταση, τα λιπαρά λειτουργούν ως ρυθμιστές του φραγμού και της έκκρισης κυτταροκινών, βλέννας και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Το βουτυρικό συγκεκριμένα, φαίνεται να βοηθά στην ισχυρή ένωση του επιθηλίου και να ρυθμίζει την διαπερατότητα του. Σε μελέτες με ασθενείς, έχουν αναφερθεί πολλές θετικές επιδράσεις. Η χορήγηση SCFAs φαίνεται να βελτιώνει την κολίτιδα και η συμπληρωματική χορήγηση με την φαρμακευτική αγωγή φαίνεται να είναι ενισχυτική. Όμως περιορισμοί για την χρήση τους και η μειωμένη συμμόρφωση των ασθενών δεν τα καθιστά πρωταρχική θεραπεία (19).

1.6. Μικροοργανισμοί και παραγωγή βουτυρικού

1.6.1. Βουτυρικό

Το βουτυρικό οξύ έχει ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος. Αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα οξείδωσης για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και επιδρά σε λειτουργίες, όπως την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, στην λειτουργία του επιθηλιακού φράγματος και την ανοσολογική λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (20, 21). Πιο συγκεκριμένα, ενισχύει την παραγωγή των T ρυθμιστικών κυττάρων, εμποδίζει την φλεγμονή και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, καθώς εμφανίζεται να λειτουργεί ως παρεμποδιστής της ιστόνης της διακετυλάσης (22). Το βουτυρικό στο ανθρώπινο έντερο παράγεται μέσω δυο κύριων μονοπατιών, αυτό της βούτυρο-CoA:οξικό CoA-τρανσφεράσης και της βουτυρικής κινάσης, με το πρώτο να κυριαρχεί(23). Μέσω διασταυρούμενων διατροφικών αλληλεπιδράσεων, οι μικροοργανισμοί μπορούν να παράξουν βουτυρικό με τη χρήση παραγώγων, όπως το οξικό και το γαλακτικό από άλλα βακτήρια, τα *Bifidobacteria* (24, 25).

1.6.2. Μικροοργανισμοί –Παραγωγοί βουτυρικού

Οι πιο γνωστοί παραγωγοί βουτυρικού είναι οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο φύλο των Firmicutes, και συγκεκριμένα στα συμπλέγματα IV και XIVa. Βέβαια, σε αυτά τα συμπλέγματα υπάρχουν βακτήρια που δεν παράγουν βουτυρικό. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι Gram +, ευαίσθητοι στο οξυγόνο, υποχρεωτικά αναερόβιοι και σακχαρολυτικοί. Οι κυρίαρχοι από αυτούς στο κόλον είναι οι *Faecalibacterium prausnitzii* για το σύμπλεγμα IV, κατέχοντας πάνω από το 14% και *Eubacterium rectale* για το σύμπλεγμα XIVa, κατέχοντας πάνω από το 13% του συνολικού μικροβιόκοσμου των κοπράνων αντίστοιχα. Το *Faecalibacterium prausnitzii* παρόλο που θεωρείται υποχρεωτικά αναερόβιο, φαίνεται να έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και σε μικροαερόφιλες συνθήκες και να παράγει βουτυρικό, αλλά με χαμηλό ρυθμό. Άλλα είδη είναι αυτά των γενών *Roseburia spp.* (*Roseburia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Roseburia intestinalis* και *Roseburia hominis*), *Eubacterium spp.* (*Eubacterium hallii*), *Anaerostipes spp.* (*Anaerostipes butyraticus*, *Anaerostipes caccae*, και *Anaerostipes hadrus*) και ο *Butyricicoccus pullicaecorum* (23, 24).

Τα βακτήρια του γένους *Bacteroides* μέχρι πρόσφατα δεν θεωρούνταν παραγωγοί βουτυρικού. Όμως, εμφανίζονται όλο και περισσότερες μελέτες που αναφέρουν την παραγωγή του βουτυρικού από στελέχη *Bacteroides*. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν βουτυρικό παρουσιάζουν ευρεία κατανομή σε 10 φύλα, αλλά τα κυριότερα στο έντερο να ανήκουν στα δυο παραπάνω συμπλέγματα. Συνεπώς, είναι φανερό η τεράστια ποικιλία στις μεταβολικές λειτουργίες των στελεχών των μικροοργανισμών. Κάποια από τα παραπάνω είδη όπως *E.rectale*, *F.prausnitzii* και *R.intestinalis* αποικίζουν περισσότερο το στρώμα του βλεννογόνου αυξάνοντας την διαθεσιμότητα του βουτυρικού στα επιθηλιακά κύτταρα του κόλον και άλλα όπως το *A.caccae* αποικίζουν κυρίως τον αυλό του κόλον. Τα βακτήρια αυτά δεν αποικίζουν το έντερο από την στιγμή της γέννησης. Μελέτη έδειξε ότι ο *F.prausnitzii*, δεν εμφανίζεται μέχρι και τους πρώτους 6 μήνες ζωής, αλλά αυξάνεται ξαφνικά στην προεφηβεία (22, 23, 24, 25).

1.6.3. Μικροοργανισμοί-Παραγωγοί βουτυρικού και ΙΦΝΕ

Έχει παρατηρηθεί σε μελέτες ότι σε ασθενείς με ΙΦΝΕ μειώνονται οι μικροοργανισμοί *Clostridium* των συμπλεγμάτων IV (ομάδα *Clostridium leptum*) και XIVa (ομάδα *Clostridium coccoides*), οι οποίοι παράγουν βουτυρικό οξύ, με τα *Faecalibacterium prausnitzii* και

Butyricicoccus pullicaecorum να μειώνονται ιδιαίτερα στα κόπρανά τους. Επίσης, σε αυτούς τους ασθενείς μειώνεται πολύ και η συγκέντρωση του βουτυρικού στα κόπρανα(23, 24).

Οι Kumari et al., μελέτησαν τις διακυμάνσεις των μικροοργανισμών που παράγουν βουτυρικό σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Οι ασθενείς επίσης χωρίστηκαν ανάλογα με τη φάση της νόσου, σε τρία τμήματα, την σοβαρή, μέτρια φάση και την φάση ύφεσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μείωση των βακτηρίων αυτών στα δείγματα ασθενών με έξαρση της νόσου και αναπλήρωση αυτών στη φάση ύφεσης. Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε στο βουτυρικό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Οι ερευνητές προτείνουν ότι η αντίστοιχη αυτή μείωση σχετίζεται με την αιτιολογία της ελκώδους κολίτιδας (25).

Η χρήση του βουτυρικού ως πρεβιοτικού ή κλυσμάτων αυτού για θεραπεία ή ενίσχυση αυτής ερευνάται τελευταία, όπως επίσης, οι μικροοργανισμοί που παράγουν βουτυρικό θεωρούνται η νέα γενιά προβιοτικών για τα ΙΦΝΕ. Έχει καταγραφεί η αποτελεσματικότητα κλυσμάτων ή πρεβιοτικών με βουτυρικό στην μείωση της κολίτιδας σε ζωικά πρότυπα αν και οι κλινικές μελέτες παρουσιάζουν ποικιλία αποτελεσμάτων (20, 21, 23). Σύμφωνα με τους Zhang et al., το βουτυρικό βελτίωσε τις βλάβες της κολίτιδας σε πρότυπο ποντικών. Η ενίσχυση των Treg και η παρεμπόδιση έκκρισης της IL-17 εντοπίστηκε και in vitro σε κύτταρα σπλήνα ποντικών και μονοκύτταρα ανθρώπων. Επίσης, στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι η χορήγηση δια στόματος αύξησε το ποσοστό του βουτυρικού οξέος, την συγκέντρωσή του στα κόπρανα και το σύνολο των SCFAs σε ποντίκια που είχε προκληθεί ελκώδη κολίτιδα(26). Πολύ πρόσφατη μελέτη που διενεργήθηκε σε τέσσερεις ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα που είχαν υποστεί κολεοστομία με θύλακα ειλεού και αναστόμωση μελέτησε την αρχική αποίκηση (στους πρώτους 2 μήνες μετά την επέμβαση) των μικροοργανισμών παραγωγών βουτυρικού και την σύγκρινε με υγιείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ξεκάθαρα την αφθονία των παραγωγών βουτυρικού στον θύλακα με έναν από τους ασθενείς να παρουσιάζει προφίλ μικροβιόκοσμου ίδιο με αυτό των υγείων και ο οποίος παρέμεινε υγιής για 25 μήνες. Οι υπόλοιποι είχαν παραλλαγές στη σύνθεση σε σχέση με τους υγιείς (23).

Αντίθετα, πρόσφατη μελέτη εφιστά την προσοχή στις προφυλάξεις που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την χορήγηση μικροοργανισμών παραγωγών βουτυρικού σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Χορηγήθηκε το βακτήριο *Anaerostipes hadrus* σε υγιή ποντίκια, αλλά και σε ποντίκια που είχε επαχθεί κολίτιδα. Στα υγιή δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές στο μικροβιόκοσμο, αλλά αυξήθηκε το σύνολο του παραγόμενου βουτυρικού. Στα ασθενή ποντίκια, όμως, άλλαξε η δομή του εντερικού μικροβιόκοσμου, καταλήγοντας στην εμφάνιση

της νόσου 3 μέρες πιο νωρίς, σε σύγκριση με την εργαστηριακή επαγωγή νόσου από μόνη της. Η διαφορά των δυο ομάδων (επαγόμενο με χορήγηση βακτηρίου και επαγόμενη κολίτιδα χωρίς βακτήριο) στην συγκέντρωση του βουτυρικού δεν ήταν σημαντική. Άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι σε αντίστοιχη αφθονία με το βακτήριο μετά την χορήγηση βρέθηκαν και άλλα βακτήρια ενδογενή όπως, *Akkermansia spp.* και *Parasutterella spp.* Το πρώτο έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε επαγόμενη οξεία φλεγμονή σε ζωικά πρότυπα και το δεύτερο σε ασθενείς με νόσο Crohn (22).

