



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης  
«Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων, κατεύθυνση:  
Φαρμακολογία»

# Μελέτη της δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Crocus sativus* έναντι μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας- επαναιμάτωσης

Ριζάκου Άννα  
Φαρμακοποιός

Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ανδρεάδου Ιωάννα  
Ακαδημαϊκό έτος 2017-2018

Αθήνα  
Απρίλιος 2018

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων, κατεύθυνση: Φαρμακολογία» του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κυρίας Ανδρεάδου Ιωάννας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα για την επιλογή και ανάθεση του θέματος. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της εργασίας, τους κυρίους Παπαπετρόπουλο Ανδρέα, καθηγητή και Δρακούλη Νικόλαο, επίκουρο καθηγητή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην αναπληρώτρια καθηγήτρια κυρία Βαλσαμή Γεωργία για τη συνεργασία και συμβολή στην ολοκλήρωση της εργασίας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κυρία Τσουμάνη Μαρία, μεταδιδάκτορα και τον κύριο Εφεντάκη Παναγιώτη, διδάκτορα για την πολύτιμη βοήθεια που παρείχαν κατά την εκτέλεση και διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους όπως επίσης και την κυρία Χριστοδούλου Ειρήνη, διδάκτορα για την καθοδήγηση και συνεργασία.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, εντός και εκτός Φαρμακευτικής Σχολής, για την υποστήριξη, την κατανόηση, την ενθάρρυνση και ψυχική συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια του παρόντος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

Τέλος, κανένα ευχαριστώ δεν είναι αρκετό να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου προς τους γονείς μου, τους ανθρώπους που πιστεύουν σε εμένα περισσότερο από οποιονδήποτε άλλον και στους οποίους χρωστάω ό,τι έχω καταφέρει. Η στήριξη και η αγάπη τους μου υπενθυμίζουν διαρκώς το ποια είμαι και ποιοι είναι οι στόχοι που έχω θέσει.

# Περιεχόμενα

## Γενικό Μέρος

	Σελίδα
1.1 Στεφανιαία Νόσος, Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου και Επιδημιολογία	9
1.2 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (OEM):	9
1.2.1 Στοιχεία παθοφυσιολογίας και μηχανισμός πρόκλησης	9
1.2.2 Ταξινόμηση OEM	11
1.2.3 Διάγνωση OEM	12
1.3 Αποκατάσταση Αιματικής Ροής	12
1.4 Μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης (Myocardial reperfusion injury)	13
1.4.1 Μορφές Μυοκαρδιακής Βλάβης Επαναιμάτωσης	14
1.5 Παθοφυσιολογία της Βλάβης Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης	15
1.5.1 Παθοφυσιολογία της Ισχαιμίας	15
1.5.2 Παθοφυσιολογία της Επαναιμάτωσης	16
1.6 Μεσολαβητές της μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης	17
1.6.1 Οξειδωτικό στρες	17
1.6.1.1 Νιτροοξειδωτικό στρες	18
1.6.2 Ενδοκυτταρική υπερφόρτωση με ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ )	18
1.6.3 Η ταχεία αποκατάσταση του φυσιολογικού pH κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης	19
1.6.4 Ο μιτοχονδριακός διάυλος διαπερατότητας (MPTP)	20
1.6.5 Ο ρόλος της Φλεγμονής στη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης	20
1.7 Καρδιοπροστασία	21
1.7.1 Ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Preconditioning)	23

1.7.2 Μετα-ισχαιμική προστασία (Ischemic Post-conditioning)	23
1.7.3 Φαρμακολογική προστασία (Pharmacological Conditioning)	24
1.7.4 Διατροφική Προετοιμασία (Nutritional Preconditioning)	25
1.8 Μηχανισμός Δράσης της Καρδιοπροστασίας	26
1.8.1 Ερεθίσματα/Διεγέρτες της Καρδιοπροστασίας	26
1.8.1.1 Δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS)	26
1.8.1.1.1 Nrf-2	27
1.8.1.1.1.1 Γενικά στοιχεία	27
1.8.1.1.1.2 Αρχές λειτουργίας	28
1.8.1.1.1.3 Ρύθμιση του Nrf-2	30
1.8.1.1.1.4 Κατώτεροι μοριακοί στόχοι του Nrf-2	32
1.8.1.1.1.4.1 Οξυγενάση της Αίμης 1 (HO-1)	32
1.8.1.1.1.4.2 Mn-υπεροξειδική δεσμουτάση (Mn-SOD)	34
1.8.1.1.1.4.5 Ενεργοποιητές του Nrf-2	35
1.8.1.2 Αυτακοϊδή	36
1.8.2 Ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές της καρδιοπροστασίας	37
1.8.2.1 Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και πρωτεϊνική κινάση G (PKG)	37
1.8.2.2 Το μονοπάτι των κινασών διάσωσης (RISK Pathway)	37
1.8.2.3 SAFE Μονοπάτι	38
1.8.2.3.1 Αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών RISK και SAFE	39
1.8.2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες	39
1.8.2.4.1 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)	39
1.8.2.4.2 Ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases-MAPK)	40

1.8.2.4.3 Πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και ενεργοποιούμενη από την μονοφωσφορική αδενοσίνη πρωτεϊνική κινάση (AMPK)	41
1.8.3 Τελεστές της Καρδιοπροστασίας	41
1.8.3.1 Μιτοχονδριακός διάυλος διαπερατότητας (Mitochondrial permeability transition pore-MPTP)	41
1.8.3.2 ATP εξαρτώμενοι διάυλοι Καλίου	42
1.8.3.3 STAT 3	43
1.9 Φαρμακολογική στόχευση της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης	43
2.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες και η συμβολή τους στην πρόληψη ασθενειών	45
2.2 Crocus sativus	46
2.2.1 Εισαγωγικά Στοιχεία	46
2.2.2 Παραδοσιακή Χρήση	47
2.2.3 Χημική Σύσταση	47
2.2.3.1 Πικροκροκίνη και Σαφρανάλη	48
2.2.3.2 Κροκίνη και Κροκετίνη	49
2.2.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες του Κρόκου και πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές του	49
2.2.4.1 Επίπτωση του Κρόκου στην αθηροσκλήρυνση και τα λιπίδια του πλάσματος	50
2.2.4.2 Καρδιοπροστασία και περιορισμός του εμφράκτου από τον Κρόκου	50
3. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και πειραματικό ζωικό μοντέλο προσομοίωσης αυτής	53
4.Σκοπός	54

## Ειδικό Μέρος

1.Παρασκευή και ποσοτικοποίηση εκχυλίσματος από τα στίγματα του φυτού <i>Crocus sativus</i> L., Iridaceae	57
2. Πειραματόζωα	57
2.1. Πειραματική Διαδικασία	58
2.1.1 Μοντέλο Πρόκλησης Ισχαιμίας-Επαναιμάτωσης σε μύες	58
2.1.2 Ισχαιμική περιοχή και υπολογισμός εμφραγματικής έκτασης στο μυοκάρδιο	59
2.2. Πειραματικό Πρωτόκολλο	60
2.2.1 1 <sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων	60
2.2.2 2 <sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων	62
2.3. Western Blot	63
2.3.1. Αρχή της Μεθόδου	63
2.3.2. Περιγραφή Μεθόδου	63
2.3.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων	63
2.3.2.1.1. Σύσταση Lysis Buffer	63
2.3.2.2. Ομογενοποίηση	65
2.3.2.3. Ηλεκτροφόρηση	65
2.3.2.4. Transportation	68
2.3.2.5. Blocking	70
2.3.2.6. Πρωτογενές Αντίσωμα	70
2.3.2.7 Δευτερογενές Αντίσωμα και Αντιδραστήριο Χημειοφωταύγειας (ECL)	71
2.3.2.8 Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο	71
2.3.2.9. Stripping	72

2.4 Προσδιορισμός επιπέδων Μηλονικής διαλδεΐδης (Malonyldihaldehyde/MDA)	73
2.5 Στατιστική Επεξεργασία	73
3 Αποτελέσματα	73
3.1 Αποτελέσματα που αφορούν τους Wild Type μύες	73
3.1.1 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επιφέρει σημαντική μείωση της εμφραγματικής περιοχής στους Wild Type μύες	73
3.1.2 Το υδατικό εκχύλισμα κρόκου μειώνει την ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα	76
3.1.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου περιορίζει/μειώνει σημαντικά το οξειδωτικό και νιτρο-οξειδωτικό στρες in vivo	78
3.1.4 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία ενεργοποιώντας το RISK μονοπάτι και μειώνει την έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6	78
3.2. Αποτελέσματα στους ApoE <sup>(-/-)</sup> μύες	80
3.2.1 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει σημαντικά το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής στους ApoE <sup>(-/-)</sup> μύες	80
3.2.2 Το υδατικό εκχύλισμα κρόκου μειώνει την ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα των ApoE <sup>(-/-)</sup> μυών	83
3.2.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει τους δείκτες οξειδωτικού και νιτρο-οξειδωτικού στρες στους ApoE <sup>(-/-)</sup> μύες	85
3.2.4 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία ενεργοποιώντας το RISK μονοπάτι, αυξάνοντας την έκφραση της eNOS και ρυθμίζοντας προς τα κάτω/καταβιπώνοντας την έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 στους ApoE <sup>(-/-)</sup> μύες	85
3.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 και των κατώτερων μοριακών του στόχων τόσο στους Wild Type όσο και στους ApoE <sup>(-/-)</sup> μύες	88
4. Συζήτηση	91

5. Συμπεράσματα	104
6. Μελλοντικές Προοπτικές	104
Βιβλιογραφία	107
Παράρτημα εικόνων	122



# Γενικό Μέρος

## 1.1 Στεφανιαία Νόσος, Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου και Επιδημιολογία

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) αποτελεί τη συνηθέστερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου [1] και την πρώτη αιτία θανάτου στον αναπτυγμένο κόσμο [2]. Το OEM με ή χωρίς ανύψωση του διαστήματος ST (STEMI ή non-STEMI, αντίστοιχα) είναι στην κλινική πρακτική ένα σύνηθες επείγον περιστατικό που σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα [2], [3].

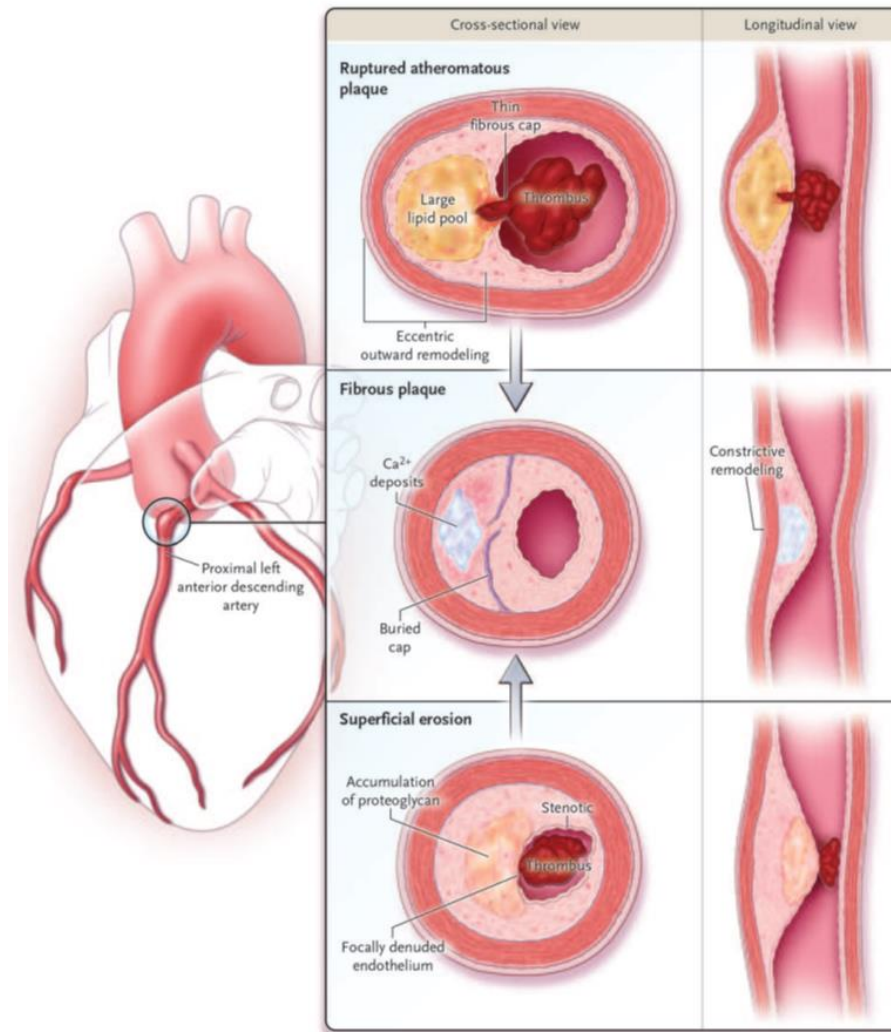
Η διαχείριση του OEM έχει βελτιωθεί δραματικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες και συνεχίζει να εξελίσσεται διαρκώς. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά επιβεβαιώνουν τη μεταβολή αυτή. Από το 1987, το αναπροσαρμοσμένο ποσοστό συχνότητας της νοσηλείας λόγω OEM ή θανατηφόρας στεφανιαίας νόσου μειώνεται σταθερά κατά 4 με 5 % κάθε χρόνο. Εντούτοις, περίπου 550.000 νέα επεισόδια και 200.000 υποτροπιάζοντα επεισόδια OEM λαμβάνουν χώρα ετησίως [4].

## 1.2 Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου (OEM):

### 1.2.1 Στοιχεία παθοφυσιολογίας

Η αιτία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου περιλαμβάνει τη ρήξη ή διάβρωση μίας εύθρυπτης, λιπώδους φύσης αθηροσκληρυντικής στεφανιαίας πλάκας. Η αιφνίδια μείωση της στεφανιαίας αρτηριακής ροής δευτερευούσης της στεφανιαίας αρτηριακής αθηροθρόμβωσης έχει ως αποτέλεσμα την απότομη μείωση της παραχθείσας από τα κύτταρα ενέργειας, που οδηγεί, τελικά, στην κυτταρική νέκρωση [2].

Οι περισσότερες μελέτες που εξετάζουν τους μηχανισμούς στεφανιαίας θρόμβωσης έχουν επικεντρωθεί στη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, το συχνότερο αίτιο θανατηφόρων οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Όσον αφορά τη δομή της αθηρωματικής πλάκας, μία ινώδης κάψα περικλείει ένα πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα, γνωστό και ως νεκρωτικό πυρήνα (Εικόνα 1) [5]. Η ινώδης κάψα περιβάλλει το λιπιδικό πυρήνα, ο οποίος είναι πλούσιος σε λιπίδια. Τέτοιες πλάκες, συχνά, όχι όμως πάντα, έχουν λεπτό τοίχωμα, πάχους 50 με 65  $\mu\text{m}$ , μεγάλο λιπιδικό πυρήνα με άφθονα φλεγμονώδη κύτταρα όπως επίσης και στικτή ή ανομοιογενή ασβεστοποίηση, χαρακτηρίζονται ως ασταθείς και είναι αυτές που συνήθως υφίστανται ρήξη [5].



Εικόνα 1: Τα χαρακτηριστικά των αθηροσκληρυντικών πλακών που σχετίζονται με διάφορες μορφές της αρτηριακής στεφανιαίας νόσου [5]

Στην εικόνα 1 απεικονίζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των στεφανιαίων αθηρωματικών πλακών με τα αντίστοιχα κλινικά περιστατικά που προκαλούν. Το άνω ζεύγος εικόνων αναπαριστά μία θετικά αναδιαμορφωμένη αθηρωματική πλάκα με λεπτή ινώδη κάψα η οποία έχει υποστεί ρήξη και έχει προκαλέσει το σχηματισμό θρόμβου. Η επούλωση τέτοιων πλακών προωθεί την εξέλιξή τους σε μία περισσότερο ινώδη πλάκα, ορατή στο μεσαίο ζεύγος εικόνων. Μία τέτοια πλάκα σχετίζεται με σταθερά ισχαιμικά σύνδρομα (π.χ στηθάγχη) ως αποτέλεσμα στένωσης του αρτηριακού αυλού. Σε αυτή την περίπτωση, η πλάκα μπορεί να περιέχει στρώσεις από παλαιότερες ινώδεις κάψες λόγω προηγηθείσας ρήξης της πλάκας και σχηματισμού θρόμβου, ακολουθούμενων από επούλωση, ίωση και συχνά αναδιαμόρφωση. Η διαδικασία αυτή προωθεί την εξέλιξη μίας μη εμφρακτικής,

αθηρωματικής, πλούσιας σε λιπίδια πλάκας σε μία στενωτική, περισσότερο ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα. Το κάτω ζεύγος εικόνων απεικονίζει μία πλάκα πλούσια σε πρωτεογλυκάνη, η οποία έχει προκαλέσει έναν εμφρακτικό θρόμβο, συνέπεια της επιφανειακής διάβρωσής της.

Παρά τη χρονιότητα της αθηροσκλήρυνσης, οι θρομβωτικές επιπλοκές, οι οποίες αποτελούν τις πιο επίφοβες κλινικές συνέπειες της νόσου αυτής, συμβαίνουν ξαφνικά και συχνά χωρίς καμία προειδοποίηση. Σύμφωνα με την ισχύουσα θεωρία, σε μία αθηροσκληρυντική στεφανιαία αρτηρία η προοδευτική στένωση περιορίζει το εύρος του αυλού σε τέτοιο βαθμό που ένα μικρός θρόμβος αιμοπεταλίων αρκεί να προκαλέσει πλήρη έμφραξη του αγγείου. Επομένως, ένας εμφρακτικός θρόμβος που περιπλέκει μία στένωση υψηλού βαθμού, θα μπορούσε να σταματήσει την αιματική ροή και να προκαλέσει OEM με ανύψωση του επάρματος ST [5].

Η οξεία έμφραξη μίας στεφανιαίας αρτηρίας σε STEMI ασθενείς υποβάλλει την περιοχή του μυοκαρδίου που τροφοδοτείται από αυτό το αγγείο σε οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία, οριοθετώντας έτσι την ισχαιμική περιοχή (area at risk-AAR) ενός OEM, στην περίπτωση που η έμφραξη αυτή παραταθεί ή γίνει μόνιμη. Εάν η περίοδος της οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας παραταθεί για περισσότερο από 20 λεπτά, ένα «κύμα» θανάτου των μυοκαρδιακών κυττάρων ξεκινά από το υποενδοκάρδιο και επεκτείνεται διατοίχωματικά με την πάροδο του χρόνου προς το επικάρδιο [6].

### 1.2.2 Ταξινόμηση OEM

Το OEM κατηγοριοποιείται, πρωτίτως, με βάση την παρουσία ή την απουσία ανυψωμένου επάρματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) και δευτερευόντως σε 6 κατηγορίες:

- ❖ Αιφνίδιο έμφραγμα του μυοκαρδίου λόγω στεφανιαίας αθηροθρόμβωσης (τύπος 1)
- ❖ Έμφραγμα οφειλόμενο σε αναντιστοιχία παροχής-ζήτησης οξυγόνου που δεν είναι αποτέλεσμα οξείας αθηροθρόμβωσης, όπως στεφανιαία ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, στεφανιαία εμβολή, σπασμός της στεφανιαίας αρτηρίας, ταχυ- ή βραδυ-αρρυθμίες, αναιμία, αναπνευστική ανεπάρκεια, υπόταση και υπέρταση με ή χωρίς αριστερή κοιλιακή υπερτροφία (τύπος 2)

- ❖ Έμφραγμα που προκαλεί αιφνίδιο θάνατο χωρίς τη δυνατότητα διενέργειας εξέτασης για βιοδείκτες ή ηλεκτροκαρδιογράφημα για επιβεβαίωση (τύπος 3)
- ❖ Έμφραγμα σχετιζόμενο με διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (percutaneous coronary intervention-PCI) (τύπος 4α)
- ❖ Έμφραγμα σχετιζόμενο με θρόμβωση στεφανιαίας ενδοαγγειακής προσθήκης (stent) (τύπος 4β) και
- ❖ Έμφραγμα που σχετίζεται με επέμβαση αορτικής στεφανιαίας παράκαμψης με μόσχευμα (coronary artery bypass grafting-CABG) (τύπος 5) [7]

### 1.2.3 Διάγνωση OEM

Στην κλινική πρακτική, το OEM διαγιγνώσκεται και εκτιμάται στη βάση κλινικής εξέτασης, ηλεκτροκαρδιογραφήματος, βιοχημικών εξετάσεων, επεμβατικών και μη επεμβατικών απεικονιστικών τεχνικών και παθολογικής αξιολόγησης [2]. Οι ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες της μυοκαρδιακής ισχαιμίας ή του εμφράγματος αποτυπώνονται στο διάστημα PR, το σύμπλεγμα QRS, το έπαρμα ST ή και το κύμα T. Οι πρώιμες εκδηλώσεις της μυοκαρδιακής ισχαιμίας αφορούν αλλαγές στα δύο τελευταία [7]. Η μέτρηση των επιπέδων των καρδιακών τροπονινών αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τη διαφοροποίηση του non-STEMI από την ασταθή στηθάγχη και τις νόσους που δε σχετίζονται με οξεία στεφανιαία σύνδρομο [2].

Οι καρδιακές τροπονίνες I, T και C αποτελούν συστατικά της συσταλτικής συσκευής των μυοκαρδιακών κυττάρων, εκφράζονται αποκλειστικά στην καρδιά και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που ρυθμίζει το σχηματισμό των διασταυρωτών γεφυρών ακτίνης-μυοσίνης κατά τη συστολή και τη χάλαση του μυοκαρδίου. Ειδικότερα, οι τροπονίνες I και T αποτελούν ειδικούς, ευαίσθητους και ισχυρούς βιοδείκτες μυοκαρδιακής βλάβης. Απελευθερώνονται στον ορό αμέσως μετά την ιστική βλάβη και αντανακλούν την έκταση της μη αναστρέψιμης μυοκαρδιακής βλάβης [8].

### 1.3 Αποκατάσταση Αιματικής Ροής

Οι σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές αντιμετώπισης του OEM έχουν εξελιχθεί και επικεντρώνονται στην αποκατάσταση της ροής στη στεφανιαία αρτηρία (επαναιμάτωση) μέσω διάλυσης του θρόμβου με φαρμακευτικές ουσίες (θρομβολυτική θεραπεία) και/ή στην εμφύτευση ενδοαγγειακής προσθήκης/stent (πρωτογενής διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση-PPCI) με σκοπό την καλύτερη

διατήρηση της αριστερής κοιλιακής λειτουργίας και τη μείωση της θνητότητας [3], [9].

Το μέγεθος του εμφράκτου, δηλαδή της περιοχής του μυοκαρδίου που νεκρώνεται, αποτελεί σημείο μεγάλης σημασίας για τον καθορισμό της αριστερής κοιλιακής συστολικής λειτουργίας και την πιθανότητα ανάπτυξης καρδιακής ανεπάρκειας [10]. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής είναι:

- ❖ Η περιοχή της μυοκαρδιακής ισχαιμίας, δηλαδή το μέγεθος της περιοχής που επαναιματώνεται και υπό φυσιολογικές συνθήκες τροφοδοτείται από τη στεφανιαία αρτηρία που έχει φραχθεί
- ❖ Η διάρκεια της ισχαιμίας στην οποία υποβάλλεται η ισχαιμική περιοχή
- ❖ Η ποσότητα της υπολειπόμενης αιματικής ροής στην ισχαιμική περιοχή, δηλαδή η συμπληρωματική αιματική ροή

Οι συστηματικές αιμοδυναμικές παράμετροι και κυρίως η καρδιακή συχνότητα είναι σημεία ελάσσονος σημασίας για τον καθορισμό του μεγέθους του εμφράκτου, ενώ το κατά πόσο αυτές επιδρούν στη μυοκαρδιακή ζήτηση οξυγόνου ή στη στεφανιαία ή συμπληρωματική αιματική ροή παραμένει ασαφές [11].

#### 1.4 Μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης (Myocardial reperfusion injury)

Αν και η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου που έχει υποστεί έμφραγμα αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την αποκατάσταση της αιματικής ροής, η διαδικασία της επαναιμάτωσης από μόνη της μπορεί να επάξει το θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης με χαρακτηριστικό το θάνατο των καρδιακών μυοκυττάρων που ήταν ζωντανά αμέσως πριν τη μυοκαρδιακή επαναιμάτωση. Αυτή η μορφή μυοκαρδιακής βλάβης, η οποία οδηγεί σε επακόλουθη αύξηση του μεγέθους του εμφράκτου, ενδεχομένως εξηγεί το λόγο για τον οποίο, παρά τη βέλτιστη μυοκαρδιακή επαναιμάτωση, το ποσοστό θανάτου μετά από ένα OEM πλησιάζει το 10% και η επίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας είναι σχεδόν 25% [12]. Η διαδικασία της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης συνεχίζει να εξελίσσεται και να βελτιώνεται χάρις στην έγκαιρη και αποτελεσματική εφαρμογή της, την πρόοδο που σημειώνεται στην τεχνολογία της PPCI και την ανάπτυξη νέων αντιαιμοπεταλιακών και αντιθρομβωτικών παραγόντων για τη διατήρηση της βατότητας της σχετιζόμενης με το έμφραγμα στεφανιαίας αρτηρίας.

Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την πρόληψη της μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης [6].

#### 1.4.1 Μορφές Μυοκαρδιακής Βλάβης Επαναιμάτωσης

Οι 4 αναγνωρισμένες μορφές της μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης περιγράφονται λεπτομερώς στη συνέχεια. Οι πρώτες δύο είναι αναστρέψιμες και οι δύο τελευταίες μη αναστρέψιμες

- ❖ Επαγόμενες από την επαναιμάτωση αρρυθμίες: Η αιφνίδια επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου σε ασθενείς με STEMI που υποβάλλονται σε PPCI μπορεί να συνοδευθεί από κολπικές αρρυθμίες, συνήθως αυτοπεριοριζόμενες και εύκολα αντιμετωπίσιμες
- ❖ Μυοκαρδιακή αναστρέψιμη συσταλτική δυσλειτουργία (Myocardial stunning): Ο όρος stunning αναφέρεται στην αναστρέψιμη μετα-ισχαιμική συσταλτική δυσλειτουργία. Η μορφή αυτή της βλάβης επαναιμάτωσης προκύπτει από τις καταστρεπτικές δράσεις του οξειδωτικού στρες και της υπερφόρτωσης του μυοκαρδιακής συσταλτικής συσκευής με ιόντα ασβεστίου.
- ❖ Μικροαγγειακή παρεμπόδιση (Microvascular obstruction-MVO): Η μικροαγγειακή παρεμπόδιση (MVO) περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1966 ως «η αδυναμία επαναιμάτωσης μιας προηγούμενης ισχαιμικής περιοχής». Οι κυριότεροι παράγοντες που οδηγούν σε αυτό το φαινόμενο περιλαμβάνουν την τριχοειδική βλάβη με ελαττωμένη αγγειοχάλαση, την εξωτερική συμπίεση των τριχοειδών λόγω «πρηξίματος» (swelling) των ενδοθηλιακών και μυοκαρδιακών κυττάρων, τη μικροεμβολή από εύθρυπτα συστατικά της αθηρωματικής πλάκας, αιμοπεταλιακούς μικρο-θρόμβους και τη συσσώρευση των ουδετεροφίλων. Η παρουσία MVO συνδέεται με μεγαλύτερο μέγεθος εμφράκτου, χαμηλότερο κλάσμα εξώθησης, δυσμενή αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και χειρότερη κλινική έκβαση. Δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τον περιορισμό της MVO σε ασθενείς υποβαλλόμενους σε PPCI. Ωστόσο, το αν η MVO αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για τον επαγόμενο από την επαναιμάτωση θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων ή το αν είναι απλώς ένας βιοδείκτης σοβαρής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης παραμένει ασαφές [6].

- ❖ Θανάσιμη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης: Ορίζεται ο οφειλόμενος στην επαναιμάτωση θάνατος των μυοκαρδιακών κυττάρων, τα οποία ήταν ζωντανά στο τέλος του ισχαιμικού επεισοδίου [6]. Οι κυριότεροι μεσολαβητές αναλύονται στις επόμενες παραγράφους και περιλαμβάνουν το οξειδωτικό στρες, την υπερφόρτωση με ασβέστιο, τη διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore -MPTP) και την υπερσυσταλτικότητα [12].

Η ύπαρξη της θανάσιμης μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης έχει σημειωθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα εμφράγματος του μυοκαρδίου όσο και σε ασθενείς με STEMI καθώς διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή θεραπευτικών παρεμβάσεων μόνο κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης μείωσε το μέγεθος του εμφράκτου κατά 40%-50% [12]. Με βάση την παρατήρηση αυτή συμπεραίνεται ότι η θανάσιμη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης είναι υπαίτια για μέχρι και το 50% του τελικού μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής. Επιπροσθέτως, εξασθενεί όλα τα οφέλη της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης όσον αφορά το μέγεθος του εμφράκτου και παρουσιάζεται ως ένας σημαντικός στόχος για καρδιοπροστασία σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τον περιορισμό της θανατηφόρου βλάβης επαναιμάτωσης σε ασθενείς που υφίστανται PPCI [6].

### 1.5 Παθοφυσιολογία της Βλάβης Ισχαιμίας/Επαναιμάτωσης

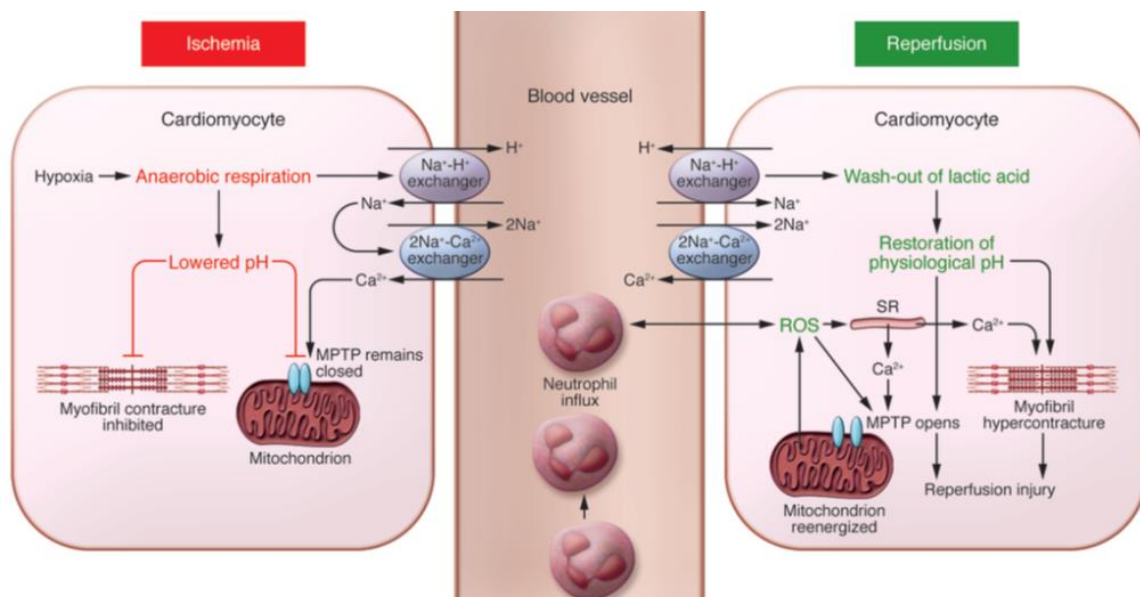
Η βλάβη που προκαλείται στο μυοκάρδιο κατά τη διάρκεια OEM είναι το αποτέλεσμα της ισχαιμίας και της επακόλουθης επαναιμάτωσης και ορίζεται ως βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (ischemia/reperfusion-I/R-injury). Η μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης είναι ένα σύνθετο φαινόμενο στο οποίο συμμετέχουν πολλοί παράγοντες και συνεισφέρουν στην τελική βλάβη που προκαλείται στην καρδιά [13].

#### 1.5.1 Παθοφυσιολογία της Ισχαιμίας

Κατά τη διάρκεια οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας, η απουσία οξυγόνου και ο αναερόβιος μεταβολισμός έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την πτώση του ενδοκυτταρικού pH. Το όξινο περιβάλλον επάγει τον ιονανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  να εξωθήσει  $\text{H}^+$  επιφέροντας υπερφόρτωση του κυττάρου με  $\text{Na}^+$ . Η μεταβολή αυτή ενεργοποιεί, με τη σειρά της, τον ιονανταλλάκτη  $2 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  και τον



ωθεί να λειτουργήσει αντίστροφα, δηλαδή να αποβάλλει  $\text{Na}^+$  προκαλώντας υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$  ενδοκυτταρικά. Παράλληλα, στην ισχαιμία η  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ΑΤΡαση παύει να λειτουργεί οξύνοντας περαιτέρω την ενδοκυτταρική υπερφόρτωση με  $\text{Na}^+$ . Οι όξινες συνθήκες που επικρατούν στην ισχαιμία προλαμβάνουν το άνοιγμα του MPTP και την υπερσυσταλτικότητα καθόλη τη διάρκειά της [6].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά την Ισχαιμία (αριστερά) και την Επαναιμάτωση (δεξιά) [6]

### 1.5.2 Παθοφυσιολογία της Επαναιμάτωσης

Κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης το ισχαιμικό μυοκάρδιο υποβάλλεται σε διάφορες απότομες βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές. Αυτές, με τη σειρά τους, εντείνουν τις μεταβολές που ξεκίνησαν κατά την περίοδο της μυοκαρδιακής ισχαιμίας [12]. Όταν ξεκινήσει η επαναιμάτωση, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων επανενεργοποιείται, αλλά πλέον παράγει ROS. Άλλες πηγές ROS αποτελούν η οξειδάση της ζανθίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η NADPH οξειδάση στα ουδετερόφιλα. Οι ROS συμβάλλουν στη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης καθώς επάγουν τη διάνοιξη του MPTP, δρουν ως χημειοτακτικά των ουδετεροφίλων και μεσολαβούν τη δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι παραπάνω δράσεις έχουν ως αποτέλεσμα, αφενός, την υπερφόρτωση του κυττάρου με ιόντα ασβεστίου και αφετέρου την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών λόγω λιπιδικής υπεροξειδωσης, επάγοντας έτσι την ενζυμική αποδιάταξη και προκαλώντας απευθείας οξειδωτική βλάβη στο DNA. Η επαναιμάτωση σε συνδυασμό με την

επανενεργοποίηση του ιονανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  οδηγούν σε έκπλυση του γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα την ταχεία αποκατάσταση του φυσιολογικού pH. Η επαναφορά του pH αναιρεί την ανασταλτική επίδραση του όξινου περιβάλλοντος στη διάνοιξη του MPTP και στη συσταλτικότητα των μυοκαρδιακών κυττάρων. Η παρατηρούμενη αποκατάσταση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί ασβέστιο στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί το άνοιγμα του MPTP [6]. Συνέπειες της διάνοιξης του MPTP αποτελούν η αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, το «πρήξιμο» (swelling) των μιτοχονδρίων και τελικά ο θάνατος των μυοκαρδιακών κυττάρων [12].

## 1.6 Μεσολαβητές της μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης

### 1.6.1 Οξειδωτικό στρες

Η επανοξυγόνωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου, αν και απαραίτητη για τη διάσωσή του, προκαλεί βλάβη σε τέτοιο βαθμό που ξεπερνά τη βλάβη που οφείλεται στην ισχαιμία [12].

Μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου (ROS) παράγονται από διάφορες πηγές. Αυτό το καταστρεπτικό φαινόμενο μεσολαβεί τη μυοκαρδιακή βλάβη και το θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω ποικίλων διαφορετικών μηχανισμών [6]. Από τη μία πλευρά, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν δομικές τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες-κλειδιά για τη βιωσιμότητα και λειτουργία του κυττάρου οδηγώντας σε ενζυμική δυσλειτουργία ή απενεργοποίησή τους. Από την άλλη πλευρά, οι ROS καταστρέφουν τα ενδοκυτταρικά λιπίδια μέσω λιπιδικής υπεροξειδωσης, διαταράσσοντας με αυτόν τον τρόπο τη μοριακή σταθερότητα της κυτταρικής μεμβράνης και των κυτταρικών οργανιδίων [14]. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες αποτελούν τους πρωταρχικούς στόχους της οξειδωτικής τροποποίησης από τα ROS [15]. Η σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids -PUFAs) τις καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτες στη λιπιδική υπεροξειδωση από αυτά. Η οξείδωση των PUFAs αυξάνει την υδροφιλικότητά τους μεταβάλλοντας τη δομή της μεμβράνης με διαταραχές στη διαπερατότητα και τη ρευστότητά της. Επίσης, η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία υποδοχέων και ενζύμων που είναι προσδεδεμένοι στη μεμβράνη [16], [17].

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, η αντιοξειδωτική θεραπεία θωρήθηκε, όπως ήταν φυσικό, μία κατάλληλη λύση για την πρόληψη της εν λόγω βλάβης. Εντούτοις, πειραματικές και κλινικές μελέτες ανέφεραν μεικτά αποτελέσματα όσον αφορά τη χορήγηση αντιοξειδωτικής θεραπείας κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης. Ένας λόγος, ενδεχομένως, της αποτυχίας αποτελεί η αδυναμία του αντιοξειδωτικού να εισέλθει στο κύτταρο [6].

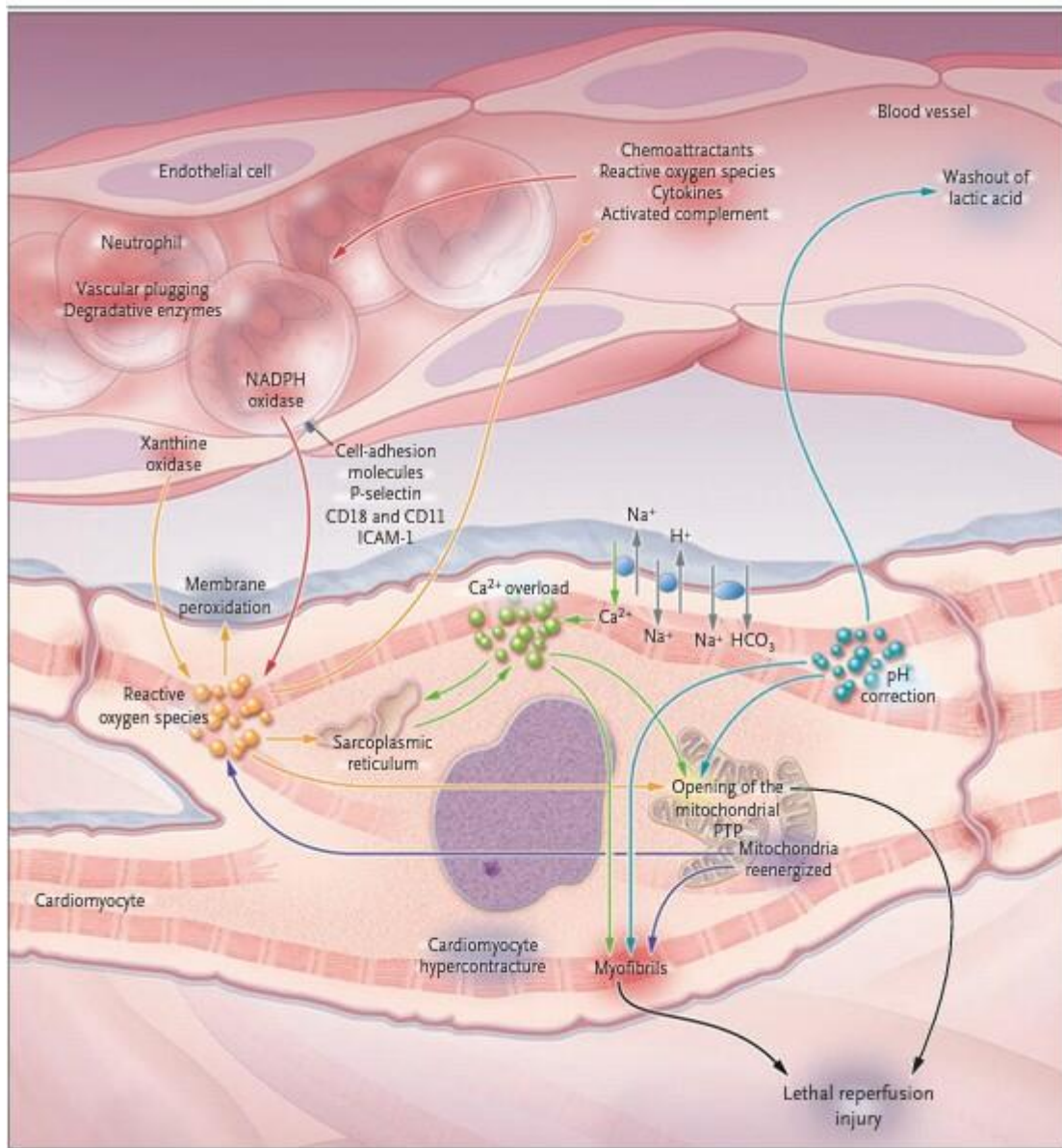
#### 1.6.1.1 Νιτρο-οξειδωτικό στρες

Επιπροσθέτως, το οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO), αέριου νευροδιαβιβαστή και ενδοκυτταρικού μορίου σηματοδότησης, εξασθενώντας τις καρδιοπροστατευτικές του δράσεις, όπως η αναστολή της συσώρευσης των ουδετεροφίλων, η απενεργοποίηση των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και η βελτίωση της στεφανιαίας αιματικής ροής [12]. Εντούτοις, το NO είναι και αυτό ελεύθερη ρίζα με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο ( $NO\bullet$ ) αλλά όχι ιδιαίτερα δραστική. Ο συνδυασμός του με ROS έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων αζώτου (reactive nitrogen species-RNS), με κυριότερο το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ( $ONOO^{\cdot-}$ ), το οποίο είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό για τους οργανισμούς καθώς προκαλεί ιστική βλάβη ενώ έχει ενοχοποιηθεί και για την οξείδωση της LDL. Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν, διαχέεται με μεγάλη ευκολία μέσω των μεμβρανών και μπορεί να προκαλέσει άμεσα οξείδωση πρωτεϊνών και βάσεων του DNA δρώντας ως ρίζα με συμπεριφορά παρόμοια με της ρίζας υδροξυλίου. Η αντίδραση των RNS με υπόλοιπα τυροσίνης πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της Νιτροτυροσίνης (NT), ενός από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους και γνωστούς δείκτες νιτρο-οξειδωτικού στρες [18].

