



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ/ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

In vitro αξιολόγηση και *in vivo* φαρμακοκινητική/ φαρμακοδυναμική μελέτη του εκχυλίσματος από τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L. με έμφαση στην αντιαθηρωματική δράση



Ειρήνη Χριστοδούλου
Φαρμακοποιός M.Sc.
Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	I
	ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	V
	ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	IX
	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	XI
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	XV
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	XVII
	ABSTRACT	XXI
	<u>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
A.1.	<i>Crocus sativus</i> L. - ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Iridaceae	1
A.1.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1.2.	ΙΣΤΟΡΙΑ	1
A.1.3.	ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	3
A.1.4.	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ	6
A.1.5.	ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΣΑΦΡΑΝ	8
A.1.5.1.	Η δράση του σαφράν στο ΚΝΣ	8
A.1.5.2.	Η επίδραση του σαφράν στα επίπεδα γλυκόζης και στο διαβήτη	9
A.1.5.3.	Η αντιοξειδωτική δράση του σαφράν	9
A.1.5.4.	Η επίδραση στην αθηρωμάτωση, τα λιπίδια του πλάσματος και την ισχαιμία	10
A.1.5.5.	Χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση του σαφράν	11
A.1.5.6.	Άλλες πιθανές δράσεις	11
A.1.5.7.	Τοξικότητα	12
A.1.5.8.	Φαρμακοκινητική-Μεταβολισμός	13
A.2.	ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	15
A.2.1.	Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ	17
A.2.2.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ	21
A.2.3.	Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ (ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ-ΕΛΑΣΤΙΝΗ) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	23

A.2.3.1.	Κολλαγόνο και αθηρωμάτωση	24
A.2.3.2.	Ελασίνη και αθηρωμάτωση	25
A.2.4.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ	26
A.2.5.	Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΔΙΚΤΟΥ (MMPs)	26
A.2.5.1.	Δομή και ταξινόμηση των MMPs	27
A.2.5.2.	Οι MMPs στην αθηρωμάτωση	30
A.2.5.3.	Οι MMPs και η σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας	30
A.2.6.	ΟΙ ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ (TIMPs)	31
A.2.7.	ΜΟΝΟΚΥΤΕ ΧΗΜΟΑΤΤΡΑΚΤΑΝΤ ΠΡΟΤΕΪΝ 1/ MCP-1	32
A.2.7.1.	Ο ρόλος του παράγοντα MCP-1 στις καρδιαγγειακές παθήσεις	33
A.2.8.	ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ (TNF-α/ IL-6)	33
A.2.8.1.	Tumor Necrosis Factor α (TNF-α)	34
A.2.8.2.	Ιντερλευκίνη 6 (IL-6)	34
A.3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΕ ΖΩΑ	36
A.4.1.	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	36
A.3.2.	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	36
A.3.3.	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ	37
A.3.4.	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	37
A.3.5.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΟΝ <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟ	38
A.3.6	ΟΙ ApoE^{-/-} ΜΥΕΣ ΩΣ ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ	39
A.3.6.1	Χαρακτηριστικά ζωικού προτύπου	39
A.3.6.2	Οι μύες με ομόζυγη έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E	40
A.4.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	43
	<u>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
B.1.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΒΑΣΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	45
B.1.1.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	45
B.1.2.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	46
B.1.3.	ΒΑΣΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	48

B.2.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ <i>IN VITRO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>Crocus sativus</i>	49
B.2.1.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΡΟΚΟΥ (SFE)	49
B.2.2.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ SFE	49
B.2.3.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΑΦΡΑΝΑΛΗΣ	50
B.2.4.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ SFE ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	51
B.3.	ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ SFE ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΕΣ	52
B.3.1.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	52
B.4.	<i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SFE ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	54
B.4.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	54
B.4.2.	ΤΕΣΤ ΑΝΟΧΗΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΟΖΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ	55
B.4.3.	ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ	55
B.4.4.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΑ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE ^{-/-})	56
B.4.4.1.	Επεξεργασία ιστών – Ιστοχημικές χρώσεις	56
B.4.4.2.	Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές	60
B.4.4.3.	Μορφομετρικές Αναλύσεις	62
B.4.5.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE ^{-/-})	63
B.5.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	66
	<u>ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	
Γ.1.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ <i>IN VITRO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>Crocus sativus</i>	67
Γ.1.1.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ SFE	67
Γ.1.2.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΑΦΡΑΝΑΛΗΣ	68
Γ.1.3.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	70
Γ.2.	ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ SFE ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΕΣ	73

Γ.2.1.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-PDA	73
Γ.2.2.	ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ SFE ΣΕ ΜΥΕΣ	74
Γ.2.2.1.	Διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση - Μοντελοποίηση	75
Γ.2.2.2.	Μη διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση	79
Γ.3.	<i>IN VIVO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ SFE ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ	82
Γ.3.1.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΟ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ, ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ	82
Γ.3.2.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΑ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE ^{-/-})	84
Γ.3.3.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE ^{-/-})	89
Γ.4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
Δ.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97
Ε.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	i
ΣΤ.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

Ονοματεπώνυμο υποψήφιας διδάκτορος: Ειρήνη Χριστοδούλου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Γεωργία Βαλσαμή (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.
Νικόλαος Κωστομητσόπουλος, Κτηνίατρος DVM, PhD, Ειδικός Λειτουργός Επιστήμονας Α΄, Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.
Ιωάννα Ανδρεάδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.

Υπόλοιπα μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής (κατ' αλφαβητική σειρά):

Δημήτριος Ρέκκας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.
Χρήστος Ρέππας, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.
Ελένη Σκαλτσά, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.
Αλεξάνδρα Τσαρούχα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

‘Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.’

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

12 και κάτι χρόνια προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών κλείνουν με τον καλύτερο τρόπο...με την απόκτηση του διδακτορικού μου διπλώματος.

12 και κάτι χρόνια στα οποία μεσολάβησαν πολλά γεγονότα που άλλαξαν τη ζωή μου σημαντικά προς το καλύτερο και ελπίζω να συνεχίσουν έτσι.

Θέλω πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά και ξεχωριστά την υπεύθυνη καθηγήτρια-σύμβουλό μου κ. Γεωργία Βαλσαμή για όλη την υποστήριξη, βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα αυτά τα χρόνια. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επικεφαλής του τμήματος Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κ. Νίκο Κωστομητσόπουλο για την παραχώρηση των εγκαταστάσεων, των πειραματοζώων και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τον μεταδιδακτορικό –πλέον – ερευνητή του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών καρδιολόγο Νίκο Καδόγλου για την αρχική ιδέα της διδακτορικής μου διατριβής και τις συμβουλές του κατά την εκπόνησή της.

Βεβαίως θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την κ. Ιωάννα Ανδρεάδου, αναπληρώτρια καθηγήτρια Φαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών, που μου έκανε την τιμή να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής μου και παρείχε συμβουλές γύρω από το καρδιαγγειακό σύστημα και την αθηρωμάτωση. Ευχαριστώ επίσης θερμά την κ. Ελένη Σκαλτσά, καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας, που με τις πολύτιμες γνώσεις της βοήθησε καταλυτικά για την *in vitro* αξιολόγηση του εκχυλίσματος με τη διενέργεια HPLC και NMR. Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής αξιολόγησης κ. Δημήτρη Ρέκκα, κ. Χρήστο Ρέππα και κ. Αλεξάνδρα Τσαρούχα για την παρουσία τους και τις συμβουλές τους για τη βελτίωση της παρούσας εργασίας.

Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ για όλη τη βοήθεια και στήριξη για την εκπόνηση των πειραμάτων όλα αυτά τα χρόνια τη Μαριάννα Στασινοπούλου, βιολόγο, το Ζαχαρία Κακαζάνη, κτηνίατρο, το Βαγγέλη Μπαλάφα, τεχνολόγο Γεωπόνου στη μονάδα των πειραματοζώων και τον Πέτρο Μουστάρδα, βιολόγο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ουρανία Κωνσταντή και το Χρήστο Κενούτη για την πολύτιμη βοήθειά τους στο κομμάτι των μοριακών πειραμάτων, PCR καθώς και την υποψήφια διδάκτορα του τομέα Φαρμακογνωσίας Μαρία-Ελένη Γραφάκου για τη συμβολή της στην ταυτοποίηση με NMR.

Η παρούσα εργασία αποτέλεσε μέρος ενός ευρύτερου προγράμματος με τίτλο «*IN VITRO* ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ *IN VIVO* ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ-ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Crocus sativus* (οικ. Iridaceae): ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

PEROS ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ» που χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΠΑΒΕΤ σε συνεργασία με την εταιρεία INTERMED. Θα ήθελα λοιπόν, να ευχαριστήσω για την οικονομική υποστήριξη που μας παρασχέθηκε για την εκπόνησή της.

Επίσης, ευχαριστώ την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία (Ε.Φ.Ε.) και την εταιρεία UNIPHARMA για τη χορήγηση της Υποτροφίας «Κλέων Τσέτης» - Αριστεία στην Εφαρμοσμένη Φαρμακευτική Τεχνολογία και τη στήριξή τους στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Κλείνοντας, ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ σε όλη μου την οικογένεια για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια σε όλα τα επίπεδα έτσι ώστε να καταφέρω να φτάσω στο τέλος. Ας μου επιτρέψουν όμως να αφιερώσω την εργασία αυτή σε μια ζωή που ήρθε αργότερα αλλά έφερε τα πάνω κάτω στην κοσμοθεωρία μου, το γιο μου...

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

➤ Προσωπικά Στοιχεία

Όνοματεπώνυμο	Ειρήνη Χριστοδούλου
Διεύθυνση	Άγγελου Σικελιανού 30, Τ.Κ. 12462, Δάσος Χαϊδαρίου
Τηλέφωνα επικοινωνίας	2105823136, 6976332564
e-mail	e_christod@pharm.uoa.gr, rena_chr@hotmail.com
Ημερομηνία Γέννησης	28/09/1987

➤ Εκπαίδευση

2013-2018	Υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Φαρμακευτικής – Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας – Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής
2010-2012	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης – «Βιομηχανική Φαρμακευτική» Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α. – Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας – Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: <i>In vivo</i> μελέτη της φαρμακοκινητικής και υπολογισμός της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης μετά από <i>per os</i> και ενδοφλέβια χορήγηση σε μύες με τη μορφή συμπλόκου με υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη.
2010	Άδεια άσκησης του φαρμακευτικού επαγγέλματος
2005-2010	Πτυχίο Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Εκπόνηση πτυχιακής εργασίας στον Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας με τίτλο: Ανάπτυξη απλής <i>in vitro</i> συσκευής για τη μελέτη της διαπερατότητας με παθητική διάχυση.

➤ Δημοσιεύσεις – Συνέδρια

Christodoulou E, Kadoglou NPE, Stasinopoulou M, Konstandi OA, Kenoutis C, Kakazanis ZI, Rizakou A, Kostomitsopoulos N, Valsami G. *Crocus sativus* L. aqueous extract reduces atherogenesis, increases atherosclerotic plaque stability and improves glucose control in diabetic atherosclerotic animals. *Atherosclerosis*. 2017 Nov 1. pii: S0021-9150(17)31370-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.032

Efentakis P, Rizakou A, **Christodoulou E**, Chatzianastasiou A, López MG, León R,

Balafas E, Kadoglou NPE, Tseti I, Skaltsa H, Kostomitsopoulos N, Iliodromitis EK, Valsami G, Andreadou I. Saffron (*Crocus sativus*) intake provides nutritional preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury in Wild Type and ApoE(-/-) mice: Involvement of Nrf2 activation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017 Oct;27(10):919-929. doi: 10.1016/j.numecd.2017.08.005. Epub 2017 Aug 31.

Tsaroucha AK, Valsami G, Kostomitsopoulos N, Lambropoulou M, Anagnostopoulos C, **Christodoulou E**, Falidas E, Betsou A, Pitiakoudis M, Simopoulos CE. Silibinin Effect on Fas/FasL, HMGB1, and CD45 Expressions in a Rat Model Subjected to Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *J Invest Surg*. 2017 Sep 27:1-12.doi: 10.1080/08941939.2017.1360416.

Kyriakopoulos G, Tsaroucha AK, Valsami G, Lambropoulou M, Kostomitsopoulos N, **Christodoulou E**, Kakazanis Z, Anagnostopoulos C, Tsalikidis C, Simopoulos C. Silibinin Improves TNF- α and M30 Expression and Histological Parameters in Rat Kidneys After Hepatic Ischemia/Reperfusion. *J Invest Surg*. 2017 Apr 18:1-9. doi: 10.1080/08941939.2017.1308044.

Lioffi AS, Ntountaniotis D, Kellici TF, Chatziathanasiadou MV, Megariotis G, Mania M, Becker-Baldus J, Kriechbaum M, Krajnc A, **Christodoulou E**, Glaubitz C, Rappolt M, Amenitsch H, Mali G, Theodorou DN, Valsami G, Pitsikalis M, Iatrou H, Tzakos AG, Mavromoustakos T. Exploring the interactions of irbesartan and irbesartan-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex with model membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Jun;1859(6):1089-1098. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.03.003. Epub 2017 Mar 6.

Kellici TF, Chatziathanasiadou MV, Diamantis D, Chatzikonstantinou AV, Andreadelis I, **Christodoulou E**, Valsami G, Mavromoustakos T, Tzakos AG. Mapping the interactions and bioactivity of quercetin-(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin complex. *Int J Pharm*. 2016 Sep 10; 511(1):303-11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.07.008. Epub 2016 Jul 7.

Christodoulou E, Kechagia IA, Tzimas S, Balafas E, Kostomitsopoulos N, Archontaki H, Dokoumetzidis A, Valsami G. Serum and tissue pharmacokinetics of silibinin after per os and i.v. administration to mice as a HP- β -CD lyophilized product. *Int J Pharm*. 2015 Sep 30; 493(1-2):366-73. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.07.060.

Christodoulou E, Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Valsami G. Saffron: A

natural product with potential pharmaceutical applications. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Aug 14. doi: 10.1111/jphp.12456.

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Anti-atherosclerotic properties of saffron aqueous extract after peros administration to C57BL/6J ApoE^{-/-} knockout mice” 1st Hellenic Chinese Congress on Health- “From Hippocratic and Traditional Chinese Medicine towards Medical and Pharmaceutical Technologies” 12-14 Μαΐου 2017

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Serum and tissue pharmacokinetics of *Crocus sativus* L. aqueous extract after peros and intravenous administration to C57/Bl6 mice” 6^ο Συνέδριο Μετρολογίας 13-14 Μαΐου 2016

Προφορική ανακοίνωση στο 2^ο Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Φαρμακευτικής Ιατρικής (ΕΛΕΦΙ) , 18-19 Μαρτίου 2016: «Η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του Κρόκου Κοζάνης στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε μύες με ομόζυγη έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης Ε»

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): Poster “Pharmacokinetics of *Crocus sativus* L. aqueous extract after peros and intravenous administration to C57/Bl6 mice”. PAGE 2015

Προφορική ανακοίνωση στο 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης 4-6 Δεκεμβρίου 2014: «Η επίδραση του εκχυλίσματος του Κρόκου Κοζάνης στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε πειραματικό ζωικό πρότυπο»

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “The impact of saffron on the development of atherosclerosis in an experimental animal model”. JOINT HSBLAS Meeting, Σεπτέμβριος 2014

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): Poster “Pharmacokinetics of silibinin after peros and intravenous administration to mice, as a HP-β-CD lyophilized product”. PAGE 2014

Χριστοδούλου Ε, Καδόγλου Ν, Κωστομητσόπουλος Ν, Μουστάρδας Π, Μπαλάφας Ε, Κωστάκης Α, Βαλσαμή Γ, Λιάπης Χ. Η επίδραση του saffron στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε πειραματικό ζωικό πρότυπο. Ελληνικά

Διαβητολογικά Χρονικά 26, 4: 253-261, 2013.

Προφορική ανακοίνωση στο 27ο Ετήσιο Διαβητολογικό Συνέδριο «Η επίδραση του saffron στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε πειραματικό ζωικό πρότυπο»

– 1ο βραβείο, 2013

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Pharmacokinetics of silibinin in mice tissues after peros and intravenous administration of a HP-β-CD lyophilized product”. AAPS Annual Meeting 2013

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Pharmacokinetics of silibinin in mice tissues and serum after peros and intravenous administration of a HP-β-CD lyophilized product”. 5th BBBB International Conference, 2013

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Pharmacokinetics of silibinin after peros and intravenous administration to mice as a HP-β-CD lyophilized product”. AAPS Annual Meeting 2012

Προφορική ανακοίνωση στο 1ο Συνέδριο Φαρμακευτικών Επιστημών : “Pharmacokinetics of silibinin after peros and intravenous administration to mice as a HP-β-CD lyophilized product” – 1ο Βραβείο, 2012

Soulele K., Christodoulou Ei., Macheras P. “Medication for the treatment of lung cancer: Emphasis on aerosolized chemotherapy” Pneumon, 2012, 25(3): 291-297

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Development of a simple laboratory device for studying the membrane permeation by passive diffusion”. 15ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο, 2010

Αναρτημένη παρουσίαση (poster): “Development of a simple laboratory device for studying the membrane permeation by passive diffusion”. 1η Συνάντηση Φοιτητών Φαρμακευτικής, 2010

Πίνακας Συντομογραφιών

Ακρωνύμιο	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
ABC	Abidin-Biotin Complex	Σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης
ApoE	Apolipoprotein E	Απολιποπρωτεΐνη E
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPX	Di-n-butyl Phthalate	Δι-n-βουτυλο-φθαλάτης
ECM	ExtraCellular Matrix	Εξωκυττάριο Πλέγμα
H+E	Haematoxylin + Eosin stain	Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης
HDL	High Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
IDL	Intermediate Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Μέσης Πυκνότητας
IL-1, -2...	Interleukin-1, 2...	Ιντερλευκίνη-1, 2...
LDL	Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
LDLr	Low-Density Lipoprotein Receptor	Υποδοχέας LDL
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1	Χημειοτακτική Πρωτεΐνη Μονοκυττάρων-1
MMP-1, -2...	Matrix Metalloproteinase	Μεταλλοπρωτεϊνάση δικτύου
MMPI	Matrix Metalloproteinase Inhibitor	Αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνάσης δικτύου
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
ox-LDL	Oxidized Low Density Lipoprotein	Οξειδωμένη Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
PBS	Phosphate Buffer Saline	Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNase	Ribonuclease	Ριβονουκλεάση
SD	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Λαουρυλοθειικό (δωδεκυλοθειικό) νάτριο

Ακρωνύμιο	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
SMC	Smooth Muscle Cell	Λείο Μυϊκό Κύτταρο
TIMP-1, -2...	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases	Ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών
TNF-α	Tumor necrosis factor	Παράγοντας νέκρωσης όγκων
Tween20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate	
VLDL	Very Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell	Αγγειακό Λείο Μυϊκό Κύτταρο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή και σκοπός: Στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν 1) η παρασκευή, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ως προς τα κύρια δραστικά συστατικά στερεού υδατικού εκχυλίσματος των στιγμάτων του φυτού *Crocus sativus* (SFE), 2) η *in vitro* μελέτη της σταθερότητας ως προς την περιεκτικότητά του σε δραστικά συστατικά, 3) η *in vivo* μελέτη της φαρμακοκινητικής του κύριου αντιοξειδωτικού συστατικού του (κροκετίνη μετά από υδρόλυση της κροκίνης) και 4) η διερεύνηση της πιθανής αντιαθηρωματικής του δράσης σε εξειδικευμένο ζωικό πρότυπο (μύες με ομόζυγη έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E, ApoE^{-/-}) μετά από χορήγηση 3 διαφορετικών δόσεων (30 – 60 – 90 mg/kg σωματικού βάρους) και του πιθανού μηχανισμού δράσης.

Μέθοδοι: Για την παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L. αναμίχθηκαν με απιονισμένο νερό και το μίγμα φυλάχθηκε για 3 ημέρες στο ψυγείο για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση. Μετά το πέρας των 3 ημερών, το εκχύλισμα διηθήθηκε και ακολούθησε η λυοφιλοποίηση. Το λυόφιλο προϊόν αναλύθηκε ως προς τη χημική του σύσταση με εφαρμογή ημιπαρασκευαστικής HPLC και φασματοσκοπίας NMR, ποσοτικοποιήθηκε ως προς τα κύρια βιοδραστικά συστατικά (κροκίνη και σαφρανάλη) και μελετήθηκε για τη σταθερότητά του κατά τη φύλαξη ως προς την περιεκτικότητα σε κροκίνη (το κύριο δραστικό συστατικό). Στη συνέχεια, το εκχύλισμα χορηγήθηκε ενδοφλέβια και από του στόματος σε 80 wild type C57/Bl6J μύες σε δόση 60 mg/kg βάρους με σκοπό την εκτίμηση της φαρμακοκινητικής και της βιοδιαθεσιμότητας του κύριου βιοδραστικού μορίου της κροκετίνης (υδρολυμένη μορφή της κροκίνης που αποτελεί το βασικότερο συστατικό του εκχυλίσματος). Συνελέγησαν δείγματα αίματος και ιστών σε επιλεγμένα χρονικά σημεία μετά τη χορήγηση (5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 min). Για την ποσοτικοποίηση της κροκετίνης στα βιολογικά δείγματα (ορός και ιστοί) βελτιστοποιήθηκε μεθοδος HPLC-PDA. Στα δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου που προέκυψαν τόσο για τον ορό όσο και για τους ιστούς εφαρμόστηκε διαμερισματική και μη-διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση με σκοπό την εκτίμηση των ΦΚ παραμέτρων. Για τη διερεύνηση της πιθανής αντιαθηρωματικής/αθηροπροστατευτικής δράσης, χρησιμοποιήθηκαν 50 μύες με ομόζυγη έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE^{-/-}), που σιτίστηκαν για 12 εβδομάδες με διαβητογόνο-αθηρογόνο τροφή και τυχαιοποιήθηκαν σε 5 ισάριθμες ομάδες: 1) Την ομάδα baseline (BLG) που θανατώθηκε χωρίς παρέμβαση στις 12 εβδομάδες, 2) τις 3 ομάδες χορήγησης SFE (SF1, SF2, SF3) που έλαβαν εκχύλισμα κρόκου από το στόμα για 4 εβδομάδες καθημερινά σε δόση 30, 60 και 90 mg/kg αντίστοιχα και 3) την ομάδα ελέγχου (COG) που έλαβε απλό ενέσιμο ύδωρ από το στόμα για 4 εβδομάδες καθημερινά. Μετά τις αιμοληψίες και την ευθανασία των ζώων, παρασκευάστηκαν οι αορτές τους, αξιολογήθηκε η αορτική στένωση και οι αθηρωματικές αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν μελετήθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs), συνδετικό ιστό και ελαστίνη καθώς και για την έκφραση φλεγμονωδών

παραγόντων όπως ο TNF- α , ο MCP-1, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες-2, -3, -9 (MMP-2, MMP-3, MMP-9) και ο αναστολέας τους TIMP-2 και η IL-6, χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και RT-qPCR.

Αποτελέσματα: Το SFE που παρασκευάστηκε είναι πλούσιο σε κροκίνες και πικροκροκίνη ενώ είναι εμφανής η χαμηλή περιεκτικότητα σε σαφρανάλη λόγω του λιγώτερο πολικού της χαρακτήρα και της υψηλότερης διαλυτότητάς της σε οργανικά μέσα. Σε ό,τι αφορά στη σταθερότητά του, το λυόφιλο εκχύλισμα παραμένει σταθερό ως προς την περιεκτικότητά του σε κροκίνη όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 18 μήνες) ενώ το ανασυσταμένο διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί εντός 24 ωρών από την παρασκευή του.

Το μονοδιαμερισματικό φαρμακοκινητικό μοντέλο κατανομής βρέθηκε να περιγράφει ικανοποιητικά την κινητική του κύριου μεταβολίτη της κροκίνης την κροκετίνη, μετά από ενδοφλέβια και *peros* χορήγηση με πρωτοταξική κινητική απορρόφησης. Μετά από *peros* χορήγηση του SFE σε δόση 60mg/kg επιτυγχάνονται επίπεδα $C_{max} = 2.77 \mu\text{g/mL}$ (%CV 2.17) και $3.84 \mu\text{g/mL}$ (%CV 1.6) για την κροκετίνη και την ολική κροκετίνη (κροκετίνη + μεταβολίτης) αντίστοιχα, σε χρόνο 30 min μετά τη χορήγηση, γεγονός που δείχνει ότι η κροκίνη υδρολύεται σε κροκετίνη στον εντερικό σωλήνα και απορροφάται στη συνέχεια γρήγορα με χρόνο επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης τα 30 min. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στους ιστούς που μελετήθηκαν δείχνουν ότι η κροκετίνη φαίνεται να κατανέμεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς, που είναι τα βασικά όργανα για τη βιομετατροπή και απομάκρυνσής της. Δεν ανιχνεύθηκαν μετρήσιμες τιμές για τη συγκέντρωση της κροκετίνης τόσο στους πνεύμονες όσο και στην καρδιά πιθανώς λόγω της ταχείας γλυκουρονιδίωσης προς τον αντίστοιχο μεταβολίτη. Σχετικά με τον μεταβολίτη της κροκετίνης, οι μετρούμενες συγκεντρώσεις δείχνουν περιορισμένη κατανομή στους ιστούς που μελετήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα της ΦΚ μελέτης προέκυψε ότι η χορηγηθείσα δόση του εκχυλίσματος (60mg/kg) οδήγησε σε επίπεδα συγκεντρώσεων κροκετίνης στον ορό του αίματος ανάλογα με αυτά που υπολογίστηκαν σε υγιείς εθελοντές μετά από χορήγηση καθαρής κροκετίνης (7,5 έως και 22,5 mg (1), που ισοδυναμεί με 0.11-0.32 mg/kg) και μετά την από του στόματος χορήγηση είτε κροκετίνης (40 nmol ή 0.37 mg/kg) είτε κροκίνης (40 nmol ή 1.12 mg/kg) σε μύες (2), και επέτρεψε την ασφαλή επιλογή δόσεων στο εύρος 30-90 mg/kg/ημέρα που αντιστοιχούν σε 2.90-8.70 mg/kg καθαρής κροκετίνης ή 0.33-0.66 mg/kg κροκίνης για να γίνει αξιολόγηση της αντιαθηρωματικής και αντιφλεγμονώδους δράσης του εκχυλίσματος.

Η μελέτη της επίδρασης του SFE στην αθηρωμάτωση έδειξε ότι το εκχύλισμα δεν επηρέασε το σωματικό βάρος των ζώων και τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ($p > 0.05$). Η υψηλή δόση (90mg/kg βάρους) βελτίωσε σημαντικά το γλυκαιμικό προφίλ και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες χορήγησης ($p < 0.05$). Η μείωση της αορτικής στένωσης στις ομάδες των πειραματοζώων ακολούθησε δοσοεξαρτώμενη σχέση ($p < 0.05$). Ακόμη, η αύξηση της δόσης SFE μείωσε αναλογικά το περιεχόμενο των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε μακροφάγα και οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά συνδετικού ιστού,

ελαστίνης, κολλαγόνου και λείων μυϊκών κυττάρων οδηγώντας σε σταθερότερο φαινότυπο αθηρωμάτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (COG, $p < 0.05$). Η επίδραση αυτή επιβεβαιώνεται και από τη σημαντική μείωση (>30%) των επιπέδων IL-6, TNF- α , MCP-1, MMP-2,-3,-9 ($p < 0.05$) και της αναλογίας MMP-2/TIMP-2. Από την ανάλυση RT-qPCR, προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα που επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας. Πιο συγκεκριμένα, έδειξαν ότι η γονιδιακή έκφραση των αντιφλεγμονωδών παραγόντων IL-6, MCP-1 και TNF- α ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη για όλες τις ομάδες μυών που έλαβαν υδατικό εκχύλισμα κρόκου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$) και μάλιστα η μείωση της έκφρασης ήταν δοσοεξαρτώμενη. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τις μεταλλοπρωτεϊνάσες που μετρήθηκαν (MMP-2, MMP-9), ενώ ο αναστολέας τους TIMP-2 –όπως ήταν αναμενόμενο- παρουσίασε αυξημένη έκφραση στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία..

Συμπεράσματα: Το SFE είναι σταθερό λυόφιλο εκχύλισμα πλούσιο σε all *trans*-κροκίνη. Η φαρμακοκινητική μελέτη επέτρεψε να προσδιοριστούν οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι και η σχετική βιοδιαθεσιμότητα του κύριου βιοδραστικού συστατικού, κροκετίνη, μετά από *per os* χορήγηση, ενώ ταυτόχρονα έδωσε τη δυνατότητα σωστής επιλογής του εύρους των δόσεων που χορηγήθηκαν για να γίνει αξιολόγηση της αθηροπροστατευτικής και αντιαθηρωματικής δράσης του εκχυλίσματος. Το SFE επέδειξε δοσοεξαρτώμενη αντιαθηρωματική δράση (μείωση έκτασης και σταθεροποίηση αθηρωματικών πλακών) σε μύες με ομόζυγη έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE^{-/-}) πιθανότατα μέσω της επίδρασης/τροποποίησης των μηχανισμών φλεγμονής της αθηρωματικής νόσου.

ABSTRACT

Background and aims: The aims of the present study were: 1) the production, identification and quantification of a solid aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L., SFE), 2) the *in vitro* study of its stability and content in bioactive components, 3) the *in vivo* pharmacokinetic study of its main antioxidant component (crocetin after crocin hydrolysis) and 4) the investigation of its possible antiatherosclerotic properties in ApoE knockout mice (ApoE^{-/-}) after the administration of 3 different doses (30-60-90 mg/ kg body weight) and its possible mechanism of action.

Methods: The production of saffron aqueous extract was accomplished with the mixture of *Crocus sativus* L. stigmas with distilled water. The mixture was let in the refrigerator for 3 days till the extraction to be completed. The extract was then infiltrated and lyophilized. The lyophilized product was studied for its chemical composition with the help of semi-preparative HPLC analysis and NMR spectroscopy, and then quantified to identify its major components (crocin, safranal). The SFE was then studied for its stability concerning its major component, crocin. Intravenous and *peros* administration to 80 C57Bl/6J mice at a dose of 60 mg/kg body weight followed in order to assess the pharmacokinetic properties and bioavailability of the main bioactive component of SFE, crocetin (hydrolyzed form of crocin). Samples were collected at selected time points after administration (5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 min). The quantification of crocetin in biological samples (serum and tissues) was accomplished after the optimization of an HPLC-PDA analysis method. The data obtained (Concentration vs time) for both serum and tissue samples were subjected to both compartmental and non-compartmental PK analysis to estimate the pharmacokinetic parameters and characterize crocetin's PK profile.

Finally, for the estimation of SFE's possible antiatherosclerotic/atheroprotective effect fifty male, ApoE^{-/-} mice, fed high-fat diet (HFD) for 12 weeks, were randomized into 5 equally numbered groups: 1) Baseline group, euthanatized, without intervention on the 12th week, 2) three saffron groups (SF1, SF2, SF3) receiving HFD and 30-,60-,90mg/kg/day of SFE, respectively, for four weeks, *peros* through gavage, after reconstitution in water for injection (WFI), 3) control group (COG) receiving daily HFD and the same volume of WFI (four weeks). After blood sampling and euthanasia, aortic roots were excised and analyzed for the gene expression and/or percentage of aortic stenosis, relative content of macrophages, smooth muscle cells (SMCs), connective tissue, tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), matrix metalloproteinases-2,-3,-9 (MMP-2,-3,-9) and their inhibitor (TIMP-2) and IL-6, with the use of immunohistochemical and qRT-PCR techniques.

Results: The saffron extract (SFE) that was produced was found rich in crocins and picrocrocins, whereas safranal was found in very low concentrations due to its less polar character which requires organic solvents to be solubilized. As far as its stability is concerned, SFE remains stable (crocin concentration)

when kept in room temperature for a long period of time (at least 18 months), and the reconstituted solution can be re-used for the first 24 hours after reconstitution.

The one-compartment model was found to describe adequately the kinetics of SFE's main metabolite crocetin after intravenous and peros administration. After peros administration of SFE at a dose of 60 mg/kg body weight C_{max} was found to be 2.77 $\mu\text{g/mL}$ (%CV 2.17) and 3.84 (%CV1.6) for free and total crocetin respectively, which shows that crocin is hydrolyzed into crocetin in the intestinal lumen and then quickly absorbed ($T_{max}=30$ min). The measurement results of the studied tissue samples show that crocetin is mainly distributed in the liver and the kidneys, which are the basic organs of its biotransformation and elimination. No measurable crocetine concentrations could be obtained from both lungs and heart samples, most probably because of its fast glucuronidation into crocetin's metabolite. Concerning crocetin's metabolite, the measured concentration values reveal limited distribution to the studied tissues.

The results of the PK study lead to the conclusion that the administered SFE dose (60 mg/kg) was capable in achieving serum concentration levels proportional to those estimated in healthy volunteers after administration of pure crocetin (7.5 up to 22.5 mg which is equivalent to 0.11-0.32 mg/kg body weight) (1) or after administration of crocin in mice (40 nmol or 1.12 mg/kg body weight) (2). These facts suggested the use of the dosage scheme between 30 and 90 mg/kg body weight/day which correspond to 2.90-8.70 mg/kg of pure crocetin or 0.33-0.33 mg/kg of crocin for the conduction of the study for the effect of SFE in atheromatosis and inflammation generally.

The study of the effect of SFE in atheromatosis, revealed that the administration of the extract did not affect body weight and total cholesterol levels ($p>0.05$). High SFE dose significantly ameliorated glucose and triglycerides profiles compared to other groups ($p<0.05$). Following a dose-dependent-manner SFE considerably decreased aortic stenosis ($p<0.05$). Furthermore, increasing SFE doses proportionally reduced macrophages content and increased the content of collagen, elastin, SMCs, in plaques promoting more stable plaque phenotype compared to COG ($p<0.05$). Those effects seemed to be associated with considerable reduction (>30%) of IL-6, TNF- α , MCP-1, MMP-2,-3,-9 ($p<0.05$) and MMP-2/TIMP-2 ratio. RT-qPCR analysis reassured our previous results of immunohistochemistry.

Conclusions: SFE is a stable lyophilized extract rich in all *trans*-crocins. The PK study allowed the estimation of basic PK parameters and the bioavailability of SFE's main bioactive component, crocetin, after *peros* administration and helped in the selection of the right dosage range for the evaluation of SFE's atheroprotective and anti-atherosclerotic effect. SFE exerted dose dependent anti-atherosclerotic and plaque-stabilizing effects in Apo-E^{-/-} mice, probably mediated by favorable modification of inflammatory mechanisms.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. *Crocus sativus* L. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Iridaceae

A.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σαφράν είναι τα ξηρά στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L. της οικογένειας Iridaceae. Πρόκειται για ένα πολυετές φυτό που συναντάται κυρίως στην Ευρώπη και την Ασία, και καλλιεργείται ευρέως στο Ιράν, την Ινδία και σε πολλές Μεσογειακές χώρες, ανάμεσα στις οποίες και η Ελλάδα (περιοχή Κοζάνης) (3). Τα στίγματα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν για αιώνες στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, ενώ οι ιδιότητές τους βρίσκουν και πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία (ως βαφή, συντηρητικό ή αντιοξειδωτικό μέσο). Το σαφράν είναι το πιο ακριβό καρύκευμα στον κόσμο, γι' αυτό και έχει χαρακτηριστεί ως «Κόκκινος Χρυσός» στο Ιράν. Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή υπολογίζεται στους 205 τόνους, το 80% εκ των οποίων προέρχεται από το Ιράν (4). Σε ό,τι αφορά στην Ευρώπη, η Ισπανία είναι μια χώρα στην οποία το φυτό *Crocus sativus* L. καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό με βάση την ετήσια εξαγωγή. Η συλλογή των στημόνων του φυτού είναι η πιο δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία που καθιστά το σαφράν ιδιαίτερα ακριβό (5).

Στις μέρες μας, το σαφράν χρησιμοποιείται κυρίως για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και συναντάται ως συστατικό πολλών συμπληρωμάτων διατροφής. Η γεύση του είναι πικρή και στυφή και προσδίδει έντονο κίτρινο χρώμα στα τρόφιμα στα οποία προστίθεται, για το λόγο αυτό αποτελεί και βασικό καρύκευμα στην Ιρανική, Αραβική, Ινδική και Μαροκινή κουζίνα (6). Έχουν γίνει αρκετές δημοσιεύσεις σχετικές με τη βιολογική δράση του σαφράν και των επιμέρους συστατικών του φυτού, κυρίως σχετικές με πιθανή αντικαρκινική δράση (7; 8). Οι πιθανές δράσεις του σαφράν και των βιοδραστικών συστατικών του οδηγούν σε αυξημένο αριθμό μελετών, οι οποίες καταλήγουν τις περισσότερες φορές σε ιδιαίτερα χρήσιμα συμπεράσματα.

A.1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ

Με βάση την Αρχαία Ελληνική Μυθολογία, ο Κρόκος ήταν φίλος του θεού Ερμή. Μια μέρα, καθώς έπαιζαν, ο Ερμής σκότωσε κατά λάθος τον Κρόκο χτυπώντας τον στο κεφάλι. Τρεις σταγόνες από το αίμα του Κρόκου έπεσαν πάνω στο λουλούδι του φυτού που βρίσκονταν εκεί και δημιουργήθηκαν τα γνωστά στίγματά του. Από τότε, το φυτό ονομάστηκε Κρόκος (9).

Ο κρόκος ως χρωστική ουσία, φάρμακο, βότανο ή άρτυμα, ήταν γνωστός τόσο στην αρχαία Ελλάδα όσο και στους άλλους αρχαίους λαούς. Σχετικά όμως με την προέλευση και καλλιέργεια του φυτού, οι γνώμες όλων όσων έχουν ασχοληθεί κατ' οποιονδήποτε τρόπο μαζί του, διαφέρουν. Ορισμένοι υποστηρίζουν πως ο κρόκος είναι ιθαγενές φυτό της Ανατολής, όπου έγινε και η πρώτη καλλιέργειά του. Από εκεί μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τους σταυροφόρους κατά το 13ο μ.Χ. αιώνα. Υπάρχουν επίσης απόψεις πως κατάγεται από την Ελλάδα, στην οποία και πρωτοκαλλιεργήθηκε κατά την μεσομινωϊκή περίοδο. Την

άποψη αυτή ενισχύει μία τοιχογραφία εκείνης της εποχής (1600 π.Χ.) "Ο ΚΡΟΚΟΣΥΛΛΕΚΤΗΣ", που βρέθηκε στα ανάκτορα της Κνωσσού, παριστάνοντας νεαρό ή νεαρή, κατ' άλλους πίθηκο, που μαζεύει λουλούδια κρόκου σε κάνιστρο.



Εικόνα Α1: Τοιχογραφία από τα Μινωικά ανάκτορα της Κνωσσού – «Ο κροκοσυλλέκτης»

Λαμβάνοντας υπόψιν τη βιβλιογραφία που βρέθηκε και μελετήθηκε, υπάρχουν τρεις τυπικές χρήσεις του σαφράν. Στη Μεσοποταμία, χρησιμοποιούνταν κυρίως για θεραπευτικούς σκοπούς. Οι Φοίνικες το εκμεταλλεύτηκαν για τη χρωστική του και ως εμπορικό αγαθό στις συναλλαγές τους με τον Ασσύριο βασιλιά Ashur-nasir-pal. Τέλος, στην αρχαία Ρώμη, γίνονταν εισαγωγή του φυτού από την Κιλικία και έβρισκε εφαρμογές στη θεραπευτική και ως χρωστικό μέσο, καθώς και σε αρώματα και αλοιφές (8).

Υποστηρίζεται ότι με την καλλιέργεια του κρόκου καταγίνονταν οι Έλληνες τόσο κατά τους Μακεδονικούς, όσο και κατά τους Βυζαντινούς χρόνους. Με τις εκστρατείες μάλιστα του Μ.Αλεξάνδρου διαδόθηκε στην Ανατολή. Το θετικότερο που γνωρίζουμε, σχετικά με την ιστορία αυτού του φυτού, είναι ότι οι Άραβες αφού συστηματοποίησαν την καλλιέργειά του και χρησιμοποίησαν τη δρόγη του όχι μόνο σαν μπαχαρικό αλλά κυρίως σαν φάρμακο, την έφεραν στην Ισπανία κατά το 960 μ.Χ. Η σημερινή πάντως καλλιέργεια του κρόκου στην Ελλάδα (περιοχή Κοζάνης) έχει εισαχθεί από την Αυστρία κατά το 17ο αιώνα. Πιο συγκεκριμένα, τη μετέφεραν Κοζανίτες έμποροι, που εκείνη την εποχή διατηρούσαν στενές εμπορικές σχέσεις με την Αυστρία.

Γενικά, η ιστορία της χρήσης των φαρμάκων, και κυρίως των προερχόμενων από φυτά είναι παρόμοια. Οι φαρμακευτικές ουσίες χρησιμοποιούνταν για συγκεκριμένους θεραπευτικούς σκοπούς και, αργότερα, για τη θεραπεία πολλών τύπων ασθενειών, λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι ασθένειες παλαιότερα ήταν συγκεκριμένες και πολύ διαδεδομένες. Στην πραγματικότητα, η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων έναντι συγκεκριμένης νόσου κατέληγε να βρίσκει εφαρμογή για οποιαδήποτε αδιαθεσία και ασθένεια στην πρώιμη ιατρική πρακτική όπου ουσιαστικά όλα γίνονταν αντιληπτά σαν μαγεία ακολουθώντας συγκεκριμένο τελετουργικό. Αργότερα, πολλά φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν και ως συμπλήρωμα στην τροφή καθώς είχαν και την ιδιότητα του συντηρητικού και έτσι μπορούσε να αποφευχθεί η μετάδοση

ασθενειών. Ακόμη, πολλά φάρμακα βρήκαν εφαρμογή και στην καθημερινότητα ως χρωστική σε υφάσματα και ως καλλυντικά (8).

Οι θεραπευτικές ιδιότητες που αποδίδονται στο σαφράν κατά τους αρχαίους χρόνους καταγράφονται στο βιβλίο του Πεδάνιου Διοσκουρίδη «Περί ύλης ιατρικής» κατά τον 1^ο μ.Χ. αιώνα. Το Μεσαίωνα και κατά τους χρόνους που ακολούθησαν, το εμπόριο του σαφράν άρχισε να υπόκειται σε αυστηρή νομοθεσία τόσο εξαιτίας της σπανιότητας του φυτού όσο και της δυσκολίας στην καλλιέργεια και τη συλλογή του. Μάλιστα, αποτέλεσε την αιτία του «Πολέμου του Κρόκου» το 1374. Κατά τη συγκεκριμένη περίοδο, η Βασιλεία της Ελβετίας ήταν το κέντρο εμπορίου του σαφράν, το οποίο προερχόταν κυρίως από την Ιταλία. Το άνθος του κρόκου έγινε μάλιστα και το σύμβολο του στρατού της Βασιλείας.

Ο Dezanì, στην πραγματεία του για τη φαρμακογνωσία (6; 10), εξηγεί ότι στη Νυρεμβέργη, μεταξύ 1449 και 1495, τρία άτομα καταδικάστηκαν στην πυρά για το έγκλημα της νοθείας του φυτού.

Στο έργο *Dizionario di Commercio* (Λεξικό του εμπορίου), που γράφτηκε από τους αδερφούς Savary, αναφέρεται ότι, «το σαφράν είναι ένα καρύκευμα που χρησιμοποιείται στη μαγειρική και ταυτόχρονα από τους ζωγράφους σε μινιατούρες και άλλα έργα τέχνης λόγω του ιδιαίτερου χρώματος που προσδίδει στις βαφές. Παράλληλα, οι γιατροί το χρησιμοποιούν με πολύ καλά αποτελέσματα στη θεραπεία πολλών ασθενειών». Παρόλα αυτά, το 1895 στη Γένοβα, στην έκδοση *Dizionario di Mercologia* (Λεξικό του εμπορίου) του Villavecchia αναφέρεται πλέον ότι «το σαφράν χρησιμοποιείται για να βάφει κίτρινα τα τρόφιμα. Κάποτε έβρισκε εφαρμογή και στην ιατρική, πλέον όμως χρησιμοποιείται μόνο για την παρασκευή λαυδάνου στη φαρμακευτική» (11). Το σαφράν έχει επίσης βρει εφαρμογή και στην αρωματοποιία (12).

Παρόλα αυτά, η σύγχρονη ιατρική ανακάλυψε εκ νέου το σαφράν και τις πιθανές θεραπευτικές του δράσεις και φαρμακευτικές εφαρμογές. Με βάση και τα παρακάτω νέα δεδομένα μελετών, το σαφράν φαίνεται να επιδεικνύει αντικαρκινική (καταστολή ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων) και αντιοξειδωτική δράση. Οι δράσεις αυτές μπορούν να εξηγήσουν και τα αποτελέσματα μελετών που καταλήγουν σε ωφέλη του φυτού έναντι της κατάθλιψης, της νόσου Alzheimer και του προεμμηνορρυσιακού συνδρόμου (13; 14; 15).



A.1.3. ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

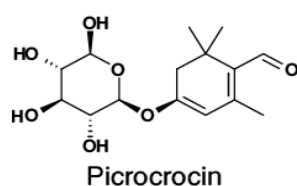
Η βασική σύσταση του φυτού είναι 14–16% νερό, 11–13% αζωτούχες ενώσεις, 12–15% σάκχαρα, 41–44% υδατοδιαλυτά στοιχεία, 0.6–0.9% πτητικά έλαια, 4–5% φυτικές ίνες, and 4–6% ολική τέφρα. Το σαφράν περιέχει επίσης δύο σημαντικές βιταμίνες: τη ριβοφλαβίνη και τη θειαμίνη ενώ σε μικρότερες ποσότητες

περιέχει και β-καροτένιο. Η περιεκτικότητα σε ριβοφλαβίνη ποικίλλει από 56 έως 138 μg/g, και είναι η υψηλότερη περιεκτικότητα που συναντάται σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Τα επίπεδα συγκέντρωσης θειαμίνης στο φυτό βρίσκονται μέσα στο εύρος 0.7 - 4 μg/g, που αποτελούν και το μέσο όρο για όλα τα φυτά και λαχανικά (16). Επίπροσθετα, το εκχύλισμα του βολβού του φυτού με πετρελαϊκό αιθέρα είναι πλούσιο σε απαραίτητα λιπαρά όξέα όπως το λινολεϊκό και λινολενικό οξύ. Επίσης, ανιχνεύονται στερόλες (καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και β-σιτοστεράλη) καθώς και ουρσολικό, ολεανολικό, παλμιτικό, παλμιτολεϊκό και ολεϊκό οξύ (17). Για την απομόνωση βιταμινών και απαραίτητων λιπαρών οξέων απαιτείται μεγάλη ποσότητα του φυτού και συνεπώς το σαφράν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τέτοιο σκοπό.

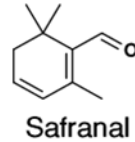
Για την εξήγηση των χημικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων του φυτού είναι απαραίτητη η χρήση των δεδομένων που προκύπτουν από τη χημική ανάλυση των κόκκινων στιγμάτων των ανθέων του *Crocus sativus*. Με βάση αυτά τα στοιχεία το φυτό περιέχει τρεις βασικούς μεταβολίτες:

- A. Πικροκροκίνες: Τα κυριότερα συστατικά που είναι υπεύθυνα για την πικρή γεύση του σαφράν
- B. Σαφρανάλη: Το πτητικό έλαιο που προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα στο σαφράν (18; 19; 20)
- Γ. Κροκίνες: Οι χρωστικές ουσίες του σαφράν (πρόκειται για υδατοδιαλυτά καροτενοειδή)

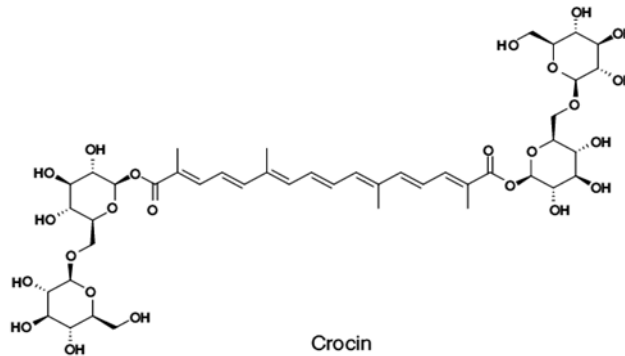
Η **πικροκροκίνη** (C₆H₂₆O₇) είναι μια ουσία με πικρή γεύση που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Kajsar (1884). Συναντάται στα στίγματα του φυτού σε ποσοστό περίπου 4%. Πρόκειται για έναν γλυκοσίδη ο οποίος διασπάται σε ένα μόριο γλυκόζης και σε ένα άγλυκο που ονομάζεται 4-υδροξυ-β-κυκλοσιτράλη. Το άγλυκο μέρος χάνει ένα μόριο νερού και μετατρέπεται εύκολα στο πτητικό μόριο σαφρανάλη ή δεϋδρο-β-κυκλοσιτράλη. Αυτό φαίνεται άλλωστε και από τη χημική δομή του μορίου (21):



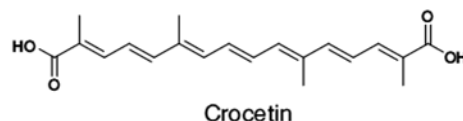
Η **σαφρανάλη**, που αποτελεί το 70% του πτητικού κλάσματος (22), προσδίδει το χαρακτηριστικό άρωμα στο σαφράν. Τα φρέσκα στίγματα δεν αναδύουν μυρωδιά, αλλά το άρωμα αρχίζει να γίνεται αντιληπτό κατά την ξήρανση και αποθήκευση των στιγμάτων του φυτού, όταν πλέον αρχίζει η διάσπαση της πικροκροκίνης. Η σαφρανάλη είναι μια κυκλική τερπενική αλδεΐδη (2,6,6-τριμεθυλο-1,3-κυκλοεξαδιεν-1-καρβοξυ-αλδεΐδη) με χημικό τύπο C₁₀H₁₄O. Το όνομά της δώθηκε από τους Kuhn και Winterstein (23), οι οποίοι απομόνωσαν πρώτοι την ουσία από την υδρόλυση της πικροκροκίνης.