Επίσης, σε μελέτη των Gerasimidis et al., παρατηρήθηκε ότι η θεραπεία με αποκλειστική εντερική διατροφή παιδιών με ενεργή νόσο του Crohn, μείωσε παραδόξως, τα επίπεδα προστατευτικών βακτηριακών ειδών και μεταβολιτών τους όπως, το *Faecalibacterium prausnitzii* και το βουτυρικό, τα οποία σχετίζονται με την βελτίωση της νόσου, ενώ βελτιώθηκε η κλινική εικόνα των ασθενών. Επίσης, σε μελέτη των Quince et al., η ίδια θεραπεία σε παιδιά με ενεργή νόσο του Crohn, μείωσε ακόμα περισσότερο τη σχετική αφθονία πολλών γενών *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* και *Faecalibacterium*, τα οποία ήταν ήδη σε χαμηλά επίπεδα, δηλαδή προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη δυσβίωση σε σχέση με την ομάδα των υγιών εθελοντών, με την κλινική εικόνα να παραμένει βελτιωμένη(17).

1.7. Μαστίχα και ΙΦΝΕ

1.7.1. Γενικά

Η θεραπευτική στρατηγική έναντι των ΙΦΝΕ στηρίζεται κυρίως, στην χορήγηση φαρμάκων. Τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά κατέχουν ένα μικρό μερίδιο της στρατηγικής αυτής, λόγω των λίγων μελετών και των αντικρουόμενων δεδομένων για την αποτελεσματικότητά τους. Όμως, οι σοβαρές παρενέργειες των φαρμάκων και οι περιορισμοί χρήσης των προβιοτικών/πρεβιοτικών έχουν στρέψει την προσοχή στη χρήση φυσικών θεραπευτικών παραγόντων και συγκεκριμένα φυτοχημικών των τροφίμων. Η Μαστίχα είναι ένα από τα φυτικά προϊόντα για τα οποία εκδηλώνεται μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (11, 27, 28, 29).

Το μαστιχόδεντρο ή *Pistacia lentiscus L.* της οικογένειας των Anacardiaceae, αναπτύσσεται κυρίως στην Μεσογειακή περιοχή, ενώ η ποικιλία Chia καλλιεργείται αποκλειστικά στο ελληνικό νησί της Χίου και μάλιστα μόνο στο νότιο τμήμα της. Η ρητίνη που εκκρίνεται κατά την δημιουργία τομών με ειδικό εργαλείο σε διάφορα σημεία του κορμού και των λεπτών

κλαδιών του δέντρου, είναι η γνωστή Μαστίχα της Χίου. Οι εκκρίσεις έχουν την μορφή κολλοειδούς δακρύου, οι οποίες στερεοποιούνται 15 έως 20 ημέρες αργότερα, πέφτουν στο έδαφος, συλλέγονται παραδοσιακά με το χέρι και καθαρίζονται. Παρά τις συνεχείς προσπάθειες στο παρελθόν, να καλλιεργηθεί το μαστιχόδενδρο και σε άλλες περιοχές της Ελλάδος, αλλά και σε γειτονικές χώρες της Ανατολής, η καλλιέργεια ήταν ανεπιτυχής. Τα δένδρα δεν αναπτύσσονταν κανονικά και δεν παραγόταν και η Μαστίχα. Ακόμα και στο βόρειο κομμάτι του νησιού, όπου αναπτύσσονται μαστιχόδενδρα δεν παράγεται η διάσημη ρητίνη. Αυτό το φαινόμενο πιθανά οφείλεται στο ιδιαίτερο μικροκλίμα της νότιας περιοχής της Χίου, ο ευγονισμός από τα αρχαία χρόνια που απέδωσε ένα νέο είδος δέντρου υπέρ-παραγωγικού και η καλή διαχείριση και φροντίδα των μαστιχοπαραγωγών (26).

Η μοναδικότητα της Μαστίχας Χίου οδήγησε, το 1997, στον χαρακτηρισμό της ως Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.), βάσει του υπ' αριθμ. 123/1997 Κανονισμού (L0224/24-1-97) της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Πλέον, η Μαστίχα φέρει το σήμα ΠΟΠ και τα προϊόντα μεταποίησης το σήμα ΕΠΠΕ «Ειδικά Παραδοσιακά Προϊόντα Εγγυημένα» (26).

1.7.2. Εφαρμογές και δράσεις της Μαστίχας

Οι ρητινοειδείς εκκρίσεις των μαστιχόδεντρων έχουν αρωματικές και θεραπευτικές ιδιότητες, οι οποίες έχουν αναφερθεί εδώ και πολλούς αιώνες από αρχαίους Έλληνες φυσιάτρους. Για περισσότερα από 2.500 χρόνια, χρησιμοποιούνταν ως φυσικό φάρμακο στην ιατρική για την θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών. Σήμερα, χρησιμοποιείται ως άρτυμα στην παραδοσιακή ελληνική κουζίνα, ως τσίχλα, αλλά είναι πολύ συχνή η χρήση της στα καλλυντικά, στην οδοντιατρική ακόμα και στην βιομηχανία. Στην Μαστίχα απαντάται ποικιλία θεραπευτικών και αρωματικών συστατικών, όπως πολυμερή, πτητικά και αρωματικά συστατικά που συνθέτουν το μαστιχέλαιο, τερπενικά οξέα, φυτοστερόλες, πολυφαινολικά μόρια και άλλα δραστικά συστατικά. Οι πολλαπλές χρήσεις της Μαστίχας Χίου στον τομέα των τροφίμων, της υγείας και προσωπικής περιποίησης απορρέουν από τον εκρηκτικό συνδυασμό συστατικών και φυτοχημικών. Από την μελέτη της χημικής σύστασης της Μαστίχας και των εκχυλισμάτων της έχει ταυτοποιηθεί το μεγαλύτερο μέρος αυτών. Η α-πιπίνη, β-πιπίνη, β-μυρσίνη, λιναλοόλη, trans-καρυοφυλλίνη και καμφίνη, αποτελούν το 65-80% του συνολικού βάρους των εκχυλισμάτων (26, 27, 28,29, 30).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν καταγραφεί πολλές δράσεις της Μαστίχας, που αποδίδονται στα παραπάνω συστατικά, αλλά και σε άλλα που περιέχονται σε αυτήν, με την αντιοξειδωτική και

αντιβακτηριακή δράση να είναι οι πιο γνωστές. Όσον αφορά στην αντιβακτηριδιακή της δράση, έχει μελετηθεί αρκετά η Μαστίχα για την επίδρασή της σε διάφορες γαστρεντερικές ασθένειες και διαταραχές όπως, τα γαστρικά έλκη, τα έλκη δωδεκαδάκτυλου, την γαστρίτιδα. Ο βασικός αιτιολογικός παράγοντας των παραπάνω διαταραχών είναι ο μικροοργανισμός *Helicobacter pylori* και οι διάφορες μελέτες *in vitro* και *in vivo* επιβεβαιώνουν την κατασταλτική δράση της Μαστίχας έναντι αυτού του παράγοντα. Έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί μορφολογικές ανωμαλίες και κυτταρικό κατακερματισμό και εμποδίζει την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κατά την φλεγμονή. Η δράση αυτή φαίνεται να οφείλεται στα τριτερπενικά οξέα, με κύριο το ισομαστιχαδιενολικό οξύ. Από την άλλη μεριά, έχουν δημοσιευτεί μελέτες σε ζωικά πρότυπα και εθελοντές που υποστηρίζουν ότι η Μαστίχα δεν έχει επίδραση στον παραπάνω μικροοργανισμό. Μελέτες έχουν διεξαχθεί για την επίδραση της Μαστίχας και σε άλλους μικροοργανισμούς (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, και *Bacillus subtilis*), αναδεικνύοντας θετικά αποτελέσματα. Η κατασταλτική επίδραση της στα στοματικά βακτήρια *in vivo*, όπως *Porphyromonas gingivalis* και *Prevotella melaninogenica*, επιβεβαιώνουν την δράση της κατά της πλάκας στην στοματική κοιλότητα. Η συνολική αντιβακτηριακή δράση οφείλεται κυρίως στην βερμπενόνη, α-τερπινόλη, λιναλοόλη (27, 30, 31). Οι μελέτες έχουν επιβεβαιώσει επίσης, την αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση της. Έχει παρατηρηθεί ότι εμποδίζει την παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών, όπως το νιτρικό οξύ (NO) και η προσταγλαδίνη (PGE₂), μέσω της ενεργοποίησης μακροφάγων, αλλά και την πρωτεϊνική κινάση C. Τα συστατικά που φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την ιδιότητα αυτή είναι τα τριτερπένια της ολεαάνης, η α-τοκοφερόλη και οι πολυφαινόλες. Λόγω της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης, η Μαστίχα έχει συσχετιστεί με την καρδιαγγειακή προστασία και την ηπατοπροστασία. Φαίνεται να εμποδίζει την οξείδωση της LDL *in vitro* και επιδρά στα περιφερικά μονονουκλεία κύτταρα με αντιοξειδωτική και αντιαθηρογόνο δράση. Οι Τριανταφύλλου et al., παρατήρησαν την επίδραση κατανάλωσης Μαστίχας σε βιοχημικούς δείκτες σε εθελοντές που κατανάλωναν υψηλή δόση (5g) και σε εθελοντές που κατανάλωναν χαμηλή δόση Μαστίχας (1/7 υψηλής δόσης). Στην υψηλή δόση παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην ολική χοληστερόλη, στην LDL και σε δείκτες που αφορούν στην ηπατοπροστασία. Στην χαμηλή δόση δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση, εκτός από την γλυκόζη στους άντρες, αναδεικνύοντας τη πιθανή δράση της ακόμα και σε τέτοιες συγκεντρώσεις. Επίσης, έχει παρατηρηθεί και αντικαρκινογόνος δράση *in vitro* και *in vivo* σε ποντίκια, καθώς επάγει την απόπτωση και έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Στον καρκίνο του προστάτη φαίνεται να παρεμποδίζει την

έκφραση του υποδοχέα των ανδρογόνων, τα οποία με τη σειρά τους συμμετέχουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη (27, 30, 31, 32, 33). Οι παραπάνω δράσεις, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να οφείλονται σε καθένα από τα κύρια συστατικά της Μαστίχας ή να προκύπτουν από την συνεργιστική δράση ενός βασικού συστατικού με κάποιο άλλο βασικό ή δευτερεύων συστατικό. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι διάφοροι μικροοργανισμοί είναι ευάλωτοι ή όχι σε διαφορετικά συστατικά μαστιχέλαιου ή κλασμάτων αυτού. Ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως τι συμβαίνει σε κάθε περίπτωση (27, 31, 34).