#### 1.6.2 Ενδοκυτταρική υπερφόρτωση με ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ )

Η ενδοκυτταρική και μιτοχονδριακή υπερφόρτωση με ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) ξεκινά κατά την οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία και επιδεινώνεται κατά την επαναιμάτωση εξαιτίας της αποδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης, της επαγόμενης από το οξειδωτικό στρες βλάβης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και της αποκατάστασης της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η τελευταία επιτρέπει την επαναφορά του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης με αποτέλεσμα την είσοδο  $Ca^{2+}$  στα μιτοχόνδρια

μέσω του μιτοχondριακού μεταφορέα  $\text{Ca}^{2+}$  και, τελικά, την επαγωγή διάνοιξης του MPTP [6].



Εικόνα 3: Οι κυριότεροι μεσολαβητές της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης [12]

### 1.6.3 Η ταχεία αποκατάσταση του φυσιολογικού pH κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης

Κατά την οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία το ενδοκυττάριο pH μειώνεται σε λιγότερο από 7, ενώ στην επαναιμάτωση το φυσιολογικό pH επανέρχεται ταχέως λόγω της έκπλυσης του γαλακτικού οξέος και της ενεργοποίησης του ιονανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  όπως επίσης και του συμμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . Αυτή η αλλαγή στο pH συμβάλλει

στο θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων λόγω της θανάσιμης μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης διότι επιτρέπει τη διάνοιξη του MPTP και την άκαμπτη υπερσυσταλτικότητα μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης [19]. Μάλιστα, η επαναιμάτωση ισχαιμικού μυοκαρδίου σε ζώα χρησιμοποιώντας όξινο ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να μειώσει το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής. Συνεπώς, μία δυναμική θεραπευτική στρατηγική για την πρόληψη της θανατηφόρου μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης θα ήταν η επιβράδυνση της επαναφοράς του φυσιολογικού pH κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης [20]. Αυτή θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω φαρμακολογικής αναστολής του ιονανταλλάκτη  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [6].

#### 1.6.4 Ο μιτοχονδριακός διάυλος διαπερατότητας (MPTP)

Οι περισσότεροι από τους προαναφερθέντες μεσολαβητές της μυοκαρδιακής βλάβης επαναιμάτωσης φαίνεται να συγκλίνουν στο μιτοχονδριακό διάυλο διαπερατότητας (MPTP). Ο MPTP είναι ένας μη εκλεκτικός διάυλος εντοπιζόμενος στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, το άνοιγμα του οποίου προκαλεί εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα την εξάντληση του ATP και τον κυτταρικό θάνατο. Στα πλαίσια της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, έχει αποδειχτεί ότι ο MPTP παραμένει κλειστός κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και ανοίγει μόνο στην επαναιμάτωση ως απάντηση στη μιτοχονδριακή υπερφόρτωση με  $\text{Ca}^{2+}$  και φωσφορικά ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), στο οξειδωτικό στρες, στη σχετική εξάντληση των αποθεμάτων ATP και στην ταχεία διόρθωση του pH. Επομένως, η πρόληψη της διάνοιξης του MPTP κατά την επαναιμάτωση με τη χορήγηση γνωστών ανστολέων του MPTP, όπως το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο Κυκλοσπορίνη A, έχει αναφερθεί σε πειραματικές μελέτες ότι μειώνει το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής κατά 40%-50% σε μικρά και μεγάλα ζωικά μοντέλα εμφράγματος του μυοκαρδίου [6], [21], [22].

#### 1.6.5 Ο ρόλος της Φλεγμονής στη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης

Μετά από το OEM, απελευθερώνονται χημειοτακτικά μόρια (chemoattractants) όπως ROS, κυτταροκίνες και το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα προσελκύοντας τα ουδετερόφιλα στην εμφραγματική ζώνη μέσα στις πρώτες 6 ώρες της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης, ενώ τις επόμενες 24 ώρες αυτά μεταναστεύουν στο εσωτερικό του μυοκαρδιακού ιστού. Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (cell-adhesion molecules) P-selectin, CD18 και CD11, και το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1

(intracellular adhesion molecule 1-ICAM-1) διευκολύνουν αυτήν τη μετακίνηση των ουδετεροφίλων στο μυοκαρδιακό ιστό, όπου μεσολαβούν το θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων, απελευθερώνουν αποικοδομητικά ένζυμα και παράγουν ROS [12], [23], [24]. Πειραματικές και κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η φλεγμονώδης απάντηση στο έμφραγμα του μυοκαρδίου σχετίζεται με την επαγωγή κυτταροκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$  -TNF- $\alpha$ ), η ιντερλευκίνη 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), οι οποίοι πιστεύεται ότι δρουν με τρόπο παρόμοιο με εκείνον των κασπασών [25].

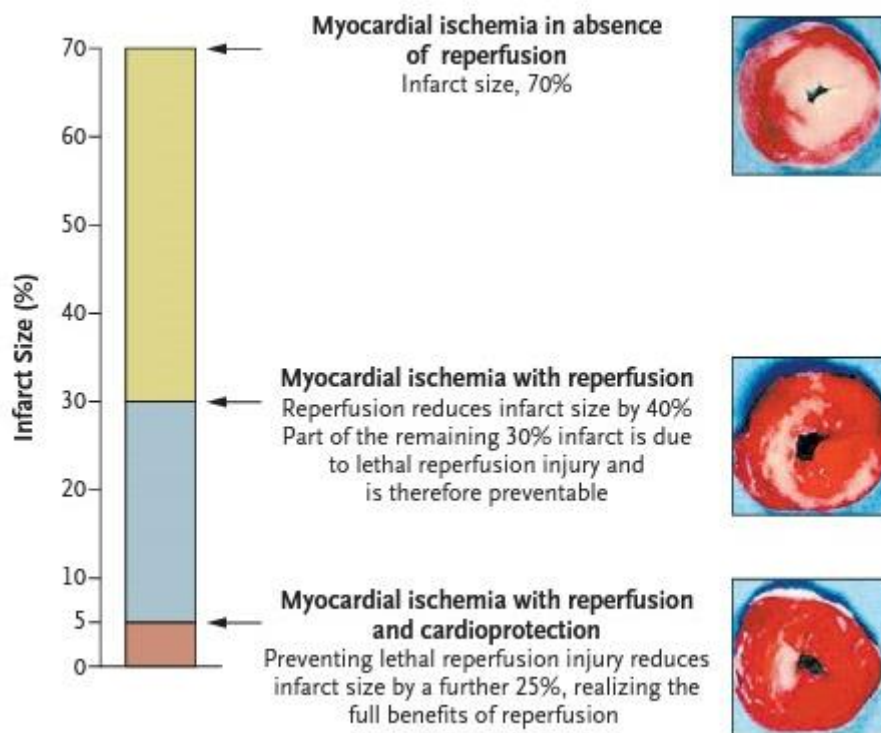
Ωστόσο, παραμένει ασαφές το αν η φλεγμονώδης απάντηση που συνοδεύει ένα OEM συμβάλλει στην παθογένεση της θανάσιμης μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ή το αν αποτελεί αντίδραση του οργανισμού στην οξεία μυοκαρδιακή βλάβη. Πειραματικές μελέτες που αξιολογούσαν τη χρήση θεραπευτικών στρατηγικών σχεδιασμένων να αναστέλλουν τη φλεγμονώδη διαδικασία κατά τη μυοκαρδιακή επαναιμάτωση με χρήση αντισωμάτων έναντι των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης και την αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, ανέφεραν σημαντική μείωση του μεγέθους του εμφράκτου. Όμως, οι κλινικές μελέτες που ακολούθησαν χρησιμοποιώντας αυτή τη θεραπευτική προσέγγιση έδωσαν αποθαρρυντικά αποτελέσματα.[6]

### 1.7 Καρδιοπροστασία

Σήμερα, λαμβάνοντας υπόψιν ότι :

- 1) η επικράτηση της ισχαιμικής καρδιακής νόσου αυξάνεται όχι μόνο στις αναπτυγμένες αλλά και στις αναπτυσσόμενες χώρες
- 2) ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός ασθενών επιβιώνουν από OEM, κυρίως λόγω έγκαιρης επαναιμάτωσης και εφαρμογής καινοτόμων ιατρικών θεραπευτικών επιλογών και
- 3) πολλοί από αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν προοδευτική μυοκαρδιακή αναδιαμόρφωση και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια,

συμπεραίνεται ότι η καρδιοπροστασία, πέρα από την επαναιμάτωση, χρήζει επείγουσα ανάγκη με σκοπό την ελαχιστοποίηση του μεγέθους του εμφράκτου, ως το κύριο καθοριστικό σημείο της εξελισσόμενης καρδιακής ανεπάρκειας [26].



Εικόνα 4: Επίδραση της επαναιμάτωσης, των στρατηγικών καρδιοπροστασίας ή της απουσία επαναιμάτωσης στο μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής [12]

Η καρδιοπροστασία είναι ένας ευρύς όρος που αναφέρεται σε όλες τις στρατηγικές που έχουν στόχο την ελαχιστοποίηση των βλαπτικών αποτελεσμάτων της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Για την επίτευξή της απαιτείται η κινητοποίηση ενδογενών μηχανισμών που ενεργοποιούνται από φυσικές παρεμβάσεις ή χημικές ουσίες. Η εφαρμογή καρδιοπροστασίας ελαχιστοποιεί όλες τις βλαβερές συνέπειες της μυοκαρδιακής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, σε διαφορετικό όμως βαθμό ανάλογα με τη στρατηγική που εφαρμόζεται [11]. Εκτός και πέρα από τη μείωση του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής, οι στρατηγικές καρδιοπροστασίας ελαττώνουν τις αρρυθμίες, διατηρούν την κοιλιακή λειτουργία και προλαμβάνουν την ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας βελτιώνοντας την κλινική έκβαση [27].

Ο όρος ισχαιμική προστασία (Ischaemic conditioning) χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία ομάδα σχετιζόμενων μεταξύ τους ενδογενών καρδιοπροστατευτικών στρατηγικών, οι οποίες βασίζονται στο να καταστήσουν την καρδιά ανθεκτική στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης υποβάλλοντάς την σε έναν ή περισσότερους σύντομους κύκλους ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Αυτοί οι κύκλοι ισχαιμίας και επαναιμάτωσης μπορούν να προστατέψουν το μυοκάρδιο από το OEM και τη

μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης [10]. Τις 3 τελευταίες δεκαετίες, ένας αριθμός επεμβατικών και φαρμακολογικών καρδιοπροστατευτικών στρατηγικών ανακαλύφθηκε σε πειραματικές μελέτες και αξιολογήθηκε στο κλινικό πλαίσιο OEM και χειρουργικής επέμβασης αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (coronary artery bypass grafting-CABG). Ωστόσο τα αποτελέσματά τους ήταν απογοητευτικά και καμία αποτελεσματική καρδιοπροστατευτική θεραπεία δε χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πράξη. Αν και η κλινική καρδιοπροστατευτική έρευνα είναι απαιτητική και γεμάτη προκλήσεις, οι νέες θεραπείες είναι αναγκαίες λόγω της αυξημένης επίπτωσης καρδιακής ανεπάρκειας σε στεφανιαίους ασθενείς [10].

#### 1.7.1 Ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Preconditioning)

Η εφαρμογή ενός ή περισσότερων σύντομων κύκλων ισχαιμίας και επαναιμάτωσης πριν από την παρατεταμένη ισχαιμία είναι γνωστή ως ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Preconditioning-IPC). Το πρωταρχικό καρδιοπροστατευτικό παράδειγμα IPC καθιερώθηκε από τον Murry και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ανέφεραν ότι 4 κύκλοι διάρκειας 5 λεπτών ισχαιμίας ακολουθούμενοι από 5 λεπτά επαναιμάτωσης πριν από 40 λεπτά παρατεταμένης ισχαιμίας οδήγησε σε μείωση του μεγέθους του εμφράκτου. Ωστόσο, η μεταβολή αυτή δεν σημειώθηκε όταν η ισχαιμία παρατάθηκε για 3 ώρες, υπογραμμίζοντας την ανάγκη έγκαιρης επαναιμάτωσης [26].

Το φαινόμενο της IPC παρατηρείται σε μία σειρά κλινικών περιστατικών στα οποία η καρδιά αυτο-προστατεύεται με βραχεία επεισόδια ισχαιμίας. Ενδεικτικά, η «warm up» στηθάγχη αναφέρεται στο φαινόμενο αυξημένης αντοχής στην άσκηση ακολούθως ενός επεισοδίου στηθάγχης μετά από περίοδο ξεκούρασης [28]. Η προ-εμφραγματική στηθάγχη ορίζεται ως η καρδιοπροστατευτική δράση προηγούμενου επεισοδίου στηθάγχης πριν από OEM με αποτέλεσμα μικρότερο μέγεθος εμφράκτου και βελτιωμένη κλινική έκβαση [7], [10]. Η IPC έχει μεταφρασθεί επιτυχώς σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή νόσο, όμως λόγω της φύσης της (‘προ’-ετοιμασία) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε συγκεκριμένες περιστάσεις, όπως στην αγγειοπλαστική [26].

#### 1.7.2 Μετα-ισχαιμική προστασία (Ischemic Post-conditioning)

Το κυριότερο μειονέκτημα της IPC ως καρδιοπροστατευτική στρατηγική είναι η ανάγκη παρέμβασης πριν την έναρξη του ισχαιμικού επεισοδίου, κάτι το οποίο καθίσταται αδύνατο στην περίπτωση ενός OEM [10]. Η μετα-ισχαιμική προστασία (Ischemic postconditioning -POC) καθιερώθηκε από τον Vinten-Johansen και τους



συνεργάτες του, οι οποίοι ανέφεραν ότι 3 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων επαναιμάτωσης/30 δευτερολέπτων ισχαιμίας αμέσως μετά από 60 λεπτά στεφανιαίας έμφραξης μείωσε το μέγεθος του εμφράκτου σε ποσοστό ισοδύναμο με αυτό της IPC [26]. Επιπροσθέτως, η POC πρόσφερε προστατευτικά οφέλη, μεταξύ των οποίων μικρότερο μυοκαρδιακό οίδημα, περιορισμό του οξειδωτικού στρες και της συσσώρευσης πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων, όπως επίσης και διαφύλαξη της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Ωστόσο, το κατά πόσο η POC εξασθενεί την προσωρινή (stunning) ή τη μόνιμη συσταλτική δυσλειτουργία σε όλο το μυοκάρδιο ή σε περιοχές αυτού παραμένει αμφιλεγόμενο [10].

Όπως και η IPC έτσι και η POC μεταφράστηκε με επιτυχία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και καθώς αποτελεί μία παρέμβαση που εφαρμόζεται αμέσως στην επαναιμάτωση, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς υποβαλλόμενους σε παρεμβατική επαναιμάτωση OEM [26]. Εντούτοις, η καρδιοπροστασία που προσφέρεται από την POC μπορεί να χαθεί παρουσία συννοσηροτήτων (όπως ο διαβήτης, η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία) ή λαμβανόμενης φαρμακοθεραπείας (όπως οι P2Y<sub>12</sub> αναστολείς) ή σε ηλικιωμένους ασθενείς [29], [30].

### 1.7.3 Φαρμακολογική προστασία (Pharmacological Conditioning)

Η υποκείμενη μεταγωγή σήματος της μηχανικά επαγόμενης ενδογενούς καρδιοπροστασίας έχει μελετηθεί εντατικά με σκοπό την ανάπτυξη φαρμακολογικών στρατηγικών προστασίας, οι οποίες δύνανται να μεταφραστούν σε ασθενείς [27]. Η διαλεύκανση των σηματοδοτικών μονοπατιών είχε ως αποτέλεσμα την πρόοδο στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της οξείας βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και την ταυτοποίηση ικανοποιητικού αριθμού μοριακών στόχων υπαγόμενων σε φαρμακολογικό χειρισμό [10]. Αν και η αποτελεσματικότητα των IPC και POC είναι αποδεδειγμένη σε πειραματόζωα, εντούτοις η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση του OEM καθίσταται δυσχερής [10]. Ωστόσο, εάν το προστατευτικό μονοπάτι σηματοδότησης μπορεί να ενεργοποιηθεί ταχέως με χορήγηση ενός φαρμάκου χορηγούμενου στην επαναιμάτωση ή πριν την ισχαιμία, τότε μπορεί να προστατεύσει την καρδιά εγκαίρως από τη βλάβη της επαναιμάτωσης. Οι πρακτικές αυτές είναι γνωστές ως φαρμακολογική προστασία

(pharmacological postconditioning) και φαρμακολογική προετοιμασία (pharmacological preconditioning), αντίστοιχα [30].

#### 1.7.4 Διατροφική Προετοιμασία (Nutritional Preconditioning)

Είναι καθολικά αποδεκτό ότι η διατροφή αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου για την αθηροσκλήρυνση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, γενικότερα και συνδέεται αιτιολογικά με τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων και γλυκόζης, την υπέρταση και την κοιλιακή παχυσαρκία. Δεδομένα που προκύπτουν από ένα προοδευτικά αναπτυσσόμενο σώμα μελετών υποστηρίζουν ότι η υψηλή κατανάλωση τροφών φυτικής προέλευσης, ιδίως φρούτων, λαχανικών, ξηρών καρπών και ολόκληρων σπόρων δημητριακών σχετίζεται με σημαντικά ελαττωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου [31]. Οι προστατευτικές δράσεις αυτών των τροφών πιθανώς μεσολαβούνται μέσω των πολλαπλά ωφέλιμων συστατικών τους, συμπεριλαμβανομένων μονο- και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ω3 λιπαρών οξέων, αντιοξειδωτικών βιταμινών, ιχνοστοιχείων, φυτικών ινών και πρωτεϊνών. Επομένως, καθίσταται σαφές ότι οι διαιτητικές παρεμβάσεις μπορούν να μεταβάλλουν το λιπιδικό προφίλ, την αρτηριακή πίεση του αίματος, το δείκτη μάζας σώματος, την αντίσταση στην ινσουλίνη, το οξειδωτικό στρες και μία πλειάδα φλεγμονωδών δεικτών [31], [32].

Τα «Nutraceuticals» ή αλλιώς λειτουργικά τρόφιμα περιλαμβάνουν οποιοδήποτε τρόφιμο ή συστατικό τροφής που μπορεί να αποδώσει ευεργετικές δράσεις στην υγεία πέρα από την παραδοσιακή του χρήση ως τροφή, εφόσον χορηγείται σε επαρκείς ποσότητες (μεγαλύτερες από τις περιεχόμενες στην τροφή) [18]. Τα Nutraceuticals μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με την πηγή, το μηχανισμό δράσης και τη χημική τους δομή. Μάλιστα, μπορούν να ενσωματωθούν σε διάφορα τρόφιμα και ποτά ή να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής με τη μορφή δισκίου, κάψουλας κ.ο.κ [18], [33]. Θα πρέπει να είναι κλινικά αποδεδειγμένη η αποτελεσματικότητά τους απέναντι σε μία συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση ώστε να συνιστούν πολύτιμο εργαλείο στην πρόληψη και θεραπεία της νόσου. Έχει αναφερθεί ότι συμβάλλουν αποφασιστικά στην πρόληψη ορισμένων από τις σημαντικότερες ασθένειες-προκλήσεις της εποχής μας, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η οστεοπόρωση, ο διαβήτης. Μεταξύ αυτών η υπεροχληστερολαιμία αποτελεί ένα από τα κυριότερους κινδύνους για την υγεία [34].

Πρόσφατα, η διατροφική προετοιμασία (nutritional preconditioning) θεωρήθηκε μία μορφή φαρμακολογικής προετοιμασίας μεσολαβούμενη από τη λήψη nutraceuticals στη διατροφή. Η λήψη αυτή επάγει την προετοιμασία του μυοκαρδίου (preconditioning), περιορίζει την καρδιακή βλάβη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, οδηγώντας σε καρδιοπροστασία. Μάλιστα, η αποτελεσματικότητά της είναι παρόμοια με αυτήν της IPC [35].

### 1.8 Μηχανισμός Δράσης της Καρδιοπροστασίας

Η μεταγωγή σήματος κατά την καρδιοπροστασία διακρίνεται σε τρία επίπεδα:

1. Στο πρώτο επίπεδο, ένας διεγέρτης (trigger) απελευθερώνεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους (καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρικές απολήξεις κλπ) κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (πριν ή μετά από παρατεταμένη μυοκαρδιακή ισχαιμία) δρώντας ως ερέθισμα για την καρδιοπροστασία.
2. Σε δεύτερο επίπεδο, ένας εξαρτώμενος ή ανεξάρτητος από υποδοχέα μεσολαβητής (mediator) ενεργοποιείται από το διεγέρτη και μεταδίδει ενεργά το καρδιοπροστατευτικό σήμα κατά τη διάρκεια υφιστάμενης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης
3. Στο τρίτο επίπεδο, ο τελεστής (effector) είναι ο στόχος της προστατευτικής σηματοδότησης, ο οποίος, όταν ενεργοποιείται κατά την παρατεταμένη ισχαιμία ή κατά την πρόωμη επαναιμάτωση, τελικά εξασθενεί τη μυοκαρδιακή βλάβη [26], [27]

#### 1.8.1 Ερεθίσματα/Διεγέρτες της Καρδιοπροστασίας

##### 1.8.1.1 Δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS)

Οι ελεύθερες ρίζες ή αλλιώς τα δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου (ROS) έχουν ένα διπλό ρόλο στα φαινόμενα της καρδιοπροστασίας: ενώ ο υπέρμετρος σχηματισμός των ROS συμβάλλει σε μη αναστρέψιμη βλάβη, μικρές ποσότητες ROS συνεισφέρουν στην προστασία. Παρατηρείται ότι οι ROS εμφανίζουν το ίδιο παράδοξο καθώς μικρή ποσότητα ROS είναι καρδιοπροστατευτική, ενώ υψηλά επίπεδα ROS επάγουν βλάβη [26], [36].

Τα δραστικά ενδιάμεσα αζώτου (Reactive nitrogen species-RNS), ιδίως το μονοξειδίο του αζώτου (NO), μοιράζονται, επίσης, αυτό το δοσοεξαρτώμενο παράδοξο.

Ειδικότερα, χαμηλές συγκεντρώσεις NO βελτιώνουν την κοιλιακή λειτουργία και την αντιστοίχιση της κατανάλωσης οξυγόνου με τη συσταλτική λειτουργία, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις καταστέλλουν τη συσταλτική λειτουργία [26]. Το NO δεν συντίθεται μόνο από εξειδικευμένα ένζυμα, αλλά παράγεται και μη ενζυματικά κατά την ισχαιμία. Αντιθέτως, το ενδογενές NO, που παράγεται από την ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), δε διεγείρει μόνο αλλά και μεσολαβεί την IPC [37]. Τον τελευταίο καιρό, και άλλα αέρια μόρια πλην του NO έχουν σημειώσει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον για τις καρδιοπροστατευτικές τους δράσεις, όπως το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Και τα δύο μόρια μειώνουν το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής όταν χορηγούνται εξωγενώς [38].

Τα ROS και RNS με τη συμβολή ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από τη διακυλογλυκερόλη (DAG), προκαλούν ενεργοποίηση της PKC και μετατόπισή της στην κυτταρική μεμβράνη, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο τη μνήμη που οδηγεί στην προστασία [36].

#### 1.8.1.1.1 Nrf-2

##### 1.8.1.1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf-2 (nuclear transcription factor erythroid-2 related factor 2) παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, ειδικά κατά την έκθεση των κυττάρων σε κάποιο χημικό ερέθισμα ή στο οξειδωτικό στρες, μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει τη βασική και την επαγόμενη έκφραση πληθώρας αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών και αποτοξινωτικών ενζύμων.

Συμπληρωματικά της δράσης του στην προστασία του κυττάρου, ο Nrf-2 συμμετέχει στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και την απόπτωση. Στο σημείο αυτό να επισημανθεί ότι ο Nrf-2 δεν είναι απαραίτητα ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα που δε βρίσκονται σε κατάσταση στρες και ενεργοποιείται μόνο παρουσία βλάβης ή στρες [39].

Ο Nrf-2, ο οποίος απομονώθηκε το 1994, είναι ένας «basic leucine zipper (bZIP)» μεταγραφικός παράγοντας της cap'n' collar (CNC) οικογένειας, η οποία περιλαμβάνει τους Nrf-1, Nrf-3, Bach1, Bach2, and NF-E2 [40]. Δρα ως μείζονας ρυθμιστής της κυτταρικής αμυντικής απάντησης καθώς αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα ρύθμισης της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων [41] όπως της Mn-υπεροξειδικής

δεσμουτάσης (Mn-SOD), της οξυγενάσης της αίμης 1 (HO-1), της Cu/Zn-υπεροξειδικής δεσμουτάσης (Cu/Zn-SOD), της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της γ- γλουταμυλο-κυστεϊνικής συνθετάσης (γ-GCS) [42]. Στους κατώτερους στόχους του Nrf-2 συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, η NAD(P)H και η κινονο-οξειδοαναγωγή-1 (NQO1) [40]. Πολλές μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η μεσολαβούμενη από τον Nrf-2 γονιδιακή έκφραση προσφέρει προστασία έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαισιμιάτωσης [42] καθώς προφυλάσσει τους καρδιακούς ινοβλάστες και τα μυοκαρδιακά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες ενισχύοντας τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς [43].

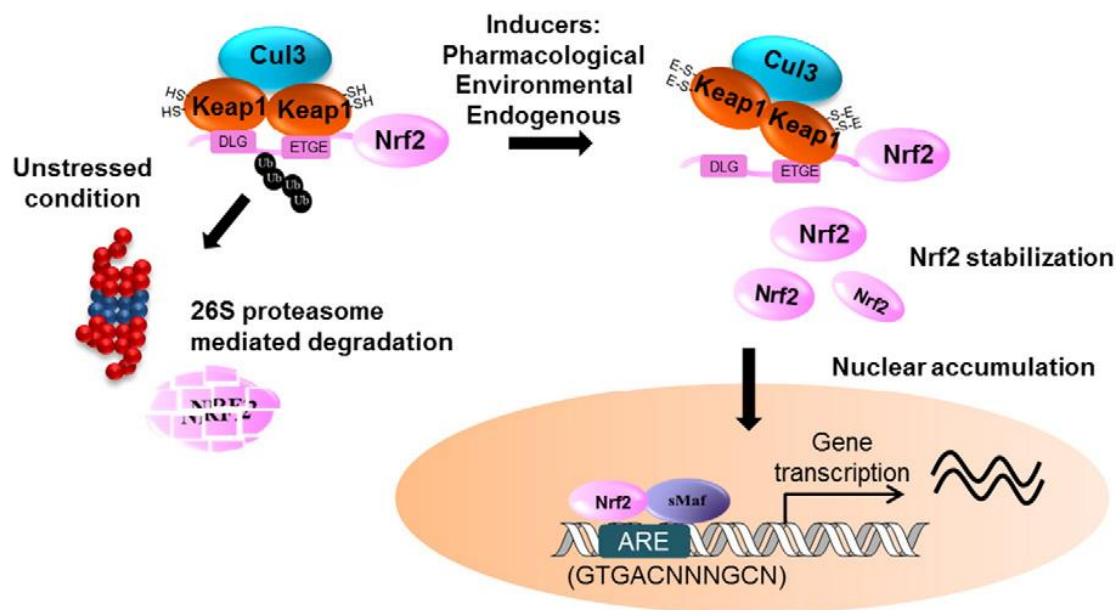
#### 1.8.1.1.2 Αρχές λειτουργίας

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα του Nrf-2 στα κύτταρα παραμένουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα καθώς συνδέεται με τον αρνητικό του ρυθμιστή, τον παράγοντα Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Ο Keap-1 σχηματίζει ένα ομοδιμερές το οποίο συνδεδεμένο με τον Nrf-2, απομονώνει τον τελευταίο στο κυττοσόλιο, εμποδίζοντας τη μεταφορά του στον πυρήνα και καθιστώντας τον με αυτόν τον τρόπο ανενεργό. Επιπροσθέτως, ο Keap-1 διευκολύνει τη μεσολαβούμενη από την κουλίνη 3 (Cul3) πολυουμπικουτινιλίωση του Nrf-2 και οδηγεί τελικά στην πρωτεοσωμική αποικοδόμησή του [39]. Μετά από αυτήν, το ομοδιμερές του Keap-1 αφήνεται ελεύθερο να απομονώσει και να προάγει το νεομεταφρασθέν Nrf-2 για αποικοδόμηση. Ένα μικρό κλάσμα του Nrf-2 αποφεύγει την αποικοδόμηση και μετατοπίζεται στον πυρήνα, διατηρώντας ένα χαμηλό, βασικό επίπεδο γονιδιακής έκφρασης κάτω από φυσιολογικές ομοιοστατικές συνθήκες [44]. Υπό κανονικές συνθήκες, ο χρόνος ημίσειας ζωής του Nrf-2 είναι μόλις 15 λεπτά, κάτι το οποίο περιορίζει την εκτεταμένη ενεργοποίηση και συσσώρευση του Nrf-2 [40].

Όταν το κύτταρο έρχεται αντιμέτωπο με ένα βλαπτικό χημικό ή μηχανικό ερέθισμα ή με το οξειδωτικό στρες, ο Nrf-2 απελευθερώνεται από τον Keap-1. Η απελευθέρωση αυτή μεσολαβείται από μια διαμορφωτική αλλαγή στα ενεργά υπόλοιπα κυστεΐνης που περιέχονται στον αρνητικό ρυθμιστή. Ο Keap-1 περιέχει μεγάλο αριθμό υπολοίπων κυστεΐνης και μάλιστα διπλάσιο σε σχέση με τη μέση πρωτεΐνη. Τα υπόλοιπα κυστεΐνης εντοπίζονται συνήθως στις λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών, είναι ευαίσθητα σε οξειδοαναγωγικές μεταβολές και αποκρίνονται άμεσα

σε αλλαγές του τοπικού περιβάλλοντος λειτουργώντας ως αισθητήρες του Keap-1 έναντι των ηλεκτρονιόφιλων και του οξειδωτικού στρες. Επομένως, ο Nrf-2 αποδεσμεύεται από τον Keap-1, δεν μπορεί πλέον να ουμπικουτινιλιωθεί και να αποκοδομηθεί και είναι πλέον ελεύθερος να μεταφερθεί και να συσσωρευθεί στον πυρήνα. Εκεί, ο Nrf-2 ετεροδιμερίζεται με μικρές Maf πρωτεΐνες (masculoaroneurotic fibrosarcoma proteins), οι οποίες διευκολύνουν την πρόσδεσή του στην αλληλουχία ARE (Antioxidant Response Element) [39], [45]. Το ARE, γνωστό και ως ηλεκτρονιοφιλο-ευαίσθητο στοιχείο (electrophile-responsive element, ErRE), είναι ένα cis-ρυθμιστικό στοιχείο (cis-regulatory element) στον πυρήνα που αντιστέκεται στο οξειδωτικό στρες και υπάρχει στα περισσότερα ζώα. Το ARE εντοπίζεται στην 5' περιοχή ελέγχου/προωθητή (promoter control region) και περιέχει την συντηρημένη αλληλουχία 5'-TGABnnnnGC-3' (στην οποία "B" σημαίνει Κυτοσίνη, Γουανίνη και Θυμίνη και το "n" αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο), το οποίο μπορεί να επάξει πολυάριθμα γονίδια να εκτελέσουν κυτταροπροστατευτικές δράσεις [40]. Έτσι, ενεργοποιείται η έκφραση μιας σειράς γονιδίων υπεύθυνων για την αντιμετώπιση της βλάβης, τα οποία προσφέρουν αυξημένη αντίσταση στο στρες και συμβάλλουν στην επαναφορά του κυττάρου στη βασική του κατάσταση. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που κατηγοριοποιούνται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών ενώσεων φάσης II, μοριακοί chaperones, ένζυμα που επιδιορθώνουν το DNA και πρωτεΐνες της αντιφλεγμονώδους απόκρισης. Ο ρόλος τους είναι η αναγωγή ενεργών ενώσεων, όπως τα ηλεκτρονιόφιλα και οι ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο τοξικά ενδιάμεσα με ταυτόχρονη ενίσχυση της ικανότητας του κυττάρου να επιδιορθώσει όποια βλάβη προκληθεί [39]. Αυτές οι δράσεις πραγματοποιούνται μόνο κατά τη διάρκεια οξείας κατάστασης στρες. Σε παρατεταμένο στρες, ο Nrf-2 μερικώς απενεργοποιείται [46].

Αυτό που γίνεται εμφανές με βάση τον τρόπο λειτουργίας του Nrf-2 είναι ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής του Nrf-2 κατά κάποιο τρόπο καθορίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και κυρίως από την αλληλεπίδρασή του με τον ευαίσθητο σε οξειδοαναγωγικές μεταβολές Keap1 [39]. Ωστόσο, είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής του Nrf-2 στα φυσιολογικά κύτταρα είναι συντομότερος απ' ό,τι στα κύτταρα υπό στρες, προτείνοντας ότι η ενεργοποίηση του Nrf-2 μπορεί να διεγερθεί υπό συνθήκες στρες [40].



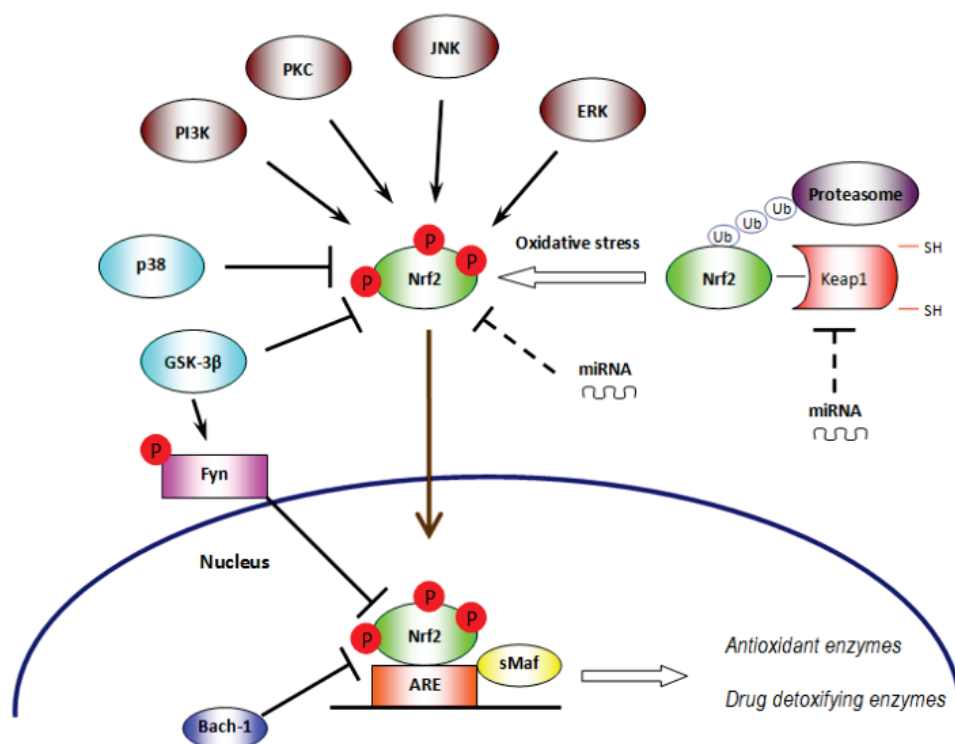
Εικόνα 5: Τρόπος λειτουργίας του Nrf-2 απουσία και παρουσία στρεσογόνων ερεθισμάτων [47]

#### 1.8.1.1.1.3 Ρύθμιση του Nrf-2

Όπως αναφέραμε και πρωτύτερα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Keap-1 είναι αυτός που ρυθμίζει αποκλειστικά τα επίπεδα του Nrf-2 διατηρώντας χαμηλά τα επίπεδά του στο κύτταρο. Ωστόσο παρουσία στρες, η ρύθμιση του Nrf-2 γίνεται πιο πολύπλοκη και εμπλέκει μηχανισμούς εξαρτημένους και ανεξάρτητους από τον Keap-1. Αν και είναι καθολικά αποδεκτό ότι η τροποποίηση (π.χ. χημική απόσπαση, οξείδωση [48], νιτροζυλίωση ή γλουταθειονυλίωση) ενός ή περισσοτέρων υπολοίπων κυστεΐνης στον Keap-1 αντιπροσωπεύει ένα πιθανό χημικο-βιολογικό διεγέρτη για την ενεργοποίηση του Nrf-2, πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια αποκαλύπτουν εναλλακτικούς μηχανισμούς ρύθμισης του Nrf-2, όπως η φωσφορυλίωση του Nrf-2 από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες (PKC, PI3K/Akt, GSK-3β, JNK), η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (p21, καβεολίνη-1) και micro-RNAs [39].

Αρκετές μελέτες προτείνουν ότι η φωσφορυλίωση του Nrf-2 μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητά του [49]–[52]. Από τη μία πλευρά, διαταράσσει την αλληλεπίδραση του Nrf-2 με τον Keap-1 προκαλώντας την αποδέσμευσή του. Από την άλλη πλευρά, φωσφορυλίωση του Nrf-2 ενόσω βρίσκεται στον πυρήνα ενδεχομένως συμβάλλει στην απομάκρυνσή του από αυτόν και στην επακόλουθη αποικοδόμησή του. Ο Nrf-2

περιέχει μεγάλο αριθμό υπολοίπων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης, τα οποία προσφέρουν θέσεις φωσφορυλίωσης από διαφορετικές κινάσες. Έχει αποδειχτεί ότι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) φωσφορυλιώνει τον Nrf-2 στη σερίνη 40, διαταράσσοντας τη σύνδεση μεταξύ του Nrf-2 με τον Keap-1, προωθώντας τη μεταφορά του πρώτου στον πυρήνα, ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες [39]. Η φωσφορυλίωση αυτή μεσολαβείται από διάφορες ισομορφές της PKC μεταξύ των οποίων η PKC- $\delta$  είναι η κυριότερη. Η PKC- $\delta$  είναι η ισομορφή που ενεργοποιείται από το οξειδωτικό στρες κατά την μυοκαρδιακή επαναιμάτωση [48].



