



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης

*Διδακτορική διατριβή*

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ  
CROCUS SATIVUS L. ΕΠΙ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ»**

**Γεωργία Γεωργιάδου**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης

---

*Διδακτορική διατριβή*

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ  
CROCUS SATIVUS L. ΕΠΙ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ»**

**Γεωργία Γεωργιάδου**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2013

© 2013 Γεωργία Γεωργιάδου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ  
CROCUS SATIVUS L. ΕΠΙ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ»**

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΑΔΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Πιτσίκας Νικόλαος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπων)*
- 2. Δρ. Σακελλαρίδης Νικόλαος**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 3. Δρ. Παπαδημητρίου Αλέξανδρος**, Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
*Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής  
(9<sup>η</sup>/27-09-2012 ΓΣΕΣ)*

1. Πιτσίκας Νικόλαος  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
  
2. Σακελλαρίδης Νικόλαος  
Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
  
3. Παπαδημητρίου Αλέξανδρος  
Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
  
4. Πολυσίου Μόσχος  
Καθηγητής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
  
5. Ταραντίλης Πέτρος  
Αναπληρωτής Καθηγητής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
  
6. Αντωνίου Αικατερίνη  
Επίκουρη Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
  
7. Δήμας Κωνσταντίνος  
Επίκουρος Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### 1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- 1.1. Ημερομηνία γεννήσεως 20 Δεκεμβρίου 1980  
1.2. Τόπος γεννήσεως Καβάλα  
1.3. Διεύθυνση κατοικίας Αγ. Λαύρας 7, 60100 Κατερίνη  
1.4. Τηλέφωνο 6972853145  
1.5. Ηλεκτρ. ταχυδρομείο georgegiadou@yahoo.gr

### 2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2.1. Πτυχιούχος του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με βαθμό Λίαν Καλώς (6,84). (2000 – 2008)  
2.2. Έναρξη εκπόνησης διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα: «Διερεύνηση της δράσης των παραγώγων του *Crocus Sativus* L. επί του κεντρικού νευρικού συστήματος στον επίμυ.» (2008)

### 3. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

#### 3.1. Αγγλικά:

- First Certificate in English – University of Cambridge (1994)  
Certificate of Proficiency in English – University of Cambridge (1996)  
Certificate of Proficiency in English – University of Michigan (1996)

#### 3.2. Γαλλικά:

- Certificat de langue française – Institut Français de Thessalonique (1995)  
Certificat pratique de langue française – Université de Paris Sorbonne (1996)

### 4. ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 4.1. Ιατρός αγώνων σε σχολικούς αγώνες της Διεύθυνσης Πρωτοβάθμιας και Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης Πιερίας. (2008 – 2009)  
4.2. Αγροτικός ιατρός στο Περιφερειακό Ιατρείο Πυργατού με τρίμηνη άσκηση στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (2010 – 2011)

### 5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 5.1. Pitsikas N, Boulதாகis A, Georgiadou G, Tarantilis PA, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*. 2008 Dec; 15(12):1135-9.  
5.2. Boulதாகis A, Georgiadou G, Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on different memory components as assessed in the object recognition task in the rat. *Behav Brain Res*. 2010 Feb 11; 207(1):208-14.  
5.3. Georgiadou G, Pitsikas N. Repeated administration of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME differentially affects rats' recognition memory. *Behav Brain Res*. 2011 Oct 10; 224(1):140-4.  
5.4. Georgiadou G, Tarantilis PA, Pitsikas N. Effects of the active constituents of *Crocus Sativus* L., crocins, in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Lett*. 2012 Oct 18; 528(1):27-30.  
5.5. Gourgiotis I, Kampouri NG, Koulouri V, Lempesis IG, Prasinou MD, Georgiadou G, Pitsikas N. Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Oct; 102(4):507-14.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της διατριβής θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν, συμβάλλοντας ο καθένας με το δικό του τρόπο, στην υλοποίησή της.

Κατ' αρχάς οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα της διατριβής μου αναπληρωτή καθηγητή κύριο Νίκο Πιτσικά, τόσο για την μύηση στα άδυτα της Συμπεριφορικής Φαρμακολογίας, όσο και για την υπομονή, την κατανόηση και την ευγένεια που μου πρόσφερε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Ήταν για μένα δάσκαλος και συμπαραστάτης και θα του είμαι πάντα ευγνώμων και για τα δύο. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, καθηγητή κύριο Νίκο Σακελλαρίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε παρέχοντάς μου την ευκαιρία αυτή, αλλά και για τις ουσιαστικές και εποικοδομητικές συμβουλές του, που αποτέλεσαν για μένα έναυσμα για αφύπνιση και αυτοβελτίωση. Θέλω να εκφράσω επιπλέον τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κύριο Αλέξανδρο Παπαδημητρίου για την εξαιρετική συνεργασία και για το ενδιαφέρον που μου ενέπνευσε για τον τομέα της Νευρολογίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Συνεταιρισμό Κροκοπαρωγών του νομού Κοζάνης για την παραχώρηση του φυτικού υλικού, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα, καθώς επίσης και τον καθηγητή κύριο Μόσχο Πολυσιού, τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Πέτρο Ταραντίλη και την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Αναστασάκη από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, που ανέλαβαν την απομόνωση των κροκινών. Τις ευχαριστίες μου θέλω να απευθύνω επίσης στην επίκουρη καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κυρία Κατερίνα Αντωνίου για την άσογη συνεργασία, καθώς και στους συνεργάτες μου στον τομέα της Συμπεριφορικής Φαρμακολογίας Στέλλα Ζησοπούλου για την καθοδήγησή της στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, Βασίλη Γρίβα για την πολύτιμη βοήθειά του και Αντώνη Μπουλταδάκη για τη συνεισφορά και τη φιλία του. Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στον κύριο Ηλία Μπέγα, ο οποίος ήταν ο άνθρωπος που έδινε λύση σε κάθε μικρό ή μεγάλο τεχνικό πρόβλημα που παρουσιαζόταν κατά τη διενέργεια των πειραμάτων. Η συμβολή του ήταν ανεκτίμητη και τον ευχαριστώ ειλικρινά για το φιλότιμο και την καλή του διάθεση.

Για την τόσο αναγκαία αρμονική καθημερινή συνύπαρξη στο εργαστήριο οφείλω πολλές ευχαριστίες στην αναπληρώτρια καθηγήτρια κυρία Έφη Ασπροδίνη, στην επίκουρη καθηγήτρια κυρία Άννα Βασιλάκη, στον επίκουρο καθηγητή κύριο Κώστα Δήμα, καθώς επίσης και στους Ηλία Βαλιάκο, Γιώργο Λεονταρίτη, Μαρία Βαΐου, Χρυσήδα Τσιμπλούλη



και Εύα Σερέτη. Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Χρήστο Γκόβαρη, ιδρυματικό υπεύθυνο του προγράμματος Ηράκλειτος ΙΙ, τον κύριο Απόστολο Ζήση και την κυρία Χρύσα Κούρτη από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την αγαστή συνεργασία.

Η παρούσα διατριβή, όπως και ό,τι άλλο έχω πετύχει στη ζωή μου, δεν θα είχε πραγματοποιηθεί ποτέ αν δεν είχα την αδιαπραγμάτευτη αγάπη, την απόλυτη στήριξη και την ακούραστη φροντίδα της οικογένειάς μου. Τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου και τους ζητώ συγνώμη για το χρόνο που τους στέρησα, για τις φορές που τους απογοήτευσα και για τα λόγια που δεν είπα.

Τα τελευταία πέντε χρόνια συνέβησαν γεγονότα που με άλλαξαν, με φόβισαν, με εξέπληξαν, που με έκαναν να αποκαθηλώσω τις μέχρι τότε πεποιθήσεις μου και να αμφισβητήσω την πίστη στον εαυτό μου. Η σκέψη που μου έδινε δύναμη τις πιο δύσκολες στιγμές ήταν η αθωότητα ενός κοριτσιού, που πριν 15 χρόνια αποφάσιζε να γίνει γιατρός με μοναδικό κριτήριο την αγάπη στον άνθρωπο. Η διατριβή αυτή αφιερώνεται σε εκείνη και σε όλους τους ανθρώπους που παρά τις προσγειώσεις που αναπόφευκτα φέρνει η ζωή, αποφασίζουν να διαλέξουν το ρομαντισμό και επιμένουν να πιστεύουν στο καλό. Άλλωστε όπως γράφει και ο Γιάννης Ρίτσος: *«ίσως εκεί που κάποιος αντιστέκεται χωρίς ελπίδα, ίσως εκεί να αρχίζει η ανθρώπινη ιστορία, που λέμε, κι η ομορφιά του ανθρώπου»*.

Γεωργία Γεωργιάδου  
Ιούνιος 2013

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κρόκος ο ήμερος (*Crocus Sativus* L.) είναι ένα σπάνιο φυτό, γνωστό από την αρχαιότητα, που καλλιεργείται σε χώρες της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα του άνθους του αποτελούν τη δρόγη και περιέχουν σημαντικές ποσότητες υδατοδιαλυτών καροτενοειδών, που λέγονται κροκίνες. Οι κροκίνες είναι γλυκοζίτες της κροκετίνης και θεωρούνται υπεύθυνες για τις πλούσιες φαρμακευτικές ιδιότητες του φυτού.

Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν αναδείξει τις χημειοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των κροκινών. Όσον αφορά στο κεντρικό νευρικό σύστημα υπάρχουν ενδείξεις ότι οι κροκίνες εμπλέκονται σε διαδικασίες μάθησης και μνήμης, παρουσιάζουν αναλγητική και αντιεπιληπτική δράση, ενώ πρόσφατες κλινικές μελέτες πρότειναν και αντικαταθλιπτική δράση αυτών. Καθώς παραμένει άγνωστο αν η δρόγη αυτή παρεμβαίνει και σε άλλες παθοφυσιολογικές οδούς του νευρικού συστήματος, στόχος της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση πιθανής ευεργετικής δράσης των κροκινών σε πειραματικά μοντέλα άγχους, ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής και σχιζοφρένειας.

Για να διερευνήσουμε την πιθανή επίδραση των κροκινών στο άγχος επιλέξαμε τη δοκιμασία φωτός – σκότους, ένα πειραματικό μοντέλο που αξιολογεί την αγχολυτική δράση ουσιών σε επίμυες, εκμεταλλευόμενο τη φυσική αποστροφή των επίμυων προς το φως. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι κροκίνες παρουσίασαν αξιοσημείωτη αγχολυτική δράση, συγκρίσιμη της διαζεπάμης.

Για την μελέτη της πιθανής επίδρασης των κροκινών στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή χρησιμοποιήσαμε έναν σεροτονινεργικό αγωνιστή (mCPP), ο οποίος όταν χορηγείται στους επίμυες επάγει υπερβολικό αυτοκαθαρισμό. Ο τελευταίος θεωρείται ανάλογο ιδεοψυχαναγκαστικής συμπτωματολογίας στα πειραματόζωα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων κατέληξε στο συμπέρασμα πως οι κροκίνες ανταγωνίστηκαν τη δράση του mCPP και ελάττωσαν τον χρόνο που τα πειραματόζωα δαπάνησαν σε συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού.

Τέλος για να διερευνήσουμε την αποτελεσματικότητα των κροκινών σε πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας χρησιμοποιήσαμε την κεταμίνη, έναν μη συναγωνιστικό ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα, ο οποίος σε υποαναισθητικές δόσεις επάγει ένα ψυχωσεομιμητικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από

υπερκινητικότητα, αταξία, στερεοτυπίες, κοινωνική απόσυρση και ελλείμματα λειτουργικής μνήμης. Για να αξιολογήσουμε τη δράση των κροκινών σε όλο το φάσμα των συμπτωμάτων επιλέχθηκαν τρεις συμπεριφορικές τεχνικές: μια δοκιμασία ανοικτού πεδίου για τις κινητικές διαταραχές, που θεωρούνται πρότυπα θετικών συμπτωμάτων της νόσου, τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης για την αξιολόγηση της κοινωνικής απόσυρσης, που θεωρείται ανάλογο αρνητικών συμπτωμάτων της νόσου και τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου για την εκτίμηση των μνημονικών διαταραχών, που αντιστοιχούν στα γνωσιακά ελλείμματα των πασχόντων. Η χορήγηση κροκινών ελάττωσε τις κινητικές διαταραχές και ανταγωνίστηκε την κοινωνική απόσυρση, καθώς και τα μνημονικά ελλείμματα που προκάλεσε η κεταμίνη.

**Λέξεις κλειδιά:** κροκίνες • επίμυς • άγχος • ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή • σχιζοφρένεια • mCPP • κεταμίνη

## ABSTRACT

*Crocus sativus* L. is a rare plant, known since antiquity, which is cultivated in countries of the Mediterranean sea and of central Asia. The dried red stigmas of its flowers consist the drug and contain significant amounts of water-soluble carotenoids, known as crocins. Crocins are crocetin glycosides and are considered responsible for the plant's extensive therapeutic properties.

Various studies have demonstrated crocins' chemopreventive, antitumoral, antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective properties. Regarding the central nervous system there is evidence that crocins act beneficially in learning and memory processes, exhibit analgesic effects and alleviate symptoms in experimental models of epilepsy. Furthermore clinical studies have revealed their antidepressant effect. Since it remains unknown if this drug affects other pathophysiological routes of the central nervous system, the aim of the present study was to investigate the possible beneficial action of crocins on experimental models of anxiety, obsessive-compulsive disorder and schizophrenia.

In order to examine the effect of crocins on anxiety we selected the light/dark test, an experimental model which evaluates the anxiolytic action of compounds in rodents and is based on their innate aversion to brightly illuminated areas. Results showed that crocins exhibit a remarkable anxiolytic effect, similar to that of diazepam.

For the evaluation of crocins' effects on obsessive-compulsive disorder we selected m-chlorophenylpiperazine (m-CPP), a serotonergic 5-HT<sub>2c</sub> agonist, which is known to induce excessive self-grooming in rats. Excessive self-grooming is considered as a model of obsessive-compulsive behavior in rodents. The analysis of the results demonstrated that crocins antagonized the action of mCPP and reduced the time spent by rats in self-grooming.

Finally in order to examine crocins' efficacy in experimental models of schizophrenia we used ketamine, a non-competitive NMDA antagonist, which in subanesthetic dosage produces a psychotomimetic syndrome, characterized by hyperlocomotion, ataxia, stereotypies, social withdrawal and working memory deficits. To determine crocins' action against the whole spectrum of symptoms we performed three behavioral techniques: an open field test for the motor disorders, which are considered analogs of positive symptoms of schizophrenia, the social interaction test for the evaluation of social withdrawal, which serves as a model for

the negative symptoms and the novel object recognition task for the memory deficits, which mimic the cognitive deficits of patients with schizophrenia. Administration of crocins alleviated the motor disorders and antagonized the social withdrawal and memory deficits, caused by ketamine.

**Keywords:** crocins • rat • anxiety • obsessive-compulsive disorder • schizophrenia • mCPP • ketamine

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Κρόκος.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1. Φυτολογία.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Καλλιέργεια.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3. Παραγωγή.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.4. Ιστορικά στοιχεία.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.5. Σύγχρονες χρήσεις.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.6. Χημική σύσταση.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7. Φαρμακοκινητική.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.8. Τοξικότητα.....</i>	<i>15</i>
<i>1.1.9. Βιολογικές δράσεις.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.9.1. Χημειοπροστατευτική δράση.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.9.2. Αντιοξειδωτική δράση.....</i>	<i>18</i>
<i>1.1.9.3. Αντιφλεγμονώδης δράση.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.9.4. Αντικαρκινική δράση.....</i>	<i>22</i>
<i>1.1.9.5. Καρδιοπροστατευτική δράση.....</i>	<i>25</i>
<i>1.1.9.6. Δράσεις στο αναπνευστικό σύστημα.....</i>	<i>28</i>
<i>1.1.9.7. Αντιδιαβητική δράση.....</i>	<i>28</i>
<i>1.1.9.8. Αφροδισιακές ιδιότητες.....</i>	<i>30</i>
<i>1.1.9.9. Οφθαλμολογικές δράσεις.....</i>	<i>31</i>
<i>1.1.10. Δράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα.....</i>	<i>31</i>
<i>1.1.10.1. Αναλγητική δράση.....</i>	<i>32</i>
<i>1.1.10.2. Επίδραση στη μνήμη.....</i>	<i>33</i>
<i>1.1.10.3. Αντικαθλιπτική δράση.....</i>	<i>36</i>
<i>1.1.10.4. Αντιεπιληπτική δράση.....</i>	<i>37</i>
<i>1.1.10.5. Αντιπαρκινσονική δράση.....</i>	<i>37</i>
<i>1.1.10.6. Επίδραση στη σκλήρυνση κατά πλάκας.....</i>	<i>38</i>
<i>1.1.10.7. Επίδραση σε εγκεφαλική ισχαιμία.....</i>	<i>38</i>
<i>1.1.10.8. Επίδραση στον ύπνο.....</i>	<i>39</i>
<b>1.2. Αγγώδεις διαταραχές.....</b>	<b>41</b>
<i>1.2.1. Εισαγωγή.....</i>	<i>41</i>
<i>1.2.2. Παθογένεση.....</i>	<i>41</i>

1.2.2.1. Εγκεφαλικές δομές.....	41
1.2.2.2. Νορεπινεφρίνη.....	42
1.2.2.3. GABA.....	43
1.2.2.4. Σεροτονίνη.....	44
1.2.2.5. Γενετικοί παράγοντες.....	45
1.2.2.6. Συστηματικές παθήσεις.....	45
<i>1.2.3. Κλινική εικόνα.....</i>	<i>46</i>
<i>1.2.4. Θεραπεία.....</i>	<i>47</i>
1.2.4.1. Βενζοδιαζεπίνες.....	47
1.2.4.2. Υδροξυζίνη.....	49
1.2.4.3. Βουσπιρόνη.....	49
1.2.4.4. β-Αδρενεργικοί αναστολείς.....	50
<b>1.3. Ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή.....</b>	<b>51</b>
<i>1.3.1. Εισαγωγή.....</i>	<i>51</i>
1.3.2. Παθογένεση.....	51
1.3.2.1. Εγκεφαλικές δομές.....	51
1.3.2.2. Σεροτονίνη.....	53
1.3.2.3. Ντοπαμίνη.....	54
1.3.2.4. Νευροπεπίδια.....	55
1.3.2.5. Γενετικοί παράγοντες.....	55
<i>1.3.3. Κλινική εικόνα.....</i>	<i>56</i>
<i>1.3.4. Θεραπεία.....</i>	<i>58</i>
<b>1.4. Σχιζοφρένεια.....</b>	<b>59</b>
<i>1.4.1. Εισαγωγή.....</i>	<i>59</i>
<i>1.4.2. Παθογένεση.....</i>	<i>61</i>
1.4.2.1. Γενετική υπόθεση.....	61
1.4.2.2. Υπόθεση εγκεφαλικής βλάβης.....	62
1.4.2.3. Νευροχημικές υποθέσεις.....	63
1.4.2.4. Νευροεκφυλιστική θεωρία.....	67
<i>1.4.3. Κλινική εικόνα.....</i>	<i>67</i>
1.4.3.1. Διαταραχές σκέψης.....	68
1.4.3.2. Διαταραχές αντίληψης.....	68
1.4.3.3. Διαταραχές συναισθήματος.....	69
1.4.3.4. Ψυχοκινητικές διαταραχές.....	69

1.4.3.5. Διαταραχές βούλησης.....	70
1.4.3.6. Διαταραχές ομιλίας.....	70
1.4.3.7. Διαταραχές νοητικών λειτουργιών.....	70
1.4.3.8. Κοινωνική απόσυρση.....	71
1.4.3.9. Σωματικές ενοχλήσεις.....	71
1.4.3.10. Σύγχρονη ταξινόμηση.....	71
1.4.4. Θεραπεία.....	72
<b>2. ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>75</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>77</b>
<b>3.1. Πειραματόζωα.....</b>	<b>77</b>
<b>3.2. Φυτικό υλικό.....</b>	<b>77</b>
<b>3.3. Φάρμακα.....</b>	<b>78</b>
<b>3.4. Συμπεριφορικές τεχνικές.....</b>	<b>78</b>
3.4.1. Μοντέλο αγχώδους διαταραχής.....	78
3.4.2. Μοντέλο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής.....	80
3.4.3. Μοντέλο σχιζοφρένειας.....	83
3.4.3.1. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	83
3.4.3.2. Δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης.....	87
3.4.3.3. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου.....	89
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>92</b>
<b>4.1. Επίδραση κροκινών σε πειραματικό μοντέλο αγχώδους διαταραχής.....</b>	<b>92</b>
4.1.1. Επίδραση των κροκινών στον λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους.....	92
4.1.2. Επίδραση των κροκινών στον αριθμό διελεύσεων από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους.....	92
4.1.3. Επίδραση των κροκινών στον χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα στη δοκιμασία φωτός/σκότους.....	92
4.1.4. Επίδραση των κροκινών στην κινητική δραστηριότητα των επίμυων σε δοκιμασία κινητικότητας.....	95
<b>4.2. Επίδραση κροκινών σε πειραματικό μοντέλο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής.....</b>	<b>96</b>
4.2.1. Επίδραση των κροκινών και του mCPP επί της διάρκειας αυτοκαθαρισμού.....	96
4.2.2. Επίδραση των κροκινών και το mCPP επί του αριθμού επεισοδίων αυτοκαθαρισμού.....	96



4.2.3. Επίδραση των κροκινών και του mCPP επί της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων.....	97
<b>4.3. Επίδραση των κροκινών σε πειραματικό μοντέλο σχιζοφρένειας.....</b>	<b>99</b>
4.3.1. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	99
4.3.1.1. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί του δείκτη διάκρισης D κατά τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	99
4.3.1.2. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί του συνολικού χρόνου εξερεύνησης κατά την T2 της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	99
4.3.1.3. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κινητικής δραστηριότητας κατά την T2 της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	99
4.3.2. Δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης.....	102
4.3.2.1. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κοινωνικής αλληλεπίδρασης των επίμυων.....	102
4.3.2.2. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων κατά τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης.....	102
4.3.3. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου.....	104
4.3.3.1. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές κυκλικές κινήσεις στο ανοικτό πεδίο.....	104
4.3.3.2. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές κινήσεις της κεφαλής.....	104
4.3.3.3. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές αιωρήσεις του κορμού.....	104
4.3.3.4. Επίδραση των κροκινών στην επαγόμενη από την κεταμίνη αταξία.....	105
4.3.3.5. Επίδραση των κροκινών στην επαγόμενη από την κεταμίνη υπερκινητικότητα.....	105
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>107</b>
<b>5.1. Κροκίνες και άγχος.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2. Κροκίνες και ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή.....</b>	<b>108</b>
<b>5.3. Κροκίνες και σχιζοφρένεια.....</b>	<b>110</b>
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>114</b>
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>116</b>

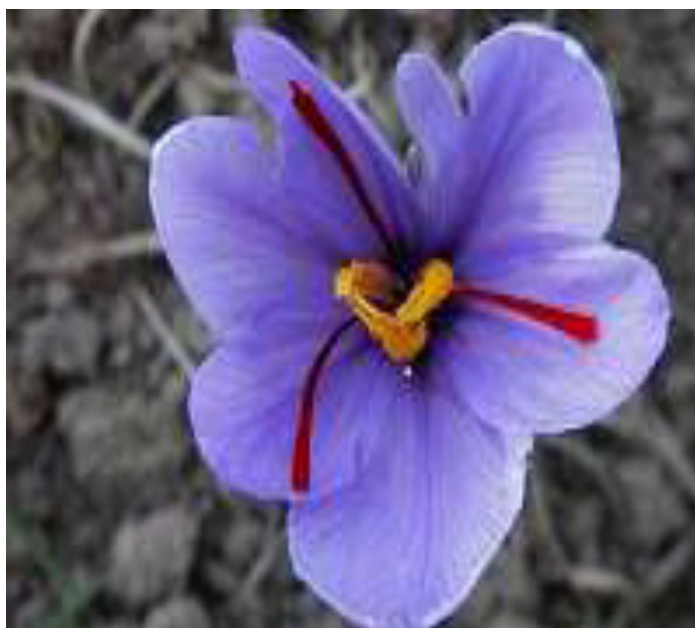
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΚΡΟΚΟΣ

### 1.1.1. Φυτολογία

Ο κρόκος ο ήμερος κατά Λινναίο, ή όπως είναι γνωστός στη διεθνή επιστημονική βοτανική ορολογία *Crocus sativus* Linneaus, ανήκει στην οικογένεια Iridaceae. Είναι ένα από τα είδη του κρόκου, που καλλιεργείται από τον άνθρωπο εδώ και αιώνες για τα πορφυρά του στίγματα (τρεις στύλοι του ύπερου), από την αποξήρανση των οποίων λαμβάνουμε το μπαχαρικό σαφράν ή ζαφορά, προϊόν υψηλής φαρμακευτικής, χρωστικής, αρτυματικής και μυρευσικής αξίας. Εκτός από τον *Crocus sativus* έχουν αναγνωρισθεί ποικίλα είδη κρόκου, ορισμένα εκ των οποίων είναι ο *Crocus cartwrightians*, ο *Crocus moabiticus*, ο *Crocus palasii*, ο *Crocus dispathaceus*, ο *Crocus thomasii*, ο *Crocus hadriaticus* και ο *Crocus niveus* (Mathew, 1977).

Οι βολβοί του φυτού έχουν διάμετρο 2-3 cm, σχήμα σφαιρικό και είναι σαρκώδεις με καστανόφαιους δικτυωτούς χιτώνες. Τα άνθη του σχηματίζουν μικρά ανορθωμένα χωνάκια και αποτελούνται από έξι βιολετί πέταλα, μήκους 4-5 cm και πλάτους 1 cm, τρεις κίτρινους στήμονες, τον στύλο που χωρίζεται σε τρία στίγματα και την ωοθήκη που είναι τρίχωρη, στενή και περιέχει άφθονα καστανά και στρογγυλά σπέρματα. Τα στίγματα, που αποτελούν και τη δρόγη του φυτού, έχουν χαρακτηριστικό πορτοκαλοκόκκινο στιλπνό χρώμα, μήκος 40-50 χιλιοστά, οδοντωτό άνω άκρο και γέρνουν από το βάρος τους προς τα κάτω. Τα φύλλα του βγαίνουν απευθείας από τον βολβό, είναι ραβδωτά και με σχήμα σπαθιού και έχουν έντονο πράσινο χρώμα. Αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια του χειμώνα και την άνοιξη φθάνουν σε μήκος τα 40-50 cm. Το συνολικό ύψος του φυτού δεν ξεπερνάει τα 40 cm (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Το άνθος του κρόκου

### *1.1.2. Καλλιέργεια*

Πρόκειται για ένα στείρο τριπλοειδές, δηλαδή δεν παράγει σπόρους και δεν αναπαράγεται εγγενώς. Ο μόνος τρόπος αναπαραγωγής είναι μέσω της διάσπασης και σποράς των βολβών του, δηλαδή των υπόγειων αναπαραγωγικών του οργάνων. Η ακολουθούμενη καλλιεργητική διαδικασία διαφέρει από χώρα σε χώρα και αποτελεί συνάρτηση των ιδιαίτερων εδαφικών και κλιματικών συνθηκών της εκάστοτε περιοχής, της μακροχρόνιας παράδοσης, των ειδικών γνώσεων και της δυνατότητας προσαρμογής στις νέες εξελίξεις των παραγωγών κάθε κράτους.

Η καλλιέργεια του κρόκου απαιτεί ξηρό και θερμό κλίμα το καλοκαίρι και ψυχρές θερμοκρασίες το χειμώνα. Το έδαφος πρέπει να είναι ξηρό, ασβεστώδες, επίπεδο και χωρίς δένδρα. Η σπορά γίνεται τους θερινούς μήνες και το φυτό ανθίζει μια φορά το χρόνο το φθινόπωρο περί τα μέσα του Οκτωβρίου. Το πρώτο βήμα είναι η συγκομιδή των λουλουδιών και ο διαχωρισμός των στιγμάτων από τα πέταλα (Εικόνα 2). Ακολουθεί η

αποξήρανση των στίγματων και η διαλογή του κρόκου. Η αποξήρανση έχει ιδιαίτερη βαρύτητα διότι καθορίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Αν η αποξήρανση γίνει σωστά, ο κρόκος διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες. Σε αυτή τη διαδικασία ο φρέσκος κρόκος χάνει τα 4/5 του αρχικού του βάρους και αποκτά το έντονο κόκκινο χρώμα του. Κατά τη διαλογή τα κόκκινα στίγματα διαχωρίζονται από τους κίτρινους στήμονες, τη γύρη και τις ξένες προσμίξεις. Τα αποξηραμένα στίγματα για να διατηρήσουν τα χαρακτηριστικά τους πρέπει να αποθηκευτούν κατά τρόπο που να τα προστατεύει από την υγρασία, την ηλιακή ακτινοβολία και τη θερμότητα.



Εικόνα 2. Τα στίγματα του κρόκου

Ο κρόκος θεωρείται ιθαγενές φυτό της νότιας Ευρώπης. Καλλιεργείται σε χώρες της Μεσογείου όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Γαλλία, η Τουρκία, η Λιβύη, η Αλγερία, το Μαρόκο, η Αίγυπτος καθώς και σε χώρες της Ασίας όπως το Πακιστάν, η Κίνα, η Ιαπωνία, η Ινδία, το Ιράν και το Αζερμπαϊτζάν (Giaccio, 2004). Στην Ελλάδα συστηματική καλλιέργεια του

φυτού γίνεται στο νομό Κοζάνης και συγκεκριμένα στα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα, Αγία Παρασκευή, Άνω Κώμη, Κάτω Κώμη, Λευκοπηγή και Πετρανά. Η καλλιέργεια του φυτού στην περιοχή καλύπτει σήμερα 3000 στρέμματα, το 1/3 των οποίων είναι βιολογικής καλλιέργειας. Η καλλιέργεια του κρόκου ακόμη και σήμερα στα περισσότερα μέρη του κόσμου γίνεται με τη χρήση παραδοσιακών ποικιλιών από οικογενειακές εκμεταλλεύσεις, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αναδύονται και απόπειρες εισαγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών στην καλλιέργεια του κρόκου.

### *1.1.3. Παραγωγή*

Για την παραγωγή μόλις 1 κιλού σαφράν απαιτούνται 5 κιλά φρέσκων στιγμάτων, 100.000 – 150.000 άνθη, εδαφική έκταση περίπου 1600 τετραγωνικών μέτρων και 400 εργατο-ώρες (Chen et al, 2003). Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη δυσκολία να καλλιεργηθεί οπουδήποτε, καθώς χρειάζεται ειδικές κλιματικές συνθήκες, και την ανάγκη χειρωνακτικής συγκομιδής και επεξεργασίας μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, καθιστούν το σαφράν το ακριβότερο μπαχαρικό στην παγκόσμια αγορά (Soeda et al, 2007). Επιβαρυντικό παράγοντα αποτελεί και το γεγονός πως ο κρόκος είναι ευάλωτος σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως μύκητες και ιούς που μεταδίδονται μέσω των βολβών και μπορεί να διαδοθούν και να καταστρέψουν όλη τη σοδειά.

Η ετήσια παραγωγή σαφράν παγκοσμίως ανέρχεται στους 200 τόνους, το 90% των οποίων είναι ιρανικής προέλευσης (Caballero Ortega et al, 2007). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στο χαμηλό εργατικό κόστος της χώρας. Η νόθευση του σαφράν είναι συχνό φαινόμενο: ένα ποσοστό της τάξεως του 30% των δειγμάτων δεν πληρούν τα κριτήρια ποιότητας, όπως έχουν θεσπιστεί από το ISO (International Standard Organization, ISO 3632:1980, pp9, 1980) (Schmidt et al, 2007). Για τη νόθευση συνήθως

χρησιμοποιούνται τρία φυτά: το *Curcuma longa* L. (οικογένεια Zingiberaceae), το *Colchicum autumnale* L. (οικογένεια Liliaceae) και το *Carthamus tinctorium* L. (οικογένεια Compositae) (Basker & Negbi, 1983).

Το κόστος μπορεί να σταθεί απαγορευτικό για την πιθανή αξιοποίηση του σαφράν ως θεραπευτικού μέσου. Μια πιθανή λύση σε αυτό το πρόβλημα θα ήταν η συνθετική παραγωγή των συστατικών του μέσα από μεθόδους βιοτεχνολογίας. Μια τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να εξασφαλίσει μέγιστη απόδοση, άριστη ποιότητα, συνθήκες στείρες παθογόνων και σαφώς ελαττωμένο κόστος (Abdullaev & Espinosa-Aguirre, 2004).

Προσπάθειες για ιστοκαλλιέργειες του φυτού και *in vitro* αναπαραγωγή των στιγμάτων βρίσκουμε ήδη από τη δεκαετία του 1980. Η καλλιέργεια στιγμάτων και τμήματος ωοθηκών σε διάφορα καλλιεργητικά μέσα (Linsmaier-Skoog ή MS agar) εμπλουτισμένα με κυτοκίνες και άλλους αυξητικούς παράγοντες οδήγησε σε εργαστηριακή ανάπτυξη τεχνητών στιγμάτων και βολβών, καθώς και σε σύνθεση κροκινών (Sano & Himeno, 1987; Chichiricco & Caiola, 1987; Plessner et al, 1990; Sarma et al, 1991; Mir et al, 2010). Ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν μέτρια, καθώς τα τεχνητά στίγματα κρόκου παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη και χαμηλά επίπεδα δευτερογενών μεταβολιτών.

Η απόπειρα σύνθεσης κροκινών μέσω ενζυμικής γλυκοζυλίωσης της κροκετίνης από την άλλη δεν είχε καλύτερα αποτελέσματα: η διαδικασία απέδωσε αρκετούς γλυκοζίτες κροκετίνης, αλλά τα επίπεδα κροκινών μεταξύ αυτών ήταν εξαιρετικά χαμηλά (Chen et al, 2003).

#### 1.1.4. Ιστορικά στοιχεία

Η λέξη κρόκος προέρχεται από την ελληνική λέξη «κρόκη» που σημαίνει νήμα ή υφάδι που με τη σαΐτα πλέκεται στο στημόνι. Φαίνεται πως αυτή έχει

τις ρίζες της στην βαβυλωνιακή λέξη kurkanu και στην αραμαϊκή kurkema. Στην ελληνική μυθολογία ο Κρόκος ήταν ο εραστής της νύμφης Σμίλακος, τον οποίο ο θεός Ερμής μεταμόρφωσε στο ομώνυμο άνθος, όταν τον σκότωσε κατά λάθος την ώρα που αγωνίζονταν στη δισκοβολία. Η λέξη σαφράν προέρχεται από την περσική λέξη zafaran που σημαίνει κίτρινο. Η τελευταία θεωρείται πως προήλθε με τη σειρά της από την σουμερική λέξη har.sag.sar, η οποία έχει την ίδια εννοιολογική σημασία με τη λέξη a-zu-ri-ru που βρέθηκε χαραγμένη σε ασσυριακή πλάκα (Giaccio, 2004).

