



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

***ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΣΕ ΖΩΙΚΟ
ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΝΟΣΟΥ
ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ***



ΕΥΣΤΑΘΙΑ ΠΑΠΑΔΑ

A.M. 20626

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΔΡΙΑΝΑ ΚΑΛΙΩΡΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΝΤΩΝΙΑ ΧΙΟΥ

Αθήνα 2010

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Λέκτορα κ. Ανδριάννα Καλιώρα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ακόμη, την ευχαριστώ για την υποστήριξη και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας, τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές της και την τελική διόρθωση της γραπτής μου εργασίας.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο και την Επ. Καθηγήτρια κ. Αντωνία Χίου για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στη συγγραφή της εργασίας, αλλά και συνολικά για τις θεωρητικές και εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέδωσαν στη διάρκεια της φοίτησής μου και οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής δουλειάς.

Οφείλω ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα κ. Αριστέα Γκιοξάρη για την υποστήριξη, τη βοήθεια και τη συμπαράστασή της.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φαρμακευτική εταιρεία ELPEN για τη διάθεση του εργαστηριακού εξοπλισμού και τη φιλοξενία των πειραματόζων. Ευχαριστώ τον κ. Απόστολο Παπαλόη, Δρ Βιολόγο και Διευθυντή του Ερευνητικού Τμήματος καθώς και το προσωπικό της εταιρείας για τη μεγάλη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου για την υποστήριξη και την υπομονή τους σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελεί μια χρόνια πάθηση του γαστρεντερικού συστήματος και περιλαμβάνει την ελκώδη κολίτιδα και τη νόσο του Crohn. Η παθογένειά τους θεωρείται συνδυασμός περιβαλλοντικών, γενετικών και ανοσολογικών παραγόντων.

Η μαστίχα Χίου αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του μαστιχόδενδρου που ευδοκιμεί αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου. Στη μαστίχα έχουν ανιχνευθεί κυρίως τερπένια αλλά και κάποιες απλές φαινόλες. Στα συστατικά αυτά αποδίδονται σειρά ευεργετικών ιδιοτήτων όπως η αντιμικροβιακή, η αντινεοπλασματική, η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης.

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης διαφόρων κλασμάτων της μαστίχας Χίου σε ζωικό μοντέλο χημικής κολίτιδας που μιμείται τη νόσο Crohn και η διευκρίνιση τελικά του πιο δραστικού από αυτά.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 50 αρσενικούς επίμυες τύπου Wistar που χωρίστηκαν με τυχαιοποιημένο τρόπο σε 10 ομάδες: (Α) ομάδα ελέγχου, (Β) μοντέλο χημικής κολίτιδας επαγόμενης με TNBS (MXK), (Γ) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 100mg/Kg ΣΒ μίγματος σκόνης μαστίχας και ινουλίνης (6:4), (Δ) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 40mg/Kg ΣΒ ινουλίνης, (Ε) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 24mg/Kg ΣΒ όξινου κλάσματος μαστίχας, (Στ) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 48mg/Kg ΣΒ όξινου κλάσματος μαστίχας, (Ζ) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 24mg/Kg ΣΒ ουδέτερου κλάσματος μαστίχας, (Η) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 48mg/Kg ΣΒ ουδέτερου κλάσματος μαστίχας, (Θ) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 7mg/Kg ΣΒ ολεανολικού οξέος και (Ι) MXK στο οποίο χορηγήθηκε 14mg/Kg ΣΒ ολεανολικού οξέος. Το πείραμα διήρκησε 5 ημέρες. Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των παραπάνω προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των TNF-α και ICAM-1 στο εντερικό ιστό και στον ορό των πειραματόζωων. Τόσο για τον TNF-α όσο και για το ICAM-1 διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων τους στον εντερικό ιστό ύστερα από την επίδραση της μαστίχας, του όξινου και του ουδέτερου κλάσματος και του ολεανολικού οξέος στη μεγαλύτερη δόση ($p < 0.05$). Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το ICAM-1 στον ορό των επιμυών. Ο TNF-α δεν ανιχνεύθηκε στο ορό.

Η δράση της μαστίχας φάνηκε να οφείλεται σε συνέργεια των επιμέρους κλασμάτων και όχι αποκλειστικά στη δράση μεμονωμένου κλάσματος για την περίπτωση του ICAM-1, ενώ για τον TNF-α δεν παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά. Περαιτέρω μελέτες για τη διευκρίνιση

ενός ή περισσότερων συστατικών της μαστίχας Χίου με δράση προφυλακτική/θεραπευτική της ΙΦΝΕ απαιτούνται.

SUMMARY

Background: Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic condition which includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). The etiology of IBD seems to be a combination of environmental, genetic, immunologic factors. Mastic gum is the resinous secretion of the mastic tree that grows exclusively at the south section of Chios Island. It consists of terpenes and polyphenols which give mastic gum antimicrobial, antineoplastic, antioxidant and anti-inflammatory properties.

Objective: To investigate the anti-inflammatory activity of different fractions of mastic gum in rats with chemically induced IBD. The final goal was to identify the most active fraction.

Methods: The experiment was carried out in 50 male Wistar rats randomly assigned in 10 groups: (A) control, (B) TNBS induced experimental model of IBD, (C) IBD model rats supplemented with 100mg/Kg BW/day of a mixture of mastic and inulin (6:4), (D) IBD model rats supplemented with 40mg inulin/Kg BW/day, (E) IBD model rats supplemented with 24mg acidic fraction/Kg BW/day, (F) IBD model rats supplemented with 48mg acidic fraction/Kg BW/day, (G) IBD model rats supplemented with 24mg neutral fraction/Kg BW/day, (H) IBD model rats supplemented with 48mg neutral fraction/Kg BW/day, (I) IBD model rats supplemented with 7mg oleanolic acid/Kg BW/day and (J) IBD model rats supplemented with 14mg oleanolic acid/Kg BW/day. Animals were sacrificed after 5 days of treatment. To evaluate the influence of mastic gum TNF- α and ICAM-1 were measured in both sera and intestines applying sandwich ELISA and photometric assays.

Results: A statistically significant decrease was observed in intestinal levels of TNF- α and ICAM-1 in groups C, E, F, G, H, J ($p < 0.05$). Likewise, serum levels of ICAM-1 decreased in the abovementioned groups, while serum levels of TNF- α were not detected.

Conclusion: Results indicate that the potential prophylactic/therapeutic effect of mastic gum in an animal model of IBD may not be based on the effects of individual compounds. On the contrary, this effect may involve a synergistic activity of drastic compounds on ICAM-1 levels, but not on TNF- α levels. Further studies to establish this firstly ever reported evidence is required.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ASCAS	αντισώματα έναντι του σακχαρομύκητα <i>cerevisiae</i>
BHT	βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (butylated hydroxytoluene)
BSA	αλβουμίνη ορρού (bovine serum albumin)
CDAI	δείκτης ενεργότητας νόσου Crohn (Crohn's Disease Activity Index)
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein)
ELAM-1	ενδοθηλιακό μόριο σύνδεσης λευκοκυττάρων τύπου 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1)
GSH	γλουταθειόνη (glutathione)
ICAM-1	διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (intracellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	ιντερφερόνη-γ (interferon-gamma)
IL-	ιντερλευκίνη- (interleukin-)
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein)
LFA 1	αντιγόνο-1 λειτουργίας των λεμφοκυττάρων (lymphocyte function associated antigen-1)
MDA	μαλοναλδεύδη (malondialdehyde)
NF- κB	πυρηνικός παράγοντας-κΒ (nuclear factor kappa beta)
OxLDL	οξειδωμένη LDL
P-ANCA	περιπυρηνικά αντιουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα
PBMC	μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffer saline)
ROS	ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)

SOD	δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase)
TAP	ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant potential)
TNBS	2, 4, 6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (trinitrobenzene sulfonic acid)
TNF- α	παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (tumor necrosis factor- α)
VCAM-1	αγγειακό συνδετικό μόριο-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VLA-4	very late antigen-4

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελίδα
<u>ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	13
1.1 Εισαγωγή	13
1.2 Παθογένεια και αιτιολογικοί παράγοντες	13
1.3 Παθολογοανατομία	15
1.4 Εκδηλώσεις	16
1.5 Διάγνωση	17
1.6 Θεραπευτική αγωγή	18
1.7 Διαιτητική αντιμετώπιση	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN	21
2.1 Νόσος του Crohn και οξειδωτικό στρες	21
2.2 Νόσος του Crohn και φλεγμονή	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ	26
3.1 Εισαγωγή	26

3.2 Το μαστιχόδενδρο	27
3.3 Η συγκομιδή της μαστίχας	28
3.4 Φυσικές ιδιότητες	30
3.5 Προϊόντα της μαστίχας	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ	33
4.1 Μαστιχέλαιο	33
4.2 Τερπένια	33
4.3 Πολυφαινόλες	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ	38
<u>ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	41
6.1 Κλασματοποίηση της μαστίχας Χίου	41
6.2 Ποσοτική ανάλυση ολεανολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography- Mass Spectrometry, GC-MS)	43
6.3 Τα πειραματόζωα	44
6.4 Πειραματικό ζωικό μοντέλο νόσου Crohn	45

6.5 Δοκιμή με μαστίχα ή συστατικά αυτής	45
6.6 Αναισθησία-ευθανασία	47
6.7 Ομογενοποίηση των ιστών	47
6.8 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford	48
6.9 Μέτρηση των επιπέδων TNF-α σε ιστό και ορό αίματος	49
6.10 Μέτρηση των επιπέδων ICAM-1 σε ιστό και ορό αίματος	50
6.11 Στατιστική επεξεργασία	52
<u>ΜΕΡΟΣ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
7.1 Παραλαβή ολεανολικού οξέος	53
7.2 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης διαφόρων κλασμάτων της μαστίχας Χίου σε ζωικό μοντέλο χημικής κολίτιδας που μιμείται τη νόσο Crohn και η διευκρίνιση τελικά του πιο δραστικού από αυτά.

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Εισαγωγή

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) αποτελεί μια χρόνια πάθηση του γαστρεντερικού συστήματος και διαχωρίζεται στην ελκώδη κολίτιδα (Ulcerative Colitis) και στη νόσο του Crohn (Crohn's Disease). Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου προσβάλλει εξίσου τα δύο φύλα και είναι συχνότερη μεταξύ της δεύτερης και τέταρτης δεκαετίας της ζωής, με μια νέα μικρότερη αύξηση της συχνότητάς της μετά την έκτη δεκαετία (Cecil, 2003). Τα ποσοστά θνητότητας είναι μεγαλύτερα κατά τα πρώτα χρόνια της νόσου αλλά και αργότερα είναι αρκετά αυξημένα λόγω του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου (Harrison, 2005).

Οι ΙΦΝΕ εμφανίζονται σε όλο τον κόσμο αν και είναι πιο κοινές σε ορισμένες περιοχές (Ηνωμένες Πολιτείες, Ηνωμένο Βασίλειο και Σκανδιναβία) από άλλες με ποσοστά επίπτωσης των 4 έως 10/100,000 άτομα ετησίως (Hendrickson et al, 2002). Και οι δύο παθήσεις είναι συχνές στους Εβραίους Ashkenazi που ζουν στην Ευρώπη ή στη Β. Αμερική (Cecil, 2003). Στην Αυστραλία, καθώς και στη Νότια και Κεντρική Ευρώπη οι περιπτώσεις είναι λιγότερες, ενώ στην Ασία και στην Αφρική είναι σπάνιες. Έτσι, ο γεωγραφικός παράγοντας φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εκδήλωση της νόσου καθώς επηρεάζει τον αριθμό των ατόμων που θα νοσήσουν σε διάστημα ενός έτους (επίπτωση της ΙΦΝΕ). Οι αστικές περιοχές και οι πλουσιότερες τάξεις εμφανίζουν μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου από τις αγροτικές περιοχές και τις φτωχότερες τάξεις (Karlinger et al, 2000).

1.2 Παθογένεια και αιτιολογικοί παράγοντες

Τόσο η ελκώδης κολίτιδα όσο και η νόσος Crohn θεωρούνται μεμονωμένα ως το αποτέλεσμα μίας μη φυσιολογικής απάντησης του ξενιστή στα φυσιολογικά αντιγόνα του γαστρεντερικού σωλήνα (McPhee, 2006a). Οι περισσότερες μελέτες για την παθογένεια της καταλήγουν στο συνδυασμό γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων κατά την οποία μια ανεξέλεγκτη ανοσολογική απάντηση στον εντερικό αυλό οδηγεί σε φλεγμονή τα άτομα με γενετική προδιάθεση (Neuman et al, 2007). Σε ό,τι αφορά τους **γενετικούς παράγοντες**, η

επίπτωσή της είναι υψηλότερη στους μονοζυγωτικούς από ό,τι στους διζυγωτικούς διδύμους (Orholm et al, 1991) και οι πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών διατρέχουν 10-15 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισής της. Επιπλέον, περίπου 10% των ασθενών με ΙΦΝΕ έχει πρώτου βαθμού συγγενή με τη νόσο (Cecil, 2003). Η παθογένεια της ΙΦΝΕ ενδεχομένως να εξαρτάται και από **λοιμώδεις παράγοντες** (Geier et al, 2007). Η έκθεση σε παθογόνα (π.χ. *Salmonella*, *Shigella* sp., *Campylobacter* sp.) μπορεί να προκαλέσει μια μη ελεγχόμενη φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί τελικά στην έναρξη της νόσου. Ωστόσο η αντίδραση σε ένα αντιγόνο εξαρτάται από τη γενετική προδιάθεση του ατόμου (Harrison, 2005). Ακόμη σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και **ανοσολογικοί παράγοντες**. Σε έναν υγιή οργανισμό, το γαστρεντερικό σύστημα βρίσκεται σε μια κατάσταση ελεγχόμενης φλεγμονής, που ρυθμίζεται με τη μεσολάβηση μικρών πεπτιδίων, γνωστές ως κυτταροκίνες για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (Cecil, 2003). Οι τελευταίες παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μεταξύ των άλλων περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες (interleukins, IL). Κάποιες κυτταροκίνες προάγουν την φλεγμονή (π.χ. TNF-α, IL-6 και IL-8), ενώ κάποιες άλλες έχουν αντιφλεγμονώδη δράση (π.χ. IL-10). Μια διαταραχή στην ισορροπία της ομοιόστασης λόγω της υπέρμετρης έκφρασης των προφλεγμονωδών είτε της ελλιπούς έκφρασης των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών ή του συνδυασμού τους έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση της ΙΦΝΕ. Στους αιτιολογικούς παράγοντες συγκαταλέγονται και **ψυχολογικά αίτια**, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε επιδείνωση των συμπτωμάτων και υποτροπή της νόσου (Mawdsley et al, 2006). Επιπρόσθετα οι **διαιτητικοί παράγοντες** μπορεί να έχουν μεγάλη επίδραση στην παθογένεια της ΙΦΝΕ. Η αυξημένη πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και η αυξημένη κατανάλωση γλυκών συσχετίζονται θετικά, ενώ η πρόσληψη βιταμίνης C σχετίζεται αρνητικά με την εμφάνιση της ελκώδους κολίτιδας (Hart et al, 2008; Sakamoto et al, 2005). Η υψηλή κατανάλωση σακχάρων, γλυκαντικών, γλυκών, λιπών, ελαίων αλλά και μονο- και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σχετίζονται θετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Crohn (Sakamoto et al, 2005). Τέλος, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας με διαφορετική επίδραση στη νόσο του Crohn και στην ελκώδη κολίτιδα είναι το κάπνισμα (Danese et al, 2004). Το **κάπνισμα** φαίνεται να αναστέλλει την εμφάνιση ελκώδους κολίτιδας, καθώς μερικοί ασθενείς εμφανίζουν τα συμπτώματά της αφού διακόψουν το κάπνισμα. Αντιθέτως, το κάπνισμα συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Crohn κατά 2 φορές και η πάθηση είναι πιο επιθετική στους καπνιστές από τους μη καπνιστές πάσχοντες από τη νόσο. (Cecil, 2003).

1.3 Παθολογοανατομία

Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Η ελκώδης κολίτιδα είναι ασθένεια του βλεννογόνου χιτώνα του παχέος εντέρου. Συνήθως, ξεκινά από το τελικό τμήμα του ορθού στο 95% των περιπτώσεων και επεκτείνεται περιλαμβάνοντας τμήμα ή ακόμα και ολόκληρο το κόλον (Cecil, 2003). Η φλεγμονή περιορίζεται κυρίως στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου και του ορθού και αποτελείται από συνεχή εμπλοκή μεταβλητής σοβαρότητας εξέλκωσης, οιδήματος και αιμορραγίας σε όλο το μήκος του παχέος εντέρου (Hendrickson et al, 2002; McPhee, 2006a). Η εικόνα του παχέος εντέρου είναι φυσιολογική κατά την ύφεση της νόσου, αλλά σε ασθενείς που πάσχουν πολλά χρόνια, ο βλεννογόνος είναι ατροφικός και το κόλον γίνεται στενότερο και βραχύτερο (Harrison, 2005). Η παρουσία ψευδοπολύποδα στις φλεγμαίνουσες περιοχές είναι συχνή (Cecil, 2003).