Εικόνα 6: Η ρύθμιση του Nrf-2 από τις κινάσες [46]

Η κινάση τυροσίνης Fyn φωσφορυλιώνει και αυτή τον Nrf-2, σε διαφορετική θέση από την PKC, στην τυροσίνη 568, με αποτέλεσμα την εξαγωγή του Nrf-2 από τον πυρήνα και την αποσύνθεσή του. Αποδείχθηκε ότι η φωσφορυλίωση της Fyn σε ένα ή περισσότερα άγνωστα υπόλοιπα Θρεονίνης καταλύεται από την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -GSK-3 $\beta$ ). Η φωσφορυλίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της Fyn στον πυρήνα, όπου τοποθετείται με τρόπο βέλτιστο για να φωσφορυλιώσει τον Nrf-2 προκαλώντας την απομάκρυνσή του από τον πυρήνα, την ουμπικουιτινίωσή του και την αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Η GSK-3 $\beta$  αποτελεί κατώτερο μοριακό



στόχο πολλών καταρρακτών σήματος κινασών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης B, γνωστής και ως Akt και των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (mitogen activated protein kinase -MAPK), η δε ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών αναστέλλει την GSK-3β μέσω φωσφορυλίωσης σε πολλαπλές θέσεις [39]. Η αρνητική ρύθμιση του Nrf-2 από το σύστημα GSK-3β/ Fyn είναι σημαντική για την καταστολή των κατώτερων μοριακών γονιδίων του Nrf-2 τα οποία επάγονται ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες [45]. Εκτός από τη φωσφορυλίωση της Fyn, η GSK-3β μπορεί να φωσφορυλώσει απευθείας και τον Nrf-2 σταθεροποιώντας τον [39]. Με αυτόν τον τρόπο επάγει τη σύνθεση μίας περιοχής «αποικοδόμησης» στον Nrf-2. Η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται από την β-TrCP (πρόκειται για προσαρμογέα λιγάσης της ουμπικουιτίνης-ubiquitin ligase adaptor) με αποτέλεσμα την επισήμανση του Nrf-2 για προτεωσωμική αποικοδόμηση [40]. Με βάση τα παραπάνω, η ταυτοποίηση της GSK-3β ως ένας ρυθμιστής «κλειδί» στη σταθερότητα του Nrf-2 έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον στην πιθανή εμπλοκή της στο σηματοδοτικό μονοπάτι αρκετών ενεργοποιητών του Nrf-2 [45].

Επιπροσθέτως, αρκετά υπόλοιπα σερίνης/θρεονίνης του Nrf-2 έχουν ταυτοποιηθεί ως θέσεις φωσφορυλίωσης από MAP κινάσες. Μάλιστα, αποδείχθηκε ότι η p38 φωσφορυλιώνει τον Nrf-2 και προωθεί τη δέσμευσή του στον Keap-1, εμποδίζοντας την πυρηνική του μετατόπιση. Πρόσφατες μελέτες υπογράμμισαν την εμπλοκή των JNK και ERK στην ενεργοποίηση του Nrf-2. Ενδεικτικά, ο επαγωγέας του Nrf-2 βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA) φαίνεται ότι αυξάνει τη φωσφορυλίωση των ERK  $\frac{1}{2}$  και JNK  $\frac{1}{2}$  ενεργοποιώντας έτσι τον Nrf-2, ο οποίος απελευθερώνεται από τον Keap-1 και μετατοπίζεται στον πυρήνα υπό των έλεγχο των σηματοδοτικών μονοπατιών ERKs και JNKs [39].

#### 1.8.1.1.4 Κατώτεροι μοριακοί στόχοι του Nrf-2

Μεταξύ των πολυάριθμων γονιδίων-στόχων του Nrf-2, ξεχωρίζουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα HO-1 και Mn-SOD καθώς αποτελούν απαραίτητους μεσολαβητές της άμυνας των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [48], [53]

##### 1.8.1.1.4.1 Οξυγενάση της Αίμης 1 (HO-1)

Οι οξυγενάσες της αίμης (HOs) είναι ένζυμα που καταλύουν το περιοριστικό βήμα της οξειδωτικής αποσύνθεσης της κυτταρικής αίμης σε μονοξείδιο του άνθρακα

(CO), χολερυθρίνη και ελεύθερο σίδηρο [54]. Τρεις ισομορφές του ενζύμου έχουν ταυτοποιηθεί: η HO-1, η HO-2 και η HO-3. Αν και οι HO-2 και HO-3 εκφράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση της HO-1 είναι επαγόμενη από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα όπως το οξειδωτικό στρες, η υποξία, οι κυτταροκίνες, τα βαρέα μέταλλα κ.α. [55]. Η HO-1 εκφράζεται στην καρδιά, το ήπαρ, το σπλήνα, το πάγκρεας, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, το έντερο, τους πνεύμονες, το δέρμα, τον προστάτη αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα [56]. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η έκφραση της HO-1 είναι αυξημένη στο μυοκάρδιο μετά την εκδήλωση καρδιακών διαταραχών όπως η καρδιακή ίνωση, η καρδιακή υπερτροφία και το έμφραγμα του μυοκαρδίου [40]. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό μόριο της άμυνας του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες, ενώ τελευταία έμφαση έχει δοθεί στις ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της [54].

Πολλά βιβλιογραφικά στοιχεία συγκλίνουν στο ότι η HO-1 παίζει σημαίνοντα ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής και ιστικής ομοιόστασης σε διάφορα *in vitro* και *in vivo* μοντέλα οξειδωτικής βλάβης [54]. Παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη παραγωγή HO-1 επιφέρει προστασία έναντι του επαγόμενου από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης οξειδωτικού στρες, συμβάλλοντας αποφασιστικά στην αντιμετώπισή του [56]. Τα καταλυτικά παραπροϊόντα του καταβολισμού της αίμης, όπως η χολερυθρίνη και η φερριτίνη (η οποία σχηματίζεται από το σίδηρο που απελευθερώνεται), έχουν προταθεί ότι μεσολαβούν τις προστατευτικές λειτουργίες της HO-1 [54] δρώντας απευθείας στην πρόληψη της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Η αντιοξειδωτική δράση της χολερυθρίνης επαρκεί για τη μείωση των επιπέδων των ROS που παράγονται κατά τη μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και, συνεπώς, προλαμβάνει την κυτταροτοξική δράση που σχετίζεται με την παραγωγή τους [56], [57]. Μάλιστα αποδείχθηκε ότι παρουσία οξειδωτικού στρες η χολερυθρίνη οξειδώνεται από τα ROS αυθόρμητα προς χολοπρασίνη (biliverdin) και μετατρέπεται πάλι σε χολερυθρίνη μέσω της αναγωγάσης της χολοπρασίνης (biliverdin reductase) [58]. Εκτός από την χολερυθρίνη, ένα ακόμα τελικό προϊόν του καταβολισμού της αίμης, το αέριο CO συμβάλλει επίσης στην προστατευτική δράση της HO-1. Το CO μπορεί να προστατέψει μεγάλο αριθμό κυττάρων από την απόπτωση, αναστέλλοντας τις καταστρεπτικές συνέπειες της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [56].

Η έκφραση της HO-1 ενισχύεται από τον άξονα PI3K/Akt, όπως επίσης και από τις ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs), όπως η p38, η JNK και οι ERKs. Εντούτοις, η επαγωγή της έκφρασης της HO-1 από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια ποικίλλει αρκετά και εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και το ερέθισμα [55]. Ολοένα και περισσότερες μελέτες αποκαλύπτουν ότι μία ποικιλία φυτικών εκχυλισμάτων μπορεί να δράσει ως εξωγενής ενεργοποιητής του άξονα Nrf-2/HO-1 για να προστατεύσει το καρδιαγγειακό σύστημα. Ο Nrf-2 ενισχύει την έκφραση της HO-1 ταυτόχρονα με αύξηση των επιπέδων της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) και της υπεροξειδικής δεσμουτάσης (SOD) [40].

#### 1.8.1.1.4.2 Mn-υπεροξειδική δεσμουτάση (Mn-SOD)

Στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των ROS βρίσκεται η εξουδετέρωση των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και η μετατροπή τους σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και τελικά μοριακό οξυγόνο. Η πρώτη αντίδραση καταλύεται από τις υπεροξειδικές δεσμουτάσες (SODs). Υπεύθυνη γι αυτή την ενέργεια στα μιτοχόνδρια είναι η Mn-υπεροξειδική δεσμουτάση (Mn-SOD ή SOD-2) [41]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελεί μείζονα πηγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου, μετατρέποντας ίσως μέχρι και το 5% του μοριακού οξυγόνου σε ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου. Λόγω της υποκυτταρικής της εντόπισης, η Mn-SOD θεωρείται ότι βρίσκεται στην πρώτη γραμμή της άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες [59]. Η υπερέκφραση της Mn-SOD μειώνει τα επίπεδα των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου και βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία παρουσία υπερχοληστερολαιμίας, διαβήτη και υπέρτασης εξαιτίας χαμηλής έκκρισης ρεννίνης [59]. Επιπροσθέτως, η έκφρασή της Mn-SOD ρυθμίζεται, όπως και αυτή της προαναφερθείσας HO-1, από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf-2 [41].

Εκτός από την εξάλειψη της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου, οι SODs έχουν και άλλη μία εξέχουσα λειτουργία. Είναι γνωστό ότι το NO αντιδρά με τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ταχύτατα προς σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους ανιόντος ( $O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^{\cdot-}$ ). Εξαιτίας της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης αυτής, η τοπική συγκέντρωση της SOD είναι καθοριστικής σημασίας για τη βιοενεργότητα και το χρόνο ημίσειας ζωής του NO. Επομένως, η δεύτερη εξέχουσα λειτουργία της SOD είναι η προστασία του NO και της μεσολαβούμενης από αυτό σηματοδότησης [59].

Δεδομένου ότι οι ROS επάγουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα, η επαγωγή της Mn-SOD στην IPC ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι της βλάβης επαναιμάτωσης. Ειδικότερα, έχει σημειωθεί σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της % αύξησης της ενεργότητας της Mn-SOD και της % μείωσης του μεγέθους του εμφράκτου. Το εύρημα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη ενεργότητα της Mn-SOD συμβάλλει στην προστασία έναντι της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης θωρακίζοντας τα μιτοχόνδρια έναντι των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου [60].

#### 1.8.1.1.1.5 Ενεργοποιητές του Nrf-2

Μέχρι στιγμής έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων, τόσο συνθετικών όσο και φυσικών, ως ενεργοποιητές (inducers) του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2. Οι ενεργοποιητές αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη χημική τους δομή σε τουλάχιστον δέκα ομάδες. Από αυτές τις ομάδες τα ισοθειοκυανικά, που αφθονούν στα σταυρανθή λαχανικά, οι οργανοσουλφουρικές ενώσεις που εντοπίζονται στο μπρόκολο, το κρεμμύδι και το σκόρδο, οι πολυφαινόλες του πράσινο τσαγιού και του κουρκουμά και οι ισοφλαβόνες της σόγιας έχουν χαρακτηριστεί ως ισχυροί ενεργοποιητές του Nrf-2 [53]. Η φαρμακολογική ενεργοποίηση του Nrf-2 από τέτοιες ενώσεις έχει προταθεί για χρήση στην πρόληψη μεγάλου αριθμού νοσημάτων σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, οι ενεργοποιητές του Nrf-2 δεν είναι μόνο οργανικής φύσης αλλά και ανόργανης, όπως υδροϋπεροξειδία, ενώσεις του τρισθενούς αρσενικού, μερκαπτάνες και βαρέα μέταλλα [39]. Ορισμένοι ενεργοποιητές του Nrf-2 με αντικαρκινικές χημειοπροφυλακτικές ιδιότητες (δηλαδή μπορούν να αναστείλουν, να επιβραδύνουν ή να αντιστρέψουν την καρκινογένεση), βρίσκονται ήδη σε κλινικές μελέτες για την αξιολόγηση της δράσης τους σε διάφορα είδη καρκίνου [39].

Σε γενικές γραμμές, αυτά τα απαντώμενα στη φύση συστατικά μπορούν να διεγείρουν διάφορους ανώτερους στόχους του Nrf-2, να διακόψουν την αλληλεπίδραση των Keap1-Nrf-2 ή/και να αναστείλουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία οδηγώντας σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του Nrf-2 [53]. Η πλειονότητα των ενεργοποιητών του Nrf-2 είναι ηλεκτρονιόφιλα μόρια ικανά να αντιδράσουν με τις σουλφυδρυδικές ομάδες της κυστεΐνης προς σχηματισμό άμεσων ομοιοπολικών δεσμών με αυτές. Επιπροσθέτως, οι περισσότεροι γνωστοί

ενεργοποιητές του Nrf-2 επάγουν ταυτόχρονα ένα μεγάλο αριθμό μονοπατιών πρωτεϊνικών κινασών, όπως για παράδειγμα η τεταρτοταγής βουτυλο-υδροκινόνη (tBHQ) ενεργοποιεί το μονοπάτι των PI3K/Akt ενώ η βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA) ενεργοποιεί τις MAP κινάσες. Έχει αποδειχτεί ότι η BHA για να ενεργοποιήσει τον Nrf-2, αυξάνει τη φωσφορυλίωση των ERK  $\frac{1}{2}$  και JNK  $\frac{1}{2}$  με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή του από τον Keap-1 και τη μεταφορά του στον πυρήνα. Η διαδικασία αυτή τελεί υπό τον έλεγχο των σηματοδοτικών μονοπατιών των ERKs και JNKs. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών παραμένουν ακατανόητοι καθώς μια τέτοια ενέργεια εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως τα χημικά χαρακτηριστικά του ενεργοποιητή, ο τύπος του κυττάρου εντός του οποίου πραγματοποιούνται όλα αυτά και η αλληλουχία του ARE, συμβάλλοντας περαιτέρω στην πολυπλοκότητα της ρύθμισης του Nrf-2 από τις σηματοδοτικές οδούς που περιγράφηκαν προηγουμένως [39].

Μία ένωση που έχει ταυτοποιηθεί ως ενεργοποιητής του μονοπατιού Nrf-2/ARE με καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης είναι η πολυφαινολική ένωση ρεσβερατρόλη. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση ρεσβερατρόλης 5 λεπτά πριν την επαναιμάτωση περιόρισε τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε επίμυες όπως φαίνεται από τη βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία, τη μείωση της εμφραγματικής περιοχής με ταυτόχρονη μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (μειωμένα επίπεδα MDA) και ενισχυμένη βιοσύνθεση των GSH-PX και SOD. Οι ευεργετικές δράσεις αυτές αποδόθηκαν στην ενεργοποίηση του Nrf-2 από τη ρεσβερατρόλη [43].

#### 1.8.1.2 Αυτακοϊδή

Τα αυτακοϊδή, όπως η αδενοσίνη και η βραδυκινίνη απελευθερώνονται από τα καρδιομυοκύτταρα, το ενδοθήλιο και τα διάμεσα κύτταρα κατά τη διάρκεια των κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της IPC. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς αδενοσίνης A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> και A<sub>3</sub> στο σαρκήλειμμα [26], [27]. Όσον αφορά τον A<sub>2B</sub>, φαίνεται ότι εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, συμμετέχοντας στην καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση, πιθανώς μέσω αναστολής διάνοιξης των MPTP [61]. Επιπροσθέτως, η αδενοσίνη ενεργοποιεί και την PKC απευθείας, ενεργοποιώντας τα μονοπάτια των κινασών διάσωσης της βλάβης επαναιμάτωσης

(Reperfusion Injury Salvage Kinases-RISK) και της eNOS/πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG). Η δράση της αδενοσίνης και της επακόλουθης ενεργοποίησης των RISK συμβαίνει κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης διότι η χορήγηση ανταγωνιστή της αδενοσίνης και αναστολέα των RISK, ακριβώς πριν από την επαναιμάτωση, καταργεί τη μείωση του εμφράκτου από την IPC [26].

Κατά τη διάρκεια των κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της IPC, η διάμεση συγκέντρωση βραδυκινίνης αυξάνεται ταχέως, και ενεργοποιεί τον υποδοχέα βραδυκινίνης υποτύπου 2 στα καρδιομυοκύτταρα, ο οποίος είναι συζευγμένος με Gi πρωτεΐνες και επάγει τα μονοπάτια των eNOS/PKG και RISK. Επίσης, η βραδυκινίνη ενεργοποιεί τη σύνθεση των κυκλοξυγενασών (COX) και των προσταγλανδινών ώστε να περιορίζει την έκταση της εμφραγματικής περιοχής [26], [62].

### 1.8.2 Ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές της καρδιοπροστασίας

#### 1.8.2.1 Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και πρωτεϊνική κινάση G (PKG)

Η eNOS ενεργοποιείται από την Akt, η οποία ενεργοποιείται μετά από ενεργοποίηση υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνη και στη συνέχεια ενεργοποίηση της κινάσης της διφωσφορικής φωφατίδουλοϊνοσιτόλης (PI3K). Το παραγόμενο NO ενεργοποιεί τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (cGC) να σχηματίσει cGMP, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την PKG. Έχει αποδειχτεί ότι η PKG είναι υπεύθυνη για την καρδιοπροστασία τόσο της IPC όσο και της POC. Στόχος της PKG είναι προφανώς ο μιτοχονδριακός εξαρτώμενος από το ATP δίαυλος καλίου και η επακόλουθη παραγωγή ROS. Κατά τη διάρκεια της POC, ο ιονανταλλάκτης  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  αποτελεί έναν ακόμη στόχο της PKG, ενώ η ενεργοποίηση της PKG επιβραδύνει την κανονικοποίηση του pH [26]. Επιπροσθέτως, το NO σηματοδοτεί καρδιοπροστασία όχι μόνο μέσω της PKG, αλλά και μέσω νιτροζυλίωσης. Αυτή η ανεξάρτητη από την PKG ενέργεια του NO λαμβάνει χώρα στην επαναιμάτωση [26], [63]

#### 1.8.2.2 Το μονοπάτι των κινασών διάσωσης (RISK Pathway)

Το μονοπάτι των κινασών διάσωσης, γνωστό ως RISK αναφέρεται στην Akt και τις ERK  $\frac{1}{2}$ , η ενεργοποίηση των οποίων στην επαναιμάτωση μειώνει το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής [30]. Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι έγινε ευρέως γνωστό από τις μελέτες των Hausenloy, Yellon και των συνεργατών τους, οι οποίοι εκτός από την επινόηση του χαρακτηριστικού ονόματος, απέδειξαν την ενεργοποίηση της PI3K,

της Akt και των ERKs στην πρόωμη επαναιμάτωση ως απάντηση σε εξωγενείς καρδιοπροστατευτικούς παράγοντες. Επιπροσθέτως, το RISK μονοπάτι διαδραματίζει καίριο ρόλο στην IPC καθώς συμβάλλει στην ενεργοποίηση της PI3K και των κατώτερων μοριακών στόχων της, δηλαδή της Akt και της GSK-3β. Παράλληλα, η ενεργοποίηση των ERKs από την αδενosίνη και η επακόλουθη τρανς-ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα μετά από τους σύντομους κύκλους ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αποτελούν σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια καρδιοπροστασίας κατά την IPC [26]. Η GSK-3β, η οποία προτάθηκε ως κατώτερος στόχος και σημείο σύγκλισης των κινασών RISK, όταν φωσφορυλιωθεί και κατά συνέπεια ανασταλεί, δρα αναστέλλοντας τη διάνοιξη των MPTP διαύλων [64]. Η αναστολή διάνοιξης των MPTP από τις RISK μπορεί να επιτευχθεί και μέσω φωσφορυλίωσης και αναστολής των προ-αποπτωτικών παραγόντων BAD και Bax, φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της eNOS ή φωσφορυλίωσης και μετατόπισης στα μιτοχόνδρια της PKCε [65].

Βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν την ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ των κινασών του RISK μονοπατιού, Akt και ERK 1/2 καθώς η φαρμακολογική αναστολή μιας κινάσης ενεργοποίησε την άλλη κινάση για να εξασφαλιστεί η μέγιστη προστασία έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [30].

### 1.8.2.3 SAFE Μονοπάτι

Έχει αποδειχθεί ότι ο φλεγμονώδης παράγοντας TNFα παραδόξως ξεκινά την ενεργοποίηση ενός νέου μονοπατιού έναντι της βλάβης επαναιμάτωσης [66]. Το μονοπάτι αυτό πήρε την ονομασία SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement pathway) και έχει την ικανότητα να ελαττώνει επιτυχώς το θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων την ώρα της επαναιμάτωσης, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των RISK. Η IPC και η POC αυξάνουν τα επίπεδα του TNFα, ο οποίος με τη σειρά του προσδένεται στον υποδοχέα του επί της κυτταρικής επιφανείας ενεργοποιώντας την κινάση c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (γνωστή και ως Janus Kinase-JAK). Όταν η JAK ενεργοποιηθεί, ενεργοποιεί, με τη σειρά της, τον STAT-3 από το κυτταρόπλασμα και τον φωσφορυλιώνει σε ένα υπόλοιπο τυροσίνης. Αυτή η φωσφορυλίωση επιτρέπει στον STAT-3 να σχηματίσει ομοδιμερή και να μετατοπιστεί στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει προς τα άνω τη μεταγραφή ποικίλων γονιδίων. Η αλληλεπίδρασή του με το DNA βελτιστοποιείται με μία επιπλέον

φωσφορυλίωση σε ένα υπόλοιπο σερίνης [66]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του STAT-3 δε συμμετέχει μόνο στην αυξορύθμιση των καρδιοπροστατευτικών πρωτεϊνών. Λόγω της εντόπισής του στα μιτοχόνδρια, βελτιώνει τη λειτουργία τους καθώς διατηρεί τη λειτουργικότητα του συμπλέγματος I (complex I) της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [67], ενώ συμμετέχει στην καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση αναστέλλοντας τη διάνοιξη των MPTP [68].

#### 1.8.2.3.1 Αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών RISK και SAFE

Ακολουθως ενός πειραματικός προκληθέντος OEM, το μονοπάτι SAFE ενεργοποιείται μόνο του ή ταυτόχρονα με το μονοπάτι RISK κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης επαναιμάτωσης. Αν και τα δύο αυτά μονοπάτια προστατεύουν το μυοκάρδιο ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, διασταύρωσή τους ενδεχομένως απαντάται στην IPC [66]. Εξάλλου, και τα δύο συγκλίνουν στα μιτοχόνδρια όπου και φαίνεται να μεσολαβούν τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις της IPC μέσω αναστολής της διάνοιξης των MPTP [65], [68].

#### 1.8.2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες

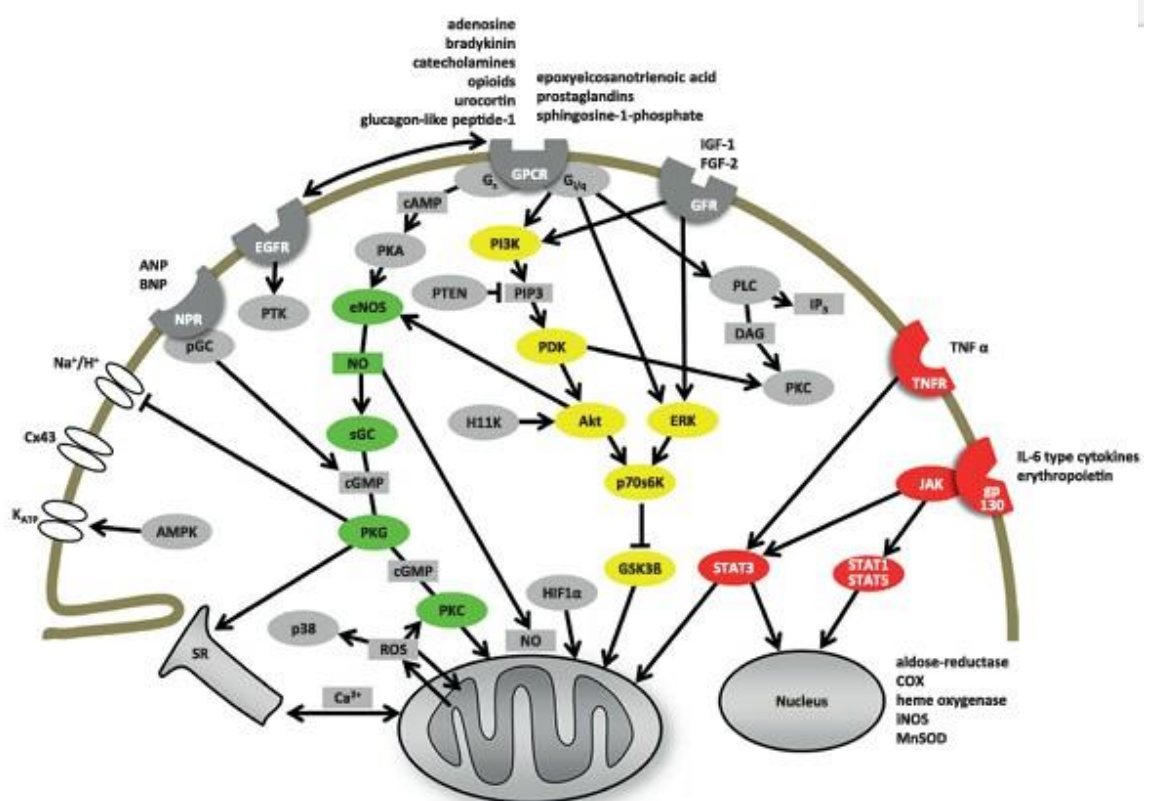
##### 1.8.2.4.1 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) ήταν ο πρώτος κυττοσολικός μεσολαβητής που ταυτοποιήθηκε από τον Downey και τους συνεργάτες του, καθώς απέδειξαν την κατάργηση της παρεχόμενης από την IPC προστασίας με τη χρήση 3 διαφορετικών αναστολέων της PKC [47], [48]. Η ενεργοποίηση της PI3K παράγει τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και ενεργοποιεί, με τη σειρά της, την εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτιδία κινάση, η οποία, ακολούθως, ενεργοποιεί την PKC [26]. Στα τρωκτικά, η ισομορφή PKC $\epsilon$  είναι η πιο σημαντική για την προστασία που παρέχεται από την IPC, και, μάλιστα, η PKC $\epsilon$  μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια μέσω μίας μεταφοράς εξαρτώμενης από πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (heat shock proteins) [71], [72]. Εκεί ενεργοποιεί τους μιτοχονδριακούς εξαρτώμενους από το ATP διαύλους καλίου παράγοντας ROS, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν εκ νέου την PKC $\epsilon$  μέσω θετικής ανατροφοδότησης [73]. Επίσης, η PKC $\epsilon$  μετατοπίζεται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου μειώνει το περιεχόμενό του σε ασβέστιο. Η ενεργοποίηση της PKC, ειδικά της ισομορφής  $\epsilon$ , εμπλέκεται αιτιολογικά και στην POC, όπου πάλι αλληλεπιδρά με τους μιτοχονδριακούς εξαρτώμενους από το ATP διαύλους καλίου και την παραγωγή ROS [26].



### 1.8.2.4.2 Ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases-MAPK)

Ένα μέρος της κυτταρικής απόκρισης στην ισχαιμία/επαναιμάτωση εμπλέκει την ενεργοποίηση διαφόρων μελών της οικογένειας των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινάσων (mitogen activated protein kinase -MAPK). Ο ρόλος της p38 MAPK, της JNK και των ERKs στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, όπως επίσης και στην IPC, αποτέλεσε ερευνητικό αντικείμενο πολλών ομάδων. Τα αποτελέσματα των ερευνών κατέληξαν στο ότι η ενεργοποίηση της p38 MAPK κατά τη διάρκεια των σύντομων κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης δρα ως διεγέρτης της IPC. Ωστόσο, η απενεργοποίησή της σε παρατεταμένη ισχαιμία σχετίζεται με μείωση του εμφράκτου και βελτίωση της κλινικής εικόνας του μυοκαρδίου μεταεμφραγματικά [74], [75]



Εικόνα 7: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που λαμβάνουν χώρα κατά την IPC. Με πράσινο συμβολίζεται το μονοπάτι των eNOS/PKG, με κίτρινο το μονοπάτι RISK και με κόκκινο το SAFE [26]

#### 1.8.2.4.3 Πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και ενεργοποιούμενη από την μονοφωσφορική αδενοσίνη πρωτεϊνική κινάση (AMPK)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η Akt, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και η ενεργοποιούμενη από την μονοφωσφορική αδενοσίνη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) φωσφορυλιώνουν την eNOS στη σερίνη 1177 ενεργοποιώντας την. Αφενός, η ενεργοποίηση της eNOS από την PKA συμμετέχει στην παρεχόμενη από την IPC καρδιοπροστασία, καθώς η αναστολή της PKA καταργεί τη μείωση του εμφράκτου και αντιστρέφει τη μειωμένη απελευθέρωση γαλακτικής δεϋδρογονάσης από την IPC [26], [76]. Αφετέρου, η ενεργοποίηση της AMPK κατά την IPC σχετίζεται με ενεργοποίηση των σαρκηλειμματικών K-ATP διαύλων και βράχυνση της διάρκειας του δυναμικού ενέργειας με αποτέλεσμα την αυξορύθμιση του μεταφορέα της γλυκόζης 4, τη βελτιωμένη πρόσληψη γλυκόζης και τη μείωση της εμφραγματικής περιοχής κατά την IPC [26].

#### 1.8.3 Τελεστές της Καρδιοπροστασίας

##### 1.8.3.1 Μιτοχονδριακός διάυλος διαπερατότητας (Mitochondrial permeability transition pore-MPTP)

Ο μιτοχονδριακός διάυλος διαπερατότητας (MPTP) εντοπίζεται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη και όταν παραμένει ανοιχτός για μεγάλο χρονικό διάστημα, προκαλεί «πρήξιμο» (swelling) της μιτοχονδριακής μήτρας, διάσπαση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον ενδομεμβρανικό χώρο στο κυττοσόλιο, όπου ενεργοποιεί πρωτεολυτικές διαδικασίες και επάγει την έναρξη της κυτταρικής αποσύνθεσης [22], [26].

Παρά τον αρχικό χαρακτηρισμό της μοριακής ταυτότητας του MPTP στα τέλη της δεκαετίας του '70 και τη συνεχιζόμενη έρευνα, η ακριβής δομή του παραμένει ασαφής. Πολλές πρωτεΐνες, όπως η αδενινονουκλεοτιδική τρανσλοκάση (adenine nucleotide translocase -ANT) και ο τάση-εξαρτώμενος ανιοντικός διάυλος (voltage-dependent anion channel-VDAC) προτάθηκαν είτε ως συστατικά του πόρου του MPTP είτε ως ρυθμιστές της διάνοιξης του [22]. Η μιτοχονδριακή κυκλοφυλλίνη D (CypD) επιβεβαιώθηκε ως ένα σημαντικό ρυθμιστικό συστατικό του MPTP, και τελευταία, η υπομονάδα c της συνθέτασης του ATP προτάθηκε ως επιπρόσθετο στοιχείο για το σχηματισμό του πόρου του MPTP στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη [21].

Η διάνοιξη του MPTP ευνοείται από την εκπόλωση της έσω μεμβράνης, τις υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων φωσφορικών και την παρουσία ROS και RNS [26].

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το καρδιοπροστατευτικό σήμα από την IPC μεσολαβεί την ανασταλτική δράση στη διάνοιξη του MPTP κατά την επαναιμάτωση, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Έχει προταθεί ένας αριθμός πιθανών μηχανισμών, οι οποίοι μπορούν να διακριθούν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες. Στην πρώτη, η οποία ορίζεται ως έμμεση αναστολή του MPTP ή παθητικό μονοπάτι, η ισχαιμική προστασία ρυθμίζει παράγοντες όπως την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, τη μιτοχονδριακή συσσώρευση ασβεστίου και φωσφορικών, το οξειδωτικό στρες και αλλαγές του ενδοκυττάρου pH, οι οποίοι είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την ευαισθησία διάνοιξης του MPTP. Αντιθέτως, η δεύτερη κατηγορία, οριζόμενη ως άμεση αναστολή του MPTP ή ενεργητικό μονοπάτι, απαιτεί την ενεργοποίηση από την ισχαιμική προστασία ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο στη συνέχεια ελέγχει την ευαισθησία διάνοιξης του MPTP είτε μέσω αλληλεπίδρασης με τα υποτιθέμενα συστατικά του MPTP, είτε μέσω τροποποίησης των ίδιων παραγόντων που συμμετέχουν στο παθητικό μονοπάτι [21], [22].

Ο μηχανισμός με τον οποίο το RISK μονοπάτι μεσολαβεί την ανασταλτική επίδραση επί του MPTP εμπλέκει πιθανώς την ενεργοποίηση μεσολαβητών όπως της PKG, της GSK-3β ή της εξοκινάσης II (hexokinase II-HKII) [21]. Πιο συγκεκριμένα, προτάθηκε ότι η αναστολή της GSK-3β αναστέλλει τη διάνοιξη του MPTP [26]. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η αναστολή της GSK-3β επιτρέπει την αποφωσφορυλίωση του VDAC, προλαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο την είσοδο των αδενινο-νουκλεοτιδίων στα μιτοχόνδρια, που αναμένονται να διευκολύνουν τη μιτοχονδριακή εκπόλωση, να μειώσουν τη συσσώρευση ασβεστίου στα μιτοχόνδρια και την παραγωγή ROS κατά τη μυοκαρδιακή ισχαιμία εμποδίζοντας το άνοιγμα του MPTP στην επαναιμάτωση. Το κατά πόσο ο μηχανισμός αυτός πραγματικά λειτουργεί στα πλαίσια της IPC και του POC χρήζει διερεύνησης [21].

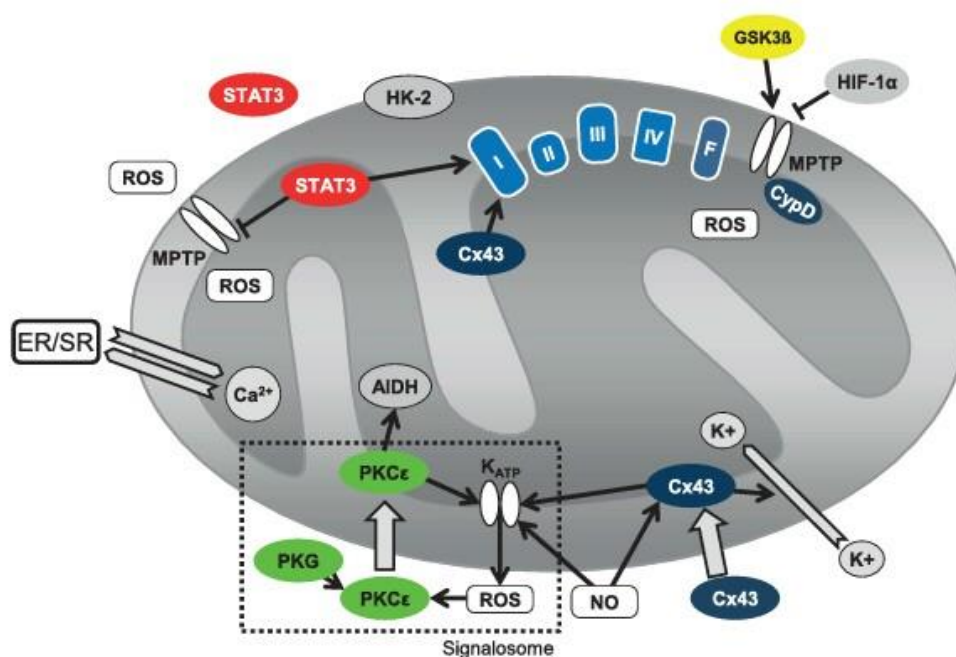
#### 1.8.3.2 ATP εξαρτώμενοι διάυλοι Καλίου

Οι ATP εξαρτώμενοι διάυλοι καλίου (K ATP διάυλοι) εντοπίζονται τόσο στο σαρκήλειμμα όσο και στα μιτοχόνδρια. Οι σαρκηλειμματικοί εξαρτώμενοι από το ATP διάυλοι καλίου συμβάλλουν στην καρδιοπροστασία, ειδικά σε τρωκτικά με υψηλή καρδιακή συχνότητα, όπως οι μύες και οι επίμυες. Εντούτοις, έχει αναφερθεί

ότι οι μιτοχονδριακοί διάυλοι K ATP συμμετέχουν στην καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση. Μάλιστα, αποτελούν στόχο του NO, της PKC και της PKG και καθώς ενεργοποιούνται, απελευθερώνουν ROS, τα οποία ενεργοποιούν την PKCε [26].

### 1.8.3.4 STAT 3

Ο STAT3 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται σε ποικίλες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο μυοκάρδιο. Εντοπίζεται στη μήτρα των υποσαρκολειμματικών και ενδοϊνωδών (interfibrillar) μιτοχονδρίων και η λειτουργία του συνοψίζεται στην αύξηση της αναπνοής μέσω του συμπλέγματος I και την αναστολή σχηματισμού ROS. Αποτελεί βασικό συντελεστή του SAFE μονοπατιού και συμβάλλει καθοριστικά στην καρδιοπροστασία κυρίως μέσω αναστολής της διάνοιξης του MPTP [26], [66], [68]



Εικόνα 8: Οι τελεστές της καρδιοπροστασίας [26]

### 1.9 Φαρμακολογική στόχευση της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης

Η ανακάλυψη και αποσαφήνιση των μονοπατιών σηματοδότησης της καρδιοπροστασίας οδήγησε στην ταυτοποίηση μίας μεγάλης ποικιλίας θεραπευτικών στόχων για φαρμακολογική καρδιοπροστασία. Ωστόσο, η μετάφρασή τους στην κλινική πράξη καθίσταται δυσχερής. Αφενός σε αυτό συνέβαλαν λάθη στο σχεδιασμό

των κλινικών μελετών σχετικά με την επιλογή των ασθενών, τη χρησιμοποιούμενη δόση ή τη χρονική στιγμή επέμβασης. Αφετέρου, πολλοί από τους θεραπευτικούς παράγοντες δεν είχαν μελετηθεί επαρκώς σε ενήλικα ή υπερήλικα πειραματόζωα μεγάλου μεγέθους παρουσία συννοσηροτήτων και δεν είχε εξεταστεί η επίδραση της λαμβανόμενης φαρμακευτικής αγωγής [77].

Θα αναφέρουμε ενδεικτικά παραδείγματα

- ❖ GLP-1 και ανάλογα αυτού: Το Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) είναι μία ορμόνη ινκρετίνης η οποία ρυθμίζει τη γλυκόζη του πλάσματος, και τα τελευταία 10 χρόνια ανάλογά της εισήχθησαν στη θεραπευτική για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Υποδοχείς του GLP-1 έχουν εντοπιστεί και στην καρδιά. Σε πειραματικές μελέτες in vivo και ex vivo, το GLP-1 και τα ανάλογά του έδειξαν προστατευτική δράση απέναντι στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Μεταξύ των καρδιοπροστατευτικών αυτών αναλόγων ξεχωρίζει η εξενατίδη/εξενατίδιο [78]–[80]. Πρόκειται για μία ουσία που μιμείται το ανθρώπινο GLP-1, ενεργοποιεί το συζευγμένο με G πρωτεΐνη υποδοχέα του GLP-1, μεταφέρει ένα προστατευτικό σήμα και μειώνει το μέγεθος του εμφράκτου σε μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε αναισθητοποιημένους χοίρους. Η καρδιοπροστατευτική αυτή δράση αναφέρθηκε πρόσφατα σε ασθενείς με OEM που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική και εμφάνισαν μικρότερο έμφραγμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση εξενατίδης αμέσως πριν την επαναιμάτωση [27].
- ❖ P2Y<sub>12</sub> αναστολείς: Η τικαγρελόρη, ένας ισχυρός P2Y<sub>12</sub> αναστολέας, έχει συσχετισθεί με μειωμένη θνησιμότητα σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Οι ευεργετικές αυτές δράσεις ενδεχομένως δεν οφείλονται μόνο στην αντιαμοπεταλιακή δράση. Προς αυτήν την κατεύθυνση, έχει αποδειχθεί ότι η τικαγρελόρη αυξάνει τα επίπεδα της εξωκυτταρικής αδενosίνης, ενός σημαντικού σηματοδοτικού μορίου στην καρδιοπροστασία. Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα, η ενδοφλέβια χορήγηση κανγρελόρης, ενός ισχυρού και ταχέως δρώντα P2Y<sub>12</sub> αναστολέα, μείωσε το μέγεθος του εμφράκτου σε μύες, επίμυες, κόνικλους και πρωτεύοντα. Η προστασία που παρέχεται από την κανγρελόρη εξαρτάται από την παρουσία των αιμοπεταλίων και μεσολαβείται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια της ισχαιμικής προστασίας. Ωστόσο, η

καρδιοπροστατευτική δράση της κανγγερόρης δεν έχει δοκιμαστεί ακόμα στην κλινική πράξη [30].