Ο κρόκος ήταν γνωστός σε διάφορους αρχαίους πολιτισμούς όπως της Ελλάδας, της Αιγύπτου, της Μεσοποταμίας και της Ρώμης, όπου το φυτό εισήχθη από την Κιλικία. Οι χρήσεις του ήταν τέσσερις: ως χρωστική ουσία για βαφή υφασμάτων, ως άρτυμα στη μαγειρική, ως αρωματική ουσία σε ναούς και θρησκευτικές ιεροτελεστίες και ως θεραπευτικό βότανο. Η καταγωγή του είναι άγνωστη. Πιθανότατα προήλθε από φυσική μετάλλαξη που συνέβη κατά την αρχαιότητα σε περιοχές της Περσίας και της λεκάνης της Μεσογείου. Άλλοι υποστηρίζουν πως καλλιεργήθηκε αρχικά στην Ανατολή και μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τους σταυροφόρους κατά τον 13<sup>ο</sup> αιώνα. Μια διαφορετική θεωρία ωστόσο υποστηρίζει ότι το φυτό καλλιεργήθηκε αρχικά στην Ελλάδα κατά τη μινωική περίοδο και μεταφέρθηκε στην Ανατολή κατά τις εκστρατείες του Μεγάλου Αλεξάνδρου. Όποια και αν είναι η αλήθεια αυτό που γνωρίζουμε με μεγαλύτερη ασφάλεια είναι ότι οι Άραβες αφού συστηματοποίησαν την καλλιέργειά του, τον έφεραν στην Ισπανία το 960 μ.Χ. και από εκεί διαδόθηκε έμμεσα ή άμεσα κατά τους νεότερους χρόνους στα υπόλοιπα κράτη της Ευρώπης. Η σημερινή καλλιέργεια του φυτού στην Ελλάδα στην περιοχή της Κοζάνης εισήχθη από την Αυστρία κατά τον 17<sup>ο</sup> αιώνα, χάρη σε Έλληνες εμπόρους που διατηρούσαν στενές εμπορικές σχέσεις με τη Βιέννη.

Τα πρώτα γνωστά αρχεία θεραπευτικών βοτάνων βρέθηκαν χαραγμένα σε μαρμάρινες πλάκες της Μεσοποταμίας και χρονολογούνται από το 2600 π.Χ. Περιλαμβάνουν περίπου 1000 φαρμακευτικές συνταγές φυτικής προέλευσης.

Μεταξύ πολλών ελαίων συναντούμε και αυτό του σαφράν. Η επόμενη μαρτυρία για την χρήση του κρόκου στην αρχαιότητα έρχεται από την μινωική εποχή. Στα ανάκτορα της Κνωσού στην Κρήτη, αλλά και στο Ακρωτήρι της Σαντορίνης βρέθηκαν τοιχογραφίες, που χρονολογούνται από το 1600 π.Χ., στις οποίες απεικονίζονται κήποι με κρόκους και νεαρά άτομα να συλλέγουν άνθη κρόκου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. «Οι κροκοσυλλέκτες»

Η Κλεοπάτρα και οι Φαραώ χρησιμοποιούσαν το σαφράν σε καλλυντικά ως αρωματική και σαγηνευτική ουσία, οι αρχαίοι Φοίνικες στις προσφορές τους στη θεά Ασάρτη, οι βυζαντινοί ζωγράφοι ως χρωστική ουσία. Αναφορές στον κρόκο βρίσκουμε στην Παλαιά Διαθήκη, στην Ιλιάδα του Ομήρου, στην Ιστορία των Φυτών του Θεόφραστου, στις Νεφέλες του Αριστοφάνη, καθώς και σε έργα του Σοφοκλή, του Αισχύλου και του Στράβωνα. Μαρτυρίες για τη θεραπευτική χρήση του κρόκου βρίσκουμε σε γραπτά του Ιπποκράτη, στο έργο



Canon Medicinae του Αβικέννα και αργότερα στο Materia Medica του Διοσκουρίδη και σε έργα του Γαληνού και του Πλίνιου.

Κατά τον Μεσαίωνα η αξία του κρόκου λόγω της σπανιότητάς του ήταν τόσο υψηλή, ώστε η εμπορία του υπόκειτο σε πολύ αυστηρούς κανόνες. Η αποθήκευσή του ήταν μια συνηθισμένη πρακτική, καθώς παρείχε ένα βολικό τρόπο φύλαξης αποθεματικού κεφαλαίου σε εύκολα ανταλλάξιμη μορφή. Αποτέλεσε μάλιστα και αφορμή για την Μάχη του Σαφράν το 1374. Την εποχή εκείνη το κέντρο της εμπορίας του ήταν η ελβετική πόλη Βασιλεία, στην οποία έφτανε σαφράν προερχόμενο από την Ιταλία. Όταν ένα φορτίο 360 κιλών σαφράν κατά το ταξίδι του προς την Ελβετία κλάπηκε ως λάφυρο, η Βασιλεία έστειλε στρατό να ανακαταλάβει το φορτίο και να προστατεύσει τους εμπορικούς δρόμους μεταφοράς από ανάλογες ενέργειες. Στην Νυρεμβέργη το 1449 τρία άτομα καταδικάστηκαν στην πυρά με την κατηγορία της νόθευσης του σαφράν, όπως αναφέρει ο Dizani στην πραγματεία του περί φαρμακογνωσίας. Το 1671 εκδόθηκε στη Γένοβα ένα βιβλίο περίπου 300 σελίδων με τον τίτλο «Crocologia» και με συγγραφέα τον Hertodt. Στο έργο, το οποίο όπως γίνεται κατανοητό και από τον τίτλο του ήταν αφιερωμένο στον κρόκο, υπήρχαν οδηγίες για την αντιμετώπιση ποικίλων παθήσεων με τη βοήθεια του κρόκου.

Στους νεότερους χρόνους και συγκεκριμένα το 1770 στο Dizionario di Commercio οι αδερφοί Savari αναφέρουν: «οι ιατροί χρησιμοποιούν το σαφράν με μεγάλη επιτυχία για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών». Έναν αιώνα αργότερα ωστόσο η χρήση του έχει αρχίσει να υποχωρεί, καθώς ο Villavecchia στο Dizionario di Merciologia το 1895 αναφέρει: «το σαφράν κάποτε χρησιμοποιούνταν στην ιατρική, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται μόνο για την παρασκευή του λάβδανου» (Giaccio, 2004).

### *1.1.5. Σύγχρονες χρήσεις*

Σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως ως άρτυμα στη μαγειρική και στη ζαχαροπλαστική. Δίνει μια χαρακτηριστική γεύση και χρώμα σε φαγητά, ροφήματα, ποτά και τυροκομικά. Οι Άραβες τον χρησιμοποιούν για να αρωματίσουν το αρνί, το κοτόπουλο και το ρύζι. Είναι βασικό συστατικό διάσημων πιάτων όπως της γαλλικής bouillabaisse, του ιταλικού risotto και της ισπανικής paella. Στην Ινδία χρησιμοποιείται ως θυμίαμα σε θρησκευτικές τελετές και ως χρωστικό μέσο για τη βαφή των μανδύων των ιερέων. Οι χρωστικές του ιδιότητες αξιοποιούνται και σε ιστολογικές τεχνικές για τη χρώση του συνδετικού ιστού.

Οι ενδείξεις για τη χρήση του σαφράν στην παραδοσιακή ιατρική καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών. Κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση κεφαλαλγίας, πυρετικών σπασμών, κατάθλιψης, κρυολογήματος, οφθαλμικών παθήσεων, καρδιαγγειακών παθήσεων, δερματικών βλαβών και όγκων. Θεωρείται πως διευκολύνει την πέψη, αυξάνει την όρεξη, ανακουφίζει από γαστρεντερικές διαταραχές και από στομαχικά άλγη. Στην κινεζική ιατρική θεωρείται εξαιρετικό αντιστηθαγχικό, αναλγητικό, εμμηναγωγό, ηρεμιστικό, σπασμολυτικό και αφροδισιακό. Στην περσική ιατρική αξιοποιείται σε διαταραχές κύκλου, εργώδη τοκετό, φλεγμονές, έμετο και αναπνευστικές διαταραχές. Όπως όλα τα βότανα που χρησιμοποιούνταν ως εμμηναγωγά, το σαφράν ήταν και ένα μέσο για την πρόκληση αποβολής (Hosseinzadeh & Sadeghnia, 2007; Sugiura et al, 1995; Akhondzadeh et al, 2004; Abdullaev & Espinosa-Aguirre, 2004; Tavakkol-Afshari et al, 2008).

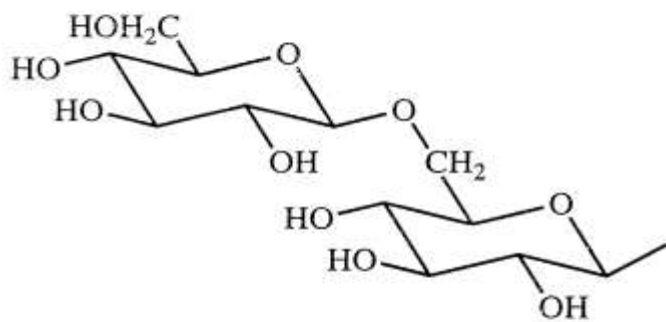
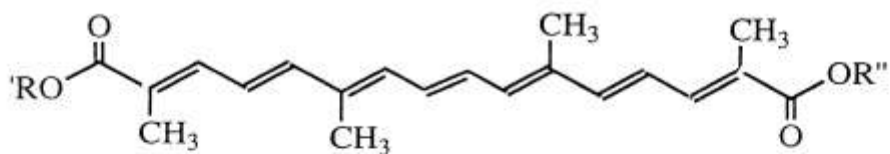
### *1.1.6. Χημική σύσταση*

Η χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού απέδειξε πως τα βασικά δρόντα συστατικά του σαφράν είναι τα καροτενοειδή κροκετίνη και κροκίνες, στα οποία οφείλεται το έντονο χρώμα του και οι μονοτερπενικές αλδεΐδες

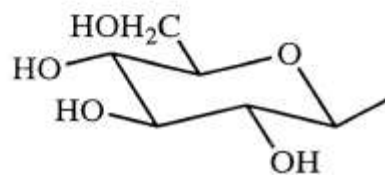
πικροκροκίνη και σαφρανάλη. Η πικροκροκίνη είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση του, ενώ η σαφρανάλη παρέχει στο μπαχαρικό την ιδιαίτερη μυρωδιά του. Ανάλογα με την ποιότητα του κρόκου τα ποσοστά τους επί του ολικού βάρους των στιγμάτων κυμαίνονται αντιστοίχως: 30% για τις κροκίνες, 5-15% για την πικροκροκίνη και 2,5% για τη σαφρανάλη (Schmidt et al, 2007).

Η κροκετίνη ( $C_{20}H_{24}O_4$ ) είναι ένα καροτενοειδές που χαρακτηρίζεται από διτερπενική συμμετρική δομή με επτά διπλούς δεσμούς και τέσσερις μεθυλικές ομάδες. Η αλυσίδα της σταθεροποιείται στα άκρα με δύο καρβοξυλικές ομάδες. Είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτή, αλλά εμφανίζει υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες. Προέρχεται από το καροτενοειδές ζεαξανθίνη και με γλυκοζυλίωση μετατρέπεται σε κροκίνες (Giaccio, 2004; Asai et al, 2005).

Οι κροκίνες είναι trans-γλυκοζίτες της κροκετίνης. Η γλυκοζυλίωση γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων που λέγονται γλυκοζυλοτρανσφεράσες (GTs) και ουσιαστικά μετατρέπουν την κροκετίνη σε υδατοδιαλυτή και σταθερή μορφή, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη βιοδιαθεσιμότητά της (Moraga et al, 2004). Ανάλογα με τον αριθμό και το είδος των σακχάρων που φέρουν διακρίνουμε τέσσερα είδη κροκινών: η κροκίνη 1 είναι δισακχαρίτης με δύο μόρια γεντιοβιόζης, η κροκίνη 2 είναι δισακχαρίτης με ένα μόριο γεντιοβιόζης και ένα μόριο γλυκόζης, η κροκίνη 3 είναι μονοσακχαρίτης με ένα μόριο γεντιοβιόζης και η κροκίνη 4 είναι μονοσακχαρίτης με ένα μόριο γλυκόζης (Εικόνα 4). Είναι ουσίες ευαίσθητες στο οξυγόνο, στη θερμότητα, στην φωτεινή ακτινοβολία και στην β-γλυκοσιδάση. Για το λόγο αυτό οι κροκίνες είναι σταθερές μόνο στη φυσική τους μορφή και υπόκεινται σε αξιοσημείωτη αποδόμηση μετά την απομόνωσή τους. Τα επίπεδα κροκινών στο φυτό αυξάνονται την περίοδο λίγο πριν την ανθοφορία και φθάνουν τα μέγιστα επίπεδά τους κατά την πλήρη άνθηση των λουλουδιών. Εκτός από τον *Crocus sativus* L. κροκίνες ανευρίσκονται και στο φυτό *Gardenia jasminoides* E. (Li et al, 1999; Tarantilis et al, 1994; Soeda et al, 2007).



X

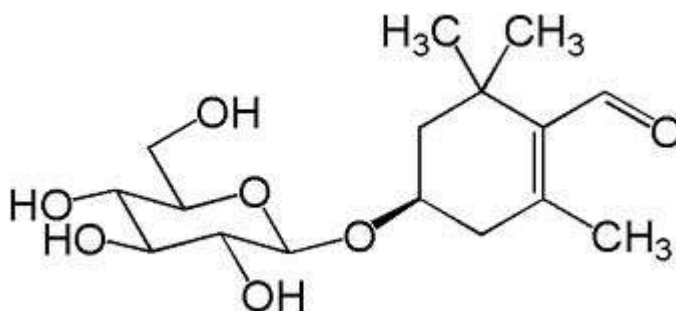


Y

Κροκίνη 1:  $R' = R'' = X$   
 Κροκίνη 2:  $R' = X, R'' = Y$   
 Κροκίνη 3:  $R' = X, R'' = H$   
 Κροκίνη 4:  $R' = Y, R'' = H$   
 Κροκετίνη:  $R' = R'' = Y$   
 X : γεντιοβιόζη  
 Y : γλυκόζη

Εικόνα 4. Χημική δομή κροκινών και κροκετίνης

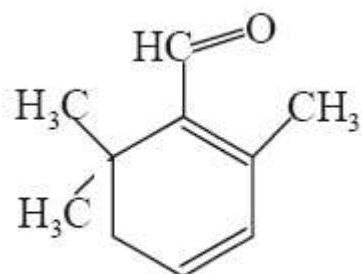
Η πικροκροκίνη ( $C_6H_{26}O_7$ ) ανακαλύφθηκε από τον Kajszer το 1884. Πρόκειται για σακχαρίτη, ο οποίος διασπάται εύκολα με μια  $\beta$ -γλυκοσιδάση σε ένα μόριο γλυκόζης και ένα άγλυκο μόριο (Εικόνα 5). Το τελευταίο όταν χάσει ένα μόριο νερού με υδρόλυση μετατρέπεται στη σαφρανάλη. Είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του σαφράν, συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων (Giaccio, 2004).



Εικόνα 5. Χημική δομή πικροκροκίνης

Η σαφρανάλη ( $C_{10}H_{14}O$ ) είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου (Εικόνα 6). Η ονομασία της προήλθε από τους ερευνητές Kuhn και Winterstein που ήταν και οι πρώτοι που την απομόνωσαν με υδρόλυση από την πικροκροκίνη. Αποτελεί το 70% του πτητικού κλάσματος του σαφράν και δίνει στον κρόκο το χαρακτηριστικό του άρωμα. Απελευθερώνεται με αφυδάτωση κατά την διαδικασία αποξήρανσης του φυτικού υλικού, γι' αυτό τα φρέσκα στίγματα είναι άοσμα. Λόγω της μη πολικής της φύσης και του σχετικά χαμηλού μοριακού της βάρους παρουσιάζει καλύτερη διάχυση δια της

κυτταρικής μεμβράνης και ως εκ τούτου επιτρέπει ταχύτερη βιολογική δράση (Giaccio, 2004; Escribano et al, 1996).



Εικόνα 6. Χημική δομή σαφρανάλης

Σε χαμηλότερες ποσότητες ανευρίσκονται στον κρόκο: ανθοκυανίνη, β-καροτένιο, τετραϋδρολυκοπένιο, ζεαξανθίνη, φλαβονοειδή (κουερκετίνη και καμπφερόλη), αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες (ριβοφλαβίνη και θειαμίνη), 2-φαινυλαιθανόλη και ναφθαλένιο (Abdullaev & Espinosa-Aguirre, 2004; Papandreou et al, 2006; Giaccio, 2004).

#### 1.1.7. Φαρμακοκινητική

Η αλβουμίνη είναι η κύρια εξωκυττάρια πρωτεΐνη του πλάσματος. Ο ρόλος της είναι να συνδέεται με οργανικά και ανόργανα μόρια που δεν διαλύονται στο ύδωρ και να τα μεταφέρει σε θέσεις στόχους. Η σύνδεση με την αλβουμίνη επηρεάζει τη φαρμακολογική, θεραπευτική και τοξική δράση των μεταφερόμενων παραγόντων. Φαρμακοκινητικές μελέτες διερεύνησαν την αλληλεπίδραση της κροκετίνης και της σαφρανάλης με την ανθρώπινη αλβουμίνη σε υδατικά διαλύματα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και οι

δύο ουσίες συνδέονται με την αλβουμίνη στις θέσεις πρόσδεσης των λιπαρών οξέων με μη ειδικό τρόπο (H-bonding) (Kanakis et al, 2007).

Άλλες μελέτες διερεύνησαν την απορρόφηση από την κυκλοφορία της κροκετίνης και των κροκινών μετά από χορήγηση *per os* σε ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η κροκετίνη όταν χορηγείται από το στόμα μεταβολίζεται μερικώς σε γλυκουρονικούς εστέρες στο βλεννογόνο του εντέρου και στο ήπαρ. Τα επίπεδά της στο πλάσμα φθάνουν στα μέγιστα επίπεδά τους περίπου 30 λεπτά μετά την χορήγηση και σταδιακά υποχωρούν μέχρι να μηδενιστούν 8 ώρες μετά την χορήγηση. Αυτή η ταχεία απορρόφηση δείχνει ότι η κροκετίνη εισέρχεται στην κυκλοφορία μέσω της κοίλης φλέβας και όχι μέσω της λεμφικής οδού, όπως άλλα καροτενοειδή που καθυστερούν περισσότερο να φθάσουν τα ανώτατα επίπεδά τους στο πλάσμα. Από την άλλη πλευρά τα γλυκουρονίδια της κροκετίνης διατηρούνται στο πλάσμα ακόμη και μετά την πάροδο των 8 ωρών. Αν και οι γλυκουρονικές ενώσεις θεωρούνται γενικά μεταβολικά υποπροϊόντα που αποβάλλονται στα ούρα, ορισμένα από αυτά εμφανίζουν βιολογική δράση μεταφέροντας τις ουσίες από τις οποίες προέρχονται σε ιστούς στόχους. Στα ποντίκια που έλαβαν κροκίνες, ανευρέθησαν επίσης κροκετίνη και γλυκουρονίδια της σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν κροκίνες στο πλάσμα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι κατά την *per os* χορήγηση οι κροκίνες υδρολύονται από β-γλυκοσιδάσες σε κροκετίνη στον γαστρεντερικό σωλήνα είτε πριν είτε κατά τη διάρκεια της απορρόφησης και ακολουθούν στη συνέχεια το μεταβολικό μονοπάτι της κροκετίνης (Asai et al, 2005).

Μεταγενέστερη μελέτη ενίσχυσε τα ανωτέρω ευρήματα καθώς παρατήρησε πως μετά την *per os* χορήγηση κροκίνης σε αρουραίους, η ουσία δεν ανιχνεύθηκε στο πλάσμα μέχρι και 6 ώρες μετά την τελευταία δόση. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής δόσης της κροκίνης (80%) αποβλήθηκε στο εντερικό περιεχόμενο μετά από 24 ώρες. Το αξιοσημείωτο είναι ότι στο πλάσμα βρέθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις κροκετίνης, οι οποίες όμως παρέμεναν σταθερές ακόμη και μετά από

επαναλαμβανόμενη χορήγηση κροκινών. Μια πιθανή ερμηνεία για το φαινόμενο αυτό είναι ότι η κροκετίνη λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της μεταβολίζεται ταχέως και δεν έχει την τάση να αθροίζεται (Xi et al, 2007).

Η πρώτη μελέτη για τη φαρμακοκινητική του κρόκου στους ανθρώπους αποκάλυψε ότι δύο ώρες μετά την από του στόματος κατανάλωση αφενήματος κρόκου από υγιείς ενήλικες, ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα υψηλά επίπεδα κροκετίνης (1.24-3.67 M), ενώ 24 ώρες μετά υπάρχει σαφής πτώση αυτών (0.10-0.24 M), όχι όμως και εξαφάνισή τους (Chryssanthi et al, 2011). Σε επόμενη μελέτη βρέθηκε ότι μετά την από του στόματος χορήγηση κάψουλας κροκετίνης, η ουσία παρουσίασε ταχεία απορρόφηση, καθώς σε 1 ώρα ήδη άρχισε να ανιχνεύεται στο πλάσμα, για να φθάσει στα μέγιστα επίπεδα σε 4 ώρες μετά την πρόσληψη. Ο χρόνος ημίσειας ζωής  $T(1/2)$  της βρέθηκε να κυμαίνεται από 6.1 ως 7.5 ώρες (Umigai et al, 2011).

#### 1.1.8. Τοξικότητα

Η επώαση φυσιολογικών κυττάρων (σπληνικά, ινοβλάστες), σε εκχύλισμα στιγμάτων κρόκου δεν επηρεάζει τη μορφολογία ούτε την βιωσιμότητά τους, ακόμη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται από μια σειρά *in vitro* μελετών (Nair et al, 1991; Mousavi et al, 2009; Abdullaev et al, 2003).

Μελέτες *in vivo* δείχνουν ότι οι μέγιστες μη θανατηφόρες δόσεις εκχυλίσματος στιγμάτων κρόκου σε ποντίκια ήταν 0.8 g/kg ip για υδατικό διάλυμα και 2 g/kg ip για αλκοολικό διάλυμα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές του LD50 βρέθηκαν να είναι 1.6 g/kg ip για υδατικό διάλυμα και 3.38 g/kg ip για αλκοολικό διάλυμα (Hosseinzadeh et al, 2002). Σε αρουραίους, η χορήγηση εκχυλίσματος στιγμάτων κρόκου σε δόσεις μέχρι και 100 mg/kg ip φαίνεται να είναι ασφαλής (Mohajeri et al, 2009). Όσον αφορά την από του στόματος χορήγηση, η LD50 του σαφράν στα ποντίκια είναι 20.7 g/kg. Από την πλειονότητα των μελετών συμπεραίνουμε πως συγκεντρώσεις από 0.1 έως 5



g/kg είναι μη τοξικές σε ποντίκια (Abdullaev et al, 2003). Μελέτες βιοχημικών δεικτών έδειξαν ότι η χορήγηση κρόκου per os σε ποντίκια σε δόση 200 mg/kg για 9 ημέρες δεν επηρέασε καθ'οιονδήποτε τρόπο τα επίπεδα των λευκών αιμοσφαιρίων, την ηπατική και τη νεφρική λειτουργία (Nair et al, 1991). Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι το εκχύλισμα του κρόκου προκαλεί αύξηση της όρεξης και κατ'επέκταση αύξηση του σωματικού βάρους σε πειραματόζωα (Mohajeri et al, 2009; Al Mofleh et al, 2006).

Ορισμένες παρενέργειες του κρόκου στον άνθρωπο έχουν ήδη αναφερθεί από τον Μεσαίωνα. Συγκεκριμένα ο Rivenius τον 17<sup>ο</sup> αιώνα παρατήρησε ότι μια υπερβολικά μεγάλη δόση σαφράν προκάλεσε το θάνατο μιας γυναίκας τρεις μέρες μετά τη λήψη. Αποπληξία και απρόσφορη ευφορία έχουν επίσης καταγραφεί στις παρενέργειες του φυτού (Matthew, 1977). Σε γενικές γραμμές δόσεις μέχρι και 1.5 g θεωρούνται ασφαλείς για τον άνθρωπο. Δεδομένου ότι στις κλινικές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα η θεραπευτική δόση ήταν τα 30 mg, αντιλαμβανόμαστε πως υπάρχει ευρύ περιθώριο ασφαλείας. Τοξικές δράσεις αρχίζουν να εμφανίζονται από τα 5 g, ενώ τα 20 g θεωρούνται θανατηφόρος δόση. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία υπάρχει η αναφορά μιας 28χρονης γυναίκας που έλαβε 5 g σαφράν διαλυμένα σε γάλα με σκοπό να προκαλέσει αποβολή. Η δόση αυτή προκάλεσε δερματικές αιμορραγικές εκδηλώσεις, αξιοσημείωτη θρομβοκυτταροπενία, διαταραχές πήξης του αίματος και η βιοψία δέρματος έδειξε σοβαρή καταστροφή τριχοειδών και προτριχοειδών αγγείων (Giaccio et al, 2004). Σε δόσεις άνω των 10 g το σαφράν προκαλεί αποβολή εμβρύου, έμετο, μητρορραγία, αιματουρία, αιμορραγίες του γαστρικού και εντερικού βλεννογόνου, ζάλη και ίλιγγο. Σε αυτή τη δόση τα χρωστικά στοιχεία του κρόκου μπορεί να συσσωρευτούν στον σκληρό χιτώνα του οφθαλμού, στο δέρμα και στους βλεννογόνους δίνοντας την εικόνα ίκτερου. Μία μόνο περίπτωση αναφυλακτικής αντίδρασης στο φυτό έχει καταγραφεί, ωστόσο η αλλεργιογόνος δράση του θεωρείται εξαιρετικά χαμηλή (Schmidt, 2007). Σε πρόσφατη κλινική μελέτη η χορήγηση σαφράν σε μορφή ταμπλέτας (200 και 400 mg για 7 ημέρες) σε υγιείς εθελοντές δεν

προκάλεσε κλινικά σημαντικές μεταβολές σε επίπεδο κλινικών, ηλεκτροκαρδιογραφικών, αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων (Modaghegh et al, 2008). Ουσιαστικά η χορήγηση κρόκου αντενδείκνυται μόνο σε εγκυμονούσες γυναίκες διότι μπορεί να προκαλέσει συστολές της μήτρας.

### *1.1.9. Βιολογικές δράσεις*

Ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών τόσο σε προκλινικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο, αναδεικνύει τις ευεργετικές επιδράσεις του κρόκου και των συστατικών του σε διάφορα συστήματα και σε ποικίλες παθήσεις.

#### 1.1.9.1. Χημειοπροστατευτική δράση

Μελέτες *in vivo* σε ποντίκια έδειξαν ότι η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (50 mg/kg ip για 5 ημέρες) αναστέλλει την τοξικότητα της σισπλατίνης, ενός κυτταροτοξικού αντινεοπλασματικού παράγοντα. Συγκεκριμένα τα πειραματόζωα που έλαβαν κρόκο και σισπλατίνη εμφάνισαν τριπλάσιο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με εκείνα που έλαβαν μόνο σισπλατίνη. Επιπλέον ο κρόκος ανέστειλε μερικώς την απώλεια βάρους, την αναιμία και τη λευκοπενία που προκάλεσε η σισπλατίνη (Nair et al, 1991). Φαίνεται πως η χημειοπροστατευτική δράση του κρόκου οφείλεται στην κροκίνη, καθώς πρόσφατες έρευνες σε επίμυες έδειξαν ότι η κροκίνη (100, 200, 400 mg/kg, ip) ανταγωνίστηκε την επαγόμενη από σισπλατίνη νεφροτοξικότητα, καθώς ανέστειλε τόσο την άνοδο των επιπέδων ουρίας και κρεατινίνης στον ορό, όσο και τις ιστολογικές αλλοιώσεις που προκάλεσε η χορήγηση σισπλατίνης στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια (Naghizadeh et al, 2010).

Νεότερες μελέτες έδειξαν επίσης πως ο κρόκος προστατεύει από τις τοξικές επιδράσεις και άλλων αντινεοπλασματικών φαρμάκων όπως της

κυκλοφωσφαμίδης και της μιτομυκίνης-C. Ειδικότερα η χορήγηση κρόκου σε πειραματόζωα ανέστειλε τις βλάβες που προκαλούν αυτοί οι αλκυλιωτικοί παράγοντες στο DNA κυττάρων του μυελού των οστών, ενώ σε πιο πρόσφατη μελέτη η χορήγηση κροκίνης σε επίμυες (10 mg/kg pro για 6 ημέρες) ανταγωνίστηκε σημαντικά την νεφροτοξική και ηπατοτοξική δράση της κυκλοφωσφαμίδης, μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Premkumar et al, 2006; Jnaneshwari et al, 2013).

Η κροκετίνη βρέθηκε πως αναστέλλει την κυτταροτοξική δράση της αφλατοξίνης B1 σε καλλιέργειες C3H10T<sub>1/2</sub> κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και σε *in vivo* έρευνες καθώς μεταγενέστερη μελέτη έδειξε πως η χορήγηση κροκετίνης ανέστειλε την ηπατοτοξική δράση της αφλατοξίνης B1 σε αρουραίους. Συγκεκριμένα μείωσε κατά 40% τις προκαλούμενες από την αφλατοξίνη ηπατικές αλλοιώσεις και ελάττωσε τα επίπεδα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST), της αλανινικής αμινοτρανσφεράσης (ALT), της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και της γ-γλουταμινοτρανσπεπτιδάσης (γ-GT) στον ορό (Wang et al, 1991).

#### 1.1.9.2. Αντιοξειδωτική δράση

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) και της ικανότητας του κυττάρου να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι ROS είναι ελεύθερες ρίζες, ιόντα ή μόρια, που παράγονται σε χαμηλά επίπεδα από τον αερόβιο κυτταρικό μεταβολισμό και οι βλάβες που προκαλούν φυσιολογικά επιδιορθώνονται συνεχώς. Όταν όμως η παραγωγή τους αυξηθεί υπέρμετρα ή οι αμυντικοί μηχανισμοί του κυττάρου ανεπαρκούν, προκαλούνται αλλοιώσεις των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, που οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου είτε με απόπτωση, είτε με νέκρωση. Ως εκ τούτου οι αντιοξειδωτικοί

παράγοντες δρουν είτε καταστέλλοντας τη δράση των οξειδωτικών μηχανισμών, είτε ενισχύοντας τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου.

Μια σειρά μελετών *in vitro* με δοκιμασίες DPPH, TEAC, TRAP, FRAP και TBARS ανέδειξε την αντιοξειδωτική δράση και την υψηλή ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών του κρόκου και των επιμέρους συστατικών του (Pellegrini et al, 2006; Assimopoulou et al, 2005; Papandreou et al, 2006; Chen et al, 2008; Xu et al, 2006; Kanakis et al, 2009; Ordoudi et al, 2009; Asdaq & Inamdar, 2010).

Η κροκίνη βρέθηκε αποτελεσματική ενάντια σε οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το 90% των κυττάρων PC-12 που επώαστηκαν για 24 ώρες με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> νεκρώθηκαν, ενώ μετά την προσθήκη κροκίνης στο υλικό επώασης το ποσοστό αυτό έπεσε στο 40%. (Ochiai et al, 2004). Σε νεότερες μελέτες η κροκίνη ανέστειλε τις προκαλούμενες από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων, αύξησε τον λόγο bcl-2/bax και ελάττωσε τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου, αποτρέποντας έτσι τον αποπτωτικό θάνατο ενδοθηλιακών κυττάρων (Xu et al, 2007).

Η κροκετίνη σε καλλιέργειες ηπατικών και ενδοθηλιακών κυττάρων ανέστειλε το σχηματισμό μαλονδιαλδεϋδης, μιας ουσίας που αποτελεί δείκτη υπεροξείδωσης των λιπιδίων, δηλαδή οξειδωτικής αποδόμησης των μεμβρανικών λιπιδίων από ελεύθερες ρίζες (Tseng et al, 1995; Xiang et al, 2006).

Βρέθηκε μάλιστα πως οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κροκίνης-1 είναι δόσοεξαρτώμενες. Σε μια δοκιμασία με θειοκυανικό οξύ η κροκίνη δρούσε ως αντιοξειδωτικό σε επίπεδα μέχρι 40 ppm, αλλά σε υψηλότερα επίπεδα έχανε την ευεργετική της δράση. Αυτό το φαινόμενο υποδηλώνει πως σε υψηλότερες δόσεις η κροκίνη πιθανώς να δρα ως μεταφορέας οξυγόνου (Pham et al, 2000).

Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν επίσης η συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής ικανότητας και χημικής δομής των διαφόρων κροκινών. Από τις μελέτες προκύπτει πως όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των σακχάρων της κροκίνης, τόσο πιο ισχυρή η αντιοξειδωτική της ικανότητα (Chen et al, 2008; Ochiai et al, 2007).

Ωστόσο ο κρόκος και τα συστατικά του όχι μόνο εμποδίζουν τη δράση των ελευθέρων ριζών, αλλά ενισχύουν και τους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι ο κρόκος αυξάνει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ηπατικών ενζύμων όπως η καταλάση (CAT), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Ταυτόχρονα φαίνεται πως ενισχύει και τα επίπεδα μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών όπως η γλουταθειόνη (GSH). Τα ανωτέρω αντιοξειδωτικά αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Ως εκ τούτου υψηλά επίπεδα αυτών συσχετίζονται με αντοχή σε κυτταρικές βλάβες (Premkumar et al, 2003; Zheng et al, 2007; Venkatraman et al, 2008).

Η προσθήκη κροκίνης στο υπόστρωμα καλλιέργειας νευρικών κυττάρων που είχαν υποστεί στέρηση ορού/γλυκόζης ενίσχυσε την έκφραση των ενζύμων GCS (gamma-glutamyl cysteine synthetase) και GR (glutathione reductase), εξασφαλίζοντας έτσι σταθερά υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης. Η πτώση των επιπέδων της γλουταθειόνης προκαλεί ενεργοποίηση της N-σφιγγομυελινάσης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των κηραμιδίων (ceramides), απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και τελικά θάνατο του κυττάρου (Ochiai et al, 2004).

Σε ένα πειραματικό μοντέλο αιμορραγικής καταπληξίας/ανάθηψης σε επίμυες η κροκετίνη ανέστειλε τις προκαλούμενες από την ισχαιμία βλάβες στον καρδιακό ιστό χάρη στην αντιοξειδωτική της δράση. Συγκεκριμένα

βρέθηκε πως ενίσχυσε την δράση της SOD και με αυτό τον τρόπο εμπόδισε την επαγόμενη από ROS μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον πυρήνα. Ο τελευταίος επάγει την ενεργοποίηση του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), πυροδοτώντας έτσι φλεγμονώδεις διεργασίες, που καταλήγουν σε σημαντικές κυτταρικές βλάβες (Yan et al, 2010).

### 1.1.9.3. Αντιφλεγμονώδης δράση

Σε μια δοκιμασία οξείας φλεγμονής σε ποντίκια, η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου ελάττωσε το βαθμό του οιδήματος που προκάλεσε η εφαρμογή ξυλένιου σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό, χαμηλότερο ωστόσο από εκείνο της δικλοφενάκης και της δεξαμεθαζόνης. Στην ίδια μελέτη σε μια δοκιμασία χρόνιας φλεγμονής με εφαρμογή φορμαλδεΰδης αυτή τη φορά, η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου για 10 ημέρες επέδειξε σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση συγκρίσιμη με αυτή της δικλοφενάκης (Hosseinzadeh et al, 2002).