Η νόσος του Crohn, σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, αφορά χαρακτηριστικά στον τελικό ειλεό ή στο παχύ έντερο, αν και μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από το στοματοφάρυγγα μέχρι την περιπρωκτική περιοχή (McPhee α, 2006). Συχνά σε τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα που νοσούν παρεμβαίνουν και υγιείς περιοχές. Η φλεγμονή μπορεί να είναι μεταβλητή. Συχνά εκτείνεται σε όλο το πάχος του εντερικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κοιλωδών εκτάσεων ή το σχηματισμό συριγγίων (Hendrickson et al, 2002). Κίνδυνος καρκίνου υπάρχει και στη νόσο Crohn, αλλά είναι μικρότερος σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα (Cecil, 2003).

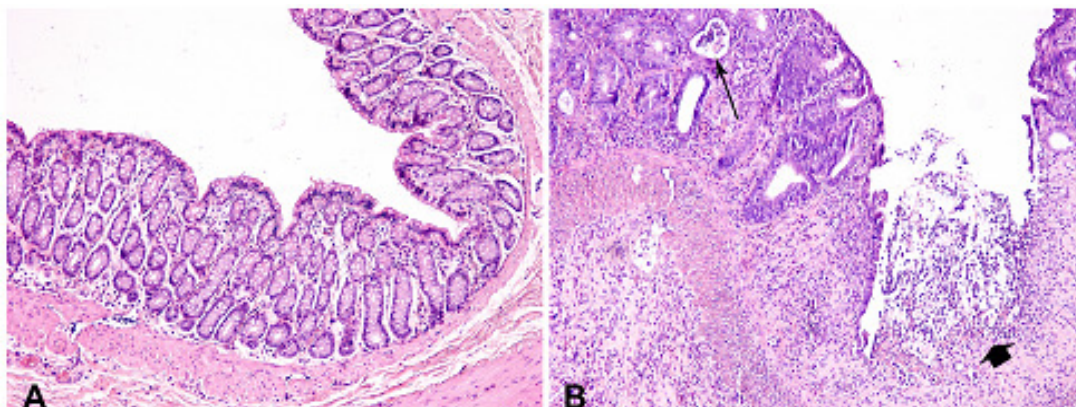


Εικόνα 1. Αριστερά υγιής βλεννογόνος παχέος εντέρου. Δεξιά εμφανείς εξελκώσεις, οίδημα και ερυθρότητα.

Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

Στην ελκώδη κολίτιδα, ενδοσκοπικά ευρήματα δείχνουν ερύθημα, ευθρυπτότητα κι εξελκώσεις του βλεννογόνου. Χαρακτηριστικό ιστολογικό γνώρισμα αποτελούν τα αποστήματα των κρυπτών.

Στη νόσο του Crohn εμφανίζονται αφθώδη έλκη, βαθιά έλκη και ασυνεχείς αλλοιώσεις. Ιστολογικό γνώρισμα είναι τα κοκκιώματα σε ποσοστό 30% των περιπτώσεων (Cecil, 2003).



Εικόνα 2. Αριστερά υγιές επιθήλιο παχέος εντέρου. Δεξιά εμφανή αποστήματα, εξελκώσεις, διήθηση λευκοκυττάρων και παραμόρφωση κρυπτών σε ασθενή με νόσο Crohn.

1.4 Εκδηλώσεις

Γαστρεντερικές εκδηλώσεις

Η ΙΦΝΕ χαρακτηρίζεται από περιόδους εξάρσεων και υφέσεων. Το πιο συχνό χαρακτηριστικό της ελκώδους κολίτιδας είναι η παρουσία αίματος και βλέννας που αναμιγνύεται με τα κόπρανα, συνοδευόμενη από πόνο χαμηλά στην κοιλιακή χώρα που είναι πιο έντονος κατά τη διάρκεια των εντερικών κινήσεων. Η τοποθεσία του κοιλιακού άλγους εξαρτάται από το βαθμό συμμετοχής του παχέος εντέρου. Οι ασθενείς κινητοποιούνται λόγω των αιματηρών διαρροιών και έτσι η διάγνωσή της γίνεται πιο άμεσα. Στα συμπτώματα συμπεριλαμβάνονται ανορεξία, ναυτία κι έμετος (Hendrickson et al, 2002).

Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η νόσος Crohn είναι ετερογενής πάθηση με αποτέλεσμα την καθυστερημένη διάγνωσή της. Η ύπαρξη γαστρεντερικών συμπτωμάτων εξαρτάται από την τοποθεσία, την έκταση και τη σοβαρότητα της συμμετοχής. Σε ασθενείς με

ειλεοκολική συμμετοχή, ο κοιλιακός πόνος είναι συνήθως μεταγευματικός και μπορεί να παραπεμφθεί στην περιομφαλική περιοχή, ιδιαίτερα στα παιδιά. Εκτεταμένη νόσος του λεπτού εντέρου προκαλεί διάχυτο κοιλιακό άλγος, ανορεξία, διάρροια και μπορεί να οδηγήσει σε δυσσαπορρόφηση λακτόζης. Η νόσος του Crohn στο παχύ έντερο μπορεί να μιμείται την ελκώδη κολίτιδα. Εμφανίζεται με βλεννοαιματηρές διάρροιες που συνδέονται με κολικοειδές χαμηλό κοιλιακό άλγος που ανακουφίζονται συχνά με αφόδευση (Hendrickson et al, 2002).

Εξωεντερικές εκδηλώσεις

Κοινή εξωεντερική εκδήλωση είναι ο πυρετός και η απώλεια βάρους. Λόγω της υποθρεψίας ή και της χρόνιας χρήσης κορτικοστεροειδών στα παιδιά παρατηρείται καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης και σεξουαλικής ωρίμανσης. Άλλη εκδήλωση είναι οι αρθραλγίες και η αρθρίτιδα που πολλές φορές προηγούνται των εντερικών εκδηλώσεων. Ακόμη, πιθανή είναι οι εμφάνιση βλεννογονοδερματικών αλλοιώσεων όπως αφθώδη έλκη, οζώδες ερύθημα και γαγγραινώδες πυόδερμα. Οι οφθαλμολογικές και ηπατοχολικές επιπλοκές περιλαμβάνονται επίσης στις εξωεντερικές εκδηλώσεις. Τέλος, μπορεί να εμφανιστεί οστεοπόρωση και οστεομαλακία λόγω έλλειψης βιταμίνης D ή δυσσαπορρόφησης ασβεστίου ή λήψης κορτικοστεροειδών, αλλά κι εξαιτίας της φλεγμονής του εντέρου (Hendrickson et al, 2002).

1.5 Διάγνωση

Η διάγνωση της ΙΦΝΕ γίνεται με διάφορες εξετάσεις όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (Hendrickson et al, 2002). Η διάκριση μεταξύ ελκώδους κολίτιδας και νόσου Crohn δεν είναι πάντα δυνατή (Harrison, 2005). Δύο αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν στον ορό ασθενών με ΙΦΝΕ: τα περιπυρηνικά αντι-ουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα (P-ANCA) (ελκώδης κολίτιδα) και τα αντισώματα έναντι του *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (νόσος Crohn) (Hendrickson et al, 2002; Main et al, 1988; Saxon et al, 1990).

Πίνακας 1. Εξετάσεις για τη διάγνωση της ΙΦΝΕ

Εξέταση	Εύρημα
<i>Πλήρες αιμοδιάγραμμα</i>	Μικροκυτταρική αναιμία, Λευκοκυττάρωση, Θρομβοκυττάρωση
<i>Φλεγμονώδεις δείκτες</i>	Αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων, Αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)
<i>Βιοχημικές εξετάσεις</i>	Χαμηλός σίδηρος ορού, Υποαλβουμιναιμία, Αυξημένα ηπατικά ένζυμα
<i>Ειδικές ορολογικές εξετάσεις</i>	pANCA, ASCA
<i>Παρασιτολογικές εξετάσεις</i>	Βακτηριακά παθογόνα, ωάρια και παράσιτα, Λανθάνουσα αιμορραγία, Λευκοκύτταρα κοπράνων
<i>Ενδοσκοπική αξιολόγηση</i>	Γαστροσκόπηση με βιοψία, Κολονοσκόπηση με βιοψία
<i>Ακτινολογικός έλεγχος</i>	Παρακολούθηση ανώτερου ΓΕΣ μέσω λεπτού εντέρου, Εντερόκλυση, Κλύσμα βαρίου

1.6 Θεραπευτική αγωγή

Η ΙΦΝΕ είναι μια χρόνια υποτροπιάζουσα νόσος. Για το λόγο αυτό η θεραπεία της διαιρείται σε τρεις φάσεις: την αντιμετώπιση της οξείας κρίσης, την πρόκληση της ύφεσης και την διατήρηση της ύφεσης. Τα ελαφριάς ή μέτριας βαρύτητας περιστατικά αντιμετωπίζονται στο εξωτερικό ιατρείο ενώ οι βαριές περιπτώσεις απαιτούν εισαγωγή στο νοσοκομείο (Cecil, 2003). Η αγωγή

περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτικά, αντιβιοτικά φάρμακα και βιολογικά φάρμακα ανάλογα με την πορεία της νόσου (Hendrickson et al, 2002).

Αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι ενώσεις του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος (5-ASA), όπως η σουλφασαλαζίνη που ενδείκνυνται για τη θεραπεία της ελαφράς ή μέτριας ενεργού νόσου. Σε περίπτωση παρενεργειών από το συγκεκριμένο φάρμακο, εναλλακτικά χορηγούνται μεσαλαμίνη και ολσαλαζίνη. Τα κορτικοστεροειδή (πρεδνιζόνη, υδροκορτιζόνη) που είναι τα πιο αποτελεσματικά για την πρόκληση ύφεσης πρέπει να χορηγούνται για όσο το δυνατό μικρότερο χρονικό διάστημα λόγω των σοβαρών παρενεργειών (Cecil, 2003).

Αντιβιοτικά φάρμακα

Η μετρονιδαζόλη και η σιπροφλοξασίνη έχουν θέση στη θεραπεία της νόσου Crohn όταν συμμετέχει το παχύ έντερο και η περιπρωκτική χώρα (Cecil, 2003).

Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα

Η αζαθειοπρίνη και η β-μερκαπτοπουρίνη χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που η νόσος ανθίσταται στα κορτικοστεροειδή (Hendrickson et al, 2002).

Βιολογικά φάρμακα

Η ινφλιξιμάμπη αποτελεί ένα χημειοκίνητο αντίσωμα (ποντικού- ανθρώπου) ενάντια του TNF-α και παρασκευάζεται με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας (Büning and Lochs, 2006). Χορηγείται όταν η νόσος Crohn δεν ανταποκρίνεται στην κλασσική αγωγή και όταν δεν υπάρχει άμεση ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης.

Χειρουργική θεραπεία

Σε περιπτώσεις κεραυνοβόλου κλινικής εικόνας, τοξικής κολίτιδας, δυσπλασίας ή καρκίνου, τότε η ΙΦΝΕ πρέπει να αντιμετωπίζεται χειρουργικά. Στην ελκώδη κολίτιδα αφαιρείται ολόκληρο το παχύ έντερο, ενώ στη νόσο του Crohn εκτελούνται τμηματικές εκτομές (Cecil, 2003).

1.7 Διαιτητική αντιμετώπιση

Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ κινδυνεύουν να αναπτύξουν πρωτεϊνοθερμίδικό υποσιτισμό και διατροφικές ανεπάρκειες ανάλογα με το σημείο που έχει προσβάλλει η νόσος. Αίτια για τα παραπάνω αποτελούν η μειωμένη πρόσληψη τροφής, οι αυξημένες ανάγκες και ταυτόχρονα οι αυξημένες απώλειες θρεπτικών συστατικών και η δυσαπορρόφηση.

Στις περιόδους εξάρσεως της νόσου Crohn η αποκλειστική χορήγηση ολικής παρεντερικής σίτισης ή στοιχειακής διαίτας για 4-6 εβδομάδες μπορεί να οδηγήσει στην ύφεση της νόσου (Cecil, 2003). Οι στοιχειακές δίαιτες ωστόσο δεν είναι καλά ανεκτές από τους ασθενείς. Η συμμόρφωση είναι καλύτερη με τις πολυμερείς δίαιτες οι οποίες φαίνεται να είναι το ίδιο ωφέλιμες με τις στοιχειακές δίαιτες. Η εντερική και παρεντερική σίτιση δε φαίνεται να έχουν διαφορά στα αποτελέσματά τους και γι' αυτό συνήθως προτιμάται η εντερική σίτιση λόγω των παρενεργειών της δεύτερης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εντερική σίτιση αποτελεί θεραπεία πρώτης επιλογής για τα παιδιά, καθώς επιτρέπει την ανάπτυξή τους σε αντίθεση με τα κορτικοστεροειδή. Οι δίαιτες αποκλεισμού και οι εντερική σίτιση φαίνεται να έχουν θέση στη τη διατήρηση της ύφεσης και στην πρόληψη της υποτροπής (Rajendran and Kumar, 2010).

Η εντερική και η παρεντερική σίτιση δεν φαίνεται να παρέχουν κάποιο όφελος σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα (Lochs et al, 2006). Η παρεντερική σίτιση φαίνεται να έχει θέση μόνο σε ασθενείς που κινδυνεύουν από υποσιτισμό πριν ή μετά από χειρουργείο και δεν ανέχονται την από του στόματος ή την εντερική σίτιση (Van Gossum et al, 2009).

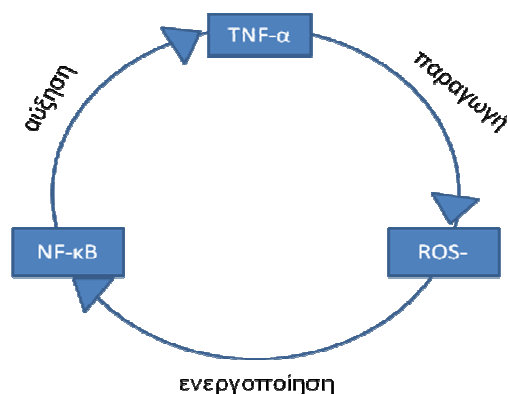
Στους ασθενείς με ΙΦΝΕ είναι συνήθως απαραίτητη η συμπληρωματική χορήγηση βιταμινών και ανόργανων στοιχείων. Σε περίπτωση προσβολής του λεπτού εντέρου μπορεί να προκληθεί δυσαπορρόφηση λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K). Σε εκτεταμένη εκτομή ειλεού είναι πιθανό να υπάρξει έλλειψη βιταμίνης B₁₂. Ακόμη συχνή είναι η σιδηροπενία. Λόγω των κορτικοστεροειδών είναι απαραίτητη η χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D. Επίσης η σουλφασαλαζίνη, που είναι ανταγωνιστής του φυλλικού οξέος, μπορεί να προκαλέσει έλλειψη της βιταμίνης αυτής (Cecil, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ CROHN

2.1 Νόσος του Crohn και οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία από τις αιτίες πολλών ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και διάφορες μορφές καρκίνου. Πλήθος μελετών καταδεικνύει τη συμβολή του και στην παθογένεια της νόσου του Crohn. Εξ ορισμού, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες παρατηρείται αυξημένη παραγωγή προοξειδωτικών παραγόντων (ελεύθερες ρίζες) έναντι αντιοξειδωτικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες είναι κάθε μόριο ή άτομο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια που υφίσταται ανεξάρτητο για μικρό χρονικό διάστημα. Βλάπτουν πρωτεΐνες ζωτικής σημασίας, το DNA του πυρήνα των κυττάρων, λιπαρά οξέα και πολυσακχαρίτες.

Στη νόσο του Crohn παρατηρείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στο βλεννογόνο του εντέρου (Head et al, 2003; Head et al, 2004; Simmonds, 1993). Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του οργανισμού (γλουταθειόνη GSH, υπεροξειδική δισμουτάση SOD και καταλάσες) είναι ικανά να εξουδετερώσουν τις ROS, αλλά η παρουσία φλεγμονής προκαλεί οξειδωτικό στρες. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι ROS ενεργοποιούν το μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει την παραγωγή του TNF-α. Ο TNF-α παράγει ROS δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο που απεικονίζεται στο Σχήμα 1 (Head et al, 2003).



Σχήμα 1. Ο πιθανός ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στη φλεγμονή

(Head et al, 2003).

Στη νόσο Crohn ο δείκτης μέτρησης του οξειδωτικού στρες που έχει καθιερωθεί για τον ορό και τον εντερικό ιστό και αποτυπώνει τα υπεροξειδωμένα λιπίδια είναι η μαλοναλδεύδη (MDA) (Kruidenier et al, 2003). Σύμφωνα με τους Levy και συν. σε μελέτη του 2000, παιδιά με νόσο Crohn έχουν 70% υψηλότερα επίπεδα MDA σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής βιταμίνης Α είναι σημαντικά χαμηλότερη. Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ παρουσιάζουν βλάβη στο DNA και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών Α και Ε στο πλάσμα (D' Odorico et al, 2001).