- ❖ Μετοπρολόλη: Η ενδοφλέβια έγχυση του ανταγωνιστή των β-αδρενεργικών υποδοχέων μετοπρολόλης αμέσως πριν την επαναιμάτωση σε ασθενείς με OEM υποβαλλόμενους σε αγγειοπλαστική προκάλεσε μείωση του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής, όπως εκτιμήθηκε με μαγνητική τομογραφία. Μάλιστα, τα οφέλη της μετοπρολόλης στην κοιλιακή λειτουργία και την επιβίωση επέμειναν για μακρύ χρονικό διάστημα. Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν το παρατηρούμενο όφελος της μετοπρολόλης απαντάται και σε άλλους β-αποκλειστές και σε ποια συγκεκριμένη ιδιότητα της μετοπρολόλης ή του αποκλεισμού των β αδρενεργικών υποδοχέων, γενικότερα, οφείλεται η προστασία αυτή [27].
- ❖ Κυκλοσπορίνη Α (CsA): Αν και αποδείχθηκε ότι η CsA μειώνει την έκταση της εμφραγματικής περιοχής σε proof-of-concept κλινική μελέτη, δε φαίνεται να βελτιώνει την κλινική έκβαση σε μία επακόλουθη μεγάλη, πολυκεντρική κλινική μελέτη με το όνομα CIRCUS2. Επομένως, το εύρημα αυτό υποδεικνύει την πρόκληση που συνιστά η μετάφραση της καρδιοπροστασίας σε κλινικό όφελος. Το αίτιο για την αποτυχία της CsA να μειώσει το μέγεθος του εμφράκτου και να βελτιώσει την κλινική έκβαση ασθενών με STEMI δεν είναι πλήρως κατανοητό. Από τη μία πλευρά, τα προκλινικά δεδομένα δεν είναι επαρκή καθώς μερικές πειραματικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν την καρδιοπροστατευτική δράση της CsA, όταν χορηγείται στην επαναιμάτωση. Από την άλλη πλευρά, τα κλινικά δεδομένα είναι περιορισμένα με μία μόνο μελέτη να αναφέρει τις ευεργετικές δράσεις της CsA σε ασθενείς με STEMI [10]. Εφόσον η CsA δεν αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα του MPTP και αναστέλλει την καλσινευρίνη και άλλες κυκλοφυλλίνες, χρήζει άμεσης ανάγκης η ανακάλυψη περισσότερο εκλεκτικών αναστολέων του MPTP, ειδικά εάν η αναστολή του MPTP θεωρηθεί θεραπευτική προσέγγιση για την καρδιοπροστασία [22]

## 2.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες και η συμβολή τους στην πρόληψη ασθενειών

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία, η οποία όταν είναι παρούσα σε χαμηλότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή προλαμβάνει σημαντικά την οξείδωσή του [81]. Κάποια απαραίτητα αντιοξειδωτικά

προσλαμβάνονται μέσω της τροφής όπως η βιταμίνη E, το β-καροτένιο και η βιταμίνη C, τα οποία προστατεύουν από τη βλάβη των ROS [82], ενώ πολλά προέρχονται από μόρια απαντώμενα σε φυτά [83].

Τα αντιοξειδωτικά δε μειώνουν μόνο το σχηματισμό των ROS αλλά και μεσολαβούν στη σηματοδότησή τους. Μάλιστα, όταν τα αντιοξειδωτικά δρουν συνδυαστικά, δηλαδή πολλά μαζί, επιφέρουν συνεργιστικά αποτελέσματα με εξέχουσα σημασία για τους οργανισμούς που τα λαμβάνουν. Επομένως, ο κατάλληλος συνδυασμός τους μπορεί να προσφέρει ένα πλήθος ευεργετικών δράσεων, συμβάλλοντας αφενός στην εξουδετέρωση των ROS και αφετέρου στην πρόληψη βλάβης [84]. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην πρόληψη ασθενειών, οι οποίες έχουν κοινό χαρακτηριστικό την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στην παθοφυσιολογία τους, π.χ. αθηροσκλήρυνση, βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, υπέρταση, διαβητική μυοκαρδιοπάθεια και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [85]. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά λειτουργικά τρόφιμα έχει συσχετιστεί με την ισορροπία οξειδωτικού στρες/αντιοξειδωτικής άμυνας βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο τον περιορισμό της οξειδωτικής βλάβης και την εξάλειψη της εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων και νεοπλασιών [18].

## 2.2 Crocus sativus

### 2.2.1 Εισαγωγικά Στοιχεία

Κρόκος ή αλλιώς σαφράν αποκαλούνται τα ξερά στίγματα του φυτού *Crocus sativus*, της οικογένειας Iridaceae. Πρόκειται για ένα πολυετές φυτό εντοπιζόμενο κυρίως στην Ευρώπη και την Ασία και καλλιεργούμενο ευρέως στο Ιράν, τις χώρες της Μεσογείου (ειδικά στο νομό Κοζάνης στην Ελλάδα) και στην Ινδία [86], [87]. Είναι γνωστό ως το ακριβότερο μπαχαρικό στον κόσμο, γεγονός που δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του ως «κόκκινος χρυσός» στο Ιράν [88]. Στην Ευρώπη, η Ισπανία θεωρείται σημαντική πηγή καλλιεργούμενου *Crocus sativus*, αν και η μεγαλύτερη ευρωπαϊκή παραγωγή Κρόκου γίνεται στην Ελλάδα, με 4,5 τόνους ετησίως, έναν αριθμό που ξεπερνά κατά πολύ την εκτιμώμενη παραγωγή της Ισπανίας [89]. Σήμερα, ο Κρόκος χρησιμοποιείται κυρίως για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και περιέχεται σε ποικίλα συμπληρώματα διατροφής. Έχει πικρή γεύση και προσδίδει ένα φωτεινό κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα στο φαγητό. Εξαιτίας της ασυνήθιστης γεύσης και

του χρώματος, χρησιμοποιείται ευρέως ως άρτυμα από την Περσία και την κεντρική Ασία μέχρι την Ινδία και το Μαρόκο. Γλυκίσματα και ποτά συχνά περιέχουν επίσης Κρόκο [90]. Επιπροσθέτως, ο Κρόκος έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, καθώς χρησιμοποιείται ως βαφή ή ως χρωστικός παράγοντας, ως συντηρητικό και ως αντιοξειδωτικό [91] ενώ αποτελεί βασικό συστατικό του οπιούχου βάμματος, λαυδάνου [89].

### 2.2.2 Παραδοσιακή Χρήση

Ήδη από τα αρχαία χρόνια, θεωρήθηκε ότι ο Κρόκος διαθέτει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες καθώς έχει χρησιμοποιηθεί ως κατασταλτικό, ευστόμαχο, τονωτικό και αποχρεμπτικό στην παραδοσιακή ιατρική. Μάλιστα, τα στίγματα του Κρόκου χορηγήθηκαν για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών, όπως η δυσεντερία, η ιλαρά, οι ουρολογικές λοιμώξεις, ο βήχας, οι στομαχικές διαταραχές, το άσθμα, η ηπατική νόσος, οι διαταραχές του εμμηνορρυσιακού κύκλου και τα καρδιαγγειακά νοσήματα [92], [93]. Οι θεραπευτικές ιδιότητες που αποδόθηκαν στον Κρόκο αναφέρονται λεπτομερώς στην *Materia Medica* του Διοσκουρίδη, τον 1<sup>ο</sup> μΧ αιώνα. Πέραν της ευεργετικής για την ανθρώπινη υγεία δράσης, στην Κίνα και την Ινδία ο Κρόκος χρησιμοποιήθηκε για πολλούς αιώνες στην αρωματοποιία, αλλά και ως χρωστική των υφασμάτων [89].

### 2.2.3 Χημική Σύσταση

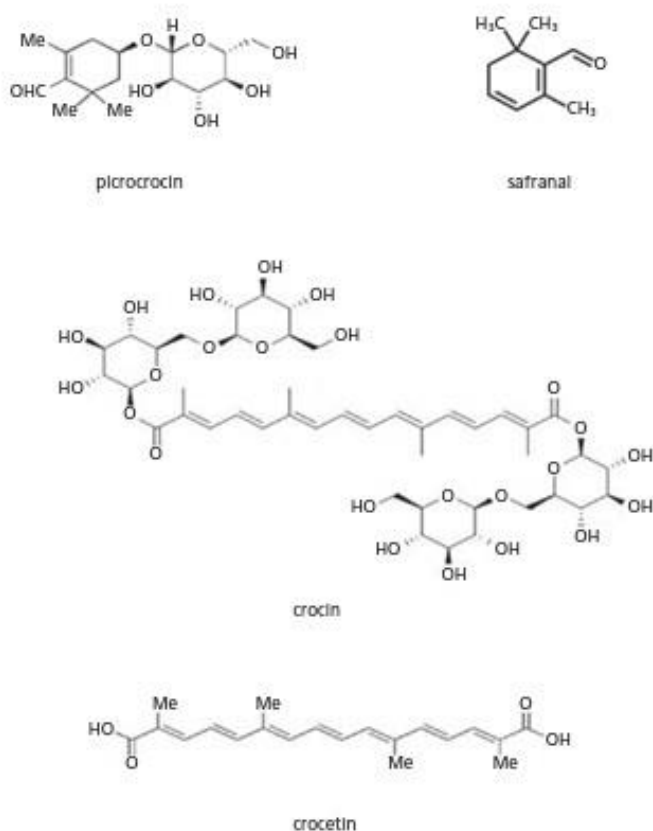
Η βασική σύσταση του Κρόκου είναι 14–16% νερό, 11–13% αζωτούχες ενώσεις, 12–15% σάκχαρα, 41–44% διαλυτό εκχύλισμα, 0.6–0.9% αιθέριο έλαιο, 4–5% ίνες και 4–6% ολική στάχτη. Επίσης, ο Κρόκος περιέχει δύο σημαντικές βιταμίνες: τη ριβοφλαβίνη και τη θειαμίνη, ενώ σε μικρές ποσότητες ευρίσκεται και το β-καροτένιο. Με βάση τα δεδομένα από την ανάλυση των κόκκινων στιγματικών λοβών του άνθους του *Crocus sativus*, το φυτό περιέχει 3 ομάδες κύριων μεταβολιτών:

1. Πικροκροκίνες, οι κυριότερες ουσίες που ευθύνονται για την πικρή γεύση του Κρόκου
2. Σαφρανάλη, στην οποία αποδίδεται το χαρακτηριστικό άρωμα της δρόγης
3. Κροκίνες, τα έγχρωμα παράγωγα του κρόκου, υδατοδιαλυτά καροτενοειδή λόγω του υψηλού γλυκοζυλικού περιεχομένου [89]



### 2.2.3.1 Πικροκροκίνη και Σαφρανάλη

Η Πικροκροκίνη, με μοριακό τύπο  $C_6H_{26}O_7$  είναι μία ένωση με πικρή γεύση παρούσα σε ποσοστό 4% στα στίγματα του φυτού. Πρόκειται για ένα γλυκοσίδη ο οποίος παρουσία οξέος ή αλκάλειως διασπάται σε ένα μόριο γλυκόζης και ένα άγλυκο που ονομάζεται 4-υδροξυ-β-κυκλοσιτράλη. Το άγλυκο, με τη σειρά του, χάνει ένα μόριο νερού και μετατρέπεται εύκολα στο πτητικό συστατικό Σαφρανάλη ή δεϋδρο-β-κυκλοσιτράλη. Η Σαφρανάλη, μία κυκλική τερπενική αλδεΐδη με μοριακό τύπο  $C_{10}H_{14}O$  αντιπροσωπεύει το 70% του πτητικού κλάσματος, είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες και ευθύνεται για το άρωμα του Κρόκου. Ωστόσο τα φρέσκα στίγματα δεν έχουν οσμή. Η χαρακτηριστική οσμή εμφανίζεται κατά τη ξήρανση και αποθήκευση του κρόκου, καθώς η Πικροκροκίνη είναι ανθεκτική στην αποσύνθεση [94].



Εικόνα 9: Τα δραστικά συστατικά του Κρόκου [89]

### 2.2.3.2 Κροκίνη και Κροκετίνη

Η Κροκίνη αποτελεί το σημαντικότερο γλυκοσίδη καροτενοειδών και προσδίδει στον Κρόκο το ιδιαίτερό του χρώμα. Ειδικότερα, πρόκειται για έναν εστέρα διγεντοβιόζης – Κροκετίνης, μοριακού τύπου  $C_{20}H_{24}O_4$ . Το άγλυκο της Κροκίνης, η Κροκετίνη, ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των φυσικών χρωστικών, γνωστών ως καροτενοειδή, αν και στερείται προ-βιταμινικής δράσης. Χαρακτηρίζεται από μία διτερπενική και συμμετρική δομή με 7 διπλούς δεσμούς και 4 μεθυλικές ομάδες. Ο μοριακός της τύπος της Κροκετίνης είναι  $C_{20}H_{24}O_4$  και το μοριακό της βάρος είναι 328,4 g/mol. Κρυσταλλώνεται σε κόκκινες βελόνες με σημείο ζέσεως  $285^{\circ}C$  ενώ σε διάλυμα έχει κίτρινο χρώμα [95]. Λόγω της χημικής της δομής, η Κροκετίνη φημίζεται για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και αποτελεί το πιο μελετημένο συστατικό του Κρόκου [89], [95].

### 2.2.4 Φαρμακολογικές ιδιότητες του Κρόκου και πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές του

Ο Κρόκος και τα συστατικά του φημίζονται για ένα μεγάλο αριθμό πιθανών δράσεων και χρήσεων. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των δραστικών συστατικών του Κρόκου, όπως η Σαφρανάλη, η Κροκίνη και η Κροκετίνη οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη χημική τους δομή [87], [89]. Εντούτοις, οι πιο αξιοσημείωτες δράσεις του Κρόκου έχουν αποδοθεί στην Κροκετίνη. Πρόκειται για μία ουσία ικανή να αυξήσει την ταχύτητα με την οποία το οξυγόνο διαχέεται και μεταφέρεται μέσω του πλάσματος στους ιστούς *in vitro* και *in vivo*, όπως αποδείχθηκε σε μελέτες πνευμονικής υποξίας. Ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος [96], [97]. Αυτή η ιδιότητα θα μπορούσε να καταστήσει την Κροκετίνη χρήσιμο θεραπευτικό εργαλείο για την αντιμετώπιση διαφόρων καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρυνση, η κυψελιδική υποξία, οι αιμορραγίες, η αρθρίτιδα, οι όγκοι κ.ο.κ [89].

Η σύγχρονη ιατρική επανέφερε στο φως τον Κρόκο δίνοντας έμφαση στις θεραπευτικές του δράσεις και τις φαρμακευτικές του εφαρμογές, δεδομένου ότι ο Κρόκος ασκεί, μεταξύ άλλων, αντικαρκινικές και προφυλακτικές των μεταλλάξεων, ανοσοτροποποιητικές και αντιοξειδωτικές δράσεις [87], [98]. Λαμβάνοντας υπόψη την εμπλοκή του οξειδωτικού στρες σε πολλές ασθένειες, αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσίασε ο δυνητικός ρόλος του Κρόκου στη διατροφή ως μέσο αντιμετώπισης μεγάλου εύρους ασθενειών. *In vitro* και *in vivo* μελέτες απέδειξαν ότι ο Κρόκος και

τα συστατικά του λειτουργούν αποτελεσματικά στη θεραπεία παθολογικών καταστάσεων, όπως η κατάθλιψη, το προεμμηνορρυσιακό σύνδρομο, η νόσος Alzheimer, η σχετιζόμενη με την ηλικία εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και η καρδιακή ισχαιμία. Το κατά πόσο τα ευρήματα αυτά μεταφράζονται στην κλινική πράξη, μέχρι στιγμής δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως [99].

#### 2.2.4.1 Επίπτωση του Κρόκου στην αθηροσκλήρυνση και τα λιπίδια του πλάσματος

Έχει βρεθεί ότι η Κροκίνη ελαττώνει την εναπόθεση εστέρων χοληστερόλης στα μακροφάγα και την πρόσληψη από αυτά της οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Ox-LDL), επιβραδύνοντας έτσι το σχηματισμό των αφρωδών κυττάρων, του πρωταρχικού στοιχείου για την έναρξη της αθηρωσκληρυντικής διαδικασίας [89], [100]. Μετρώντας τη συγκέντρωση του κολλαγόνου και της ελαστίνης στις αθηρωματικές πλάκες, η χορήγηση Κρόκου και ειδικά Κροκίνης ενίσχυσε τη σταθερότητα της πλάκας και εξασθένησε τον κίνδυνο ρήξης αυτής [89].

Παρόλα αυτά, τα κλινικά δεδομένα απουσιάζουν για αυτό και χρήζει επιτακτικής ανάγκης η διεξαγωγή καλά ελεγχόμενων κλινικών μελετών με ικανοποιητικό αριθμό ασθενών [89].

#### 2.2.4.2 Καρδιοπροστασία και Περιορισμός του εμφράκτου από τον Κρόκο

Όπως αναφέρθηκε, βασικός στόχος της καρδιοπροστασίας είναι ο περιορισμός της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής [11]. Τα τελευταία χρόνια, ο Κρόκος και τα συστατικά του έχουν προσελκύσει τον ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, όσον αφορά τις επιδράσεις τους στο καρδιαγγειακό σύστημα και ιδιαίτερα στην ισχαιμική καρδιακή νόσο [89], [101]. Οι περισσότερες μελέτες που εξέταζαν τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη του κρόκου, αφορούσαν τις περισσότερες φορές καρδιακή υπερτροφία προκαλούμενη από νορεπινεφρίνη [102] ή ισοπροτερενόλη [16], [85], [103], ισχαιμία/επαναιμάτωση προκαλούμενη μηχανικά, φράσσοντας τον πρόσθιο κατιόντα κλάδο της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας [84], [101], [104] ή καρδιοτοξικότητα οφειλούμενη στη Δοξορουβικίνη μαζί με μηχανική πρόκληση OEM [105]–[107]. Η πλειονότητα των μελετών αυτών απέδιδε τις ευεργετικές δράσεις του Κρόκου και των συστατικών του στην αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική του δράση [98].

Αρχικά, αποδείχτηκε ότι η χορήγηση Κροκετίνης σε δόση 25 ή 50 mg/kg/ημέρα για 14 ημέρες παρουσία καρδιακής υπερτροφίας από Νορεπινεφρίνη σε επίμυες, βελτίωσε σημαντικά τις ιστολογικές βλάβες και τις αλλοιώσεις στο μυοκάρδιο, εξαλείφοντας το οίδημα και την απώλεια μυοκαρδιακών ινιδίων. Οι δράσεις αυτές ήταν μάλιστα δόσοεξαρτώμενες [102]. Τα ευρήματα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε ex-vivo σε μυοκάρδιο ινδικών χοιριδίων με υδατοαιθανολικό εκχύλισμα Κρόκου και Διλτιαζέμη έδειξαν ότι ο Κρόκος ασκεί ανασταλτική δράση στους διαύλους ασβεστίου ή/και κάποια άλλη επιπρόσθετη δράση, όπως αντανακλάται στη δόσοεξαρτώμενη μείωση της καρδιακής συχνότητας και της συσταλτικότητας [108].

Σε επίμυες, η χορήγηση Κροκίνης σε 3 δόσεις (5, 10 και 20 mg/kg/ημέρα) για 21 ημέρες μαζί με Ισοπροτερενόλη (μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα καταλήγοντας σε μία κατάσταση που μοιάζει στο έμφραγμα του μυοκαρδίου) εξάλειψε δόσοεξαρτώμενα την προκαλούμενη από την Ισοπροτερενόλη αριστερή κοιλιακή συστολική και διαστολική δυσλειτουργία, περιόρισε τη μυοκαρδιακή νέκρωση, συνέβαλε στην προστασία της ακεραιότητας της μυοκαρδιακής μεμβράνης και διατήρησε τη φυσιολογική μορφολογία των μυοκαρδιακών κυττάρων [16].

Εκτός από την Κροκίνη, αποδείχθηκε ότι και ο Κρόκος, συνολικά, ασκεί προστατευτική δράση έναντι της Ισοπροτερενόλης σε επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε διάλυμα Κρόκου σε δόση ισοδύναμη με 100 mg/kg ξηρού βάρους στίγματος. Οι καρδιοπροστατευτικές δράσεις οφείλονται αφενός σε αρνητική χρονότροπο και ινότροπο δράση υπό στρεσογόνες καταστάσεις (λόγω της ανασταλτικής δράσης επί των διαύλων ασβεστίου) και αφετέρου σε σταθεροποίηση και ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας [103]. Η προστασία του μυοκαρδίου από την τοξικότητα της Ισοπροτερενόλης επιβεβαιώθηκε με τη χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου (20, 40, 80 και 160 mg/kg IP) ή Σαφρανάλης (0.025, 0.050, 0.075 ml/kg IP) καθώς περιορίστηκαν η μυοκαρδιακή και λειτουργική βλάβη (μειωμένα επίπεδα LDH και CK-MB σε ορό) [109].

Η πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση της Σαφρανάλης αξιολογήθηκε σε επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε σε δόση 0.1–0.5 mL/kg/ημέρα, i.p για 14 ημέρες ενώ τη 15<sup>η</sup> μέρα προκλήθηκε χειρουργικά OEM. Η Σαφρανάλη μείωσε σημαντικά την έκταση της εμφραγματικής περιοχής, βελτίωσε την ευρύτερη αιμοδυναμική

κατάσταση της καρδιάς ενώ περιορίσε το οίδημα και τη φλεγμονή. Επομένως, η Σαφρανάλη ασκεί διατροφική προετοιμασία αναστέλοντας το μονοπάτι IKKb/NF-κB και φωσφορυλιώνοντας τις Akt, GSK-3β και eNOS. Η αύξηση της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και η μείωση της έκφρασης της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και της κασπάσης 3 σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα του TNF-α έδειξαν ότι στην καρδιοπροστασία της Σαφρανάλης συμβάλλουν η ισχυρή αντιαποπτωτική και αντιφλεγμονώδης της δράση [101].

Το ίδιο έτος πραγματοποιήθηκε η πρώτη μελέτη καθορισμού της δόσης με την οποία επιτυγχάνονται τα μέγιστα καρδιοπροστατευτικά οφέλη του εκχυλίσματος Κρόκου. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με την χορηγηθείσα δόση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου (200, 400 και 800 mg/kg) και προκλήθηκε ισχαιμία χημικά με τη χρήση Ισοπροτερενόλης. Οι καρδιοπροστατευτικές δράσεις του Κρόκου ήταν εμφανείς και στις 3 δόσεις, ωστόσο στη μεσαία δόση των 400 mg/kg παρατηρήθηκαν τα βέλτιστα αποτελέσματα καθώς το μυοκάρδιο εμφάνισε μία σχεδόν φυσιολογική εικόνα χωρίς οίδημα, νέκρωση και φλεγμονώδη διήθηση των κυττάρων [85]. Οι καρδιοπροστατευτικές δράσεις της Κροκίνης (10, 20 και 40 mg/kg) εξετάστηκαν παράλληλα με αυτές της Βιταμίνης E (100 mg/kg) σε ex-vivo μοντέλο με χρήση της συσκευής Langendorff. Η Κροκίνη, όπως και η Βιταμίνη E, συνέβαλε στην προστασία του μυοκαρδίου από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αποκαθιστώντας τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό και εμποδίζοντας τη μυοκαρδιακή βλάβη από τα ROS [84]. Η καρδιοπροστατευτική δράση της Κροκίνης μεσολαβείται από το NO όπως διαπιστώθηκε σε ex vivo μοντέλο απομονωμένης καρδιάς μυών. Η Κροκίνη χορηγούμενη σε δόση 40 mg/kg αυξάνει την έκφραση της eNOS και παράλληλα μειώνει την έκφραση της iNOS [110]. Η χορήγηση Κροκετίνης (50mg/kg/day, i.g) σε επίμυες για 7 μέρες φαίνεται ότι λειτουργεί καρδιοπροστατευτικά έναντι της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης καθώς μείωσε το λόγο I/R, τα επίπεδα CK-MB στον ορό ενώ ταυτόχρονα συνέβαλε στην εξάλειψη του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής και της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η Κροκετίνη ασκεί αυτές τις δράσεις περιλαμβάνει τη μείωση των επιπέδων του TNF-α και της έκφρασης της Bax, την αύξηση της έκφρασης των Bcl-2 και eNOS, την αυξημένη παραγωγή NO [104].

Μεγάλος αριθμός μελετών εξέτασε τα πιθανά προστατευτικά οφέλη του Κρόκου έναντι της καρδιοτοξικότητας από Δοξορουβικίνη, η οποία αποτελεί αντικαρκινικό

φάρμακο και είναι ιδιαίτερα τοξική για την καρδιά. Η χρόνια τοξικότητά της έχει μελετηθεί εκτενώς και σχετίζεται με την εμφάνιση διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας με τυπικά χαρακτηριστικά καρδιακής ανεπάρκειας [111]. Η έγχυση υδατομεθανολικού εκχυλίσματος Κρόκου (10 mg/ml) 1 λεπτό πριν και κατά τη διάρκεια ηλεκτρόλυσης σε απομονωμένη καρδιά κόνικλου προστάτευσε το μυοκάρδιο από την οξειδωτική βλάβη, ωστόσο όταν χορηγήθηκε πριν ή συγχρόνως με τη Δοξορουβικίνη προσέφερε μερική προστασία [105]. Στη συνέχεια, μελετήθηκε οξέως η χορήγηση εκχυλίσματος Κρόκου 5 λεπτά πριν την ισχαιμία ή στην επαναιμάτωση με ή χωρίς Δοξορουβικίνη στο ίδιο πειραματικό *ex vivo* μοντέλο. Το εκχύλισμα ήταν περισσότερο αποτελεσματικό όταν χορηγήθηκε στην επαναιμάτωση καθώς προκάλεσε μείωση της έκτασης της οξειδωτικής βλάβης και βελτίωση της συσταλτικότητας με αναστολή του μονοπατιού της p38 MAPK κινάσης και ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt/mTOR/4EBP1 [106]. Οι καρδιοπροστατευτικές δράσεις του Κρόκου έναντι της τοξικότητας από τη Δοξορουβικίνη επαληθεύτηκαν και *in vitro* [107]. Η χορήγηση Κροκίνης χρονίως (10 και 20 mg/kg) για 3 εβδομάδες σε επίμυες μαζί με Δοξορουβικίνη (3.5 mg/kg δυο φορές εβδομαδιαίως) οδήγησε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση της καρδιοτοξικότητας όπως φαίνεται από τη βελτίωση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, την αποκατάσταση της αρχιτεκτονικής των μυοκαρδιακών κυττάρων και τη μείωση των επιπέδων της Τροπονίνη T, της LDH και της CK-MB στον ορό [112].

Η πιο πρόσφατη μελέτη που εξέταζε τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη του Κρόκου πραγματοποιήθηκε *ex vivo* σε καρδιές από κόνικλους. Το εκχύλισμα χορηγήθηκε στα πειραματόζωα μέσω του νερού για 6 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε ότι ο Κρόκος αποκατέστησε τη μυοκαρδιακή λειτουργία μετά την ισχαιμία/επαναιμάτωση, περιόρισε την έκταση της εμφραγματικής περιοχής και επανέφερε την έκφραση των συσταλτικών πρωτεϊνών Τροπονίνη C και  $\alpha$ -Ακτίνη σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα. Επιπροσθέτως, αποκατέστησε τη φωσφορυλίωση των Akt, 4EBP1 και p38 [113].

### 3. Ενδοθηλιακή Δυσλειτουργία και πειραματικό ζωικό μοντέλο προσομείωσης αυτής

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία εκδηλώνεται με ελαττωμένη την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοχάλαση, αποτελεί έναν ευρύτατα καθιερωμένο δείκτη της αθηροσκλήρυνσης, της υπέρτασης και των καρδιαγγειακών συμβαμάτων [114]. Η διαταραχή στην παραγωγή και σηματοδότηση του NO είναι το κυριότερο

χαρακτηριστικό της δυσλειτουργίας αυτής [115]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το παραγόμενο NO από το ενδοθήλιο, διαχέεται στους παρακείμενους λείους μυες των αγγείων προκαλώντας αγγειοχάλαση και δρώντας ως ένας εξισορροπιστικός παράγοντας που αντιτίθεται στο μέγεθος της αγγειοσυσπαστικής απόκρισης. Στην περίπτωση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται προς όφελος της αγγειοσύσπασης [115].

Η Απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), στον άνθρωπο, παράγεται στα ηπατοκύτταρα και κυκλοφορεί ως συστατικό επιφανείας της πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (vLDL) και της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (HDL), ρυθμίζοντας το συστηματικό μεταβολισμό αυτών των μορίων. Επιπροσθέτως, η ApoE παράγεται σε υψηλές ποσότητες και στους εξωηπατικούς ιστούς, παραδείγματος χάριν από μακροφάγα και λιπώδη κύτταρα. Στον άνθρωπο, η παραγόμενη από τα μακροφάγα ApoE παίζει σημαντικό ρόλο στο αγγειακό τοίχωμα καθώς συμβάλλει στην προστασία του από την αθηροσκλήρυνση [114].

Οι μύες που δεν εκφράζουν την απολιποπρωτεΐνη E (apolipoprotein E knockout-apoE KO-ApoE<sup>(-/-)</sup>) ως πειραματικό μοντέλο ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αθηροσκλήρυνσης αναπτύχθηκαν πριν δύο δεκαετίες. Έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσουν αθηροσκλήρυνση με αυθόρμητο και αναπαραγωγίμο τρόπο, παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται στον άνθρωπο. Επομένως, οι ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες καθίστανται ένα εξαιρετικά χρήσιμο μοντέλο καθώς προσφέρουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να αξιολογήσουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης και να αναπτύξουν νέες θεραπείες για την αντιμετώπισή της [116].

#### 4.Σκοπός

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο ρόλος της διατροφής στην ανάπτυξη και επίπτωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι εκτεταμένα μελετημένος και τεκμηριωμένος [32] και ότι η ισχαιμική καρδιακή νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και νοσηρότητας στον αναπτυγμένο κόσμο [4], γίνεται αντιληπτή η χρησιμότητα των Nutraceuticals στην πρόληψη και την αντιμετώπιση σε πρώιμο στάδιο των διαταραχών αυτών. Οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες του Κρόκου και των δραστικών του συστατικών, έχουν μελετηθεί σε μοντέλα in vivo αλλά και ex vivo. Ωστόσο, η πλειονότητα των μελετών αυτών εξετάζει τη δράση των μεμονωμένων συστατικών αντί του ολικού εκχυλίσματος. Επιπροσθέτως, οι μελέτες αυτές

πραγματοποιήθηκαν ως επί το πλείστον σε υγιή πειραματόζωα χωρίς να λαμβάνουν υπόψιν τους την ύπαρξη συννοσηροτήτων, όπως η αθηροσκλήρυνση, ο διαβήτης κλπ. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μελετήσουμε τη δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου στη μείωση του εμφράγματος τόσο σε υγιές μυοκάρδιο όσο και παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η τελευταία αποτελεί σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό των ασθενών με αθηροσκλήρυνση και OEM. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες, δηλαδή μύες που δεν εκφράζουν την Απολιποπρωτεΐνη E. Ακολούθως επιδιώχθηκε η διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται η καρδιοπροστασία στους υγιείς και τους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες εξετάζοντας εάν το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μπορεί να επάγει διατροφική προετοιμασία.



## Ειδικό μέρος

## 1. Παρασκευή και ποσοτικοποίηση εκχυλίσματος από τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* L., Iridaceae

Η παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος από τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ποσοτικοποίηση του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής και το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών προϊόντων του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

## 2. Πειραματόζωα

Τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα είναι αρσενικοί C57BL/6J μύες και ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες οι οποίοι διαβιούν σε καθαρό, σωστά αεριζόμενο και κλιματιζόμενο χώρο, επιβλεπόμενοι από εξειδικευμένο, επιστημονικό προσωπικό.

Η μεθοδολογία, που ακολουθείται είναι πλήρως εναρμονισμένη με:

1. Την οδηγία 86/609 της Ευρωπαϊκής Ένωσης
2. Το προεδρικό διάταγμα 160/91 (ΦΕΚ τεύχος 10, φύλλο 64/91)
3. Το νόμο 2015/92, ο οποίος επικυρώνει την ευρωπαϊκή σύμβαση για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων, που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς και επιπλέον συμβαδίζει με τις «Αρχές για τη διαχείριση των πειραματόζωων», που δημιουργήθηκαν από τη National Society for Medical Research και την «Οδηγία για την προστασία και χρήση των πειραματόζωων» του Ινστιτούτου Ερευνών Πειραματόζωων του Εθνικού Συμβουλίου Ερευνών .

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματοζώων και στο κέντρο πειραματικής χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών με αριθμό αδείας EL 25 BIO 03. Τα πειραματικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έλαβαν έγκριση από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και τις Κτηνιατρικές αρχές της Αυτοδιοίκησης Αθηνών.

Στην εν λόγω μελέτη, επιλέχθηκαν ως πειραματόζωα οι μύες λόγω της πληθώρας πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν: χαμηλό κόστος αγοράς και συντήρησης, ευκολία στην ανατροφή, μικρό προσδόκιμο επιβίωσης και μεγάλος αριθμός

απογόνων. Επιπροσθέτως το μικρό τους μέγεθος διευκολύνει τη γενετική τροποποίηση [117], [118]. Οι μύες έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης και υπερέχουν έναντι άλλων πειραματοζώων καθώς οι προκαλούμενες από την ισχαιμία και την επαναιμάτωση αρρυθμίες είναι λιγότερο συχνές και αυτοπεριοριζόμενες [119], [120]

## 2.1. Πειραματική Διαδικασία

### 2.1.1 Μοντέλο Πρόκλησης Ισχαιμίας-Επαναιμάτωσης σε μύες

Για την μελέτη της επίδρασης του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου επί του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου χρησιμοποιήθηκαν 24 αρσενικοί C57BL/6J μύες ηλικίας 20 εβδομάδων και 19 αρσενικοί ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες ηλικίας 20 εβδομάδων. Μετά το πέρας των 4 εβδομάδων τα ζώα ζυγίστηκαν και προετοιμάστηκαν για τη χειρουργική επέμβαση πρόκλησης εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Αρχικά, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ( $0.01 \text{ mL kg}^{-1}$ ) ενός συνδυασμού κεταμίνης, ξυλαζίνης και ατροπίνης ( $100, 20, \text{ and } 0.6 \text{ mg kg}^{-1}$ , αντίστοιχα). Ακολούθησε τραχειοστομία, ώστε τα ζώα να οξυγονώνονται μηχανικά με οξυγόνο 95% με τη βοήθεια αναπνευστήρα. Ο αναπνεόμενος όγκος ορίστηκε στα  $0,2 \text{ mL}$  και ο ρυθμός αναπνοής προσαρμόστηκε έτσι ώστε το pH του αίματος και τα αέρια των αρτηριών τους να διατηρούνται σε φυσιολογικά επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της επέμβασης. Η καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος επετεύχθη με τη συσκευή LEAD 1 ECG με το λογισμικό PowerLab 4.0 (ADInstruments, UK). Οι καταγραφές αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού LabChart 8.0.

Ακολούθως, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε αριστερή πλάγια ανάκλιση και ο θώρακας διενόχθη χειρουργικά με αριστερή θωρακοτομή μέσω του αριστερού 4<sup>ου</sup> μεσοπλευρίου διαστήματος. Το μυοκάρδιο αποκαλύφθηκε και το περικάρδιο διαρρήχθηκε. Με τη βοήθεια χειρουργικού ράμματος 6-0 μεταξίου έγινε περίδεση του πρόσθιου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Η έμφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας σε αυτό το τμήμα κανονικά οδηγεί σε ισχαιμία μεγάλης περιοχής του αριστερού κοιλιακού τοιχώματος στην κορυφή και προσθιοπλάγια. Η τμηματική ισχαιμία επετεύχθη με τη βοήθεια δακτυλίου από πολυαιθυλένιο, ο οποίος διαπερνάται, κλείνοντας το ράμμα, ενώ η περίσφιξη της αρτηρίας έγινε με τη βοήθεια λαβίδας. Η ισχαιμία επιβεβαιώθηκε με αλλαγή του χρώματος του μυοκαρδίου σε

κυανό και διατηρήθηκε για 30 λεπτά. Ελευθερώνοντας την περίσφιξη της αρτηρίας με το άνοιγμα της λαβίδας και την ελευθέρωση του ράμματος, επετεύχθη επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου για 2 ώρες. Για να εκτιμήσουμε το βαθμό της μη αναστρέψιμης μυοκαρδιακής βλάβης, δηλαδή το μέγεθος του εμφράκτου που προκλήθηκε από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης με και χωρίς τη θεραπεία υπό εξέταση, υπολογίστηκαν οι εμφραγματικές περιοχές. Για αυτό το λόγο, μετά το πέρας της επαναιμάτωσης, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του καρδιακού ιστού και καθετηριασμός της αορτής. Ακολούθησε καλή έκπλυση με φυσιολογικό ορό διαμέσου της αορτής έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλο το αίμα [121]

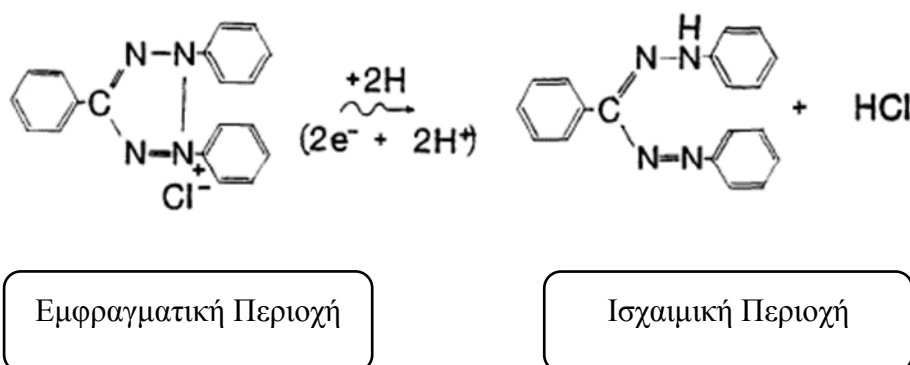
### 2.1.2 Ισχαιμική περιοχή και υπολογισμός εμφραγματικής έκτασης στο μυοκάρδιο

Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία επαναφράσσεται και ακολουθεί ειδική χρώση με Evans Blue που έχει τη δυνατότητα και χρωματίζει κυανό το τμήμα του μυοκαρδίου, το οποίο αιματώνονταν κανονικά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι ιστοί καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  και μετά το πέρας 24 ωρών τεμαχίστηκαν σε τομές πάχους 3 mm με τη βοήθεια νυστεριού.



Εικόνα 10: Χειρουργική διαδικασία πρόκλησης οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου σε μύες: A. Ακινητοποίηση και μηχανικός αερισμός, B-D: Θωρακοτομή και αποκάλυψη του μυοκαρδίου, E: Διάρρηξη του περικαρδίου, F-J: Περίσφιξη πρόσθιου κατίοντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, K-L: Απελευθέρωση της περίσφιξης και επαναιμάτωση

Οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα 1% τριφαινυλο-τετραζόλιο χλωριδίου (TTC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 για 20 min στους 37°C. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο έχει τη δυνατότητα να αντιδρά με τα ένζυμα νικοτιναμιδικής αδενυλικής διουκλεοτιδάσης και δεϋδρογενάσης και εναποτίθεται στους ζώντες ιστούς σαν κόκκινο χρώμα, ενώ στους ιστούς οι νεκρωτικές περιοχές παραμένουν λευκές.