Νεότερες έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι κροκίνες αναστέλλουν τις κυκλοοξυγενάσες 1 και 2 (COX-1, COX-2), ένζυμα που καταλύουν τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες, επάγοντας έτσι τη φλεγμονή. Δρουν δηλαδή με μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ). Φαίνεται όμως πως οι κροκίνες σε αντίθεση με τα ΜΣΑΦ, όπως η ινδομεθακίνη, προστατεύουν τον γαστρικό βλεννογόνο από ελκωτικές και αιμορραγικές αλλοιώσεις, ελαττώνοντας την έκκριση γαστρικού οξέος (Xu et al, 2009; Al Mofleh et al, 2006).

Πειράματα σε αρουραίους επίσης έδειξαν ότι η κροκετίνη χορηγούμενη υπό πειραματικές συνθήκες αιμορραγικής καταπληξίας ανέστειλε την έκφραση του ενζύμου iNOS (επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου) το οποίο αυξάνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου και πυροδοτεί μια

σύνθετη φλεγμονώδη απόκριση, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κυτοκινών όπως της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και καταλήγει σε λειτουργικές και μορφολογικές βλάβες (Yang et al, 2006).

Σε ένα πειραματικό μοντέλο ελκώδους κολίτιδος σε ποντίκια η χορήγηση κροκετίνης ανέστειλε την φλεγμονώδη καταστροφή της αρχιτεκτονικής και την διείσδυση ουδετεροφίλων στον εντερικό βλεννογόνο. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η κροκετίνη ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση της καταστέλλοντας την έκφραση της φλεγμονώδους κυτοκίνης TH1 και ενισχύοντας την έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης TH2 στα CD4+ T κύτταρα. Οι ανωτέρω δράσεις με τη σειρά τους αποδίδονται στην ικανότητα της κροκετίνης να αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ (nuclear factor kappa B), ενός διαμεσολαβητή των πρώιμων σταδίων της φλεγμονής (Kazi & Qian, 2009).

Σε πειραματικά πρότυπα αρθρίτιδας σε επίμυες και κουνέλια η χορήγηση κροκίνης ανέστειλε το περιαρθρικό οίδημα, τη στένωση των μεσάρθριων διαστημάτων και την εκφύλιση του χόνδρου. Η δράση της αυτή αποδόθηκε στην ικανότητά της να επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα ενζυματικούς (MMP-13, MMP-3, MMP-9) και μη ενζυματικούς (TNF-α, IL-1β, NF-κΒ, IL-6, COX-2, PGE2) διαμεσολαβητές φλεγμονής (Hemshekhhar et al, 2012; Ding et al, 2012 ).

#### 1.1.9.4. Αντικαρκινική δράση

Οι ενδείξεις που υπάρχουν για τις αντικαρκινικές ιδιότητες του κρόκου προέρχονται από πολλές ερευνητικές εργασίες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε πειραματόζωα. Ο κρόκος και τα συστατικά του, κυρίως τα καροτενοειδή, επιδεικνύουν αξιοσημείωτη δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση ενάντια σε σειρές διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων όπως: σαρκώματος (Sarcoma-180, A-204), αδενοκαρκινώματος (Ehrlich ascites carcinoma, DHD/K12-

PROb, HT-29, AGS), λευχαιμίας (P388 leukemia, K562 leukemia, HL-60 promyelocytic leukemia, L1210 leukemia), λεμφώματος (Dalton's lymphoma), καρκίνου τραχήλου μήτρας (HeLa), ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepG2), καρκίνου μαστού (MCF-7), καρκίνου παγκρέατος (MIA-PaCa-2), καρκίνου παχέος εντέρου (SW480) οστεοσαρκώματος, καρκίνου ωοθηκών. Η προσθήκη στο καλλιεργητικό υλικό εκχυλίσματος κρόκου ελαττώνει τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων, παρεμποδίζει την ανάπτυξη αποικιών και αναστέλλει έτσι τον πολλαπλασιασμό τους. Τα καρκινικά κύτταρα που επώαστηκαν με κρόκο παρουσίασαν και μορφολογικές αλλοιώσεις ιστολογικά ορατές, όπως συρρίκνωση του κυττάρου, μειωμένο κυτταρόπλασμα, πύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του ολιγονουκλεοσωμικού DNA. Οι βλάβες αυτές είναι συμβατές με μηχανισμούς απόπτωσης, έναν γενετικά προγραμματισμένο τύπο κυτταρικού θανάτου, που προκαλείται από ποικίλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Tarantilis et al, 1994; Nair et al, 1991; Abdullaev et al, 2003; Abdullaev et al, 2004 ; Escribano et al, 1996 ; Tavakkol-Afshari et al, 2008; Mousavi et al, 2009; Dhar et al, 2009; Li et al, 2012; Noureini & Wink, 2012; Hoshyar et al, 2013).

Πειραματόζωα στα οποία είχαν εμφυτευθεί καρκινικά κύτταρα (αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, σαρκώματος, λεμφώματος, καρκίνου πνεύμονα) όταν τους χορηγήθηκε εκχύλισμα κρόκου παρουσίασαν ελάττωση της πιθανότητας εμφάνισης όγκου, σημαντική καθυστέρηση στο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων και διπλάσιο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Όταν μάλιστα η χορήγηση του φαρμάκου γινόταν πριν την έκθεση στα καρκινικά κύτταρα τα αποτελέσματα ήταν ακόμη καλύτερα (Magesh et al, 2006; Nair et al, 1991; Giaccio, 2004; Abdullaev et al, 2004).

Η από του στόματος χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου, αλλά και η τοπική εφαρμογή διαλύματος κροκετίνης στο δέρμα ποντικών προφύλαξε από την υπερπλασία και από την ανάπτυξη δερματικών όγκων προκαλούμενων από την εφαρμογή διμεθυλβενζοανθρακένιου (DMBA) (Giaccio, 2004; Das et al, 2010).



Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους ο κρόκος ασκεί την αντικαρκινική του δράση, όπως η βιομετατροπή του σε βιταμίνη Α, οι προκαλούμενες αλλαγές στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, η ενίσχυση ανοσολογικών αμυντικών μηχανισμών και η αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων. Η τελευταία σχετίζεται με την ικανότητα του κρόκου να αναστέλλει την RNA-πολυμεράση και των συστατικών του να συνδέονται με την ιστόνη H1 και να εμποδίζουν την αλληλεπίδρασή της με το DNA. Πράγματι έχει βρεθεί ότι η κροκετίνη αναστέλλει τρεις κύριες μεταβολικές οδούς των καρκινικών κυττάρων: τη σύνθεση του DNA, τη σύνθεση του RNA και τη σύνθεση πρωτεϊνών. Επιπλέον φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων c-Jun, c-Fos και c-Myc, ενώ αντίθετα ενισχύει την έκφραση του ογκογονιδίου Bax, η ενεργοποίηση του οποίου αυξάνει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ενεργοποίηση μιας σειράς κασπασών και τελικά αποπτωτικό θάνατο του καρκινικού κυττάρου. Μελέτες έδειξαν επίσης ότι η κροκετίνη διακόπτει την διαίρεση των καρκινικών κυττάρων στο στάδιο G<sub>2</sub> της μετάφασης χάρη στην ικανότητά της να αλληλεπιδρά με ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως η Cdc-2, η Cdc-25C και η κυκλίνη B1 (Mousavi et al, 2009; Abdullaev, 1994; Ashrafi et al, 2005; Giaccio, 2004; Dhar et al, 2009).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει θετική συσχέτιση μεταξύ φλεγμονής και νεοπλασίας. Φλεγμονώδεις διεργασίες στο μικροπεριβάλλον του όγκου προάγουν τον πολλαπλασιασμό και ευνοούν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, την νεοαγγειογένεση και τη μετάσταση. Μοριακές μέθοδοι αποκάλυψαν ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την COX-2 και οι αναστολείς της καταστέλλουν την γένεση και εξέλιξη όγκων. Συνεπώς η αντικαρκινική δράση του κρόκου θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει και στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του (Xu et al, 2009).

Αυτό που διαφοροποιεί τον κρόκο από άλλους αντινεοπλασματικούς παράγοντες είναι η εκλεκτικότητά του όσον αφορά την κυτταροτοξική του

δράση: αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζει τα υγιή κύτταρα (Jagadeeswaran et al, 2000).

#### 1.1.9.5. Καρδιοπροστατευτική δράση

Ο εμπλουτισμός της διατροφής με κροκετίνη ή κροκίνη για 5-8 εβδομάδες σε κουνέλια, αρουραίους και ποντίκια που υπόκειντο σε υπερλιπιδαιμική δίαιτα, ελάττωσε τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης (low density lipoprotein), και των τριγλυκεριδίων, αύξησε τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (high density lipoprotein) στον ορό, μείωσε το πάχος, καθώς και τις ιστολογικές αλλοιώσεις του τοιχώματος της αορτής, απέτρεψε την εναπόθεση μακροφάγων και αφρωδών κυττάρων στο ενδοθήλιο και ανέστειλε έτσι το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας (Zheng et al, 2005; Sheng et al, 2006; Lee et al, 2005).

Σε μια κλινική μελέτη σε πάσχοντες από στεφανιαία νόσο βρέθηκε ότι η χορήγηση 50 mg σαφράν διαλυμένου σε 100 mL γάλακτος δύο φορές ημερησίως για 6 εβδομάδες προκάλεσε στατιστικά σημαντική ελάττωση της οξείδωσης των LDL λιποπρωτεϊνών, ένα πρώιμο βήμα της αθηρογένεσης (Verma & Bordia, 1998).

Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την προστατευτική δράση των συστατικών του κρόκου είναι η αναστολή της παγκρεατικής λιπάσης με συνεπακόλουθο την αδυναμία υδρόλυσης του λίπους σε λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια και ως εκ τούτου την ελαττωμένη απορρόφηση των λιπαρών οξέων από τον γαστρεντερικό σωλήνα, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ουσίας, η καταστολή έκφρασης προσκολλητικών μορίων όπως του VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) και του ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), η αποτροπή ενεργοποίησης του NF-Κβ (nuclear factor kappa B) στο ενδοθήλιο του αγγειακού τοιχώματος, η παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των λείων μυικών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος -

και κατ'επέκταση της υπερπλασίας του έσω χιτώνα- μέσω καταστολής έκφρασης των ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) και μείωσης των ενδοκυττάρων επιπέδων του ασβεστίου. Η κροκετίνη διακόπτει την κυτταρική διαίρεση στο στάδιο G1 καταστέλλοντας την έκφραση της κυκλίνης D και ενισχύοντας τον αναστολέα CDKI p27<sup>kip1</sup>. Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων είναι η απενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) με τη συνεπακόλουθη καταστολή έκφρασης των πρωτο-ογκογονιδίων c-fos, c-jun και c-myc. Η ικανότητα της κροκετίνης να αυξάνει τη δράση του ενζύμου eNOS (endothelial nitric oxide synthase) και ως εκ τούτου να αυξάνει την παραγωγή του NO και της cGMP (cyclic guanosine monophosphate) συμβάλλει περαιτέρω στην ελάττωση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου και στη χάλαση του ενδοθηλιακού τοιχώματος της αορτής (Giaccio, 2004; Zheng et al, 2006; Xiang et al, 2006; Zhou et al, 2006; Tang et al, 2006; Zhou et al, 2010; Asdaq & Inamdar, 2010).

Η ενδοφλέβια χορήγηση εκχυλίσματος σαφράν (2.5, 5 και 10 mg/kg) προκάλεσε στατιστικά σημαντική πτώση της μέσης αρτηριακής πίεσης σε επίμυες με αρτηριακή υπέρταση επαγόμενη από δεσοξυκορτικοστερόνη. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι για την αντιυπερτασική δράση του κρόκου υπεύθυνες είναι κυρίως η σαφρανάλη και η κροκίνη. Κανένα από τα συστατικά του κρόκου δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές της καρδιακής συχνότητας. Είναι γνωστό πως η αρτηριακή πίεση είναι συνισταμένη δύο παραγόντων: της καρδιακής παροχής και των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων. Δεδομένου ότι τα συστατικά του κρόκου έχουν την ικανότητα να προκαλούν χάλαση του ενδοθηλιακού τοιχώματος των αγγείων, χωρίς να επηρεάζουν την καρδιακή συχνότητα καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ασκούν την αντιυπερτασική τους δράση κυρίως ελαττώνοντας τις περιφερικές αγγειακές αντιστάσεις (Imenshahidi et al, 2010).

Ευεργετική δράση φαίνεται να έχει η κροκετίνη και η κροκίνη σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Ειδικότερα βρέθηκε ότι η

κροκετίνη βελτίωσε την λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, ελάττωσε τα επίπεδα ορού της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), της τροπονίνης I και της κρεατινικής κινάσης (CK) που θεωρούνται δείκτες μυοκαρδιακής νέκρωσης, ενώ ταυτόχρονα ελάττωσε το ύψος του κύματος T σε ηλεκτροκαρδιογραφικές μελέτες και μείωσε την έκταση της μυοκαρδιακής νέκρωσης στα παθολογοανατομικά δείγματα σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (Zhang et al, 2009; Goyal et al, 2010; Joukar et al, 2010).

Η κροκετίνη παρουσιάζει και μια αξιοσημείωτη δόσοεξαρτώμενη αντιαιμοπεταλιακή δράση, καθώς μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι αναστέλλει τη συσσώρευση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ελαττώνοντας την απελευθέρωση ADP και σεροτονίνης από τα πυκνά κοκκία. Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στην ικανότητα της κροκετίνης να μειώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου, τόσο αναστέλλοντας την απελευθέρωσή του από τις ενδοκυττάρια αποθήκες, όσο και παρεμποδίζοντας την είσοδο του εξωκυττάριου ασβεστίου στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (Yang et al, 2008; Jessie et al, 2005; Thushara et al, 2013). Η αντιπηκτική δράση της κροκετίνης αναδείχθηκε και σε ένα πειραματικό μοντέλο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης σε κουνέλια. Η χορήγηση της κροκετίνης βελτίωσε τα επίπεδα αιμοπεταλίων, τα επίπεδα ινωδογόνου και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης C στον ορό, παρέχοντας μια αξιοσημείωτη αντιθρομβωτική προστασία (Tsantarliotou et al, 2013).

Η κροκετίνη επίσης ανέστειλε την ανάπτυξη υπερτροφίας αριστερής κοιλίας προκαλούμενης από νορεπινεφρίνη σε αρουραίους και σε ποντίκια. Συγκεκριμένα ανέστειλε την αύξηση του μεγέθους των μυοκαρδιακών κυττάρων και της καρδιακής σκιάς, ελάττωσε την διάταση των κοιλιακών τοιχωμάτων καθώς και την άνοδο των νατριουρητικών πεπτιδίων ANP και BNP, που σχετίζονται με καρδιακή ανεπάρκεια. Αυτή η δράση αποδίδεται αφ' ενός στην ιδιότητά της να ενισχύει τη δράση της  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPάσης στον καρδιακό ιστό και της  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ATPάσης στα μιτοχόνδρια και έτσι να αποτρέπει την άνοδο των ενδοκυττάρια επιπέδων ασβεστίου και αφ' ετέρου

στην ικανότητά της να αναστέλλει τις μεταλλοπρωτεϊνάσες 2 και 9 (MMP-2 & MMP-9) και με αυτό τον τρόπο να αποτρέπει την σύνθεση κολλαγόνου και την σχετιζόμενη με υπερτροφία ίνωση και αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου. Σταθερά υψηλά ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου επηρεάζουν αρνητικά τη μιτοχονδριακή λειτουργία και ενεργοποιούν μια σειρά ενζύμων (φωσφολιπάσες, πρωτεάσες, ενδονουκλεάσες), τα οποία προκαλούν μη αναστρέψιμες βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη, στα οργανίδια και στη χρωματίνη, καταλήγοντας τελικά στο θάνατο του κυττάρου (Shen et al, 2006; Cai et al, 2009; Shen et al, 2009; Liu et al, 2005).

#### 1.1.9.6. Δράσεις στο αναπνευστικό σύστημα

Το εκχύλισμα του κρόκου βρέθηκε να έχει ισχυρή και δόσοεξαρτώμενη βρογχοδιασταλτική δράση, συγκρίσιμη με αυτή της θεοφυλλίνης. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να αποδοθεί σε διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων, σε αναστολή των H1-ισταμινικών υποδοχέων, σε αναστολή των μουσκαρινικών χολινεργικών υποδοχέων ή διακοπή των διαύλων ασβεστίου (Boskabady & Aslani, 2006; Nemati et al, 2008).

#### 1.1.9.7. Αντιδιαβητική δράση

Η χορήγηση κροκετίνης (40 mg/kg po για 8 εβδομάδες) ανέστειλε μια σειρά παθολογικών αλλοιώσεων προκαλούμενων από υπεργλυκαιμική διαίτα σε επίμυες. Συγκεκριμένα εμπόδισε την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, αντιρροπιστικής υπερινσουλιαιμίας, δυσλιπιδαιμίας και συστολικής υπέρτασης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόκριση των ιστών στην ινσουλίνη και συσχετίζεται θετικά με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και το μεταβολικό σύνδρομο. Η προστατευτική δράση της κροκετίνης αποδίδεται στην ικανότητά της να αναστέλλει την έκφραση του

παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και να ενισχύει την έκφραση της αντιγονεκτίνης, μιας ουσίας που αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και καταστέλλει τη φλεγμονή (Xi et al, 2007). Νεότερα ευρήματα σε κυτταρικό επίπεδο υποστηρίζουν ότι η κροκετίνη ασκεί την δράση της αυτή αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της κινάσης JNK και του αναστολέα IKKβ και εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση της PKCθ (Yang et al, 2010).

Ανάλογη μεταγενέστερη μελέτη σε επίμυες αποκάλυψε ότι η δράση αυτή της κροκετίνης οφείλεται πιθανώς και στην ικανότητά της να τροποποιεί την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Ειδικότερα φαίνεται να επιταχύνει τον ηπατικό μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά τους στην περιφέρεια και ως εκ τούτου προλαμβάνει την ανάπτυξη ανοτοχής στην ινσουλίνη (Sheng et al, 2008).

Σε νεότερη μελέτη το εκχύλισμα των στιγμάτων του κρόκου (40 mg/kg ip) εμφάνισε στατιστικά σημαντική υπογλυκαιμική δράση τόσο σε φυσιολογικούς, όσο και σε διαβητικούς επίμυες. Μάλιστα η χορήγησή του για 1 μήνα σε επίμυες με επαγόμενο από αλλοξάνη σακχαρώδη διαβήτη, αντέστρεψε τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του παγκρέατος, όπως την ατροφία των νησιδιακών κυττάρων, την λεμφοκυτταρική διήθηση και καταστροφή των νησιδίων του Langerhans και την ελάττωση του αριθμού των β-κυττάρων (Mohajeri et al, 2009). Μεταγενέστερες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως το υπεύθυνο για την υπογλυκαιμική δράση του κρόκου συστατικό είναι η κροκίνη καθώς βρέθηκε ότι η χορήγησή της (60 mg/kg ip για 6 εβδομάδες) ελάττωσε σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης του ορού, την γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη και την μικροαλβουμινουρία σε ένα μοντέλο σακχαρώδους διαβήτη επαγόμενου από στρεπτοζοκίνη σε επίμυες (Rajaei et al, 2013; Shirali et al, 2012 ).

Είναι επίσης πιθανό ο κρόκος να προστατεύει και από τις επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη όπως η διαβητική αγγειοπάθεια και η διαβητική νευροπάθεια. Βρέθηκε ότι η επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με κροκετίνη

ανέστειλε την προκαλούμενη από υψηλά επίπεδα γλυκόζης απόπτωση των κυττάρων. Η αντιαποπτωτική αυτή δράση της κροκεΐνης αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην ικανότητά της να ενεργοποιεί την κινάση p-Akt και να αυξάνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου, ενισχύοντας τη δράση της eNOS (Meng & Cui, 2008). Αντίστοιχα η επώαση νευρωνικά διαφοροποιημένων κυττάρων PC12 με κροκίνη ανταγωνίστηκε την προκαλούμενη από υψηλά επίπεδα γλυκόζης νευροτοξικότητα και η δράση της αυτή οφείλεται στην ικανότητά της να ελαττώνει την ενδοκυττάρια παραγωγή ελευθέρων ριζών, που παρεμποδίζουν την επιβίωση των νευρώνων.

#### 1.1.9.8. Αφροδισιακές ιδιότητες

Η επίδραση του εκχυλίσματος κρόκου στη στυτική δυσλειτουργία διερευνήθηκε τόσο σε προκλινικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο. Σε άρρενες επίμυες βελτίωσε την στυτική λειτουργία και η δράση του ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της σιλденаφίλης (Hosseinzadeh et al, 2008a). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και κλινικά καθώς βρέθηκε πως η χορήγηση σαφράν 200 mg ημερησίως για 10 ημέρες σε εθελοντές με στυτική δυσλειτουργία αύξησε τους δείκτες ακαμψίας και διάτασης όπως καταμετρήθηκαν στο NPT test, ενώ ταυτόχρονα βελτίωσε τους δείκτες επιθυμίας και ικανοποίησης όπως καταμετρήθηκαν στο ερωτηματολόγιο ILEF-15 για την στυτική δυσλειτουργία. (Shamsa et al, 2009). Πιθανώς τα συστατικά του κρόκου χάρη στην ικανότητά τους να αυξάνουν τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου και να ελαττώνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου, ευνοούν τη χάλαση των μυικών ινών των σπαραγγωδών σωμάτων που είναι απαραίτητη για την στύση.

#### 1.1.9.9 Οφθαλμολογικές δράσεις

Η επώαση με κροκίνη και κροκετίνη αύξησε τη βιοσιμότητα φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς που είχαν εκτεθεί σε στρες φωτός, ένα *in vitro* μοντέλο εκφυλιστικών παθήσεων του αμφιβληστροειδούς. Ο προτεινόμενος μηχανισμός του φαινομένου είναι η αναστολή της δραστηριότητας της κασπάσης-3 και της κασπάσης-9 (Laabich et al, 2006; Yamauchi et al, 2011). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και *in vivo* σε μια μελέτη που έδειξε ότι ο εμπλουτισμός της διατροφής επίμυων με εκχυλίσμα κρόκου για 6 εβδομάδες προστατεύσε τους φωτοϋποδοχείς τόσο από μορφολογικές όσο και από λειτουργικές αλλοιώσεις, αποτρέποντας αποπτωτικές διεργασίες (Maccarone et al, 2008). Πρόσφατη έρευνα ανέδειξε την προστατευτική δράση της κροκετίνης (20 mg/kg, po) και σε ένα πειραματικό μοντέλο ισχαιμικής αμφιβληστροειδοπάθειας σε ποντίκια μέσα από ιστολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες (Ishizuka et al, 2013). Τέλος σε κλινική μελέτη βρέθηκε ότι η πρόσληψη 20 mg σαφράν ημερησίως για 3 μήνες βελτίωσε την λειτουργία του αμφιβληστροειδούς σε πάσχοντες από εκφύλιση της ωχράς κηλίδας (Falsini et al, 2010).

#### *1.1.10. Δράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα*

Η απόπτωση συμβάλλει σημαντικά στην παθοφυσιολογία των νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Ο TNF- $\alpha$  είναι μια κυτοκίνη με πολλαπλές δράσεις που πυροδοτεί ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων. Τα επίπεδά του στον εγκέφαλο υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι χαμηλά. Ωστόσο παθολογικές καταστάσεις όπως τραύμα, ισχαιμία ή λοίμωξη μπορούν να προκαλέσουν δραματική αύξηση των επιπέδων του, η οποία πυροδοτεί μια αλληλουχία γεγονότων που καταλήγει στην απόπτωση των νευρώνων. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση του TNF- $\alpha$  καταστέλλει αρχικά την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-X<sub>L</sub> και Bcl-2 και διεγείρει την έκφραση



των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-Xs, Bax και LICE. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, τον σχηματισμό του αποπτοσώματος, την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3 και τέλος την ενεργοποίηση της δεοξυριβονουκλεάσης CAD. Η τελευταία προκαλεί κατακερματισμό του DNA των κυττάρων και συνακόλουθες μορφολογικές αλλοιώσεις που οδηγούν στον αποπτωτικό θάνατο του νευρώνα. Επώση με κροκίνη νευρωνικά διαφοροποιημένων με NGF PC12 κυττάρων βρέθηκε να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο τροποποιώντας την έκφραση του TNF-α και των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Soeda et al, 2001).

Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μακροφάγα που εμπλέκονται σε ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ενεργοποιούνται σε παθολογικές καταστάσεις για να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση. Η ενεργοποίησή τους περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό, μετανάστευση στην περιοχή της βλάβης, αύξηση της έκφρασης ανοσοτροποποιητών και μετατροπή τους σε φαγοκύτταρα, ικανά να απομακρύνουν κατεστραμμένα κύτταρα και υπολείμματα. Η παρατεταμένη ωστόσο ενεργοποίηση της μικρογλοίας μπορεί να πυροδοτήσει νευρωνική βλάβη μέσω απελευθέρωσης κυτταροτοξικών διαμεσολαβητών φλεγμονής (TNF-α, IL-1β, IL-6, NO, ROS). Σε μια *in vitro* μελέτη βρέθηκε ότι η επώση εγκεφαλικών μικρογλοιακών κυττάρων επίμυος με κροκίνη ή κροκετίνη εμπόδιζε την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και αύξησε τη βιωσιμότητα των νευρώνων (Nam et al, 2010).

#### 1.1.10.1. Αναλγητική δράση

Η εφαρμογή ερεθιστικών ουσιών στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού χρησιμοποιείται ως πειραματικό μοντέλο για την αξιολόγηση της αναλγητικής δράσης ουσιών. Η χορήγηση κροκίνης (12.5, 25 και 50 mg/kg, icv ή 100 και

200 mg/kg, ip) σε επίμυες ελάττωσε τα επίπεδα άλγους επαγόμενου από εφαρμογή διαλύματος NaCl 5M στον κερατοειδή και τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά της μορφίνης. Παρόμοια αποτελέσματα είχε η κροκίνη και σε μια δοκιμασία φορμαλίνης σε επίμυες. Και στις δύο περιπτώσεις, η συγχορήγηση κροκίνης ενίσχυσε σημαντικά την αναλγητική δράση της μορφίνης. Ωστόσο η συγχορήγηση ναλοξόνης ανέστειλε την αναλγητική δράση της μορφίνης, όχι όμως και της κροκίνης, γεγονός που υποδηλώνει πως οι αναλγητικές ιδιότητες της κροκίνης δεν οφείλονται σε πιθανή αλληλεπίδρασή της με υποδοχείς οπιοειδών. Πιθανώς ο κρόκος και τα συστατικά του να ασκούν την αναλγητική τους δράση τροποποιώντας GABA-εργικά και χολινεργικά κυκλώματα που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άλγους (Tamaddonfard & Hamzeh-Gooshchi, 2010).

Σε ένα πειραματικό πρότυπο νευροπαθητικού άλγους σε επίμυες (chronic constriction injury, CCI) η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου για 7 ημέρες (50, 100 και 200 mg/kg, i.p.) ελάττωσε κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο τα συμπεριφορικά συμπτώματα άλγους και η δράση του αυτή ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της γκαμπαπεντίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο αναφοράς (Amin et al, 2012).

#### 1.1.10.2. Επίδραση στη μνήμη

Είναι γνωστό πως ο ιππόκαμπος αποτελεί μια σημαντική δομή για τις διαδικασίες μάθησης και μνήμης. Η ηλεκτροφυσιολογική διέγερση των προσυναπτικών νευρώνων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου με υψηλής συχνότητας δυναμικά προκαλεί αύξηση των συναπτικών δυναμικών στις διεγερτικές συνάψεις, ένα φαινόμενο, που καλείται μακροχρόνια ενδυνάμωση (long-term potentiation, LTP). Η μακροχρόνια ενδυνάμωση απαιτεί την ενεργοποίηση των NMDA γλουταμινεργικών υποδοχέων και θεωρείται η κυτταρική βάση των διαδικασιών μάθησης και μνήμης. Η χορήγηση

εκχυλίσματος κρόκου σε επίμυες *per os* ανέστειλε την κατασταλτική δράση της αιθανόλης και της ακεταλδεϋδης στην LTP, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο κρόκος ασκεί πιθανή ευεργετική επίδραση στις γνωσιακές λειτουργίες (Sugiura et al, 1995; Abe et al, 1999). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η ιδιότητα αυτή του κρόκου οφείλεται στις κροκίνες και μάλιστα η δράση τους ήταν τόσο ισχυρότερη, όσο περισσότεροι ήταν οι γλυκοζιτικοί δεσμοί στο μόριο της κροκίνης (Soeda et al, 2007).

Η θετική επίδραση του κρόκου στη μνήμη αναδείχθηκε και μέσα από μελέτες συμπεριφορικής φαρμακολογίας. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (30 και 60 mg/kg, *ip*) σε επίμυες ανέστειλε την απώλεια αναγνωριστικής μνήμης, που παρατηρείται φυσιολογικά μετά από 24 ώρες, βελτιώνοντας την αποθήκευση και ανάκληση της πληροφορίας στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Επίσης η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (30 και 60 mg/kg, *ip*) σε επίμυες ανταγωνίστηκε τα γνωσιακά ελλείμματα που προκάλεσε η σκοπολαμίνη στη δοκιμασία της παθητικής αποφυγής. Και στις δύο δοκιμασίες δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές της γενικής εξερευνητικής δραστηριότητας σε καμία ομάδα μελέτης. Σε μεταγενέστερη μελέτη βρέθηκε ότι οι κροκίνες (15 και 30 mg/kg, *ip*) χορηγούμενες σε αρουραίους επίσης βελτίωσαν τη μνημονική λειτουργία στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου και επιπλέον ανταγωνίστηκαν τα ελλείμματα λειτουργικής και αναφορικής χωρικής μνήμης που προκάλεσε η σκοπολαμίνη στη δοκιμασία του ακτινωτού υδατικού λαβυρίνθου (Pitsikas & Sakellaridis, 2006; Pitsikas et al, 2007). Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα σε νεότερες μελέτες, όπου διερευνήθηκε η επίδραση της κροκίνης στη χωρική μνήμη επίμυων με τη χρήση της δοκιμασίας υδατικού λαβυρίνθου κατά Morris. Σε αυτές βρέθηκε πως η χορήγηση κροκινών ανέστειλε τα ελλείμματα χωρικής μνήμης που προκλήθηκαν από τη χορήγηση στρεπτοζοκίνης, από την πρόκληση εγκεφαλικής ισχαιμίας και από την έκθεση σε χρόνιο στρες (Naghizadeh et al, 2013; Hosseinzadeh et al, 2012; Ghadrdoost et al, 2011). Επιπρόσθετα η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (150 και 450 mg/kg, *ip*) σε

ποντίκια ανέστειλε τα μνημονικά ελλείμματα που προκάλεσε η μορφίνη στη δοκιμασία παθητικής αποφυγής, τόσο στην εγγραφή όσο και στην ανάκληση της πληροφορίας. (Naghibi et al, 2012). Πιθανές ερμηνείες για την ευεργετική επίδραση του κρόκου και των συστατικών του στη μνήμη περιλαμβάνουν τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, την αλληλεπίδραση με υποδοχείς NMDA και GABA, την εμπλοκή σε ντοπαμινεργικά και χολινεργικά κυκλώματα, την ελάττωση των επιπέδων κορτικοστερόνης καθώς και την επίπτωσή τους στα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου.

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση αμυλοειδούς β-πρωτεΐνης στους νευρώνες. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η επώαση με εκχύλισμα στιγμάτων κρόκου ανέστειλε τη σύνθεση και συσσώρευση των ινών αμυλοειδούς με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Μάλιστα βρέθηκε πως η αναστολή της  $A_{\beta 1-40}$  ινωδογένεσης οφείλεται στη δράση των κροκινών και αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα πως ο κρόκος θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στην πρόληψη και επιβράδυνση της νόσου Alzheimer (Papandreou et al, 2006; Ahn et al, 2011).

Υποστήριξη στα ανωτέρω ευρήματα παρείχαν δύο διπλά τυφλές, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, οι οποίες έδειξαν πως η χορήγηση κάψουλας κρόκου (30 mg ημερησίως για 16 και για 22 εβδομάδες αντίστοιχα) σε πάσχοντες από ελαφριάς προς μέτριας βαρύτητας άνοια τύπου Alzheimer βελτίωσε τις νοητικές λειτουργίες όπως αυτές εκτιμήθηκαν στις δοκιμασίες MMSE, ADAS-cog και CDR-SB σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μάλιστα η ευεργετική δράση του κρόκου ήταν συγκρίσιμη με αυτή της δονεπεζίλης, ενός αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer. Ωστόσο η ομάδα των ασθενών που έλαβε τον κρόκο εμφάνισε λιγότερες παρενέργειες από το γαστρεντερικό σύστημα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε δονεπεζίλη (Akhondazadeh et al, 2010).

### 1.1.10.3. Αντικαθλιπτική δράση

Είναι αξιοσημείωτο πως η χρήση του κρόκου για την αντιμετώπιση καταθλιπτικής συμπτωματολογίας χρονολογείται από την αρχαιότητα. Στις χώρες καλλιέργειας του κρόκου, το αφέψημα με σαφράν έχει τη φήμη ότι βελτιώνει τη διάθεση, γεγονός που φαίνεται να επιβεβαιώνεται από τα ακόλουθα σύγχρονα δεδομένα.

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εκχυλίσματος στιγμάτων κρόκου σε ποντίκια ελάττωσε τον χρόνο ακινησίας και αύξησε το χρόνο κολύμβησης και το χρόνο αναρρίχησης στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, ένα ευρέως διαδεδομένο συμπεριφορικό πρότυπο για την αξιολόγηση της αντικαταθλιπτικής δράσης ουσιών. Η δράση του κρόκου ήταν συγκρίσιμη με αυτή της φλουοξετίνης και αποδόθηκε στα συστατικά του κροκίνες και σαφρανάλη. Υποστηρίζεται η άποψη ότι οι κροκίνες πιθανώς να δρουν αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη ντοπαμίνης και νορεπινεφρίνης, ενώ η σαφρανάλη αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης (Hosseinzadeh et al, 2004; Wang et al, 2010).

Σε τρεις διπλά τυφλές, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες η χορήγηση κάψουλας κρόκου (30 mg/ημερησίως για 6 εβδομάδες) σε πάσχοντες από ελαφριάς προς μέτριας έντασης κατάθλιψη βελτίωσε την επίδοση στο τεστ Hamilton για την κατάθλιψη σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν placebo, φλουοξετίνη (20 mg/ημερησίως) ή ιμιπραμίνη (100 mg/ημερησίως). Μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (Akhondzadeh et al, 2005; Akhondzadeh et al, 2004; Noorbala et al, 2005). Είναι ωστόσο ενδιαφέρον το εύρημα μεταγενέστερης κλινικής μελέτης ότι η χορήγηση κρόκου αποκαθιστά τη σεξουαλική δυσλειτουργία που προκαλούν οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης στις γυναίκες, γεγονός που υποδηλώνει πως ο κρόκος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως συμπλήρωμα της συνήθους

αντικαταθλιπτικής φαρμακευτικής αγωγής (Kashani et al, 2013; Modabbernia et al, 2012).