2.2 Νόσος του Crohn και φλεγμονή

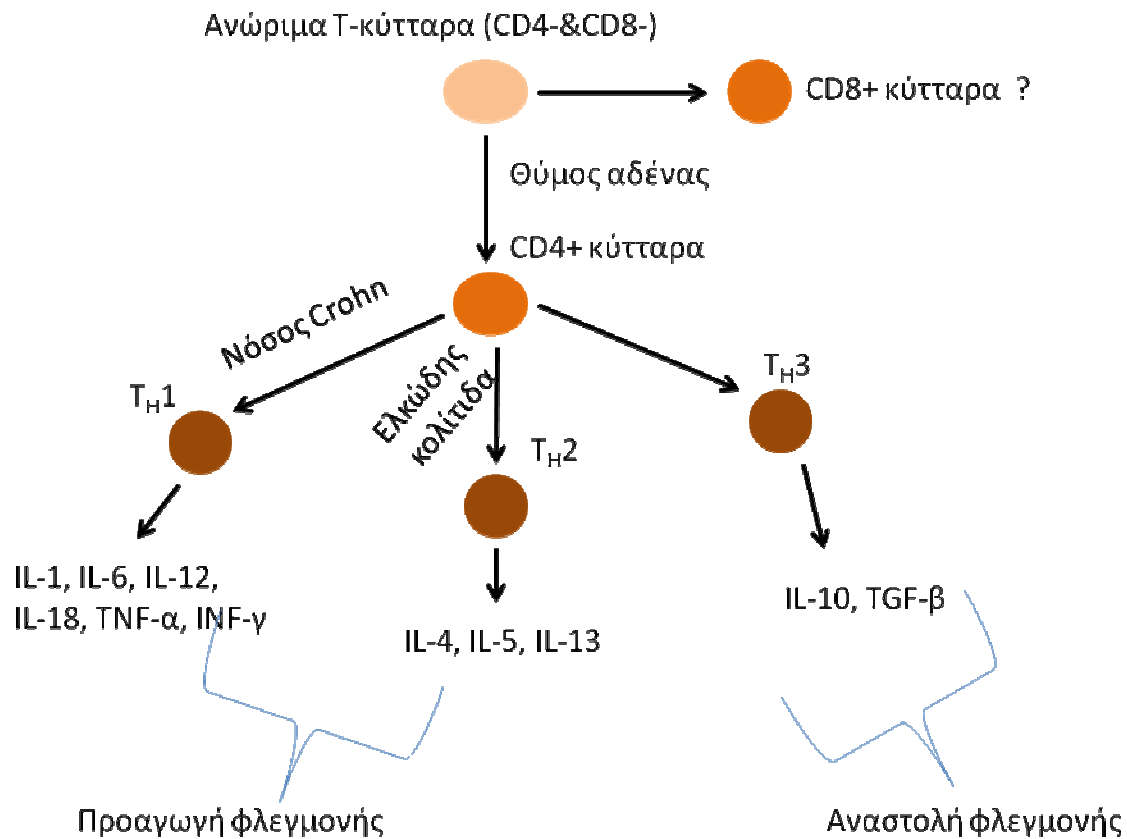
Η φλεγμονή είναι η μορφή της φυσικής ανοσίας που ονομάζεται και απόκριση οξείας φάσης. Ορίζεται ως η ταχύτατη προσαρμογή της ομοιοστασίας που εκφράζεται με αλλαγές στη σύνθεση των πρωτεϊνών του πλάσματος σαν απόκριση σε βλαπτικό ερέθισμα όπως λοίμωξη, κάκωση, ιστών ή νεοπλασία. Κλινική έκφραση της φλεγμονής στη θέση επίδρασης του αρχικού ερεθίσματος είναι η ερυθρότητα, η θερμότητα και το οίδημα (McPhee, 2006b).

Τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, καθώς λειτουργούν ως φραγμός για τα αντιγόνα, αλλά και στην έναρξη της φλεγμονής. Στην ΙΦΝΕ αναγνωρίζουν μικροοργανισμούς ή ουσίες που παράγονται από αυτούς. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες αντιδρούν και παράγονται κυτταροκίνες, χημοκίνες και άλλοι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η ΙΦΝΕ είναι αποτέλεσμα της ακατάλληλης και υπερβολικής απάντησης του βλεννογόνου του εντέρου στη φυσιολογική μικροχλωρίδα (Bouma and Strober, 2003).

Όταν τα CD4+ T-κύτταρα και τα CD8+ κυτταροτοξικά εντοπίσουν κάποιο αντιγόνο στο βλεννογόνο του εντέρου, τότε τα CD4+ κύτταρα διαφοροποιούνται σε T-βοηθητικά κύτταρα που εκφράζουν κυτταροκίνες (Σχήμα 2). Τα CD8+ κυτταροτοξικά T-κύτταρα δεν φαίνεται να έχουν ουσιαστικό ρόλο στην ΙΦΝΕ, αφού η απουσία τους σε πειραματόζωα δεν οδηγεί σε επεισόδιο φλεγμονής. (Strober et al, 2002).

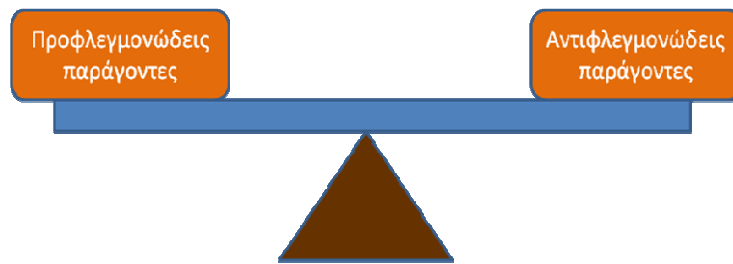
Τα T-βοηθητικά κύτταρα διαφοροποιούνται περαιτέρω σε ενεργοποιημένα βοηθητικά κύτταρα T_H1 και T_H2. Τα T_H1 εκκρίνουν τις IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, τον TNF-α και την IFN-γ (ιντερφερόνη-γ) και τα T_H2 εκκρίνουν τις IL-4, IL-5 και IL-13. Οι παραπάνω κυτταροκίνες λειτουργούν ως προφλεγμονώδεις παράγοντες, δηλαδή επάγουν τη φλεγμονή. Από την άλλη

πλευρά τα CD4+ κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και σε ρυθμιστικά κύτταρα, όπως τα T_H3, που λειτουργούν ως αναστολείς της παραπάνω ανοσολογικής απάντησης, εκκρίνοντας IL-10 και TGF-β. Φαίνεται ότι τα T_H1 κύτταρα αναστέλλουν τα T_H3 κύτταρα, ενώ τα T_H2 τα διεγείρουν.

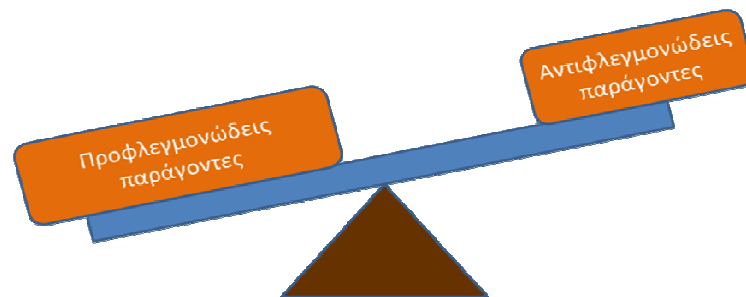


Σχήμα 2. Ανοσολογική απάντηση στην ΙΦΝΕ.

Σε έναν υγιή οργανισμό η φλεγμονή ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ των Τ-βοηθητικών κυττάρων και των ρυθμιστικών κυττάρων και κατ' επέκταση των προφλεγμονωδών και των αντιφλεγμονωδών παραγόντων (Εικόνα 3). Όταν διαταράσσεται αυτή η ισορροπία είτε λόγω υπερβολικής λειτουργίας των Τ-βοηθητικών κυττάρων είτε λόγω μειωμένης δράσης των ρυθμιστικών κυττάρων, η φλεγμονή γίνεται ανεξέλεγκτη (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα, η νόσος του Crohn χαρακτηρίζεται από υπερβολική λειτουργία των T_H1 κυττάρων και η ελκώδης κολίτιδα από την υπερβολική δράση των T_H2 κυττάρων (Bouma and Strober, 2003).



Εικόνα 3. Ισορροπία μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων.



Εικόνα 4. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων.

Κατά τη φλεγμονή εκκρίνονται TNF- α , IL-6, IL-8 και ICAM-1. Ο TNF- α παράγεται από τα μονοκύτταρα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα. Κύρια κύτταρα-στόχοι του είναι τα ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά, τα T- και B-λεμφοκύτταρα. Ο TNF- α διεγείρει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης από το μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα κB (NF- κB). Ακόμη, η προφλεγμονώδης δράση του ασκείται μέσω αυξημένου πολλαπλασιασμού και αναστολής της απόπτωσης (Sanchez-Muñoz et al, 2008). Η IL-6 παράγεται από μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και T-λεμφοκύτταρα υπό την επήρεια IL-1 και TNF- α . Δρα στα ηπατοκύτταρα αυξάνοντας τις πρωτεΐνες οξείας φάσης. Η IL-8 παράγεται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα λόγω κάποιου αντιγόνου και διαχέεται στο περιβάλλον παραγωγής της προκαλώντας χημειοταξία. Όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτίθενται στον TNF- α , επάγουν την παραγωγή του ενδοθηλιακού μορίου σύνδεσης των λευκοκυττάρων τύπου 1 (ELAM-1) που προσκολλά εκλεκτικά τα ουδετερόφιλα

πολυμορφοπύρρηνα. Μετά από ένα χρονικό διάστημα τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (ICAM-1) και το αγγειακό συνδετικό μόριο-1 (VCAM-1). Το ICAM-1 συνδέει τα Τ-λεμφοκύτταρα μέσω ενός μορίου σύνδεσης, του LFA 1 (lymphocyte function associated antigen). Το VCAM συνδέει τόσο Τ όσο και μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα μέσω ενός άλλου μορίου σύνδεσης, του VLA-4 (very late antigen-4) (McPhee, 2006b).

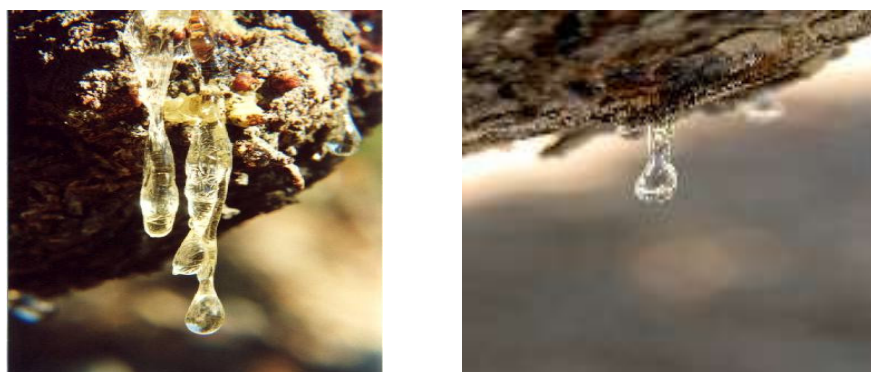
Ο TNF-α είναι αυξημένος σε ασθενείς με ενεργό νόσο (Baert et al, 1999). Καθώς στην ενεργό ΙΦΝΕ ο NF-κΒ διεγείρεται λόγω της αυξημένης παραγωγής TNF-α, εκκρίνει μεγάλες ποσότητες IL-1, IL-6, TNF-α, IL-8, ELAM-1 και ICAM-1. (Jurjus et al, 2004).

Στη νόσο του Crohn υπάρχει και αυξημένη παραγωγή IL-12 και INF-γ, ενώ στην ελκώδη κολίτιδα υπάρχει και αυξημένη παραγωγή IL-5 (Bouma and Strober, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Η μαστίχα Χίου είναι η ρητινώδης έκκριση του Μαστιχοφόρου Σχίνου ή αλλιώς μαστιχόδενδρου (*Pistacia Lentiscus* var. *Chia*, *Anacardiaceae*). Πρόκειται για φυσική, αρωματική ρητίνη, που εκκρίνεται σα δάκρυ και ρέει κατά σταγόνες στο χώμα, από τις επιφανειακές τομές που προκαλούνται με αιχμηρά εργαλεία στον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του μαστιχόδενδρου (Εικόνα 5) (Ενωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, EMX)). Η ανάπτυξή του επιτρέπεται από τις εδαφολογικές και τις κλιματολογικές συνθήκες μόνο στο νότιο τμήμα του νησιού. Το γεγονός της αποκλειστικής παραγωγής της μαστίχας στη Χίο ήδη από την αρχαιότητα, προκάλεσε τη διεκδίκηση του νησιού από πολλούς λαούς.



Εικόνα 5. Το δάκρυ της μαστίχας.

Η μαστίχα της Χίου αναγνωρίστηκε από τα αρχαία χρόνια, τόσο για το ιδιαίτερο άρωμα της, όσο και για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Έχει καταγραφεί ως η πρώτη φυσική τσίκλα του αρχαίου κόσμου, που χρησιμοποιούνταν για τον καθαρισμό των δοντιών και τη φρεσκάδα της αναπνοής. Από τον 5^ο αιώνα π.Χ. ο Ηρόδοτος αναφέρει χαρακτηριστικά ότι στην αρχαία Ελλάδα μασούσαν το αποξηραμένο ρητινώδες υγρό που ρέει από τον φλοιό του μαστιχόδενδρου (Σαββίδης, 2000). Ήδη από τα ρωμαϊκά χρόνια οι κυρίες της Ρώμης χρησιμοποιούσαν οδοντογλυφίδες από ξύλο μαστιχόδενδρου για την καλύτερη υγιεινή του στόματος. Η μαστίχα αναφέρεται και στα έργα άλλων αρχαίων συγγραφέων όπως ο Ιπποκράτης και ο Διοσκουρίδης που την αποκαλούν «σχινική ρητίνη» και δίνουν έμφαση στις θεραπευτικές της ιδιότητες. Συγκεκριμένα ο Διοσκουρίδης, ο πατέρας της φαρμακολογίας, στο έργο του «περί ύλης ιατρικής» (*de material medica*), αναφέρει τις ευεργετικές ιδιότητες της ρητίνης στη δυσπεψία και στην αναπαραγωγή του αίματος και τις θεραπευτικές ιδιότητες του μαστιχελαίου στα

καρκινώματα στομάχου και στις δυσεντερικές παθήσεις. Τη χρησιμοποιούσαν ακόμη στην κοσμετολογία για καθαρισμό του προσώπου και του σώματος. Επιπρόσθετα στα κείμενα του Ηροδότου και του Διόδωρου η μαστίχα αναφέρεται ως μέσο ταρίχευσης του ανθρωπίνου σώματος.

Η μαστίχα Χίου από το 1997, έχει χαρακτηριστεί ως «Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.)».

3.2 Το μαστιχόδενδρο

Το μαστιχόδενδρο είναι αειθαλής θάμνος με ύψος 2-3 μέτρα που πολλές φορές μπορεί να φτάσει και τα 5 μέτρα στα ηλικιωμένα φυτά (Εικόνα 6) (Σαββίδης, 2000). Όλα τα όργανα του μαστιχόδενδρου (βλαστός, φύλλα, ρίζες, άνθη, καρποί) διατρέχονται από ρητινοφόρους αγωγούς (σύστημα αγωγών). Είναι δίοικο είδος, εμφανίζει δηλαδή άρρενες και θήλεις ταξιανθίες σε διαφορετικά άτομα. Τα άρρενα άτομα, που καλούνται και «καρπόσκινα», είναι εκείνα που καλλιεργούνται κυρίως καθώς αποδίδουν περισσότερη και πιο ποιοτική μαστίχα. Το μαστιχόδενδρο αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς και ολοκληρώνει την ανάπτυξή του στα 40-50 χρόνια. Η παραγωγή μαστίχας ξεκινά τον 5ο ή 6ο χρόνο, ενώ από το 12^ο μέχρι το 15^ο έτος παρουσιάζεται η μέγιστη απόδοση. Η μέση ετήσια απόδοση ανά δένδρο είναι 150-180 γραμμάρια μαστίχας ενώ υπάρχουν και σπάνιες περιπτώσεις δένδρων που παράγουν δύο κιλά αλλά και δένδρα που βγάζουν μόνο 10 γραμμάρια. Το μαστιχόδενδρο ζει πάνω από 100 χρόνια, αλλά αρχίζει να παρακμάζει από το 70^ο έτος της ηλικίας του. Το αξιοπρόσεκτο είναι, ότι ενώ σχίνοι υπάρχουν σε όλο το νησί, η παραγωγή της μαστίχας γίνεται μόνο στο νότιο τμήμα της Χίου, στα Μαστιχόχωρα, όπου το κλίμα είναι ιδιαίτερα θερμό και ξηρό. Ο σχίνος είναι φυτό ανθεκτικό και έχει ελάχιστες απαιτήσεις, γι' αυτό ευδοκimeί σε άγονα, πετρώδη και φτωχά εδάφη. Επειδή οι ρίζες του απλώνονται στην επιφάνεια του εδάφους, μπορεί να επιβιώσει σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας.



Εικόνα 6. Μαστιχόδενδρα.

Σε σχέση με τη συστηματική του κατάταξη το μαστιχόδενδρο ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae. Η οικογένεια περιλαμβάνει 4 γένη, τα Rhus, Cotinus, Schinus και Pistacia, όλα μικρά δένδρα ή θάμνοι. Τα είδη του γένους Pistacia είναι: (α) P. terebinthus, (β) P. atlantica, (γ) P. palestina, (δ) P. vera, (ε) P. chinensis και (στ) P. lentiscus. Το σημείο προέλευσης του γένους Pistacia είναι η κεντρική Ασία, από όπου ξεκίνησε η εξάπλωση διαφόρων ειδών γύρω από την Μεσόγειο. Δύο από τα είδη της Pistacia, η P. lentiscus και η P. atlantica, χρησιμοποιήθηκαν από την αρχαιότητα για την παραγωγή και τη διακίνηση της μαστίχας.

