

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΟΜΟΤΙΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΖΑΜΠΕΛΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΔΡΙΑΝΑ ΚΑΛΙΩΡΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΒΑΪΟΣ ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΕΔΟΥΣΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΟΣΧΟΣ ΠΟΛΥΣΙΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΠΕΡΡΕΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του κ. Νικόλαου Ανδρικόπουλου, Ομότιμου Καθηγητή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Ανδρικόπουλο, για την πολύτιμη καθοδήγησή του και την ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφερε σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να δώσω στην κα Ανδριάννα Καλιώρα, Λέκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για το αμέριστο ενδιαφέρον, την υπομονετική διάθεσή της και την καθοριστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνη Ζαμπέλα, Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς και τον κ. Βάιο Καραθάνο, διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας-Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη του στη διεκπεραίωση της μελέτης μου.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στον κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για τη σημαντική βοήθεια και στήριξη της μελέτης μου, καθώς και στην κα Αντωνία Χίου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Η διεκπαιρέωση της μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή της φαρμακευτικής εταιρίας ΕΛΠΕΝ. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ τον Δρ. Απόστολο Παπαλόη, Διευθυντή του Ερευνητικού Κέντρου της ΕΛΠΕΝ, για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και εξοπλισμού, τη φιλοξενία των πειραματόζωων και την υλοποίηση μέρους του ερευνητικού πρωτοκόλλου. Επιπλέον, ευχαριστώ το προσωπικό της ΕΛΠΕΝ για το αμείωτο ενδιαφέρον τους και την προθυμία τους να βοηθήσουν σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε.

Για την αρμονική και αποτελεσματική συνεργασία ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου.

Τέλος, για την προμήθεια των δειγμάτων μαστίχας, αλλά και μεγάλου μέρους χρηματοδότησης των πειραμάτων ευχαριστώ την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (ΕΜΧ), ενώ τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χρηματοδότηση της μελέτης μου.

Στην οικογένειά μου.....

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACF	-	aberrant crypt foci
ALP	αλκαλική φωσφατάση	alkaline phosphatase
Ang2	αγγειοποιητίνη 2	angiopoietin 2
AOM	Αζοξομεθάνιο	azoxymethane
AP-1	μεταγραφικός παράγοντας-1	activated protein-1
ASCAS	αντισώματα κατά του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antibodies
BHT	βουτυλιωμενο-υδροξυ τολουόλιο	butylated hydroxytoluene
BSA	αλβουμίνη ορού μόσχου	bovine serum albumin
BSTFA	-	bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CDAI	δείκτης ενεργότητας της νόσου Crohn	Crohn's disease activity index
cDNA	συμπληρωματικό DNA	complementary DNA
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	C-reactive protein
DEN	διαιθλνιτροζαμίνη	diethylnitrosoamine
DMAPP	πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο	dimethylallyl pyrophosphate
DMBA	7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DMEM	-	Dublecco's modified eagle serum
DMH	1,2-διμεθυλδραζίνη	1,2-dimethylhydrazine
DMSO	διμέθυλοσουλφοξείδιο	dimethylsulfoxide
ELAM-1	ενδοθηλιακό συνδετικό μόριο λευκοκυττάρων-1	endothelial leukocyte adhesion molecule-1
FACS	ανάλυση κυτταρομετρίας ροής	fluorescence-activated cell sorting
FBS	ορός νεογνού μόσχου	fetal bovine serum
GC-MS	αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας	gas chromatography-mass spectrometry
GSH	γλουταθειόνη	glutathione
GO	οντολογική ανάλυση γονιδίων	gene ontology
γ-GT	γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση	γ-glutamyltransferase
HDL	λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας	high density lipoprotein
ICAM-1	διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1	intracellular adhesion molecule-1
IFN-γ	ιντερφερόνη-γ	interferon-gamma
IL-	ιντερλευκίνη-	interleukin-
IPP	πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο	isopentenyl pyrophosphate
ISO	ισοπροτερενόλη	isoproterenol
LDH	γαλακτική αφυδρογονάση	lactate dehydrogenase
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας	low density lipoprotein
LFA 1	-	lymphocyte function associated antigen-1
LLC cells	καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis	Lewis lung carcinoma cells
LPS	λιποπολυσακχαρίδιο	lipopolysaccharides
MDA	μαλοναλδεύδη	malonaldehyde
NF- κB	πυρηνικός παράγοντας-κΒ	nuclear factor kappa beta

NK	φονικά κύτταρα	natural killers
oxLDL	οξειδωμένη LDL	oxidized LDL
P-ANCAS	περιπυρηνικά αντι-ουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα	perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
PARP	-	poly ADP ribose polymerase
PBMC	μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος	peripheral blood mononuclear cells
PBS	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	phosphate-buffer saline
PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	polymerase chain reaction
PFTBA	υπερφθοροτριβουτυλαμίνη	perfluorotributylamine
PIP3	τριφωσφο (3,4,5)- φωσφατιδυλινσιτόλη	phosphatidylinositol tri-phosphate (3,4,5)
POH	περιλλυλ αλκοόλη	perillyl alcohol
ROS	ελεύθερες ρίζες οξυγόνου	reactive oxygen species
SGOT	γλουταμινική-οξαλοξική τρανσαμινάση ορού	serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	γλουταμινική-πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού	serum glutamic pyruvic transaminase
SOD	δισμουτάση του υπεροξειδίου	superoxide dismutase
TAP	ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος	total antioxidant potential
TBARS	αντιδρώντα στοιχεία στο θειοβαρβιτουρικό οξύ	thiobarbituric acid reactant substances
TGF-β	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β	transforming growing factor-beta
TMCS	τριμεθυλχλωροσιλάνιο	trimethylchlorosilane
TNBS	2,4,6-τρινιτροβενζοσουλφονικό οξύ	trinitrobenzene sulfonic acid
TNF-α	παράγοντας νέκρωσης όγκου-α	tumor necrosis factor-alpha
UDP-GT	διφωσφωγλυκορονοσυλ-τρανσφεράση ουριδίνης	uridine diphosphoglucuronosyl transferase
VCAM-1	αγγειακό συνδετικό μόριο-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας	vascular endothelial growth factor
VLA 4	-	very late antigen-4
EMX	Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου	-
Mo	μονοκύτταρα	monocytes
MΦ	μακροφάγα	macrophages
MXEΠ	μαστίχα Χίου ελεύθερη πολυμερών	-
ΣΒ	σωματικό βάρος	-

ΣΚΟΠΟΣ

1. Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της μαστίχας Χίου σε ζωικό πρότυπο χημικής κολίτιδας που μιμείται τη νόσο Crohn.
2. Η διευκρίνιση του δραστικού κλάσματος /συστατικού της μαστίχας Χίου στην αντιμετώπιση της φλεγμονής σε ζωικό πρότυπο που μιμείται τη νόσο Crohn.
3. Η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του δραστικού κλάσματος /συστατικού της μαστίχας Χίου σε κυτταρικό μοντέλο που μιμείται τη φλεγμονή σε εντερικό ιστό στη νόσο Crohn.
4. Η ανάδειξη της μαστίχας Χίου ως φυσικού προϊόντος με ευεργετικές δράσεις στη νόσο Crohn.

SCOPE

1. To investigate the antioxidant and anti-inflammatory effects of Chios mastic on experimental animal model that mimics Crohn's disease.
2. To investigate the bioactive fraction or component of Chios mastic in experimental animal model that mimics Crohn's disease.
3. To determine the underlying mechanism of action of Chios mastic or fraction or component in cell culture system that mimics inflammation in colon epithelial cells of patients with Crohn's disease.
4. To highlight Chios mastic as a natural product with beneficial effects in Crohn's disease

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανασκόπηση: Η μαστίχα Χίου, φυσική ρητίνη πλούσια σε τερπενοειδή, έχει αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική, αντινεοπλασματική και αντιμικροβιακή δράση. Σύμφωνα με πρόσφατη πιλοτική μελέτη, η πρόσληψή της βελτιώνει την κλινικο-εργαστηριακή εικόνα ασθενών με ενεργή νόσο Crohn. Ωστόσο, η δράση αυτή δεν έχει αποσαφηνιστεί και ο μηχανισμός δράσης παραμένει αδιευκρίνιστος.

Σκοπός: Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της μαστίχας Χίου σε: α) ζωικό πρότυπο που μιμείται τη νόσο Crohn και β) κυτταρικό μοντέλο φλεγμονής του παχέος εντέρου που μιμείται τη νόσο Crohn, με σκοπό τη διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης.

Μεθοδολογία: Σε μια σειρά πειραμάτων, η μαστίχα χορηγείται σε επίμυες τύπου Wistar στους οποίους έχει προηγηθεί ενδοκολονική έγχυση τρινιτροβενζολοσουλφονικού οξέος (TNBS). Το τελευταίο προκαλεί αλλοιώσεις στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου παρόμοιες με εκείνες της νόσου Crohn. Μετά το πέρας 24 ωρών από την έγχυση TNBS, η μαστίχα χορηγείται από του στόματος με τη βοήθεια καθετήρα ως εναιώρημα σε νερό. Οι επιδράσεις της εξετάζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρονικές περιόδους. Από τα αποτελέσματα καθορίζεται η βέλτιστη δόση και χρονική περίοδος της διατροφικής παρέμβασης. Σε επόμενη σειρά πειραμάτων πραγματοποιείται παρέμβαση στο ίδιο ζωικό πρότυπο και στις συνθήκες που καθορίστηκαν από την 1η σειρά πειραμάτων. Η διατροφική παρέμβαση περιλαμβάνει τη διατροφή των πειραματόζωων με μαστίχα ως έχει, καθώς και με τα κλάσματά της (όξινο, ουδέτερο) και με το ολεανολικό οξύ, το κύριο τριτερπένιο της μαστίχας. Η βλάβη του εντερικού επιθηλίου αξιολογείται μικροσκοπικά. Για την αξιολόγηση της φλεγμονής μετρώνται οι IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α και ICAM-1 στον ιστό και ορό, ενώ η συγκέντρωση της μαλοναλδεϋδης στον ιστό χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Ο μηχανισμός δράσης της μαστίχας διερευνάται σε μια 3η σειρά πειραμάτων, στην οποία πραγματοποιείται συγκαλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου ανθρώπου (HT29) και ενεργοποιημένων μακροφάγων. Η κυτταρική βλάβη στα HT29 κύτταρα εκτιμάται με την %απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης, ενώ η φλεγμονή με τη μέτρηση των επιπέδων της IL-8 και της ενεργοποίησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Η έκφραση των IL-8 και ICAM-1 μετράται τόσο στο εντερικό επιθήλιο των επίμυων όσο και στα HT29 κύτταρα.

Αποτελέσματα: Η χορήγηση μαστίχας σε δόση ίση προς 100mg /Kg σωματικού βάρους (ΣΒ) για 3 ημέρες βελτιώνει την ιστική βλάβη ($p<0.001$), μειώνει τα επίπεδα όλων των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον ιστό ($p<0.05$) και ελαχιστοποιεί την έκκριση μαλοναλδεϋδης ($p<0.001$). Η κλασματοποίηση, ωστόσο, του προϊόντος σε όξινο (πλούσιο σε τερπενικά οξέα) και σε ουδέτερο κλάσμα (πλούσιο σε τερπενικές αλκοόλες και αλδεϋδες) δεν επιφέρει τα ίδια θετικά αποτελέσματα. Όταν τα δύο κλάσματα χορηγούνται χωριστά σε δόσεις που εμπεριέχονται στα 100mg μαστίχας/Kg ΣΒ, μειώνουν μεν την έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ($p<0.05$) ακόμη και σε επίπεδο mRNA ($p<0.05$), ωστόσο δεν βελτιώνουν ούτε την ιστική βλάβη, ούτε την έκκριση της μαλοναλδεϋδης. Επίσης, το ολεανολικό οξύ δεν έχει καμία επίδραση στους TNBS-επίμυες. Συνεπώς,

η δράση της μαστίχας θα πρέπει να αποδίδεται σε δράση όλων των συστατικών της. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro* δείχνουν ότι τα ενεργοποιημένα μακροφάγα πυροδοτούν τη φλεγμονή και αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα ($p < 0.001$) στα HT29 κύτταρα αυξάνοντας την απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Επώαση των HT29 κυττάρων με μαστίχα αναστέλλει την κυτταροτοξικότητα ($p < 0.001$). Επιπλέον, μειώνονται τα επίπεδα και η έκφραση της IL-8 ($p < 0.001$), ενώ ταυτόχρονα απενεργοποιείται ο NF-κB ($p < 0.001$).

Συμπεράσματα: Η μαστίχα Χίου φαίνεται να έχει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες στην TNBS-κολίτιδα, με πιθανό μηχανισμό την απενεργοποίηση του NF-κB, μορίου κλειδί στην πυροδότηση της φλεγμονής. Η μαστίχα φαίνεται να ασκεί τις ευεργετικές της δράσεις όταν χορηγείται στη φυσική της μορφή, καθώς κανένα από τα κλάσματά της ή το ολεανολικό οξύ δεν βρέθηκε να δρα ευεργετικά από μόνο του. Συνεπώς, το μοναδικό αυτό προϊόν της Ελληνικής χλωρίδας θα μπορούσε στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της φλεγμονής, ωστόσο περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν προκειμένου να επιβεβαιώσουν τις ευεργετικές της δράσεις, αλλά και να διευκρινίσουν τα βιοδραστικά συστατικά της.

Abstract

Background: Chios mastic, a natural resin rich in terpenoids, possesses antioxidant, cardioprotective, anticancer and antimicrobial properties. A recent pilot study in patients with active Crohn's disease showed that mastic consumption ameliorated the disease activity index. However, this effect is not clear yet and the underlying mechanism of action has not been identified.

Purpose: The aim of the present study was to investigate mastic's antioxidant and anti-inflammatory effects: a) on animal experimental model that mimics Crohn's disease and b) on inflamed human colon epithelial cells that mimic inflammation in Crohn's disease, in order to determine the mechanism of action.

Methods: In the first series of experiments, Chios mastic was administered in Wistar rats previously treated with intracolonic infusion of TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid). TNBS induces damage in intestinal epithelium similar to that of Crohn's disease patients. After 24 hours of TNBS treatment, mastic was administered in the form of powder dispersed in water by oral gavage at different concentrations and time periods. The results determined the optimum mastic dose and time of intervention. In the next series of experiments the same animal model was used according to experimental conditions determined by the 1st series of experiments. Animals were administered with mastic, as well as with mastic's fractions (acidic, neutral) and oleanolic acid, the main triterpene of mastic. Colonic damage was assessed microscopically. Inflammation was estimated by measuring the levels of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and ICAM-1 in rat tissue and serum. Malonaldehyde concentration was used as a marker of oxidative stress. In order to determine the inflammation pathways that interfere with mastic, HT29 human colon epithelial cells were co-cultured with activated macrophages. Mastic's effects were studied as regards to regulation of lactate dehydrogenase % release, production of IL-8 and NF- κ B activation. Expression of IL-8 and ICAM-1 at mRNA level was measured in both rat epithelium and HT29 cells.

Results: Administration of mastic at 100mg/Kg of body weight (BW) for a time period of 3 days improved colonic damage score ($p < 0.001$), reduced the levels of all proinflammatory cytokines ($p < 0.05$) and diminished malonaldehyde concentrations ($p < 0.001$). Resin fractionization into acidic- (rich in terpenic acids) and neutral fraction (rich in terpenic alcohols and aldehydes) had no positive results. When these fractions were individually administered at doses contained in 100mg mastic/Kg of BW, levels of pro-inflammatory cytokines were decreased ($p < 0.05$) even at transcriptional level ($p < 0.05$). However, neither colonic damage nor malonaldehyde concentration did change. Oleanolic acid was also found to be ineffective. In whole, mastic has beneficial properties only when administered in its natural form. The results of the *in vitro* experiments showed that macrophages trigger inflammation and induce cytotoxicity ($p < 0.001$) in HT29 cells by increasing lactate dehydrogenase release. However, incubation of mastic with HT29 cells decreased cytotoxicity ($p < 0.001$). Additionally, levels and expression of IL-8 decreased ($p < 0.001$) via deactivation of NF- κ B ($p < 0.001$).

Conclusions: Chios mastic exerts potent antioxidant and anti-inflammatory effects on TNBS-induced colitic rats, via neutralizing the NF- κ B inflammation cascade. Mastic's properties are evident when administered in its natural form, since no effect was observed when fractions or oleanolic acid were individually administered. In conclusion, this unique product of Greek flora may be used in the near future for the treatment of inflammation, however further research is needed to confirm the beneficial effects of mastic, as well as its bioactive compounds.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	
Συντμήσεις	
Σκοπός / Scope	
Περίληψη / Abstract	

ΜΕΡΟΣ Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.3 Μαστιχοφόρος Σχίνος (ή μαστιχόδενδρο).....	3
1.4 Η συγκομιδή της μαστίχας.....	5
1.5 Φυσικές ιδιότητες.....	7
1.6 Χημική σύσταση	
1.6.1 Μαστιχέλαιο.....	8
1.6.2 Τερπένια.....	8
1.6.3 Πολυφαινόλες.....	11
1.7 Τα προϊόντα της μαστίχας.....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

2.1 Γενικά.....	13
2.2 Αντινεοπλασματική δράση.....	13
2.3 Αντιοξειδωτική δράση.....	16
2.4 Αντιμικροβιακή δράση.....	19
2.5 Αντιφλεγμονώδης δράση (νόσος Crohn).....	20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

3.1 Γενικά.....	22
3.2 Αντινεοπλασματική δράση.....	22
3.3 Χημειοθεραπευτική δράση	
3.3.1 Πάγκρεας.....	22
3.3.2 Μαστοί.....	23
3.3.3 Ήπαρ.....	23
3.3.4 Πεπτικό σύστημα.....	24
3.3.5 Αγγειογένεση.....	25
3.3.6 Κλινικές δοκιμές.....	25
3.4 Χημειοπροστατευτική δράση	
3.4.1 Κόλον.....	26
3.4.2 Μαστοί.....	26
3.4.3 Δέρμα.....	27

3.5 Αντιοξειδωτική δράση.....	27
3.6 Αντιμικροβιακή δράση.....	28
3.7 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

4.1 Εισαγωγή.....	30
4.2 Παθογένεια.....	30
4.3 Παθολογοανατομική εικόνα	
4.3.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά.....	32
4.3.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά.....	32
4.4 Συμπτωματολογία.....	33
4.5 Διάγνωση.....	33
4.6 Αγωγή.....	34
4.7 Διατροφική αντιμετώπιση.....	35
4.8 Νόσος Crohn και οξειδωτικό στρες	
4.8.1 Γενικά.....	36
4.8.2 Μέτρηση οξειδωτικού στρες.....	37
4.9 Νόσος Crohn και φλεγμονή	
4.9.1 Γενικά.....	37
4.9.2 Ανοσολογικοί μηχανισμοί στη νόσο Crohn.....	37
4.9.3 Σημαντικοί παράγοντες φλεγμονής στη νόσο Crohn.....	39

ΜΕΡΟΣ Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Σύσταση μαστίχας

5.1 Κλασματοποίηση μαστίχας Χίου.....	43
5.2 Παραγωγοποίηση.....	44
5.3 Ανάλυση αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (GC-MS analysis).....	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: *In vivo* μελέτη

6.1 Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζων.....	46
6.2 Πειραματικό ζωικό πρότυπο νόσου Crohn.....	46
6.3 Δοκιμή με μαστίχα και συστατικά αυτής.....	47
6.4 Πειραματικές Ομάδες.....	48
6.5 Αναισθησία-Ευθανασία.....	50
6.6 Ομοιογενοποίηση των ιστών.....	50
6.7 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford σε ιστό.....	51
6.8 Μέτρηση των επιπέδων κυτταροκινών σε ιστό και ορό.....	52
6.9 Μέτρηση των επιπέδων μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό.....	53
6.10 Ιστολογική εξέταση.....	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: *In vitro* πείραμα

7.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC) ανθρώπου	55
7.2 Καλλιέργειες/συγκαλλιέργειες.....	55
7.2.1 Μέτρηση των κυττάρων κι έλεγχος βιωσιμότητας.....	56
7.2.2 Καλλιέργεια ανθρώπινης σειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29.....	56
7.2.3 Ψύξη και απόψυξη των HT29 κυττάρων	57
7.2.4 Διέγερση των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29.....	57
7.2.5 Διαφοροποίηση μονοκυττάρων προερχόμενα από PBMC ανθρώπου σε μακροφάγα	58
7.2.6 <i>In vitro</i> μοντέλο φλεγμονής παχέος εντέρου νόσου Crohn	58
7.3 Μέτρηση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).....	59
7.4 Μέτρηση πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65.....	60
7.5 Έκφραση παραγόντων φλεγμονής.....	61
7.6 Έλεγχος PCR.....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Στατιστική επεξεργασία.....	64
---	----

ΜΕΡΟΣ Γ΄ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Σύσταση μαστίχας.....	66
-----------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: *In vivo* μελέτη σε ζωικά πρότυπα

10.1 Πιλοτικό πείραμα.....	67
10.2 Α΄ Πειραματικό μέρος.....	67
10.2.1 Ιστολογική ανάλυση.....	68
10.2.2 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό.....	69
10.2.3 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ορό.....	73
10.2.4 Μέτρηση μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό.....	74
10.2.5 Σωματικό βάρος επίμυων.....	75
10.3 Β΄ Πειραματικό μέρος.....	76
10.3.1 Ιστολογική ανάλυση.....	77
10.3.2 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό.....	79
10.3.3 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ορό.....	81
10.3.4 Μέτρηση μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό.....	82
10.3.5 Έκφραση παραγόντων φλεγμονής σε ιστό.....	83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: *In vitro* μελέτη σε κύτταρα

11.1 Απελευθέρωση % της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).....	85
11.2 Συγκέντρωση TNF-α.....	87
11.3 Συγκέντρωση IL-8.....	87
11.4 Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NF-κΒ p65.....	88
11.5 Έκφραση παραγόντων φλεγμονής στα HT29 κύτταρα.....	90

ΜΕΡΟΣ Δ΄ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

12.1 Συνοπτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.....	93
12.2 Φλεγμονή και βιοχημικοί δείκτες.....	94
12.3 Νόσος Crohn και βιοδραστικά συστατικά.....	95
12.4 Νόσος Crohn και δράση των ROS.....	96
12.5 Νόσος Crohn και χημειοταξία.....	98
12.6 Νόσος Crohn και εντερικό επιθήλιο.....	99
12.7 Επίλογος.....	99

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100
--------------------------	------------

ΜΕΡΟΣ Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΜΑΣΤΙΧΑ ΧΙΟΥ

1.1 Εισαγωγή

Η μαστίχα είναι μια ρητινώδης ουσία που εξέρχεται από τον κορμό και τα κλαδιά του Μαστιχοφόρου Σχίνου (ή μαστιχόδενδρου), ο οποίος ευδοκιμεί αποκλειστικά στη Χίο. Η έκκριση της προκαλείται από το χάραγμα του σχίνου, το λεγόμενο «κέντημα», με ένα αιχμηρό εργαλείο. Ως αποτέλεσμα, η ρητίνη εμφανίζεται σαν δάκρυ και ρέει κατά σταγόνες (**Εικόνα 1.1**). Εδαφικά και κλιματολογικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν την ανάπτυξη του μαστιχόδενδρου μόνο στο νότιο τμήμα του νησιού. Η μαστίχα Χίου είναι γνωστή από την αρχαιότητα για τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της, αλλά και για τις ευεργετικές της ιδιότητες.



Εικόνα 1.1 Δάκρυα μαστίχας

1.2 Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες πληροφορίες για τη μαστίχα χρονολογούνται από την εποχή του Ηρόδοτου (5^{ος} αιώνας π.Χ.), ο οποίος αναφέρει χαρακτηριστικά ότι στην αρχαία Ελλάδα μασούσαν το αποξηραμένο ρητινώδες υγρό που ρέει από τον φλοιό του μαστιχόδενδρου (Σαββίδης, 2000). Αρχαίοι συγγραφείς, όπως ο Ιπποκράτης, ο Θεόφραστος, ο Διοσκουρίδης, ο Πλίνιος και ο Γαληνός, εστιάζουν στις θεραπευτικές δράσεις της μαστίχας, την οποία και αποκαλούν «σχινική ρητίνη». Για παράδειγμα, ο Διοσκουρίδης (40-90 μ.Χ.), ο «πατέρας της φαρμακολογίας», επισημαίνει στο έργο του «Περί Ύλης Ιατρικής» (De Materia Medica) τις ευεργετικές ιδιότητες της ρητίνης στη δυσπενία, στην αναπαραγωγή του αίματος και στο χρόνιο βήχα. Για το μαστιχέλαιο υποστηρίζει ότι θεραπεύει τα εμφανιζόμενα καρκινώματα του στόμαχου, τις κοιλιακές και δυσεντερικές παθήσεις, τις παθήσεις της μήτρας, ενώ καθαρίζει και δίνει ωραίο χρώμα στο πρόσωπο. Ο Πλίνιος (23-79 μ.Χ.) στο «Φυσική Ιστορία» (Naturalis Historia) αναφέρει ότι το μαστιχόδενδρο καλλιεργείται μόνο στο νότιο

τμήμα του νησιού και θεωρεί τη μαστίχα Χίου πιο φημισμένη από εκείνη της Ινδίας και της Αραβίας. Μάλιστα, ο Γαληνός (129-199 μ.Χ.) υποστηρίζει ότι η ρητίνη που παράγεται στην Αίγυπτο είναι κατώτερης ποιότητας. Σύμφωνα με κείμενα του Ηρόδοτου και του Διόδωρου από τη Σικελία, η μαστίχα ήταν ένα από τα υλικά ταρίχευσης του ανθρώπινου σώματος, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από αναλύσεις σε μούμιες που βρέθηκαν στην Αρχαία Καρχηδόνα το 1902. Κατά τη ρωμαϊκή εποχή (146 π.Χ.-395 μ.Χ.), αρκετοί Έλληνες και Λατίνοι γιατροί, όπως ο Ριβάσιος, ο Σορανός, ο Εφέσιος, ο Etius Medicus, ο Scribonius Largus κ.α., μιλούν για τις φαρμακευτικές δράσεις της μαστίχας. Δεν ήταν τυχαίο ότι οι κυρίες της Ρώμης, και αργότερα αυτές της Κωνσταντινούπολης, χρησιμοποιούσαν οδοντογλυφίδες από ξύλο μαστιχόδενδρου για την υγιεινή του στόματος.

Κατά τη Βυζαντινή εποχή (324-1204), η οικονομία της Χίου ήταν αρκετά ακμάζουσα. Σημειώνεται ότι η μαστίχα ήταν ευρέως διαδεδομένη στα εμπορικά κέντρα της Ευρώπης και της Ανατολής. Παρόλα αυτά, λίγα χρόνια μετά την κατάληψη της Κωνσταντινούπολης από τους Φράγκους (1204), ο Μιχαήλ Παλαιολόγος αναγκάστηκε να εκχωρήσει την παραγωγή και τη διακίνηση του προϊόντος στους Γενοβέζους. Κατά την περίοδο κυριαρχίας των τελευταίων στο νησί (1346-1566) ιδρύθηκε η «Μαόνα», μια επιχείρηση που κρατούσε το μονοπώλιο της μαστίχας με αντάλλαγμα τη συνεισφορά της στις δαπάνες αμύνης του νησιού. Όταν η Χίος περιήλθε στο ζυγό της Οθωμανικής αυτοκρατορίας, το 1566, οι μαστιχοπαραγωγοί απέκτησαν ιδιαίτερα προνόμια. Πιο συγκεκριμένα, τα χωριά τους (μαστιχώχωρα) έγιναν αυτοδιοικούμενα, καταργήθηκε το παιδομάζωμα και ασκήθηκε το δικαίωμα της ορθόδοξης πίστης.

Κατά τη διάρκεια του βαλκανικού και του Α΄ παγκοσμίου πολέμου, η παραγωγή μαστίχας μειώθηκε σημαντικά. Μετά το Β΄ παγκόσμιο πόλεμο, παρά την αντικατάσταση της από μη φυσικά υποκατάστατα, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως στη ζαχαροπλαστική, την ποτοποιία και τη βιομηχανία.

1.3 Μαστιχοφόρος Σχίνος (ή μαστιχόδενδρο)

Το μαστιχόδενδρο (**Εικόνα 1.2**) είναι ένας αειθαλής θάμνος ύψους 2-3 μέτρων που μερικές φορές φτάνει και τα 5 μέτρα (Σαββίδης, 2000). Ζει πάνω από 100 χρόνια, ωστόσο από το 70^ο έτος περίπου αρχίζει η παρακμή του. Η ανάπτυξη του γίνεται με αργούς ρυθμούς και ολοκληρώνεται στα 40-50 χρόνια. Είναι δίοικο είδος, εμφανίζει δηλαδή άρρενες και θήλεις ταξιανθίες σε διαφορετικά άτομα. Τα άρρενα άτομα, «καρπόσκινα», είναι εκείνα που αποδίδουν περισσότερη και καλύτερη ποιότητα μαστίχας και αυτά κυρίως καλλιεργούνται. Οι μασχαλιαίες ή επάκριες ταξιανθίες (**Εικόνα 1.2**) αναπτύσσονται στα μέσα Μαρτίου και η άνθηση ολοκληρώνεται στις αρχές Απριλίου. Όλα τα όργανα του μαστιχόδενδρου (βλαστός, φύλλα, ρίζες, άνθη, καρποί) διατρέχονται από ρητινοφόρους αγωγούς (σύστημα αγωγών). Η παραγωγή μαστίχας αρχίζει τον 5^ο ή 6^ο χρόνο, ενώ το μέγιστο της απόδοσης (130-200g) εμφανίζεται από το 12^ο μέχρι το 15^ο έτος της ηλικίας.

Όσον αφορά στη 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 γένος *Pistacia* προέρχεται από την κεντρική Ασία, σημείο από το οποίο τα διάφορα είδη εξαπλώθηκαν γύρω από την Μεσόγειο. Η λέξη “*Pistacia*” προέρχεται από τις λέξεις «πίσσα» (= πυκνόρρευστος κολλώδης χυμός) και «αέκομαι» (= θεραπεύω). Δύο από τα είδη της *Pistacia*, η *P. lentiscus* και η *P. atlantica*, είναι γνωστά από τα αρχαία χρόνια για την παραγωγή και διακίνηση του προϊόντος.

Σύμφωνα με τις πατατηρήσεις των Poiret (1809) και De Candolle (1825), τα φυλλάρια του μαστιχόδενδρου είναι πλατιά. Πέρα όμως από το συγκεκριμένο είδος, υπάρχουν και άλλα με πολύ στενότερα φυλλάρια. Το 1985, ο Browicz αναφέρεται στον όρο «κλώνος», προκειμένου να περιγράψει τις διάφορες μορφές μαστιχόδενδρων με βάση παρόμοια γνωρίσματα, όπως το σχήμα των φύλλων και του βλαστού, τις μηχανικές ιδιότητες του φλοιού και την ποιότητα της μαστίχας. Έως τώρα έχουν αναφερθεί 5 κλώνοι που φέρουν τοπικά ονόματα: μαυρόσκοινος (ή λαγκαδιώτης), βότομος, βιγλιώτης (ή μαρουλόσκοινος ή μαρουλιώτης ή καλλιμασιώτης), κρεμεντινός και λιβανός.

Οι ρητινοφόροι αγωγοί προστατεύονται εξωτερικά από τόξα σκληρεγχυματικών ινών (Σαββίδης, 2000). Στο βλαστό και στη ρίζα οι ρητινοφόροι αγωγοί αποτελούνται από πολυάριθμα κύτταρα, τα οποία περιέχουν άφθονα σκοτεινά κοκκία ή χυμοτόπια με φαινολικά συστατικά. Στα φύλλα ρητινοφόροι αγωγοί απαντώνται στον κεντρικό μίσχο και στους μικρότερους μίσχους των επιμέρους φυλλαρίων. Τα υποτυπώδη φύλλα (λέπια) που προστατεύουν τους οφθαλμούς (μπουμπούκια) διαθέτουν καλά αναπτυγμένους ρητινοφόρους αγωγούς. Οι τελευταίοι παράγουν ρητίνη η οποία λειτουργεί ως εντομοαπωθητικό, με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο προστατευτικός ρόλος των λεπίων. Και στα φύλλα υπάρχουν κύτταρα που περιέχουν φαινολικές ουσίες. Ο ρόλος των τελευταίων είναι η απορρόφηση της έντονης ηλιακής ακτινοβολίας, η οποία πιθανό να προκαλέσει υπερθέρμανση και πήξιμο της ρητίνης και συνεπώς, τη δυσκολία ροής της μέσα στον αγωγό.

Όλοι οι επιμέρους ρητινοφόροι αγωγοί της ρίζας, του βλαστού και των φύλλων σχηματίζουν ένα συνεχές τρισδιάστατο σύστημα. Μέσω του παραπάνω συστήματος αυξάνεται η συγκράτηση του νερού στους ιστούς και με αυτόν τον τρόπο προστατεύεται το φυτό από την αφυδάτωση και τη ξηρασία. Τυχόν τραυματισμός κάποιου οργάνου έχει ως συνέπεια την έξοδο ρητίνης μαζί με το χυμό του αγωγού ιστού. Ορισμένα συστατικά εξατμίζονται, ενώ κάποια άλλα παραμένουν και επουλώνουν το τραύμα, ώστε το φυτό να έχει τις λιγότερες απώλειες σε χυμό. Η παρουσία της ρητίνης στην τραυματισμένη περιοχή βοηθάει στην άμυνα του φυτού εμποδίζοντας την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών.

Η έναρξη δημιουργίας ενός ρητινοφόρου αγωγού σηματοδοτείται με τη διεύρυνση του μεσοκυττάριου χώρου ομάδας κυττάρων στο δευτερογενές φλοιώμα. Οι ρητινοφόροι αγωγοί αρχικά αναπτύσσονται σχιζογενώς, δηλαδή ο ιστός σχίζεται στην περιοχή των μεσοκυττάρων χώρων. Στη

συνέχεια ακολουθεί έκκριση της ρητίνης, η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Πρώτα, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των επιμέρους συστατικών των επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τους ρητινοφόρους αγωγούς. Η σύνθεση τους πραγματοποιείται ξεχωριστά από τα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και πιθανό στα ίδια κυτταρικά οργάνδια να συντίθεται διαφορετικά συστατικά. Για παράδειγμα, η σύνθεση των τερπενίων φαίνεται να συμβαίνει σε όλα όργανα του φυτού (βλαστός, φύλλο, ρίζα, ανθός, καρπός), ενώ καθένα από αυτά παράγει διαφορετικά τερπενικά συστατικά. Ακολουθεί αποικοδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων (λύση) και απελευθέρωση των παραπάνω συστατικών στο εσωτερικό του αγωγού. Τα κυτταρικά τοιχώματα διαλύονται βαθμιαία αρχίζοντας από τις στοιβάδες που βρίσκονται κοντά στο κυτόπλασμα. Τα συστατικά των κυττάρων, τα υπολείμματα των κυτταρικών τοιχωμάτων, ακόμα και ολόκληρα κύτταρα δημιουργούν μια άμορφη μάζα, η οποία αποτελεί το πρόδρομο υλικό της ρητίνης.



Εικόνα 1.2 Το μαστιχόδεντρο (πάνω) και μασχαλιαίες ή επάκριες ταξιανθίες (κάτω)

1.4 Η συγκομιδή της μαστίχας

Η παραγωγή μαστίχας γίνεται τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο, ενώ αν το επιτρέπουν οι συνθήκες συνεχίζει και τον Οκτώβριο (Σαββίδης, 2000). Ο καθορισμένος με νόμο χρόνος συλλογής, από τις 15 Ιουλίου μέχρι τις 15 Οκτωβρίου, εξασφαλίζει την ομοιόμορφη παραγωγή της ρητίνης (πήξιμο).

Προκαταρκτικές εργασίες: Πριν από το κέντημα και τη συλλογή μαστίχας, απομακρύνονται όλα τα φυτά γύρω από το βλαστό. Ακολουθεί καθάρισμα, ισοπέδωση και πάτημα, ώστε οι σταγόνες

μαστίχας που πιθανό να πέσουν στο έδαφος να είναι εύκολο να παραληφθούν. Η ισοπέδωση πραγματοποιείται με κοσκινισμένο ασπρόχωμα, το οποίο πιέζεται και στρώνεται καλά στο έδαφος, ώστε να δημιουργηθεί λεία επιφάνεια. Οι σταγόνες ή τα δάκρυα μαστίχας πάνω στο ασπρόχωμα αποκτούν λαμπρότητα και στερεοποιούνται ευκολότερα. Το ασπρόχωμα αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), το οποίο είναι αδρανές υλικό και δεν επηρεάζει ούτε τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μαστίχας, ούτε την καθαρότητα της. Σε περίπτωση που το χώμα δεν είναι ασπρόχωμα, η μαστίχα σκουραίνει και χάνει την εμπορική της αξία (μαυρομάστιχο).

Πρώτο κέντημα (ρήνιασμα): Η μαστίχα προκύπτει από τραυματισμό του φλοιού του βλαστού με ειδικά εργαλεία, κυρίως το «κεντητήρι», ένα μικρό, αιχμηρό και αυλακωτό στην άκρη σιδερένιο αντικείμενο. Οι τομές, «κεντήματα», επαναλαμβάνονται μερικές φορές από τις αρχές Ιουλίου μέχρι το τέλος του Αυγούστου (**Εικόνα 1.3**). 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 στερεοποίηση, δηλαδή το πήξιμο της μαστίχας διαρκεί 10-15 ή ακόμη και 20 μέρες. Ο αέρας και η χαμηλή θερμοκρασία επιταχύνουν τη στερεοποίηση της.

Πρώτη συλλογή: Η πρώτη συλλογή γίνεται μετά τις 15 Αυγούστου όταν έχουν συμπληρωθεί 6-10 κεντήματα. Η διαδικασία αυτή αρχίζει όταν στερεοποιηθεί η μαστίχα και πραγματοποιείται με ένα ειδικό εργαλείο, το οποίο ονομάζεται «τιμητήρι». Αρχικά συλλέγεται η χοντρή μαστίχα, ενώ με το ίδιο εργαλείο συλλέγεται και η μαστίχα που έχει πήξει στο κορμό του δένδρου (δάκρυα), καθώς και αυτή που κρέμεται από τα κλαριά (φλισκάρια). Στη συνέχεια, η μαστίχα τοποθετείται σε ξύλινα κιβώτια και αποθηκεύεται σε δροσερούς χώρους.

Δεύτερο κέντημα (κεντιά): Το δεύτερο κέντημα διαρκεί 5-6 εβδομάδες και ακολουθούνται όλες οι προηγούμενες διεργασίες μέχρι την τελευταία συλλογή του φθινοπώρου.

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



Εικόνα 1.3 Κέντημα και «δάκρυ» ρητίνης

Αν και η μέση απόδοση ανά δένδρο ποικίλλει, αυτή κυμαίνεται μεταξύ 80-200g. Ενώ σε νεαρή ηλικία η μέση απόδοση είναι 7-13g, αργότερα φθάνει τα 130-200g. Η μεγαλύτερη απόδοση του μαστιχόδενδρου γίνεται στην ηλικία των 12-15 ετών. Μετά τη συλλογή πραγματοποιείται καθαρισμός της μαστίχας, ο οποίος αρχίζει με κοσκίνισμα για την απομάκρυνση του χώματος και των ξερών φύλλων. Στη συνέχεια, πλένεται καλά με κρύο νερό και σαπούνι και απλώνεται σε σκιερό μέρος για να στεγνώσει. Μετά το στέγνωμα οι κόκκοι της μαστίχας καθαρίζονται από τυχόν ξένα σώματα που παρέμειναν εγκλωβισμένα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «τσίμπημα» και γίνεται κυρίως τις νυχτερινές ώρες. Τέλος, η μαστίχα περνά διαδοχικά από διάφορα κόσκινα για την τελική ταξινόμηση.

Σήμερα, εφαρμόζονται επιπλέον εναλλακτικές μέθοδοι συλλογής της ρητίνης χρησιμοποιώντας την ιστοερεθιστική ουσία Ethrepon (Ethrel), πάστα θεικού οξέος, πλαστικά φύλλα ή διαχυτήρες θειώδους νατρίου.

1.5 Φυσικές ιδιότητες

Κατά τη διάρκεια έκκρισής της, η μαστίχα βρίσκεται υπό τη μορφή παχύρευστου, εξαιρετικά κολλώδους και διαηγούς ρευστού (Σαββίδης, 2000). Με την παραμονή της στο δένδρο ή το έδαφος σε θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την περίοδο συλλογής της (Ιούνιος-Σεπτέμβριος), στερεοποιείται με τη μορφή σταγόνων ή συσσωματωμάτων ακανόνιστου σχήματος. Η στερεοποίηση αυτή οφείλεται σε μερική εξάτμιση του αιθέριου ελαίου και στον πολυμερισμό των συστατικών της ρητίνης. Η κολλώδης ιδιότητά της μειώνεται, γεγονός το οποίο επιτρέπει την ευκολότερη συλλογή της. Η πυκνότητα της μαστίχας είναι 1.06 και ο βαθμός οξύτητάς της 50-75.

Στην αρχή, το χρώμα της ρητίνης είναι υποκίτρινο ή ωχρό πράσινο εξαιτίας της περιεκτικότητας της σε χλωροφύλλη. Σταδιακά όμως χάνεται και σε δώδεκα με δεκαοχτώ μήνες γίνεται κιτρινωπή, κάτι το οποίο πιθανώς να οφείλεται σε οξείδωση. Εξωτερικά δημιουργείται μια σκληρότερη κρούστα που προστατεύει τα εσωτερικά στρώματα από την περαιτέρω οξείδωση. 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 δίνει δάκρυ μικρό και μεγαλύτερης σκληρότητας, διότι πραγματοποιείται πιο γρήγορα πολυμερισμός. Τέλος, η γεύση της μαστίχας είναι αρχικά υπόπικρη, ενώ 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.