#### 1.1.10.4. Αντιεπιληπτική δράση

Ορισμένες έρευνες ανέδειξαν και τις αντιεπιληπτικές ιδιότητες των στιγμάτων του κρόκου, οι οποίες αποδίδονται κατά κύριο λόγο στη σαφρανάλη. Συγκεκριμένα η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σαφρανάλης σε επίμυες παρουσίασε μια δόσοεξαρτώμενη ελάττωση επίπτωσης, βράχυνση διάρκειας και καθυστέρηση εμφάνισης γενικευμένων τονικοκλονικών σπασμών προκαλούμενων από πεντυλενετετραζόλη (PTZ), έναν εκλεκτικό ανταγωνιστή των διαύλων χλωρίου στο σύμπλεγμα του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα, που χρησιμοποιείται σε συμπεριφορικές μελέτες για την αξιολόγηση της αντιεπιληπτικής δράσης ουσιών. Την ευεργετική δράση της σαφρανάλης ανέστειλε η χορήγηση φλουμαζεπίλης (ανταγωνιστής βενζοδιαζεπινών), αλλά όχι η χορήγηση ναλοξόνης (ανταγωνιστής οπιοειδών), γεγονός που υποδηλώνει πως οι αντιεπιληπτικές ιδιότητες της σαφρανάλης σχετίζονται κυρίως με την επίδρασή της στους GABA<sub>A</sub> υποδοχείς και όχι σε υποδοχείς οπιοειδών (Hosseinzadeh & Sadeghnia, 2007).

Αντιεπιληπτική δράση επέδειξε και η χορήγηση κροκίνης (25, 50 και 100 µg, icv) σε επίμυες. Η κροκίνη ανέστειλε την επαγόμενη από την πενικιλίνη επιληπτικόμορφη δραστηριότητα, όπως καταγράφηκε σε ηλεκτροφλοιογραφικές μετρήσεις και επιπλέον ενίσχυσε και την αντιεπιληπτική δράση της διαζεπάμης (Tamaddonfard et al, 2012).

#### 1.1.10.5. Αντιπαρκινσονική δράση

Η 6-υδροξυ-ντοπαμίνη (6-OHDA) είναι μια κατεχολαμινεργική νευροτοξίνη, που όταν εγχύεται στο μελαίνο-ραβδωτό σύστημα προκαλεί

εκτεταμένη απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων και χρησιμοποιείται σε πειραματικά ζωικά μοντέλα της νόσου Πάρκινσον. Η χορήγηση κροκετίνης σε επίμυες για 7 ημέρες πριν την έγχυση 6-OHDA αποκατέστησε τις διαταραχές κινητικότητας, διατήρησε υψηλά τα επίπεδα της ντοπαμίνης και των μεταβολιτών της (DOPAC και HVA) στο ραβδωτό σώμα και προστάτευσε τους νευρώνες από εκφυλιστικές αλλοιώσεις (Ahmad et al, 2005).

#### 1.1.10.6. Επίδραση στη σκλήρυνση κατά πλάκας

Η πολλαπλή σκλήρυνση, ή σκλήρυνση κατά πλάκας, είναι μια φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) είναι ένα χρήσιμο πειραματικό μοντέλο της νόσου, καθώς συνδυάζει την ανοσοποίηση με μυελινικά αντιγόνα, παρουσίασή τους στα T-κύτταρα και μετανάστευση των ενεργοποιημένων κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (500 mg/kg για 21 ημέρες) σε C57BL/6 ποντίκια με EAE ελάττωσε τη βαρύτητα των συμπτωμάτων και καθυστέρησε σημαντικά την έναρξη της νόσου. Ιστολογικές μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι ο κρόκος ελάττωσε τη λευκοκυτταρική διήθηση και τις φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα των πειραματοζώων, διατήρησε την ακεραιότητα των νευραξόνων και του ελύτρου μυελίνης και προστάτευσε έτσι από την νευρωνική εκφύλιση (Ghazavi et al, 2009; Deslauriers et al, 2011).

#### 1.1.10.7. Επίδραση σε εγκεφαλική ισχαιμία

Η αμφοτερόπλευρη απόφραξη της κοινής καρωτίδας (BCCAO, Bilateral Common Carotid Artery Occlusion) είναι ένα διαδεδομένο πειραματικό μοντέλο που μιμείται την ελαττωμένη εγκεφαλική αιματική ροή της παροδικής

εγκεφαλικής ισχαιμίας. Η χορήγηση κροκίνης (10 και 20 mg/kg ig για 3 εβδομάδες) σε ποντίκια στα οποία εφαρμόστηκε η BCCAO ανέστειλε μια σειρά παθολογικών διεργασιών που προκλήθηκαν από την ισχαιμία. Συγκεκριμένα ανέστειλε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και ενίσχυσε τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, ανταγωνίστηκε την προκαλούμενη από την ισχαιμία άνοδο των επιπέδων του μονοξειδίου του αζώτου, που σχετίζεται με καταστροφή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και τις μορφολογικές αλλοιώσεις των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του φλοιού (CMEC, Cortical Microvascular Endothelial Cells), που σχετίζονται με καταστροφή της ακεραιότητας των τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, ανταγωνίστηκε και τις βιοχημικές βλάβες που προκάλεσε η πειραματική ισχαιμία, όπως την φωσφορυλίωση της κινάσης ERK1/2, την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) και την μετανάστευση της GRK2 από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη (Zheng et al, 2010).

Σε ένα ανάλογο μοντέλο με απόφραξη όμως της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (MCAO) η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης (60 mg/kg) σε αρουραίους ελάττωσε την έκταση του έμφρακτου και του εγκεφαλικού οιδήματος που προκάλεσε η ισχαιμία. Επιπλέον η κροκίνη ελάττωσε τα νευρολογικά ελλείμματα που προκάλεσε η MCAO. Στη συγκεκριμένη μελέτη η δράση της κροκίνης αποδόθηκε στην ικανότητά της να ενισχύει τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων και να καταστέλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Vakili et al, 2012).

#### 1.1.10.8. Επίδραση στον ύπνο

Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης (30-100 mg/kg) και κροκετίνης (100 mg/kg) αύξησε τον ολικό χρόνο του non-REM (non-Rapid Eye Movement) ύπνου κατά 60%, 170% και 50% αντίστοιχα. Οι μηχανισμοί που προτείνονται για την υπνωτική δράση των



συστατικών του κρόκου είναι η τροποποίηση του ισταμινικών ή χολινεργικών κυκλωμάτων που εμπλέκονται σε διαδικασίες εγρήγορσης και αφύπνισης (Masaki et al, 2012).

Σε μια διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη, συγκριτική κλινική μελέτη βρέθηκε ότι η χορήγηση κάψουλας κροκετίνης 7.5 mg για 2 εβδομάδες σε υγιείς ενήλικες με ήπια διαταραχή ύπνου ελάττωσε τον αριθμό των επεισοδίων αφύπνισης, χωρίς όμως να επηρεάζει τον χρόνο έλευσης του ύπνου (Kuratsune et al, 2010).

## 1.2. ΑΓΧΩΔΕΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

### 1.2.1. Εισαγωγή

Ετυμολογικά ο όρος άγχος προέρχεται από το ρήμα «άγχω», που στην αρχαία ελληνική γλώσσα σημαίνει σφίγγω ή πνίγω. Ως ψυχιατρικός όρος εισήχθη από τον Freud το 1894. Μπορεί να οριστεί ως ένα δυσάρεστο αίσθημα ανησυχίας και έντασης για επικείμενο, αλλά ακαθόριστο κίνδυνο. Το άγχος είναι μια φυσιολογική σωματική και ψυχική αντίδραση σε μια απειλή. Ιδιαίτερα το βραχυπρόθεσμο άγχος μπορεί και να συμβάλει στη μεγιστοποίηση της επαγρύπνησης και της απόδοσης του ατόμου. Αποκτά όμως παθολογικό χαρακτήρα όταν παρατείνεται, όταν παρεμποδίζει τη λειτουργικότητα του πάσχοντος και όταν είναι δυσανάλογο με το ερέθισμα που το προκαλεί. Σε αυτή την περίπτωση ο πάσχων αντιλαμβάνεται μια -αληθινή ή μη- διάσταση μεταξύ των απαιτήσεων μιας κατάστασης και των βιολογικών, ψυχολογικών και κοινωνικών ικανοτήτων του να ανταποκριθεί σε αυτήν.

Φόβος και άγχος είναι παραπλήσιες καταστάσεις, η διαφορά τους όμως έγκειται στο γεγονός πως στον φόβο υπάρχει συγκεκριμένο φοβογόνο αντικείμενο, ενώ στο άγχος όχι. Επιπλέον ο φόβος πυροδοτεί μια ορισμένη δράση φυγής ή επίθεσης, ενώ αντίθετα το παθολογικό άγχος είναι δυνατόν να αδρανοποιήσει τον ασθενή.

### 1.2.2. Παθογένεση

#### 1.2.2.1. Εγκεφαλικές δομές

Οι κρίσιμες εγκεφαλικές δομές που εμπλέκονται στο άγχος και στις φοβικές συμπεριφορές είναι ο υπομέλανας τόπος (Locus coeruleus), ο ιππόκαμπος, ο προμετωπιαίος φλοιός, ο θάλαμος, ο υποθάλαμος, η περιϋδραγωγός φαιά περιοχή (PAG - periaqueductal gray area) και ιδιαίτερα η αμυγδαλή (Charney et al, 1998).

Η αμυγδαλή εντοπίζεται στο πρόσθιο τμήμα του μέσου κροταφικού λοβού. Επεξεργάζεται αισθητηριακές πληροφορίες, αξιολογεί τον βαθμό της απειλής και οργανώνει την απόκριση σε αυτή, μέσω αμφίδρομων προβολών στον ιππόκαμπο, τον θάλαμο, τον υποθάλαμο, την πρόσθια έλικα του προσαγωγίου, τον κογχομετωπιαίο φλοιό και περιοχές του στελέχους (PAG, PBN, πυρήνες της ραφής, υπομέλας τόπος). Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση των προβολών στην πρόσθια έλικα του προσαγωγίου και στον κογχομετωπιαίο φλοιό επάγει συναισθηματικές φοβικές αντιδράσεις, η ενεργοποίηση της προβολής προς την PAG ρυθμίζει την κινητική απόκριση άμυνας ή αποφυγής, η σύνδεση με τον υποθάλαμο καθορίζει τις νευροενδοκρινικές αποκρίσεις στο στρες, η σύνδεση με τον PBN αυξάνει τον ρυθμό τη αναπνοής και εκείνη με τον υπομέλανα τόπο τις αντιδράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

#### 1.2.2.2. Νορεπινεφρίνη

Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει την εμπλοκή της νορεπινεφρίνης σε διαδικασίες άγχους. Η διέγερση του υπομέλανος τόπου στο στέλεχος οδηγεί σε απελευθέρωση νορεπινεφρίνης στους α1 και β1 αδρενεργικούς υποδοχείς της αμυγδαλής, του προμετωπιαίου φλοιού, του ιπποκάμπου, του θαλάμου, του υποθαλάμου, της περιδραγωγού φαιάς ουσίας και του πυρήνα τελικής ταινίας. (Vermetten & Bremner, 2002).

Επιπλέον, σε πάσχοντες από αγχώδεις διαταραχές έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα του MHPG, ενός μεταβολίτη της νορεπινεφρίνης, υποδηλώνοντας αυξημένη έκκριση νορεπινεφρίνης στα άτομα αυτά. Κλινικές μελέτες έδειξαν επίσης ότι η χορήγηση αγωνιστών των β-νοραδρενεργικών υποδοχέων όπως είναι η ισοπροτερενόλη αυξάνουν τα επίπεδα άγχους. Την εμπλοκή της νορεπινεφρίνης στο άγχος υποστηρίζει και η παρατήρηση πως εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της νοραδρεναλίνης (βενλαφαζίνη, δουλοξετίνη), απευαισθητοποιώντας τους μετασυναπτικούς β

και  $\alpha 1$  αδρενεργικούς υποδοχείς, προκαλούν μέτριας έντασης αγχώλυση (Yamada et al, 2000; Cameron & Minoshima, 2002; Damatarca et al, 2004).

### 1.2.2.3. GABA

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ και υποδοχείς του απαντώνται σε όλες σχεδόν τις περιοχές του εγκεφάλου. Ασκει τις επιδράσεις του μέσω τουλάχιστον δύο υποδοχέων: τους  $GABA_A$  και  $GABA_B$  υποδοχείς. Οι  $GABA_A$  αποτελούνται από πέντε υπομονάδες πρωτεϊνών, οι οποίες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο. Το πενταμερές αυτό περικλείει ένα ιοντικό διάυλο, ο οποίος όταν είναι ανοιχτός επιτρέπει τη διέλευση ιόντων χλωρίου προς το μετασυναπτικό νευρώνα, γεγονός που προκαλεί ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά. Οι  $GABA_A$  υποδοχείς φέρουν πέντε θέσεις δέσμησης. Η μία από αυτές αντιστοιχεί στον ενδογενή νευροδιαβιβαστή, δηλαδή το GABA, ενώ στις υπόλοιπες τέσσερις δεσμεύονται οι βενζοδιαζεπίνες, τα βαρβιτουρικά, η πικροτοξίνη και η αιθανόλη. Η ενεργοποίηση της GABA-εργικής νευροδιαβίβασης ασκεί αγχολυτική δράση, καθώς αναστέλλει τη διέγερση των μετασυναπτικών  $GABA_A$  υποδοχέων της αμυγδαλής και κατ'επέκταση εμποδίζει την ενεργοποίηση των προβολών της αμυγδαλής προς τον ιππόκαμπο, τον θάλαμο, τον υποθάλαμο, την πρόσθια έλικα του προσαγωγίου, τον κογχομετωπιαίο φλοιό και περιοχές του στελέχους (PAG, PBN, πυρήνες της ραφής, υπομέλας τύπος).

Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η τοπική έγχυση GABA, μουσκιμόλης (αγωνιστή GABA), βενζοδιαζεπινών και μερικών αγωνιστών του σεροτονινεργικού  $5-HT1_A$  υποδοχέα στην αμυγδαλή μειώνει το άγχος. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι φάρμακα τα οποία δρουν αγωνιστικά στην θέση βενζοδιαζεπινών και αιθανόλης στο σύμπλοκο του  $GABA_A$  υποδοχέα μειώνουν την έκκριση του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης και κατ'

επέκταση της κορτιζόλης ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες (Kallueff & Nutt, 2007; Lopez et al, 1999).

#### 1.2.2.4. Σεροτονίνη

Το σεροτονινεργικό σύστημα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του άγχους. Διαταραχές στην απελευθέρωση ή στην επαναπρόσληψη της σεροτονίνης από τους προσυναπτικούς υποδοχείς, καθώς και αυξημένη ευαισθησία των μετασυναπτικών υποδοχέων στη σεροτονίνη έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση συμπτωμάτων άγχους. Η παρουσία σεροτονινεργικών υποδοχέων και σε άλλες νευροχημικές οδούς (heteroreceptors) δείχνει ότι η τροποποίηση της σεροτονινεργικής λειτουργίας μπορεί να επηρεάσει και άλλα κυκλώματα, όπως της νορεπινεφρίνης, της ντοπαμίνης, του γλουταμικού και του GABA (Richardson-Jones et al, 2011).

Η επίδραση της σεροτονίνης στο άγχος είναι περίπλοκη και εξαρτάται από τους υποδοχείς που διεγείρονται. Η διέγερση των 5-HT<sub>1A</sub> προσυναπτικών υποδοχέων στους πυρήνες της ραφής επάγει αγχώλυση, ενώ η διέγερση των 5-HT<sub>1A</sub> μετασυναπτικών υποδοχέων στον ραχιαίο ιππόκαμπο επάγει άγχος. (DeVry, 1995; File, 1996). Σε πειράματα συμπεριφορικής φαρμακολογίας βρέθηκε πως η χορήγηση αγωνιστών των 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέων προκαλεί άγχος σε τρωκτικά, ενώ γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με πλήρη έλλειψη 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέων εμφάνισαν μειωμένο άγχος, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα πως η διέγερση των 5-HT<sub>1B</sub> υποδοχέων έχει αγχογόνο δράση (Lin & Parsons, 2002; Groenink et al, 2003).

Η διέγερση των 5-HT<sub>2A</sub> υποδοχέων ασκεί αγχογόνο δράση, πιθανώς εξαιτίας της ικανότητάς της να επάγει την έκκριση αδρενοκορτικοτρόφου ορμόνης (ACTH) από τον υποθάλαμο (Costall & Naylor, 1995; Carrasco & Van De Kar, 2003). Αγχογόνο επίδραση φαίνεται να έχει και η διέγερση των 5-HT<sub>2C</sub>, καθώς έχει βρεθεί ότι η χορήγηση αγωνιστών του όπως το mCPP

προκαλεί άγχος σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, ενώ η χορήγηση ανταγωνιστών του (π.χ. SB-242084) επιφέρει αγχώλυση (Martin et al, 2002; Kennett et al, 1997). Τα ανωτέρω στοιχεία επιβεβαιώνονται και κλινικά καθώς έχει βρεθεί ότι ανταγωνιστές των υποδοχέων 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>2C</sub> όπως η ριτανσερίνη, η μιανσερίνη, η αμιτρυπτιλίνη, η τραζοδόνη, η μιρταζαπίνη και η κλομιπραμίνη επιφέρουν αξιόλογη αγχολυτική δράση (Marek et al, 1992).

#### 1.2.2.5. Γενετικοί παράγοντες

Μελέτες σε διδύμους έχουν δείξει ότι οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι αδελφοί των πασχόντων έχουν 80 – 90% πιθανότητα να νοσήσουν από γενικευμένη αγχώδη διαταραχή, ενώ οι διζυγωτικοί μόλις 10 – 15 %, γεγονός που αποδεικνύει τη συμβολή της γενετικής προδιάθεσης στην εμφάνιση της νόσου.

#### 1.2.2.6. Συστηματικές παθήσεις

Εκδηλώσεις άγχους μπορεί να οφείλονται και σε μια σειρά νοσημάτων από διάφορα συστήματα, οι οποίες πρέπει να αποκλείονται προτού τεθεί η τελική διάγνωση αγχώδους διαταραχής. Σε αυτά περιλαμβάνονται νευρολογικές παθήσεις (νεοπλάσματα, τραύματα, μεταδιασεισικό σύνδρομο, υπαραχνοειδής αιμορραγία, ημικρανία, εγκεφαλίτιδα, σύφιλη, σκλήρυνση κατά πλάκας, νόσος του Huntington, κροταφική επιληψία), ενδοκρινικές διαταραχές (υπερθυρεοειδισμός, φαιοχρωμοκύτωμα, παθήσεις υπόφυσης, υπογλυκαιμία), αυτοάνοσα νοσήματα (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, οζώδης πολυαρτηρίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, κροταφική αρτηρίτιδα), στερητικές νόσοι (πελάγρα, ανεπάρκεια βιταμίνης B12), χρήση ουσιών (καφεΐνη, αμφεταμίνη, κάνναβις, αλκοόλη, συμπαθητικομιμητικές ουσίες, πενικιλλίνη, σουλφοναμίδες, υδράργυρος, αρσενικό, φώσφορος, οργανοφωσφορικές

ενώσεις) και ψυχιατρικές παθήσεις (κατάθλιψη, σχιζοφρένεια, ψυχογενής ανορεξία, υποχονδρίαση, ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή).

### *1.2.3. Κλινική εικόνα*

Θεμελιώδες σύμπτωμα της γενικευμένης αγχώδους διαταραχής είναι το υπερβολικό άγχος, το οποίο είναι παρόν στο μεγαλύτερο διάστημα της καθημερινής ζωής του ατόμου, διαρκεί τουλάχιστον 6 μήνες, διαχέεται σε κάθε πτυχή της δραστηριότητάς του, επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργικότητά του και είναι μη ελεγχόμενο. Συνοδεύεται από αίσθημα ακαθόριστης ανησυχίας και φόβο απώλειας ελέγχου. Ωστόσο η ενεργοποίηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος επάγει και μια σειρά σωματικών συμπτωμάτων που σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να κυριαρχούν. Σε αυτά συγκαταλέγονται υπερκινητικότητα, κόπωση, αδυναμία συγκέντρωσης, ευερεθιστότητα, νευρικότητα, τρόμος, αυξημένη μυϊκή τάση, εφιδρώσεις, κεφαλαλγία, αίσθημα παλμών, ταχυκαρδία, έκτακτες συστολές, ταχύπνοια, ζάλη, επιγαστρική δυσφορία και διαταραχές ύπνου.

Το άγχος μπορεί να λάβει όμως και τη μορφή κρίσης πανικού. Πρόκειται για ένα σύντομο επεισόδιο μέγιστου και ανεξέλεγκτου φόβου που εμφανίζεται ξαφνικά χωρίς προσδιορίσιμη αιτία. Χαρακτηρίζεται από μια αίσθηση επικείμενης σωματικής ή ψυχικής κατάρρευσης σε συνδυασμό με εκδηλώσεις από το συμπαθητικό σύστημα όπως ταχυκαρδία, θωρακικό άλγος, αίσθημα πνιγμονής, δύσπνοια, ζάλη, αστάθεια, τρόμο, ναυτία και εφίδρωση. Τα συμπτώματα παρουσιάζουν μια σταδιακή κορύφωση και ακολουθεί προοδευτική αποκλιμάκωσή τους μέσα σε 10-30 λεπτά. Στα μεσοδιαστήματα των κρίσεων ο πάσχων διακατέχεται από το άγχος αναμονής του επόμενου επεισοδίου και ως εκ τούτου αποφεύγει χώρους και περιστάσεις από όπου δεν θα μπορέσει να διαφύγει σε περίπτωση νέας κρίσης. Σταδιακά η συμπεριφορά αυτή μπορεί να πυροδοτήσει φοβίες και δευτερογενή κατάθλιψη. Λόγω της

υψηλής συννοσηρότητάς τους η κλινική πορεία των διαταραχών άγχους ποικίλει, σε γενικές γραμμές όμως ακολουθεί χρόνια διαδρομή με εξάρσεις και υφέσεις.

Η ύπαρξη ψυχοκαταπονήσεων και στρεσογόνων γεγονότων στη ζωή των ατόμων με διαταραχές άγχους επιβαρύνει την πρόγνωση. Δεν είναι σπάνιο οι ασθενείς αυτοί να οδηγηθούν στην εξάρτηση από αλκοόλ ή βενζοδιαζεπίνες κατά την επίμονη προσπάθεια ανακούφισης από το άγχος.

#### *1.2.4. Θεραπεία*

Η φαρμακευτική αγωγή περιλαμβάνει αγχολυτικά (κυρίως βενζοδιαζεπίνες και αζαπρόνες), ορισμένα αντικαταθλιπτικά (αμιτριπτιλίνη, βενλαφαξίνη, παροξετίνη) ή συνδυασμούς αυτών. Καθώς το χρονικό διάστημα χρήσης των βενζοδιαζεπινών δεν μπορεί να ξεπεράσει τις 8-12 εβδομάδες και η θεραπευτική τους δράση είναι συμπτωματική και όχι θεραπευτική, κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός με κάποια μορφή ψυχοθεραπείας συμπεριφορικού, ψυχοδυναμικού ή υποστηρικτικού τύπου.

##### 1.2.4.1. Βενζοδιαζεπίνες

Οι βενζοδιαζεπίνες είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα σήμερα, καθώς το 15% του ευρωπαϊκού πληθυσμού τις χρησιμοποιεί συστηματικά. Είναι φάρμακα με δράση όχι μόνο αγχολυτική, αλλά και μυοχαλαρωτική, υπναγωγό και αντιεπιληπτική. Στις ενδείξεις τους περιλαμβάνονται εκτός από τη γενικευμένη αγχώδη διαταραχή και την κρίση πανικού, οι διαταραχές ύπνου, το άγχος κατά τη διαδρομή ψυχιατρικών και οργανικών παθήσεων, το στερητικό σύνδρομο, η προεγχειρητική προετοιμασία για αναισθησία και η προετοιμασία για επεμβατικές διαδικασίες όπως οι ενδοσκοπήσεις.



Απορροφώνται καλά κατά την χορήγηση από το στόμα και η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα επιτυγχάνεται σε μια ώρα. Όλες έχουν υψηλή λιποδιαλυτότητα και διαπερνούν ταχύτατα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Όσον αφορά τον μεταβολισμό τους υφίστανται βιομετατροπή σε ενδιάμεσα φαρμακολογικά ενεργά προϊόντα τα οποία μετατρέπονται σε ανενεργά μέσω του μεταβολισμού πριν απεκκριθούν. Τελικός μεταβολίτης των περισσότερων είναι η δεσμεθυλδιαζεπάμη. Διακρίνονται σε βενζοδιαζεπίνες: μακράς διάρκειας δράσεως (χλωροδιαζεποξείδη, πραζεπάμη και χλωραζεπάτη), ενδιάμεσου διάρκειας δράσεως (φθοριονιτραζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, κλοναζεπάμη, νιτραζεπάμη) και βραχείας διάρκειας δράσεως (τριαζολάμη, οξαζεπάμη, λοραζεπάμη, τεμαζεπάμη).

Οι βενζοδιαζεπίνες είναι σε γενικές γραμμές ασφαλή φάρμακα ακόμη και σε μεγάλες δόσεις, καθώς παρουσιάζουν χαμηλή ηπατοτοξική και νεφροτοξική δράση. Επάγουν ωστόσο ανεπιθύμητες ενέργειες όπως κόπωση, καταστολή, υπνηλία, αταξία, λήθαργο, νοητική σύγχυση, διαταραχές μνήμης, ψυχοκινητική έκπτωση. Η συνεχής χρήση τους, ακόμη και σε θεραπευτικές δόσεις, ενδέχεται να προκαλέσει εξάρτηση, με αποτέλεσμα η αιφνίδια διακοπή να πυροδοτήσει στερητικά φαινόμενα. Γι' αυτό και η συνολική διάρκεια της αγωγής δεν θα πρέπει να ξεπερνά τις 8-12 εβδομάδες, συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου σταδιακής διακοπής.

Οι βενζοδιαζεπίνες είναι θετικοί αλλοστερικοί τροποποιητές του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα. Αυτό σημαίνει ότι επί απουσίας GABA οι ουσίες αυτές δεν έχουν καμία επίδραση στον υποδοχέα, ενώ όταν το GABA συνδέεται στην θέση σύνδεσης στον υποδοχέα του, η σύνδεση της βενζοδιαζεπίνης στη δική της αλλοστερική θέση σύνδεσης ευοδώνει ακόμη περισσότερο τη διάνοιξη του διαύλου. Αυτό έχει ως συνέπεια την ακόμη μεγαλύτερη εισροή ιόντων χλωρίου, τα οποία υπερπολώνουν τον μετασυναπτικό νευρώνα καταστέλλοντας την διεγερσιμότητα του. Οι υποδοχείς των βενζοδιαζεπινών προσδιορίστηκαν στο GABA-εργικό υποδοχειακό σύμπλοκο και βρίσκονται σε

υψηλές συγκεντρώσεις στην αμυγδαλή και άλλες περιοχές που εμπλέκονται στο άγχος, όπως είναι ο προμετωπιαίος φλοιός.

#### 1.2.4.2. Υδροξυζίνη

Πρόκειται για έναν ανάστροφο αγωνιστή των  $H_1$  ισταμινικών υποδοχέων, που χρησιμοποιείται περιστασιακά στην αντιμετώπιση του άγχους. Σε αντίθεση με τα περισσότερα αντισταμινικά πρώτης γενιάς δεν εμφανίζει συγγένεια προς τους μουςκαρινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, ως εκ τούτου δεν προκαλεί ανεπιθύμητες αντιχολινεργικές δράσεις. Επιπρόσθετα έχει επίσης βρεθεί ότι δρα και ως ανταγωνιστής των  $5-HT_{2A}$  και των  $\alpha_1$ -αδρενεργικών υποδοχέων, γεγονός που ερμηνεύει περαιτέρω την αγχολυτική και ηρεμιστική της δράση.

#### 1.2.4.3. Βουσπιρόνη

Αποτελεί την πρωτότυπη ουσία μιας νέας χημικής κατηγορίας ουσιών που ονομάζονται αζαπιρόνες. Δρα ως μερικός αγωνιστής στους προσυναπτικούς υποδοχείς  $5-HT_{1A}$  της σεροτονίνης, εξομαλύνοντας έτσι την σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση. Σε σύγκριση με τις βενζοδιαζεπίνες ασκεί αγχολυτική δράση, χωρίς όμως να προκαλεί καταστολή, εξάρτηση ή επιδείνωση των ανώτερων νοητικών λειτουργιών. Ωστόσο δεν ενδείκνυται για αντιμετώπιση οξέων επεισοδίων άγχους, καθώς το θεραπευτικό της αποτέλεσμα εμφανίζεται μετά από 1-2 εβδομάδες και το μέγιστο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται μετά από 4-6 εβδομάδες.

#### 1.2.4.4. β-Αδρενεργικοί αναστολείς

Πρόκειται για φάρμακα που αποκλείουν τους β-αδρενεργικούς υποδοχείς. Χρησιμοποιούνται για την καταστολή των σωματικών συμπτωμάτων του άγχους, όπως το αίσθημα παλμών, η ξηροστομία, η διάρροια. Αντενδείκνυται η χρήση τους σε πάσχοντες από βρογχικό άσθμα ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Συνηθέστερα επιλέγονται η πινδολόλη, η οξπρενολόλη και η προπρανολόλη.

## 1.3. ΙΔΕΟΨΥΧΑΝΑΓΚΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

### 1.3.1. Εισαγωγή

Η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες, ανεπιθύμητες και απaráδεκτες για το άτομο σκέψεις, που συνοδεύονται από δυσφορία και σε άλλοτε άλλο βαθμό από κινητικές ή και νοητικές εκδηλώσεις. Το άτομο διατηρεί εναισθησία, προσπαθεί να αντισταθεί, αλλά τελικά υποκύπτει στις επιταγές της διαταραχής. Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε το 1878 από τον Westphal και ολοκληρώθηκε το 1903 από τον Janet, ο οποίος την ονόμασε «*folie de doute*».

Η νόσος προσβάλλει το 2% του γενικού πληθυσμού, ενώ το ποσοστό αυτό ανέρχεται σε 10% όταν πρόκειται για ψυχιατρικούς ασθενείς και σε 30% όταν μελετώνται καταθλιπτικοί ασθενείς. Η νόσος προσβάλλει εξίσου και τα δύο φύλα, όταν όμως τα συμπτώματα ξεκινούν κατά τη παιδική ηλικία, υπάρχει σαφής υπεροχή των αρρένων. Η μέση ηλικία έναρξης είναι τα 20 έτη, με το 75% των περιπτώσεων η διαταραχή να έχει ήδη εκδηλωθεί μέχρι τα 30 έτη. (Ruscio et al, 2010).

### 1.3.2. Παθογένεση

#### 1.3.2.1. Εγκεφαλικές δομές

Έχουν προταθεί τρία μοντέλα για το νευροανατομικό υπόστρωμα της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής. Κοινό σημείο είναι η δυσλειτουργία των κυκλωμάτων που συνδέουν το μεταιχμιακό σύστημα με τον κορχομετωπιαίο φλοιό και την έλικα του προσαγωγίου καθώς και τα βασικά γάγγλια με τον φλοιό μέσω του θαλάμου. Μελέτες με λειτουργικές νευροαπεικονιστικές τεχνικές σε πάσχοντες από ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή δείχνουν αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα στο κορχικό τμήμα του προμετωπιαίου φλοιού και στα βασικά γάγγλια, κυρίως στον κερκοφόρο πυρήνα, καθώς και στην έλικα

του προσαγωγίου, περιοχές οι οποίες ελέγχουν την αναστολή και τον τερματισμό ακατάλληλων σχεδίων συμπεριφορών . Είναι αξιοσημείωτο ότι η μεταβολική δραστηριότητα στις περιοχές αυτές επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα όταν βελτιωθούν τα συμπτώματα ανεξάρτητα, από το αν η βελτίωση αυτή επήλθε μετά από φαρμακευτική ή συμπεριφορική θεραπεία. Ευρήματα από τη δομική απεικόνιση του εγκεφάλου με αξονική και μαγνητική τομογραφία δείχνουν αμφοτερόπλευρη αύξηση του μεγέθους των κερκοφόρων πυρήνων (Modell et al, 1989; Schwartz, 1998; Aouizerate et al, 2004, Scarone et al, 1992; Whiteside et al, 2004; Saxena et al, 1999).

Ο κορχομετωπιαίος φλοιός ευδοώνει γνωστικές, συναισθηματικές και συμπεριφορικές λειτουργίες και την μεταξύ τους αλληλεπίδραση, δεχόμενος ίνες από την αμυγδαλή και τον υποθάλαμο. Οι λειτουργίες αυτές περιλαμβάνουν την εκτίμηση της σημασίας ενός ερεθίσματος, την εκμάθηση κατάλληλων αποκρίσεων σε αποστροφικά ερεθίσματα και σε ερεθίσματα που προκαλούν ανταμοιβή, την ρύθμιση συναισθηματικών καταστάσεων και την αλλαγή αποκρίσεων σε μια κατάσταση όταν χρειάζεται. Ο κορχομετωπιαίος φλοιός εμπλέκεται επίσης στον ανασταλτικό έλεγχο, ελλείμματα του οποίου οδηγούν στην εμφάνιση καταναγκασμών (Bechara et al, 2000; Menzies et al, 2008).

Οι συνδέσεις των βασικών γαγγλίων με τον φλοιό είναι υπεύθυνες για την επιτέλεση ενεργειών ως αλληλουχίες συμπεριφορών. Η λειτουργία αυτή οδηγεί σε μια σειρά συντονισμένων διαδοχικών κινητικών πράξεων που συσχετίζονται με συγκεκριμένες σκέψεις και κίνητρα. Οι πάσχοντες από ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή παραμένουν προσκολλημένοι σε ένα πλαίσιο, αδύναμοι να μεταπηδήσουν από μια προτεραιότητα σε άλλη καθώς και να θέσουν νέες, με συνέπεια να εγκλωβίζονται σε ένα συγκεκριμένο συμπεριφορικό πρότυπο (Graybiel & Rauch, 2000).

Η έλικα του προσαγωγίου μπορεί να διαιρεθεί σε δύο περιοχές. Η μία είναι η ραχιαία η οποία είναι η γνωστική περιοχή που συνδέεται με τον ραχιαίο έξω

προμετωπιαίο φλοιό και η άλλη είναι η κοιλιακή που συνδέεται με την αμυγδαλή, τον επικλινή πυρήνα, τον υποθάλαμο, τον ιππόκαμπο και τον κογχομετωπιαίο φλοιό. Η δυσλειτουργία της συγκεκριμένης περιοχής στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή οδηγεί στην μη αναγνώριση λαθών και στην λανθασμένη διαχείριση των συναισθηματικών συνεπειών των πράξεων. (Bush et al, 2000; Devinsky et al, 1995).