Τα φυλλάρια του μαστιχόδενδρου είναι πλατιά (Εικόνα 7). Ωστόσο υπάρχουν και άλλα είδη με πολύ στενότερα φυλλάρια. Ο όρος «κλώνος» χρησιμοποιείται για την περιγραφή διαφόρων μορφών μαστιχόδενδρων με βάση παρόμοια γνωρίσματα, όπως το σχήμα των φύλλων και του βλαστού, οι μηχανικές ιδιότητες του φλοιού και η ποιότητα της μαστίχας. Έως τώρα έχουν περιγραφεί 5 κλώνοι που φέρουν τοπικά ονόματα: μαυρόσκοινος (ή λαγκαδιώτης), βότομος, βιγλιώτης (ή μαρουλόσκοινος ή μαρουλιώτης ή καλλιμασιώτης), κρεμεντινός και λιβανός.



Εικόνα 7. Αριστερά τα φύλλα του δένδρου. Δεξιά το άνθος της μαστίχας.

3.3 Η συγκομιδή της μαστίχας

Ο χρόνος συλλογής της μαστίχας είναι καθορισμένος από το νόμο την περίοδο από τις 15 Ιουλίου μέχρι της 15 Οκτωβρίου.

Προκαταρκτικές εργασίες: Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η λίπανση (Δεκέμβριος), το κλάδεμα (Ιανουάριος, Φεβρουάριος) και το σκάψιμο του εδάφους (Μάρτιος, Απρίλιος). Από τα μέσα Ιουνίου έως τις αρχές Ιουλίου απομακρύνονται όλα τα φυτά γύρω από το βλαστό. Ακολουθεί ισοπέδωση και πάτημα με κοσκινισμένο ασπρόχωμα ώστε να δημιουργηθεί λεία επιφάνεια (Εικόνα 8). Έτσι οι σταγόνες μαστίχας που πέφτουν στο έδαφος παραλαμβάνονται

εύκολα. Το ασπρόχωμα αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), το οποίο καθώς είναι αδρανές υλικό δεν επηρεάζει ούτε τις φυσικοχημικές ιδιότητες ούτε την καθαρότητα της μαστίχας. Αν το χώμα που χρησιμοποιείται δεν είναι ασπρόχωμα, η μαστίχα σκουραίνει και χάνει την εμπορική της αξία (μαυρομάστιχο).



Εικόνα 8. Μετά το ασπροχωμάτισμα

Πρώτο κέντημα (ρήνισμα): Το κέντημα, όπως λένε το χάραγμα των σχίνων, είναι η πιο σημαντική φάση στη διαδικασία παραγωγής της μαστίχας (Εικόνα 9). Ξεκινάει τον Ιούλιο και συνεχίζεται μέχρι τον Αύγουστο. Με ένα μικρό αιχμηρό και αυλακωτό στην άκρη σιδερένιο εργαλείο, το κεντητήρι, χαράζουν τον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά του δέντρου, αρχίζοντας από χαμηλά στον κορμό και συνεχίζοντας προς τα κλαδιά. (Εικόνα 9). Οι τομές, «κεντήματα», επαναλαμβάνονται μερικές φορές από τις αρχές Ιουλίου μέχρι το τέλος του Αυγούστου. Ο αριθμός των τομών είναι ανάλογος με το μέγεθος και την ηλικία του δένδρου. Το κέντημα γίνεται 2 φορές την εβδομάδα και διαρκεί 5-6 εβδομάδες. Η μαστίχα αρχίζει να στερεοποιείται σε 15-20 μέρες μετά από το κέντημα.



Εικόνα 9. Κέντημα.

Πρώτη συλλογή: Η πρώτη συλλογή γίνεται μετά τις 15 Αυγούστου τις πρώτες πρωινές ώρες.. Όταν η μαστίχα σταθεροποιηθεί αρχίζει το μάζεμα της με ένα ειδικό εργαλείο που λέγεται «τιμητήρι». Πρώτα συλλέγεται η χοντρή μαστίχα, η πίτα όπως ονομάζεται, και με το ίδιο εργαλείο συλλέγεται και η μαστίχα που έχει πήξει στον κορμό του δέντρου, τα λεγόμενα δάκρυα, και αυτή που κρέμεται από τα κλαδιά (φλισκάρια). Η υπόλοιπη μαστίχα μαζεύεται με «σκούπες» ή με τα χέρια. Τελικά η μαστίχα τοποθετείται σε ξύλινα κιβώτια και αποθηκεύεται σε δροσερούς χώρους όπου θα καθαριστεί

Δεύτερο κέντημα (κεντιά): Το δεύτερο κέντημα διαρκεί 5-6 εβδομάδες και ακολουθούνται όλες οι προηγούμενες διεργασίες μέχρι την τελευταία συλλογή του φθινοπώρου. Κάθε δέντρο πρέπει να κεντηθεί περίπου 10 με 12 φορές.

Δεύτερο μάζεμα ή μάζεμα της κεντιάς: Το τελικό μάζεμα γίνεται μετά τις 15 Σεπτεμβρίου, όταν συλλέγεται η μαστίχα από τον κορμό και το έδαφος.

Μετά την τελική συλλογή της μαστίχας αρχίζει η διαδικασία του καθαρίσματος. Η μαστίχα κοσκινίζεται και διαλύεται μέσα σε κρύο νερό και σαπούνι. Μετά το στέγνωμα γίνεται το καθαρίσμα της μαστίχας με μυτερά μαχαίρια που απομακρύνουν τις ξένες ύλες που υπάρχουν (EMX).

3.4 Φυσικές ιδιότητες

Κατά την έκκρισή της η μαστίχα έχει τη μορφή κολλώδους και διαυγούς υγρού και στερεοποιείται σε ακανόνιστα σχήματα μετά την πάροδο 15-20 ημερών, υπό την επίδραση των καιρικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή κατά την καλοκαιρινή περίοδο, δηλαδή την έντονη ξηρασία και ηλιοφάνεια (EMX). Ταυτόχρονα, υπάρχει μείωση της κολλώδους ιδιότητάς της και με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η συλλογή της. Η πυκνότητα της μαστίχας είναι 1.06 και ο βαθμός οξύτητας της 50-75.

Αρχικά, η ρητίνη έχει ένα υποκίτρινο ή ωχρό πράσινο χρώμα λόγω της περιεκτικότητάς της σε χλωροφύλλη που σταδιακά όμως λόγω πιθανής οξείδωσης παίρνει ένα κιτρινωπό χρώμα σε διάστημα δώδεκα έως δεκαοκτώ μηνών. Τα εσωτερικά στρώματα προστατεύονται από την περαιτέρω οξείδωση με τη βοήθεια μια σκληρότερης κρούστας που δημιουργείται εξωτερικά. Η σκληρότητα εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού της ρητίνης. Με τη σειρά του, ο πολυμερισμός επηρεάζεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, το χρόνο έκθεσης στη φύση,

καθώς και από το μέγεθος που έχει το δάκρυ. Όταν η ροή είναι συνεχής, το δάκρυ είναι μεγάλο και σχετικά μαλακό λόγω της προστασίας της εσωτερικής μάζας από παράγοντες πολυμερισμού. Αντίθετα, η μη συνεχής ροή, λόγω πιο γρήγορου πολυμερισμού, δίνει δάκρυ μικρό και μεγαλύτερης σκληρότητας. Τέλος, ενώ η γεύση της μαστίχας είναι αρχικά υπόπικρη, αργότερα η πικράδα εξαφανίζεται.

Η μαστίχα έχει ισχυρή κολλητική ικανότητα. Είναι διαλυτή στη βενζίνη, στον αιθέρα, στον οξικό αιθυλεστέρα, στην ακετόνη, στην αιθυλική αλκοόλη, στο χλωροφόρμιο, στο τερεβινθέλαιο και σε άλλους οργανικούς διαλύτες. Το σημείο τήξης είναι μεγαλύτερο από 96°C.

3.5 Προϊόντα της μαστίχας

Η μαστίχα χρησιμοποιείται ως συστατικό στις οδοντόκρεμες και διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή τσίχλας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην οδοντιατρική χρησιμοποιείται ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων οδοντοστοιχιών (Σαββίδης, 2000). Στην ορθοδοντική βοηθάει στη βελτίωση των ατελειών της οδοντοστοιχίας και στη λειτουργική ικανότητα των μασητήριων μυών.

Μαστίχα: Η μαστίχα διατίθεται σε τρεις τύπους, χονδρή, μεσαία και ψιλή. Ακόμη διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης είτε μαγειρικής είτε διατροφικής.

Τσίχλα: Σήμερα, η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου παράγει την τσίχλα ΕΛΜΑ (Ελληνική Μαστίχη), η οποία περιέχει φυσική ρητίνη, μαλακτικές ουσίες και ζάχαρη ή τεχνητές γλυκαντικές ύλες (Σαββίδης, 2000).

Μαστιχέλαιο: Είναι το αιθέριο έλαιο, το οποίο λαμβάνεται από την απόσταξη της μαστίχας (Σαββίδης, 2000). Το μαστιχέλαιο χρησιμοποιείται από εταιρείες καλλυντικών και αρωμάτων τόσο ως άρωμα ως και ως σταθεροποιητής αρώματος. Ταυτόχρονα αυξάνεται ολοένα και περισσότερο η χρήση του στη μαγειρική, στη ζαχαροπλαστική και στην παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής. Η ποιότητα της μαστίχας καθορίζει και την απόδοση σε μαστιχέλαιο.

Μαστιχόνερο: Παραλαμβάνεται από τη μαστίχα μέσω απλής απόσταξης με ατμό. Το μαστιχόνερο αποστάζει μαζί με το φυσικό μαστιχέλαιο και διαχωρίζεται από την ελαιώδη φάση με απλή διαδικασία διαχωρισμού φάσεων. Είναι φυσικά αρωματισμένο νερό το οποίο μεταφέρει

το αυθεντικό άρωμα μαστίχας και όλες τις ευεργετικές της ιδιότητες, καθώς είναι διαλυμένη σε αυτό μικρή ποσότητα μαστιγελαίου. Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, την ενυδάτωση και την περιποίηση του προσώπου, ενώ προτείνεται και για χρήση στη μαγειρική, στην ζαχαροπλαστική και την αρτοποιία και ποτοποιία.

Κολοφώνιο: Είναι η ρητινώδης ουσία που απομένει μετά την απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου από την μαστίχα (Σαββίδης, 2000). Χρησιμοποιείται για την παρασκευή χειρουργικών νημάτων (ράμματα), τα οποία απορροφώνται από τον οργανισμό. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων κλπ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Η ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ

4.1 Μαστιχέλαιο

Κατά την έκκρισή της η περιεκτικότητα της μαστίχας σε μαστιχέλαιο είναι 17-20%, ενώ τρεις μέρες μετά τη συλλογή της η παραπάνω περιεκτικότητα μειώνεται στο 14% (Σαββίδης, 2000). Κατά την αύξηση της παραμονής της το ποσοστό ελαττώνεται περισσότερο αν και το φαινόμενο αυτό μπορεί να καθυστερήσει με την ψύξη του προϊόντος.

Ευεργετικές δράσεις

Το μαστιχέλαιο παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τη διαδικασία της αγγειογένεσης *in vitro* και *in vivo* (Loutrari et al, 2006). Ακόμη σε πρόσφατη έρευνα των Moulos και συν. το 2009, μελετήθηκε η μοριακή βάση της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παρατηρήθηκε ότι η έκθεση Lewis καρκινωμάτων του πνεύμονα σε μαστιχέλαιο προκαλεί αλλαγή στην έκφραση 925 γονιδίων.

4.2 Τερπένια

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό ισοπρενικών ομάδων στο μόριό τους σε (Conolly and Hill, 2007): ημιτερπένια (1 ισοπρενική ομάδα), μονοτερπένια (2 ισοπρενικές ομάδες), σεσκιτερπένια (3 ισοπρενικές ομάδες), διτερπένια (4 ισοπρενικές ομάδες), σεστερτερπένια (5 ισοπρενικές ομάδες), τριτερπένια (6 ισοπρενικές ομάδες), τετρατερπένια (8 ισοπρενικές ομάδες), πολυτερπένια (πολλές ισοπρενικές ομάδες). Τα αιθέρια έλαια και οι ρητίνες περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία τερπενίων. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από πτητικά, χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια, ενώ οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενίων (Σαββίδης, 2000).

Ευεργετικές δράσεις

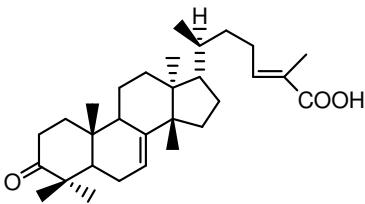
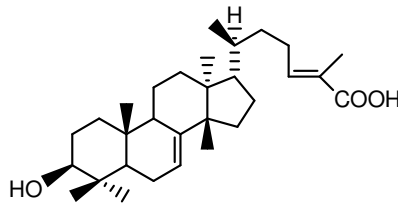
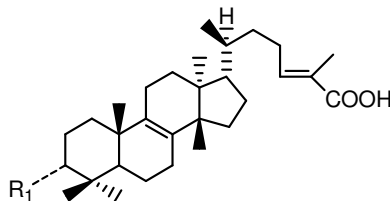
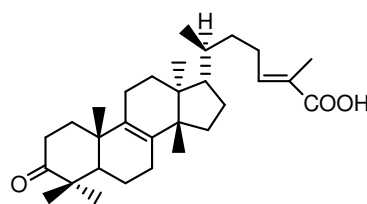
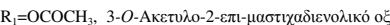
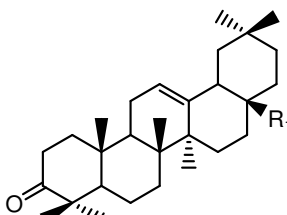
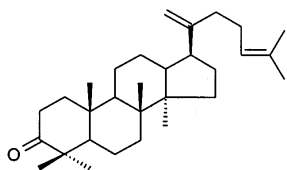
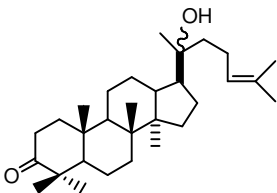
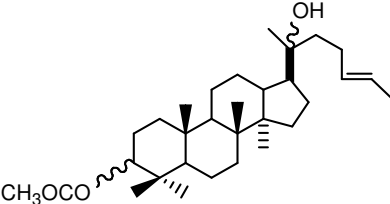
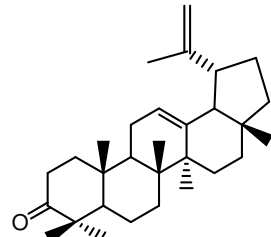
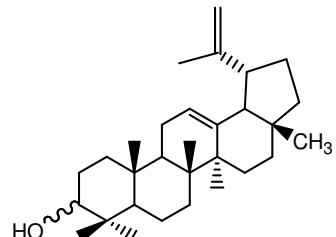
Το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στα μονοτερπένια (κυρίως περιλλυλ-αλκοόλη, λεμονένιο, μενθόλη, γερανιόλη, α-πινένιο) και στα τριτερπένια (κυρίως ολεανολικό, ουρσολικό

οξύ). Τα τριτερπένια εμφανίζουν αντινεοπλασματική δράση. Τέτοια δράση εμφανίζεται στο πάγκρεας, στους μαστούς, στο ήπαρ, στο κόλον και στον οισοφάγο (Stayrook et al, 1997; Haag και Gould, 1994; Mills et al, 1995; Furtado et al, 2003; Yamai et al, 2009). Ωστόσο, δυστυχώς κλινικές μελέτες σε καρκινοπαθείς δεν επιβεβαιώνουν αυτήν την ιδιότητα (Bailey et al, 2008; Matos et al, 2008; Stratton et al, 2008). Τα μονοτερπένια προστατεύουν από τον καρκίνο του κόλου, του μαστού και του δέρματος (Reddy et al, 1997; Maltzman et al, 1991; Elegbede et al, 1993; Batherlman et al, 1998). Ακόμη σε πολλές μελέτες παρατηρείται αντιοξειδωτική δράση των μονο- και τριτερπενίων (Grassmann, 2005; Schwarz et al, 1996; Choi et al, 2000; Somova et al, 2003; Senthil et al, 2007). Πολλές μελέτες διαπιστώνουν ακόμη την αντιμικροβιακή δράση και την αντιφλεγμονώδη δράση των τριτερπενίων (Mutai et al, 2009; Tabopda et al, 2009; Vitor et al, 2009; Ding et al, 2009).

Τα τερπένια στη μαστίχα Χίου: μαστιχαδιενονικό οξύ, ισο-μαστιχαδιενονικό οξύ, ολεανονικό οξύ, τιρουκαλλόλη, (8R)-3β,8-διυδροξυ-πολυποδα-13E,17E,21-τριένιο, β-αμυρόνη, β-αμυρίνη, ολεανονική αλδεϋδη, γερμανικόλη, λουπεόλη, διπτεροκαπρόλη, 3-οξυ-28-νορολεαν-12-ένη, 3-οξυ-28-νορλουμ-20(29)-ένη, 3-οξυ-δαμμαρα-20(21),24-διένη, (8R)-3-οξυ-8-υδροξυπολυποδα-13E,17E,21-τριένη, 28-υδροξυ-β-αμυρόνη, (20S)-3β-ακετοξυ-20-υδροξυδαμμάρ-24-ένη, 3β-υδροξυ-μαλαβαρικά-14(26),17E,21, τριένη, μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ, μαστιχαδιενολικό οξύ, 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, 3-O-ακετυλ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ (Paraschos et al, 2007; Andrikopoulos et al, 2003; Papageorgiou et al, 1997).