1.6 Χημική σύσταση

1.6.1 Μαστιχέλαιο

Στην υγρή της μορφή, δηλαδή κατά τη διάρκεια έκκρισής της, η μαστίχα περιέχει 17-20% μαστιχέλαιο, ενώ τρεις μέρες μετά τη συλλογή της η παραπάνω περιεκτικότητα μειώνεται στο 14% (Σαββίδης, 2000). Το ποσοστό μαστιχελαίου ελαττώνεται με την αύξηση παραμονής της μαστίχας, φαινόμενο το οποίο μπορεί να καθυστερήσει με τη ψύξη του προϊόντος.

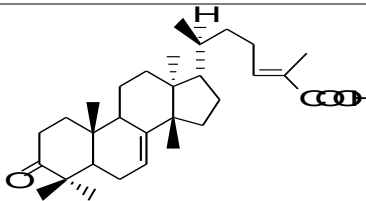
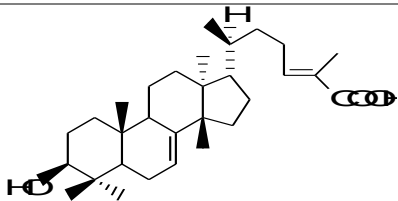
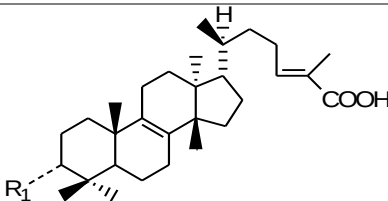
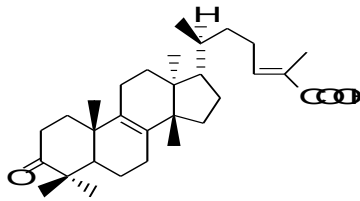
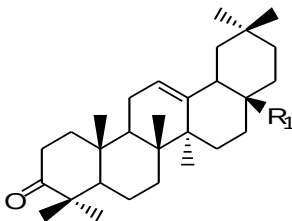
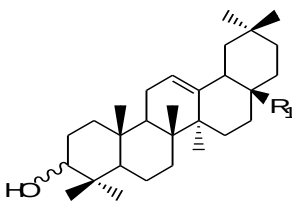
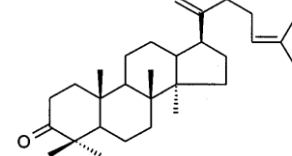
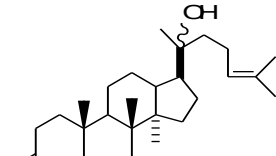
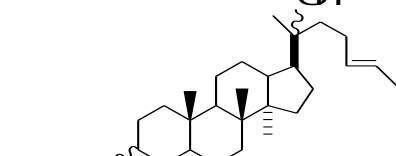
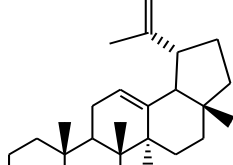
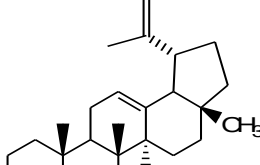
1.6.2 Τερπένια

Τα αιθέρια έλαια και οι ρητίνες περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία τερπενίων (**Εικόνα 1.4**). Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από πτητικά, χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια, ενώ οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενίων (Σαββίδης, 2000). Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $H_2C=C(CH_3)-CH=CH_2$ (2-μεθυλοβουταδιένιο1,3) ανοικτής αλυσού ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Σύμφωνα με τον αριθμό ισοπρενικών ομάδων στο μόριό τους ταξινομούνται σε (Conolly και 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). Με πολυμερισμό του ισοπρενίου σε κατάλληλες συνθήκες μπορεί να πραγματοποιηθεί χημική σύνθεση των τερπενίων. Για το λόγο αυτό τα τερπένια ονομάζονται και ισοπρενοειδή. Η βιοσύνθεσή τους απαιτεί τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος ή εναλλακτικά, την οδό φωσφογλυκεριναλδεϋδης/πυροσταφυλικού οξέος. Το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), προϊόντα της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού, αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις σύνθεσης όλων των τερπενίων (Taiz και Zeiger, 2006).

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-έννη, 3-οξυ-28-νορλουμ-20(29)-έννη, 3-οξυ-δαμμαρα-20(21),24-διέννη, (8R)-3-οξυ-8-υδροξυπολυποδα-13E,17E,21-τριέννη, 28-υδροξυ-β-αμυρόνη, (20S)-3β-ακετοξυ-20-υδροξυδαμμαρα-24-έννη, 3β-υδροξυ-μαλαβαρικά-14(26),17E,21, τριέννη, μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ, μαστιχαδιενολικό οξύ, 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, 3-O-ακετυλ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ (Paraschos και συν, 2007, Andrikopoulos και συν, 2003, Papageorgiou και συν, 1997).

Σύσταση αιθέριου ελαίου μαστίχας: 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, καμφοραλδεύδη, περιλλένιο, δευδρο-π-κυμένιο, α-κοπαένιο, καμφορά, πινοκαμφορά, λιναλοόλη, οξικός λιναλυστέρας, 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-δωδρο-π-κυμεν-8-όλη, α-χουμουλένιο, καρβόνη, σαντανόλη, νεράλη, cis-περιλλυλική αλκοόλη, βερμπενόνη, γ-μουουρολένιο, α-τερπινεόλη, βορνεόλη, πιπεριτόνη, ναφθαλένιο, α-μουουρολένιο, γερανιάλη, α-δωδρο-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 καρυοφυλλενίου, ανησαλδεύδη, μεθυλο-ευγενόλη, νερολιδόλη, cis-μεθυλο-ισοευγενόλη, trans-μεθυλο-ισοευγενόλη, διμυρκένιο βερατραλδεύδη (Koutsoudaki και συν, 2005, Magiatis και συν, 1999).

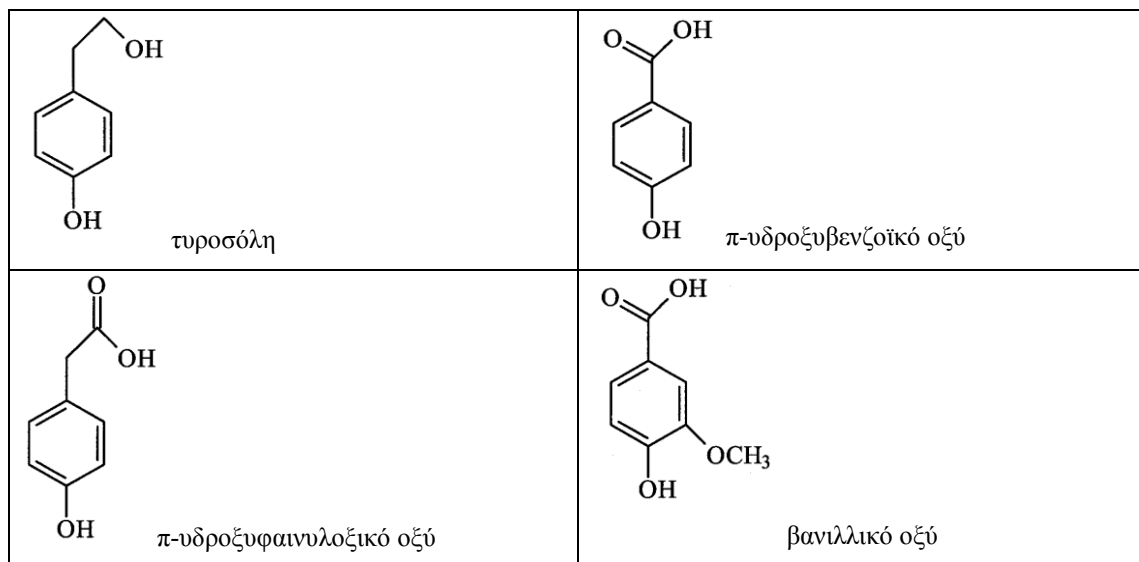
		
Μαστιχαδιενονικό οξύ	Μαστιχαδιενολικό οξύ	
		
$R_1=OH$, 3-Επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ $R_1=OCOCH_3$, 3-Ο-Ακετυλο-2-επι-μαστιχαδιενολικό οξύ		Ισομαστιχαδιενονικό οξύ
	β -Αμυρόνη Nor- β -αμυρόνη 28-Υδροξυ- β -αμυρόνη Ολεανονική αλδεϋδη Ολεανονικό οξύ 18 α H-Ολεανονικό οξύ	R_1 CH ₃ H OH CHO COOH COOH
	β -Αμυρίνη Nor- β -αμυρίνη Ολεανολικό οξύ	R_1 CH ₃ H CHO
		
Δαμμαραδιενόνη	Υδροξυδαμμαρενόνη	3-Ακετοξυ-υδροξυδαμμαρενόνη
		

Εικόνα 1.4 Τριτερπένια της ρητίνης *Pistacia lentiscus*

1.6.3 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και η δομή τους μπορεί να είναι απλή, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, μέχρι εξαιρετικά πολύπλοκη, όπως είναι οι ταννίνες. Οι πολυφαινόλες είναι εν μέρει υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των τροφίμων. Η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και ποτών εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε αυτές.

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 και συν, 2002). Το 2004 προσδιορίζεται η παρουσία πολυφαινολών και στη ρητίνη (**Εικόνα 1.5**) με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας-μάζας (GC-MS) (Kaliora και συν, 2004). Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται οι πολυφαινόλες τυροσόλη (375ng/g), π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (136ng/g), π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ (107ng/g) και βανιλικό οξύ (41ng/g). Επίσης, υπάρχουν ίχνη σε γαλλικό οξύ και trans-κινναμικό οξύ.



Εικόνα 1.5 Πολυφαινόλες της ρητίνης *Pistacia lentiscus*

1.7 Τα προϊόντα της μαστίχας

Τσίχλα: Σήμερα, η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (EMX) παράγει τη τσίχλα ΕΛΜΑ (Ελληνική Μαστίχη), η οποία περιέχει φυσική ρητίνη, μαλακτικές ουσίες και ζάχαρη ή τεχνητές γλυκαντικές ύλες (www.gummastic.gr).

Μαστιχέλαιο: Είναι το αιθέριο έλαιο, το οποίο λαμβάνεται από την απόσταξη της μαστίχας (Σαββίδης, 2000). Εταιρείες καλλυντικών και αρωμάτων χρησιμοποιούν το μαστιχέλαιο τόσο ως άρωμα όσο και σταθεροποιητή αρώματος, ενώ η χρήση του στη μαγειρική, τη ζαχαροπλαστική και την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής διαδίδεται ολοένα και περισσότερο. Η απόδοση σε μαστιχέλαιο εξαρτάται από την ποιότητα της μαστίχας.

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 με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται επέμβαση κοπής τους. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων κλπ.

Μαστιχόνερο: Παραλαμβάνεται από τη μαστίχα μέσω απλής απόσταξης με ατμό (www.gummastic.gr). 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 μικρή ποσότητα μαστιχελαίου είναι διαλυμένη σε αυτό. Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, την ενυδάτωση και την περιποίηση του προσώπου, ενώ συνίσταται και για χρήση στη μαγειρική, στην ζαχαροπλαστική και την αρτοποιία και ποτοποιία.

Κάψουλες μαστίχας: Το σκεύασμα έχει εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων ως ειδικό τρόφιμο και χρησιμοποιείται για την υγιεινή του πεπτικού συστήματος.

Σκόνη μαστίχας: Η μαστίχα κυκλοφορεί στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης αναμεμιγμένης με ινουλίνη σε αναλογία 6/4 (www.gummastic.gr). Το σκεύασμα προορίζεται για φαρμακευτική χρήση με σκοπό την προαγωγή της υγείας. Η προσθήκη ινουλίνης εμποδίζει τη συσσωμάτωση της σκόνης μαστίχας, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τη διασπορά της στο νερό και την κατάποση.



Εικόνα 1.6 Χρήση των «δακρύων» μαστίχας στην αρτοποιία

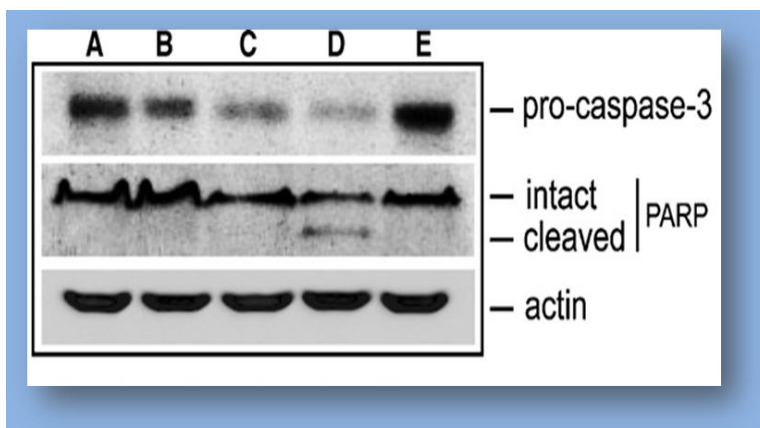
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ

2.1 Γενικά

Η χρήση της μαστίχας Χίου από αρχαιοτάτων χρόνων ως θεραπευτικού μέσου, οδήγησε τους ερευνητές στη διερεύνηση των ευεργετικών επιδράσεών της. Οι πρώτες μελέτες έγιναν στα μέσα της δεκαετίας του '80 και αφορούσαν στα πεπτικά έλκη (Al-Habbal και συν, 1984, Al-Said και συν, 1986, Huwez και Al-Habbal, 1986). Έκτοτε, ολοένα και περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνται με σκοπό την ανάδειξη του προϊόντος με διατροφοφαρμακευτικές δράσεις σε μια σειρά νοσημάτων.

2.2 Αντινεοπλασματική δράση

Η έρευνα για τις αντινεοπλασματικές δράσεις της μαστίχας είναι πολύ νέα. Πρώτοι, οι Balan και συν (2005) δείχνουν ότι το εξανικό εκχύλισμα μαστίχας προκαλεί την απόπτωση των HCT116 καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης, η ρητίνη φαίνεται να διεγείρει έναν καταρράκτη αντιδράσεων που καταλύεται από μια οικογένεια πρωτεασών, τις κασπάσες. Ως αποτέλεσμα, καταρκεματίζεται το DNA των καρκινικών κυττάρων και αυξάνεται ο ρυθμός απόπτωσής τους. Το αιθανολικό εκχύλισμα μαστίχας έχει παρόμοιες ιδιότητες (Εικόνα 2.1), ενώ η παρατήρηση ότι τα κύτταρα εξακολουθούν να θανατώνονται ακόμα και απουσία μαστίχας μετά από αγωγή τριών ημερών, σημαίνει ότι η απόπτωση είναι πλέον προγραμματισμένη (Balan και συν, 2007). Παρόμοιος μηχανισμός δράσης διαπιστώθηκε και σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (He και συν, 2006, He και συν 2007a,b).

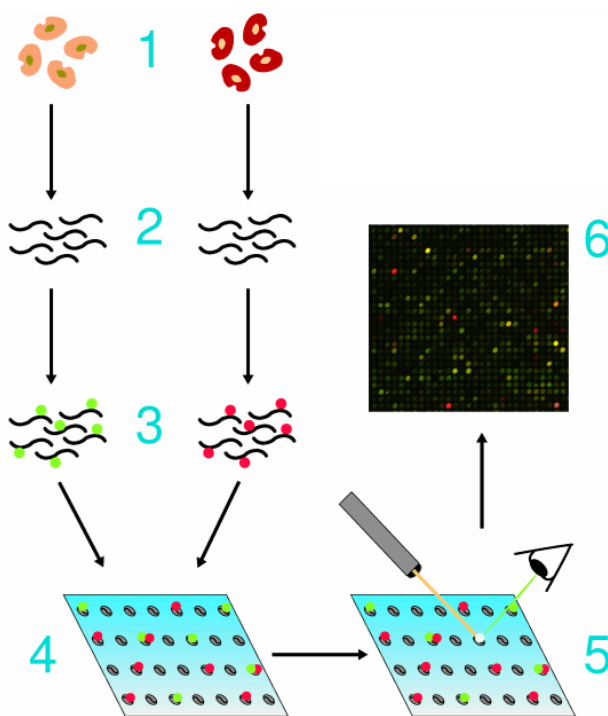


Εικόνα 2.1 Μηχανισμός απόπτωσης των HCT116 καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου υπό την επίδραση αιθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας. Σύμφωνα με την ανάλυση κατά Western-Blot, το εκχύλισμα μαστίχας σε 0.5% αιθανόλη (D) προκαλεί την ενεργοποίηση της πρωτεάσης, κασπάση-3, και την πρωτεολυτική κοπή της πολυμεράσης, PARP (poly

ADP ribose polymerase). A, ομάδα ελέγχου· B, εκχύλισμα μαστίχας σε 0.1% αιθανόλη· C, εκχύλισμα μαστίχας σε 0.2% αιθανόλη· D, εκχύλισμα μαστίχας σε 0.5% αιθανόλη· E, αιθανόλη 0.5%. Balan και συν, 2007

Καινοτομική είναι η μελέτη των Moulos και συν (2009), οι οποίοι μελετούν την αντινεοπλασματική δράση του μαστιχελαιίου σε επίπεδο έκφρασης όλου του γονιδιώματος (genome-

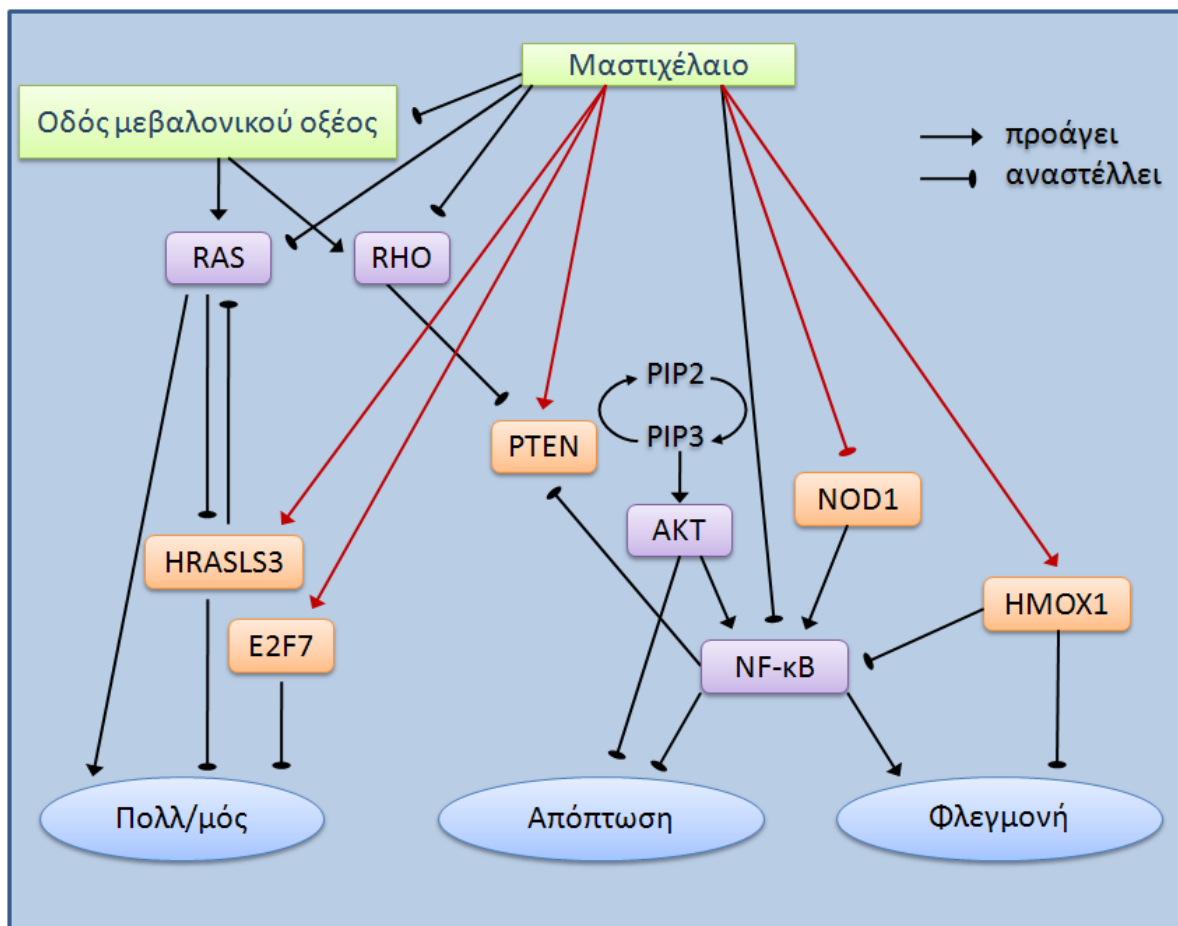
wide expression analysis). Η τεχνική που εφαρμόζουν ονομάζεται «μικροσυστοιχία DNA» (DNA microarray). Αρχικά, η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε για τη μέτρηση έκφρασης παρά μόνο λίγων γονιδίων. Πλέον, η εξέλιξη της μεθόδου κατέστησε δυνατή τη μέτρηση έκφρασης όλων των γονιδίων, γεγονός το οποίο επιτρέπει την ταυτοποίηση των λειτουργιών, των μεταβολικών οδών, καθώς και των ρυθμιστικών μηχανισμών τους σε ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος. Η μέθοδος της μικροσυστοιχίας αποτελεί ορόσημο στην επιστήμη της γενετικής, μιας και αποδίδει μεγάλο όγκο δεδομένων σε μικρό χρονικό διάστημα επιτρέποντας, μάλιστα, την ποσοτικοποίησή τους. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.2**, η μικροσυστοιχία αποτελείται από ένα μικροσκοπικό τσιπ στο οποίο τοποθετείται μια σειρά από χιλιάδες ολιγονουκλεοτίδια με συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Αυτά ονομάζονται «έλεγχοι» (probes) και χρησιμοποιούνται για την υβριδοποίηση ενός δείγματος cDNA, το οποίο έχει προηγουμένως σημειωθεί με χρωστικές φθορισμού. Τα φθορίζοντα σήματα υβριδοποίησης ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές λέιζερ. Η ένταση κάθε σήματος είναι ανάλογη του ποσοστού έκφρασης των γονιδίων. Τα δεδομένα κανονικοποιούνται και ομαδοποιούνται (clusters) χρησιμοποιώντας στατιστικά προγράμματα και αλγορίθμους. Για το σχολιασμό των γονιδίων και τις λειτουργίες που συμμετέχουν χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων, όπως η «οντολογική ανάλυση γονιδίων» (GO).



Εικόνα 2.2 Μικροσυστοιχία DNA. (1) Αρχικά, επιλέγεται η κυτταρική σειρά ελέγχου και η κυτταρική σειρά προς μελέτη. (2) Απομονώνεται το RNA και πολλαπλασιάζεται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ακολουθεί, μετατροπή του σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. (3) Το cDNA σημαίνεται με χρωστικές φθορισμού: κύτταρα ελέγχου → πράσινο και κύτταρα προς μελέτη → κόκκινο (4) Πραγματοποιείται υβριδοποίηση των “probes” και του cDNA στο τσιπ. (5) Ανιχνεύονται τα σήματα φθορισμού. (6) Τα δεδομένα αναλύονται με στατιστικά προγράμματα και εργαλεία βιοπληροφορικής.

Όσον αφορά στη μελέτη των Moulos και συν (2009), η καλλιέργεια των LLC καρκινικών κυττάρων πνεύμονα με μαστιχέλαιο (0.01% v/v) αλλάζει την έκφραση 925 γονιδίων. Τα γονίδια

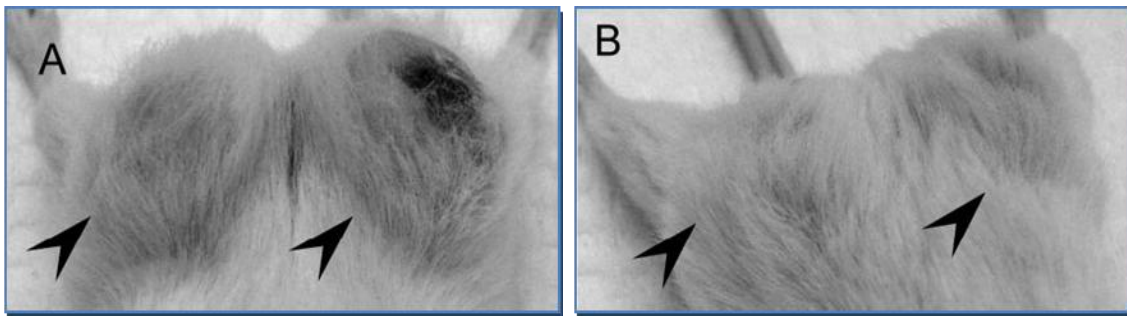
αυτά παίζουν καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, στον πολλαπλασιασμό, στη μεταγωγή σημάτων και στην απόπτωση. Ένα πολύ σημαντικό γονίδιο είναι το *PTEN*, του οποίου η έκφραση αναστέλλεται στα LLC, στα HCT116, καθώς και στα λευχαιμικά K562 κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιείται η πρωτεϊνική ομάδα AKT, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και οδηγεί σε φλεγμονώδη απάντηση μέσω της πυροδότησης του NF-κB. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το μαστιχέλαιο προάγει την έκφραση του *PTEN* με την ενεργοποίηση της AKT να παρεμποδίζεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της τριφωσφο (3,4,5)-φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP3). Η δράση του μαστιχελαίου αναστέλλεται μερικώς μετά από προσθήκη αναστολέα του *PTEN*, γεγονός που αποδεικνύει ότι την πολυπλοκότητα του μηχανισμού δράσης. Άλλα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την αγωγή με μαστιχέλαιο είναι τα *E2F7*, *HRASLS3*, *NOD1* και *HMOX1*. Ο ρόλος όλων αυτών των γονιδίων φαίνεται στο **Εικόνα 2.3**



Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση της δράσης του μαστιγελαίου στα LLC καρκινικά κύτταρα πνεύμονα.

Moulos και συν, 2009

Πρόσφατη μελέτη σε μύες με καρκίνο του παχέος εντέρου επιβεβαιώνει τον αντινεοπλασματικό ρόλο της μαστίχας (Dimas και συν, 2009). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.4**, η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας σε δόση ίση προς 200mg/Kg σωματικού βάρους (ΣΒ) είναι αρκετή προκειμένου να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων. Ωστόσο, το σχήμα χορήγησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση τοξικότητας. Όταν το παραπάνω εκχύλισμα δίνεται για περίπου ένα μήνα με διαστήματα αποχής διάρκειας 2 ημερών κάθε 5 ημέρες, το μέγεθος των όγκων μειώνεται μεν σημαντικά (38%, $p<0.05$), αλλά κανένα από τα ζώα δεν επιβιώνει στο τέλος των 35 ημερών παρέμβασης. Αντίθετα, όταν ο κύκλος χορήγησης-διακοπής είναι 4 προς 3, οι όγκοι συρρικνώνονται κατά 35% ($p<0.05$) και όλα τα ζώα επιβιώνουν.



Εικόνα 2.4 Μακροσκοπική παρατήρηση στο κόλον μύων. Μύες (N=18) με γενετική ανοσοκαταστολή (NOD.CB17Prkdc^{scid}) δέχτηκαν ενέσεις κακοηθών κυττάρων του παχέος εντέρου (HCT116) στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Όταν τα ζώα απέκτησαν όγκους 100mm³, ακολούθησε είτε πλήρης αποχή από οποιαδήποτε παρέμβαση (εικόνα A) είτε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 200mg/Kg ΣΒ εξανικού εκχυλίσματος μαστίχας (εικόνα B). Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές ανάπτυξης των όγκων. Όπου ΣΒ = σωματικό βάρος. *Dimas και συν, 2009*

2.3 Αντιοξειδωτική δράση

Η αθηροσκλήρυνση είναι μία εξελισσόμενη νόσος η οποία αρχίζει νωρίς από την παιδική ηλικία, αλλά οι κλινικές εκδηλώσεις παρουσιάζονται συνήθως κατά τη μέση ηλικία ή αργότερα. Βασική μορφολογική αλλοίωση είναι η αθηρωματική πλάκα. Αυτή σχηματίζεται στον έσω χιτώνα της αρτηρίας και χαρακτηρίζεται από έναν διακριτό πυρήνα λιπιδίων, κυρίως χοληστερόλης, συνήθως σε συμπλέγματα με πρωτεΐνες και εστέρες χοληστερόλης. Πλήθος παραγόντων συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Σε αυτούς συγκαταλέγονται τα ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα αιμοπετάλια, οι λιποπρωτεΐνες, καθώς και χημικοί μεσολαβητές, όπως κυτταροκίνες, αναπτυξιακοί, χημειοτακτικοί και θρομβογόνοι παράγοντες.

Η LDL αποτελεί το βασικό μεταφορέα χοληστερόλης στους ιστούς μέσω του περιφερικού αίματος και ευθύνεται για την εναπόθεση της χοληστερόλης στο ενδοθήλιο των αρτηριών. Υπό

συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στην LDL μετατρέποντάς την στην οξειδωμένη της μορφή (oxLDL). Το γεγονός αυτό προκαλεί διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τη μετανάστευση μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMC) και αύξηση της διαπερατότητας για τις λιποπρωτεΐνες. Τα PBMC διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, ενώ παράγονται πρωτεΐνες που προκαλούν βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και οξείδωση της LDL (Steinberg και συν, 1989). Εντέλει, τα μακροφάγα μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (Fuhrman και συν, 2002). Ο πυρήνας τους συρρικνώνεται, η κυτταρική μεμβράνη χάνει την ακεραιότητά της και το DNA καταστρέφεται, απελευθερώνοντας στο ενδοθήλιο χοληστερόλη και οξειδωμένα λίπη (Aviram, 2000).

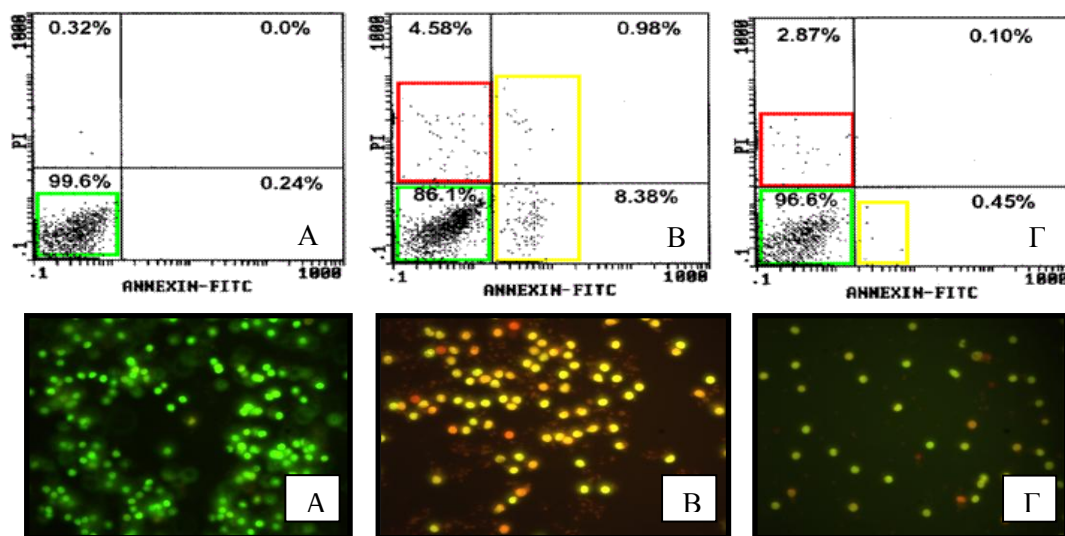
Τα πρώτα δεδομένα για την αντιοξειδωτική δράση της ρητίνης προέρχονται από τους Andrikopoulos και συν (2003), οι οποίοι εξετάζουν διαφορετικά κλάσματα και εκχυλίσματα του προϊόντος ως προς την οξείδωση της LDL *in vitro*. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μαστίχα παρεμποδίζει το φαινόμενο της οξείδωσης από 75.3% έως 99.9% με τρόπο δόσοεξαρτώμενο, ενώ το εκχύλισμα μεθανόλης/νερού φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Η % προστασία διαφορετικών κλασμάτων και εκχυλισμάτων της μαστίχας Χίου έναντι στην οξείδωση της LDL

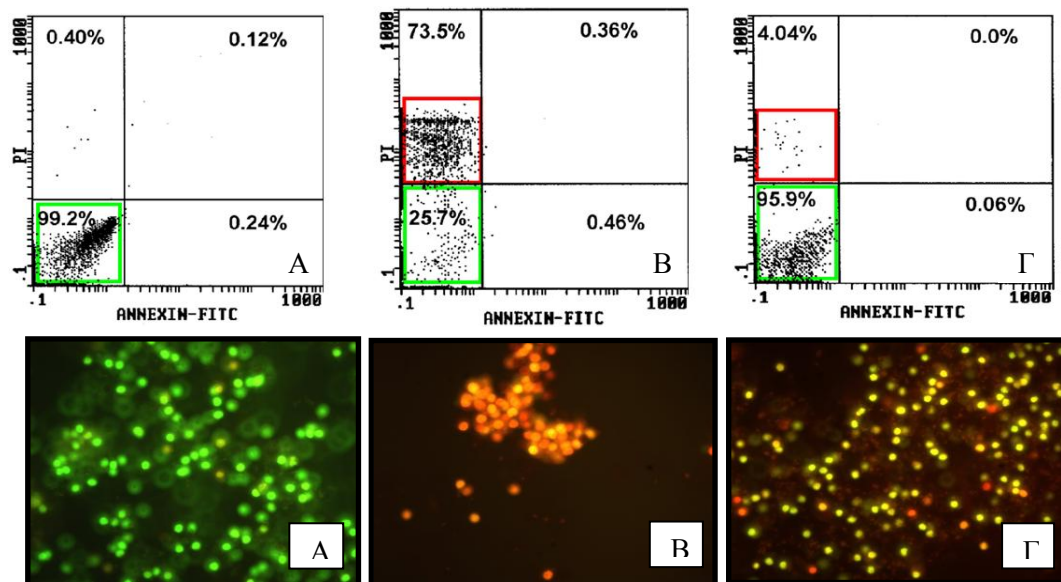
Κλάσμα μαστίχας	% Προστασία			
	M/N-E	M-M	OA-OA	E-E
Όξινο κλάσμα (NaOH)	65.0±18.7	-	-	-
Όξινο κλάσμα (Na ₂ CO ₃)	65.1±21.3	-	-	-
Ουδέτερο κλάσμα	19.6±18.7	-	-	-
Ρητίνη	75.3±19.5	74.7±19.5	73.2±18.9	69.0±22.5
Κολοφώνιο	73.0±9.3	-	-	-
Μαστιχέλαιο	77.8±19.3	-	-	-

Τα εκχυλίσματα παραλήφθηκαν με: (α) διάλυμα μεθανόλης/νερού με ακόλουθη έκπλυση με εξάνιο (M/N-E), (β) μεθανόλη x2 (M-M), (γ) οξικό αιθυλεστέρα x2 (OA-OA) και (δ) εξάνιο x2 (E-E). Η αξιολόγηση της % προστασίας πραγματοποιήθηκε βάσει της συγκέντρωσης των αντιδρώντων στοιχείων στο θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Andrikopoulos και συν, 2003

Ακολούθως, οι Dedoussis και συν (2004) μελετούν την επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας σε καλλιέργεια των PBMC. Παρατηρούν ότι η έκθεση των PBMC σε oxLDL προκαλεί κυτταροτοξικότητα ($60.1 \pm 2.0\%$ επιβίωση), αλλά αυτή αποτρέπεται μετά από προσθήκη εκχυλίσματος μαστίχας ($90.0 \pm 2.4\%$ επιβίωση). Ύστερα από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS), η μείωση νέκρωσης των κυττάρων από 73.5% σε 4.04% σηματοδοτεί την αντιοξειδωτική προστασία της ρητίνης (Εικόνες 2.5 και 2.6). Η μείωση στην έκφραση του CD36 υποδοχέα της oxLDL στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και η αναστολή μείωσης των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) ($p < 0.05$) αποτελούν δύο σημαντικούς μηχανισμούς δράσης της μαστίχας. Η καρδιοπροστατευτική δράση της πρόσληψης της μαστίχας Χίου επιβεβαιώνεται τρία χρόνια αργότερα (2007) στην κλινική μελέτη των Triantafyllou και συν, στην οποία συμμετέχουν 133 ασθενείς (40 άνδρες και 93 γυναίκες) με υψηλό λιπιδαιμικό προφίλ και ηλικία άνω των 50 ετών. Αιματολογικές εξετάσεις στο τέλος της παρέμβασης (18 μήνες) δείχνουν ότι το λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών βελτιώνεται σημαντικά ύστερα από ημερήσια κατανάλωση 5g μαστίχας ($N=48$) με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μειώσεις στην ολική χοληστερόλη, στην LDL, στην αναλογία ολικής χοληστερόλης/HDL, καθώς και στις απολιποπρωτεΐνες A-1 και -B ορού ($p < 0.05$). Βελτιώσεις σημειώνονται και στις ηπατικές παραμέτρους, γλουταμινική-οξαλοξική τρανσαμινάση (SGOT), γλουταμινική-πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT) και γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση (γ -GT) ορού ($p < 0.05$). Τα επίπεδα της γλυκόζης, των τριγλυκερίδιων και της HDL παραμένουν αμετάβλητα. Χαμηλότερη δόση των 5g μαστίχας ημερησίως ($N=85$) δεν επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 2.5 Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) των PBMC (πάνω). Παρατήρηση από μικροσκόπιο φθορισμού των PBMC (κάτω). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 48h απουσία οποιασδήποτε παρέμβασης (Α), παρουσία oxLDL (Β), καθώς και παρουσία μεθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας (Γ). Πράσινο χρώμα: επιζώντα κύτταρα, κίτρινο χρώμα: αποπτωτικά κύτταρα, πορτοκαλί χρώμα: νεκρωτικά κύτταρα. Dedoussis και συν, 2004



Εικόνα 2.6 Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) των PBMC (πάνω). Παρατήρηση από μικροσκόπιο φθορισμού των PBMC (κάτω). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 72h απουσία οποιασδήποτε παρέμβασης (Α), παρουσία oxLDL (Β), καθώς και παρουσία μεθανολικού εκχυλίσματος μαστίχας (Γ). Πράσινο χρώμα: επιζώντα κύτταρα, κίτρινο χρώμα: αποπτωτικά κύτταρα, πορτοκαλί χρώμα: νεκρωτικά κύτταρα. *Dedoussis και συν, 2004*

2.4 Αντιμικροβιακή δράση

Η μαστίχα χρησιμοποιείται ευρέως στον κλάδο της ιατρικής. Στη χειρουργική αποτελεί βασικό συστατικό των νημάτων για ράμματα, τα οποία απορροφώνται από τον ίδιο τον οργανισμό μετά την πάροδο κάποιων ημερών (Koutsoudaki και συν, 2005). Επιπρόσθετα, η μάσηση της συμβάλλει στην αντισηψία του στόματος και στο δυνάμωμα των ούλων (Topitsoglou-Themeli και συν, 1984). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως συστατικό στις οδοντόκρεμες και διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή τσίχλας. Στην οδοντογιατρική χρησιμοποιείται ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων οδοντοστοιχιών (Σαββίδης, 2000κ). Στην ορθοδοντική βοηθάει στη βελτίωση των ατελειών της οδοντοστοιχίας και στη λειτουργική ικανότητα των μασητήριων μυών. Η συστηματική μάσηση μαστίχας αφαιρεί ή περιορίζει σημαντικά το σχηματισμό των μικροβιακών πλακών. Με αυτόν τον τρόπο προλαμβάνεται η τερηδόνα και οι περιοδοντικές παθήσεις (Sterer, 2006). Σε ασθενείς με προχωρημένη τερηδόνα η μάσηση μαστίχας για 15min ελαττώνει το συνολικό βακτηριακό φορτίο, ενώ στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.001$) εμφανίζονται μετά από 135min μάσησης (Askoy και συν, 2007).

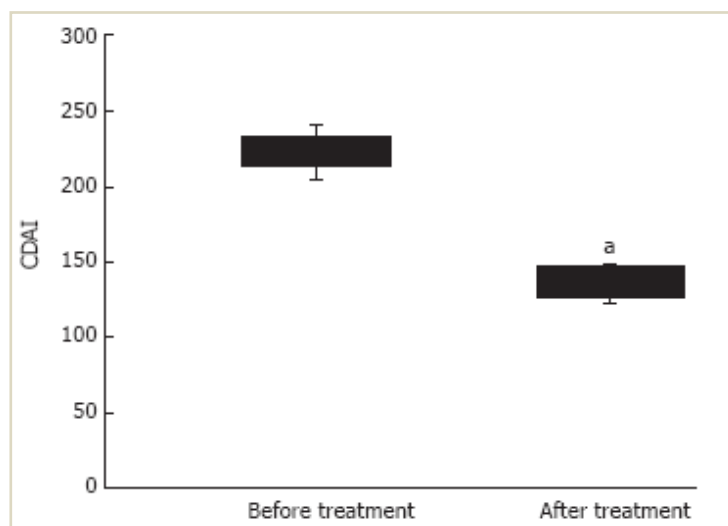
Οι αντιμικροβιακές ικανότητες της μαστίχας εκτείνονται και στην υπόλοιπη γαστρεντερική οδό. Αρκετές είναι οι μελέτες που αφορούν στη δράση της ρητίνης εναντίον του *Helicobacter pylori*, ενός gram αρνητικού και αερόβιου βακτηρίου που ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας ενεργούς

γαστρίτιδας, καθώς και μιας σειράς άλλων στομαχικών διαταραχών, όπως εξέλκωση, ατροφία, αδενοκαρκίνωμα και λέμφωμα (Peek και Crabtree, 2006). Οι πρώτες έρευνες *in vitro* δείχνουν ότι η μαστίχα Χίου είναι ικανή να καταπολεμήσει το *H. pylori* (Huwez και συν, 1998, Marone και συν, 2001), συμπέρασμα στο οποίο δεν καταλήγουν οι Louhglin και συν το 2003. Οι ερευνητές δεν παρατηρούν καμία επίδραση στην ενεργότητα της νόσου μετά από ημερήσια ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 4g μαστίχας σε μύες για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα πιλοτικής μελέτης, όπου 9 ασθενείς εξακολουθούν να παραμένουν θετικοί στο βακτήριο μετά από μία εβδομάδα πρόσληψης 4g μαστίχας ημερησίως (Bebb και συν, 2003). Παρόλα αυτά, ημερήσια πρόσληψη 0.75mg μαστίχας για 3 μήνες, φαίνεται να μειώνει τις αποικίες του *Helicobacter pylori* σειράς SS1 στο στόμαχο επιμολυσμένων μυών ($p=0.0024$), γεγονός το επιβεβαιώνεται και με ιστοπαθολογική εξέταση (Paraschos και συν, 2007).