Η **κροκίνη**, είναι το πιο βασικό καροτενοειδές που προσδίδει στο σαφράν το χαρακτηριστικό του χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, είναι ο εστέρας της κροκετίνης ($C_{20}H_{24}O_4$), με έναν β-γλυκοσιδικό δεσμό ο οποίος διασπάται από την εμουλσίση (β-γλυκοσιδάση) (24; 25).



Η **κροκετίνη** ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των φυσικών βαφών, τα καροτενοειδή, αν και δε διαθέτει τη δράση προβιταμίνης. Η πλειοψηφία των μορίων που εντάσσονται σε αυτήν την κατηγορία είναι υδατάνθρακες με το γενικό χημικό τύπο $C_{40}H_{56}$, ή οξυγονωμένα προϊόντα αυτών. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια μικρή ομάδα καροτενοειδών που έχουν καρβοξυλικές και όξινες ομάδες και η οποία δεν μπορεί να ενταχθεί στη γενική χημική δομή. Η κροκετίνη (το άγλυκο μέρος της κροκίνης είναι το 8,8-διαπο-8,8-καροτενοϊκό οξύ και ανήκει στη μικρή αυτή ομάδα καροτενοειδών που αναφέρθηκε παραπάνω. Χαρακτηρίζεται από τη διτερπενική συμμετρική δομή που περιλαμβάνει 7 διπλούς δεσμούς και 4 μεθυλο-ομάδες. Ο αρχικός χημικός τύπος είναι $C_{20}H_{24}O_4$ με μοριακό βάρος 328,4. Έχει την ιδιότητα να κρυσταλλώνεται σε ερυθρές βελόνες και το σημείο τήξης είναι οι 285 °C. Όταν βρίσκεται υπό μορφήν διαλύματος έχει χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Είναι ελάχιστα διαλυτή σε βασικό υδατικό διάλυμα (20 μ M σε pH 8) και πολύ διαλυτή σε οργανικές βάσεις, όπως η πυριδίνη. Εάν το διάλυμα της ουσίας γίνει υπέρκορο, τότε σχηματίζεται κίτρινο ίζημα. Η κροκετίνη είναι κυρίως γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (εξαιτίας της χημικής της δομής), και είναι ένα μόριο για το οποίο γίνονται εκτενείς μελέτες.



A.1.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ

Ο κρόκος είναι εύκολο να καλλιεργηθεί. Ήπιο κλίμα, βροχοπτώσεις και καλοδουλεμένο έδαφος είναι επαρκείς παράγοντες. Ένα ράντισμα με τρίμματα οστών στο χώμα στο οποίο θα φυτευτεί προσδίδει στο έδαφος την επαρκή ποσότητα φωσφόρου για την ανάπτυξη του φυτού.

Η αναπαραγωγή γίνεται με την φυσική ανάπτυξη του υπόγειου τμήματος αναπαραγωγής, ιδιότητα που την έχουν λίγα μόνο φυτά. Η φυτεία αναπτύσσεται αργά, συνήθως κατά τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο. Οι βολβοί φυτεύονται σε απόσταση 10-15 εκατοστά μεταξύ τους και 20-25 εκατοστά βάθους. Για τη φυτεία ενός στρέμματος χρειάζονται 250-350 κιλά βολβοί.

Συγκεκριμένα στην Ελλάδα, το επίπεδο, ανοιχτό, χαμηλό τοπίο από την πόλη της Κοζάνης μέχρι τη λίμνη Πολυφύτου προσφέρει ιδανικές συνθήκες για την καλλιέργεια του κρόκου. Κάθε 6-9 χρόνια τα υπόγεια τμήματα αναπαραγωγής απομακρύνονται, καθαρίζονται και χωρίζονται και επαναφυτεύονται σε ένα άλλο μέρος επιτρέποντας έτσι στο προηγούμενο να επανακτήσει όλες τις ουσίες που έχει χάσει λόγω της καλλιέργειας του κρόκου.

Κάθε φθινόπωρο, όταν ανθίζει ο κρόκος, οι ξηραμένες ωχρές εκτάσεις μεταβάλλονται σε μία θάλασσα από χρώματα, τα οποία ποικίλουν από πορτοκαλί σε βιολετί. Τα λουλούδια που αρχίζουν να βγαίνουν κατά τα μέσα Οκτώβρη μαζεύονται προσεκτικά και μεταφέρονται στα σπίτια με κοφίνια. Η κοπιαστική αυτή εργασία, που χρειάζεται και σχετική δεξιοτεχνία, συνεχίζεται από την ανατολή μέχρι και τη δύση του ηλίου και διαρκεί 20-25 ημέρες (Εικόνα Α1).

Ο κρόκος είναι έτοιμος για συγκομιδή μόλις το λουλούδι ανοίξει τελείως. Νωρίς το πρωί ή αργά το απόγευμα είναι η καλύτερη ώρα για συγκομιδή, διότι τα φυτικά έλαια βρίσκονται στην υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση.

Τα άνθη τοποθετούνται λίγα - λίγα πάνω σε ειδικό τραπέζι όπου με τη δημιουργία αέρα από ηλεκτροκίνητους ανεμιστήρες διαχωρίζονται τα πέταλα από τους στήμονες και τα στίγματα. Ακολουθεί το στέγνωμα της σοδειάς. Η ξήρανση των στιγμάτων είναι η πιο βασική και λεπτή εργασία και απαιτεί πείρα, μεγάλη προσοχή και τέχνη. Αν ο κρόκος ξεραθεί κανονικά, διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες (χρώμα-άρωμα). Η ξήρανση γίνεται με την τοποθέτηση σε λεπτά στρώματα των νωπών στιγμάτων, πάνω σε τελάρα με δικτυωτή συρμάτινη ή μεταξωτή βάση. Τα τελάρα μεταφέρονται σε θερμαινόμενα, σκοτεινά δωμάτια, που θερμαίνονται με θερμάστρες πετρελαίου, ξύλου ή κάρβουνου. Εκεί με προοδευτικά ανερχόμενη θερμοκρασία μέχρι 40°C, ο κρόκος στεγνώνει σε 8-12 ώρες. Την επόμενη μέρα συσκευάζεται μέσα σε τενεκέδες ή πλαστικές σακούλες. Τις μέρες που ακολουθούν διαχωρίζονται με υπομονή και προσοχή οι στήμονες από τα στίγματα και απομακρύνονται οι ξένες ύλες. Όταν ολοκληρωθεί και αυτή η εργασία, που διαρκεί από έναν έως τρεις μήνες, το προϊόν είναι πλέον έτοιμο να

παραδοθεί στο συνεταιρισμό. Χρειάζονται 50.000 περίπου στίγματα για να προκύψουν 100 γραμμ. κόκκινου κρόκου.

Το φύτεμα, το σκάλισμα, η συγκομιδή, η διαλογή και η αποξήρανση, όλα γίνονται με το χέρι. Ο κρόκος είναι η σημαντικότερη καλλιέργεια στο Ν.Κοζάνης. Ενα στρέμμα θα επιφέρει περίπου κατά μέσο όρο 800 g σαφράν το έτος. Κάθε χρόνο παράγονται στην περιοχή 6-8 τόνοι σαφράν που στη συνέχεια μέσα από τον συνεταιρισμό φεύγουν, κυρίως, για τις αγορές του εξωτερικού. Η ποιότητα του κρόκου εξαρτάται κατά μεγάλο βαθμό από το μέρος που καλλιεργείται, αλλά κύρια από τον τρόπο επεξεργασίας που γίνεται από τον παραγωγό. Υπάρχει μεγάλη διαφορά στην ποιότητα. Εάν είναι καφέ το προϊόν, είναι ως επί το πλείστον παλιό, άσχημα συσκευασμένο ή ακόμη και νοθευμένο. Το χρώμα του είναι διακριτικό, βαθύ σκούρο κόκκινο με μυρωδιά χαρακτηριστική έως έντονη. Το γνήσιο σαφράν πωλείται μέσα σε τενεκεδένια δοχεία και φιαλίδια και συνήθως αποθηκεύεται σε σκοτεινά σημεία. Η ίδρυση του Αναγκαστικού Συνεταιρισμού Κροκοπαραγωγών Κοζάνης το 1971 αναμφισβήτητα υπήρξε σταθμός για την παραπέρα εξέλιξη και ανάπτυξη της κροκοφυτείας. Σε σύντομο χρονικό διάστημα η καλλιέργεια του κρόκου εξελίχθηκε σε δυναμική καλλιέργεια και σήμερα καλύπτει περισσότερα από 10.000 στρέμματα.



Εικόνα Α2: Η διαδικασία συλλογής του κρόκου

A.1.5. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΣΑΦΡΑΝ

Το σαφράν και τα βασικά συστατικά του είναι γνωστά για έναν αρκετά μεγάλο αριθμό πιθανών δράσεων και εφαρμογών. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των ενώσεων του φυτού, όπως η σαφρανάλη, η κροκίνη και η κροκετίνη, οφείλονται στη χημική τους δομή και οι πιο σημαντικές από αυτές καταγράφηκαν σε μελέτες και πειράματα που έγιναν *in vitro* στα Chemical Abstracts μεταξύ 1925 και 1999. Το σαφράν έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την όρεξη και να προλαμβάνει τη γαστρεντερική ατονία (26). Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι δρα θεραπευτικά στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Εστιάζοντας στα βασικά του συστατικά, η σαφρανάλη είναι χρήσιμη στη θεραπεία παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος, ιδίως της χρόνιας βρογχίτιδας. Λόγω της εκτεταμένης κατανομής της στους πνεύμονες, η σαφρανάλη καταπραΰνει το βήχα δρώντας ως αναισθητικό του πνευμονογαστρικού νεύρου (8). Η κροκίνη είναι αποτελεσματική έναντι της δυσμηνόρροιας καθώς περιορίζει σημαντικά της συσπάσεις της μήτρας. Η πικροκροκίνη έχει καταπραΰντική δράση στους σπασμούς και τους πόνους της μέσης (27). Παρόλα αυτά, οι πιο αξιοσημείωτες δράσεις του σαφράν έχουν αποδοθεί στην κροκετίνη διότι πρόκειται για μια ουσία με δυνατότητα να αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς του οξυγόνου προς τους ιστούς τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η δυνατότητα αυτή της μεταφοράς οξυγόνου και συνεπώς η αντιοξειδωτική δράση καθιστά την κροκετίνη ένα μόριο υποψήφιο για την αντιμετώπιση πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, η αρθρίτιδα, ο καρκίνος κ.α. (28).

A.1.5.1. Η δράση του σαφράν στο ΚΝΣ

Το σαφράν και ιδίως η σαφρανάλη είναι γνωστά για τις αντικαταθλιπτικές τους ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί ότι το φυτό είναι αποτελεσματικό και ασφαλές για τη χρήση έναντι της κατάθλιψης συγκρίνοντάς το μάλιστα με πολλές συνθετικές ουσίες, όπως η φλουοξετίνη και η μιπραμίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια δράση με τις συνθετικές ουσίες στην ήπια ή μέτρια κατάθλιψη και επιληψία (αντισπασμωδική δράση) χωρίς τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων (29; 30; 13; 31; 14). Ορισμένα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού *Crocus sativus* L. και ορισμένα διαλύματα σαφρανάλης έχουν καταγραφεί ως κατασταλτικά του λεγόμενου συνδρόμου αφαίρεσης (withdrawal syndrome) σε μύες (32). Επιπρόσθετα, τα στίγματα του φυτού επιδρούν αγχολυτικά και υπνωτικά σε μύες. Έχει αποδειχθεί για τη σαφρανάλη ότι προσδένεται σε ορισμένα μόρια βενζοδιαζεπινών (BZ1, BZ2, BZ3) και βελτιώνει τα φαινόμενα αϋπνίας. Παρόλα αυτά, η σαφρανάλη δε φαίνεται να δρά μυοχαλαρωτικά σε μύες (33).

Σε ό,τι αφορά στις γνωσιακές και μαθησιακές ικανότητες μετά από χρόνια εγκεφαλική υποαιμάτωση, η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου ή διαλύματος κροκίνης βελτίωσε σημαντικά τη μνήμη σε αρουραίους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (34). Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί από την ερευνητική ομάδα του Abe οι οποίες έδειξαν ότι η κροκίνη και η κροκετίνη επιδρούν ευεργετικά σε πολλές νευρογενετικές διαταραχές (35; 36; 37) και σε παθήσεις που σχετίζονται με τη μνήμη.

Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα κρόκου και τα συστατικά του έχουν δοκιμαστεί έναντι των νόσων Alzheimer και Parkinson. Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από την αποδόμηση των αμυλοειδών β-πεπτιδίων των ινιδίων (Αβ). Η οξειδωση αποδείχθηκε ότι επάγει τόσο το σχηματισμό όσο και την αποδόμηση των Αβ ινιδίων. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος των σιγμάτων του φυτού *C. sativus* και η επίδραση στην αναγέννηση των Αβ1-ινιδίων εκτιμήθηκαν σε μια διπλά τυφλή μελέτη με placebo σε ασθενείς με Alzheimer (38). Η μελέτη έδειξε σημαντική βελτίωση της μνήμης και της εγκεφαλικής λειτουργίας σε ήπια και μέτρια νόσο Alzheimer μετά τη χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου για 4 μήνες σε σχέση με την ομάδα placebo. Σε ό,τι αφορά στους υποκείμενους μηχανισμούς, η παθολογική ανάλυση ανθρώπινων εγκεφάλων έδειξε ότι η κροκετίνη επάγει αναστολή της αποδόμησης των Αβ αμυλοειδών πλακών (39). Συγκεκριμένα, το κύριο καρροτενοειδές που περιέχεται στο φυτό, η *trans*-κροκίνη-4 (εστέρας της κροκετίνης) ανέστειλε τη δημιουργία Αβ αμυλοειδών πλακών σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη χορήγηση διμεθυλο-κροκετίνης, αποδεικνύοντας ότι η δράση των καρροτενοειδών ενισχύεται παρουσία σακχάρων. Σε ό,τι αφορά στη νόσο του Parkinson, η νευρορυθμιστική δράση της κροκετίνης σε μοντέλο αρουραίου για τη νόσο (πρόκληση με 6-υδροξυ-ντοπαμίνη) διερευνήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Ahmad (40). Οι ιστοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν σημαντική βελτίωση στην αναγέννηση των νευρώνων στις υπό θεραπεία ομάδες ζώων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αποδείχθηκε τόσο προληπτική όσο και θεραπευτική δράση έναντι της νόσου του Parkinson.

A.1.5.2. Η επίδραση του σαφράν στα επίπεδα γλυκόζης και στο διαβήτη

Ο διαβήτης είναι μια πολύπλοκη μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία η οποία σταδιακά οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικού στρες που μπορεί να παίξει ρόλο-κλειδί στη δημιουργία διαβήτη (41; 42). Η κροκίνη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Ένας από τους μηχανισμούς δράσης που έχουν προταθεί για το γεγονός αυτό είναι η διέγερση της λειτουργίας των νησιδίων του Langerhans καθώς και η ευαισθητοποίηση των περιφερικών μυών απέναντι στην ινσουλίνη. Το πιο σημαντικό είναι ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κροκίνης φαίνεται (43) να βοηθούν τα β-παγκρεατικά κύτταρα να αυξήσουν την έκκριση ινσουλίνης οδηγώντας σε μείωση των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (44) (45). Παρόλα αυτά, δεν έχει γίνει ακόμη αποκλειστική *in vivo* μελέτη για την αντιδιαβητική δράση της κροκίνης. Επίσης, απαιτείται κλινική μελέτη για τη διερεύνηση πιθανής υπογλυκαιμικής δράσης του εκχυλίσματος του σαφράν με ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ως προς το κάθε συστατικό και τη συμβολή αυτού στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης.

A.1.5.3. Η αντιοξειδωτική δράση του σαφράν

Η πλειοψηφία των μελετών έχουν δείξει ότι ο κρόκος διαθέτει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφείλεται κυρίως στην παρουσία καρροτενοειδών. Η αντιοξειδωτική δράση αυτών των καρροτενοειδών

είναι μεγαλύτερη από αυτήν της σαφρανάλης, ενώ η κροκίνη θεωρείται το πιο σημαντικό μόριο για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Παρόλα αυτά, ουσιαστικά η συνέργεια μεταξύ όλων των συστατικών του σαφράν είναι αυτή που προσδίδει εν τέλει τη σημαντική αντιοξειδωτική του ικανότητα. Οι ουσίες που περιέχονται στον κρόκο μπορούν να προστατεύσουν τόσο το DNA όσο και το tRNA από μη αναστρέψιμες χημικές μεταλλάξεις μέσω της δημιουργίας πολυνουκλεοτιδικών συμπλόκων (46; 47) τα οποία μετρώνται φασματοσκοπικά για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των επιμέρους συστατικών του κρόκου. Γενικά, ο κρόκος και τα συστατικά του μπορούν να προσδένονται σε πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (DNA, tRNA) (48; 49) και λιπίδια (λινολεϊκό οξύ) (50) προστατεύοντάς τα έτσι από τις ελεύθερες ρίζες (51). Αν μάλιστα αναλογιστεί κανείς τον πολυπαραγοντικό ρόλο που παίζει το οξειδωτικό στρες στη δημιουργία πολλών παρακείμενων νόσων, μπορεί να συμπεράνει τις πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές του σαφράν.

A.1.5.4. Η επίδραση στην αθηρωμάτωση, τα λιπίδια του πλάσματος και την ισχαιμία του μυοκαρδίου

Η προσκόλληση και μετανάστευση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ένα από τα αρχικά στάδια στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης. Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advance glycation end products - AGEs) οδηγούν στην ενίσχυση αυτής της μετανάστευσης πιθανώς μέσω της έκφρασης του πρωτεϊνικού μορίου διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (intercellular adhesion molecule-1 - ICAM-1). Η κροκετίνη (ο βασικός μεταβολίτης της κροκίνης) βρέθηκε ότι αναστέλει την καταστολή των βόειων ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τα AGEs και μειώνει σημαντικά το ρυθμό προσκόλλησης λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα παράλληλα με τον περιορισμό της έκφρασης της πρωτεΐνης ICAM-1 (52). Επιπρόσθετα, η κροκίνη έχει δείξει προστατευτική δράση επί των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει την ικανότητα να μειώνει την εναπόθεση εστέρων της χοληστερόλης στα μακροφάγα κύτταρα και να περιορίζει σημαντικά την οξείδωση της LDL (Ox-LDL). Ως αποτέλεσμα, η κροκίνη μπορεί να επιβραδύνει το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων που αποτελούν το πρωταρχικό δομικό στοιχείο για την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Η κροκίνη επέδειξε πιθανή αντιαθηρωματική δράση σε ορτύκια μέσω της μείωσης των επιπέδων της Ox-LDL (53). Ακόμη ένας πιθανός μηχανισμός της αθηροπροστατευτικής δράσης της κροκίνης και της κροκετίνης είναι η ικανότητά τους να αυξάνουν τη ροή του οξυγόνου στο πλάσμα. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα μεγάλης κλινικής σημασίας καθώς θα μπορούσε να περιορίσει την καταστροφή των αρτηριών και την είσοδο χοληστερόλης σε αυτές (6; 54).

Η σαφρανάλη αντίστοιχα έχει δείξει σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες ως προς την αντιμετώπιση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Με βάση αρκετές *in vivo* μελέτες, η σαφρανάλη μπορεί να περιορίσει την έκταση του εμφράγματος, να βελτιώσει την κυκλοφορία του αίματος και το αιμοδυναμικό status του μυοκαρδίου. Αποδείχθηκε ότι μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση, η σαφρανάλη αυξάνει τη φωσφορυλίωση της βιοχημικής οδού Akt/GSK-3b/eNOS και μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης IKK-b/NFκB (55; 56; 57).

A.1.5.5. Χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση του σαφράν

Ο καρκίνος εξακολουθεί να αποτελεί τη δεύτερη κυριότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, υπολογίζοντας ότι περίπου 6 εκατομμύρια θάνατοι οφείλονται σε αυτή τη νόσο ετησίως (58). Μια εξαιρετικά φιλόδοξη στρατηγική για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η χημειοπροστασία, η χρήση δηλαδή συνθετικών ή φυσικών προϊόντων (μόνα ή σε συνδυασμό) με σκοπό την πρόληψη εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο. Η χημική σύσταση του σαφράν έχει προσελκύσει μια μεγάλη μερίδα ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες, κυρίως λόγω των 3 βασικών συστατικών του (κροκίνες, πικροκροκίνη, σαφρανάλη). Με βάση ένα μεγάλο αριθμό μελετών, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι το σαφράν και τα συστατικά του διαθέτουν αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (59; 60; 61; 62). Το εκχύλισμα του κρόκου, είτε χρησιμοποιούμενο τοπικά, είτε *per os*, είτε ενδοφλέβια, έχει δώσει εξαιρετικά αποτελέσματα έναντι νεοπλασιών του δέρματος (καθυστέρηση στην εξέλιξη ή ακόμα και αναστολή). Επιπρόσθετα, η χρήση κροκετίνης στον καρκίνο του πνεύμονα βρέθηκε ότι μειώνει τη λιπιδική υπεροξειδωση και τα ένζυμα που μεταβολίζουν τη γλουταθειόνη ενώ αναστρέφει τις ιστοπαθολογικές αλλαγές που συμβάλλουν στην ανάπτυξη όγκων (63; 64).

Το εκχύλισμα του κρόκου έχει αποδειχθεί ικανό να αναστέλλει ή και να καθυστερεί την ανάπτυξη όγκων σε πολλά πειραματικά μοντέλα. Για παράδειγμα, το υδατικό εκχύλισμα αναστέλλει την εξέλιξη του καρκίνου στο ΓΕΣ σε αρουραίους και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενη σχέση. Το εκχύλισμα φαίνεται ότι επάγει το μηχανισμό της κυτταρικής απόπτωσης σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του εντέρου, του παγκρέατος και της ουροδόχου κύστης. Η αντικαρκινική δράση μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Έχει προταθεί ότι το σαφράν και τα συστατικά του αναστέλλουν τη σύνθεση κυτταρικού DNA και RNA, όχι όμως και την πρωτεϊνική σύνθεση (65; 59). Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός δράσης είναι η ανασταλτική επίδραση επί της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, καθώς τα καρτενοειδή στην πλειοψηφία τους είναι λιποδιαλυτά και μπορούν να λειτουργήσουν ως μόρια δεσμευτικά για τις ελεύθερες ρίζες (αντιοξειδωτικές ιδιότητες) (66; 67). Ένα τρίτος μηχανισμός δράσης που έχει προταθεί είναι η μεταβολική μετατροπή των καρτενοειδών σε ρετινοειδή, αν και πρόσφατα καταγράφηκε ότι η μετατροπή τους σε βιταμίνη Α δεν είναι απαραίτητη για την αντικαρκινική δράση (68). Τέλος, έχει επίσης προταθεί ότι η κυτταροτοξική δράση του σαφράν μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των καρτενοειδών με την τοποϊσομεράση II, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη δημιουργία κυτταρικού DNA και πρωτεϊνών (67).

A.1.5.6. Άλλες πιθανές δράσεις

Το σαφράν και τα δραστικά συστατικά του έχουν επίσης αναφερθεί και για επιπλέον δράσεις πέραν των παραπάνω. Καταρχήν, έχουν γίνει μελέτες που δείχνουν την επίδραση του εκχυλίσματος του φυτού σε εγκαύματα δευτέρου βαθμού σε πειραματικό ζωικό πρότυπο (69). Η σύγκριση των ιστολογικών στοιχείων απέδειξε ότι το σαφράν αύξησε σημαντικά την αναγέννηση του ιστού στα σημεία των εγκαυμάτων. Αν και

ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, πιθανολογείται ότι οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος συνέβαλαν σε αυτό το αποτέλεσμα. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα του σαφράν έναντι αυτοάνοσων νοσημάτων δείχνει να είναι σημαντική καθώς δρα ανασταλτικά επί των ισταμινικών H1 υποδοχέων (70) (69). Τα συμπτώματα του άσθματος επίσης περιορίστηκαν λόγω της χαλάρωσης των λείων μυών της τραχείας και της βρογχοδιασταλτικής δράσης του εκχυλίσματος (70).

Ακόμη, το σαφράν έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία σεξουαλικών δυσλειτουργιών (κυρίως όταν αυτές οφείλονται σε κατάθλιψη) τόσο σε άνδρες όσο και γυναίκες καθώς και για την αντιμετώπιση στυτικών προβλημάτων καθώς έχει ευεργετική αφροδισιακή δράση που έχει αποδειχθεί τόσο σε μελέτες σε ζώα όσο και σε μελέτες στον άνθρωπο (71). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι άνδρες και γυναίκες που βρίσκονται σε θεραπεία με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRIs) είχαν ευεργετικά αποτελέσματα στη σεξουαλική τους δραστηριότητα με ταυτόχρονη λήψη εκχυλίσματος κρόκου (72).

Η σαφρανάλη έχει μελετηθεί για την επίδρασή της επί της επαγόμενης με 6-χλωρο-βουταδιένιο νεφροτοξικότητας σε αρουραίους. Αποδείχθηκε ότι δρα προστατευτικά σε συγκεκριμένες δόσεις ανά βάρος του ζώου. Οι δείκτες που αξιολογήθηκαν για να μελετηθεί η βελτίωση ή μη ήταν η συγκέντρωση της ουρίας στο πλάσμα, η κρεατινίνη και η γλυκόζη σε συνδυασμό με ιστολογική ανάλυση των νεφρών (73). Τέλος, τόσο η κροκίνη όσο και η σαφρανάλη χορηγήθηκαν σε μύες με στρεσογόνο ανορεξία, αποδεικνύοντας ότι το υδατικό εκχύλισμα το οποίο είναι πλουσιότερο σε κροκίνη περιορίζει την ανορεξία (74).

A.1.5.7. Τοξικότητα

Η χρήση του κρόκου θεωρείται ασφαλής ακόμα και σε μεγάλες δόσεις. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο ότι τα καρτενοειδή που περιέχει (ειδικά η κροκίνη), η σαφρανάλη καθώς και τα περισσότερα συστατικά του είναι υδατοδιαλυτά.

Σύμφωνα με την Ινδική λαϊκή θεραπευτική η τοξική δόση του κρόκου αντιστοιχεί περίπου σε 9 g. Αναφέρεται επίσης ότι μακροχρόνια χρήση μπορεί να είναι βλαπτική για το νευρικό σύστημα και τη λειτουργία της μνήμης. Άλλες πηγές αναφέρουν ότι ο κρόκος μπορεί να είναι τοξικός σε δόσεις πάνω από 5 g κι ότι η θανατηφόρος δόση ανέρχεται περίπου στα 20 g. Η ημερήσια δόση 1,5 g θεωρείται ασφαλής. Υπάρχουν ακόμα αναφορές ότι ο κρόκος έχει χρησιμοποιηθεί σε δόσεις μεγαλύτερες των 10g για την πρόκληση αποβολών, και για το λόγο αυτό η χρήση του φυτού από εγκύους θα έπρεπε να αποφεύγεται.

Σε μία σύγχρονη έρευνα παρατηρήθηκε εμφάνιση αλλεργικής αντίδρασης μετά από per os λήψη κρόκου, ωστόσο η πρόκληση αντιδράσεων υπερευαισθησίας από τα συστατικά του φυτού θεωρείται πολύ σπάνια. Γενικά, όλες οι σύγχρονες έρευνες και μελέτες υποστηρίζουν ότι ο κρόκος είναι μη-τοξικός ή ότι η τοξικότητά του είναι πάρα πολύ χαμηλή. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα, όπου ο

κρόκος χορηγήθηκε ως αφέψημα η μέση θανατηφόρος δόση (LD50) ήταν 20,7 g/kg.

Επιπλέον έχουν γίνει μελέτες για την πιθανή επίδραση του κρόκου και των συστατικών του στην ηπατική λειτουργία από τις οποίες προέκυψε ότι η κροκίνη σε φυσιολογικές δόσεις ακόμα και μετά από χρόνια χρήση δεν την επηρεάζει. Ηπατικές βλάβες παρατηρήθηκαν μόνο μετά από την λήψη μεγάλων δόσεων (100mg/kg) για δύο εβδομάδες ενώ η χρήση κροκίνης 1% στην διατροφή αρουραίων για 4 μήνες οδήγησε σε κάποιες ήπιες ηπατικές δυσλειτουργίες οι οποίες όμως ήταν πλήρως αναστρέψιμες. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι ούτε ο κρόκος ούτε οι δραστικοί μεταβολίτες του έχουν μεταλλαξογόνο δράση.

Τέλος, έχουν γίνει κάποιες μελέτες πάνω στην τοξικότητα και των υπολοίπων τμημάτων του φυτού και φαίνεται ότι η γύρη και οι στήμονες του κρόκου μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις σε ορισμένα άτομα που ασχολούνται με την καλλιέργεια και την συγκομιδή του (3).

A.1.5.8. Φαρμακοκινητική - Μεταβολισμός

Παρόλο που οι βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες του κρόκου έχουν μελετηθεί εκτενώς και πολυάριθμες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω σ'αυτές, τα δεδομένα που διαθέτουμε για την φαρμακοκινητική των βιοδραστικών συστατικών του φυτού είναι περιορισμένα.

Σε μία από τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, 8 ώρες μετά από per os χορήγηση κροκίνης και κροκετίνης δεν ανιχνεύτηκε καθόλου κροκίνη στο πλάσμα των ζώων, ενώ βρέθηκε κροκετίνη τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και συζευγμένη με γλυκουρονίδια. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κροκίνη δεν απορροφήθηκε από το έντερο και μόνο ο μεταβολίτης της, η κροκετίνη διαπέρασε τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου κι απορροφήθηκε. Επίσης το γεγονός ότι δεν υπήρχε κροκίνη στο πλάσμα την στιγμή που βρέθηκε κροκετίνη κατέδειξε ότι οι per os λαμβανόμενες κροκίνες υδρολύονται σε κροκετίνη πριν ή κατά την διέλευση από το έντερο (2).

Σε μία άλλη έρευνα (75) μετά από εφάπαξ χορήγηση κροκίνης σε αρουραίους βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος της λαμβανόμενης ποσότητας ανιχνεύτηκε στα κόπρανα και στα εντερικά περιεχόμενα εντός 24 ωρών, ενώ στο αίμα ανιχνεύτηκε μόνο κροκετίνη σε μικρές συγκεντρώσεις. Στο ίδιο χρονικό διάστημα δεν ανιχνεύτηκε κροκίνη στα ούρα. Επίσης η ουσία ήταν ανθεκτική στα γαστρικά υγρά για περίπου 4 ώρες. Στην ίδια μελέτη τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και μετά από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις (75). Ταυτόχρονα, η in situ μελέτη των χαρακτηριστικών απορρόφησης της κροκίνης έδειξε ότι η συγκέντρωση της κροκίνης μειωνόταν κατά μήκος των διαφόρων τμημάτων του εντέρου, με τις μεγαλύτερες απώλειες να σημειώνονται στο παχύ έντερο. Από τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε ότι η από του στόματος λαμβανόμενη κροκίνη δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα, η κροκίνη μετά από per os χορήγηση αποβάλλεται σε μεγάλο βαθμό μέσω του εντερικού σωλήνα, η κροκετίνη δεν έχει την τάση να συσσωρεύεται στον οργανισμό μετά από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις per os και ο εντερικός σωλήνας αποτελεί το κύριο σημείο υδρόλυσης της κροκίνης.

Κατά τη διάρκεια μεταγενέστερης μελέτης σε ανθρώπους, χορηγήθηκε εφάπαξ κροκετίνη σε δέκα υγιείς ενήλικους εθελοντές (πέντε άντρες-πέντε γυναίκες), ελήφθησαν δείγματα αίματος 1, 2, 4, 6, 8, 10 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση και μετρήθηκαν τα επίπεδα της ουσίας σε αυτά (1). Τα αποτελέσματα απ' αυτήν την μελέτη ενισχύουν την άποψη ότι η κροκετίνη - σε αντίθεση με τα περισσότερα καροτενοειδή - απορροφάται ταχύτητα, καθώς ανιχνεύθηκε στο αίμα ήδη από την πρώτη ώρα μετά την χορήγηση, με την μέγιστη συγκέντρωση C_{max} να επιτυγχάνεται μετά από 4 ώρες. Οι μέσες τιμές του C_{max} και $AUC_{(0-24h)}$ κυμάνθηκαν από 100.9-279.9 ng/mL και 556.5-1720.8 ng*h/mL αντίστοιχα. Οι μέσες τιμές του C_{max} και $AUC_{(0-24h)}$ αυξάνονταν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο χρόνος ημιζωής βρέθηκε 6.1-7.5 ώρες με τα επίπεδα κροκίνης να μειώνονται σταδιακά στο όριο ανίχνευσης μέσα σε 24h. Η κροκετίνη είναι πιο υδρόφιλη και μικρότερη από άλλα καροτενοειδή όπως το λυκοπένιο, η λουτεΐνη και το β-καροτένιο. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη και αποτελέσματα μελετών σε ζώα προτάθηκε ότι η ταχεία απορρόφηση της κροκετίνης οφείλεται σε απευθείας μεταφορά της από την πυλαία φλέβα στην γενική κυκλοφορία. Επίσης έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση της κροκετίνης με την ανθρώπινη αλβουμίνη και φαίνεται ότι η κροκετίνη συνδέεται σε μικρό μόνο βαθμό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (1).

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη κατά την οποία έγινε προσομοίωση των γαστρεντερικών συνθηκών *in vitro*, παρατηρήθηκαν απώλειες των αρχικών κροκινών λόγω της μετατροπής τους σε κροκετίνη και πιθανώς και σε άλλους άγνωστους μεταβολίτες. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαίωσαν ότι η κροκίνη δεν είναι βιοδιαθέσιμη όταν λαμβάνεται από του στόματος ωστόσο ένα ποσοστό αυτής υδρολύεται προς *trans* κροκετίνη, η οποία απορροφάται με παθητική διάχυση κατά μήκος του εντερικού φραγμού, σε μεγάλη έκταση και σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η εντερική απογλυκοζυλίωση των κροκινών οφείλεται κυρίως σε ενζυμικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου ενώ σε πολύ μικρότερο ποσοστό στην δραστηριότητα των μικροβίων του παχέως εντέρου. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι τα βακτήρια των κοπράνων διασπούν τον σκελετό των καροτενοειδών προς μικρότερες μονάδες αλκυλίων οι οποίες δεν παρουσιάζουν την κλασική απορρόφηση των κροκινών στο UV. Τέλος, θεωρείται ότι η κροκετίνη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και εισέρχεται στο ΚΝΣ με σχετικά αργό ρυθμό (76).

Τα παραπάνω αφορούν κυρίως την απορρόφηση της κροκίνης και της κροκετίνης και αναμφίβολα απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την κατανόηση της κατανομής και της απομάκρυνσης των ουσιών αυτών από το ανθρώπινο σώμα και για να διαλευκανθεί εάν και με ποιόν τρόπο μπορεί η κροκετίνη να φτάσει σε θεραπευτικά επίπεδα καθώς και αν υπάρχει κάποιος άλλος άγνωστος ενεργός μεταβολίτης.

A.2. ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

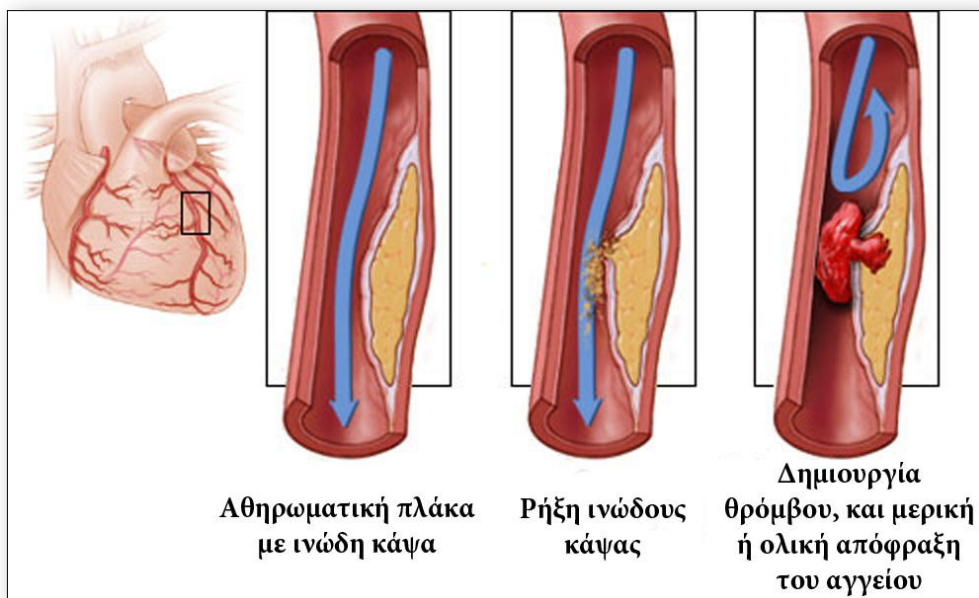
Η αθηρωμάτωση είναι μια εκφυλιστική πάθηση του αρτηριακού τοιχώματος που εκδηλώνεται τόσο σε μεσαίου μεγέθους όσο και σε μεγάλα αγγεία (κεντρικές αγωγές αρτηρίες). Η πάθηση αυτή δρα ως υπόστρωμα για την εκδήλωση του συνόλου των καρδιαγγειακών νοσημάτων, δηλαδή της στεφανιαίας νόσου, της περιφερικής αρτηριακής νόσου και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Αν και έχει επικρατήσει η άποψη ότι η αθηρωμάτωση είναι μια σύγχρονη νόσος, λόγω του σημερινού επιβαρυντικού τρόπου ζωής, είναι γνωστό πως υπάρχει ως ανθρώπινη ασθένεια εδώ και πάνω από 3500 χρόνια, αφού έχει εντοπιστεί σε Αιγυπτιακές μούμιες παρουσιάζοντας τα ίδια παθολογικά χαρακτηριστικά με τα σημερινά (77). Τα νοσήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω και αποτελούν άμεσες συνέπειες της αθηρωμάτωσης, εξακολουθούν να αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας (78; 79) ανδρών και γυναικών ιδίως στον αναπτυσσόμενο δυτικό κόσμο (80), παρά το γεγονός ότι τα τελευταία 25 χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική πρόοδος στη διάγνωση και θεραπεία τους με αποτέλεσμα την πώση της θνητότητας κατά 24,7% (81). Με βάση τους σημερινούς ρυθμούς πληθυσμιακής αύξησης, το μέλλον φαντάζει ακόμη πιο δυσοίωνο, καθώς υπολογίζεται ότι από το 2020 τα καρδιαγγειακά νοσήματα θα αποτελούν την κύρια αιτία θνητότητας παγκοσμίως (82). Στην Ευρώπη η καρδιαγγειακή νόσος καταγράφεται ως η κύρια αιτία για τους μισούς σχεδόν (48%) θανάτους ετησίως, οι οποίοι οφείλονται είτε σε στεφανιαία νόσο, είτε σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Γενικά, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης πάνω 2 εκατομμύρια θάνατοι οφείλονται ετησίως σε καρδιαγγειακά συμβάματα (83). Η οικονομική επίπτωση της διάγνωσης και θεραπείας της καρδιαγγειακής νόσου είναι αρκετά υψηλή, καθώς το κόστος ανέρχεται τουλάχιστον στα 169 δισεκατομμύρια ευρώ, μόνο για τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (84).

Η αθηρωμάτωση εκδηλώνεται με την ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα Α2). Στα αρχικά στάδια, η βλάβη αφορά στο ενδοθήλιο των στεφανιαίων αρτηριών, ακολουθούμενη από εναπόθεση οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), με τη μορφή λιποειδών γραμμώσεων. Ενεργοποιημένα μονοκύτταρα εισέρχονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή, όπου μετατρέπονται σε μακροφάγα, και κατόπιν σε αφρώδη κύτταρα. Ακολουθεί πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών ινών του μέσου χιτώνα, και παραγωγή εξωκυττάρου συνδετικού ιστού, μέσω αυξητικών παραγόντων. Η σχηματιζόμενη αθηρωματική πλάκα αποτελείται από έναν κεντρικό λιπώδη πυρήνα, αποτελούμενο κυρίως από εστεροποιημένη χοληστερόλη σε μορφή κρυστάλλων, ο οποίος περιβάλλεται από ινώδη κάψα (85).

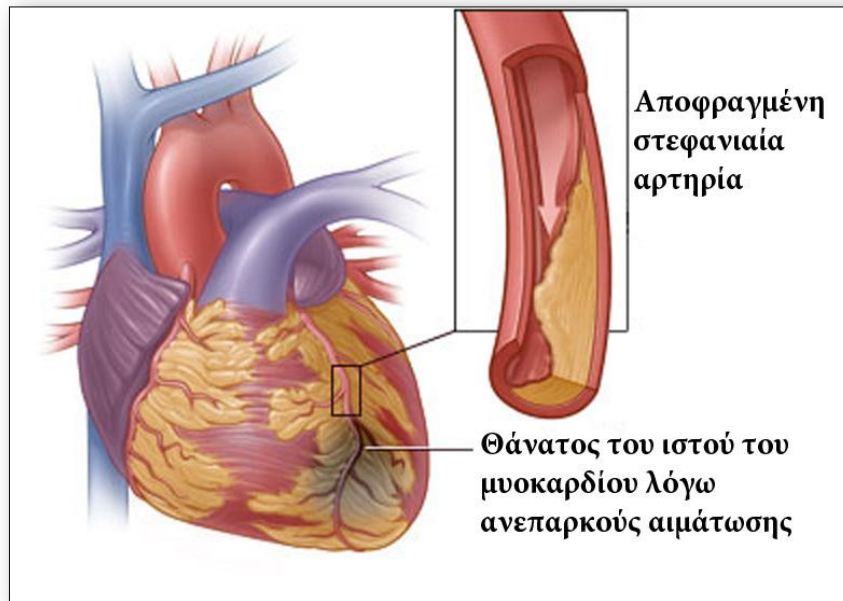
Η δημιουργία και η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας είναι μια μακροχρόνια διαδικασία που ξεκινά από τα παιδικά χρόνια και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής του ανθρώπου (86). Στα πρώιμα στάδιά της η αλλοίωση δεν είναι εμφανής ανατομικά και χαρακτηρίζεται από τη διήθηση μακροφάγων κυττάρων και τη σποραδική παρουσία αφρωδών κυττάρων. Η λιπώδης γράμμωση είναι η πρώτη ανατομικά εμφανής αλλοίωση, κατά την οποία τα μακροφάγα συγκεντρώνουν LDL χοληστερόλη με

ενδοκύττωση, η οποία οξειδώνεται μερικώς με αποτέλεσμα την έναρξη τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης (87). Η λιπώδης γράμμωση ακολουθείται από την επονομαζόμενη “ενδιάμεση αλλοίωση”, κατά την οποία παρατηρούνται συγκεντρώσεις LDL χοληστερόλης και εξωκυτταρικά. Το επόμενο στάδιο εξέλιξης είναι η εμφάνιση ενός εξωκυτταρίου λιπιδικού πυρήνα, οπότε και σχηματίζεται πλέον η αθηρωματική πλάκα. Στα πιο όψιμα στάδια εξέλιξής της η πλάκα διακόπτει τη συνέχεια της έσω στοιβάδας και διαχωρίζεται από τον αυλό του αγγείου μέσω μιας ινώδους κάψας, η οποία όταν είναι λεπτή χαρακτηρίζει την πλάκα ως ασταθή (88).

Η αθηρωμάτωση φαίνεται να αποτελεί το παθολογικό υπόστρωμα και τη βάση εκδήλωσης όλων των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Στις περιπτώσεις των οξέων καρδιαγγειακών συμβαμάτων η ανάπτυξη θρόμβου πάνω από μια υποκείμενη αθηρωματική πλάκα αποτελεί την κύρια αιτία των κλινικών εκδηλώσεων της αγγειακής νόσου. Η θρόμβωση των στεφανιαίων αγγείων είναι υπεύθυνη ως επί το πλείστον για την εμφάνιση ασταθούς στηθάγχης, εμφράγματος του μυοκαρδίου και αιφνίδιου θανάτου από ισχαιμικό επεισόδιο του μυοκαρδίου (89) (Εικόνα A4). Η ρήξη της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στην έκθεση θρομβογόνων παραγόντων, όπως του ιστικού παράγοντα, που εντοπίζονται στην αθηρωματική πλάκα σε πηκτικούς παράγοντες του αίματος. Από την επαφή και αλληλεπίδραση αυτή ξεκινούν αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό πλούσιων σε αιμοπετάλια θρόμβων, οι οποίοι φράσσουν μερικώς ή πλήρως τον αρτηριακό αυλό (Εικόνα A3) (90; 91).



Εικόνα A3: Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. © Healthwise, Incorporated



Εικόνα A4: Ισχαιμικό επεισόδιο μυοκαρδίου. © Healthwise, Incorporated

Επιπλέον, η ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να οδηγήσει τις στοιβάδες του τοιχώματος του αγγείου να υποστούν αναδιοργάνωση (remodeling), προκειμένου να αντισταθμίσουν την στένωση του αυλού. Σε σπάνιες περιπτώσεις, το χρόνιο και επαναλαμβανόμενο remodeling επιφέρει την ανάπτυξη μεγάλων κοιλοτήτων, των ανευρυσμάτων, η ενδεχόμενη ρήξη των οποίων, μετά από μηχανικό stress ή αυξημένη αρτηριακή πίεση, οδηγεί σε αιμορραγία και οξεία συμβάματα. Η αθηρωμάτωση αποτελεί την κυρίαρχη αιτία ανάπτυξης ανευρύσματος στην κατιούσα θωρακική αορτή, ενώ πολύ σπανιότερα, μπορεί να είναι η αιτία ανευρύσματος στην ανιούσα θωρακική αορτή (92).

A.2.1. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

Η διαρκής εξέλιξη της αθηρωμάτωσης περιγράφεται συνήθως με δύο τρόπους: είτε ως μια αλληλουχία ιστολογικών διεργασιών και μεταβολών είτε ως μια σειρά από διακριτά στάδια ορατών αλλοιώσεων του ιστού. Αν και διαφορετικοί, δρουν συμπληρωματικά και βελτιώνουν την κατανόηση της φύσης της νόσου (Εικόνα A5).

Στα πρώτα στάδια της εξέλιξής της, η αθηρωματική αλλοίωση εμφανίζει μακροσκοπικά φυσιολογική εικόνα. Η αρχική αλλοίωση ξεκινά από τη διήθηση σωματιδίων LDL στην έσω στοιβάδα του αγγείου, όπου και συσσωρεύονται, αν τα επίπεδα της LDL στο αίμα είναι αυξημένα. Έπειτα, οξειδώνονται από ελεύθερες ρίζες και ένζυμα και γίνονται κυτταροτοξικά (φλεγμονώδεις παράγοντες), προκαλώντας την αντίδραση του φυσικού ανοσοποιητικού συστήματος, με τα μονοκύτταρα να μετατρέπονται σε μακροφάγα που φαγοκυτταρώνουν τα LDL σωματίδια. Τα μακροφάγα, δεν έχουν τη δυνατότητα να αποδομήσουν τα LDL

σωματίδια και να τα εστεροποιήσουν για αποθήκευση, όπως συμβαίνει για τα μη οξειδωμένα λίπη, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους και τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (93).

ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ												
Κατάταξη κατά American Heart Association	I		II		III	IV	V			VI		
			IIa	IIb			Va	Vb	Vc	VIa	VIb	VIc
Συμπτωματολογία Στεφανιαίας Νόσου	Ασυμπτωματική						Συνήθως ασυμπτωματική. Μπορεί να σχετίζεται με σταθερή στηθάγχη.	Συνήθως σταθερή στηθάγχη. Αλλώς, ασυμπτωματική.	Όξο στεφανιαίο σύνδρομο ή ασυμπτωματική εξέλιξη της βλάβης.			
Νωρίτερη εμφάνιση	Πρώτη δεκαετία			Τρίτη δεκαετία			Τέταρτη δεκαετία					
Όνομασία	Αρχική Αλλοίωση		Λιπώδης Γράμμωση		Ενδιάμεση Αλλοίωση - Προαθήρωμα		Αθήρωμα - Αθηρωματική πλάκα		Ινολιπώδης πλάκα		Επιπλεγμένη Αλλοίωση	
Ιστολογική εμφάνιση	Initial lesion		Fatty streak		Intermediate lesion		Atheroma		Fibroatheroma		Complicated lesion	
Μηχανισμός εξέλιξης	Εξέλιξη κυρίως μέσω προσθήκης λιπών.							Αύξηση λείων μυικών κυττάρων και κολλαγόνου.		Ρήξη κάψα, θρόμβωση ή/και αιμάτωμα.		