Για τη μέτρηση των ορίων μεταξύ της ισχαιμικής, της εμφραγματικής και της υγιούς περιοχής χρειάστηκε η λήψη φωτογραφιών των τμημάτων του καρδιακού ιστού με τη χρήση στερεοσκοπίου. Ακολούθησε επεξεργασία των φωτογραφιών με το λογισμικό Adobe Photoshop 6.0 και πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες μετρήσεις με τη βοήθεια του προγράμματος Image J. Για κάθε καρδιά υπολογίστηκε το συνολικό μέγεθος της ολικής (All ή A), της ισχαιμικής (Area at Risk ή Risk ή R) και της εμφραγματικής περιοχής μετά από μετατροπή σε όγκους, εκφρασμένους σε  $\text{cm}^3$ . Η ισχαιμική περιοχή εκφράστηκε ως ποσοστό της ολικής περιοχής (R/A %) και η εμφραγματική ως ποσοστό της ισχαιμικής (I/R %) [121].

## 2.2. Πειραματικό Πρωτόκολλο

### 2.2.1 1<sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων

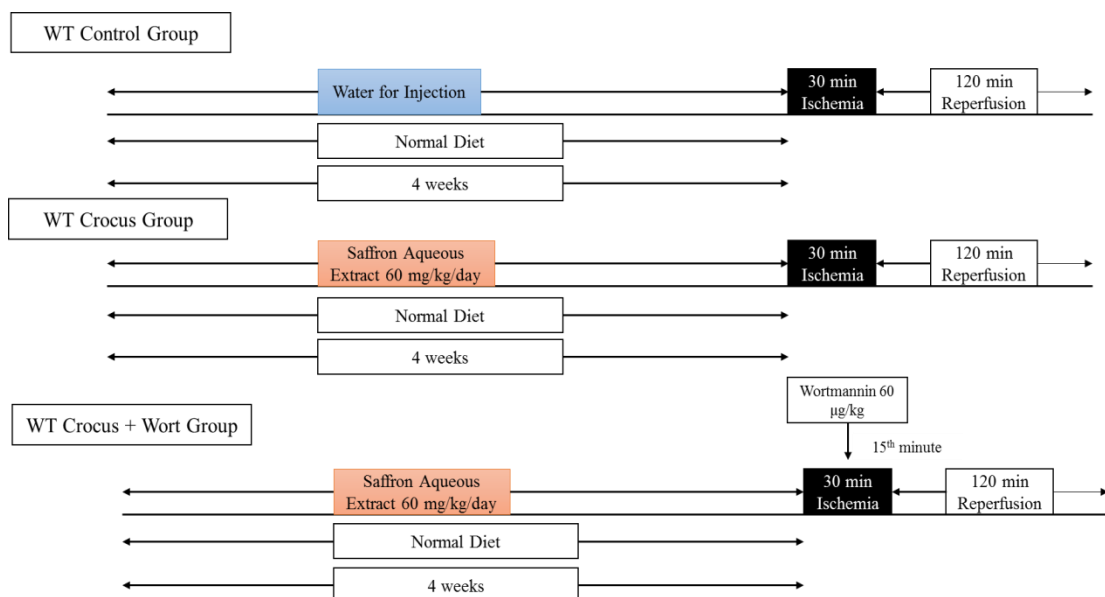
Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες σύμφωνα με τις παρακάτω παρεμβάσεις:

1. Ομάδα Ελέγχου WT (WT Control Group) που έλαβαν απλό ενέσιμο ύδωρ (water for injection/WFI) για 4 εβδομάδες (n=10)
2. Ομάδα Παρέμβασης WT (WT Crocus Group) που λάμβανε per os θεραπεία με υδατικό εκχυλίσμα από τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus* (SFE)

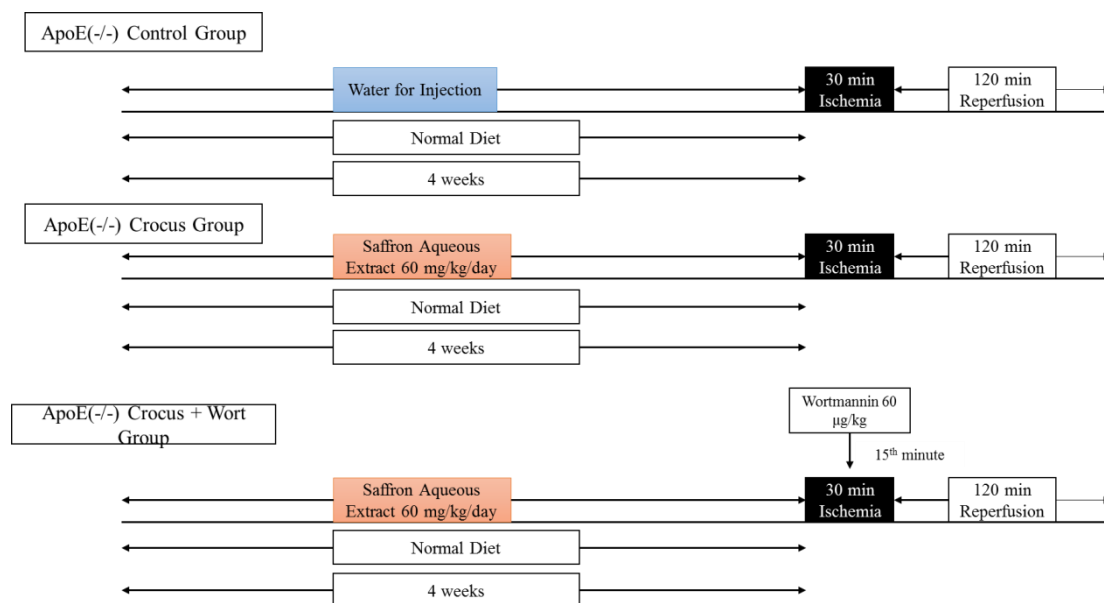
διαλυμένο σε 100 μl WFI μέσω gavage σε δόση 60 mg/kg σωματικού βάρους καθημερινά για 4 εβδομάδες (n=8)

Η επιλογή της δόσης βασίστηκε σε προκαταρκτική φαρμακοκινητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου χορηγούμενο σε δόση της τάξης των 60 mg/kg/ημέρα μέσω gavage σε μύες C57BL/6J οδήγησε σε μετρήσιμη έκθεση Κροκετίνης, του βασικού δραστικού συστατικού του χορηγούμενου εκχυλίσματος. Στην επιλογή της δόσης συνέβαλλαν και βιβλιογραφικά δεδομένα [122].

3. Ομάδα Παρέμβασης + Βορτμαννίνη (WT Crocus + Wort Group) που λάμβανε SFE με τον τρόπο που περιεγράφηκε προηγουμένως και Βορτμαννίνη σε δόση 60 μg/kg bolus 15 λεπτά πριν την επαναιμάτωση (n=6). Η επιλογή της δόσης έγινε με βάση τη βιβλιογραφία [123], [124].
4. Ομάδα Ελέγχου ApoE<sup>(-/-)</sup> (ApoE<sup>(-/-)</sup> Control Group) που λάμβανε WFI per os μέσω gavage καθημερινά για 4 εβδομάδες (n=7)
5. Ομάδα Παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> (ApoE<sup>(-/-)</sup> Crocus Group) λάμβανε per os θεραπεία με υδατικό εκχύλισμα SFE διαλυμένο σε 100 μl WFI μέσω gavage σε δόση 60 mg/kg σωματικού βάρους καθημερινά για 4 εβδομάδες (n=6)
6. Ομάδα Παρέμβασης + Βορτμαννίνη (ApoE<sup>(-/-)</sup> Crocus + Wort Group) που λάμβανε SFE με τον τρόπο που περιεγράφηκε προηγουμένως και Βορτμαννίνη σε δόση 60 μg/kg bolus 15 λεπτά πριν την επαναιμάτωση



Εικόνα 11: Σχηματική Αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας (Work Flow) για τις ομάδες 1-3



Εικόνα 12: Σχηματική Αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας (Work Flow) για τις ομάδες 4-6

#### 2.2.2.2<sup>1</sup> Σειρά Πειραμάτων

Οι προαναφερθείσες παρεμβάσεις επαναλήφθηκαν ομοίως με τη διαφορά ότι η ευθανασία πραγματοποιήθηκε στο 10<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (αντί των 2 ωρών) με σκοπό τη λήψη δείγματος από την ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου για ανάλυση του μοριακού μηχανισμού με την τεχνική Western Blot και τη λήψη αίματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων της Μηλονικής διαλδεΰδης (MDA) ως βιοδείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης

1. Ομάδα Ελέγχου WT (WT Control Group) (n=6)
2. Ομάδα Παρέμβασης WT (WT Crocus Group) (n=6)
3. Ομάδα Ελέγχου ApoE<sup>(-/-)</sup> (ApoE<sup>(-/-)</sup> Control Group) (n=5)
4. Ομάδα Παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> (ApoE<sup>(-/-)</sup> Crocus Group) (n=5)

Το 10<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης επιλέχθηκε λαμβάνοντας υπόψιν ότι όλοι οι καρδιοπροστατευτικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη διάσωση του μυοκαρδίου και την προστασία του από τη μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ενεργοποιούνται μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης [125], [126]

## 2.3. Western Blot

### 2.3.1. Αρχή της Μεθόδου

Η Western Blot χρησιμοποιείται συχνά στην έρευνα για το διαχωρισμό και την αναγνώριση πρωτεϊνών σε κυτταρικά διαλύματα καθώς και στην ποσοτικοποίηση της έκφρασής της. Σε αυτήν την αναλυτική τεχνική το μείγμα των πρωτεϊνών διαχωρίζεται βάσει μοριακού βάρους μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη. Στη συνέχεια το «περιεχόμενο» της γέλης μεταφέρεται σε μεμβράνη με ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF), δίνοντας μια «μπάντα» για κάθε πρωτεΐνη. Η μεμβράνη επωάζεται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Τα αντισώματα έχουν την ιδιότητα να συνδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών, οι οποίες χαρακτηρίζονται με τον όρο επίτοπα. Επειδή η αλληλουχία των αμινοξέων διαφοροποιείται σε διαφορετικές πρωτεΐνες, τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, εντός ομάδας πολλών. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα εκπλένεται αφήνοντας το δεσμευμένο αντίσωμα στην πρωτεΐνη που καλούμαστε να προσδιορίσουμε. Τα δεσμευμένα αντισώματα ανιχνεύονται με ανάπτυξη φωτογραφικού φιλμ με τη μορφή μπάντας το πάχος της οποίας αντιστοιχεί στην ποσότητα της πρωτεΐνης που είναι παρούσα, επομένως, η χρήση προτύπου μπορεί να υποδείξει το ποσό της παρούσας πρωτεΐνης [127].

### 2.3.2. Περιγραφή Μεθόδου

#### 2.3.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων

Ο μυοκαρδιακός ιστός ομογενοποιείται με τη χρήση υγρού αζώτου και ξηρού πάγου για την αποφυγή καταστροφής μέρους των πρωτεϊνών. Μέρος του δείγματος φέρεται σε γουδί πορσελάνης με θερμοκρασία -50 έως -80 °C. Διαβρέχεται αυτόματα με υγρό άζωτο και με τη χρήση υπέρου μετατρέπεται σε κόνι, η οποία άμεσα τοποθετείται στους -80 °C. Ο μυοκαρδιακός ιστός διαβρέχεται με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer).

##### 2.3.2.1.1. Σύσταση Lysis Buffer

- ❖ 1% Triton X100: Μη ιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας. Απαιτείται για τη λύση του κυττάρου και την απελευθέρωση των διαμεμβρανικών



πρωτεϊνών. Εισέρχεται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα που συνιστά την κυτταρική μεμβράνη, ειδικότερα στην εσωτερική, προκαλώντας λύση της.

- ❖ 20 mM Tris HCl pH 7,4: Διαθέτει πολύ καλή ρυθμιστική ικανότητα κι εξασφαλίζει συνθήκες αντίστοιχες με του ανθρώπινου σώματος.
- ❖ 150 mM NaCl: Αναστέλλει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών κι ευνοεί τη λύση των κυττάρων μέσω όσμωσης.
- ❖ 50 mM NaF: Αναστολέας φωσφατασών Σερίνης/Θρεονίνης (πιθανή αναστολή μεταλλοενζύμων με προσθετική ομάδα  $Mg^{2+}$ )
- ❖ 1mM EDTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ενζύμων του κυττάρου που απαιτούν την ύπαρξή του για να δράσουν
- ❖ 1mM EGTA: Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ιόντων  $Ca^{2+}$
- ❖ 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate): Ανιονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας, προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης.
- ❖ 0,5% Sodium Deoxycholate: Μετα Na-άλας χολικού οξέος. Χρησιμοποιείται ως επιφανειοδραστικός παράγοντας για τη λύση του κυττάρου και τη διαλυτοποίηση του μεμβρανικού και κυτταρικού περιεχομένου κι ειδικότερα για την παραλαβή των εγκλωβισμένων στις μεμβράνες πρωτεϊνών.
- ❖ PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride): Αναστολέας πρωτεασών Σερίνης, Κυστεΐνης
- ❖ NADYPI : Αναγωγικό μέσο/Αντιοξειδωτικός παράγοντας
- ❖ Protease phosphatase inhibitor cocktail (10μl στα 2,5 ml Lysis Buffer)

Ακολουθεί προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας στο δείγμα του μυοκαρδιακού ιστού σύμφωνα με τον πίνακα 1

<b>Βάρος ιστών (mg)</b>	<b>Όγκος suspension buffer (ml)</b>
<b>100</b>	0.3
<b>200</b>	0.6
<b>300</b>	0.9
<b>400</b>	1.2

### 2.3.2.2.Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση γίνεται μέσα σε πάγο για 10sec. Κάθε δείγμα ομογενοποιείται δύο φορές από 10sec και αφήνεται να επωαστεί για 30 λεπτά ώστε οι πρωτεΐνες να εγχυλιστούν στο διάλυμα λύσης. Φυγοκεντρείται για 15 min στα 11000 rpm στους 4°C και λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί προσδιορισμός της υπάρχουσας πρωτεΐνης αναφοράς με τη χρήση της μεθόδου Lowry μετρώντας την απορρόφηση στα 750 nm. Μέσω της καμπύλης αναφοράς (συγκέντρωση συναρτήσει απορρόφησης) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων στην αναλύσιμη πρωτεΐνη, ώστε αυτά στη συνέχεια να υποστούν την κατάλληλη αραιώση για να έχουν όλα την ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης. Έτσι εξασφαλίζεται ότι στο κάθε κελί της προς ηλεκτροφόρηση γέλης θα φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης αναφοράς και ότι τα αποτελέσματα θα είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Επίσης εξασφαλίζεται ότι θα φορτωθεί ποσότητα πρωτεΐνης η οποία θα είναι εντός των ορίων ανίχνευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Κατόπιν, με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου Excel αναμειγνύονται για κάθε δείγμα κατάλληλες ποσότητες πρωτεΐνης-ομογενοποιημένου δείγματος, αραιωτικού διαλύματος λύσης και Sample buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0,004% bromophenyl blue, 0.125 M Tris/Hcl), το οποίο είναι απαραίτητο για την αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών [127].

### 2.3.2.3.Ηλεκτροφόρηση

Όταν εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της γέλης, οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν σε αυτή με διαφορετικές ταχύτητες με κινητήριο δύναμη το φορτίο τους (έχουν φορτιστεί αρνητικά από το SDS και μετακινούνται στο θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο μέσω της γέλης ακρυλαμίδιου) και με βάση το μοριακό τους βάρος. Η διαφορετική ταχύτητα ανάπτυξης της κάθε πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα αυτές να χωρίζονται σε ζώνες/μπάντες βάσει μοριακού βάρους [127].

Σε δύο πλαστικά falcons παρασκευάζονται δύο πηκτές ακρυλαμίδιου διαφορετικής σύστασης, η γέλη running/seperating όπου θα πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και η γέλη stacking όπου θα δημιουργηθούν κελιά και θα τοποθετηθούν

τα δείγματα. Διαλύουμε 0.1 g σε 1ml d.H<sub>2</sub>O και φτιάχνουμε 10% APS (Ammonium persulfate). Οι πλάκες που θα χρησιμοποιηθούν πλένονται με αιθανόλη και τοποθετούνται σε ζευγάρια στο ειδικό στατώ της Western. Μόλις προστεθούν το TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) και το APS στη running γέλη, το μείγμα περιχύνεται ανάμεσα στις πλάκες μέχρι το επιθυμητό ύψος διότι η προσθήκη αυτών επάγει τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου: το APS παρέχει το όξινο περιβάλλον, το οποίο είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού ενώ το TEMED δίνει την αμινομάδα που αντιδρά με το ακρυλαμίδιο ώστε να γίνει ο πολυμερισμός. Έπειτα ακολουθεί συμπλήρωση με d.H<sub>2</sub>O μέχρι το πάνω μέρος της πλάκας, για να επιτευχθεί σωστός σχηματισμός της γέλης και η απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων. Έπεται αναμονή μέχρι να πήξει το υπόλειμμα στο falcon, περίπου 30 λεπτά. Αφού η γέλη πήξει, αφαιρείται με διηθητικό χαρτί το νερό που είχε προστεθεί. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται η γέλη stacking προσθέτοντας στην κωνική το TEMED και το APS και με τη βοήθεια πιπέτας περιχύνεται αμέσως ανάμεσα στις πλάκες (πολυμερίζεται ταχύτερα από το running). Αφού οι πλάκες γεμίσουν, τοποθετούνται με προσοχή τα χτενάκια της συσκευής και αναμένεται να πήξει το υπόλειμμα στο falcon, περίπου για 10 λεπτά.

Για την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού, το ποσοστό ακρυλαμιδίου στη γέλη running μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που πρόκειται να προσδιοριστεί αλλάζοντας την αναλογία ακρυλαμιδίου/dH<sub>2</sub>O. Έτσι για προσδιορισμό πρωτεϊνών με μέγεθος μέχρι 60kDa επιλέγεται 9-11% ακρυλαμιδίου, για προσδιορισμό πρωτεϊνών με μέγεθος 60 kDa-85kDa 8-10% και για το προσδιορισμό πρωτεϊνών 85kDa-140 kDa 7,5% ακρυλαμιδίου. Αντιθέτως, το stacking έχει πάντοτε την ίδια σύσταση ανεξάρτητα από το είδος των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών.

Για να ξεκινήσει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, τα δείγματα καθώς και ο ιχνηθέτης (marker) φέρονται σε πάγο. Ο marker είναι ένα μίγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη, διαθέσιμο στο εμπόριο. Είναι έγχρωμος και διαμορφώνει ορατές μπάντες που συμβάλλουν στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που αναπτύσσονται στα δείγματα. Οι πλάκες απομακρύνονται από το στατώ και μεταφέρονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με την μικρή πλάκα προς την εσωτερική πλευρά. Τα χτενάκια αφαιρούνται προσεκτικά και το κενό ανάμεσα στις πλάκες γεμίζει με Running Buffer 1x, το οποίο παρασκευάζεται με αραιώση 100ml

σε 900ml d. H<sub>2</sub>O. Είναι σημαντικό, καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, η συσκευή να είναι πάντα γεμάτη με Running buffer 1x μέχρι το τέλος της μεγάλης πλάκας.

	<b>Running Gel</b>	<b>Running Gel</b>	<b>Stacking Gel</b>
	<b>7,5 %</b>	<b>10%</b>	
<b>30% Acrylamide/Bisacrylamide</b>	3,75 ml	5 ml	650 μl
<b>Separating Buffer 4x</b>	3,75 ml	3,75 ml	-
<b>Stacking Buffer 4x</b>	-	-	1,25 ml
<b>d.H2O</b>	7,5 ml	6,25 ml	3,00 ml
<b>APS</b>	150 μl	150 μl	70 μl
<b>TEMED</b>	15 μl	150 μl	7 μl
<b>Bromophenol Blue</b>	-	-	12 μl

Πίνακας 2: Συνταγή παρασκευής γελών Running και Stacking. Οι αναγραφόμενες ποσότητες αναφέρονται στη λήψη 2 γελών.

<b>Γλυκίνη</b>	<b>142 g</b>
<b>Tris</b>	30,2 g
<b>SDS</b>	10 g

<b>d.H<sub>2</sub>O</b>	<b>Qs 1000 ml</b>
-------------------------	-------------------

Πίνακας 3: Σύσταση Running Buffer 10x

Για την απομάκρυνση όσου ακρυλαμιδίου δεν πολυμερίστηκε όπως και τυχόν ακαθαρσιών, πραγματοποιείται flashing, δηλαδή έγχυση με τη βοήθεια σύριγγας running buffer μέσα σε κάθε κελί. Κατόπιν, ο marker εγχέται με πιπέτα στο πρώτο, αριστερό κελί της κάθε γέλης και στη συνέχεια προστίθενται τα δείγματα διαδοχικά στα επόμενα κελιά. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, τοποθετείται σε κελί ο αραιωμένος marker (αραίωση 1:4 με διάλυμα λύσης και sample). Η ποσότητα (μl) του κάθε δείγματος έχει υπολογιστεί από πριν με βάση την πρωτεΐνη που θα προσδιορίσουμε. Η τοποθέτηση των δειγμάτων (loading) θα πρέπει να γίνεται με ακρίβεια και για αυτό θα πρέπει κάθε φορά που παίρνουμε ένα δείγμα. Συστήνεται επίσης να ολοκληρώνεται η τοποθέτηση των δειγμάτων πρώτα στη μία γέλη και στη συνέχεια η διαδικασία να επαναλαμβάνεται στην επόμενη. Αφού ολοκληρωθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων, αρχίζει η ηλεκτροφόρηση. Επιλέγονται τα 75V μέχρι τη στιγμή διαχωρισμού του marker σε έγχρωμες στοιβάδες. Στη συνέχεια, η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 120V μέχρι το ύψος του επιθυμητού διαχωρισμού ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθος της προς προσδιορισμό πρωτεΐνης.

#### 2.3.2.4. Transportation

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται προσεκτικά η μία κασέτα από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και επιδιώκεται η διάνοιξή της με τη βοήθεια σπάτουλας χωρίς να σπάσει η γέλη. Η γυάλινη πλάκα φέρεται προς την πλευρά εκείνη που κολλάει η γέλη και μέρος της γέλης stacking αποκόπτεται με τη σπάτουλα με βάση τη σχηματιθείσα γραμμή στη βάση της γέλης. Με προσοχή, ξεκολλάται η γέλη και η γέλη που περιέχει τις ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες επωάζεται σε transfer buffer ίδιας συστάσεως με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά, για 10 λεπτά με στόχο την εξισορόπηση της διαφοράς pH και SDS μεταξύ running και transfer buffer.

Παράλληλα, επωάζεται και η μεμβράνη PVDF (προτιμάται σε σχέση με νιτροκυτταρίνη διότι βιβλιογραφικά έχει διαπιστωθεί μειωμένη ανίχνευση θορύβου [127]) για 10 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί και να είναι σε θέση να δεσμεύσει τις πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί και υπάρχουν στη γέλη. Έπειτα η μεμβράνη PVDF επωάζεται με 1x Transfer Buffer για 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί ομαλή μετάβαση στο επόμενο περιβάλλον. Ταυτόχρονα όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση σε

ένα γυάλινο σκεύος προστίθεται Transfer Buffer 1x. Εντός του σκεύους αφήνονται να διαβραχούν σε transfer buffer οι κασέτες με τα ειδικά σφουγγαράκια τους, τεμάχια διηθητικού χαρτιού κι ένα μικρό γυάλινο σιφώνιο.

	<b>Transfer Buffer 10x</b>	<b>Transfer Buffer 1x</b>
<b>Γλυκίνη</b>	75 g	7,5 g
<b>Tris</b>	15 g	1,5 g
<b>d.H<sub>2</sub>O</b>	900 ml	900 ml
<b>Μεθανόλη</b>	100 ml	100 ml

Πίνακας 4: Σύσταση Transfer Buffer

Η μία κασέτα, ανοιχτή, τοποθετείται στο γυάλινο σκεύος με τη μαύρη πλευρά κάτω και πάνω σε αυτή τοποθετείται ειδικό σφουγγάρι. Αφού οι γέλες επωαστούν για 10 λεπτά στο transfer buffer, με ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί, ανασηκώνεται η γέλη ώστε τελικά να μεταφερθεί ολόκληρο πάνω στο χαρτί χωρίς να διαρραγεί.

Φροντίζεται η μπάντα του πυκνού marker να βρίσκεται δεξιά και αυτή του αραιού marker αριστερά. Στη συνέχεια, τοποθετείται το χαρτί με τη γέλη πάνω από το σφουγγάρι στην κασέτα και εναποτίθεται η μεμβράνη πάνω από τη γέλη ακουμπώντας πρώτα το κέντρο και μετά τις άκρες. Με ένα γυάλινο σιφώνιο διαβρέχεται η μεμβράνη για να φύγουν τυχόν φυσαλίδες που έχουν παγιδευτεί. Τέλος, τοποθετείται από πάνω και άλλο τεμάχιο βρεγμένου διηθητικού χαρτιού, διαβρέχεται πάλι με γυάλινο σιφώνιο, η κασέτα κλείνει και τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς με τη μαύρη πλευρά προς τη μαύρη πλευρά της συσκευής και τη διαφανή στην κόκκινη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και για την άλλη πλάκα. Μετά το πέρας των διαδικασιών αυτών, πραγματοποιείται η διαδικασία του transportation για 1,5 h σε πάγο στα 100 V.

Όταν τελειώσει το transportation ελέγχεται αν έχει μεταφερθεί ο marker στη μεμβράνη. Αν αυτό δεν έχει συμβεί, πιθανότατα για κάποιο λόγο δεν έγινε το transportation. Στην περίπτωση αυτή, δεν πρέπει να μετακινηθεί η γέλη από τη μεμβράνη και το transportation πρέπει να επαναληφθεί. Αν το transportation έχει γίνει επιτυχώς, η κασέτα ανοίγει με τη μαύρη πλευρά της να βρίσκεται από πάνω αυτή τη

φορά, το σφουγγαράκι και το πρώτο διηθητικό χαρτί αφαιρείται και λαμβάνεται η μεμβράνη της PVDF μαζί με τη γέλη χωρίς να διαχωριστούν. Στη συνέχεια αφού αφαιρεθεί η γέλη από τη μεμβράνη, αυτή προσανατολίζεται κατάλληλα και κόβεται στην άνω αριστερή γωνία. Τοποθετώντας πάντα το κόψιμο πάνω αριστερά καθίσταται σαφές ποια είναι η πλευρά του PVDF στην οποία έγινε η μεταφορά.

### 2.3.2.5. Blocking

Παρασκευάζεται το TBS-Tween. Αναμιγνύονται 100ml από το 10x TBS (Tris Buffer Saline) με 900ml d.H<sub>2</sub>O και 2ml Tween 20.

	<b>TBS 10x</b>
<b>NaCl</b>	88 g
<b>Tris</b>	24,2 g
<b>HCl 37%</b>	q.s pH 7,4
<b>d.H<sub>2</sub>O</b>	q.s 1000 ml

Πίνακας 5: Σύσταση TBS 10x

Έπειτα παρασκευάζεται το Blocking Buffer. Για δύο γέλες διαλύονται 2,5g γάλακτος σε σκόνη σε 50ml TBS-Tween. Η μεμβράνη επωάζεται στο Blocking Buffer για 1 ώρα. Ο λόγος για τον οποίο η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη Western Blot είναι η ανάγκη αποκλεισμού περιοχών της μεμβράνης που δεν έχουν πρωτεΐνες ώστε να μειωθεί η σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων εκεί και να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Έτσι, όταν το αντίσωμα προστίθεται, επισυνάπτει μόνο τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους (παρεμπόδιση της μη-ειδικής σύνδεσης). Αφού περάσει η μία ώρα, το Blocking Buffer απορρίπτεται και η μεμβράνη εκπλένεται για 5-10 λεπτά με TBS-Tween. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύπτεται με ζελατίνα και με τη βοήθεια χάρακα και νυστεριού κόβεται σε λωρίδες με οδηγό τις στοιβάδες του marker, μεταξύ των kDa όπου αναμένονται να ληφθούν οι προσδιοριζόμενες πρωτεΐνες.

### 2.3.2.6. Πρωτογενές Αντίσωμα

Εντωμεταξύ, προετοιμάζεται το πρωτογενές αντίσωμα (Primary Antibody-Pr Ab) με αραιώση 1:1000 (ή ακολουθώντας τις οδηγίες του παραγωγού) χρησιμοποιώντας: 2,5

μl Pr Ab, 2,5ml TBS/Tween, 2,5 μl 25% NaN<sub>3</sub>-Νατραζίδιο (για 1 ζώνη μεμβράνης) . Η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα για όλη τη νύχτα στους 4°C. Το πρωτογενές αντίσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί τρεις φορές (λόγω του συντηρητικού NaN<sub>3</sub> που περιέχει) γι αυτό μετά τη χρήση του δεν απορρίπτεται αλλά φυλάσσεται στους -20 °C.

#### 2.3.2.7 Δευτερογενές Αντίσωμα και Αντιδραστήριο Χημειοφωταύγειας (ECL)

Μετά το πέρας της επώασης του πρωτογενούς αντισώματος η μεμβράνη εκπλένεται για 5-10 λεπτά με TBS-Tween και παράλληλα ετοιμάζεται το δευτερογενές αντίσωμα (Secondary Antibody) με αραιώση συνήθως 1:2000. Για 1 ζώνη μεμβράνης προστίθενται σε 3ml TBS-Tween συνήθως 1,5μl από το Δευτερογενές Αντίσωμα. Για κάθε πρωτογενές είναι γνωστό ποιο δευτερογενές αντίσωμα θα χρησιμοποιηθεί και πόσο πρέπει να διαλυθεί. Ειδικότερα, αν το πρωτογενές προέρχεται από κόνικλο τότε ως δευτερογενές θα χρησιμοποιηθεί το Anti-Rabbit. Χρειάζεται προσοχή, το δευτερογενές αντίσωμα να μην προορίζεται για το ίδιο ζώο από το οποίο προέρχονται τα αρχικά δείγματα διότι κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε σημαντική μείωση της εκλεκτικότητας δεδομένου ότι το αντίσωμα θα συνδεόταν και με τις IgG ανοσοσφαιρίνες του ζώου. Η μεμβράνη επώαζεται στο δευτερογενές αντίσωμα για 2 ώρες και στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η διαδικασία έκπλυσης με TBS-Tween για 3 φορές από 15 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η συνολική ποσότητα NaN<sub>3</sub>, το οποίο καταστρέφει μέρος των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας. Αυτός είναι κι ο λόγος για τον οποίο εν αντιθέσει με το πρωτογενές, το δευτερογενές αντίσωμα δεν επαναχρησιμοποιείται. Μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, παρασκευάζεται το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας από τα διαλύματα GE Healthcare ECL Western Blotting Detection Reagents με ανάμιξή τους σε αναλογία 50/50 και οι μεμβράνες επωάζονται για 5 λεπτά. Κατόπιν, οι μεμβράνες τυλίγονται σε διαφανή μεμβράνη και τοποθετούνται στη συσκευή εμφάνισης κλείνοντάς την ερμητικά.

#### 2.3.2.8 Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ στο σκοτεινό θάλαμο

Η όλη διαδικασία της εμφάνισης πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο υπό κόκκινο φως (IR). Τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν, δηλαδή το detector/developer και το fixer, τοποθετούνται σε λεκάνες, αφού αραιωθούν πρώτα με νερό (σε 200 ml πυκνού διαλύματος detector ή fixer προστίθεται 800 ml νερού). Κομμάτια φωτογραφικού φιλμ τοποθετούνται πάνω από τις μεμβράνες και η συσκευή



εμφάνισης κλείνει για 30 με 40 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το φιλμ εμβαπτίζεται στο detector μέχρι την εμφάνιση σήματος. Εφόσον η εικόνα είναι ευκρινής, τότε το φιλμ εκπλένεται ελαφρώς σε νερό και εμβαπτίζεται στο fixer.

Ανάλογα με το λαμβανόμενο σήμα η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Αν το σήμα είναι πολύ έντονο, η παραμονή του φιλμ εντός της συσκευής εμφάνισης διαρκεί μερικά μόνο δευτερόλεπτα, ενώ αν το σήμα είναι πολύ ασθενές μπορεί να παραταθεί μέχρι και 10-15 λεπτά. Μετά το τέλος της εμφάνισης, οι μεμβράνες εκπλένονται για λίγα λεπτά σε TBS-Tween και φυλάσσονται στο ψυγείο στους  $-4^{\circ}\text{C}$  για stripping.

#### 2.3.2.9.Stripping

Στην περίπτωση προσδιορισμού ολικής ή φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ή μέτρησης κάποιας άλλης πρωτεΐνης παρόμοιου μοριακού βάρους με την προσδιοριζόμενη, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης των ίδιων μεμβρανών με τη διαδικασία του Stripping. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς κάνει οικονομία στη κατανάλωση των δειγμάτων αλλά και στο χρόνο. Κάθε μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί τρεις φορές. Η διαδικασία ξεκινά με μεταφορά των μεμβρανών και έκπλυσή τους με TBS-Tween. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες επωάζονται για 20 λεπτα σε υδατόλουτρο στους  $42-45^{\circ}\text{C}$  με Stripping Buffer (σύσταση: 7,6g Tris, 20,0g SDS, 1000ml d.H<sub>2</sub>O, pH~6,8) μαζί με 175 μl 2-Μερκαπτοαιθανόλης. Η μερκαπτοαιθανόλη είναι ιδιαίτερα τοξική και η προσθήκη της γίνεται αποκλειστικά και μόνο στον απαγωγό με μεγάλη προσοχή. Η προσθήκη της αποσκοπεί στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών ώστε να απομακρυνθούν από την επιφάνεια της μεμβράνης τα αντισώματα. Εν συνεχεία, ακολουθούν πέντε πλύσεις των πέντε λεπτών η κάθε μία με TBS-Tween. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το Blocking Buffer κατά τα γνωστά κι επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία εκπλύσεων και επώασεων με τα επιλεγμένα αντισώματα, ενώ στο τέλος πραγματοποιείται η εμφάνιση στο σκοτεινό θάλαμο. Εναλλακτικά, υπάρχει και μία ηπιότερη παραλλαγή της παραπάνω διαδικασίας γνωστή ως mild stripping. Η διαφορά έγκειται σε δύο σημεία:

- ❖ Τη σύσταση του stripping buffer: 9 ml Γλυκίνης, 1 ml SDS και 1 σταγόνα Tween
- ❖ Την επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά

## 2.4 Προσδιορισμός επιπέδων Μηλονικής διαλδεΰδης (Malondialdehyde/MDA)

Ο ορός παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση ολικού αίματος και τα επίπεδα της Μηλονικής διαλδεΰδης (Malondialdehyde/MDA) μετρήθηκαν φωτομετρικά. Ειδικότερα, μέρος από τα δείγματα αναμίχθηκε σε συγκεκριμένη αναλογία με διάλυμα Beaker (10.3 mM N-methyl-2-phenyl-indole) σε ακετονιτρίλιο και διάλυμα HCl 37%. Ακολούθησε επώαση στους 45 °C για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για λίγα λεπτά στον πάγο και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 στροφές στους 4°C για 15 λεπτά. Η απορρόφηση των υπερκειμένων μετρήθηκε φωτομετρικά στα 586 nm. Για ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε και καμπύλη αναφοράς αποτελούμενη από σειρά προτύπων διαλυμάτων MDA.

## 2.5 Στατιστική Επεξεργασία

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (means  $\pm$  standard error of the mean). Στα πειράματα αυτά, οι διαφορές στις εμφραγματικές περιοχές μεταξύ των τριών ομάδων αναλύθηκαν και η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε με ανάλυση διασποράς One-Way ANOVA ακολουθούμενη από Tukey post-hoc τεστ. Οι διαφορές στα επίπεδα των δεικτών νιτρο-οξειδωτικού στρες και πρωτεϊνικής έκφρασης μεταξύ των ομάδων υπολογίστηκαν με unpaired t test με διόρθωση Welch ή με Mann-Whitney τεστ/Kruskal-Wallis τεστ (μη παραμετρική ανάλυση διασποράς) για μεταβλητές με σημαντικές διαφορές στις τυπικές αποκλίσεις τους. Όλοι οι υπολογισμοί εκτελέστηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism 4. Η μετρημένη τιμή της μεταβλητής p που είναι μικρότερη από 0.05 ( $p < 0.05$ ) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

## 3.Αποτελέσματα

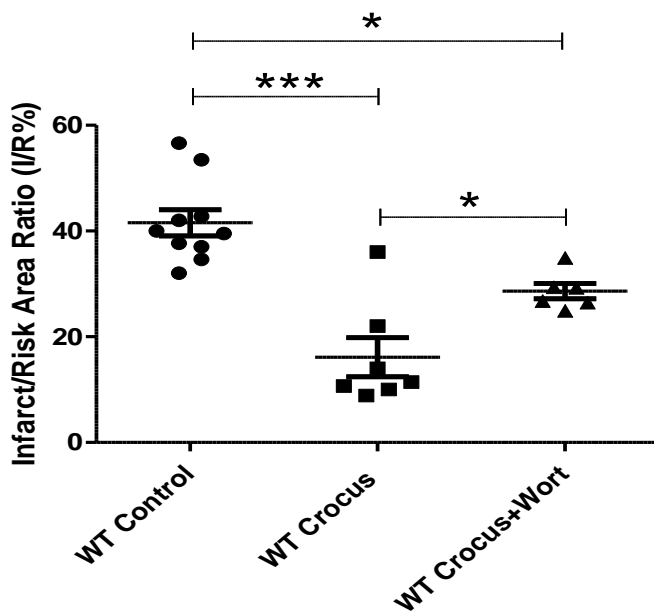
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έχουν δημοσιευθεί [128].

### 3.1 Αποτελέσματα που αφορούν τους Wild Type μύες

#### 3.1.1 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επιφέρει σημαντική μείωση της εμφραγματικής περιοχής στους Wild Type μύες

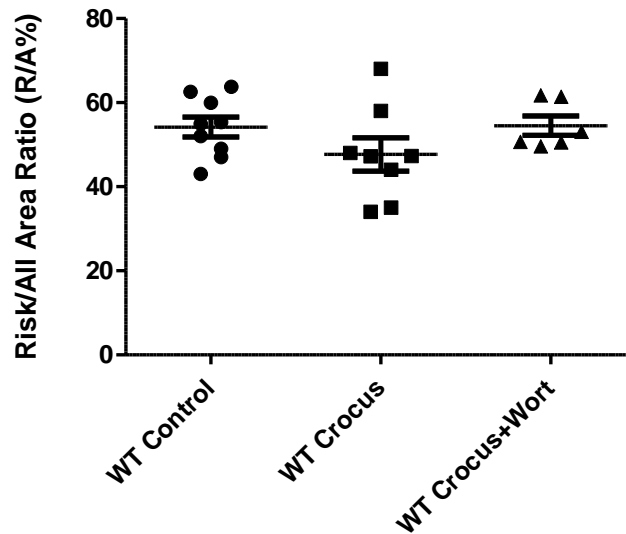
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, κύριος στόχος της καρδιοπροστασίας είναι η μείωση του μεγέθους του εμφράκτου [11]. Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επέφερε μείωση και μάλιστα στατιστικά σημαντική στο μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής, εκφρασμένης ως I/R % στους WT μύες (ομάδα παρέμβασης WT  $16.15 \pm 3.7\%$  έναντι

ομάδας ελέγχου WT  $41.57 \pm 2.48\%$ ,  $***p < 0.001$ - Σχήμα 1). Παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση Βορτμαννίνης προκάλεσε μερική αναστολή της καρδιοπροστατευτικής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου, όπως βλέπουμε από το αντίστοιχο ποσοστό I/R% ( $28.63 \pm 1.44\%$ ,  $*p < 0.05$  έναντι ομάδας παρέμβασης WT και  $*p < 0.05$  έναντι ομάδας ελέγχου WT-Σχήμα 1) [128].