Το μαστιχέλαιο χαρακτηρίζεται επίσης από αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοτερπένια καταπολεμά *in vitro* ποικιλία βακτηρίων που προσβάλλουν το πεπτικό σύστημα, όπως τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* (Koutsoudaki και συν, 2005).

2.5 Αντιφλεγμονώδης δράση (νόσος Crohn)

Η νόσος Crohn ανήκει στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ) με κύριο χαρακτηριστικό την παρουσία φλεγμονής στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου. 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 (**Εικόνα 2.7**). Σε συμφωνία με την παρατήρηση αυτή, η στατιστικά σημαντική μείωση δεικτών φλεγμονής ($p<0.05$), όπως της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), σε συνδυασμό με την αύξηση στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος ($p<0.05$), καταδεικνύουν τον ευεργετικό ρόλο της μαστίχας στην ΙΦΝΕ. Η επίδραση της ρητίνης στα απομονωμένα από τους παραπάνω ασθενείς PBMC επιβεβαιώνει τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του προϊόντος (Kaliora και συν, 2007b). Σε πρόσφατη μελέτη των Loizou και συν (2009), το ουδέτερο κλάσμα μαστίχας παρεμποδίζει την προσκόλληση των μακροφάγων (U937) στα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAEC) παρουσία TNF-α. Ταυτόχρονα, μειώνεται η έκφραση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF-κB), ενός παράγοντα «κλειδί» στο μονοπάτι της φλεγμονής ($p<0.05$).



Εικόνα 2.7 Η ενεργότητα της νόσου Crohn (CDAI) πριν (αριστερή μπάρα) και μετά (δεξιά μπάρα) από αγωγή με μαστίχα σε 10 ασθενείς. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης (4 εβδομάδες), οι εθελοντές λάμβαναν από του στόματος 2.2g μαστίχας ημερησίως σε μορφή κάψουλας. Οι οριζόντιες μπάρες αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση). ^a $p < 0.05$. Kaliora και συν, 2007a

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

3.1 Γενικά

Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται κυρίως στα μονο- και τριτερπένια, τα οποία φαίνεται να έχουν σημαντικές αντινεοπλασματικές, αντιοξειδωτικές, αντισηπτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα κυριότερα μονοτερπένια είναι η περιλλυλ-αλκοόλη, το λεμονένιο, η μενθόλη, η γερανιόλη και το α-πινένιο, τα οποία χρησιμοποιούνται και ως βελτιωτικά γεύσης και αρώματος στη βιομηχανία τροφίμων. Τα πιο σημαντικά τριτερπένια είναι το ολεανολικό και το ισομερές ουρσολικό οξύ.

3.2 Αντινεοπλασματική δράση

Τα μονοτερπένια έχουν την ικανότητα, όχι μόνο να αναστέλλουν την ανάπτυξη του καρκίνου (χημειοπροστατευτική δράση), αλλά και να δρουν θεραπευτικά (χημειοθεραπευτική δράση). Πολυάριθμες είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν τον ευεργετικό τους ρόλο σε πάγκρεας, μαστό, κόλον, ήπαρ, καθώς και στο δέρμα (Crowell, 1999). Μάλιστα, η περιλλυλ-αλκοόλη και το λεμονένιο κατέχουν την πρώτη θέση. Και τα δύο αυτά μονοτερπένια εμφανίζουν μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα τόσο στα πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Στους επίμυες μεταβολίζονται σε περιλλυλικό οξύ και διϋδροπεριλλυλικό οξύ (Crowell και συν, 1992), ενώ στον άνθρωπο παράγεται και ένα τρίτο προϊόν, η λιμονεν-1,2-διόλη (Crowell και συν, 1994).

3.3 Χημειοθεραπευτική δράση

3.3.1 Πάγκρεας

Η χημειοθεραπευτική δράση της περιλλυλ-αλκοόλης είναι πλέον επιβεβαιωμένη. Στη μελέτη των Stark και συν (1995) πραγματοποιείται έγχυση PC-1 αδеноκαρκινικών κυττάρων στο πάγκρεας χάμστερ και ακολουθεί περίοδος αναμονής έως ότου οι όγκοι αναπτυχθούν σε διάμετρο 2mm. Σε αυτό το σημείο, η περιλλυλ-αλκοόλη σε ποσότητα ίση προς 2-4% ενσωματώνεται στη δίαιτα των ζώων για 3 εβδομάδες. Ως αποτέλεσμα, οι όγκοι συρρικνώνονται σε $497 \pm 57 \text{ mm}^3$ έναντι $3121 \pm 120 \text{ mm}^3$ της ομάδας ελέγχου ($p < 0.05$). Μάλιστα, σε 5 από τα 25 χάμστερ παρουσιάζεται πλήρης υποχώρηση των νεοπλασμάτων, ενώ κανένα από τα ζώα δεν εμφανίζει τοξικότητα. Σε ό,τι αφορά το μηχανισμό δράσης, η περιλλυλ-αλκοόλη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ($p < 0.05$) των B12/13 αδеноκαρκινικών κυττάρων του παγκρέατος και ταυτόχρονα επάγει την απόπτωση τους ($p < 0.001$) (Stayrook και συν, 1997). Την ίδια στιγμή, η έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bak πολλαπλασιάζεται έως και 8 φορές, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά D27 παγκρεατικά αδενοκύτταρα. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων είναι «Bak-εξαρτώμενη».

3.3.2 Μαστοί

Μια άλλη μέθοδος επαγωγής νεοπλασμάτων είναι η χορήγηση τοξικογενών ουσιών. Το 7,12-διμεθυλβενζ[α]ανθρακένιο (DMBA) είναι προκαρκινογόνος ουσία και εφόσον μετατραπεί σε DMBA-3,4-διϋδροδιολ-1,2-εποξείδιο, δημιουργεί συμπλέγματα στο DNA. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο διαδοχικές οξειδώσεις που καταλύονται από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, όπως τα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1. Τα τρία αυτά ένζυμα εκφράζονται στο ήπαρ και στο μαστό και η ανάπτυξη του καρκίνου εξαρτάται από το βαθμό των παραπάνω οξειδώσεων (Rowlands και συν, 2001). Το 1994, οι Haag και Gould του πανεπιστημίου Wisconsin (ΗΠΑ) πραγματοποιούν δύο μελέτες, όπου εξετάζουν την επίδραση της περιλλυλ-αλκοόλης στον καρκίνο του μαστού σε επίμυες. Για το σκοπό αυτό, χορηγούν στα ζώα DMBA και περιμένουν μέχρι την ανάπτυξη όγκων διαμέτρου 3mm. Τρεις εβδομάδες μετά τον εμπλουτισμό της διατροφής τους με 2.5% περιλλυλ-αλκοόλη, οι όγκοι σε 22 από τους 27 επίμυες (81%) υποχωρούν πλήρως. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί τους ερευνητές σε δεύτερη *in vivo* μελέτη, στην οποία εξετάζουν την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του μονοτερπενίου σε όγκους που έχουν ήδη φτάσει τα 10mm. Ύστερα από 15 εβδομάδες παρέμβασης, ο εμπλουτισμός της δίαιτας με 2% περιλλυλ-αλκοόλης οδηγεί στη πλήρη συρρίκνωση των όγκων σε 10 από τα 20 ζώα, με άλλα 5 να εμφανίζουν μερική βελτίωση. Παρόλα αυτά, πρόσληψη τροφής εμπλουτισμένη με περιλλυλ-αλκοόλη 3% οδηγεί στην εμφάνιση τοξικότητας και στο θάνατο κάποιων ζώων. Η παρατήρηση αυτή δεν είναι σε συμφωνία με εκείνη των Stark και συν (1995) που υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση του μονοτερπενίου στην ίδια συγκέντρωση είναι απολύτως ασφαλής. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και αυτό οφείλεται σε μεθοδολογικές αδυναμίες. Η πρόσληψη τροφής εξαρτάται τόσο από το σωματικό βάρος όσο και από τον αριθμό των ζώων που βρίσκονται σε κάθε κελί. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τρωκτικά διατηρούν ένα είδος ιεραρχίας με εμφανή την παρουσία του «ισχυρότερου» και του πιο «αδύναμου». Όσο περισσότερα ζώα απαρτίζουν μια ομάδα, τόσο πιο δύσκολος καθίσταται ο υπολογισμός πρόσληψης της τροφής. Στη μελέτη των Haag και Gould (1994) σε κάθε κλουβί διαβιούν μόλις δύο ζώα, ενώ σε αυτήν των Stark και συν (1995) δεν αναφέρεται. Επιπλέον, οι τροφές που χορηγούνται έχουν διαφορετική σύσταση (π.χ. σε αντιοξειδωτικά). Η επιλογή της καθαρής σειράς (strain) των ζώων πρέπει να επιλέγεται με αυστηρά κριτήρια για τις ανάγκες της μελέτης. Έτσι, το λεμονένιο φαίνεται να μειώνει την επίπτωση του καρκίνου των νεφρών στους F344 επίμυες ($p < 0.001$), όχι όμως στους NCI-Black-Reiter επίμυες, λόγω της απουσίας έκφρασης της $\alpha 2$ γλοβουλίνης στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος (Dietrich και Swenberg, 1991).

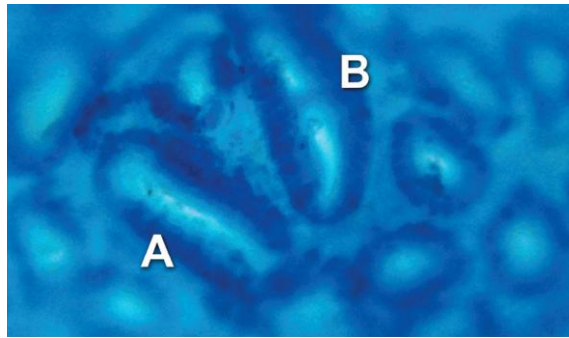
3.3.3 Ήπαρ

Η χημειοθεραπευτική δράση της περιλλυλ-αλκοόλης αναφέρεται και στο ήπαρ. Η δημιουργία ηπατικών καρκινωμάτων στα πειραματόζωα επιτυγχάνεται με τη χορήγηση της διαιθυλνιτροζαμίνης (DEN). Αυτή προκαλεί ηπατική νέκρωση και γονιδιακές μεταλλάξεις (Liao και

συν, 2001). Μετά από 19 εβδομάδες ενσωμάτωσης 1% περιλλυλ-αλκοόλης στη διατροφή των επίμυων με DEN-ηπατικό καρκίνο, το μέγεθος των όγκων μειώνεται έως και 10 φορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Mills και συν, 1995). Μάλιστα, στους μεγάλους όγκους η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αυξάνεται έως και 5 φορές ($p<0.01$) και στους μικρούς έως και 10 φορές ($p<0.001$). Τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα για τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού- β (TGF- β) αυξάνονται σημαντικά ($p<0.05$), επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση. Αντίθετα, στην *in vitro* μελέτη των Löw-Baselli και συν (2000), η περιλλυλ-αλκοόλη δεν έχει ευεργετικές επιδράσεις στα αρχικά στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης.

3.3.4 Πεπτικό σύστημα

Παρά την έλλειψη δεδομένων για τις αντινεοπλασματικές ιδιότητες των τριτερπενίων, πειράματα σε σειρές καρκινικών κυττάρων τονίζουν τη χημειοθεραπευτική τους δράση (Setzer και Setzer, 2003). Τα πιο μελετημένα τριτερπένια είναι το ολεανολικό και το ουρσολικό οξύ. Πρόσφατη έρευνα σε επίμυες εξετάζει την από του στόματος πρόσληψη των παραπάνω ισομερών στην εξέλιξη του καρκίνου στο κόλον (Furtado και συν, 2003). Αρχικά, χορηγείται στα ζώα 1,2-διμεθυλυδραζίνη (DMH) για δύο εβδομάδες. Αυτή προκαλεί βλάβη στις εντερικές κρύπτες με την παρουσία επιβλαβών αδένων σωληνοειδούς μορφής (**Εικόνα 3.1**). Οι αλλοιώσεις αυτές, γνωστές ως “aberrant crypt foci” (ACF), αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρκίνου στο κόλον. Ακολούθως, τα ζώα λαμβάνουν ολεανολικό, ουρσολικό ή μίγμα ολεανολικού-ουρσολικού οξέος (35%-65%) σε δόση ίση προς 25mg/Kg ΣΒ για 5 φορές εβδομαδιαίως. Στο τέλος των δύο εβδομάδων παρέμβασης, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι όλα τα παραπάνω τερπένια οδηγούν σε πλήρη απουσία των ACF ($p<0.05$). Σημαντικό πλεονέκτημα της μελέτης είναι ότι τα τριτερπένια δίνονται με τη βοήθεια γαστρο-οισοφαγικού καθετήρα, γεγονός το οποίο επιτρέπει την ακριβέστερη χορήγηση τους. Στη μελέτη των Yamai και συν (2009) τα τριτερπένια ενισχύουν τη συμβατική θεραπεία στον καρκίνο του οισοφάγου και η αντινεοπλασματική αυτή δράση ίσως να οφείλεται στον ισχυρό αντιοξειδωτικό τους ρόλο (Ovesná και συν, 2006) και στην ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την αγγειογένεση (Sogno και συν, 2009). Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες εστιάζουν στα συνθετικά παράγωγα του ολεανολικού οξέος (CDDO, CDDO-Me, CDDO-Imm), τα οποία φαίνεται να έχουν επίσης αντικαρκινικές ιδιότητες (Gao και συν, 2007, Sogno και συν, 2009). Κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους βρίσκονται σε εξέλιξη.



Εικόνα 3.1 Παρουσία “aberrant crypt foci” (ACF) στο κόλον επίμυων τύπου Wistar μετά από αγωγή με 1,2-διμεθυλδραζίνη (DMH). Φωτογραφία από φωτονικό μικροσκόπιο (100x) χρησιμοποιώντας χρωστική μπλε-μεθυλενίου. Οι εστίες ACF είναι εμφανείς (A,B). *Furtado και συν, 2003*

3.3.5 Αγγειογένεση

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης των μονοτερπενίων είναι η αναστολή της αγγειογένεσης (Loutrari και συν, 2009). Η περιλλυλ-αλκοόλη παρεμποδίζει την αγγειογένεση σε έμβρυα πτηνών, αυξάνοντας την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ($p < 0.05$) διαμέσου της ενισχυμένης δράσης των κασπασών. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της ακτίνης. Η απελευθέρωση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (VEGF) μειώνεται, ενώ η έκφραση της αγγειοποιητίνης 2 (Ang2) αυξάνεται ($p < 0.05$). Ο VEGF παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα ως απάντηση στις ογκογενικές πρωτεΐνες Ras, αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων και αυτά πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αγγείων. Αντίθετα, η Ang2 εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει την αποικοδόμηση των αγγείων.

3.3.6 Κλινικές δοκιμές

Παρόλα αυτά, οι κλινικές δοκιμές σε καρκινοπαθείς είναι αποθαρρυντικές. Πολύ πρόσφατη είναι η μελέτη των Bailey και συν (2008) σε 14 γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Σε αυτήν 1200mg/m^2 ή 1500mg/m^2 περιλλυλ-αλκοόλης προσλαμβάνονται 4 φορές ημερησίως σε κύκλους 28-ωρου. Η εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως κόπωση και γαστρεντερικά προβλήματα, οδηγεί σε διακοπή της μελέτης με μόνο δύο ασθενείς να λαμβάνουν το μονοτερπένιο για πάνω από δύο κύκλους. Καμία μεταβολή δεν παρατηρείται στην εξέλιξη του καρκίνου, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης της ίδιας ερευνητικής ομάδας (2004). Αν και τα μεταβολικά προϊόντα της περιλλυλ-αλκοόλης ανιχνεύονται στο αίμα των ασθενών, τα επίπεδα του TGF- β πλάσματος και η έκφραση των πρωτεϊνών Ras παραμένουν αμετάβλητα. Ομοίως, στην πιλοτική μελέτη των Matos και συν (2008) το μέγεθος των παγκρεατικών όγκων παραμένει ως έχει, αλλά ο χρόνος ζωής των ασθενών τείνει να αυξάνεται ($p = 0.2$). Υπάρχει τάση αύξησης της

απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και κανένας ασθενής δεν εμφανίζει τοξικότητα. Αρνητικά είναι και τα αποτελέσματα τοπικής εφαρμογής της περιλλυλ-αλκοόλης σε ήπιες δερματικές αλλοιώσεις που οφείλονται στη UV ακτινοβολία (Stratton και συν, 2008). Τέλος, πρόσληψη 55mg περιλλυλ-αλκοόλης επί 4 φορές ημερησίως για έξι μήνες, μειώνει έως και 50% το μέγεθος των όγκων στο 3.4% των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (da Fonseca και συν, 2008a,b).

3.4 Χημειοπροστατευτική δράση

3.4.1 Κόλον

Τα μονοτερπένια δρουν και χημειοπροστατευτικά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Reddy και συν (1997), οι οποίοι εξετάζουν την επίδραση της περιλλυλ-αλκοόλης στον καρκίνο του κόλου. Για δύο εβδομάδες πριν την έναρξη, αλλά και κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, ενσωματώνουν στη δίαιτα των επίμυων περιλλυλ-αλκοόλη ίση προς 1 ή 2g/Kg τροφής. Η επαγωγή καρκίνου στο κόλον γίνεται με χορήγηση αζοξομεθανίου (AOM). Αυτό έχει την ικανότητα να υδροξυλιώνεται σε μεθυλαζοξομεθανόλη που με τη σειρά της αλκυλιώνει το DNA (Nagasawa και συν, 1972). Μετά από 52 εβδομάδες παρέμβασης με 1g περιλλυλ-αλκοόλης/Kg τροφής, το ποσοστό των επίμυων με επιθετικό καρκίνο είναι 8.3% έναντι 27.7% της ομάδας ελέγχου ($p<0.05$). Η πρόσληψη 2g μονοτερπενίου/Kg τροφής δεν έχει σημαντικές επιδράσεις στον επιθετικό καρκίνο, αλλά καταφέρνει να μειώσει τον αριθμό μικρών αδενοκαρκινωμάτων στο 50% της ομάδας ελέγχου ($p<0.05$). Στην ίδια έρευνα, η δράση και των δύο δόσεων περιλλυλ-αλκοόλης οφείλεται στην αύξηση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων ($p<0.0001$), κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου.

3.4.2 Μαστοί

Παρόμοια είναι και η χημειοπροστατευτική δράση του λεμονενίου. Όταν η πρόσληψη λεμονενίου (10% τροφής) προηγείται μίας εβδομάδας της χορήγησης DMBA, τότε το μέγεθος των όγκων στο μαστό επίμυων μειώνεται έως και 72% στο τέλος των 18 εβδομάδων αγωγής (Elegbede και συν, 1984). Επτά χρόνια αργότερα (1991), οι Maltzman και συν παρατηρούν ότι η παραπάνω χημειοπροστασία οφείλεται στην ικανότητα του μονοτερπενίου να αναστέλλει την τοξικότητα του DMBA. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη λεμονενίου (5% της τροφής) δύο εβδομάδες πριν την επαγωγή καρκίνου, αυξάνει τη νεφρική απέκκριση του DMBA και των μεταβολιτών του κατά 2.3 φορές. Ταυτόχρονα, μειώνεται ο σχηματισμός συμπλόκων DMBA-DNA έως και 50% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το λεμονένιο φαίνεται να εμπλέκεται στο μονοπάτι της ηπατικής αποτοξίνωσης φάσης I, μιας και αυξάνονται τα επίπεδα των ενζύμων CYP2B και 2C του κυτοχρώματος P450, καθώς και της εποξειδικής υδρατάσης ($p<0.05$). Η ομάδα των Elegbede και συν (1993) αποκαλύπτει ότι η παραπάνω δίαιτα διεγείρει και το μονοπάτι αποτοξίνωσης φάσης II. Συγκεκριμένα, αυξάνονται τα επίπεδα τόσο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης ($p<0.05$) όσο και της GSH ($p<0.05$) στο

ήπαρ. Ακόμα, παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση των ισοενζύμων UDP-GT (διφοσφογλυκορονοσυλ-τρανσφεράση της ουριδίνης) ($p < 0.05$).

3.4.3 Δέρμα

Τα μονοτερπένια προλαμβάνουν και τον καρκίνο του δέρματος. Μία εβδομάδα πριν την εκπομπή ακτινοβολίας UV σε μύες, διάλυμα περιλλυλ-αλκοόλης σε ακετόνη (1 ή 10mM) εφαρμόζεται δερματικά 3 φορές την εβδομάδα. Έπειτα και για 18 εβδομάδες, τα ζώα εκτίθενται σε ακτινοβολία UVB της τάξης των $1.1 \times 10^6 \text{ J/m}^2/\text{s}$. Τριάντα λεπτά μετά την έκθεση στην ακτινοβολία και για 3 φορές την εβδομάδα, ακολουθεί αγωγή με περιλλυλ-αλκοόλη στα αυτιά και στο δέρμα. Στο τέλος των 18 εβδομάδων παρέμβασης, η συγκέντρωση των 10mM περιλλυλ-αλκοόλης προκαλεί μελανώματα μόλις στο 7% των επίμυων, σε αντίθεση με το 37% της ομάδας ελέγχου. Μάλιστα, στο τέλος των 22 εβδομάδων, η περιλλυλ-αλκοόλη (10mM) μειώνει και το μέγεθος των όγκων σε 32mm^2 έναντι 100mm^2 της ομάδας ελέγχου (Batherlman και συν, 1998). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην κατά 75% αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα AP-1. Ο AP-1 διεγείρεται από την έκθεση σε UVB και UVC διαμέσου ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που μεταγωγείται από τις ογκογονικές πρωτεΐνες Ras. Η περιλλυλ-αλκοόλη πιθανώς να εμπλέκεται σε αυτό τον καταρράκτη αντιδράσεων απενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση του AP-1.

3.5 Αντιοξειδωτική δράση

Παρά την έλλειψη δεδομένων για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μονοτερπενίων, αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί στα αιθέρια έλαια (Grassmann, 2005). Τα μονοτερπένια, που απαντούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις, φαίνεται να αποτελούν τα βιοδραστικά συστατικά. Παρεμποδίζουν το φαινόμενο της οξείδωσης είτε με τη μεταφορά ατόμων υδρογόνου στις ρίζες λιποειδών είτε δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες. Σύμφωνα με τις πρώτες μελέτες, τα φαινολικά μονοτερπένια, όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη, φαίνεται να ευθύνονται για την αντιοξειδωτική δράση (Aeschbach και συν, 1994, Schwarz και συν, 1996). Λίγα χρόνια όμως αργότερα, οι Choi και συν (2000) παρατηρούν ότι ακόμη και μη φαινολικά μονοτερπένια, όπως το γ-τερπινένιο, είναι ικανά να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Η ανακάλυψη ότι τα φυτικά έλαια (π.χ. ηλιέλαιο) προστατεύονται από την υπεροξείδωση κατά τη θέρμανση, προσδίδει στα μονοτερπένια την ιδιότητα του φυσικού συντηρητικού (Abdalla και Roozen, 1999, Dang και συν, 2001, Schwarz και συν, 1992, Youdim και συν, 1999). Επιπρόσθετα, η ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) *in vitro*, ίσως να αποτελεί ένδειξη για καρδιοπροστατευτική δράση (Grassmann και συν, 2003, Grassmann και συν, 2001, Takahashi και συν, 2003, Teissedre και Waterhouse, 2000).

Σε ό,τι αφορά τα τριτερπένια, τα δεδομένα από *in vivo* πειράματα είναι ενθαρρυντικά (Somova και συν, 2003). Επίμυες με ιδιοπαθή υπέρταση λαμβάνουν από του στόματος ποσότητα

ολεανολικού ή ουρσολικού οξέος ίση προς 50mg/Kg ΣΒ ημερησίως. Ως αποτέλεσμα των 6 εβδομάδων παρέμβασης, η αύξηση της πίεσης προλαμβάνεται σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p<0.05$). Συγκεκριμένα, η καρδιακή συχνότητα μειώνεται (κατά 34% και 32%, αντίστοιχα), η LDL πλάσματος ελαττώνεται (έως και 2 φορές), ενώ η νεφρική λειτουργία ενισχύεται. Παράλληλα, παρατηρείται βελτίωση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος διότι αυξάνονται τα επίπεδα της GSH (κατά 12% και 10%, αντίστοιχα) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) (κατά 12% και 22%, αντίστοιχα). Στην ίδια μελέτη, το ολεανολικό και το ουρσολικό οξύ μειώνουν τη γλυκόζη αίματος κατά 20% και 50%, αντίστοιχα. Άλλωστε, σε πιο πρόσφατη *in vitro* μελέτη το ολεανοϊκό οξύ φαίνεται να αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης από τα INS-1 832/13 παγκρεατικά κύτταρα ($p<0.05$) (Teodoro και συν, 2008). Οι Senthil και συν (2007), όταν χορηγούν στο μυοκάρδιο υγιών επίμων ισοπροτερενόλη (ISO), παρατηρούν αύξηση της οξειδωσης των κατεχολαμινών και επαγωγή οξειδωτικής βλάβης που αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους κινδύνους εμφάνισης ισχαιμικού επεισοδίου. Όταν δίνεται ολεανολικό ή ουρσολικό οξύ σε δόση ίση προς 40mg/Kg ΣΒ ημερησίως για 9 μέρες, τα τριτερπένια αυτά προστατεύουν το μυοκάρδιο αυξάνοντας τα επίπεδα της SOD (κατά 58% και 89%, αντίστοιχα) και της GSH (κατά 66% και 86%, αντίστοιχα). Την ίδια στιγμή αυξάνονται οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης C (κατά 40% και 54%, αντίστοιχα) και της βιταμίνης E (κατά 48% και 77%, αντίστοιχα) στον ιστό. Το ουρσολικό οξύ τείνει να έχει μεγαλύτερη προστατευτική δράση από ότι το ολεανολικό. Όλα τα αποτελέσματα είναι σημαντικά, ωστόσο δεν αναφέρεται ούτε η σύσταση της συνήθους διατροφής των ζώων ούτε οι συνθήκες διαβίωσής τους, παράγοντες οι οποίοι μπορούν να εμπλακούν στην αξιοπιστία και στην εγκυρότητα των πειραμάτων.

3.6 Αντιμικροβιακή δράση

Πολυάριθμες είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων *in vitro* (Kalembe και Kunicka, 2003). Φαίνεται να καταπολεμούν βακτήρια που προσβάλλουν πολλαπλά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, όπως το αναπνευστικό (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*) και το πεπτικό (*Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*) (Inouye και συν, 2001a,b, Ohno και συν, 2003).

Τα τριτερπένια καταπολεμούν μια πληθώρα βακτηρίων μεταξύ των οποίων τα *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Salmonella typhi*. Επίσης, εμφανίζουν και μυκητοκτόνο δράση έναντι των *Candida albicans*, *Candida krusei* και *Cryptococcus neoformans* (Mutai και συν, 2009, Shai και συν, 2008, Taborpa και συν, 2009). Η υποχώρηση της γαστρίτιδας σε μύες προσβεβλημένους από *Helicobacter pylori* μετά από δίαιτα εμπλουτισμένη σε τριτερπένια ενισχύει την παραπάνω αντιβακτηριδιακή δράση (Lee και συν, 2010).

3.7 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τελευταίες μελέτες σε ενεργοποιημένα μακροφάγα δείχνουν ότι τα αιθέρια έλαια είναι ικανά να ελαττώσουν σημαντικούς δείκτες φλεγμονής, όπως τις προφλεγμονώδεις ιντερλευκίνες IL-1, IL-6, καθώς και τον TNF- α (Dung και συν, 2009, Rodrigues και συν, 2009). Ιδιαίτερο, ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι έρευνες σε ζωικά μοντέλα ΙΦΝΕ. Η επαγωγή της νόσου Crohn στα ζώα γίνεται με τη χορήγηση με υποκλυσμό του τρινιτροβενζολοσουλφονικού οξέος (TNBS). Η ενσωμάτωση μίγματος αιθέριων ελαίων από ρίγανη και θυμάρι για 7 μέρες στη συνήθη δίαιτα των TNBS-μυών, μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των IL-1 και IL-6 στο προσβεβλημένο κόλον ($p < 0.01$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το ίδιο συμβαίνει και για τα επίπεδα mRNA των IL-1, IL-6, όχι όμως του TNF- α . Μορφολογικές βελτιώσεις στο βλεννογόνο επιβεβαιώνουν την υποχώρηση της φλεγμονής μακροσκοπικά, κάτι το οποίο όμως δεν φαίνεται να συμβαίνει και μικροσκοπικά (Bukovská και συν, 2007). Στη μελέτη των Dundar και συν (2008), η ενδοπεριτοναϊκή και η ενδοκολονική έγχυση αιθέριου ελαίου ρίγανης σε TNBS-επίμυες για 7 μέρες μειώνει τη φλεγμονή τόσο μακροσκοπικά, όσο και μικροσκοπικά.

Τα τριτερπένια χαρακτηρίζονται και εκείνα από αντιφλεγμονώδη δράση. Πρόσληψη μίγματος α - και β -αμυρίνης 1:1 για 7 μέρες σε ποσότητα ίση προς 3mg/Kg ΣΒ ημερησίως, μειώνει τα επίπεδα της IL-1 ($p < 0.05$) και τείνει να αυξάνει αυτά της αντιφλεγμονώδους IL-10 στο κόλον μυών με TNBS κολίτιδα (Vitor και συν, 2009). Στη μελέτη αυτή ζώα με χορήγηση δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιούνται ως ομάδα θετικού ελέγχου. Μετά από ανοσοϊστοχημική ανάλυση, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα τριτερπένια, και όχι η δεξαμεθαζόνη, μειώνουν την έκφραση του πυρηνικού παράγοντα- κB (NF- κB). Η μικροσκοπική βελτίωση των αλλοιώσεων στο βλεννογόνο του εντέρου επιβεβαιώνει τον παραπάνω ρόλο των τριτερπενίων. Ευεργετικές είναι και οι επιδράσεις τους σε RAW264.7 μακροφάγα μυών παρουσία λιποπολυσακχαριδίου (LPS) (Ding και συν, 2009). Η LPS διεγείρει τα μακροφάγα οδηγώντας σε έκφραση κυτταροκινών, όπως της IL-6 και του TNF- α . Ως αποτέλεσμα της χορήγησης τριτερπενίων απομονωμένων από τα φύλλα του *Rhus sylvestris* Siebold και *Zucc* (*Anacardiaceae*), οι παραπάνω δείκτες φλεγμονής μειώνονται σημαντικά ($p < 0.05$). Ανάμεσά τους είναι και η β -αμυρίνη η οποία μειώνει τα επίπεδα του TNF- α ακόμα και σε συγκέντρωση της τάξης 0.01 μM .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Η ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

4.1 Εισαγωγή

Η ιδιοπαθής φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΙΦΝΕ) αναφέρεται στη νόσο Crohn (Crohn's Disease) και στην ελκώδη κολίτιδα (Ulcerative Colitis). Αποτελεί χρόνια πάθηση του πεπτικού συστήματος και η διάγνωση της γίνεται συνήθως μεταξύ της 3ης και 4ης δεκαετίας της ζωής, χωρίς να παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα. Περίπου το 20% των ασθενών με ΙΦΝΕ θα εμφανίσει συμπτώματα κατά την παιδική ηλικία, ενώ το 5% θα διαγνωστεί πριν την ηλικία των 10 ετών (Hendrickson και συν, 2002).

Η επίπτωση της ΙΦΝΕ, δηλαδή ο αριθμός των ατόμων που θα νοσήσουν σε διάστημα ενός έτους, ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Η Βόρεια Αμερική και η Βόρεια και Δυτική Ευρώπη έχουν τη μεγαλύτερη επίπτωση και στις μέρες μας εκτιμάται γύρω στα 3 με 14 περιστατικά ανά 100.000 άτομα (Lakatos, 2006, Loftus και συν, 2007). Στην Αυστραλία, καθώς και στη Νότια και Κεντρική Ευρώπη οι περιπτώσεις είναι λιγότερες, ενώ στην Ασία και στην Αφρική είναι σπάνιες. Αυτό υποδηλώνει τη σημασία του περιβαλλοντικού παράγοντα στην εκδήλωση της νόσου, ωστόσο θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το εκάστοτε σύστημα υγειονομικής περίθαλψης. Η συχνότητα της ΙΦΝΕ είναι υψηλότερη στις αστικές περιοχές από ότι στις αγροτικές και μεγαλύτερη στις πλουσιότερες τάξεις από ότι στις φτωχότερες (Karlinger και συν, 2000). Οι νέγροι είναι πιο επιρρεπείς από τους λευκούς και οι Καυκάσιοι και οι Εβραίοι αποτελούν πληθυσμούς με τον υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Karlinger και συν, 2000). Η επίπτωση της ΙΦΝΕ παρουσιάζει δυο ηλικιακές αιχμές. Η πρώτη είναι μεταξύ 15 και 30 ετών, ενώ η δεύτερη εμφανίζεται μεταξύ των 60 και 80 ετών. Τέλος, όσον αφορά στα ποσοστά θνητότητας, τα υψηλότερα παρατηρούνται κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της νόσου και στην παρατεταμένη διάρκεια αυτής εξαιτίας του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου (Harrison, 2005).

4.2 Παθογένεια

Η παθογένεια της ΙΦΝΕ παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη. Ωστόσο, πιθανολογείται ότι ένας συνδυασμός γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων οδηγεί σε διαταραχή της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης και τελικά, στην εμφάνιση της νόσου (Neuman και συν, 2007).

Γενετικοί παράγοντες: Υπάρχουν ενδείξεις ότι το γενετικό υπόβαθρο παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της ΙΦΝΕ. Έχει διαπιστωθεί ότι η επίπτωση της είναι υψηλότερη στους μονοωογενείς από ότι στους διωογενείς διδύμους (Orholm και συν, 1991) και ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς των ασθενών διατρέχουν 10-15 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της (Cecil, 2003). Συγκεκριμένα, η παθογένεια της νόσου Crohn σχετίζεται με το γονίδιο CARD15/NOD (Mathew και Lewis, 2004) και τελευταία δεδομένα υποστηρίζουν ότι η γενετική προδιάθεση συνδέεται περισσότερο με τη νόσο

Crohn από ότι με την ελκώδη κολίτιδα. Η επίπτωση της τελευταίας μεταξύ μονογενών διδύμων είναι μόλις 6-14%, ενώ εκείνη της νόσου Crohn 44-50% (Farrell και Peppercorn, 2002). Τέλος, η εμφάνιση της ΙΦΝΕ φαίνεται να συνδέεται και με ορισμένα γενετικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Turner (Harrison, 2005).

Ανοσολογικοί παράγοντες: Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γαστρεντερικό σύστημα βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς αλλά ελεγχόμενης φλεγμονής. Αυτή ρυθμίζεται με τη μεσολάβηση μικρών πεπτιδίων, γνωστές ως κυτταροκίνες (Cecil, 2003). Οι τελευταίες παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες (IL), τις ιντερφερόνες (IFN), τις μονοκίνες και τις λεμφοκίνες. Κάποιες κυτταροκίνες προάγουν την φλεγμονή (π.χ. TNF-α, IL-1, IL-6 και IL-8), ενώ κάποιες άλλες έχουν ανοσορρυθμιστική (π.χ. IFN-γ, IL-12 και IL-18) ή αντιφλεγμονώδη δράση (π.χ. IL-10 και TGF-β). Στην ΙΦΝΕ κλονίζεται η ισορροπία της ομοιόστασης με αποτέλεσμα διαταραχή στην έκφραση των προφλεγμονωδών, των ανοσορρυθμιστικών και των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών.

Λοιμώδεις παράγοντες: Η ΙΦΝΕ ενδεχομένως να έχει και λοιμώδη αιτιολογία (Geier και συν, 2007). Αν και η απάντηση σε ένα αντιγόνο εξαρτάται από το γενετικό υπόστρωμα του ατόμου, η έκθεση σε παθογόνα (π.χ. *Salmonella*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*) μπορεί να πυροδοτήσει μια μη ελεγχόμενη φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί τελικά στην έναρξη της νόσου (Harrison, 2005). Σε έναν υγιή γαστρεντερικό σωλήνα, η μικροχλωρίδα του εντέρου ελέγχει την έκφραση των «ανοσο-υπεύθυνων» γονιδίων. Αντίθετα, στους ασθενείς με ΙΦΝΕ χάνεται η παραπάνω ικανότητα και η έκκριση των παραγόντων φλεγμονής διαταράσσεται. Η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού βακτηρίων στο κόλον ασθενών αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι η φυσιολογική χλωρίδα παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΙΦΝΕ (Harrison, 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι για την εμφάνιση της ΙΦΝΕ σε πειραματόζωα είναι απαραίτητη η παρουσία εντερικής χλωρίδας (Panza και συν, 1987).

Ψυχοκοινωνικοί παράγοντες: Διάφοροι ψυχοκοινωνικοί παράγοντες πιθανώς να συμμετέχουν στην επιδείνωση των συμπτωμάτων. Έρευνες αναφέρουν ότι τα δυσμενή γεγονότα της ζωής μπορούν να συμβάλουν στην υποτροπή της νόσου (Mawdsley και συν, 2006). Γεγονότα, όπως οι ασθένειες, ο θάνατος αγαπημένου προσώπου, οι διαπροσωπικές διαμάχες ή άλλες σημαντικές απώλειες συσχετίζονται με επίταση των συμπτωμάτων, επιφέροντας άλγος, δυσλειτουργία του εντέρου και αιμορραγία (Harrison, 2005). Το καθημερινό έντονο στρες μπορεί, επίσης, να επιδεινώσει τα συμπτώματα. Υπάρχει η υπόθεση ότι οι ασθενείς με ΙΦΝΕ είναι πιο ευπρόσβλητοι στο συγκινησιακό στρες. Ωστόσο, η συναισθηματική δυσλειτουργία θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της χρόνιας νόσου παρά αιτία.

Κάπνισμα: Άλλος ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας είναι το κάπνισμα (Danese και συν, 2004). Το κάπνισμα έχει διαφορετική επίδραση στην ελκώδη κολίτιδα και στη νόσο Crohn. Ο κίνδυνος εμφάνισης ελκώδους κολίτιδας στους καπνιστές είναι στο 40% αυτού των μη καπνιστών (Cecil, 2003). Μια δεύτερη άποψη υποστηρίζει ότι το κάπνισμα είναι προστατευτικός παράγοντας

στην εμφάνιση ελκώδους κολίτιδας, εφόσον μερικοί ασθενείς εμφανίζουν τα συμπτώματα 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 εκείνη στους μη καπνιστές πάσχοντες από τη νόσο.

4.3 Παθολογοανατομική εικόνα

4.3.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Η ελκώδης κολίτιδα είναι ασθένεια του βλεννογόνιου χιτώνα. Συνήθως, ξεκινά από το τελικό τμήμα του ορθού και επεκτείνεται περιλαμβάνοντας τμήμα ή ακόμα και ολόκληρο το κόλον (Cecil, 2003). Η κεντρική εξάπλωση (διασπορά) είναι συνεχής και ο βλεννογόνος εμφανίζεται ερυθρηματώδης με λεπτοκοκκώδη επιφάνεια. Σε μεγαλύτερου βαθμού φλεγμονή, εκδηλώνονται αιμορραγία, οίδημα και εξελκώσεις. Κατά την ύφεση της νόσου, το παχύ έντερο έχει φυσιολογική εικόνα, αλλά σε ασθενείς που πάσχουν πολλά χρόνια, ο βλεννογόνος είναι ατροφικός και το κόλον γίνεται στενότερο και βραχύτερο (Harrison, 2005). Η παρουσία ψευδοπολύποδα στις φλεγμαίνουσες περιοχές είναι συχνή (Cecil, 2003).

Η νόσος Crohn εντοπίζεται σε οποιαδήποτε περιοχή του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμα έως και τον πρωκτό. Συνήθως προσβάλλει το τελικό τμήμα του ειλεού, για το λόγο αυτό καλείται και «εντερίτιδα». Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η διασπορά της είναι τμηματική και διατοιχωματική. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η εμφάνιση συμφύσεων μεταξύ των εντερικών ελίκων, καθώς και προς άλλα όργανα είναι συνήθης. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται ψηλαφητές μάζες, συρίγγια, καθώς και απόφραξη του εντέρου. Κίνδυνος καρκίνου υπάρχει και στην νόσο Crohn, αλλά είναι μικρότερους σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα (Cecil, 2003).

4.3.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

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

Στη νόσο Crohn, τα ιστολογικά ευρήματα είναι παρόμοια, με τη διαφορά ότι προσβάλλονται όλα τα στρώματα του εντερικού τοιχώματος από το βλεννογόνο έως και τον ορογόνο υμένα. Τα παχιά και άκαμπτα τοιχώματα είναι διηθημένα από ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα με σχηματισμό κοκκιωμάτων (Cecil, 2003).

4.4 Συμπτωματολογία

Η ΙΦΝΕ χαρακτηρίζεται από περιόδους έξαρσης και ύφεσης και η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από το βαθμό ενεργότητας της νόσου (Hendrickson και συν, 2002). Το κυριότερο σύμπτωμα της ελκώδους κολίτιδας είναι κοιλιακός άλγος και διάρροια συνοδευμένη από αίμα ή/και βλέννα. Το άλγος εμφανίζεται συνήθως στο κατώτερο δεξί τερτημόριο της κοιλιακής περιοχής, όμως σε σοβαρότερες περιπτώσεις εκτείνεται σε όλη την περιτοναϊκή κοιλότητα (πανκολίτιδα). Στα συμπτώματα περιλαμβάνονται ανορεξία, ναυτία, έμετος, πυρετός, αλλά και απώλεια βάρους. Σε αυτή την περίπτωση η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών είναι αναπόφευκτη.

Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η νόσος Crohn είναι ετερογενής πάθηση με αποτέλεσμα την αργή διάγνωσή της (Hendrickson και συν, 2002). Τα συμπτώματα εξαρτώνται από τη θέση και έκταση των αλλοιώσεων, αλλά σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, διάρροια και απώλεια βάρους. Όταν η νόσος εντοπίζεται στον ειλεό, το κοιλιακό άλγος εμφανίζεται μεταγευματικά και για το λόγο αυτό οι ασθενείς μειώνουν τη θερμιδική πρόσληψη. Στην περίπτωση που η νόσος προσβάλλει το κόλον, τα κόπρανα συνοδεύονται από αίμα ή/και βλέννα, ενώ δυσασπορόφηση λακτόζης παρατηρείται όταν οι βλάβες παρουσιάζονται στο λεπτό έντερο. Και εδώ η έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι συνήθης, όπως σιδηροπενική αναιμία, ανεπάρκεια της βιταμίνης B₁₂ και των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K μετά από εκτομή ή νόσο του ειλεού.

Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ πάσχουν και από εξωεντερικές παθήσεις. Στα παιδιά παρατηρείται καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης και σεξουαλικής ωρίμανσης, γεγονός το οποίο οφείλεται στην υποθρεψία (Hendrickson και συν, 2002). Άλλη κύρια επιπλοκή είναι η εμφάνιση αρθραλγιών και αρθρίτιδας, η οποία συνήθως προηγείται των εντερικών εκδηλώσεων. Διαταραχές του ηπατοχολικού συστήματος και των νεφρών εμφανίζονται συχνά, ενώ η πορεία της νόσου μπορεί επιπλακεί με οστεοπόρωση και οστεομαλακία. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη βιταμίνης D, στη δυσασπορόφηση ασβεστίου, στην πλημμελή θρέψη, στη λήψη κορτικοστεροειδών, αλλά και στην ίδια τη φλεγμονή του εντέρου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς που λαμβάνουν κορτιζόνη μπορεί να παρουσιάσουν και επιπλοκές στην όραση.

4.5 Διάγνωση

Οι εργαστηριακές εξετάσεις για τη διάγνωση της ΙΦΝΕ περιλαμβάνουν: α) πλήρες αιμαδιάγραμμα, β) συγκέντρωση των δεικτών φλεγμονής στον ορό ή πλάσμα και γ) μεταβολικό προφίλ (Hendrickson και συν, 2002). Αύξηση της συγκέντρωσης του αριθμού των αιμοπεταλίων, της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και μείωση της αιμοσφαιρίνης συσχετίζονται με την εμφάνιση της ΙΦΝΕ (Harrison, 2005). Ταυτόχρονα, παρατηρείται λευκοκυττάρωση (αριθμός λευκών >20.000/mm³), μικροκυτταρική αναιμία και θρομβοκυττάρωση (Hendrickson και συν, 2002). Η έκκριση από το ήπαρ μιας ομάδας πρωτεϊνών γνωστές ως «πρωτεΐνες οξείας φάσης», όπως η CRP, αποτελεί το σημαντικότερο εργαστηριακό εύρημα. Ρόλος τους είναι να συμμετέχουν στη διαδικασία

της φλεγμονής, με αρκετές από αυτές να χρησιμεύουν στην ελαχιστοποίηση της έκτασης της ιστικής βλάβης (Vander, 2001). Στο 90% των παιδιών που πάσχουν από νόσο του Crohn παρατηρείται αυξημένη CRP. Υποαλβουμιναιμία και μείωση των επιπέδων σιδήρου ορού παρατηρούνται επίσης συχνά. Τέλος, αυξημένη συγκέντρωση των ηπατικών ενζύμων υποδηλώνουν βλάβη στο ήπαρ. Η κολονοσκόπηση, καθώς και οι ιστολογικές εξετάσεις χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου. Η γαστροσκόπηση είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της προσβολής του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου σε ασθενείς με συμπτώματα από τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα. Παρόλα αυτά, η διάκριση μεταξύ ελκώδους κολίτιδας και νόσου Crohn είναι αδύνατη σε ποσοστό 10-15% των περιπτώσεων, οπότε η κολίτιδα είναι απροσδιόριστη (Harrison, 2005). Δύο αντισώματα τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν στον ορό ασθενών με ΙΦΝΕ είναι τα περιπυρηνικά αντι-ουδετερόφιλα κυτταροπλασματικά αντισώματα (P-ANCA) και τα αντισώματα έναντι του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (Hendrickson και συν, 2002). Τα τελευταία ανιχνεύονται σε ασθενείς με νόσο Crohn, ενώ ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα είναι θετικοί στα P-ANCA (Main και συν, 1988, Saxon και συν, 1990).

4.6 Αγωγή

Η αγωγή της ελκώδους κολίτιδας είναι παρόμοια με αυτή της νόσου Crohn και περιλαμβάνει αντιφλεγμονώδη, ανοσοκατασταλτικά και αντιβιοτικά φάρμακα, ανάλογα με την πορεία της νόσου (Hendrickson και συν, 2002). Η από του στόματος λήψη σουλφασαλαζίνης αποτελεί τη συνηθέστερη αγωγή για την ΙΦΝΕ ήπιας έως μέτριας σοβαρότητας (Büning και Lochs, 2006). Νεότερα φαρμακευτικά σκευάσματα του 5-αμινοσαλικυλικού οξέος (μεσαλαμίνη, ολσαλαζίνη και βαλσαλσίδη) ενδείκνυνται σε ασθενείς με δυσανεξία στη σουλφασαλαζίνη λόγω εμφάνισης παρενεργειών, όπως κεφαλαλγία, ναυτία, έμετος, αιμολυτική αναιμία και δερματίτιδα.

Σε βαριά μορφή της νόσου, οι ασθενείς πρέπει να εισαχθούν σε νοσοκομείο για στενότερη κλινική παρακολούθηση και ενδοφλέβια αγωγή με κορτικοστεροειδή (Hendrickson και συν, 2002). Η τελευταία πρέπει να διαρκέσει μέχρις ότου υποχωρήσουν τα κοιλιακά άλγη και η αιμορραγική διάρροια. Τα κορτικοστεροειδή έχουν σημαντικές παρενέργειες (καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης, οστεοπενία) και η μακροπρόθεσμη χρήση τους πρέπει να αποφεύγεται. Επιπλέον, δεν είναι αποτελεσματικά για τη διατήρηση της ύφεσης της νόσου και για το λόγο αυτό προτιμάται ταυτόχρονη χορήγηση σχήματος σουλφασαλαζίνης/5-αμινοσαλικυλικού οξέος. Τα πιο γνωστά κορτικοστεροειδή είναι η πρεδνιζόνη και η υδροκορτιζόνη. Η αζαθειοπρίνη και η 6-μερκαπτοπουρίνη είναι ανοσοκατασταλτικά φάρμακα και χορηγούνται για την αντιμετώπιση της εξαρτημένης από τα κορτικοστεροειδή ΙΦΝΕ. Η μετρονιδαζόλη και η σιπροφλοξασίνη αποτελούν τα συνήθη αντιβιοτικά στη νόσο Crohn, ενώ η μεθοτρεξάτη έχει αντιφλεγμονώδη δράση, κάτι το οποίο σχετίζεται με τη μειωμένη παραγωγή IL-1 (Harrison, 2005, Hendrickson και συν, 2002).

Η ινφλιξιμάμπη είναι ένα χιμαιρικό αντίσωμα (ποντικού- ανθρώπου) έναντι του TNF-α (Büning και Lochs, 2006). Ο TNF είναι μια φλεγμονώδης κυτταροκίνη με αυξημένη έκφραση στην ΙΦΝΕ. Η χορήγηση ινφλιξιμάμπης ενδείκνυται σε ασθενείς με νόσο Crohn που δεν ανταποκρίνονται στη συνηθισμένη φαρμακευτική αγωγή και δεν χρειάζονται άμεση χειρουργική αντιμετώπιση. Η επαγωγή απόπτωσης των διαφοροποιημένων PBMC πιθανότατα να ευθύνεται για την παραπάνω δράση (Lügering και συν, 2001).

Πέραν από τη φαρμακευτική αγωγή, κάποιες περιπτώσεις πρέπει να αντιμετωπιστούν χειρουργικά. Οι κύριες ενδείξεις είναι η κεραινοβόλος κλινική εικόνα, η τοξική κολίτιδα και ο καρκίνος (Cecil, 2003). Στην ελκώδη κολίτιδα, ανεξάρτητα από την έκταση της νόσου, πρέπει να αφαιρείται ολόκληρο το παχύ έντερο (Harrison, 2005). Η ανάγκη για χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με νόσο Crohn σχετίζεται με τη διάρκεια της νόσου και τη θέση της βλάβης. Η νόσος Crohn υποτροπιάζει και στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται νέα επέμβαση μέσα σε 5-10 χρόνια.

4.7 Διατροφική αντιμετώπιση

Η διαιτητική αντιμετώπιση στοχεύει τόσο στην επίτευξη όσο και στη διατήρηση της καλής θρεπτικής κατάστασης των ασθενών με ΙΦΝΕ. Σε περιπτώσεις σοβαρής έξαρσης της νόσου Crohn, η ολική παρεντερική διατροφή οδηγεί το γαστρεντερικό σωλήνα σε ηρεμία, γεγονός το οποίο καθιστά την παρεντερική σίτιση εξίσου αποτελεσματική με τα κορτικοστεροειδή. Ωστόσο, όσον αφορά στη διατήρηση της ύφεσης δεν παρατηρούνται θετικά αποτελέσματα. Σε αντίθεση με τη νόσο Crohn, στην ενεργό ελκώδη κολίτιδα οι στοιχειακές δίαιτες ή η ολική παρεντερική διατροφή είναι αναποτελεσματικές (Harrison, 2005).

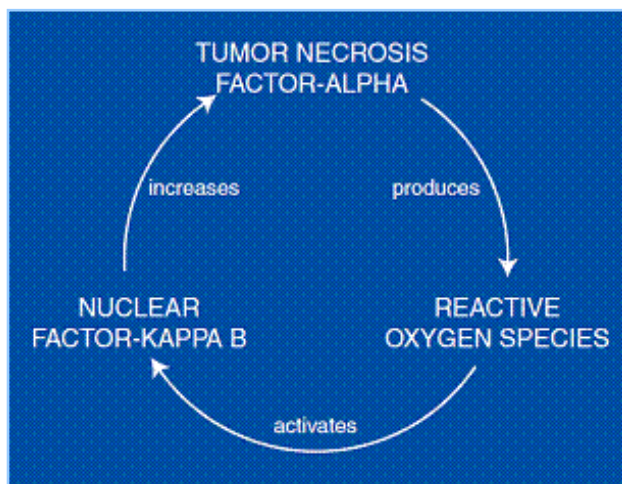
Οι ασθενείς με ΙΦΝΕ εμφανίζουν πολύ συχνά κακή θρέψη και η συμπληρωματική λήψη ανόργανων στοιχείων και βιταμινών είναι συνήθως απαραίτητη. Η νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή πρόσληψη και δυσαπορόφηση των θρεπτικών συστατικών, αύξηση των πρωτεϊνικών αναγκών και αύξηση του βασικού μεταβολισμού. Σε ασθενείς με εκτεταμένη νόσο του ειλεού παρατηρείται δυσαπορόφηση της βιταμίνης B12. Όταν η νόσος εντοπίζεται στο λεπτό έντερο εμφανίζεται ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών, σιδηροπενία, έλλειψη φυλλικού οξέος, και σε σοβαρές διάρροιες, έλλειψη ψευδαργύρου (Cecil, 2003). Σε γενικές γραμμές οι διαιτητικές συστάσεις περιλαμβάνουν δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος εξαιτίας της μειωμένης απορρόφησης των λιπών και υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες για τη βελτίωση ή πρόληψη της υποαλβουμιναιμίας. Όταν η αγωγή περιλαμβάνει κορτικοστεροειδή, απαιτείται λήψη συμπληρώματος ασβεστίου και βιταμίνης D (Hendrickson και συν, 2002). Σε περιόδους έξαρσης της ΙΦΝΕ η μείωση του στερεού υπολείμματος από την τροφή κρίνεται αναγκαία.

4.8 Νόσος Crohn και οξειδωτικό στρες

4.8.1 Γενικά

Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων εις βάρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός οργανισμού, καλείται «οξειδωτικό στρες» (Grassmann, 2005). Εμφανίζεται τόσο στο φυτικό βασίλειο όσο και στο ζωικό. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, περίπου το 1-3% του οξυγόνου που καταναλώνει ο άνθρωπος μετατρέπεται σε υπεροξειδία ή άλλες ελεύθερες ρίζες (ROS) (Halliwell, 1996). Αυτές είναι κάθε μόριο ή άτομο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Οι ROS δρουν προοξειδωτικά βλάπτοντας το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες (Halliwell, 1996). Ως απάντηση, ο οργανισμός αμύνεται με τη βοήθεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων (GSH, SOD και καταλάσες), των ενδογενών μορίων που δεσμεύουν τις ROS (ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες) και του ουρικού οξέος. Η αύξηση της κατανάλωσης φυτικών προϊόντων που περιέχουν ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών (τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ, τερπένια, πολυφαινόλες) συνίσταται για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Grassmann, 2005).

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα και διάφορες μορφές καρκίνου χαρακτηρίζονται από αυξημένη παραγωγή ROS (Halliwell, 1996). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στη νόσο Crohn (Head και συν, 2003, Head και συν, 2004, Simmonds και Rampton, 1993). Το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα είναι ικανό να εξουδετερώνει τις ROS στο βλεννογόνο του εντέρου, αλλά η παρουσία φλεγμονής στο έντερο αυξάνει τη ζήτηση σε αντιοξειδωτικά, με αποτέλεσμα τη περαιτέρω επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Οι βλάβες στο εντερικό τοίχωμα είναι αναπόφευκτες. Σύμφωνα με Head και συν (2003), διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι ROS ενεργοποιούν τον NF-κΒ, ο οποίος με τη σειρά του ενισχύει την παραγωγή του TNF-α δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο που απεικονίζεται στην **Εικόνα 4.1**



Εικόνα 4.1 Ο πιθανός ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στη φλεγμονή. Head και Jurenka, 2003

4.8.2 Μέτρηση οξειδωτικού στρες

Για τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες εφαρμόζονται κυρίως μέθοδοι ποσοτικοποίησης των προϊόντων οξείδωσης των λιπών και των πρωτεϊνών. Στη νόσο Crohn συνήθως δείκτης μέτρησης του οξειδωτικού στρες στον ορό και εντερικό ιστό είναι η μαλοναλδεύδη (MDA) (Kruidenier και συν, 2003). Είναι δείκτης μέτρησης των υπεροξειδωμένων λιπιδίων τα οποία προκαλούν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες και έχουν καταστροφικά αποτελέσματα για το κύτταρο (Reiter και συν, 2001, Reznick και συν, 1994). Σε παιδιά με νόσο Crohn τα επίπεδα MDA είναι 70% μεγαλύτερα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (Levy και συν, 2000), ενώ η συγκέντρωση της βιταμίνης Α (αντιοξειδωτική) σημαντικά χαμηλότερη ($p < 0.05$). Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις των D'Odorico και συν το 2001, όπου οι ασθενείς παρουσιάζουν βλάβη στο DNA και στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών Α και Ε στο πλάσμα ($p < 0.05$). Έκτοτε, πολλοί ερευνητές ελέγχουν την επίδραση της πρόσληψης αντιοξειδωτικών στην εξέλιξη της ΙΦΝΕ. Συγκεκριμένα, η χορήγηση διαλύματος βιταμίνης C και Ε σε ασθενείς με ύφεση της νόσου Crohn οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση του οξειδωτικού στρες ($p < 0.05$) (Aghkassi και συν, 2003).

4.9 Νόσος Crohn και φλεγμονή

4.9.1. Γενικά

Φλεγμονή είναι η απάντηση του οργανισμού στην ιστική βλάβη. Χαρακτηρίζεται από αυξημένη αιματική ροή, μεγάλη αγγειακή διαπερατότητα, διήθηση λευκοκυττάρων και συσσώρευση κυτταροκινών (Feghali και συν, 1997).

Πρωτεύοντα ρόλο στην οξεία και χρόνια φλεγμονή έχουν οι χημικοί μεσολαβητές. Οι τελευταίοι πυροδοτούν έναν καταρράκτη αντιδράσεων με αποτέλεσμα την έκφραση διακυτταρικών μορίων προσκόλλησης και τη χημειοταξία. Συγκεκριμένα, ελέγχουν τη διέγερση τόσο των κυττάρων στο φλεγμένοντα ιστό, όπως των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων και των ιστιοκυττάρων, όσο και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα). Οι χημικοί μεσολαβητές μπορεί να είναι: α) προϊόντα του μεταβολισμού των λιπών, όπως είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και τα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος (προσταλαγδίνες, λευκοτριένια), β) πρωτεάσες (π.χ. κινίνες) με προφλεγμονώδη δράση, γ) το νιτρικό οξύ με αγγειοδιασταλτικό ρόλο και δ) κυτταροκίνες. Αυτές είναι πολυλειτουργικές και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία, στον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων και στην επαγωγή της φλεγμονής στους αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς ιστούς (Neuman, 2007).

4.9.2 Ανοσολογικοί μηχανισμοί στη νόσο Crohn

Συνήθως, η ανοσολογική απάντηση ξεκινάει όταν τα CD8⁺ κυτταροτοξικά ή τα CD4⁺ T-κύτταρα εντοπίσουν την παρουσία αντιγόνου στο εντερικό επιθήλιο. Ως αποτέλεσμα, τα CD4⁺

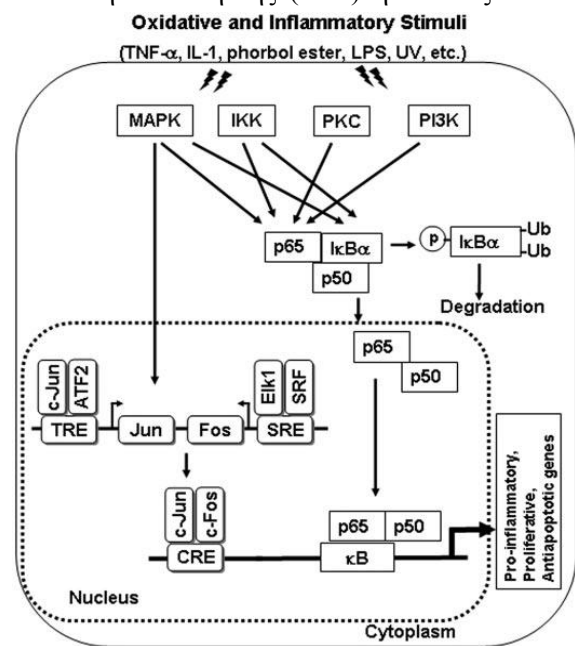
κύτταρα διαφοροποιούνται σε Τ-βοηθητικά κύτταρα που εκκρίνουν τις κυτταροκίνες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η φλεγμονή ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ των Τ-βοηθητικών κυττάρων και των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων. Στην ΙΦΝΕ διαταράσσεται αυτή η ισορροπία και έρευνες σε πειραματόζωα αποκαλύπτουν ότι η επίμονη φλεγμονή οφείλεται σε διαταραχή στην έκφραση των Τ-βοηθητικών και Τ-ρυθμιστικών κυττάρων (Bouma και Strober, 2003). Τα ενεργοποιημένα βοηθητικά κύτταρα T_H1 εκφράζουν τις IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, τον TNF-α και την IFN-γ. Τα βοηθητικά κύτταρα T_H2 εκκρίνουν τις IL-4, IL-5 και IL-13. Οι παραπάνω κυτταροκίνες επάγουν τη φλεγμονή με σκοπό την περαιτέρω διήθηση των λευκοκυττάρων στο φλεγμένοντα ιστό. Συνήθως, η παύση της παραπάνω ανοσολογικής απάντησης πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, τα $CD4^+$ κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και σε ρυθμιστικά. Ένας τύπος τέτοιων ρυθμιστικών κυττάρων είναι τα TGF-β εκκριτικά Τ-κύτταρα (ή T_H3). Η παραγωγή της IL-10, μιας κυτταροκίνης με αντιφλεγμονώδη δράση, επάγει την έκφραση του TGF-β, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την απόκριση των T_H1 κυττάρων. Ο TGF-β έχει και αυτο-διεγερτικό ρόλο, δηλαδή η έκφρασή του οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή TGF-β. Η έκκριση της IL-10 προέρχεται από την ενεργοποίηση ενός άλλου τύπου ρυθμιστικών κυττάρων, των IL-10 εκκριτικών Τ-κυττάρων (ή Tr1). Παρουσία της IL-2, τα $CD25^+$ κύτταρα εκφράζουν τόσο TGF-β όσο και IL-10. Τέλος, ένας πολύ σημαντικός τύπος ρυθμιστικών κυττάρων είναι τα φονικά κύτταρα (NK). Αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα γλυκολιπίδια του αντιγόνου πάνω σε ένα μόριο (MHC class I molecule) που εκφράζεται στην επιφάνεια των δενδριτικών, των Β- και των επιθηλιακών κυττάρων. Τα $CD8^+$ κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα δεν φαίνεται να έχουν ουσιαστικό ρόλο στην ΙΦΝΕ, μιας και απουσία τους σε πειραματόζωα δεν οδηγεί σε επεισόδιο φλεγμονής. Ωστόσο, σε περιπτώσεις απώλειας των επιθηλιακών κυττάρων παρατηρείται κυτταροτοξική δράση (Strober και συν, 2002).

Τα Β-κύτταρα δεν έχουν άμεση επίπτωση ούτε στην επαγωγή της φλεγμονής ούτε στη διατήρησή της. Αντιθέτως, φαίνεται να παίζουν προστατευτικό ρόλο, αλλά η δράση τους σε ασθενείς με ΙΦΝΕ δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Σημαντική προστασία παρέχουν και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Αυτά δημιουργούν ένα φραγμό ενάντια στην έκθεση του βλεννογόνου σε μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε αλλοιώσεις σε αυτόν το φραγμό αποτελούν πρωταρχική αιτία εμφάνισης ΙΦΝΕ στα πειραματόζωα. Συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν χημοκίνες που με τη σειρά τους προσελκύουν λευκοκύτταρα, με σκοπό την επαγωγή της φλεγμονής. Σημείο κλειδί φαίνεται να αποτελούν τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα). Αυτά επάγουν την ενεργοποίηση τόσο των Τ-βοηθητικών κυττάρων όσο και των Τ-ρυθμιστικών. Είναι πιθανό βλάβες στην απόκριση των Τ-κυττάρων να οφείλονται είτε σε βλάβες των αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων είτε σε αλληλεπιδράσεις τους με τα Τ-βοηθητικά κύτταρα. Τα μακροφάγα, ένα είδος αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων, προάγουν τη φλεγμονή. Συγκεκριμένα,

όταν ενεργοποιηθούν παρουσία LPS αυξάνουν την έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1, IL-6, IL-12 και TNF- α (Strober και συν, 2002).

4.9.3 Σημαντικοί παράγοντες φλεγμονής στη νόσο Crohn

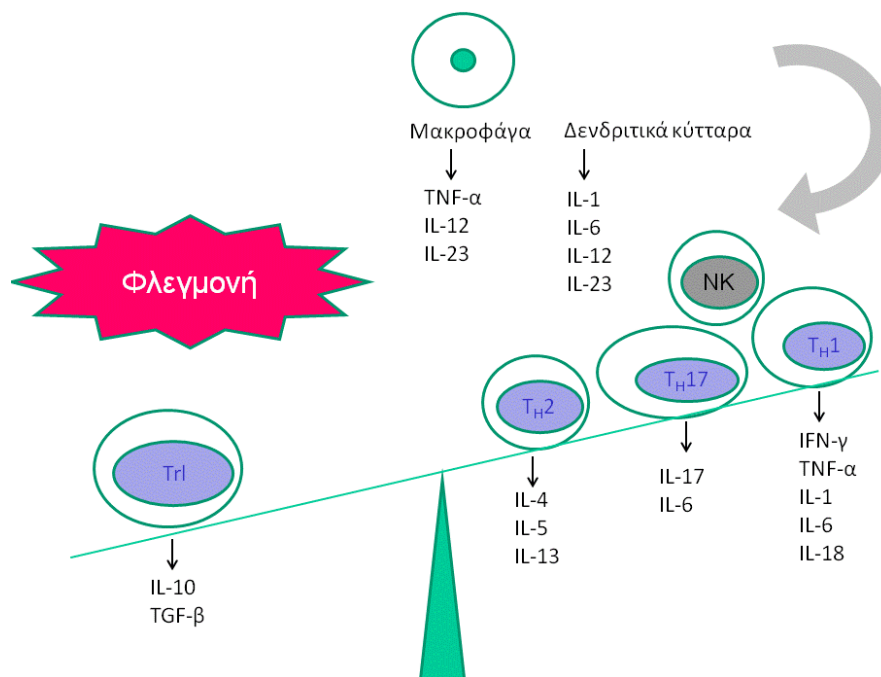
Η έκφραση πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF- α και IL-8), καθώς και κάποιων συνδετικών μορίων (ELAM-1 και ICAM-1) ρυθμίζεται από το μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα- κ B (NF- κ B). Πρόκειται για μια διμερή πρωτεΐνη που σχηματίζεται από την ένωση των πρωτεϊνών της οικογένειας Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p52 p50). Στην ανενεργή του μορφή απαντάται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη I κ B (Shanmugam και συν, 2011). Παράγοντες όπως η φλεγμονή (π.χ. LPS, TNF- α) και το οξειδωτικό στρες προκαλούν την ενεργοποίησή του. Αρχικά, η I κ B φωσφορυλιώνεται από την κινάση της (IKK) ή από τις MAP κινάσες, γεγονός που οδηγεί στην ουβικιτινίωση της και στην αποδόμησή της από το πρωτεόσωμα. Ακολούθως, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.2**, ο NF- κ B απελευθερώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και συνδέεται στο DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (κ B). Ο NF- κ B λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για τουλάχιστον 200 γονίδια που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Johnson, 2007). Στην ενεργό ΙΦΝΕ αυξάνεται η ενεργοποίηση του NF- κ B (Jurjus και συν, 2004) και η απενεργοποίησή του ίσως να αποτελεί τη λύση-κλειδί για τη θεραπεία της νόσου. Σε ζωικό πρότυπο ελκώδους κολίτιδας, αγωγή με ολιγονουκλεοτίδια-αναστολείς του NF- κ B βελτιώνει



Εικόνα 4.2 Ενεργοποίηση του NF- κ B.

την ιστική βλάβη και μειώνει τα επίπεδα των TNF- α , IL-1 και IL-6 στον ορθό (Murano και συν, 2000).

Οι κυτταροκίνες IL-12, IL-18 και IL-23 έχουν κεντρικό ρόλο στην ΙΦΝΕ διατηρώντας την T_H1 ανοσολογική απάντηση (**Εικόνα 4.3**). Ως συνέπεια, παράγονται οι IL-1, IL-6 και TNF- α που επάγουν περαιτέρω φλεγμονή με τη διέγερση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και χημικών μεσολαβητών. Μια νέα κατηγορία T-βοηθητικών κυττάρων είναι τα T_H17 που εκκρίνουν την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-17. Η θεραπεία με αντισώματα της IL-17 είναι αρκετά υποσχόμενη (Korzenik και Podolsky, 2006).



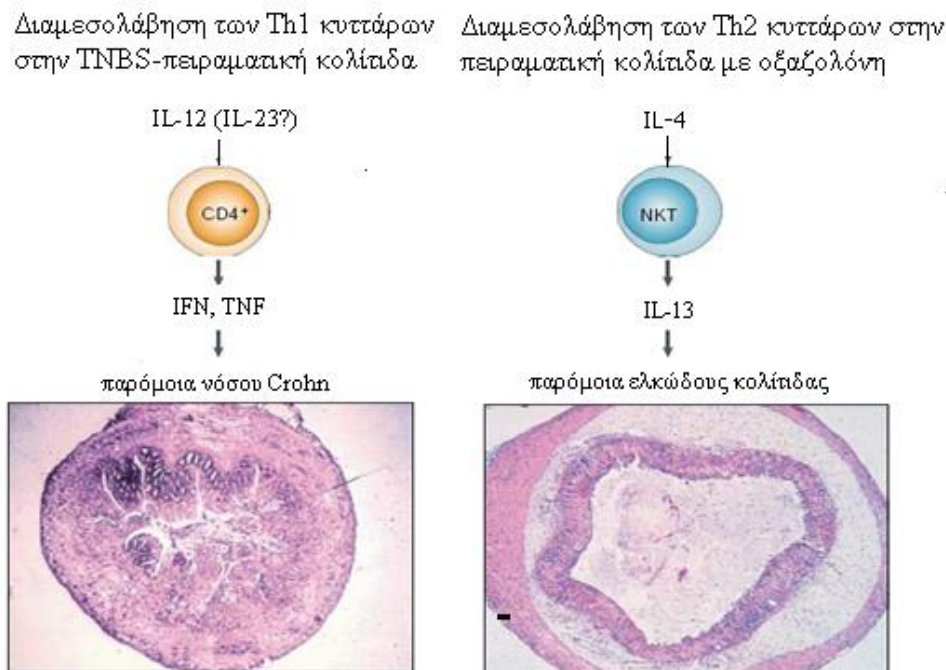
Εικόνα 4.3 Διαφοροποίηση των T-κυττάρων και έκκριση των κυτταροκινών. Sanchez-Muñoz , 2006

Η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων που μιμούνται την ΙΦΝΕ βοηθούν στην κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη διαταραγμένη ανοσολογική απόκριση. Έρευνες σε πειραματόζωα αποκαλύπτουν ότι η νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από την υπερέκκριση των T_H1 κυττάρων, ενώ η ελκώδης κολίτιδα από εκείνη των T_H2 κυττάρων (**Εικόνα 4.4**). Σε ασθενείς με νόσο Crohn παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση της αντιφλεγμονώδους IL-10 στο φλεγμένοντα ιστό. Αντίθετα, στους ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα αυξάνεται η έκκρισή της (Sanchez-Muñoz και συν, 2008).

Η IL-6 δρα στα ηπατοκύτταρα με αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσης, ενώ παράλληλα προκαλεί πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων και ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Αντίστοιχα, η IL-8 προσελκύει λευκοκύτταρα στην περιοχή της βλάβης (χημειοταξία). Σε ασθενείς με ενεργό ΙΦΝΕ παρατηρούνται αυξημένες τιμές της IL-6 και οι τιμές της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της κατάστασης της νόσου. Το ίδιο παρατηρείται και για την IL-8 (Mitsuyama και συν, 1994), ωστόσο τα επίπεδα είναι υψηλότερα σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα σε σύγκριση με αυτά σε ασθενείς με νόσο Crohn (Mahida και συν, 2000). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά την έκθεση στον TNF-α επάγουν στην επιφάνειά τους την έκφραση του ενδοθηλιακού μορίου σύνδεσης των λευκοκυττάρων τύπου 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1). Το μόριο αυτό προσκολλά εκλεκτικά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα. Ο TNF-α που παράγεται συνεχίζει να επιδρά επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία είναι προγραμματισμένα έτσι ώστε να εκφράζουν δυο άλλα συνδετικά μόρια, το διακυτταρικό συνδετικό μόριο-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1) και το αγγειακό συνδετικό μόριο-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Το ICAM-1 συνδέει τα T λεμφοκύτταρα μέσω ενός μορίου σύνδεσης, του LFA 1

(lymphocyte function associated antigen). Το VCAM συνδέει τόσο τα T- όσο και τα μονοκύτταρα λευκοκύτταρα μέσω ενός άλλου μορίου σύνδεσης, του VLA-4 (very late antigen-4). Ο TNF-α είναι αυξημένος σε ασθενείς με ενεργό νόσο και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΙΦΝΕ (Baert και συν, 1999, Targan και συν, 1997). Η άποψη αυτή υποστηρίζεται λόγω της θεαματικής βελτίωσης της ενεργού νόσου Crohn μετά από τη χορήγηση αντισωμάτων του TNF-α (ινφλιξιμάμπη).

Η αυξημένη παραγωγή IL-18 έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκκριση από τα T κύτταρα της αντιφλεγμονώδους IL-10 (Maerten και συν, 2004). Επίσης, σε μύες με χημική κολίτιδα η IL-18 δρα συνεργιστικά με την IL-12 με αποτέλεσμα να παράγεται περαιτέρω IFN-γ και να οδηγεί σε επιδείνωση της φλεγμονής (Okamura και συν, 1998). Οι Kazaku και συν (1999) παρατηρούν ότι ασθενείς με ενεργό νόσο Crohn έχουν αυξημένες τιμές IL-12 και IFN-γ στον εντερικό ιστό, σε αντίθεση με τις IL-2, IL-4 και IL-10 που δεν είναι αυξημένες. Τέλος, σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο Crohn τα επίπεδα των δεικτών ICAM-1 και VCAM-1 στον ορό είναι αυξημένα (Nielsen και συν, 1994, Goke και συν, 1997).



Εικόνα 4.4 Διαμεσολάβηση των T_H1 και T_H2 κυττάρων στην ΙΦΝΕ. Το τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS) και η οξαζολόνη προκαλούν διαφορετικούς τύπους κολίτιδας με παρόμοια ιστολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Crohn και της ελκώδους κολίτιδας, αντίστοιχα. Όταν το TNBS δίνεται σε SJL/J ή C57BL/10 μύες, ενεργοποιούνται τα $CD4^+$ κύτταρα με αποτέλεσμα την έκκριση της IFN-γ και του TNF-α διαμέσου της παραγωγής της IL-12 από τα T_H1 κύτταρα. Αντίθετα, η οξαζολόνη διεγείρει τα T_H2 κύτταρα τα οποία παράγουν την IL-13 διαμέσου της IL-4 από τα φονικά κύτταρα (NK). Bouma και Strober, 2003

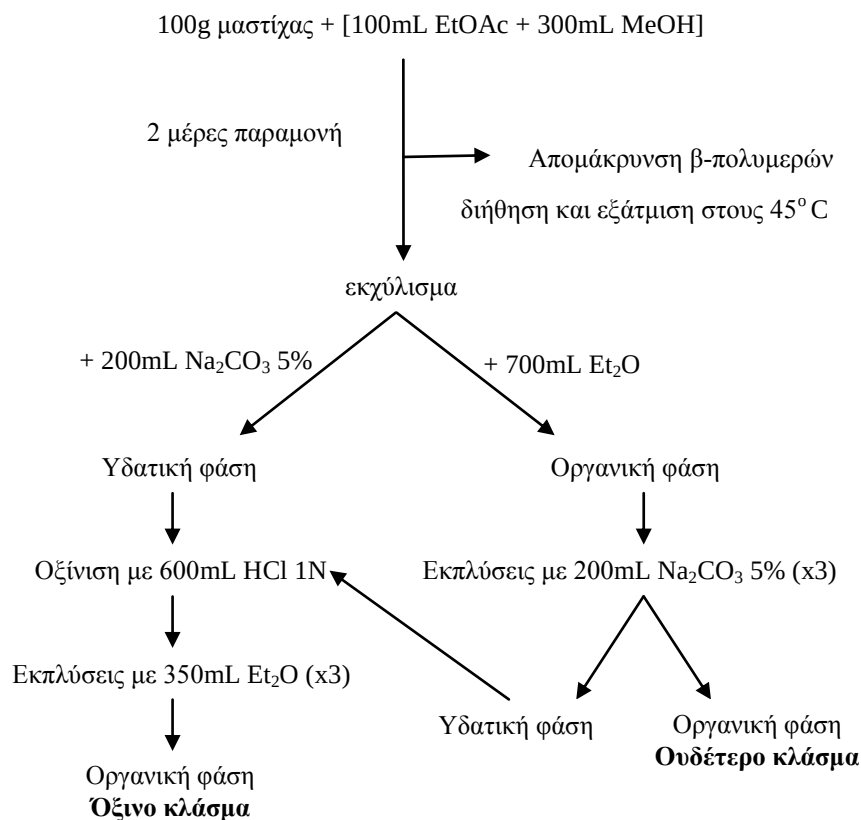
ΜΕΡΟΣ Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΑΣΤΙΧΑΣ****5.1 Κλασματοποίηση μαστίχας Χίου**Αντιδραστήρια-όργανα:

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής 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 των 100mL και 500mL, ογκομετρική φιάλη του 1L, ποτήρι ζέσεως των 250mL και 500mL, σφαιρική φιάλη των 250mL και 500mL
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (Heidolph Laborota 4000 efficiency), ψυγείο ($2-4^\circ\text{C}$)

Αναλυτική πορεία:

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.1**, συνολικά 100g ρητίνης διαχωρίζονται σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα σύμφωνα με τους Paraschos και συν (2007). Συγκεκριμένα, στην παραπάνω ποσότητα μαστίχας προστίθενται 100mL μεθανόλης και 300mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για περίπου 15min. Μετά από παραμονή δύο ημερών 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.



Εικόνα 5.1 Κλασματοποίηση μαστίχας σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα. Όπου MeOH μεθανόλη, EtOAc οξικός αιθυλεστέρας και Et₂O διαιθυλαιθέρας. *Paraschos και συν, 2007*

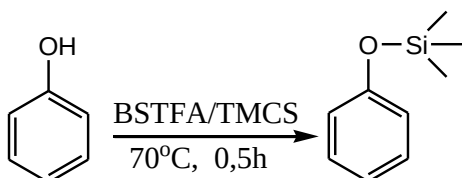
5.2 Παραγωγοποίηση

Αντιδραστήρια -όργανα:

- TMCS (trimethylchlorosilane), BSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide]
- Υδατόλουτρο, vortex

Αρχή της μεθόδου:

Η δημιουργία τριμέθυλοσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS (**Εικόνα 5.2**) οδηγεί σε αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας στην επίδραση υψηλής θερμοκρασίας.



Εικόνα 5.2 Δημιουργία τριμέθυλοσιλυλαιθέρων με BSTFA παρουσία καταλύτη TMCS

Αναλυτική πορεία:

Αιθανολικό διάλυμα πρότυπης ουσίας ολεανολικού οξέος, καθώς και αιθανολικό εκχύλισμα όξινου κλάσματος της μαστίχας Χίου, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και παραγωγοποιούνται με προσθήκη BSTFA (200μL) και TMCS (10μL). Μετά από ανακίνηση σε vortex, το κάθε μίγμα αντίδρασης τοποθετείται σε υδρόλουτρο 70°C για 30min κι έπειτα αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου πριν την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας.

5.3 Ανάλυση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS analysis)Αντιδραστήρια -όργανα:

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας, πρότυπη ουσία ολεανολικού οξέος καθαρότητας >99%, PFTBA (perfluorotributylamine)
- Αέριος χρωματογράφος: HP 6890 με αυτόματο δειγματολήπτη HP 1000, φασματομέτρο μάζας HP 5972, ανιχνευτής: HP MSD 5972 (EI, 70eV)
- Υλικό πλήρωσης: 5% φαινυλο- και 95% μέθυλο- σιλοξάνιο, φέρον αέριο: ήλιο
- Ρυθμός ροής: 0.6mL/min, θερμοκρασία θαλάμου εισαγωγής: 280°C, θερμοκρασία στήλης: 300°C
- Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου

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

Αρχή της μεθόδου:

Πτητικά συστατικά διέρχονται της στήλης στην αέρια φάση σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία και διαχωρίζονται. Το συστατικό στο φασματομέτρο μάζας βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενεργείας. Αποβάλλεται από το μόριο της ένωσης ένα e- προς μοριακό ιόν $M^{+•}$ ($M + e \rightarrow M^{+•} + 2e$) κι από αυτό θυγατρικά ιόντα διαγράφουν κυκλική τροχιά ακτίνας r, σε μαγνητικό πεδίο έντασης H και ηλεκτρικού δυναμικού V. Η μάζα του μορίου είναι $m = (H^2 \times r^2) / 2V$.

Αναλυτική πορεία:

Ο ιοντισμός των μορίων ρυθμίζεται με PFTBA. Πραγματοποιείται ένεση (α) 1μL διαλύματος παραγωγοποιημένης πρότυπης ουσίας μεμονωμένα και (β) 3μL παραγωγοποιημένου όξινου κλάσματος της μαστίχας Χίου. Εφαρμόζεται η τεχνική SIM (Selective Ion Monitoring) (EMV 1910 +200V) κατά την οποία ο ανιχνευτής παρακολουθεί εκλεκτικά 1-3 ιόντα για κάθε εκλούόμενο συστατικό, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης περίπου 50-100 φορές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ

6.1 Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζωων

Υγιείς, άρρενες επίμυες τύπου Wistar (Εικόνα 1) προέρχονται από εγκεκριμένη μονάδα παροχής πειραματόζωων. Είναι ενήλικες (3 μηνών) με ώριμο πεπτικό σωλήνα και σύνθετες μικροβιακό φορτίο. Αμέσως μετά την παραλαβή τους στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις ακολουθεί περίοδος εγκλιματισμού για 2 εβδομάδες. Οι επίμυες διαβιούν σε ανοξείδωτα κελιά υπό ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 22°C και υγρασία 50%) διατηρώντας κύκλο φωτός-σκότους 12:12h. 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. Όλα τα πειράματα τυγχάνουν έγκρισης της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχίας Αθηνών και διεξάγονται σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης 86/609/EEC και την Ελληνική Νομοθεσία (ν. 160, Α-64, Μάιος, 1991).