Εικόνα A5: Η εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας (Μουστάρδας Π., 2013)

Η συσσώρευση αφρωδών κυττάρων ουσιαστικά αποδεικνύει και ιστολογικά την ύπαρξη φλεγμονής, που μακροσκοπικά εμφανίζεται ως μια κιτρινόχρωμη πάχυνση του ενδοθηλίου που χαρακτηρίζεται ως λιπώδης γράμμωση. Η μακροσκοπική ανίχνευση της λιπώδους γράμμωσης αν και συνήθως χρησιμοποιείται ως ένδειξη διαχωρισμού μεταξύ των δύο αρχικών σταδίων εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου (τύποι I και II – Εικόνα A5), δεν αποτελεί απόλυτο κριτήριο, καθώς είναι κριτήριο ικανό αλλά όχι αναγκαίο. Ενώ όλες οι λιπώδεις γραμμώσεις αποτελούν αλλοιώσεις τύπου II, υπάρχουν αλλοιώσεις τύπου II που δεν εμφανίζουν λιπώδη γράμμωση.

Ο διαχωρισμός είναι όμως εμφανής και διακριτός μικροσκοπικά. Οι αλλοιώσεις τύπου II αποτελούνται κυρίως από μακροφάγα αφρώδη κύτταρα σε στοιβάδες, και όχι ως μεμονωμένες συσσωματώσεις λίγων κυττάρων. Επίσης, τα λεία μυϊκά κύτταρα περιέχουν και αυτά σταγονίδια λιπιδίων. Οι αλλοιώσεις τύπου II

περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό μακροφάγων χωρίς λιπίδια, και επίσης υπάρχει παρουσία T-λεμφοκυττάρων. Ακόμη, υπάρχει αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων σε σχέση με τη φυσιολογική ιστολογική εικόνα της έσω στοιβάδας ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων στις αλλοιώσεις τύπου II ανιχνεύεται ενδοκυττάρια (93). Οι αλλοιώσεις αυτές του ενδοθηλίου δημιουργούνται νωρίς στη ζωή του ανθρώπου, από την πρώτη κιάλας δεκαετία της ζωής. Οι αρτηρίες των παιδιών και των εφήβων εμφανίζουν κατά κανόνα ορατές αλλοιώσεις μόνο τύπου II και όχι μεγαλύτερες. Οι περαιτέρω αλλοιώσεις αρχίζουν κι εμφανίζονται από την τρίτη δεκαετία.

Η περαιτέρω εξέλιξη μιας αλλοίωσης τύπου II, αποτελεί συνήθως συνάρτηση των μηχανικών πιέσεων που ασκούνται στο σημείο της αλλοίωσης. Οι θέσεις στις οποίες εντοπίζονται οι αλλοιώσεις τύπου II είναι σχετικά σταθερές και προβλέψιμες (94). Από το σύνολο των αλλοιώσεων αυτών, που εμφανίζονται σε άτομα με φυσιολογικά επίπεδα λιποπρωτεϊνών, μία μικρή υποομάδα είναι αυτή που θα εξελιχθεί σε αλλοίωση τύπου III και μετέπειτα σε αθήρωμα. Οι αλλοιώσεις της υποομάδας αυτής, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία με προβλέψιμη πάχυνση του ενδοθηλίου, ονομάζονται εξελίξιμες και κατατάσσονται στην υποκατηγορία IIa. Οι υπόλοιπες αλλοιώσεις τύπου II, που αποτελούν το μεγαλύτερο υποσύνολο και εντοπίζονται σε λεπτό ενδοθήλιο με λίγα λεία μυϊκά κύτταρα ονομάζονται σταθερές (τύπου IIb). Αυτές είτε δεν εξελίσσονται περαιτέρω, ή αν εξελίσσονται αυτό γίνεται με πολύ αργούς ρυθμούς, ή μόνο σε άτομα με μεγάλες συγκεντρώσεις αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα (93).

Η κατάταξη των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε τύπου III (ενδιάμεσες αλλοιώσεις, προαθήρωμα) εφαρμόζεται για τις αλλοιώσεις εκείνες που αποτελούν το μεταβατικό στάδιο μεταξύ των τύπου II και των αθηρωμάτων (τύπου IV). Τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά είναι τα εξωκυττάρια σταγονίδια λιπιδίων, σε βαθμό τέτοιο που λίμνες του υλικού αυτού σχηματίζονται ανάμεσα στις στοιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων που βρίσκονται σε περιοχές προσαρμοστικής πάχυνσης του ενδοθηλίου (Εικόνα A5). Τα σταγονίδια λιπιδίων αυτά, μπορεί να περιβάλλονται από μεμβράνη ή όχι. Οι λιπιδικές λίμνες βρίσκονται κάτω από τις στοιβάδες των μακροφάγων και των αφρωδών κυττάρων, και αντικαθιστούν τις πρωτεογλυκάνες και τα ινίδια του μεσοκυττάρου χώρου, διαχωρίζοντας τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταξύ τους. Το λιπιδικό περιεχόμενο των αλλοιώσεων τύπου III διαφέρει από του τύπου II, καθώς τα πρώτα περιέχουν περισσότερη ελεύθερη χοληστερόλη, λιπαρά οξέα, σφιγγομυελίνη, λυσολεκτίνη και τριγλυκερίδια. Μέχρι και το στάδιο αυτό της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας, οι αλλοιώσεις είναι αναστρέψιμες. Μεμονωμένα αφρώδη κύτταρα, και μεμονωμένες λίμνες εξωκυττάρων λιπιδίων δεν αναγνωρίζονται ως αθηροσκλήρωση. Η νόσος της αθηροσκλήρωσης θεωρείται ότι ξεκινά όταν η συσσώρευση λιπιδίων εμφανίζεται ως συμβάλλουσες λίμνες λιπιδίων και εξωκυττάρια λιπιδικοί πυρήνες με μειωμένο κυτταρικό περιεχόμενο.

Με τη συνεχόμενη συσσώρευση λιπιδίων από το πλάσμα, η αύξηση σε μέγεθος και ποσότητα των λιπιδικών λιμνών και η συσσωμάτωσή τους σε ένα ενιαίο, μεγάλο και καλά καθορισμένο όγκο εντός του ενδοθηλίου, σχηματίζει έναν λιπιδικό πυρήνα. Η ύπαρξη του λιπιδικού πυρήνα είναι το κύριο

χαρακτηριστικό της αλλοίωσης που σε αυτό το στάδιο ονομάζεται αθηρωματική πλάκα, ή αθήρωμα. Η αλλοίωση αυτή, που κατατάσσεται ως τύπου IV, είναι η πρώτη από τις φάσεις της αθηρωματικής νόσου που θεωρείται εξελιγμένη, εξαιτίας της έντονης αποδιοργάνωσης του ενδοθηλίου που προκαλεί ο λιπιδικός πυρήνας. Τα λεία μυϊκά κύτταρα και ο συνδετικός ιστός είναι σε αυτή τη φάση διασκορπισμένα, και έχουν αντικατασταθεί από συσσωρευμένα σωματίδια εξωκυττάρων λιπιδίων. Τα διασκορπισμένα κύτταρα έχουν μειωμένο μέγεθος και επιμηκυμένο σχήμα, ενώ μπορεί να έχουν επίσης ασυνήθιστα παχιά βασική μεμβράνη. Τα οργανίδια των λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί να εμφανίζουν ασβετώσεις (αποτιτανώσεις), ενώ σωματίδια ασβεστίου συχνά υπάρχουν εντός του λιπιδικού πυρήνα. Μεταξύ του λιπιδικού πυρήνα και της επιφάνειας της έσω στοιβάδας, το ενδοθήλιο περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα, με ή χωρίς συσσωρεύσεις λιπιδίων. Στην περιοχή αυτή επίσης εντοπίζονται μικρότεροι αριθμοί λεμφοκυττάρων και μαστοκυττάρων (95). Οι αθηρωματικές πλάκες, όταν πρωτοεμφανίζονται, σε άτομα νεαρής ηλικίας (2^η – 3^η δεκαετία), εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές όπου έγινε η έκκεντρη προσαρμοστική πάχυνση του ενδοθηλίου. Συνεπώς, η αθηρωματική πλάκα, στα αρχικά τουλάχιστον στάδια, είναι μια έκκεντρη αλλοίωση. Οι λιπιδικοί πυρήνες παχύνουν το αρτηριακό τοίχωμα και είναι συνήθως αρκετά μεγάλοι ώστε να είναι ορατοί με το μάτι. Παρόλα αυτά, το αθήρωμα σπανίως επιφέρει στένωση του αρτηριακού αυλού. Όσο η πλάκα μεγαλώνει, το τοπικό τμήμα του αρτηριακού τοιχώματος αυξάνει τη διάμετρό του ώστε να αντισταθμίσει την επαπειλούμενη μείωση της διατομής του αυλού (96). Η αναδιοργάνωση αυτή του ιστού σταματά όταν το αθήρωμα καταλαμβάνει περίπου το 40% της διατομής. Περαιτέρω μεγέθυνση της πλάκας μειώνει τον αυλό και μπορεί να γίνει αιμοδυναμικά σημαντική (88). Παρότι η στένωση που προκαλούν αυτού του τύπου οι αλλοιώσεις είναι μικρή, η κλινική σημασία που εν δυνάμει έχουν έγκειται στο γεγονός ότι επειδή η περιοχή μεταξύ του λιπιδικού πυρήνα και της επιφάνειας της αλλοίωσης περιέχει πρωτεογλυκάνες και μακροφάγα αφρώδη κύτταρα, και ελάχιστες ποσότητες λείων μυϊκών κυττάρων και κολλαγόνου, είναι επιρρεπής στο σχηματισμό ρωγμών και το σχηματισμό με αυτόν τον τρόπο περιπλεγμένης αλλοίωσης (τύπου VI).

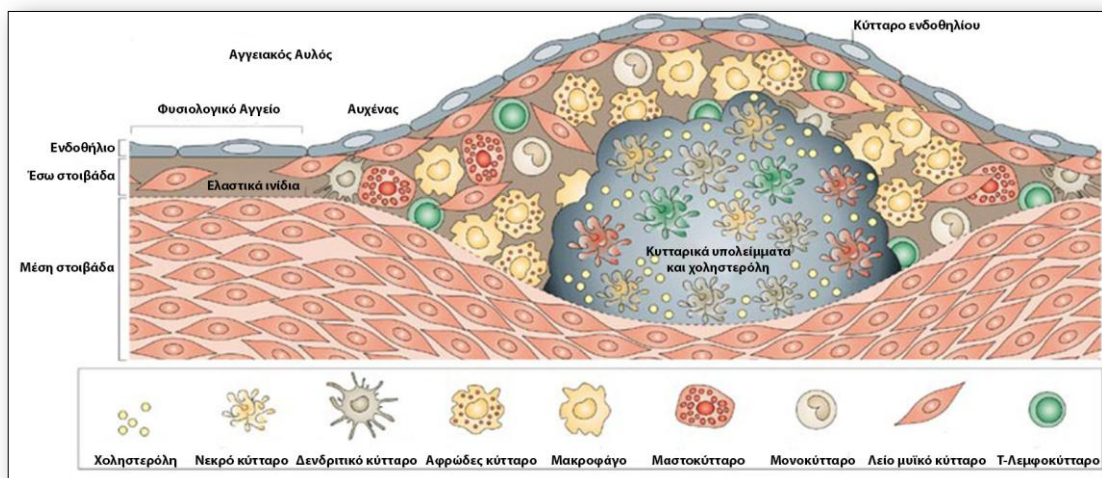
Σε περιοχές όπου η μεγάλη συγκέντρωση εξωκυττάρων λίπους διαταράσσει ή διαλύει εντελώς την φυσιολογική δομή των κυττάρων και του συνδετικού ιστού, συντίθεται καινούριος επανορθωτικός συνδετικός ιστός, η ινώδης κάψα, δημιουργώντας έτσι τη φυσιολογία της αθηρωματικής αλλοίωσης τύπου V. Πολλές φορές μάλιστα ο καινούριος συνδετικός ιστός είναι υπεύθυνος για μεγαλύτερο μέρος της πάχυνσης από ότι η υποκείμενη συσσώρευση λιπιδίων. Ο νέος ιστός αποτελείται από μεγάλες συγκεντρώσεις κολλαγόνου και λείων μυϊκών κυττάρων πλούσιων σε Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο. Σε περιπτώσεις που ο ιστός είναι ιδιαίτερα παχύς, μέρος του μπορεί να είναι υπολείμματα θρόμβων που ενσωματώθηκαν στον ιστό (88). Οι αθηρωματικές αλλοιώσεις που εμφανίζουν μεγάλη συγκέντρωση νεοδημιουργηθέντος συνδετικού ιστού με υποκείμενο λιπιδικό πυρήνα ονομάζονται ινολιπώδεις πλάκες και κατατάσσονται ως τύπου Va. Οι αλλοιώσεις αυτές μπορεί να εμφανίζουν πολυεπίπεδη δομή, με λιπιδικούς πυρήνες άτακτα διαστρωματωμένους και διαχωριζόμενους μεταξύ τους από ινώδεις κάψες. Η

ασύμμετρη πάχυνση του τοιχώματος, επιπλέον, προκαλεί αλλαγή στις αιμοδυναμικές πιέσεις και είναι πιθανό να οδηγήσει σε σχηματισμό καινούριων αλλοιώσεων σε σημεία πλησίον της αρχικής. Μια αλλοίωση τύπου V στην οποία ο λιπιδικός πυρήνας και άλλα μέρη εμφανίζουν αποθέσεις ασβεστίου (αποτιτανώσεις) καλείται τύπου Vb. Σε άλλες περιπτώσεις, όπου ο λιπιδικός πυρήνας είναι απών, ή πολύ μικρός, η αλλοίωση αναφέρεται ως τύπου Vc. Στο στάδιο αυτό της αλλοίωσης, οι αρτηρίες εμφανίζουν στένωση του αυλού. Επίσης, μπορεί να δημιουργηθούν ρήξεις που θα προκαλέσουν αιμάτωμα ή θρόμβο.

Σε μεγαλύτερες ηλικίες, η ινώδης κάψα λεπταίνει σε σημεία κι εξασθενεί, λόγω της χωρίς έλεγχο πρωτεολυτικής δράσης ενζύμων που αποδομούν τον συνδετικό ιστό. Η λεπτή αυτή κάψα είναι επιρρεπής σε ρήξη. Στο ενδεχόμενο της ρήξης της ινώδους κάψας (αλλοίωση τύπου VIa), το θρομβογόνο περιεχόμενο της πλάκας έρχεται σε επαφή με την κυκλοφορία και προκαλεί θρόμβο που εκτείνεται στον αρτηριακό αυλό. Η αλλοίωση αυτή, που ονομάζεται επιπλεγμένη, αν συνοδεύεται από θρόμβωση κατατάσσεται ως τύπου VIb, ενώ αν συνοδεύεται από αιμάτωμα ονομάζεται τύπου VIc. Οι επιρρεπείς προς ρήξη αλλοιώσεις (ινολιπώδεις πλάκες με λεπτή κάψα, ή Thin Cap Fibro Atheromata, TCFAs) αναφέρονται ως ασταθείς πλάκες λόγω του ρίσκου διάρρηξής τους και της απειλής της ζωής του ασθενούς. Εμφανίζονται στις ηλικίες από 55-65, πριν ακριβώς από την ηλικία κορύφωσης των επεισοδίων εμφράγματος του μυοκαρδίου και καρδιακής προσβολής.

A.2.2. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

Η αυξανόμενη κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης της αθηρωμάτωσης και των επιπλοκών της έχει συμβάλλει σημαντικά τα τελευταία χρόνια στη μεταστροφή ως προς τη συνολική θεώρηση της νόσου, στην αναθεώρηση των κριτηρίων αξιολόγησης της βαρύτητας των αθηρωματικών αλλοιώσεων, αλλά και σε αλλαγή των στρατηγικών για την πρόληψη και την αντιμετώπιση τόσο της ίδιας της νόσου όσο και συνεπειών της. Παλαιότερα η αθηρωμάτωση θεωρούνταν απλά μια στενωτική νόσος των αγγείων, που



Εικόνα Α6: Κυτταρικοί τύποι και άλλα συστατικά στην αθηρωματική πλάκα. © 2006 Nature publishing Group

οδηγεί σε ελαττωμένη αιματική παροχή και αιμοδυναμικές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να καταλήξουν σε κυκλοφορικές διαταραχές ή οξεία συμβάματα. Θέτοντας αυτό ως βασική θεώρηση, ο βαθμός στένωσης των αγγείων αποτελούσε τη βασικότερη παράμετρο για τον καθορισμό της βαρύτητας της νόσου. Παράλληλα, η θεραπευτική στρατηγική κατά τη αθηρωμάτωσης εστιαζόταν στην άρση ή στο μετριασμό της στένωσης με φαρμακευτικές ή χειρουργικές παρεμβάσεις (97). Τα τελευταία χρόνια, η αναγνώριση της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και του επακόλουθου σχηματισμού θρόμβου, που μπορεί να αποφράξει το σημείο της αλλοίωσης ή μέσω της κυκλοφορίας να φράξει κάποιο περιφερικό αγγείο, ως κύριας αιτίας των εμβολικών συμβαμάτων, έφερε στο επίκεντρο της θεραπευτικής στόχευσης τη σύσταση και τη μορφολογία της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα Α6).

Μετά από εκτενείς μελέτες, είναι πλέον γνωστό ότι οι αθηρωματικές πλάκες διαφέρουν μεταξύ τους όχι μόνο ως προς τη σύστασή τους, αλλά και ως προς την οργάνωση που τις διακρίνει. Πιο συγκεκριμένα, ένας κλινικά σημαντικός διαχωρισμός των προχωρημένων αθηρωματικών αλλοιώσεων, που γίνεται σε συνάρτηση με τη μορφολογία και τη σύστασή τους, είναι αυτός που τις διακρίνει σε σταθερές ή ασταθείς (ευάλωτες). Οι ασταθείς πλάκες μπορούν, κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως οι αιμοδυναμικές και μηχανικές πιέσεις, να διαρραγούν και να αποτελέσουν άμεσο κίνδυνο για τη ζωή του ασθενούς, σε αντίθεση με τις σταθερές που εμφανίζονται πιο ανθεκτικές στις μηχανικές πιέσεις (98; 99)

Μια πληθώρα κλινικών, πειραματικών και υπολογιστικών μελετών έχουν προσδιορίσει τους παράγοντες εκείνους που συντελούν στην ευπάθεια της αθηρωματικής πλάκας, και που στο σύνολό τους αποτελούν τα κριτήρια για να χαρακτηριστεί ένα αθήρωμα ασταθές. Τα κριτήρια αυτά μπορούν να εφαρμοστούν τόσο για την αξιολόγηση της σοβαρότητας μιας παθολογικής κατάστασης όσο και για την εκτίμηση της επίδρασης φαρμακευτικών παρεμβάσεων προς έναν πιο υγιή φαινότυπο, αλλά και για τον καθορισμό παραγόντων κινδύνου που θεωρείται ότι επιτείνουν τη νόσο. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά μίας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας είναι τα ακόλουθα:

- Μεγάλος λιπιδικός – νεκρωτικός πυρήνας (≥ 30 -40% του συνολικού όγκου της πλάκας), ο οποίος αποτελείται από ελεύθερη κρυσταλλική χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης και οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες εμποτισμένες με ιστικό παράγοντα (100).
- Λεπτή ινώδης κάψα ($< 65\mu\text{m}$), με χαμηλή περιεκτικότητα σε λεία μυϊκά κύτταρα και κολλαγόνο (96; 100; 101; 102).
- Θετική –προς τα έξω- αναδιαμόρφωση (remodeling) του τοιχώματος του αγγείου (100; 103; 104).
- Διήθηση παραγόντων φλεγμονής από την ινώδη κάψα και την άπω στοιβάδα του αρτηριακού τοιχώματος, κυρίως μονοκύτταρων, μακροφάγων, ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, μαστοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων (100; 105; 106).
- Αυξημένη νεοαγγείωση εντός της αθηρωματικής πλάκας, και κυρίως στις περιοχές των ορίων της (107; 108; 109).

- Διαπίδυση ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αθηρωματική πλάκα που οδηγεί σε ενδοπλακική αιμορραγία (110).
- Παρουσία αποτιτανώσεων και σποραδικών αποθέσεων ασβεστίου (111; 112).
- Αλλοίωση σε περιοχή όπου η πλάκα υπόκειται σε ισχυρή διατμητική τάση τοιχώματος (shear stress). (103; 104).

Με τη συσσώρευση όλων των νέων αυτών πληροφοριών σχετικά με τη φύση της αθηρωματικής νόσου, και αναγνωρίζοντας ότι η αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας βρίσκεται σε άμεσα συνδεδεμένη με την κλινική έκβαση της νόσου, έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η σύγχρονη θεώρηση για την αντιμετώπιση της αθηρωματικής νόσου εστιάζει σε τρία σημεία:

1. Η αναγνώριση και ο έλεγχος των παραγόντων κινδύνου που καθιστούν ένα άτομο επιρρεπές στην ανάπτυξη αθηρωματικών αλλοιώσεων.
2. Η επιβράδυνση της εξέλιξης των βλαβών που ήδη έχουν σχηματιστεί, ακόμα και η υποστροφή τους.
3. Η φαινοτυπική μεταβολή των αθηρωμάτων προς μια σταθερότερη κατάσταση.

Οι σύγχρονες, διεθνώς αποδεκτές, θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως η δίαιτα, η άσκηση ή η χορήγηση υπολιπιδαιμικών και άλλων φαρμάκων, δυστυχώς έχει φανεί ότι επιφέρουν πολύ μικρές μεταβολές στο μέγεθος των αθηρωματικών αλλοιώσεων και στο βαθμό στένωσης των αρτηριών. Παρά τα φτωχά αποτελέσματά τους όμως στον τομέα της βελτίωσης της εικόνας της στένωσης του αρτηριακού αυλού, τα κλινικά οφέλη που παρουσιάζουν είναι αξιοπρόσεκτα, γεγονός που πιθανότατα εξηγείται από τις μεταβολές που προκαλούν στη μορφολογία και τη σύσταση της αθηρωματικής πλάκας, μειώνοντας την τάση ρήξης και θρόμβωσης. Έτσι, επιβεβαιώνεται η σύγχρονη προσέγγιση αντιμετώπισης του καρδιαγγειακού κινδύνου μέσα από τον περιορισμό και την αντιμετώπιση των ασταθών αθηρωμάτων και όχι της αρτηριακής στένωσης που η νόσος προκαλεί (113; 114). Θεραπευτικές παρεμβάσεις όπως η μείωση των LDL λιπιδίων της κυκλοφορίας μέσω διατροφικών αλλαγών, η λήψη στατινών και η απευθείας χορήγηση της απολιποπρωτεΐνης A-I και λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), μειώνουν τη συσσώρευση λίπους στις αθηρωματικές πλάκες, ελαττώνουν τα επίπεδα της φλεγμονής, των μεταλλοπρωτεϊνών και του ιστικού παράγοντα και ταυτόχρονα αυξάνουν την συγκέντρωση του κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες (115; 116; 117). Όλες οι παραπάνω μεταβολές οδηγούν σε σταθεροποίηση της πλάκας με εμφανή κλινικά οφέλη (118).

A.2.3. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ (ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ-ΕΛΑΣΤΙΝΗ) ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Η εξωκυττάρια σύσταση του αρτηριακού τοιχώματος χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη παρουσία δύο μακρομορίων, της ελαστίνης και του κολλαγόνου. Η λεπτή ισορροπία μεταξύ των λείων μυϊκών κυττάρων και των δύο αυτών ελαστικών μορίων δίνει στο αορτικό τοίχωμα τις λειτουργικές του ιδιότητες (119).

Εκτός από τον προφανή τους ρόλο στη διαμόρφωση του εξωκυττάριου σκελετού πάνω στον οποίο στηρίζονται τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των στοιβάδων του αγγειακού τοιχώματος, η ελαστίνη και το κολλαγόνο συμβάλλουν στην κατακράτηση λιποπρωτεϊνών, τη μεταφορά σημάτων αυξητικών και άλλων παραγόντων καθώς και την εξασφάλιση της δύναμης, της δομικής ακεραιότητας αλλά και της ελαστικότητας του αγγειακού τοιχώματος (120; 121; 122). Η ελαστίνη και το κολλαγόνο διατάσσονται μέσα στις στοιβάδες του αγγειακού τοιχώματος σε ένα πλέγμα (ExtraCellular Matrix, ECM) με ισχυρούς δεσμούς, που δίνει στο αγγείο τις δομικές και μηχανικές του ιδιότητες. Η επαναδιοργάνωση του ECM είναι μια δυναμική διαδικασία που ελέγχεται και συντονίζεται από την αλληλεπίδρασή του με το αγγειακό τοίχωμα, μέσα από ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, με αποτέλεσμα τη φαινοτυπική προσαρμογή του ECM. Θεωρείται λοιπόν πως η επαναδιοργάνωση του ECM αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων των αγγείων όπως η αθηρωμάτωση (123). Πέραν όμως του ρόλου που ασκεί το ECM στη δημιουργία κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, φαίνεται πως η μορφολογία του πλέγματος εντός των αθηρωματικών πλακών, ο τρόπος διασύνδεσης των μακρομορίων εντός του πλέγματος και η αναλογία κολλαγόνου-ελαστίνης εντός του αθηρώματος, αποτελούν παράγοντες σταθερότητας της αθηρωματικής πλάκας (124; 125). Η πρόκληση βλάβης ή τραυματισμού στον αγγειακό ιστό άλλωστε, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, εκκινεί μια απάντηση του οργανισμού προς επιδιόρθωση. Το σχηματιζόμενο κολλαγόνο και η ελαστίνη συνεισφέρουν στην ακεραιότητα και δύναμη της ινώδους κάψας και επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηρωματικής αλλοίωσης σε τέτοιο βαθμό ώστε να θεωρούνται σημαντικοί διαγνωστικοί δείκτες αθηρωμάτωσης (126). Ενώ το πλέγμα του κολλαγόνου προάγει την σύνδεση των κυττάρων, την μιτωτική αναπαραγωγή και την κυτταρική μετανάστευση, οι ελαστικές ίνες φαίνεται να αναστέλλουν τις παραπάνω λειτουργίες (127).

A.2.3.1. Κολλαγόνο και αθηρωμάτωση

Κολλαγόνο ονομάζεται μια οικογένεια ζωικών πρωτεϊνών που εμφανίζεται άφθονη στο συνδετικό ιστό των σπονδυλωτών. Αποτελεί το κύριο συστατικό του συνδετικού ιστού, και την αφθονότερη ποσοτικά πρωτεΐνη στα θηλαστικά (128; 129). Έχουν αναγνωριστεί 28 τύποι μορίων που ανήκουν στην οικογένεια του κολλαγόνου, με τον τύπο I (ο οποίος συναντάται και στις στοιβάδες του αγγειακού τοιχώματος) να αποτελεί τον συχνότερο, κατά ποσοστό μεγαλύτερο του 90% (128; 130).

Το κολλαγόνο είναι το κύριο συστατικό τόσο των σταθερών όσο και των ασταθών αθηρωματικών πλακών. Βασική πηγή σύνθεσής του είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα της έσω στοιβάδας του αγγείου (VSMCs), ενώ ο ρόλος του, ως συστατικού του ECM, είναι συνδετικός, κι εξασφαλίζει τη δομική ακεραιότητα του αγγείου έναντι των μηχανικών πιέσεων που ασκούνται στα τοιχώματά του από την κυκλοφορία του αίματος. Στις αθηρωματικές αλλοιώσεις, η παρουσία του κολλαγόνου προάγει επίσης τη δομική ευστάθεια έναντι των ίδιων πιέσεων και αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι της ρήξης. Η περιεκτικότητα του ECM σε κολλαγόνο είναι απόρροια μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης

του μακρομορίου από τους μυοϊνοβλάστες, αλλά και της διαρκούς αποδόμησής του από πρωτεολυτικά ένζυμα. Έτσι, μείωση της περιεκτικότητας της αθηρωματικής αλλοίωσης σε κολλαγόνο μπορεί να προέλθει από τη διατάραξη αυτής της ισορροπίας, είτε με μείωση της παραγωγής του (μείωση VSMCs λόγω αυξημένης απόπτωσης, μείωση μετανάστευσης VSMCs στην αθηρωματική πλάκα ή μειωμένη ινοβλαστική δραστηριότητά τους), ή με αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των ενζύμων που το αποδομούν, που προέρχονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα (131; 132).

Τόσο σε πειραματικές όσο και σε κλινικές μελέτες, φαίνεται ότι οι αθηρωματικές πλάκες που εμφανίζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο έχουν παχύτερη ινώδη κάψα, καλύτερα οργανωμένο ECM και εμφανίζουν με αυτόν τον τρόπο αυξημένη ικανότητα αντίστασης στις αιμοδυναμικές πιέσεις, πράγμα που τις καθιστά ευσταθείς. Αντίστοιχα, επιβεβαιώνεται ότι οι ασταθείς πλάκες, που οδηγούν σε οξεία απόφραξη του αρτηριακού αυλού από θρόμβωση, χαρακτηρίζονται από σχετικό έλλειμμα σε κολλαγόνο (133; 134).

A.2.3.2. Ελαστίνη και αθηρωμάτωση

Οι ελαστικές ίνες αποτελούν σημαντικό συστατικό του συνδετικού ιστού. Όπως υποδεικνύει και το όνομά τους, η κύρια ιδιότητά τους είναι η ελαστικότητα, που επιτρέπει στους ιστούς να διατηρούν το σχήμα τους μετά από οποιαδήποτε προσπάθεια παραμόρφωσης, π.χ. λόγω της υψηλής αρτηριακής πίεσης. Οι ελαστικές ίνες μπορούν να διαταθούν έως και 50% του μήκους τους και να επανέλθουν στο αρχικό τους σχήμα με την παύση της τάσης. Στον αγγειακό ιστό, το ελαστικό πλέγμα όχι μόνο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών παρά τις αιμοδυναμικές πιέσεις, αλλά επίσης καθορίζει τη ικανότητα των αγγείων για σύσπαση και χάλαση, και είναι υπεύθυνο για την ομαλοποίηση της πίεσης που προκαλείται από την καρδιά εξασφαλίζοντας έτσι την ομαλότερη ροή του αίματος (135; 136; 137). Τέλος, το πλέγμα των ελαστικών ινών αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα μονοπατιών σηματοδότησης, μέσω μηχανικής αγωγής σημάτων που εμπλέκονται στη μορφογένεση, την απάντηση σε τραύμα και τη φλεγμονή (136).

Η αποδόμηση της ελαστίνης αποτελεί κεντρικό σημείο στη διαμόρφωση της αθηρωματικής νόσου. Φαίνεται πως με την αύξηση της ηλικίας, η ικανότητα των κυττάρων του ενήλικου ιστού για σύνθεση τροποελαστίνης (πρόδρομης ελαστίνης) και για οργάνωσή της σε ώριμες και λειτουργικές δομές σταδιακά μειώνεται (136). Αυτό οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της αναλογίας κολλαγόνου/ελαστίνης στο ECM, δείκτη που αποτελεί ένδειξη αρτηριακής σκληρότητας που οδηγεί τελικά σε ανελαστικότητα του αγγειακού τοιχώματος (138). Επίσης, προάγει τη μετανάστευση των VSMCs από το μέσο στον έσω χιτώνα, διαμέσου των ελαστικών στοιβάδων και τέλος προωθεί τη θετική αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος, την αποσταθεροποίηση της πλάκας και την επακόλουθη ρήξη της (122).

Η ελαστίνη, εκτός από την εξασφάλιση της συνοχής και της ακεραιότητας της αθηρωματικής πλάκας, μεσολαβεί επίσης στην εναπόθεση λίπους στις αθηρωματικές πλάκες. Η ελαστίνη που εντοπίζεται στην

έσω στοιβάδα αγγείου με αθηρωματική πλάκα περιέχει περισσότερη χοληστερόλη από την αντίστοιχη μη αθηρωματικού αγγείου (139). Αυτό πιθανότατα συμβαίνει γιατί η ελαστίνη συνδέεται και κατακρατά τα μόρια LDL, IDL και VLDL στο αγγειακό τοίχωμα (140). Στις αθηρωματικές περιοχές που είναι προδιατεθειμένες για ρήξη παρουσιάζεται αυξημένη συγκέντρωση μακροφάγων και ταυτόχρονα μεγάλος ρυθμός αποδόμησης της ελαστίνης.

Παρεμβάσεις που στοχεύουν στην αλλαγή της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας, όσον αφορά το ECM, και επιδιώκουν με αυτόν τον τρόπο τη σταθεροποίησή της αποκτούν στρατηγική σημασία για την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Δείκτες της αποτελεσματικότητας τέτοιων παρεμβάσεων αποτελούν η συγκέντρωση κολλαγόνου και ελαστίνης στις αθηρωματικές αλλοιώσεις και την ινώδη κάψα.

A.2.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

Τα μακροφάγα λεμφοκύτταρα είναι στοιχεία τόσο των πρώιμων όσο και των προχωρημένων μορφών της αθηρωματικής αλλοίωσης. Ο ρόλος τους είναι η απορρόφηση από τον φλεγμαίνοντα ιστό της οξειδωμένης LDL χοληστερόλης. Η χημειοτακτική διαδικασία διαπίδυσής τους στο ενδοθήλιο ξεκινά από τα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας, που δεχόμενα σήματα από μόρια προσκόλλησης κι άλλους χημειοτακτικούς παράγοντες εισέρχονται στις στοιβάδες του αγγείου. Τα σήματα αυτά προέρχονται από τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β (ApoB-LPs) (141). Εισερχόμενα στον υποενδοθηλιακό χώρο, διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τα οποία φαγοκυτταρώνουν την οξειδωμένη LDL. Αδυνατώντας να την καταβολίσουν, σταδιακά το κυτταρόπλασμά τους γεμίζει οργανίδια που περιέχουν λιπίδια και τα μακροφάγα μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (142).

A.2.5. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΔΙΚΤΥΟΥ (MMPs)

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες δικτύου (Matrix metalloproteinases, MMPs) αποτελούν μια οικογένεια εξωκυττάρων πρωτεολυτικών ενζύμων (ενδοπεπτιδασών) που αποδομούν πρωτεϊνικά υποστρώματα. Οι MMPs αποτελούν τμήμα της υπεροικογένειας των εξαρτώμενων από Zn^{2+} ενδοπεπτιδασών, των μετζινκινών (metzinkins). Το κοινό χαρακτηριστικό των μετζινκινών είναι ο μηχανισμός δράσης, που εμπλέκει την ενεργοποίηση ενός μορίου νερού δεσμευμένου στην ενεργό περιοχή του ενζύμου μέσω ενός κατιόντος ψευδαργύρου (Zn^{2+}), το οποίο δρα ως συνένζυμο.

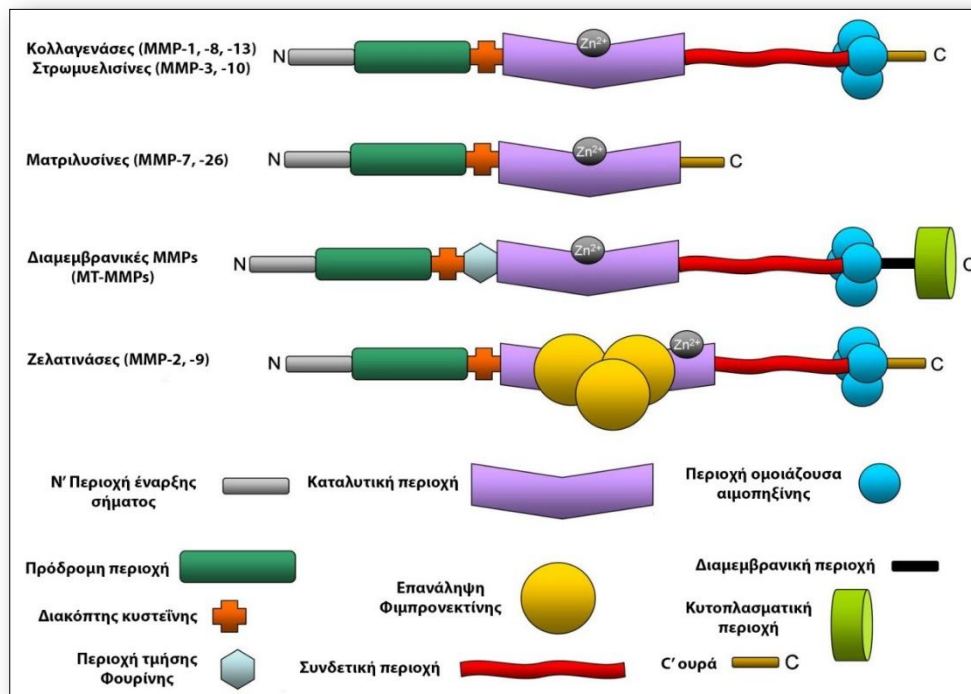
Παρότι το καταλυτικό τμήμα των MMPs είναι εξαιρετικά όμοιο μεταξύ των μελών της οικογένειας, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μελών των MMPs που εντοπίζονται στην ειδικότητα πάνω στα υποστρώματα, στον κυτταρικό και ιστολογικό εντοπισμό τους, στη δέσμευσή τους ή μη στην κυτταρική μεμβράνη και στη ρύθμισή τους. Έτσι, αποτελούν μια ευέλικτη οικογένεια που επιτελεί πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών. Μπορούν συνολικά να αποδομήσουν όλες τις πρωτεΐνες του ECM, ενώ ορισμένες μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι επίσης δραστικές στην τμήση κι άλλων ενεργών μορίων με αποτέλεσμα την κατά περίπτωση ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή τους. Είναι φανερό ότι η

λειτουργικότητα των MMPs είναι απαραίτητη σε διαδικασίες όπως η επαναδιοργάνωση του αγγειακού ιστού ως απάντηση σε τραύμα. Σε φυσιολογικές συνθήκες σχεδόν όλοι οι κυτταρικοί τύποι του αγγειακού τοιχώματος, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και οι ινοβλάστες του έξω χιτώνα εκκρίνουν μεταλλοπρωτεΐνάσες. Σε παθολογικές όμως συνθήκες (π.χ. στην αθηρωμάτωση ή σε ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής) την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών αναλαμβάνουν επιπλέον τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα (143; 144).

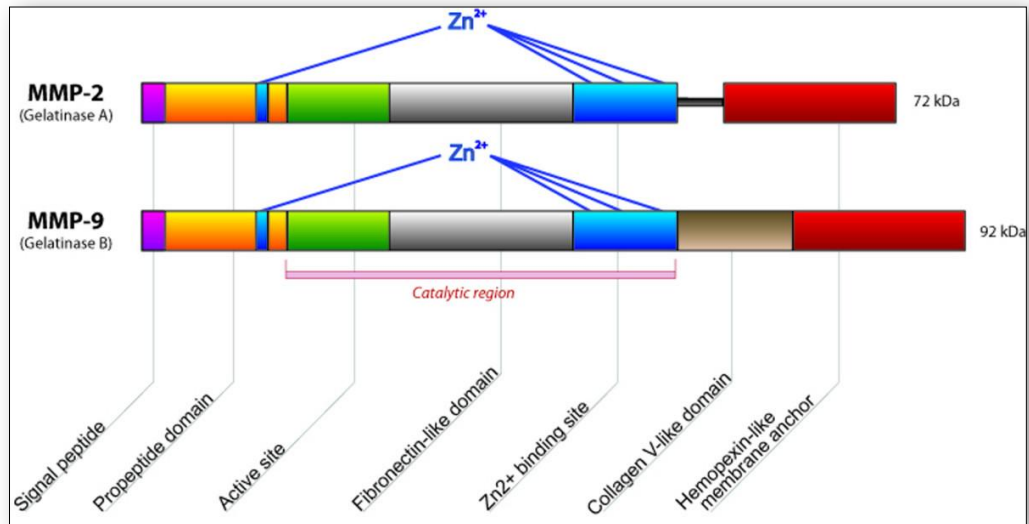
A.2.5.1. Δομή και ταξινόμηση των MMPs

Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου αριθμεί μέχρι σήμερα 25 μόρια (Πίνακας A1), εκ των οποίων τα 23 εντοπίζονται στον άνθρωπο, ενώ τα 24 στους μύες (145). Οι MMPs είναι κατά κύριο λόγο εκκρινόμενες πρωτεΐνες που αποτελούνται από συγκεκριμένες περιοχές (domains). Όλες οι MMPs έχουν κοινά τα εξής δομικά χαρακτηριστικά (Εικόνα A7, A8):

- A. Την περιοχή μεταφοράς του σήματος
- B. Την πρόδρομη περιοχή (predomain)
- Γ. Την καταλυτική περιοχή (catalytic domain)
- Δ. Την περιοχή διασύνδεσης και
- Ε. Την περιοχή με δομή που μοιάζει με την αιμοπεξίνη (hemopexin-like domain) με βασική λειτουργία την αναγνώριση του υποστρώματος (146).



Εικόνα A7: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών των μεταλλοπρωτεϊνών (Μουστάρδας Π., 2013)



Εικόνα Α8: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών των MMP-2 και MMP-9 (Μουστάρδας Π., 2013)

Οι MMPs χωρίζονται σε κατηγορίες κυρίως βάσει της ειδικότητάς τους στα υποστρώματα αλλά και του εντοπισμού τους (εκκρινόμενες ή διαμεμβρανικές) ως εξής (147; 148):

I) **Κολλαγενάσες** (εκκρινόμενες): MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18

Μπορούν να αποδομήσουν το κολλαγόνο τριπλής έλικας σε διακριτά κομμάτια του $\frac{1}{4}$ και των $\frac{3}{4}$. Οι MMPs είναι μάλιστα τα μόνα γνωστά ένζυμα θηλαστικών που είναι ικανά να αποδομήσουν το μόριο αυτό.

II) **Ζελατινάσες** (εκκρινόμενες): MMP-2, MMP-9:

Έχουν ως κύρια υποστρώματα τη ζελατίνη και το κολλαγόνο τύπου IV.

III) **Στρωμελυσίνες** (εκκρινόμενες): MMP-3, MMP-10, MMP-11

Αποδομούν μια ευρεία γκάμα εξωκυττάριου υλικού, αλλά αδυνατούν να λύσουν το ινώδες κολλαγόνο.

IV) **Ματριλυσίνες** (εκκρινόμενες): MMP-7, MMP-26

V) **Μεμβρανικού τύπου**, MT-MMPs (διαμεμβρανικές): MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25.

Μια άλλη ταξινόμηση των MMPs είναι αυτή που έχει εξελικτικά κριτήρια και στηρίζεται σε μελέτες βιοπληροφορικής, κατατάσσοντάς τες στις παρακάτω τέσσερις εξελικτικές κατηγορίες (149):

- I) MMP-19
- II) MMPs 11, 14, 15, 16, και 17
- III) MMP-2 και MMP-9
- IV) Όλες οι υπόλοιπες MMPs

Πίνακας A1: Μεταλλοπρωτεϊνάσες, εναλλακτικά ονόματα και τα αντίστοιχα υποστρώματα δράσης τους.

MMP	Άλλη ονομασία	Τύπος	Υπόστρωμα - Άλλα σχόλια
MMP1	Interstitial collagenase, Collagenase 1	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, VII, VIII, X), gelatin, proteoglycans, MMP-2, MMP-9
MMP2	Gelatinase-A, 72 <u>kDa</u> gelatinase	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagens (I, IV, V, VII, X, XI, XIV), elastin, fibronectin, laminin, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP3	Stromelysin 1	Εκκρινόμενη	Collagens (III, IV, V, IX, X), gelatin, fibronectin, laminin, MMP-1, -7, -8, -9, -13
MMP7	Matrilysin 1, PUMP 1	Εκκρινόμενη	Collagens (IV, X), gelatin, fibronectin, laminin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1 complex.
MMP8	Neutrophil collagenase, Collagenase 2	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, V, VII, VIII, X), gelatin, proteoglycans
MMP9	Gelatinase-B, 92 kDa gelatinase	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagens (IV, V, VII, X, XIV), elastin, fibronectin, plasminogen
MMP10	Stromelysin 2	Εκκρινόμενη	Collagens (III, IV, V), gelatin, casein, MMP-1, MMP-8
MMP11	Stromelysin 3	Εκκρινόμενη	Gelatin, collagen IV, fibronectin, casein, proteoglycans
MMP12	Macrophage metalloelastase	Εκκρινόμενη	Collagen IV, gelatin, elastin, fibronectin, casein, fibrinogen, plasminogen, MMP-2
MMP13	Collagenase 3	Εκκρινόμενη	Collagens (I, II, III, IV, IX, X, XIV) gelatin, MMP-9
MMP14	MT1-MMP	Διαμεμβρανική	Collagens (I, II, III), gelatin, casein, elastin, fibronectin, laminin, MMP-2, MMP-13
MMP15	MT2-MMP	Διαμεμβρανική	gelatin, fibronectin, laminin, MMP-2
MMP16	MT3-MMP	Διαμεμβρανική	Collagen III, gelatin, casein, fibronectin, MMP-2
MMP17	MT4-MMP	Διαμεμβρανική	Gelatin, proMMP-2 glycosyl phosphatidylinositol-attached
MMP18	xc04, <u>xenopus</u> collagenase, Collagenase 4		No known human <u>orthologue</u>
MMP19	RASI-1, stromelysin-4		Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein
MMP20	Enamelysin	Εκκρινόμενη	Aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein
MMP21	X-MMP	Εκκρινόμενη	
MMP23A	CA-MMP	Διαμεμβρανική	
MMP23B		Διαμεμβρανική	
MMP24	MT5-MMP	Διαμεμβρανική	Proteoglycans, proMMP-2, collagen I, gelatin, fibronectin, laminin

MMP25	MT6-MMP	Διαμεμβρανική	Collagen IV, proMMP-8, proMMP-9 glycosyl phosphatidylinositol-attached
MMP26	Matrilysin-2, endometase		Collagen IV, fibronectin, gelatin, proMMP-9, fibrinogen
MMP27	MMP-22, C-MMP		
MMP28	Epilysin	Εκκρινόμενη	

A.2.5.2. Οι MMPs στην αθηρωμάτωση

Η απορρύθμιση της οργάνωσης του ECM θεωρείται πως συμβάλλει στο αρτηριακό remodeling κατά την ανάπτυξη, εξέλιξη και τις επιπλοκές των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Ως κύριοι ρυθμιστές του μεταβολισμού του ECM, οι MMPs φαίνεται πως παίζουν βασικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία. Αυξημένη έκφραση των MMPs έχει εντοπιστεί στην αθηρωματική πλάκα, ενώ η ενεργοποίηση της έκφρασης των MMPs φαίνεται να διευκολύνει την αθηρογένεση, τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και την αποσταθεροποίηση της πλάκας (150; 151). Οι MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 και MMP-12 παράγονται από τα μακροφάγα στο αρτηριακό τοίχωμα, και εμφανίζουν τη μέγιστη έκφρασή τους στις αθηρωματικές αλλοιώσεις. Επίσης, στις περιφερειακές περιοχές των αθηρωματικών πλακών και σε περιοχές συσσώρευσης αφρωδών κυττάρων, ανιχνεύεται αυξημένη έκφραση MMP-1, MMP-3 και MMP-9. Η χαμηλή σε λιπαρά διατροφή, που σχετίζεται με μειωμένη αθηρωμάτωση, προκαλεί μεταξύ άλλων πτώση των επιπέδων MMP-1 στα μακροφάγα (152). Ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία με αιμοδιάλυση τείνουν να αναπτύσσουν ταχέως αθηρωμάτωση, και εμφανίζουν ενδείξεις απορρυθμισμένης πρωτεόλυσης και ινόλυσης στο πλάσμα. Η MMP-2 θεωρείται ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης στους παραπάνω ασθενείς (153). Τα παραπάνω στοιχεία που προκύπτουν από κλινικές και πειραματικές μελέτες, εμπλέκουν τη λειτουργία των MMPs σε μια πληθώρα καταστάσεων που αφορούν τόσο στην ανάπτυξη κι εξέλιξη της αθηρωμάτωσης όσο και στην έκβαση των προχωρημένων αθηρωματικών αλλοιώσεων.

A.2.5.3. Οι MMPs και η σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας

Καθώς οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στις αθηρωματικές πλάκες προάγουν, μέσω της αποδόμησης του εξωκυττάριου υλικού, τη φλεγμονώδη διήθηση με μακροφάγα, τη νεοαγγειογένεση και τη λέπτυνση της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας, θεωρείται ότι συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας (154). Μελέτες σε μύες, κόνικλους και ανθρώπους έχουν δείξει ότι οι MMP-1, MMP-3 και MMP-9 εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση στις περιοχές με αυξημένη πιθανότητα ρήξης της αθηρωματικής πλάκας (155). Επίσης, υψηλά επίπεδα των MMP-8, MMP-11, MMP-14 και MMP-16 παρατηρήθηκαν στον αυχένα αθηρωματικών πλακών ανθρώπων, περιοχή ευάλωτη στις μηχανικές

δυνάμεις και επιρρεπή σε ρήξη. Έχουν τη δυνατότητα να διασπούν το κολλαγόνο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα και σταθερότητα στην αθηρωματική πλάκα, οδηγώντας στη δημιουργία τρωτών σημείων προς ρήξη στην ινώδη κάψα (156). Οι MMP-9 και MMP-12 διασπούν την ελασίνη, ενώ αντίστοιχα οι MMP-3 και MMP-7 αποδομούν τα προϊόντα διάσπασης του κολλαγόνου μαζί με πρωτεογλυκάνες. Φαίνεται λοιπόν ότι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την ταχεία εξέλιξη και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας.