Τερπένια στο μαστιχέλαιο: α-θουτζένιο, α-πινένιο, φενχένιο, καμφένιο, εξανάλη, β-πινένιο, σαμπινένιο, βερμπενένιο, μυρκένιο, δ-3-καρένιο, α-φελλανδρένιο, 1,4 κινεόλη, α-τερπινένιο, λεμονένιο, 1,8-κινεόλη, β-φελλανδρένιο, 2-πεντυλο-φουράνιο, cis-οκιμένιο, εποξείδιο του οκιμενίου, γ-τερπινένιο και trans-οκιμένιο, 2-βινυλο-3,5-διμεθυλοφουράνιο, π-κυμένιο, τερπινολένιο και 2-οκτανόλη, οκτανάλη, ο-κυμένιο, 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη, 2-εννεανόνη, εννεανάλη, μεθυλο-ο-κρεσόλη, καμφοραλδεϋδη, περιλλένιο, δευδρο-π-κυμένιο, α-κοπαένιο, καμφορά, πινοκαμφορά, λιναλοόλη, οξικός λιναλυλεστέρας, δ-καδινένιο, οξικός βορνυλεστέρας, β-καρυοφυλλένιο, τερπινεν-4-όλη, 2-ενδεκανόνη, μυρτενάλη, trans-σαμπινόλη, trans-περιλλυλική αλκοόλη, trans-π-μενθα-2,8-διεν-1-όλη, οξικός χρυσανθενυλεστέρας, α-διυδρο-π-κυμεν-8-όλη, α-χουμουλένιο, καρβόνη, σαντανόλη, νεράλη, cis-περιλλυλική αλκοόλη, βερμπενόνη, γ-μουουρολένιο, α-τερπινεόλη, βορνεόλη, πιπεριτόνη, ναφθαλένιο, α-μουουρολένιο, γερανιάλη, α-διυδρο-κυμεν-8-όλη, cis-ανηθόλη, μυρτενάλη, trans-ανηθόλη,

trans-καρβεόλη, π-κυμεν-8-όλη, 6,10-διμεθυλο-ενδεκα-5,9-διεν-2-όνη, κουμινυλική αλκοόλη, οξείδιο του καρνοφυλλενίου, ανησαλδεύδη, μεθυλο-ευγενόλη, νερολιδόλη, cis-μεθυλο-ισοευγενόλη, trans-μεθυλο-ισοευγενόλη, διμυρκένιο βερατραλδεύδη (Magiatis et al, 1999).

		
Μαστιχαδιενονικό οξύ	Μαστιχαδιενολικό οξύ	
		
$R_1=OH$, 3-Επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ	Ισομαστιχαδιενονικό οξύ	
		
$R_1=OCOCH_3$, 3-Ο-Ακετυλο-2-επι-μαστιχαδιενονικό οξύ		
	Ολεανολικό οξύ	R_1 COOH
		
Δαμμαραδιενόνη	Υδροξυδαμμαρενόνη	3-Ακετοξυ-υδροξυδαμμαρενόνη
		
Nor-λουπεόλη	Λουπεόλη	

Σχήμα 3. Τριτερπένια της ρητίνης *Pistacia lentiscus*.

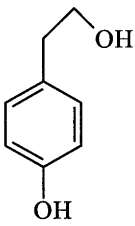
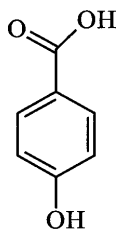
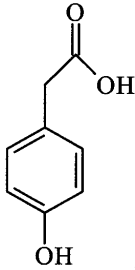
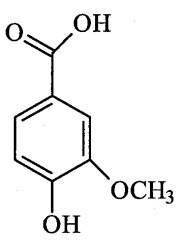
4.3 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Βρίσκονται στο φυτικό βασίλειο και είναι πολυπληθείς και ποικιλόμορφες ως προς τη δομή τους. Είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών.

Ευεργετικές δράσεις

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση κι οι ιδιότητές τους αυτές μπορεί να φανούν ιδιαίτερα ωφέλιμες στην προστασία έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών και καρκίνων (Ovaskainen et al, 2008). Η προστατευτική τους ικανότητα οφείλεται στην ιδιότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες ή στην αποδόμηση των αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων.

Πολυφαινόλες στη μαστίχα Χίου: Το 2002, στα φύλλα του μαστιχόδενδρου προσδιορίζονται οι παρακάτω πολυφαινόλες: γαλλικό οξύ, 5-*O*-γαλλοϋλ-, 3,5-*O*-διγαλλοϋλ- και 3,4,5-*O*-τριγαλλοϋλ- κινινικό οξύ, (-) κατεχίνη, μυρισετίνη 3-*O*- ρουτινοσίδη και ραμνοσίδη, κερκετίνη 3-*O*-γλυκοσίδη, δελφινιδίνη 3-*O*-γλυκοσίδη και κυανιδίνη 3-*O*-γλυκοσίδη (Romani et al, 2002). Το 2004 ανιχνεύονται στη ρητίνη απλές φαινόλες με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας-μάζας (GC-MS) (Kaliora et al, 2004). Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται οι τυροσόλη (375ng/g), π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (136ng/g), π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ (107ng/g) και βανιλλικό οξύ (41ng/g) (Σχήμα 4). Επίσης, στη ρητίνη βρίσκονται και ίχνη γαλλικού οξέος και trans-κινναμικού οξέος.

 τυροσόλη	 π-υδροξυβενζοϊκό οξύ
 π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	 βανιλικό οξύ

Σχήμα 4. Πολυφαινόλες της ρητίνης *Pistacia lentiscus*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

Η μαστίχα Χίου φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό αντιμικροβιακό, αντινεοπλασματικό, αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο.

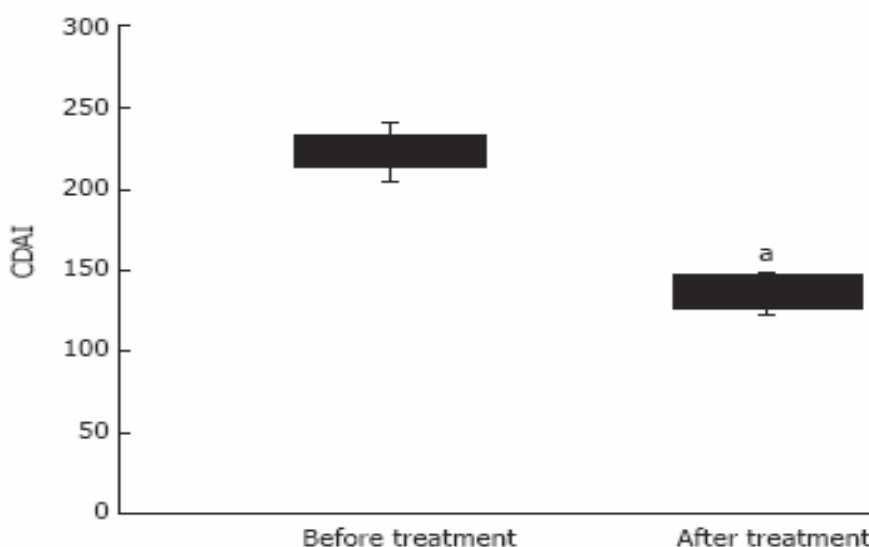
Η **αντιμικροβιακή δράση** της μαστίχας έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Σε ό,τι αφορά τη στοματική υγιεινή, η μάσησή της συμβάλλει στην αντισηψία του στόματος (Topitsoglou-Themeli et al, 1984). Η ομάδα των Aksoy και συν. το 2006 δείχνει την αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας έναντι του *Streptococcus mutans* που προκαλεί τερηδόνα. Ακόμη έχει βρεθεί ότι αφαιρεί ή περιορίζει σημαντικά το σχηματισμό των μικροβιακών πλακών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ενάντια στην κακοσμία του στόματος και την ουλίτιδα (Sterer, 2006). Ωστόσο έχουν μελετηθεί κι οι αντιμικροβιακές δράσεις της μαστίχας σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Αρκετές είναι οι μελέτες που αφορούν στη δράση της ρητίνης εναντίον του *Helicobacter pylori*, ενός gram αρνητικού και αερόβιου βακτηρίου που ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας ενεργούς γαστρίτιδας (Peek and Crabtree, 2006). Η μαστίχα Χίου φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην καταπολέμηση του *H. Pylori* (Marone et al, 2001), αν και τα αποτελέσματα άλλων ερευνών είναι αντικρουόμενα και δε συνάδουν με αυτά των Marone et al (Loughlin et al, 2003; Bebb et al, 2003). Τελευταία μελέτη των Paraschos και συν. (2007) αναφέρουν μείωση στις αποικίες του *Helicobacter pylori* σε μύες και την αποδίδουν πιθανώς στα τριτερπένια του όξινου κλάσματος της μαστίχας. Το μαστιχέλαιο χαρακτηρίζεται επίσης από αντιμικροβιακές ιδιότητες. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοτερπένια καταπολεμά *in vitro* βακτήρια, όπως τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* (Koutsoudaki et al, 2005).

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η **δράση της μαστίχας ενάντια στον καρκίνο**. Σε μία πρώτη έρευνα φαίνεται ότι το αιθανολικό και εξανικό εκχύλισμα μαστίχας προκαλεί απόπτωση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Balan et al, 2005; Balan et al, 2007). Μάλιστα, σε μύες με καρκίνο του παχέος εντέρου το εξανικό εκχύλισμα φαίνεται να μειώνει και το μέγεθος των όγκων (Dimas et al, 2009). Παρόμοιες ευεργετικές ιδιότητες παρατηρούνται και στον καρκίνο του προστάτη (He et al, 2006; He et al 2007a,b).

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) αποτελούν το βασικό μεταφορέα χοληστερόλης στους ιστούς μέσω του περιφερικού αίματος και μέσω αυτών η χοληστερόλη εναποτίθεται στο ενδοθήλιο των αρτηριών. Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης.

Η μελέτη της **αντιοξειδωτικής δράσης** της ρητίνης που ξεκίνησε από τους Andrikopoulos και συν. (2003) έδειξε ότι η μαστίχα αναστέλλει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL in vitro. Άλλωστε, πολικό εκχύλισμα μαστίχας βρέθηκε να αναστέλλει τη μείωση της GSH σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) όταν καλλιεργούνται με οξειδωμένη LDL (oxLDL) (Dedoussis et al, 2004). Στην κλινική μελέτη των Triantafyllou και συν. (2007) το λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών βελτιώνεται σημαντικά ύστερα από την ημερήσια κατανάλωση 5g μαστίχας.

Η νόσος Crohn ανήκει στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ). Σύμφωνα με την πιλοτική μελέτη των Kaliora και συν. (2007a), η ημερήσια πρόσληψη 2.2g μαστίχας Χίου για ένα μήνα βελτιώνει την κλινική εικόνα ασθενών με νόσο Crohn ήπιας έως μέτριας βαρύτητας (Σχήμα 5). Παρατηρείται επίσης στατιστικά σημαντική μείωση δεικτών όπως της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ενώ η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος αυξάνεται. Η επίδραση της ρητίνης στα απομονωμένα από τους παραπάνω ασθενείς PBMC και η δράση της ως αναστολέας του TNF-α επιβεβαιώνει τις αντιοξειδωτικές και **αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες** του προϊόντος (Kaliora et al, 2007b).



Σχήμα 5. Η ενεργότητα της νόσου (CDAI) πριν και μετά από αγωγή με μαστίχα σε 10 ασθενείς με νόσο Crohn. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης (4 εβδομάδες), οι εθελοντές λάμβαναν 2.2g μαστίχας ημερησίως σε μορφή κάψουλας. Οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (□ τυπική απόκλιση) ($p < 0.05$) (Kaliora et al, 2007a)

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ουδέτερο εκχύλισμα της μαστίχας και η τριουκαλλόλη αναστέλλουν σημαντικά την έκφραση των ICAM-1 και VCAM-1 και την προσκόλληση μονοκυττάρων σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα τη αορτής διεγερμένα από τον TNF-α και επιδεικνύουν αντιφλεγμονώδη δράση (Loizou et al, 2009). Πέρα από τις παραπάνω δράσεις, πρόσφατη μελέτη του 2010 μελετά την επίδραση της μαστίχας Χίου στη λειτουργική δυσπεψία σε ανθρώπους. Η μαστίχα Χίου φαίνεται να μειώνει στατιστικά σημαντικά συμπτώματα όπως πόνο στο στομάχι και αίσθημα καύσου σε σχέση με ασθενείς που λάμβαναν placebo (Dabos et al, 2010).

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 Κλασματοποίηση της μαστίχας Χίου

Αντιδραστήρια-όργανα:

Διαλύτες HPLC καθαρότητας: μεθανόλη (CH_3OH), οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) και διαιθυλαιθέρας ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$)

5% Na_2CO_3 , 1N HCl , Na_2SO_4

Ογκομετρικός κύλινδρος (100mL) και (500mL), ογκομετρική φιάλη (1L), ποτήρι ζέσεως (250mL) και (500mL), σφαιρική φιάλη (250mL) και (500mL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (Heidolph Laborota 4000 efficiency), ψυγείο (2-4°C)

Για την κλασματοποίηση χρησιμοποιήθηκε διατροφική μαστίχα από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (Εικόνα 10).

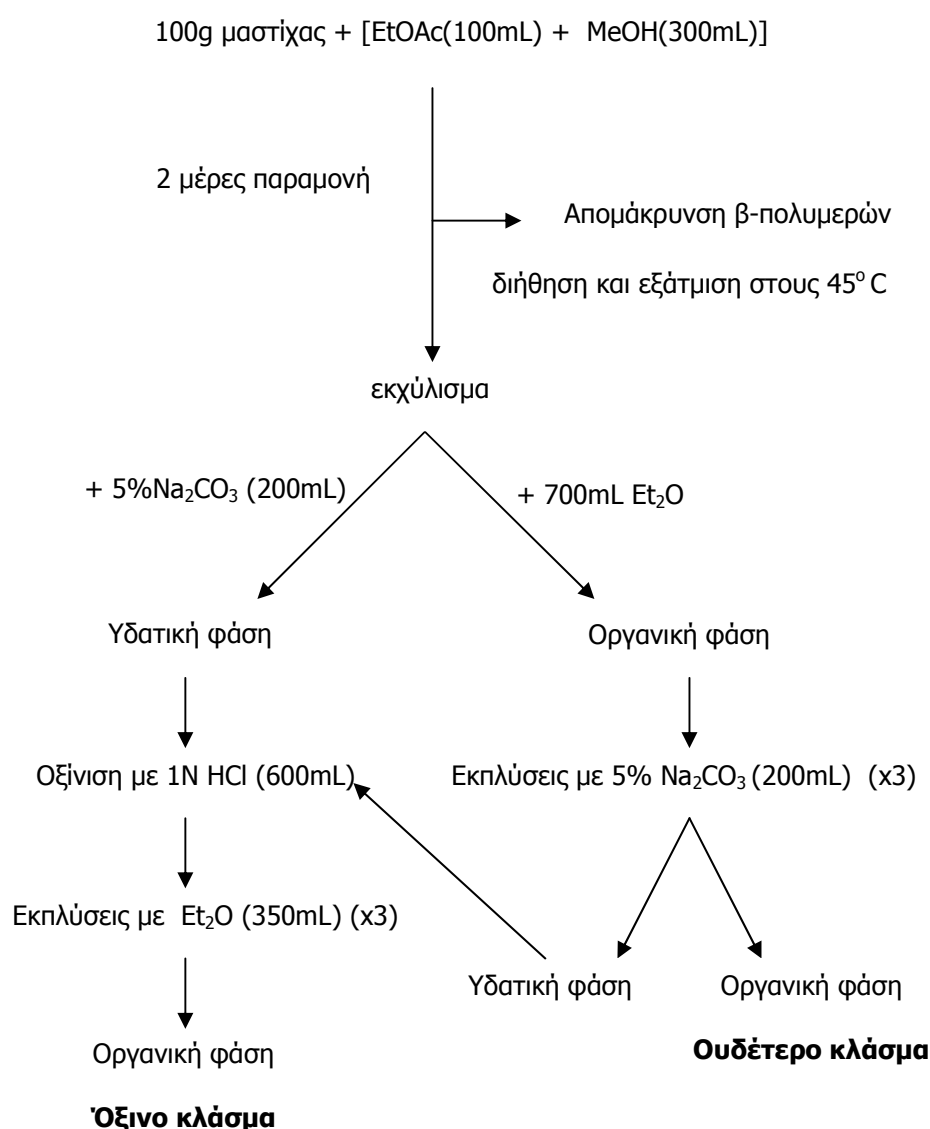


Εικόνα 10. Διατροφική μαστίχα

Αναλυτική πορεία:

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, συνολικά 100g ρητίνης διαχωρίζονται σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα (Paraschos et al, 2007). Συγκεκριμένα, στην παραπάνω ποσότητα μαστίχας προστίθενται 300mL μεθανόλης και 100mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για περίπου 15min. Μετά από παραμονή 48h σε ηρεμία, πραγματοποιείται διήθηση για

παραλαβή του υπερκείμενου εκχυλίσματος, ενώ το στερεό υπόλειμμα αυξημένης περιεκτικότητας σε β-πολυμερή απομακρύνεται. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση σε 200mL Na_2CO_3 5% και 700mL διαιθυλαιθέρα. Στην οργανική φάση επαναλαμβάνονται τρεις εκπλύσεις με 200mL Na_2CO_3 5%, εκ των οποίων οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 και εξατμίζονται μέχρι ξηρού. Η σκόνη που παραλαμβάνεται αποτελεί το ουδέτερο κλάσμα μαστίχας. Οι υδατικές φάσεις των παραπάνω εκπλύσεων προστίθενται σε αυτή του πρώτου διαχωρισμού. Ακολουθεί οξίνισή τους με 600mL HCl 1N και πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με 350mL διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 και εξατμίζονται μέχρι ξηρού. Η σκόνη που παραλαμβάνεται αποτελεί το όξινο κλάσμα μαστίχας. Όλα τα κλάσματα συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης.