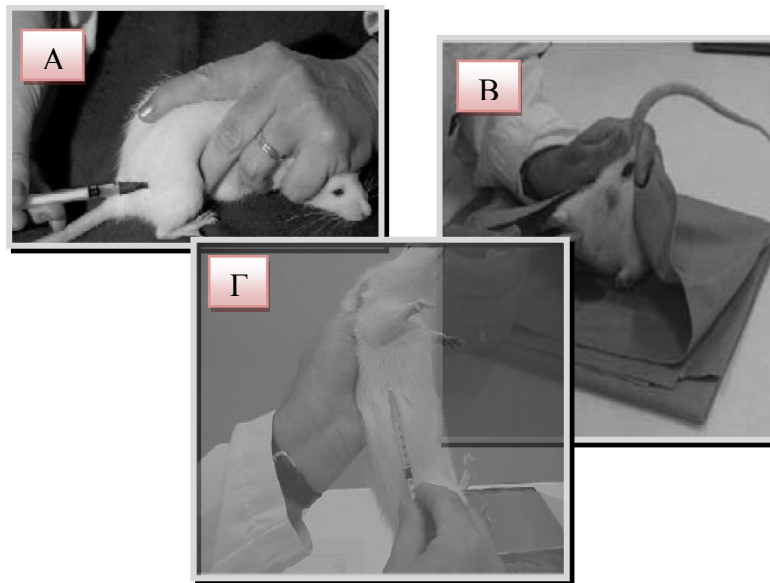
6.2 Πειραματικό ζώικό πρότυπο νόσου Crohn

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Κεταμίνη, ξυλαζίνη, τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS), φυσιολογικός ορός, αιθανόλη 50% σε φυσιολογικό ορό
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: φλεβοκαθετήρες (Brown Vasofix 17G), σύριγγες του 1mL, χειρουργικές λαβίδες Adson
- Ποτήρι ζέσεως των 250ml, ογκομετρικός κύλινδρος των 100mL
- Αναλυτικός ζυγός τριών δεκαδικών ψηφίων

Αναλυτική πορεία:

Την ημέρα έναρξης των πειραμάτων, καταγράφεται το σωματικό βάρος (ΣΒ) όλων των ζώων. Ακολούθως, πραγματοποιείται ελαφρά αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης/ξυλαζίνης (80mg/Kg ΣΒ και 16mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Για το σκοπό αυτό οι επίμυες ακινητοποιούνται με τον τρόπο που φαίνεται στην **Εικόνα 6.1.A**. Η δράση του αναισθητικού επιβεβαιώνεται ασκώντας πίεση στα άκρα με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας, διαφορετικά χορηγείται αναισθητικό συμπληρωματικά. Έπειτα, το ζώικό πρότυπο νόσου Crohn αναπτύσσεται με ενδοκολονική χορήγηση διαλύματος TNBS (100mg/Kg ΣΒ) σε 0.25mL 50% αιθανόλη. Συγκεκριμένα, οι επίμυες ακινητοποιούνται (**Εικόνα 6.1.B**) και η παραπάνω ουσία δίνεται με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Τα 2/3 του όγκου εγχύονται κατά την είσοδο του φλεβοκαθετήρα στο κόλον και το 1/3 κατά την έξοδο. Οι επίμυες διατηρούνται σε κατακόρυφη θέση για 2min για την αποφυγή διαρροής



Εικόνα 6.1 Ακίνητοποίηση επίμυων. Α) Ενδομυϊκή αναισθησία, Β) Ενδοκολονική έγχυση TNBS και Γ) Υποδόρια έγχυση υδροκορτιζόνης.

6.3 Δοκιμή με μαστίχα και συστατικά αυτής

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Σκόνη μαστίχας εμπορίου (60% μαστίχα και 40% ινουλίνη), όξινο και ουδέτερο κλάσμα, ολεανολικό οξύ (>99% καθαρότητα), ινουλίνη (>99% καθαρότητα), υδροκορτιζόνη
- Αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και αναλώσιμα μίας χρήσης: καθετήρες (Nelaton CH08), σύριγγες του 1mL και των 5mL
- Πλαστικές πιπέττες Pasteur μιας χρήσης, erpendorfs των 1.5mL
- Ποτήρι ζέσεως των 250mL
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Νερό βρύσης

Αναλυτική πορεία:

Όλες οι ουσίες προς μελέτη χορηγούνται 24h μετά την επαγωγή της νόσου με TNBS με οισοφαγική διασωλήνωση. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ακίνητοποίηση του επίμυ, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6.2**. Στη συνέχεια, ο καθετήρας τοποθετείται στον οισοφάγο και οι ουσίες δίνονται με τη μορφή εναιωρήματος σε νερό. Συνολικά γίνονται 3 εκπλύσεις με νερό (3x1.5mL) μέχρι την απομάκρυνση όλου του προϊόντος από τον καθετήρα. Τέλος, η χορήγηση κορτιζόνης γίνεται υποδόρια (**Εικόνα 6.1.Γ**).



Εικόνα 6.2 Ακίνητοποίηση επίμυ για γαστρο-οισοφαγική διασωλήνωση

6.4 Πειραματικές ομάδες

Πιλοτικό πείραμα: Ενδοκολονική χορήγηση TNBS γίνεται σε συνολικά 5 επίμυες. Ευθανασία πραγματοποιείται ύστερα από 24h, με σκοπό την επιβεβαίωση της φλεγμονώδους απάντησης στο παχύ έντερο με ιστολογική ανάλυση. Υγιείς επίμυες (n=5) χρησιμοποιούνται ως ομάδα ελέγχου.

Α΄ Πειραματικό μέρος: Σκοπός είναι η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της σκόνης μαστίχας Χίου. Συνολικά 84 επίμυες ($261 \pm 4.13\text{g}$) χωρίζονται με τυχαίοποιημένο τρόπο σε 7 ομάδες (12x7), από τις οποίες η ομάδα Α αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες και η ομάδα Β το πειραματικό ζωικό πρότυπο της νόσου Crohn (**Πίνακας 6.1.Ι**). Η σκόνη μαστίχας χορηγείται μία φορά ημερησίως στις ομάδες Γ-ΣΤ σε διαφορετικές δόσεις. Στην τελευταία ομάδα (ομάδα Ζ) γίνεται έγχυση υδροκορτιζόνης. Το πείραμα εκτελείται σε δύο χρονικές περιόδους. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (n=42) η παρέμβαση με μαστίχα διαρκεί 3 μέρες, ενώ στη δεύτερη σειρά πειραμάτων (n=42) 7 μέρες. Ακολουθεί αναισθησία-ευθανασία.

Β΄ Πειραματικό μέρος: Σκοπός είναι η διερεύνηση του κλάσματος ή συστατικού της σκόνης μαστίχας Χίου με ευεργετικές ιδιότητες. Συνολικά 80 επίμυες ($258 \pm 3.7\text{g}$) χωρίζονται με τυχαίοποιημένο τρόπο σε 10 ομάδες (8x10), από τις οποίες η ομάδα Α αποτελεί τους υγιείς μάρτυρες και η ομάδα Β το πειραματικό ζωικό πρότυπο της νόσου Crohn (**Πίνακας 6.1.ΙΙ**). Οι πειραματικές συνθήκες καθορίζονται από τα αποτελέσματα του Α΄ πειραματικού μέρους. Τα συστατικά της σκόνης μαστίχας (ομάδες Δ-Ι), όξινο κλάσμα, ουδέτερο κλάσμα, ολεανολικό οξύ και ινουλίνη, χορηγούνται ξεχωριστά σε δόσεις που εμπεριέχονται στη δραστική δόση σκόνης μαστίχας (ομάδα Γ), όπως αυτή προκύπτει από τα αποτελέσματα του Α΄ πειραματικού μέρους.

Πίνακας 6.1 Πειραματικές ομάδες *in vivo*

I.

Α΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ			
Ομάδες	TNBS	Σκόνη μαστίχας (mg/Kg ΣΒ)	Υδροκορτιζόνη
A	-	-	-
B	+	-	-
Γ	+	50	-
Δ	+	100	-
Ε	+	200	-
Στ	+	300	-
Z	+	-	+

II.

**Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Ομάδες	TNBS	Σκόνη μαστίχας	Ινουλίνη	Όξινο κλ mg/Kg ΣΒ	Ουδέτερο κλ	Ολεανολικό οξύ
A	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-
Γ	+	δραστική δόση	-	-	-	-
Δ	+	-	α	-	-	-
Ε	+	-	-	β	-	-
Στ	+	-	-	2β	-	-
Z	+	-	-	-	γ	-
H	+	-	-	-	2γ	-
Θ	+	-	-	-	-	δ
I	+	-	-	-	-	2δ

Η σκόνη μαστίχας εμπορίου (60% μαστίχα και 40% ινουλίνη), τα κλάσματά της (όξινο και ουδέτερο), το ολεανολικό οξύ (>99% καθαρότητα) και η ινουλίνη (>99% καθαρότητα) χορηγούνται από του στόματος (mg/Kg ΣΒ/ημέρα). Η υδροκορτιζόνη (25μg/Kg ΣΒ/ημέρα) χορηγείται υποδόρια.

6.5 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 του 1mL, γάζες, χειρουργικές λαβίδες Adson, οφθαλμικά κυρτά ψαλίδια, νυστέρια μίας χρήσης (No21)
- Eppendorfs των 1.5mL
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, υπερκατάψυξη (-80°C), υγρό άζωτο (-196°C), ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)

Αναλυτική πορεία:

Στο τέλος των πειραμάτων γίνεται καταγραφή του ΣΒ όλων των ζώων και ακολουθεί αναισθησία με ενδομυϊκή έγχυση διαλύματος κεταμίνης/ξυλαζίνης (100mg/Kg ΣΒ και 20mg/Kg ΣΒ, αντίστοιχα) σε φυσιολογικό ορό. Η δράση του αναισθητικού επιβεβαιώνεται ασκώντας πίεση στα άκρα με τη βοήθεια χειρουργικής λαβίδας. 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 τρία τμήματα: α) φύλαξη σε υγρό άζωτο (-196°C) για μέτρηση παραγόντων φλεγμονής και οξειδωτικού στρες, β) φύλαξη σε υγρό άζωτο (-196°C) για απομόνωση RNA και γ) φύλαξη σε φορμαλίνη (10%) για μικροσκοπική εξέταση. Ύστερα από τομή στη θωρακική κοιλότητα, αίμα παραλαμβάνεται απευθείας από τη κοιλιακή αορτή. Ακολουθεί ευθανασία χορηγώντας δολεθάλη απευθείας στην αριστερή κοιλία της καρδιάς (0.6mg/Kg ΣΒ). Μετά από παραμονή 30min, το αίμα φυγοκεντρείται σε 1800rpm για 10min στους 4°C για την παραλαβή ορού. Στο τέλος όλων των ευθανασιών, τα δείγματα ορού φυλάσσονται στους -80°C.

6.6 Ομοιογενοποίηση των ιστών

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 20mM και PH 7.4, 0.5M βουτυλωμενο-υδροξυ τολουόλιο (BHT) σε ακετονιτρίλιο, φυσιολογικός ορός
- Κωνικές φιάλες των 50mL και 100mL, δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 5 ή 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, eppendorfs των 1.5mL, αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL και 100-1000μL)
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ομοιογενοποιητής (ULTRA-TURAX, IKA-Labortechnik), vortex, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία:

Οι ιστοί ζυγίζονται σε ζυγό 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 ομοιογενοποίησης. Η τελευταία πραγματοποιείται σε ομοιογενοποιητή και διαρκεί περίπου μισό λεπτό. Ακολουθεί vortex και φυγοκέντρωση (3000rcf στους 4°C) για 15min, ώστε να παραληφθεί το εκχύλισμα ιστών. Αμέσως μετά προσδιορίζεται η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford.

6.7 Ποσοτικοποίηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford σε ιστόΑντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)
- Αντιδραστήριο Bradford, ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4, πυκνό διάλυμα 1mg/mL αλβουμίνης ορού μόσχου (BSA) σε PBS 20mM και PH 7.4
- Κυψελίδες των 1.5mL, eppendorfs των 1.5mL, αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL)
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, vortex
- Απεσταγμένο ή 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 απορόφηση στα 595nm

Αναλυτική πορεία:

Δείγματα ιστού: Τα ομογενοποιημένα εκχυλίσματα ιστών αραιώνονται με διάλυμα PBS σε αναλογία 1/10 έως 1/20. Ακολούθως, όγκος ίσος προς 10μL από κάθε δείγμα προστίθεται σε 500μL αντιδραστηρίου Bradford και 490μL διαλύματος PBS (τελικός όγκος 1000μL). Τα δείγματα αναδεύονται ήπια σε vortex και παραμένουν σε ηρεμία για 5min μέχρι τη φωτομέτρησή τους στα 595nm.

Καμπύλη αναφοράς: Σε κυψελίδα που περιέχει 500μL αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται PBS και πυκνό διάλυμα BSA ώστε να προκύπτουν 5 τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις BSA (1 έως 10μg/mL) 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 $\mu\text{g/mL}$.

6.8 Μέτρηση των επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό και ορό

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)
- Εξειδικευμένα Elisa Kit για TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1, IL-10
- Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, erpendorfs των 1.5mL, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

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

Αναλυτική πορεία:

Τα επίπεδα του παράγοντα φλεγμονής στα δείγματα ιστού μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, προετοιμάζεται το τρυβλίο όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα, προστίθενται 100 μL μονοκλωνικού αντισώματος και το τρυβλίο επωάζεται για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (3x400 μL), ενώ παράλληλα προετοιμάζονται όλα τα αντιδραστήρια, τα standard, τα control και τα δείγματα. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο προστίθενται 100 μL standard, control ή δείγματος και ακολουθεί επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης. Στο τρυβλίο προστίθενται 100 μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 3 φορές. Προστίθενται 100 μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 3 φορές και προστίθενται 100 μL υποστρώματος (H_2O_2 και tetramethylbenzidine 1:1). Το τρυβλίο επωάζεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Τέλος, προστίθενται 100 μL

διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H_2SO_4 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα στο ιστό εκφράζονται σε pg/mg ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη καμπύλη αναφοράς. Στο ορό οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε pg/mL ορού.

6.9 Μέτρηση των επιπέδων μαλοναλδεΐδης (MDA) σε ιστό

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο UV (analyticjena SPECORD 200)
- Εξειδικευμένο MDA Kit
- Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 5mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων
- Υδατόλουτρο, απλή φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5417C), vortex

Αρχή της μεθόδου:

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

Αναλυτική πορεία:

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

6.10 Ιστολογική εξέταση

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτονικό μικροσκόπιο
- Κύβοι παραφίνης, διάλυμα χρωστικής ηωσίνης-αιματοξυλίνης
- Αντικειμενοφόρες πλάκες και καλυπτρίδες

Αναλυτική πορεία:

Για την ιστολογική εξέταση, τα παρασκευάσματα μονιμοποιούνται σε διάλυμα ουδετεροποιημένης φορμαλίνης 10%. Λαμβάνονται χαρακτηριστικές θέσεις από το καθένα και εγκλείονται σε κύβους παραφίνης. Τομές πάχους 4μm από τους κύβους παραφίνης χρησιμοποιούνται για χρώση με ηωσίνη-αιματοξυλίνη και ακολούθως εξετάζονται σε φωτονικό μικροσκόπιο. Για την βαθμονόμηση των πλακιδίων ως προς τη βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων χρησιμοποιείται η κλίμακα των Geboes και συν (2000). Συγκεκριμένα, αξιολογούνται οι παρακάτω παράμετροι: (0) βλάβες στην αρχιτεκτονική δομή του επιθηλίου: 0.0 = καμία αλλοίωση, 0.1 = ήπια αλλοίωση, 0.2 = μέτριες εστίες αλλοίωσης, 0.3 = σοβαρές ή διάχυτες εστίες αλλοίωσης· (1) χρόνια φλεγμονώδης διήθηση: 1.0 = καμία αύξηση, 1.1 = ήπια αλλά μη σαφής αύξηση, 1.2 = μέτρια αύξηση, 1.3 = σημαντική αύξηση· (2) ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα: 2.0 = καμία αύξηση, 2.1 = ήπια αλλά μη σαφής αύξηση, 2.2 = μέτρια αύξηση, 2.3 = σημαντική αύξηση· (3) ουδετερόφιλα στο επιθήλιο: 3.0 = κανένα, 3.1 = σε λιγότερο από το 50% των κρυπτών, 3.2 = στο 50% των κρυπτών, 3.3 = σε περισσότερο από το 50% κρυπτών· (4) αποικοδόμηση κρυπτών: 4.0 = καμία, 4.1 = πιθανή τοπική διήθηση ουδετερόφιλων σε τμήμα των κρυπτών, 4.2 = ανάρρωση των κρυπτών, 4.3 = καταστροφή των κρυπτών· (5) διάβρωση ή εξέλκωση: 5.0 = καμία, 5.1 = πιθανή ανάρρωση του επιθηλίου και υποχώρηση της παρακείμενης φλεγμονής, 5.2 = πιθανή αλλοίωση, 5.3 = ασαφής διάβρωση, 5.4 = εξέλκωση ή αδένωμα. Όλες οι φωτογραφίες αφορούν χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης και ελήφθησαν σε μεγέθυνση 100x.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ

7.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMC) ανθρώπου

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 με L-γλουταμίνη 2mM, ανθρώπινος ορός, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, αντιπηκτικό EDTA
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 50mL (sterilized falcon tubes), αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5 ή 10mL, αποστειρωμένες αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), αποστειρωμένες πλαστικές πιπέττες Pasteur των 2mL
- Αποστειρωμένο διάλυμα Ficoll 1mg/mol, αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4, διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου (trypan blue)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV, επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂), αιμοκυττόμετρο, φωτονικό μικροσκόπιο και απλή φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)

Αναλυτική πορεία:

Η απομόνωση των PBMC βασίζεται στη μέθοδο διαχωρισμού με διάλυμα Ficoll. Σε δοκιμαστικό σωλήνα 10mL αίματος (παρουσία αντιπηκτικού EDTA) από υγιείς εθελοντές (άρρενες και θήλειες, ηλικίας 23-45 ετών) αραιώνονται σε ίσο όγκο διαλύματος PBS και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται καλά. Το αραιωμένο αίμα στρώνεται σιγά σιγά σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 15mL διαλύματος Ficoll και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 1800rpm για 20min στους 20°C (χωρίς επιτάχυνση και φρένα). Τα PBMC (ενδιάμεση στιβάδα) παραλαμβάνονται με τη βοήθεια πιπέττας Pasteur και μεταφέρονται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5min σε 1800rpm στους 20°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα πλένεται για δεύτερη φορά σε καλλιεργητικό υλικό, ώστε να απομακρυνθούν ίχνη διαλύματος Ficoll. Το υπερκείμενο απομακρύνεται ξανά και στα κύτταρα προστίθεται κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 με προσθήκη 10% ανθρώπινου ορού, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα μετρώνται σε αιμοκυττόμετρο ύστερα από αραιώση σε διάλυμα χρωστικής trypan blue (1:4).

7.2 Καλλιέργειες/συγκαλλιέργειες

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Ορός νεογνού μόσχου (FBS), διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 με L-γλουταμίνη 2mM, καλλιεργητικό υλικό DMEM με L-γλουταμίνη 2mM, πενικιλίνη-

- στρεπτομυκίνη, διάλυμα χρωστικής κυανού του τρυπανίου (trypan blue), αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4, διάλυμα Trypsin-EDTA, λιποπολυσακχαρίδιο (LPS)
- Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 ή 50mL (sterilised falcon tubes), αποστειρωμένα πλαστικά σιφώνια των 5 ή 10mL, αποστειρωμένες αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, και 100-1000μL), πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 12 βοθρίων επιφάνειας 3.8cm², πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 24 βοθρίων επιφάνειας 1.9cm², εξειδικευμένα τρυβλία επώασης των 12 βοθρίων με παρεμβλήματα με περατή μεμβράνη στον κάτω τομέα (επιφάνεια 1.12cm² και μέγεθος πόρου 0.4μm), αποστειρωμένα κρυοάντοχα σωληνάρια των 2mL και καλλιεργητικές φλάσκες επιφάνειας 70cm²
 - Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂), ψυγείο (2-4°C), καταψύκτης (-20°C), υπερκατάψυξη (-80°C), υγρό άζωτο (-196°C), θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV, αιμοκυττόμετρο, υδατόλουτρο, φωτονικό μικροσκόπιο, ψυχόμενη φυγόκεντρος (eppendorf centrifuge 5810R)
 - FACScan (Becton Dickinson), αντισώματα FITC-conjugated anti-CD3 και phycoerythrin-conjugated anti-CD14

Αναλυτική πορεία:

7.2.1 Μέτρηση των κυττάρων κι έλεγχος βιωσιμότητας

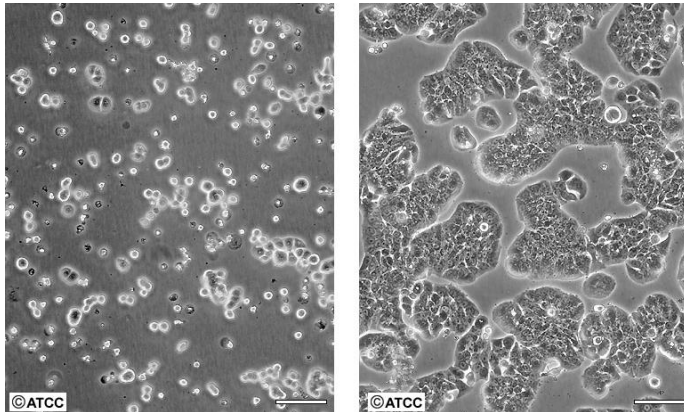
Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με αιμοκυττόμετρο. Στο κυτταρικό αιώρημα προστίθεται κατάλληλος όγκος χρωστικής trypan blue. Ακολουθεί επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα τοποθετούνται στο αιμοκυττόμετρο και μετρώνται. Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφτεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας σύμφωνα με τη σχέση:

«Ποσοστό βιώσιμων = 100 x νεκρά κύτταρα (κυανά) / μετρηθέντα κύτταρα»

7.2.2 Καλλιέργεια ανθρώπινης σειράς επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29

Τα HT29 είναι κυτταρική σειρά προερχόμενη από το παχύ έντερο ανθρώπου που εκφράζει όλα τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των ώριμων εντεροκυττάρων. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θρεπτικό υλικό που αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό DMEM με προσθήκη 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ στους 37°C. Με οπτική μικροσκοπία καθορίζεται η ημέρα ανάπτυξης συνοχής-συρροής των κυττάρων, δηλαδή του σχηματισμού συνεχόμενου μονόστιβου επιθηλίου που καλύπτει την επιφάνεια εργασίας. Ο χρόνος διπλασιασμού είναι 48h. Για τη μέτρηση των κυττάρων, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα, πλένουμε με PBS (5mL) κι επιδρούμε με διάλυμα Trypsin-EDTA (2-3mL) παρατηρώντας στο μικροσκόπιο μέχρι να αποκολληθεί η στιβάδα από τη φλάσκα (συνήθως μεταξύ 5 και 10min). Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει θρεπτικό υλικό (15-

20mL) και φυγοκεντρούμε για 5min σε 1800rpm στους 20°C, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα Trypsin-EDTA. Τα κύτταρα πλένονται ξανά, μετρώνται και μοιράζονται ανάλογα με το πλάνο του πειράματος σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία επώασης των 24 βοθρίων (1×10^5 κύτταρα ανά βοθρίο). Σε κάθε βοθρίο προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 1mL και τα κύτταρα επωάζονται (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂) για 24h, δηλαδή έως ότου προσκολληθούν στην επιφάνεια των βοθρίων.



Εικόνα 7.1 Καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29. Αριστερά: χαμηλή πυκνότητα. Δεξιά: υψηλή πυκνότητα. Κλίμακα 100μm.

7.2.3 Ψύξη και απόψυξη των HT29 κυττάρων

Καλλιέργεια των HT29 κυττάρων σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης φυγοκεντρείται σε 1800rpm για 5min στους 20°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα ψύξης που αποτελείται από θρεπτικό υλικό με 20% FBS και 10% DMSO. Η πυκνότητα των κυττάρων ρυθμίζεται στα 5×10^6 κύτταρα/mL. Από το κυτταρικό αιώρημα φέρεται 1mL σε ειδικά κρυοάντοχα σωληνάρια των 2mL, τα οποία καταψύχονται σταδιακά μέχρι να μεταφερθούν τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου (-196°C). Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται φέροντας το κρυοάντοχο σωληνάριο, από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται περίπου δέκα φορές με θρεπτικό υλικό (37°C) και φυγοκεντρείται για 5min σε 1800rpm στους 20°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα πλένονται ξανά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 5mL θρεπτικού υλικού, φέρεται σε φλάσκες καλλιέργειας και τοποθετείται στον κλίβανο (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂).

7.2.4 Διέγερση των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29

Στις καλλιέργειες των HT29 κυττάρων (στα τρυβλία των 24 βοθρίων), γίνεται επίδραση με τον προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α σε συγκέντρωση ίση προς 50ng/mL θρεπτικού υλικού. Μετά από 24h επώασης (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂), το υπερκείμενο κάθε βοθρίου παραλαμβάνεται και μετρώνται τα επίπεδα της IL-8 (όπως περιγράφεται παραπάνω). Στα κύτταρα που μελετάται ο

μηχανισμός δράσης της μαστίχας και των συστατικών της, πριν τη διέγερση με TNF- α , διαφορετικές συγκεντρώσεις προστίθενται στην καλλιέργεια κυττάρων και επώάζονται για 24h. Η μαστίχα και τα συστατικά της είναι απαλλαγμένα από β-πολυμερή, μιας και έχει πραγματοποιηθεί εκχύλιση της μαστίχας σε οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη. Ως αποτέλεσμα, μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε αιθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας. Για τον έλεγχο ενεργοποίησης του NF- κ B, παραλαμβάνονται τα κύτταρα, λύνονται και μετράται η απορρόφηση της NF- κ B p65 υπομονάδας.

7.2.5 Διαφοροποίηση μονοκυττάρων προερχόμενα από PBMC ανθρώπου σε μακροφάγα

Αριθμός PBMC ίσος προς 3×10^6 τοποθετείται σε πολυστυρενικό τρυβλίο επώασης 12 βοθρίων μέσα σε 1mL θρεπτικού υλικού (RPMI-1640, 10% ανθρώπινου ορού, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης). Ύστερα από 4h επώασης σε 37°C και 5% CO₂, τα μονοκύτταρα (Mo) προσκολλώνται στην επιφάνεια των βοθρίων (3×10^5), ενώ τα T και B λεμφοκύτταρα αιωρούνται στο υπερκείμενο το οποίο και απορρίπτεται. Στα τρυβλία προστίθεται θρεπτικό υλικό και τα Mo επώαζονται (37°C, 95% υγρασία, 5% CO₂) για περίπου 6 μέρες, έως ότου διαφοροποιηθούν σε μακροφάγα (Mo/MΦ). Τα Mo/MΦ διεγείρονται με προσθήκη LPS σε συγκέντρωση 150ng/mL για 20h. Προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό (RPMI-1640, 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης) και τα κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα εκχυλίσματα μαστίχας και συστατικών της για 24h. Ακολούθως, μετρώνται τα επίπεδα TNF- α στο υπερκείμενο.

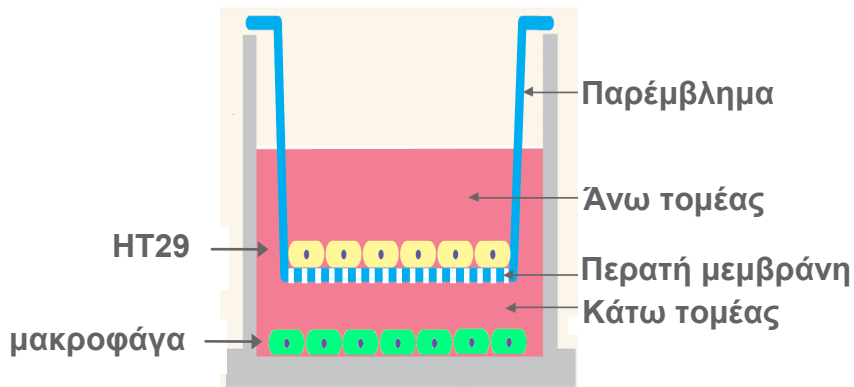
Για την ταυτοποίηση του πληθυσμού των Mo, πραγματοποιείται ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) με τη βοήθεια του FACScan. Τα κύτταρα που έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια των βοθρίων σημαίνονται με conjugated anti-CD3 και phycoerythrin-conjugated anti-CD14, αντισώματα που προσδένονται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων και των Mo, αντίστοιχα.

7.2.6 *In vitro* μοντέλο φλεγμονής παχέος εντέρου-νόσου Crohn

Για την ανάπτυξη ενός *in vitro* μοντέλου φλεγμονής στο παχύ έντερο που μιμείται τη νόσο Crohn, εφαρμόζεται σύστημα συγκαλλιέργειας Mo/MΦ και επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29, σε εξειδικευμένα τρυβλία 12 βοθρίων με παρεμβλήματα με περατή μεμβράνη στον κάτω τομέα. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια των HT29 κυττάρων αναπτύσσεται στον άνω τομέα του συστήματος, ενώ των Mo/MΦ στον κάτω τομέα.

Μετά την πάροδο 24h όπου η συρροή στις καλλιέργειες είναι >90%, τα παρέμβλημα με τις καλλιέργειες των HT29 κυττάρων μεταφέρονται στα βοθρία με τις καλλιέργειες των Mo/MΦ. Και στους δύο τομείς χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό με RPMI-1640, 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης. Τα Mo/MΦ έχουν ήδη διεγερθεί με LPS (150ng/mL) για 20h. Για τη διευκρίνιση της δράσης της μαστίχας και των συστατικών της, διαφορετικές συγκεντρώσεις προστίθενται στις καλλιέργειες των HT29 και ακολουθεί επώαση για 24h παρουσία

του κάτω παρεμβλήματος με τα Μο/ΜΦ. Ακολούθως, μετρώνται τα επίπεδα των IL-8 στο υπερκείμενο των HT29 κυττάρων, καθώς και η ένταση ενεργοποίησης της πρωτεΐνης NF-κΒ p65 στα HT29 κύτταρα.



Εικόνα 7.2 Σύστημα συγκαλλιέργειας

7.3 Μέτρηση γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

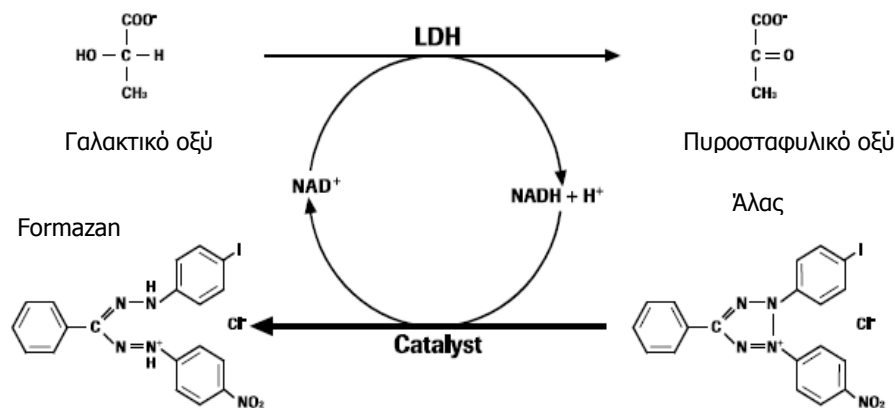
Για τη μελέτη της επίδρασης των συστατικών της μαστίχας στη βιωσιμότητα των HT29 κυττάρων, μετρώνται τα επίπεδα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate dehydrogenase, LDH) στα υπερκείμενα της καλλιέργειας των HT29, με εξειδικευμένο kit.

Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN)
- Εξειδικευμένο LDH Kit
- Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 10mL με αντίστοιχα πώματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, erpendorfs των 1.5mL , πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων

Αρχή της μεθόδου:

Αρχικά, το γαλακτικό οξύ οξειδώνεται σε πυροσταφυλικό οξύ με καταλύτη LDH και ταυτόχρονη αναγωγή του NAD^+ σε $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$. Ακολούθως, η διαφοράση καταλύει τη μεταφορά H/H^+ από το NADH/H στο κίτρινο άλας τετραζολίου που ανάγεται προς το κυανούν ίζημα formazan. Η συγκέντρωση της formazan υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 490nm.



Εικόνα 7.3. Αντίδραση LDH

Αναλυτική πορεία:

Τα υπερκείμενα (100μL) συλλέγονται και μεταφέρονται σε τρυβλίο 96 βοθρίων. Μίγμα άλατος τετραζολίου και γαλακτικού οξέος (1:45) όγκου 100μL, προστίθεται στο βοθρίο και ακολουθεί επώαση στους 15-25°C σε σκοτάδι. Μετά από χρόνο 30min, μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 490nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με εφαρμογή του τύπου:

Κυτταροτοξικότητα (%) = $[(A_{490\text{nm}} \text{ δείγμα} - A_{490\text{nm}} \text{ low control}) / (A_{490\text{nm}} \text{ high control} - A_{490\text{nm}} \text{ low control})] * 100$, όπου

“low control” η τιμή που αντιστοιχεί σε βοθρίο στο οποίο προστίθεται το υπερκείμενο καλλιέργειας που δεν έχει επιδράσει κανένας διεγέρτης και

“high control” η τιμή που αντιστοιχεί σε βοθρίο στο οποίο προστίθεται το υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων που προηγούμενα λύνονται με 1% Triton X-100.

7.4 Μέτρηση πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) p65Αντιδραστήρια-όργανα:

- Φωτόμετρο ELISA (SUNRISE TECAN), συσκευή υπερήχων (BANDELIN electronic)
- Εξειδικευμένο Elisa Kit
- Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 10mL με αντίστοιχα πάματα ανθεκτικά στο ακετονιτρίλιο, erpendorfs των 1.5mL, πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 20mM και PH 7.4
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του NF-κB, μετράται η ένταση της απορρόφησης της πρόδρομης πρωτεΐνης (NF-κB) p65. Μετά τη λύση των κυττάρων, η p65 προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα και στη συνέχεια προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής της προσδεμένης πρωτεΐνης στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο για απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών και προσθήκη anti-ενζύμου-υποστρώματος, όπου λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

Αναλυτική πορεία:

Λύση των κυττάρων: Στα κύτταρα προστίθεται παγωμένο διάλυμα PBS και αφού αυτό απομακρυνθεί, τοποθετείται 0.2mL διαλύματος λύσης των κυττάρων (cell lysis buffer) μαζί με 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Ακολουθεί επώαση για 5min σε πάγο και τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Με τη βοήθεια υπέρηχων τα κύτταρα λύνονται και φυγοκεντρούνται για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες απομονώνεται, μεταφέρεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80 °C.

Ένταση ενεργοποίησης NF-κB p65: Η αξιολόγηση της ενεργοποίησης της p65 βασίζεται σε ELISA φωτόμετρο με την εφαρμογή εξειδικευμένου sandwich Kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευαστικής εταιρείας. Αρχικά, 100μL δείγματος αραιώνονται με Sample Diluent 1:1 και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για κάποια δευτερόλεπτα. Ακολουθώντας, 100μL αραιωμένου δείγματος προστίθενται στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο όπου έχει ήδη προσδεθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση για 2h στους 37°C ή για 12h στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται με το διάλυμα πλύσης (4x200μL). Στο τρυβλίο προστίθενται 100μL από το διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος και επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C. Απομακρύνεται ξανά το υπερκείμενο και ξεπλένεται 4 φορές. Προστίθενται 100μL διαλύματος ενζύμου Streptavidin-HRP και επωάζεται στους 37°C για 30min. Απομακρύνεται πάλι το υπερκείμενο, ξεπλένεται 4 φορές και προστίθενται 100μL υποστρώματος (TMB). Επωάζεται στους 37°C για 10min ή 30min στους 25°C. Τέλος, προστίθενται 100μL διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (H₂SO₄ 2N) και μετράται η απορρόφηση στα 450nm σε φωτόμετρο ELISA. Η ενεργοποίηση του NF-κB αξιολογείται σύμφωνα με την τιμή απορρόφησης στην ομάδα ελέγχου (υγιά κύτταρα).

7.5 Έκφραση παραγόντων φλεγμονήςΑντιδραστήρια-όργανα:

- Θερμικός κυκλοποιητής (PCR), vortex
- RNA extraction Kit
- Superscript One-Step RT-PCR Kit with platinum Taq DNA polymerase
- Εκκινητές IL-8, ICAM-1 και β-ακτίνης επίμυ, εκκινητές IL-8 και β-ακτίνης ανθρώπου

- Αυτόματες πιπέττες και tips (1-10μL, 10-100μL, 100-1000μL), δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15mL ελεύθερα από DNase/RNase, eppendorfs των 1.5mL ελεύθερα από DNase/RNase
- Απιονισμένο νερό

Αρχή της μεθόδου:

Βασίζεται στην ανίχνευση σήματος φθορισμού, ο οποίος είναι ανάλογος της ποσότητας του DNA που συντίθεται κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase change reaction, RT-PCR). Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει τη νουκλεοτιδική ακολουθία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας.

Τα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για την *in vitro* σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης (reversed transcriptase, RT). Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase) επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει τη κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη (template denaturation).
2. Σύνδεση εκκινητών (primer annealing).
3. Επιμήκυνση (primer extension).

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επαναυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές. Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών.

Αναλυτική πορεία:

Η επίδραση της μαστίχας και των συστατικών της ελέγχεται περαιτέρω με την ποσοτικοποίηση της έκφρασης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, ολικό RNA απομονώνεται από τον ιστό επίμυων και από τα HT29 κύτταρα που έχουν προηγουμένως αλληλεπιδράσει με Μο/ΜΦ. Η εκχύλιση RNA βασίζεται στην τεχνολογία “spin column” σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η τεχνική “One Step RT-PCR”, όπου η σύνθεση cDNA και η RT-PCR πραγματοποιούνται διαδοχικά χρησιμοποιώντας το ίδιο eppendorf. Αρχικά δημιουργείται μίγμα με τα παρακάτω αντιδραστήρια: PCR buffer, MgSO₄, RT/Taq DNA πολυμεράση, dNTP's, primer L (left primer-αριστερός εκκινητής), primer R (right

primer-δεξιάς εκκινητής) και H₂O. Σε κάθε eppendorf τοποθετούνται 1000pg από κάθε δείγμα RNA. Το μίγμα αναδεύεται καλά και διατηρείται σε πάγο.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν την ακόλουθη αλληλουχία:

✓ επίμυες: IL-8 (L:5-GGCAGGGATTCACTTCAAGA-3, R:5-GCCATCGGTGCAATCTATCT-3), ICAM-1 (L:5-AGGTATCCATCCATCCACACA-3, R:5-AGTGTCTCATTGCCACGGAG-3), β-ακτίνη (L:5-AATCGTGCGTGACATCAAAG-3, R:5-ATGCCACAGGATTCCATACC-3)

✓ άνθρωπος: IL-8 (L:5-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3, R:5-AATTTCTGTGTTGGCGC-AGTGT-G-3) και β-ακτίνη (L:5-TGACGGGGTTCATCCA-CACTGTGCCCATCTA-3, R:5-CTAG-AAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3)

Ως γονίδιο ελέγχου της PCR χρησιμοποιείται το γονίδιο της β-ακτίνης.

Για να αποφευχθεί η εξάτμιση του μίγματος κατά τη διαδικασία της PCR που πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες, σε κάθε eppendorf προστίθεται μια σταγόνα mineral oil. Τα eppendorfs τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή (PCR) και πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια: Βήμα 1ο: 95°C για 5 min, Βήμα 2ο: 40 φορές τα βήματα 4, 5, 6: Βήμα 3ο: 95°C για 30 sec, Βήμα 4ο: 57°C για 30 sec, Βήμα 5ο: 72°C για 30 sec, Βήμα 6ο: 72°C για 10 min, Βήμα 7ο: Αποθήκευση στους 8°C.

7.6 Έλεγχος PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα αυτό περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) 10mg/mL, το οποίο φωσφορίζει στο υπεριώδες. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων διαχωρίζεται μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 3-3,1 Kb.