Πρόσφατα, τον Ιούλιο του 2015, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) δημοσίευσε την μονογραφία της Μαστίχας, αναγνωρίζοντάς την ως παραδοσιακό φάρμακο φυτικής προέλευσης. Οι επίσημα αναγνωρισμένες θεραπευτικές ενδείξεις της Μαστίχας είναι προς το παρόν, τα μέτριας βαρύτητας δυσπεπτικά προβλήματα, οι δερματικές φλεγμονές και η επούλωση μικρών δερματικών πληγών. Η αναγνώρισή αυτή προέκυψε μετά από κατάθεση φακέλου για την επιστημονική τεκμηρίωση των φαρμακευτικών ιδιοτήτων της Μαστίχας από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου και είχε ως αποτέλεσμα την κυκλοφορία σκευασμάτων Μαστίχας στην Ευρώπη με εγκεκριμένους ισχυρισμούς υγείας (35).

1.7.3. Η δράση της Μαστίχας στις ΙΦΝΕ

Η μελέτη της Μαστίχας και της επίδρασης της σε ασθένειες ή διαταραχές είναι πολύ πρόσφατη και οι μελέτες λιγιστές. Όσον αφορά στις ΙΦΝΕ συγκεκριμένα, οι Καλιώρα et al., μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της Μαστίχας στην κλινική εικόνα και τους φλεγμονώδεις παράγοντες 10 ασθενών με νόσο Crohn για 4 εβδομάδες. Βρέθηκε ότι μετά από χορήγηση 2,2 g καθημερινά, ο δείκτης δραστηριότητας της ασθένειας μειώθηκε, καθώς και τα επίπεδα της IL-6 και της CRP στο πλάσμα του αίματος, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε στα μονοπύρρηνα κύτταρα που συλλέχθηκαν από τους ίδιους ασθενείς με τη νόσο Crohn, την μείωση του παράγοντα TNF-α μετά από χορήγηση Μαστίχας, όπως επίσης και τον περιορισμό της μετανάστευσης και χημειοταξίας των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Επίσης, η ίδια ομάδα τονίζει τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της στις ΙΦΝΕ που προκύπτουν από το συνολικό προϊόν παρά από κλάσματα αυτού (27, 29, 36, 37).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η ανίχνευση και καταμέτρηση κάποιων ευεργετικών μικροβιακών πληθυσμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΙΦΝΕ. Επίσης η παρατήρηση πιθανών μεταβολών στους μικροοργανισμούς αυτούς, σε εθελοντές με ΙΦΝΕ που πήραν μέρος σε διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη με πρόσληψη φυσικού συμπληρώματος Μαστίχας Χίου.

Πιο συγκεκριμένα οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν τα Ολικά Βακτήρια, τα βακτήρια του *Bifidobacterium spp.*, τα βακτήρια της ομάδας των *Eubacterium rectale* και *Roseburia spp* και βακτήρια του είδους *Faecalibacterium prausnitzii*.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Κλινική δοκιμή

3.1.1. Γενικά

Πρόκειται για μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη με σκοπό την μελέτη της επίδρασης φυσικού συμπληρώματος μαστίχας Χίου έναντι εικονικού σκευάσματος σε διάφορους κλινικούς δείκτες ασθενών με ΙΦΝΕ, παράλληλα με τη φαρμακευτική αγωγή. Η μελέτη έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και διεξήχθη με βάση τη Διακήρυξη των Ανθρωπίνων Δικαιωμάτων του Ελσίνκι της World Medical Association. Ακόμη, το πρωτόκολλο καταχωρήθηκε στο ClinicalTrials.gov με αριθμό NCT02796339.

3.1.2. Πρωτόκολλο παρέμβασης

Η στρατολόγηση ξεκίνησε μέσω πρόσκλησης των ασθενών με ανακοινώσεις στο Σύλλογο Ασθενών με Νόσο Crohn κι Ελκώδη Κολίτιδα και οι ενδιαφερόμενοι προσήλθαν για την αρχική αξιολόγηση προκειμένου να διαπιστωθεί αν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη. Τα κριτήρια ένταξης ήταν η ηλικία (18-65 ετών) και η διαγνωσμένη ΙΦΝΕ, ενώ τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η μη σταθερή φαρμακευτική αγωγή, η εντερική ή παρεντερική διατροφή, η κατάχρηση φαρμάκων ή αλκοόλ, η χρήση κανναβινοειδών & μη ναρκωτικών ουσιών, η λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων, η ομοιοπαθητική, η χορτοφαγία ή μακροβιοτική δίαιτα πριν & κατά την διάρκεια της μελέτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, ιστορικό απόφραξης μυοκαρδίου, η στηθάγχη, το εγκεφαλικό επεισόδιο, οι ψυχιατρικές διαταραχές, η εγκυμοσύνη, ο θηλασμός, το πεπτικό έλκος ή καρκίνος του γαστρεντερικού.

Στη συνέχεια οι ασθενείς που τελικά ήταν κατάλληλοι για να συμμετάσχουν στη μελέτη υπέγραψαν έντυπο εθελοντικής συμμετοχής και τυχαιοποιήθηκαν στην ομάδα που λάμβανε τις ταμπλέτες Μαστίχας και στην ομάδα εικονικού σκευάσματος (placebo). Το συμπλήρωμα μαστίχας και το φαινομενικά πανομοιότυπο εικονικό συμπλήρωμα παρασκευάστηκαν από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. Η τυφλοποίηση διενεργήθηκε από την ίδια την Ένωση και η τυχαιοποίηση ήταν ίση στις δυο ομάδες εθελοντών (παρέμβασης και ελέγχου). Οι εθελοντές λάμβαναν 4 δισκία, κατανεμημένα ανά 2 μέσα στην ημέρα. Το φυσικό συμπλήρωμα περιείχε 700mg Μαστίχας ανά δισκίο, με αποτέλεσμα η ημερήσια δόση να φτάνει τα 2,8g φυσικού προϊόντος. Η παρέμβαση είχε διάρκεια 3 μήνες.

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της παρέμβασης αξιολογήθηκαν τα παρακάτω πριν και μετά την παρέμβαση:

Κοινωνικοδημογραφικά στοιχεία, Βασικά ανθρωπομετρικά στοιχεία (ηλικία, βάρος, ύψος, BMI), Ποιότητα ζωής των ασθενών με ειδικό ερωτηματολόγιο (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ)), εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου μέσω ιατρικού ιστορικού, εξετάσεων και δεικτών ενεργότητας, αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης, προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών σε δείγματα αίματος και φλεγμονωδών δεικτών σε δείγματα ορού και κοπράνων.

3.2. Συλλογή δειγμάτων κοπράνων

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν δείγματα κοπράνων ασθενών που βρίσκονταν σε έξαρση. Από τους 127 εθελοντές που στρατολογήθηκαν συνολικά στην κλινική μελέτη, οι 25 διένυσαν φάση έξαρσης και παρέδωσαν δείγμα κοπράνων στην έναρξη της παρέμβασης, ενώ οι 15 από αυτούς ολοκλήρωσαν την παρέμβαση και παρέδωσαν δείγμα κοπράνων για τον επανέλεγχο. Τα δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν με τη χρήση του ειδικού συλλέκτη OMNIgene®•GUT της DNAgenotek Inc. (Ontario, Canada), ο οποίος εκτός από την εύκολη συλλογή προσφέρει ταυτόχρονα και ένα σύστημα σταθεροποίησης του DNA. Ο κατασκευαστής προτείνει ότι ο συλλέκτης εμπεριέχει κατ' εκτίμηση 520 ± 101 mg κοπράνων (διάμεσος) και ότι η απόδοση του DNA ανά 250μl δείγματος είναι 1.91 ± 1.28 μg (διάμεσος). Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα διατηρήθηκαν σε ψύξη (4°C) και στη συνέχεια διανεμήθηκαν σε δυο αποστειρωμένους σωλήνες των 2ml και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να αναλυθούν.

3.3. Απομόνωση ολικού DNA από δείγματα κοπράνων

3.3.1. Μέθοδος απομόνωσης

Η απομόνωση του ολικού μικροβιακού DNA από τα δείγματα κοπράνων (200μl) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο RBB+C (Repeated Bead Beating plus Column), κατόπιν τροποποιήσεών της για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (38, 39). Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα (QIAamp® DNA Mini Kit; QIAGEN GmbH, Germany) και μηχανικής λύσης. Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του DNA ελέγχθηκαν στο φωτόμετρο IMPLEN P330 με την χρήση του προγράμματος για dsDNA (double-stranded DNA).