#### 1.3.2.2. Σεροτονίνη

Μια σειρά ευρημάτων υποστηρίζει πως σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου διαδραματίζει μια διαταραχή στη σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση. Κατ' αρχάς έχει βρεθεί πως ασθενείς με ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή εμφανίζουν υψηλά επίπεδα του μεταφορέα της σεροτονίνης SERT, ο οποίος ρυθμίζει τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη (Pogarell et al, 2003). Επιπρόσθετα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό πασχόντων βρέθηκαν υψηλά επίπεδα του κύριου μεταβολίτη της σεροτονίνης 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) (Insel et al, 1985).

Κλινικά δεδομένα καταδεικνύουν επίσης ότι οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (φλουοξετίνη, σερτραλίνη, σιταλοπράμη) αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τα συμπτώματα της εν λόγω διαταραχής. Φαίνεται πως η χρόνια χορήγηση των φαρμάκων αυτών προκαλεί απευαισθητοποίηση των μετασυναπτικών σεροτονινεργικών υποδοχέων στον κογχομετωπιαίο φλοιό (El Mansari & Blier, 2006).

Σε επίπεδο υποδοχέων ιδιαίτερη σημασία έχουν οι 5-HT<sub>2</sub> υποδοχείς, καθώς οι ανταγωνιστές τους μιρταζαπίνη και ρισπεριδόνη βρέθηκαν αποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση της νόσου (McDougle et al, 2000; Koran et al, 2005). Το mCPP (meta-Chlorophenylpiperazine), ένας μη εκλεκτικός αγωνιστής των 5-HT<sub>2</sub> υποδοχέων, με μεγαλύτερη συγγένεια για τους 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχείς, προκαλεί επίταση των συμπτωμάτων της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής σε

πάσχοντες και επάγει καταναγκαστική συμπτωματολογία σε επίμυες (Goddard et al, 2008). Τέλος ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου του 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέα παρουσίασαν άμβλυνση της καταναγκαστικής συμπεριφοράς (Chou-Green et al, 2003).

### 1.3.2.3. Ντοπαμίνη

Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή και της ντοπαμίνης στην παθοφυσιολογία της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής. Η χορήγηση υψηλών δόσεων ντοπαμινεργικών αγωνιστών όπως η αμφεταμίνη, η βρωμοκρυπτίνη, η απομορφίνη και η L-dopa προκάλεσαν στερεοτυπικές κινήσεις σε ζώα οι οποίες ομοιάζουν με την καταναγκαστική συμπεριφορά που επιδεικνύουν άτομα με ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Το εύρημα αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην αυξημένη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση (Micallef & Blin, 2001). Η εμπλοκή της ντοπαμίνης στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι άτομα τα οποία πάσχουν από σχιζοφρένεια και ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, εμφανίζουν παρκινσονικά συμπτώματα σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με άτομα τα οποία πάσχουν μόνο από σχιζοφρένεια (Tibbo et al, 2000).

Υποστήριξη στα ανωτέρω ευρήματα παρέχουν μελέτες σε ασθενείς με ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, οι οποίες αναδεικνύουν μειωμένη δέσμευση του ανταγωνιστή των D<sub>1</sub> υποδοχέων [11C]-SCH23390 στο ραβδωτό σώμα, καθώς και ελαττωμένη δέσμευση της ντοπαμίνης στους D<sub>2</sub> υποδοχείς του κερκοφόρου πυρήνα. Τα φαινόμενα αυτά αποδίδονται σε απευαισθητοποίηση (down regulation) των υποδοχέων, εξαιτίας αυξημένης ντοπαμινεργικής δραστηριότητας (Olver et al, 2009; Denys et al, 2004).

#### 1.3.2.4. Νευροπεπτίδια

Η βασοπρεσσίνη ενδέχεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή αφού έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα του συγκεκριμένου πεπτιδίου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό πασχόντων από τη νόσο. (Altemus et al, 1992). Επιπρόσθετα τα επίπεδα της βασοπρεσσίνης εμφανίζουν θετική συσχέτιση με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της διαταραχής. Η ενδοαμυγδαλική χορήγηση της βασοπρεσσίνης αυξάνει την συμπεριφορά αυτοπεριποίησης σε αρουραίους, η οποία ομοιάζει με τα συμπτώματα της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής στους ανθρώπους (Elkabir et al, 1990).

Επίσης, η χορήγηση ωκυτοκίνης έχει βρεθεί ότι αυξάνει την συμπεριφορά αυτοπεριποίησης στους αρουραίους, ενώ μεγάλος αριθμός υποδοχέων του συγκεκριμένου πεπτιδίου βρίσκονται στην έλικα του προσαγωγίου, στην ωχρά σφαίρα, στον υποθαλάμιο πυρήνα καθώς και σε προμετωπιαίες δομές περιοχές οι οποίες συνδέονται με την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (Van Wimersma et al, 1990; McDougle et al, 1999).

Η χορήγηση τόσο της κορτικοτροπίνης (ACTH), όσο και του εκλυτικού της παράγοντα (CRF) σχετίζεται με αύξηση συμπεριφοράς αυτοπεριποίησης σε αρουραίους (Monnikes et al, 1992). Ωστόσο τα επίπεδα του CRF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό πασχόντων από ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή δεν διέφεραν από εκείνα των υγιών εθελοντών (Fossey et al, 1996).

#### 1.3.2.5. Γενετικοί παράγοντες

Κληρονομικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής. Μελέτες σε διδύμους διαπίστωσαν ότι μονοζυγωτικοί δίδυμοι παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν από κοινού τη νόσο σε σύγκριση με διζυγωτικούς. Επιπλέον οι πρώτου βαθμού συγγενείς των πασχόντων έχουν 35% πιθανότητα να



εμφανίσουν και οι ίδιοι ιδεοψυχαναγκαστικά συμπτώματα. Νεότερα ευρήματα επιβεβαίωσαν τη συμβολή της κληρονομικότητας στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Συγκεκριμένα συσχέτιση με τη νόσο εμφανίζουν η απαλοιφή της 22q11 περιοχής και ο πολυμορφισμός Val158met του γονιδίου που κωδικοποιεί την COMT (Catechol-*O*-methyltransferase), πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τον μεταφορέα DAT (Dopamine Active Transporter) και τους D1, D2, D3, D4 ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, καθώς και πολυμορφισμοί γονιδίων που κωδικοποιούν τον SERT και τους 5-HT<sub>2A</sub> και 5-HT<sub>1B</sub> σεροτονινεργικούς υποδοχείς. Τέλος συσχέτιση με τη νόσο εμφανίζει και η χρωμοσωμική περιοχή 9p24, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί τον γλουταμινεργικό μεταφορέα SLC1A1 (Karayiorgou et al, 1997; Hemmings et al, 2003; Camarena et al, 2004; Arnold et al, 2006; Nicolini et al, 2009).

### *1.3.3. Κλινική εικόνα*

Τα βασικότερα συμπτώματα της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής είναι δύο: οι ιδεοληψίες και οι καταναγκασμοί. Οι ιδεοληψίες ορίζονται ως επίμονες και επαναλαμβανόμενες σκέψεις, αμφιβολίες, πεποιθήσεις, φόβοι, εικόνες ή παρορμήσεις οι οποίες παρεμβάλλονται στη ροή των φυσιολογικών σκέψεων του ατόμου, προκαλώντας άγχος και δυσφορία. Μπορεί να είναι μονήρεις ή πολλαπλές, επεισοδιακές ή συνεχείς, εμβόλιμες ή διαδεχόμενες η μία την άλλη. Πιο συγκεκριμένα οι ιδεοληπτικές σκέψεις μπορεί να είναι λέξεις, φράσεις ή στίχοι που συχνά έχουν ανόητο, βλάσφημο ή πρόστυχο περιεχόμενο. Οι ιδεοληπτικές αμφιβολίες ή ιδεομηρυκασμοί είναι μια σειρά από σκέψεις που διαδέχονται η μία την άλλη κατά τρόπο ατέρμονο και που αφορούν είτε σε καταστάσεις που δεν μπορούν εύκολα να επαληθευθούν, είτε σε καθημερινές ασχολίες για τις οποίες το άτομο δυσκολεύεται να λάβει μια απόφαση, είτε σε κοινές ενέργειες για τις οποίες ο ασθενής αμφιβάλλει αν έγιναν και νιώθει την ανάγκη να τις ελέγξει επανειλημμένως. Στην τελευταία μάλιστα περίπτωση υπάρχει συνήθως ένας μαγικός αριθμός για το πόσες φορές πρέπει να γίνει ο

έλεγχος, που προστατεύει τον ασθενή από την αμφιβολία. Οι ιδεοληπτικές πεποιθήσεις έχουν συχνά μαγικό περιεχόμενο, το άτομο δηλαδή πιστεύει πως με τη σκέψη μπορεί να προκαλέσει ένα γεγονός. Οι ιδεοληπτικοί φόβοι έχουν σχέση με μόλυνση ή με τραυματισμό από αιχμηρά αντικείμενα. Οι ιδεοληπτικές εικόνες είναι πολύ ζωντανά βιούμενες φαντασιωσικές σκηνές βίαιου, σεξουαλικού ή αηδιαστικού περιεχομένου. Οι ιδεοληπτικές παρορμήσεις συνήθως σχετίζονται με πρόκληση βλάβης στον εαυτό και στους άλλους ή με κοινωνικά ασυμβίβαστη συμπεριφορά, ωστόσο δεν πραγματοποιούνται.

Οι καταναγκασμοί ή ψυχαναγκασμοί ορίζονται ως επαναλαμβανόμενες σκόπιμες πράξεις ή συμπεριφορές που επιτελούνται ως απάντηση στο άγχος που προκαλεί μια ιδεοληψία. Υπακούουν σε ορισμένους προκαθορισμένους από το άτομο κανόνες και χαρακτηρίζονται από στερεότυπο τρόπο ακολουθίας και ολοκλήρωσης. Συνήθως παίρνουν τη μορφή πράξεων ελέγχου, προσευχής, μετρήματος, αγγίγματος, τακτοποίησης ή μετακίνησης αντικειμένων, πλυσίματος και νοητικών συντημήσεων. Συχνά η σειρά των ενεργειών είναι τόσο αυστηρά καθορισμένη που παίρνει τη μορφή ιεροτελεστίας, γνωστή ως «ψυχαναγκαστική τελετουργία». Αυτό που προσδίδει στον καταναγκασμό παθολογικό χαρακτήρα είναι η παρατεταμένη διάρκεια, που επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην καθημερινή δραστηριότητα του πάσχοντος. Συνήθως ο τύπος του καταναγκασμού καθορίζεται από το περιεχόμενο της ιδεοληψίας, για παράδειγμα ιδεοληψίες μόλυνσης συνοδεύονται από καταναγκαστικό πλύσιμο, ενώ ιδεοληψίες αμφιβολίας από καταναγκασμούς έλεγχου.

Η πορεία της νόσου είναι χρόνια με εξάρσεις και υφέσεις. Σε ένα μικρό ποσοστό των αρρώστων (5%) η πορεία είναι επεισοδιακή με ελάχιστα ή καθόλου συμπτώματα μεταξύ των επεισοδίων. Οι ασθενείς αναζητούν βοήθεια αργά κατά την διαδρομή της νόσου και μόνο όταν τα συμπτώματά τους έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην καθημερινότητά τους (Jenike, 2004).

#### 1.3.4. Θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου χάρη στην χρήση των εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI, Selective Serotonin Reuptake Inhibitors). Οι μισοί περίπου ασθενείς ανταποκρίνονται ευνοϊκά στα σκευάσματα αυτά, ωστόσο η διακοπή τους συνοδεύεται κατά κανόνα από υποτροπή της νόσου. Για το λόγο αυτό συνήθη πρακτική αποτελεί ο συνδυασμός με κάποια συμπεριφορική μορφή ψυχοθεραπείας. Εξαιρετικά χρήσιμες αποδεικνύονται οι τεχνικές έκθεσης και οι αποτρεπτικές μέθοδοι, ενώ οι γνωσιακές και ψυχοδυναμικές προσεγγίσεις βοηθούν σε επιλεγμένες περιπτώσεις. Η ενημέρωση του πάσχοντος και της οικογένειάς του για τη νόσο, η συμμετοχή σε ομάδες αυτοβοήθειας και η κοινωνική υποστήριξη αποτελούν χρήσιμα θεραπευτικά εργαλεία.

Τα SSRI προκαλούν ισχυρή και εκλεκτική αναστολή επαναπρόσληψης της σεροτονίνης από τον προσυναπτικό νευρώνα, χάρη στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λειτουργία του μεταφορέα SERT. Στην οικογένεια των SSRI ανήκουν η φλουβοξαμίνη, η φλουοξετίνη, η σιταλοπράμη, η εσιταλοπράμη, η παροξετίνη και η σερτραλίνη. Στις κυριότερες παρενέργειές τους περιλαμβάνονται ναυτία, κεφαλαλγία, τρόμος, νευρικότητα, άγχος, αϋπνία, ζάλη, ξηροστομία, εφιδρώσεις και σεξουαλικές διαταραχές. Έχουν επίσης αναφερθεί και αιμορραγικές εκδηλώσεις από το δέρμα και τους βλεννογόνους.

## 1.4. ΣΧΙΖΟΦΡΕΝΕΙΑ

### 1.4.1. Εισαγωγή

Η σχιζοφρένεια κατέχει δεσπόζουσα θέση στο φάσμα των ψυχικών διαταραχών. Πρόκειται για μια σύνθετη νοσολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από μια σειρά διαταραχών στη σκέψη, την αντίληψη, το συναίσθημα, τη βούληση και τη συμπεριφορά. Αυτό που αποτελεί πρόκληση για τους θεράποντες είναι πως η σχιζοφρένεια προσβάλλει τις λειτουργίες εκείνες που παρέχουν στο άτομο το αίσθημα της ατομικότητας, της μοναδικότητας και του ελέγχου του εαυτού και εμφανίζεται κατά κανόνα σε νεαρά άτομα, κατακερματίζοντας τα πλέον παραγωγικά και δημιουργικά χρόνια της ζωής τους.

Μια στοιχειώδης ιστορική αναδρομή αποκαλύπτει ότι ορισμένα χαρακτηριστικά συμπτώματα, που σήμερα εντάσσονται στο νοσολογικό φάσμα της νόσου, έχουν περιγραφεί ήδη από την αρχαιότητα. Ο Ιπποκράτης τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. περιγράφει την «παράνοια» ως μια προοδευτική έκπτωση των νοητικών λειτουργιών, ο Γαληνός την ονομάζει «παραφροσύνη», ο Αρεταίος ο Καππαδόκης και ο Σωρανός ο Εφέσιος περιγράφουν περιστατικά παραληρήματος. Οι θεοκρατικές σκοταδιστικές αντιλήψεις του Μεσαίωνα αντιμετώπισαν τη σχιζοφρένεια ως εκδήλωση δαιμονοκατοχής, με αποτέλεσμα την δια της πυράς αντιμετώπισή της. Κατά την Αναγέννηση η επανάκαμψη των ιπποκρατικών αντιλήψεων οδήγησε σε περισσότερο ανθρωπιστικές προσεγγίσεις των πασχόντων. Θα χρειαστεί να φτάσουμε στον 18<sup>ο</sup> αιώνα για να έχουμε τις πρώτες κλινικές παρατηρήσεις για τη νόσο από τους Arnold, Pinel, Haslam και Morel. Ο τελευταίος το 1857 εισήγαγε τον όρο «*dementia praecox*» ή «*πρώιμη άνοια*», περιγραφικό της προοδευτικής ψυχονοητικής έκπτωσης που χαρακτηρίζει τη νόσο. Σαράντα χρόνια αργότερα ο Kraepelin διέκρινε τις διάφορες μορφές της νόσου τις οποίες ενέταξε σε μια ενιαία νοσολογική οντότητα. Ο όρος «σχιζοφρένεια» εισήχθη το 1919 από τον Bleuler, ο οποίος περιέγραψε και τα πρωταρχικά συμπτώματα της νόσου: την

ασυναρτησία, την απροσφορότητα του συναισθήματος, την αμφιθυμία και τον αυτισμό. Η τετράδα αυτή των συμπτωμάτων έμεινε γνωστή στην αγγλοσαξονική βιβλιογραφία ως «τέσσερα άλφα». Μετά από πολλές ατυχείς θεραπευτικές απόπειρες, όπως η ινσουλινοθεραπεία και η μετωπιαία λοβοτομή, το 1952 οι Delay και Deniker εισήγαγαν στην αντιμετώπιση της νόσου τις φαινοθειαζίνες, σηματοδοτώντας έτσι τις απαρχές της σύγχρονης ψυχοφαρμακολογίας.



Εικόνα 7. Paul Eugen Bleuler

Η σχιζοφρένεια δεν γνωρίζει γεωγραφικά, χρονικά, φυλετικά, κοινωνικά σύνορα. Σε γενικές γραμμές προσβάλλει εξίσου και τα δύο φύλα, αλλά υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φύλων ως προς την έναρξη της νόσου, την κλινική πορεία και την επίδραση διαφόρων παραγόντων επικινδυνότητας. Παράγοντες που επηρεάζουν θετικά την πρόγνωση της νόσου είναι η όψιμη ηλικία έναρξης της νόσου, το θήλυ φύλο, η καλή προνοσηρή κοινωνική προσαρμογή, το υψηλό κοινωνικό, οικονομικό και μορφωτικό επίπεδο, η

επαρκής οικογενειακή και κοινωνική στήριξη, ο αιφνίδιος τρόπος εισβολής της νόσου, η απουσία περιγεννητικών επιπλοκών, η ύπαρξη συγγενών με συναισθηματική διαταραχή, η έλλειψη συγγενών με σχιζοφρένεια, ο γάμος, η βραχεία διάρκεια της νόσου, η ύπαρξη εκλυτικών παραγόντων, η εναισθησία, η εμφάνιση κυρίως θετικών και όχι αρνητικών συμπτωμάτων, η ικανοποιητική συναισθηματική ανταπόκριση, η παρουσία καταθλιπτικών ή μανιακών συμπτωμάτων, οι συγχυτικές εκδηλώσεις, η έγκαιρη έναρξη θεραπείας, η άμεση ανταπόκριση στη θεραπεία, η καλή συμμόρφωση στη θεραπεία, οι σπάνιες υποτροπές, η απουσία επιθετικότητας, χρήσης ουσιών ή νευρολογικής σημειολογίας και η φυσιολογική απεικόνιση των κοιλιών του εγκεφάλου.

#### *1.4.2. Παθογένεση*

##### 1.4.2.1. Γενετική υπόθεση

Ο ρόλος της κληρονομικότητας στην αιτιοπαθογένεια της σχιζοφρένειας έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Μελέτες οικογενειών και διδύμων δείχνουν πως συγγενείς πρώτου βαθμού σχιζοφρενών έχουν τετραπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν τη νόσο σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι των σχιζοφρενών έχουν 45% πιθανότητα να νοσήσουν σε αντιδιαστολή με μόλις 15% των διζυγωτικών. Το μεγάλο εύρος διακύμανσης ωστόσο αυτών των ποσοστών αφήνει ανερμήνευτο ένα σημαντικό ποσοστό της γενικότερης επικράτησης της νόσου. Οι πλέον πρόσφατες γενετικές μελέτες αναζητούν συνδυασμούς γενετικών δεικτών ή πιθανών γονιδίων, καθώς και συνδέσεων χρωμοσωμικών θέσεων σε οικογένειες σχιζοφρενών με μεθόδους μοριακής βιολογίας. Θέσεις που έχουν επισημανθεί (p ή q) αφορούν σε αρκετά χρωμοσώματα (3, 5, 6, 8, 11, X). Η θεωρία που φαίνεται να επικρατεί είναι πολυπαραγοντική και υποστηρίζει ότι η γονιδιακή μεταβίβαση της νόσου δεν οφείλεται σε ένα μεμονωμένο γονίδιο, αλλά σε ένα συνδυασμό γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Εάν η

παθογόνος επίδραση ενός τέτοιου συνδυασμού ξεπεράσει τον ουδό ευαλωσίας, τότε μπορεί να φθάσει σε σημείο καθοριστικό για την εμφάνιση της νόσου.

#### 1.4.2.2. Υπόθεση εγκεφαλικής βλάβης

Παθολογοανατομικές μελέτες σε πάσχοντες έχουν αναδείξει ανατομικές αλλοιώσεις που πιθανώς να ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου. Αφορούν κυρίως στο μεταιχμιακό σύστημα, όπου παρατηρείται μειωμένο μέγεθος της αμυγδαλής, του ιπποκάμπου και της παραϊπποκάμπειας έλικας, αλλά και στα βασικά γάγγλια όπου ανευρίσκονται ελαττωμένο μέγεθος της ωχράς σφαίρας και της μέλαινας ουσίας, καθώς και αύξηση του αριθμού των D2 ντοπαμινεργικών υποδοχέων στον κερκοφόρο πυρήνα. Νεότερες έρευνες υποστηρίζουν άλλοτε αυξημένη και άλλοτε μειωμένη έκφραση ιοντοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού (Glu) σε κάποιες περιοχές του εγκεφάλου. Η αυξημένη έκφραση μπορεί να είναι αντισταθμιστική στην πιθανή υπολειτουργία αυτών των υποδοχέων στην σχιζοφρένεια, αφού έχει παρατηρηθεί και μετά τη χορήγηση ανταγωνιστών του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού (NMDA) υποδοχέα σε πειραματόζωα και σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων (Ulas & Cotman, 1993; Meador-Woodruff & Healy, 2001; Gao et al, 2000; Bora et al, 2011).

Ανατομικές αλλοιώσεις αναδεικνύουν και οι απεικονιστικές μελέτες πασχόντων. Η αξονική και η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου δείχνουν αδρές ανωμαλίες όπως, ατροφία μετωπιαίου και κροταφικού λοβού, ατροφία ιπποκάμπου, μεγέθυνση κερκοφόρου πυρήνα, διεύρυνση πλαγίων και τρίτης κοιλίας, σμίκρυνση θαλάμου, ανωμαλίες στο σχήμα του μεσολοβίου και της παρεγκεφαλίδας, συνολική μείωση του όγκου του εγκεφάλου. Οι λειτουργικές απεικονιστικές μέθοδοι (MRS, PET, SPECT, fMRI) δείχνουν μείωση του μεταβολισμού στους μετωπιαίους λοβούς, αδυναμία αύξησης της αιματικής ροής κατά τη διάρκεια προκλητών ψυχολογικών δοκιμασιών, αύξηση του

μεταβολισμού και της αιματικής ροής στον αριστερό κροταφικό λοβό. Οι μορφολογικές αυτές διαταραχές διαμόρφωσαν την υπόθεση ότι η σχιζοφρένεια αποτελεί νευροαναπτυξιακή διαταραχή και διάφορα νευροαναπτυξιακά πειραματικά πρότυπα της σχιζοφρένειας υποστηρίζουν την υπόθεση αυτή (Barkataki et al, 2006; Harrison, 1999; Lieberman, 1999; Deakin et al, 1997).

Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου. Ηλεκτροεγκεφαλικά ευρήματα περιλαμβάνουν μείωση της  $\alpha$  δραστηριότητας, αύξηση της  $\theta$  και  $\delta$  δραστηριότητας και αύξηση της επιληπτοειδούς δραστηριότητας. Τα προκλητά εγκεφαλικά δυναμικά δείχνουν μεταβολές τόσο των πρώιμων, όσο και των όψιμων κυματομορφών κατά τη διάρκεια παρουσίασης ερεθισμάτων. Η γενική εκτίμηση είναι πως στη σχιζοφρένεια μετά από μια αυξημένη αρχική κινητοποίηση, ακολουθεί μια προοδευτική μείωση της ικανότητας επεξεργασίας των ερεθισμάτων. Η ηλεκτροδερματική αντίδραση βρέθηκε εξαιρετικά μειωμένη ή και απύσα σε σημαντικό αριθμό σχιζοφρενών σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Ανώμαλες οφθαλμικές κινήσεις που σχετίζονται κυρίως με την παρακολούθηση κινούμενου αντικειμένου και τις σακκαδικές κινήσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί σε σχιζοφρενείς και σε συγγενείς τους.

#### 1.4.2.3. Νευροχημικές υποθέσεις

Σε νευροχημικό επίπεδο δύο είναι οι θεωρίες που κυριάρχησαν στην παθογένεια της νόσου. Η παρατήρηση τη δεκαετία του 1960 ότι φάρμακα που αυξάνουν τη ντοπαμινεργική δραστηριότητα, όπως η αμφεταμίνη, οδηγούν σε σχιζοφρενικόμορφες εκδηλώσεις και η διαπίστωση αργότερα ότι τα κλασικά νευροληπτικά ως ανταγωνιστές των D2 υποδοχέων ασκούν αντιψυχωσική δράση, οδήγησε στην υπόθεση ότι η σχιζοφρένεια οφείλεται σε υπερλειτουργία ντοπαμινεργικών κυκλωμάτων στο μεσομεταιχμιακό σύστημα (προβολές από



την κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας προς τον επικλινή πυρήνα, την αμυγδαλή και τον υπόκαμπο), θέτοντας έτσι τις βάσεις για την ντοπαμινεργική θεωρία.

Με την πάροδο του χρόνου έγινε εμφανές ότι η παραπάνω διατύπωση της ντοπαμινεργικής θεωρίας μπορούσε να ερμηνεύσει μόνο τη θετική συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας. Ο ανταγωνισμός των D2 υποδοχέων αδυνατούσε να αναστείλει τα αρνητικά συμπτώματα και τα γνωσιακά ελλείμματα των πασχόντων. Η συσχέτιση των παραπάνω συμπτωμάτων με διαταραχή στη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού οδήγησε στην αναδιατύπωση της ντοπαμινεργικής θεωρίας. Σύμφωνα με αυτή η εμφάνιση των αρνητικών συμπτωμάτων και των γνωσιακών διαταραχών στη σχιζοφρένεια αποδίδεται στην υπολειτουργία της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης μέσω των D1 υποδοχέων στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Συμπερασματικά η ντοπαμινεργική θεωρία υποστηρίζει ότι η σχιζοφρένεια οφείλεται σε δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος χαρακτηριζόμενη από υπερλειτουργία στην περιοχή του μεσομεταιχμιακού συστήματος (που προκαλεί τη θετική συμπτωματολογία) και υπολειτουργία στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (που προκαλεί την αρνητική συμπτωματολογία και τις γνωσιακές διαταραχές) (Davis et al, 1991).

Η παρατήρηση στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ότι η χορήγηση ανταγωνιστών των NMDA γλουταμινεργικών υποδοχέων (κεταμίνη, φαινκυκλιδίνη, MK-801) προκαλεί ψυχωσεομιμητικά φαινόμενα σε υγιείς εθελοντές και επιτείνει τη συμπτωματολογία της σχιζοφρένειας σε πάσχοντες οδήγησε στην διατύπωση της γλουταμινεργικής θεωρίας. Η χορήγηση ανταγωνιστών του NMDA υποδοχέα προκαλεί θετικά, αρνητικά συμπτώματα, αλλά και γνωσιακές διαταραχές (διαταραχές μνήμης και προσοχής). Τα παραπάνω δεδομένα ενίσχυσαν την υπόθεση ότι η υπολειτουργία του γλουταμινεργικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα του NMDA-R παίζει

σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (Javitt, 2007; Lahti et al, 2001; Malhotra et al, 1996; Heresco-Levy, 2003).

Το γλουταμικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ και θεωρείται απαραίτητο για τη φυσιολογική λειτουργία του 40% των συνάψεων του εγκεφάλου. Διακρίνουμε δύο τύπους υποδοχέων: τους ιονοτροπικούς (NMDA, AMPA, καϊνικού) και τους μεταβοτροπικούς (mGluR). Οι πρώτοι είναι μετασυναπτικοί διαμεμβρανικοί διάλυτοι ιόντων ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), ενώ οι δεύτεροι εντοπίζονται σε ποικίλες θέσεις (προσυναπτικοί, μετασυναπτικοί, γλοία, ετεροσυναπτικοί) και συνδέονται με πρωτεΐνες G και συστήματα δεύτερων αγγελιοφόρων, παρέχοντας θετική ή αρνητική ανατροφοδότηση για την απελευθέρωση γλουταμικού από τον προσυναπτικό νευρώνα.

Οι NMDA υποδοχείς είναι ευρέως κατανεμημένοι στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό με υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ιππόκαμπο, τον εγκεφαλικό φλοιό και τους πυρήνες του μεσεγκεφάλου και του μεταιχμιακού συστήματος. Εντοπίζονται στη μετασυναπτική μεμβράνη των διεγερτικών συνάψεων και εμπλέκονται σε μηχανισμούς που σχετίζονται με τη συναπτική πλαστικότητα και τη μνήμη όπως η μακροχρόνια ενδυνάμωση (LTP). Για να λειτουργήσουν και να επιτρέψουν την εισροή ασβεστίου στον μετασυναπτικό νευρώνα δεν αρκεί μόνο η πρόσδεση του γλουταμικού στη θέση σύνδεσής του. Πρέπει ταυτόχρονα η γλυκίνη ή η d-σερίνη να προσδεθούν στις θέσεις σύνδεσης τους και η κυτταρική μεμβράνη να υποστεί εκπόλωση ώστε να απομακρύνει ιόντα μαγνησίου που δρουν ως αρνητικοί αλλοστερικοί τροποποιητές. Παρατεταμένη ωστόσο ενεργοποίησή τους μπορεί να είναι βλαπτική και να οδηγήσει σε θάνατο του κυττάρου μέσω ενός μηχανισμού που καλείται διεγερσιτοξικότητα (excitotoxicity).

Η γλουταμινεργική θεωρία συνδέεται και ερμηνεύει την ντοπαμινεργική θεωρία. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η υπολειτουργία των NMDA υποδοχέων στο φλοιό-στελεχιαίο γλουταμινεργικό κύκλωμα εμποδίζει την ανασταλτική

λειτουργία των διάμεσων GABA νευρώνων στο ντοπαμινεργικό κύκλωμα του μεσομεταιχμιακού συστήματος, προκαλώντας έτσι υπερδραστηριότητα αυτού και συσχετίζεται με τα θετικά συμπτώματα της νόσου. Ταυτόχρονα καθώς οι γλουταμινεργικοί νευρώνες του φλοιο-στελεχιαίου κυκλώματος επικοινωνούν άμεσα με τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού, η μειωμένη δραστηριότητα των πρώτων στη σχιζοφρένεια καταστέλλει τη διέγερση των δεύτερων, ερμηνεύοντας με αυτό τον τρόπο την αρνητική συμπτωματολογία και τα γνωσιακά ελλείμματα της νόσου.

Μια σειρά συμπεριφορικών, φαρμακολογικών και ηλεκτροφυσιολογικών μελετών έδειξε ότι η χορήγηση ανταγωνιστών του NMDA υποδοχέα επάγει αύξηση των επιπέδων γλουταμικού οξέος και διέγερση των πυραμιδικών νευρώνων σε περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού. Περαιτέρω νευροαπεικονιστικές έρευνες έδειξαν αύξηση των επιπέδων γλουταμίνης (ένδειξη της ανακύκλωσης του γλουταμικού στις συνάψεις) και αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας στον προμετωπιαίο φλοιό εθελοντών που έλαβαν υποαναισθητικές δόσεις κεταμίνης και πασχόντων από σχιζοφρένεια που δεν βρίσκονταν υπό αντιψυχωσική αγωγή (Holcomb et al, 2005; Bartha et al, 1997; Théberge et al, 2002). Αυτό το παράδοξο φαινομενικά εύρημα μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στον εγκεφαλικό φλοιό οι γλουταμινεργικοί νευρώνες επικοινωνούν με τους GABAεργικούς ενδονευρώνες, που με τη σειρά τους δρουν ανασταλτικά επί των πυραμιδικών νευρώνων του μετωπιαίου φλοιού. Ως εκ τούτου η υπολειτουργία των NMDA υποδοχέων προκαλεί άρση της GABA-εργικής αναστολής, ενεργοποίηση φλοιο-φλοιικών γλουταμινεργικών κυκλωμάτων και επακόλουθη υπερέκκριση γλουταμικού. Τα υψηλά επίπεδα γλουταμικού πιθανώς να ενεργοποιούν με τη σειρά τους μη NMDA υποδοχείς γλουταμικού και η δράση αυτή να καταλήγει σε διεγερσιτοξικότητα και ψυχωσική συμπτωματολογία (Olney & Farber, 1995; Keverne, 1999; Benes & Berretta, 2001; Deutsch et al, 2001; Farber, 2003).

#### 1.4.2.4. Νευροεκφυλιστική θεωρία

Η προϊούσα πορεία της νόσου οδήγησε και στη διατύπωση της νευροεκφυλιστικής θεωρίας για τη σχιζοφρένεια. Σύμφωνα με αυτή η νόσος αποδίδεται σε σταδιακή εκφύλιση των νευρώνων είτε μέσω μηχανισμών διεγερσιτοξικότητας, είτε μέσω αποπτωτικών διεργασιών. Συγκεκριμένα η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση γλουταμινεργικών νευρώνων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οδηγεί σε αθρόα είσοδο ιόντων ασβεστίου στον μετασυναπτικό νευρώνα, η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων ενζύμων και την παραγωγή καταστροφικών για το κύτταρο ελευθέρων ριζών. Από την άλλη πλευρά έχει βρεθεί ότι η μέτρια ενεργοποίηση γλουταμινεργικών νευρώνων επάγει την έκφραση αντιαποπτωτικών παραγόντων όπως η πρωτεΐνη Akt και ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF και επομένως η υπολειτουργία των NMDA υποδοχέων επάγει την απόπτωση των νευρώνων (Keshavan, 1999; Archer, 2010).

#### *1.4.3. Κλινική εικόνα*

Η κλινική εικόνα της σχιζοφρένειας περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, που ποικίλουν σε ένταση και διάρκεια. Η νόσος μπορεί να εισβάλει αιφνίδια με έντονες διαταραχές της συμπεριφοράς, ή βαθμιαία με προοδευτική ανάπτυξη παράξενων ιδεών και ενεργειών. Συνήθως προηγείται μια πρόδρομη φάση διάρκειας περίπου πέντε ετών με αμβληγρές κλινικές εκδηλώσεις, η οποία ακολουθείται από την ενεργό φάση με έκπτωση της πλήρους κλινικής συμπτωματολογίας, μετά την αποδρομή της οποίας παρατηρείται η υπολειμματική φάση, η οποία μπορεί να διακόπτεται από επεισόδια έξαρσης της νόσου ή να ακολουθεί συνεχή πορεία. Εκείνο που θα πρέπει να επισημανθεί είναι ότι μετά την έναρξη της νόσου το άτομο δεν επανέρχεται πλήρως στην προνοσηρή λειτουργικότητά του. Τα συμπτώματα της σχιζοφρένειας μπορούν να ταξινομηθούν στις κάτωθι κατηγορίες:

#### 1.4.3.1. Διαταραχές σκέψης

Ο ασθενής εμφανίζει διαταραχές στη δομή και οργάνωση της σκέψης (ασαφής λόγος, συνωστισμός και συγχώνευση ιδεών, ασυναρτησία, νεολογισμοί, σαλάτα λέξεων), διαταραχές στη ροή της σκέψης (ανακοπή σκέψης), διαταραχές στον έλεγχο και στην κατοχή της σκέψης (απώλεια σκέψης, παρεμβολή σκέψης, εκπομπή σκέψης), διαταραχές στο περιεχόμενο της σκέψης (παραληρητικές ιδέες, ιδέες αυτοαναφοράς, ιδέες επιδράσεως). Οι παραληρητικές ιδέες αποτελούν θεμελιώδες σύμπτωμα της σχιζοφρένειας και χρήζουν ειδικής αναφοράς. Πρόκειται για λανθασμένες πεποιθήσεις που δεν ανασκευάζονται με λογική επιχειρηματολογία, δεν συνοδεύονται από διαταραχές του επιπέδου συνείδησης, είναι συναισθηματικά φορτισμένες και επηρεάζονται από το πολιτιστικό περιβάλλον του ασθενούς. Ανάλογα με το περιεχόμενό τους διακρίνονται σε ιδέες διώξεως, αναφοράς, μεγαλείου, ελέγχου, υποχονδριακές, κοσμογονικές, ερωτομανιακές και ζηλοτυπικές. Μπορεί να είναι πρωτογενείς, να αναδύονται δηλαδή αιφνιδίως ή δευτερογενείς δηλαδή να εμφανίζονται στα πλαίσια της προσπάθειας του ασθενούς να εξηγήσει τα υπόλοιπα παθολογικά του βιώματα.