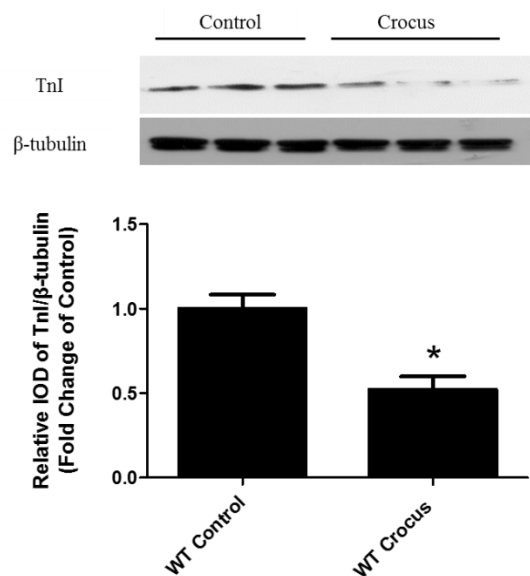
Σχήμα 1: Αντιπροσωπευτικό γράφημα του λόγου I/R % στους WT μύες ( $*p < 0.05$  έναντι ομάδας ελέγχου WT)

Για να επαληθεύσουμε την επαναληψιμότητα της χειρουργικής διαδικασίας πρόκλησης εμφράγματος του μυοκαρδίου μετρήσαμε το ποσοστό R/A %, το οποίο δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 3 ομάδων ( $57.18 \pm 2.23\%$  στην ομάδα ελέγχου WT,  $47.69 \pm 4.00\%$  στην ομάδα παρέμβασης WT και  $54.53 \pm 2.29\%$  στην ομάδα παρέμβασης + Βορτμαννίνη WT,  $p > 0.05$ , NS-Σχήμα 2) [128].



Σχήμα 2: Γραφική απεικόνιση του λόγου R/A % στους WT μύες ( $p > 0.05$ , NS)

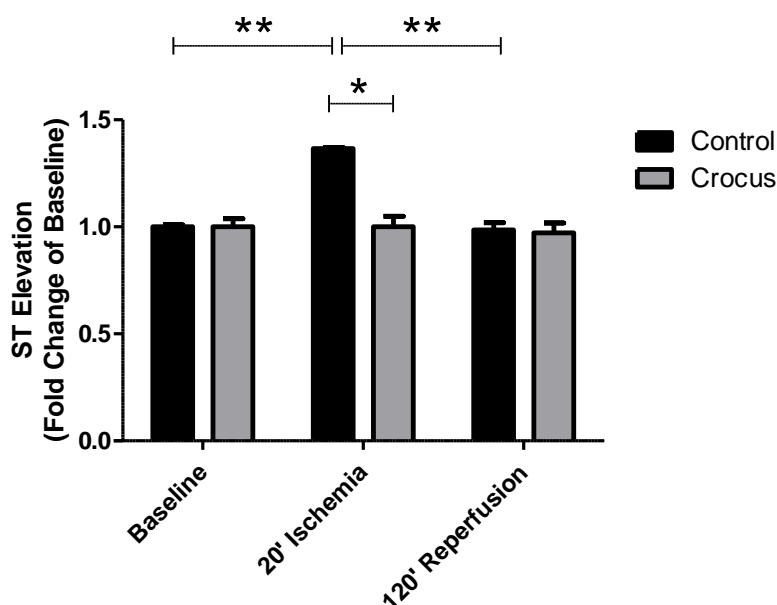
Επιπροσθέτως, μετρήσαμε στο 10<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης την Τροπονίνη I (TnI), η οποία αποτελεί δείκτη της μυοκαρδιακής βλάβης [8], [129]. Παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της TnI στην ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου (\* $p < 0.05$  έναντι της ομάδας ελέγχου-Σχήμα 3) [128].



Σχήμα 3: Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από την αντίστοιχη πυκνομετρική ανάλυση της Τροπονίνης I (TnI) σε WT μύες (\* $p < 0.05$  έναντι της ομάδας ελέγχου)

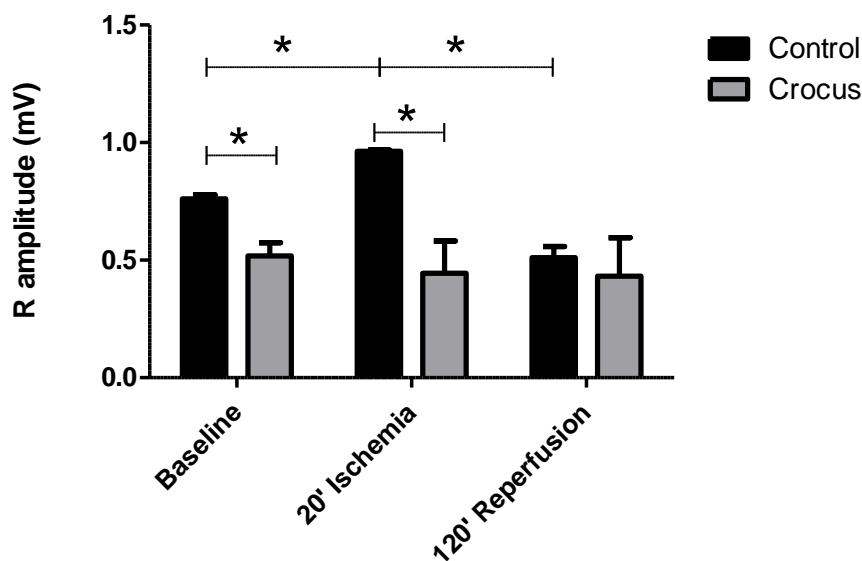
### 3.1.2 Το υδατικό εκχύλισμα κρόκου μειώνει την ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα

Η επεξεργασία του ηλεκτροκαρδιογραφήματος που ελήφθη κατά τη διάρκεια της χειρουργικής διαδικασίας πρόκλησης εμφράγματος βασίστηκε σε 3 χρονικές στιγμές: αμέσως πριν την Ισχαιμία (baseline), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της ισχαιμίας (20' Ischemia) και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (120' Reperfusion). Η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου για 4 εβδομάδες σε WT μύες επηρέασε την ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά του μυοκαρδίου. Ειδικότερα, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάσπασης του διαστήματος ST (STEMI) στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (Σχήμα 4) [128]. Συνεπώς, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μείωσε τη βλάβη που υφίσταται το μυοκάρδιο κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας.



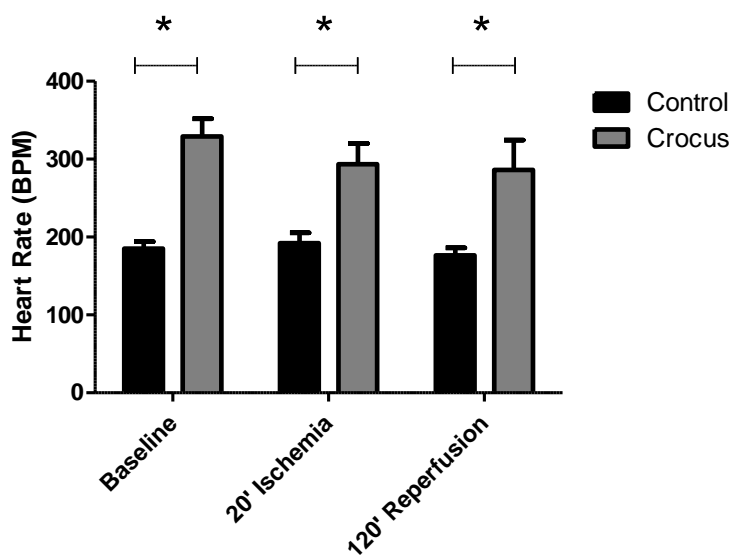
Σχήμα 4: Αντιπροσωπευτικό Γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε WT μύες που αναπαριστά την ανάσπαση του διαστήματος ST σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

Επιπροσθέτως, μείωσε το εύρος του R τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (Σχήμα 5)[128]. Το R αποτελεί μέρος του συμπλέγματος QRS με το τελευταίο να αντιπροσωπεύει τα περίπλοκα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την εκπόλωση των κοιλιών. Η μείωση του εύρους του R ερμηνεύεται ως αναστολή της διαστολής της αριστερής κοιλίας κατά την ισχαιμία [130].



Σχήμα 5: Αντιπροσωπευτικό γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε WT μύες που αναπαριστά το εύρος του διαστήματος R σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

Όσον αφορά την καρδιακή συχνότητα, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου προκάλεσε αύξηση της και τις 3 χρονικές στιγμές (Σχήμα 6) [128].

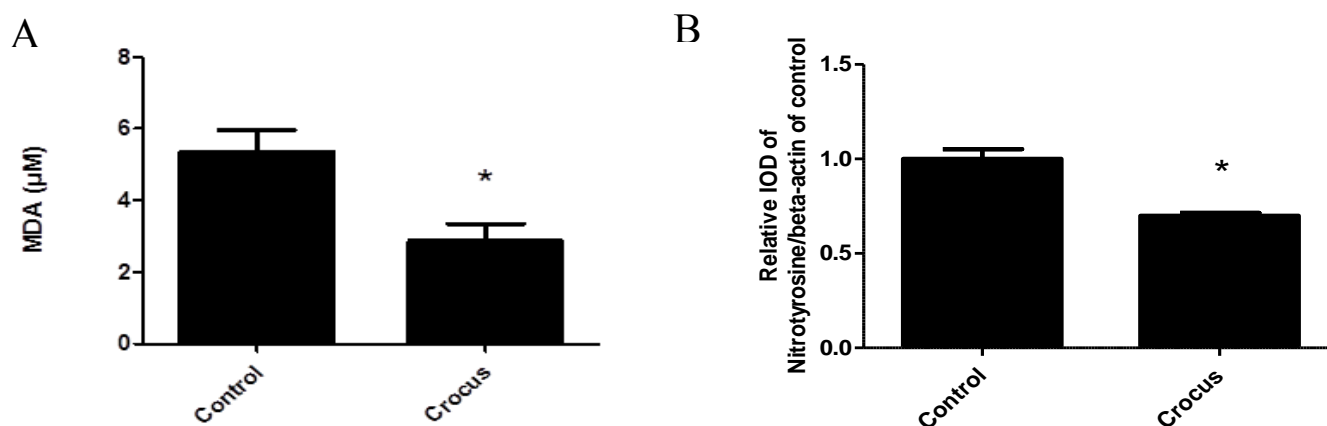


Σχήμα 6: Αντιπροσωπευτικό γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε WT μύες που αναπαριστά την καρδιακή συχνότητα σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως

πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

### 3.1.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει σημαντικά το οξειδωτικό και νιτρο-οξειδωτικό στρες in vivo

Για να εκτιμήσουμε την επίδραση που ασκεί το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου στο οξειδωτικό και το νιτρο-οξειδωτικό στρες, μετρήσαμε στον ορό και στο μυοκαρδιακό ιστό αντίστοιχα τα επίπεδα της Μηλονικής διαλδεύδης (Malondialdehyde-MDA) που αποτελεί δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης [41] και της νιτροτυροσίνης (Nitrotyrosine-NT), η οποία είναι δείκτης του νιτροξειδωτικού στρες [18]. Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επέφερε στατιστικά σημαντική μείωση (\*p < 0.05) στα επίπεδα και των 2 αυτών δεικτών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου WT (Σχήματα 7A και 7B) [128].

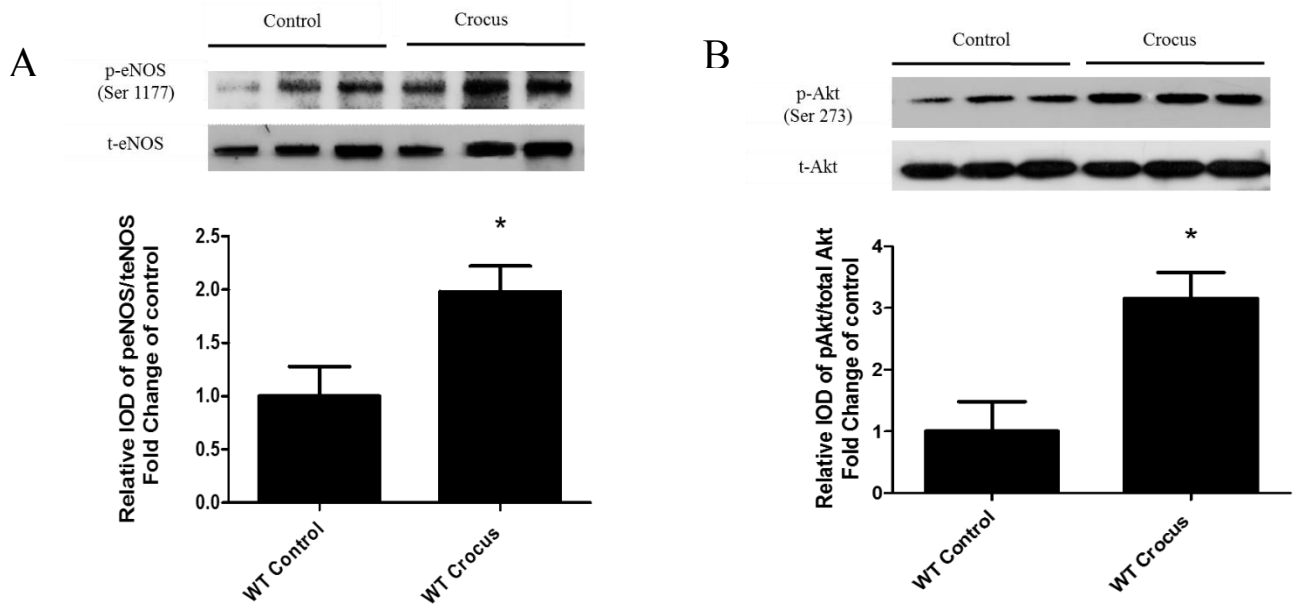


Σχήμα 7: A. Επίπεδα MDA στον ορό σε WT μύες (\*p < 0.05 vs Control) B. Σχετική πυκνομετρική ανάλυση της Νιτροτυροσίνης (NT) κανονικοποιημένης ως προς τη β-ακτίνη (\*p < 0.05 vs Control) σε WT μύες

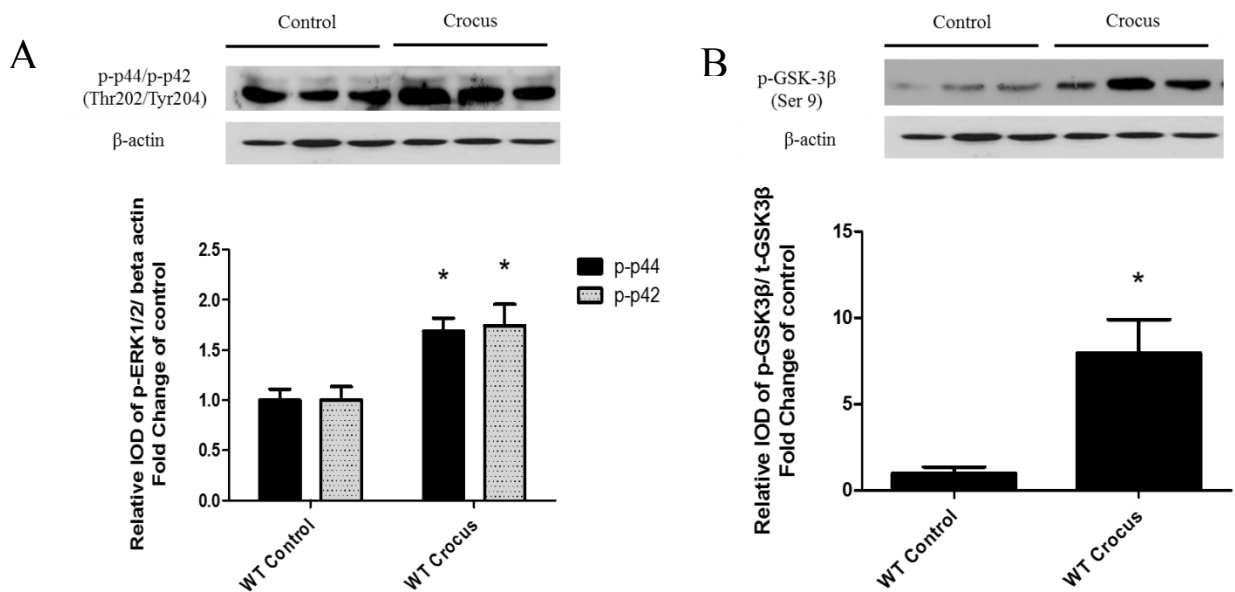
### 3.1.4 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία ενεργοποιώντας το RISK μονοπάτι και μειώνοντας την έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η ενεργοποίηση των κινασών διάσωσης RISK πραγματοποιείται μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης ως απάντηση σε καρδιοπροστατευτικές ενώσεις [26]. Επομένως πρόκειται για κύριους μεσολαβητές της καρδιοπροστασίας που ασκείται από φαρμακευτικές ουσίες ή Nutraceuticals. Αυτός είναι και ο λόγος που εξετάσαμε την επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος

Κρόκου στο RISK μονοπάτι. Παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου αυξάνει τη φωσφορυλίωση των κινασών Akt και ERK 1/2, αυξάνει τη φωσφορυλίωση της eNOS και αυξάνει τη φωσφορυλίωση της GSK-3β (στη Σερίνη 9) (Σχήματα 8, 9) [128], η οποία οδηγεί σε αναστολή της κινάσης.



**Σχήμα 8:** A. Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από σχετική πυκνομετρική ανάλυση της p-eNOS (Ser1177)/ t-eNOS (\*p < 0.05). B. Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από σχετική πυκνομετρική ανάλυση της p-Akt (Ser 273)/ t-Akt (\*p < 0.05)

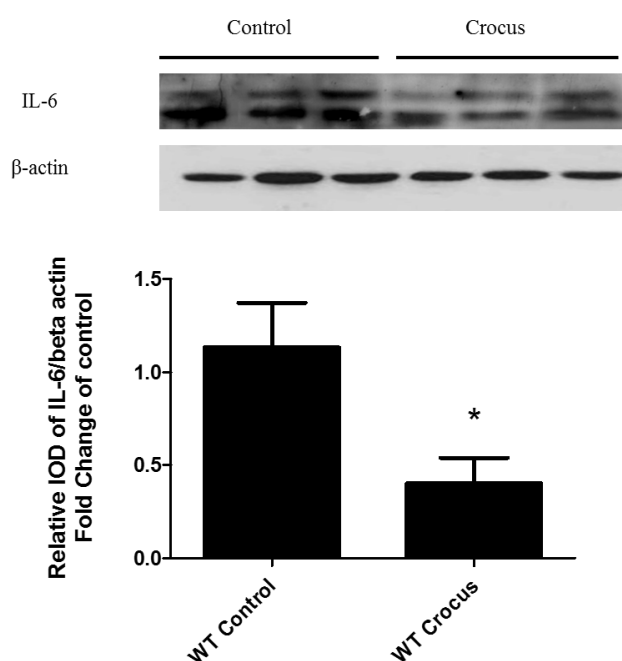




Σχήμα 9: A. Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από σχετική πυκνομετρική ανάλυση των p-p44/p-p42 (Thr 202/Tyr 204) κανονικοποιημένων προς τη β-ακτίνη (\*p < 0.05). B. Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από σχετική πυκνομετρική ανάλυση της p-GSK-3β (Ser 9)/ t-GSK-3β (\*p < 0.05).

Παράλληλα, στην ομάδα παρέμβασης WT είδαμε ότι ο Κρόκος προκαλεί μείωση της έκφρασης της Ιντερλευκίνης 6 (IL-6). Η IL-6 αποτελεί προφλεγμονώδη κυτταροκίνη, η οποία είναι ενεργή κατά τη διάρκεια της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης (Σχήμα 10) [131].

Όλες οι προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές (\*p < 0.05) [128].



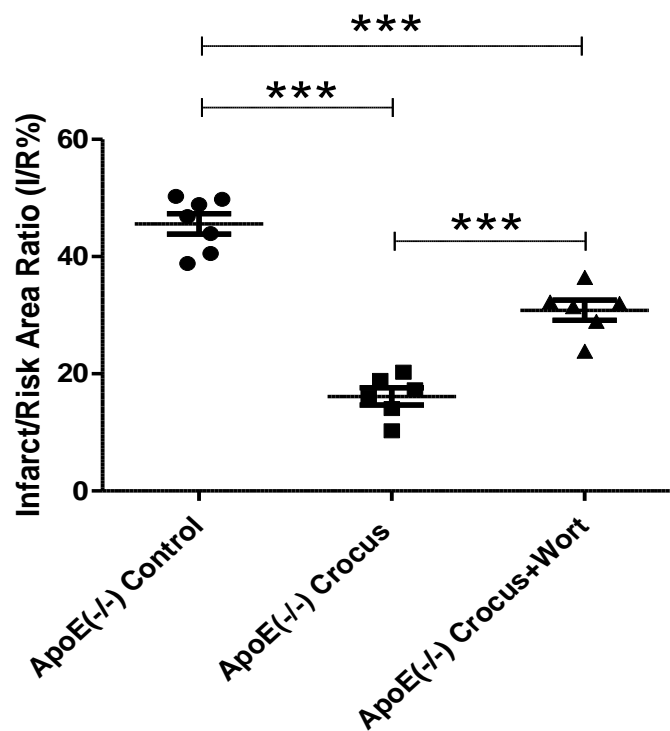
Σχήμα 10: Γραφική απεικόνιση των επιπέδων της IL-6, κανονικοποιημένης προς τη β-ακτίνη (\*p < 0.05)

### 3.2. Αποτελέσματα στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες

#### 3.2.1 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει σημαντικά το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε θέλαμε να εξετάσουμε την επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, παρουσία συννοσηροτήτων. Για αυτό χρησιμοποιήσαμε ως μοντέλο ενδοθηλιακής

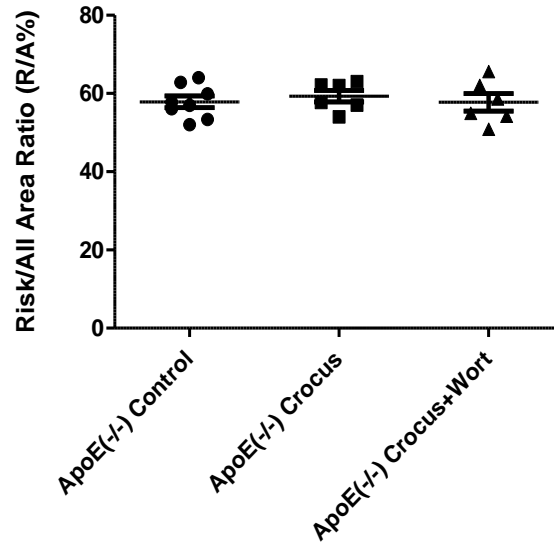
δυσλειτουργίας τους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες. Πράγματι, η καρδιοπροστατευτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου ασκείται και παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας καθώς παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής (εκφρασμένου ως I/R%) στην ομάδα παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> ( $16.14 \pm 1.47\%$  έναντι της ομάδας ελέγχου ApoE<sup>(-/-)</sup>  $45.57 \pm 1.73\%$ , \*\*\* $p < 0.001$  Σχήμα 9). Ομοίως όπως και στα πειράματα στους WT μύες, η Βορτμαννίνη ανέστειλε μερικώς την καρδιοπροστατευτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου ( $30.85 \pm 1.71\%$ , \*\*\* $p < 0.001$  έναντι της ομάδας ελέγχου ApoE<sup>(-/-)</sup> και της ομάδας παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> -Σχήμα 9) [128].



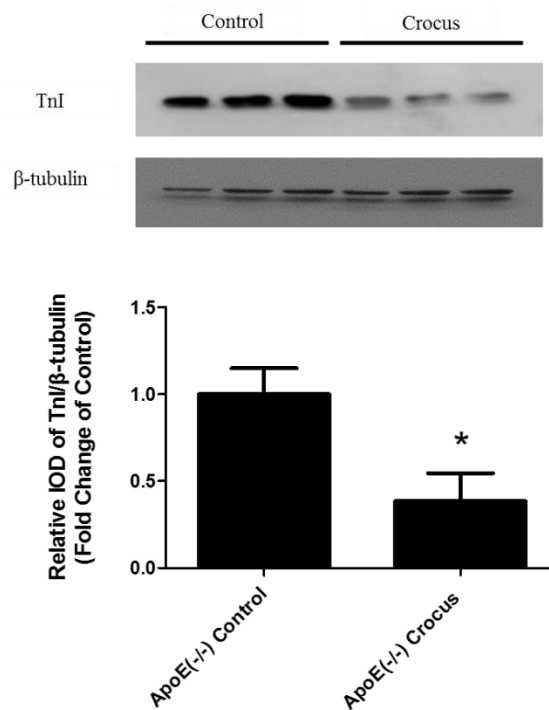
Σχήμα 11: Αντιπροσωπευτικό γράφημα του λόγου I/R % στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (\*\*\* $p < 0.001$ )

Και εδώ, το ποσοστό R/A δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων επιβεβαιώνοντας την επαναληψιμότητα της χειρουργικής διαδικασίας ( $57.85 \pm 1.49\%$  στην ομάδα ελέγχου ApoE<sup>(-/-)</sup>,  $58.99 \pm 5.06\%$  στην ομάδα παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> και  $57.74 \pm 2.23\%$  στην ομάδα παρέμβασης + Βορτμαννίνη ApoE<sup>(-/-)</sup>,  $p > 0.05$ , NS-Σχήμα 10) [128].

Παράλληλα, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου περιορίζει την έκταση της μυοκαρδιακής βλάβης και στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες, όπως φαίνεται από τη μείωση της TnI (Σχήμα 11) [128].



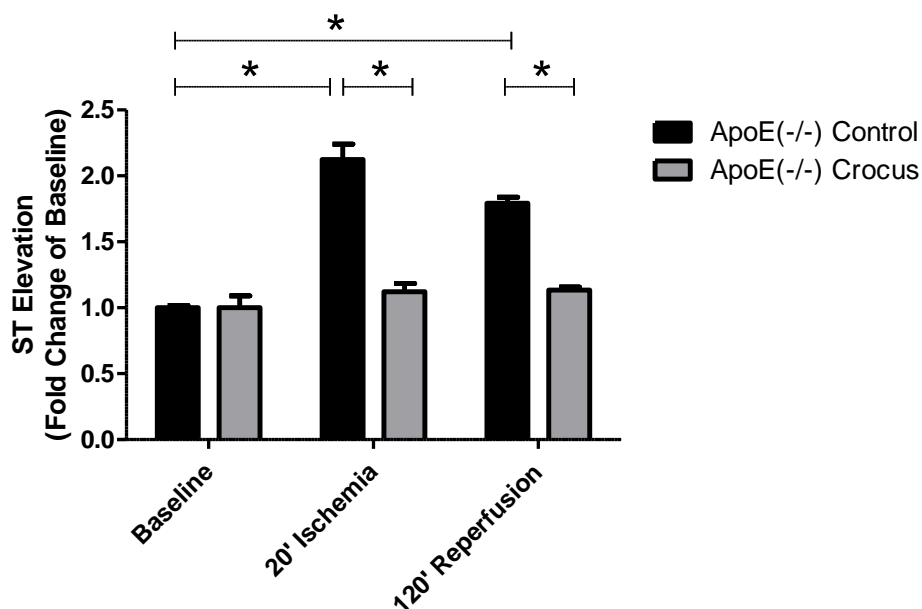
Σχήμα 12: Αντιπροσωπευτικό γράφημα του λόγου R/A % στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες ( $p > 0.05$ , NS)



Σχήμα 13: Αντιπροσωπευτικές Western Blots συνοδευόμενες από την αντίστοιχη πυκνομετρική ανάλυση της Τροπονίνης I (TnI) σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (\*p < 0.05 έναντι της ομάδας ελέγχου)

### 3.2.2 Το υδατικό εκχύλισμα κρόκου μειώνει την ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα των ApoE<sup>(-/-)</sup> μυών

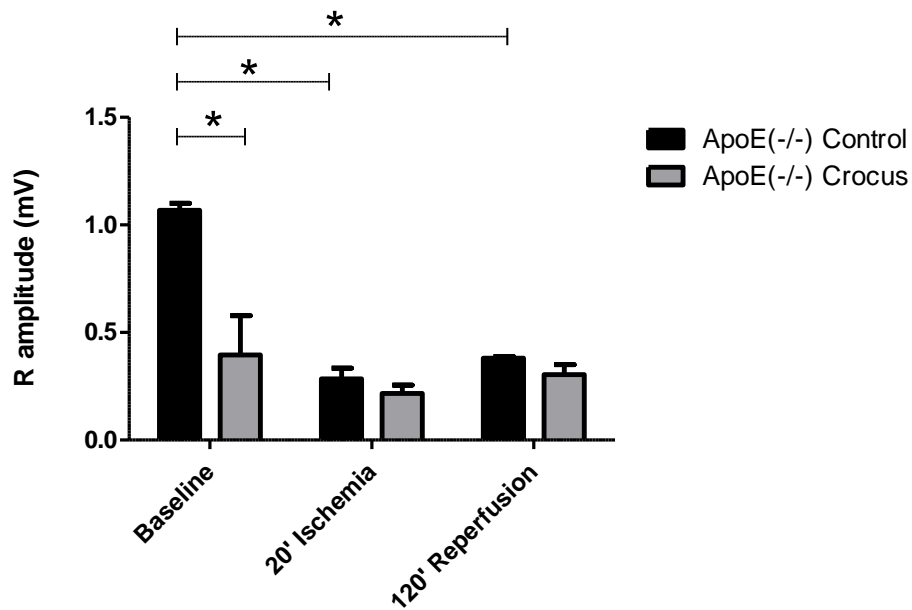
Για την ανάλυση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή στους WT μύες. Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει σημαντικά την ανάσπαση του διαστήματος ST στους ApoE<sup>(-/-)</sup> και στις 3 χρονικές στιγμές (Σχήμα 14) [128]. Συνεπώς, η προστατευτική επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου έναντι της βλάβης που υφίσταται το μυοκάρδιο κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση διατηρείται και παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας.



Σχήμα 14: Αντιπροσωπευτικό γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες που αναπαριστά την ανάσπαση του διαστήματος ST σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

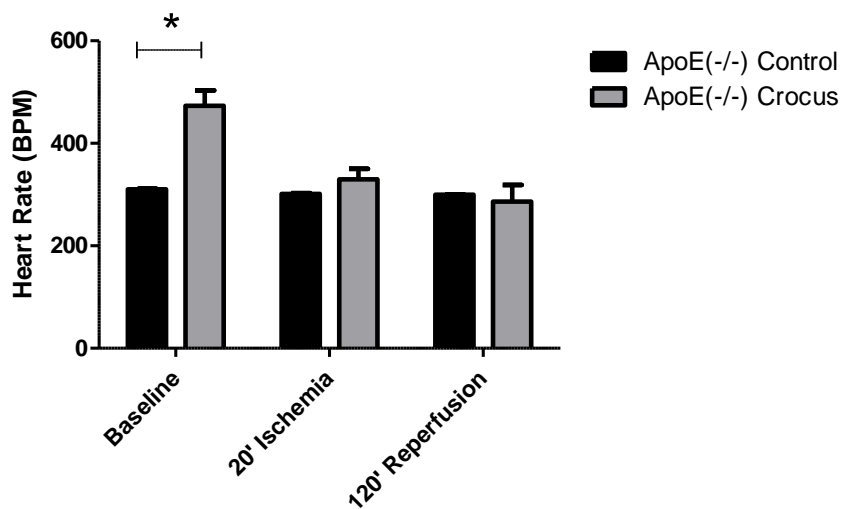
Όσον αφορά το εύρος του R, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου προκαλεί μείωσή του τη χρονική στιγμή πριν την Ισχαιμία στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες. Ωστόσο, το εύρος R δε μεταβάλλεται παρουσία κρόκου ούτε στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας ούτε στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης. Το μειωμένο εύρος R στην ομάδα ελέγχου στις δυο

τελευταίες χρονικές στιγμές διαφέρει σημαντικά με αυτό της χρονικής στιγμής πριν την ισχαιμία (Σχήμα 15) [128].



Σχήμα 15: Αντιπροσωπευτικό γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες που αναπαριστά το εύρος του διαστήματος R σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

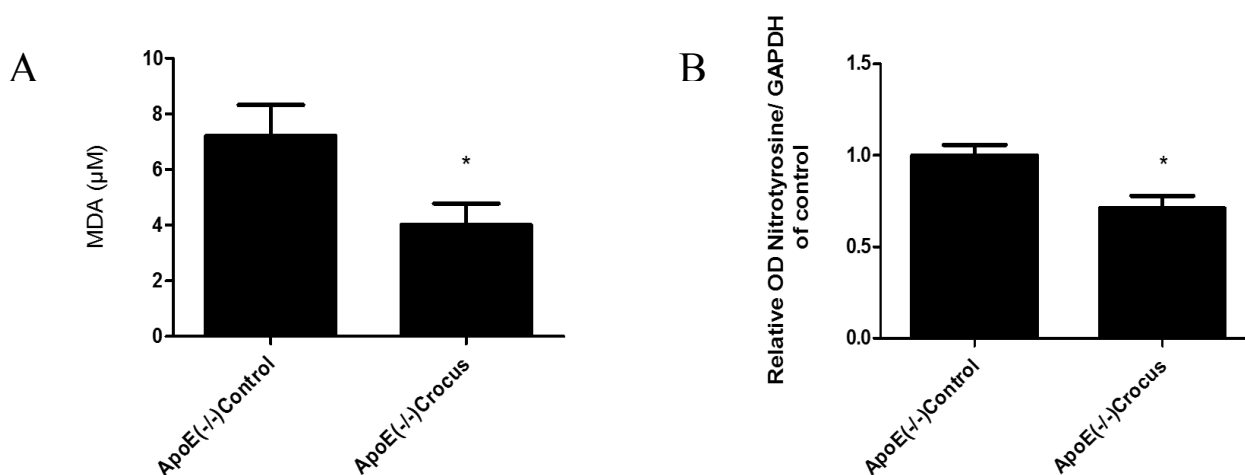
Εν αντιθέσει με τους WT μύες, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου δεν επηρεάζει την καρδιακή συχνότητα στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες παρά μόνο τη χρονική στιγμή πριν την πρόκληση ισχαιμίας (Σχήμα 16) [128].



Σχήμα 16: Αντιπροσωπευτικό γράφημα της ανάλυσης ΗΚΓ σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες που αναπαριστά την καρδιακή συχνότητα σε τρεις χρονικές στιγμές: Baseline (αμέσως πριν την Ισχαιμία), στο 20<sup>ο</sup> λεπτό της Ισχαιμίας και στο 120<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης (\*p<0.05)

### 3.2.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μειώνει τους δείκτες οξειδωτικού και νιτρο-οξειδωτικού στρες στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες

Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου στο νιτρο-οξειδωτικό στρες στους ApoE<sup>(-/-)</sup>, μετρήσαμε τα επίπεδα της MDA και της NT στον ορό και στον μυοκαρδιακό ιστό, αντίστοιχα. Η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου μειώνει σημαντικά την λιπιδική υπεροξείδωση (\*p < 0.05) και το νιτρο-οξειδωτικό στρες (\*p < 0.05) παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Σχήμα 13) [128].

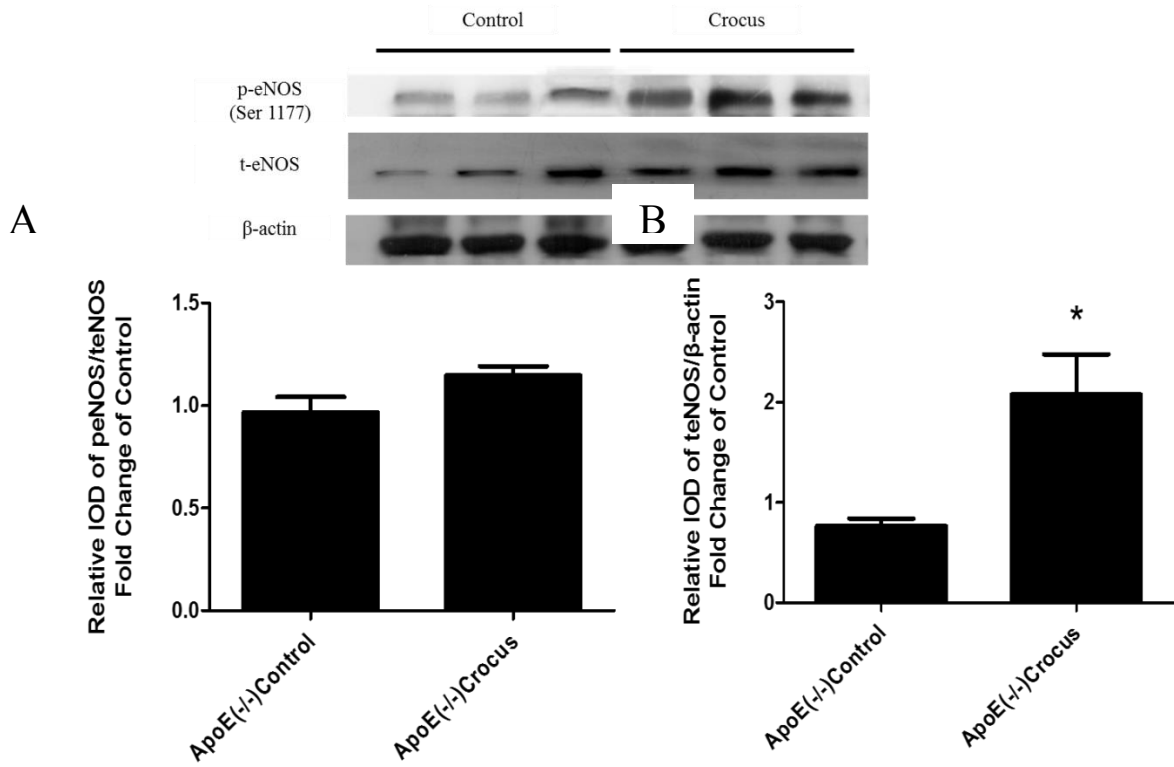


Σχήμα 17: A. Επίπεδα MDA στον ορό σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες B. Σχετική πυκνομετρική ανάλυση της Νιτροτυροσίνης (NT) κανονικοποιημένης ως προς τη β-ακτίνη (\*p < 0.05 vs Control) σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (\*p < 0.05 vs Control)

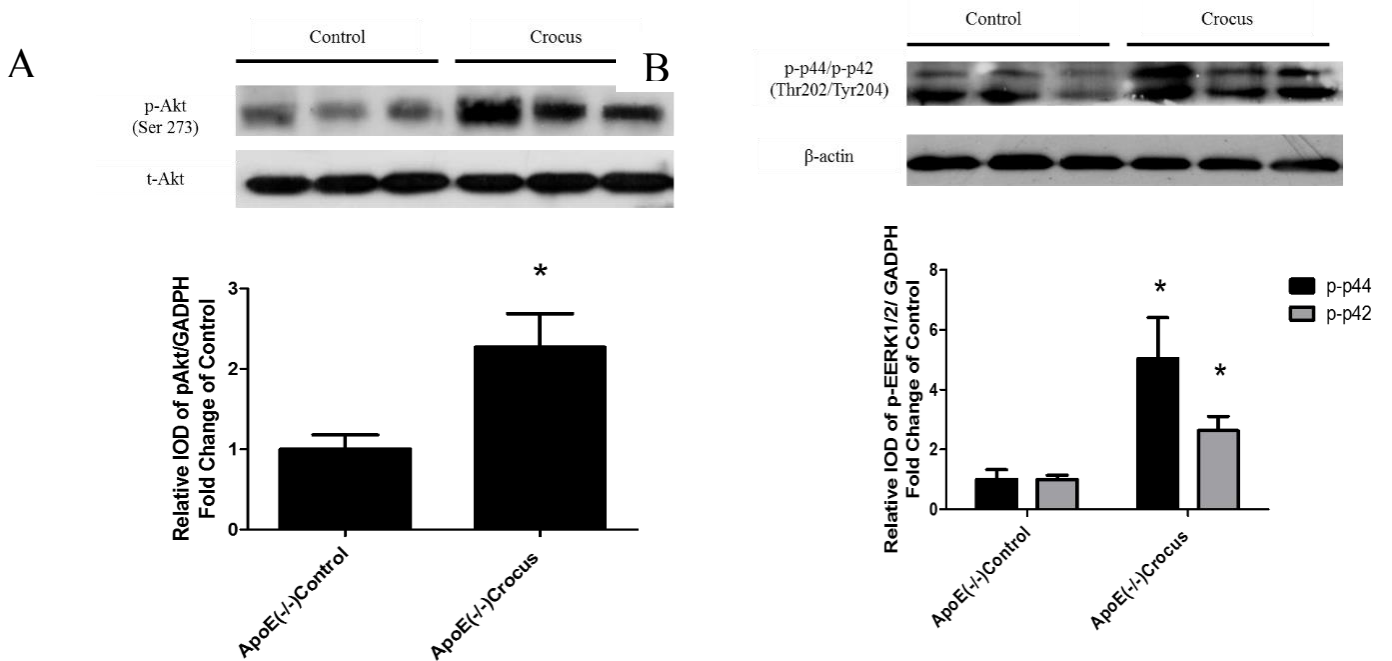
### 3.2.4 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία ενεργοποιώντας το RISK μονοπάτι, αυξάνοντας την έκφραση της eNOS και μειώνοντας την έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες

Η καρδιοπροστατευτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου διατηρείται και παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας με το μονοπάτι των κινασών διάσωσης RISK να διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο. Η χορήγηση του εκχυλίσματος κρόκου στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των Akt και ERK 1/2,

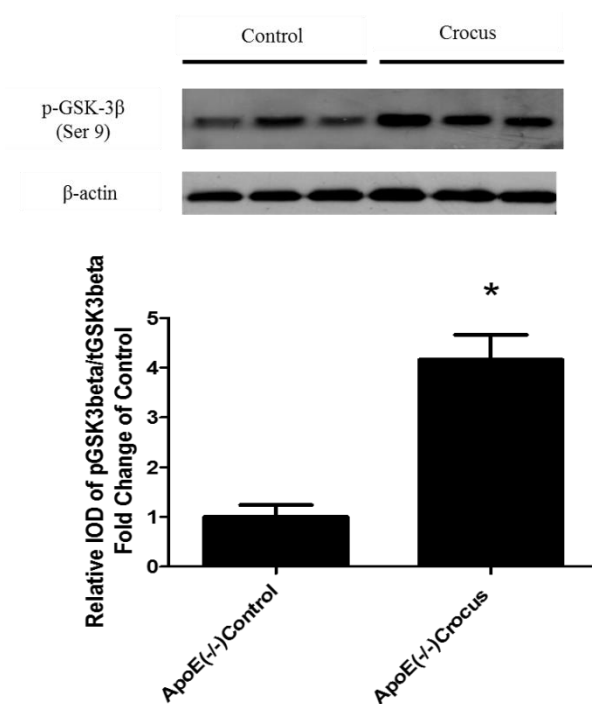
φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της GSK-3β ενώ παρατηρήσαμε ότι εκτός από ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της eNOS προκαλεί και αύξηση της έκφρασης της (Σχήματα 18-20) [128].