3.3.2. Αναλυτική πορεία

Η μέθοδος αποτελείται από 3 φάσεις: α) την κυτταρική λύση, β) την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, γ) την απομάκρυνση του RNA, των πρωτεϊνών και καθαρισμός. Κατά το πρώτο στάδιο, μετά από αργή απόψυξη σε πάγο, μεταφέρονταν 200μl δείγματος σε αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου που περιείχαν σφαιρίδια 2 μεγεθών, 0,1mm(0,3g) και 0,5 mm (0,1g). Αμέσως μετά προσθέτονταν και 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και ακολουθούσε ομογενοποίηση για μηχανική λύση της κυτταρικής μεμβράνης στο Mini-BeadbeaterTM (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονταν στους 95°C για 15 λεπτά και ακολουθούσε φυγοκέντρωση αυτών για 5 λεπτά στις 20,000 xg στροφές σε φυγόκεντρο AvantiTM 30 Centrifuge (Beckman Coulter) και η διαδικασία επαναλαμβανόταν για ακόμη μία φορά. Στο δεύτερο στάδιο, προστέθηκαν 260μL οξικό αμμώνιο 10M σε κάθε δείγμα και μετά από φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 16,000xg στροφές προστέθηκε ισοπροπανόλη 1:1 και ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση, απόρριψη του υπερκειμένου, καθαρισμός με 70% αλκοόλη, καλό στέγνωμα των σωληναρίων και επαναδιάλυση σε 100μL Tris-EDTA. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, προστέθηκαν 2μLRNase (10mg/mL) επώαστηκαν τα δείγματα στους 37°C και στη συνέχεια 15μLπρωτεϊνάση K και 200μLρυθμιστικό διάλυμα AL από το QIAamp[®] DNA Mini Kit και επώαστηκαν στους 70°C. Ακολούθησαν διαδοχικές προσθήκες 200μL αιθανόλης, 500μL AW1, 500μL AW2, 200μL AE, και μεταφορές των μιγμάτων σε στήλες QIAamp του kit για την απομάκρυνση του RNA, των πρωτεϊνών και άλλων ακαθαρσιών μετά από φυγοκέντρωση. Τα τελικά δείγματα DNA φωτομετρήθηκαν στο φωτόμετρο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί ο μοριακός προσδιορισμός.

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

Ο ποσοτικός προσδιορισμός (log₁₀copies/ml) στο ολικό DNA των ολικών βακτηρίων, του γένους *Bifidobacterium*, καθώς και τα βουτυροπαραγωγά *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group και *Faecalibacterium prausnitzii*, πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των εκάστοτε μικροοργανισμών σε

κάθε αντίδραση (ΠΙΝΑΚΑΣ 1). Τα προϊόντα της PCR ιχνηλατούνται με φθορίζοντα μόρια, με αποτέλεσμα να μετράται η ένταση φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) με χρήση του μίγματος αντιδράσεων KAPA SYBR® Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems Inc., USA), το οποίο στηρίζεται στη τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green. Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται 10μl του kit, 0.4μl του κάθε εκκινητή, 0.25μl BSA (Bovine serum Albumin, για αποφυγή της προσκόλλησης του μίγματος της αντίδρασης στα γυάλινα τριχοειδή), 5μl από το DNA-στόχο (αραιώσεις πρότυπου στελέχους ή δείγματα κοπράνων) και 3.95μl PCR-grade ύδατος. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση), την ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι), την ανάλυση melting curves και τη ψύξη του οργάνου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (ενίσχυση του προϊόντος) προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης για την κάθε υπό εξέταση μικροβιακή ομάδα.

Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται βάσει της τιμής του Ct (threshold circle), η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης καθώς είναι η μόνη φάση (log-linear phase) όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να φτάσει ένα δείγμα στο δεδομένο επίπεδο φθορισμού (μικρότερο Ct) τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων γίνεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική σχέση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA στο πρότυπο μικροβιακό στέλεχος προς τις αντίστοιχες τιμές Ct. Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή των καμπύλων αναφοράς επιτυγχάνεται με τη χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), με αποδεκτό εύρος απόδοσης το 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου/ml δείγματος» ($\log_{10}$ copies / ml δείγματος).

Πίνακας 1. Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης.

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	40
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward Reverse	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	58°C	243	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	41
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i>	RrecF Rrec630mR	GCGGTRCGGCAAGTCTGA CCTCCGACACTCTAGTMCAGAC	60°C	81	<i>Roseburia intestinalis</i> DSM 14610	42
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG AATTCCGCCTACCTCTGCACT	60°C	248	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	43, 44, 45

3.5. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 23. Ο έλεγχος κανονικότητας των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών βασίστηκε στις μέσες τιμές (για τα παραμετρικά) ή στις διαμέσους (για τα μη παραμετρικά) των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου/ml δείγματος (log10copies/ml δείγματος). Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων για κάθε μια από τις χρονικές στιγμές 0 και 3 μήνες (έναρξη και λήξη διατροφικής παρέμβασης) πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο ανεξάρτητων δειγμάτων (Independent samples t- Test) για τα παραμετρικά και με τον έλεγχο Mann Whitney για τα μη παραμετρικά. Για παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο (π.χ. φύλο, διατροφικοί παράγοντες) πραγματοποιήθηκε ανάλυση Συνδιακύμανσης (Univariate analysis of Covariance (ANCOVA)). Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών εντός της κάθε ομάδας κατά τη διάρκεια της παρέμβασης πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο t για εξαρτημένα δείγματα (paired-samples T test) για τα παραμετρικά ή με τον έλεγχο Wilcoxon για τα μη παραμετρικά. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p < 0.05$).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κοινωνικοδημογραφικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης

Στην έναρξη της παρέμβασης οι εθελοντές που έδωσαν δείγματα κοπράνων για την ανάλυση τους στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, ήταν 25, εκ των οποίων οι 16 είχαν διαγνωσμένη νόσο του Crohn και οι 9 ελκώδη κολίτιδα. Παρατηρούμε ότι στην CD το 37,5% των εθελοντών είναι άνδρες και το 62,5 γυναίκες, ενώ για τη UC το 44,4% άνδρες και το 55,6% γυναίκες. Η κατανομή των εθελοντών, όσον αφορά στο φύλο, είναι ομοιόμορφη μεταξύ των δύο νόσων. Σε ότι αφορά το κάπνισμα παρατηρείται μια αυξημένη τάση των ασθενών με CD να καπνίζει (37,5%), σε σχέση με τους ασθενείς της UC (11,1%), αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης, η ηλικία των εθελοντών ακολουθεί ομοιόμορφη κατανομή στις δυο ομάδες (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 . Βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.

Παράμετρος	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p -value
Φύλο (Άνδρες:Γυναίκες)	10:15	6:10	4:5	0,734
Ηλικία (χρόνια)	40,96 ± 14,89	41 ± 15,77	40,89± 14,11	0,986
Κάπνισμα (αριθμός καπνιστών)	7	6	1	0,158

*Για την ηλικία οι τιμές εκφράζονται σε μ.ο. ± SD.

Η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με ειδικό ερωτηματολόγιο που ταξινομεί την δραστηριότητα σε τρία επίπεδα: καθιστική ζωή, ελαφριά δραστηριότητα, μέτρια δραστηριότητα. Στον **Πίνακα 3** φαίνεται ότι η δραστηριότητα των εθελοντών δεν διέφερε σημαντικά στις δυο νόσους. Οι ασθενείς της UC στο μεγαλύτερο ποσοστό ακολουθούσαν το πρότυπο της καθιστικής ζωής χωρίς αυτό το εύρημα να είναι στατιστικά σημαντικό.

Πίνακας 3. Εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.

PA SCORE	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p -value
Καθιστική (αρ.εθελοντών)	18	10	8	0,245
Ελαφριά (αρ. εθελοντών)	4	4	0	
Μέτρια (αρ.εθελοντών)	3	2	1	

4.2. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4**, στο σύνολο των εθελοντών η μέση τιμή για το ύψος είναι στα 1,71 m, για το βάρος 67Kg και για το BMI στα 20,7 Kg/m². Τα παραπάνω ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά δεν παρουσιάζουν καμία σημαντική διαφοροποίηση στις δυο νόσους.

Πίνακας 4. Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.

Παράμετρος	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p -value
Ύψος (m)	1,71 ± 0,11	1,70 ± 0,13	1,72 ± 0,07	0,659
Βάρος (Kg)	67 (56-80,5)	64,5 (57-78)	70 (54-100,5)	0,496
BMI (Kg/m ²)	20,7 (19,5-28,3)	20,55 (19,1-28,4)	21,9 (19,5-34,1)	0,692

4.3. Διατροφικά χαρακτηριστικά εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης

Όσον αφορά στην συνολική ενέργεια, παρατηρείται ότι οι ασθενείς της UC έχουν αυξημένη συνολική ενεργειακή πρόσληψη κατά 200 θερμίδες, αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η πρόσληψη υδατανθράκων και λίπους παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή στις δυο νόσους. Από την άλλη μεριά, η πρόσληψη πρωτεΐνης, το ποσοστό λίπους και το ποσοστό των πρωτεϊνών παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών των δυο νόσων. Επίσης, η πρόσληψη διαιτητικών ινών παρουσιάζει αυξημένη τάση στην CD. Οι ασθενείς με UC φαίνεται ότι έχουν χαμηλότερο ποσοστό λίπους κατά 8%, αλλά

υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης κατά 8% περίπου και υψηλότερη πρόσληψη πρωτεΐνης κατά 24 g. Επίσης, οι ασθενείς της UC έχουν χαμηλότερη πρόσληψη διαιτητικών ινών κατά 5 g (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης.