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης (2g αγαρόζης σε 100mL αραιωμένου διαλύματος TAE) το οποίο και μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου να προκύψει διαυγές διάλυμα. Στο διάλυμα προστίθενται 3μL EtBr 10mg/mL και το μίγμα αποχύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης. Όταν το gel πήξει, προστίθενται 250mL αραιωμένου διαλύματος TAE και τα δείγματα προετοιμάζονται για την ηλεκτροφόρηση. Σε eppendorf τοποθετούνται 10μL από το προϊόν της PCR και 4μL χρωστικής. Σε κάθε βοθρίο που έχει σχηματιστεί στο gel, προστίθενται 10μL από το δείγμα, ενώ σε ένα τοποθετείται ο μάρτυρας (DNA ladder 100bp). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 Volts για 20min περίπου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel παρατηρείται στο υπεριώδες. Η ύπαρξη ζωνών συγκεκριμένου μήκους υποδηλώνει ότι η διαδικασία της PCR έγινε με επιτυχία. Το μήκος κάθε ζώνης υπολογίζεται σε σχέση με το μάρτυρα, ο οποίος αποτελείται από κομμάτια DNA συγκεκριμένου μήκους (DNA ladder). Η ποσοτικοποίηση της έντασης φωτεινότητας των ζωνών βασίζεται στο πρόγραμμα QuantityOne Analysis (Bio-Rad).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

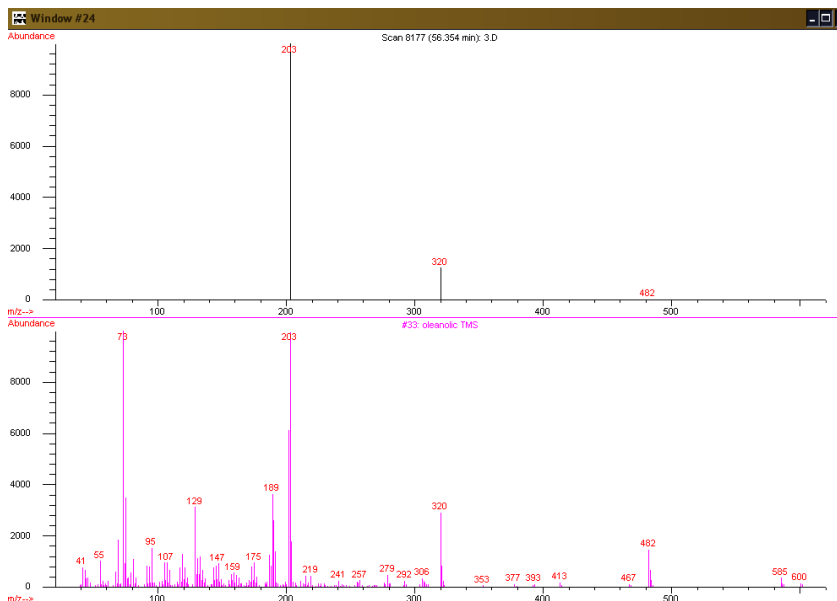
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα test είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη γίνονται με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Bonferroni test (≤ 7 ομάδες σύγκρισης) ή το Tukey test (> 7 ομάδες σύγκρισης). Η ανάλυση μη παραμετρικών δεδομένων γίνεται με το Mann Whitney (2 ομάδες σύγκρισης) ή το Kruskal-Wallis test (≥ 2 ομάδες σύγκρισης). Η τιμή $p\text{-value} \leq 0.05$ καθορίζεται σαν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

ΜΕΡΟΣ Γ΄ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

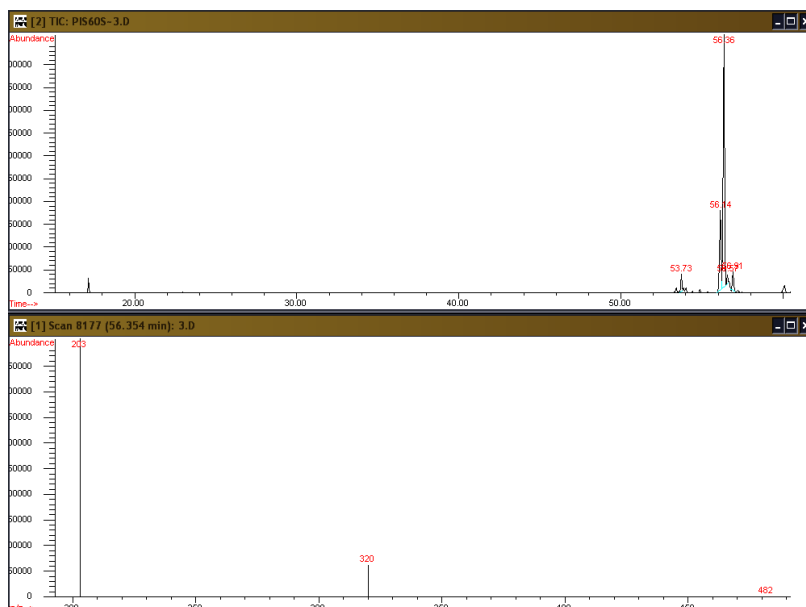
ΜΕΡΟΣ Γ' ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΑΣΤΙΧΑΣ

Σύμφωνα με τη μέθοδο κλασματοποίησης, το $42 \pm 3\%$ της ρητίνης αποτελεί το όξινο κλάσμα και το $40 \pm 4\%$ το ουδέτερο κλάσμα. Τα μη διαλυτά συστατικά της μαστίχας, τα β-πολυμερή, καταλαμβάνουν το $13.3 \pm 0.3\%$ της ρητίνης. Η ανάλυση GC-MS δείχνει ότι το τριτερπένιο, ολεανολικό οξύ, αποτελεί το $30 \pm 4\%$ του όξινου κλάσματος (Εικόνα 9.1). Συνεπώς, όλα τα πειράματα της παρούσας διατριβής πραγματοποιούνται βάσει της παραπάνω σύστασης σε όξινο κλάσμα, ουδέτερο κλάσμα και ολεανολικό οξύ.



Εικόνα 9.1 Πάνω: Τριμέθυλ-
συλλιωμένα ιοντικά
θραύσματα ολεανολικού οξέος.
Κάτω: Σύσταση όξινου
κλάσματος σε ολεανολικό οξύ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ

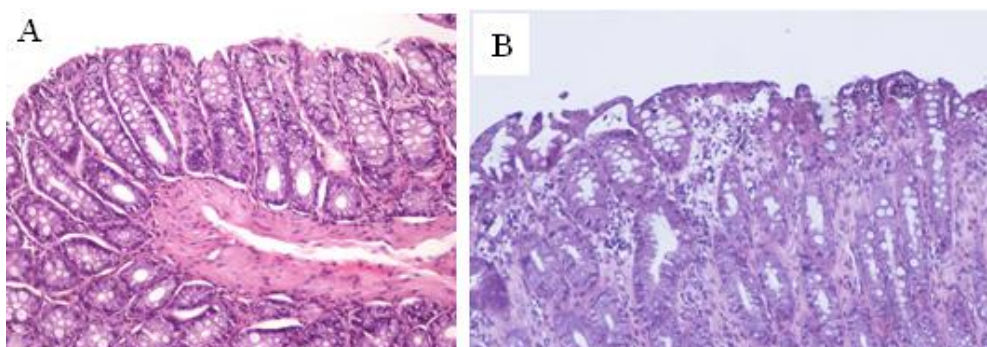
10.1 Πιλοτικό πείραμα

Στον **Πίνακα 10.1** παρουσιάζεται η κλίμακα των ιστολογικών αλλοιώσεων στο παχύ έντερο επίμυων, 24h μετά την επαγωγή φλεγμονής με TNBS. Η εμφανής παρουσία βλάβης στο επιθήλιο (**Εικόνα 10.1.B**) σημαίνει την επιτυχία του πειραματικού μοντέλου της νόσου Crohn και επιτρέπει την περαιτέρω διεξαγωγή των πειραμάτων.

Πίνακας 10.1 Βαρύτητα ιστολογικών αλλοιώσεων 24h μετά την ενδοκολονική χορήγηση TNBS σε επίμυες.

Ομάδες	24h	p-value
Υγιείς επίμυες	0.0±0.0	
TNBS-επίμυες	4.7±0.3*	0.00

Η βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων εκφράζεται ως μέσος όρος±S.E. *Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Mann-Whitney δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.



Εικόνα 10.1 Επιθήλιο παχέος εντέρου 24h μετά την ενδοκολονική έγχυση TNBS σε επίμυες. Εγκάρσιες τομές, χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης, μεγέθυνση 100x. [A] Υγιές κόλον. [B] Βλάβη παχέος εντέρου με εμφανή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, φλεγμονή, εξέλκωση, οίδημα και παρουσία ηωσινόφιλων.

10.2 Α΄ Πειραματικό μέρος

Στο πείραμα αυτό μελετάται χορηγείται σκόνη μαστίχας Χίου (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη) στους TNBS-επίμυες σε διαφορετικές δόσεις (0, 50, 100, 200 και 300mg/Kg ΣΒ) και χρονικές περιόδους (3 και 6 μέρες) παρέμβασης. Η επίδραση του προϊόντος αξιολογείται ως προς την ιστοπαθολογοανατομική εικόνα του εντέρου, τη συγκέντρωση παραγόντων φλεγμονής στον ιστό και ορό, καθώς την αντιοξειδωτική δράση.

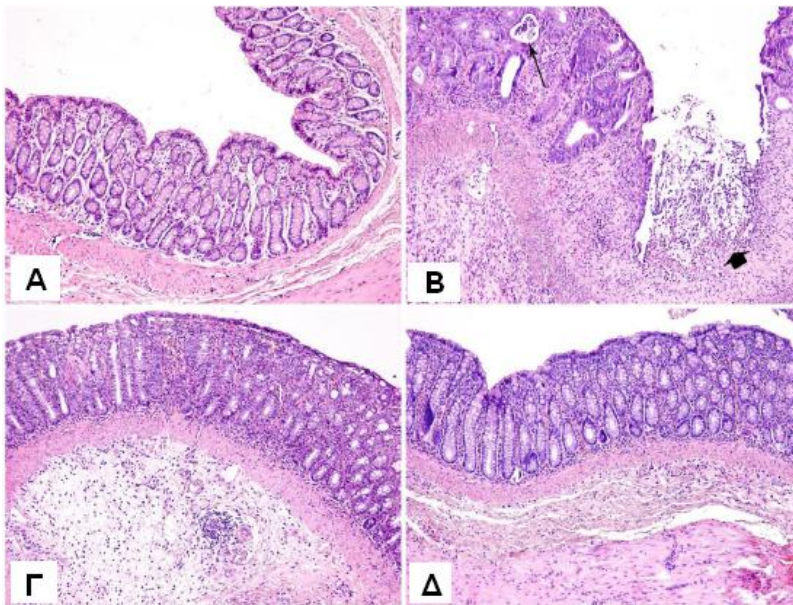
10.2.1 Ιστολογική ανάλυση

Στον **Πίνακα 10.2** παρουσιάζεται η κλίμακα των ιστολογικών αλλοιώσεων στο παχύ έντερο επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή φλεγμονής με TNBS. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των υγιών επίμυων (**Εικόνα 10.2.Α**) και εκείνων με TNBS-κολίτιδα (**Εικόνα 10.2.Β**). Η έγχυση υδροκορτιζόνης μειώνει την ιστολογική βλάβη (**Εικόνα 10.2.Γ**). Η χορήγηση σκόνης μαστίχας για 3 μέρες είναι αρκετή για να μειώσει τη βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων σε όλες τις εξεταζόμενες δόσεις (**Εικόνα 10.2.Δ**). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μετά από 6 μέρες παρέμβασης με σκόνη μαστίχας ή υδροκορτιζόνη.

Πίνακας 10.2 Βαρύτητα ιστολογικών αλλοιώσεων 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη) σε επίμυες με TNBS-κολίτιδα.

Ομάδες	3 μέρες	p-value
Ομάδα Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	0.0±0.0	
Ομάδα Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	4.7±0.5*	0.00
Ομάδα Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	1.4±0.3**	0.00
Ομάδα Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	1.3±0.1**	0.00
Ομάδα Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	2.5±0.6**	0.001
Ομάδα ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	1.7±0.2**	0.00
Ομάδα Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	2.1±0.0**	0.00

Η βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων εκφράζεται ως μέσος όρος±S.E. Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Kruskal-Wallis επιβεβαιώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τάξεων. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν είτε σκόνη μαστίχας είτε υδροκορτιζόνη.



Εικόνα 10.2 Επιθήλιο παχέος εντέρου 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη) σε επίμυες με TNBS-κολίτιδα. Εγκάρσιες τομές, χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης, μεγένθυση 100x. [Α] υγιή ζώα: φυσιολογικό επιθήλιο, [Β] TNBS-επίμυες: σοβαρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, απόστημα κρυπτών (βέλος), φλεγμονή, οίδημα και εξέλκωση (παχύ βέλος), [Γ] TNBS-επίμυες με αγωγή υδροκορτιζόνης: μερική διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, οίδημα και αυξημένη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων, [Δ] TNBS-επίμυες με αγωγή σκόνης μαστίχας: σπάνια παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων με μικρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών.

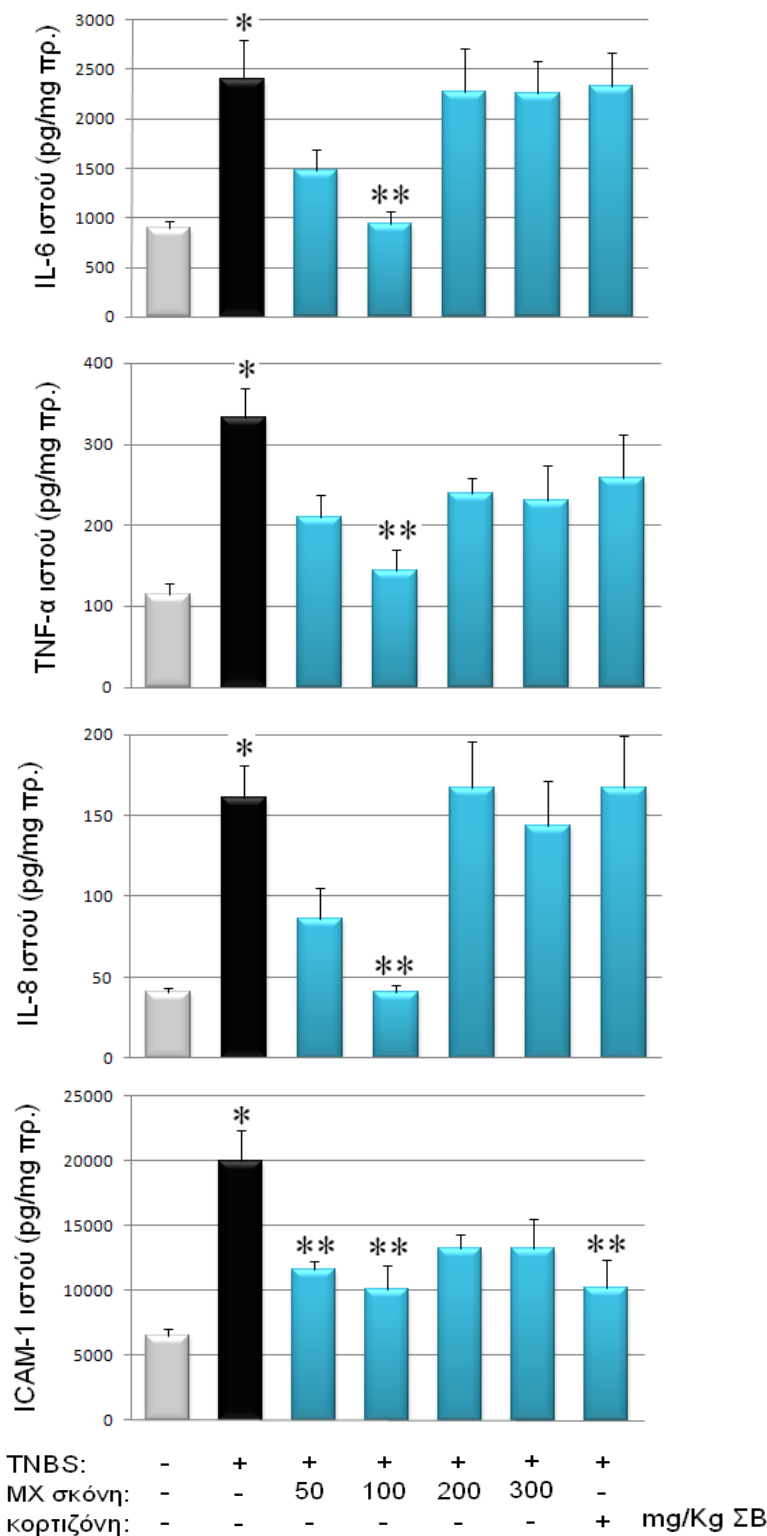
10.2.2 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό

Η βαρύτητα της φλεγμονής στο κόλον αξιολογείται περαιτέρω με τη μέτρηση παραγόντων φλεγμονής. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10.3**, η απουσία ιστολογικής βλάβης στην ομάδα Α (υγιή ζώα) συμφωνεί με την εύρεση χαμηλών συγκεντρώσεων παραγόντων φλεγμονής. Σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις των TNF-α (332 ± 36 έναντι 114 ± 14 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.001$), IL-6 (2398 ± 396 έναντι 898 ± 67 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.028$), IL-8 (161 ± 20 έναντι 41 ± 2 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.011$) και ICAM-1 (20030 ± 2312 έναντι 6541 ± 494 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.00$) παρατηρούνται στο κόλον των TNBS-επίμυων (ομάδα Β) συγκριτικά με εκείνων της ομάδας Α. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται στα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους IL-10 (464 ± 123 έναντι 267 ± 28 pg/mg πρωτεΐνης, $p=1.0$), 3 μέρες μετά την επαγωγή κολίτιδας.

Η παραπάνω αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών αναστέλλεται ύστερα από αγωγή με σκόνη μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη), ιδιαίτερα στην ομάδα Δ (100mg/Kg ΣΒ/ημέρα). Συγκεκριμένα, η αύξηση των επιπέδων του TNF-α, μορίου κλειδί στο μονοπάτι της φλεγμονής, μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα Β (143 ± 27 έναντι 332 ± 36 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.008$)

(**Εικόνα 10.3**). Στην ομάδα Δ, σημαντικά μειωμένες είναι και οι τιμές των IL-6 και IL-8 (935 ± 137 έναντι 2398 ± 396 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.036$ και 41 ± 5 έναντι 161 ± 20 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.010$, αντίστοιχα) (**Εικόνα 10.3**). Όσον αφορά στα επίπεδα του ICAM-1, στατιστικά σημαντικές μειώσεις παρατηρούνται στις ομάδες Γ (50 mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ/ημέρα) και Δ (100 mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ/ημέρα). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις είναι 11612 ± 622 έναντι 20030 ± 2312 pg/mg πρωτεΐνης ($p=0.027$) και 10132 ± 1821 έναντι 20030 ± 2312 pg/mg πρωτεΐνης ($p=0.005$), αντίστοιχα. Η αγωγή με υδροκορτιζόνη (ομάδα Ζ) δεν καταφέρνει να ρυθμίσει την έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, εκτός του ICAM-1 (101800 ± 2158 έναντι 20030 ± 2312 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.005$) (**Εικόνα 10.3**). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται στα επίπεδα της αντιφλεγμονώδους IL-10 ύστερα από αγωγή με σκόνη μαστίχας ή υδροκορτιζόνη (**Πίνακας 10.3**).

Στο τέλος των 6 ημερών παρέμβασης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μόνο στα επίπεδα του ICAM-1 μεταξύ της ομάδας των υγιών ζώων και εκείνων με TNBS-κολίτιδα (3220 ± 739 έναντι 6659 ± 500 pg/mg πρωτεΐνης, $p=0.026$). Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων κυτταροκινών (TNF- α , IL-6 και IL-8) παραμένουν ίδιες, γεγονός που σημαίνει τη μείωση της δραστηριότητας του TNBS, 6 μέρες μετά την χορήγησή του (**Πίνακας 10.4**).



Εικόνα 10.3 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη). Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών-και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν είτε σκόνη μαστίχας είτε υδροκορτιζόνη.

Πίνακας 10.3 Συγκεντρώσεις IL-10 στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη).

Ομάδες	IL-10	p-value
Ομάδα Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	267±28	
Ομάδα Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	464±123	1.00
Ομάδα Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	411±115	1.00
Ομάδα Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	351±28	1.00
Ομάδα Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	410±86	1.00
Ομάδα ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	395±37	1.00
Ομάδα Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	378±62	1.00

Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pg/mg πρωτεΐνης (μέσος όρος±S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

Πίνακας 10.4 Συγκεντρώσεις κυτταροκινών στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 6 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη).

Ομάδες	TNF- α	IL-6	IL-8	IL-10
Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	185±22	1496±241	42±6	359±16
Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	125±14	1247±201	50±7	359±60
Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	170±32	1503±118	38±5	390±51
Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	145±16	1975±543	39±9	318±32
Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	140±13	1744±305	33±4	376±71
ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	138±18	1259±230	34±9	341±70
Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	154±18	2149±418	64±10	377±70

Ομάδες	ICAM-1
Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	3220±739
Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	6659±500*
Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	4322±243
Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	4105±643
Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	4805±663
ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	3777±463
Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	6421±1195

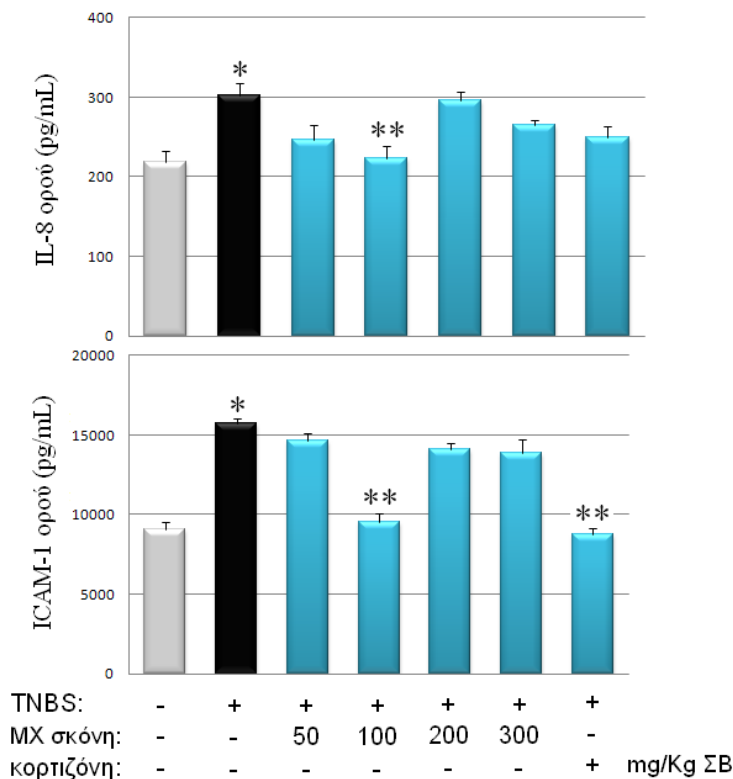
Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pg/mg πρωτεΐνης (μέσος όρος±S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων.

10.2.3 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ορό

Οι συγκεντρώσεις των προφλεγμονωδών κυτταροκινών μετρώνται και στον ορό των επίμυων με TNBS-κολίτιδα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10.4**, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα επίπεδα των IL-8 και ICAM-1 μεταξύ των υγιών μαρτύρων (ομάδα Α) και των TNBS-επίμυων (ομάδα Β), 3 μέρες μετά την επαγωγή κολίτιδας (218 ± 15 έναντι 302 ± 15 pg/mL, $p=0.04$ και 9080 ± 434 έναντι 15725 ± 309 pg/mL, $p=0.00$, αντίστοιχα). Στην ομάδα Δ (100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ/ημέρα), σημαντικά μειωμένα είναι τα επίπεδα της IL-8 (223 ± 15 έναντι 302 ± 15 pg/mL, $p=0.09$) και του ICAM-1 (9567 ± 524 έναντι 15725 ± 309 pg/mL, $p=0.00$). Η αγωγή με υδροκορτιζόνη (ομάδα Ζ) ελαττώνει τα επίπεδα του ICAM-1 (8773 ± 339 έναντι 15725 ± 309 pg/mL, $p=0.00$), όχι όμως και της IL-8. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-6 δεν ανιχνεύονται στον ορό.

Στο τέλος των 6 μερών παρέμβασης, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ της ομάδας Α και των TNBS-επίμυων στα επίπεδα της IL-8 και του ICAM-1, γεγονός που σημαίνει την απουσία δραστικότητας του TNBS (**Πίνακας 10.5**).



Εικόνα 10.4 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη). Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν είτε σκόνη μαστίχας είτε υδροκορτιζόνη.

Πίνακας 7.5 Συγκεντρώσεις κυτταροκινών στον ορό επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 6 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη).

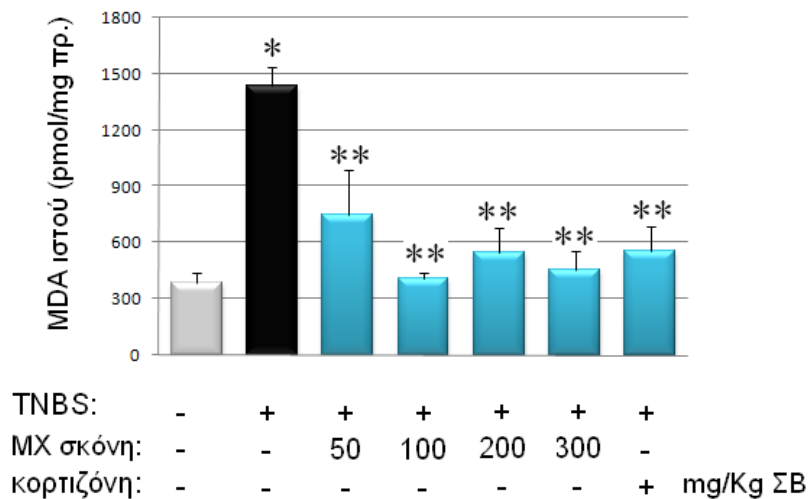
Ομάδες	IL-8	ICAM-1
A: ελέγχου, υγιείς επίμυες	197±19	14547±471
B: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	234±13	15408±507
Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	215±14	14976±392
Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	192±17	14712±727
E: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	197±10	14962±481
ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	202±14	14626±433
Z: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	200±13	16104±394

Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pg/mL (μέσος όρος±S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

10.2.4 Μέτρηση μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό

Για την αξιολόγηση του ρόλου των ROS στο μονοπάτι της φλεγμονής, μετρώνται τα επίπεδα της MDA στον ιστό επίμυων με TNBS-κολίτιδα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10.5**, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των υγιών μαρτύρων και της ομάδας B (389 ± 53 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης, $p=0.00$), 3 μέρες μετά την επαγωγή κολίτιδας. Η συγκέντρωση MDA μειώνεται σε όλες τις ομάδες που έλαβαν σκόνη μαστίχας (ομάδες Γ, Δ, E, ΣΤ) ή υδροκορτιζόνη (ομάδα Z). Συγκεκριμένα, οι τιμές είναι 751 ± 235 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.013$), 409 ± 36 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.00$), 550 ± 127 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.00$), 453 ± 104 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.00$) και 553 ± 137 έναντι 1433 ± 100 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.001$), αντίστοιχα.

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ της ομάδας B και των υπόλοιπων ομάδων, 6 μέρες μετά την επαγωγή της φλεγμονής (**Πίνακας 10.6**). Αυτό επιβεβαιώνει τη απουσία δραστηριότητας του TNBS, 6 μέρες μετά τη χορήγησή του.



Εικόνα 10.5 Συγκέντρωση μαλοναλδεϋδης (MDA) στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη). Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν είτε σκόνη μαστίχας είτε υδροκορτιζόνη.

Πίνακας 10.6 Συγκεντρώσεις μαλοναλδεϋδης (MDA) στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 6 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη).

Ομάδες	MDA	p-value
Ομάδα Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	572±127	
Ομάδα Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	353±45	1.00
Ομάδα Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	598±115	1.00
Ομάδα Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	556±126	1.00
Ομάδα Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	352±66	1.00
Ομάδα ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	374±86	1.00
Ομάδα Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)	368±63	1.00

Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pmol/mg πρωτεΐνης (μέσος όρος±S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

10.2.5 Σωματικό βάρος επίμυων

Καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή δεν παρατηρείται στο ΣΒ των επίμυων, μετά από 3 ή 6 μέρες παρέμβασης με σκόνη μαστίχας ή υδροκορτιζόνη (**Πίνακας 10.7**).

Πίνακας 10.7 Σωματικό βάρος (ΣΒ) επίμυων με TNBS-κολίτιδα, 3 και 6 μέρες μετά τη χορήγηση σκόνης μαστίχας (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη).

Ομάδες	3 μέρες (Kg)	6 μέρες (Kg)
Ομάδα Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες		
Ομάδα Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα		
Ομάδα Γ: TNBS-επίμυες, 50mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα		
Ομάδα Δ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα		
Ομάδα Ε: TNBS-επίμυες, 200mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα		
Ομάδα ΣΤ: TNBS-επίμυες, 300mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα		
Ομάδα Ζ: TNBS-επίμυες, υδροκορτιζόνη (25μg /Kg ΣΒ/ημέρα)		

Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Bonferroni ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

10.3 Β΄ Πειραματικό μέρος

Όπως αποδεικνύεται από την πρώτη σειρά πειραμάτων, η σκόνη μαστίχας Χίου (60% ρητίνη και 40% ινουλίνη) σε δόση ίση προς 100mg/Kg ΣΒ/ημέρα έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, όταν χορηγείται 3 μέρες σε TNBS-επίμυες. Βάσει αυτής της δόσης μαστίχας, διαμορφώνονται και οι ομάδες του 2ου πειράματος.

Πίνακας 10.8 Πειραματικές ομάδες *in vivo*

2ο ΠΕΙΡΑΜΑ						
Ομάδες	TNBS	Σκόνη μαστίχας	Ινουλίνη	Όξινο κλ mg/Kg ΣΒ	Ουδέτερο κλ	Ολεανολικό οξύ
A	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-
Γ	+	δραστική δόση	-	-	-	-
Δ	+	-	40	-	-	-
Ε	+	-	-	24	-	-
ΣΤ	+	-	-	46	-	-
Ζ	+	-	-	-	24	-
Η	+	-	-	-	48	-
Θ	+	-	-	-	-	24
Ι	+	-	-	-	-	48

10.3.1 Ιστολογική ανάλυση

Στον **Πίνακα 10.9** παρουσιάζεται η κλίμακα των ιστολογικών αλλοιώσεων στο παχύ έντερο επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή φλεγμονής με TNBS. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των υγιών μαρτύρων (**Εικόνα 10.6.A**) και των επίμυων με TNBS-κολίτιδα (**Εικόνα 10.6.B**). Σε συμφωνία με τη πρώτη σειρά πειραμάτων, η χορήγηση 100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ/ημέρα, μειώνει σημαντικά την ιστική βλάβη (**Εικόνα 10.6.Γ**).

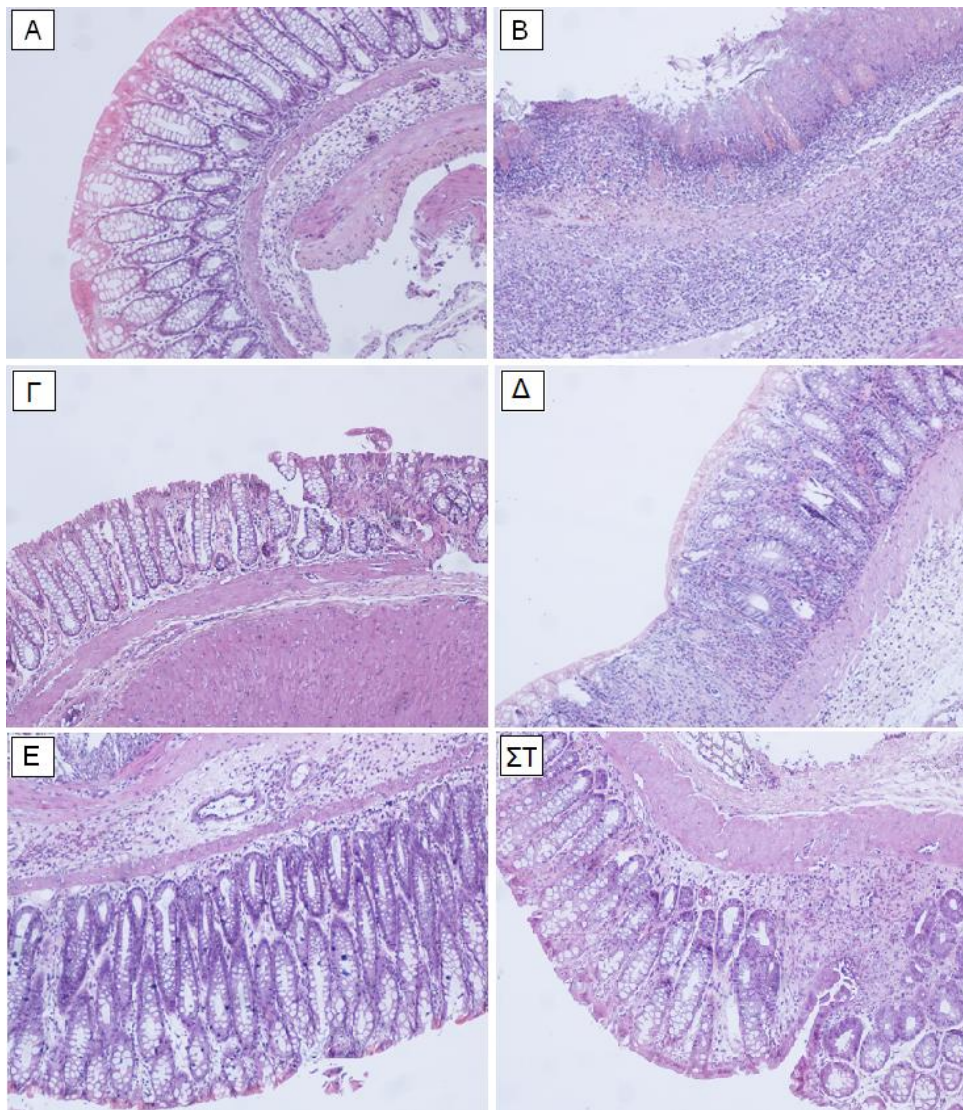
Για τη μελέτη του δραστικού συστατικού της σκόνης μαστίχας Χίου, χορηγούνται δόσεις ινουλίνης, όξινου κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος ή ολεανολικού οξέος που αντιστοιχούν σε 100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ (ομάδα Γ). Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ της ομάδας Γ και της ομάδας που έλαβε ισοδύναμη δόση ινουλίνης (60mg/Kg ΣΒ – ομάδα Δ). Το ίδιο συμβαίνει όταν στα ζώα χορηγούνται ισοδύναμες δόσεις όξινου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ – ομάδα Ε), ουδέτερου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ – ομάδα Ζ) ή ολεανολικού οξέος (7mg/Kg ΣΒ – ομάδα Θ). Ωστόσο, όταν η χορήγηση των κλασμάτων και του ολεανολικού οξέος διπλασιάζεται (ομάδες ΣΤ, Η και Ι), οι ιστολογικές αλλοιώσεις βελτιώνονται σημαντικά.

Πίνακας 10.9 Βαρύτητα ιστολογικών αλλοιώσεων 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας σε επίμυες.

Ομάδες	3 μέρες	p-value
Ομάδα Α: ελέγχου, υγιείς επίμυες	0.0±0.0	
Ομάδα Β: επίμυες με TNBS-κολίτιδα	5.3±0.3*	0.00
Ομάδα Γ: TNBS-επίμυες, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ/ημέρα	1.5±0.2**	0.00
Ομάδα Δ: TNBS-επίμυες, 40mg ινουλίνης /Kg ΣΒ/ημέρα	4.8±0.6	1.00
Ομάδα Ε: TNBS-επίμυες, 24mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ/ημέρα	4.5±0.5	1.00
Ομάδα ΣΤ: TNBS-επίμυες, 48mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ/ημέρα	2.4±0.4**	0.001
Ομάδα Ζ: TNBS-επίμυες, 24mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ/ημέρα	4.9±0.4	1.00
Ομάδα Η: TNBS-επίμυες, 48mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ/ημέρα	2.8±0.7	0.008
Ομάδα Θ: TNBS-επίμυες, 7mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ/ημέρα	5.3±0.1	1.00
Ομάδα Ι: TNBS-επίμυες, 14mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ/ημέρα	3.2±0.5	0.040

Η βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων εκφράζεται ως μέσος όρος±S.E. Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Kruskal-Wallis επιβεβαιώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τάξεων. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

*Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν αγωγή.



Εικόνα 10.6 Επιθήλιο παχέος εντέρου 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας σε επίμυες. Εγκάρσιες τομές, χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης, μεγένθυση 100x. [Α] υγιή ζώα: φυσιολογικό επιθήλιο, [Β] TNBS-επίμυες: σοβαρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, μεγάλη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων, σοβαρή φλεγμονή, εξέλκωση και οίδημα, [Γ] TNBS-επίμυες με αγωγή σκόνης μαστίχας 100mg/Kg ΣΒ/ημέρα: σπάνια παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων με μικρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, [Δ] TNBS-επίμυες με αγωγή ινουλίνης (60mg/Kg ΣΒ/ημέρα) ή όξινου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα) ή ουδέτερου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα) ή ολεανολικού οξέος (7mg/Kg ΣΒ/ημέρα): σοβαρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, μεγάλη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων, σοβαρή φλεγμονή και οίδημα, [Ε] TNBS-επίμυες με αγωγή όξινου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ/ημέρα) ή ουδέτερου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ/ημέρα): σπάνια παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων με μικρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών, [ΣΤ] TNBS-επίμυες με αγωγή ολεανολικού οξέος (14mg/Kg ΣΒ/ημέρα): αυξημένη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων με μικρή παρουσία οιδήματος και μικρή διάβρωση της αρχιτεκτονικής των κρυπτών.

10.3.2 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ιστό

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 10.10**, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των επίμυων με TNBS-κολίτιδα στις συγκεντρώσεις του TNF- α ($p=0.00$), της IL-6 ($p=0.013$), της IL-8 ($p=0.05$) και του ICAM-1 ($p=0.00$). Σε συμφωνία με την πρώτη σειρά πειραμάτων, η αύξηση στα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών αναστέλλεται ύστερα από αγωγή με σκόνη μαστίχας (100mg/Kg ΣΒ/ημέρα), επιτυγχάνοντας επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας $p=0.00$, $p=0.009$, $p=0.050$ και $p=0.00$, αντίστοιχα.

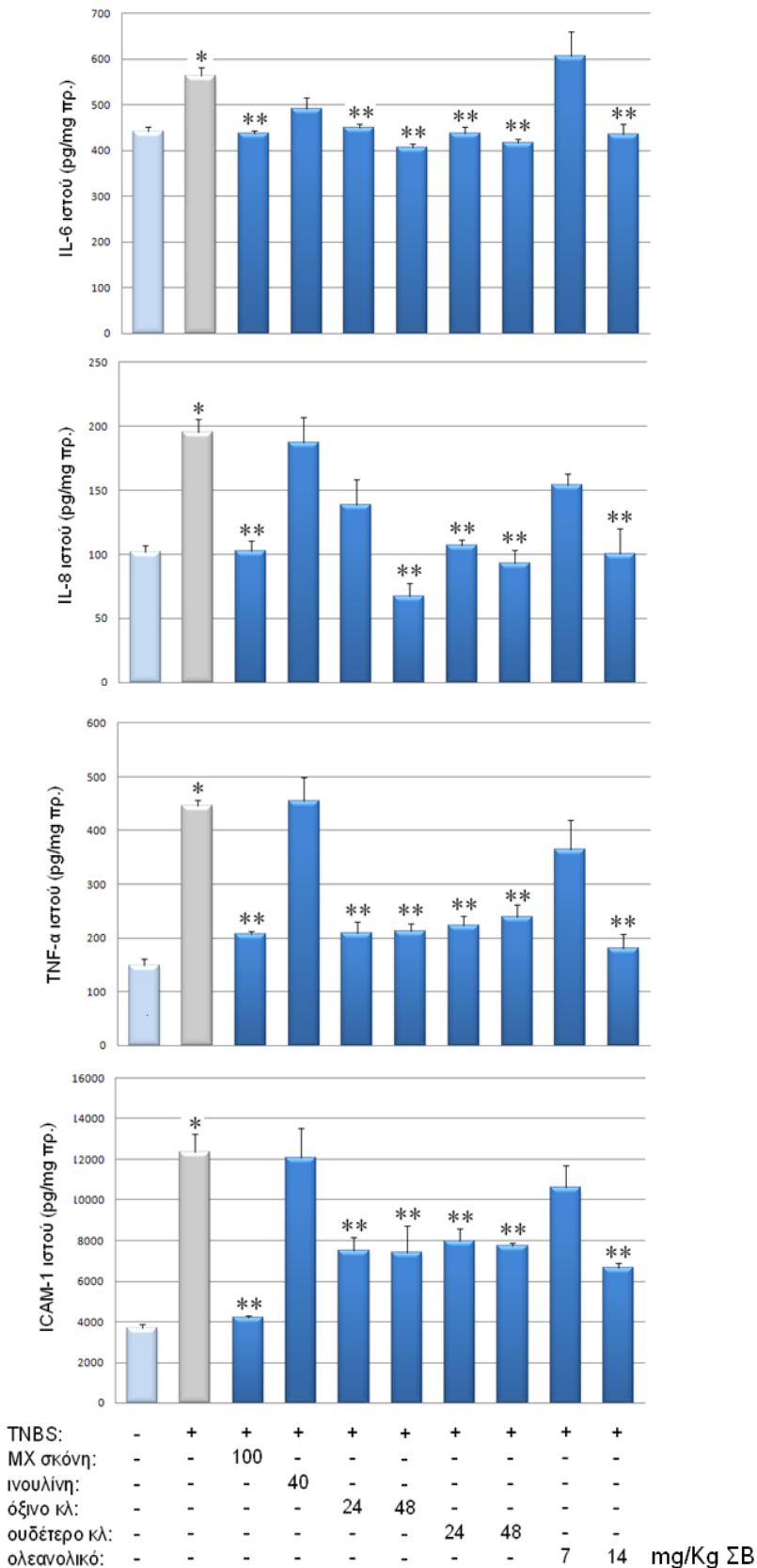
Για τη μελέτη του δραστικού συστατικού της σκόνης μαστίχας Χίου, χορηγούνται δόσεις ινουλίνης, όξινου κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος ή ολεανολικού οξέος που αντιστοιχούν στα 100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ. Αγωγή με 60mg ινουλίνης/Kg ΣΒ/ημέρα, δεν καταφέρνει να ρυθμίσει την έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο κόλον των TNBS-επίμυων, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία δραστηριότητάς της. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 10.7**, χορήγηση όξινου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα) μειώνει σημαντικά τα επίπεδα του TNF- α ($p=0.00$), της IL-6 ($p=0.026$) και του ICAM-1 ($p=0.05$). Το ουδέτερο κλάσμα (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα) ελαττώνει τις συγκεντρώσεις όλων των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, TNF- α ($p=0.00$), IL-8 ($p=0.009$), IL-6 ($p=0.009$) και ICAM-1 ($p=0.017$), ενώ το ολεανολικό οξύ (7mg/Kg ΣΒ/ ημέρα) δεν έχει καμία επίδραση στην έκκρισή τους. Όταν τα κλάσματα μαστίχας ή το ολεανολικό οξύ χορηγούνται σε διπλάσιες δόσεις (ομάδες ΣΤ, Η και Ι), μειώνονται σημαντικά όλες οι κυτταροκίνες (**Πίνακας 10.10**).

Πίνακας 10.10 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο κόλον επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας.