Σε αντίθεση με τη θεώρηση της δράσης των MMPs ως παράγοντα αστάθειας της αθηρωματικής πλάκας, η προ-αθηρογόνος δράση των MMP-2, MMP-9 και MMP-14 κατά τα αρχικά στάδια της νόσου αποδεικνύεται προστατευτική έναντι της ρήξης σε εξελιγμένες αθηρωματικές αλλοιώσεις. Φαίνεται, κατά συνέπεια, ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν την ικανότητα είτε να προάγουν, είτε να εμποδίζουν τη ρήξη της πλάκας. Το ποιά δράση θα υπερισχύσει εξαρτάται από το φάσμα των μεταλλοπρωτεϊνών που εκφράζεται, τα επίπεδα της δραστηριότητάς τους και το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται η αθηρωματική πλάκα.

Ο μηχανισμός δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών δεν περιορίζεται μόνο στην αποδόμηση του υπάρχοντος εξωκυττάριου υλικού, αλλά επεκτείνεται στην καταστολή σύνθεσης νέου εξωκυττάριου υλικού, οδηγώντας σε λέπτυνση της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επίδρασης των μεταλλοπρωτεϊνών δικτύου και των κυτοκινών στα VSMCs, είτε άμεσα, με αναστολή της παραγωγής εξωκυττάριου υλικού, ή έμμεσα, με διέγερση της απόπτωσής τους (157).

Οι MMPs συνεπώς, ενεργούν ξεχωριστά ή σε συνέργεια για την αποδόμηση όλων των δομικών συστατικών του εξωκυττάριου υλικού στο αρτηριακό τοίχωμα. Μέσω της διαδικασίας αυτής ευνοείται η μετακίνηση κυττάρων, ιδίως φλεγμονωδών κυττάρων και VSMCs προς το εσωτερικό της αθηρωματικής πλάκας, τα οποία με τη σειρά τους ενισχύουν την πρόσληψη χοληστερόλης, τη δημιουργία λιπιδικού-νεκρωτικού πυρήνα και την περαιτέρω παραγωγή MMPs. Τα ένζυμα αυτά αναδιαμορφώνουν σταδιακά την αθηρωματική πλάκα, καθιστώντας την ασταθή (λεπτή ινώδης κάψα, μικρή περιεκτικότητα σε κολλαγόνο, άφθονα μακροφάγα, μεγάλος λιπιδικός πυρήνας) και συμβάλλοντας έτσι στην ταχεία ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.

A.2.6. ΟΙ ΙΣΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ (TIMPs)

Η διαδικασία της φυσιολογικής αναστολής της λειτουργίας των MMPs είχε αρχικά ανιχνευθεί σε πολλές μελέτες με καλλιέργειες κυττάρων και ιστών, που διεξήχθησαν πριν από αρκετές δεκαετίες. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως σημαντικοί ρυθμιστές των MMPs και σε ορισμένες περιπτώσεις και άλλων μεταλλο-ενδοπεπτιδασών. Οι TIMPs αναστέλλουν τη λειτουργία των MMPs δημιουργώντας σύμπλοκα με αυτές με στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Παρότι έχει κατοχυρωθεί η σημασία τους στη ρύθμιση της ικανότητας των κυττάρων για έλεγχο του περιβάλλοντός τους, από την επαναδιοργάνωση του ECM μέχρι την

αλληλεπίδραση των κυττάρων μέσω σύνδεσης και μοριακής σηματοδότησης αυξητικών και άλλων παραγόντων, πρόσφατα έχει ξεκινήσει να εκτιμάται και η λειτουργία τους ως αυτόνομοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί (158; 159). Πράγματι, οι TIMPs εμφανίζουν μια πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, όπως η προαγωγή της κυτταρικής αύξησης, η αντι-αγγειογένεση, η αντι- ή προ-αποπτωτική δράση και λειτουργίες συναπτικής πλαστικότητας, πολλές από τις οποίες είναι ανεξάρτητες της αναστολής των μεταλλοπρωτεϊνών.

Ο ρόλος των TIMPs στα αρχικά στάδια της αθηρωμάτωσης, που αφορούν στον ενδοθηλιακό τραυματισμό και την υπερπλασία του έσω χιτώνα, δεν είναι ιδιαίτερα σαφής. Έχει φανεί ότι οι TIMPs, παρεμποδίζοντας την αποδόμηση του ECM δρουν αντισταθμιστικά στην πρωτεολυτική δραστηριότητα των MMPs και ευνοούν τη σταθεροποίηση της πλάκας. Η διατάραξη, άλλωστε, της ισορροπίας μεταξύ MMPs και TIMPs οδηγεί πιθανότατα σε ρήξη της πλάκας και θρομβωτικό επεισόδιο (160).

Σε $ApoE^{-/-}$ μύες, στους οποίους είχε γίνει χορήγηση τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, μετά από εισαγωγή του γονιδίου του TIMP-1 μέσω αδενοϊού προκειμένου ο συγκεκριμένος αναστολέας να υπερ-εκφράζεται, η παρέμβαση αυτή επιβράδυνε την αύξηση του μεγέθους της αθηρωματικής πλάκας και μείωσε την περιεκτικότητά της σε μακροφάγα στην περιοχή της ρίζας της αορτής (161). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη σε $ApoE^{-/-}$ μύες με ετερόζυγη ή ομόζυγη υπερ-έκφραση του TIMP-1, στους οποίους χορηγήθηκε υπερλιπιδαιμική διαίτα για 3 ή 6 μήνες, βρέθηκε ότι ο TIMP-1 μείωσε την αποδόμηση της ελαστίνης, και τη συγκέντρωση των μακροφάγων στις πλάκες, αλλά σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, δεν ανιχνεύθηκε καμία επίπτωση στο μέγεθος των αθηρωματικών αλλοιώσεων (162).

Με βάση τα αποτελέσματα μελετών, φαίνεται ότι η απαλοιφή του γονιδίου για τον TIMP-1 συνδέεται με αυξημένη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα και αυξημένη αποδόμηση της ελαστίνης, προκαλώντας έτσι την αποσταθεροποίηση της πλάκας (163; 164) και παράλληλα ότι οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών δρουν ανασταλτικά ως προς τη ρήξη της πλάκας (165; 166).

A.2.7. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗ MCP-1 (MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1/ MCP-1)

Ο παράγοντας MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) ή αλλιώς CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2) είναι μια κυτοκίνη μικρού μεγέθους που ανήκει στην οικογένεια CC των χυμοκινών. Έχει την ικανότητα να προκαλεί συσώρευση μονοκυττάρων, T-λεμφοκυττάρων μνήμης και δενδριτικών κυττάρων σε φλεγμαίνουσες περιοχές. Η φλεγμονή συνήθως οφείλεται σε τραυματισμό ιστού ή μόλυνση (167; 168).

Ο παράγοντας MCP-1 εμπλέκεται στην παθογένεση πληθώρας ασθενειών στις οποίες εντάσσονται η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η αθηρωμάτωση (169).

A.2.7.1. Ο ρόλος του παράγοντα MCP-1 στις καρδιαγγειακές παθήσεις

Ο παράγοντας MCP-1 είναι επίσης, υψίστης σημασίας για την έναρξη και το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών. Πολλές μελέτες συνδέουν τον παράγοντα MCP-1 με τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η ερευνητική ομάδα του Gu (170), χρησιμοποίησε διαγονιδιακούς μύες με έλλειψη LDL οι οποίοι είτε εξέφραζαν είτε όχι τον παράγοντα MCP-1. Στα ζώα που δεν εξέφραζαν τον παράγοντα παρατηρήθηκε μικρότερου βαθμού εναπόθεση λιπιδίων, ενώ είχαν λιγότερα μακροφάγα στο αορτικό τοίχωμα. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την αθηρωμάτωση και χρησιμοποιήθηκε ζωικό πρότυπο μυών με έλλειψη του γονιδίου MCP-1, αποδείχθηκε ότι η απουσία είτε της πρωτεΐνης, είτε του υποδοχέα της οδηγεί σε ουσιαστική μείωση στην αρτηριακή εναπόθεση λίπους (171). Συνολικά, οι δύο παραπάνω μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας MCP-1 μπορεί να οδηγήσει στην αθηρογένεση, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι χοληστερόλης/ λιποπρωτεϊνών.

Επιπλέον, η βελτίωση στην κλινική εικόνα της νόσου σχετίστηκε με το μειωμένο αριθμό μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα με βάση τη μελέτη της ομάδας Dawson (172) καθώς παρατηρείται προσέλκυση μονοκυττάρων στο υπενδοθηλίο μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα MCP-1. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι αυξημένα επίπεδα MCP-1 μετά από αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αγγείων οδηγούν σύντομα σε επαναστένωση και επιταχυνόμενη μορφή αθηρωμάτωσης (173). Τέλος, σε ένα κομμάτι του πληθυσμού συναντάται ένας πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί τα τον παράγοντα MCP-1 με αυξημένο κίνδυνο για ένα άτομο να υποφέρει από στεφανιαία νόσο (174; 175).

A.2.8. ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ (TNF- α / IL-6)

Οι κυτοκίνες (ή κυτταροκίνες) είναι επαγωγείς έκφρασης πρωτεϊνών και συμμετέχουν σε πολλά φυσιολογικά μονοπάτια ενώ παράλληλα παίζουν καταλυτικό ρόλο στη φλεγμονή. Αποτελούν μια ομάδα ετερογενών μεταξύ τους μορίων που περιλαμβάνει πάνω από 100 παράγοντες που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε υπο-ομάδες: τις ιντερλευκίνες (interleukins - ILs), τις ιντερφερόνες (interferons - IFNs), τους αυξητικούς παράγοντες (transforming growth factors - TGFs), τους διεγερτικούς παράγοντες αποικιών (colony-stimulating factors - CSFs) και διάφορες χημοκίνες.

Οι κυτοκίνες παράγονται από τα T-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα αιμοπετάλια, καθώς και από ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) και αδιποκύτταρα ως απάντηση στην φλεγμονή. Ένας αυξημένος αριθμός προ-φλεγμονωδών κυτοκινών σχετίζεται επίσης με την εξέλιξη της υποκείμενης νόσου και προάγει την αθηρωμάτωση (176). Η επαγόμενη από τις κυτοκίνες ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία του ενδοθηλίου που συνοδεύεται συνήθως από αύξηση της προσκόλλησης χημοκινών και κυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα) οδηγώντας έτσι σε υποτροπή της αθηρωματικής νόσου (177). Οι κυτοκίνες επηρεάζουν επίσης τη λειτουργικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs)

προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους (178). Σε προχωρημένα στάδια αθηρωμάτωσης, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες οδηγούν σε αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών, στην απόπτωση πολλών κυττάρων και την αποδόμηση του τοιχώματος. Συνεπώς επιταχύνεται η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και ο σχηματισμός θρόμβων (179; 180).

Για πολλά χρόνια, οι κυτοκίνες που παράγονταν από τα T-βοηθητικά κύτταρα κατηγοριοποιούνταν σε 2 ομάδες: τις κυτοκίνες που παράγονται από τα T1- βοηθητικά κύτταρα και αυτές που παράγονται από τα T2- βοηθητικά κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης τη σημασία των T17- βοηθητικών κυττάρων και των T-ρυθμιστικών κυττάρων στην παθογένεση πολλών νοσημάτων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο κύριος ρόλος των κυτοκινών που προέρχονται από τα T1 κύτταρα είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων και των T-λεμφοκυττάρων. Οι κυτοκίνες που παράγονται με τη βοήθεια των T2 κυττάρων επάγουν τη χυμική ανοσία (181). Στην πρώτη κατηγορία κυτοκινών εντάσσεται ο παράγοντας TNF- α ενώ στη δεύτερη η ιντερλευκίνη 6.

A.2.8.1. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Ο TNF- α είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται στην ομοίωση των κυττάρων και στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (182). Έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο-κλειδί στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης. Παράγεται από τα CD4+ T κύτταρα και τα μυελοειδή κύτταρα της αορτής. Η εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου σχετίζεται ευθέως με την τοπική αύξηση των επιπέδων του TNF- α στην αθηρωματική πλάκα και στο αίμα (183).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μύες με έλλειψη του γονιδίου τόσο για τον παράγοντα TNF- α όσο και για την απολιποπρωτεΐνη E [double knockout of the TNF- α (Tnf- $\alpha^{-/-}$) and ApoE (ApoE $^{-/-}$)] έδειξαν ότι στους μύες με διπλή έλλειψη υπήρχε σημαντική μείωση στην έκταση της αθηρωματικής πλάκας σε σχέση με μύες με μονή έλλειψη του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E λόγω της μειωμένης έκφρασης του παράγοντα MCP-1 και άλλων μορίων που προσκολλώνται στα αρτηριακά τοιχώματα (184). Κατά συνέπεια, αποδεικνύεται ο παθολογικός ρόλος του παράγοντα TNF- α στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης.

A.2.8.2. Ιντερλευκίνη - 6 (IL-6)

Πρόκειται για διμερές μόριο που εκφράζεται μέσω ειδικών υποδοχέων τύπου gp130 σε συνδυασμό με IL-6R (185). Η σύνδεση του μορίου με τους ειδικούς υποδοχείς ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής STAT1 και STAT3 (186). Η IL-6 έγινε αρχικά γνωστή ως η κυτταροκίνη που είναι υπεύθυνη για την διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα (πλασματοκύτταρα). Εκτός από την σημασία της στη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων, η σημαντικότερη συστηματική δράση της IL-6 είναι η διέγερση των ηπατικών κυττάρων προς την παραγωγή φλεγμονωδών πρωτεϊνών, όπως η CRP, η SAA και η φερριτίνη, με παράλληλη ελάττωση της παραγωγής λευκωματίνης, στα πλαίσια της

αντίδρασης οξείας φάσεως. Επιπλέον, η IL-6 προάγει την φλεγμονώδη αντίδραση και μέσω της ενεργοποίησης και του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, της διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων, καθώς και της προσέλκυσης λευκοκυττάρων. Η ιντερλευκίνη-6 μπορεί να παίζει τόσο προ-φλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη ρόλο στην παθογένεση πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων. Επίσης, η ιντερλευκίνη-6 μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση του ανταγωνιστή του υποδοχέα IL-1 (IL-1RA) και να απελευθερώσει την πρωτεΐνη που αποτελεί τον υποδοχέα του TNF- α (που καταστέλλει τη δράση των IL-1 και TNF- α αντίστοιχα) (187). Έχει προταθεί ότι ο ρόλος της στην αθηρωμάτωση εξαρτάται από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η ασθένεια με αποτέλεσμα να έχει είτε παθογόνο είτε προστατευτική δράση (186; 188). Η IL-6 πιθανόν ενέχεται στην παθογένεια της αθηρωμάτωσης μέσω επαγωγής της παραγωγής της CRP, που όπως αναφέρθηκε προηγούμενα συσχετίσθηκε με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, με τη χημειοταξία και προσκόλληση των λευκοκυττάρων, αλλά και με διαταραχές του πηκτικού μηχανισμού πήξης (189). Επιπλέον, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η IL-6 μπορεί να έχει *per se* αθηρογόνες δράσεις (όπως η προαγωγή της σύνθεσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης CRP και ινωδογόνου, η αναστολή της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και η διέγερση της λιπόλυσης και η μεταβολή της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και τη λειτουργία του ενδοθηλίου) καθώς έχει βρεθεί αυξημένη έκφρασή της στο στάδιο της ινώδους πλάκας της αθηροσκληρωτικής βλάβης (190; 191).

Προηγηθείσες μελέτες έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης IL-6 οδηγεί σε διπλασιασμό της έκτασης της αθηρωματικής πλάκας σε μύες με έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE^{-/-} deficient), επιβεβαιώνοντας τον προ-φλεγμονώδη ρόλο της κυτοκίνης (192). Παράλληλα, σε μύες ApoE^{-/-} ηλικίας 24 εβδομάδων με ταυτόχρονη έλλειψη του γονιδίου της IL-6 (IL6^{-/-}ApoE^{-/-} deficient mice) παρατηρήθηκε εξαιρετικά ταχεία ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών σε συνδυασμό με χαμηλή περιεκτικότητα σε κολλαγόνο, μειωμένη παραγωγή IL-10 και μειωμένη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων στις αθηρωματικές αλλοιώσεις (193). Σε άλλη μελέτη ωστόσο που συμπεριέλαβε μύες IL6^{-/-}ApoE^{-/-} ηλικίας 9 εβδομάδων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές με την ομάδα ελέγχου (190).

A.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΕ ΖΩΑ

A.3.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ο πειραματισμός σε ζώα, η ευρέως αποκαλούμενος *in vivo* πειραματισμός είναι η χρήση μη ανθρώπινων όντων σε πειράματα. Εκτιμάται παγκοσμίως ότι ο αριθμός των σπονδυλωτών ειδών ποικίλλει από δεκάδες εκατομμύρια ζώα και περισσότερα από 100 εκατομμύρια ετησίως. Μύες, επίμυες, πτηνά, ιχθύες, βάτραχοι κ.α. περιλαμβάνονται στη λίστα των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων (194). Η πλειοψηφία των πειραματοζώων θανατώνονται μετά το πέρας των πειραμάτων με ευθανασία (195). Οι πηγές προέλευσης ποικίλλουν από εκτροφές με σκοπό την ανατροφή πειραματοζώων με συγκεκριμένες προδιαγραφές έως και την αιχμαλώτιση από την άγρια φύση (196).

Η έρευνα διεξάγεται κυρίως σε πανεπιστήμια, φαρμακευτικές εταιρίες, ερευνητικά κέντρα και εμπορικές εγκαταστάσεις που παρέχουν υπηρεσίες πειραματισμού σε ζώα στη βιομηχανία (197). Τις περισσότερες φορές, η έρευνα αφορά στη γενετική, τη μελέτη της συμπεριφοράς, τη βιοϊατρική, τον έλεγχο φαρμάκων καθώς και δοκιμασίες τοξικότητας (κυρίως σε σχέση με τη χρήση καλλυντικών).

A.3.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι παλαιότερες αναφορές γύρω από τον πειραματισμό στα ζώα βρίσκονται στις γραφές των Αρχαίων Ελλήνων κατά το 2^ο και 4^ο π.Χ. αιώνα. Ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) και ο Ερασίστρατος (304-258 π.Χ.) ήταν ανάμεσα σε αυτούς που επεχείρησαν πειράματα σε ζωντανά ζώα (198). Ο Γαληνός, φυσιολόγος από τη Ρώμη (2^{ος} μ.Χ. αιώνας) έκανε ανατομία σε χοίρους και αίγες και έγινε γνωστός ως ο πατέρας της ζωτομίας.

Τα ζώα έχουν ακόμη χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα κατά την ανάπτυξη της βιοϊατρικής έρευνας. Το 1880, ο Louis Pasteur, παρουσίασε τη γονιδιακή θεωρία γύρω από τα φάρμακα στηρίζοντάς την σε ένα πείραμα κατά το οποίο ενσωμάτωσε άνθρακα στο γενετικό υλικό προβάτων (199). Η ινσουλίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1922 από κύνες, φέρνοντας την επανάσταση στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη (200). Στις 3 Νοεμβρίου 1957, η Λάικα, σκύλος από τη Σοβιετική Ένωση, ήταν ο πρώτος ζωντανός οργανισμός που μπήκε σε τροχιά γύρω από τη Γη. Τη δεκαετία του 1970, αναπτύχθηκαν αντιβιοτικά και εμβόλια κατά της λέπρας χάρη στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε armadillos (201). Ακολούθησαν τα πειράματα γενετικής που οδήγησαν στη γέννηση της Dolly το 1996, του πρώτου θηλαστικού που κλωνοποιήθηκε από ένα και μόνο ενήλικο κύτταρο (202). Τα τεστ τοξικότητας έγιναν δημοφιλή κατά των 20^ο αιώνα, καθώς κατά τον 19^ο αιώνα η νομοθεσία γύρω από τα φάρμακα και τα καλλυντικά ήταν λιγότερο αυστηρή. Η ανάγκη προέκυψε μετά το σκάνδαλο με το «Ελιξίριο του σουλφανιλαμιδίου) το 1937, όταν απεβίωσαν περισσότερα από 100 άτομα κατά τη χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η νομοθεσία όρισε τότε ως απαραίτητη τη διενέργεια ελέγχων ασφαλείας των

φαρμάκων με τη χρήση πειραματοζώων πριν την ευρεία κυκλοφορία τους στο εμπόριο. Οι τελικοί αυστηροί έλεγχοι καθορίστηκαν μετά την τραγωδία με τη θαλιδομίδη, τη δεκαετία του 1960.

A.3.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

Οι κανονισμοί που διέπουν τη χρήση πειραματοζώων διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος. Γενικά, οποιαδήποτε πειραματική διεργασία μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα πειραματόζωο, εάν αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί και να τεκμηριωθεί επιστημονικά ως απαραίτητη. Συνήθως, κάθε ίδρυμα με πειραματόζωα, έχει ως επικεφαλής έναν κτηνίατρο-σύμβουλο, ο οποίος καθοδηγεί τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επίσης, πρέπει να διασφαλίζεται ότι έχουν ληφθεί πρωτίστως υπόψιν οι εναλλακτικές της αποφυγής πειραματισμού σε ζώα, και ότι εξασφαλίζεται αναισθησία (με εξαίρεση την παρεμβολή της στα πειραματικά αποτελέσματα) (203).

Υπάρχει γενική αποδοχή ότι η ζωή των πειραματοζώων είναι σημαντική και ότι οι επιστήμονες οφείλουν να χρησιμοποιούν τον ελάχιστο δυνατό αριθμό (204). Παρόλα αυτά, οι αρχές θεωρούν τον πόνο ως το πιο σημαντικό ζήτημα και για το λόγο αυτό ορίζουν την ευθανασία ως το μέσο ελάττωσης του πόνου (205). Τα πειραματόζωα θυσιάζονται συνήθως στο τέλος των πειραματικών διεργασιών είτε για τη συλλογή δειγμάτων είτε και για τοξικολογική εξέταση. Η κυριότερη μέθοδος ευθανασίας είναι η ταχεία αναισθησία και θανάτωση χωρίς την πρόκληση πόνου (206) (Guide for the care and use of laboratory animals, 1996). Τα ζώα γενικώς εισπνέουν κάποιο αναισθητικό αέριο (π.χ. ισοφλουράνιο) και η θανάτωση γίνεται είτε με αποκεφαλισμό (decapitation – για τρωκτικά) είτε με αυχενική εξάρθρωση (για μύες, πτηνά κ.α.) είτε με τεμαχισμό (πτηνά μιας ημέρας) είτε με εγκεφαλική έκθεση σε υψηλής συχνότητας ακτινοβολία).

A.3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Η βασική έρευνα κατευθύνεται στον τρόπο συμπεριφοράς κάθε οργανισμού, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του και στην περίπτωση αυτή απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραματοζώων καθώς και αυξημένη ποικιλία ειδών. Φρουτόμυγες, νηματοειδείς έλμινθες, μύες και επίμυες αποτελούν τον κύριο όγκο των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων. Συνήθως, η καθαρή έρευνα ασχολείται με την εμβρυογένεση, τη στόχευση γονιδίων (207; 208), τη συμπεριφορά και την προσαρμοστικότητα των ζώων (209) αλλά και την εξέλιξη των ειδών (210).

Η εφαρμοσμένη έρευνα στοχεύει στην επίλυση σοβαρών και πρακτικών προβλημάτων και εφαρμόζεται κυρίως στη φαρμακευτική βιομηχανία και την πανεπιστημιακή κοινότητα. Αφορά κυρίως στην ανάπτυξη ζωικών μοντέλων για νόσους και το πρώιμο στάδιο της ανακάλυψης και σχεδιασμού νέων φαρμάκων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα περιλαμβάνουν τη γενετική τροποποίηση ζώων για τη μελέτη ασθενειών (211), τη χρήση νοσοúντων οργανισμών για την εφαρμογή και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας θεραπευτικών προσεγγίσεων (212; 213), τον έλεγχο τοξικότητας καλλυντικών και φαρμάκων και τις

διαφορετικές οδούς χορήγησης, τη διεξαγωγή μελετών αποτελεσματικότητας (φαρμακοδυναμική) φαρμάκων κ.α.

A.3.5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΟΝ *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟ

Τα ηθικά διλήμματα που προκύπτουν γύρω από την εφαρμογή πειραμάτων σε ζώα βρίσκονται υπό διερεύνηση και έχουν κατατεθεί πολλές απόψεις γύρω από το συγκεκριμένο ζήτημα. Αυτά έχουν να κάνουν κυρίως με το ποιες διαδικασίες είναι χρήσιμες και για ποιο σκοπό μπορούν να εφαρμοστούν σε *in vivo* πειραματισμό. Παγκοσμίως, είναι πλέον αποδεκτή η χρήση πειραματοζώων για επιστημονικούς και ιατρικούς σκοπούς, αρκεί να εξασφαλίζεται ότι τα πειραματόζωα δεν υποφέρουν και ότι χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός αριθμός (1985 Amendment to Animal Welfare Act).

Κατά γενική αποδοχή, έχει επικρατήσει ο κανονισμός των «3R» (204) ο οποίος περιλαμβάνει τα εξής:

1. **Replacement:** Αναφέρεται στην προτίμηση χρήσης άλλων μεθόδων και όχι της *in vivo* όπου αυτό είναι εφικτό (για την επίτευξη του ίδιου επιστημονικού σκοπού)
2. **Reduction:** Η χρήση του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματοζώων και η εξασφάλιση ότι από αυτόν θα ληφθεί η μέγιστη πληροφορία
3. **Refinement:** Αφορά στον περιορισμό του πόνου που υποφέρουν τα πειραματόζωα και την εξασφάλιση της ευζωίας τους στο μέτρο του δυνατού κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Search, 2012).

Βασιζόμενοι στα παραπάνω, οι επιστήμονες ανά τον κόσμο χρησιμοποιούν τις *in vivo* μεθόδους για την εξέλιξη της επιστημονικής γνώσης και την ανακάλυψη νέων δεδομένων που θα συμβάλλουν καταλυτικά στην θεραπεία ασθενειών, στην εξεύρεση λύσεων στα προβλήματα της σύγχρονης κοινωνίας κ.λπ.

A.3.6. ΟΙ $\text{ApoE}^{-/-}$ ΜΥΕΣ ΩΣ ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

Ο μυς (*Mus musculus*) είναι ένα παμφάγο μικρό θηλαστικό ζώο της τάξης των τρωκτικών και αποτελεί το πιο γνωστό και διαδεδομένο τρωκτικό στον κόσμο. Είναι δραστήριο κατά το λυκόφως και τη νύχτα.

A.3.6.1. Χαρακτηριστικά ζωικού προτύπου

Οι μύες ως πειραματικό ζωικό πρότυπο συγκεντρώνουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως είναι το μικρό μέγεθος (25-35 g σωματικού βάρους), που τους καθιστά εύκολους στο χειρισμό, και σε συνδυασμό με τη μικρή διάρκεια γενιάς (φθάνουν σε αναπαραγωγική ηλικία μέσα σε δύο μήνες κι έχουν προσδόκιμο ζωής 2 έτη) και το μεγάλο αριθμό απογόνων (4-6 ανά αναπαραγωγικό κύκλο) διευκολύνει τη γρήγορη δημιουργία μεγάλης αποικίας όμοιων ζώων. Το μικρό τους μέγεθος εξασφαλίζει μειωμένο κόστος συντήρησης τόσο όσον αφορά στη μονάδα πειραματόζωων (μικρή απαίτηση σε χώρο) όσο και στη διατροφή τους. Η μικρή διάρκεια ζωής είναι επίσης ένα πλεονέκτημα, καθώς επιταχύνει τον πειραματικό προγραμματισμό, ιδιαίτερα όταν αυτός απαιτεί τα πειραματόζωα να είναι ενήλικα. Στην περίπτωση της ανάπτυξης της νόσου της αθηρωμάτωσης σε μύες, αυτό μπορεί να επιτευχθεί γρήγορα, μέσα σε μόλις 4 μήνες ζωής. Ως θηλαστικό, ο μυς έχει μεγάλο βαθμό ομολογίας με τον άνθρωπο και επίσης είναι εξαιρετικά ανθεκτικό με υψηλή βιωσιμότητα μετά από χειρουργικές παρεμβάσεις.

Οι μύες παρουσιάζουν όμως και ορισμένα μειονεκτήματα, που αφορούν κυρίως σε τρεις παράγοντες. Το μικρό μέγεθος του ζώου, αν και αποτελεί - όπως προαναφέρθηκε - πλεονέκτημα, ταυτόχρονα δημιουργεί δυσκολία στη διεξαγωγή λεπτών χειρουργικών χειρισμών, αλλά και στην *in vivo* απεικόνιση, ενώ τα βιολογικά δείγματα που λαμβάνονται είναι πολλές φορές μικρά σε όγκο και επαρκούν για περιορισμένο αριθμό εξετάσεων. Η μικρή διάρκεια ζωής καθιστά δύσκολη την αναγωγή των φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε κλινική αντιστοίχιση, καθώς στο χρονικό πλαίσιο διεξαγωγής μιας μέσου μήκους μελέτης το πειραματόζωο θα έχει διανύσει μεγάλο τμήμα της ζωής του, πράγμα που αφενός δεν ανταποκρίνεται στα ανθρώπινα δεδομένα κι αφετέρου κάνει το στενό χρονικά σχεδιασμό του πειράματος επιτακτικό. Τέλος, ο μυς έχει σημαντικές διαφορές από τον ανθρώπινο οργανισμό, που θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ερμηνεία νοσημάτων και φαινομένων.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της χρήσης πειραματόζωων είναι οι απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (π.χ. διαίτα, θερμοκρασία, ημερήσιος κύκλος), αλλά επίσης το κοινό γενετικό υπόβαθρο (background) των πειραματικών ομάδων και η δυνατότητα ταυτόχρονης θεραπευτικής παρέμβασης σε όλα τα άτομα της μελέτης, στοιχεία που περιορίζουν την επίδραση εξωγενών παραγόντων, πράγμα αδύνατο σε κλινικές μελέτες. Επίσης, σε ανθρώπινο πληθυσμό είναι αδύνατη η στοχευμένη μελέτη γενετικών αλλαγών και η επακόλουθη επίπτωσή τους σε συγκεκριμένες παθογόνες διαταραχές, παρά μόνο με πληθυσμιακές μελέτες. Με τη χρήση όμως πειραματόζωων και τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, τέτοιου είδους μελέτες είναι εφικτές παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες. Στο γεγονός αυτό

συμβάλλει και η πληθώρα διαφορετικών ειδών, τα οποία προέρχονται από διασταυρώσεις γενετικά τροποποιημένων πειραματόζων σε διάφορους συνδυασμούς.

Ειδικότερα, στη μελέτη της αθηρωμάτωσης, τα ζωικά πρότυπα αποκτούν όλο και ευρύτερη εφαρμογή χάρη στην ευκολία δημιουργίας αθηρωμάτωσης και στην ικανοποιητική προσομοίωση με την ανθρώπινη παθοφυσιολογία. Το 2002, το Mouse Genome Sequencing Consortium δημοσίευσε εργασία σχετικά με την αποτελεσματικότητα και σταθερότητα της γονιδιακής σειράς C57BL/6J στην ανάπτυξη μεταβολικών διαταραχών σε μύες (214). Με το γενετικό αυτό υπόστρωμα ως βάση, και με μεθόδους μοριακής γενετικής δόθηκε η δυνατότητα προσθήκης εξωγενών γονιδίων στους μύες. Έτσι, στους μύες αυτούς αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν τεχνικές αφαίρεσης (knockout) ή αντικατάστασης (replacement) ενδογενών γονιδίων. Η ανάπτυξη τέτοιων τεχνικών ώθησε στη χρήση τους σε πειράματα για τη στοχευμένη μελέτη της έκφρασης και παραγωγής μακρομορίων σε συγκεκριμένες καταστάσεις.

A.3.6.2. Οι μύες με ομόζυγη έλλειψη της απολιπρωτεΐνης E

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες, ομόζυγοι ως προς την έλλειψη της απολιπρωτεΐνης E (ApoE knockout mice – ApoE^{-/-}). Η απολιπρωτεΐνη E (ApoE) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 34kDa η οποία συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και τον εγκέφαλο, ενώ η ίδια αποτελεί συστατικό όλων των λιποπρωτεϊνών, με εξαίρεση τη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL).

Η κύρια λειτουργία της ApoE είναι η σύνδεση, με ισχυρή συγγένεια, με τους υποδοχείς της απολιπρωτεΐνης B, της LDL και των χυλομικρών του ήπατος. Με αυτό τον τρόπο διαμεσολαβεί στην πρόσληψη από το ήπαρ ορισμένων λιποπρωτεϊνών (215). Επίσης, είναι παρούσα σε λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που μεταφέρουν τη χοληστερόλη από τις τροφές και το ήπαρ και επομένως λειτουργεί ως διαμεσολαβητής με τους αντίστοιχους υποδοχείς, οι οποίοι απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα υπολείμματα χυλομικρών και τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL). Παρά το γεγονός ότι οι ηπατικοί υποδοχείς της LDL μπορούν να συνδεθούν με λιποπρωτεΐνες που περιέχουν τόσο LDL όσο και ApoE λιποπρωτεΐνες, η κάθαρση των λιπιδικών υπολειμμάτων από τους υποδοχείς της LDL εξαρτάται μόνο από την ApoE (216). Παράλληλα, η ApoE συντίθεται από μονοκύτταρα και μακροφάγα των αγγείων και πιστεύεται πως ασκεί αρνητική δράση τοπικά στην ομοιοστασία της χοληστερόλης και τη φλεγμονώδη διαδικασία των αθηροσκληρωτικών αγγείων (217). Τέλος, είναι γνωστό ότι η εν λόγω γλυκοπρωτεΐνη συμμετέχει στη χολική έκκριση της χοληστερόλης (218). Συνολικά, η ApoE συμμετέχει στην κάθαρση των λιποπρωτεϊνών, που προέρχονται από τον αγγειακό ιστό, στο ήπαρ και επομένως διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της αθηρωμάτωσης (219).

Το ζωικό πρότυπο μύων με ομόζυγη έλλειψη της ApoE (ApoE^{-/-}) δημιουργήθηκε με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της ApoE στην αθηρωμάτωση. Μετά την ανάπτυξή του, καθιερώθηκε ως δημοφιλές μοντέλο

αθηρωμάτωσης λόγω της ευκολίας ανάπτυξης της νόσου αλλά επίσης και λόγω των ομοιοτήτων που η παθοφυσιολογία της νόσου παρουσιάζει με αυτή του ανθρώπου.

Οι ApoE^{+/-} και οι ApoE^{-/-} μύες δε διαφέρουν ως προς το σωματικό τους βάρος από τους φυσιολογικούς C57BL/6J μύες, ούτε έχουν διακριτές εξωτερικές διαφορές. Υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων και το λιπιδαιμικό τους προφίλ, καθώς οι ApoE^{-/-} μύες έχουν μέχρι και 500% αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Τα επίπεδα αυτά δεν επηρεάζονται από την ηλικία ή το φύλο των πειραματόζωνων. Αντίθετα, οι τιμές της HDL στα γενετικώς τροποποιημένα ζώα αντιστοιχούν στο 45% των φυσιολογικών τιμών, ενώ τα τριγλυκερίδια είναι συνήθως κατά 68% αυξημένα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μύες. Παρατηρείται λοιπόν σημαντική μετατόπιση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από την HDL, που αποτελεί την κύρια λιποπρωτεΐνη μεταφοράς σε φυσιολογικούς μύες, σε χαμηλής περιεκτικότητας υπολείμματα χυλομικρών και VLDL. Όπως προαναφέρθηκε, στους μύες υπάρχουν υψηλά επίπεδα HDL και χαμηλά επίπεδα LDL, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει στον άνθρωπο. Επιπλέον, οι μύες στερούνται της πρωτεΐνης μεταφοράς του χοληστερολικού εστέρα, ενός ενζύμου το οποίο μεταφέρει τον χοληστερολικό εστέρα από την HDL στη VLDL και στην LDL. Παρά τις παραπάνω διαφορές οι ApoE^{-/-} μύες παρουσιάζουν αξιοσημείωτες φαινοτυπικές ομοιότητες με τους ανθρώπους που έχουν έλλειψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Έτσι, με φυσιολογική διαίτα, οι ApoE^{-/-} μύες εμφανίζουν τιμές ολικής χοληστερόλης ίσες περίπου με 500 mg/dL, κυρίως μέσα σε κλάσματα VLDL και χυλομικρών, ενώ η ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών είναι ταχεία και συγκεντρώνει όλα σχεδόν τα χαρακτηριστικά της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης στους ανθρώπους.

Οι ApoE^{-/-} μύες αναπτύσσουν αθηρωματικές πλάκες οι οποίες προσομοιάζουν με εκείνες του ανθρώπου και για το λόγο αυτό θεωρούνται ένα έγκυρο και αποτελεσματικό ζωικό πρότυπο μελέτης της αθηρωμάτωσης (220). Η προσομοίωση των χαρακτηριστικών της αθηρωματικής νόσου του ανθρώπου από το μοντέλο αυτό έχει οδηγήσει σε μια ευρείας κλίμακας χρήση του για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας της αθηρωμάτωσης και για την ανάλυση των παραγόντων που επηρεάζουν το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας και τη σύστασή της, αλλά και για τη μελέτη των επιδράσεων φαρμακολογικών ή μη παρεμβάσεων (221).

A.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αθηρωμάτωση είναι μια πάθηση του αρτηριακού τοιχώματος που χαρακτηρίζεται από τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, συσσώρευση λιπιδίων, φλεγμονωδών κυττάρων, λείων μυϊκών κυττάρων, υπολειμμάτων νέκρωσης και άλλων εξωκυττάρων ουσιών στην έσω στοιβάδα του αγγειακού ιστού και συνδέεται με την εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων και οξέων συμβαμάτων. Αποτελεί μια συστηματική, πολυπαραγοντική διαταραχή με μακρόχρονες διαδικασίες εξέλιξης, η έναρξη των οποίων συμβαίνει από πολύ νωρίς, από την πρώτη κιόλας δεκαετία ζωής του ανθρώπου. Καθώς είναι μια παθολογική κατάσταση υπεύθυνη για μεγάλη πλειοψηφία περιστατικών νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως, το ερευνητικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη διερεύνηση των μηχανισμών ανάπτυξής της, με γνώμονα την πρόληψη και αναστολή της αθηρογένεσης και της ταχείας εξέλιξης της νόσου, και με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη παρεμβάσεων αναχαίτισής της.

Παρότι μέχρι πρόσφατα οι κλινικές επιπτώσεις της αθηρωμάτωσης έδειχναν να σχετίζονται με το στενωτικό χαρακτήρα της νόσου, και η αθηρωμάτωση αντιμετωπιζόταν κατά κύριο λόγο αναλόγως, τα τελευταία χρόνια έχει μετατοπιστεί το βάρος της προσοχής στη σύσταση της αθηρωματικής πλάκας, που την καθιστά επιρρεπή ή μη σε ρήξη. Η σύσταση της αθηρωματικής αλλοίωσης, η οποία επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, διαμορφώνει τους όρους εξέλιξης και πρόγνωσης της καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, φαίνεται πως τα ποιοτικά κυρίως και λιγότερο τα ποσοτικά χαρακτηριστικά μιας στενωτικής βλάβης προσδιορίζουν το βαθμό επικινδυνότητάς της κι επηρεάζουν την τελική της έκβαση.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη στροφή της επιστημονικής κοινότητας στη χρήση φυτικών σκευασμάτων για την πρόληψη νοσημάτων αλλά και συνδυαστικά με τη φαρμακευτική αγωγή για την υποβοήθηση της θεραπείας.

Ο Κρόκος Κοζάνης είναι ένα φυτό το οποίο, με την πληθώρα των ιδιοτήτων του, και κυρίως με την αντιοξειδωτική του δράση καθίσταται υποψήφιο για την πρόληψη και αναστολή της νόσου της αθηρωμάτωσης.

Στόχοι της παρούσας μελέτης, ήταν:

- 1) Η παρασκευή, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ως προς τα κύρια δραστικά συστατικά στερεού υδατικού εκχυλίσματος των στιγμάτων του φυτού *Crocus sativus* (SFE),
- 2) Η *in vitro* μελέτη της σταθερότητας ως προς την περιεκτικότητά του σε δραστικά συστατικά,
- 3) Η *in vivo* μελέτη της φαρμακοκινητικής του κύριου αντιοξειδωτικού συστατικού του (κροκίνη-κροκετίνη) και ο προσδιορισμός της απαιτούμενης δόσης χορήγησης για τη μελέτη της αντιαθηρωματικής δράσης

4) Η διερεύνηση της πιθανής αντιαθηρωματικής του δράση σε εξειδικευμένο ζωικό πρότυπο μετά από χορήγηση 3 διαφορετικών δόσεων (30 – 60 – 90 mg/kg σωματικού βάρους).

Η αντιαθηρωματική δράση μελετήθηκε α) μακροσκοπικά (έκταση και σύσταση αθηρωματικής πλάκας), β) με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημείας για τη διερεύνηση πιθανού μηχανισμού δράσης (επίδραση στις MMPs, φλεγμονώδεις παράγοντες) και γ) με πειράματα μελέτης της έκφρασης των εμπλεκόμενων γονιδίων με τη βοήθεια RT-qPCR για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**B.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΒΑΣΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ****B.1.1.ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

Για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

1. Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους Pharmaspec UV-1700 (UV-Vis Spectrophotometer)- SHIMADZU
2. Κυψελίδες από χαλαζία, 9-Q-10mm Semi Micro Rectangular Quartz cell with 10mm P/L 2 off Lightpath Optical (UK) LTD.
3. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης - HPLC-PDA με αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu το οποίο αποτελείται από αντλία LC-20AD, απαερωτή (degasser), DGU-20A5R, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-HTc, θερμοστατούμενο θάλαμο («φούρνο») CTO-20AC και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A.
4. Ζυγός: Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός KERN AEJ (max 220g, min 0.01g)
5. Ανακινούμενο-θερμοστατούμενο υδατόλουτρο με σκέπαστρο P Selecta, Unitronic or για ανάδευση και θερμοστάτηση δειγμάτων
6. Vortex IKA MS 3 Basic
7. Λυοφιλοποιητής Cryodos TELSTAR Model CRYODOS – 50 2002
8. Πεχάμετρο: Schott Lab 360
9. Συσκευή διήθησης AFORA 5810/3, 5810/4
10. Χωνί διήθησης Buchner
11. Κωνική φιάλη κενού για διήθηση
12. Ιστοκινέτα TP1020 - Semi-enclosed Benchtop Tissue Processor Leica Biosystems GmbH Wetzlar, Germany
13. Μικροτόμος RM2255 - Fully Automated Rotary Microtome Leica Biosystems GmbH Wetzlar, Germany
14. Συσκευή έγκλεισης σε παραφίνη #5100 - Tissue-Tek TEC 5, Sakura Finetek Torrance, CA, USA
15. Μαγνητικός αναδευτήρας
16. Θερμοστατούμενο λουτρό υπερήχων, Elma 100H Elmasonic
17. Γυάλινα σκεύη
18. Μικροσκόπιο Leica
29. Φασματογράφος Bruker DRX 400 (399.95 MHz για $^1\text{H-NMR}$)
20. Φυγόκεντρος
21. Στήλη Hichrom CRI C18 (30 cm x 7.75 mm i.d.) – Ημιπαρασκευαστική μέθοδος

22. Στήλη Hypersil BDS C18 5 μm (4.6 x 150 mm)
23. Στήλη Knauer C18 Eurospher II (50 x 4.6 mm)
24. Μηχάνημα qPCR MJ Research
25. NanoDrop Thermo Fischer Scientific

B.1.2. ΑΝΤΙΔΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ-ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια και υλικά:

- CD_3OD (3.31 ppm για $^1\text{H-NMR}$ και 49.5 ppm για $^{13}\text{C-NMR}$).
- Crocin (Ευγενική χορηγία του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
- Dextrose 10%, αμπούλες των 5 mL, DEMO S.A.
- DPX glue
- Formalin 10 % (10 % Neutral Buffered Formalin Solution), VWR Radnor, PA, USA
- Hematoxylin – Eosin solutions
- KAPA Probe Fast Kit
- KAPA Taq PCR Kit
- MAC-3
- Masson's trichrome staining kit
- Monoclonal α -actin antibody. 1mL concentrate. Cat. No: MSK030 Zytomed Systems
- Monoclonal antibody IL-6 purified. C = 0.2 mg/mL. Cat. No: AM33491PU-T Acris Antibodies
- Monoclonal antibody MMP-2 purified. C = 0.2 mg/mL Cat. No: AM00257PU-N Acris Antibodies
- Monoclonal MCP-1 antibody purified. C = 1.0 mg/mL. Cat. No: AM06749PU-N Acris Antibodies
- Monoclonal TIMP-2 antibody – 0.2 mL Cat. No: NBP1-42375 Novus Biologicals
- Nucleospin® totalRNA FFPE, Macherey-Nagel
- Polyclonal antibody MMP-3 purified. C = 1.0 mg/mL Cat. No: AP06233PU-N Acris Antibodies
- Polyclonal MMP-9 antibody – 0.1 mg lyophilized – Cat. No: NBP1-57940 Novus Biologicals
- Polyclonal TNF- α antibody purified. C = 1.0 mg/mL. Cat. No: AP20373PU-N Acris Antibodies
- Poly-L-lysine slides Gerhard Menzel GmbH Braunschweig, Germany
- Primers (περιγράφονται αναλυτικά σε πίνακα – TIB Molbiol)
- PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time- Roche Diagnostics)
- Rings ιστοχημείας embedding rings, KALTEK srl Padova, Italy
- Safranin (Sigma Aldrich CAS116-26-7. CIOHIYO) W338907-25G-K
- Sirius Red solution

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics)
- Tween 20
- Water for injection, αμπούλες των 5 mL, DEMO S.A.
- Zytomed Permanent AEC kit
- Zytomedm Plus HRP kit
- Αθηρογόνο τροφή Harlan Teklad Madison, WI USA (Western type diet)
- Αιθανόλη (100%) Ethanol Absolute $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ MB=46,07g/mol Panreac
- Ακετονιτρίλιο
- Απιονισμένο νερό
- β -glucuronidase from *Helix pomatia* Type H-1 196000 units/g solid, Sigma-Aldrich
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)
- Δισόξινο φωσφορικό Νάτριο (ένυδρο), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ MB=156,02 g/mol Merck Darmstadt Germany
- Ισοφλουράνιο TEVA UK Limited
- Καλούπια έγκλεισης base mould - 15x15x06 mm, KALTEK srl Padova, Italy
- Καλυπτρίδες
- Καψάκια ιστοχημείας embedding cassettes, KALTEK srl Padova, Italy
- Κιτρικό νάτριο (Sodium citrate dehydrate)
- Κουρκουμίνη (εσωτερικό πρότυπο)
- Μεθανόλη (CH_3OH) βαθμού καθαρότητας HPLC Fischer Scientific
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4)
- Νερό HPLC
- Ξυλόλη X/0250/17 - Xylene Analytical reagent grade, VWR Radnor, PA, USA
- Οξικό Νάτριο (CH_3COONa) MB=82,03g/mol Merck Darmstadt Germany
- Παγόμορφο οξικό οξύ (CH_3COOH glacial) MB=60,05 g/mol Merck Darmstadt Germany
- Παραφίνη 720-0250 - Parammat extra pastillated Gurr, VWR Radnor, PA, USA
- Πυκνό υδροχλωρικό οξύ (π. HCl) 37% 2,5 L Carlo EBBA
- Ρυθμιστικά διαλύματα (pH 4.0, 7.0, 10.0) για τη βαθμονόμηση του πεχάμετρου
- Σπόγγοι ιστοχημείας protective biopsy pads, KALTEK srl Padova, Italy
- Στίγματα σαφράν (ένωση κροκοπαραγωγών Κοζάνης)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) MB=40,00g/mol Merck Darmstadt Germany
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)

- Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) MB=58,44 g/mol Panreac

B.1.3. ΒΑΣΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M pH 4.5

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 0,1 M, σε ένα ποτήρι ζέσεως των 600ml διαλύονται 4,1g CH_3COONa σε περίπου 400 ml H_2O με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Το pH ρυθμίζεται στο 4.5 με την προσθήκη CH_3COOH στάγδην υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml και αραιώνεται έως την χαραγή με νερό.

Διάλυμα παρακαταθήκης σαφρανάλης

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προστίθεται 1,0 μl σαφρανάλης κι αναμιγνύεται με μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC. Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος παρακαταθήκης είναι 1,0 mg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο.