Παράμετρος	Σύνολο (N=25)	CD (N=16)	UC (N=9)	p-value
Ενέργεια (kcal)	1809,84 ± 743,49	1723,11 ± 516,84	1964,02 ± 1056,25	0,449
Υδατάνθρακες (g)	215,67 ± 83,58	211,48 ± 76,64	223,11 ± 99,22	0,746
% Υδατάνθρακες	48,13 ± 7,91	48,74 ± 8,36	47,04 ± 7,37	0,614
Λίπος (g)	67,5 ± 35,9	68,74 ± 26,24	65,29 ± 50,66	0,823
% Λίπος	33,15 ± 9,04	36,00 ± 8,51	28,08 ± 8,00	0,032
Διαιτητικές Ίνες (g)	12,99 ± 7,01	14,73 ± 6,79	9,88 ± 6,63	0,097
Πρωτεΐνη (g)	73,03 (54,93-98,58)	64,78 (51,78-87,18)	88,87 (69,85-170,96)	0,036
% Πρωτεΐνη	17,37 (13,91-22,59)	16,36 (12,6-18,09)	24,24 (18,26-32,75)	0,003

4.4. Μικροβιολογική εικόνα εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης

Οι ασθενείς και των δυο νόσων έχουν παρόμοιο ολικό μικροβιακό φορτίο. Επίσης, δεν παρουσιάζεται σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς του *Faecalibacterium prausnitzii* και της ομάδας των μικροοργανισμών *Roseburia* spp- *E.rectale* στις δυο νόσους. Αντίθετα, οι μικροοργανισμοί του γένους *Bifidobacterium* παρουσιάζουν τάση να είναι περισσότεροι στους ασθενείς της UC, σε σύγκριση με τα δείγματα των ασθενών με CD (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών (log₁₀copies/ml κοπράνων) εντερικού μικροβιόκοσμου εθελοντών με ΙΦΝΕ στην έναρξη της παρέμβασης.

Μικροοργανισμός	CD (N=16)	UC (N=9)	p-value
Ολικά βακτήρια (log ₁₀ copies/ml)	10,89 (10,04-11,13)	10,55 (10,28-10,87)	0,282
<i>Bifidobacterium</i> spp. (log ₁₀ copies/ml)	8,98 ± 0,76	9,47 ± 0,44	0,09
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (log ₁₀ copies/ml)	8,46 (6,37-9,44)	9,11 (8,67-9,48)	0,217
<i>Roseburia</i> spp. - <i>Eubacterium rectale</i> (log ₁₀ copies/ml)	8,21 ± 1,04	8,56 ± 0,7	0,376

* Για τις παραμέτρους που ακολουθούν κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο ±SD, ενώ για τις παραμέτρους που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως διάμεσος (Q1-Q3).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην αρχή της παρέμβασης ανιχνεύτηκαν σε όλους τους εθελοντές οι μικροοργανισμοί του γένους *Bifidobacterium* και της ομάδας *Roseburia* spp.-*E.rectale*. Όσον αφορά στο *F.prausnitzii*, είχαν όλοι οι ασθενείς με UC, ενώ σε 3 ασθενείς με CD από τους 16 δεν ανιχνεύτηκε ο μικροοργανισμός (**Πίνακας 7**).

Πίνακας 7. Συχνότητα εμφάνισης του μικροοργανισμού *F.prausnitzii* σε εθελοντές στην έναρξη της παρέμβασης.

Συχνότητα εμφάνισης		CD	UC	Σύνολο	p-value
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Όχι	3	0	3	0,166
	Ναι	13	9	22	
Σύνολο		16	9	25	

4.5. Επίδραση συγχυτικών παραγόντων στο μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση συγχυτικών παραγόντων στη συγκέντρωση των μικροοργανισμών. Οι παράγοντες που φαίνεται από την βιβλιογραφία να επηρεάζουν τους μικροοργανισμούς είναι το φύλο, η ηλικία και το BMI (2, 5). Επίσης, από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ατόμων των δύο νόσων ως προς κάποιους διατροφικούς παράγοντες, πιο συγκεκριμένα, τα ποσοστά πρωτεΐνης και λίπους και την πρόσληψη διαιτητικών ινών. Έτσι πραγματοποιήθηκε μία αρχική κανονικοποίηση των πληθυσμών ως προς την πρώτη ομάδα των παραγόντων (φύλο, ηλικία και BMI) και επιπρόσθετα ως προς τη δεύτερη ομάδα που περιλαμβάνει και τους διατροφικούς παράγοντες (φύλο, ηλικία και BMI + ποσοστά πρωτεΐνης, λίπους και πρόσληψη διαιτητικών ινών). Οι συγχυτικοί παράγοντες μεταξύ τους είναι ασυσχέτιστοι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Επίδραση δυο διαφορετικών ομάδων συγχυτικών παραγόντων στους μικροοργανισμούς των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης μετά από ανάλυση Συνδυακύμανσης (ANCOVA).

Μικροοργανισμοί	p-value T-test	p-value ANCOVA Ομάδα 1	p-value ANCOVA Ομάδα 2
Ολικά βακτήρια (log10copies/ml)	0,282	0,397	0,491
<i>Bifidobacterium</i> spp. (log10copies/ml)	0,09	0,111	0,32
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (log10copies/ml)	0,217	0,203	0,17
<i>Roseburia</i> spp. - <i>Eubacterium rectale</i> (log10copies/ml)	0,376	0,193	0,102

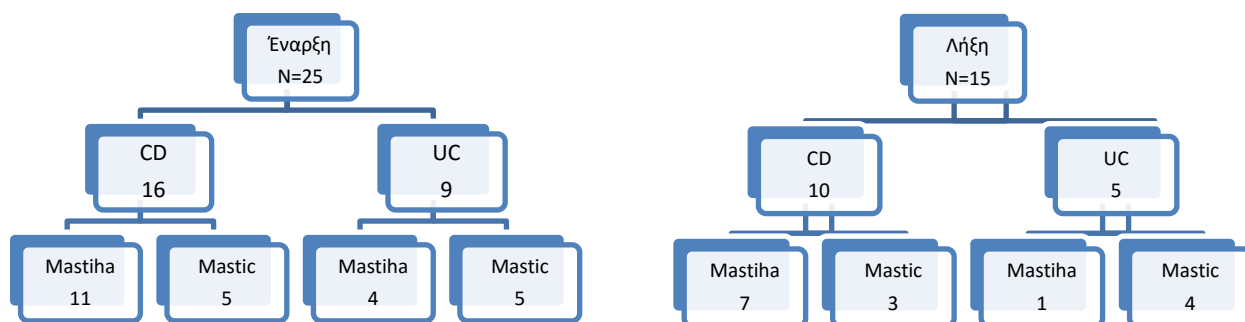
*Ομάδα 1: φύλο, ηλικία, BMI

*Ομάδα 2: φύλο, ηλικία, BMI, % πρωτεΐνης, % λίπους, διαιτητικές ίνες (g)

Για τα ολικά βακτήρια δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων παρ'όλη την επίδραση των συγχυτικών παραγόντων. Για τους μικροοργανισμούς του γένους *Bifidobacterium* όμως, η αρχική τάση για υψηλότερη συγκέντρωση στην UC, δεν φαίνεται να διατηρείται μετά την επίδραση των συγχυτικών παραγόντων. Στους μικροοργανισμούς της ομάδας *Roseburia* spp. και *E.rectale*, φαίνεται ότι συνεχίζουν μετά τη στατιστική επεξεργασία, να μην παρουσιάζονται διαφορές σημαντικές μεταξύ των δύο ομάδων . Τέλος, για το *F.prausnitzii*, εξακολουθούν να μην παρουσιάζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις μετά την επεξεργασία με τους συγχυτικούς παράγοντες .

4.6. Επίδραση της παρέμβασης στο μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών μετά την λήξη της παρέμβασης

Από τους 25 εθελοντές όπου συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων στην αρχή της παρέμβασης, μόνο οι 15 ολοκλήρωσαν την παρέμβαση. Στο **Σχήμα 1** φαίνεται σχηματικά πόσοι τελικά από κάθε νόσο και για κάθε τύπο παρέμβασης ολοκλήρωσαν τους 3 μήνες της κλινικής μελέτης.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των εθελοντών που ολοκλήρωσαν της παρέμβαση και η κατανομή τους στην νόσο και στον τύπο παρέμβασης.

Οι εθελοντές ξεκίνησαν την παρέμβαση χωρίς να έχουν σημαντική διαφοροποίηση στους αρχικούς πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων, του *F.prausnitzii* και της ομάδας *Roseburia spp.-E.rectale* για τους δυο τύπους παρέμβασης. Σε αντίθεση με τους μικροοργανισμούς του γένους *Bifidobacterium*, όπου οι εθελοντές της παρέμβασης mastic φαίνεται ότι είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο φορτίο. Στο τέλος της παρέμβασης, οι εθελοντές που προσλάμβαναν το σκεύασμα mastic συνέχιζαν να έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο πληθυσμό στους μικροοργανισμούς του γένους *Bifidobacterium*, όμως καμία διαφοροποίηση στους υπόλοιπους (Πίνακας 9).

Πίνακας 9 . Μικροβιολογικό προφίλ των εθελοντών στους δυο τύπους παρέμβασης (mastiha, mastic) στην έναρξη και την λήξη της παρέμβασης.

Μικροοργανισμός	t=0			t=3		
	Mastiha (N=15)	Mastic (N=10)	p-value	Mastiha (N=8)	Mastic (N=7)	p-value
Ολικά βακτήρια (log10 copies/ml)	10,60±0,64	10,54±0,50	0,835	10,23±0,79	10,56±0,59	0,377
<i>Bifidobacterium spp.</i> (log10 copies/ml)	8,86 (8,24-9,30)	9,45 (9,15-9,77)	0,028	9,03 (8,78-9,21)	9,61 (9,20-9,77)	0,049
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (log10 copies/ml)	8,78 (7,03-9,54)	8,68 (8,46-9,25)	0,886	8,72 (5,95-9,23)	8,88 (7,95-9,68)	0,475
<i>Roseburia spp. - Eubacterium rectale</i> (log10 copies/ml)	7,97±1,09	8,37±0,70	0,431	7,70±0,97	8,23±2,10	0,535

* Για τις παραμέτρους που ακολουθούν κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο ±SD, ενώ για τις παραμέτρους που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως διάμεσος (Q1-Q3).

Στους εθελοντές που προσλάμβαναν το σκεύασμα mastiha αλλά και το σκεύασμα mastic δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην συγκέντρωση των μικροοργανισμών (Πίνακες 10-11).