Σχήμα 6. Κλασματοποίηση μαστίχας σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα. Όπου MeOH μεθανόλη, Et_2OAC οξικός αιθυλεστέρας και Et_2O διαιθυλαιθέρας (Paraschos et al, 2007).

6.2 Ποσοτική ανάλυση ολεανολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

Αντιδραστήρια και όργανα:

Αέριος χρωματογράφος Φασματόμετρο μάζας (GC-MS)

Αέριο ήλιο

Τριχοειδής στήλη HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0.25 mm x 250 μ).

Αρχή της μεθόδου:

Ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης ή το υλικό κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και τη ροή του φέροντος αερίου.

Αναλυτική πορεία:

Ποσότητα παραγωγοποιημένου δείγματος ίση με 1 μL εγχύεται στον αέριο χρωματογράφο σε λόγο σχάσης 1:20. Το δείγμα διαχωρίζεται με τη χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 MS (5% φαίνυλο- 95% μέθυλο σιλοξάνιο, 30 m x 0.25 mm x 250 μ). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο με ρυθμό έκχυσης 0.6 mL / min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς ρυθμίζεται στους 280 °C και 300°C αντίστοιχα. Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας του φούρνου ρυθμίζεται ως εξής:

Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου GC / MS

Αρχική	70 °C για 5 λεπτά
1^η άνοδος	15 °C / min μέχρι 130 °C
2^η άνοδος	4 °C / min μέχρι 160 °C
	160 °C για 15min
3^η άνοδος	10 °C / min μέχρι 300 °C
Τελική	300 °C για 15min

Για τον προσδιορισμό του ολεανολικού οξέος χρησιμοποιείται η μέθοδος selective ion monitoring (SIM) GC / MS. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην παρουσία ιόντων για το συστατικό σε χρόνο κατακράτησης ± 0.05 του χρόνου κατακράτησης του αντίστοιχου προτύπου. Το ιόν στο οποίο βασίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός συμβολίζεται με T ενώ τα ιόντα που καταγράφονται για την επιβεβαίωση της παρουσίας του συστατικού στο δείγμα συμβολίζονται με Q1 και Q2. Τα ιόντα που παρακολουθούνται είναι τα 203, 320, 482. Η 3-(4- υδρόξυφαινυλ)-1- προπανόλη χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο στο χαρακτηριστικό ιόν m/ Z 206 και τα προσδιοριστικά 191 και 179. Η ένωση αυτή δεν περιέχεται στα υπό ανάλυση δείγματα και η κορυφή της είναι ευδιάκριτη και ικανή να διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά.

6.3 Τα πειραματόζωα

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιούνται 50 υγιείς, ενήλικες (3 μηνών), άρρενες επίμυες τύπου Wistar (Εικόνα 11) που προέρχονται από εγκεκριμένη μονάδα παροχής πειραματοζώων. Έχουν ώριμο πεπτικό σύστημα και σύνθετες μικροβιακό φορτίο. Οι επίμυες διαβιούν σε ανοξείδωτα κελιά υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50%) διατηρώντας κύκλο φωτός-σκότους 12:12 ώρες. Η συνήθης διατροφή τους (ΣΔ) είναι τυποποιημένη τροφή εργαστηρίου με συγκεκριμένη σύσταση μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών (Vergerio Mangimi srl, Italy). Η πρόσβαση σε τροφή και νερό είναι ελεύθερη.



Εικόνα 11. Επίμυς τύπου Wistar.

6.4 Πειραματικό ζωικό μοντέλο νόσου Crohn

Αντιδραστήρια-όργανα:

Κεταμίνη, ξυλαζίνη, τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS), φυσιολογικός ορός, αιθανόλη 50% σε φυσιολογικό ορρό

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

Ποτήρι ζέσεως (250mL), ογκομετρικός κύλινδρος (100mL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτική πορεία:

Την ημέρα 0, δηλαδή την ημέρα έναρξης των πειραμάτων, καταγράφεται το σωματικό βάρος (ΣΒ) όλων των ζώων. Οι επίμυες χωρίζονται με τυχαιοποιημένο τρόπο σε 10 ομάδες (10x5), από τις οποίες η ομάδα Α αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες και η ομάδα Β το πειραματικό ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn. Ακολούθως, πραγματοποιείται ελαφρά αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης-ξυλαζίνης (80mg/Kg ΣΒ και 16mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Έπειτα, το ζωικό μοντέλο νόσου Crohn αναπτύσσεται με ενδοκολονική χορήγηση διαλύματος TNBS (100mg/Kg ΣΒ) σε 0.25mL 50% αιθανόλη. Συγκεκριμένα, οι επίμυες ακινητοποιούνται και η παραπάνω ουσία δίνεται με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Τα 2/3 του όγκου εγχέονται κατά την είσοδο του φλεβοκαθετήρα στο κόλον και το 1/3 κατά την έξοδο. Οι επίμυες διατηρούνται σε κατακόρυφη θέση για 2min για την αποφυγή διαρροής.

6.5 Δοκιμή με μαστίχα ή συστατικά αυτής

Αντιδραστήρια-όργανα

Σκόνη μαστίχας (60% ρητίνη, 40% ινουλίνη), όξινο και ουδέτερο κλάσμα, ολεανολικό οξύ, ινουλίνη

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

Πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης, eppendorfs (1.5mL)

Ποτήρι ζέσεως (250mL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Νερό βρύσης

Αναλυτική πορεία:

Η χορήγηση της σκόνης μαστίχας, του ουδέτερου και του όξινου κλάσματος, του ολεανολικού οξέος και της ινουλίνης πραγματοποιείται μία φορά ημερησίως στις ομάδες Γ-I βάσει του ΣΒ κάθε ζώου. Η χορήγησή τους ξεκινάει 24h από την επαγωγή της νόσου (ημέρα 1) και γίνεται με γαστρο-οισοφαγική διασωλήνωση. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ακινητοποίηση του επίμυ. Στη συνέχεια, ο καθετήρας τοποθετείται στον οισοφάγο και οι ουσίες προς εξέταση δίνονται με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Ειδικότερα, γίνονται 3 εκπλύσεις (3x1.5mL) μέχρι την απομάκρυνση όλου του προϊόντος από τον καθετήρα.

Πίνακας 2. Ομάδες επιμυών και δόση για κάθε συστατικό

Ομάδες	Χημική κολίτιδα	Σκόνη μαστίχας	Ινουλίνη	Όξινο κλάσμα	Ουδέτερο κλάσμα	Ολεανολικό οξύ
A	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-
Γ	+	100mg/Kg ΣΒ	-	-	-	-
Δ	+	-	40mg/Kg ΣΒ	-	-	-
E	+	-	-	24mg/Kg ΣΒ	-	-
Στ	+	-	-	48mg/Kg ΣΒ	-	-
Z	+	-	-	-	24mg/Kg ΣΒ	-
H	+	-	-	-	48mg/Kg ΣΒ	-
Θ	+	-	-	-	-	7mg/Kg ΣΒ
I	+	-	-	-	-	14mg/Kg ΣΒ

6.6 Αναισθησία-ευθανασία

Αντιδραστήρια-όργανα:

Κεταμίνη, ξυλαζίνη, δολεθάλη, φυσιολογικός ορός, υγρό άζωτο (-196°C), 10% φορμαλίνη σε φυσιολογικό ορό

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

Eppendorfs (1.5mL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R), υπερκατάψυξη (-80°C)

Αναλυτική πορεία:

Την τελευταία μέρα των πειραμάτων (ημέρα 5) γίνεται καταγραφή του ΣΒ όλων των ζώων και ακολουθεί αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης-ξυλαζίνης (100mg/Kg ΣΒ και 20mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Ακολούθως, πραγματοποιείται τομή στην περιτοναϊκή κοιλότητα και αφαιρούνται 6cm του παχέος εντέρου με αφετηρία τον πρωκτό. Μετά από διάνοιξη του αυλού για απομάκρυνση των κοπράνων με βαμβακοφόρο στείλεό, πραγματοποιείται κατά μήκος διαχωρισμός του εντέρου σε δύο τμήματα. Το ένα τμήμα φυλάσσεται σε υγρό άζωτο (-196°C) για την μέτρηση των κυτταροκινών, ενώ το άλλο σε φορμαλίνη (10%) για μικροσκοπική εξέταση. Λαμβάνεται αίμα απευθείας από τη δεξιά κοιλία της καρδιάς, το οποίο μετά από 20min σε ηρεμία, φυγοκεντράται στις 3000rcf για 10min. Ο ορός κάθε επίμυ φυλάσσεται σε υπερκατάψυξη (-80°C). Ακολουθεί ευθανασία χορηγώντας δολεθάλη απευθείας στη δεξιά κοιλία της καρδιάς (0.6mg/Kg ΣΒ). Στο τέλος όλων των ευθανασιών, τα δείγματα ιστών, εκτός εκείνων προς ιστοπαθολογική ανάλυση, φυλάσσονται σε υπερκατάψυξη (-80°C).

6.7 Ομογενοποίηση των ιστών

Αντιδραστήρια-όργανα:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 20mM και PH 7.4, 0.5M βουτυλο-υδροξυ τολουόλιο (BHT) σε ακετονιτρίλιο, φυσιολογικός ορός

Κωνικές φιάλες (50mL) και (100mL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου (5mL) με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, eppendorfs των 1.5mL, αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL και 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ομογενοποιητής (ULTRA-TURAX, IKA-Labortechnik), vortex, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)

Απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία:

Οι ιστοί ζυγίζονται σε ζυγό ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, πλένονται με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με PBS (1mL/2g ιστού) και BHT (10μL/mL ομογενοποιημένου ιστού). Το BHT χρησιμοποιείται για αναστολή της αυτοοξειδωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, που πραγματοποιείται σε ομογενοποιητή και διαρκεί περίπου 0,5min. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντρωση (3000rcf; 4°C) για 15min ώστε να παραληφθεί το εκχύλισμα ιστών.

6.8 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford

Αντιδραστήρια-όργανα:

Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)

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

Κυψελίδες (1.5mL), eppendorfs (1.5mL), αυτόματες πιπέτες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL)

Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, vortex

Απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

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

Αναλυτική πορεία:

Δείγματα ιστού: Τα ομογενοποιημένα εκχυλίσματα ιστών αραιώνονται σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Ακολούθως, σε κατάλληλο όγκο από κάθε δείγμα προστίθενται 500μL αντιδραστηρίου Bradford και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000μL. Τα δείγματα αναδεύονται ήπια σε vortex και παραμένουν σε ηρεμία για 5min μέχρι τη φωτομέτρησή τους (595nm).

Καμπύλη αναφοράς: Σε πρώτο στάδιο προετοιμάζονται τουλάχιστον πέντε διαφορετικά διαλύματα BSA συγκέντρωσης 1 έως 10μg/mL. Στην ίδια κυψελίδα προστίθενται 500μL αντιδραστηρίου Bradford και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000μL. Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε vortex και παραμονή 5min σε κατάσταση ηρεμίας. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm και η προκύπτουσα γραμμική ευθεία αποδίδει εξίσωση τύπου $y = ax + \beta$ ($R^2 \approx 1$). Το «y» αντιπροσωπεύει την τιμή απορρόφησης και το «x» τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης εκφραζόμενης σε μg/mL.

6.9 Μέτρηση των επιπέδων TNF-α σε ιστό και ορό

Αντιδραστήρια-όργανα:

Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)

Εξειδικευμένα Elisa Kit για TNF-α

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

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4

Απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

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

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα του TNF-α στα δείγματα ιστού μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζεται το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100μL μονοκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο επώάζεται για 12h. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (3x400μL). Παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο προστίθενται 100μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Για τα δείγματα ιστού πραγματοποιείται αραιώση 1/4, ενώ για τα δείγματα ορού καμία. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 3 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Επώάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς.

6.10 Μέτρηση των επιπέδων ICAM-1 σε ιστό και ορό αίματος

Αντιδραστήρια-όργανα:

Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)

Εξειδικευμένα Elisa Kit για ICAM-1

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

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4

Απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Το ICAM-1 προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα (Capture antibody) και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής (Detection antibody) του προσδεμένου ICAM-1 στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα του ICAM-1 στα δείγματα ιστού και ορού μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζεται το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100μL μονοκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο επωάζεται για 12h. Έπειτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (3x400μL). Παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standards, τα controls και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο προστίθενται 100μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Για τα δείγματα ιστού πραγματοποιείται αραίωση 1/80, ενώ για τα δείγματα ορού 1/40. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 3 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-

HRP και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς.

6.11 Στατιστική επεξεργασία

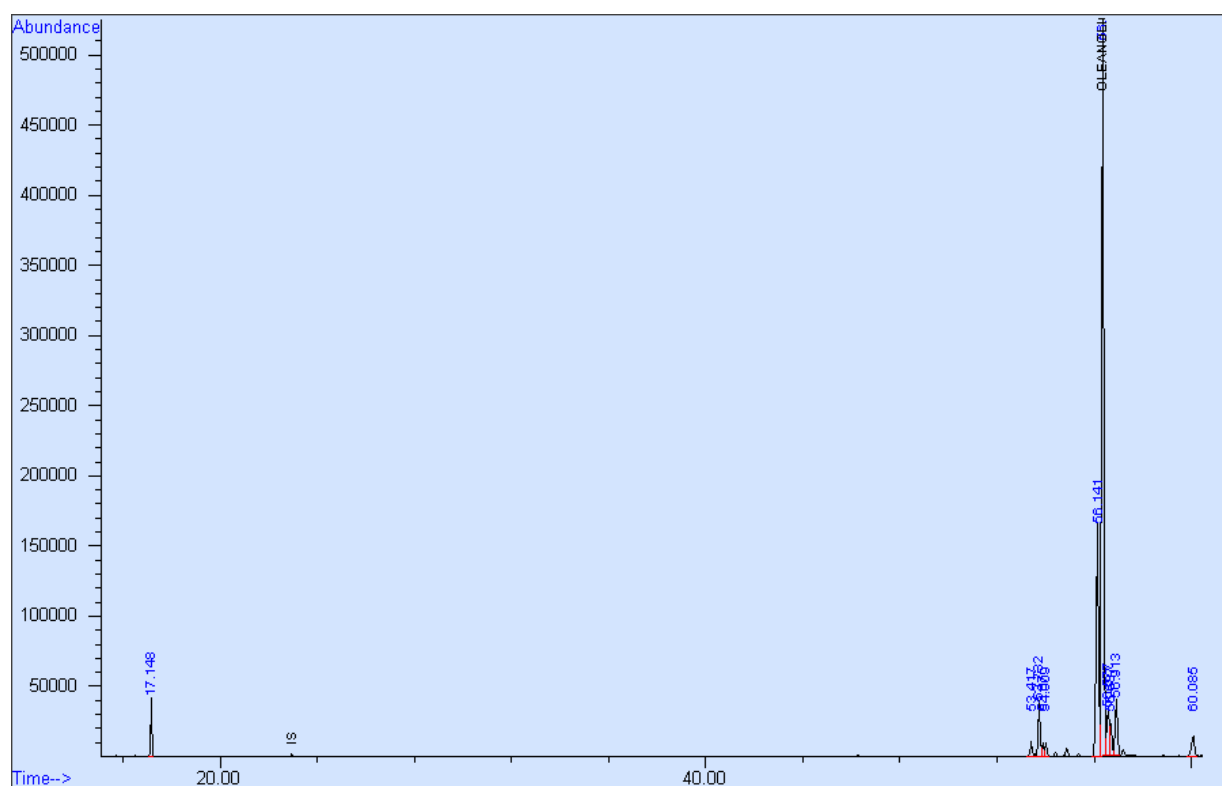
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS 13.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Η εξέταση της κανονικότητας της κατανομής γίνεται με το Kolmogorov- Smirnov test. Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη γίνονται με το Bonferroni test. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται η τιμή $p < 0.05$.

ΜΕΡΟΣ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Ποσοτικοποίηση ολεανολικού οξέος

Σύμφωνα με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) λαμβάνεται το παρακάτω χρωματογράφημα. Το ολεανολικό οξύ εκλύεται σε χρόνο 56.141sec και αποτελεί το 30% του όξινου κλάσματος.



Σχήμα 7. Χρωματογράφημα

7.2 Δοκιμή σε ζωικό μοντέλο της νόσου Crohn

Την ημέρα 2 καταγράφεται ο θάνατος ενός επίμυ στην ομάδα Β. Μετά την επαγωγή της χημικής κολίτιδας, την ημέρα 1 και καθώς περνούν οι ημέρες τα κόπρανα των πειραματόζωων εμφανίζονται όλο και περισσότερο υδαρή. Μόνο στις ομάδες Θ και Ι φαίνεται τα κόπρανά τους να είναι πιο σκληρά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τις ημέρες 2 και 3 το τρίχωμά τους φαίνεται ανασηκωμένο και οι επίμυες συγκεντρώνονται στις γωνίες των κλουβιών, ενδείξεις πόνου στα

πειραματόζωα. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική αλλαγή στο σωματικό βάρος τους από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 5 της ευθανασίας.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των TNF- α και ICAM-1 στον ιστό και τον ορό των πειραματόζωων.