Διάλυμα παρακαταθήκης κροκίνης

Η πρότυπη ουσία κροκίνης μας χορηγήθηκε από τον Τομέα Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων σε μορφή πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 1,0 mg/mL (διάλυμα παρακαταθήκης Α). Από το διάλυμα Α, 3.6 mL αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL με μεθανόλη HPLC και προκύπτει νέο διάλυμα κροκίνης συγκέντρωσης 0,18 mg/mL. Το διάλυμα παρακαταθήκης Β χρησιμοποιείται για την Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Διάλυμα παρακαταθήκης κροκετίνης

Ζυγίζονται 1 mg πρότυπης ουσίας κροκετίνης και διαλύονται σε 10 mL DMSO. Το τελικό διάλυμα που φυλάσσεται σε κατάψυξη έχει συγκέντρωση 100 μg/mL.

Διάλυμα παρακαταθήκης εσωτερικού προτύπου κουρκουμίνης

Ζυγίζονται 1 mg πρότυπης ουσίας κουρκουμίνης και διαλύονται σε 20 mL DMSO. Το τελικό διάλυμα που φυλάσσεται σε κατάψυξη έχει συγκέντρωση 50 μg/mL.

Διάλυμα ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης 3000 units/mL

Ζυγίζονται 3,2 mg ενζύμου και διαλύονται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών. Το διάλυμα του ενζύμου παρασκευάζεται και χρησιμοποιείται αυθημερόν.

Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών

Σε 1000mL απιονισμένου νερού διαλύονται υπό ανάδευση 2,94g sodium citrate (dihydrate). Στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται στο 6.0 με διαδοχικές ρίψεις σταγόνων HCl 1N. Τέλος, προστίθενται 0,5ml Tween20 και γίνεται καλή ανάδευση.

Phosphate buffer saline (PBS) 10x

Για την παρασκευή 1L 10x stock solution πραγματοποιείται διάλυση με καλή ανάδευση σε 800mL απιονισμένου νερού 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄ και 2.4g of KH₂PO₄. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 με ρίψεις σταγόνων HCl 1N ή NaOH 1N, αν χρειαστεί. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι του 1L με απιονισμένο νερό. Πριν τη χρήση, γίνεται αραίωση 1:10 με απιονισμένο νερό.

B.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ *IN VITRO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Crocus sativus***B.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΚΡΟΚΟΥ (SFE)**

Ζυγίζονται 3 g στιγμάτων Κρόκου Κοζάνης και μεταφέρονται σε φιάλη με πώμα μαζί με 37,5 mL απιονισμένου νερού. Η φιάλη σφραγίζεται και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο για 3 ημέρες. Μετά το πέρας των 3 ημερών, το περιεχόμενο διηθείται και το διήθημα μεταφέρεται σε καινούρια φιάλη, ψύχεται στον υπερκαταψύκτη και ακολουθεί λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του νερού.

Αμέσως μετά τη λυοφιλοποίηση, ζυγίστηκε το προϊόν της εκχύλισης (SFE) για τον υπολογισμό της απόδοσης της παρασκευαστικής μεθόδου η οποία βρέθηκε ίση με 85%.

B.2.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ SFE

Η αποτύπωση του χημικού προφίλ των εκχυλισμάτων επιτυγχάνεται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP₁₈-HPLC) συνδεδεμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD, Diode Array Detector). Η απομόνωση των ουσιών του SFE μετά απο ανασύσταση με νερό και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 50/50 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ημι-παρασκευαστικής μεθόδου HPLC που ακολουθήθηκε (222) και περιλαμβάνει τις εξής συνθήκες:

- Τύπος έκλουσης: Βαθμιδωτή
- Στήλη: Hichrom CRI C18 (30 cm x 7.75 mm id)
- Ροή: 2 mL/min
- λ_{max}: 250, 308 και 328 nm
- Loop: 500 μL

Κινητή φάση: Linear gradient από 20% έως 100% ακετονιτρίλιο σε νερό για 30 λεπτά, ενώ ο χρόνος της ένεσης του δείγματος ορίστηκε σε 35 min.

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης με σκοπό τη συλλογή των κλασμάτων των διαφορετικών ουσιών του εκχυλίσματος ζυγίστηκαν 84.0 mg λυόφιλου προϊόντος και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 50-50 με τελική συγκέντρωση 7 mg/mL. Ακολούθησε η ημι-παρασκευαστική ανάλυση HPLC, και με βάση το χρωματογράφημα συνελέγησαν διαφορετικά κλάσματα. Ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε χαμηλή θερμοκρασία υπό κενό των συλλεχθέντων κλασμάτων σε προζυγισμένες φιάλες. Τα συμπυκνωμένα κλάσματα τοποθετήθηκαν σε ενεργοποιημένο ξηραντήρα υπό κενό για την απομάκρυνση όλης της περιεχόμενης υγρασίας. Εν συνεχεία, τα κλάσματα ζυγίστηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) για να γίνει ο έλεγχος των ληφθέντων υπολειμμάτων με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, σε φασματογράφο Bruker DRX 400 (399.95 MHz για $^1\text{H-NMR}$). Τα φάσματα ελήφθησαν με διαλύτη CD_3OD δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (3.31 ppm για $^1\text{H-NMR}$). Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz).

B.2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΑΦΡΑΝΑΛΗΣ

Η ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας του SFE σε κροκίνη και σαφρανάλη, τις 2 κυριότερες ουσίες που θεωρητικά περιέχονται σε αυτό πραγματοποιήθηκε στο σύστημα HPLC-PDA Shimadzu και η μέθοδος των Valle García-Rodríguez et al (223) με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Τύπος έκλουσης: Βαθμιδωτή (gradient)
- Στήλη: Hypersil BDS C18 column (5 μm , 150 \times 4.6 mm)
- Κινητή φάση: (A): H_2O και (B): ACN. Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή με το ακόλουθο σχήμα: 20% B: 0-5 min, 20-80% B 5-15 min, 80% B 15-20 min
- Ροή: 0,8 mL/min
- Loop : 20 μL
- λ_{max} : 330 και 440 nm (για τη σαφρανάλη και την κροκίνη αντίστοιχα).
- R_t crocin = 18 min, R_t safranal = 24 min

Για την ποσοτικοποίηση του SFE ζυγίστηκαν 4.5 (± 0.5) mg εκχυλίσματος και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 1 mL νερού καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια 150 μL από το διάλυμα αραιώθηκαν περαιτέρω νερό HPLC σε τελικό όγκο 10 mL.

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία:

1. Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης κροκίνης με ζύγιση 10 mg κροκίνης και διάλυσης σε 50 mL

MeOH (C=0.18 mg/mL). Το διάλυμα διατηρείται στην κατάψυξη στους -20 °C.

2. Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης σαφρανάλης με ζύγιση 10 mg SIGMA safranai και διάλυση σε 10 mL MeOH (C=0.88 mg/mL). Το διάλυμα διατηρείται στην κατάψυξη στους -20 °C.
3. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας κροκίνης και σαφρανάλης με κατάλληλη αραίωση σε κινητή φάση A.

B.2.4. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ SFE ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ

Για τη μελέτη της σταθερότητας του παρασκευασθέντος SFE πραγματοποιούνται μετρήσεις τόσο στο ξηρό λυόφιλο εκχύλισμα όσο και σε ανασυσταμένο σε νερό διάλυμα (που αποτελεί και το μέσο διάλυσης για τις επερχόμενες χορηγήσεις κατά τις *in vivo* μελέτες σε μύες).

Για το λυόφιλο SFE πραγματοποιήθηκε αρχικά ποσοτικοποίηση την ημέρα παρασκευής του, ως προς την κροκίνη. Η σταθερότητα ως προς την περιεκτικότητα σε σαφρανάλη δεν μελετήθηκε λόγω της χαμηλού ποσοστού παρουσίας της στο υδατικό εκχύλισμα.

Κατά τη διαδικασία αυτή ζυγίζονται 2 mg του SFE την ημέρα που ολοκληρώνεται η λυοφιλοποίηση, και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL όπου διαλύονται με νερό. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση ως προς την περιεχόμενη κροκίνη με τη μέθοδο HPLC-PDA που αναφέρεται στην παράγραφο B.2.3.

Το λυόφιλο SFE φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, απουσία φωτός και υγρασίας και ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2, 4, 7, 11, 14, 20, 45, 90 και 120 μέρες) ζυγίζονται εκ νέου 2 mg τα οποία διαλύονται σε 10 mL νερού και αφού αραιωθούν γίνεται ποσοτικοποίηση ως προς κροκίνη, με σκοπό να διαπιστωθεί εάν το ξηρό λυόφιλο εκχύλισμα είναι σταθερό με την πάροδο του χρόνου.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μελέτη σταθερότητας και σε ανασυσταμένο διάλυμα λυόφιλου SFE. Συγκεκριμένα ζυγίζονται 2 mg του εκχυλίσματος του κρόκου μόλις αυτό παρασκευαστεί, και τοποθετούνται σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL όπου διαλύονται με νερό και φυλάσσονται στο ψυγείο. Στη συνέχεια,) ακολουθεί ποσοτικοποίηση ως προς την περιεχόμενη κροκίνη σε συγκεκριμένους χρόνους (0, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h). Ο λόγος της μέτρησης της συγκέντρωσης της κροκίνης και στο ανασυσταμένο διάλυμα κατά τη διάρκεια της ημέρας είναι για να διερευνηθεί εάν το διάλυμα μπορεί να συντηρηθεί και να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες από μια χορηγήσεις στις *in vivo* μελέτες σε μύες.

Στα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν μεταξύ των μετρήσεων τα διαλύματα φυλάσσονται στο ψυγείο, απουσία φωτός.

B.3. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ SFE ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΕΣ

B.3.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η φαρμακοκινητική μελέτη του SFE αφορά σε ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα του βασικού βιοδραστικού συστατικού του εκχυλίσματος, της κροκετίνης (υδρολυμένη μορφή της κροκίνης, του κύριου συστατικού του SFE), στον ορό του αίματος και στους ιστούς με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος και να προσδιοριστούν οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι και η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα μετά από *peros* χορήγηση. Επιπλέον, είναι απαραίτητη για τον καθορισμό του εύρους των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν στην *in vivo* μελέτη της αντιαθηρωματικής δράσης.

Χρηιάστηκαν 80 μύες του γένους C57BL/6J (wild type) εκ των οποίων 40 χρησιμοποιήθηκαν για την ενδοφλέβια και 40 για την από του στόματος χορήγηση. Η δόση καθορίστηκε και για τις 2 οδούς χορήγησης σε 60 mg/kg σωματικού βάρους. Η δόση σε μL διέφερε από μm σε μm με σκοπό την εξασφάλιση της ίδιας δόσης σε mg/kg σε όλα τα ζώα. Οι μύες χωρίστηκαν σε ομάδες των 5, καθεμιά από τις οποίες αποτελούσε και ένα χρονικό σημείο. Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες με ολική αφαίμαξη με την τεχνική της καρδιοπαρακέντησης υπό πλήρη αναισθησία με ισοφλουράνιο και εν συνεχεία ακολούθησε η λήψη ιστών (καρδιά, ήπαρ, εγκέφαλος, σπλήνας, πνεύμονες, νεφροί) για τον προσδιορισμό των επιπέδων κροκετίνης (του μεταβολίτη της κροκίνης). Τα χρονικά σημεία που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ήταν τα ακόλουθα: 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 min. Όλα τα δείγματα (ο ορός του αίματος λαμβάνονταν με άμεση φυγοκέντρηση του ολικού) φυλάσσονταν στους -70°C μέχρι την ανάλυση με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με βελτιστοποίηση της ήδη υπάρχουσας από τη βιβλιογραφία (224) για την ανάλυση τόσο των δειγμάτων αίματος όσο και των ιστών έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Τύπος έκλουσης: Ισοκρατική
- Στήλη: Knauer C18 Eurospher II 50 x 4.6 mm
- Ροή: 0.5 mL/min
- Κινητή φάση: MeOH-H₂O-CH₃COOH: 75-24.5-0.5
- $\lambda_{\text{max}} = 423 \text{ nm}$
- Θερμοκρασία δωματίου
- Loop: 20 μL

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων ελεύθερης κροκετίνης στον ορό του αίματος η επεξεργασία του δείγματος ήταν η εξής: 25 μL ορού αίματος αναμιγνύονται με 50 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου κουρκουμίνης σε ακετονιτρίλιο ενώ στο μίγμα προστίθενται 5 μL DMSO. Ακολούθησε έντονη περιδίνηση με vortex για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τη βοήθεια του ακετονιτριλίου και στη συνέχεια

φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό ενίεται απευθείας προς ανάλυση σε όγκο 20 μL . Για την αντιστοίχιση των λαμβανόμενων κορυφών με συγκεντρώσεις χρειάστηκε η κατασκευή καμπυλών αναφοράς σε blank πλάσμα αίματος. Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς περιλαμβάνει την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας πρότυπης κροκετίνης σε DMSO σε εύρος συγκεντρώσεων 0,25-25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Στη συνέχεια, 25 μL blank ορού αναμιγνύονται με 5 μL από το κάθε διάλυμα εργασίας και 50 μL εσωτερικού προτύπου σε ακετονιτρίλιο σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία. Οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς βρίσκονται στο εύρος 0,05-5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων ολικής κροκετίνης στον ορό του αίματος η επεξεργασία του δείγματος ήταν η εξής: 15 μL ορού αίματος αναμιγνύονται με 45 μL διαλύματος ενζύμου β -γλυκουρονιδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5.0. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης στα δείγματα προστίθενται 5 μL DMSO και 120 μL εσωτερικού προτύπου κουρκουμίνης σε ακετονιτρίλιο. Ακολουθεί έντονη περιδίνηση με vortex για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό ενίεται απευθείας προς ανάλυση σε όγκο 20 μL . Για την αντιστοίχιση των λαμβανόμενων κορυφών με συγκεντρώσεις χρειάστηκε η κατασκευή καμπυλών αναφοράς σε blank πλάσμα αίματος. Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς περιλαμβάνει την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας πρότυπης κροκετίνης σε DMSO σε εύρος συγκεντρώσεων 0,25-25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Στη συνέχεια, 15 μL blank ορού αναμιγνύονται με 5 μL από το κάθε διάλυμα εργασίας, 45 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών και 120 μL εσωτερικού προτύπου σε ακετονιτρίλιο σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία. Οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς βρίσκονται στο εύρος 0,5-30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Οι μετρήσεις τόσο για την ελεύθερη όσο και για την ολική κροκετίνη αφορούν στον υπολογισμό του λόγου του εμβαδού των κορυφών που παρατηρούνται στο χρωματογράφημα για την κροκετίνη και την κουρκουμίνη (εσωτερικό πρότυπο) αντίστοιχα. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου περιορίζει το μέγεθος του σφάλματος κατά την αναλυτική διαδικασία. Για την επεξεργασία των ιστών, χρειάστηκε ομογενοποίηση του κάθε ιστού ξεχωριστά σε φυσιολογικό ορό σε αναλογία βάρους 1:3. Το τελικό διάλυμα υπόκειται σε επεξεργασία όμοια με αυτήν του ορού έτσι ώστε να γίνει η μέτρηση με υγρή χρωματογραφία. Οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάζονται σε blank ιστούς.

B.4. IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ SFE ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

B.4.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 αρσενικοί $ArpE^{-/-}$ μύες. Μετά τον απογαλακτισμό τους, σε ηλικία 3 εβδομάδων, χορηγήθηκε στους μύες φυσιολογική τροφή για χρονικό διάστημα 5 εβδομάδων, για την ολοκλήρωση της βιολογικής τους ωρίμανσης. Σε ηλικία 8 εβδομάδων ξεκινούν τη λήψη αθηρογόνου/διαβητογόνου τροφής [High Fat Diet-HFD: με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και χοληστερόλη (21% λίπος, 0,15% χοληστερόλη και 19,5% καζεΐνη, Harland, Teklad, TD88137)] για χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων έτσι ώστε να αυξήσουν το βάρος τους (συνήθως διπλάσιο του μέσου όρου των 20-21g) αλλά και για την ανάπτυξη επαρκούς αθηρωμάτωσης. Στο πείραμά μας μετά το πέρας των 12 εβδομάδων σίτισης με HFD, τα ζώα τυχαιοποιήθηκαν σε 5 ισάριθμες ομάδες:

1. Ομάδα baseline (BLG, n=10): Τα συγκεκριμένα ζώα στο πέρας των 12 εβδομάδων χορήγησης αθηρογόνου τροφής θανατώθηκαν για να αποτελέσουν την ομάδα σύγκρισης.

2. Ομάδα ελέγχου (Control, COG, n=10): Τα συγκεκριμένα ζώα συνέχισαν τη σίτιση με HFD ενώ καθημερινά και για 4 εβδομάδες υποβάλλονταν στην τεχνική του gavage (δι-οισοφάγειος καθετήρας για peros χορήγηση) λαμβάνοντας απλό ενέσιμο ύδωρ (200 μ L water for injection).

3. Ομάδα κρόκου 1 (SF1-Saffron Group 1, n=10): Τα ζώα της ομάδας αυτής συνέχισαν επίσης τη σίτιση με HFD, αλλά καθημερινά και για 4 εβδομάδες λάμβαναν από του στόματος ανασυσταμένο σε ενέσιμο ύδωρ SFE σε δόση 30 mg/kg βάρους.

4. Ομάδα κρόκου 2 (SF2-Saffron Group 2, n=10): Τα ζώα της ομάδας αυτής συνέχισαν επίσης τη σίτιση με HFD, αλλά καθημερινά και για 4 εβδομάδες λάμβαναν από του στόματος ανασυσταμένο σε ενέσιμο ύδωρ SFE σε δόση 60 mg/kg βάρους.

5. Ομάδα κρόκου 3 (SF3-Saffron Group 3, n=10): Τα ζώα της ομάδας αυτής συνέχισαν επίσης τη σίτιση με HFD, αλλά καθημερινά και για 4 εβδομάδες λάμβαναν από του στόματος ανασυσταμένο σε ενέσιμο ύδωρ SFE σε δόση 90 mg/kg βάρους.

Ακολούθησε αρίθμηση και σήμανση των μυών και ζύγιση του σωματικού τους βάρους με ηλεκτρονικό ζυγό. Οι μύες επεστράφησαν στους κλωβούς τους (2 κλωβοί ανά ομάδα) όπου και παρέμειναν μέχρι το τέλος της μελέτης.

Όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τη ΦΚ μελέτη όσο και για τη μελέτη της επίδρασης του SFE στην αθηρωμάτωση στεγάζονταν στις ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Η μονάδα των πειραματοζώων χαρακτηρίζεται ως μονάδα όπου πραγματοποιούνται τόσο αναπαραγωγή (Breeding) όσο και πειραματικές μελέτες σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία 56/2013 που εναρμονίζεται με τη διεθνή νομοθεσία και την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63 που αφορά στην

προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειραματικές μελέτες και για άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Οι μύες διέμεναν σε κατάλληλους κλωβούς με σωστό αερισμό (Tecniplast, Varese, Italy) κάτω από αυστηρές συνθήκες μακριά από παθογόνους παράγοντες και με σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος (12:12 ώρες κύκλος φωτός – συσκότισης/ 0700-1900, θερμοκρασία $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, και σχετική υγρασία $45\pm 10\%$). Τα πειραματικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη έλαβαν έγκριση από τις Κτηνιατρικές Αρχές της Περιφερειακής Ενότητας Αττικής (Αριθμός Πρωτοκόλλου: 587/05-02-2015).

Αμέσως μετά την τυχαιοποίηση των μυών σε ομάδες, συνεχίστηκε η χορήγηση σετς πειραματικές ομάδες (εκτός της BLG) της αθηρογόνου, “δυτικού τύπου”, τροφής (Harlan Teklad; 88137) για το χρονικό διάστημα της μελέτης. Η χορηγούμενη δόση του SFE σε mg/kg καθοριζόταν από το σωματικό βάρος κάθε ζώου. Τα ζώα ζυγίζονταν κάθε εβδομάδα για τον εκ νέου υπολογισμό της χορηγούμενης δόσης.

Πραγματοποιήθηκε τεστ ανοχής στη γλυκόζη σε όλες τις ομάδες ζώων πριν την έναρξη καθώς και στο τέλος της χορήγησης του SFE.

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, και μετά την πραγματοποίηση του τεστ ανοχής στη γλυκόζη, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με καρδιοπαρακέντηση υπό βαθιά αναισθησία με ισοφλουράνιο και ακολούθησε ευθανασία των ζώων με σκοπό την αφαίρεση της καρδιάς μαζί με όλο το μήκος της θωρακικής και κοιλιακής αορτής έως το ύψος των κοινών λαγόνιων αρτηριών. Από τα ιστολογικά δείγματα απομακρύνθηκαν το λίπος και ο συνδετικός ιστός, στο βαθμό που αυτό ήταν εφικτό. Από το block καρδιάς-αορτής, αφού αυτό καθαρίστηκε με έγχυση φυσιολογικού ορού μέσω της καρδιάς, κόπηκε το άνω $\frac{1}{2}$ τμήμα της καρδιάς μαζί με την αορτική βαλβίδα έως και το αορτικό τόξο, και στη συνέχεια τοποθετήθηκε μέσα σε ειδικά καψάκια με σπόγγους για τη διατήρηση της ευθύτητας της αορτής κι εμβαπτίστηκε σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% για μονιμοποίηση και περαιτέρω ιστολογική διεργασία. Η θωρακική αορτή μαζί με την κοιλιακή αορτή τοποθετήθηκαν σε RNase free φιαλίδια erpendorf κι αποθηκεύθηκαν στους -80°C για περαιτέρω βιοχημική διεργασία. Αναλυτικά περιγράφονται παρακάτω όλες οι βιοχημικές, ιστολογικές/ιστοχημικές και μοριακές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του SFE στην αντιμετώπιση της αθηρωμάτωσης.

B.4.2. ΤΕΣΤ ΑΝΟΧΗΣ ΣΤΗ ΓΛΥΚΟΖΗ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

Το τεστ ανοχής στη γλυκόζη περιλαμβάνει την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση διαλύματος γλυκόζης (2g/kg σωματικού βάρους από διάλυμα γλυκόζης 20%) ενώ πραγματοποιήθηκαν λήψεις σταγόνας αίματος από την ουρά του κάθε μύος για τις χρονικές στιγμές: 0, 15, 30, 60 και 120 min. Οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια ταινιών μέτρησης σακχάρου και ειδικό μηχάνημα μέτρησης.

B.4.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ

Στο τέλος της μελέτης για όλες τις ομάδες των ζώων, πραγματοποιήθηκε λήψη του ολικού αίματος και φυγοκέντρηση για παραλαβή του ορού. Οι οροί εστάλησαν στο βιοχημικό εργαστήριο του ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟΝ»

για τη μέτρηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων.

B.4.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΑ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ΑροΕ-/-)

B.4.4.1. Επεξεργασία ιστών – Ιστοχημικές χρώσεις

Ο ιστός τμήματος καρδιάς που αφαιρέθηκε από τα πειραματόζωα, μαζί με το αορτικό τόξο, εγκλείστηκαν μέσα σε ειδικά πλαστικά καψίδια ιστολογίας, τοποθετούμενα σε ευθεία θέση με χρήση ειδικών σπόγγων ιστολογίας. Τοποθετήθηκαν άμεσα σε διάλυμα φορμαλίνης 10% στους 4°C για μονιμοποίηση. Παρέμειναν στο μονιμοποιητικό υγρό για χρονικό διάστημα 18 ωρών (overnight, ο/η) κι έπειτα ακολουθήθηκε διεργασία για τη σκίνωσή τους σε παραφίνη και την έγκλειση των ιστών σε blocks μικροτόμου, που περιγράφεται παρακάτω:

- Έντονο ξέπλυμα από τη φορμαλίνη με νερό βρύσης για 10min.
- Εμβάπτιση και παραμονή ο/η σε διάλυμα αιθανόλης 70% στους 4°C.
- Αφυδάτωση με εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης, 1h/συγκέντρωση: 70%, 80%, 95%, 100%, 100% σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Υδροφοβοποίηση με εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 1h σε RT. (x2 φορές)
- Εμπότιση παραφίνης με εμβάπτιση σε υγρή παραφίνη για 1h στους 60°C. (x2)
- Έγκλειση σε blocks παραφίνης με χρήση καλουπιού και ψύξη στους -10°C.
- Αποθήκευση για τουλάχιστον 24h στους -20°C.

Κατά την έγκλειση των ιστών, ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον ακριβή προσανατολισμό των δειγμάτων σχετικά με τον έναν άξονα και τα τρία επίπεδα συμμετρίας του αγγείου. Συγκεκριμένα, ο διαμήκης άξονας συμμετρίας τοποθετήθηκε κάθετος στο επίπεδο λήψης τομών, ώστε οι τομές μικροσκοπίας να είναι εγκάρσιες στο αγγείο, με τη ρίζα της αορτής προς το πλησίον επίπεδο (επίπεδο πρώτης τομής). Από τα blocks παραφίνης έγινε λήψη τομών μικροσκοπίας σε μικροτόμο, ακολουθώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την εξασφάλιση της ομοιότητας της εξεταζόμενης περιοχής, αλλά και για τη διευκόλυνση της μετέπειτα χρώσης με πολλαπλές χρωστικές διαφορετικών τομών και παρατήρησης μέσω αυτών των άμεσα γειτονικών ιστολογικών δομών για διαφορετικές ουσίες. Συγκεκριμένα, οι τομές ήταν πάχους 5μm, και ελήφθησαν από μετρούμενες αποστάσεις από την αορτική βαλβίδα. Μόλις εντοπιζόταν η αορτική βαλβίδα στις ιστολογικές τομές, ξεκινούσε η λήψη τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίας. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αυτές που ελήφθησαν 0,5 mm (100 τομές πάχους 5μm) μετά την τελευταία τομή στην οποία ήταν ορατές οι γλωχίνες της αορτικής βαλβίδας. Με τη μέθοδο αυτή ελήφθησαν σειριακές τομές από ολόκληρο το αορτικό τόξο. Οι τομές αυτές τοποθετήθηκαν αριθμημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες ακολουθώντας μοτίβο τέτοιο ώστε σε κάθε

αντικειμενοφόρο να τοποθετούνται 3 τομές που απείχαν 50μm η μία από την επόμενη, ενώ η πρώτη τομή κάθε αντικειμενοφόρου ήταν η επόμενη (5μm απόσταση) από την πρώτη τομή της προηγούμενης αντικειμενοφόρου. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίστηκε και η κατανομή των υπό μελέτη τομών, ώστε ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε χρώση να ανταποκρίνεται όχι σε σημειακή αλλά ευρύτερη μέτρηση, όπως επίσης και το γεγονός ότι η σύγκριση μεταξύ μετρήσεων διαφορετικών χρώσεων ήταν σε συνεντοπισμένα ανατομικά χαρακτηριστικά.

Προκειμένου οι λεπτές τομές να παρατηρηθούν και να αξιολογηθούν, είναι απαραίτητη η χρώση των στοιχείων τους με ειδικές χρωστικές. Οι μη χρωματισμένες τομές υπό το οπτικό μικροσκόπιο είναι σχεδόν διαφανείς, και είναι αδύνατη η αναγνώριση των λεπτών δομών των ιστών, πέραν μιας αδρής εκτίμησης που μπορεί να γίνει με χρήση φίλτρων αντίθεσης φάσης φωτός (phase contrast microscopy). Έχουν περιγραφεί διάφορες μέθοδοι χρώσης των τομών οπτικής μικροσκοπίας, που βάζουν διαφορετικά στοιχεία, κι έτσι αναδεικνύουν διαφορετικές πληροφορίες από τους ιστούς. Δυστυχώς, η κάθε τομή μπορεί να βαφεί με περιορισμένο αριθμό χρωστικών, πριν η επικάλυψη των χρωμάτων αρχίσει να κρύβει αντί να αναδεικνύει πληροφορίες. Προκειμένου να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε πλήθος μορίων, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές χρώσεις σε “γειτνιάζουσες” τομές, στοχεύοντας στον συνεντοπισμό των ανιχνευόμενων στοιχείων. Μέρος των τομών που ελήφθησαν από το αορτικό τόξο των πειραματόζων χρησιμοποιήθηκαν για την ιστοχημική χρώση των δειγμάτων και παρατήρηση των μοφομετρικών τους στοιχείων σε οπτικό μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις αιματοξυλίνης/ηωζίνης για μορφομετρικούς σκοπούς, Masson’s Trichrome για χρώση κι εντοπισμό συνδετικού ιστού, και sirius red για χρώση κι εντοπισμό του κολλαγόνου στις αθηρωματικές πλάκες.

Όλες οι χρώσεις ξεκινούν με την τήξη της παραφίνης των τομών τοποθετώντας τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμαινόμενη πλάκα με θερμοκρασία 60°C περίπου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σταδιακή ενυδάτωση των τομών (οι ειδικές χρωστικές είναι υδατοδιαλυτές με αποτέλεσμα για να εφαρμοστούν να απαιτείται υδρόφιλο περιβάλλον και όχι ο λιπόφιλος χαρακτήρας της παραφίνης) με διαδοχική εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών στους εξής διαλύτες (αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση):

- Ξυλόλη 1: 10 min
- Ξυλόλη 2: 10 min
- Αιθανόλη 100%: 5 min
- Αιθανόλη 95%: 5 min
- Αιθανόλη 80%: 5 min
- Αιθανόλη 50%: 5 min
- Νερό βρύσης: 5 min

Χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (Haematoxylin + Eosin, H+E) στηρίζεται στο μωβ χρώμα με το οποίο η αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων, και στο ερυθρό με το οποίο η ηωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα. Η συγκεκριμένη χρώση βοηθά στη μέτρηση και τον υπολογισμό της έκτασης της αθηρωματικής πλάκας μέσω της μέτρησης της επιφάνειάς της επί του συνόλου της αγγειακής επιφάνειας. Αμέσως μετά την ενυδάτωση των τομών, οι αντικειμενοφόροι πλάκες εμβαπτίζονται σε διηθημένο διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 λεπτά, ξεπλένονται με καταϊωνισμό νερού και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε έτοιμο διάλυμα ηωσίνης/εοσίνης για ακόμη 2 λεπτά. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση και ακολουθεί η διαδικασία αφυδάτωσης (αντίστροφη πορεία από αυτήν της ενυδάτωσης) που περιλαμβάνει εμβαπτίσεις των αντικειμενοφόρων πλακών στα ακόλουθα διαλύματα:

- Αιθανόλη 80%: 10sec
- Αιθανόλη 95%: 10sec
- Αιθανόλη 100% 1: 10sec
- Αιθανόλη 100% 2: 30sec
- Ξυλόλη 100% 1: 5min
- Ξυλόλη 100% 2: 5 min

Τοποθετείται ειδική κόλλα (DPX) στην επιφάνεια των αντικειμενοφόρων πλακών και καλύπτονται με καλυπτρίδες. Μετά το στέγνωμά τους (24h), οι τομές φωτογραφήθηκαν σε ειδικό μικροσκόπιο και πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των φωτογραφιών με τη χρήση του λογισμικού Adobe Photoshop για τη συνένωση των επιμέρους φωτογραφιών που ελήφθησαν. Οι φωτογραφίες μετρήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Image Pro Plus ως προς τη συνολική επιφάνεια του αγγειακού αυλού, την επιφάνεια της κάθε παρατηρούμενης αθηρωματικής πλάκας σε μm^2 και το % ποσοστό κάλυψης του αγγείου από την αθηρωματική πλάκα.

Χρώση Masson's Trichrome

Η χρώση Masson's trichrome αποτελεί τον έμμεσο προσδιορισμό των επιπέδων ελαστίνης του αθηρώματος καθώς μετράται το % ποσοστό θετικής χρώσης (μπλε χρώμα) που αναπαριστά το συνδετικό ιστό (ελαστίνη-κολλαγόνο). Η ελαστίνη συμβάλλει καταλυτικά στη σταθερότητα του αθηρώματος ενώ αυξημένα ποσοστά υποδεικνύουν την αύξηση δυσκολίας ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και κατά συνέπεια τη μείωση κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών εμφραγμάτων. Ουσιαστικά όμως οι μετρήσεις καταγράφονται ως σύνολο του συνδετικού ιστού που απαντάται στην αορτή. Η διαδικασία της αποπαραφινοποίησης και ενυδάτωσης των τομών πραγματοποιήθηκε κατά τα όσα έχουν ήδη περιγραφεί, οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις τομές τοποθετούνται σε επίπεδη σταθερή επιφάνεια, οι τομές κυκλώνονται με ειδικό μαρκαδόρο PapPen και στη συνέχεια η χρώση περιλαμβάνει τα εξής βήματα με

βάση τη χρήση του kit της Masson's Trichrome:

- Εναπόθεση μίας σταγόνας θερμού διαλύματος Bouin σε κάθε τομή ξεχωριστά για 15 λεπτά
- Έκπλυση με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλο το κίτρινο χρώμα του πικρικού οξέος που περιέχεται στο εν λόγω διάλυμα
- Εναπόθεση μίας σταγόνας διαλύματος αιματοξυλίνης Weigert σε κάθε τομή ξεχωριστά για 10 λεπτά
- Έπλυση με νερό βρύσης για 5 λεπτά έτσι ώστε να χρωματιστούν μπλε οι πυρήνες των κυττάρων
- Εναπόθεση μίας σταγόνας διαλύματος Biebrich scarlet acid fuchsin σε κάθε τομή ξεχωριστά για 5 λεπτά
- Έκπλυση με απιονισμένο νερό για 3 λεπτά
- Προσθήκη Phosphotungstic/phosphomolybdic acid στην επιφάνεια της τομής για 10 λεπτά και απομάκρυνση
- Προσθήκη Aniline blue για 5 λεπτά
- Έκπλυση με απιονισμένο νερό για 3 λεπτά
- Προσθήκη 1% οξικού οξέος σε νερό για 1 λεπτό

Στη συνέχεια ακολουθείται κανονικά η διαδικασία αφυδάτωσης κατά το γνωστό πρωτόκολλο που έχει αναφερθεί στη χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (βλ. σελ.59) και τοποθετούνται καλυπτρίδες στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν με κάμερα μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας συνδετικού ιστού στην αθηρωματική πλάκα και στο αγγειακό τοίχωμα. Συνοπτικά, προσδιορίστηκε η σχετική συγκέντρωση συνδετικού ιστού στην αθηρωματική πλάκα όλων των μυών κάθε ομάδας με τη βοήθεια της αξιολόγησης της έντασης του χρώματος της χρώσης (μπλε-μέτρηση ποσοστού μπλε χρώσης ανά αθηρωματική πλάκα και επί του συνόλου του αγγείου).

Χρώση Sirius Red

Η χρώση sirius red χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του κολλαγόνου στο αγγειακό τοίχωμα και στην αθηρωματική πλάκα. Η χρώση αυτή δίνει ένα χαρακτηριστικό έντονο κόκκινο χρώμα στις ίνες κολλαγόνου και καθιστά τα αγγεία και τις αθηρωματικές πλάκες εξαιρετικά ευδιάκριτα. Αμέσως μετά την ενυδάτωση των τομών, γίνεται εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε micro-sirius red για 60 min. Μετά το πέρας του χρόνου αναμονής πραγματοποιούνται εμβάπτισεις σε οξινισμένο νερό (acidified water). Ακολουθεί διαδικασία αφυδάτωσης κατά τα προαναφερθέντα. Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν με κάμερα μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας κολλαγόνου στην αθηρωματική πλάκα και στο αγγειακό τοίχωμα. Συνοπτικά, προσδιορίστηκε η σχετική συγκέντρωση κολλαγόνου στην αθηρωματική πλάκα όλων

των μυών κάθε ομάδας με τη βοήθεια της αξιολόγησης της έντασης του χρώματος της χρώσης (κόκκινο-μέτρηση ποσοστού κόκκινης χρώσης ανά αθηρωματική πλάκα και επί του συνόλου του αγγείου).

B.4.4.2. Ανοσοϊστοχημικές Τεχνικές

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στη λειτουργία αντισωμάτων για την ποιοτική ταυτοποίηση αντιγόνων (υπό διερεύνηση ουσιών) με οπτική μικροσκοπία. Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών-στόχων, χρησιμοποιήθηκε έμμεση ανοσοϊστοχημεία (με χρήση δύο αντισωμάτων) και μέθοδο συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης (ABC). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής, που περιγράφηκε το 1981, εκμεταλλεύεται την ισχυρή τάση σύνδεσης της αβιδίνης (μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στο ασπράδι των αυγών κότας) με τη βιοτίνη, και σε γενικές γραμμές είναι η ακόλουθη: Το πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό απέναντι στο προς ανίχνευση αντιγόνο, προσδένεται στα σημεία των τομών όπου βρίσκεται το αντιγόνο. Μετά από τη σήμανση του αντιγόνου από το πρωτογενές αντίσωμα, ένα δευτερογενές αντίσωμα, ειδικό έναντι μιας περιοχής του πρωτογενούς αντισώματος, δεσμεύεται με τη σειρά του στις περιοχές όπου υπάρχει το πρωτογενές αντίσωμα, μετά την πρόσδεσή του τελευταίου με την ουσία που μελετάται. Το δευτερογενές αντίσωμα, φέρει επίσης το ένζυμο βιοτίνη. Σε ξεχωριστή αντίδραση, γίνεται συμπλοκοποίηση της αβιδίνης με ένα βιοτυλιωμένο ένζυμο (στην περίπτωσή μας υπεροξειδάση), σε τέτοια αναλογία ώστε να μένουν ορισμένα σημεία σύνδεσης της αβιδίνης ελεύθερα. Όταν τα σύμπλοκα αυτά αναμειχθούν με τον ιστό, τα ελεύθερα σημεία σύνδεσης της αβιδίνης συνδέονται με τη βιοτίνη του δευτερογενούς αντισώματος. Αποτέλεσμα αυτού είναι περισσότερο ένζυμο συνδεδεμένο στο στόχο από ότι θα ήταν δυνατό με ένα σύστημα πρωτογενούς αντισώματος – δευτερογενούς με ένζυμο, η αντίδραση του οποίου όταν εισαχθεί υπόστρωμα δημιουργεί χρώση.

Σε οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε και όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στους ιστούς που εξετάστηκαν. Επίσης, ασθενή χρώση (background) μπορεί να προκαλέσει η μη ειδική σύνδεση του δευτερογενούς αντισώματος και η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Για τους λόγους αυτούς, η ανοσοϊστοχημική χρώση ακολουθείται πάντα από negative control (συνήθως η πρώτη από τις τρεις τομές σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα), στο οποίο ακολουθείται όλη η διαδικασία με εξαίρεση την εφαρμογή πρωτογενούς αντισώματος, και από ένα positive control, μια αντικειμενοφόρο που περιέχει τομές από ιστό που γνωρίζουμε ότι περιέχει σε μεγάλη ποσότητα την υπό ανίχνευση ουσία.

Στις τομές που ελήφθησαν από τους μύες του πειράματος εξετάστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας οι παρακάτω πρωτεΐνες: MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, MAC-3, IL-6, TNF α και α -actin. Η γενική μεθοδολογία για την ανοσοϊστοχημική χρώση περιλαμβάνει τα γενικά βήματα ενυδάτωσης των τομών του ιστού που έχουν ήδη περιγραφεί και ακολουθεί η εξής διαδικασία:

- Αποκάλυψη επιτόπιων με εμβάπτιση σε ρυθμιστικό δ/μα κιτρικού οξέος 10mM pH=6,0 Tween20 και βρασμό για 20min.
- Σταδιακή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 30min).
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με εμβάπτιση σε δ/μα H₂O₂ 1,5% σε PBS για 15min στο σκοτάδι.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Blocking των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης με τη βοήθεια του kit Αβιδίνης-Βιοτίνης. (15 min για κάθε αντιδραστήριο, μεσολαβεί μόνο μια έκπλυση με διάλυμα PBS pH=6,0).
- Εφαρμογή Zytomed Blocking Solution (παρέχεται από το kit της Zytomed) για 5 min
- Εφαρμογή πρωτογενούς αντισώματος αραιωμένου κατάλληλα (εξαρτάται από το αντίσωμα) σε διάλυμα 0.1% Tween 20/PBS.
- Τοποθέτηση σε θάλαμο με υγρασία, στους 4°C ο/ν.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εφαρμογή δευτερογενούς αντισώματος: Zytomed Biotinylated Secondary antibody για 2 ώρες.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εφαρμογή Streptavidin-HRP complex (Zytomed kit) για 15 min.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6,0 για 5min. (x3)
- Εφαρμογή του διαλύματος AEC για περίπου 2 min και αναστολή της αντίδρασης με απιονισμένο νερό.
- Χρώση πυρήνων (counterstain) με αιματοξυλίνη Mayer's, 5min και έκπλυση με απιονισμένο νερό.
- Σταδιακή αφυδάτωση με εμβάπτισεις σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης EtOH: 80% (10sec), 95% (10sec), 100% (10sec), 100% (30sec).
- Εμβάπτιση σε ξυλένιο 100% για 5min. (x2)
- Εφαρμογή μέσου επικάλυψης (DPX) με πουάρ κι επικάλυψη με καλυπτρίδα (με άσκηση πίεσης για απομάκρυνση φυσαλίδων και πλεονάζοντος DPX).
- Στέγνωμα για 24h.

Στον πίνακα Β1 καταγράφονται οι αραιώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Οι αραιώσεις γίνονται σε PBS - Tween 20 0.1%.

Πίνακας Β1: Αραιώσεις αντισωμάτων για χρήση στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ
a-actin	1:500
MMP-2	1:500
MMP-3	1:250
MMP-9	1:500
MCP-1	1:500
MAC-3	1:500
IL-6	1:500
TIMP-2	1:500
TNF-a	1:500

B.4.4.3. Μορφομετρικές Αναλύσεις

Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Οι εικόνες από τη χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του συνολικού εμβαδού του αγγείου (σε μm^2) και του αυλού κάθε αγγείου, αφαιρώντας τα στόμια των διακλαδούμενων αρτηριών, εφόσον και εάν αυτά υπήρχαν στις τομές. Παράλληλα, προσδιορίστηκε το εμβαδόν όλων των παρατηρούμενων αθηρωματικών αλλοιώσεων σε κάθε τομή. Το έσω ελαστικό πέταλο του αρτηριακού τοιχώματος, δηλαδή το όριο έσω-μέσου χιτώνα, που αποτελεί το έσω όριο της αθηρωματικής πλάκας, και η γραμμή διεπαφής αρτηριακού αυλού-ινώδους κάψας ήταν ευδιάκριτα με τη χρώση H+E και μπορούσε πολύ εύκολα να προσδιοριστεί με την πραγματοποίηση της παραπάνω μέτρησης. Έχοντας ως δεδομένο το εμβαδόν του αυλού (Lu) και το εμβαδό των αθηρωματικών πλακών (PI) μπορούσε εύκολα να υπολογιστεί το ποσοστό στένωσης (SF), με την απλή μαθηματική εξίσωση $SF=PI/(Lu+PI)$. Μετά την αξιολόγηση και εμβαδομέτρηση ξεχωριστά όλων των τομών από κάθε μυ υπολογιζόταν ο μέσος όρος όλων των ποσοστών στένωσης από τις μετρούμενες τομές, ο οποίος τελικά αποτελούσε το συνολικό δείκτη μεγέθους της αθηρωμάτωσης σε κάθε μυ. Η μέθοδος αυτή προσδιορισμού του μεγέθους της αθηρωματικής βλάβης κατά μήκος του αορτικού τόξου είναι προτιμότερη από εκείνη της μέτρησης του εμβαδού των αθηρωματικών πλακών σε τυχαίες τομές, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά σημεία του αορτικού τόξου, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ενιαίο μέτρο σύγκρισης. Συνολικά, η ποσοτική μέτρηση των αθηρωματικών αλλοιώσεων στο αορτικό τόξο είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε μύες (225; 226).

Χρώσεις Sirius Red/ Masson's Trichrome

Για την ποσοτική εκτίμηση της εκατοστιαίας αναλογίας θετικής χρώσης για κολλαγόνο και συνδετικό ιστό στο αγγειακό τοίχωμα αλλά και στην αθηρωματική πλάκα έγινε χρωματολογική ανάλυση. Συγκεκριμένα, η παλέτα χρωμάτων (κόκκινο για Sirius Red και μπλε για Masson's Trichrome), που αντιπροσώπευε τη θετική χρώση στο πρώτο κατά σειρά δείγμα, εισήχθη στο πρόγραμμα επεξεργασίας και έπειτα καθορίστηκε η περιοχή ενδιαφέροντος (αθηρωματική αλλοίωση και αγγειακό τοίχωμα, ξεχωριστές μετρήσεις). Η παλέτα χρωμάτων αποθηκεύθηκε ώστε να αποτελέσει το κοινό μέτρο για κάθε μετέπειτα εικόνα. Το πρόγραμμα καταμέτρησε τα εικονοστοιχεία που ενέπυταν εντός της προκαθορισμένης γκάμας χρωμάτων, και τα εξέφρασε ως ποσοστό επί του συνολικού εμβαδού της περιοχής ενδιαφέροντος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις εικόνες. Από κάθε μμ της μελέτης, μετρήθηκαν 3 τομές, βαμμένες με την κάθε χρωστική, που απείχαν κατά 50μm η κάθε μία από την επόμενη. Σε περίπτωση που υπήρχαν περισσότερες από μία αθηρωματικές πλάκες σε μία τομή ενός εξεταζόμενου αγγείου λαμβανόταν υπόψη ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων του κολλαγόνου και του συνδετικού ιστού από όλες τις πλάκες της τομής αυτής. Στο τέλος, ο μέσος όρος των τιμών των συγκεντρώσεων του κολλαγόνου και του συνδετικού ιστού από όλες τις τομές αποτελούσε το αποτέλεσμα για κάθε μμ. Με αυτό τον τρόπο αξιολογήθηκαν συνολικά τομές από όλους τους μύες.

Ανοσοϊστοχημικές Χρώσεις

Οι σχετικές συγκεντρώσεις των MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, IL-6, TNF- α , α -ακτίνης και MAC-3 μετρήθηκαν στις αθηρωματικές πλάκες των μυών με μεθοδολογία όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για το κολλαγόνο και το συνδετικό ιστό. Έχοντας σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα την πρώτη τομή ως negative control μετρήθηκε τόσο η θετική χρώση από background όσο και το θετικό σήμα που έδωσαν οι αντιδράσεις των αντισωμάτων. Με απλή αφαίρεση του μέσου ποσοστού background-σήματος, υπολογίστηκε το θετικό σήμα κάθε δείγματος.

B.4.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE^{-/-})

Πρωτόκολλο διεξαγωγής αναλύσεων PCR

Η απομόνωση του συνολικού RNA από τα δείγματα των αορτών έγινε με τη βοήθεια ειδικού kit για την απομόνωση RNA από ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη. Τα στάδια απομόνωσης είναι τα εξής:

- Σε 20 τομές από το block παραφίνης όπου βρίσκεται εγκλειστος ο ιστός της αορτής προστίθεται 1 mL ξυλόλης και το erpendorf τοποθετείται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C για 5 λεπτά.

- Απορρίπτεται με προσοχή η ξυλόλη και η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη 1 mL μίγματος EtOH/ ξυλόλης σε αναλογία 50/50. Ακολουθεί περιδίνηση (vortex) και το erperndorf τοποθετείται εκ νέου στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 55°C.
- Απορρίπτεται με προσοχή ο διαλύτης και πλέον προστίθεται 1 mL EtOH. Ακολουθεί περιδίνηση και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 10000 στροφές. Η πιο πάνω διαδικασία αποσκοπεί στην απομάκρυνση της παραφίνης και στην αποκάλυψη του ιστού.
- Απορρίπτεται η αιθανόλη και στη συνέχεια προστίθενται 12 μL διαλύματος πρωτεϊνάσης K (Kit NucleoSpin totalRNA). Γίνεται ήπια ανάδευση και το δείγμα επώαζεται για 15 λεπτά στους 56°C.
- Προστίθενται 12 μL διαλύματος ΜΚΑ (Kit NucleoSpin totalRNA), γίνεται περιδίνηση του δείγματος και στη συνέχεια αφήνεται για 5 λεπτά στον πάγο (0°C). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 16000 x g.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο erpendorf και επώαζεται για ακριβώς 15 λεπτά στους 80°C.
- Προστίθενται 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος ΜΧ (Kit NucleoSpin totalRNA), ακολουθεί περιδίνηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το περιεχόμενο του erpendorf μεταφέρεται σε ειδική στήλη με φίλτρο που παρέχεται από το kit (Nucleospin RNA FFPE Column) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 16000 x g και απορρίπτεται το διήθημα.
- Ακολουθεί πλύσιμο της στήλης με διαδοχική προσθήκη διαλύματος ΜW2 Αρχικά 400 μL και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 16000 x g και εν συνεχεία 200 μL και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 16000 x g. Μετά και από τις δύο φυγοκεντρήσεις απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 25 μL ενζύμου rDNase στη στήλη και ακολουθεί επώαση του δείγματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται επιπλέον 50 μL διαλύματος ΜΧ, το δείγμα αφήνεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 16000 x g.
- Επαναλαμβάνεται πλύσιμο της στήλης με διαδοχική προσθήκη διαλύματος ΜW2 Αρχικά 400 μL και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 16000 x g και εν συνεχεία 200 μL και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 16000 x g. Μετά και από τις δύο φυγοκεντρήσεις απορρίπτεται το διήθημα.
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό αποστειρωμένο erpendorf και προστίθενται 30 μL αποστειρωμένου ύδατος (RNase free water), το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται στα 16000 x g για 1 λεπτό. Στο διήθημα βρίσκεται πλέον το απομονωμένο και καθαρό RNA του ιστού. Τα δείγματα RNA φυλάσσονται στην κατάψυξη.