#### 1.4.3.2. Διαταραχές αντίληψης

Εδώ υπάγονται οι ψευδαισθήσεις και οι παραισθήσεις. Οι ψευδαισθήσεις είναι αντιλήψεις που προκαλούνται χωρίς την ύπαρξη αντίστοιχων εξωτερικών ερεθισμάτων. Αφορούν και στις πέντε αισθήσεις, ωστόσο οι ακουστικές είναι συχνότερες και χαρακτηριστικές της σχιζοφρένειας. Έχουν τη μορφή φωνών που σχολιάζουν τη συμπεριφορά του ασθενούς ή συζητούν μεταξύ τους για τον ασθενή, αλλά πιθανώς να είναι και μη λεκτικές όπως σφυρίγματα, βόμβοι και γέλια. Μπορεί να είναι συνεχείς ή επεισοδιακές, σαφείς ή συγκεχυμένες, οργανωμένες ή αόριστες. Ως προς το περιεχόμενό τους μπορεί να είναι γλευστικές, υβριστικές, απειλητικές, επαινετικές, προτρεπτικές ή

προειδοποιητικές. Οι παραισθήσεις είναι αντιλήψεις που δημιουργούνται από παραποίηση υπαρκτών ερεθισμάτων. Τα χρώματα ή οι ήχοι μπορεί να φαίνονται ασυνήθιστα ζωνρά ή αλλαγμένα και ασήμαντα χαρακτηριστικά των αντικειμένων μπορεί να αποκτούν ιδιαίτερη βαρύτητα για τον ασθενή.

#### 1.4.3.3. Διαταραχές συναισθήματος

Οι κυριότερες συναισθηματικές διαταραχές που εμφανίζουν οι σχιζοφρενείς είναι η αμφιθυμία, η συναισθηματική απροσφορότητα, η ανηδονία και η επιπέδωση του συναισθήματος. Στην πρώτη παρατηρούνται αντιφατικά συναισθήματα για το αυτό αντικείμενο, στη δεύτερη παρατηρείται δυσαρμονία μεταξύ της βαρύτητας του ερεθίσματος και της συναισθηματικής απάντησης, στην τρίτη αδυναμία του ατόμου να αντλήσει ευχαρίστηση από δραστηριότητες και στην τέταρτη συναισθηματική αποστασιοποίηση, που εκδηλώνεται με ανέκφραστο προσωπίο, μείωση αυθόρμητων κινήσεων, απουσία εκφραστικών χειρονομιών και χρωματισμού της φωνής, αποφυγή βλεμματικής επαφής.

#### 1.4.3.4. Ψυχοκινητικές διαταραχές

Στις διαταραχές της ψυχοκινητικότητας κατατάσσονται καταρχάς οι ιδιορρυθμίες των κινήσεων δηλαδή αφύσικες και επιτηδευμένες θέσεις και στάσεις του σώματος, παράδοξοι μορφασμοί του προσώπου και στερεοτυπικές κινήσεις που ορίζονται ως επαναληπτικές, άσκοπες και ρυθμικές κινήσεις του σώματος ή της κεφαλής. Ενδιαφέροντα συμπτώματα αυτής της κατηγορίας είναι και τα σημεία προκλητής υποβολιμότητας όπως η ηχοπραξία (επανάληψη πράξεων ή χειρονομιών), η ηχομιμία (αναπαραγωγή εκφράσεων του προσώπου που αντιλαμβάνεται στον εξεταστή) και η κηρώδης ευκαμψία, η διατήρηση δηλαδή των μελών σε άβολες θέσεις μετά από παθητική μετακίνησή τους από

τον εξεταστή. Οι σημαντικότερες ωστόσο διαταραχές αυτής της ομάδας από διαγνωστικής σκοπιάς αφορούν στο σύνολο της ψυχοκινητικότητας και είναι η κατατονική εμβροντησία, δηλαδή η πλήρης αναστολή της αυθόρμητης κινητικότητας με ελάχιστη ή καμία αντίδραση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, κατάσταση που αν παραταθεί απαιτεί επείγουσα παρέμβαση, η κατατονική διέγερση με εμφανώς άσκοπη κινητική δραστηριότητα που μπορεί να εξελιχθεί ακόμη και σε επιθετική συμπεριφορά, οι παρορμητικές πράξεις και ο αρνητισμός (έντονη αντίσταση να συμμορφωθεί σε απλές οδηγίες ή να επιτελέσει ακόμα και τις πλέον βασικές βιολογικές λειτουργίες, με αποτέλεσμα παραμελημένη εμφάνιση και συχνές απουσίες από την εργασία).

#### 1.4.3.5. Διαταραχές βούλησης

Από τα αρχικά στάδια της νόσου εμφανίζεται μια προοδευτικά αυξανόμενη μείωση των πρωτοβουλιών, δυσκολία στη λήψη αποφάσεων, αναβλητικότητα και αίσθημα κόπωσης ακόμη και σε μικρή προσπάθεια.

#### 1.4.3.6. Διαταραχές ομιλίας

Ως προς την ομιλία ο ασθενής μπορεί να επαναλαμβάνει άχρωμα σαν ηχώ τις λέξεις που ακούει (ηχολαλία), να καθυστερεί να δώσει απάντηση σε ερωτήματα ή να μην απαντά καθόλου (αλαλία) και να επαναλαμβάνει στερεότυπα αδόκιμες λέξεις ή φράσεις.

#### 1.4.3.7. Διαταραχές νοητικών λειτουργιών

Η μνήμη των σχιζοφρενών δεν βλάπτεται πρωτοπαθώς, ωστόσο δευτεροπαθώς παρατηρούνται μνημονικού τύπου διαταραχές όπως εκμνησίες

(αναβίωση παρελθουσών εμπειριών ως σημερινών) και παραμνησίες (διαστρέβλωση μνημονικού υλικού με αποτέλεσμα προϊόντα της φαντασίας να εκλαμβάνονται ως αναμνήσεις). Η προσοχή μπορεί επίσης να διαταράσσεται στη σχιζοφρένεια με συχνότερα συμπτώματα την αδυναμία συγκέντρωσης λόγω εύκολης διάσπασης της προσοχής.

#### 1.4.3.8. Κοινωνική απόσυρση

Το άτομο αποφεύγει τις κοινωνικές επαφές, οι σχέσεις του γίνονται επιφανειακές με χαρακτηριστική έλλειψη οικειότητας, χάνει τα ενδιαφέροντά του και παρουσιάζει ελαττωμένη σεξουαλική επιθυμία.

#### 1.4.3.9. Σωματικές ενοχλήσεις

Εδώ περιλαμβάνονται κυρίως εκδηλώσεις από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, όπως ζάλη, μυική αδυναμία, αναστροφή κερκαδιανών ρυθμών, αγγειοκινητικές διαταραχές και κεφαλαλγίες μη ειδικού τύπου.

#### 1.4.3.10. Σύγχρονη ταξινόμηση

Τα τελευταία χρόνια κυριαρχεί μια νέα ταξινόμηση των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας, η οποία κατατάσσει τα ανωτέρω συμπτώματα σε τρεις κατηγορίες: α) τα θετικά συμπτώματα, που αντανακλούν επίταση φυσιολογικών λειτουργιών και περιλαμβάνουν τις ψευδαισθήσεις, τις παραληρητικές ιδέες και την ψυχοκινητική διέγερση, β) τα αρνητικά συμπτώματα, που χαρακτηρίζονται από άμβλυνση των φυσιολογικών λειτουργιών και περιλαμβάνουν τις διαταραχές του συναισθήματος, την κοινωνική απόσυρση



και τις διαταραχές της βούλησης και γ) τις γνωσιακές διαταραχές, που περιλαμβάνουν διαταραχές μάθησης, μνήμης και προσοχής.

Όλα τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν ανήκουν στο ευρύ φάσμα της σχιζοφρενικής συμπτωματολογίας, ωστόσο σπάνια ανευρίσκονται όλα μαζί σε έναν ασθενή και η διαγνωστική τους αξία ποικίλει. Η παρουσία αρνητικών συμπτωμάτων είναι ιδιαίτερα δυσμενής για την πρόγνωση, γιατί είναι αυτή που θα καθορίσει την ποιότητα ζωής του πάσχοντος, την ικανότητά αυτοεξυπηρέτησης, τη διατήρηση διαπροσωπικών σχέσεων και την ικανότητα επανόδου στο εργασιακό του περιβάλλον.

#### *1.4.4. Θεραπεία*

Η σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας περιλαμβάνει δύο προσεγγίσεις: την φαρμακολογική και την ψυχοκοινωνική. Η φαρμακολογική αντιμετώπιση έχει κατά κανόνα τον πρώτο ρόλο, ωστόσο οι δύο αυτές προσεγγίσεις αλληλοδιαπλέκονται καθ' όλη τη διάρκεια της νόσου με ορισμένες τροποποιήσεις ως προς την προτεραιότητα εφαρμογής της καθεμιάς ανάλογα με τη φάση εξέλιξης της νόσου. Βασικοί κανόνες που διέπουν όλη τη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου είναι η εξατομίκευση της όποιας θεραπευτικής απόπειρας, η διαρκής αξιολόγηση της συνολικής λειτουργικότητας του αρρώστου, η εδραίωση καλής ψυχοθεραπευτικής σχέσης με τον ασθενή και με την οικογένειά του, η λεπτομερής μελέτη της προσωπικότητας και του ιστορικού.

Τα αντιψυχωσικά φάρμακα αποτελούν τον κεντρικό κορμό της θεραπείας στην οξεία φάση της νόσου και απαραίτητο συμπλήρωμα των ψυχολογικών προσεγγίσεων κατά τα μεσοδιαστήματα μεταξύ των εξάρσεων της νόσου. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα κλασικά νευροληπτικά και τα άτυπα νευροληπτικά. Η επιλογή του φαρμάκου καθορίζεται από το είδος των συμπτωμάτων (θετικά ή αρνητικά). Κατ' αρχήν επιλέγονται φάρμακα που

υπήρξαν αποτελεσματικά στο παρελθόν στον συγκεκριμένο άρρωστο. Αρχικά επιλέγεται μια σχετικά υψηλή δοσολογία ως δόση εφόδου, αλλά μετά την ύφεση της οξείας φάσης εφαρμόζεται μια σταδιακή ελάττωση της δόσης μέχρι να επιτευχθεί η χαμηλότερη αποτελεσματική δόση η οποία και συνεχίζεται ως αγωγή συντήρησης.

Τα κλασικά νευροληπτικά είναι αποτελεσματικά σε ένα ποσοστό της τάξεως του 25%, δεν αντιμετωπίζουν τα αρνητικά συμπτώματα της νόσου, εμφανίζουν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες, ωστόσο θεωρούνται αναντικατάστατα στις εξάρσεις της νόσου χάρη στην εξαιρετική κατασταλτική τους δράση. Αποκλείουν μη εκλεκτικά τους D2 υποδοχείς σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου. Ο αποκλεισμός της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στο μεσομεταιχμιακό σύστημα βελτιώνει τα θετικά συμπτώματα, όμως στον προμετωπιαίο φλοιό επιδεινώνει τα αρνητικά συμπτώματα, στο μελαινораβδωτό σύστημα προκαλεί εξωπυραμιδικές εκδηλώσεις και στην πρόσθια υπόφυση προκαλεί υπερπρολακτιναιμία. Τα κλασικά νευροληπτικά περιλαμβάνουν τις φαινοθειαζίνες (χλωροπρομαζίνη, θειοριδαζίδη, πιμοζίδη, πενφλουριδόλη, προμαζίνη, λεβομεπρομαζίνη, προμεθαζίνη, περισιαζίνη, θειοπροπεραζίνη, τριφθοριοπεραζίνη, περφαιναζίνη), τις βουτυροφαινόνες (αλοπεριδόλη, βενπεριδόλη, πιπαμπερόνη), τα θειοξανθένια (χλωροπροθιζένη και ζουκλοπενθιζόλη) και τις βενζαμίδες (σουλτοπρίδη, τιαπρίδη, σουλπρίδη, αμισουλπρίδη). Στις παρενέργειές τους περιλαμβάνονται το κακόηθες νευροληπτικό σύνδρομο, ορθοστατική υπόταση, εξωπυραμιδικές εκδηλώσεις, ζάλη, αύξηση βάρους, υπερπρολακτιναιμία, σεξουαλική δυσλειτουργία, φωτοευαισθησία και επιληπτικές κρίσεις.

Τα άτυπα νευροληπτικά περιλαμβάνουν την κλοζαπίνη, τη λοξαπίνη, την ολανζαπίνη, τη ρισπεριδόνη, τη ζιπρασιδόνη, την κουετιαπίνη, την αμισουλπρίδη, την αριπιπραζόλη και τη ζοτεπίνη. Τα φάρμακα αυτά διαφέρουν από τα κλασικά κατά το ότι αποκλείουν τους D2 υποδοχείς εκλεκτικά στο μεταιχμιακό σύστημα, αλλά όχι στο μελαινораβδωτό σύστημα ούτε στον προμετωπιαίο φλοιό. Αυτό έχει ως συνέπεια ηπιότερες εξωπυραμιδικές

εκδηλώσεις αφ' ενός και μια σχετική βελτίωση των αρνητικών συμπτωμάτων αφ'ετέρου. Λευκοπενία, ακοκκιοκυτταραιμία, αύξηση σωματικού βάρους, υπεργλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία, ηπατικές διαταραχές και καταστολή αναφέρονται ως οι σοβαρότερες παρενέργειες.

## 2. ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Καθώς παραμένει άγνωστο αν οι κροκίνες παρεμβαίνουν και σε άλλες παθοφυσιολογικές οδούς του νευρικού συστήματος, στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης των κροκινών σε πειραματικά μοντέλα ψυχιατρικών διαταραχών μέσα από μεθόδους συμπεριφορικής φαρμακολογίας.

A. Δεδομένου ότι υπάρχουν ευρήματα στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν την εμπλοκή του κρόκου και των συστατικών του στη λειτουργία των GABA-εργικών κυκλωμάτων, ο πρώτος στόχος ήταν η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης των κροκινών σε πειραματικό ζωικό πρότυπο άγχους. Η πειραματική διαδικασία που επιλέχθηκε για να μελετήσει τις πιθανές αγχολυτικές ιδιότητες των κροκινών ήταν η δοκιμασία φωτός- σκότους.

B. Η εκτεταμένη υποστήριξη της αντικαταθλιπτικής δράσης του κρόκου από σειρά μελετών και η συσχέτιση της κατάθλιψης με την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή μέσα από νευροχημικά και κλινικά δεδομένα, οδήγησαν στον δεύτερο στόχο που ήταν η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης των κροκινών σε πειραματικό πρότυπο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η δράση των κροκινών επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού (grooming), επαγόμενου από τον αγωνιστή των 5-HT<sub>2</sub> υποδοχέων mCPP.

Γ. Η επίδραση των κροκινών σε διαδικασίες όπως η LTP, που ρυθμίζονται από τους NMDA υποδοχείς, η επίδραση του κρόκου στα επίπεδα γλουταμικού, καθώς και η πρόκληση ελλειμμάτων αναγνωριστικής μνήμης από τον ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα κεταμίνη, ενός τύπου μνήμης που διαταράσσεται στους σχιζοφρενείς, οδήγησε στον τρίτο στόχο της διατριβής, που ήταν η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης των κροκινών σε πειραματικό πρότυπο σχιζοφρένειας, επαγόμενο από υποαναισθητικές δόσεις κεταμίνης. Η κεταμίνη προκαλεί έκπτωση γνωσιακών λειτουργιών, ανάλογη

της έκπτωσης που παρατηρείται σε πάσχοντες από σχιζοφρένεια. Επιπρόσθετα προκαλεί ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπερκινητικότητα, στερεοτυπίες και αταξία, το οποίο θεωρείται πειραματικό πρότυπο θετικών συμπτωμάτων. Επιπλέον επάγει κοινωνική απόσυρση σε πειραματόζωα, που χρησιμοποιείται ως πειραματικό πρότυπο των αρνητικών συμπτωμάτων της νόσου. Η διερεύνηση μιας πιθανής ευεργετικής δράσης των κροκινών επί των προκαλούμενων από την κεταμίνη ελλειμμάτων αναγνωριστικής μνήμης έγινε χρησιμοποιώντας τη διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Οι επαγόμενες από την κεταμίνη υπερκινητικότητα, στερεοτυπίες και αταξία μελετήθηκαν σε ένα ανοικτό πεδίο. Τέλος η ικανότητα των κροκινών να αναστρέφουν την κοινωνική απόσυρση που προκαλούν οι υποαναισθητικές δόσεις της κεταμίνης μελετήθηκε μέσω της δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Πειραματόζωα

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν άρρενες, επίμυες του γένους Wistar. Το βάρος των ζώων κατά την πειραματική διαδικασία ήταν 250-300 γραμμάρια και η ηλικία τους 2-3 μήνες. Οι συνθήκες διαβίωσης ήταν σταθερές για όλα τα ζώα: ο φωτισμός ήταν κυκλικός, δηλαδή 12 ώρες φως (7.00 π.μ.-7.00 μ.μ) και 12 ώρες σκοτάδι (7.00 μ.μ.-7.00 π.μ.), σχετική υγρασία 50-55%, θερμοκρασία περιβάλλοντος  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  και ο χώρος καλά αεριζόμενος. Τα ζώα ήταν τοποθετημένα σε ίδια κλουβιά (45 cm x 20 cm x 35 cm) ανά τρία, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Οι πειραματικές δοκιμασίες λάμβαναν χώρα μεταξύ 10.00 π.μ. και 2.00 μ.μ. Η καταγραφή και αξιολόγηση της συμπεριφοράς τους γινόταν από παρατηρητές που δεν γνώριζαν την εφαρμοσθείσα φαρμακευτική αγωγή. Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε σε συμφωνία με εθνικές και διεθνείς οδηγίες όπως ορίζονται από τα νομικά πλαίσια του κράτους και της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (EEC Council Directive 86/609, JL 358, 1, December 12, 1987; NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no.85-23, 1985).

#### 3.2. Φυτικό υλικό

Οι κροκίνες απομονώθηκαν από τα αποξηραμένα στίγματα του κρόκου μετά από διαδοχική εκχύλιση με: α) πετρελαϊκό αιθέρα  $40-60^\circ\text{C}$ , β) διαιθυλαιθέρα ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) και γ) μεθανόλη ( $\text{MeOH}$ ) 80%. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε λουτρό υπερήχων τύπου Sonorex, Super RK 255H (300 mm x 150 mm x 150 mm εσωτερικών διαστάσεων), σε σταθερή συχνότητα 35 kHz. Η θερμοκρασία του ύδατος ήταν  $25^\circ\text{C}$ . Οι δύο πρώτες διαδικασίες είχαν στόχο την απομόνωση από τα στίγματα της μικροκροκίνης και της σαφρανάλης αντίστοιχα. Το εκχύλισμα της μεθανόλης μετά από εξάτμιση σε

συνθήκες κενού και σε θερμοκρασία δωματίου, παρείχε τις κροκίνες ως σκούρο κόκκινο υπόλειμμα σε μορφή σκόνης.

### 3.3. Φάρμακα

Οι κροκίνες, η υδροχλωρική κεταμίνη και το mCPP (1-[3-chlorophenyl]piperazine hydrochloride) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) αραιώθηκαν σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%). Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν την ημέρα που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν και χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα ενδοπεριτοναϊκά σε αναλογία 1 mL/kg. Στους επίμυες μάρτυρες χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά φυσιολογικός ορός.

### 3.4. Συμπεριφορικές τεχνικές

#### 3.4.1. Μοντέλο αγχώδους διαταραχής

Για την αναπαραγωγή συμπτωμάτων άγχους επιλέχθηκε η δοκιμασία φωτός-σκότους (Forestiero et al, 2006). Το πειραματικό αυτό πρότυπο αξιολογεί την αγχολυτική δράση ουσιών σε επίμυες, εκμεταλλευόμενο τη φυσική αποστροφή των επίμυων προς το φως. Το μοντέλο αυτό βασίζεται στη διαπίστωση ότι ένα αγχογόνο ερέθισμα (έκθεση στο φως) για τα πειραματόζωα μπορεί να αναστείλει μια συγκεκριμένη συμπεριφορά των πειραματόζωων (εξερεύνηση χώρων) και ότι αυτή η αναστολή μπορεί να είναι αποτέλεσμα του φόβου που αισθάνονται. Η συσκευή αποτελείται από ένα αδιαφανή ξύλινο χώρο, χωρισμένο σε 2 διαμερίσματα ίσων διαστάσεων (48 cm x 27 cm x 24 cm) που επικοινωνούν μεταξύ τους με μια μικρή θύρα (10 cm x 10 cm). Το ένα διαμέρισμα έχει μαύρο χρώμα και φέρει κάλυμμα οροφής, ενώ το άλλο έχει λευκό χρώμα, δεν έχει σκεπή και φωτίζεται από μια λάμπα 60 W. Το πειραματόζωο τοποθετείται στο κέντρο του φωτεινού διαμερίσματος, αφήνεται ελεύθερο για 5 λεπτά και η δραστηριότητά του βιντεοσκοπείται. Αυτή η

έκθεση στο φως προκαλεί στρες στο φυσιολογικό πειραματόζωο και το αναγκάζει να ζητήσει καταφύγιο στο σκοτεινό διαμέρισμα της συσκευής όπου και περνάει τον περισσότερο από τον διαθέσιμο χρόνο του. Μια ουσία με αγχολυτικές ιδιότητες αντιστρέφει αυτή τη συμπεριφορά και το πειραματόζωο έχει την τάση να μοιράζει το χρόνο του μεταξύ των δύο διαμερισμάτων (φωτεινό και σκοτεινό) της πειραματικής συσκευής. Η μέτρηση της απόδοσης των πειραματόζωων υπολογίζεται με το λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα, τον συνολικό χρόνο που το πειραματόζωο δαπάνησε στο φωτεινό διαμέρισμα και με τον ολικό αριθμό διελεύσεων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο.



Εικόνα 9. Πειραματική διάταξη δοκιμασίας φωτός/σκότους

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χωρίσαμε τυχαία τα πειραματόζωα σε πέντε πειραματικές ομάδες (N=10 επίμυες). Η πρώτη ήταν ομάδα ελέγχου και έλαβε φυσιολογικό ορό, η δεύτερη έλαβε κροκίνες 15 mg/kg, η τρίτη κροκίνες 30 mg/kg, η τέταρτη κροκίνες 50 mg/kg και η πέμπτη το αγχολυτικό φάρμακο διαζεπάμη σε δόση 1.5 mg/kg, ως φάρμακο αναφοράς. Η επιλογή της συγκεκριμένης δόσης της διαζεπάμης έγινε διότι σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε αποτελεσματική στην ίδια συμπεριφορική δοκιμασία, χωρίς να επάγει



ανεπιθύμητες ενέργειες (Zanolì et al, 2002). Η χορήγηση του φυσιολογικού ορού και των κροκινών έγινε 60 λεπτά πριν τη δοκιμασία, ενώ η χορήγηση της διαζεπάμης 20 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Προκειμένου να αποκλείσουμε την πιθανότητα η συμπεριφορά των ζώων να οφείλεται σε επίδραση των κροκινών επί της κινητικότητάς τους και όχι σε αγχολυτική δράση αυτών, ελέγξαμε σε μια άλλη μελέτη την κινητικότητα των επίμυων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας που έλαβε κροκίνες σε δόση 50 mg/kg σε ειδικό κλωβό κινητικότητας, που καταγράφει ηλεκτρονικά τα βήματα του πειραματόζωου σε ορισμένο χρονικό διάστημα.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) ενός παράγοντα. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Tukey's test για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων.

#### *3.4.2. Μοντέλο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής*

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από έναν κλωβό κινητικότητας (Ugo Basile, Varese, Italy). Ο κλωβός (50 cm x 50 cm x 33 cm) φέρει πλαστικά, διαφανή τοιχώματα και οροφή και συνδέεται με συσκευή ψηφιακής καταγραφής της κινητικότητας του πειραματόζωου. Κάθε πειραματόζωο τοποθετείται στο κέντρο του κλωβού και αφήνεται ελεύθερο για 10 λεπτά, ώστε να εξοικειωθεί με το χώρο. Ακολούθως λαμβάνει την φαρμακολογική αγωγή που του αντιστοιχεί και επανατοποθετείται στον κλωβό, όπου αφήνεται για 20 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων βιντεοσκοπείται η συμπεριφορά του και καταγράφεται η κινητικότητά του. Ο παρατηρητής αποχωρεί από το δωμάτιο, ώστε η παρουσία του να μην επηρεάζει τη συμπεριφορά του πειραματόζωου. Ακολούθως γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων κατά την οποία καταμετράται σε δευτερόλεπτα ο συνολικός χρόνος που το

πειραματόζωο αφιέρωσε σε διαδικασίες αυτοκαθαρισμού, καθώς και ο αριθμός των επεισοδίων αυτοκαθαρισμού που παρουσίασε κάθε επίμυς. Ο αυτοκαθαρισμός (self-grooming) θεωρείται ανάλογο ιδεοψυχαναγκαστικής συμπτωματολογίας στους επίμυες και περιλαμβάνει γλείψιμο, ξύσιμο ή γρατσούνισμα της κεφαλής, του κορμού και των γεννητικών οργάνων.

Για την πρόκληση ιδεοψυχαναγκαστικών συμπτωμάτων, χρησιμοποιήθηκε ένας μη εκλεκτικός σεροτονινεργικός αγωνιστής, με μεγαλύτερη συγγένεια για τον 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέα, το mCPP (m-chlorophenylpiperazine). Η ουσία αυτή έχει βρεθεί ότι επάγει συμπεριφορές αυτοκαθαρισμού σε επίμυες και επιδεινώνει τη συμπτωματολογία ασθενών με ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. (Graf et al, 2003; Zohar et al, 1987; Gommans et al, 1998)

Για την μελέτη της δράσης των κροκινών επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, επαγόμενου από τη χορήγηση mCPP, χωρίσαμε τυχαία τα πειραματόζωα σε έξι πειραματικές ομάδες, η αγωγή των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 1. Η δόση του mCPP, που επιλέχθηκε για την πρόκληση του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού ήταν αυτή των 0.6 mg/kg, διότι σε προκαταρκτικές μας δοκιμές βρέθηκε πιο αποτελεσματική.

Όλα τα δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Tukey t-test για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΟΜΑΔΑ	ΕΝΕΣΗ 1	ΕΝΕΣΗ 2
1	Φυσιολ. ορός	Φυσιολ. ορός
2	Κροκίνες 30mg/kg	Φυσιολ. ορός
3	Κροκίνες 50 mg/kg	Φυσιολ. ορός
4	Φυσιολ. ορός	mCPP 0.6 mg/kg
5	Κροκίνες 30 mg/kg	mCPP 0.6 mg/kg
6	Κροκίνες 50 mg/kg	mCPP 0.6 mg/kg

Πίνακας 1



Εικόνα 10. Κλωβός κινητικότητας

### 3.4.3. Μοντέλο σχιζοφρένειας

Όπως έγινε κατανοητό από την εισαγωγή, η σχιζοφρένεια είναι μια νόσος με ευρύ φάσμα συμπτωμάτων. Ως εκ τούτου οποιαδήποτε απόπειρα πειραματικού προτύπου της νόσου οφείλει να αναπαράγει τις τρεις κύριες κατηγορίες συμπτωμάτων ήτοι: τα νοητικά ελλείμματα, τα αρνητικά συμπτώματα και τα θετικά συμπτώματα. Συνεπώς για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των κροκινών χρησιμοποιήσαμε τρεις χωριστές πειραματικές δοκιμασίες: για τα νοητικά ελλείμματα τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, για τα αρνητικά συμπτώματα τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης και για τα θετικά συμπτώματα μια δοκιμασία ανοικτού πεδίου.

Κοινό στοιχείο και στα τρία πειραματικά μοντέλα ήταν η πρόκληση παθολογικών συμπτωμάτων με τη χρήση της κεταμίνης, ενός μη συναγωνιστικού ανταγωνιστή του NMDA υποδοχέα, με ταχεία έναρξη δράσης και μικρό χρόνο ημίσειας ζωής. Είναι γνωστό ότι η κεταμίνη σε υποαναισθητικές δόσεις στα πειραματόζωα ένα σύνδρομο που περιλαμβάνει υπερκινητικότητα, αταξία, στερεοτυπίες, κοινωνική απόσυρση και γνωσιακά ελλείμματα. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικά πρότυπα σχιζοφρένειας (De Oliveira Viana Arruda et al, 2008; Becker & Grecksch, 2004; Pitsikas et al, 2008).

#### 3.4.3.1. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου

Για να διερευνήσουμε την αποτελεσματικότητα των κροκινών σε νοητικά ελλείμματα οφειλόμενα σε αποκλεισμό του NMDA υποδοχέα, επιλέξαμε τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, μια συμπεριφορική τεχνική που αξιολογεί την αναγνωριστική μνήμη στους επίμυες (Ennaceur and Delacours, 1988). Αυτή η πειραματική δοκιμασία βασίζεται στην φυσική τάση των επίμυων να εξερευνούν νέα αντικείμενα. Η πειραματική διάταξη αποτελείται

από ένα πλαστικό χώρο διαστάσεων 80 cm x 60 cm x 50 cm. Τα αντικείμενα (σε 3 αντίγραφα το καθένα), που πρέπει να αναγνωρισθούν είναι κατασκευασμένα από διαφορετικά υλικά (γυαλί, πλαστικό ή μέταλλο) και έχουν διαφορετικά σχήματα: κύβοι, πυραμίδες, κύλινδροι. Τα αντικείμενα αυτά δεν μπορούν να μετατοπιστούν από τα πειραματόζωα. Η δοκιμασία εκτελείται σε δύο περιόδους. Την πρώτη ημέρα οι επίμυες τοποθετούνται στην πειραματική συσκευή για να εξοικειωθούν στο χώρο. Σε αυτή τη φάση δεν υπάρχουν αντικείμενα μέσα στην πειραματική συσκευή. Η δοκιμασία μνήμης πραγματοποιείται τη δεύτερη ημέρα. Τα ζώα εκτελούν δύο δοκιμές διάρκειας 2 λεπτών έκαστη. Κατά τη διάρκεια της πρώτης δοκιμής, που ονομάζεται δοκιμή εκπαίδευσης T1 (sample trial) δύο ίδια αντικείμενα τοποθετούνται σε δύο αντίθετες γωνίες του πειραματικού χώρου. Ο επίμυς τοποθετείται στο κέντρο της συσκευής και του επιτρέπεται να εξερευνήσει τα δύο αντικείμενα για όλη τη χρονική διάρκεια της δοκιμής. Μετά την ολοκλήρωση της T1 το πειραματόζωο επιστρέφει στο κλουβί του και δίδεται ένα μεσοδιάστημα (intertrial interval) διάρκειας 60 λεπτών. Ακολούθως πραγματοποιείται η δεύτερη δοκιμή ή δοκιμή επιλογής T2 (choice trial). Αυτή τη φορά ένα νέο αντικείμενο (N) έχει αντικαταστήσει ένα από τα δύο ίδια αντικείμενα της πρώτης δοκιμής. Συνεπώς, οι επίμυες καλούνται να εξερευνήσουν δύο διαφορετικά αντικείμενα σ' αυτή τη δοκιμή: το ήδη γνωστό αντικείμενο (F) και το νέο (N). Αν ο επίμυς κατά τη T2 εξερευνήσει για περισσότερο χρόνο το νέο από το ήδη γνωστό αντικείμενο αυτό αποτελεί ένδειξη καλής μνήμης. Όλοι οι συνδυασμοί των αντικειμένων και της θέσης τους επιλέγονται με τυχαίο και ισορροπημένο τρόπο προς αποφυγή πιθανής προτίμησης σχήματος, υφής ή τοποθεσίας. Για να αποφευχθεί η παρουσία οσφρητικών υπολειμμάτων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις επιλογές των πειραματοζώων, η διάταξη και τα αντικείμενα καθαρίζονται προσεκτικά μετά από κάθε δοκιμή. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ο παρατηρητής καταγράφει χειροκίνητα με χρονόμετρο τους χρόνους εξερεύνησης (σε sec) έκαστου αντικείμενου τόσο κατά την T1 όσο και κατά την T2. Απ' αυτή την καταγραφή εξάγεται μια σειρά μεταβλητών: α) ο ολικός χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την T1,

β) ο ολικός χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την T2, γ) ο δείκτης διάκρισης D, ο οποίος υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$D (\text{Δείκτης διάκρισης}) = N-F/N+F$$

όπου N ο ολικός χρόνος εξερεύνησης του νέου αντικειμένου κατά την T2 και F ο ολικός χρόνος εξερεύνησης του γνωστού αντικειμένου κατά την T2. Όσο υψηλότερος είναι αυτός ο δείκτης, τόσο υψηλότερη είναι και η μνημονική επίδοση των επιμύων σε αυτή τη δοκιμασία (Cavoy & Delacours, 1993). Ως εξερευνητική δραστηριότητα ορίζεται η κατεύθυνση της μύτης του επίμυος προς το αντικείμενο σε απόσταση όχι μεγαλύτερη από 2cm. Περιστροφή γύρω από το αντικείμενο ή στάση επάνω στο αντικείμενο δεν θεωρείται εξερευνητική δραστηριότητα. Επιπλέον καταγράφηκε και ο αριθμός των βημάτων του κάθε επίμυος κατά τη διάρκεια της T2, ως δείκτης της κινητικής του δραστηριότητας. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τη διερεύνηση των διαφόρων διαδικασιών της μνήμης. Αν μια ουσία χορηγηθεί πριν την T1 θα επιδράσει στην εγγραφή της πληροφορίας. Αν χορηγηθεί αμέσως μετά την T1 θα επιδράσει κυρίως στην αποθήκευση, αλλά και στην ανάκληση της πληροφορίας. Τέλος, αν μια ουσία χορηγηθεί ακριβώς πριν την T2 επηρεάζει αποκλειστικά την ανάκληση της πληροφορίας.