Πίνακας 10 . Ποσοτικές αλλαγές στους μικροοργανισμούς των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση μετά από λήψη mastiha

Μικροοργανισμός	Mastiha t=0 (N=15)	Mastiha t=3 (N=8)	p-value
Ολικά βακτήρια (log10 copies/ml)	10,6±0,64	10,23±0,79	0,236
<i>Bifidobacterium</i> spp. (log10 copies/ml)	8,86 (8,24-9,30)	9,03 (8,78-9,21)	0,889
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (log10 copies/ml)	8,78 (7,03-9,54)	8,72 (5,95-9,23)	0,893
<i>Roseburia</i> spp. - <i>Eubacterium rectale</i> (log10 copies/ml)	7,97±1,09	7,70±0,97	0,161

Όσον αφορά στην συχνότητα εμφάνισης του *F.prausnitzii* στους εθελοντές που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση, παρατηρήθηκε ότι 2 ασθενείς με CD δεν είχαν αρχικά τον μικροοργανισμό και στο τέλος της παρέμβασης ο ένας από αυτούς συνέχισε να μην εμφανίζει, ενώ ο άλλος απέκτησε. Οι δυο εθελοντές προσλάμβαναν το σκεύασμα mastiha. Επίσης, από τους ασθενείς με UC εμφάνιζαν όλοι τον μικροοργανισμό στην έναρξη της παρέμβασης, όμως στο τέλος, ένας από αυτούς έπαψε να τον εμφανίζει. Το σκεύασμα που προσλάμβανε ο τελευταίος εθελοντής ήταν επίσης mastiha.

Πίνακας 11 . Ποσοτικές αλλαγές στους μικροοργανισμούς των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση μετά από λήψη mastic

Μικροοργανισμός	Mastic t=0 (N=10)	Mastic t=3 (N=7)	p-value
Ολικά βακτήρια (log10 copies/ml)	10,54±0,5	10,56±0,59	0,924
<i>Bifidobacterium</i> spp. (log10 copies/ml)	9,45 (9,15-9,77)	9,61 (9,20-9,77)	0,735
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (log10 copies/ml)	8,68 (8,46-9,25)	8,88 (7,95-9,68)	0,499
<i>Roseburia</i> spp. - <i>Eubacterium rectale</i> (log10 copies/ml)	8,37±0,70	8,23±2,10	0,612

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου αποτελούν μια ομάδα γαστρεντερικών διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή και περιλαμβάνουν δυο κύριες κλινικές μορφές, την νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Η συχνότητα εμφάνισης των ΙΦΝΕ είναι αυξημένη στις Δυτικές χώρες, όμως τις τελευταίες δυο δεκαετίες παρατηρείται αυξανόμενη τάση εμφάνισης και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παρά την επιστημονική πρόοδο σε κλάδους, όπως τη μικροβιολογία, τη γενετική και την ανοσολογία, η παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ συνεχίζει να είναι ανεξιχνίαστη. Η γενική αλλά μερικώς τεκμηριωμένη υπόθεση, καταλήγει στο ότι οι ΙΦΝΕ προκύπτουν από μια μη φυσιολογική και συνεχή ανοσολογική απόκριση έναντι των μικροβίων του εντέρου ή των προϊόντων τους. Αυτή η διαταραχή προωθείται ακόμα περισσότερο όταν υπάρχει γενετική προδιάθεση. Το φαινόμενο της δυσβίωσης είναι συχνά αναπόσπαστο κομμάτι των νόσων αυτών και φαίνεται να πυροδοτείται από πολλούς παράγοντες όπως η διαίτα, η φαρμακευτική αγωγή και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η επίδραση των οποίων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Το σημαντικότερο κενό στην μελέτη των ΙΦΝΕ είναι η αναγνώριση του φαινομένου της δυσβίωσης ως αίτιο ή συνέπεια των νόσων αυτών (12, 18). Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών περιλαμβάνει κυρίως φαρμακευτική αγωγή. Οι βιολογικά ενεργοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συχνά στην θεραπεία των ΙΦΝΕ παρουσιάζουν προβλήματα σε μακροχρόνια χρήση και ανοσοτοξικότητα. Συνεπώς, οι ίδιοι οι ασθενείς καταφεύγουν σε φυσικούς προϊόντα, ώστε να περιορίσουν τις παρενέργειες. Η Μαστίχα Χίου αποτελεί τα τελευταία χρόνια σημαντικό αντικείμενο μελέτης για το πλήθος των δράσεών της. Από τις έως τώρα μελέτες έχουν αναδειχθεί η αντιμικροβιακή, η αντιφλεγμονώδης, η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινογόνος δράση της. Τα επιστημονικά δεδομένα που έχουν προκύψει από μελέτες *in vitro* και *in vivo* αποκαλύπτουν την θετική επίδραση της Μαστίχας σε γαστρεντερικές διαταραχές και προκαλούν την ανάγκη μελέτης της επίδρασης της και στις ΙΦΝΕ (12, 27, 30, 31, 34).

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής μελέτης, μελετήθηκαν πιθανές μεταβολές στα επίπεδα μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες και παραγώγων βουτυρικού οξέος σε δείγματα κοπράνων ασθενών με CD και UC. Τα δείγματα αυτά ήταν μέρος μιας κλινικής παρέμβασης, κατά την οποία χορηγήθηκαν στους ασθενείς 2,8g φυσικής Μαστίχας για 3 μήνες. Από τον αρχικό αριθμό εθελοντών που έλαβαν μέρος στην παρέμβαση, οι 25 παρέδωσαν δείγμα κοπράνων (CD:16, UC:9) στην έναρξη. Βασικό κριτήριο για την ένταξή τους στο κομμάτι της ανάλυσης της παρούσας πτυχιακής ήταν να διανύουν περίοδο έξαρσης της

νόσου. Ένα υποσύνολο αυτών, πιο συγκεκριμένα μόνο οι 15 από αυτούς, ολοκλήρωσαν την παρέμβαση και ακολούθησε δείγμα κοπράνων για τον επανέλεγχο. Στην έναρξη της παρέμβασης δεν υπήρχε καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των ασθενών στις δύο νόσους, όσον αφορά στους κοινωνικό-δημογραφικούς παράγοντες όπως, το φύλο, την ηλικία, το κάπνισμα, τη φυσική δραστηριότητα. Καμία διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε στα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, ύψος, βάρος, BMI μεταξύ των δυο νόσων. Στην διατροφική πρόσληψη παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στην πρόσληψη πρωτεΐνης, το ποσοστό πρωτεΐνης και το ποσοστό λίπους. Οι ασθενείς της UC κατανάλωναν υψηλότερη πρωτεΐνη και ποσοστό πρωτεΐνης, αλλά χαμηλότερο ποσοστό λίπους σε σχέση με την CD. Επίσης, παρουσιάστηκε αυξημένη τάση πρόσληψης διαιτητικών ινών στους ασθενείς της CD. Ο ρόλος των διαιτητικών ινών στην αιτιολογία και παθοφυσιολογία των ΙΦΝΕ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι συστάσεις αναφέρονται σε μείωση των ινών σε ενεργή νόσο, ενώ σε ανενεργή νόσο δεν υπάρχουν συστάσεις, καθώς η ανοχή των ασθενών ποικίλει. Συνεπώς, η κατανάλωση ινών στους εθελοντές της μελέτης και για τις δυο νόσους είναι χαμηλή (CD: $14,73 \pm 6,79$, UC: $9,88 \pm 6,63$) σε σχέση με την συνιστώμενη ημερησία πρόσληψη για τους υγιείς (25 -30g για τους ενήλικες ή 14g/1000kcal) και αυτό είναι αναμενόμενο (35, 49). Επίσης, παρατηρείται η τάση να συστήνεται στους ασθενείς αυξημένη πρόσληψη πρωτεΐνης σε σχέση με την συνιστώμενη (46g για γυναίκες -56 g για άντρες), γεγονός που εμφανίζεται και στα αποτελέσματα [CD: 64,78 (51,78-87,18), UC: 88,87 (69,85-170,96)] (46). Οι ασθενείς της UC τείνουν να ακολουθούν πιο περιοριστική και αυστηρή διατροφή, καθώς τα συμπτώματα συχνά είναι πιο έντονα και πολλές φορές μπορεί να χρειαστεί και νοσηλεία. Ίσως αυτός είναι ένας λόγος που παρατηρούμε χαμηλότερα επίπεδα ινών και ποσοστού λίπους και υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης συγκριτικά με την CD.

Όσον αφορά στο μικροβιακό προφίλ των εθελοντών στην έναρξη της παρέμβασης, παρατηρήθηκε τάση αυξημένων επιπέδων των μικροοργανισμών του *Bifidobacterium* spp. στην ελκώδη κολίτιδα σε σχέση με την νόσο Crohn. Στα ολικά βακτήρια, το *Faecalibacterium prausnitzii* και τους μικροοργανισμούς της ομάδας *Roseburia* spp.-*E.rectale* δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των δυο νόσων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα τρία κυρίαρχα φύλα που αναπτύσσονται στο έντερο είναι τα Firmicutes, Bacteroidetes και Actinobacteria. Η εντερική σύνθεση επηρεάζεται από παράγοντες, όπως ο γονότυπος του ξενιστή, η δίαιτα, το περιβάλλον, το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα κάθε άτομο να χαρακτηρίζεται από έναν μοναδικό εντερικό μικροβιόκοσμο. Τα υγιή άτομα έχουν την ικανότητα να διατηρούν μια καλή ισορροπία του εντερικού οικοσυστήματος, αλλά εάν διαταραχθεί η ομοιόσταση,