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν μετρήθηκαν στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της ακριβούς τους ποσότητας στο σύστημα NanoDrop του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του

Πανεπιστημίου Αθηνών το οποίο παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης σε μικρό όγκο δείγματος (1-2 μL) και εκφράζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Στη συνέχεια, έγινε σύνθεση cDNA (RT PCR) με τη χρήση περίπου 2 mg RNA με τη βοήθεια του PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time). Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 2,4 μL δείγματος (περίπου 1,6 mg RNA) αναμιγνύονται με 8,5 μL ddH₂O και 2 μL random 6 mers (kit Roche) και πραγματοποιείται το στάδιο του denaturation στους 65°C.
- Προστίθενται 4 μL buffer, 0,5 μL RNase inhibitor, 2 μL dNTP's και 0,5 μL RT enzyme mix και το δείγμα τοποθετείται στο μηχάνημα PCR για 10 λεπτά στους 25 °C, για 30 λεπτά στους 55°C και για 5 λεπτά στους 85 °C. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι το cDNA.

Για την πραγματοποίηση όλων των αντιδράσεων PCR (για όλα τα υπό εξέταση γονίδια) χρησιμοποιήθηκε το kit KAPA Taq PCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τη μίξη 2 μL cDNA με 2 μL από τον κάθε εκκινητή του ζεύγους (σύνολο 4 μL , διαφορετικό ζεύγος για κάθε γονίδιο), 2,5 μL buffer, 1 μL dNTP's, 0,5 μL Taq polymerase και 15 μL ddH₂O (συνολικός όγκος για την αντίδραση: 25 μL) και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα και ο προγραμματισμός περιλάμβανε 1 κύκλο για 3 λεπτά στους 94 °C, 40 κύκλους από 1 λεπτό στους 94 °C, 50 δευτερόλεπτα στους 59 °C και 50 δευτερόλεπτα στους 72 °C και τέλος 1 κύκλο στους 72 °C για 10 λεπτά.

Στη συνέχεια, το προϊόν της κάθε αντίδρασης PCR μεταφέρεται σε γέλη αγαρόζης σε ειδικές σημασμένες θέσεις και με τη βοήθεια διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Μετά το διαχωρισμό, το gel τοποθετείται σε τράπεζα με λαμπτήρα UV και λαμβάνονται φωτογραφίες όπου διακρίνονται οι ζώνες για την κάθε πρωτεΐνη. Οι ζώνες καθορίζονται πάντα σε σύγκριση με το γονίδιο της GAPDH η οποία αποτέλεσε το εσωτερικό πρότυπο των μοριακών αναλύσεων καθώς βρίσκεται σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως λήψης SFE ή μη. Για την ανίχνευση του κάθε γονιδίου-πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα B2.

Πίνακας Β2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων RT-qPCR

	FORWARD	REVERSE
IL-6	5'-TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG-3'	5'-GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA C-3'
MMP-9	5'-GCT TTG CTG ATG CTT CAG AA-3'	5'-CAG AGT AGT TTT GGA TCC AGT ATG TG-3'
TNF-a	5'-CCA GAC CCT CAC ACT CAG ATC AT-3'	5'-CTT GGG CAG ATT GAC CTC AG-3'
TIMP-2	5'-CAG TAT GAG ATC AAG CAG ATA AAG ATG TT-3'	5'-GCT CTT CTC TGT GAC CCA GTC-3'
MMP-2	5'-AGA CAA AGA GTT GGC AGT GCA AT-3'	5'-CTG TAT GTG ATC TGG TTC TTG TCC C-3'
MCP-1	5'-GCT CAG CCA GAT GCA GT-3'	5'-GTC ACT CCT ACA GAA GTG CTT GA-3'
GAPDH	5'-ATT CAA CGG CAC AGT CAA GG-3'	5'-TGG ATG CAG GGA TGA TGT TC-3'

B.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (mean \pm SD). Η σύγκριση των τιμών μεταξύ των ομάδων έγινε με τη βοήθεια της δοκιμασίας one-way ANOVA και η ποιοτική σύγκριση μεταξύ των ομάδων έγινε με τη βοήθεια της post-hoc ανάλυσης κατά Tuckey. Οι μεταβολές του βάρους και των βιοχημικών παραμέτρων μέσα σε κάθε ομάδα (αρχική τιμή έναντι τελικής τιμής του ίδιου πειραματόζωου) εξετάστηκαν με τη δοκιμασία paired-samples t-test. Έγινε έλεγχος για την κανονικότητα των μεταβλητών χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία κατά Shapiro-Wilk. Σε όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως μικρότερο του 0,05 ($p < 0.05$) και διπλής κατεύθυνσης. Οι στατιστικές αναλύσεις εφαρμόστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS (version 22.0; IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). Τα αποτελέσματα δίνονται συνολικά στο Παράρτημα IV.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**Γ.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ *IN VITRO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ ΣΤΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Crocus sativus*****Γ.1.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ– ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ SFE**

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης με σκοπό τη συλλογή των κλασμάτων των διαφορετικών ουσιών του εκχυλίσματος έγινε ημι-παρασκευαστική ανάλυση HPLC, και με βάση το χρωματογράφημα συνελέγησαν διαφορετικά κλάσματα στους εξής χρόνους:

Πίνακας Γ1. Χρόνοι συλλογής κλασμάτων εκχυλίσματος ημι-παρασκευαστικής χρωματογραφίας – Βάρος μετά την ξήρανση

Κλάσματα	Rt (min)	Βάρος (mg)
1	2.6	0.7
2	3.2	8.5
3	3.4	38.5
4	6.5	10.3
5	6.7	1.7
6	7.2	1.5
7	7.7	0.2
8	8.8	5.2
9	13.0	0.5
10	14.0	0.3
11	15.7	0.4
12	16.3	0.2
13	17.5	1.1
14	20.0	3.2

Μετά από τη συμπύκνωση μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση σε δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) έγινε ο έλεγχος των ληφθέντων υπολειμμάτων με φασματοσκοπία ¹H-NMR.

Από τα παραπάνω κλάσματα ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις: πικροκροκίνη ($R_t = 3.2$ min), all *trans*-κροκίνη ($R_t = 3.4$ min) και άγλυκο πικροκροκίνης ($R_t = 6.5$ min). Τα φάσματα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας (227). Οι ουσίες που πιθανώς συνελέγησαν στα υπόλοιπα κλάσματα του εκχυλίσματος δεν ανιχνεύθηκαν λόγω χαμηλής περιεκτικότητας στο λυόφιλο εκχύλισμα. Ενδεικτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και οι αναλυτικοί πίνακες δίνονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι μαζί με το χρωματογράφημα της ημι-παρασκευαστικής ανάλυσης HPLC.

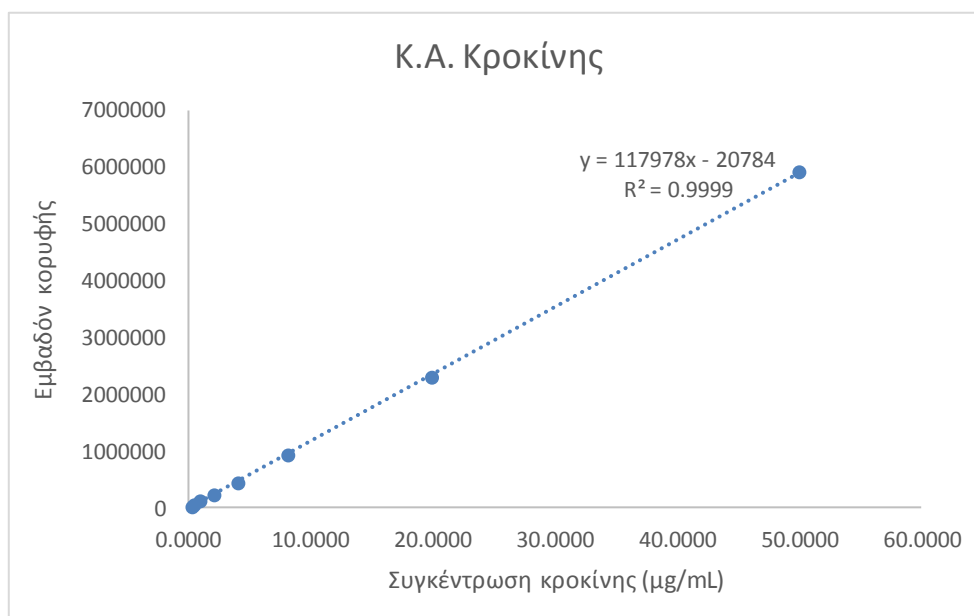
Γ.1.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΑΦΡΑΝΑΛΗΣ

Για την ποσοτικοποίηση του SFE ως προς την περιεκτικότητα σε κροκίνη και σαφρανάλη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Valle García-Rodríguez et al (223) και κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για την κροκίνη στο εύρος συγκεντρώσεων 1.0-100.0 $\mu\text{g/mL}$ και για τη σαφρανάλη στο εύρος συγκεντρώσεων 0.02 – 1.0 $\mu\text{g/mL}$.

Στους πίνακες Γ2 και Γ3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς για την κροκίνη και τη σαφρανάλη, αντίστοιχα και ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς δίνονται στα σχήματα Γ1 και Γ2.

Πίνακας Γ2: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του SFE σε κροκίνη

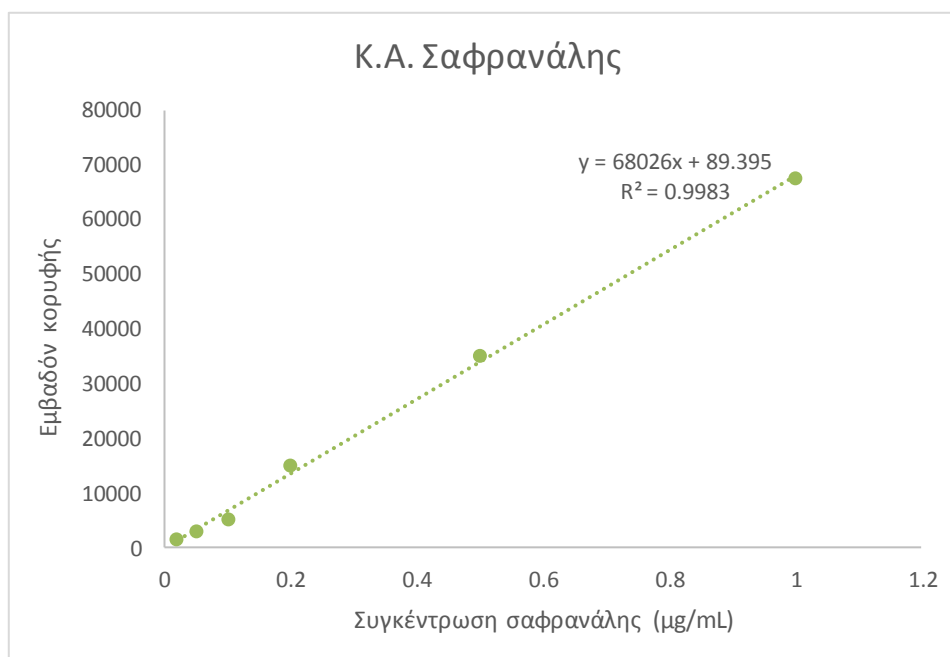
Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων ($\mu\text{g/mL}$)	Αριθμός πειραματικών σημείων	Κλίση \pm SD	Τομή \pm SD	R^2
1	0.3-50	8	117978 \pm 589	-20784 \pm 11387	0.9999
2	0.3-50	8	118932 \pm 727	-24068 \pm 14053	0.9998
3	0.3-50	8	117910 \pm 641	-22454 \pm 12384	0.9998



Σχήμα Γ1: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του SFE σε κροκίνη

Πίνακας Γ3: Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του SFE σε σαφρανάλη

Καμπύλη αναφοράς	Εύρος συγκεντρώσεων (µg/mL)	Αριθμός πειραματικών σημείων	Κλίση ± SD	Τομή ± SD	R ²
1	0.02-1	6	67535±1661	286±774	0.9976
2	0.02-1	6	68213±1621	169±755	0.9977
3	0.02-1	6	68026±1405	89.4±655	0.9983



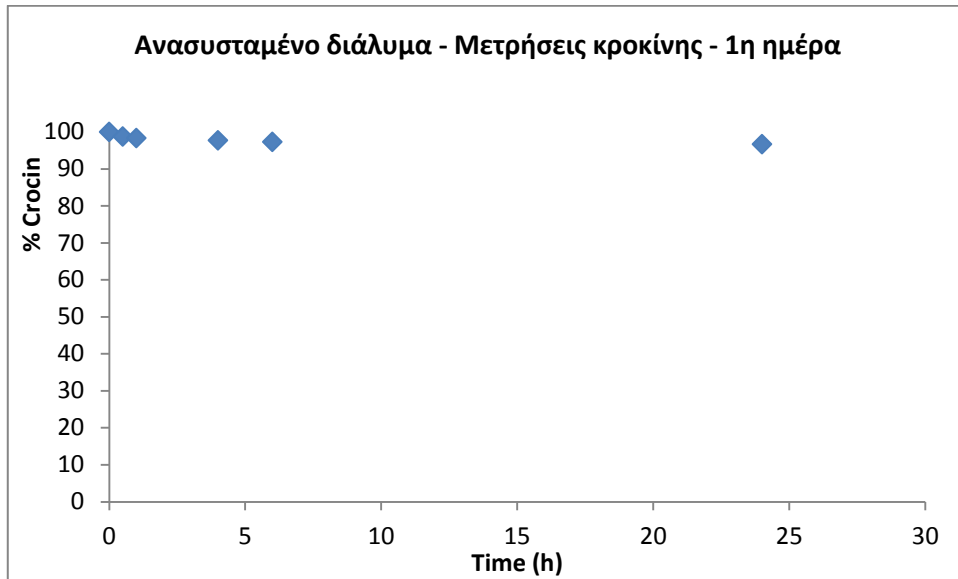
Σχήμα Γ2: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του SFE σε σαφρανάλη

Στο Παράρτημα Ι παρατίθενται ενδεικτικά χρωματογραφήματα κροκίνης και σαφρανάλης.

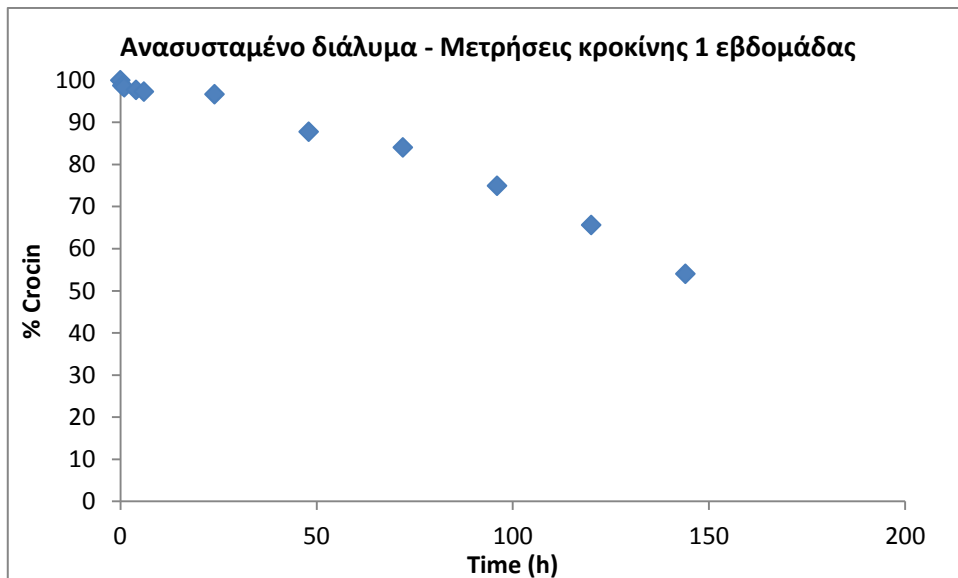
Από τις μετρήσεις που έγιναν σε εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σε διαφορετικές ημέρες (πάντα με τις ίδιες συνθήκες, όπως έχει ήδη περιγραφεί) προκύπτει ότι η μέση περιεκτικότητα του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου σε κροκίνη είναι 26.54(±1,99) % β/β και σε σαφρανάλη 0.32(±0.03) % β/β. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα στις *in vivo* μελέτες μετά από χορήγηση του SFE σε μύες οι μετρήσεις στα βιολογικά δείγματα αφορούσαν μόνο την κροκίνη και συγκεκριμένα το προϊόν υδρόλυσής της, την κροκετίνη.

Γ.1.3. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ

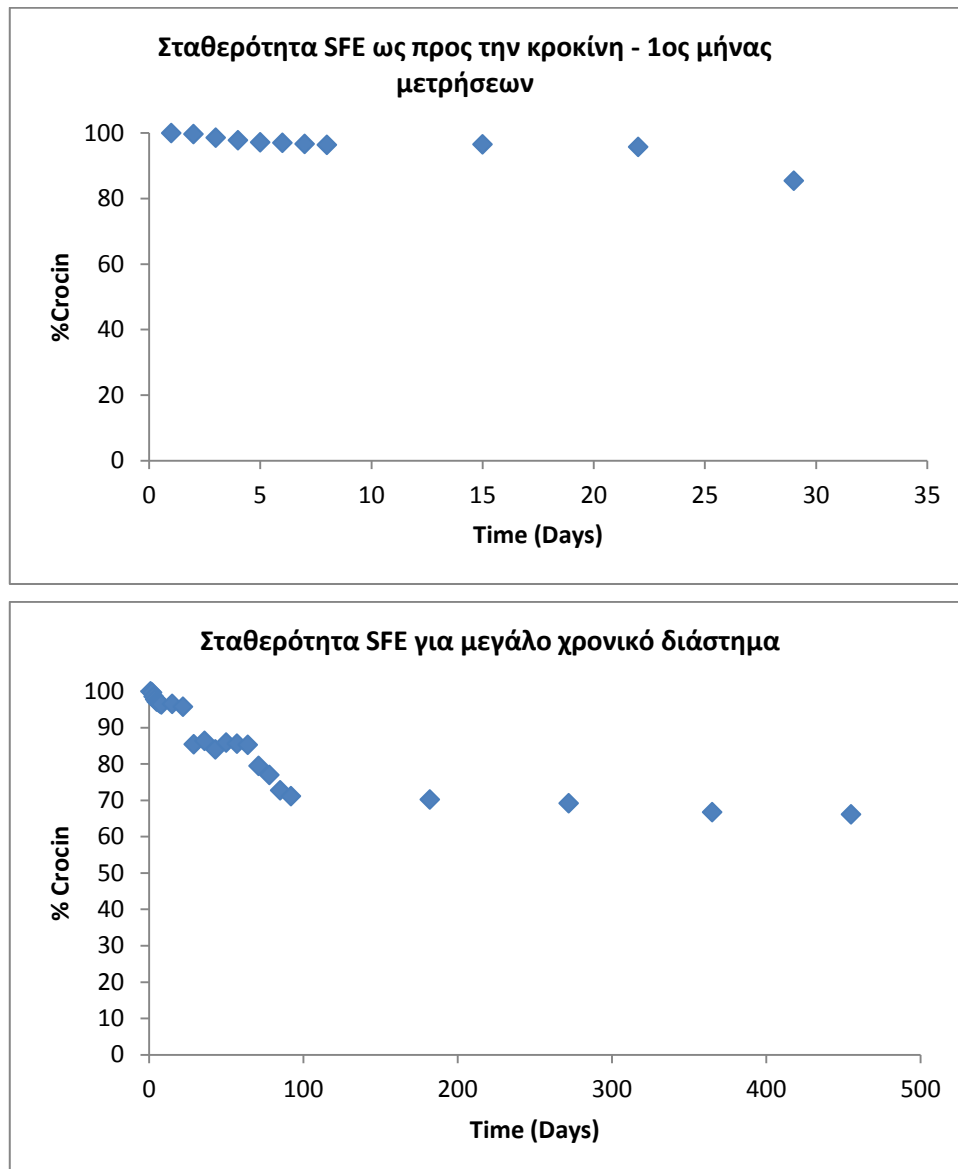
Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η μεταβολή της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος ως προς την κροκίνη με την πάροδο του χρόνου τόσο για το ανασυσταμένο σε νερό στερεό εκχύλισμα (διάλυμα) (Σχήματα Γ3, Γ4) όσο και για το λυόφιλο στερεό εκχύλισμα (Σχήματα Γ5-A και Β). Η αρχική συγκέντρωση ορίστηκε ως 100% και η σύγκριση των επόμενων μετρήσεων έγινε με αυτήν τη συγκέντρωση έτσι ώστε να προκύψουν τα φθίνοντα ποσοστά περιεκτικότητας ως προς κροκίνη.



Σχήμα Γ3: Σταθερότητα ανασυσταμένου σε νερό SFE στη διάρκεια ενός 24ώρου



Σχήμα Γ4: Σταθερότητα ανασυσταμένου σε νερό SFE στη διάρκεια μιας εβδομάδας



Σχήματα Γ5-Α και Β. Σταθερότητα SFE κατά τη διάρκεια της μελέτης: Α. Για τον πρώτο μήνα και Β: Για μεγάλο χρονικό διάστημα (1,5 έτη)

Με βάση τα παραπάνω, παρατηρήθηκε ότι το στερεό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε παραμένει σταθερό ως προς την περιεκτικότητά του σε κροκίνη για τουλάχιστον 1 μήνα όταν φυλάσσεται θερμοκρασία δωματίου (90.90 ± 0.34 % της υποδηλούμενης ποσότητας που αποτελεί και το κατώτατο αποδεκτό όριο με βάση τις οδηγίες ICH), ενώ η περιεκτικότητά του σταθεροποιείται στο 70.40 ± 0.22 % της αρχικής μετά από 6 μήνες και μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης σταθερότητας. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι το ανασυσταμένο διάλυμα παραμένει σταθερό ($95.64 \pm 1.48\%$ της περιεκτικότητας σε κροκίνη) για το πρώτο 24ωρο και μειώνεται στο $90.18 (\pm 1.32)$ %, 48 ώρες μετά την ανασύσταση. Τελικά, η περιεκτικότητα σε κροκίνη μειώνεται σταδιακά έως περίπου 50 (53.53 ± 0.78) % την 6^η ημέρα μετά την ανασύσταση σε νερό. Ενδεικτικές μετρήσεις παρατίθενται σε πίνακα στο Παράρτημα Ι.

Γ.2. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ SFE ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΕΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η φαρμακοκινητική μελέτη του SFE αφορά σε ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος σε μύες του γένους C57BL/6J (wild type), σε δόση 60mg/kg βάρους σώματος, έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα του βασικού βιοδραστικού συστατικού του εκχυλίσματος, της κροκετίνης (υδρολυμένη μορφή της κροκίνης, του κύριου συστατικού του SFE), στον ορό του αίματος και τους ιστούς με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος και να προσδιοριστούν οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι και η βιοδιαθεσιμότητα μετά από *peros* χορήγηση. Επιπλέον, η φαρμακοκινητική μελέτη ήταν απαραίτητη για τον καθορισμό του εύρους των δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στην *in vivo* μελέτη της αντιαθηρωματικής δράσης.

Η αρχική επιλογή της δόσης έγινε με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα χορήγησης σε μελέτες επίδρασης των βιοδραστικών συστατικών του κρόκου, κροκίνη και κροκετίνη, στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπου η χορηγούμενη δόση κροκίνης ή/και κροκετίνης κυμαινόταν από 20 mg/kg έως και 100 mg/kg σωματικού βάρους (54; 228; 53; 229; 230; 231).

Γ.2.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΟΚΕΤΙΝΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-PDA

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κροκετίνης στον ορό αίματος και τους ιστούς ήταν αυτή των Mohammadrou et al (72), όπως τροποποιήθηκε για την παρούσα μελέτη. Η μέθοδος είναι ταχεία και επικυρώθηκε για την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και την % ανάκτηση. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου καταγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα Γ4, με βάση τη διαδικασία της επικύρωσης που πραγματοποιήθηκε ενώ στο Σχήμα Γ6 δίνεται ενδεικτική καμπύλη αναφοράς:

Πίνακας Γ4: Χαρακτηριστικά ποιότητας (ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ανάκτηση εκχυλιστικής διαδικασίας) για τον ορό του αίματος

Όνομασία Δείγματος (ονομαστική συγκέντρωση c – µg/mL)	Intra-day accuracy (%RE)	Inter-day accuracy (%RE)	Intra-day precision (%RE)	Inter-day precision (%RE)
Low QC (0.15)	1.5	1.8	-2.2	-2.5
Medium QC (1.5)	-0.8	-1.2	-1.4	-1.8
High QC (4.5)	1.1	1.3	0.9	1.1

Ανάκτηση εκχυλιστικής διαδικασίας

Low QC	Medium QC	High QC
--------	-----------	---------

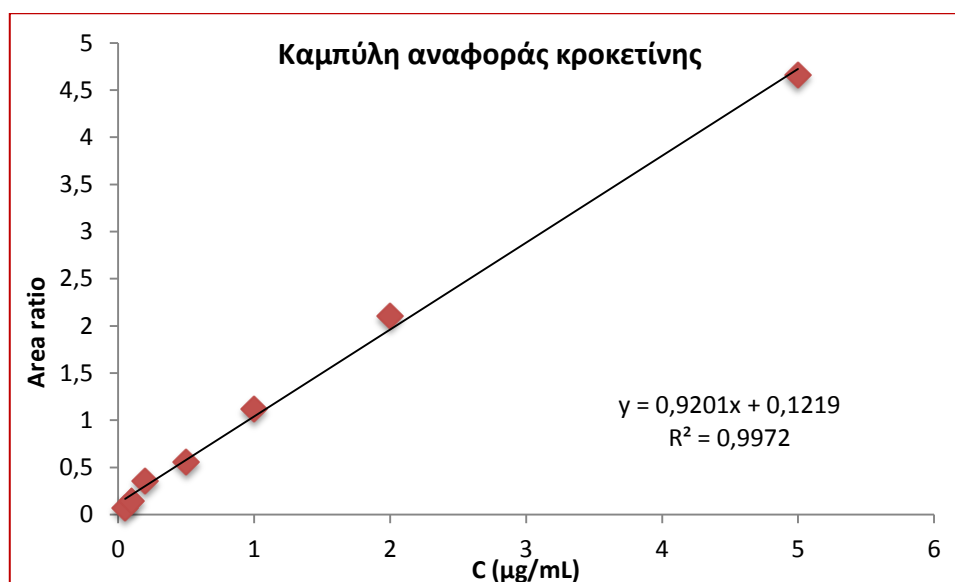
98.432±0.248

99.218±1.058

101.402±0.618

Ανάκτηση εσωτερικού
προτύπου (κουρκουμίνη)

99.598±0.608

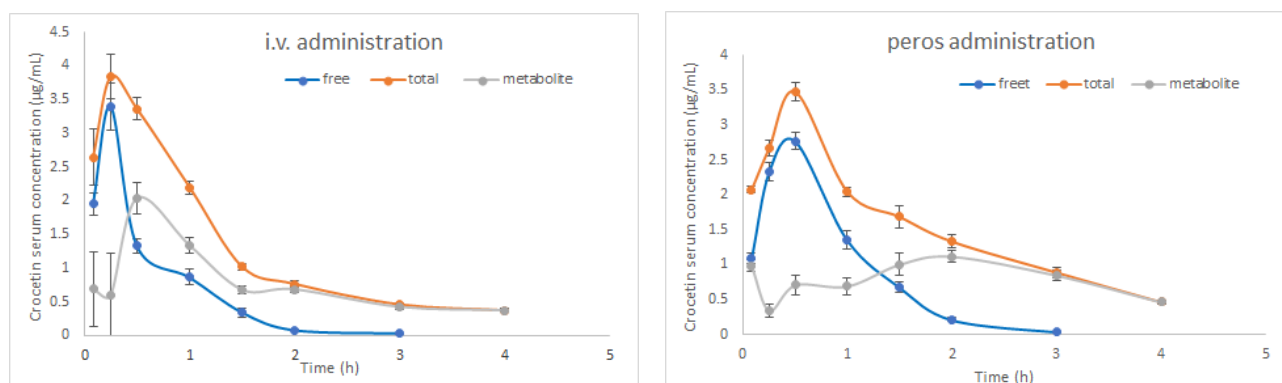


Σχήμα Γ6: Καμπύλη αναφοράς για την ελεύθερη κροκετίνη σε ορό αίματος

Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και για την ποσοτικοποίηση της κροκετίνης στους ιστούς. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς για κάθε ιστό δίνονται στο Παράρτημα II μαζί με χρωματογραφήματα που ελήφθησαν κατά τη μέτρηση προτύπων και αγνώστων δειγμάτων σε ορό και ιστούς.

Γ.2.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ SFE ΣΕ ΜΥΕΣ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της κροκετίνης, του μεταβολίτη της (γλυκουρονίδιο) και της ολικής κροκετίνης (κροκετίνης και γλυκουρονίδιο) στον ορό τόσο για την ενδοφλέβια όσο και για την από του στόματος χορήγηση του ανασυσταμένου σε νερό SFE δίνονται στο σχήμα Γ7. Και στις 2 χορηγήσεις παρατηρείται η καθυστέρηση εμφάνισης της μέγιστης συγκέντρωσης στον ορό εξαιτίας του σταδίου μετατροπής της κροκίνης στο μεταβολίτη κροκετίνη (ενώ σε ενδοφλέβια χορήγηση κανονικά η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται στην πρώτη μέτρηση).



Σχήμα Γ7: Απεικονίσεις μεταβολής της συγκέντρωσης της κροκετίνης (μέσες τιμές \pm SD) (μητρική, ολική, μεταβολίτης) στον ορό μετά από ενδοφλέβια (αριστερά) και peros (δεξιά) χορήγηση SFE (60 mg/kg)

Σε ό,τι αφορά στους ιστούς καρδιάς, ήπατος, νεφρών και πνευμόνων που αναλύθηκαν εφαρμόζοντας την ίδια αναλυτική μέθοδο για την ανίχνευση κροκετίνης σε ομογενοποίημα ιστού με αυτήν στον ορό του αίματος, η ελεύθερη κροκετίνη δεν ανιχνεύθηκε. Αντίθετα, οι μετρήσεις για την ολική κροκετίνη (ελεύθερη και γλυκουρονίδιο) έδωσαν τα αποτελέσματα που καταγράφονται στους αντίστοιχους πίνακες του Παραρτήματος.

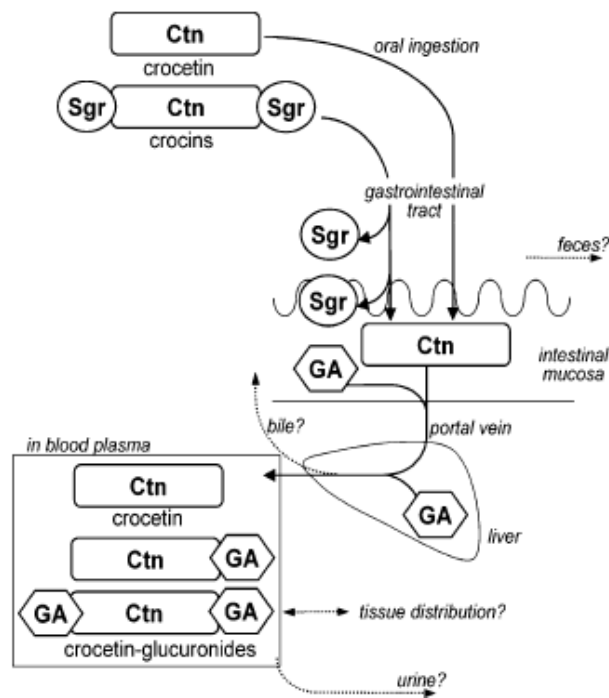
Σε ό,τι αφορά στους ιστούς σπλήνα και εγκέφαλο δε μετρήθηκαν επίπεδα συγκεντρώσεων εντός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου. Στο Παράρτημα II παρατίθενται σε πίνακες όλες οι μετρήσεις συγκεντρώσεων για τον ορό του αίματος και τους ιστούς για την ελεύθερη και ολική κροκετίνη αλλά και για το μεταβολίτη που χρησιμοποιήθηκαν για τη ΦΚ ανάλυση και μοντελοποίηση.

Γ.2.2.1. Διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση - Μοντελοποίηση

Δεδομένου ότι στη μελέτη υπήρχε ένα δείγμα αίματος ανά πειραματόζωο, πραγματοποιήθηκε naïve pooled πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση των δεδομένων στο λογισμικό Phoenix[®]. Η μέθοδος αυτή, όταν εφαρμόζεται σε πληθυσμιακά δεδομένα, αντιμετωπίζει όλες τις παρατηρήσεις σε να προέρχονται από ένα άτομο, δηλαδή αγνοεί την υπάρχουσα διατομική μεταβλητότητα και υπολογίζει μόνο τις τιμές των παραμέτρων, και το τυπικό σφάλμα της εκτίμησης, λαμβάνοντας όμως υπόψη τις διατομικές διαφορές στη δόση και στις τιμές των συμμεταβλητών, αν υπάρχουν. Το μονοδιαμερισματικό μοντέλο βρέθηκε να περιγράφει ικανοποιητικά την κινητική τόσο για την ελεύθερη μορφή της κροκετίνης όσο και για το γλυκουρονίδιο μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μετά τη χορήγηση πραγματοποιείται ταχεία υδρόλυση της κροκίνης (το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος) προς κροκετίνη. Παράλληλα, για την περιγραφή της κινητικής του μεταβολίτη της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο) χρησιμοποιήθηκε μια πρωτοταξική σταθερά κινητικής (k_a) που δείχνει το ρυθμό βιομετατροπής της κροκετίνης προς το αντίστοιχο γλυκουρονίδιο. Σε ό,τι αφορά στην από του στόματος χορήγηση, το μονοδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική απορρόφησης, φαίνεται να

περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Για τον τύπο του σφάλματος της εκτίμησης χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις το log-additive residual error. Τα αποτελέσματα της διαμερισματικής ΦΚ ανάλυσης παρατίθενται στο Σχήμα Γ8 ενώ στον πίνακα Γ5 δίνονται οι τιμές των ΦΚ παραμέτρων στον ορό του αίματος μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τόσο για την ελεύθερη κροκετίνη όσο και για το γλυκουρονίδιο και για τις δύο οδούς χορήγησης.

Οι παράμετροι του ΦΚ μοντέλου για την από του στόματος χορήγηση, υπολογίζονται σε σχέση με την παράμετρο F που είναι η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα. Μια προσέγγιση της τιμής της βιοδιαθεσιμότητας F της κροκετίνης θα μπορούσε να γίνει με τη σύγκριση της υπολογιζόμενης τιμής της κάθαρσης του ελεύθερου φαρμάκου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ($Cl_{\text{crocetin-iv}}$) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή μετά την από του στόματος χορήγηση ($Cl_{\text{crocetin-peros}}$) (Πίνακας Γ5). Το γεγονός όμως ότι η κροκετίνη χορηγείται έμμεσα μέσω της χορήγησης του SFE και τα μετρούμενα επίπεδα προκύπτουν μετά από μετατροπή της περιεχόμενης στο SFE κροκίνης σε κροκετίνη, δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας. Η τιμή που προκύπτει είναι $F = 1.34$. Τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της κροκετίνης μετά την από του στόματος χορήγηση του SFE, σε σχέση με την ενδοφλέβια, πιθανώς οφείλονται στην εκτεταμένη υδρόλυση που υφίσταται η κροκίνη σε κροκετίνη στο γαστρεντερικό αυλό (πριν την απορρόφηση) ή/και στον εντερικό βλεννογόνο (στη διάρκεια της απορρόφησης) προς κροκετίνη, η οποία εισέρχεται ταχέως στη γενική κυκλοφορία μέσω της πυλαίας φλέβας (2). Πιο συγκεκριμένα, οι Asai et al. (2) προτείνουν το μεταβολικό μονοπάτι που φαίνεται στην εικόνα Γ1 για την από του στόματος χορηγούμενη κροκετίνη και κροκίνη.

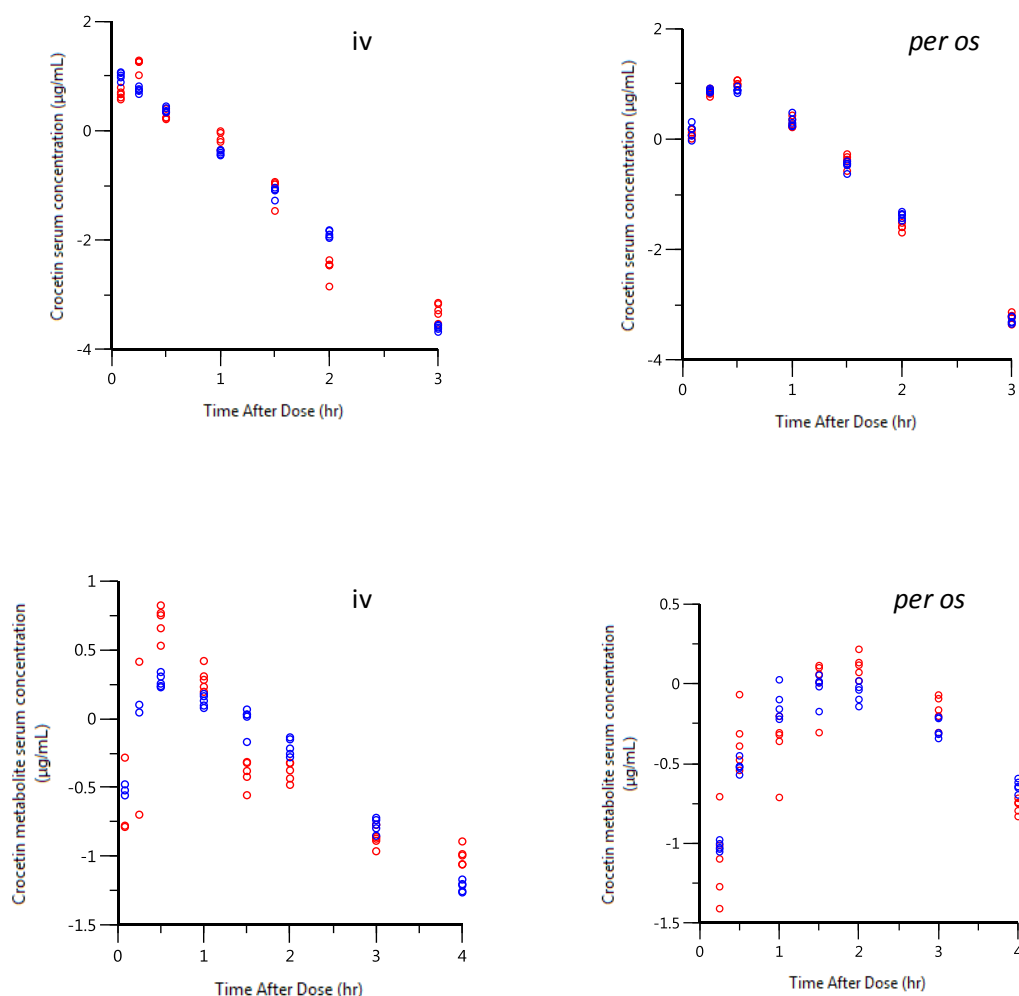


Εικόνα Γ1: Προτεινόμενο μεταβολικό μονοπάτι κροκίνης και κροκετίνης μετά από peros χορήγηση (2).

Σε αντίστοιχα συμπεράσματα καταλήγουν οι Lautenschläger et al. (77) μετά από *in vitro* μελέτη της εντερικής απορρόφησης της κροκίνης και κροκετίνης. Σύμφωνα με τους Lautenschläger et al. (77) η κροκίνη υπόκειται σε εντερική υδρόλυση προς την απογλυκοζυλιωμένη *trans*-κροκετίνη η οποία στη συνέχεια απορροφάται με παθητική διάχυση σε υψηλό βαθμό και ταχύτητα από το εντερικό επιθήλιο. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η εντερική απογλυκοζυλίωση της κροκίνης οφείλεται κυρίως σε ενζυματική διαδικασία στα επιθηλιακά κύτταρα και δευτερευόντως, σε πολύ μικρό βαθμό, στην επίδραση των μικροβίων στο παχύ έντερο.

Επιπρόσθετα, η μετατροπή της κροκίνης σε κροκετίνη μετά από ενδοφλέβια χορήγηση SFE φαίνεται να είναι ταχύτερη, όπως προκύπτει από την καλή προσαρμογή του μονοδιαμερισματικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα χωρίς την ανάγκη θεώρησης πρωτοταξικής σταθερά κινητικής (k_a) της μετατροπής όπως στην περίπτωση του μεταβολίτη της κροκετίνης (Πίνακας Γ5). Αυτό, σε συνδυασμό με τη γρήγορη γλυκουρονιδίωση της κροκετίνης και το σχηματισμό του αντίστοιχου μεταβολίτη ενδεχομένως να συμβάλλει στην αυξημένη τιμή της κάθαρσης της κροκετίνης μετά την ενδοφλέβια χορήγηση SFE και μείωση της μετρούμενης συγκέντρωσης (Πίνακας Γ5).

Όσον αφορά στο φαινόμενο όγκο κατανομής, οι υψηλές τιμές που προσδιορίζονται μετά από *iv* και *per os* χορήγηση SFE, σε σχέση με το συνολικό όγκο αίματος του ζωικού προτύπου της μελέτης που αναφέρεται περίπου ίσος με 58 mL/kg (περίπου 1,5 mL για μέσο βάρος σώματος 25 g ή 6-8% του συνολικού βάρους του ζώου), αντανakλούν σημαντική κατανομή στους περιφερικούς ιστούς τόσο της κροκετίνης όσο και του μεταβολίτη της.



Σχήμα Γ8: Ημιλογαριθμικές απεικονίσεις της μεταβολής των μετρούμενων (○) και προσδιοριζόμενων (○) συγκεντρώσεων στον ορό για την ελεύθερη κροκετίνη (άνω απεικονίσεις) και τον μεταβολίτη της κροκετίνης (κάτω απεικονίσεις).

Πίνακας Γ5: Εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της κροκετίνης (ελεύθερη μορφή) και του γλυκουρονιδίου της (μεταβολίτη, συζευγμένη μορφή) μετά από ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση σε μύες, με τη θεώρηση μονοδιαμερισματικού μοντέλου κατανομής και με τη χρήση *naïve* pooled μεθοδολογίας

Παράμετρος	Κροκετίνη (ασύζευκτη, μητρική)				Μεταβολίτης κροκετίνης (συζευγμένη μορφή)			
	<i>iv</i>		<i>per os</i> *		<i>iv</i>		<i>per os</i> *	
	Εκτίμηση	CV%	Εκτίμηση	CV%	Εκτίμηση	CV%	Εκτίμηση	CV%
K_a (1/hr)	-	-	1.94	3.38	0.45**	9.41	0.63	4.32
V (mL)	35.6	9.25	12.5	7.09	5.45	17.1	44.8	4.03
Cl (mL/hr)	56.8	6.87	42.3	2.82	31.9	4.55	28.3	4.01
SE	0.39	10.4	0.15	12.6	0.32	10.6	0.22	10.3

*Οι παράμετροι του ΦΚ μοντέλου για την από του στόματος χορήγηση, υπολογίζονται σε σχέση με την παράμετρο F που είναι η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα. ** Πρωτοταξική σταθερά που περιγράφει το ρυθμό βιομετατροπής της κροκετίνης προς το αντίστοιχο γλυκουρονίδιο

Γ.2.2.2. Μη διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση

Η φαρμακοκινητική της κροκετίνης (ολικής και μητρικής) και του μεταβολίτη της στον ορό και του ιστούς μελετήθηκε επίσης με εφαρμογή μη διαμερισματικής φαρμακοκινητικής ανάλυσης (NCA sparse data methodology, Phoenix[®]) για τον προσδιορισμό βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων όπως όπως AUC_{0-t} (εμβαδόν επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου για χρόνο από 0 έως αυτόν του τελευταίου πειραματικού σημείου), AUC_{inf} (εμβαδόν επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου με επέκταση στο άπειρο), C_{max} (μέγιστη μετρούμενη συγκέντρωση) and T_{max} (χρόνος επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης) και τον υπολογισμό της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας. Σύμφωνα με τη μέθοδο NCA που χρησιμοποιήθηκε (NCA sparse data methodology, Phoenix[®]), κατασκευάστηκε η μέση απεικόνιση συγκέντρωσης-χρόνου και χρησιμοποιήθηκε μαζί με την υπάρχουσα πληροφορία για κάθε πειραματόζωο για τον υπολογισμό των PK παραμέτρων (AUC , C_{max}) και του αντίστοιχου τυπικού σφάλματος (SE). Ο υπολογισμός της AUC έγινε με τη μέθοδο των τραπεζίων ενώ οι παράμετροι C_{max} και T_{max} προκύπτουν απευθείας από τα πειραματικά δεδομένα. Για τον υπολογισμό της παραμέτρου $t_{1/2}$ έγινε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα τρία τελευταία σημεία της απεικόνισης συγκέντρωσης-χρόνου, υπολογίστηκε η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης k_{el} από την κλίση της ευθείας και ο χρόνος ημιζωής από τη σχέση $k_{el}=0.693/t_{1/2}$. Η παράμετρος Cl υπολογίζεται από τη σχέση $Cl=Dose/AUC$. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στον Πίνακα Γ6. Οι υπολογισθείσες τιμές AUC για την ολική κροκετίνη (μεταβολίτης και κροκετίνη) βρέθηκαν 1.5-2.5 φορές υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές της κροκετίνης, αντικατοπτρίζοντας έτσι τη βιομετατροπή της κροκετίνης προς τη συζευγμένη μορφή μετά από ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου. Οι εκτιμώμενες τιμές της κάθαρσης της κροκετίνης και του μεταβολίτη της βρέθηκαν ίσες με 55 mL/h και 30.6 mL/h για την ενδοφλέβια χορήγηση και 40.8 mL/h and 28.2 mL/h για την από του στόματος χορήγηση αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τις τιμές που εκτιμήθηκαν από τη διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση (Πίνακας Γ5). Η βιοδιαθεσιμότητα της κροκετίνης και της ολικής κροκετίνης (κροκετίνη και μεταβολίτης) (F) μετά την από του στόματος χορήγηση του λυόφιλου υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου σε σχέση με την ενδοφλέβια χορήγηση SFE υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση:

$$F = \frac{AUC_{0-t(oral)} \times Dose_{(i.v.)}}{AUC_{0-t(i.v.)} \times Dose_{(oral)}}$$

όπου $AUC_{0-t(oral)}$ και $AUC_{0-t(i.v.)}$ είναι η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου από το χρόνο μηδέν έως το τελευταίο σημείο δειγματοληψίας μετά την από του στόματος και την ενδοφλέβια χορήγηση του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου. Οι παράμετροι $Dose_{(oral)}$ and $Dose_{(iv)}$ είναι αντίστοιχες δόσεις για την κάθε οδό χορήγησης. Η τιμή της βιοδιαθεσιμότητας της κροκετίνης μετά από peros χορήγηση του SFE σε σχέση με την ενδοφλέβια χορήγηση ίδιας δόσης SFE, υπολογίστηκε σε 1.33. Η τιμή

αυτή, συνάδει επίσης με την εκτιμώμενη τιμή από το μονοδιαμερισματικό ΦΚ μοντέλο που βρέθηκε να περιγράφει τη φαρμακοκινητική της κροκετίνης στον ορό με βάση την ανάλυση με το λογισμικό Phoenix[®]. Θεωρώντας την ολική κροκετίνη (κροκετίνη και μεταβολίτης) η τιμή του F υπολογίζεται ίση με 1.16 που δείχνει ότι η εντερική απορρόφηση της κροκετίνης μετά από peros χορήγηση του SFE (60 mg/kg) οδηγεί σε επίπεδα ολικής κροκετίνης στον ορό σχεδόν ίδια με αυτά μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της ίδιας δόσης SFE και επιβεβαιώνει την εντερική μετατροπή της κροκίνης σε κροκετίνη.

Η μη διαμερισματική ανάλυση εφαρμόστηκε και για τον υπολογισμό βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων της κροκετίνης (ελεύθερης και ολικής) και του γλυκουρονιδίου της (Πίνακας Γ6) στους ιστούς. Μια πρώτη εκτίμηση για την κατανομή του φαρμάκου μεταξύ ιστών και ορού αίματος μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την αναλογία AUC_{tissue}/AUC_{serum} (K_{rapp}) ως μέτρο της κατανομής στους ιστούς τόσο μετά από την ενδοφλέβια όσο και μετά την από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος του κρόκου σε μύες σε δόση 60 mg/kg σωματικού βάρους. Οι υπολογισθείσες τιμές K_{rapp} παρατίθενται στον Πίνακα Γ6. Επισημαίνεται βέβαια ότι η προσέγγιση αυτή γίνεται με προσοχή δεδομένου ότι οι μετρήσεις της συγκέντρωσης τόσο της ελεύθερης κροκετίνης όσο και του μεταβολίτη έχουν γίνει μετά από απλή χορήγηση και όχι σε σταθεροποιημένη κατάσταση. Με βάση τα αποτελέσματα από τους ιστούς που μελετήθηκαν, η κροκετίνη φαίνεται να κατανέμεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς, που είναι τα βασικά όργανα για τη βιομετατροπή και απομάκρυνση της κροκετίνης, και οι υπολογιζόμενες τιμές της παραμέτρου K_{rapp} είναι ίσες ή μεγαλύτερες της μονάδας. Δεν ανιχνεύθηκαν μετρήσιμες τιμές για τη συγκέντρωση της κροκετίνης τόσο στους πνεύμονες όσο και στην καρδιά. Σχετικά με το μεταβολίτη της κροκετίνης, οι υπολογισθείσες τιμές της παραμέτρου K_{rapp} (εύρος 0.28-1.41, Πίνακας Γ6) δείχνουν μικρότερη κατανομή στους ιστούς που μελετήθηκαν σε σύγκριση με την κροκετίνη, γεγονός που αντανακλάται και στις υψηλότερες τιμές κάθαρσης.