Σχήμα 18: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των A. p-eNOS (Ser 1177)/t-eNOS και B. t-eNOS/ $\beta$ -ακτίνη (\*p < 0.05)



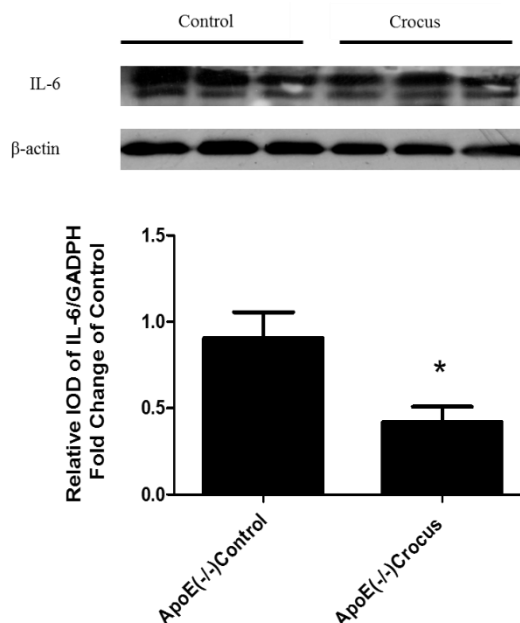
Σχήμα 19: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των A. p-Akt (Ser 273)/t-Akt και B. p-p44/p-p42 (Thr 202/Tyr 204) /β-ακτίνη (\*p< 0.05)



Σχήμα 20: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση της GSK-3β (Ser 9) κανονικοποιημένης προς τη β-ακτίνη (\*p< 0.05)

Η μείωση των επιπέδων της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 στην ομάδα παρέμβασης ApoE<sup>(-/-)</sup> ενισχύει τον προστατευτικό ρόλο που ασκεί το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου στη φλεγμονή που παρατηρείται στη βλάβη ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης (Σχήμα 17) [128]

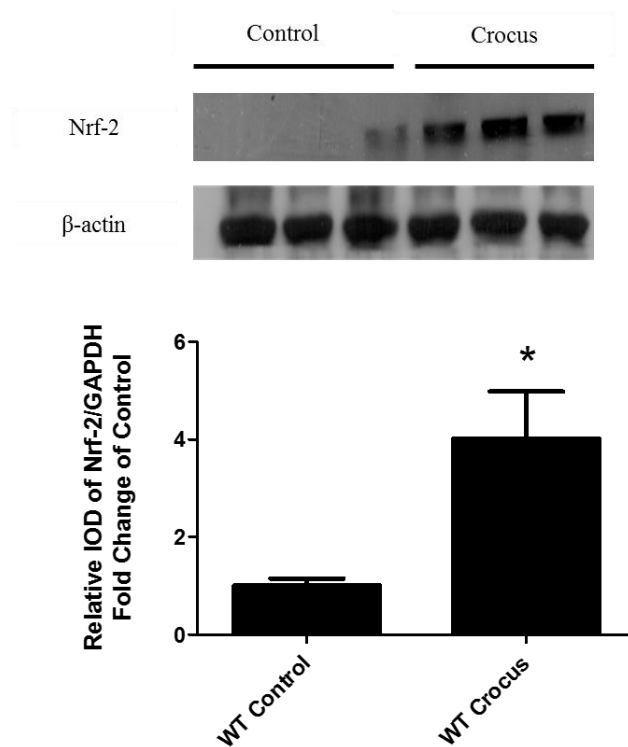




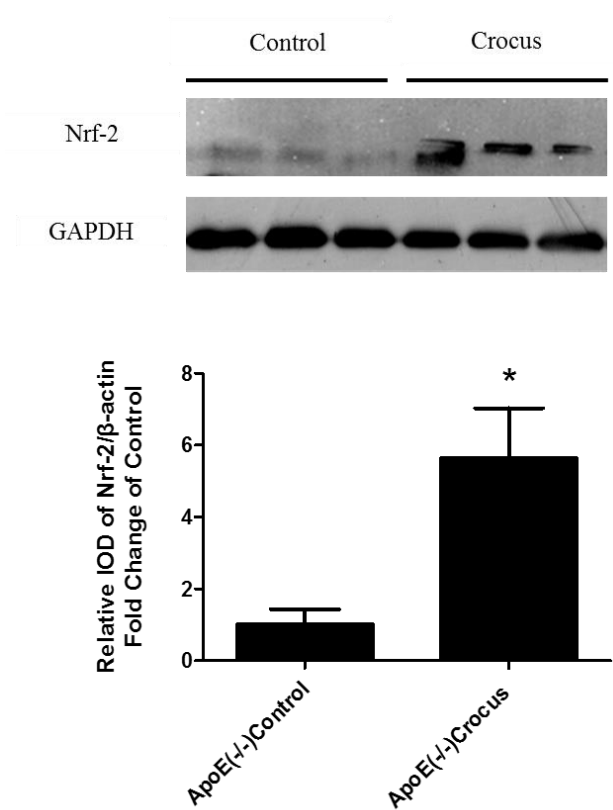
Σχήμα 21: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση της IL-6 κανονικοποιημένης προς την β-ακτίνη (\* $p < 0.05$ )

3.3 Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 και των κατώτερων μοριακών του στόχων τόσο στους Wild Type όσο και στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες

Ένα εύρημα εξέχουσας σημασίας της παρούσας εργασίας αποτελεί το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου προκαλεί αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 τόσο στους WT όσο και στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (Σχήματα 22, 23) [128]. Ο Nrf-2 είναι ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος όταν ενεργοποιείται προάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών και άλλων προστατευτικών ενζύμων, όπως η οξυγενάση της αίμης (HO-1), η Mn υπεροξειδική δεσμουτάση (Mn-SOD) κ.α . Με αυτόν τον τρόπο ενισχύει την προστασία του κυττάρου αλλά και την επιβίωσή του [45].



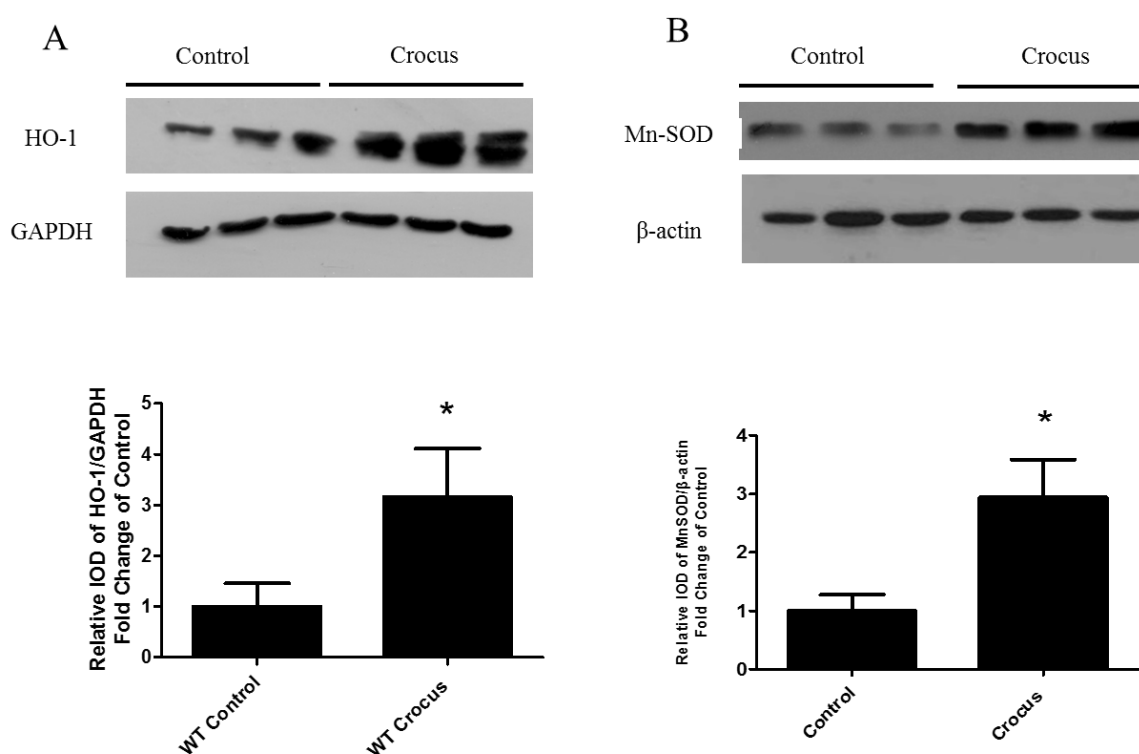
Σχήμα 23: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση του Nrf-2 κανονικοποιημένου ως προς τη  $\beta$ -ακτίνη σε WT μύες (\*p<0.05)



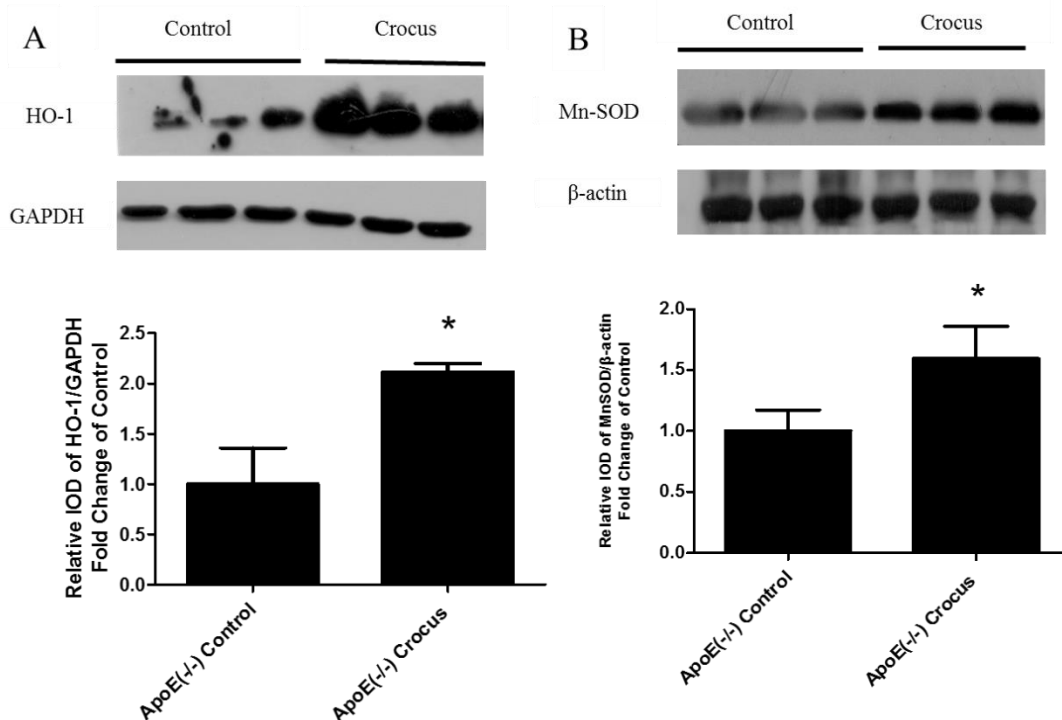
Σχήμα 24: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση του Nrf-2 κανονικοποιημένου ως προς τη GAPDH σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (\*p<0.05)

Εφόσον είδαμε ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου αυξάνει την έκφραση του Nrf-2 εξετάσαμε τα επίπεδα των κατώτερων στόχων του, HO-1 και Mn-SOD.

Παρατηρήσαμε επακόλουθη αύξηση της έκφρασης των HO-1 και Mn-SOD στους WT μύες (Σχήματα 24A και 24B) και στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (Σχήματα 25A και 25B) [128]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο καρδιοπροστατευτικός μηχανισμός του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf-2. Μάλιστα, η χορήγησή του χρονίως οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του Nrf-2 και κατ'επέκταση των μορίων-στόχων του, δηλαδή των HO-1 και Mn-SOD.



Σχήμα 24: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των: A. HO-1 κανονικοποιημένης ως προς την GAPDH και B. Mn-SOD κανονικοποιημένης ως προς τη β-ακτίνη σε WT μύες (\*p<0.05)



Σχήμα 25: Αντιπροσωπευτικές Western Blots και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των: A. HO-1 κανονικοποιημένης ως προς την GAPDH και B. Mn-SOD κανονικοποιημένης ως προς τη β-ακτίνη σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες (\*p<0.05)

#### 4. Συζήτηση

Αποδείξαμε ότι η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε δόση 60 mg/kg/ημέρα για 4 εβδομάδες ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση στο μυοκάρδιο τόσο υγιών μυών όσο και μυών με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, το υδατικό εκχύλισμα κρόκου άσκησε διατροφική προετοιμασία (nutritional preconditioning) μειώνοντας τον λόγο της εμφραγματικής προς την ισχαιμική περιοχή (I/R). Η μείωση της μυοκαρδιακής βλάβης επιβεβαιώνεται και από τα μειωμένα επίπεδα Τροπονίνης I στην ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου στο 10<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης. Επομένως, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι η καρδιοπροστατευτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου διατηρείται παρουσία συννοσηροτήτων, και ειδικότερα ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών ασθενειών του καρδιαγγειακού συστήματος, μεταξύ των οποίων η αθηροσκλήρυνση, η υπέρταση, ο διαβήτης κλπ [114]. Η χρήση ολόκληρου του εκχυλίσματος αντί των μεμονωμένων συστατικών θα μπορούσε να «μεταφραστεί» ευκολότερα στην καθημερινή κλινική πράξη ως συμπλήρωμα διατροφής σε ασθενείς με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Πρέπει να σημειώσουμε ότι οι

περισσότερες μελέτες για την καρδιοπροστατευτική δράση του Κρόκου πραγματοποιήθηκαν σε υγιή πειραματόζωα είτε *in vivo* είτε *ex vivo*. Επίσης, λίγες ήταν οι περιπτώσεις όπου η ισχαιμία/επαναιμάτωση προκλήθηκε μηχανικά [101], [104], καθώς τις περισσότερες φορές γινόταν χημικά με Ισοπροτερενόλη [16], [103] ή Δοξορουβικίνη [105]–[107]. Επιπροσθέτως, δεν εξετάστηκε η επίδραση του συνολικού εκχύλισματος Κρόκου στη μηχανικώς προκαλούμενη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αλλά των συστατικών του μεμονωμένα. Σε αυτά ακριβώς τα σημεία διαφοροποιείται και η παρούσα μελέτη.

Όσον αφορά στον μηχανισμό δράσης, αποδείξαμε ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία μέσω φωσφορυλίωσης των Akt, GSK-3β, ERK ½, eNOS σε WT και ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες, στο μυοκαρδιακό ιστό που ελήφθη κατά το 10<sup>ο</sup> λεπτό της επαναιμάτωσης. Μάλιστα, στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες ο Κρόκος εκτός από φωσφορυλίωση της eNOS προκαλεί και αύξηση της έκφρασής της. Φαίνεται ότι η προστασία που ασκείται από το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου μοιράζεται τα ίδια μονοπάτια με αυτά της IPC και της φαρμακολογικής προστασίας. Για να βεβαιώσουμε ότι οι RISK μεσολαβούν τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη του Κρόκου, σε νέα σειρά πειραμάτων χορηγήσαμε Βορτμαννίνη, έναν αναστολέα της PI3K, 15 λεπτά πριν την επαναιμάτωση. Η PI3K αποτελεί ανώτερο στόχο της Akt, μιας εκ των κινασών διάσωσης [124]. Η δόση της Βορτμαννίνης στα 60 μg/kg επιλέχθηκε με βάση προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας [123]. Παρατηρήσαμε ότι η Βορτμαννίνη καταργεί εν μέρει την καρδιοπροστατευτική δράση του υδατικού εκχύλισματος Κρόκου τόσο στα υγιή πειραματόζωα όσο και στα πειραματόζωα με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η χορήγηση Βορτμαννίνης προκαλεί αύξηση του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με τα πειραματόζωα που έλαβαν Κρόκο. Ωστόσο, το μέγεθος του λόγου I/R % στην ομάδα που έλαβε Βορτμαννίνη παραμένει μικρότερο από το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου. Επομένως, η μελέτη μας είναι η πρώτη που δείχνει ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου επάγει καρδιοπροστασία μέσω του μονοπατιού των κινασών διάσωσης. Φαίνεται ότι ο Κρόκος φωσφορυλιώνει τις κινάσες Akt και ERK ½, που ανήκουν στο RISK μονοπάτι. Η Akt, όταν φωσφορυλιωθεί ενεργοποιείται, φωσφορυλιώνοντας με τη σειρά της αφενός τη GSK-3β (η οποία απενεργοποιείται) και την e-NOS με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του NO και την αναστολή της διάνοιξης των mPTP διαύλων. Ωστόσο, η ενεργοποίηση των RISK δεν αποτελεί τη μοναδική οδό μέσω της οποίας

ασκείται η καρδιοπροστασία από τον Κρόκο καθώς φαίνεται ότι σε αυτήν συμβάλλουν η καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής [12], [26].

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε πως μόνο στα ApoE<sup>(-/-)</sup> πειραματόζωα το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου προκαλεί εκτός από φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της eNOS και αύξηση της έκφρασής της.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί που ευθύνονται για την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες είναι η αυξημένη παραγωγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου και η ελαττωμένη ενζυμική δραστηριότητα της eNOS. Αφενός, η χρόνια αναστολή του ενζύμου από τις ελεύθερες ρίζες ή τους ενδογενείς ανταγωνιστές των NOS, όπως η ασύμμετρη διμεθυλο-αργινίνη (ADMA), περιορίζουν τη δράση της eNOS στις αρτηρίες των ApoE<sup>(-/-)</sup> μυών [132]. Αφετέρου, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου επηρεάζουν την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοχάλαση όχι μόνο μέσω σχηματισμού του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτού και της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH<sub>4</sub>), ενός από τους συμπαραγόντες της ενζυματικής παραγωγής του NO [133]. Σε γενικές γραμμές, παρουσία πληθώρας παθολογικών καταστάσεων, η ενζυματική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από την eNOS δε συζεύγνυται με την οξείδωση της L-Αργινίνης, οδηγώντας στην παραγωγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) αντί NO. Ακολούθως, οι ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου αντιδρούν με το αγγειακό NO προς σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους ανιόντος (ONOO<sup>-</sup>). Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως αποσύζευξη της eNOS (eNOS uncoupling). Ο συμπαραγόντας BH<sub>4</sub> μπορεί να οξειδωθεί από το υπεροξυνιτρώδες ανιόν προς BH<sub>2</sub>. Επομένως, το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη οξείδωση και, κατά συνέπεια, εξάντληση της BH<sub>4</sub>. Επομένως, η αναγωγή της BH<sub>4</sub> θα μπορούσε να αποτελέσει αίτιο για την αποσύζευξη και δυσλειτουργία της eNOS στην παθοφυσιολογία των αγγείων [37].

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες έδειξαν ότι τα πειραματόζωα αυτά εμφανίζουν μεγαλύτερη παραγωγή ROS και ειδικά ριζών ανιόντος υπεροξειδίου [134], αυξημένη αποικοδόμηση και μειωμένα επίπεδα της BH<sub>4</sub> λόγω οξείδωσής της στην αρτηρία και το μυοκάρδιο, σε σχέση με τους WT μύες [135]–[137]. Τα ευρήματα αυτά συνέκλιναν στο συμπέρασμα ότι η αποσύζευξη της eNOS υπό παθολογικές συνθήκες οφείλεται σε ανεπάρκεια του απαραίτητου για την ενζυμική παραγωγή NO, συμπαραγόντα BH<sub>4</sub> [138].

Επιπροσθέτως, στο ενδοθήλιο, η καβεολίνη-1 (cav-1) προσδένεται και αναστέλλει τη δραστηριότητα της eNOS ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή NO και την επακόλουθη μεταγωγή σήματος. Η άμεση πρόσδεση της eNOS στην cav-1 έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή NO. Εντούτοις, η ενεργοποίηση και απομάκρυνση της eNOS από την cav-1 επιτυγχάνεται είτε μέσω ενεργοποίησης της Akt είτε μέσω αύξησης της αλληλεπίδρασης κυτοσολικού ασβεστίου/καλμοδουλίνης. Μελέτες απέδειξαν ότι η ApoE διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ της cav-1 και της eNOS στο ενδοθήλιο προβάλλοντας έναν νέο ρόλο γι αυτήν. Η τροποποίηση αυτής της ανασταλτικής αλληλεπίδρασης από την ApoE επηρεάζει την ενδοθηλιακή παραγωγή NO και τη μεσολαβούμενη από το NO χάλαση των αγγείων στον ανθρώπινο οργανισμό [114].

Επομένως, με βάση τα παραπάνω θεωρητικά και πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία μπορούμε να εξηγήσουμε το λόγο για τον οποίο το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου αυξάνει την έκφραση της eNOS μόνο παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, δηλαδή στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες. Η αντιοξειδωτική δράση διαδραματίζει και σε αυτήν την περίπτωση σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση προς τα πάνω της eNOS. Η μείωση του οξειδωτικού και του νιτρο-οξειδωτικού στρες σε συνδυασμό με την ενίσχυση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού που εκδηλώνεται με ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 και των αντιοξειδωτικών ενζύμων HO-1 και Mn-SOD εμποδίζουν την οξείδωση και εξάντληση της BH<sub>4</sub>, ενός από τους κυριότερους παράγοντες για την αποσύζευξη και ελαττωμένη δραστηριότητα της eNOS. Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση της eNOS σε συνδυασμό με την ενεργοποίησή της από την Akt οδηγούν σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και τελικά στην καρδιοπροστασία, με την τελευταία να εκδηλώνεται με περιορισμό του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής. Επιπροσθέτως, να τονίσουμε ότι στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες η δραστηριότητα της eNOS είναι έτσι κι αλλιώς ελαττωμένη λόγω της απουσίας ApoE, η οποία ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της eNOS με την cav-1 [114].

Η επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για τη διάσωσή του και τον περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε εκτενώς και στην εισαγωγή η επαναιμάτωση προκαλεί βλάβη, στην οποία σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου [139].

Η παρουσία MDA στον ορό είναι αντιπροσωπευτική της ιστικής βλάβης και κυτταρικής καταστροφής ως αποτέλεσμα της λιπιδικής υπεροξειδωσής και αποτελεί δείκτη του οξειδωτικού στρες [140]. Ωστόσο η MDA μπορεί να προκαλέσει και μόνη της σοβαρή κυτταρική βλάβη, καθώς αντιδρά με τις ελεύθερες αμινοομάδες των πρωτεϊνών, τα φωσφολιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα οδηγώντας σε δομική τροποποίηση, η οποία επάγει με τη σειρά της τη δυσλειτουργία των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού[18], [104].

Η αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος Κρόκου αποδίδεται στη συνεργειστική δράση των κύριων (Κροκίνη, Σαφρανάλη) με τα δευτερεύοντα συστατικά του [92].

Σε *in vitro* πείραμα αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης της κροκίνης σε κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυττώματος PC12, αποδείχθηκε ότι σε συγκέντρωση 10 mM αφενός αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση, αποκαθιστά μερικώς τη δραστηριότητα της SOD και διατηρεί τη μορφολογία των κυττάρων και αφετέρου είναι πιο αποτελεσματική από την αντίστοιχη συγκέντρωση τοκοφερόλης-α [141]. Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου και η Κροκίνη περιόρισαν την έκταση της λιπιδικής υπεροξειδωσής όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων MDA στη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στους νεφρούς. Μάλιστα, το εκχύλισμα είχε αποτελεσματικότερη δράση σε σχέση με την Κροκίνη μόνη της [122]. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι και η Σαφρανάλη ασκεί αντιοξειδωτική δράση σε *in vivo* μοντέλο εγκεφαλικής ισχαιμίας [17]. Από τους περιεχόμενους γλυκοσίδες του κρόκου (όλοι έχουν ως άγλυκο την Κροκετίνη), την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση την έχει η Κροκίνη τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* μοντέλο νευρωνικής βλάβης πιθανώς προκαλώντας εμμέσως αύξηση της έκφρασης του γονιδίου γ-GCS και επομένως της Γλουταθειόνης [142]. Η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε δόση 100 mg/kg για 7 ημέρες πριν από την πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης επέφερε σημαντική ενίσχυση στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT και SOD [143]. Η Κροκετίνη εκτός από αντιοξειδωτική δράση που εκδηλώνεται με μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσής και ενίσχυση της ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας διαθέτει και αντιαθηρογόνο δράση καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL σε υπερλιπιδαιμικούς κόνικλους [144].



Όσον αφορά τις δράσεις του Κρόκου και των δραστικών συστατικών του στο καρδιαγγειακό σύστημα, η Κροκετίνη σε δόσεις 25 και 59 mg/kg/ημέρα περιόρισε σημαντικά την έκταση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και αύξησε τη δραστηριότητα των SOD και GSHPx σε καρδιακή υπερτροφία από Νορεπινεφρίνη. Ο μηχανισμός της προστασίας που ασκεί αποδίδεται στην ενίσχυση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος και στην άμεση αντιοξειδωτική δράση [102]. Η καρδιοπροστατευτική δράση της Κροκίνης αλλά και του Κρόκου έναντι της τοξικότητας της Ισοπροτερενόλης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Στα πειραματόζωα που χορηγήθηκαν παρατηρήθηκε: αποκατάσταση της δράσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων (αυξημένα επίπεδα SOD, CAT, GSH), περιορισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης (μειωμένα επίπεδα TBARS) και κατά συνέπεια μειωμένη διαρροή των ενζύμων CK-MB και LDH λόγω διατήρησης της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης [16], [85], [103].

Η Σαφρανάλη προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων Νιτροτυροσίνης (NT) σε μυοκάρδιο που έχει υποστεί βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Παράλληλα, προκαλεί αυξημένη ρύθμιση της Mn-SOD. Προτάθηκε ότι η Σαφρανάλη ασκεί την προστατευτική αυτή δράση είτε δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και ασκώντας άμεση αντιοξειδωτικό ρόλο είτε έμμεσα αναστέλλοντας ή επάγοντας μονοπάτια της βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (IKK-β/NF-κB και Akt/GSK-3β αντίστοιχα) με αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή ROS ή και ενίσχυση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού [101].

Σε ex vivo μοντέλο καρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, αποδείχθηκε ότι η Κροκίνη ασκεί αντιοξειδωτική δράση επιφέροντας μείωση των επιπέδων MDA και αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων CAT και SOD με τα αποτελέσματα αυτά να είναι αθροιστικά με συνχορήγηση βιταμίνης E [84]. Η Κροκετίνη σε δόση 50 mg/kg/ημέρα για 1 εβδομάδα περιορίζει την έκταση του εμφράγματος που προκλήθηκε από τη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και ο μηχανισμός περιλαμβάνει αυξημένα επίπεδα SOD και μειωμένα επίπεδα MDA, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, αντίστοιχα [104].

Μελετώντας τη βιβλιογραφία, όλα τα ευρήματα συγκλίνουν στο εξής: τα εκχυλίσματα του Κρόκου και τα δραστικά συστατικά του προσφέρουν

αποτελεσματική προστασία έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μέσω μείωσης της παραγωγής ROS, αύξηση της δέσμευσής τους και ενίσχυσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αποτέλεσμα των δράσεων αυτών είναι η διάσωση των μυοκαρδιακών κυττάρων από τη νέκρωση αλλά και η αποκατάσταση της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου.

Με τη σειρά μας αποδείξαμε ότι το εκχύλισμα Κρόκου χορηγούμενο για 4 εβδομάδες σε δόση των 60 mg/kg/ημέρα για 4 εβδομάδες σε C57BL/6J μύες και ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες μειώνει τη μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης περιορίζοντας το βαθμό του οξειδωτικού και του νιτρο-οξειδωτικού στρες.

Στην παρούσα μελέτη, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι ο δείκτης φλεγμονής που επιλέχθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου στον περιορισμό της φλεγμονής κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Η IL-6 είναι μία κυτταροκίνη που ρυθμίζει την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού απέναντι σε μεγάλη ποικιλία παθοφυσιολογικών ερεθισμάτων. Οι πλειοτροπικές της δράσεις περιλαμβάνουν τη διέγερση της διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων, την ενεργοποίηση των μακροφάγων ενώ φαίνεται ότι εμπλέκεται στην καρδιακή αναδιαμόρφωση και στην παραγωγή των πρωτεϊνών οξείας φάσης από το ήπαρ [131], [145], [146]. Η IL-6 παράγεται από πολλά κύτταρα του οργανισμού όπως από μονοκύτταρα/μακροφάγα, ουδετερόφιλα αλλά και ενδοθηλιακά κύτταρα και οστεοβλάστες [25]. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι η σύνθεση της IL-6 αποτελεί καθοριστικό σημείο της αντίδρασης του οργανισμού έναντι της βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και σχετίζεται με την επαγωγή της ICAM-1 στα μυοκαρδιακά κύτταρα [25]. Η ρύθμιση προς τα πάνω του TNF-α που παρατηρείται στο έμφραγμα του μυοκαρδίου ενδεχομένως προκαλεί με τη σειρά του, την παραγωγή της IL-6. Η έκφρασή της στην αριστερή κοιλία αυξάνεται τις πρώτες 24 ώρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου και τα επίπεδά της στο πλάσμα και στον ιστό της αριστερής κοιλίας παραμένουν υψηλά τις 3 πρώτες μέρες. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η IL-6 εκφράζεται στην ισχαιμική περιοχή του επαναιματούμενου μυοκαρδίου, συνεπώς συμμετέχει στη σηματοδότηση σε αυτήν την περιοχή και παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία που ακολουθεί μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου [131]. Επιπροσθέτως, η IL-6 είναι αυξημένη σε ασθενείς με φλεγμονώδη νοσήματα και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνητότητας μετά από καρδιαγγειακά συμβάντα. Η

κυκλοφορούσα IL-6 είναι συχνά αυξημένη σε ασθενείς με STEMI και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση [146].

Ο Κρόκος και τα δραστικά του συστατικά ασκούν ισχυρό αντιφλεγμονώδη ρόλο, όπως έχει μελετηθεί και αποδειχθεί σε πληθώρα πειραματικών μοντέλων και νόσων [101], [147]–[149]. Σε υπερχοληστερολαιμικούς κόνικλους, η χορήγηση Κροκετίνης για 8 εβδομάδες μέσω της τροφής ανέστειλε το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας μειώνοντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την έκφραση πολλών πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη φλεγμονή, την απόπτωση κ.α. [150]. Η μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του αγγειακού μορίου κυτταρικής προσκόλλησης (Vascular cell adhesion molecule-1-VCAM-1), που εμπλέκεται στην αθηρογένεση ενισχύοντας την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και την περαιτέρω διήθηση μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα [151]. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι η Κροκετίνη ασκεί προστατευτική δράση σε μοντέλο καρδιακής υπερτροφίας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* ρυθμίζοντας τα μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονή καθώς μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της μονοκυτταρικής χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1), της ιντερλευκίνης 1 (IL-1) και της έκφρασης του TNF-α. Τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται στην ανασταλτική της επίδραση επί του NF-κΒ καθώς η Κροκετίνη εμποδίζει την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στο DNA και την πρωτεϊνική έκφραση. Η Κροκετίνη φαίνεται ότι αναστέλλει τη δράση της κινάσης IKK, χωρίς να επηρεάζει την έκφρασή της. Ο φυσιολογικός ρόλος της IKK είναι η φωσφορυλίωση του IκΒ (αρνητικού ρυθμιστή του NF-κΒ) και κατά συνέπεια η αποικοδόμησή του αφήνοντας τον NF-κΒ ελεύθερο να επιτελέσει τη λειτουργία του. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, η Κροκετίνη εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του NF-κΒ, αναστέλλει τη φλεγμονή ήδη από τα πρώτα στάδια και ρυθμίζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια πολλών κυτταροκινών [152].

Η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κΒ και η μειωμένη παραγωγή των TNF-α και IL-6 εμπλέκονται στην προστατευτική δράση της Κροκετίνης στην καρδιακή και νεφρική βλάβη που οφείλονται σε αιμορραγικό σοκ. Στο μηχανισμό αυτό εμπλέκονται τόσο η εξάλειψη των ROS και η ενίσχυση της δραστηριότητας της SOD όσο και η μειωμένη δραστηριότητα της iNOS και των φλεγμονωδών κυτταροκινών, TNF-α και IL-6 [140], [153].

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η ερευνητική ομάδα του Bharti ήταν η πρώτη που απέδειξε ότι η Σαφρανάλη, χορηγούμενη για 14 ημέρες σε επίμυες, ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της βλάβης που προκαλείται από την ισχαιμία και την επακόλουθη επαναιμάτωση. Φαίνεται ότι η Σαφρανάλη αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα το μονοπάτι των IKK-b/NF-κB, όπως επίσης και πολλών κατώτερων μοριακών στόχων του, δηλαδή του TNF-α, της κασπάσης 3, της Nox 4 και της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Η αναστολή αυτή πιθανώς οφείλεται στην φωσφορυλίωση των Akt/GSK-3β/eNOS από τη Σαφρανάλη. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι ο περιορισμός της φλεγμονής (επιβεβαιώθηκε και ιστολογικά), η αναχαίτιση της απόπτωσης και η μειωμένη παραγωγή ROS [101]. Ομοίως με τη Σαφρανάλη, αποδείχτηκε ότι και η Κροκετίνη χορηγούμενη σε δόση 50mg/kg/ημέρα για 7 ημέρες, ασκεί καρδιοπροστασία σε μυοκάρδιο επίμυων υφιστάμενο βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Μάλιστα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα TNF-α με ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης αντιφλεγμονωδών παραγόντων, όπως της Ιντερλευκίνης 10 (IL-10) [104].

Η Κροκίνη αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την έκφραση της iNOS σε μακροφάγα διεγερόμενα από LPS, επηρεάζοντας την απελευθέρωση του NO από αυτά. Παράλληλα, η Κροκίνη αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την αποικοδόμηση του IκB-α και τη μετακίνηση του Nf-κB από το κυτοσόλιο στον πυρήνα, εμποδίζοντας την p65 υπομονάδα του τελευταίου να προσδεθεί στο DNA και να ξεκινήσει την έκφραση πρωτεϊνών-στόχων. Δεδομένου ότι ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή, η Κροκίνη ενδεχομένως αναστέλλει την έκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο TNF-α, η IL-6 και η IL-1β [55].

Στη μελέτη μας αποδείξαμε ότι η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε WT και ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες για 4 εβδομάδες προκαλεί μείωση των επιπέδων της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 και επομένως ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση έναντι της μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Οι προηγούμενες μελέτες που εξέταζαν την αντιφλεγμονώδη δράση του Κρόκου σε διάφορα μοντέλα φλεγμονής σχετιζόμενης ή μη με ισχαιμία αφορούσαν τα μεμονωμένα συστατικά του εκχυλίσματος [55], [101], [104], [112], [147], [152]. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του Κρόκου φαίνεται ότι οφείλονται στην υψηλή αντιοξειδωτική του ικανότητα [147]. Οι ROS ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης όπως αυτό των MAPKs και εκείνο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, τα οποία ως γνωστόν

ρυθμίζουν την έκφραση πληθώρας προφλεγμονωδών κυτταροκινών [154]. Επομένως, το υδατικό εκχύλισμα του Κρόκου ασκεί έμμεσα αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και της ενίσχυσης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Η επίδραση του Κρόκου και των δραστικών του συστατικών στην ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά της καρδιάς δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ελάχιστα. Η οξεία χορήγηση υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος Κρόκου κατά τη διάρκεια πειραματικά προκαλούμενης κολπικής μαρμαρυγής σε απομονωμένο κολποκοιλιακό κόμβο κονίκλων προκάλεσε αύξηση του χρόνου αγωγής και της αντίστασης (refractoriness) του κολποκοιλιακού κόμβου, επηρεάζοντας τις εξαρτώμενες από το ρυθμό ιδιότητές του. Η καταστολή αυτή μεσολαβήθηκε από το ενδογενές παραγόμενο NO, καθώς τα αποτελέσματα αυτά δεν παρατηρήθηκαν κατά τη χορήγηση του αναστολέα της συνθέσεως του NO, L-NAME [155]. Η αναδιαμόρφωση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της καρδιάς λόγω της αύξησης της αντίστασης του κολποκοιλιακού κόμβου εξηγεί και την παρατηρούμενη μείωση της κοιλιακής ταχυκαρδίας σε ex vivo μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [113]

Την ίδια χρονιά εξετάστηκαν οι ηλεκτροκαρδιογραφικές μεταβολές που προκλήθηκαν σε επίμυες μετά τη χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε 3 διαφορετικές δόσεις (50, 100 και 200 mg/kg/ημέρα) για 7 ημέρες. Οι παρατηρούμενες μεταβολές περιλάμβαναν την παράταση του κύματος P, του συμπλέγματος QRS και των διαστημάτων PR, QTc και JT και πιθανώς οφείλονταν σε αλλαγή της έκφρασης ή της διαπερατότητας των ιοντικών διαύλων που ευθύνονται για την παραγωγή και τη διάδοση του δυναμικού ενέργειας στα καρδιακά κύτταρα. Το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου σε υψηλές δόσεις επιβραδύνει την ταχύτητα της ηλεκτρικής αγωγιμότητας τόσο στους κόλπους όσο και στις κοιλίες και επίσης προκαλεί καθυστέρηση στην επαναπόλωση των κοιλιακών κυττάρων αυξάνοντας τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας. Η αρνητική χρονότροπος δράση που αναφέρθηκε προηγουμένως [108] επιβεβαιώθηκε μόνο στις 2 υψηλότερες δόσεις του εκχυλίσματος καθώς η δόση των 50 mg/kg/ημέρα προκάλεσε σημαντική ενίσχυση της καρδιακής συχνότητας [156].