Ομάδες	TNF- α	IL6	IL-8	ICAM-1
ελέγχου, υγιείς επίμυες	149 $\pm$ 13	442 $\pm$ 9	102 $\pm$ 5	3710 $\pm$ 172
επίμυες με TNBS-κολίτιδα	445 $\pm$ 12*	564 $\pm$ 18*	195 $\pm$ 10*	12367 $\pm$ 885*
TNBS, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ	206 $\pm$ 7**	438 $\pm$ 6**	103 $\pm$ 8**	4222 $\pm$ 91**
TNBS, 60mg ινουλίνης /Kg ΣΒ	454 $\pm$ 44	492 $\pm$ 25	187 $\pm$ 20	12078 $\pm$ 1475
TNBS, 24mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ	208 $\pm$ 21**	450 $\pm$ 7**	138 $\pm$ 20	7515 $\pm$ 631**
TNBS, 48mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ	212 $\pm$ 15**	407 $\pm$ 8**	67 $\pm$ 10**	7406 $\pm$ 1326**
TNBS, 24mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ	224 $\pm$ 18**	438 $\pm$ 14**	107 $\pm$ 5**	7981 $\pm$ 618**
TNBS, 48mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ	239 $\pm$ 23**	317 $\pm$ 7**	93 $\pm$ 10**	7762 $\pm$ 143**
TNBS, 7mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ	365 $\pm$ 55	606 $\pm$ 55	154 $\pm$ 8	10621 $\pm$ 1075
TNBS, 14mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ	181 $\pm$ 25**	435 $\pm$ 24**	101 $\pm$ 19**	6670 $\pm$ 205**

Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pg/mg πρωτεΐνης (μέσος όρος $\pm$ S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p\leq 0.05$. *Στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυνων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυνων και TNBS-επίμυνων που έλαβαν αγωγή.



Εικόνα 10.7 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο κόλον επίμυνων, 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας. Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυνων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυνων και TNBS-επίμυνων που έλαβαν αγωγή.

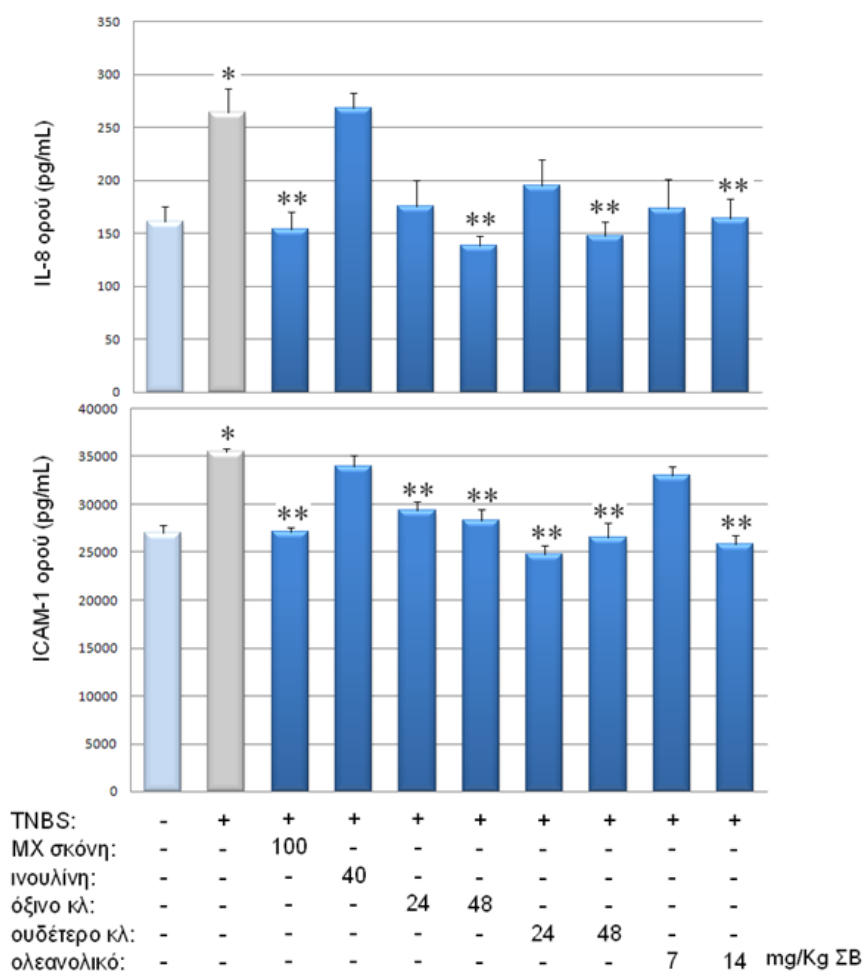
10.3.3 Μέτρηση επιπέδων παραγόντων φλεγμονής σε ορό

Οι κυτταροκίνες TNF-α και IL-6 δεν ανιχνεύονται στον ορό, ωστόσο τα επίπεδα της IL-8 και του ICAM-1 αυξάνονται σημαντικά στην ομάδα των TNBS-επίμυων συγκριτικά με την ομάδα των υγιών μαρτύρων ($p=0.018$ και $p=0.00$, αντίστοιχα). Σε συμφωνία με την πρώτη σειρά πειραμάτων, στατιστικά σημαντικές μειώσεις παρατηρούνται ύστερα από αγωγή με σκόνη μαστίχας ($p=0.009$ και $p=0.00$, αντίστοιχα). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10.8**, το όξινο (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα) και το ουδέτερο κλάσμα (24mg/Kg ΣΒ/ημέρα), σε δόσεις που αντιστοιχούν στα 100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ, μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα του ICAM-1 ορού ($p=0.04$ και $p=0.00$, αντίστοιχα). Τα επίπεδα της IL-8 δεν επηρεάζονται ούτε από την ομάδα του όξινου ($p=0.071$) ούτε από την ομάδα του ουδέτερου κλάσματος ($p=0.295$). Τόσο η ινουλίνη (60mg/Kg ΣΒ/ημέρα) όσο και το ολεανολικό οξύ (7mg/Kg ΣΒ/ ημέρα), σε δόσεις που αντιστοιχούν στα 100mg σκόνης μαστίχας/Kg ΣΒ, δεν καταφέρνουν να ρυθμίσουν την έκκριση κυτταροκινών, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία δραστηριότητάς τους (**Πίνακας 10.11**). Όταν χορηγούνται κλάσματα μαστίχας ή ολεανολικό οξύ σε διπλάσιες δόσεις (ομάδες ΣΤ, Η και Ι), τα επίπεδα των IL-8 και ICAM-1 μειώνονται σημαντικά.

Πίνακας 10.11 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας.

Ομάδες	IL-8	ICAM-1
ελέγχου, υγιείς επίμυες	161±15	26958±853
επίμυες με TNBS-κολίτιδα	265±23*	35453±434*
TNBS, 100mg σκόνης μαστίχας /Kg ΣΒ	154±16**	27128±474**
TNBS, 60mg ινουλίνης /Kg ΣΒ	268±15	33957±1171
TNBS, 24mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ	176±24	29416±929**
TNBS, 48mg όξινου κλάσματος /Kg ΣΒ	138±9**	28273±1266**
TNBS, 24mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ	195±25	24805±871**
TNBS, 48mg ουδέτερου κλάσματος /Kg ΣΒ	148±14**	26519±1530**
TNBS, 7mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ	173±28	33011±1003
TNBS, 14mg ολεανολικού οξέος /Kg ΣΒ	164±19**	25882±848**

Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως pg/mL (μέσος όρος±S.E). Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p\leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν αγωγή.

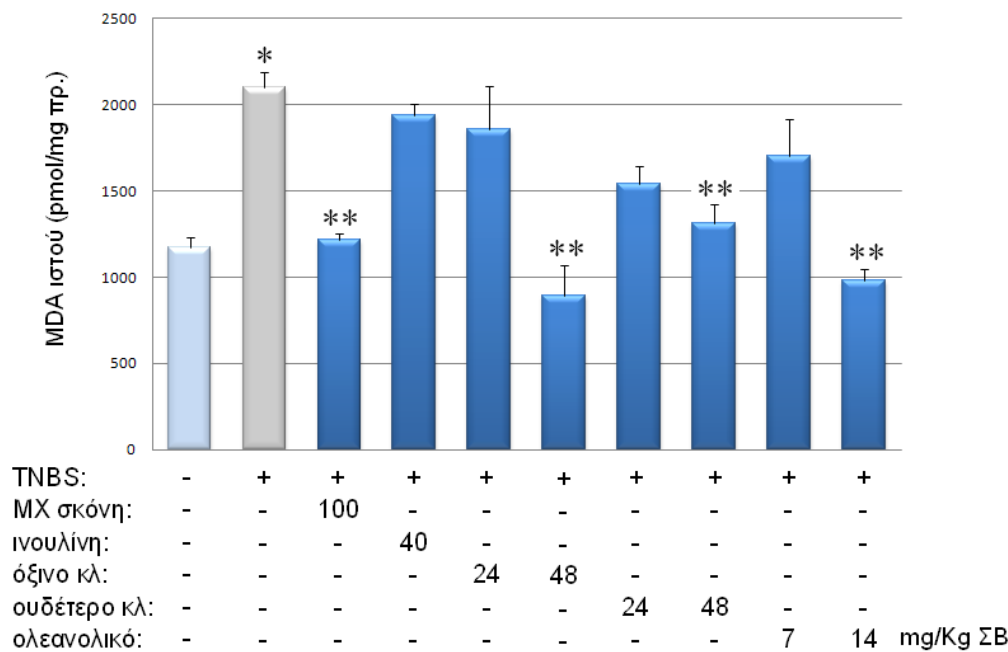


Εικόνα 10.8 Συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτταροκινών στον ορό επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας. Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν αγωγή.

10.3.4 Μέτρηση μαλοναλδεϋδης (MDA) σε ιστό

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10.9**, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των επίμυων με TNBS-κολίτιδα και των υγιών μαρτύρων (2104 ± 86 έναντι 1173 ± 58 pmol/mg πρωτεΐνης, $p=0.001$). Η συγκέντρωση MDA ελαττώνεται σημαντικά στην ομάδα με αγωγή σκόνης μαστίχας (1220 ± 34 έναντι 2104 ± 86 pmol/mg πρωτεΐνης, $p=0.01$), αλλά όχι σε εκείνες του όξινο κλάσματος (24 mg/Kg ΣΒ/ημέρα), του ουδέτερου κλάσματος (24 mg/Kg ΣΒ/ημέρα) και του ολεανολικού οξέος (7 mg/Kg ΣΒ/ημέρα). Συγκεκριμένα, οι τιμές είναι 1854 ± 257 έναντι 2104 ± 86 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.951$), 1541 ± 101 έναντι 2104 ± 86 pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.139$) και

1702±214 έναντι 2104±86pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.556$), αντίστοιχα. Παρομοίως, η ινουλίνη αποτυγχάνει στη μείωση των επιπέδων MDA (1941±63 έναντι 2104±86pmol/mg πρωτεΐνης, $p=0.997$). Ωστόσο, χορήγηση διπλάσιας δόσης από το όξινο κλάσμα, το ουδέτερο κλάσμα ή το ολεανολικό οξύ, μειώνει σημαντικά τα επίπεδα MDA. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις είναι 890±180 έναντι 2104±86pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.00$), 1312±112 έναντι 2104±86pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.007$), 979±69 έναντι 2104±86pmol/mg πρωτεΐνης ($p=0.00$), αντίστοιχα.

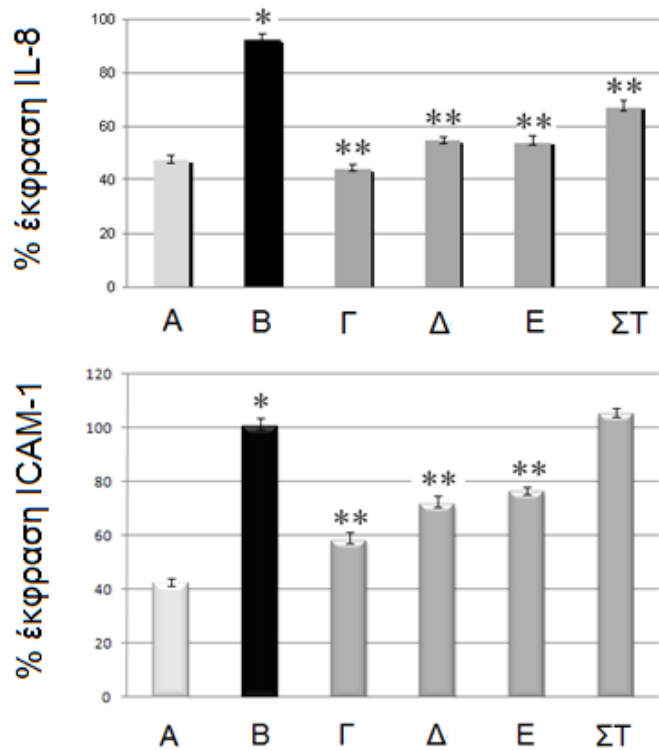


Εικόνα 10.9 Συγκέντρωση μαλοναλδεϋδης (MDA) στο κόλον επίμυων, 3 μέρες μετά την επαγωγή TNBS-κολίτιδας. Όλες οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. *Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών- και TNBS-επίμυων, **Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ TNBS-επίμυων και TNBS-επίμυων που έλαβαν αγωγή.

10.3.5. Έκφραση παραγόντων φλεγμονής σε ιστό

Η **Εικόνα 10.10** δείχνει την έκφραση των IL-8 και ICAM-1 mRNA στο κόλον επίμυων με TNBS-κολίτιδα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα ELISA, η έκφραση των παραπάνω κυτταροκινών αυξάνεται σημαντικά στους TNBS-επίμυες συγκριτικά με τα υγιή ζώα ($92 \pm 3\%$ έναντι $47 \pm 2\%$, $p=0.00$ και $101 \pm 3\%$ έναντι $42 \pm 2\%$, $p=0.00$, αντίστοιχα). Χορήγηση σκόνης μαστίχας σε δόση ίση προς 100mg/Kg ΣΒ μειώνει την έκφραση σε $52 \pm 2\%$ ($p=0.00$) και $58 \pm 3\%$ ($p=0.00$), αντίστοιχα. Ισοδύναμες δόσεις όξινου (24mg/Kg ΣΒ) ή ουδέτερου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ) επίσης ελαχιστοποιούν την έκφραση των κυτταροκινών ($p=0.00$): $55 \pm 1\%$ και $54 \pm 3\%$, αντίστοιχα για την

IL-8 και $72 \pm 3\%$ και $76 \pm 2\%$, αντίστοιχα για τον ICAM-1. Χορήγηση ισοδύναμης δόσης ολεανολικού οξέος (7mg/Kg ΣΒ) μειώνει την έκφραση της IL-8 ($67 \pm 3\%$, $p=0.00$), αλλά όχι και του ICAM-1 ($105 \pm 2\%$, $p=0.783$).



Εικόνα 10.10 Επίδραση της μαστίχας Χίου και συστατικών της στο IL-8 και ICAM-1 mRNA. (Α) υγιή ζώα, (Β) TNBS-επίμνες, (Γ) TNBS-επίμνες με αγωγή σκόνης μαστίχας (100mg/Kg ΣΒ), (Δ) TNBS-επίμνες με αγωγή όξινου κλάσματος (24mg/Kg ΣΒ), (Ε) TNBS-επίμνες με αγωγή ουδέτερου κλάσματος (48mg/Kg ΣΒ) και (ΣΤ) TNBS-επίμνες με αγωγή ολεανολικού οξέος (7mg/Kg ΣΒ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στο *in vitro* πείραμα μελετώνται ισοδύναμες συγκεντρώσεις μαστίχας Χίου ελεύθερης από β-πολυμερή (ΜΧΕΠ), όξινου κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος και ολεανολικού οξέος σε αιθανόλη (Πίνακας 11.1).

Πίνακας 11.1 Πειραματικές ομάδες *in vitro*

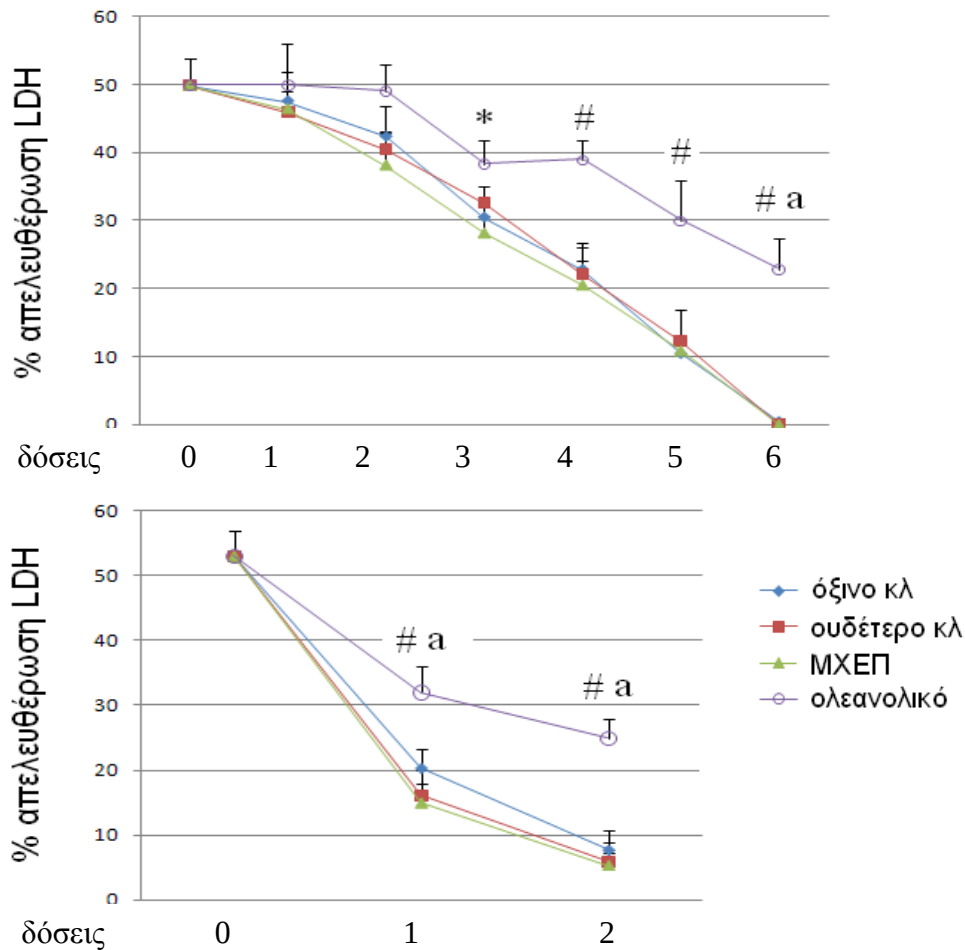
ΜΧΕΠ	Όξινο κλάσμα ng/mL	Ουδέτερο κλάσμα ng/mL	Ολεανολικό οξύ
0	0	0	0
5	2.3	2.3	0.69
10	4.6	4.6	1.38
20	9.2	9.2	2.76
40	18.4	18.4	5.52
80	36.8	36.8	11.04
150	69	69	20.7

11.1. Απελευθέρωση % της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Καλλιέργεια: Όταν τα HT29 επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου επωάζονται με TNF- α , παρατηρείται $50 \pm 4\%$ απελευθέρωση της LDH. Ο βαθμός απελευθέρωσης του ενζύμου ως απάντηση στη φλεγμονή, αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη βαρύτητας της νόσου σε ασθενείς με νόσο Crohn. Η αύξηση στην απελευθέρωση της LDH αναστέλλεται ύστερα από αγωγή με ΜΧΕΠ ή συστατικά της, με τρόπο δοσοεξαρτώμενο (**Εικόνα 11.1**). Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΜΧΕΠ, δηλαδή σε 80 και 150ng/mL, η απελευθέρωση του ενζύμου αγγίζει μόλις το $11 \pm 1\%$ και το $0 \pm 0\%$, αντίστοιχα ($p=0.00$). Παρομοίως, επώαση των κυττάρων με ισοδύναμες δόσεις όξινου (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερου κλάσματος (37 και 69ng/mL), ελαχιστοποιεί την αύξηση της LDH: $10 \pm 2\%$ και $0 \pm 0\%$, αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και $13 \pm 5\%$ και $0 \pm 0\%$, αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Όσον αφορά στο ολεανολικό οξύ, μόνο στη συγκέντρωση των 21ng/mL παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική μείωση ($23 \pm 5\%$, $p=0.02$).

Συγκαλλιέργεια: Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11.1**, επώαση των μακροφάγων (Μο/ΜΦ) με LPS οδηγεί σε $53 \pm 4\%$ απελευθέρωση της LDH από τα υπερκείμενα HT29 κύτταρα. Όταν στα Μο/ΜΦ προστίθενται 80 και 150ng ΜΧΕΠ/mL, η απελευθέρωση του ενζύμου φτάνει στο $15 \pm 3\%$ ($p=0.00$) και στο $6 \pm 2\%$ ($p=0.00$), αντίστοιχα. Παρομοίως, επώαση των κυττάρων με όξινο (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερο κλάσμα (37 και 69ng/mL), ελαχιστοποιεί την αύξηση της LDH: $21 \pm 3\%$ ($p=0.017$) και

$8\pm 3\%$ ($p=0.00$), αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και $16\pm 4\%$ ($p=0.00$) και $6\pm 3\%$ ($p=0.00$), αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Το ολεανολικό οξύ σε συγκέντρωση 11 και 21ng/mL ελαττώνει την απελευθέρωση του ενζύμου σε $33\pm 4\%$ ($p=0.017$) και $25\pm 3\%$ ($p=0.02$), αντίστοιχα.



Εικόνα 11.1 Απελευθέρωση της LDH σε μονοκαλλιέργεια HT29 επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου (πάνω) και συγκαλλιέργεια Mo/MΦ-HT29 κυττάρων (κάτω). Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p\leq 0.05$. Στη μονοκαλλιέργεια μελετήθηκαν ισοδύναμες δόσεις μαστίχας Χίου ελεύθερης πολυμερών (ΜΧΕΠ) (0-150ng/mL), όξινου κλάσματος (0-69ng/mL), ουδέτερου κλάσματος (0-69ng/mL) ή ολεανολικού οξέος (0-21ng/mL). Στη συγκαλλιέργεια μελετήθηκαν οι δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών. *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν μόνο με μαστίχα. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα ή ισοδύναμες συγκεντρώσεις όξινου ή ουδέτερου κλάσματος. ^{#a} Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα ή ισοδύναμες δόσεις όξινου κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος ή ολεανολικού οξέος.

11.2 Συγκέντρωση TNF-α

Σύμφωνα με την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS), το 97% των PBMC που προσκολλώνται στην επιφάνεια των βοθρίων εκφράζουν τη CD14 πρωτεΐνη, αποδεικνύοντας την ταυτότητα του πληθυσμού των μονοκυττάρων. Μόλις το 3% των κυττάρων εκφράζουν την CD3 πρωτεΐνη, γεγονός που σημαίνει τη σχεδόν πλήρη απουσία των T-λεμφοκυττάρων ανάμεσα στα μονοκύτταρα.

Ο ρόλος της μαστίχας στο μονοπάτι της φλεγμονής ελέγχεται με τη μέτρηση των επιπέδων του TNF-α στο υπερκείμενο των Μο/ΜΦ. Όταν στα κύτταρα προστίθενται ΜΧΕΠ ή συστατικά της, η έκκριση του TNF-α παραμένει αμετάβλητη. Σε δόσεις ΜΧΕΠ 80 και 150ng/mL, η συγκέντρωση της κυτταροκίνης είναι 34.97 ± 3.30 έναντι 38.83 ± 4.13 ng/mL ($p=0.996$) και 29.27 ± 3.35 έναντι 38.83 ± 4.13 ng/mL ($p=0.660$), αντίστοιχα. Ισοδύναμες συγκεντρώσεις όξινου (37 και 69ng/mL) και ουδέτερου κλάσματος (37 και 69ng/mL) οδηγούν σε παρόμοια αποτελέσματα: 40.16 ± 4.08 ($p=1.00$) και 35.25 ± 2.69 ng/mL ($p=0.998$), αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και 40.91 ± 1.71 ($p=1.00$) και 32.62 ± 3.43 ng/mL ($p=0.938$), αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Παρομοίως, το ολεανολικό οξύ (11 και 21ng/mL) σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις δεν αλλάζει τα επίπεδα του TNF-α ($p=1.00$): 40.59 ± 5.52 και 37.58 ± 3.58 ng/mL, αντίστοιχα.

11.3 Συγκέντρωση IL-8

Καλλιέργεια: Επώαση των HT29 επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου με TNF-α, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της IL-8 (17 ± 1.00 έναντι 0 ± 0 , $p=0.00$). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vivo*, όπου η συγκέντρωση της κυτταροκίνης είναι υψηλή στο φλεγμένοντα ιστό των TNBS-επίμυων. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11.2**, αγωγή των κυττάρων με ΜΧΕΠ ή συστατικά της, μειώνει τα επίπεδα της IL-8 με τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Σε δόσεις ΜΧΕΠ 80 και 150ng/mL, η συγκέντρωση της κυτταροκίνης είναι 4 ± 0.30 και 0 ± 0 , αντίστοιχα ($p=0.00$). Επώαση των κυττάρων με όξινο (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερο κλάσμα (37 και 69ng/mL), επίσης αναστέλλει την αύξηση της IL-8 ($p=0.00$): 5 ± 0.34 και 0.6 ± 0.27 , αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και 3 ± 0.18 και 0.6 ± 0.17 , αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Όσον αφορά στο ολεανολικό οξύ, συγκεντρώσεις ίσες προς 11 και 21ng/mL, ελαττώνουν τα επίπεδα της κυτταροκίνης σε 12 ± 0.12 ($p=0.00$) και 8 ± 0.5 ($p=0.00$), αντίστοιχα.

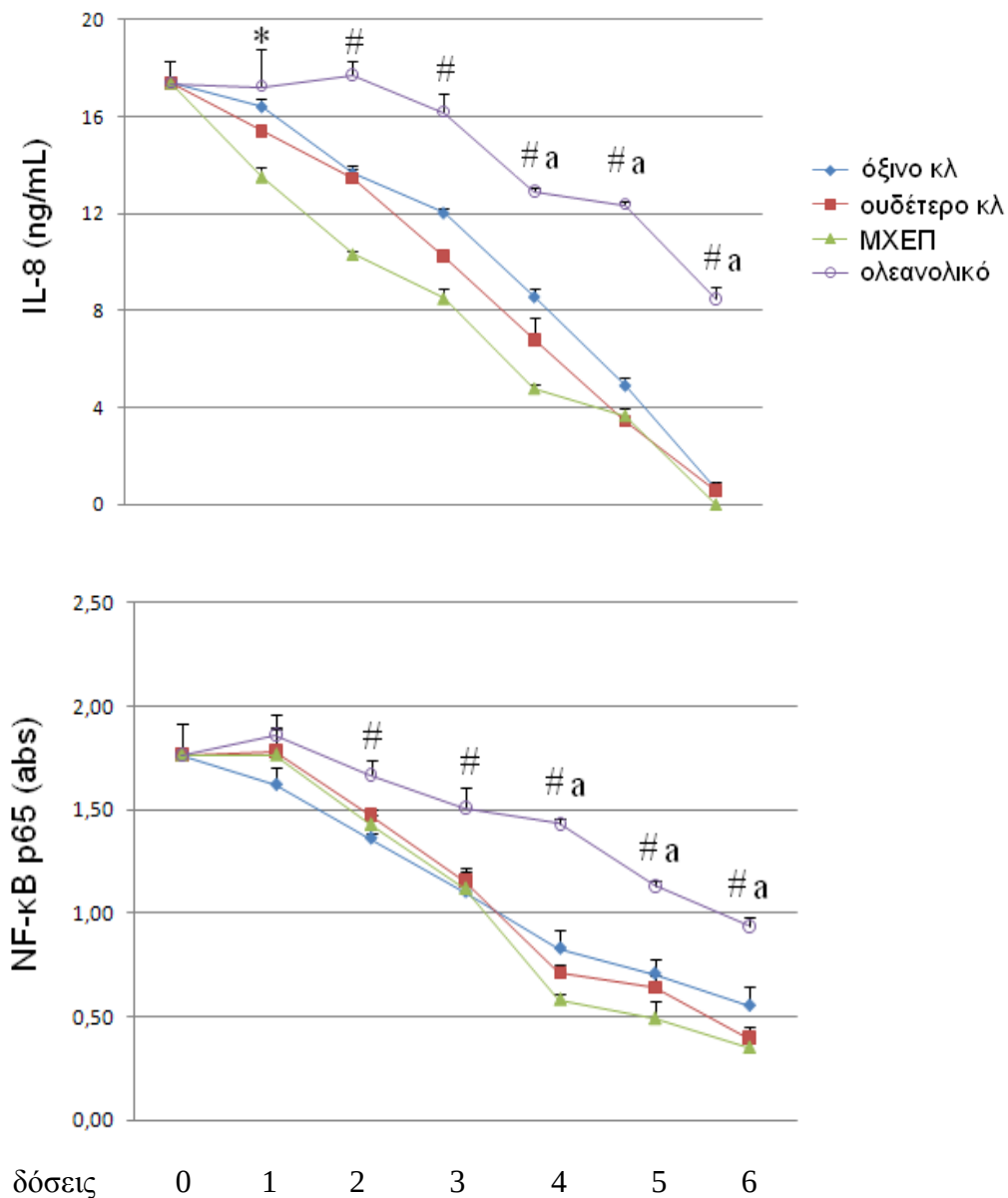
Συγκαλλιέργεια: Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11.3**, επώαση των Μο/ΜΦ με LPS οδηγεί σε σημαντική αύξηση της έκκρισης της IL-8 από τα υπερκείμενα HT29 κύτταρα (14 ± 1.30 έναντι 0 ± 0 , $p=0.00$). Η αύξηση αυτή είναι αναμενόμενη, μιας και τα μακροφάγα, παρουσία LPS, εκκρίνουν TNF-α. Όταν στα Μο/ΜΦ προστίθενται 80 και 150ng ΜΧΕΠ/mL, η συγκέντρωση της IL-8 μειώνεται σημαντικά σε 4 ± 0.40 ($p=0.00$) και 2 ± 0.4 ($p=0.00$), αντίστοιχα. Παρομοίως, επώαση των κυττάρων με όξινο (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερο κλάσμα (37 και 69ng/mL), αναστέλλει την αύξηση της κυτταροκίνης ($p=0.00$): 6 ± 0.65 και 3 ± 0 , αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και 5 ± 0.39 και 3 ± 0.52 ,

αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Όσον αφορά στο ολεανολικό οξύ, συγκεντρώσεις ίσες προς 11 και 21ng/mL, ελαττώνουν τα επίπεδα της IL-8 σε 10 ± 0.52 ($p=0.028$) και 8 ± 0.33 ($p=0.02$), αντίστοιχα.

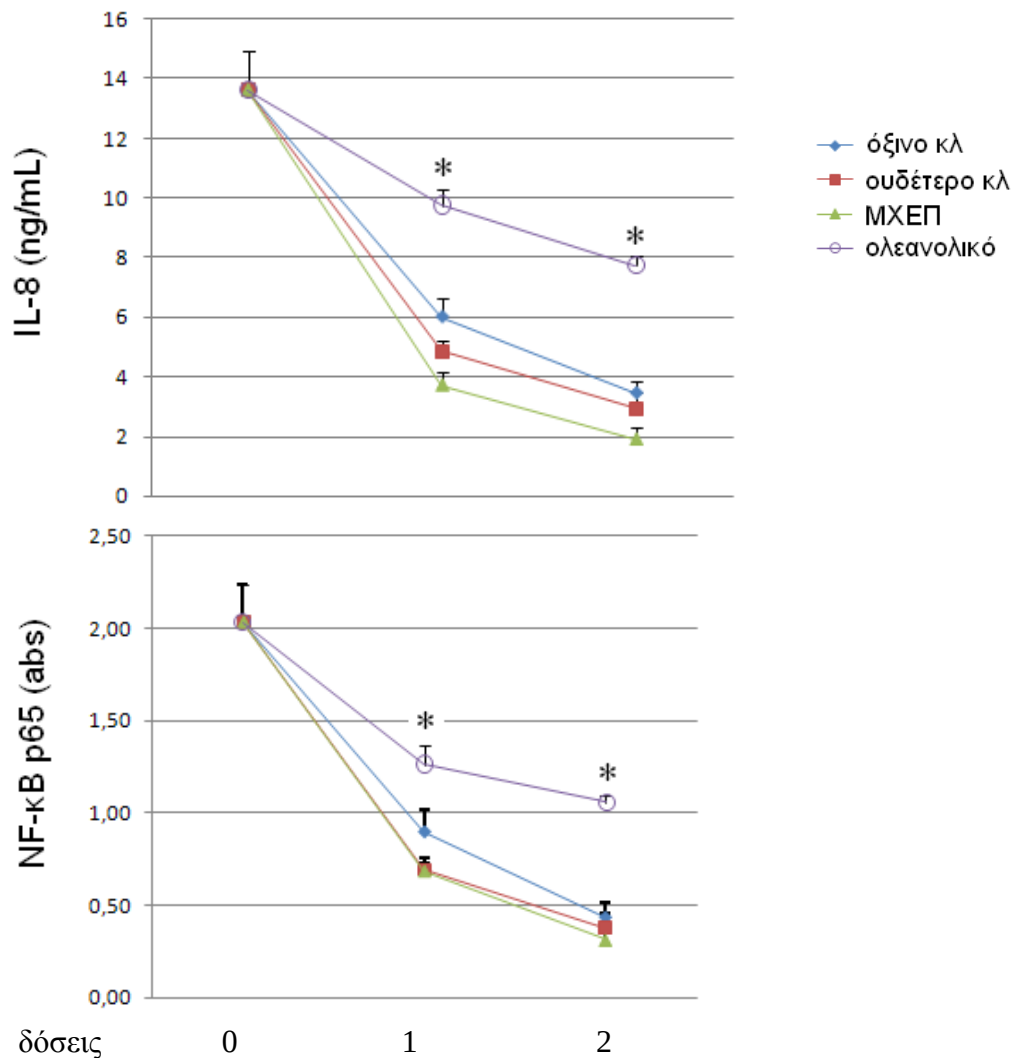
11.4 Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης NF-κB p65

Καλλιέργεια: Επώαση των HT29 επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου με TNF- α , οδηγεί σε ενεργοποίηση της (NF-κB) p65 (1.77 ± 0.14 έναντι 0.18 ± 0.07 , $p=0.00$). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την υψηλή συγκέντρωση της IL-8 στο υπερκείμενο των HT29 κυττάρων, μιας και η συγκεκριμένη κυτταροκίνη εμπλέκεται στο μονοπάτι φλεγμονής που διεγείρει ο NF-κB. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11.2**, αγωγή των κυττάρων με ΜΧΕΠ ή συστατικά της, αναστέλλει την ενεργοποίηση της p65 με τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Σε δόσεις ΜΧΕΠ 80 και 150ng/mL, οι τιμές απορρόφησης αγγίζουν το 0.49 ± 0.08 και 0.35 ± 0.04 , αντίστοιχα ($p=0.00$). Επώαση των κυττάρων με όξινο (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερο κλάσμα (37 και 69ng/mL), επίσης αναστέλλει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ($p=0.00$): 0.71 ± 0.07 και 0.44 ± 0.09 , αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και 0.64 ± 0.05 και 0.40 ± 0.05 , αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Όσον αφορά στο ολεανολικό οξύ, συγκεντρώσεις ίσες προς 11 και 21ng/mL, ελαττώνουν την ενεργοποίηση της p65 σε 1.13 ± 0.02 ($p=0.00$) και 0.94 ± 0.04 ($p=0.00$), αντίστοιχα.

Συγκαλλιέργεια: Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11.3**, επώαση των Μο/ΜΦ με LPS οδηγεί σε σημαντική ενεργοποίηση της p65 από τα υπερκείμενα HT29 κύτταρα (2.03 ± 0.21 έναντι 0.31 ± 0.06 , $p=0.00$). Όταν στα Μο/ΜΦ προστίθενται 80 και 150ng ΜΧΕΠ/mL, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης μειώνεται σημαντικά αγγίζοντας τιμές απορρόφησης 0.69 ± 0.04 ($p=0.00$) και 0.31 ± 0.09 ($p=0.00$), αντίστοιχα. Παρομοίως, επώαση των κυττάρων με όξινο (37 και 69ng/mL) ή ουδέτερο κλάσμα (37 και 69ng/mL), αναστέλλει την ενεργοποίηση της p65 ($p=0.00$): 0.90 ± 0.12 και 0.44 ± 0.08 , αντίστοιχα για το όξινο κλάσμα και 0.69 ± 0.07 και 0.38 ± 0.08 , αντίστοιχα για το ουδέτερο κλάσμα. Όσον αφορά στο ολεανολικό οξύ, συγκεντρώσεις ίσες προς 11 και 21ng/mL, ελαττώνουν την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης σε 1.27 ± 0.10 ($p=0.001$) και 1.06 ± 0.04 ($p=0.00$), αντίστοιχα.



Εικόνα 11.2 Συγκέντρωση IL-8 και ενεργοποίηση NF-κB p65, σε μονοκαλλιέργεια HT29 επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. Στη μονοκαλλιέργεια μελετήθηκαν ισοδύναμες δόσεις μαστίχας Χίου ελεύθερης πολυμερών (ΜΧΕΠ) (0-150ng/mL), όξινου κλάσματος (0-69ng/mL), ουδέτερου κλάσματος (0-69ng/mL) ή ολεανολικού οξέος (0-21ng/mL). *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα ή ισοδύναμες συγκεντρώσεις όξινου ή ουδέτερου κλάσματος. #a Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα ή ισοδύναμες δόσεις όξινου κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος ή ολεανολικού οξέος.

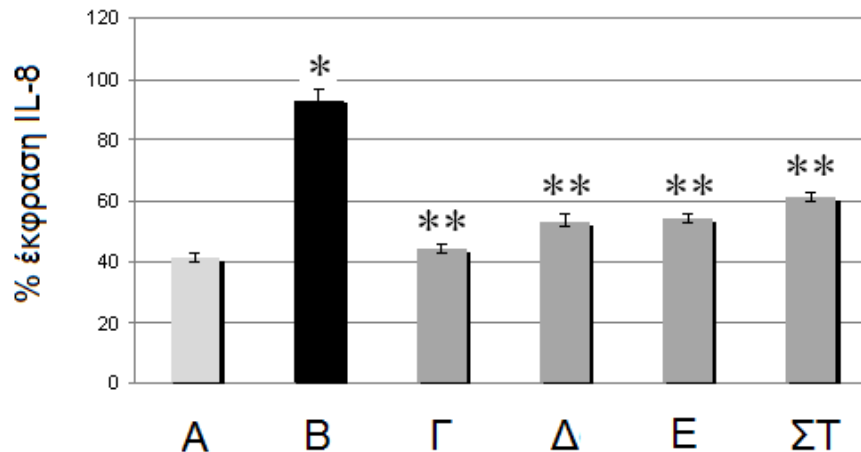


Εικόνα 11.3 Συγκέντρωση IL-8 και ενεργοποίηση NF-κB p65, σε συγκαλιέργεια Mo/MΦ-HT29 κυττάρων. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±S.E. Για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιείται το Tukey ANOVA test με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0.05$. Στη συγκαλλιέργεια μελετήθηκαν ισοδύναμες δόσεις μαστίχας (80 και 150ng/mL), όξινο κλάσματος (0-69ng/mL), ουδέτερου κλάσματος (0-69ng/mL) ή ολεανολικού οξέος (0-21ng/mL). *Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα και ισοδύναμες συγκεντρώσεις όξινο ή ουδέτερου κλάσματος. ^{#a} Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και εκείνων που επώαστηκαν με μαστίχα ή ισοδύναμες δόσεις όξινο κλάσματος, ουδέτερου κλάσματος ή ολεανολικού οξέος.

8.4 Έκφραση παραγόντων φλεγμονής στα HT29 κύτταρα

Στην **Εικόνα 11.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης της IL-8 mRNA στη συγκαλλιέργεια Mo/MΦ-HT29 κυττάρων. Η έκφραση της IL-8 είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα

φλεγμονώδη HT29 κύτταρα συγκριτικά με τα υγιή ($93\pm 4\%$ έναντι $41\pm 2\%$, $p=0.00$). Αγωγή των κυττάρων με 150ng MXEP/mL μειώνει την έκφραση της IL-8 σε $52\pm 2\%$ ($p=0.00$). Ακόμα, χορήγηση όξινου (69ng/mL) ή ουδέτερου κλάσματος (69ng/mL) μειώνει την έκφραση της κυτταροκίνης ($p=0.00$): $53\pm 3\%$ και $54\pm 2\%$, αντίστοιχα. Τέλος, το ολεανολικό οξύ (21ng/mL) ελαττώνει την έκφραση της IL-8 σε $59\pm 4\%$ ($p=0.00$).



Εικόνα 11.4 Επίδραση της μαστίχας Χίου και συστατικών της στο IL-8 mRNA. (A) υγιή HT29 κύτταρα, (B) Mo/MΦ-HT29 κύτταρα, (Γ) Mo/MΦ-HT29 κύτταρα με αγωγή MXEP (150ng/mL), (Δ) Mo/MΦ-HT29 κύτταρα με αγωγή όξινου κλάσματος (69ng/mL), (Ε) Mo/MΦ-HT29 κύτταρα με αγωγή ουδέτερου κλάσματος (69ng/mL) και (ΣΤ) Mo/MΦ-HT29 κύτταρα με αγωγή ολεανολικού οξέος (21ng/mL).

ΜΕΡΟΣ Δ΄ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

12.1 Συνοπτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καταδεικνύουν την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της μαστίχας Χίου στην TNBS-κολίτιδα. Όπως προκύπτει από την 1η σειρά πειραμάτων *in vivo*, η από του στόματος χορήγηση μαστίχας οδηγεί σε σημαντική βελτίωση της ιστικής βλάβης, μείωση της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μείωση του οξειδωτικού στρες. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που δείχνει τα οφέλη του προϊόντος σε ζωικό πρότυπο της νόσου Crohn που χαρακτηρίζεται από σοβαρό βαθμό φλεγμονής. Στο παρελθόν μόνο μία πιλοτική μελέτη αναφέρεται στην ικανότητα της μαστίχας να βελτιώνει την κλινικο-εργαστηριακή εικόνα ασθενών με νόσο Crohn, ωστόσο η νόσος ήταν ήπιας έως μέτριας σοβαρότητας (Kaliora και συν, 2007a).