επέρχεται η λεγόμενη δυσβίωση. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούν στις ΙΦΝΕ επιβεβαιώνουν την αφθονία των φύλων Proteobacteria και Actinobacteria σε ασθενείς με ΙΦΝΕ. Αντίθετα, μια ομάδα του φύλου Actinobacteria και συγκεκριμένα το γένος *Bifidobacterium*, τα Lachnospiraceae και Bacteroidetes βρίσκονται σε μειωμένα επίπεδα, αν και τα δεδομένα για τα τελευταία δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Επίσης, παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών της οικογένειας Enterobacteriaceae, αλλά μείωση των επιπέδων συγκεκριμένων ομάδων του φύλου Firmicutes, με σημαντικότερους αντιπροσώπους, μικροοργανισμούς του γένους *Roseburia* και το *Faecalibacterium prausnitzii*. Τα τελευταία έχουν κατακτήσει τον τίτλο των ευεργετικών μικροοργανισμών λόγω της παραγωγής βουτυρικού οξέος. Το βουτυρικό οξύ ανήκει στα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, τα οποία προκύπτουν από την ζύμωση των άπεπτων διαιτητικών ινών και παρουσιάζουν ευεργετική επίδραση σε καταστάσεις δυσβίωσης. Είναι ενδιαφέρον ότι σε κάποιους ασθενείς παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στον μικροβιόκοσμο του εντέρου, ενώ σε άλλους ο μικροβιόκοσμος ομοιάζει με αυτό των υγιών ατόμων (14). Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής έρχονται σε σύγκρουση με το πλήθος των μελετών, καθώς δεν αναδεικνύουν μειωμένα επίπεδα των μικροοργανισμών των *Bifidobacterium* spp. και *Roseburia* spp.-*E.rectale* και του μικροοργανισμού *Faecalibacterium prausnitzii*. Αντίθετα, τα επίπεδά τους είναι αυξημένα. Πάρα ταύτα, έχουν δημοσιευτεί μελέτες που παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα συγκριτικά με την πλειοψηφία. Οι Wan et al., μελέτησαν δείγματα κοπράνων και βιοψιών από ασθενείς με ΙΦΝΕ σε φάση ύφεσης είτε σε φάση έξαρσης. Παρατήρησαν σε δείγματα κοπράνων αυξημένα επίπεδα των μικροοργανισμών των γενών *Bifidobacterium* σε ασθενείς με ενεργή CD και UC με καμία διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα στους υγιείς. Το *F. prausnitzii*, μειώθηκε σημαντικά σε ασθενείς με ενεργή CD και ενεργή UC στα κόπρανα κάτι το οποίο δεν συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα (18). Οι μικροοργανισμοί από τα *Bifidobacterium* spp. και *Roseburia* spp.-*E.rectale* ανιχνεύονται σε όλους τους εθελοντές. Αντίθετα, το *Faecalibacterium prausnitzii* εμφανίζεται σε όλους τους εθελοντές με UC, αλλά σε 13 από τους 16 στην CD. Σύμφωνα με τους Pascal et al., οι ασθενείς με UC φαίνεται να έχουν μικρότερη ποικιλότητα, αλλά όχι αυξημένη δυσβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς με CD. Οι ασθενείς με CD έχουν λιγότερο σταθερό μικροβιόκοσμο από αυτούς με UC. Στην CD παρατηρείται μείωση των ευεργετικών μικροοργανισμών παρά εμφάνιση παθογόνων. Σε ασθενείς με UC δεν λείπει το γένος *Faecalibacterium* και σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτό είναι ένας σημαντικός δείκτης να διακριθούν οι δυο νόσοι. Το γένος *Faecalibacterium*, ένα γένος της οικογένειας Peptostreptococcaceae, το γένος *Anaerostipes*, *Methanobrevibacter* και

ένα άγνωστο γένος της Christensenellaceae ήταν άφθονα σε ασθενείς με UC και υγιείς και απουσίαζαν πλήρως ή στην πλειοψηφία των ασθενών με CD, ενώ τα γένη *Fusobacterium* και *Escherichia* ήταν άφθονα σε CD και σχεδόν απόντα από υγιείς και UC (13). Συνεπώς, τα παραπάνω έρχονται σε σχετική συμφωνία με τα δεδομένα της παρούσας πτυχιακής μελέτης αν και ο μικροοργανισμός απουσίαζε μόνο στο 18,8% των εθελοντών της παρέμβασης. Επίσης, κάποιες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η συγκέντρωση του *F. prausnitzii* είναι δυνατό στοιχείο για την πρόβλεψη της ενεργής ΙΦΝΕ, καθώς χαμηλά επίπεδα του μικροοργανισμού και χαμηλό πηλίκο των φύλων Firmicutes/Bacteroidetes σχετίζονται με την ενεργή ΙΦΝΕ (47).

Είναι γνωστό ότι το φύλο, η ηλικία, το BMI επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο οπότε ελέγχθηκε η επίδρασή τους στους μικροβιακούς πληθυσμούς (2, 5). Επίσης, από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση κάποιων διατροφικών χαρακτηριστικών, όπως το ποσοστό λίπους και το ποσοστό πρωτεΐνης και μια τάση επίδρασης των ινών. Σχεδιάστηκαν 2 ομάδες συγχυτικών παραγόντων, η πρώτη περιελάμβανε μόνο τα ανθρωπομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά και τη δεύτερη τα προηγούμενα μαζί με τα διατροφικά. Παρατηρήθηκε ότι οι συγχυτικοί παράγοντες μείωσαν τη τάση των *Bifidobacterium* να είναι περισσότεροι στην UC σε σχέση με την CD. Κανένας από τους συγχυτικούς παράγοντες δεν επηρέασε περισσότερο σε κανένα από τα δυο μοντέλα.

Μετά από την παρατήρηση διαφοροποιήσεων σε επίπεδο νόσου, η ανάλυση των αποτελεσμάτων κατευθύνθηκε στην επίδραση της παρέμβασης. Δυστυχώς, οι εθελοντές που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση ήταν μόλις 15. Η κατανομή τους στις δυο νόσους και στη συνέχεια στους δυο τύπους παρεμβάσεων ήταν δυσανάλογη με αποτέλεσμα η στατιστική επεξεργασία να είναι περιορισμένη. Οι εθελοντές που προσλάμβαναν το σκεύασμα mastic ξεκίνησαν με στατιστικά σημαντικά υψηλότερο πληθυσμό των μικροοργανισμών *Bifidobacterium* spp. σε σχέση με αυτούς που προσλάμβαναν mastiha και αυτά τα υψηλά επίπεδα διατηρήθηκαν και μετά την λήξη της παρέμβασης χωρίς κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ της έναρξης και της λήξης της παρέμβασης. Μετά από την παρέμβαση με mastic είτε με mastiha τα επίπεδα των μικροοργανισμών δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά. Επίσης, σε έναν από τους δυο ασθενείς που δεν ανιχνεύτηκε αρχικά το *F. prausnitzii*, στο τέλος της παρέμβασης ανιχνεύτηκε και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα. Ο ασθενής αυτός προσλάμβανε mastiha. Αυτό το εύρημα έρχεται να το αντικρούσει η παρατήρηση ότι σε έναν από τους ασθενείς με UC μετά από πρόσληψη mastiha παύει να ανιχνεύεται ο μικροοργανισμός που στην έναρξη της παρέμβασης βρισκόταν σε αφθονία.

Οι μέχρι τώρα μελέτες που έχουν διεξαχθεί με χορήγηση Μαστίχας είναι πολύ λίγες και δεν έχουν μελετήσει την επίδραση της Μαστίχας στην σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Σε ζωικά πρότυπα όπου έχει επαχθεί κολίτιδα παρατηρείται η καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου και των συμπτωμάτων σε δείγματα ιστολογικά ή αλλαγές στην παραγωγή κυτταροκινών σε δείγματα πλάσματος. Στην πλειοψηφία των κλινικών μελετών, ο αριθμός των εθελοντών είναι πολύ μικρός και έχουν μελετηθεί προς το παρόν μόνο αλλαγές στα επίπεδα κυτταροκινών σε κύτταρα ασθενών (36, 37, 48). Συνεπώς, δεν μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Σίγουρα ο μικρός αριθμός των εθελοντών αποτελεί σημαντικό περιοριστικό παράγοντα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την διεξαγωγή συμπερασμάτων. Είναι πιθανό αυτό να οδηγεί στην απουσία παρατήρησης διαφοροποιήσεων. Όμως, οι περισσότερες μελέτες που μελετούν τις ΙΦΝΕ έχουν τον ίδιο περιορισμό. Βάσει των παραπάνω, δεν μπορεί να διαπιστωθεί υπεροχή ενός από τα δύο σκευάσματα mastic και mastiha. Είναι αναγκαίο να επεκταθεί η μελέτη σε περισσότερους ασθενείς, καθώς φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο φυσικό όπλο για την καταπολέμηση των ΙΦΝΕ. Η δυνητική χρήση της ως φυσικό φαρμακευτικό σκεύασμα μπορεί να είναι καταλυτική για την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΙΦΝΕ. Το μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών θα ήταν ιδανικό για να εμφανιστούν πιθανές διαφοροποιήσεις.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Avijit Ray and Bonnie N. Dittel, 2015. Interrelatedness between dysbiosis in the gut microbiota due to immunodeficiency and disease penetrance of colitis. *Immunology*, 146, 359–368.
2. Matthew J. Bull, BSc, PhD; Nigel T. Plummer, PhD, 2014. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative M Plummer—Human Gut Microbiome Medicine* • Vol. 13, No. 6 • December 2014.
3. Rebecca Martin, Sylvie Miquel, Florian Chain, Jane M Natividad, Jennifer Jury, Jun Lu, Harry Sokol, Vassilia Theodorou, Premysl Bercik, Elena F. Verdu, Philippe Langella and Luis G. Bermudez-Humaran, 2015. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. Martín et al. *BMC Microbiology* (2015) 15:67, DOI 10.1186/s12866-015-0400-1.
4. Spyros Vrakas, Konstantinos C. Mountzouris, George Michalopoulos, George Karamanolis, George Papatheodoridis, Charalampos Tzathas, Maria Gazouli, 2017. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 12(1): e0170034.doi:10.1371/ journal.pone.0170034
5. Mentis, F. Gypas, A.F. Mentis, 2013. Human enteric microbiome: Its role in health and disease. *Archives of Hellenic Medicine* 2013, 30(3):272–288.
6. Sandra Macfarlane, Helen Steed, and George T. Macfarlane, 2009. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2009; 46(1): 25–54. A.F.A.
7. Audrey Rivière, Marija Selak, David Lantin, Frédéric Leroy and Luc De Vuyst , 2016. Bifidobacteria and Butyrate Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, June 2016 Volume 7 Article 979.
8. Maria Jose Saez-Lara, Carolina Gomez-Llorente, Julio Plaza-Diaz and Angel Gil, 2015. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 505878.
9. Kendle M Maslowski & Charles R Mackay, 2011. Diet, gut microbiota and immune Responses. *Nature immunology* volume 12 number 1 January 2011.
10. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148: 257-266.

11. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). What is IBD? Impact Survey. <https://www.ecco-ibd.eu/>
12. Jonathan Kaunitz, Piyush Nayyar, 2015. Bugs, genes, fatty acids, and serotonin: Unraveling inflammatory bowel disease. *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):1146.
13. Victoria Pascal, Marta Pozuelo, Natalia Borrueal, Francesc Casellas, David Campos, Alba Santiago, Xavier Martinez, Encarna Varela, Guillaume Sarrabayrouse, Kathleen Machiels, Severine Vermeire, Harry Sokol, Francisco Guarner, Chaysavanh Manichanh, 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 2017; 0:1–10. doi :10.1136/gutjnl-2016-313235.
14. Yu Qi Qiao, Chen Wen Cai & Zhi Hua Ran, 2016. Therapeutic modulation of gut microbiota in inflammatory bowel disease: More questions to be answered. *Journal of Digestive Diseases* 2016; 17; 800–810 doi: 10.1111/1751-2980.12422.
15. Maria Feng J, Tang H, Li M, Pang X, Wang L, Zhang M, Zhao Y, Zhang X, Shen J. The abundance of fecal *Faecalibacterium prausnitzii* in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Archives of Microbiology*. 2014;196: 73-77.
16. Konstantinos Gerasimidis, Martin Bertz, Laura Hanske, Jana Junick, Olga Biskou, Margarita Aguilera, Vikki Garrick, Richard K. Russell, Michael Blaut, Paraic McGrogan, and Christine A. Edwards, 2014. Decline in Presumptively Protective Gut Bacterial Species and Metabolites Are Paradoxically Associated with Disease Improvement in Pediatric Crohn's Disease During Enteral Nutrition. *Inflammatory Bowel Disease* 2014; 20:861–871.
17. Christopher Quince, Umer Zeeshan Ijaz, Nick Loman, A. Murat Eren, Delphine Saulnier, Julie Russell, Sarah J. Haig, Szymon T. Calus, Joshua Quick, Andrew Barclay, Martin Bertz, Michael Blaut, Richard Hansen, Paraic McGrogan, Richard K. Russell, Christine A. Edwards and Konstantinos Gerasimidis, 2015. Extensive Modulation of the Fecal Metagenome in Children with Crohn's Disease during Exclusive Enteral Nutrition. *The American Journal of Gastroenterology* 2015; 110:1718–1729; doi: 10.1038/ajg.2015.357.
18. Wei Wang, Liping Chen, Rui Zhou, Xiaobing Wang, Lu Song, Sha Huang, Ge Wang, Bing Xia, 2013. Increased Proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* p. 398–406 February 2014 Volume 52 Number 2.

19. Mingming Sun, Wei Wu Zhanju Liu, Yingzi Cong, 2016. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR and inflammatory bowel diseases. Journal of Gastroenterology DOI 10.1007/s00535-016-1242-9.
20. Annelies Geirnaert, Alix Steyaert, Venessa Eeckhaut, Bo Debruyne, Jan B.A. Arends, Filip Van Immerseel, Nico Boon, Tom Van de Wiele, 2014. *Butyricicoccus pullicaecorum*, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions. Anaerobe 30 (2014) 70e74.
21. Marjan Steppe, Filip Van Nieuwerburgh, Griet Vercauteren, Filip Boyen, Venessa Eeckhaut, Dieter Deforce, Freddy Haesebrouck, Richard Ducatelle, Filip Van Immerseel, 2014. Safety assessment of the butyrate-producing *Butyricicoccus pullicaecorum* strain 25-3T, a potential probiotic for patients with inflammatory bowel disease, based on oral toxicity tests and whole genome sequencing. Food and Chemical Toxicology 72 (2014) 129–137.
22. Qianpeng Zhang, Yanqiu Wu, Jing Wang, Guojun Wu, Wenmin Long, Zhengsheng Xue, Linghua Wang, Xiaojun Zhang, Xiaoyan Pang, Yufeng Zhao, Liping Zhao & Chenhong Zhang, 2015. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate producing Bacterium. Scientific Reports | 6:27572 | DOI: 10.1038/srep27572.
23. Marius Vital, Christopher R Penton, Qiong Wang, Vincent B Young, Dion A Antonopoulos, Mitchell L Sogin, Hilary G Morrison, Laura Raffals, Eugene B Chang, Gary B Huffnagle, Thomas M Schmidt, James R Cole and James M Tiedje, 2013. A gene-targeted approach to investigate the intestinal butyrate-producing bacterial community. Vital et al. Microbiome 2013, 1:8.
24. Audrey Rivière, Marija Selak, David Lantin, Frédéric Leroy and Luc De Vuyst , 2016. Bifidobacteria and Butyrate Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. Frontiers in Microbiology, June 2016 Volume 7 Article 979.
25. Reena Kumari, Vineet Ahuja, Jaishree Paul, 2013. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. World Journal of Gastroenterology 2013 June 14; 19(22): 3404-3414 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840.
26.  νωση Μαστιχοπαραγωγών Χΐου
www.gummastic.gr

27. Konstantinos S. Dimas, Panayotis Pantazis and Rama Ramanujam, 2012. Chios Mastic Gum: A Plant-produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical and Biomedical Properties. *In vivo* 26:777-786 (2012).
28. J.K. Triantafyllidis, 2008. The use of natural products in the treatment of inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 2008, 21 (1):14-16.
29. Aikaterini Triantafyllidi, Theodoros Xanthosa, Apostolos Papalois, John K. Triantafyllidis, 2015. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology* (2015) 28, 210-220.
30. Sotirios Paraschos, Prokopios Magiatis, Sofia Mitakou, Kalliopi Petraki, Antonios Kalliaropoulos, Petros Maragkoudakis, Andreas Mentis, Dionyssios Sgouras, and Alexios-Leandros Skaltsounis, 2007. In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, Feb. 2007, p. 551–559 Vol. 51, No. 20066-4804/07/\$08.00_0 doi:10.1128/AAC.00642-0.
31. Angeliki Triantafyllou, Nikolaos Chaviaras, Theodoros N. Sergentanis, Evaggelia Protopapa, John Tsaknis, 2007. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology* 111 (2007) 43-49.
32. Mei-Lan He, Hui-Qing Yuan, An-Li Jiang, Ai Yu Gong, Wei-Wen Chen, Peng-Ju Zhang, Charles Y. F. Young, Jian-Ye Zhang, 2006. Gum Mastic Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer* June 15, 2006 / Volume 106 / Number 12.
33. Angelike Triantafyllou, Alfiya Bikineyeva, Anna Dikalova, Rafal Nazarewicz, Stamatios Lerakis and Sergey Dikalov, 2011. Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutrition Journal* 2011, 10:64 <http://www.nutritionj.com/content/10/1/64>.
34. Christina Koutsoudaki, Martin Krsek and Alison Rodger, 2005. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var . chia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2005, 53, 7681-7685.
35. Office of Disease Prevention and Health Promotion (DPHP) Dietary Guidelines for Americans 2015-2020 Eighth Edition. <http://www.ema.europa.eu/ema/>
36. Andriana C Kaliora, Maria G Stathopoulou, John K Triantafyllidis, George VZ Dedoussis, Nikolaos K Andrikopoulos, 2007. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* 2007 February 7; 13(5): 748-753 www.wjgnet.com World Journal of Gastroenterology ISSN 1007-9327.

37. Andriana C Kaliora, Maria G Stathopoulou, John K Triantafillidis, George VZ Dedoussis, Nikolaos K Andrikopoulos, 2007. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World Journal of Gastroenterology* 2007 December 7; 13(45): 6031-6036. *World Journal of Gastroenterology* ISSN 1007-9327.
38. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiology Methods*. 2010; 81: 127-134.
39. Yu Z and Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*. 2004; 36: 808-812.
40. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002; 148: 257-266.
41. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 97: 1166-1177.
42. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ, 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME Journal* 2011;5: 220-230.
43. Maria Feng J, Tang H, Li M, Pang X, Wang L, Zhang M, Zhao Y, Zhang X, Shen J. The abundance of fecal *Faecalibacterium prausnitzii* in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Archives of Microbiology*. 2014;196: 73-77.
44. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied Environmental Microbiology*. 1996; 62: 1242-1247.
45. Suau A, Rochet V, Sghir A, Gramet G, Brewaeys S, Sutren M, Rigottier-Gois L, Doré J. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human faecal flora. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001; 24: 139-145.

46. Frank M. Ruemmele, 2016. Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrition and Metabolism* 2016; 68(suppl 1):33–41 DOI: 10.1159/000445392.
47. Edgar S. Wills, Daisy M. A. E. Jonker, Paul H. Savelkoul, Ad A. Masclee, Marieke J. Pierik, John Penders, 2014. Fecal Microbial Composition of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Patients in Remission and Subsequent Exacerbation. *PLoS ONE* 9(3): e90981. doi:10.1371/journal.pone.0090981.
48. Hyun-Jo Kim and Constantinos Neophytou, 2009. Natural Anti-Inflammatory Compounds for the Management and Adjuvant Therapy of Inflammatory Bowel Disease and its Drug Delivery System. *Archives of Pharmacal Research* Vol 32, No 7, 997-1004, 2009 DOI 10.1007/s12272-009-1704-1.
49. Celestine Wong, Philip J. Harris and Lynnette R. Ferguson, 2016. Potential Benefits of Dietary Fibre Intervention in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, 17, 919; doi: 10.3390/ijms17060919.