Η Κροκίνη σε δόση 10mg/kg/ημέρα για 3 εβδομάδες οδήγησε παρουσία καρδιοτοξικότητας από Δοξορουβικίνη σε πτώση της καρδιακής συχνότητας και σε

σημαντική βελτίωση της εικόνας του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, πλην μίας ελαφράς αύξησης του πλάτους του συμπλέγματος QRS. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του εύρους του κύματος P και αποκατάσταση του επάρματος ST και του σχήματος του κύματος T [112].

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου προκάλεσε αύξηση της καρδιακής συχνότητας στους WT μύες και στις 3 χρονικές στιγμές (γραμμή βάσης, 20° λεπτό ισχαιμίας, 120° λεπτό επαναιμάτωσης), η οποία οφείλεται στο μέγεθος της δόσης που επιλέξαμε στα 60 mg/kg/ημέρα, καθώς ο κρόκος, όπως αναφέραμε [156] προκαλεί αύξησή της σε δόσεις πλησίον των 50 mg/kg/ημέρα. Στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες η αύξηση της καρδιακής συχνότητας παρατηρήθηκε μόνο κατά τη γραμμή βάσης, πιθανώς λόγω της παρουσίας ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και κατά συνέπεια της μεγαλύτερης επιρρέπειας στην υποτασική και αρνητική χρονότροπη δράση της ξυλαζίνης που χρησιμοποιήθηκε στην αναισθησία [157]. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας παρατηρήθηκε ανύψωση του επάρματος ST στους WT και τους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες των ομάδων ελέγχου. Η ανύψωση αυτή διατηρήθηκε και στην επαναιμάτωση παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ενώ επανήλθε στους WT μύες. Ωστόσο, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι στους WT μύες που έλαβαν υδατικό εκχύλισμα Κρόκου η ανύψωση του επάρματος ST ήταν σημαντικά μικρότερη στην ισχαιμία, και μάλιστα σε επίπεδα ίδια με αυτά της γραμμής βάσης. Όσον αφορά τους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του επάρματος ST τόσο στην ισχαιμία όσο και την επαναιμάτωση.

Η αύξηση του εύρους του κύματος R που παρατηρείται κατά την οξεία ισχαιμία εξηγείται από την καθυστερημένη αγωγή διαμέσου των ινών Purkinje στην ισχαιμική περιοχή [130]. Στους WT μύες η χορήγηση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του εύρους R πριν και κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, χωρίς σημαντική επίδραση στην επαναιμάτωση. Αντιθέτως, παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, η μείωση αυτή επετεύχθη μόνο πριν την ισχαιμία καθώς παρατηρήθηκε γενικότερα μείωση του εύρους R κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση.

Η οξεία ενεργοποίηση του Nrf-2 έχει αποδειχθεί ότι είναι καρδιοπροστατευτική μετά από ένα επεισόδιο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Πειραματικά δεδομένα από μυοκάρδιο

επίμυων έδειξαν ότι περίσφιξη του πρόσθιου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας για αρκετή ώρα οδήγησε σε μείωση των επιπέδων Nrf-2 στον πυρήνα. Εντούτοις, η IPC συμβάλλει στην πρόληψη αυτής της μείωσης. Πρόκειται για εύρημα εξέχουσας σημασίας, καθώς προτείνει ότι η απαραίτητη προϋπόθεση για να ξεκινήσει ο Nrf-2 την αντιοξειδωτική άμυνα έναντι του επαγόμενου από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης οξειδωτικού στρες είναι η διάρκεια της προηγηθείσας ισχαιμίας [158]. Εξάλλου, υπενθυμίζεται ότι σε παρατεταμένο στρες, ο Nrf-2 μερικώς απενεργοποιείται [46]. Εναλλακτικά, η ισχαιμική προετοιμασία θα μπορούσε να δράσει ως ένα πρώιμο σήμα κινδύνου που θα ενεργοποιούσε τον Nrf-2 πριν από ένα παρατεταμένο επεισόδιο ισχαιμίας. [158].

Η εφαρμογή IPC σε απομονωμένη καρδιά κονίκλων κινητοποιεί μέσω ενεργοποίησης της PKC τη μεταφορά του Nrf-2 στον πυρήνα και την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής προστασίας. Η τελευταία επιτυγχάνεται με ρύθμιση προς τα πάνω της έκφρασης των HO-1 και Mn-SOD, τα γονίδια των οποίων αποτελούν στόχους του Nrf-2. Η χρήση αναστολέα της PKC (Πολυμυξίνη Β) ανέστειλε την ενεργοποίηση και τη μεταφορά στον πυρήνα του Nrf-2 περιορίζοντας την καρδιοπροστατευτική δράση της IPC και τεκμηριώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η PKC αποτελεί ανώτερο μοριακό στόχο του Nrf-2 κατά την ισχαιμική προετοιμασία [48]. Πρόσφατη έρευνα από τον Huang και τους συνεργάτες του έδειξε ότι η ενεργοποίηση του άξονα Nrf-2/ARE είναι υπεύθυνη για την επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων (HO-1, Mn-SOD) σε κυτταρικό μοντέλο υποξικής προετοιμασίας. Μάλιστα παρατήρησαν αυξημένη μετατόπιση του Nrf-2 στον πυρήνα μαζί με αυξημένη αλληλεπίδρασή του με τις ARE αλληλουχίες που εντοπίζονται στην προωθητική περιοχή των γονιδίων των HO-1 και Mn-SOD. Επομένως, το μονοπάτι Nrf-2/ARE φαίνεται ότι συμμετέχει στη μεσολαβούμενη από την υποξική προετοιμασία καρδιοπροστασία [53].

Με βάση τις παραπάνω μελέτες γίνεται αντιληπτό ότι η καρδιοπροστασία που εξασφαλίζει η IPC σχετίζεται με την ενεργοποίηση του Nrf-2 και την επαγωγή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων HO-1 και Mn-SOD. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν απαραίτητους μεσολαβητές της άμυνας των κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [48], [53]

Η Κροκίνη, ένα από τα δραστικά συστατικά του κρόκου, έχει ταυτοποιηθεί ως ενεργοποιητής του Nrf-2 in vivo και in vitro [55], [147]. Η χορήγηση Κροκίνης σε 3

διαφορετικές συγκεντρώσεις (50, 100, and 200 ppm) για 15 εβδομάδες μέσω της τροφής αναστέλλει την ανάπτυξη κολίτιδας και τη σχετιζόμενη με αυτήν καρκινογένεση στο έντερο. Η μελέτη επαναλήφθηκε με το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαφορά ότι η διάρκεια ήταν 4 εβδομάδες και στόχος ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης Κροκίνης. Βρέθηκε, λοιπόν ότι οι δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις (100 και 200 ppm) Κροκίνης προκαλούν στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του Nrf-2 τόσο στο κόλον υπό φλεγμονή όσο και στα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος. Ωστόσο η μελέτη αυτή δεν κατάφερε να αποσαφηνίσει το μηχανισμό με τον οποίο η Κροκίνη προκαλεί επάγει την έκφραση του Nrf-2 [147].

Η ενεργοποίηση του Nrf-2 από την Κροκίνη φαίνεται ότι αποτελεί μέρος του μηχανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η καταστολή της iNOS σε μακροφάγα διεγερόμενα από λιποπολυσακχαρίτη/LPS. Ειδικότερα, η Κροκίνη επάγει δόσοεξαρτώμενα τη μετατόπιση του Nrf-2 στον πυρήνα, την πρόσδεσή του στην αλληλουχία ARE και τα επίπεδα mRNA της HO-1, επομένως πρώτα ενεργοποιεί τον Nrf-2 και στη συνέχεια αυξάνει την έκφραση της HO-1. Η ενεργοποίηση του Nrf-2 από την Κροκίνη πραγματοποιείται μέσω ταχείας αύξησης του κυττοσολικού ασβεστίου με επακόλουθη ενεργοποίηση των CAMK4, Akt, ERK  $\frac{1}{2}$ , και JNK. Η μεσολαβούμενη από την Κροκίνη εκροή ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες φαίνεται ότι διεγείρει την απελευθέρωση και μεταφορά στον πυρήνα του Nrf-2. Παράλληλα, η Κροκίνη φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις Akt, ERK  $\frac{1}{2}$ , και JNK, κινάσες που έχουν ταυτοποιηθεί ως ανώτεροι στόχοι της επαγόμενης από τον Nrf-2 έκφραση της HO-1. Συνεπώς, η Κροκίνη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση ρυθμίζοντας προς τα πάνω την έκφραση της HO-1 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των CAMK4-PI3K/Akt-Nrf2 in vitro [55].

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αποδεικνύει ότι το υδατικό εκχύλισμα του Κρόκου αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 σε μοντέλο μυοκαρδιακής βλάβης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, τόσο στους WT όσο και στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες. Μάλιστα αυτή η αύξηση της έκφρασης προκαλείται χρονίως, καθώς το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου χορηγήθηκε για 4 εβδομάδες σε δόση 60 mg/kg βάρους /ημέρα. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι, αφενός η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων HO-1 και Mn-SOD, που αποτελούν κατώτερους μοριακούς στόχους του Nrf-2 και αφετέρου η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής προστασίας και ο περιορισμός του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με τη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Η



αυξημένη έκφραση του Nrf-2 οφείλεται τόσο σε έμμεση όσο και σε άμεση δράση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου. Έμμεσα, διότι αποδείξαμε ότι το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου φωσφορυλιώνει τις Akt, ERK ½ και GSK-3β, ενεργοποιώντας τις 2 πρώτες και απενεργοποιώντας την τελευταία. Αναφέραμε και νωρίτερα ότι οι Akt και ERK ½ μπορούν να ενεργοποιήσουν, με τη σειρά τους, τον Nrf-2 καταλύοντας τη φωσφορυλιώσή του και κατά συνέπεια τη μεταφορά του στον πυρήνα. Από την άλλη πλευρά, η απενεργοποίηση της GSK-3β σημαίνει ότι η κινάση Fyn παραμένει ανενεργή και δε μπορεί να απομακρύνει το Nrf-2 από τον πυρήνα [39].

Η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου είναι και άμεση, όπως αποδείχθηκε σε *in vitro* μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Φαρμακολογίας του πανεπιστημίου της Μαδρίτης υπό την εποπτεία των καθηγητών Manuela G. Lopez και Raphael Leon. Σε κυτταρική σειρά AREc32, το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1,3,10, 30 και 60 μg/ml) επάγει τον Nrf-2 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η επαγωγή αυτή μετράται μέσω της αύξησης της δραστηριότητας της Λουσιφεράσης (Luciferase). Μέγιστη επαγωγή του Nrf-2 παρατηρήθηκε στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις: 30 μg/ml (αύξηση επί 2) και 60 μg/ml (αύξηση επί 5). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι συγκεντρώσεις αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τη δόση που επιλέχθηκε για τη χορήγηση του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου στους μύες.

##### 5. Συμπεράσματα

Η χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε Wild Type και ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες για 4 εβδομάδες σε δόση 60 mg/kg/ημέρα περιόρισε το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής στο υποβαλλόμενο σε 30 λεπτά ισχαιμίας, ακολουθούμενης από 120 λεπτά επαναιμάτωσης μυοκάρδιο. Παράλληλα, μείωσε την ανάσπαση του διαστήματος ST, περιόρισε την έκταση της μυοκαρδιακής βλάβης (μειωμένα επίπεδα TnI), του οξειδωτικού και νιτρο-οξειδωτικού στρες (μείωση MDA, NT) και μείωσε τα επίπεδα των προφλεγμονωδών μεσολαβητών (IL-6). Η ασκούμενη από τον Κρόκο καρδιοπροστασία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των Akt, ERK ½, eNOS και απενεργοποίηση της GSK-3β, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την αναστολή της καρδιοπροστατευτικής δράσης με χορήγηση Βορτμαννίνης. Στους ApoE<sup>(-/-)</sup> μύες, παρατηρήθηκε εκτός από την ενεργοποίηση και αύξηση της έκφρασης της eNOS. Τέλος, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 και τα αυξημένα επίπεδα

των κατώτερων μοριακών στόχων του, HO-1 και Mn-SOD διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην προστασία που επιφέρει το υδατικό εκχύλισμα Κρόκου στο OEM απουσία και παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας.

## 6. Μελλοντικές Προοπτικές

Το OEM, η συνηθέστερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου, αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας στον αναπτυγμένο κόσμο [2]. Αν και το ποσοστό των ασθενών που επιβιώνουν από ένα επεισόδιο OEM έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια χάρις στην πρόοδο που σημειώνεται στις τεχνικές επαναιμάτωσης, την αγγειοπλαστική και τους φαρμακολογικούς θρομβολυτικούς παράγοντες, το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζει καρδιακή ανεπάρκεια παραμένει υψηλό. Βασική αιτία αποτελεί το μέγεθος του εμφράκτου, το οποίο καθορίζεται από τη βλάβη που υφίσταται το μυοκάρδιο τόσο στην ισχαιμία όσο και την επαναιμάτωση [11]. Οι σύγχρονες στρατηγικές καρδιοπροστασίας αποσκοπούν στη μείωση της εμφραγματικής περιοχής, όμως παρά τα ενθαρρυντικά τους αποτελέσματα σε προκλινικές μελέτες, η μετάφρασή τους στην καθημερινή κλινική πράξη καθίσταται δυσχερής [10]. Ωστόσο, τα ευεργετικά αποτελέσματα των λειτουργικών τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία σε συνδυασμό με την ευκολία χορήγησής τους μέσω της διατροφής και την απουσία ανεπιθύμητων ενεργειών των χημικά συντιθέμενων φαρμάκων τα καθιστούν χρήσιμα εργαλεία στην καταπολέμηση πολλών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων της ισχαιμικής καρδιακής νόσου και του OEM [33], [34]. Οι καρδιοπροστατευτικές δράσεις του Κρόκου και των δραστικών συστατικών του έχουν μελετηθεί και τεκμηριωθεί εκτενώς, όμως απουσιάζουν τα κλινικά δεδομένα [87], [89]. Η παρούσα μελέτη προσέφερε καινοτόμα ευρήματα, καθώς αποδείχτηκε η ωφέλιμη δράση ολόκληρου του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου παρουσία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, ενώ ταυτόχρονα διαλευκάνθηκε ο υποκείμενος μηχανισμός καρδιοπροστατευτικής δράσης. Επιπροσθέτως, η αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf-2 συμβάλλει στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου και της αποτελεσματικότητάς του έναντι του οξειδωτικού στρες. Το τελευταίο συνιστά παθολογικό γνώρισμα πολλών διαταραχών του καρδιαγγειακού συστήματος (π.χ διαβήτης, αθηροσκλήρυνση, μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης). Επομένως, το επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος και η αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του υδατικού εκχυλίσματος Κρόκου σε κλινικό επίπεδο, σε εθελοντές με την παρουσία

συννοσηροτήτων. Οι κλινικές μελέτες θα συμβάλλουν στην ανάδειξη του Κρόκου ως ένα αποτελεσματικό όπλο στη φαρέτρα της σύγχρονης ιατρικής για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της ισχαιμικής καρδιακής νόσου και των εκδηλώσεών της.

## Βιβλιογραφία

- [1] J. Perk *et al.*, “European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts),” *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 13, pp. 1635–1701, Jul. 2012.
- [2] J. L. Anderson and D. A. Morrow, “Acute Myocardial Infarction,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 21, pp. 2053–2064, 25 2017.
- [3] S. Toldo and A. Abbate, “The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction,” *Nat. Rev. Cardiol.*, Nov. 2017.
- [4] Writing Group Members *et al.*, “Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 133, no. 4, pp. e38-360, Jan. 2016.
- [5] P. Libby, “Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 21, pp. 2004–2013, May 2013.
- [6] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 1, pp. 92–100, Jan. 2013.
- [7] K. Thygesen *et al.*, “Third universal definition of myocardial infarction,” *Glob. Heart*, vol. 7, no. 4, pp. 275–295, Dec. 2012.
- [8] K. B. Wallace *et al.*, “Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 32, no. 1, pp. 106–121, Feb. 2004.
- [9] Z. J. Eapen *et al.*, “Defining heart failure end points in ST-segment elevation myocardial infarction trials: integrating past experiences to chart a path forward,” *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*, vol. 5, no. 4, pp. 594–600, Jul. 2012.
- [10] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “Ischaemic conditioning and reperfusion injury,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 13, no. 4, pp. 193–209, Apr. 2016.
- [11] G. Heusch, “Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 381, no. 9861, pp. 166–175, Jan. 2013.

- [12] D. M. Yellon and D. J. Hausenloy, "Myocardial reperfusion injury," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 11, pp. 1121–1135, Sep. 2007.
- [13] B. Ibáñez *et al.* "Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 65, no. 14, pp. 1454–1471, Apr. 2015.
- [14] D. Moris *et al.*, "The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation," *Ann. Transl. Med.*, vol. 5, no. 16, p. 324, Aug. 2017.
- [15] B. Naghizadeh *et al.* "Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats," *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 20, no. 6, pp. 537–542, Apr. 2013.
- [16] S. N. Goyal *et al.*, "Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats," *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 17, no. 3–4, pp. 227–232, Mar. 2010.
- [17] H. Hosseinzadeh and H. R. Sadeghnia, "Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus," *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.*, vol. 8, no. 3, pp. 394–399, Aug. 2005.
- [18] J. Lee *et al.* "Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 3, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2004.
- [19] J. J. Lemasters *et al.*, "The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes," *EXS*, vol. 76, pp. 99–114, 1996.
- [20] M. V. Cohen *et al.* "The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis," *Circulation*, vol. 115, no. 14, pp. 1895–1903, Apr. 2007.
- [21] S.-B. Ong *et al.* "Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 8, pp. 2074–2084, Apr. 2015.
- [22] S.-B. Ong *et al.* "The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 78, pp. 23–34, Jan. 2015.

- [23] J. Vinten-Johansen, "Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury," *Cardiovasc. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 481–497, Feb. 2004.
- [24] J. Vinten-Johansen *et al.* "Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion Injury," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 21, no. 1, pp. 123–145, Feb. 2007.
- [25] M. Gwechenberger *et al.*, "Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions," *Circulation*, vol. 99, no. 4, pp. 546–551, Feb. 1999.
- [26] G. Heusch, "Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning," *Circ. Res.*, vol. 116, no. 4, pp. 674–699, Feb. 2015.
- [27] P. Kleinbongard and G. Heusch, "Extracellular signalling molecules in the ischaemic/reperfused heart - druggable and translatable for cardioprotection?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 8, pp. 2010–2025, Apr. 2015.
- [28] R. P. Williams *et al.* "'Warm-up Angina': harnessing the benefits of exercise and myocardial ischaemia," *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 100, no. 2, pp. 106–114, Jan. 2014.
- [29] P. Ferdinandy *et al.* "Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning," *Pharmacol. Rev.*, vol. 66, no. 4, pp. 1142–1174, Oct. 2014.
- [30] D. J. Hausenloy *et al.*, "Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 111, no. 6, p. 70, Nov. 2016.
- [31] H. Patel *et al.* "Plant-Based Nutrition: An Essential Component of Cardiovascular Disease Prevention and Management," *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 19, no. 10, p. 104, Sep. 2017.

- [32] K. Griffiths *et al.* “Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention,” *Dis. Basel Switz.*, vol. 4, no. 3, Aug. 2016.
- [33] M. Pirro *et al.* “Joint position statement on ‘Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia’ of the Italian Society of Diabetology (SID) and of the Italian Society for the Study of Arteriosclerosis (SISA),” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, vol. 27, no. 1, pp. 2–17, Jan. 2017.
- [34] A. Santini and E. Novellino, “Nutraceuticals in hypercholesterolaemia: an overview,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 174, no. 11, pp. 1450–1463, Jun. 2017.
- [35] Z. Liao *et al.*, “Long-term oral resveratrol intake provides nutritional preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury: involvement of VDAC1 downregulation,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 454–464, Mar. 2015.
- [36] F. Tullio *et al.* “Redox balance and cardioprotection,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 108, no. 6, p. 392, Nov. 2013.
- [37] U. Förstermann and T. Münzel, “Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace,” *Circulation*, vol. 113, no. 13, pp. 1708–1714, Apr. 2006.
- [38] I. Andreadou *et al.* “The role of gasotransmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 6, pp. 1587–1606, Mar. 2015.
- [39] H. K. Bryan *et al.* “The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 85, no. 6, pp. 705–717, Mar. 2013.
- [40] S. Jiang *et al.*, “An overview of the mechanisms and novel roles of Nrf2 in cardiovascular diseases,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 20, no. 12, pp. 1413–1424, Dec. 2016.

- [41] J. Egea *et al.*, “European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS),” *Redox Biol.*, vol. 13, pp. 94–162, Oct. 2017.
- [42] M. Buelna-Chontal *et al.* “Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 74, pp. 145–156, Sep. 2014.
- [43] L. Cheng *et al.* “Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway,” *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 7, pp. 10420–10428, 2015.
- [44] L. E. Tebay *et al.*, “Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 88, no. Pt B, pp. 108–146, Nov. 2015.
- [45] J. W. Kaspar *et al.* “Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, no. 9, pp. 1304–1309, Nov. 2009.
- [46] M. Barančík *et al.* “Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases,” *Physiol. Res.*, vol. 65 Suppl 1, pp. S1–S10, Sep. 2016.
- [47] Y. Huang *et al.* “The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, no. 12, pp. 1401–1413, Dec. 2015.
- [48] X. Zhang *et al.* “Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 372, no. 1–2, pp. 169–179, Jan. 2013.
- [49] H.-C. Huang *et al.* “Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 45, pp. 42769–42774, Nov. 2002.
- [50] S. Numazawa *et al.* “Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 285, no. 2, pp. C334–342, Aug. 2003.
- [51] D. A. Bloom and A. K. Jaiswal, “Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not



- required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 44675–44682, Nov. 2003.
- [52] J. Pi *et al.*, “Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 42, no. 12, pp. 1797–1806, Jun. 2007.
- [53] X.-S. Huang *et al.* “Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for hypoxic preconditioning-mediated delayed cardioprotection,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 385, no. 1–2, pp. 33–41, Jan. 2014.
- [54] L. E. Otterbein *et al.*, “Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 422–428, Apr. 2000.
- [55] J.-H. Kim *et al.* “Crocic acid suppresses LPS-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by upregulation of heme oxygenase-1 via calcium/calmodulin-dependent protein kinase 4,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, p. 728709, 2014.
- [56] G. Jancsó *et al.*, “Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1095, pp. 251–261, Jan. 2007.
- [57] R. Stocker *et al.* “Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance,” *Science*, vol. 235, no. 4792, pp. 1043–1046, Feb. 1987.
- [58] D. E. Baranano *et al.* “Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 25, pp. 16093–16098, Dec. 2002.
- [59] F. M. Faraci and S. P. Didion, “Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1367–1373, Aug. 2004.
- [60] S. Hoshida *et al.* “The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 495–505, Aug. 2002.

- [61] K. Grube *et al.*, “Evidence for an intracellular localization of the adenosine A2B receptor in rat cardiomyocytes,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 106, no. 3, pp. 385–396, May 2011.
- [62] G. Heusch *et al.* “Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria,” *Circulation*, vol. 118, no. 19, pp. 1915–1919, Nov. 2008.
- [63] P. Pagliaro and C. Penna, “Redox signalling and cardioprotection: translatability and mechanism,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 8, pp. 1974–1995, Apr. 2015.
- [64] M. Juhaszova *et al.* “Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection,” *Circ. Res.*, vol. 104, no. 11, pp. 1240–1252, Jun. 2009.
- [65] D. J. Hausenloy *et al.* “The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning,” *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 15, no. 2, pp. 69–75, Feb. 2005.
- [66] S. Lecour, “Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 47, no. 1, pp. 32–40, Jul. 2009.
- [67] G. Heusch *et al.* “Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion,” *Circ. Res.*, vol. 109, no. 11, pp. 1302–1308, Nov. 2011.
- [68] K. Boengler *et al.* “Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 105, no. 6, pp. 771–785, Nov. 2010.
- [69] K. Ytrehus *et al.* “Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation,” *Am. J. Physiol.*, vol. 266, no. 3 Pt 2, pp. H1145–1152, Mar. 1994.
- [70] Y. Liu *et al.* “Chelerythrine, a highly selective protein kinase C inhibitor, blocks the anti-infarct effect of ischemic preconditioning in rabbit hearts,” *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 8, no. 6, pp. 881–882, Dec. 1994.

- [71] G. R. Budas *et al.* “Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 83–92, Oct. 2010.
- [72] P. Ping *et al.*, “Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection,” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 4, pp. 499–507, Feb. 2002.
- [73] A. D. T. Costa and K. D. Garlid, “Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 295, no. 2, pp. H874–882, Aug. 2008.
- [74] A. Lochner *et al.* “Comparison between ischaemic and anisomycin-induced preconditioning: role of p38 MAPK,” *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 17, no. 3, pp. 217–230, May 2003.
- [75] E. Marais, S. Genade, B. Huisamen, J. G. Strijdom, J. A. Moolman, and A. Lochner, “Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 769–778, Apr. 2001.
- [76] C. Yang *et al.* “Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 97, no. 1, pp. 33–43, Jan. 2013.
- [77] D. J. Hausenloy *et al.*, “Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations,” *Eur. Heart J.*, vol. 38, no. 13, pp. 935–941, 01 2017.
- [78] A. K. Bose *et al.* “Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model,” *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 19, no. 1, pp. 9–11, Jan. 2005.
- [79] A. K. Bose *et al.* “Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury,” *Diabetes*, vol. 54, no. 1, pp. 146–151, Jan. 2005.
- [80] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “GLP-1 therapy: beyond glucose control,” *Circ. Heart Fail.*, vol. 1, no. 3, pp. 147–149, Sep. 2008.

- [81] A. J. Young and G. M. Lowe, "Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 385, no. 1, pp. 20–27, Jan. 2001.
- [82] D. K. Thompkinson *et al.* "Dietary approaches for management of cardiovascular health- a review," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 10, pp. 2318–2330, Oct. 2014.
- [83] E. Karimi *et al.* "Evaluation of Crocus sativus L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity," *Mol. Basel Switz.*, vol. 15, no. 9, pp. 6244–6256, Sep. 2010.
- [84] M. Dianat *et al.* "Protective Effects of Crocin on Ischemia-reperfusion Induced Oxidative Stress in Comparison With Vitamin E in Isolated Rat Hearts," *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 9, no. 2, p. e17187, May 2014.
- [85] J. Sachdeva *et al.*, "Crocus sativus L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system," *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.*, vol. 64, no. 6, pp. 557–564, Sep. 2012.
- [86] S. Z. Bathaie and S. Z. Mousavi, "New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no. 8, pp. 761–786, Sep. 2010.
- [87] M. Moshiri *et al.* "Clinical Applications of Saffron (Crocus sativus) and its Constituents: A Review," *Drug Res.*, vol. 65, no. 6, pp. 287–295, Jun. 2015.
- [88] M. José Bagur *et al.*, "Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food," *Mol. Basel Switz.*, vol. 23, no. 1, Dec. 2017.
- [89] E. Christodoulou *et al.* "Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 67, no. 12, pp. 1634–1649, Dec. 2015.
- [90] M. Kamalipour and S. Akhondzadeh, "Cardiovascular effects of saffron: an evidence-based review," *J. Tehran Heart Cent.*, vol. 6, no. 2, pp. 59–61, 2011.
- [91] M. Schmidt *et al.* "Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses," *Wien. Med. Wochenschr. 1946*, vol. 157, no. 13–14, pp. 315–319, 2007.

- [92] A. N. Assimopoulou *et al.* “Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents,” *Phytother. Res. PTR*, vol. 19, no. 11, pp. 997–1000, Nov. 2005.
- [93] M. H. Kang *et al.* “Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney,” *J. Nutr.*, vol. 128, no. 6, pp. 1018–1022, Jun. 1998.
- [94] S. I. Bukhari *et al.* “A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids,” *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.*, vol. 98, pp. 733–745, Feb. 2018.
- [95] K. Lech *et al.* “Saffron yellow: characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection,” *J. Mass Spectrom. JMS*, vol. 44, no. 12, pp. 1661–1667, Dec. 2009.
- [96] P. D. Wagner *et al.* “Effects of crocetin on pulmonary gas exchange in foxhounds during hypoxic exercise,” *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, vol. 89, no. 1, pp. 235–241, Jul. 2000.
- [97] J. V. Gainer and R. Nugent, “Effect of increasing the plasma oxygen diffusivity on experimental cryogenic edema,” *J. Neurosurg.*, vol. 45, no. 5, pp. 535–538, Nov. 1976.
- [98] M. H. Boskabady and T. Farkhondeh, “Antiinflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of *Crocus sativus* L. and its Main Constituents,” *Phytother. Res. PTR*, vol. 30, no. 7, pp. 1072–1094, Jul. 2016.
- [99] G. K. Broadhead, A. Chang, J. Grigg, and P. McCluskey, “Efficacy and Safety of Saffron Supplementation: Current Clinical Findings,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 16, pp. 2767–2776, Dec. 2016.
- [100] K. Abe *et al.* “Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo,” *Brain Res.*, vol. 851, no. 1–2, pp. 287–289, Dec. 1999.
- [101] S. Bharti *et al.* “Akt/GSK-3 $\beta$ /eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in rats,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 51, no. 6, pp. 719–727, Sep. 2012.

- [102] X.-C. Shen and Z.-Y. Qian, "Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats," *Pharm.*, vol. 61, no. 4, pp. 348–352, Apr. 2006.
- [103] S. Joukar *et al.*, "The effect of saffron consumption on biochemical and histopathological heart indices of rats with myocardial infarction," *Cardiovasc. Toxicol.*, vol. 10, no. 1, pp. 66–71, Mar. 2010.
- [104] Y. Wang, *et al.* "Protective effects of crocetin pretreatment on myocardial injury in an ischemia/reperfusion rat model," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 741, pp. 290–296, Oct. 2014.
- [105] N. Chahine "Protective effect of saffron extract against doxorubicin cardiotoxicity in isolated rabbit heart," *Pharm. Biol.*, vol. 51, no. 12, pp. 1564–1571, Dec. 2013.
- [106] N. Chahine *et al.* "Cardioprotective effect of saffron extracts against acute doxorubicin toxicity in isolated rabbit hearts submitted to ischemia-reperfusion injury," *Z. Naturforschung C J. Biosci.*, vol. 69, no. 11–12, pp. 459–470, Dec. 2014.
- [107] N. Chahine *et al.* "Saffron extracts alleviate cardiomyocytes injury induced by doxorubicin and ischemia-reperfusion in vitro," *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 39, no. 1, pp. 87–96, 2016.
- [108] M. H. Boskabady, M. N. Shafei, A. Shakiba, and H. S. Sefidi, "Effect of aqueous-ethanol extract from *Crocus sativus* (saffron) on guinea-pig isolated heart," *Phytother. Res. PTR*, vol. 22, no. 3, pp. 330–334, Mar. 2008.
- [109] R. Mehdizadeh *et al.* "Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats," *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 56–63, Jan. 2013.
- [110] M. Esmailizadeh *et al.* "Effect of crocin on nitric oxide synthase expression in post-ischemic isolated rat heart," *Avicenna J. Phytomedicine*, vol. 5, no. 5, pp. 420–426, Oct. 2015.
- [111] B. F. Polegato *et al.*, "Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats," *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 35, no. 5, pp. 1924–1933, 2015.

- [112] N. M. Elsherbiny *et al.* “Crocicn protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 247, pp. 39–48, Mar. 2016.
- [113] M. Nader *et al.* “Saffron (*Crocus sativus*) pretreatment confers cardioprotection against ischemia-reperfusion injuries in isolated rabbit heart,” *J. Physiol. Biochem.*, vol. 72, no. 4, pp. 711–719, Dec. 2016.
- [114] L. Yue *et al.*, “Apolipoprotein E enhances endothelial-NO production by modulating caveolin 1 interaction with endothelial NO synthase,” *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 60, no. 4, pp. 1040–1046, Oct. 2012.
- [115] S. W. Seto *et al.* “Impaired acetylcholine-induced endothelium-dependent aortic relaxation by caveolin-1 in angiotensin II-infused apolipoprotein-E (ApoE<sup>-/-</sup>) knockout mice,” *PloS One*, vol. 8, no. 3, p. e58481, 2013.
- [116] M. L. Porto *et al.*, “Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice,” *Lipids Health Dis.*, vol. 10, p. 155, Sep. 2011.
- [117] J. A. Diaz *et al.*, “Critical review of mouse models of venous thrombosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 3, pp. 556–562, Mar. 2012.
- [118] G. S. Getz and C. A. Reardon, “Animal models of atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 5, pp. 1104–1115, May 2012.
- [119] S. C. Black and I. W. Rodger, “Methods for studying experimental myocardial ischemic and reperfusion injury,” *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 35, no. 4, pp. 179–190, Aug. 1996.
- [120] D. J. Hearse and F. J. Sutherland, “Experimental models for the study of cardiovascular function and disease,” *Pharmacol. Res.*, vol. 41, no. 6, pp. 597–603, Jun. 2000.
- [121] A. Chatzianastasiou *et al.*, “Cardioprotection by H<sub>2</sub>S Donors: Nitric Oxide-Dependent and -Independent Mechanisms,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 358, no. 3, pp. 431–440, 2016.
- [122] H. Hosseinzadeh *et al.* “Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced

oxidative damage in rats,” *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.*, vol. 8, no. 3, pp. 387–393, Aug. 2005.

[123] P. Efentakis *et al.*, “Ranolazine triggers pharmacological preconditioning and postconditioning in anesthetized rabbits through activation of RISK pathway,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 789, pp. 431–438, Oct. 2016.

[124] T.-L. Yue *et al.*, “Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury,” *Diabetes*, vol. 54, no. 2, pp. 554–562, Feb. 2005.

[125] S.-I. Bibli *et al.*, “Cardioprotection by H<sub>2</sub>S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 106, no. 3, pp. 432–442, Jun. 2015.

[126] I. Andreadou *et al.*, “Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 94, no. 3, pp. 501–509, Jun. 2012.

[127] J. J. Bass *et al.*, “An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research,” *Scand. J. Med. Sci. Sports*, vol. 27, no. 1, pp. 4–25, Jan. 2017.

[128] P. Efentakis *et al.*, “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. NMCD*, vol. 27, no. 10, pp. 919–929, Oct. 2017.

[129] K. C. Park *et al.* “Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 113, no. 14, pp. 1708–1718, Dec. 2017.

[130] Y. Birnbaum *et al.* “Changes in R wave amplitude: ECG differentiation between episodes of reocclusion and reperfusion associated with ST-segment elevation,” *J. Electrocardiol.*, vol. 30, no. 3, pp. 211–216, Jul. 1997.



- [131] S. Kötter *et al.*, “Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction,” *Circ. Res.*, vol. 119, no. 9, pp. 1017–1029, Oct. 2016.
- [132] L. V. d’Uscio *et al.*, “Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 1017–1022, Jun. 2001.
- [133] H. Li *et al.*, “Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse,” *Nitric Oxide Biol. Chem.*, vol. 12, no. 4, pp. 231–236, Jun. 2005.
- [134] J. B. Laursen *et al.*, “Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin,” *Circulation*, vol. 103, no. 9, pp. 1282–1288, Mar. 2001.
- [135] N. J. Alp *et al.*, “Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 3, pp. 445–450, Mar. 2004.
- [136] S. Kawashima, “Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis,” *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 96, no. 4, pp. 411–419, Dec. 2004.
- [137] P. Wohlfart *et al.*, “Antiatherosclerotic effects of small-molecular-weight compounds enhancing endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 325, no. 2, pp. 370–379, May 2008.
- [138] N. Xia *et al.*, “Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 335, no. 1, pp. 149–154, Oct. 2010.
- [139] L. C. Hool, “Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 33, no. 1–2, pp. 146–151, Feb. 2006.

- [140] Y. Wang *et al.* “Protective effect of crocetin on hemorrhagic shock-induced acute renal failure in rats,” *Shock Augusta Ga*, vol. 38, no. 1, pp. 63–67, Jul. 2012.
- [141] T. Ochiai *et al.* “Crocetin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol,” *Neurosci. Lett.*, vol. 362, no. 1, pp. 61–64, May 2004.
- [142] T. Ochiai *et al.*, “Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1770, no. 4, pp. 578–584, Apr. 2007.
- [143] S. Saleem *et al.*, “Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats,” *J. Med. Food*, vol. 9, no. 2, pp. 246–253, 2006.
- [144] S. Zheng *et al.* “Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 47, no. 1, pp. 70–76, Jan. 2006.
- [145] M. Huang *et al.* “Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction,” *Heart Fail. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 25–38, Jan. 2015.
- [146] J. Müller *et al.*, “Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 109, no. 6, p. 440, 2014.
- [147] K. Kawabata *et al.* “Dietary Crocetin Inhibits Colitis and Colitis-Associated Colorectal Carcinogenesis in Male ICR Mice,” *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM*, vol. 2012, p. 820415, 2012.
- [148] K. N. Nam *et al.*, “Anti-inflammatory effects of crocetin and crocetin in rat brain microglial cells,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 648, no. 1–3, pp. 110–116, Dec. 2010.
- [149] R. Yang *et al.*, “Suppression of NF- $\kappa$ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 674, no. 2–3, pp. 391–396, Jan. 2012.

- [150] S. Zheng *et al.* “Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 70, no. 8, pp. 1192–1199, Oct. 2005.
- [151] S. Blankenberg *et al.* “Adhesion molecules and atherosclerosis,” *Atherosclerosis*, vol. 170, no. 2, pp. 191–203, Oct. 2003.
- [152] J. Cai *et al.*, “Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1/2 signalling pathway,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 5, pp. 909–925, May 2009.
- [153] J. Yan *et al.*, “Effect of crocetin on blood pressure restoration and synthesis of inflammatory mediators in heart after hemorrhagic shock in anesthetized rats,” *Shock Augusta Ga*, vol. 33, no. 1, pp. 83–87, Jan. 2010.
- [154] Y.-Q. Zheng *et al.* “Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia,” *Brain Res.*, vol. 1138, pp. 86–94, Mar. 2007.
- [155] V. Khori *et al.*, “Frequency-dependent electrophysiological remodeling of the AV node by hydroalcohol extract of *Crocus sativus* L. (saffron) during experimental atrial fibrillation: the role of endogenous nitric oxide,” *Phytother. Res. PTR*, vol. 26, no. 6, pp. 826–832, Jun. 2012.
- [156] S. Joukar, “Electrocardiogram alterations following one-week consumption of *Crocus sativus* L. (Saffron),” *EXCLI J.*, vol. 11, pp. 480–486, 2012.
- [157] C. F. Janssen *et al.* “Comparison of Atipamezole with Yohimbine for Antagonism of Xylazine in Mice Anesthetized with Ketamine and Xylazine,” *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS*, vol. 56, no. 2, pp. 142–147, Mar. 2017.
- [158] R. Howden, “Nrf2 and cardiovascular defense,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2013, p. 104308, 2013.

## Παράρτημα εικόνων

- ❖ Εικόνα 1: P. Libby, “Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 21, pp. 2004–2013, May 2013.

- ❖ Εικόνα 2: D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target,” *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 1, pp. 92–100, Jan. 2013.
- ❖ Εικόνες 3, 4: D. M. Yellon and D. J. Hausenloy, “Myocardial reperfusion injury,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 11, pp. 1121–1135, Sep. 2007.
- ❖ Εικόνα 5: Y. Huang *et al.* “The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, no. 12, pp. 1401–1413, Dec. 2015
- ❖ Εικόνα 6: M. Barančík *et al.* “Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases,” *Physiol. Res.*, vol. 65 Suppl 1, pp. S1–S10, Sep. 2016.
- ❖ Εικόνες 7,8: G. Heusch, “Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning,” *Circ. Res.*, vol. 116, no. 4, pp. 674–699, Feb. 2015.
- ❖ Εικόνα 9: E. Christodoulou *et al.* “Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 67, no. 12, pp. 1634–1649, Dec. 2015