ΟΜΑΔΑ Α: υγιή

ΟΜΑΔΑ Β: χημική κολίτιδα

ΟΜΑΔΑ Γ: χημική κολίτιδα+ 100mg/Kg ΣΒ μίγμ. σκόνης μαστίχας-ινουλίνης (6:4)

ΟΜΑΔΑ Δ: χημική κολίτιδα+ ινουλίνη 40mg/Kg ΣΒ

ΟΜΑΔΑ Ε: χημική κολίτιδα+ όξινο κλάσμα 24mg/Kg ΣΒ

ΟΜΑΔΑ Στ: χημική κολίτιδα+ όξινο κλάσμα 48mg/Kg ΣΒ

ΟΜΑΔΑ Ζ: χημική κολίτιδα+ ουδέτερο κλάσμα 24mg/Kg ΣΒ

ΟΜΑΔΑ Η: χημική κολίτιδα+ ουδέτερο κλάσμα 48mg/Kg ΣΒ

ΟΜΑΔΑ Θ: χημική κολίτιδα+ ολεανολικό οξύ 7mg/Kg ΣΒ

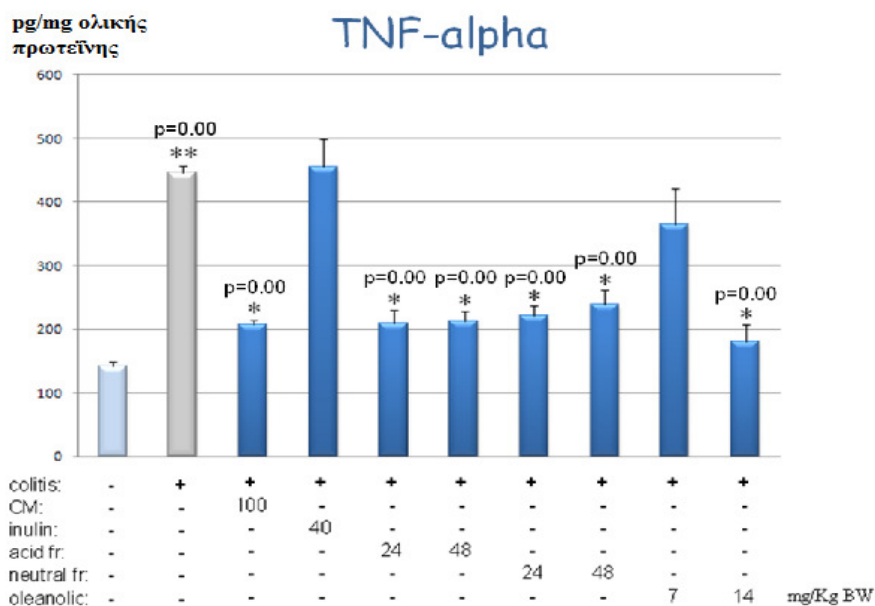
ΟΜΑΔΑ Ι: χημική κολίτιδα+ ολεανολικό οξύ 14mg/Kg ΣΒ

Πίνακας 3. Επίπεδα TNF- α και ICAM-1 στον ιστό.

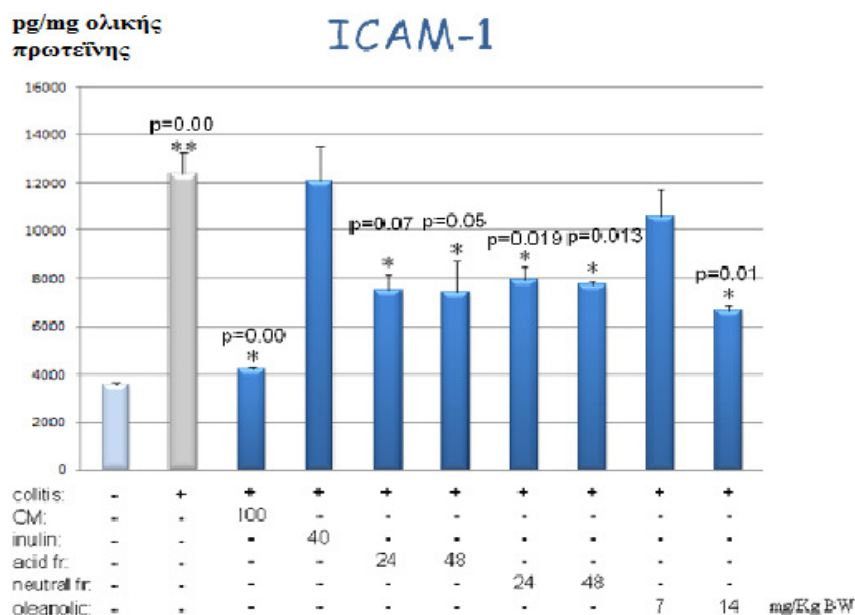
(pg/mg)	A	B	Γ	Δ	Ε	Στ	Ζ	Η	Θ	Ι
TNF- α	141.32	445.48	206.41	453.92	208.46	212.26	221.24	239.40	364.80	181.06
ICAM-1	3551	12367	4222	12078	7515	7406	7908	7762	10621	6670

Τόσο για τον TNF- α όσο και για το ICAM-1 διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Β (**). Η αύξηση των επιπέδων τους μεταξύ των υγιών ζώων και των ζώων που χορηγήθηκε TNBS καταμαρτυρεί την επιτυχή δημιουργία του ζωικού μοντέλου. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα των TNF- α και ICAM-1 στις ομάδες Γ, Ε, Στ, Ζ, Η, Ι (*) στις οποίες χορηγήθηκαν μαστίχα ή συστατικά αυτής σε σύγκριση με την ομάδα Β της χημικής κολίτιδας. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε

μεταξύ της ομάδας Β και Δ στα επίπεδα TNF-α ή ICAM-1 στον εντερικό ιστό στην οποία και χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη.



Σχήμα 8. Επίπεδα του TNF-α στον ιστό. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Β (**) και ανάμεσα στις ομάδες Β και Γ, Ε, Στ, Ζ, Η, Ι (*).



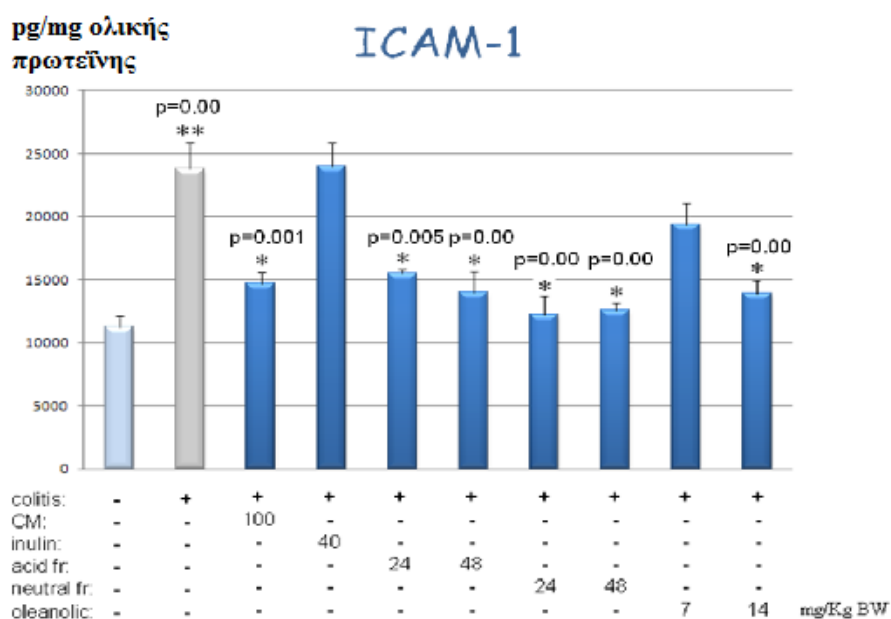
Σχήμα 9. Επίπεδα του ICAM-1 στον ιστό. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες Α και Β (**) και ανάμεσα στις ομάδες Β και Γ, Ε, Στ, Ζ, Η, Ι (*).

Πίνακας 4. Επίπεδα ICAM-1 στον ορό.

	A	B	Γ	Δ	E	Στ	Z	H	Θ	I
ICAM-1 (pg/mg)	11272	23792	14664	23946	15454	14014	12247	12566	19373	13901

Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα ICAM-1 του ορού μεταξύ των ομάδων A (υγιή ζώα) και B (χημική κολίτιδα) (**). Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα ICAM-1 του ορού στις ομάδες Γ, E, Στ, Z, H, I (*) στις οποίες χορηγήθηκαν μαστίχα ή συστατικά αυτής σε σύγκριση με την ομάδα B της χημικής κολίτιδας. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας B και Δ στην οποία και χορηγήθηκε αποκλειστικά ινουλίνη.

Ο TNF-α δεν ανιχνεύτηκε στον ορό των πειραματόζωων.



Σχήμα 10. Επίπεδα ICAM-1 στον ορό των πειραματόζωων. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες A και B (**) και ανάμεσα στις ομάδες B και Γ, E, Στ, Z, H, I (*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου περιλαμβάνει τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Η παθογένειά της και οι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνισή της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, ωστόσο φαίνεται ότι η ΙΦΝΕ είναι αποτέλεσμα μιας ανεξέλεγκτης ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού στον εντερικό βλεννογόνο (Neuman et al, 2007). Έχει αποδειχθεί ότι η διαταραχή της σύνθεσης, της παραγωγής ή της βιολογικής δράσης των κυτταροκινών που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη μετάδοση ρυθμιστικών μηνυμάτων μεταξύ διαφόρων κυτταρικών τύπων, συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου Crohn. Το διακυτταρικό αυτό σύστημα, που περιγράφεται ως δίκτυο διακυτταρικής επικοινωνίας, αποτελείται από πολλαπλές προφλεγμονώδεις και ανασταλτικές κυτταροκίνες και συμμετέχει στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Αρκετές από τις κυτταροκίνες χρησιμοποιούνται σήμερα ως θεραπευτικά μέσα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Abbas and Lichtman, 2003).

Καθώς η ΙΦΝΕ αποτελεί μια διαταραχή μεταξύ προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων (Bouma and Strober, 2003), η αντιφλεγμονώδης δράση της μαστίχας σε σχέση με την ΙΦΝΕ αποτελεί αντικείμενο μελετών. Η μαστίχα αποτελεί τη ρητινώδη έκκριση του μαστιχόδενδρου. Περιέχει τερπένια και πολυφαινόλες, συστατικά που της προσδίδουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Η μαστίχα φαίνεται να βελτιώνει την κλινική κατάσταση ασθενών με νόσο του Crohn σε πιλοτική μελέτη (Kaliora et al, 2007a και 2007b). Στο παρόν πείραμα χορηγείται σε ομάδες επιμυών με χημική κολίτιδα μαστίχα (60% μαστίχα και 40% ινουλίνη), ινουλίνη, όξινο κλάσμα μαστίχας που είναι πλούσιο σε τριτερπένια μεγάλου μοριακού βάρους, ουδέτερο κλάσμα μαστίχας που είναι πλούσιο σε τριτερπένια, μονοτερπένια και πολυφαινόλες χαμηλού μοριακού βάρους και, τέλος, ολεανολικό οξύ που είναι ένα τριτερπένιο της μαστίχας. Η κατάσταση της υγείας των επιμυών αξιολογείται με τη μέτρηση των επιπέδων TNF-α και ICAM-1 στον ιστό του εντέρου και στον ορό. Σε προηγούμενο πείραμα όταν σε ομάδες επιμυών με χημική κολίτιδα χορηγήθηκε μαστίχα σε δόσεις 50mg/Kg ΣΒ, 100mg/Kg ΣΒ, 200mg/Kg ΣΒ, 300mg/Kg ΣΒ, αλλά και κορτιζόνη, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα τα επίπεδα του TNF-α στον ιστό των πειραματόζων στην ομάδα που χορηγήθηκε μαστίχα (100mg/Kg ΣΒ) σε σχέση με την ομάδα ασθενών ($p<0.05$). Δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην ομάδα που χορηγήθηκε θεραπευτικά κορτιζόνη. Τα επίπεδα του ICAM-1 ήταν και αυτά στατιστικά σημαντικά μειωμένα στην ομάδα που χορηγήθηκε μαστίχα (50mg/Kg ΣΒ και 100mg/Kg ΣΒ), όπως και στην ομάδα που χορηγήθηκε κορτιζόνη σε σχέση με την ομάδα ασθενών ($p<0.05$). Αφού και στους δύο δείκτες

διαπιστώθηκε προηγούμενα στατιστικά σημαντική μείωση μετά τη χορήγηση 100mg/Kg ΣΒ μαστίχας, χρησιμοποιείται στο παρόν πείραμα η ίδια δόση μαστίχας. Άλλωστε, και τα κλάσματα που χορηγήθηκαν ήταν αντίστοιχα με αυτά που περιέχονται στη χρησιμοποιούμενη δόση μαστίχας, ενώ για λόγους ακρίβειας στο όξινο κλάσμα ποσοτικοποιήθηκε η περιεχόμενη ποσότητα ολεανολικού οξέος χρωματογραφικά και ακολούθως χορηγήθηκε στα ζώα σε συγκέντρωση αντίστοιχη με αυτή στη χρησιμοποιούμενη δόση μαστίχας.

Λόγω της πολυπλοκότητας του δικτύου των κυτταροκινών απαιτείται συχνά πολυπαραμετρική προσέγγιση για τη μελέτη της νόσου Crohn, αφού η δράση κάθε κυτταροκίνης επηρεάζεται από την παρουσία άλλων κυτταροκινών που συνυπάρχουν στο περιβάλλον. Οι μέθοδοι sandwich-ELISA που εφαρμόστηκαν και στην παρούσα μελέτη είναι ευαίσθητες ενζυμικές ανοσομέθοδοι, που ανιχνεύουν με ειδικό τρόπο και προσδιορίζουν ποσοτικά τη συγκέντρωση διαλυτών πρωτεϊνών, κυτταροκινών και χημειοκινών. Καθώς απαιτούν τη χρήση αντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι δύο ή περισσότερων διαφορετικών επιτόπων, είναι εξαιρετικά ειδικές και μπορούν να διακρίνουν κυτταροκίνες με αλληλεπικαλυπτόμενες βιολογικές δράσεις. Η μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών μπορεί να γίνεται σε δείγματα ορού, πλάσματος, βιολογικού υγρού. Οι κυτταροκίνες ασκούν τη βιολογική τους δράση σε πολύ μικρή συγκέντρωση στο πλάσμα και στον ορό (picomols), ο δε χρόνος βιολογικής ημίσειας ζωής τους είναι μικρός. Η σύνθεσή τους αρχίζει μόλις λίγες ώρες μετά την ενεργοποίηση των αντίστοιχων κυτταρικών πληθυσμών, γρήγορα όμως συνδέονται με υποδοχείς κυττάρων ή πρωτεΐνες του πλάσματος, ακολουθεί πρωτεολυτική αποδόμηση και κάθαρση μέσω των νεφρών.

Ανάμεσα σε αυτές, ο TNF-α είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που παράγεται από τα μονοκύτταρα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα και διεγείρει την παραγωγή άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης από τον NF-κΒ (McPhee, 2006b). Ακόμη, συμβάλλει στην έναρξη κυτταροτοξικών και αποπτωτικών διεργασιών και απάντησης οξείας φάσης (Neuman, 2007). Τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα τόσο στις προσβεβλημένες όσο και στις μη προσβεβλημένες περιοχές του εντέρου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ, όταν συγκρίνονται με υγιείς μάρτυρες (Leon et al, 2009). Ο σημαντικός ρόλος του στην ΙΦΝΕ φαίνεται και από τη βελτίωση της κατάστασης των ασθενών κατά τη χορήγηση αντι-TNF-α παράγοντα (ινφλιξιμάμπη) (Büning and Lochs, 2006). Στο παρόν πείραμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ της ομάδας των υγιών και της ομάδας των ασθενών, των οποίων τα επίπεδα του TNF-α στον ιστό είναι αυξημένα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την επιτυχία επαγωγής χημικής κολίτιδας μέσω του TNBS. Μετά τη χορήγηση των

διαφόρων συστατικών, τα επίπεδα του TNF- α στον ιστό είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) μειωμένα στις ομάδες της μαστίχας, του όξινου και του ουδέτερου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ και 48 mg/Kg ΣΒ) και του ολεανολικού οξέος (14mg/Kg ΣΒ). Το γεγονός της μείωσης του TNF- α είναι πολύ σημαντικό, καθώς στην ΙΦΝΕ η συγκεκριμένη κυτταροκίνη είναι αυξημένη και προκαλεί διάσπαση του εντερικού επιθηλιακού φραγμού, επαγωγή της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και παραγωγή χημειοκινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ardizzone and Bianchi Porro, 2002). Ο TNF- α δεν ανιχνεύθηκε στον ορό των πειραματόζων με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, είτε γιατί ήταν σε συγκεντρώσεις κάτω των ορίων ανίχνευσης, είτε γιατί είχε αποδομηθεί.