Για την πραγματοποίηση του πειράματος τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες (N=10 επίμυες), η αγωγή των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 2. Όλες οι ενέσεις έγιναν αμέσως μετά την T1, έτσι ώστε 60 λεπτά μετά, κατά την T2 να έχουν ήδη παρέλθει πιθανές παρενέργειες από τη χορήγηση της κεταμίνης (υπερκινητικότητα, στερεοτυπίες, αταξία). Η δόση της κεταμίνης που επιλέχθηκε για την πρόκληση μνημονικών ελλειμμάτων ήταν αυτή των 3 mg/kg διότι βρέθηκε αποτελεσματική σε προγενέστερη μελέτη (Boultadakis & Pitsikas, 2010).

ΟΜΑΔΑ	ΕΝΕΣΗ 1	ΕΝΕΣΗ 2
1	Φυσιολ. ορός	Φυσιολ. ορός
2	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 15 mg/kg
3	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 30 mg/kg
4	Κεταμίνη 3 mg/kg	Φυσιολ. ορός
5	Κεταμίνη 3 mg/kg	Κροκίνες 15 mg/kg
6	Κεταμίνη 3 mg/kg	Κροκίνες 30 mg/kg

Πίνακας 2



Εικόνα 11. Πειραματική διάταξη δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένων

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων. Οι παράγοντες ήταν οι κροκίνες και η κεταμίνη. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Student's t-tests για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων.

#### 3.4.3.2. Δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από έναν κλωβό κινητικότητας (Ugo Basile, Varese, Italy). Ο κλωβός (50 cm x 50 cm x 33 cm) φέρει πλαστικά, διαφανή τοιχώματα και οροφή και συνδέεται με συσκευή ψηφιακής καταγραφής της κινητικότητας του πειραματόζωου. Ως ζωικό πειραματικό πρότυπο αρνητικών συμπτωμάτων χρησιμοποιούμε τη συμπεριφορική δοκιμασία της κοινωνικής αλληλεπίδρασης. Σύμφωνα με αυτή δύο πειραματόζωα που έχουν λάβει ίδια αγωγή, έχουν παρόμοιο βάρος και είναι άγνωστα μεταξύ τους, τοποθετούνται ταυτόχρονα στον κλωβό κινητικότητας και αφήνονται ελεύθερα για 10 λεπτά, κατά τη διάρκεια των οποίων βιντεοσκοπείται η δραστηριότητά τους και καταγράφεται η κινητικότητά τους. Ο παρατηρητής αποχωρεί από το δωμάτιο, ώστε η παρουσία του να μην επηρεάζει τη συμπεριφορά του πειραματόζωου. Έπειτα γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων κατά την οποία ελέγχουμε δύο παραμέτρους: το χρόνο που το ζεύγος των επίμυων αφιέρωσε σε κοινωνική αλληλεπίδραση και την κινητικότητα ως δείκτη γενικής δραστηριότητας. Ως κοινωνική αλληλεπίδραση ορίζεται η συμπεριφορά εκείνη κατά την οποία οποιοδήποτε μέλος του ζεύγους ακολουθεί, καθαρίζει, οσμίζεται, δαγκώνει, σκαρφαλώνει ή μάχεται το άλλο (Koros et al, 2007; O'Shea et al, 2006; Sams-Dodd, 1996; Silvestre, 1997;).

Για να μελετήσουμε τη δράση των κροκινών επί της κοινωνικής απόσυρσης που προκαλεί η χορήγηση κεταμίνης, τα πειραματόζωα



χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες (N=10 ζεύγη επίμυων), η αγωγή των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 3. Τις δύο ημέρες πριν τη δοκιμασία, οι επίμυες των ομάδων 1-3 έλαβαν από μία ενδοπεριτοναϊκή ένεση φυσιολογικού ορού, ενώ εκείνοι των ομάδων 4-6 από μια ενδοπεριτοναϊκή ένεση κεταμίνης 8 mg/kg. Αμέσως μετά την ένεση κάθε πειραματόζωο αφήθηκε στον κλωβό για 10 λεπτά ώστε να εξοικειωθεί με το χώρο. Την τρίτη ημέρα τα πειραματόζωα έλαβαν την αγωγή όπως ορίζεται στον Πίνακα 3 και 30 λεπτά μετά την ένεση υπόκειντο στη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης για 10 λεπτά.

Η δόση της κεταμίνης που επιλέχθηκε για τον σκοπό αυτό ήταν αυτή των 8 mg/kg, διότι σε προκαταρκτικές δοκιμασίες αναδείχθηκε ως η πιο αποτελεσματική. Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί πως για την χορήγηση της κεταμίνης επιλέχθηκε ένα επαναλαμβανόμενο δοσολογικό σχήμα 3 ημερών, διότι μελέτες έχουν αποδείξει ότι με αυτό τον τρόπο αναπτύσσεται ανοχή στην αταξική δράση της κεταμίνης, όχι όμως και στην πρόκληση κοινωνικής απόσυρσης (Koros et al, 2007). Αυτός ο τρόπος χορήγησης δηλαδή καταστέλλει τα κινητικά συμπτώματα και επιτρέπει την εκλεκτική ανάδειξη μόνο των αρνητικών συμπτωμάτων.

Η διάρκεια της κοινωνικής αλληλεπίδρασης και η κινητική δραστηριότητα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων. Οι παράγοντες ήταν οι κροκίνες και η κεταμίνη. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Student's t-tests για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων.

ΟΜΑΔΑ	ΕΝΕΣΗ 1	ΕΝΕΣΗ 2
1	Φυσιολ. ορός	Φυσιολ. Ορός
2	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 30 mg/kg
3	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 50 mg/kg
4	Κεταμίνη 8 mg/kg	Φυσιολ. Ορός
5	Κεταμίνη 8 mg/kg	Κροκίνες 30 mg/kg
6	Κεταμίνη 8 mg/kg	Κροκίνες 50 mg/kg

Πίνακας 3

#### 3.4.3.3. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου

Η πειραματική διάταξη αποτελείται από έναν κλωβό κινητικότητας (Ugo Basile, Varese, Italy). Ο κλωβός (50 cm x 50 cm x 33 cm) φέρει πλαστικά, διαφανή τοιχώματα και οροφή και συνδέεται με συσκευή ψηφιακής καταγραφής της κινητικότητας του πειραματόζωου. Αρχικά το κάθε πειραματόζωο τοποθετείται στη συσκευή και αφήνεται για 10 λεπτά ώστε να εξοικειωθεί με το χώρο. Ακολούθως απομακρύνεται από τον κλωβό, δέχεται την φαρμακολογική αγωγή που του αντιστοιχεί και επανατοποθετείται στην πειραματική διάταξη για 10 λεπτά, στη διάρκεια των οποίων βιντεοσκοπείται η δραστηριότητά του και καταγράφεται η κινητικότητά του. Ο παρατηρητής αποχωρεί από το δωμάτιο, ώστε η παρουσία του να μην επηρεάζει τη συμπεριφορά του πειραματόζωου. Έπειτα γίνεται η επεξεργασία των δεδομένων κατά την οποία ελέγχουμε τις εξής παραμέτρους: την κινητικότητα, τις στερεοτυπικές κινήσεις της κεφαλής, τις στερεοτυπικές αιωρήσεις του σώματος, τις στερεοτυπικές κυκλικές κινήσεις μέσα στον κλωβό και την αταξία. Για την ποσοτική εκτίμηση των δεικτών αυτών το χρονικό διάστημα του πειράματος χωρίζεται σε 10 διαστήματα του ενός λεπτού το καθένα. Αν το ζώο σε κάθε διάστημα εμφανίσει έναν από τους δείκτες παίρνει έναν πόντο για

τον συγκεκριμένο δείκτη. Ως εκ τούτου η μέγιστη τιμή για κάθε παράμετρο είναι 10.

Για να μελετήσουμε τη δράση των κροκινών επί των ψυχωσεομιμητικών συμπτωμάτων που επάγει η κεταμίνη, τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε έξι πειραματικές ομάδες (N=10 επίμυες), η αγωγή των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 4. Η δόση της κεταμίνης που επιλέχθηκε ήταν αυτή των 25 mg/kg, διότι έχει βρεθεί ότι επάγει έντονα κινητικά συμπτώματα (υπερκινητικότητα, στερεοτυπίες, αταξία) (Razoux et al, 2007).

Τα αποτελέσματα όσον αφορά στην κινητική δραστηριότητα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας αναλύσεις διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων. Οι παράγοντες ήταν οι κροκίνες και η κεταμίνη. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Student's t-tests για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων.

Όσον αφορά στις στερεοτυπικές κινήσεις και στην αταξία οι συχνότητες εκδήλωσης για κάθε μία από τις παραμέτρους αθροίστηκαν και κάθε συμπεριφορική παράμετρος αναλύθηκε κατά διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το Kruskal-Wallis μη παραμετρικό τεστ. Όπου επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα, ακολούθησαν εκ των υστέρων αναλύσεις με χρήση Newman-Keuls test, για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των τιμών των διαφόρων πειραματικών ομάδων.

ΟΜΑΔΑ	ΕΝΕΣΗ 1	ΕΝΕΣΗ 2
1	Φυσιολ. ορός	Φυσιολ. Ορός
2	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 30 mg/kg
3	Φυσιολ. Ορός	Κροκίνες 50 mg/kg
4	Κεταμίνη 25 mg/kg	Φυσιολ. Ορός
5	Κεταμίνη 25 mg/kg	Κροκίνες 30 mg/kg
6	Κεταμίνη 25 mg/kg	Κροκίνες 50 mg/kg

Πίνακας 4

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Επίδραση κροκινών σε πειραματικό μοντέλο αγχώδους διαταραχής

*4.1.1. Επίδραση των κροκινών στον λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους.*

Η χορήγηση κροκινών και η χορήγηση διαζεπάμης επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα [ $F(4, 45)=8, p<0.01$ ]. Εκ των υστέρων συγκρίσεις έδειξαν ότι οι επίμυες που έλαβαν κροκίνες 50 mg/kg και οι επίμυες που έλαβαν διαζεπάμη 1.5 mg/kg διέθεσαν περισσότερο χρόνο στο φωτεινό διαμέρισμα, προτού εισέλθουν για πρώτη φορά στο σκοτεινό τμήμα της διάταξης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p<0.05$ , Σχήμα 1).

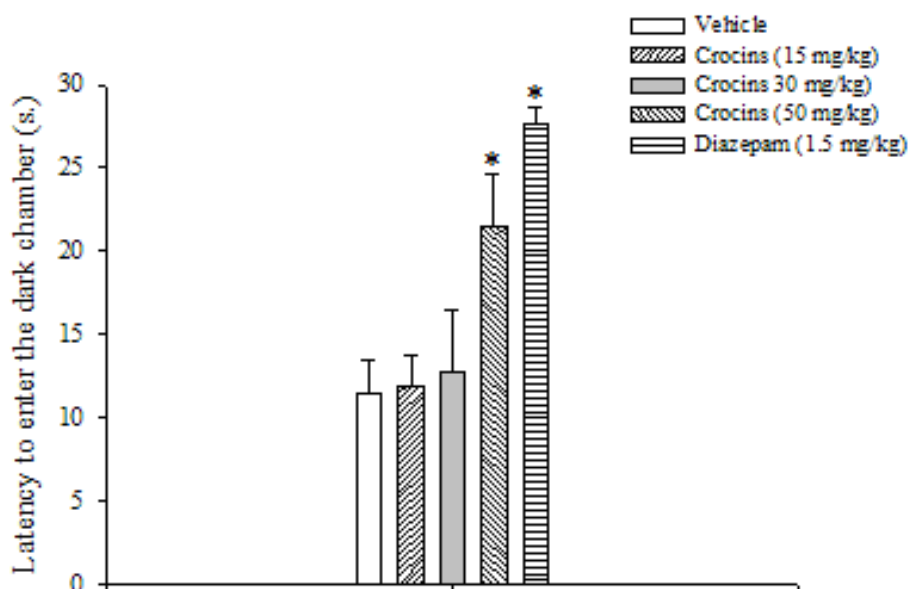
*4.1.2. Επίδραση των κροκινών στον αριθμό διελεύσεων από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους.*

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση των κροκινών ή της διαζεπάμης στον αριθμό των διελεύσεων μεταξύ των δύο διαμερισμάτων. [ $F(4, 45)=2.3, p=0.072$ ] (Σχήμα 2).

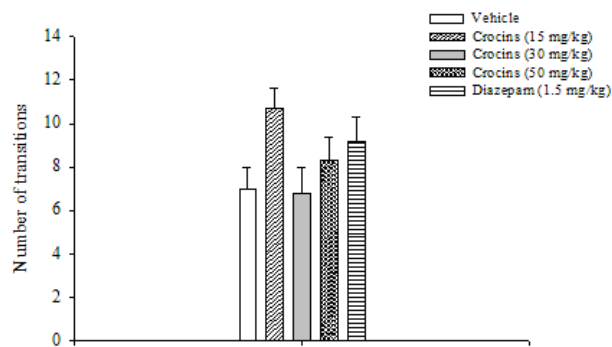
*4.1.3. Επίδραση των κροκινών στον χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα στη δοκιμασία φωτός/σκότους*

Η ανάλυση αυτής της παραμέτρου κατέδειξε μια σημαντική επίδραση των κροκινών και της διαζεπάμης στον χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα. [ $F(4, 45)=4.5, p<0.01$ ]. Εκ των υστέρων αναλύσεις έδειξαν ότι οι επίμυες που έλαβαν κροκίνες 50 mg/kg και οι επίμυες που έλαβαν διαζεπάμη 1.5 mg/kg

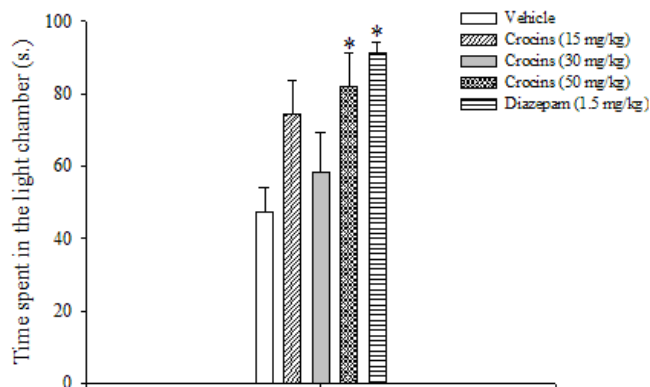
παρέμειναν περισσότερο χρόνο στο φωτεινό διαμέρισμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ( $p < 0.05$ , Σχήμα 3).



Σχήμα 1. Λανθάνων χρόνος εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους. Οι κροκίνες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Η διαζεπάμη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 20 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι της ομάδας ελέγχου.



Σχήμα 2. Αριθμός διελεύσεων μεταξύ των διαμερισμάτων κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους. Οι κροκίνες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Η διαζεπάμη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 20 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα.



Σχήμα 3. Χρόνος παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα κατά τη δοκιμασία φωτός/σκότους. Οι κροκίνες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Η διαζεπάμη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 20 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

\* $p < 0.05$  έναντι της ομάδας ελέγχου.

4.1.4. Επίδραση των κροκινών στην κινητική δραστηριότητα των επίμυων σε δοκιμασία κινητικότητας

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων όσον αφορά στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα των επίμυων.

ΟΜΑΔΑ	N	Κινητικότητα
Φυσιολ.ορός	10	175.4 ± 17
Κροκίνες 50 mg/kg	10	194.8 ± 33.4

Πίνακας 5



## 4.2. Επίδραση κροκινών σε πειραματικό μοντέλο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής

### 4.2.1. Επίδραση των κροκινών και του mCPP επί της διάρκειας αυτοκαθαρισμού

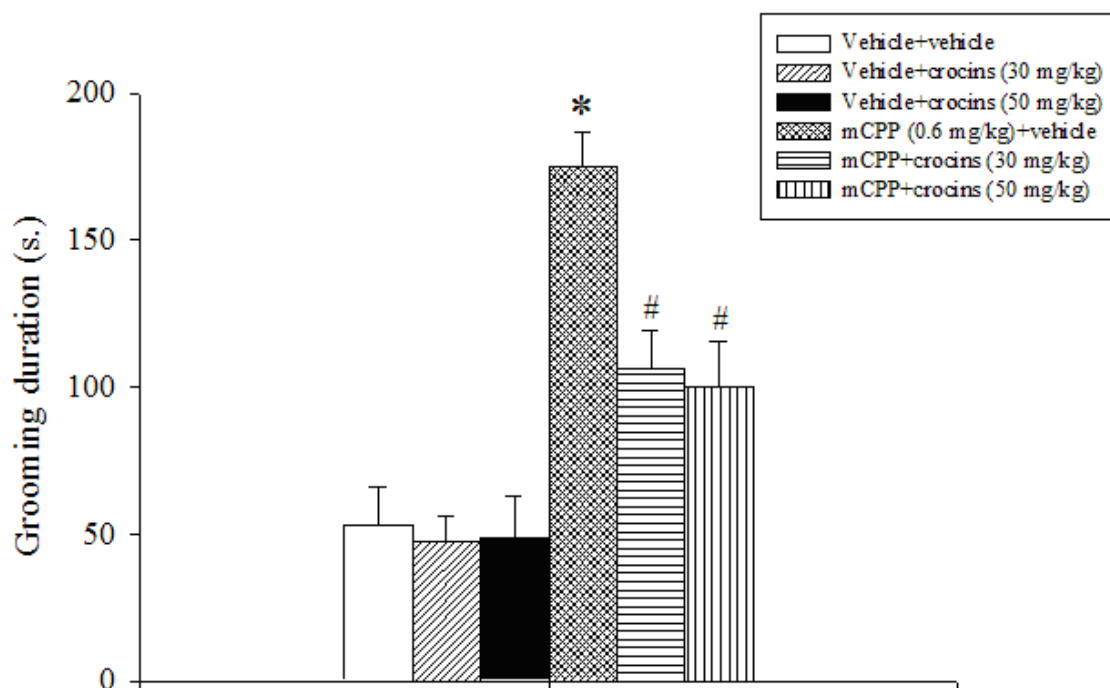
Η στατιστική επεξεργασία της παραμέτρου αυτής έδειξε μια σημαντική κύρια επίδραση του mCPP [ $F(1, 47)=55.3, p<0.01$ ], των κροκινών [ $F(2, 47)=6, p<0.01$ ], καθώς και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ mCPP και κροκινών [ $F(2, 47)=4.6, p<0.01$ ]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε αυξημένη διάρκεια αυτοκαθαρισμού στην ομάδα που έλαβε mCPP, σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων και των ομάδων που έλαβαν mCPP και κροκίνες 30 mg/kg και mCPP και κροκίνες 50 mg/kg ( $p<0.05$ ). Οι ομάδες που έλαβαν mCPP και κροκίνες, παρουσίασαν μεγαλύτερη διάρκεια αυτοκαθαρισμού σε σχέση με τις ομάδες που έλαβαν κροκίνες και φυσιολογικό ορό ( $p<0.05$ , Σχήμα 4).

### 4.2.2. Επίδραση των κροκινών και το mCPP επί του αριθμού επεισοδίων αυτοκαθαρισμού.

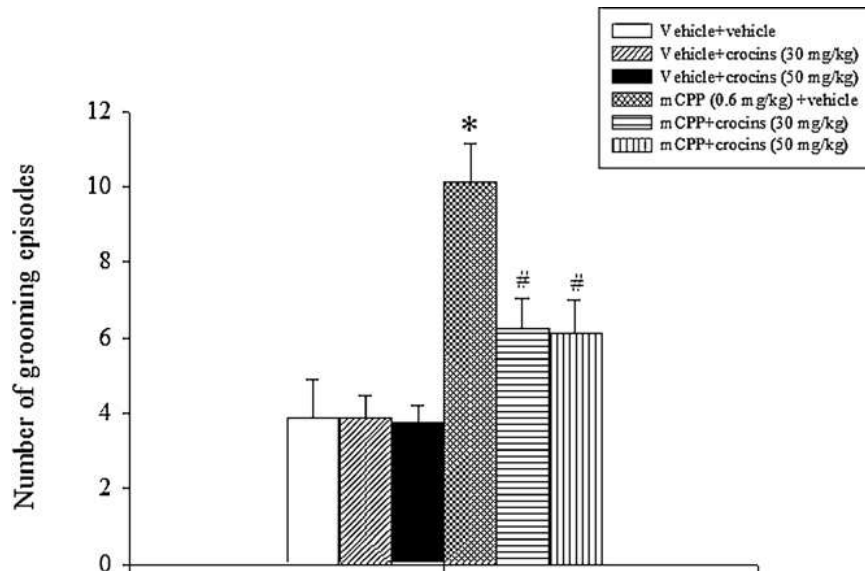
Η στατιστική ανάλυση του αριθμού των επεισοδίων αυτοκαθαρισμού ανέδειξε μια σημαντική κύρια επίδραση του mCPP [ $F(1, 47)=28.4, p<0.01$ ], των κροκινών [ $F(2, 47)=3.77, p<0.05$ ], καθώς και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ τους [ $F(2, 47)=3.6, p<0.05$ ]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η ομάδα που έλαβε mCPP και φυσιολογικό ορό εμφάνισε υψηλότερο αριθμό επεισοδίων αυτοκαθαρισμού σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες ( $p<0.05$ ). Οι ομάδες που έλαβαν mCPP και κροκίνες, παρουσίασαν περισσότερα επεισόδια αυτοκαθαρισμού σε σχέση με τις ομάδες που έλαβαν κροκίνες και φυσιολογικό ορό ( $p<0.05$ , Σχήμα 5).

#### 4.2.3. Επίδραση των κροκινών και του mCPP επί της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων

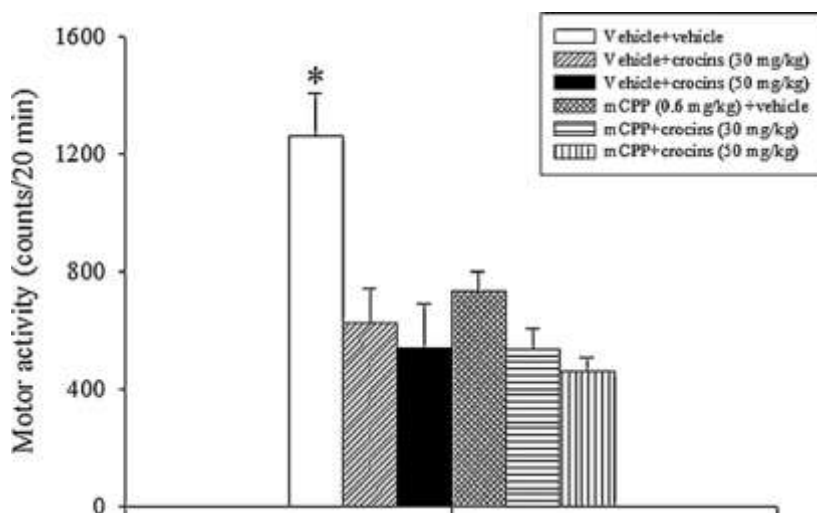
Η κινητικότητα αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σημαντική κύρια επίδραση του mCPP [ $F(1, 47)=7.1, p<0.05$ ] και των κροκινών [ $F(2, 47)=2.8, p=0.07$ ], αλλά δεν βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο παραγόντων. Εκ των υστέρων αναλύσεις έδειξαν ότι η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα κινητικότητας σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες ( $p<0.05$ , Σχήμα 6).



Σχήμα 4. Διάρκεια αυτοκαθαρισμού. Οι κροκίνες και το mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ακριβώς πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p<0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων. # $p<0.05$  έναντι των ομάδων ελέγχου.



Σχήμα 5. Επεισόδια αυτοκαθαρισμού. Οι κροκίνες και το mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ακριβώς πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων. # $p < 0.05$  έναντι των ομάδων ελέγχου.



Σχήμα 6. Κινητική δραστηριότητα. Οι κροκίνες και το mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ακριβώς πριν από την έναρξη της δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων.

### **4.3. Επίδραση των κροκινών σε πειραματικό μοντέλο σχιζοφρένειας**

#### *4.3.1. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου*

##### 4.3.1.1. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί του δείκτη διάκρισης D κατά τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου

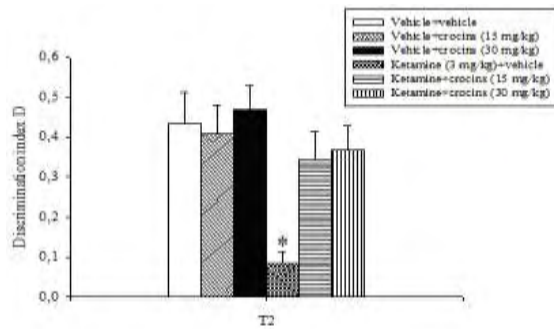
Η στατιστική ανάλυση του δείκτη διάκρισης D αποκάλυψε μια σημαντική κύρια επίδραση της κεταμίνης [ $F(1, 59)=10.8, p<0.01$ ], των κροκινών [ $F(2, 59)=3.5, p<0.05$ ], καθώς και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κεταμίνης και κροκινών [ $F(2, 59)=3.09, p=0.05$ ]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε πως η ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό και κεταμίνη εμφάνισε χαμηλότερη τιμή του δείκτη διάκρισης D σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες, συμπεριλαμβανομένων και των ομάδων που έλαβαν κεταμίνη + κροκίνες 15 mg/kg και κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg ( $p<0.05$ , Σχήμα 7).

##### 4.3.1.2. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί του συνολικού χρόνου εξερεύνησης κατά την T2 της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου.

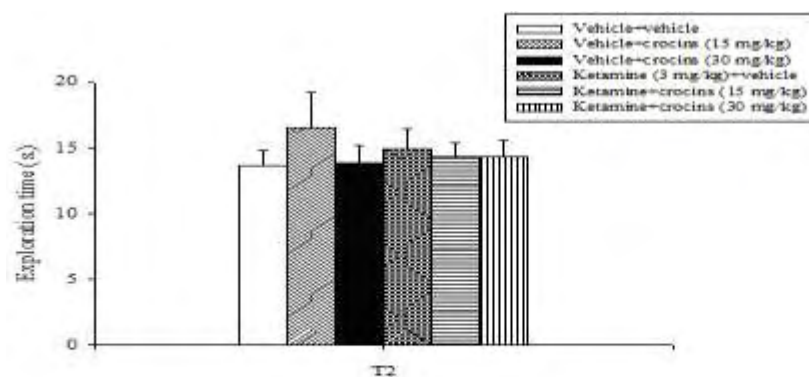
Η στατιστική ανάλυση της παραμέτρου αυτής δεν αποκάλυψε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση των κροκινών, της κεταμίνης ή του συνδυασμού τους στον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την T2 (Σχήμα 8).

##### 4.3.1.3. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κινητικής δραστηριότητας κατά την T2 της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου.

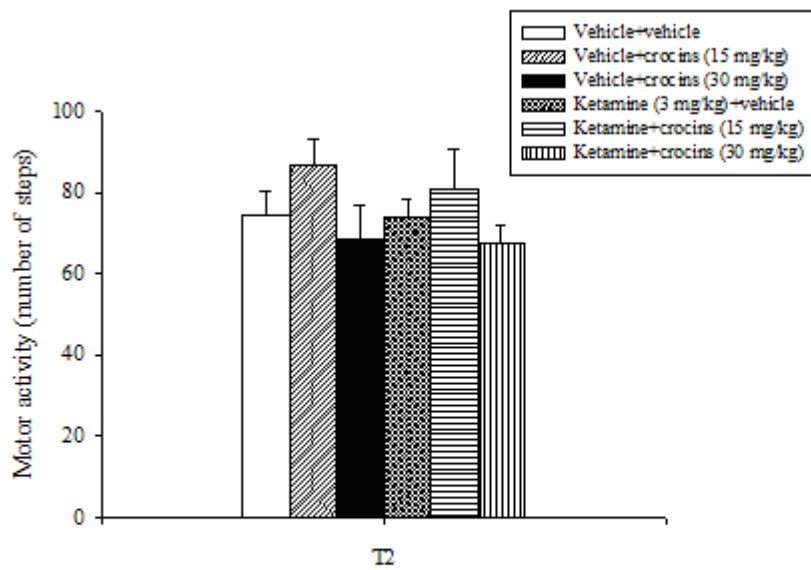
Η στατιστική ανάλυση της κινητικής δραστηριότητας δεν αποκάλυψε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση των κροκινών, της κεταμίνης ή του συνδυασμού τους στην παράμετρο αυτή (Σχήμα 9).



Σχήμα 7. Δείκτης διάκρισης D. Οι κροκίνες και η κεταμίνη χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν την έναρξη της T2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων.



Σχήμα 8. Συνολικός χρόνος εξερεύνησης κατά την T2. Οι κροκίνες και η κεταμίνη χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν την έναρξη της T2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα.



Σχήμα 9. Κινητική δραστηριότητα κατά την T2. Οι κροκίνες και η κεταμίνη χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 λεπτά πριν την έναρξη της T2. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

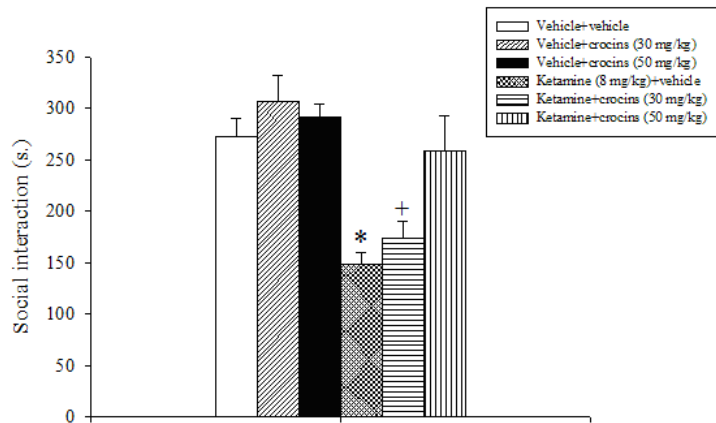
#### 4.3.2. Δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης

##### 4.3.2.1. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κοινωνικής αλληλεπίδρασης των επίμυων.

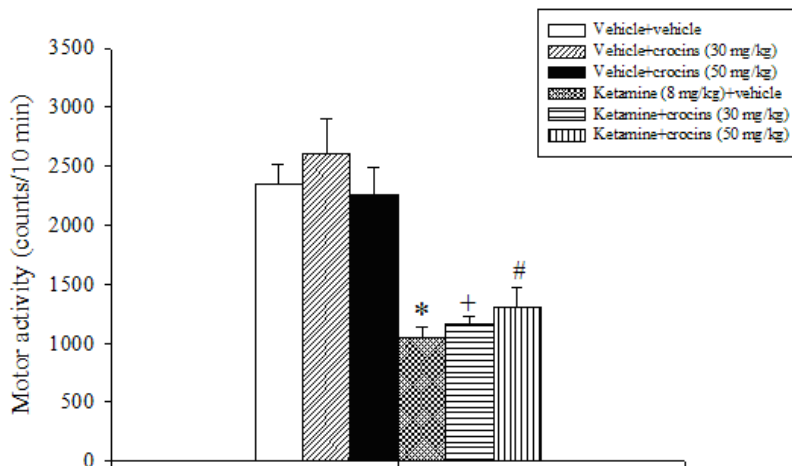
Η στατιστική ανάλυση της κοινωνικής αλληλεπίδρασης αποκάλυψε μια σημαντική κύρια επίδραση της κεταμίνης [ $F(1, 47)=31.1, p<0.01$ ], των κροκινών [ $F(2, 47)=4.54, p=0.016$ ], καθώς και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κεταμίνης και κροκινών [ $F(2, 47)=3.35, p<0.05$ ]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε πως η ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό + κεταμίνη, καθώς και η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα κοινωνικής αλληλεπίδρασης σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες, συμπεριλαμβανομένης και εκείνης που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg ( $p<0.05$ , Σχήμα 10).

##### 4.3.2.2. Επίδραση της κεταμίνης και των κροκινών επί της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων κατά τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης

Η στατιστική ανάλυση της κινητικότητας έδειξε μια σημαντική κύρια επίδραση της κεταμίνης [ $F(1, 47)=64.2, p<0.01$ ]. Δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ κεταμίνης και κροκινών όσον αφορά αυτή την παράμετρο. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε πως η ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό + κεταμίνη, καθώς και οι ομάδες που έλαβαν κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg και κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg αντίστοιχα παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα κινητικότητας σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες ( $p<0.05$ , Σχήμα 11).



Σχήμα 10. Κοινωνική αλληλεπίδραση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων, εκτός της ομάδας που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg. + $p < 0.05$  έναντι όλων των υπολοίπων ομάδων, εκτός της ομάδας που έλαβε κεταμίνη+ φυσιολογικό ορό.



Σχήμα 11. Κινητική δραστηριότητα κατά τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \*, +, # $p < 0.05$  έναντι των ομάδων ελέγχου.



### 4.3.3. Δοκιμασία ανοικτού πεδίου

#### 4.3.3.1. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές κυκλικές κινήσεις στο ανοικτό πεδίο

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η χορήγηση κεταμίνης αύξησε σημαντικά αυτή την παράμετρο ( $H=39.4$ ,  $p<0.001$ ). Εκ των υστέρων αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg, καθώς και η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της παραμέτρου αυτής σε σχέση με την ομάδα που έλαβε κεταμίνη + φυσιολογικό ορό ( $p<0.05$ , Πίνακας 6).

#### 4.3.3.2. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές κινήσεις της κεφαλής

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η χορήγηση κεταμίνης αύξησε σημαντικά αυτή την παράμετρο ( $H=49$ ,  $p<0.001$ ). Εκ των υστέρων αναλύσεις αποκάλυψαν πως η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg, καθώς και η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο κεταμίνη (Πίνακας 6).

#### 4.3.3.3. Επίδραση των κροκινών στις επαγόμενες από την κεταμίνη στερεοτυπικές αιωρήσεις του κορμού

Η χορήγηση κεταμίνης αύξησε σημαντικά αυτή την παράμετρο ( $H=48.967$ ,  $p<0.001$ ). Εκ των υστέρων αναλύσεις αποκάλυψαν πως η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg, όπως και η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο κεταμίνη. (Πίνακας 6).

#### 4.3.3.4. Επίδραση των κροκινών στην επαγόμενη από την κεταμίνη αταξία

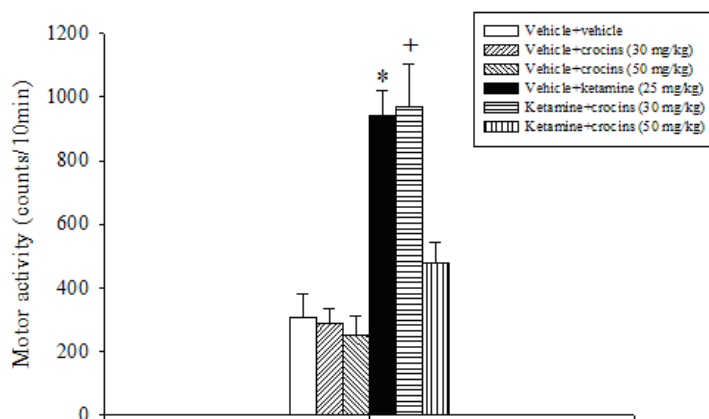
Η χορήγηση κεταμίνης αύξησε σημαντικά αυτή την παράμετρο ( $H=48.2$ ,  $p<0.001$ ). Εκ των υστέρων αναλύσεις έδειξαν ότι η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα αταξίας σε σχέση με την ομάδα που έλαβε κεταμίνη + φυσιολογικό ορό ( $p<0.05$ , Πίνακας 6).