Πίνακας Γ6: Εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της κροκετίνης μετά από ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση με τη χρήση μη διαμερισματικής φαρμακοκινητικής ανάλυσης

Παράμετρος	Κροκετίνη (ελεύθερη, ασύζευκτη μορφή)						Ολική κροκετίνη (ελεύθερη + μεταβολίτης)					
	ορός		ήπαρ		νεφροί		ορός		ήπαρ		νεφροί	
	iv	peros	iv	peros	iv	peros	iv	peros	iv	peros	iv	peros
AUC_{last} (h×μg/mL)* (%CV)	2.13 (0.05)	2.86 (1.47)	4.38 (1.84)	2.75 (3.0)	1.81 (4.98)	3.82 (0.08)	5.21 (1.11)	6.10 (1.07)	5.57 (1.03)	4.62 (0.92)	3.43 (2.31)	5.35 (1.24)
AUC_{INF} (h×μg/mL)*	2.16	2.88	5.65	3.08	3.13	5.18	6.11	7.06	5.99	5.15	3.71	5.85
C_{max} (μg/mL)* (%CV)	3.40 (4.71)	2.77 (2.17)	2.50 (6.37)	2.58 (5.15)	2.08 (14.0)	2.35 (1.87)	3.84 (3.85)	3.48 (1.6)	3.05 (0.16)	2.93 (2.67)	2.54 (4.27)	2.54 (1.77)
T_{max} (h)	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
t_{1/2} (h)	0.45	0.39	1.49	0.85	1.19	1.49	1.69	1.43	1.11	1.21	0.80	1.11
Cl_F (mL/h)	55.0	40.8	21.0	38.2	38.0	22.7	19.4	16.7	19.8	22.8	32.0	20.1
K_{papp} (AUC_{tissue}/AUC_{serum})	-	-	2.06	0.96	0.85	1.34	-	-	1.07	0.76	0.66	0.88
Παράμετρος	Μεταβολίτης κροκετίνης (συζευγμένη μορφή)											
	ορός		ήπαρ		νεφροί		καρδιά		πνεύμονες			
	iv	peros	iv	peros	iv	peros	iv	peros	iv	peros		
AUC_{last} (h×μg/mL) (%CV)	3.16 (3.75)	3.12 (2.18)	0.88 (5.3)	1.75 (4.23)	1.49 (7.64)	1.01 (10.5)	2.10 (2.72)	2.39 (0.86)	3.96 (5.71)	4.41 (1.59)		
AUC_{INF} (h×μg/mL)	3.88	4.18	1.13	2.32	2.18	1.65	3.18	2.91	4.22	4.83		
C_{max} (μg/mL) (%CV)	2.03 (4.96)	1.12 (3.32)	0.67 (5.22)	0.76 (4.62)	0.73 (36.0)	0.61 (24.0)	2.08 (10.4)	1.94 (0.79)	2.17 (17.6)	2.45 (1.68)		
T_{max} (h)	0.5	2	0.5	1.5	0.25	1	0.25	0.5	0.08	0.5		
t_{1/2} (h)	1.34	1.58	1.72	1.28	1.97	2.58	2.02	1.27	0.99	1.14		
Cl_F (mL/h)	30.6	28.2	105	50.6	54.4	71.1	37.3	40.5	28.1	24.3		
kp (AUC_{tissue}/AUC_{serum})			0.28	0.56	0.47	0.32	0.67	0.77	1.25	1.41		

* Οι μονάδες AUC και C_{max} h×μg/g ιστού και μg/g ιστού είναι ισοδύναμες με τις αντίστοιχες στον ορό με βάση τη διαδικασία χειρισμού (ομογενοποίησης) των δειγμάτων (βλ. σελ 71)

Γ.3. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ SFE ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ

Με βάση τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής μελέτης επελέγησαν τρία δοσολογικά σχήματα για τη διερεύνηση της αντιαθηρωματικής δράσης του SFE. Πιο συγκεκριμένα έγινε από του στόματος επαναλαμβανόμενη χορήγηση διάρκειας 4 εβδομάδων ημερησίας δόσης SFE 30 mg/kg, 60 mg/kg και 90 mg/kg σε αρσενικούς ομόζυγους ως προς την έλλειψη απολιποπρωτεΐνης E μύες (ApoE^{-/-}) που είναι το κατεξοχήν μοντέλο αθηρωμάτωσης λόγω των ομοιοτήτων της παθοφυσιολογίας της προκαλούμενης νόσου με αυτή του ανθρώπου.

Γ.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΟ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ, ΤΟ ΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ

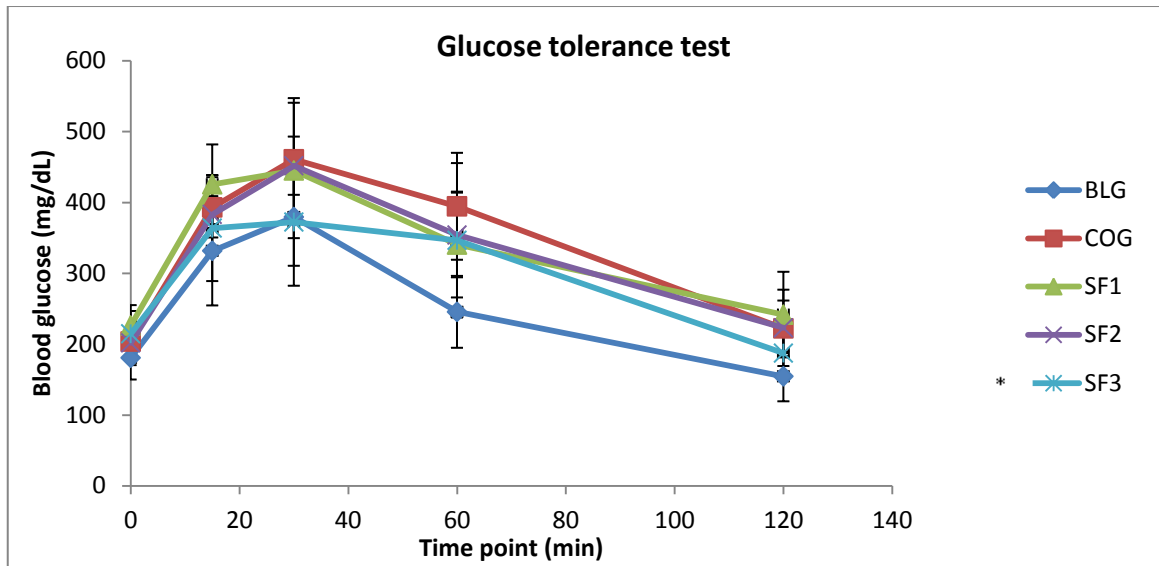
Με βάση τα παρατιθέμενα στοιχεία στον Πίνακα Γ12, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο βάρος των μυών και στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ορού ανάμεσα σε όλες τις ομάδες στο τέλος των πειραμάτων ($p > 0.05$). Αντίθετα, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων παρουσίασαν μια δοσοεξαρτώμενη μείωση ανάμεσα στις ομάδες που έλαβαν το εκχύλισμα κρόκου με στατιστικά σημαντική διαφορά να παρατηρείται για την υψηλή δόση των 90mg/kg σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (COG, $p = 0.003$). Παράλληλα, σε ό,τι αφορά τις τιμές AUC γλυκόζης που προέκυψαν μετά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ζώα της ομάδας ελέγχου (COG) και τα ζώα των ομάδων SF1 και SF2 που έλαβαν δόση 30 και 60 mg/kg σωματικού βάρους, αντίστοιχα (SF1: $p = 0.54$ and SF2, $p = 0.36$). Αντίθετα, τα ζώα της ομάδας SF3 (που έλαβαν την υψηλή δόση, 90 mg/kg) παρουσίασαν σημαντική βελτίωση στον έλεγχο της γλυκόζης σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες ($*p = 0.034$) προσομοιάζοντας τα επίπεδα της ομάδας BLG. Στα Σχήματα που ακολουθούν δίνονται σχηματικά τα αποτελέσματα του τεστ ανοχής στη γλυκόζη (καμπύλες σακχάρου, Σχήμα Γ9) και των επιπέδων ολικής χοληστερόλης ορού (Σχήμα Γ10) και τριγλυκεριδίων (Σχήμα Γ11) σε μορφή ραβδογραμμάτων.

Πίνακας Γ7: Παρουσίαση αποτελεσμάτων μετρήσεων σωματικού βάρους, ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και επιπέδων και AUC γλυκόζης μετά από τεστ ανοχής στη γλυκόζη και για τις 4 ομάδες ζώων^a

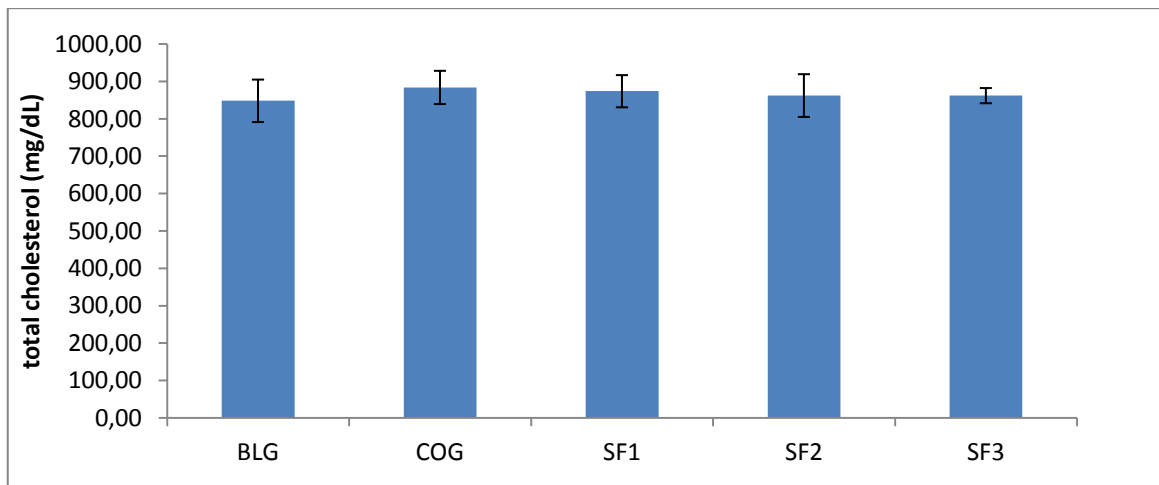
Παράμετρος	BLG (n=10)	COG (n=10)	SF1 (n=10)	SF2 (n=10)	SF3 (n=10)
Σωματικό βάρος (g)	39.94±4.89	41.25±4.76	41.48±6.36	38.82±5.22	38.11±2.96
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	848.18±56.80	884.00±44.40	873.90±43.05	862.22±57.18	862.00±20.33
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	91.27±27.03	103.00±11.77	92.00±12.67	88.22±12.59	76.88±9.30 ^{(*)b}
Γλυκόζη νηστείας (mg/dL)	180.8±30.73	203.7±18.64	226.3±20.44	195.5±31.24	187.6±22.19
AUC γλυκόζης (mg*min/dL)	30503±2605 ^(**) c	42223±7149	40916±5126	40054±5227	34271±6861 ^(***) d

SF-1, ομάδα χορήγησης 30 mg/kg ημερησίως SFE (Low dose); SF-2, ομάδα χορήγησης 60 mg/kg ημερησίως SFE (Medium dose); SF-3 ομάδα χορήγησης 90 mg/kg ημερησίως SFE (High dose); COG, ομάδα ελέγχου, χορήγηση ίσου όγκου WFI ημερησίως; ^aΌλες οι τιμές δίνονται ως mean ± SD; ^b (*) Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.003$) σε

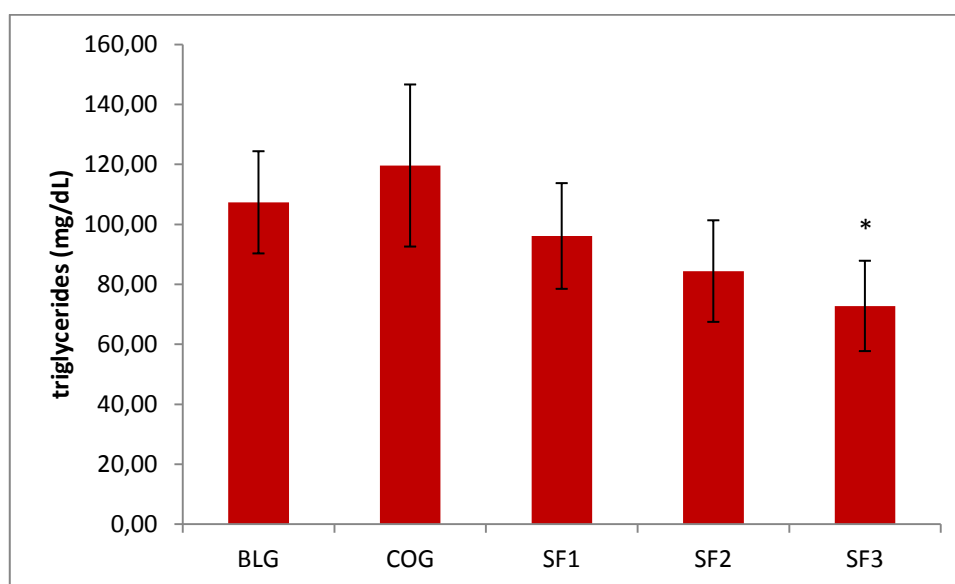
σύγκριση με την ομάδα COG; ^{c (**)} Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.01$) μεταξύ ομάδας BLG και όλων των άλλων ομάδων εκτός της SF3; ^{d (***)} Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.034$) μεταξύ ομάδας SF3 και ομάδας COG.



Σχήμα Γ9: Διάγραμμα καμπύλης σακχάρου μετά από το τεστ ανοχής στη γλυκόζη για τις 5 ομάδες πειραματοζώων



Σχήμα Γ10: Ραβδόγραμμα παρουσίασης μετρήσεων ολικής χοληστερόλης για τις 5 ομάδες πειραματοζώων



Σχήμα Γ11: Ραβδόγραμμα παρουσίασης μετρήσεων τριγλυκεριδίων για τις 5 ομάδες πειραματοζώων

Γ.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΑ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE^{-/-})

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των ιστομορφομετρικών μετρήσεων που παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα Γ8, η αρτηκή στένωση, που εκφράζεται ως το επί τοις εκατό ποσοστό του εμβαδού των αθηρωματικών πλακών σε σχέση με το εμβαδό του αγγειακού αυλού, μειώθηκε σημαντικά και για τις 3 ομάδες χορήγησης εκχυλίσματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, COG (* $p < 0.05$). Σε ό,τι αφορά τα ποσοστά συνδετικού ιστού και κολλαγόνου, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα ζώα που έλαβαν θεραπεία όχι μόνο παρουσίασαν σημαντική μείωση στην αρτηκή στένωση, αλλά και οι εναπομείνουσες αθηρωματικές πλάκες απέκτησαν μεγαλύτερη σταθερότητα και ελαστικότητα χάρη στην αυξημένη συγκέντρωση κολλαγόνου και συνδετικού ιστού (και κατά συνέπεια ελαστίνης) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, COG (* $p < 0.05$, Πίνακας Γ16). Αυτό συμβάλλει στην ορατή μείωση του κινδύνου ρήξης της αθηρωματικής πλάκας που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Σχετικά με τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που οδηγούν σε χρήσιμα συμπεράσματα γύρω από το μηχανισμό δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου, για όλες τις μετρούμενες μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-2, MMP-3, MMP-9) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση και στις τρεις ομάδες παρέμβασης σε σύγκριση με την ομάδα σύγκρισης (BLG) και την ομάδα ελέγχου, COG (* $p < 0.05$), με ιδιαίτερα πιο εμφανή τα αποτελέσματα στις ομάδες SF2 και SF3. Αποτέλεσμα αναμενόμενο με βάση τη θεωρητική προσέγγιση καθώς το δίκτυο των μεταλλοπρωτεϊνών ενεργοποιείται με την εμφάνιση φλεγμονής του

καρδιαγγειακού συστήματος και αθηρωμάτωσης. Ταυτόχρονα, ο ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP-2) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στις ομάδες SF2 και SF3 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$) και την ομάδα που έλαβε τη χαμηλή δόση εκχυλίσματος (SF1, $*p < 0.05$). Επιπλέον, και επίσης σημαντικό, ο υπολογιζόμενος λόγος MMP-2/TIMP-2 μειώθηκε σημαντικά και με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στις ομάδες χορήγησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και ήταν 1.85, 0.99, 0.39 και 0.30 για τις ομάδες COG, SF1, SF2 και SF3, αντίστοιχα.

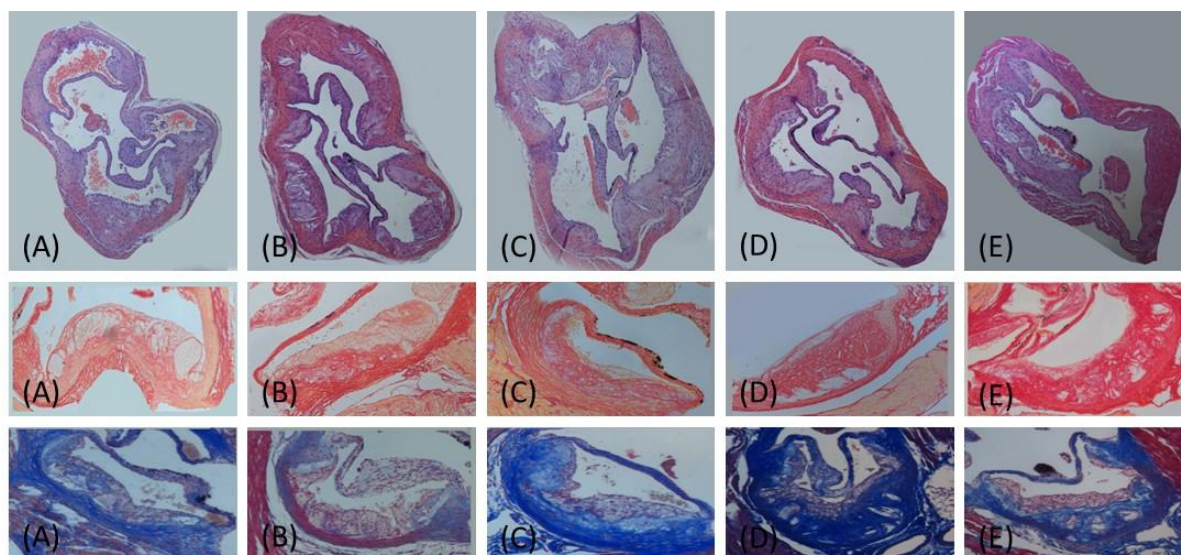
Σε ό,τι αφορά στους παράγοντες φλεγμονής (μακροφάγα, MCP-1, TNF- α και IL-6), σε όλες τις ομάδες χορήγησης μετρήθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ποσοστά χρώσης για τα μόρια αυτά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, COG ($*p < 0.05$), γεγονός που επιβεβαιώνει και τον περιορισμό και τη βελτίωση της εικόνας της νόσου. Σε αντιδιαστολή, τα λεία μυϊκά κύτταρα (που μετρώνται με την εκτίμηση του ποσοστού χρώσης του αντισώματος της α -ακτίνης) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση και για τις τρεις ομάδες παρέμβασης τόσο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, COG όσο και σε σχέση με την ομάδα BLG (Πίνακας Γ16, $*p < 0.05$).

Παρατίθενται, επίσης στις Εικόνες Γ12 και Γ13 ενδεικτικές φωτογραφίες από τις χρώσεις που πραγματοποιήθηκαν τόσο για την εκτίμηση της έκτασης και σύστασης των αθηρωματικών πλακών όσο και με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας.

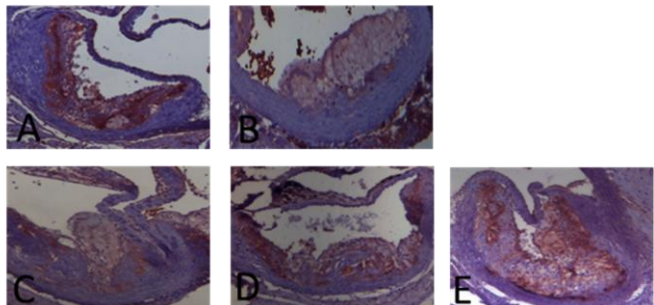
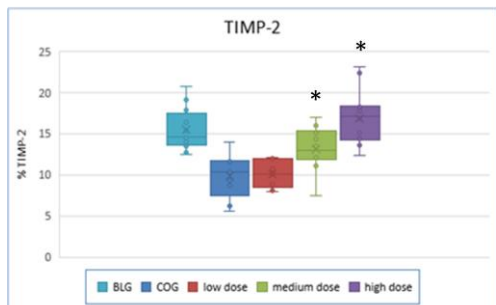
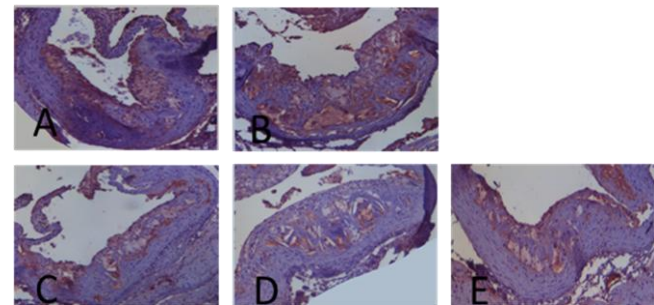
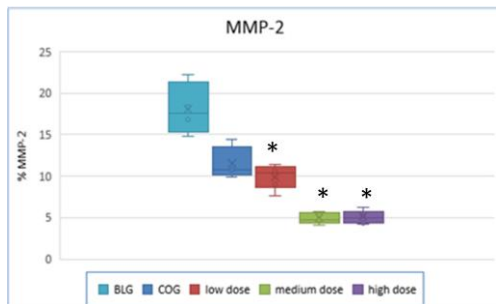
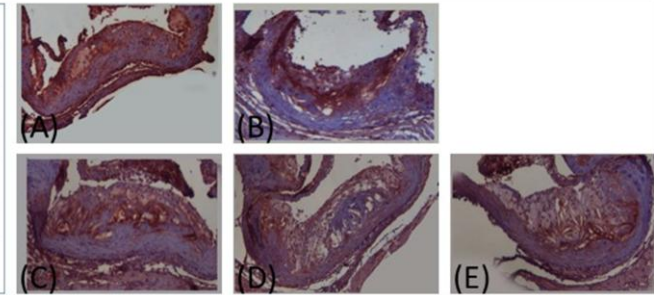
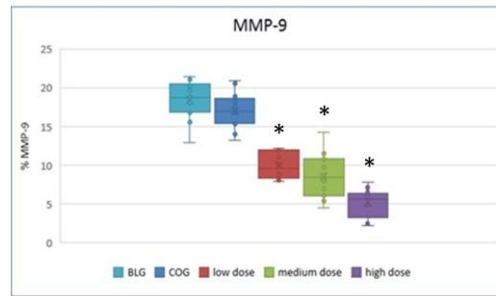
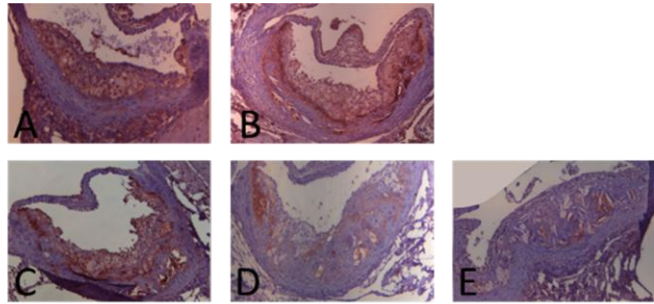
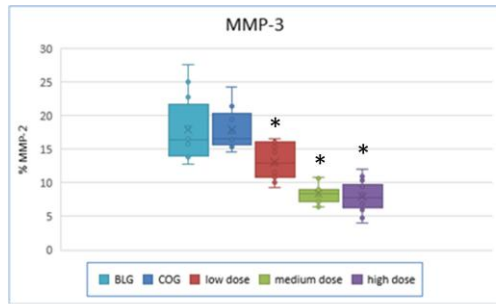
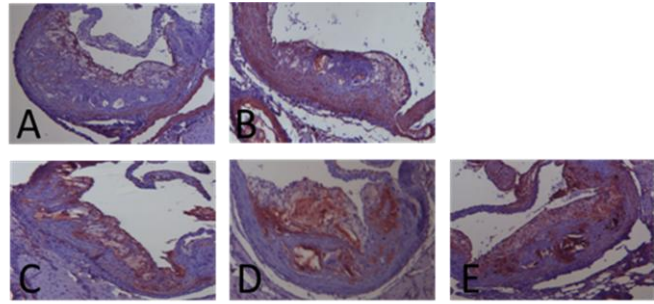
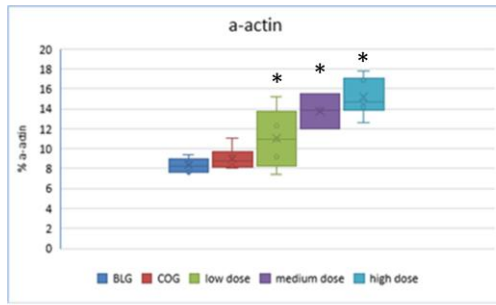
Πίνακας Γ8: Συνοπτική παρουσίαση όλων των ιστομορφομετρικών μετρήσεων και μετρήσεων ανοσοϊστοχημείας^α και για τις 4 ομάδες ζώων^β

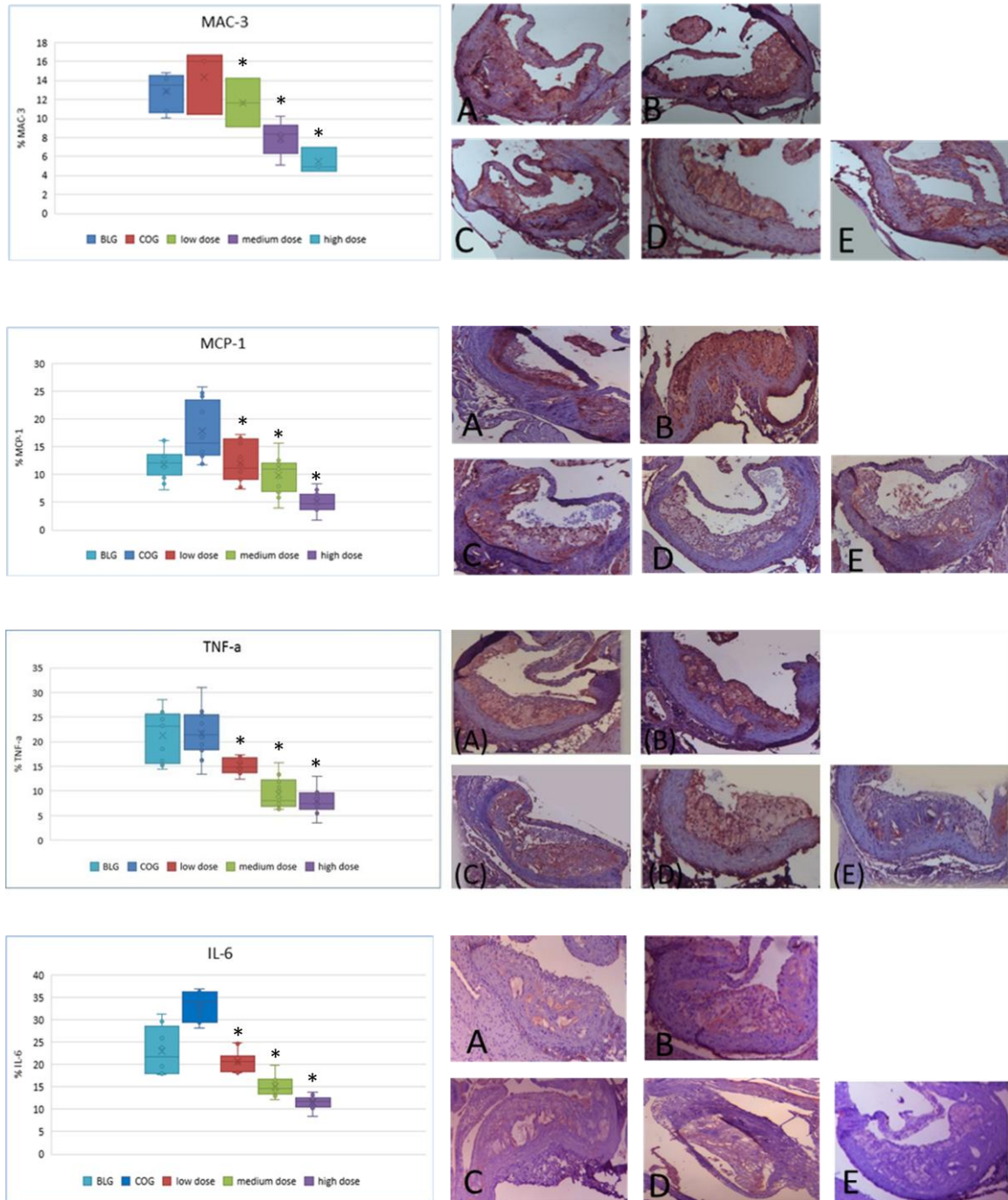
	BLG (n=10)	GOG (n=10)	SF1* (n=10)	SF2* (n=10)	SF3* (n=10)
Αορτική στένωση (%)	22.73±7.04	29.53±8.75	20.60±5.23	18.83±4.89	15.14±3.29
Συνδετικός ιστός (%)	30.64±6.08	27.72±8.79	39.03±9.99	44.27±8.89	40.73±3.49
Κολλαγόνο (%)	16.16±3.08	17.32±1.03	23.17±1.49	23.02±1.70	31.33±1.52
SMCs (%)	8.34±3.22	9.01±1.13	11.52±2.57	13.79±1.79	15.18±1.87
Μακροφάγα (%)	12.86±2.03	14.36±3.46	11.67±2.57	7.94±1.87	5.42±1.32
MMP-2 (%)	11.46±1.98	18.08±3.15	9.94±1.42	5.15±0.81	5.06±0.79
MMP-3 (%)	17.93±4.77	17.95±3.18	14.21±4.55	8.14±1.43	7.93±2.31
MMP-9 (%)	17.44±4.03	17.79±3.27	11.73±2.96	8.53±2.73	5.19±1.83
TIMP-2 (%)	15.44±2.60	9.79±2.69	10.03±1.64 ^c	13.11±2.74	16.86±3.17
MCP-1 (%)	12.45±3.17	17.84±5.29	12.05±3.66	9.93±3.23	5.03±1.77
TNF-α (%)	22.49±6.22	20.24±4.67	16.85±4.34	9.39±3.11	7.88±2.47
IL-6 (%)	22.99±5.45	32.22±3.37	20.65±2.44	15.15±2.37	11.49±1.55

SF-1, ομάδα χορήγησης 30 mg/kg ημερησίως SFE (Low dose); SF-2, ομάδα χορήγησης 60 mg/kg ημερησίως SFE (Medium dose); SF-3 ομάδα χορήγησης 90 mg/kg ημερησίως SFE (High dose); BLG, ομάδα σύγκρισης, θανάτωση στις 12 εβδομάδες HFD; COG, ομάδα ελέγχου, χορήγηση ίσου όγκου WFI ημερησίως; ^α Αποτελέσματα εκφρασμένα ως % ποσοστό της συνολικής επιφάνειας της πλάκας; ^β Όλες οι τιμές δίνονται ως mean ± SD. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις μετρούμενες τιμές όλων των SF ομάδων σε σύγκριση με την ομάδα σύγκρισης (BLG) και την ομάδα ελέγχου, COG (* $p < 0.05$) εκτός των μετρήσεων TIMP-2 της ομάδας SF1 ($p = 1.0$)^c.



Εικόνα Γ12: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που αφορούν στις ιστομορφομετρικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης (επάνω), χρώση Sirius Red για το κολλαγόνο (μέση) και χρώση Masson's Trichrome (κάτω). (A) Baseline group (BLG), (B) Control group (COG), (C) SF1 group που έλαβε 30mg/kg/ημέρα εκχύλισμα κρόκου, (D) SF2 group με δόση 60 mg/kg/ημέρα εκχυλίσματος κρόκου και (E) SF3 group με δόση 90 mg/kg εκχυλίσματος κρόκου ημερησίως





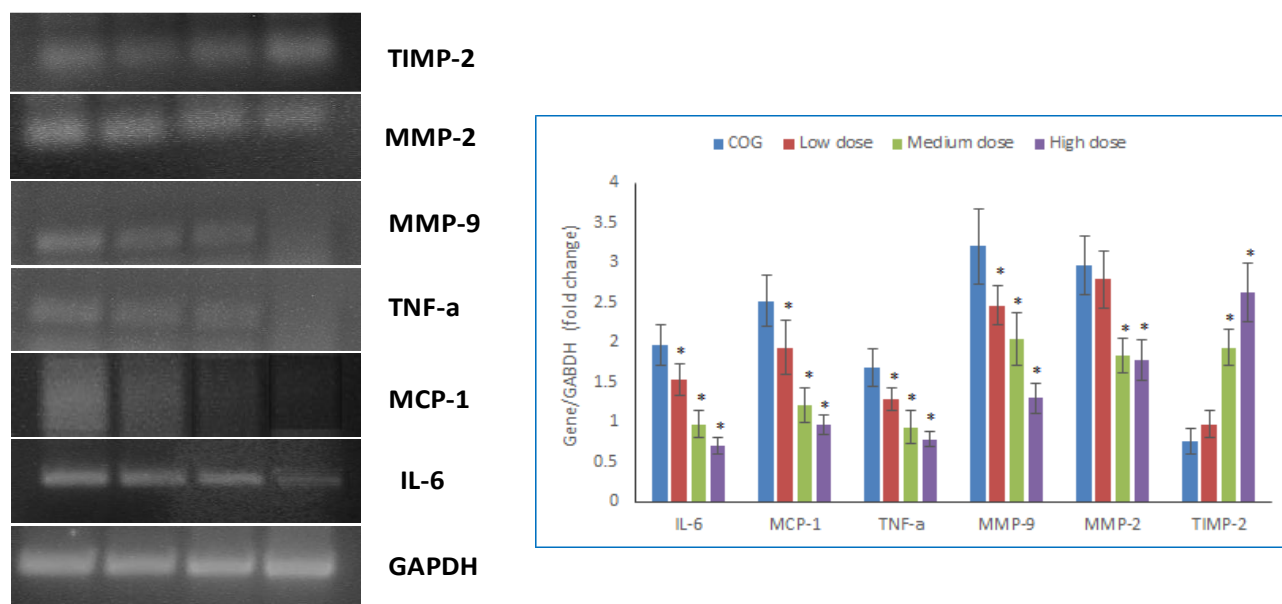
Εικόνα Γ13: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες τομών στο ύψος της αορτικής βαλβίδας κεχρωσμένων με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας για την απεικόνιση όλων των μετρώμενων παραγόντων (μεταλλοπρωτεϊναιών, προφλεγμονωδών παραγόντων και παραγόντων φλεγμονής). Παράλληλα, απεικονίζονται σχηματικά με τη βοήθεια διαγράμματος box plot οι μετρήσεις για τα ίδια αντισώματα. (A) Baseline group (BLG), (B) Control group (COG), (C) SF1 group που έλαβε 30mg/kg/ημέρα εκχυλίσμα κρόκου, (D) SF2 group με δόση 60 mg/kg/ημέρα εκχυλίσματος κρόκου και (E) SF3 group με δόση 90 mg/kg εκχυλίσματος κρόκου ημερησίως.

Στο Παράρτημα III παρατίθενται αναλυτικά όλες οι μετρήσεις για το γλυκαιμικό και λιπιδαιμικό προφίλ των πειραματοζώων, καθώς και όλες οι ιστομορφομετρικές αναλύσεις και μετρήσεις ανοσοϊστοχημείας.

Γ.3.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ SFE ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΕ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ (ApoE^{-/-})

Από την ανάλυση RT-qPCR, προέκυψε ότι η γονιδιακή έκφραση των αντιφλεγμονωδών παραγόντων IL-6, MCP-1 και TNF-α ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη για όλες τις ομάδες μυών που έλαβαν υδατικό εκχύλισμα κρόκου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$) και μάλιστα η μείωση της έκφρασης ήταν δοσοεξαρτώμενη. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τις μεταλλοπρωτεΐνάσες που μετρήθηκαν (MMP-2, MMP-9), ενώ ο αναστολέας τους TIMP-2 –όπως ήταν αναμενόμενο- παρουσίασε αυξημένη έκφραση στις ομάδες που έλαβαν θεραπεία.

Στην εικόνα Γ14 παρατίθενται οι φωτογραφίες των gel αгарόζης με τα δείγματα οι οποίες ελήφθησαν σε τράπεζα UV και η επεξεργασία τους έγινε με τη βοήθεια του Adobe Photoshop. Με βάση την ένταση του φθορισμού γίνεται η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Image Pro Plus, που χρησιμοποιήθηκε και για τις μετρήσεις των χρώσεων και της ανοσοϊστοχημείας. Συνοπτικά, οι μετρήσεις παρατίθενται στο διάγραμμα και το σύνολό τους σε πίνακα στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.



Εικόνα Γ14: Γονιδιακή έκφραση των παραγόντων IL-6, MCP-1 and TNF-α, MMP-9, MMP-2 και TIMP-2 στα ζώα της ομάδας ελέγχου (COG, n=10) που έλαβαν καθημερινά ενέσιμο ύδωρ από του στόματος, στα ζώα της ομάδας SF1 που έλαβαν εκχύλισμα κρόκου σε δόση 30mg/kg ημερησίως (Low dose, n=10), στα ζώα της ομάδας SF2 που έλαβαν δόση 60 mg/kg την ημέρα (Medium dose, n=10) και στα ζώα της ομάδας SF3 που έλαβαν εκχύλισμα σε δόση 90 mg/kg ημερησίως (High dose n=10). Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($*p < 0.05$) σε όλα τα ζώα που έλαβαν θεραπεία συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου. Εξαιρεση αποτέλεσε η ομάδα της χαμηλής δόσης που δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για τους παράγοντες MMP-2 και TIMP-2.

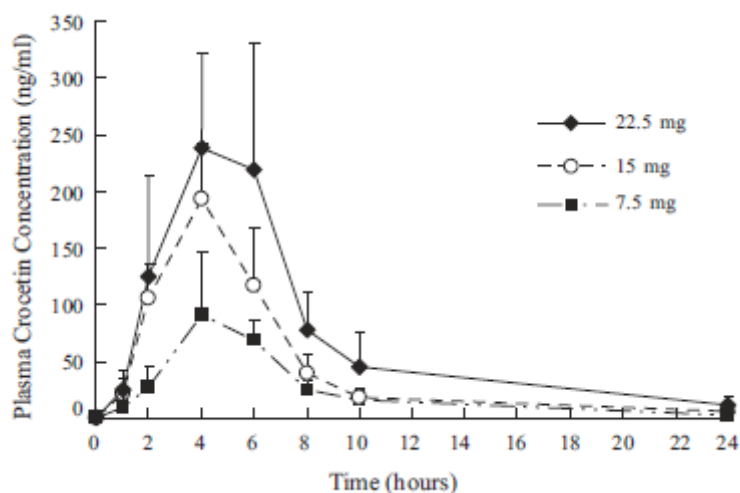
Γ.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκε και αξιολογήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* το υδατικό εκχύλισμα του Κρόκου Κοζάνης. Με βάση στα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν (ποσοτικοποίηση και NMR), βρέθηκε ότι το SFE είναι πλούσιο σε *all-trans* κροκίνη και πικροκροκίνη ενώ είναι εμφανής η χαμηλή περιεκτικότητα σε σαφρανάλη λόγω του πολικού της χαρακτήρα και της υψηλότερης διαλυτότητάς της σε οργανικά μέσα. Σε ό,τι αφορά στη σταθερότητά του, το λυόφιλο εκχύλισμα παραμένει σταθερό όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 18 μήνες) ενώ το ανασυσταμένο διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί εντός 24 ωρών από την παρασκευή του φυλασσόμενο στο ψυγείο.

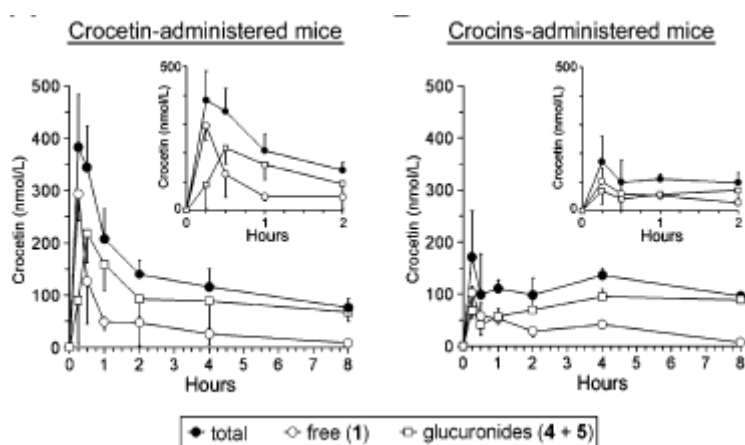
Η φαρμακοκινητική μελέτη του εκχυλίσματος που προηγήθηκε της μελέτης επί της αθηρωμάτωσης έδειξε ότι μετά από *per os* χορήγηση του SFE σε δόση 60mg/kg επιτυγχάνονται επίπεδα $C_{max} = 2.77 \mu\text{g/mL}$ (%RSD 2.17) και $3.84 \mu\text{g/mL}$ (%RSD 1.6) για την κροκετίνη και την ολική κροκετίνη αντίστοιχα, σε χρόνο 30 min μετά τη χορήγηση, γεγονός που δείχνει ότι η κροκίνη υδρολύεται σε κροκετίνη στον εντερικό αυλό και απορροφάται στη συνέχεια γρήγορα με χρόνο επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης τα 30 min. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από μελέτες που υποδεικνύουν ότι οι κροκίνες υδρολύονται ταχύτατα προς κροκετίνη μέσω της εντερικής οδού (76; 2). Επιπλέον, η ολική και η ελεύθερη κροκετίνη ακολουθούν παρόμοιο προφίλ απομάκρυνσης μία ώρα μετά τη χορήγηση ενώ μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών δεν ανιχνεύονται επίπεδα τόσο στο αίμα όσο και στους ιστούς. Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται η φαρμακοκινητική της κροκετίνης στον ορό και στους ιστούς μετά από χορήγηση εκχυλίσματος από τα στίγματα του κρόκου. Η αναζήτηση στη βιβλιογραφία έδωσε αποτελέσματα μόνο για χορήγηση καθαρής κροκίνης ή καθαρής κροκετίνης (76; 75; 1; 2) ενώ το εκχύλισμα που έχει χορηγηθεί υπό μορφήν αφειψήματος έχει μελετηθεί μόνο ως προς τη μέτρηση επιπέδων στον εγκέφαλο χωρίς τη διαξαγωγή ΦΚ μελέτης (232).

Τα αποτελέσματα της ΦΚ μελέτης έδειξαν ότι οι επιλεγμένες δόσεις του SFE οδηγούσαν σε επίπεδα συγκεντρώσεων κροκετίνης στον ορό του αίματος ανάλογα (proportional) με αυτά που υπολογίστηκαν σε υγιείς εθελοντές μετά από χορήγηση καθαρής κροκετίνης (7,5 έως και 22,5 mg που ισοδυναμεί με 0.11-0.32 mg/kg (1)) και μετά την από του στόματος χορήγηση είτε κροκετίνης (40 nmol ή 0.37 mg/kg) είτε κροκίνης (40 nmol ή 1.12 mg/kg) σε μύες (2). Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Umigai et al. (1) η μέγιστη συγκέντρωση ελεύθερης κροκετίνης υπολογίστηκε στα 100 ng/ml, 200 ng/ml και 280 ng/ml (Εικόνα Γ15) μετά από χορήγηση 0.11 mg/kg, 0.21 mg/kg και 0.37 mg/kg κροκετίνης, που αντιστοιχεί σε περίπου 5 μg/mL μετά από χορήγηση των 5.4 mg/kg της δικής μας μελέτης, θεωρώντας γραμμική κινητική σε όλο το φάσμα των χορηγούμενων δόσεων, όπως αναφέρεται και στη συγκεκριμένη μελέτη. Αντίστοιχα στη μελέτη των Asai et al. (2) τα μετρούμενα επίπεδα κροκετίνης μετά από χορήγηση 0.52 mg/kg κροκετίνης ή 1.56 mg/kg κροκίνης σε μύες ήταν περίπου 300 nmol/L και 100 nmol/L, αντίστοιχα (Εικόνα Γ16), που

αντιστοιχούν σε 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 2.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα, μετά από χορήγηση των 5.4 mg/kg κροκετίνης ή 16.2 mg/kg κροκίνης της δικής μας μελέτης, θεωρώντας και πάλι γραμμική κινητική σε όλο το φάσμα των χορηγούμενων δόσεων.



Εικόνα Γ15: Φαρμακοκινητικό προφίλ κροκετίνης στο πλάσμα μετά από peros χορήγηση δόσης 7.5 mg, 15 mg και 22.5 mg σε υγιείς εθελοντές (1)



Εικόνα Γ16: Φαρμακοκινητικό προφίλ κροκετίνης στο πλάσμα μετά από peros χορήγηση κροκετίνης (0.52 mg/kg) και κροκίνης (1.56 mg/kg) (2)

Λαμβάνοντας υπόψιν τα πιο πάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με την πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη της ομάδας μας (234) στην οποία χορηγήθηκε από του στόματος υδατικό εκχύλισμα κρόκου σε δόση 60 mg/kg για 4 εβδομάδες και βρέθηκε η καρδιοπροστατευτική του δράση έναντι ισχαιμίας/επαναιμάτωσης τόσο σε Wild-Type όσο και σε $\text{ApoE}^{-/-}$ μύες, επελέγησαν δόσεις στο εύρος 30-90 mg/kg/ημέρα που αντιστοιχούν σε 2.7-8.1 mg/kg/ημέρα καθαρής κροκετίνης ή 8.1-24.3 mg/kg/ημέρα κροκίνης για να γίνει αξιολόγηση της αντιαθηρωματικής δράσης του εκχυλίσματος.

Τέλος, η μελέτη μας έδειξε την καινοτόμο αντιαθηρωματική δράση του υδατικού εκχυλίσματος του

κρόκου Κοζάνης σε ζωικό πρότυπο. Με βάση τα αποτελέσματα, αποδείχθηκε η σαφέστατη μείωση της έκτασης της αθηρωματικής πλάκας σε συνδυασμό με τη βελτίωση στη σταθερότητα του αθηρώματος και μάλιστα κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο. Λαμβάνοντας υπόψιν την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφοροποιήσεων στο σωματικό βάρος και τις βιοχημικές μετρήσεις των μυών, η αντιαθηρωματική δράση φαίνεται να οφείλεται στο σημαντικό περιορισμό της φλεγμονής σε συνδυασμό με τη μικρή διαφοροποίηση στις τιμές της γλυκόζης μεταξύ των ομάδων.

Το λυόφιλο υδατικό εκχύλισμα του κρόκου χορηγήθηκε από του στόματος σε 3 διαφορετικές δόσεις (30, 60, 90mg/kg ημερησίως).

Οι ApoE^{-/-} μύες που τρέφονται με αθηρογόνο/διαβητογόνο τροφή συνήθως αναπτύσσουν υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη (235). Η ομάδα μυών που έλαβε 90 mg/kg ημερησίως παρουσίασε με στατιστικά σημαντική διαφορά βελτίωση στο γλυκαιμικό προφίλ σε σχέση με τις άλλες ομάδες θεραπείας και την ομάδα ελέγχου. Η ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία μάλιστα υποστηρίζει την αντιδιαβητική δράση του κρόκου (236; 237). Παρόλο που οι υποκείμενοι θεραπευτικοί μηχανισμοί δράσης παραμένουν άγνωστοι, είναι σχεδόν βέβαιο ότι οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις της κροκίνης – του κύριου συστατικού του υδατικού εκχυλίσματος- μπορούν να παρέχουν εξήγηση για το φαινόμενο του καλύτερου γλυκαιμικού ελέγχου μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος (238). Παρόμοια με το μοτίβο που ακολουθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, οι χαμηλότερες τιμές τριγλυκεριδίων παρατηρήθηκαν μόνο μετά τη χορήγηση της υψηλής δόσης εκχυλίσματος, πράγμα που καταδεικνύει πιθανώς την επίδραση της μείωσης των επιπέδων σακχάρου. Κατά συνέπεια, και από τη στιγμή που διερεύνηση της αντιδιαβητικής δράσης του κρόκου δεν ήταν ανάμεσα στους στόχους της παρούσας εργασίας, οι υποκείμενοι μηχανισμοί δράσης τίθενται υπό περαιτέρω μελέτη.