Το διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (ICAM-1) παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνδέει τα T-λεμφοκύτταρα στην περιοχή της ιστικής βλάβης μέσω του LFA 1 (McPhee, 2006b). Τα επίπεδα του ICAM-1 είναι αυξημένα σε ασθενείς με ΙΦΝΕ και γίνονται ολοένα και περισσότερες προσπάθειες για τη δημιουργία βιολογικών φαρμάκων που θα αναστέλλουν την αυξημένη παραγωγή του (Nakamura et al, 2006). Η διαφορά που παρατηρείται ανάμεσα στις ομάδες των υγιών και των ασθενών πειραματόζων στα επίπεδα του ICAM-1 είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Οι ομάδες της μαστίχας, του όξινου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ), του ουδέτερου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ και 48 mg/Kg ΣΒ) και του ολεανολικού οξέος (14mg/Kg ΣΒ) εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές ICAM-1 στον ιστό ($p < 0,05$). Ωστόσο και για τη χαμηλότερη δόση του όξινου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ) παρατηρείται τάση. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από τις μετρήσεις στον ορό των πειραματόζων.

Η επίδραση της ινουλίνης στα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων ήταν στατιστικά μη σημαντική. Η ινουλίνη ανήκει στις φρουκτάνες που έχουν χαρακτηριστεί ως πρεβιοτικά και βρίσκεται σε αξιοσημείωτες ποσότητες σε ποικιλία φρούτων και λαχανικών. Τα επιστημονικά δεδομένα για την επίδρασή της στο ζωικό μοντέλο της ΙΦΝΕ είναι αρκετά και στο σύνολό τους καταδεικνύουν την ευεργετική δράση όταν αυτή χορηγείται σε μεγάλες ποσότητες (Leenen and Dieleman, 2007). Το 2009 οι Ito et al. έδειξαν ότι προηγούμενη χορήγηση φρουκτανών ανάλογων της ινουλίνης σε επίμυες στους οποίους ακολούθως χορηγήθηκε TNBS για την επαγωγή φλεγμονής είχε ως αποτέλεσμα την προφύλαξη από την επίδραση της ουσίας και την αναστολή της φλεγμονής. Η ποσότητα όμως που χορηγήθηκε για 7 ημέρες ήταν 60g/Kg, ενώ στην παρούσα εργασία η ποσότητα ήταν 40mg/Kg, πολύ μικρή για να εμφανίζει κάποια δράση.

Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πιλοτικής μελέτης των Kaliora και συν. το 2007, οι οποίοι παρατηρούν στατιστικά σημαντική

μείωση των CDAI, IL-6 και CRP στο πλάσμα ασθενών με ήπια έως μέτρια ενεργή νόσο του Crohn, που λάμβαναν κάψουλες μαστίχας για 4 εβδομάδες. Η ίδια ομάδα παρατηρεί στατιστικά σημαντική μείωση της έκκρισης TNF-α από τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών, που οφείλεται στην αντιφλεγμονώδη δράση της μαστίχας. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει και την αποτελεσματικότητα της προσομοίωσης του ζωικού μοντέλου με επαγόμενη χημικά κολίτιδα σε σχέση με την νόσο του Crohn στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η μείωση των επιπέδων του TNF-α και ICAM-1 στον ιστό των επιμυών τόσο υπό την επίδραση της μαστίχας όσο και υπό την επίδραση των κλασμάτων της δείχνει πως το σύνολο των επιμέρους συστατικών της μαστίχας συμβάλλει στην αντιφλεγμονώδη δράση της μαστίχας. Εφόσον κανένα από τα κλάσματα δε φαίνεται να ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση μεμονωμένα, από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν μπορεί παρά να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η δράση των συστατικών της μαστίχας είναι αποτέλεσμα συνέργειας για την περίπτωση του ICAM-1, ενώ για τον TNF-α δεν παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά .

Σε άλλες μελέτες φαίνεται η συνεργιστική δράση των συστατικών διαφόρων φυσικών προϊόντων. Οι Kametani και συν. το 2007 μελέτησαν την επίδραση δέκα διαφορετικών ενώσεων εκχυλίσματος αλόης (cape aloe) στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων Ehrlich. Οι ερευνητές παρατηρούν ότι η ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων δεν οφείλεται σε μία ένωση μεμονωμένα, αλλά στη συνεργιστική δράση περισσότερων ενώσεων.

Η χρήση φυσικών παραγόντων της διατροφής, όπως τα (ω-3) PUFA και οι πολυφαινόλες που εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα είναι αντικείμενο πολλών μελετών (Gil, 2002; Camuesco et al, 2004; Camacho-Barquero et al, 2007). Οι Minich et al (2007) έδειξαν την ασφαλή και αποτελεσματική αντιφλεγμονώδη δράση του μίγματος φυτοχημικών NG440 αποτελούμενο από εκχύλισμα δενδρολίβανου και λυκίσκου και ολεανολικό οξύ σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα. Οι ερευνητές κατέδειξαν ως αιτιολογικό μηχανισμό τη μείωση των επιπέδων κυτταροκινών και του σχηματισμού της προσταγλανδίνης E2. Η προσπάθεια για την ταυτοποίηση και την επιστημονική απόδειξη της δράσης φυσικών παραγόντων έχει εντατικοποιηθεί καθώς πολλά από τα θεραπευτικά σχήματα που εφαρμόζονται σε φλεγμονώδεις παθήσεις έχουν σοβαρές παρενέργειες. Στη μελέτη των Minich et al το μίγμα δεν εμφάνισε τις παρενέργειες που παρατηρούνται στο καρδιαγγειακό και πεπτικό σύστημα με την εφαρμογή αναστολέων της κυκλοξυγονάσης 2 και οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το μίγμα θα μπορούσε να εφαρμόζεται θεραπευτικά εναλλακτικά των αναστολέων κυκλοξυγονάσης 2. Στη νόσο Crohn τα ισχυρά ανοσοκατασταλτικά που χορηγούνται μειώνουν την άμυνα του

οργανισμού στις λοιμώξεις (π.χ. φυματίωση), ενώ μπορεί να έχουν σοβαρές παρενέργειες και από το νευρικό σύστημα. Περαιτέρω μελέτες για τις ευεργετικές ιδιότητες της μαστίχας Χίου στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου ίσως καλύψουν τα επιστημονικά κενά και παρέχουν την ολοκληρωμένη επιστημονική απόδειξη της συμβολής αυτού του φυσικού προϊόντος στη προφύλαξη ή και στη θεραπεία της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas A, Lichtman A. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology, (5th) Saunders 2003; 243-274
- Aksoy A, Duran N, Koksall F. In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and *mutans streptococci*. Arch Oral Biol. 2006 Jun;51(6):476-81.
- Andrikopoulos N.K., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N., et al. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. Phytother Res, 2003; 17(5): 501-07.
- Ardizzone S. and Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. Journal of Internal Medicine 2002; 252: 475–496
- Baert F.J. and Rutgeerts P.R. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. Int J Colorectal Dis, 1999; 14: 47-51.
- Bailey H.H., Attia S., Love R.R., et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. Chemother Pharmacol, 2008; 62: 149-57.
- Balan K.V., Prince J., Han Z., et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. Phytomedicine, 2007; 14: 263-72.
- Balan K.V., Demetzos C., Prince J., et al. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. In Vivo, 2005; 19: 93-102.
- Barthelman M., Chen W., Gensler H.L., et al. Inhibitory effects of perillyl alcohol on UVB-induced murine skin cancer and AP-1 transactivation. Cancer Res, 1998; 58: 711-16.
- Bebb J.R., Bailey-Flitter N., Ala'Aldeen D. and Atherton J.C. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 522-23.
- Bouma G. and Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol, 2003; 3: 521-33.
- Büning C. and Lochs H. Conventional therapy for Crohn's disease. World J Gastroenterol, 2006; 12:4794-806.

- Camacho-Barquero L, Villegas I, Sánchez-Calvo JM, Talero E, Sánchez-Fidalgo S, Motilva V, Alarcón de la Lastra C. Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol.* 2007 Mar;7(3):333-42.
- Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol.* 2004 Dec;143(7):908-18.
- Cecil. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Στο: Παθολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας 5η έκδοση, 2003: 420-25.
- Choi H.S., Song H.S., Ukeda H., et al. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem*, 2000; 48(9): 4156-61.
- Connolly J.D. and Hill R.A. Triterpenes. *Natural Prod Rep*, 2007; 24: 465-86.
- Dabos KJ, Sfika E, Vlatia LJ, Frantzi D, Amygdalos GI, Giannikopoulos G. Is Chios mastic gum effective in the treatment of functional dyspepsia? A prospective randomised double-blind placebo controlled trial. *J Ethnopharmacol.* 2010 Feb 3;127(2):205-9.
- Danese S., Sans M. and Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 2004; 3: 394-400.
- Dedoussis G.V., Kaliora A.C., Psarras S., et al. Antiatherogenic effect of Pistacia lentiscus via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 2004; 174: 293-303.
- Dimas K., Hatziantoniou S., Wyche J.H., et al. A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo.* 2009; 23: 63-8.
- Ding Y., Nguyen H.T., Kim S.I., et al. The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of Rhus sylvestris. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009; 19: 3607-10.

- D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca' R, Martines D, Ferronato A, Sturniolo GC. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Dec;36(12):1289-94..
- Elegbede J.A., Maltzman T.H., Elson C.E., et al. Effects of anticarcinogenic monoterpenes on phase II hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis*, 1993; 14: 1221-25.
- Furtado R.A., Rodrigues E.P., Araújo F.R., et al. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. *Toxicol Pathol*, 2008; 36: 576-80.
- Geier M.S., Butler R.N. and Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol*, 2007; 115: 1-11.
- Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother*. 2002 Oct;56(8):388-96
- Grassmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vit Horm*, 2005; 72: 505-35.
- Haag J.D. and Gould M.N. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994; 34: 477-83.
- Harrison. Εισαγωγή στο ανοσιακό σύστημα. Στο: Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 16^η έκδοση. Ελληνική έκδοση 2005.
- Hart AR., Luben R., Olsen A. et al. Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Digestion*. 2008;77(1):57-64.
- He M.L., Chen W.W., Zhang P.J., et al. Gum mastic increases maspin expression in prostate cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2007b; 28: 567-72.
- He M.L., Li A., Xu C.S., et al. Mechanisms of antiprostata cancer by gum mastic: NF-kappaB signal as target. *Acta Pharmacol Sin*, 2007a; 28: 446-52.
- He M.L., Yuan H.Q., Jiang A.L., et al. Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer*, 2006; 106: 2547-55.

- Head A.K. and Jurenka S.J. Inflammatory bowel disease Part II: Crohn's Disease-Pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2004, Volume 9, number 4.
- Head A.K. and Jurenka S.J. Inflammatory bowel disease Part I: ulcerative colitis-Pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003, Volume 8, number 3.
- Hendrickson B.A., Gokhale R. and Cho J.H. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol*, 2002; 15: 79-95.
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995 Feb 27;155(4):381-6.
- Jurjus A.R., Khoury N.N. and Reimund J-M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol*, 2004; 50: 81-92.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., et al. Alternations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol*, 2007b; 13: 6031-36.
- Kaliora A.C., Stathopoulou M.G., Triantafillidis J.K., et al. Chios mastic treatment of patients with active Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 2007a; 13: 748-53.
- Kaliora A.C., Mylona A., Chiou A., et al. Detection and identification of simple phenolis in *Pistacia lentiscus* resin. *Lig Chromatogr R T*, 2004; 27: 289-300.
- Kametani S, Kojima-Yuasa A, Kikuzaki H, Kennedy DO, Honzawa M, Matsui-Yuasa I. Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich ascites tumor cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 May;71(5):1220-9.
- Karlinger K., Györke T., Makö E., et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 2000; 35: 154-67.
- Koutsoudaki C., Krsek M. and Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 7681-85.

- Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C.B., et al. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*, 2003; 201: 28-36.
- Leenen and Dieleman, Inulin and oligofructose in chronic inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2007, 137(11):2572S-2575S
- León AJ, Gómez E, Garrote JA, Bernardo D, Barrera A, Marcos JL, Fernández-Salazar L, Velayos B, Blanco-Quirós A, Arranz E. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:580450.
- Levy E., Rizwan Y., Thibault L., et al. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71: 807-15.
- Lochs H., Dejong C., Hammarqvist F., Hebutterne X., Leon-Sanz M., Schutz T., Van Gemert W., Van Gossum A., Valentini L., Lubke H., Bischoff S., Engelmann N., Thul P. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. *Clinical Nutrition* (2006) 25, 260–274
- Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2009 May;234(5):553-61.
- Loughlin M.F., Ala'Aldeen D.A. and Jenks P.J. Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51: 367-71.
- Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika V, Kolisis FN, Papapetropoulos A, Roussos C. Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutr Cancer*. 2006;55(1):86-93.
- Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Plant Med*, 1999; 65: 749-52.
- Main J., McKenzie H. and Yeaman G.R. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn disease. *BMJ*, 1988; 297: 1105-06.

- Maltzman T.H., Christou M., Gould M.N., et al. Effects of monoterpenoids on in vivo DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis*, 1991; 12: 2081-90.
- Marone P., Bono L., Leone E., et al. Bacterial activity of Pistacia lentiscus mastic gum against *Helicobacter pylori*. *J Chemother*, 2001; 13: 611-14.
- Matos J.M., Schmidt C.M., Thomas H.J., et al. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *J Surg Res*, 2008; 147: 194-99.
- Mawdsley J.E., Rampton D.S. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation*, 2006; 13: 327-36.
- McPhee S., Μουτσόπουλος Χ. Φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου Στο: Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2006 a: 487-492.
- McPhee S., Μουτσόπουλος Χ. Ανοσολογία Στο: Παθολογική Φυσιολογία. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2006 b: 71-74.
- Mills J.J., Chari R.S., Boyer I.J., et al. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res*, 1995; 55: 979-83.
- Minich DM, Bland JS, Katke J, Darland G, Hall A, Lerman RH, Lamb J, Carroll B, Tripp M. Clinical safety and efficacy of NG440: a novel combination of rho iso-alpha acids from hops, rosemary, and oleanolic acid for inflammatory conditions. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007 Sep;85(9):872-83.
- Moulos P, Papadodima O, Chatziioannou A, Loutrari H, Roussos C, Kolisis FN. A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics*. 2009 Dec 15;2:68.
- Mutai C., Bii C., Vagias C., et al. Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol*, 2009; 123: 143-8.
- Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 7;12(29):4628-35.

- Neuman M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*, 2007; 149: 173-86.
- Orhlom M., Munkholm P., Langholz E., et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 1991; 324: 84-88.
- Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr*. 2008 Mar;138(3):562-6.
- Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K., et al. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr A*, 1997; 769: 263-73.
- Paraschos S., Magiatis P., Mitakou S., et al. In vitro and in vivo activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51: 551-59.
- Peek R.M. Jr. and Crabtree J.E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol*, 2006; 208: 233-48.
- Rajendran N, Kumar D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar 28;16(12):1442-8.
- Reddy B.S., Wang C.X., Samaha H., et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res*, 1997; 57: 420-25..
- Romani A., Pinelli P., Galardi C., et al. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochem Anal*, 2002; 13: 79-86.
- Sakamoto N., Kono S., Wakai K. et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Feb;11(2):154-63.
- Sanchez-Muñoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008 July 21; 14(27): 4280-4288.
- Saxon A., Shanahan F. and Landers C. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 86: 202-10.
- Schwarz K., Ernst H. and Ternes W. Evaluation of antioxidant constituents of thyme. *J Sci Food Agric*, 1996; 70:217–23.

- Senthil S., Sridevi M. and Pugalendi K.V. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol*, 2007; 35: 418-23.
- Simmonds N.J. and Rampton D.S. Inflammatory bowel disease-a radical view. *Gut* 1993, 1993; 34: 865-68.
- Somova L.O., Nadar A., Rammanan P., et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 2003;10:115-21.
- Stayrook K.R., McKinzie J.H., Burke Y.D., et al. Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 1655-58.
- Sterer N. Antimicrobial effect of mastic gum methanolic extract against *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Food*, 2006; 9: 290-92.
- Stratton S.P., Saboda K.L., Myrdal P.B., et al. Phase 1 study of topical perillyl alcohol cream for chemoprevention of skin cancer. *Nutr Cancer*, 2008; 60(3): 325-30.
- Strober W., Fuss I.J. and Blumberg R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 495-99.
- Tabopda T.K., Ngoupayo J., Khan Tanoli S.A., et al. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Med*, 2009; 75: 522-7.
- Topitsoglou-Themeli V., Dagalis P. and Lambrou D.A. Chios mastiche chewing gum and oral hygiene. I. The possibility of reducing or preventing microbial plaque formation. *Hell Stomatol Crohn*, 1984; 28: 166-70.
- Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergeantanis TN, Protopapa E and Tsaknis J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol*, 2007; 111: 43-9.
- Van Gossum A., Cabre E., Hebuterne X., Jeppesen P., Krznaric Z., Messing B., Powell-Tuck J., Staun M., Nightingale J. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Gastroenterology. *Clinical Nutrition* 28 (2009) 415–427.

Vitor C.E., Figueiredo C.P., Hara D.B., et al. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol.* 2009; 157: 1034-44.

Yamai H., Sawada N., Yoshida T., et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int J Cancer,* 2009; 125: 952-60.

Επίσημη ιστοσελίδα της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου (EMX) (www.gummastic.gr)

Ζαμπέλας Α. Διαταραχές του κατώτερου γαστρεντερικού συστήματος. Στο: Κλινική διαιτολογία και διατροφή με στοιχεία παθολογίας. Αθήνα Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2007: 640-645.

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