Σύμφωνα με την πρώτη σειρά πειραμάτων *in vivo*, η αντιφλεγμονώδης δράση της μαστίχας δεν είναι δόσοεξαρτώμενη και αυτό παρατηρείται στις δόσεις μεγαλύτερες των 100mg/Kg ΣΒ. Καθώς αυξάνει η χορηγούμενη ποσότητα της μαστίχας αυξάνει και η χορήγηση των β-πολυμερών, γεγονός που φαίνεται να παρεμποδίζει τη δράση των βιοδραστικών συστατικών της στο εντερικό επιθήλιο των TNBS-επίμυων. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro* στα οποία η ελεύθερη από πολυμερή μαστίχα μειώνει όλους τους προφλεγμονώδεις παράγοντες με τρόπο δόσοεξαρτώμενο.

Η μαστίχα Χίου φαίνεται να ασκεί τις ευεργετικές της ιδιότητες μόνο όταν βρίσκεται στη φυσική της μορφή και περιέχει όλα τα συστατικά της. Σύμφωνα με τη 2η σειρά πειραμάτων *in vivo*, κανένα από τα εξεταζόμενα κλάσματα της μαστίχας, όξινο ή ουδέτερο, δεν ευθύνεται από μόνο του για τη δραστηριότητα της μαστίχας. Αν και μειώνουν τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ακόμη και σε επίπεδο έκφρασης, αδυνατούν να βελτιώσουν την ιστική βλάβη και το οξειδωτικό στρες. Το ολεανολικό οξύ, κυρίαρχο τριτερπένιο της μαστίχας, δεν φαίνεται να έχει κανένα ευεργετικό αποτέλεσμα στη φλεγμονή. Παρόλα αυτά, είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται να μελετηθεί το δραστικό κλάσμα ή επιμέρους συστατικό της μαστίχας στη νόσο Crohn.

Επίσης, είναι η πρώτη φορά που διερευνάται και ο μηχανισμός δράσης της μαστίχας στο επιθήλιο. Στο *in vitro* μοντέλο φλεγμονής, όπου ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα παχέος εντέρου (HT29) αλληλεπιδρούν με διεγερμένα μακροφάγα (Mo/MΦ), τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μοναδικό αυτό προϊόν ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση του αναστέλλοντας το μονοπάτι που πυροδοτεί ο NF-κΒ.

Σε ό,τι αφορά στο ΣΒ των TNBS-επίμυων στην παρούσα μελέτη, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν σημειώνεται κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Αυτό είναι αναμενόμενο, μιας και ο χρόνος παρέμβασης δεν ξεπέρασε τις 6 μέρες μετά την επαγωγή κολίτιδας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της μαστίχας Χίου στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ).

12.2 Φλεγμονή και βιοχημικοί δείκτες

Με σκοπό την κατανόηση των ανοσολογικών μηχανισμών που διέπουν τη χρόνια φλεγμονή του εντέρου διατίθεται μια σειρά ζωικών προτύπων, τα οποία μιμούνται την ΙΦΝΕ σε κύρια κλινικά, ιστολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Ανάμεσα σε αυτά τα πρότυπα, ανήκει και εκείνο της TNBS-κολίτιδας που αναπτύχθηκε από τους Morris και συν (1989). Έχει αρκετές ομοιότητες με τη νόσο Crohn και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη σημαντικών οδών της φλεγμονής (Pizarro και συν, 2003). Κύριο γνώρισμά του είναι η αυξημένη παραγωγή των Th1 κυτταροκινών, όπως είναι ο TNF-α. Ο τελευταίος έχει κεντρική θέση στο μονοπάτι της φλεγμονής. Όταν σε μύες με TNBS-κολίτιδα γίνεται ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αντισώματος του TNF-α, η κλινική και ιστοπαθολογοανατομική εικόνα των ζώων βελτιώνεται σημαντικά (Neurath και συν, 1997). Οι ασθενείς με νόσο Crohn έχουν αυξημένη συγκέντρωση της κυτταροκίνης στον ορό (Maeda και συν, 1992), ωστόσο υπάρχουν μελέτες που δείχνουν το αντίθετο (Youngman και συν, 1993). Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση μαστίχας μειώνει τα επίπεδα του TNF-α, γεγονός που ίσως να σημαίνει ότι η μαστίχα αποτρέπει την εξέλιξη της ιστικής βλάβης. Σήμερα, πολλές είναι οι θεραπευτικές τεχνικές που εστιάζουν στην αναστολή του καταρράκτη του TNF-α (Papadakis και Targan, 2000). Μέχρι τώρα τα δεδομένα από την επίδραση των infliximab και CDP571, μονοκλωνικών αντισωμάτων του TNF-α, στην εξέλιξη της νόσου Crohn είναι αρκετά υποσχόμενα (Song και συν, 2011, Hanauer και συν, 2002).

Εκτός από τον TNF-α, και άλλες κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ΙΦΝΕ. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6 και IL-8 υπερεκκρίνονται, ενώ η παραγωγή της αντιφλεγμονώδους IL-10 μειώνεται, γεγονότα που διαιωνίζουν τη φλεγμονή (MacDonald και Monteleone, 2000). Η IL-6 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης στο ήπαρ και η συγκέντρωσή της είναι αυξημένη στον ορό και στον εντερικό ιστό ασθενών με νόσο Crohn (Gross και συν, 1992). Σε ζωικό πρότυπο ΙΦΝΕ, η χορήγηση αντισώματος της IL-6 μειώνει τη φλεγμονή αναστέλλοντας την έκφραση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης (Ito, 2003). Δύο χρόνια αργότερα, οι Ito και συν (2005) παρατηρούν ότι η αγωγή με αντίσωμα της IL-6 καταφέρνει να μειώσει σημαντικούς δείκτες φλεγμονής στο 80% των ασθενών με νόσο Crohn, ενώ σε 20% των εθελοντών η νόσος υποχωρεί σημαντικά. Η IL-8 αποτελεί από τις πιο ισχυρές χημοκίνες που πυροδοτούν τη διήθηση των ουδετερόφιλων στη φλεγμαίνουσα περιοχή (Grimm και συν, 1996, Ina και συν, 1997). Στο επιθήλιο ασθενών με νόσο Crohn παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της IL-8 που σχετίζονται ισχυρά με τον αριθμό ουδετερόφιλων που έχουν διηθηθεί (MacDermott, 1999). Σύμφωνα με τους Smith και συν (1991), η IL-8 αυξάνει τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων στο

ενδοθήλιο έως και 90% μόλις μέσα σε μία ώρα, για το λόγο αυτό η αναστολή της έκκρισής της άρχισε να μελετάται ως θεραπευτική τεχνική (Daig και συν, 1996). Η μεγάλη έκκριση κυτταροκινών επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης πάνω στο ενδοθήλιο, όπως του ICAM-1, με συνέπεια τη συσσώρευση νέων φλεγμονωδών κυττάρων (Neuman, 2007). Η αγωγή με αντίσωμα του ICAM-1 φαίνεται να έχει ευεργετικά αποτελέσματα. Στους TNBS-επίμυες επιφέρει μείωση της διήθησης των λευκοκυττάρων στον εντερικό ιστό (Sans και συν, 1999). Σε ασθενείς με ενεργή νόσο Crohn, η χορήγηση αντισώματος οδηγεί σε ύφεση της νόσου (Yacyshyn και συν, 1998) και μείωση της ανάγκης για λήψη στεροειδών (Schreiber και συν, 2001). Μακροπρόθεσμα φαίνεται να είναι τα αποτελέσματα της θεραπείας σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα ήπιας έως μέτριας σοβαρότητας (Van Deventer και συν, 2004). **Στην παρούσα μελέτη, η μαστίχα μειώνει την έκκριση των IL-6, IL-8 και ICAM-1, όχι όμως και της αντιφλεγμονώδους IL-10. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η πολυπλοκότητα των ανοσολογικών οδών σε μία χρόνια και ακόμη όχι πλήρως κατανοητή ασθένεια, όπως η ΙΦΝΕ.**

12.3 Νόσος Crohn και βιοδραστικά συστατικά

Η συμβατική αγωγή της ΙΦΝΕ επιφέρει αρκετές παρενέργειες, για το λόγο αυτό οι επιστήμονες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στα τρόφιμα. Η εύρεση των βιοδραστικών συστατικών ίσως να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία της νόσου. Διαιτητικές ίνες, ω-3 λιπαρά οξέα και πολυφαινόλες φαίνεται να έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση στην TNBS-κολίτιδα (Camacho-Barquero και συν, 2007, Camuesco και συν, 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των ω-3 λιπαρών οξέων, αυξημένη πρόσληψη μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και επομένως σε οξειδωτικό τραύμα στην περιοχή της φλεγμονής (Nieto και συν, 1998). Το πρόβλημα αυτό φαίνεται να αντιμετωπίζεται με ταυτόχρονη χορήγηση πολυφαινολών, όπως κερκετίνης (Camuesco και συν, 2006). Σε πρόσφατη μελέτη των Κορο και συν (2010) η ευεργετική δράση των ω-3 λιπαρών οξέων ενισχύεται, όταν στη δίαιτα των TNBS-επίμυων προστίθενται τριγλυκερίδια μέσης αλύσου. Η διακοπή του καταρράκτη που πυροδοτεί ο NF-κΒ φαίνεται να είναι ο μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης του α-λινολενικού οξέος (Hasan και συν, 2010).

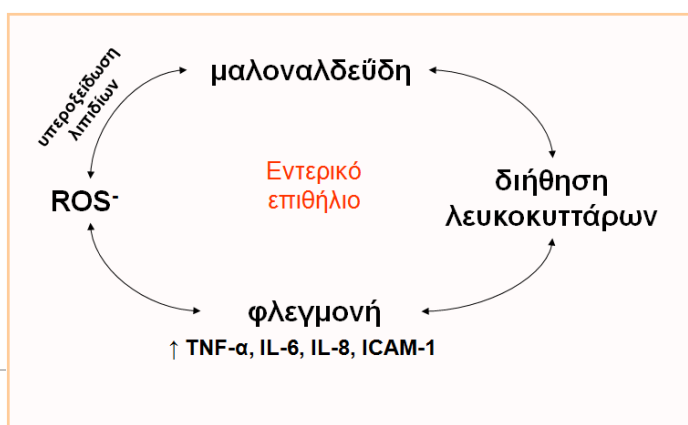
Ανάμεσα στα συστατικά της τροφής που εξετάζονται για την αντιφλεγμονώδη δράση τους στην ΙΦΝΕ είναι και η ινουλίνη. Είναι πρεβιοτικό και ανήκει στην ομάδα των άπεπτων πολυσακχαριτών που ονομάζονται φρουκτάνες. Αντιστέκεται στην πέψη από τα παγκρεατικά και ηπατικά ένζυμα, αλλά υπόκειται σε ζύμωση από τη μικροβιακή χλωρίδα του παχέος εντέρου (Gibson και συν, 2004). Όταν χορηγείται σε επαρκείς ποσότητες, αυξάνεται η σακχαρολυτική δραστηριότητα στο έντερο και προάγεται ο πολλαπλασιασμός των bifidobacteria. Πιλοτικές μελέτες σε ασθενείς με ΙΦΝΕ δείχνουν ότι η ινουλίνη έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Casellas και συν, 2007, Lindsay και συν, 2006). Χορήγησή της σε επίμυες, 7 μέρες πριν- και 10 μέρες μετά με την επαγωγή της TNBS-

κολίτιδας, παρεμποδίζει τη δράση των ενδοτοξινών και τη βακτηριακή μετατόπιση, με αποτέλεσμα η νόσος να υποχωρεί (Ito και συν, 2009). **Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η δράση της φρουκτάνης στην παρούσα μελέτη, χορηγείται σε δόση που εμπεριέχεται στη δραστική δόση της σκόνης μαστίχας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ινουλίνη δεν έχει καμία επίδραση στην TNBS-κολίτιδα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί: α) η χορηγούμενη δόση (40mg/Kg ΣΒ) είναι πολύ μικρότερη από εκείνη των Ito και συν (400mg/Kg ΣΒ) και β) η χορήγηση της ακολουθεί την επαγωγή της νόσου.**

Η ρητίνη διαθέτει φαινολικά συστατικά με επιβεβαιωμένη αντιοξειδωτική δράση (Kaliora και συν, 2004). Ωστόσο, οι ευεργετικές ιδιότητες του προϊόντος αποδίδονται κυρίως στην πλούσια περιεκτικότητά του σε τερπενοειδή (Andrikopoulos et al, 2003, Moulos et al, 2009, Paraschos et al, 2007). **Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι τα οφέλη της μαστίχας οφείλονται στη συνολική δράση του όξινου και του ουδέτερου κλάσματος και όχι μεμονωμένα σε κάποιο από αυτά. Το ολεανολικό οξύ, ένα από τα κυριότερα τριτερπένια του προϊόντος, δεν έχει θετικά αποτελέσματα στη φλεγμονή, παρά μόνο όταν δίνεται σε δόση διπλάσια από εκείνη που εμπεριέχεται στη δραστική δόση της σκόνης μαστίχας.** Πολυάριθμες είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν την ευεργετική δράση φυσικών προϊόντων ή μεμονωμένων συστατικών στην TNBS-κολίτιδα. Για παράδειγμα, αγωγή με κουρκουμίνη (Lubbad και συν, 2009) βελτιώνει το οξειδωτικό στρες στους TNBS-επίμυες ελαττώνοντας τα επίπεδα της MDA και της μυελούπεροξειδάσης (MPO). Άλλα φυσικά εκχυλίσματα που εξετάζονται για τις ευεργετικές τους επιδράσεις είναι εκείνα των βοτάνων *Ginkgo biloba* και *Hypericum perforatum*. Αυτά φαίνεται να αυξάνουν την αντιοξειδωτική δραστηριότητα στο επιθήλιο, να μειώνουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων και να ελαχιστοποιούν την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως των TNF-α, NF-κΒ p65 και IL-6 (Dost και συν, 2009, Zhou και συν, 2006). Αντιφλεγμονώδη δράση στην TNBS-κολίτιδα έχει διαπιστωθεί και για τα αιθέρια έλαια των φύλλων και ρητινών κάποιων ειδών του γένους *Protium* της Βραζιλίας (Siani και συν, 1999). Σύμφωνα με τη μελέτη των Vitor και συν (2009), η α- και η β-αμυρίνη αποτελούν τα βιοδραστικά συστατικά του *Protium kleinii* και χορήγησή τους μειώνει την έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν διευκρινίζεται αν οι συγκεντρώσεις των παραπάνω τερπενίων αντιστοιχούν στη δραστική δόση του αιθέριου ελαίου. Αρκετές είναι οι μελέτες που δεν διευκρινίζουν τα βιοδραστικά συστατικά των προϊόντων με ευεργετικές επιδράσεις στην TNBS-κολίτιδα. Το Si-Ni-San, παραδοσιακό βότανο της Κίνας, έχει μεγαλύτερη θεραπευτική δράση από ότι η γλυκυρριζίνη, ένας γλυκοζιτης τριτερπενοειδούς σαπωνίνης (Sun και συν, 2009). Το ίδιο παρατηρείται και για τη θυμοκινόνη, τερπένιο που απαντάται στο αιθέριο έλαιο του *Nigella sativa*, ανθοφόρου φυτού της νότιας Ασίας (Isik και συν, 2011).

12.4 Νόσος Crohn και δράση των ROS

Η ΙΦΝΕ χαρακτηρίζεται από διήθηση ουδετερόφιλων και μακροφάγων (Μο/ΜΦ) στον εντερικό ιστό. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) είναι αυξημένη, με αποτέλεσμα την οξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και την αλλοίωση του DNA. Είναι πλέον επιβεβαιωμένο ότι οι ROS, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υποχλωριώδες οξύ (HClO), δεν είναι απλά υποπροϊόντα της διαδικασίας της φλεγμονής, αλλά αποτελούν μέρος της παθογένειάς της. Κεντρικό ρόλο στην παραγωγή των ROS έχει η MPO, ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των λευκοκυττάρων και μετατρέπει το H_2O_2 στο ισχυρά κυτταροτοξικό HClO. Φυσιολογικά, ο οργανισμός ρυθμίζει την παραγωγή τους με την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών στο εντερικό επιθήλιο. Για παράδειγμα, οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SOD) μετατρέπουν τα O_2^- στον πιο σταθερό μεταβολίτη H_2O_2 και στη συνέχεια οι καταλάσες ή οι υποεροξειδάσες της γλουταθειόνης μετατρέπουν το H_2O_2 σε νερό. Η παρουσία των ROS είναι σημαντικά αυξημένη στο εντερικό επιθήλιο ασθενών με ΙΦΝΕ (Shanahan, 2001). Επειδή οι ROS έχουν μικρό χρόνο ημι-ζωής, η μέτρησή τους είναι αρκετά δύσκολη. Το μέγεθος της οξειδωτικής βλάβης αξιολογείται συνήθως με μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης των λιπών (MDA), των ενδογενών αντιοξειδωτικών (SOD, GSH) ή των προ-οξειδωτικών παραγόντων (MPO, συνθάσες του NO). Τόσο σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Verspaget και συν, 1988) όσο και σε επίμυες με TNBS-κολίτιδα (Girgin και συν, 2000), η έκκριση της MDA αυξάνεται και εκείνη των SOD μειώνεται. **Όπως επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα ROS αυξάνουν την διαπερατότητα του ενδοθηλίου με αποτέλεσμα να προάγουν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ως συνέπεια, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων και πυροδοτείται διαρκώς η φλεγμονή (Σχήμα 12.1).** Η χορήγηση όμως μαστίχας ελαχιστοποιεί την MDA, γεγονός που δείχνει την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, τα οποία δείχνουν ότι η μαστίχα Χίου παρεμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων σε ασθενείς με νόσο Crohn (Kaliora και συν, 2007a), την *in vitro* οξείδωση της LDL και την κυτταροτοξικότητα των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος από την οξειδωμένη LDL (Dedoussis και συν, 2004).

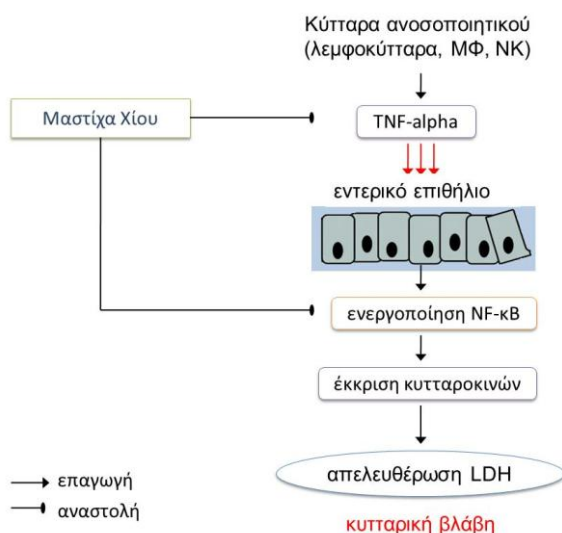


Σχήμα 12.1. Παραγωγή κυτταροκινών παρουσία των ROS στο εντερικό επιθήλιο TNBS-επίμυων.

12.5 Νόσος Crohn και χημειοταξία

Τα διεγερμένα μακροφάγα (Μο/ΜΦ) παίζουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της φλεγμονής. Μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης και ως αποτέλεσμα της χημειοταξ που προκαλούν, εκκρίνουν TNF-α. Η παραγωγή TNF-α από μη λεμφοειδή κύτταρα, όπως τα ΜΦ, κρίνεται απαραίτητη για τη διατήρηση της φλεγμονής (Xavier και Podolsky, 2007). Όταν σε γενετικά τροποποιημένους μύες με ανικανότητα έκκρισης της IL-10 (IL-10 -deficient mice) αφαιρούνται τα ΜΦ, αναστέλλεται η φλεγμονή στο εντερικό επιθήλιο (Kamada και συν, 2005). **Στη συγκαλλιέργεια της παρούσας μελέτης, η μαστίχα Χίου δεν μειώνει την έκκριση του TNF-α από τα Μο/ΜΦ. Ωστόσο, στην *in vivo* μελέτη η σκόνη μαστίχας Χίου μειώνει τα επίπεδα του TNF-α στον ιστό των TNBS-επίμυων, γεγονός που σημαίνει ότι και άλλα κύτταρα πέρα από τα ΜΦ εκκρίνουν TNF-α.**

Στη συγκαλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HT29 με Μο/ΜΦ, η αύξηση στην ενεργοποίηση της NF-κΒ p65 αναστέλλεται ύστερα από επώαση με μαστίχα. Ο καταρράκτης αντιδράσεων που πυροδοτεί ο NF-κΒ αποτελεί από τα σημαντικότερα μονοπάτια φλεγμονής. Βιοψίες εντερικού επιθηλίου σε ασθενείς με ΙΦΝΕ δείχνουν σημαντική ενεργοποίηση της υπομονάδας p65 (Chung και συν, 2000). Η χρησιμοποίηση μονοκλωνικού αντισώματος της p65 με τη μέθοδο ELISA αποτελεί βασικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του NF-κΒ (Rogler και συν, 1998). Μάλιστα, η θεραπεία με αντι-ολιγονουκλεοτίδια για το γονίδιο της p65 φαίνεται αποτελεσματική (Lawrance και συν, 2003). Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι συμπληρωματικά στο mRNA-στόχο, με συνέπεια η πρόσδεσή τους σε αυτό να απενεργοποιεί το γονίδιο που προκαλεί τη βλάβη. Στην παρούσα μελέτη, υποθέτουμε ότι ο TNF-α που εκκρίνεται από τα Μο/ΜΦ προσδένεται στον TNFR υποδοχέα των HT29 κυττάρων, οδηγώντας σε ενεργοποίηση του NF-κΒ και τελικά σε κυτταρική βλάβη. Στον παραπάνω καταρράκτη, η μαστίχα παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-κΒ και μειώνει την έκφραση των IL-8 και ICAM-1 τόσο στον ιστό των TNBS-επίμυων, όσο και στα HT29 κύτταρα. Έτσι, η ρύθμιση της έκφρασης προφλεγμονωδών παραγόντων αποτελεί σημαντική τεχνική για την αγωγή της νόσου (Σχήμα 12.2).



Σχήμα 12.2 Μηχανισμός δράσης της μαστίχας στην ΙΦΝΕ. LPS=λιποπολυσάκχαριδιο, LDH=γαλακτική αφυδρογονάση

12.6 Νόσος Crohn και εντερικό επιθήλιο

Η μείωση της ενεργοποίησης του NF-κΒ οδηγεί στην έκφραση μιας πληθώρας αντι-αποπτωτικών γονιδίων, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ιστική βλάβη και προστατεύοντας τον εντερικό φραγμό (Dixit και Mak, 2002). **Στην παρούσα μελέτη, η μαστίχα Χίου μειώνει την απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) από τα HT29 κύτταρα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.** Η απελευθέρωση της LDH από το κυτταρόπλασμα είναι χρήσιμος δείκτης του βαθμού ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Sung και συν, 1995). Η φυσιολογική αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων είναι ύψιστης σημασίας για τη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου, καθώς είναι εκείνη που επηρεάζει την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και του νερού στο αίμα. Στους ασθενείς με νόσο Crohn το εντερικό επιθήλιο έχει μεγάλη διαπερατότητα, ιδιαίτερα όταν η νόσος είναι ενεργή (Irvine και Marshall, 2000). Το φαινόμενο αυτό έχει άμεση σχέση με τη διήθηση λευκοκυττάρων και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF-α. Κατά τη φυσιολογική απόπτωση των κυττάρων ο εντερικός φραγμός δεν επηρεάζεται, ωστόσο η παρουσία προ-οξειδωτικών και προφλεγμονωδών παραγόντων προάγει την κυτταροτοξικότητα και οδηγεί σε μείωση της ακεραιότητας του επιθηλίου (Xavier και Podolsky, 2007). **Στην παρούσα διατριβή, η αναστολή της βλάβης στα HT29 κύτταρα από τη μαστίχα είναι προφανής.**

12.7 Επίλογος

Συμπερασματικά, η χορήγηση μαστίχας στους TNBS-επίμυες με σοβαρή φλεγμονή, οίδημα και εξέλκωση στο κόλον επιδρά ευεργετικά βελτιώνοντας τη βλάβη. Τα ευρήματα της μελέτης έρχονται σε συμφωνία με την ικανότητα του προϊόντος να βελτιώνει την κλινική εικόνα ασθενών με ενεργή νόσο Crohn ήπιας έως μέτριας σοβαρότητας. Παρόλο που δεν διευκρινίζεται ποιο κλάσμα ή συστατικό της ρητίνης είναι το βιοδραστικό, αποσαφηνίζεται ο μηχανισμός με τον οποίο η μαστίχα ασκεί την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της. Εφόσον ο NF-κΒ έχει ρόλο κλειδί στην εξέλιξη της φλεγμονής, η αναστολή της ενεργοποίησης του πιθανά να αποτελεί έναν στόχο στη μελλοντική θεραπεία της ΙΦΝΕ. Περαιτέρω μελέτες, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, απαιτούνται για την επιβεβαίωση των ευεργετικών επιδράσεων του μοναδικού αυτού προϊόντος της Ελληνικής χλωρίδας, ενώ απαραίτητη είναι και μελέτη εμφάνισης πιθανών τοξικών παρενεργειών που μπορούν να εμφανιστούν από την πρόσληψή του.

Βιβλιογραφία

- Abdalla A.E., Roozen J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem*, 1999; 64: 323-29.
- Adeyemi E.O., Neumann S., Chadwick V.S., et al. Circulating human leucocyte elastase in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1985; 26: 1306-11.
- Aeschbach R., Loliger J., Scott B.C., et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*, 1994; 32: 31–36.
- Aghkassi E., Wendland B.E., Steinhart H., et al. Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol*, 2003; 98: 348-53.
- Aksoy A., Duran N., Toroglu S., et al. Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients. *Angle Orthodontist*, 2007; 77: 124-28.
- Al-Habbal M.J., Al-Habbal Z., Huwez F.U. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1984; 11: 541-44.
- Al-Said M.S., Ageel A.M., Parmar N.S., et al. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol*, 1986; 15: 271-78.
- 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: 501-07.
- Aviram M. Review on human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res*, 2000; 33: 85-97.
- Baert F.J., 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.
- Bailey H.H., Wilding G., Tutsch K.D., et al. A phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004; 54: 368-76.
- 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.
- 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.
- 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., et al. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 52: 522-23.

- Bouma G., Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3: 521-33.
- Bukovská A., Cikos S., Juhás S., et al. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators Inflamm*, 2007; 2007: 23296.
- Büning C., Lochs H. Conventional therapy for Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 2006; 12:4794-806.
- Camacho-Barquero L., Villegas I., Sánchez-Calvo J.M., et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 2007; 7: 333-42.
- Camuesco D., Comalada M., Concha A., et al. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr*, 2006; 25: 466-76.
- Camuesco D., Comalada M., Rodríguez-Cabezas M.E., et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol*, 2004; 143: 908-18.
- Casellas F., Borruel N., Torrejón A., et al. Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007; 25: 1061-67.
- 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: 4156-61.
- Chung S.W., Kang B.Y., Kim S.H., et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 2000; 275: 32681-87.
- Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenes. *Natural Prod Rep*, 2007; 24: 465-86.
- Crowell P.L. Symposium on phytochemicals: biochemistry and physiology. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr*, 1999; 129: 775-78.
- Crowell P.L., Elegbede J.A., Elson C.E., et al. Human metabolism of the antitumor agent d-limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994; 35: 31-37.
- Crowell P.L., Lin S., Vedejs E., et al. Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992; 31: 205-12.
- Da Fonseca C.O., Linden R., Futuro D., et al. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol. *Arch Immunol Ther*, 2008a; 56: 267-76.
- Da Fonseca C.O., Schwartzmann G., Fisher J., et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg Neurol*, 2008b; 70: 259-67.

- Daig R., Andus T., Aschenbrenner E., et al. Increased interleukin-8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1996; 38: 216-22.
- Danese S., Sans M., Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 2004; 3: 394-400.
- Dang M.N., Takacsova M., Nguyen D.V., et al. Antioxidant activity of essential oils from various spices. *Nahrung/Food*, 2001; 45: 64-6.
- 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.
- Dietrich D.R., Swenberg J.A. The presence of α_2 -globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Res*, 1991; 51: 3512-17.
- 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.
- Dixit V., Mak T.W. NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell*, 2002; 111: 615-19.
- D'Oodorico A., Bortolan S., Cardin R., et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease *Scand J Gastroenterol*, 2001; 36: 1289-94.
- Dost T., Ozkayran H., Gokalp F., et al. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Dig Dis Sci*, 2009; 54: 1214-21.
- Dundar E., Olgun E.G., Isiksoy S., et al. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Exp Toxicol Pathol*, 2008; 59: 399-408.
- Dung N.T., Bajpai V.K., Yoon J.I., et al. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Food Chem Toxicol*, 2009; 47: 449-53.
- Elegbede J.A., Elson C.E., Qureshi A., et al. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. *Carcinogenesis*, 1984; 5: 661-65.
- 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.
- Farrell R.J., Peppercorn M.A. Ulcerative colitis. *Lancet*, 2002; 359: 331-340.
- Feghali C.A., Wright T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 1997; 2: 12-26.
- Fuhrman B., Volkova N., Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice, protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*, 2002; 161: 307-16.
- 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.

- Gao X., Deeb D., Jiang H., et al. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. *J Neurooncol*, 2007; 84: 147-57.
- Geier M.S., Butler R.N., Howarth G.S. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int J Food Microbiol*, 2007; 115: 1-11.
- Gibson G.R., Probert H.M., Loo J.V., et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, 2004; 17: 259-75.
- Girgin F., Karaoglu O., Erkuş M., et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health A*, 2000; 59: 641-62.
- Goke M., Hoffman J.C., Evers J., et al. Elevated serum concentrations of soluble selectin and immunoglobulin type adhesion molecules in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 1997; 32: 480-86.
- Grassmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vit Horm*, 2005; 72: 505-35.
- Grassmann J., Hippeli S., Vollmann R., et al. Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *J Agric Food Chem*, 2003; 51: 7576-82.
- Grassmann J., Schneider D., Weiser D., et al. Antioxidative effects of lemon oil and its components on copper induced oxidation of low density lipoprotein. *Arzneimitt Forsch/Drug Res*, 2001; 51: 799-805.
- Grimm M.C., Elsbury S.K., Pavli P., et al. Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1996; 38: 90-8.
- Gross V., Andus T., Caesar I., et al. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1992; 102: 514-19.
- Haag J.D., Gould M.N. Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994; 34: 477-83.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr*, 1996; 16: 33-50.
- Hanauer S.B., Feagan B.G., Lichtenstein G.R., et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*, 2002; 359: 1541-49.
- Harrison: Εισαγωγή στο ανοσιακό σύστημα. Στο: Εσωτερική Παθολογία. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 16η έκδοση. Ελληνική έκδοση 2005.
- Hassan A., Ibrahim A., Mbodji K., et al. An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr*, 2010; 140: 1714-21.
- 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., 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.
- Head A.K., 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.
- Hendrickson B.A., Gokhale R., Cho J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol*, 2002; 15: 79-95.
- Huwez F.U., Al-Habbal M.J. Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Gastroenterol Jpn*, 1986; 21: 273-74.
- Huwez F.U., Thirlwell D., Cockayne A., et al. Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med*, 1998; 339: 1946.
- Ina K., Kusugami K., Yamaguchi T., et al. Mucosal interleukin-8 is involved in neutrophil migration and binding to extracellular matrix in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 1997; 92: 1342-46.
- Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother*, 2001a; 47: 565-73.
- Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother*, 2001b; 7: 251-54.
- Irvine E.J., Marshall J.K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*, 2000; 119: 1740-44.
- Isik F., Tunali Akbay T., Yarat A., et al. Protective effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on TNBS-induced experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci*, 2011; 56: 721-30.
- Ito H. IL-6 and Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003; 2: 125-30.
- Ito H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol*, 2005; 40:32-34.
- Ito H., Tanabe H., Kawagishi H., et al. Short-chain inulin-like fructans reduce endotoxin and bacterial translocations and attenuate development of TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*, 2009; 54: 2100-08.
- Johnson IT. Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc*, 2007; 66: 207-15.
- Jurjus A.R., Khoury N.N., Reimund J.M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol*, 2004; 50: 81-92.
- Kakazu T., Hara J., Matsumoto T., et al. Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 1999; 94: 2149-55.
- Kalemba D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*, 2003; 10: 813-829.
- Kaliora A.C., Mylona A., Chiou A., et al. Detection and identification of simple phenolis in *Pistacia lentiscus* resin. *Liq Chromatogr R T*, 2004; 27: 289-300.

- 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.
- Kamada N., Hisamatsu T., Okamoto S., et al. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol*, 2005; 175: 6900-08.
- Karlinger K., Györke T., Makö E., et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 2000; 35: 154-67.
- Kono H., Fujii H., Ogiku M., et al. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res*, 2010; 156: 282-91.
- Korzenik J.R., Podolsky D.K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 197-09.
- Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. *chia*. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 7681-85.
- 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.
- Lakatos L.P. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol*, 2006; 12: 6102-08.
- Lawrance I.C., Wu F., Leite A.Z., et al. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology*, 2003; 125: 1750-61.
- Lee J.H., Lee D.U., Jeong C.S. Gardenia Jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem Toxicol*, 2010; 24: 233-34
- 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.
- Liao D.J., Blanck A., Eneroth P., et al. Diethylnitrosamine causes pituitary damage, disturbs hormone levels, and reduces sexual dimorphism of certain liver functions in the rat. *Environ Health Perspect*, 2001; 109: 943-47.
- Lindsay J.O., Whelan K., Stagg A.J., et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 2006; 55: 348-55.
- Loftus G.C., Loftus V.E., Harmsen S.W., et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmest country, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis*, 2007; 13: 254-61.
- Loizou S., Paraschos S., Mitakou S., et al. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med*, 2009; 234: 553-61.

- Loughlin M.F., Ala'Aldeen D.A., Jenks P.J. Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51: 367-71.
- Loutrari H., Hatzia Apostolou M., Skouridou V., et al. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004; 311: 568-75.
- Löw-Baselli A., Huber W.W., Käfer M., et al. Failure to demonstrate chemoprevention by the monoterpene perillyl alcohol during early rat hepatocarcinogenesis: a cautionary note. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 1869-77.
- Lubbad A.S., Oriowo M.A., Khan I. Curcumin reverses attenuated carbachol-induced contraction of the colon in a rat model of colitis. *Scand J Gastroenterol*, 2009; 44: 187-94.
- Lügering A., Schmidt M., Lügering N., et al. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*, 2001; 121: 1145-57.
- MacDermott R.P. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol*, 1999; 19: 266-72.
- MacDonald T.T., Monteleone G. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med*, 2000; 32: 552-60.
- Maeda M., Watanabe N., Neda H., et al. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1992; 14: 451-61.
- Maerten P., Shen C., Colpaert S., et al. Involvement of interleukin 18 in Crohn's disease: evidence from in vitro analysis of human gut inflammatory cells and from experimental colitis models. *Clin Exp Immunol*, 2004; 135: 310-17.
- 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.
- Mahida Y.R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2000; 6: 21-33.
- Main J., McKenzie H., 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.
- Mathew C.G., Lewis C.M. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Human Molecular Genetics*, 2004; 13: 161-68.
- 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.

- 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.
- Mitsuyama K., Toyonaga A., Sasaki E., et al. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*, 1994; 96: 432-36.
- Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 1989; 96: 795-803.
- Moulos P., Papadodima O., Chatziioannou A., et al. A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics*, 2009; 2: 1-15.
- Murano M., Maemura K., Hirata I., et al. Therapeutic effect of intracolonicallly administered nuclear factor κB (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol*, 2000; 120: 51-58.
- Mutai C., Bii C., Vagias C., et al. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol*, 2009; 123: 143-8.
- Nagasawa H.T., Shiota F.N., Matsumoto H. Decomposition of methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin, in D₂O. *Nature*, 1972; 236: 234-35.
- Neuman M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*, 2007; 149: 173-86.
- Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol*, 1997; 27: 1743-50.
- Nielsen O.H., Langholz E., Hendel J., et al. Circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in active inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, 1994; 39: 1918-23.
- Nieto N., Fernandez M.I., Torres M.I., et al. Dietary monounsaturated n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Dig Dis Sci*, 1998; 43: 2676-87.
- O'Bryan C.A., Crandall P.G., Chalova V.I., et al. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J Food Sci*, 2008; 73: 264-67.
- Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2003; 8: 207-15.
- Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., et al. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998, 10: 259-64.
- O'Morain C., Smethurst P., Levi A.J., et al. Biochemical analysis of enzymic markers of inflammation in rectal biopsies from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Pathol*, 1983; 36: 1312-16.
- Orhlom M., Munkholm P., Langholz E., et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 1991; 324: 84-88.
- Ovesná Z., Kozics K., Slamenová D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat Res*, 2006; 600: 131-7.

- Panza E., Franceschi S., La Vecchia S. Dietary factors in the aetiology of inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol*, 1987; 19: 205-09.
- Papadakis K.A., Targan S.R. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology*, 2000; 119: 1148-57.
- 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., Crabtree J.E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol*, 2006; 208: 233-48.
- Pizarro T.T., Arseneau K.O., Bamias G., et al. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med*, 2003; 9: 218-22.
- Reddy B.S., Wang C.X., Samaha H., et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res*, 1997; 57: 420-25.
- Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*, 2001; 34: 237-56.
- Reznick Z.A., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: NJ Abelson and IM Simon, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1994: 357-63.
- Rodrigues T.G., Fernandes A., Sousa J.P., et al. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. *Nat Prod Res*, 2009; 23: 319-26.
- Rodrigues T.G., Fernandes A., Sousa J.P.B., et al. In vitro and in vivo effects of clove on pro-inflammatory cytokines production by macrophages. *Nat Prod Res*, 2009; 23: 319-26.
- Rogler G., Brand K., Vogl D., et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 1998; 115: 357-69.
- 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.
- Rowlands J.C., He L., Hakkak R., et al. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr*, 2001; 131: 3281-87.
- Sanchez-Muñoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2008; 14: 4280-88.
- Sans M., Panés J., Ardite E., et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*, 1999; 116: 874-83.
- Saxon A., Shanahan F., Landers C. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1990; 86: 202-10.
- Schreiber S., Nikolaus S., Malchow H., et al. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2001; 120: 1339-46.

- Schwarz K., Ernst H., Ternes W. Evaluation of antioxidant constituents of thyme. *J Sci Food Agric*, 1996; 70:217–23.
- Schwarz K., Ternes W., Schmauderer E. Antioxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1992; 195: 104-07.
- Senthil S., Sridevi M., Pugalandi K.V. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicol Pathol*, 2007; 35: 418-23.
- Setzer W.N., Setzer M.C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem*, 2003; 3: 540-56.
- Shai L.J., McGaw L.J., Aderogba M.A., et al. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol*, 2008; 119: 238-44.
- Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2001; 48: 609.
- Shanmugam M.K., Kannaiyan R., Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr Cancer*, 2011; 63: 161-73.
- Siani A.C., Ramos M.F., Menezes-de-Lima O., et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*, 1999; 66: 57-69.
- Simmonds N.J., Rampton D.S. Inflammatory bowel disease-a radical view. *Gut* 1993, 1993; 34: 865-68.
- Smith W.B., Gamble J.R., Clark-Lewis I., et al. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology*, 1991; 72: 65-72.
- Sogno I., Vannini N., Lorusso G., et al. Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: oleanic acid terpenoids. *Recent Results Cancer Res*, 2009; 181: 209-12.
- 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.
- Song L., Hanlon D.W., Chang L., et al. Single molecule measurements of tumor necrosis factor α and interleukin-6 in the plasma of patients with Crohn's disease. *J Immunol Methods*, 2011; 372: 177-86.
- Stark M.J., Burke Y.D., McKinzie J.H., et al. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett*, 1995; 96: 15–21.
- 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.
- Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenesis. *N Engl J Med*, 1989; 320: 915-24.
- 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: 325-30.

- Strober W., Fuss I.J., Blumberg R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 495-99.
- Sun Y., Cai T.T., Shen Y., et al. Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription, and its active ingredient glycyrrhizin ameliorate experimental colitis through regulating cytokine balance. *Int Immunopharmacol*, 2009; 9: 1437-43.
- Sung M., Kendall C., Koo M., et al. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer*, 1995; 23: 259-69.
- Tabopda T.K., Ngoupayo J., Khan Tanoli S.A., et al. Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Med*, 2009; 75: 522-7.
- Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology*. ISBN: 087-893-856-7, published by Sinauer Associates Inc., 2006 (4th edition).
- Takahashi Y., Inaba N., Kuwahara S., et al. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003; 67: 195-97.
- Targan S.R., Hanauer S.B., van Deventer S.J., et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's Disease. Crohn's Disease cA2 study group. *N Engl J Med*, 1997; 337: 1029-35.
- Teissedre P.L., Waterhouse A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J Agric Food Chem*, 2000; 48: 3801-05.
- Teodoro T., Zhang L., Alexander T., et al. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*, 2008; 582: 1375-80.
- Topitsoglou-Themeli V., Dagalis P., 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 T.N., et al. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol*, 2007; 111: 43-9.
- Van Deventer S.J., Tami J.A., Wedel M.K. A randomised, controlled, double blind, escalating dose study of alicaforsen enema in active ulcerative colitis. *Gut*, 2004; 53: 1646-61.
- Vander A., Sherman J., Luciano D. Αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού. Στο: Φυσιολογία του ανθρώπου. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 8η έκδοση, 2001, σελ: 904-954.
- Verspaget H.W., Peña A.S., Weterman I.T., et al. Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut*, 1988; 29: 223-28.
- 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.
- Xavier R.J., Podolsky D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2007; 448: 427-34.

- Yacyshyn B.R., Bowen-Yacyshyn M.B., Jewell L., et al. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1998; 114: 1133-42.
- 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.
- Youdim K.A., Dorman H.J., Deans S.G. The antioxidant effectiveness of thyme oil, α-tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. *J Essent Oil Res*, 1999; 11: 643-48.
- Youngman K.R., Simon P.L., West G.A., et al. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology*, 1993; 104: 749-58.
- Σαββίδης Θ. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*). ISBN: 960-343-528-7, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδης Α.Ε., 2000.