Με βάση την αναζήτηση που έγινε στη βιβλιογραφία, η παρούσα είναι η δεύτερη μελέτη που καταδεικνύει ευθέως την αντιαθηρωματική δράση του φυτού *Crocus sativus* (Saffron), καθώς η 4 εβδομάδων χορήγηση του εκχυλίσματος σε μύες του γένους ApoE^{-/-} που έλαβαν ταυτόχρονα και αθηρογόνο-διαβητογόνο τροφή μείωσε σημαντικά την έκταση των αθηρωματικών πλακών στην αορτή και παράλληλα βελτίωσε σημαντικά τη σύστασή τους. Η ομάδα του Zheng (2005) (54) κατέγραψε περιορισμό της έκτασης της αθηρωμάτωσης σε κόνικλους που έλαβαν επίσης αθηρογόνο-διαβητογόνο τροφή μετά από χορήγηση καθαρής κροκετίνης, αν και το λιπιδαιμικό προφίλ των ζώων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις (54). Παρόμοια, προηγούμενες μελέτες είχαν υποθέσει έμμεση αντιαθηρωματική δράση του φυτού βασιζόμενες στη βελτίωση των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η υπερχοληστερολαιμία (236; 239). Παρόλα αυτά, στη μελέτη μας η μείωση των επιπέδων χοληστερόλης δεν αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου έναντι της αθηρωματικής νόσου, καθώς η αναχαίτιση της εξάπλωσης των αθηρωματικών πλακών παρατηρήθηκε χωρίς να υπάρξουν σημαντικές μεταβολές στο λιπιδαιμικό προφίλ των μυών. Το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα κρόκου οδήγησε σε βελτίωση της σύστασης των αθηρωματικών αλλοιώσεων στα

ζώα μέσω ενός καινοτόμου μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει τις αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα.

Ο βαθμός της στένωσης του αρτηριακού αυλού παραμένει το βασικό κριτήριο για την πιθανότητα επαναγγείωσης των αθηρωματικών αρτηριών. Παρόλα αυτά, η αιτία των περισσότερων εμφραγμάτων του μυοκαρδίου δεν είναι τόσο ο βαθμός στένωσης όσο η ευαισθησία που παρουσιάζουν οι αθηρωματικές αλλοιώσεις ως προς την πιθανότητα ρήξης. Ο κίνδυνος αυτός καθορίζεται αποκλειστικά από την ποιοτική σύσταση της αθηρωματικής πλάκας (240; 241; 242). Η βελτίωση της σύστασης και υφής των αθηρωματικών αλλοιώσεων με τη βοήθεια φαρμακευτικής αγωγής αποτελεί το βασικό στόχο της επιθετικής αγωγής με στατίνες σε ασθενείς με στεφανιαία και καρωτιδική νόσο, παρά τα πιθανά μειονεκτήματα (243; 244). Στην παρούσα πρώτη μελέτη διερεύνησης της πιθανής θετικής επίδρασης του υδατικού εκχυλίσματος του Κρόκου Κοζάνης στη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών, καταγράφηκε ότι το εκχύλισμα βελτιώνει σημαντικά τη σύσταση του αθηρώματος, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της περιεκτικότητάς του σε κολλαγόνο και λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) καθώς και της μείωσης της συσσώρευσης μακροφάγων οδηγώντας έτσι σε σταθερότερο φαινότυπο αθηρωμάτωσης (245). Η επίδραση του εκχυλίσματος έδειξε δοσοεξαρτώμενο χαρακτήρα, ενώ η υψηλή δόση (SF3 group, 90mg/kg ημερησίως) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Για την καλύτερη εκτίμηση της αντιαθηρωματικής δράσης του εκχυλίσματος του Κρόκου όσο και της ικανότητάς του να σταθεροποιεί τις ήδη υπάρχουσες αθηρωματικές πλάκες πραγματοποιήθηκε μελέτη στην επίδραση στους φλεγμονώδεις παράγοντες και τις μεταλλοπρωτεΐνες. Όταν καταγραφεί χρόνια συστηματική φλεγμονή, τα μακροφάγα κύτταρα διηθούν τις αθηρωματικές πλάκες και ενεργοποιούν μέσω των προφλεγμονωδών κυτοκινών την απελευθέρωση παραγόντων όπως οι MCP-1, IL-6 και TNF-α (246; 247) αποσταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο τις αθηρωματικές πλάκες που έχουν σχηματιστεί (248). Οι μεταλλοπρωτεΐνες συμμετέχουν στο μονοπάτι της ανάπτυξης αθηρωμάτωσης όταν υπάρξει φλεγμονώδης αντίδραση. Ανάμεσα στα διάφορα στάδια εξέλιξης της αθηρωματικής νόσου, οι μεταλλοπρωτεΐνες κατευθύνουν την εξωκυτταρική αποδόμηση, τη διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων, την αγγειακή μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων και τη λέπτυνση της ινώδους κάψας, οδηγώντας σταδιακά στην επιδείνωση της νόσου, την αποσταθεροποίηση των αθηρωμάτων (249; 250; 251) και την πιθανή ρήξη τους (252). Η αυξημένη έκφραση όλων των παραπάνω παραγόντων σε συνδυασμό με την μειωμένη συγκέντρωση αντιφλεγμονωδών μορίων (π.χ. TIMP-2) έχουν συσχετιστεί με την ευκολία ρήξης των αθηρωμάτων και την όξυνση των γενικότερων συμπτωμάτων της νόσου (253).

Στην παρούσα μελέτη, αλλά και σε άλλες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν, αποδεικνύεται ότι παρεμβάσεις που παρεμποδίζουν την εμφάνιση φλεγμονής οδηγούν ταυτόχρονα σε επιβράδυνση της εξέλιξης της αθηρωμάτωσης και σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών (254; 255). Οι αυξανόμενες δόσεις υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου Κοζάνης μείωσαν κατ' αναλογία την περιεκτικότητα των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε μακροφάγα και τα φλεγμονώδη παράγωγά τους, συμπεριλαμβανομένων

των MCP-1, TNF- α , IL-6, MMP-2, MMP-3 και MMP-9. Σε αντίστροφη λογική με τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-2, ο παράγοντας TIMP-2 παρουσίασε αυξημένα ποσοστά και για τις 3 δόσεις που χορηγήθηκαν στους μύες. Ο λόγος MMP-2/TIMP-2 σημείωσε στατιστικά σημαντική μείωση για τα ζώα που έλαβαν θεραπεία ανεξαρτήτως δόσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με αποτέλεσμα της εξασφάλιση μεγαλύτερης προστασίας έναντι της νόσου (256). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να εξηγήσουν τις ευεργετικές αλλαγές στην υφή και σταθερότητα των αθηρωματικών αλλοιώσεων των ζώων που έλαβαν θεραπεία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα, διερευνήσαμε τους πιθανούς αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του Κρόκου, με βάση προηγούμενες *in vitro* μελέτες (257) που έδειξαν τη δράση της κροκετίνης έναντι της φλεγμονής από μακροφάγα (258). Στο σώμα των αθηρωματικών πλακών τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούν την αυξημένη έκφραση παραγόντων όπως οι MCP-1, IL-6 και TNF- α (247; 249; 259) οι οποίοι οδηγούν νομοτελειακά στον κύκλο της φλεγμονής: συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων, σύνθεση αφρωδών κυττάρων, αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών μορίων (MCP-1, TNF- α , MMP-3, MMP-9, IL-6) από τα μακροφάγα και μειωμένη παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων (TIMP-2) (260; 261). Όλα τα παραπάνω συναινούν στο γεγονός ότι η αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος του Κρόκου λειτουργεί μέσω διπλού μηχανισμού: μειωμένη συσσώρευση μακροφάγων ή καταστολή των εκκριτικών μηχανισμών των μακροφάγων που οδηγούν στην απελευθέρωση των φλεγμονωδών παραγόντων. Ένας τέτοιου είδους μηχανισμός δράσης συμβάλλει στον περιορισμό της εξέλιξης της νόσου και της αποσταθεροποίησης των αθηρωματικών πλακών (247).

Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα της μελέτης, υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Καταρχήν, η αξιολόγηση της σταθερότητας ή μη της αθηρωματικής πλάκας στους ApoE^{-/-} μύες που σιτίζονται με αθηρογόνο/ διαβητογόνο τροφή γίνεται έμμεσα καθώς η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας στα ζώα αυτά παρατηρείται σπάνια (262). Δεδομένου όμως ότι οι αθηρωματικές πλάκες στους μύες τύπου ApoE^{-/-} έχουν κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τις ανθρώπινες αθηρωματικές αλλοιώσεις και οι διαδικασίες που οδηγούν στη ρήξη αυτών είναι παραπλήσιες (263), θεωρείται ένα έγκυρο πρότυπο για τη μελέτη της σύστασης της αθηρωμάτωσης. Θα πρέπει πάντως να τονιστεί ότι η κλινική αναγωγή των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο πρέπει να γίνει με προσοχή καθώς τα πειραματικά ευρήματα δεν αποτελούν κατ' ανάγκη και κλινικά ευρήματα. Ωστόσο, η σχετική ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των διαφόρων πρωτεϊνών που βρίσκονται στις αθηρωματικές αλλοιώσεις με βάση την ανοσοϊστοχημεία καθώς και ο υπολογισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης τους με τη βοήθεια ποσοτικής RT-PCR και οι ξεκάθαρες στατιστικά σημαντικές διαφορές που κατεγράφησαν μεταξύ των ομάδων ελέγχου και παρέμβασης παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για την ανασταλτική επίδραση του SFE επί των φλεγμονωδών παραγόντων.

Κλείνοντας, στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η διαδικασία παρασκευής του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου Κοζάνης, ποσοτικοποιήθηκε ως προς τα κύρια δραστικά συστατικά με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία και μελετήθηκε *in vitro* για τη σταθερότητά του με την πάροδο του χρόνου. Η ΦΚ μελέτη ως

προς το βασικό συστατικό κροκίνη και τον μεταβολίτη της κροκετίνη αποτέλεσε το βασικό στάδιο για τη συνέχιση των πειραμάτων και τη διερεύνηση της επίδρασης του SFE στην εξέλιξη της αθηρωματικής νόσου. Μετά τη χορήγησή του SFE σε ApoE^{-/-} μύες απεδείχθη η μείωση της έκτασης των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε συνδυασμό με τον περιορισμό της εξέλιξης της νόσου καθώς και η αύξηση της σταθερότητας των αθηρωματικών πλακών. Οι παραπάνω δράσεις ήταν δοσοεξαρτώμενες και οδήγησαν και στη βελτίωση της υπάρχουσας φλεγμονής. Η μελέτη προτείνει εν τέλει μια καινοτόμο χρήση του SFE για το καρδιαγγειακό σύστημα με τη βελτίωση των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της αθηρωματικής νόσου.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Umigai N, Murakami K, Ulit MV, Antonio LS, Shirotori M, Morikawa H, Nakano T.** The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration. *Phytomedicine*. 18(7): 575-8, 2011.
2. **Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A.** Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem*. 53: 7302-7306, 2005.
3. **Bathaie SZ, Mousavi SZ.** New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 50(8): 761-86, 2010.
4. **Hagh Nazari S, Keifi N.** Saffron and various fraud matter in its production and trade. *2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology*. 2006.
5. **Betti G, Schmidt M.** Valorization of saffron (*Crocus sativus*). *2nd Int Symposium on Saffron Biology and Technology*. 2006.
6. **Kamalipour M, Akhondzadeh S, FBPharmacolS.** Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review. *Teh Univ Heart Ctr*. 6(2):59-61, 2011.
7. **Deng Y, Guo ZG, Zeng ZL, Wang Z.** Studies on the pharmacological effects of saffron (*Crocus sativus* L.) - A review. *Zhongguo Zhongn Yao Za Zhi*. 27:565-568, 2002.
8. **Giaccio M.** Crocetin from Saffron: an active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44:155-72, 2004.
9. **Koulakiotis NS.** Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό βιοδραστικών συστατικών του *Crocus sativus* και άλλων ενδημικών taxa. Πάτρα : s.n., 2009. Μεταπτυχιακή εργασία.
10. **Dezani S.** *Trattato di Farmacognosia*. Genua : A. Donath Ed., 1895.
11. **Pasquali G.** *Dizionario del Commercio dei Signori Fratelli Savary*. Venezia : Zafferano, 1770.
12. **Schmidt M, Betti G, Hensel A.** Saffron in Phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr*. 157:315-319, 2007.
13. **Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, Amini H, Fallah-Poor H, Jamshidi AH, Khani M.** *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Phytother Res*. 19:148-151, 2005.
14. **Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH.** Hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* L versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol*. 97:281-284, 2005.
15. **Agha-Hosseini M, Kashani L, Aleyaseen A, Ghoreishi A, Rahmanpour H, Zarrinara AR, Akhondzadeh S.** *Crocus sativus* L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo controlled trial. *BJOG*. 115:515-519, 2008.

16. **Bhat JV, Broker R.** Riboflavine and thiamine contents of saffron, *Crocus sativus*. *Nature*. 172:544-545, 1953.
17. **Loukis A, Al-Kofahi A, Philianos S.** Constituents of *Crocus sativus* L. bulbs. *Plant Med Phytother*. 17(2):89-91.
18. **Fernandez JA.** Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Res Devel Plant Sci*. 2:127-59, 2004.
19. **Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manez S.** An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res*. 10:189-193, 1996.
20. **Winterhalter P, Straubinger M.** Saffron-renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*. 16(1):39-59, 2000.
21. **Buchecker R, Eugster CH.** Absolute configuration of picrocrocin. *Helv Chi Acta*. 56(3):1121-1124, 1973.
22. **Curro P, Lanuzza F, Micali G.** Valutazione della frazione volatile dello zafferano mediante gascromatografia dello spazio di testa. *Rassegna Chimica*. 38(6):331-334, 1986.
23. **Kuhn R, Winsterstein G.** Picrocrocin, the terpene glucoside of saffron and the biogenesis of the carotenoid-carboxylic acid. *Naturwissenschaften*. 21:527, 1933.
24. **Dhingra VK, Sesahdri TR, Mukerjee SK.** Minor carotenoid glycosides from saffron (*Crocus sativus*). *Indian J Chem*. 1975, Τόμ. 13(4):339-341.
25. **Speranza G et al.** 13-cis-crocin: a new crocinoid of saffron. *Gazz Chim It*. 114:189-192, 1984.
26. **La Barre J.** Tractus digestif. *Pharmacodinamic Biochimique*. 12ve ed. Paris : Masson & C/ie, 1961.
27. **Lequerc H.** *Precis de Phytotherapie*. Paris : Masson & C/ie, 1973.
28. **Frank A.** Purpura resulting from artificial abortion. *Deut Med Wochschr*. 86:1618-1620, 1961.
29. **Akhondzadeh Basti A, Moshiri E, Noorbala AA, Jamshidi AH, Abbasi SH, Akhondzadeh S.** Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot doubleblind randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31:439-442, 2007.
30. **Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F.** Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: A pilot double-blind randomized trial. *BMC Complement Altern Med*. 4:12, 2004.
31. **Hosseinzadeh H, Karimi G, Niapoor M.** Antidepressant effect of *Crocus sativus* L. stigma extracts and their constituents, crocin and safranal, in mice. *Acta Hort*. 650:435-445, 2004.
32. **Hosseinzadeh H, Jahanian Z.** Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res*. 24: 726-730, 2010.
33. **Hosseinzadeh H, Noraei NB.** Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytother Res*. 23: 768-74, 2009.

34. **Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohageri SA.** Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory, after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytother Res.* 26: 381-386, 2012.
35. **Sugiura M, Saito H, Abe K.** Ethanol extract of *Crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Phytother Res.* 9: 100-104, 1995.
36. **Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K.** Crocin (crocetin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus *in-vivo*. *J Pharmacol Exper Ther.* 271: 703-707, 1994.
37. **Abe K, Saito H.** Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res.* 2000, Τόμ. 14: 149-52.
38. **Akhondzadeh S, Sabet MS, Harichian MH, Togha M, et al.** Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, a randomized and placebo controlled trial. *J Clin Pharm and Ther.* 35: 581-585, 2010.
39. **Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, Lamari FN.** Inhibitory activity on amyloid- β - aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem.* 54: 8762-8768, 2006.
40. **Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F.** Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav.* 81: 805-813, 2005.
41. **Bonnefort-Rousselot D.** Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5: 561-568, 2002.
42. **Rajaei Z, Hadjadeh Mousa Al-Reza, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S.** Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozocin-induced diabetic rats. *J Med Food.* 16(3): 1-5, 2013.
43. **Kianbakht S, Hajiaghaee R.** Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranalm in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Plants.* 10: 82-89, 2011.
44. **Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP.** Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res.* 19: 997-1000, 2005.
45. **Shirali S, Bathaie Z, Nakhjavani M.** Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res.* 27:1042-1047, 2013.
46. **Kanakis CD, Tarantilis PA, Pappas C, Bariyanga J, Riahi HAT, Polissiou MG.** An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. *J Phytochem Photobiol B.* 95: 204-212, 2009.
47. **Kumar V, Bhat ZA, Kumar D, Khan NA, Chasoo IA, Shah MY.** Pharmacological profile of *Crocus sativus*-A comprehensive review. *Pharmacologyonline.* 3: 789-811, 2011.
48. **Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG.** DNA interaction with saffron's secondary metabolites safranalm, crocetin, and dimethylcrocetin. *DNA Cell Biol.* 26: 63-70, 2007.

49. —. Interaction of tRNA with safranal, crocetin and dimethylcrocetin. *J Biomol Struct Dyn*. 24: 537-546, 2007.
50. **Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Tong VH, Van Calsteren MR.** Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J Agric Food Chem*. 48: 1455-1461, 2000.
51. **Abduallev FI.** Biological effects of saffron. *Biofactors*. 4: 83-6, 1993.
52. **Min X, Qian Z, Chenghua Z, Juan L, Wenna L.** Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *Journal of ethnopharmacology*. 107: 25-31, 2006.
53. **He S, Qian Z, Tang F, Wen N, Xu G, Sheng L.** Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sciences*. 77: 907-921, 2005.
54. **Zheng S, Qian Z, Tang F, Sheng L.** Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol*. 70 (8): 1192-1199, 2005.
55. **Rezaee R, Hosseinzadeh H.** Safranal: From an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iran J Basic Med Sci*. 16(1): 12-26, 2013.
56. **Bharti S, Golechha M, Kumari S, Siddiqui KM, Arya DS.** Akt/GSK-3b/eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Nutr*. 2011.
57. **Sadeghnia HR, Boroushaki MT, Mofidpour H.** Effect of safranal, a constituent of saffron (*Crocus sativus* L.) on lipid peroxidation level during renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci Fall*. 8: 179-185, 2005.
58. **Abdullaev FI, Rivera Luna R, Roitendurd Belacortu V, Espinosa Aguirre J.** Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res*. 31(5): 526-531, 2000.
59. **Nair SC, Pannikar B, Pannikar KR.** Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett*. 57(2): 109-114, 1991.
60. **Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M, Garcia-Olmo D.** Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rats. *Nutr Cancer*. 35(2): 120-126, 1999.
61. **Escribano J, Diaz-Guerra MJ, Riese HH, Alvarez A, Proenza R, Fernandez JA.** The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted from corns of saffron plant (*Crocus sativus*) on human cell lines in culture. *Planta med*. 66(2): 157-162, 2000.
62. **Feizzadeh B, Tavakkol Afshari J, Rakshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H.** Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J*. 5:161-7, 2008.
63. **Inoue E, Shimizu Y, Shoji M, Tsuchida H, Sano Y, Ito C.** Pharmacological properties of N-095, a drug containing red ginseng, polygala root, saffron, antelope horn and aloe wood. *Am J Chin Med*. 33(1): 49-60, 2005.

64. **Bhargava BK.** Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* Linn (saffron). *Int J Pharm Pharm Sci.* 3(3): 22-26, 2011.
65. **Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH.** Saffron chemoprevention in biology and medicine: A review. *Cancer Biother.* 10(4): 257-264, 1995.
66. **Abduallev FL, Frenkel GD.** Saffron in biological and medical research. *Saffron Crocus sativus L.* 103-113. Amsterdam : Negbi M, Ed, 1999.
67. **Molnar J, Szabo D, Puztai R, Musci I, Berek I, Ocsovski I, Kawata E, Shoyama Y.** Membrane associated antitumor effects of crocine-ginsenoside- and cannabinoid derivatives. *Anticancer Res.* 20(2a): 861-867, 2000.
68. **Smith TAD.** Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. *Br J Biomed Sci.* 55(4): 268-275, 1998.
69. **Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A.** The effect of Saffron (*Crocus sativus*) extract for healing of second-degree burn wound in rats. *Keio J Med.* 57(4): 190-195, 2008.
70. **Bayrami G, Boskabadi MH.** The potential effect of the extract of *Crocus sativus* and safranal on the total and differential white blood cells of ovalbumine-sensitized guinea pigs. *RPS.* 7(4): 249-255, 2012.
71. **Hosseinzadeh H, Ziaee T, Sadeghi A.** The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine.* 15: 491-495, 2008.
72. **Modabbernia A, Sohrabi H, Nasehi AA, Raisi F, Saroukhani S, Jashmidi A, Tabrizi M, Ashrafi M, Akhondzadeh S.** Effect of saffron on fluoxetine-induced sexual impairment in men: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Psychopharmacology.* 223(4): 381-8, 2012.
73. **Boroushaki MT, Mofidpour H, Sadeghnia HR.** Protective effect of safranal against hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat. *Iran J Med Sci.* 32(3): 173-176, 2007.
74. **Halataei BS, Khosravi M, Arbabian S, Sahraei S, Golmanesh L, Zardooz H, Jalili C, Ghoshooni H.** Saffron (*Crocus sativus*) aqueous extract and its constituent crocin reduces stress-induced anorexia in mice. *Phytother Res.* Published online on Wiley Online Library, 2011.
75. **Xi L, Qian Z, Du P, Fu J.** Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine.* 14(9): 633-6, 2007.
76. **Lautenschläger M, Sendker J, Huvel S, Galla HJ, Brandt S, Dufer M, Riehemann K, Hensel A.** Intestinal formation of trans-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and *in vitro* permeation through intestinal and blood brain barrier. *Phytomedicine.* 22(1): 36-44, 2015.
77. **Shattock SG.** Report upon the pathological condition of the aorta of King Menephtah, traditionally regarded as the Pharaoh of the Exodus. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 2: 122-127, 1909.
78. **Vongpatanasin W.** Cardiovascular morbidity and mortality in high-risk populations: epidemiology and opportunities for risk reduction. *J Clin Hypertens.* 9: 11-15, 2007.

79. **Paul SL, Srinkath VK, Thrift AG.** The large and growing burden of a stroke. *Current Drug Targets.* 8: 786-793, 2007.
80. **Organisation, World Health.** Annex Table 2 Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO region estimates for 2002. *WHO.* 120-121, 2004.
81. **Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D et al.** Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 135(10): e146-e603, 2017.
82. **Murray CJ, Lopez AD.** Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 349: 1436-42, 1997.
83. **Rayne M, Allender S, Scarborough P.** Cardiovascular disease in Europe. *European Journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology and Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology.* 16 Suppl 2: 43-47, 2009.
84. **Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, Ptetersen S, Rayner M.** Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *European Heart Journal.* 27: 1610-9, 2006.
85. **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature.* 407: 233-41, 2000.
86. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R.** Robbins Basic Pathology. *Saunders Elsevier.* 348-351, 2007.
87. **Webb NR, Moore KJ.** Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy. *Current Drug Targets.* 8: 1249-63, 2007.
88. **Insull W Jr.** The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque response to medical treatment. *The American Journal of Medicine.* 122: 3-14, 2009.
89. **Shah PK.** Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *Journal of the American College of Cardiology.* 41: 15-22, 2003.
90. **Chapman MJ.** From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacology & Therapeutics.* 113: 184-196, 2007.
91. **Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ.** Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *Journal of the American College of Cardiology.* 46: 937-54, 2005.
92. **Isselbacher EM.** Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 111: 816-28, 2005.
93. **Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 89(5): 2462-78, 1994.

94. **Cornhill JF, Herderick EE, Stary HC.** Topography of human aortic sudanophilic lesions. *Monogr Atheroscler.* 15: 13-9, 1990.
95. **Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(9):1512-31, 1995.
96. **Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM.** Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: the oxford plaque study. *Stroke.* 39(6):1722-9, 2008.
97. **Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Jamieson MJ, Kaul S, Berman D, Fayad Z, Budoff MJ, Rumberger J, Naqvi TZ, Shaw LJ, Faergeman O, Cohn J, Bahr R, Koenig W, Demirovic J, Arking D, Herrera VL, Badimon J, Goldstein JA, Rudy Y, Airaksinen J, Schwartz RS, Riley WA.** From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol.* 98(2A):2H-15H, 2006.
98. **Johnson JL.** Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert review of cardiovascular therapy.* 5: 265-82, 2007.
99. **Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J.** Vulnerable plaque versus vulnerable patient: emerging blood biomarkers for risk stratification. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 7(3):195-201, 2007.
100. **Toutouzas K, Synetos A, Nikolaou C, Tsiamis E, Tousoulis D, Stefanadis C.** Matrix metalloproteinases and vulnerable atheromatous plaque. *Curr Top Med Chem.* 12(10):1166-80, 2012.
101. **Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT.** Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res.* 71(4): 850-8, 1992.
102. **Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD.** Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations. *Atherosclerosis.* 96(1): 71-81, 1992.
103. **Ohayon J, Finet G, Gharib AM, Herzka DA, Tracqui P, Heroux J, Rioufol G, Kotys MS, Elagha A, Pettigrew RI.** Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(2): H717-27, 2008.
104. **Soloperto G, Casciaro S.** Progress in atherosclerotic plaque imaging. *World J Radiol.* 4(8): 353-71, 2012.
105. **Drakopoulou M, Toutouzas K, Michelongona A, Tousoulis D, Stefanadis C.** Vulnerable plaque and inflammation: potential clinical strategies. *Curr Pharm Des.* 17(37): 4190-209., 2011.
106. **Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuéllar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT.** Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation.* 94(12): 3090-7, 1996.
107. **Jeziorska M, Woolley DE.** Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol.* 188(2): 189-96, 1999.

108. **McCarthy MJ, Loftus IM, Thompson MM, Jones L, London NJ, Bell PR, Naylor AR, Brindle NP.** Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg.* 30(2): 261-8, 1999.
109. **Depré C, Havaux X, Wijns W.** Neovascularization in human coronary atherosclerotic lesions. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 39(3): 215-20, 1996.
110. **Moreno PR.** Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment. *Cardiol Clin.* 28(1): 1-30, 2010.
111. **Richardson PD, Davies MJ, Born GV.** Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 2(8669): 941-4, 1989.
112. **Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, Cardoso L, Weinbaum S.** A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303(5): H619-28, 2012.
113. **Shah PK.** Insights into the molecular mechanisms of plaque rupture and thrombosis. *Indian Heart J.* 57(1): 21-30, 2005.
114. **Kadoglou NP, Gerasimidis T, Moutzouoglou A, Kapelouzou A, Sailer N, Fotiadis G, Vitta I, Katinios A, Kougiass P, Bandios S, Voliotis K, Karayannacos PE, Liapis CD.** Intensive lipid-lowering therapy ameliorates novel calcification markers and GSM score in patients with carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 35(6): 661-8, 2008.
115. **Kooistra T, Verschuren L, de Vries-van der Weij J, Koenig W, Toet K, Princen HM, Kleemann R.** Fenofibrate reduces atherogenesis in ApoE*3Leiden mice: evidence for multiple antiatherogenic effects besides lowering plasma cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(10): 2322-30, 2006.
116. **Verreth W, De Keyzer D, Davey PC, Geeraert B, Mertens A, Herregods MC, Smith G, Desjardins F, Balligand JL, Holvoet P.** Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. *Br J Pharmacol.* 151(3): 347-55, 2007.
117. **Grothusen C, Bley S, Selle T, Luchtefeld M, Grote K, Tietge UJ, Drexler H, Schieffer B.** Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin-angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 182(1): 57-69, 2005.
118. **Watanabe K, Sugiyama S, Kugiyama K, Honda O, Fukushima H, Koga H, Horibata Y, Hirai T, Sakamoto T, Yoshimura M, Yamashita Y, Ogawa H.** Stabilization of carotid atheroma assessed by quantitative ultrasound analysis in nonhypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 46(11): 2022-30, 2005.
119. **You BA, Shen L, Li JF, Chen YG, Gu XH, Gao HQ.** The correlation between carotid-femoral pulse wave velocity and composition of the aortic media in CAD patients with or without hypertension. *Swiss Med Wkly.* 142: w13546, 2012.
120. **Parks WC.** Who are the proteolytic culprits in vascular disease? *J Clin Invest.* 104(9): 1167-8, 1999.
121. **Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP.** Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(8): 1359-66, 2004.

122. **Libby P, Lee RT.** Matrix matters. *Circulation*. 102(16): 1874-6, 2000.
123. **Kong CH, Lin XY, Woo CC, Wong HC, Lee CN, Richards AM, Sorokin VA.** Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 16(1): 11-5, 2013.
124. **Samouillan V, Dandurand J, Lacabanne C, Stella A, Gargiulo M, Degani A, Gandaglia A, Spina M.** Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas. *Pathol Biol (Paris)*. 60(1): 58-65, 2012.
125. **Gonçalves I, Moses J, Dias N, Pedro LM, Fernandes e Fernandes J, Nilsson J, Ares MP.** Changes related to age and cerebrovascular symptoms in the extracellular matrix of human carotid plaques. *Stroke*. 34(3): 616-22, 2003.
126. **Tran LT, Park HJ, Kim HD.** Is the carotid intima-media thickness really a good surrogate marker of atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 19(7): 680-90, 2012.
127. **Liu SQ, Teft BJ, Zhang LQ, Li YC, Wu YH.** Elastic laminae in vascular development and disease. *Mol Cell Biomech*. 7(2): 59-76, 2010.
128. **Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD.** Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem*. 277(6):4223-31, 2002.
129. **Müller WE.** The origin of metazoan complexity: porifera as integrated animals. *Integr Comp Biol*. 43(1): 3-10, 2003.
130. **Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R.** Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem*. 281(6): 3494-504, 2006.
131. **Nadkarni SK, Pierce MC, Park BH, de Boer JF, Whittaker P, Bouma BE, Bressner JE, Halpern E, Houser SL, Tearney GJ.** Measurement of collagen and smooth muscle cell content in atherosclerotic plaques using polarization-sensitive optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*. 49(13): 1474-81, 2007.
132. **Rekhter MD.** Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res*. 41(2): 376-84, 1999.
133. **Deguchi JO, Aikawa E, Libby P, Vachon JR, Inada M, Krane SM, Whittaker P, Aikawa M.** Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*. 112(17): 2708-15, 2005.
134. **Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P.** Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 99(19): 2503-9, 1999.
135. **Liu X, Zhao Y, Gao J, Pawlyk B, Starcher B, Spencer JA, Yanagisawa H, Zuo J, Li T.** Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*. 36(2): 178-82, 2004.

136. **Bashur CA, Venkataraman L, Ramamurthi A.** Tissue engineering and regenerative strategies to replicate biocomplexity of vascular elastic matrix assembly. *Tissue Eng Part B Rev.* 18(3): 203-17, 2012.
137. **Fhayli W, Ghandour Z, Mariko B, Pezet M, Faury G.** [Elastin and microfibrils in vascular development and ageing: complementary or opposite roles?]. *Biol Aujourdhui.* 206(2): 87-102, 2012.
138. **Lee HY, Oh BH.** Aging and arterial stiffness. *Circ J.* 74(11): 2257-62, 2010.
139. **Noma A, Takahashi T, Yamada K, Wada T.** Elastin--lipid interaction action in the arterial wall. Part 1. Extraction of elastin from human aortic intima. *Atherosclerosis.* 33(1): 29-39, 1979.
140. **Noma A, Takahashi T, Wada T.** Elastin-lipid interaction in the arterial wall. Part 2. *In vitro* binding of lipoprotein-lipids to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process. *Atherosclerosis.* 38(3-4): 373-82, 1981.
141. **Mestas J, Ley K.** Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 18(6): 228-32, 2008.
142. **Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y.** Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm.* 2012 :693083, 2012.
143. **Thompson, RW, Parks WC.** Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 800. 157-174, 1996.
144. **VJ, Ferran.** New insights into the world of matrix metalloproteinases. *Circulation.* 105: 405-407, 2002.
145. **Klein T, Bischoff R.** Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids.* 41: 271-290, 2011.
146. **Murphy G, Knauper V.** Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Journal of the International Society for Matrix Biology.* 15: 511-518, 1997.
147. **Chow AK, Cena J, Schulz R.** Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British journal of pharmacology.* 152: 189-205, 2007.
148. **Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW.** Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques.* 38: 73-83, 2005.
149. **Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S.** Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 12: 1075-1095, 1998.
150. **Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD.** Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology.* 56:173-189 , 2005.
151. **Beaudeux JL, Giral, P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ.** Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC.* 42: 121-131, 2004.

152. **Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing E, Nagai R, Schoen FJ, Libby P.** Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circulation research*. 83: 1015-1026, 1998.
153. **Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M.** Urokinase-type plasminogen activator and metalloproteinase-2 are independently related to the carotid atherosclerosis in haemodialysis patients. *Thrombosis research*. 121: 543-548, 2008.
154. **Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, Westin-Eriksson A, Wennbo H, Herslof M, Elebring M, George SJ, McPheat WL, Jackson CL.** Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovascular Research*. 71(3): 586-95, 2006.
155. **Dollery CM, Libby P.** Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovascular research*. 69: 625-635, 2006.
156. **Nagase H, Visse R, Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 69:562-573, 2006.
157. **P, Libby.** Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *The American journal of cardiology*. 86: 3J-8J; discussion 8J-9J, 2000.
158. **WG, Stetler-Stevenson.** The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer metastasis review*. 27: 57-66, 2008.
159. **Brew K, Nagase H.** The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta*. 1803: 55-71, 2010.
160. **Knox JB, Sukhova GK, Whitemore AD, Libby P.** Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation*. 95: 205-212, 1997.
161. **Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Dacht C, Chapman MJ.** Adenovirus-Mediated Overexpression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Reduces Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 100: 533-540, 1999.
162. **Cuaz-Pérolin C, Jguirim I, Larigauderie G, Jlassi A, Furman C, Moreau M, Chapman MJ, Fruchart JC, Slimane MN, Mezdour H, Rouis M.** Apolipoprotein E knockout mice over-expressing human tissue inhibitor of metalloproteinase 1 are protected against aneurysm formation but not against atherosclerotic plaque development. *Journal of vascular research*. 43: 493-501, 2006.
163. **Lemaitre V, Soloway PD, D'Armiento J.** Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation*. 107: 333-338, 2003.
164. **Silence J, Collen D, Lijnen HR.** Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circulation research*. 90: 897-903, 2002.
165. **Πέτρος, Μουστάρδας.** Μελέτη των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών. Αθήνα : s.n., 2013.

166. **Νικόλαος, Καδόγλου.** *Μεταβολικοί παράγοντες στη μυική άσκηση - Πειραματική μελέτη.* Αθήνα : s.n., 2007.
167. *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.* **Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA.** s.l. : National Academy of Sciences of the United States of America, 1994.
168. **Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM.** Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells *in vitro*. *Journal of Leukocyte Biology.* 60(3): 365–71, 1996.
169. **Xia M, Sui Z.** Recent developments in CCR2 antagonist. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 19(3): 295–303, 2009.
170. **Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ.** Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 2: 275-281, 1998.
171. **Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF.** Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 394: 894-897, 1998.
172. **Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N.** Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 143: 205-211, 1999.
173. **Cipollone F, Marini M, Fazia M, Pini B, Iezzi A, Reale M, Paloscia L, Materazzo G, D’Annunzio E, Conti P, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A.** Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 327-334, 2001.
174. **Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horváth L, Császár A.** Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G in CAD patients. *Atherosclerosis.* 158: 233-239, 2001.
175. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research.* 29(6): 313-326, 2009.
176. **Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A.** Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:969–979, 2011.
177. **Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, De Almeida JR, Anderson TJ, Verma S.** New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 108:1917–1923, 2003.
178. **Hansson GK, Libby P, Tabas I.** Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 278:483–493, 2015.
179. **Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK.** Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 209: 13-22, 2015.
180. **Hansson GK, Libby P, Tabas I.** Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 278:483–493, 2015.

181. **Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A.** The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Re.* 50:364–369, 2009.
182. **Kalliolias GD, Ivashkiv LB.** TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 12:49–62, 2016.
183. **Canault M, Peiretti F, Poggi M, Mueller C, Kopp F, Bonardo B, Bastelica D, Nicolay A, Alessi MC, Nalbhone G.** Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF-alpha. *J Pathol.* 214: 574-583, 2008.
184. **Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M.** Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 180:11–17, 2005.
185. **Jones LL, Vignali DA.** Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res.* 51:5–14, 2011.
186. **Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, Scheller J.** Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23:85–97, 2012.
187. **Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 101:311–320, 1998.
188. **Fontes JA, Rose NR, Cihakova D.** The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 74:62–68, 2015.
189. **Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V.** Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? . *Atherosclerosis.* 148(2):209-14, 2000.
190. **Elhage R, Clamens S, Besnard S, Mallat Z, Tedgui A, Arnal J, Maret A, Bayard F.** Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17beta-estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 156(2): 315-20, 2001.
191. **Χρυσόστομος, Δημητριάδης.** Μελέτη της παθογένειας και της εξέλιξης των αθηροσκληρωτικών αγγειακών αλλοιώσεων σε ουραιμικούς ασθενείς. Θεσσαλονίκη : s.n., 2009.
192. **Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R.** Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2364–2367, 1999.
193. **Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H.** Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation.* 110: 349-3500, 2004.
194. **M, Cohn.** Alternatives to animal testing gaining ground. *The Baltimore Sun.* 2010.
195. **L, Carbone.** What animals want. *Oxford University Press* . p.26, 2004.
196. **Research, Institute for Laboratory Animal.** Institute for Laboratory Animal Research Animals in Biomedical and Behavioral Research. *The National Academies Press.* 1988.

197. **Parliament, UK.** *Select Committee on Animals in Scientific Procedures Report.* 13/07/2012.
198. **Cohen BJ, Loew FM.** *Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives in laboratory Animal Medicine.* Academic Press Inc Orlando. 1984.
199. **Mock M, Fouet A.** Anthrax. *Annu Rev Microbiol.* 55:647–71, 2001.
200. **P, Gorden.** Non-insulin dependent diabetes—the past, present and future. *Ann Acad Med Singap.* 26(3): 326–30, 1997.
201. **R, Walgate.** Armadillos fight leprosy. *Nature.* 291(5816): 527, 1981.
202. **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385(6619): 810–3, 1997.
203. **L, Carbone.** *What animals want.* s.l. : Oxford University Press, 2004.
204. **Flecknell P.** Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 19(2): 73–8, 2002.
205. **Committee, Animal Procedures.** review of cost-benefit assessment in the use of animals in research. *The Animal Procedures Committee.* 46-7, 2003.
206. **Animals, Committee for the Update of the Guide for the Care of Laboratory.** *Guide for the care and use of laboratory animals.* Washington D.C. : The National Academies Press, 1996.
207. **Sung YH, Song J, Lee HW.** Functional genomics approach using mice. *Journal of biochemistry and molecular biology.* 37(1): 122–32, 2004.
208. **Venken KJ, Bellen HJ.** Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews Genetics.* 6(3): 167–78, 2005.
209. **Prasad B, Reed R.** Chemosensation: molecular mechanisms in worms and mammals. *Trends in Genetics.* 15: 150–3, 1999.
210. **M, Festing.** Inbred Strains of Mice and their Characteristics. *The Jackson Laboratory.* 2008.
211. **Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH.** Animal models of Huntington's disease. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources.* 48(4): 356–73, 2007.
212. **Vail DM, MacEwen EG.** Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation.* 18(8): 781–92, 2000.
213. **SP, Dunham.** Lessons from the cat: development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary immunology and immunopathology.* 112(1–2): 67–77, 2006.
214. **Consortium, Mouse Genome Sequencing.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420(6915): 520-62, 2002.
215. **Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N.** Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.).* 258: 468-471, 1992.

216. **Linton MF, Hasty AH, Babaev VR, Fazio S.** Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of clinical investigation*. 101: 1726-1736, 1998.
217. **Curtiss LK, Boisvert WA.** Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* . 11: 243-251 , 2000.
218. **Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL.** Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(7): 3433-7, 2000.
219. **RW, Mahley.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science (New York, N.Y.)* . 240: 622-630, 1988.
220. **Meir KS, Leitersdorf E.** Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. . *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 24: 1006-1014, 2004.
221. **JL, Breslow.** Mouse models of atherosclerosis . *Science (New York, N.Y.)* . 272: 685-688, 1996.
222. **Tarantilis PA, Polissiou MA, Manfait M.** Separation of picrocrocins, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A*. 664(1): 55-61, 1994.
223. **Valle García-Rodríguez M, Serrano-Díaz J, Tarantilis PA, López-Córcoles H, Carmona M, Alonso GL.** Determination of saffron quality by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 62(32): 8068-74, 2014.
224. **Mohammadpour AH, Ramezani M, Tavakoli Anaraki N, Malaekheh-Nikouei B, Amel Farzad S, Hosseinzadeh H.** Development and Validation of HPLC Method for Determination of Crocetin, a constituent of Saffron, in Human Serum Samples. *Iran J Basic Med Sci*. 16(1): 47-55, 2013.
225. **Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W.** Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of lipid research*. 36: 2320-2328, 1995.
226. **Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA.** Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* . 68: 231-240, 1987.
227. **Sobolev AP, Carradori S, Capitani D, Vista S, Trella A, Marini F, Mannina L.** Saffron Samples of Different Origin: An NMR Study of Microwave-Assisted Extracts. *Foods*. 3(3): 403-419, 2014.
228. **Kyriakoudi A, Ordoudi SA, Roldan-Medina A, Tsimidou MZ.** Saffron, a functional spice. *Austin J Nutri Food Sci*. 3(1): 1059, 2015.
229. **He SY, Qian ZY, Wen N, Tang FT, Xu GL, Zhou CH.** Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails. *Eur J Pharmacol*. 554(2-3):191-5, 2007 .
230. **Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L.** Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase. *Eur J Pharmacol* . 543(1-3): 116-22, 2006.

231. **Goyal SN, Arora S, Sharma AK, Joshi S, Ray R, Bhatia J, Kumari S, Arya DS.** Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine*. 17(3-4): 227-32, 2010.
232. **Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, Cordopatis P.** A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma-application after saffron tea consumption. *J Pharm Biomed Anal*. 55(3): 563-8, 2011.
233. **Asai A., Nakano T., Takahashi M, Nagao A.** Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem*. 53(18): 7302-6, 2005.
234. **Efentakis P, Rizakou A, Christodoulou E, Chatzianastasiou A, López MG, León R, Balafas E, Kadoglou NPE, Tseti I, Skaltsa H, Kostomitopoulos N, Iliodromitis EK, Valsami G, Andreadou I.** Saffron (*Crocus sativus*) intake provides nutritional preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury in Wild Type and ApoE(-/-) mice: Involvement of Nrf2 activation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 27(10): 919-929, 2017.
235. **Li J, Wang Q, Chai W, Chen MH, Liu Z, Shi W.** Hyperglycemia in apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Cardiovasc Diabetol*. 10:117, 2011.
236. **Hemmati M, Asghari S, Zohoori E, Karamian E.** Hypoglycemic effects of three Iranian edible plants; jujube, barberry and saffron: correlation with serum adiponectin level. *Pak J Pharm Sci*. 28: 2095-2099, 2015.
237. **Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T.** Crocin attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Cytokine*. 88: 20-28, 2016.
238. **Hazman Ö, Ovalı S.** Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Inflammation*. 38(3): 1012-9, 2015.
239. **Mahdavifard S, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Taghikhani M.** The synergistic effect of antiglycating agents (MB-92) on inhibition of protein glycation, misfolding and diabetic complications in diabetic-atherosclerotic rat. *Eur J Med Chem*. 121:892-902, 2016.
240. **Ibrahimi P, Jashari F, Nicoll R, Bajraktari G, Wester P, Henein MY.** Coronary and carotid atherosclerosis: how useful is the imaging? *Atherosclerosis*. 231:323-33, 2013.
241. **Erlöv T, Cinthio M, Edsfieldt A, Segstedt S, Dias N, Nilsson J, Gonçalves I.** Determining carotid plaque vulnerability using ultrasound center frequency shifts. *Atherosclerosis*. 246: 293-300, 2016.
242. **Kadoglou NP, Gerasimidis T, Kapelouzou A, Moutzouoglou A, Avgerinos ED, Kakis JD, Karayannacos PE, Liapis CD.** Beneficial changes of serum calcification markers and contralateral carotid plaques echogenicity after combined carotid artery stenting plus intensive lipid-lowering therapy in patients with bilateral carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 39: 258-65, 2010.
243. **Dorresteijn JA, Boekholdt SM, van der Graaf Y, Kastelein JJ, LaRosa JC, Pedersen TR, DeMicco DA, Ridker PM, Cook NR, Visseren FL.** High-dose statin therapy in patients with stable coronary artery disease: treating the right patients based on individualized prediction of treatment effect. *Circulation*. 127: 2485-93, 2013.

244. **Kadoglou NP, Sailer N, Moumtzouoglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD.** Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *J Vasc Surg.* 51:114-21, 2010.
245. **Geronimo FR, Barter PJ, Rye KA, Heather AK, Shearston KD, Rodgers KJ.** Plaque stabilizing effects of apolipoprotein A-IV. *Atherosclerosis.* 251: 39-46, 2016.
246. **OA, Centurión.** Serum biomarkers and source of inflammation in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. *Cardiovasc Revasc Med.* 17: 119-28, 2016.
247. **Rao VH, Rai V, Stoupa S, Subramanian S, Agrawal DK.** Tumor necrosis factor- α regulates triggering receptor expressed on myeloid cells-1-dependent matrix metalloproteinases in the carotid plaques of symptomatic patients with carotid stenosis. *Atherosclerosis.* 248: 160-9, 2016.
248. **Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN.** Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int.* 2016: 9582430, 2016.
249. **Butoi E, Gan AM, Tucureanu MM, Stan D, Macarie RD, Constantinescu C, Calin M, Simionescu M, Manduteanu I.** Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1863(7 Pt A): 1568-78, 2016.
250. **Higashikata T, Yamagishi M, Higashi T, Nagata I, Iihara K, Miyamoto S, Ishibashi-Ueda H, Nagaya N, Iwase T, Tomoike H, Sakamoto A.** Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis.* 185(1): 165-72, 2006.
251. **Qin H, Zhao Y, Zhang J, Pan X, Yang S, Xing D.** Inflammation-targeted gold nanorods for intravascular photoacoustic imaging detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP(2)) in atherosclerotic plaques. *Nanomedicine.* 12:1765-1774, 2016.
252. **Ruddy JM, Ikonmidis JS, Jones JA.** Multidimensional contribution of matrix metalloproteinases to atherosclerotic plaque vulnerability: multiple mechanisms of inhibition to promote stability. *J Vasc Res.* 53: 1-16, 2016.
253. **Biscetti F, Straface G, Bertolotti G, Vincenzoni C, Snider F, Arena V, Landolfi R, Flex A.** Identification of a potential proinflammatory genetic profile influencing carotid plaque vulnerability. *J Vasc Surg.* 61: 374-81, 2015.
254. **Moustardas P, Kadoglou NP, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Karayannacos PE, Kostakis A, Liapis CD.** The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. *PLoS One.* 29;9(9): e108240, 2014.
255. **Wang X, Chen Q, Pu H, Wei Q, Duan M, Zhang C, Jiang T, Shou X, Zhang J, Yang Y.** Adiponectin improves NF- κ B-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Dis.* 18(15): 33, 2016.

256. **Gluba-Brzózka A, Michalska-Kasiczak M, Franczyk B, Nocuń M, Toth P, Banach M, Rysz J.** Markers of increased atherosclerotic risk in patients with chronic kidney disease: a preliminary study. *Lipids Health Dis.* 15:22, 2016.
257. **Boskabady MH, Farkhondeh T.** Antiinflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Crocus sativus* L. and its Main Constituents. *Phytother Res.* 30: 1072-94, 2016.
258. **Patel NK, Bhutani KK.** Suppressive effects of *Mimosa pudica* (L.) constituents on the production of LPS-induced pro-inflammatory mediators. *EXCLI J.* 13: 1011-21, 2014.
259. **Hu ZB, Chen Y, Gong YX, Gao M, Zhang Y, Wang GH, Tang RN, Liu H, Liu BC, Ma KL.** Activation of the CXCL16/CXCR6 pathway by inflammation contributes to atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. *Int J Med Sc.* 13: 858-867, 2016.
260. **Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P.** An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor *in vivo* and *in vitro*. *Circulation.* 103(2): 276-83, 2001.
261. **Luan Z, Chase AJ, Newby AC.** Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:769-75, 2003.
262. **Johnson JL, Jackson CL.** Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis.* 154: 399-406, 2001.
263. **Ylä-Herttuala S1, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, Hoefler I, Jukema JW, Krams R, Kwak BR, Marx N, Naruszewicz M, Newby A, Pasterkamp G, Serruys PW, Waltenberger J, Weber C, Tokgözoğlu.** Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 106(1): 1-19, 2011.