#### 4.3.3.5. Επίδραση των κροκινών στην επαγόμενη από την κεταμίνη υπερκινητικότητα

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μια σημαντική κύρια επίδραση της κεταμίνης [ $F(1, 59)=58.6$ ,  $p<0.01$ ], των κροκινών [ $F(2, 59) =6.8$ ,  $p<0.01$ ], καθώς και μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κεταμίνης και κροκινών [ $F(2, 59)=4.7$ ,  $p=0.01$ ]. Εκ των υστέρων στατιστική ανάλυση αποκάλυψε πως η ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό + κεταμίνη, καθώς και η ομάδα που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα κινητικής δραστηριότητας σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες, συμπεριλαμβανομένης και εκείνης που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 50 mg/kg ( $p<0.05$ , Σχήμα 12).

ΑΓΩΓΗ	ΣΤΕΡΕΟΤΥΠ. ΚΥΚΛΙΚΕΣ ΚΙΝΗΣΕΙΣ	ΣΤΕΡΕΟΤΥΠ. ΚΙΝΗΣΕΙΣ ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΤΕΡΕΟΤΥΠ. ΔΙΩΡΗΣΕΙΣ ΚΟΡΜΟΥ	ΑΤΑΞΙΑ
Φ.ορός + Φ.ορός	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)
Φ.ορός + Κροκ. 30	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)
Φ.ορός + Κροκ. 50	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)
Φ.ορός + Κετ 25	4.5 (2.0 – 6.0) *	5.0 (5.0 – 8.0)*	7.0 (6.0 – 9.0) *	7.0 (6.0 – 8.0)*
Κετ25 + Κροκ 30	2.0 (0.0 – 4.0) *, #, +	7.0 (5.0 – 9.0)*	7.5 (6.0 – 8.0) *	7.0 (4.0 – 8.0)*, +
Κετ 25 + Κροκ 50	0.0 (0.0 – 0.0) #	5.0 (4.0 – 6.0)*	5.0 (4.0 – 7.0) *	3.5 (2.0 – 5.0)*, #

Πίνακας 6. Επίδραση των κροκινών σε κινητικές διαταραχές (στερεοτυπίες και αταξία) επαγόμενες από την κεταμίνη. Τα δεδομένα εκφράζονται με διάμεσο και ενδοτεταρτημοριακό εύρος. \* $p < 0.05$  σε σχέση με την ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό, # $p < 0.05$  σε σχέση με την ομάδα που έλαβε κεταμίνη 25 mg/kg, + $p < 0.05$  σε σχέση με την ομάδα που έλαβε κεταμίνη 25 mg/kg+κροκίνες 50 mg/kg.



Σχήμα 12. Κινητική δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα. \* $p < 0.05$  έναντι όλων των άλλων ομάδων εκτός της ομάδας που έλαβε κεταμίνη + κροκίνες 30 mg/kg, + $p < 0.05$  έναντι όλων των άλλων ομάδων εκτός της ομάδας που έλαβε φυσιολογικό ορό + κεταμίνη.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Κροκίνες και άγχος

Τα αποτελέσματα του πειράματος δείχνουν πως οι κροκίνες στη δόση των 50 mg/kg επέδειξαν αξιοσημείωτη αγχολυτική δράση, διότι αύξησαν τόσο τον λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα, όσο και τον συνολικό χρόνο παραμονής των επίμυων στο φωτεινό διαμέρισμα. Η χορήγηση κροκινών σε αυτή τη δόση δεν επηρέασε τον αριθμό των διελεύσεων μεταξύ των διαμερισμάτων. Η διαζεπάμη, μια βενζοδιαζεπίνη, ευρέως χρησιμοποιούμενη για την αντιμετώπιση αγχώδους συμπτωματολογίας, χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο αναφοράς και είχε την ίδια επίδραση στις ανωτέρω παραμέτρους. Η χορήγηση κροκινών σε χαμηλότερες δόσεις (15 και 30 mg/kg) δεν επηρέασε τα συμπεριφορά των πειραματοζώων, γεγονός που υποδηλώνει πως η δράση των κροκινών στην εν λόγω πειραματική δοκιμασία ήταν δοσοεξαρτώμενη. Έχει βρεθεί ότι ο συνολικός χρόνος παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα είναι πιο ευαίσθητος δείκτης αγχολυτικής δράσης από ό,τι ο αριθμός των διελεύσεων μεταξύ των διαμερισμάτων, γιατί ο αριθμός των διελεύσεων αποτελεί και δείκτη της εξερευνητικής δραστηριότητας του ζώου (Kilfoil et al, 1989; Young & Johnson, 1991; Lepicard et al, 2000). Τα ευρήματά μας συνάδουν με τα δεδομένα αυτά.

Η δοκιμασία φωτός-σκότους αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για την αξιολόγηση της επίδρασης μιας ουσίας σε συμπεριφορές άγχους σε τρωκτικά (Crawley & Goodwin, 1980). Ωστόσο μπορεί να επιφέρει ψευδώς θετικά ευρήματα, λόγω μη ειδικής επίδρασης της εξεταζόμενης ουσίας επί της κινητικής δραστηριότητας. Αυτή η πιθανότητα αποκλείστηκε, καθώς στη δοκιμασία κινητικότητας που διενεργήθηκε, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επίμυων που έλαβαν κροκίνες (50 mg/kg) και των μαρτύρων που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι οι κροκίνες επέδειξαν αγχολυτική δράση σε επίμυες στην πειραματική

δοκιμασία φωτός-σκότους, χωρίς να επηρεάζουν την κινητική δραστηριότητα των επίμων.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι κροκίνες ανέστειλαν μνημονικά ελλείμματα προκαλούμενα από χρόνιο στρες σε επίμους και ελάττωσαν τα επίπεδα κορτικοστερόνης στον ορό (Hooshmandi et al, 2011; Ghadrdoost et al, 2011). Τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν δενδριτική ατροφία σε πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου, αναστέλλουν τη νευρογένεση και προκαλούν σμίκρυνση του ιπποκάμπου (Conrad et al, 2007; Magarinos and McEwen, 1995; Gould et al, 1997). Πιθανώς οι κροκίνες να αλληλεπιδρούν με τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα, προκαλώντας καταστολή έκκρισης της κορτικοτροπίνης (ACTH) και κατ' επέκταση της κορτικοστερόνης (Halataei et al, 2011). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι φάρμακα τα οποία δρουν αγωνιστικά στην θέση των βενζοδιαζεπινών στο σύμπλοκο του GABA<sub>A</sub> υποδοχέα μειώνουν την έκκριση του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης και κατ' επέκταση της κορτιζόλης ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες (Lopez et al, 1999). Η αγχολυτική δράση των κροκινών επομένως πιθανώς να διαμεσολαβείται από αγωνιστική δράση αυτών επί των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων.

## **5.2. Κροκίνες και ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή**

Η χορήγηση του mCPP αύξησε τον χρόνο αυτοκαθαρισμού στους επίμους, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες (Graf et al, 2003; Bagdy et al, 1992). Η χορήγηση κροκινών δεν επηρέασε τη συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού των πειραματοζώων. Ωστόσο οι κροκίνες και στις δύο δόσεις που ελέγχθησαν (30 και 50 mg/kg) ανταγωνίστηκαν τη δράση του mCPP επί της παραμέτρου αυτής, χωρίς όμως να επαναφέρουν τα επίπεδά της στα επίπεδα των μαρτύρων.

Η κινητική δραστηριότητα σε αυτή την πειραματική δοκιμασία αξιολογήθηκε ως ανεξάρτητος δείκτης, ώστε να αποκλείσουμε την πιθανότητα η επίδραση των κροκινών επί του αυτοκαθαρισμού να οφείλεται σε μη ειδική επίδραση αυτών επί της γενικής δραστηριότητας των επίμυων. Τα πειραματόζωα που έλαβαν mCPP και/ή κροκίνες παρουσίασαν όμοια επίπεδα κινητικότητας, αν και χαμηλότερα από εκείνα των μαρτύρων που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Το στοιχείο αυτό αποδεικνύει πως η συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού δεν σχετίζεται με την κινητικότητα των επίμυων στην εν λόγω δοκιμασία.

Τα παρόντα ευρήματα έρχονται σε αντίφαση με τα αποτελέσματα μιας προγενέστερης μελέτης, στην οποία βρέθηκε πως η χορήγηση κροκινών ελάττωσε τόσο τα επίπεδα κινητικότητας, όσο και τα επίπεδα αυτοκαθαρισμού (Hosseinzadeh & Noraei, 2009). Οι αντιθέσεις αυτές ωστόσο μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές στις πειραματικές διαδικασίες (είδος πειραματόζωου, φαρμακολογικό σχήμα, συμπεριφορικά πρότυπα) που ακολουθήθηκαν. Συγκεκριμένα στην προαναφερθείσα έρευνα η μελέτη της δράσης των κροκινών έγινε σε ποντίκια, η χορήγηση των κροκινών έγινε 30 λεπτά πριν τη συμπεριφορική δοκιμασία και οι δόσεις των κροκινών που χρησιμοποιήθηκαν κυμάνθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα (50-600 mg/kg).

Το mCPP είναι ένας μη εκλεκτικός αγωνιστής των 5-HT<sub>2</sub> υποδοχέων με μεγαλύτερη συγγένεια για τον 5-HT<sub>2C</sub> υπότυπο (Porter et al, 1998). Ο επαγόμενος από το mCPP υπερβολικός αυτοκαθαρισμός ανεστάλη από την χορήγηση του SB-242084, ενός εκλεκτικού ανταγωνιστή του 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέα, όχι όμως και από την χορήγηση του SB-215505, ενός εκλεκτικού ανταγωνιστή του 5-HT<sub>2B</sub> υποδοχέα. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η δράση του mCPP επί της συμπεριφοράς αυτοκαθαρισμού οφείλεται σε ενεργοποίηση του 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέα (Graf et al, 2003). Συνεπώς μια πιθανή ερμηνεία για τα ευρήματά μας να είναι ότι οι κροκίνες ανταγωνίστηκαν τη δράση του mCPP στον αυτοκαθαρισμό, μέσω λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τον 5-HT<sub>2C</sub> υποδοχέα.

### 5.3. Κροκίνες και σχιζοφρένεια

Στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου βρέθηκε ότι η χορήγηση κεταμίνης (3 mg/kg) ελάττωσε σημαντικά τις ικανότητες αναγνωριστικής μνήμης των επίμυων, χωρίς όμως να επηρεάσει την κινητική ή την εξερευνητική τους δραστηριότητα. Η χορήγηση κροκινών (15 και 30 mg/kg) ανταγωνίστηκε πλήρως τη δράση αυτή της κεταμίνης, επαναφέροντας τις ικανότητες αναγνωριστικής μνήμης των επίμυων στα φυσιολογικά επίπεδα. Η χορήγηση των φαρμάκων έγινε αμέσως μετά την T1, επιδρώντας με τον τρόπο αυτό σε κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς αποθήκευσης της πληροφορίας. Η παρέλευση 60 λεπτών μεταξύ της χορήγησης των φαρμάκων και της δοκιμασίας εκλογής διασφαλίζει την υποχώρηση των όποιων παρενεργειών της κεταμίνης επί του κινητικού συστήματος. Τα φυσιολογικά επίπεδα κινητικότητας και εξερευνητικής δραστηριότητας όλων των εξεταζόμενων ομάδων αποκλείουν την πιθανότητα τα ευρήματα να οφείλονται σε επίδραση της αγωγής επί της κινητικότητας ή επί του κινήτρου των επίμυων. Η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου είναι μια συμπεριφορική δοκιμασία που αξιολογεί την αναγνωριστική μνήμη σε τρωκτικά. Είναι γνωστό πως ο συγκεκριμένος τύπος μνήμης διαταράσσεται τόσο σε πάσχοντες από σχιζοφρένεια (Calev et al, 1983; Edwards et al, 2002), όπως και σε υγιείς εθελοντές που λαμβάνουν κεταμίνη (Morgan et al, 2004). Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν σχετίζεται με διαδικασίες τιμωρίας ή ανταμοιβής, αλλά βασίζεται αποκλειστικά στην φυσική περιέργεια του επίμυος και στην προτίμησή του για νέα και άγνωστα αντικείμενα (Dere et al, 2007). Ως εκ τούτου ομοιάζει με διαγνωστικές δοκιμασίες που εφαρμόζονται σε ανθρώπους και θεωρείται πως έχει υψηλή αξιοπιστία.

Στην δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης βρέθηκε πως η υποξεία χορήγηση κεταμίνης (8 mg/kg) για τρεις συνεχόμενες ημέρες προκάλεσε κοινωνική απόσυρση και ελάττωση της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων. Η χορήγηση κροκινών στη δόση των 30 mg/kg δεν ανταγωνίστηκε καμία από τις δύο αυτές δράσεις της κεταμίνης. Η χορήγηση ωστόσο κροκινών

στη δόση των 50 mg/kg επανέφερε τα επίπεδα κοινωνικής αλληλεπίδρασης των πειραματοζώων στα φυσιολογικά επίπεδα, χωρίς όμως να αναστέλλει την υποκινητικότητα που προκάλεσε η κεταμίνη. Εφόσον τα επίπεδα της κινητικής δραστηριότητας δεν διαφέρουν μεταξύ της ομάδας που έλαβε μόνο κεταμίνη και της ομάδας που έλαβε κεταμίνη και κροκίνες 50 mg/kg, είναι απίθανο η δράση των κροκινών επί της κοινωνικής αλληλεπίδρασης να οφείλεται σε επίδρασή τους επί της κινητικότητας των πειραματοζώων. Επιπρόσθετα η κοινωνική απόσυρση που προκάλεσε η κεταμίνη δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε αγχογόνο επίδραση αυτής, καθώς οι ανταγωνιστές του NMDA υποδοχέα φαίνεται να έχουν αγχολυτικές ιδιότητες (Xie & Commissaris, 1992). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δείχνουν πως ο ανταγωνισμός του NMDA υποδοχέα από την κεταμίνη επάγει μεταβολές στην κοινωνική συμπεριφορά των επίμυων, που μπορούν να θεωρηθούν ανάλογες των αρνητικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας και οι μεταβολές αυτές αναστρέφονται με τη χορήγηση κροκινών.

Στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου βρέθηκε κατ' αρχάς πως η χορήγηση κεταμίνης (25 mg/kg) στα πειραματοζώα προκάλεσε όπως ήταν αναμενόμενο υπερκινητικότητα, στερεοτυπικές κινήσεις και αταξία, γεγονός που συνάδει με τα ευρήματα πρηνέστερων μελετών (Moghaddam et al, 1997; Razoux et al, 2007). Η χορήγηση κροκινών στη δόση των 30 mg/kg δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη δράση επί των ανωτέρω παραμέτρων, με εξαίρεση μια μέτρια αναστολή των στερεοτυπικών κυκλικών κινήσεων μέσα στον κλωβό. Αντίθετα, η χορήγηση κροκινών στη δόση των 50 mg/kg επανέφερε την υπερκινητικότητα και τις στερεοτυπικές κυκλικές κινήσεις μέσα στον κλωβό στα φυσιολογικά επίπεδα, ανταγωνίστηκε μερικώς την επαγόμενη από κεταμίνη αταξία, ενώ δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στις στερεοτυπικές κινήσεις της κεφαλής και στις στερεοτυπικές αιωρήσεις του κορμού.

Συμπεραίνουμε από το σύνολο των πειραμάτων ότι η χορήγηση κροκινών σε επίμυες ανταγωνίζεται τις επαγόμενες από την κεταμίνη ψυχοκινητικές



διαταραχές, που αναπαριστούν τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας, την κοινωνική απόσυρση που αποτελεί πρότυπο της αρνητικής συμπτωματολογίας, αλλά και τις μνημονικές διαταραχές που θεωρούνται δείκτες των γνωσιακών ελλειμμάτων που προκαλεί ο ανταγωνισμός του NMDA υποδοχέα στη σχιζοφρένεια. Στους πιθανούς μηχανισμούς δράσης των κροκινών συγκαταλέγεται η αλληλεπίδρασή τους με τον NMDA υποδοχέα. Κατ' αρχάς έχει βρεθεί όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή ότι οι κροκίνες βελτιώνουν τη μακροχρόνια ενδυνάμωση (LTP), στην οποία ο εν λόγω υποδοχέας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Sugiura et al, 1995; Abe et al, 1999). Μεταγενέστερες έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα του κρόκου και η κροκετίνη παρουσιάζουν συγγένεια για τον NMDA και για τον  $\sigma_1$  υποδοχέα στη θέση σύνδεσης της PCP (Lechtenberg et al, 2008). Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι χορήγηση της σαφρανάλης, ενός συστατικού του κρόκου, μείωσε την επαγόμενη από το καϊνικό οξύ αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων του γλουταμικού στον ιππόκαμπο των επίμων (Hosseinzadeh et al, 2008β). Επιπλέον, μία σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πυραμιδικά κύτταρα εγκεφαλικού φλοιού επίμους αποκάλυψε ότι το εκχύλισμα του κρόκου ελάττωσε την επαγόμενη από το γλουταμικό αποφόρτιση της κυτταρικής μεμβράνης και ανέστειλε προκλητά δυναμικά σχετιζόμενα με NMDA (Berger et al, 2011). Συνολικά αυτή η δράση του κρόκου και των συστατικών του επί του γλουταμικού δύναται να έχει θεραπευτική αξία, καθώς η ψυχοσεομιμητική δράση της κεταμίνης συνδέεται με υψηλά επίπεδα και υπερδραστηριότητα του γλουταμικού οξέος (Moghaddam et al, 1997).

Υπάρχουν ενδείξεις στη βιβλιογραφία ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα ψυχιατρικών διαταραχών, περιλαμβανομένης και της σχιζοφρένειας. Συγκεκριμένα έχουν αποκαλυφθεί διαταραχές στη λειτουργία αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GSHPx, CAT), υψηλά επίπεδα προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων (θειοβαρβιτουρικό οξύ και μαλονδιαλδεύδη) και χαμηλά επίπεδα μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών (γλουταθειόνη) σε

πάσχοντες από σχιζοφρένεια. Μάλιστα σειρά κλινικών και προκλινικών μελετών υποστηρίζουν τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών ως συμπληρωματική αγωγή σε αυτούς τους ασθενείς (Zhang & Yao, 2013; Boskovic et al, 2011; Singh et al, 2010; Yao & Keshavan, 2011). Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι κροκίνες πιθανώς να εμποδίζουν την εμφάνιση ψυχωσεομιμητικών εκδηλώσεων μέσω της ισχυρής αντιοξειδωτικής και συνεπώς νευροπροστατευτικής τους δράσης.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των κροκινών, παραγώγων του *Crocus sativus* L., σε πειραματικά μοντέλα άγχους, ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής και σχιζοφρένειας, χρησιμοποιώντας μεθόδους συμπεριφορικής φαρμακολογίας σε επίμυες.

Στην δοκιμασία φωτός/σκότους η χορήγηση κροκινών (50 mg/kg) παρουσίασε αγχολυτική δράση, συγκρίσιμη με εκείνη της διαζεπάμης (1.5 mg/kg), καθώς αύξησε τον λανθάνοντα χρόνο εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα και τον συνολικό χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα, χωρίς να επηρεάζει τον αριθμό των διελεύσεων μεταξύ των διαμερισμάτων, ούτε την κινητική δραστηριότητα των επίμυων.

Στο πειραματικό πρότυπο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής η χορήγηση κροκινών (30 και 50 mg/kg) ανταγωνίστηκε τον επαγόμενο από τον 5-HT<sub>2</sub> αγωνιστή mCPP (0.6 mg/kg) υπερβολικό αυτοκαθαρισμό, καθώς ελάττωσε τόσο τον συνολικό χρόνο που τα πειραματόζωα δαπάνησαν σε διαδικασίες αυτοκαθαρισμού, όσο και τα επεισόδια αυτοκαθαρισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση αυτή των κροκινών δεν μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολές επί της κινητικής δραστηριότητας των επίμυων.

Για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των κροκινών σε πειραματικό μοντέλο σχιζοφρένειας χρησιμοποιήσαμε τρεις χωριστές πειραματικές δοκιμασίες: για τα νοητικά ελλείμματα, τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, για τα αρνητικά συμπτώματα, τη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης και για τα θετικά συμπτώματα, μια δοκιμασία ανοικτού πεδίου. Στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου βρέθηκε ότι η χορήγηση κροκινών (15 και 30 mg/kg) ανέστειλε πλήρως τα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης που προκάλεσε η χορήγηση κεταμίνης (3 mg/kg), χωρίς να επηρεάζει την κινητική ή την εξερευνητική δραστηριότητα των επίμυων. Στη δοκιμασία κοινωνικής αλληλεπίδρασης βρέθηκε πως η χορήγηση

κροκινών (50 mg/kg) ανταγωνίστηκε την κοινωνική απόσυρση που προκάλεσε η χορήγηση κεταμίνης (8 mg/kg) και η δράση τους αυτή δεν σχετίζεται με μεταβολές επί της κινητικής δραστηριότητας. Τέλος στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου η χορήγηση κροκινών (50 mg/kg) ανταγωνίστηκε την υπερκινητικότητα που προκάλεσε η χορήγηση κεταμίνης (25 mg/kg) και ελάττωσε τα επίπεδα στερεοτυπικών κυκλικών κινήσεων και αταξίας που προκάλεσε η κεταμίνη.

Η χρήση φυτικών ουσιών για θεραπευτικούς σκοπούς αποτελεί πανάρχαια τακτική. Ακόμη και σήμερα όμως τα φυτά αποτελούν εξαιρετικά ελκυστικές πηγές προέλευσης βιολογικά δραστικών ουσιών με θεραπευτικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαρμάκων που δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και προέρχονται από φυτά είναι: η εφεδρίνη (*Ephedra sinica* S.), η υοσκίνη (*Hyoscyamus niger* L.), η μορφίνη (*Papaver somniferum* L.), η φυσοστιγμίνη (*Physostigma venenosum* B.), η γαλανταμίνη (είδη *Galanthus* και *Narcissus*). Τα φυτικά σκευάσματα μπορούν να προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ασφάλεια της θεραπείας, την ανοχή στο σκεύασμα, ακόμη και τη συμμόρφωση του αρρώστου. Η χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης μπορεί να μην έχει πάντα επαρκείς επιστημονικές ενδείξεις, ωστόσο νεότερες φαρμακολογικές έρευνες ολοένα επιβεβαιώνουν τις παραδοσιακές γνώσεις για τις ιδιότητές τους. Συνεπώς η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες είναι επιτακτική, ώστε να πιστοποιηθούν με επιστημονικά κριτήρια οι θεραπευτικές ενδείξεις, τα δοσολογικά σχήματα και το προφίλ των παρενεργειών.

Εν κατακλείδει, αν μέσω αξιόπιστων προκλινικών και κλινικών μεθόδων τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητα του κρόκου, έχοντας ήδη δεδομένη τη πολύ χαμηλή τοξικότητά του, θα μπορέσουμε μακροπρόθεσμα να υποστηρίξουμε τη χρήση του από τη σύγχρονη ιατρική.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdullaev FI. Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicol Lett* 1994; 70:243-51.

Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R, Espinosa-Aguirre JJ. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicol In Vitro* 2003; 17:731-6.

Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev* 2004; 28:426-32

Abe K, Sugiura M, Yamaguchi S, Shoyama Y, Saito H. Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res* 1999; 851:287-9

Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81:805-13

Ahn JH, Hu Y, Hernandez M, Kim JR. Crocetin inhibits beta-amyloid fibrillization and stabilizes beta-amyloid oligomers. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414:79-83

Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816]. *BMC Complement Altern Med* 2004; 2:4:12

Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala A, Amini H, Fallah-Pour H, Jamshidi A, Khani M. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytother Res* 2005; 19:148-51

Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Zare F, Moradi A. Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther* 2010; 35:581-8

Akhondzadeh S, Shafiee Sabet M, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Rezazadeh SA, Yousefi A, Zare F, Moradi A, Vossoughi A. A 22-week, multicenter, randomized, double-blind controlled trial of *Crocus sativus* in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 2010; 207:637-43

Al-Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sohaibani MO, Qureshi S, Rafatullah S. Antigastric ulcer studies on 'saffron' *crocus sativus* L. in rats. *Pak J Biol Sci* 2006; 9:1009-13

Altemus M, Pigott T, Kalogeras KT, Demitrack M, Dubbert B, Murphy DL, Gold PW. Abnormalities in the regulation of vasopressin and corticotropin releasing factor secretion in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49:9-20

Amin B, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia* 2012; 83:888-95

Aouizerate B, Guehl D, Cuny E, Rougier A, Bioulac B, Tignol J, Burbaud P. Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: A necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Prog Neurobiol* 2004; 72:195-221

Archer T. Neurodegeneration in schizophrenia. *Expert Rev Neurother* 2010; 10:1131-41

Arnold PD, Sicard T, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL. Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63:769-76

Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7302-6

Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 162:358-72

Ashrafi M, Bathaie SZ, Taghikhani M, Moosavi-Movahedi AA. The effect of carotenoids obtained from saffron on histone H1 structure and H1-DNA interaction. *Int J Biol Macromol* 2005; 36:246-52

Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res* 2005; 19:997-1000

Bagdy G, Kalogeras KT, Szemeredi K. Effect of 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor stimulation on excessive grooming, penile erection and plasma oxytocin concentrations. *Eur J Pharmacol* 1992; 229:9-14

Barkataki I, Kumari V, Das M, Taylor P, Sharma T. Volumetric structural brain abnormalities in men with schizophrenia or antisocial personality disorder. *Behav Brain Res* 2006; 169:239-47

Bartha R, Williamson PC, Drost DJ, Malla A, Carr TJ, Cortese L, Canaran G, Rylett RJ, Neufeld RWJ. Measurement of glutamate and glutamine in the medial prefrontal cortex of never-treated schizophrenic patients and healthy controls by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54:959-65

Basker D, Negbi M. Uses of saffron. *Econom Botany* 1983; 37:228-36

Bechara A, Damasio H, Damasio AR. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 2000; 10:295-307

Becker, A., & Grecksch, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28:1267-77

Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: Implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25:1-27

Berger F, Hensel A, Nieber K. Saffron extract and trans-crocetin inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat cortical brain slices. *Neuroscience* 2011; 180:238-47

Bora E, Fornito A, Radua J, Walterfang M, Seal M, Wood SJ, Yücel M, Velakoulis D, Pantelis C. Neuroanatomical abnormalities in schizophrenia: A multimodal voxelwise meta-analysis and meta-regression analysis. *Schizophr Res* 2011; 127:46-57

Boskabady MH, Aslani MR. Relaxant effect of crocus sativus (saffron) on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58:1385-90

Boskovic M, Vovk T, Kores Plesnicar B, Grabnar I. Oxidative stress in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol* 2011; 9:301-12

Boultadakis A, Pitsikas N. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on recognition and spatial memory deficits produced by different NMDA receptor antagonists in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35:2357-66



Bush G, Luu P, Posner MI. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 2000; 4:215-22

Caballero-Ortega H, Pereda-Miranda R, Abdullaev FI. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*crocus sativus* L.) sources. *Food Chem* 2007; 100:1126-31

Cai J, Yi F, Bian Z, Shen D, Yang L, Yan L, Li H. Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1-2 signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2009; 13:909-25

Calev A, Venables PH, Monk AF. Evidence for distinct verbal memory pathologies in severely and mildly disturbed schizophrenics. *Schizophr Bull* 1983; 9:247-64

Camarena B, Aguilar A, Loyzaga C, Nicolini H. A family-based association study of the 5-HT-1D $\beta$  receptor gene in obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7:49-53

Cameron OG, Minoshima S. Regional brain activation due to pharmacologically induced adrenergic interoceptive stimulation in humans. *Psychosom Med* 2002; 64:851-61

Carrasco GA, Van De Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003; 463:235-72

Cavoy A, Delacour J. Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats. *Physiol Behav* 1993; 53:527-30

Charney DS, Grillon C, Bremner JD. The neurobiological basis of anxiety and fear: Circuits, mechanisms, and neurochemical interactions. *Neuroscientist* 1998; 4:35-44

Chen S, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y. Production of crocin using *crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnol Lett* 2003; 25:1235-8

Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Chen C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *gardenia jasminoides* ELLIS and *crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem* 2008; 109:484-92

Chichiricco G, Grilli Caiola M. In vitro development of parthenocarpic fruits of *crocus sativus* L. *J Plant Biotechnol* 1987; 11:75-8

Chou-Green JM, Holscher TD, Dallman MF, Akana SF. Compulsive behavior in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor knockout mouse. *Physiol Behav* 2003; 78:641-9

Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, Cordopatis P. A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma--application after saffron tea consumption. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55:563-8

Conrad CD, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci* 2007; 27:8278-85

Costall B, Naylor RJ. Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. *Br J Pharmacol* 1995; 116:2989-99

Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 13:167-70

Damatarca C, Stahl J, Stahl SM. Psychopharmacologic approaches to the management of anxiety. *Drug Benefit Trends* 2004; 16:94-100

Das I, Das S, Saha T. Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: A histopathological study. *Acta Histochem* 2010; 112:317-27

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 1991; 148:1474-86

De Oliveira Viana Arruda M, Soares PM, Honório Jr. JER, De Sousa Lima RC, Chaves EMC, De Freitas Guimarães Lobato R, De Aguiar Rocha Martin AL, Sales GTM, De Moraes Carvalho K, Assreuy AMS, De Brito EM, Vasconcelos SMM. Activities of the antipsychotic drugs haloperidol and risperidone on behavioural effects induced by ketamine in mice. *Scientia Pharmaceutica* 2008; 76:673-87

De Vry J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: Recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology* 1995; 121:1-26

Deakin JFW, Simpson MDC, Slater P, Hellewell JSE. Familial and developmental abnormalities of frontal lobe function and neurochemistry in schizophrenia. *J Psychopharmacol* 1997; 11:133-42

Denys D, Van Der Wee N, Janssen J, De Geus F, Westenberg HGM. Low level of dopaminergic D<sub>2</sub> receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 2004; 55:1041-5

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31:673-704

Deslauriers AM, Afkhami-Goli A, Paul AM, Bhat RK, Acharjee S, Ellestad KK, Noorbakhsh F, Michalak M, Power C. Neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress are coregulated by crocin to prevent demyelination and neurodegeneration. *J Immunol* 2011; 187:4788-99

Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: Therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24:43-9

Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 1995; 118:279-306

Dhar A, Mehta S, Dhar G, Dhar K, Banerjee S, Van Veldhuizen P, Campbell DR, Banerjee SK. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:315-23

Ding Q, Zhong H, Qi Y, Cheng Y, Li W, Yan S, Wang X. Anti-arthritic effects of crocin in interleukin-1 $\beta$ -treated articular chondrocytes and cartilage in a rabbit osteoarthritic model. *Inflamm Res* 2013; 62:17-25

Edwards J, Jackson HJ, Pattison PE. Emotion recognition via facial expression and affective prosody in schizophrenia: A methodological review. *Clin Psychol Rev* 2002 ;22:789-832

El Mansari M, Blier P. Mechanisms of action of current and potential pharmacotherapies of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30:362-73

Elkabir DR, Wyatt ME, Vellucci SV, Herbert J. The effects of separate or combined infusions of corticotrophin-releasing factor and vasopressin either intraventricularly or into the amygdala on aggressive and investigative behaviour in the rat. *Regul Pept* 1990; 28:199-214

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31:47-59

Escribano J, Alonso G, Coca-Prados M, Fernández J. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 100:23-30

Falsini B, Piccardi M, Minnella A, Savastano C, Capoluongo E, Fadda A, Balestrazzi E, Maccarone R, Bisti S. Influence of saffron supplementation on retinal flicker sensitivity in early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:6118-24

Farber NB. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003:119-30

File SE. Recent developments in anxiety, stress, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54:3-12

Forestiero D, Manfrim CM, Guimarães FS, De Oliveira RMW. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology* 2006; 184:166-72

Fossey MD, Lydiard RB, Ballenger JC, Laraia MT, Bissette G, Nemeroff CB. Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor concentrations in patients with anxiety disorders and normal comparison subjects. *Biol Psychiatry* 1996; 39:703-7

Gao X, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: Effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157:1141-9

Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, Haghighi S, Sameni HR, Pahlvan S. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 667:222-9

Ghazavi A, Mosaycbi G, Salchi H, Abtahi H. Effect of ethanol extract of saffron (*crocus sativus* L.) on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Pak J Biol Sci* 2009; 12:690-5

Giaccio M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004 44:155-72

Goddard AW, Shekhar A, Whiteman AF, McDougale CJ. Serotonergic mechanisms in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Drug Discov Today* 2008; 13:325-32

Gommans J, Hijzen TH, Maes RAA, Olivier B. Discriminative stimulus properties of mCPP: Evidence for a 5-HT<sub>2C</sub> receptor mode of action. *Psychopharmacology* 1998; 137:292-302

Gould E, Tanapat P, Cameron HA. Adrenal steroids suppress granule cell death in the developing dentate gyrus through an NMDA receptor-dependent mechanism. *Dev Brain Res* 1997; 103:91-3

Goyal SN, Arora S, Sharma AK, Joshi S, Ray R, Bhatia J, Kumari S, Arya DS. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine* 2010; 17:227-32

Graf M, Kantor S, Anheuer ZE, Modos EA, Bagdy G. m-CPP-induced self-grooming is mediated by 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Behav Brain Res* 2003; 142:175-9

Graybiel AM, Rauch SL. Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron* 2000; 28:343-7

Groenink L, Van Bogaert MJV, Van Der Gugten J, Oosting RS, Olivier B. 5-HT<sub>1A</sub> receptor and 5-HT<sub>1b</sub> receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behav Pharmacol* 2003; 14:369-83

Halataei BA, Khosravi M, Arbabian S, Sahraei H, Golmanesh L, Zardooz H, Jalili C, Ghoshooni H. Saffron (*Crocus sativus*) aqueous extract and its constituent crocin reduces stress-induced anorexia in mice. *Phytother Res* 2011; 25:1833-8

Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 1999; 122:593-624

Hemmings SMJ, Kinnear CJ, Niehaus DJH, Moolman-Smook JC, Lochner C, Knowles JA, Corfield VA, Stein DJ. Investigating the role of dopaminergic and serotonergic candidate genes in obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13:93-8

Hemshekhar M, Sebastin Santhosh M, Sunitha K, Thushara RM, Kemparaju K, Rangappa KS, Girish KS. A dietary colorant crocin mitigates arthritis and associated secondary complications by modulating cartilage deteriorating enzymes, inflammatory mediators and antioxidant status. *Biochimie* 2012; 94:2723-33

Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27:1113-23

Holcomb HH, Lahti AC, Medoff DR, Cullen T, Tamminga CA. Effects of noncompetitive NMDA receptor blockade on anterior cingulate cerebral blood flow in volunteers with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:2275-82

Hooshmandi Z, Rohani AH, Eidi A, Fatahi Z, Golmanesh L, Sahraei H. Reduction of metabolic and behavioral signs of acute stress in male Wistar rats by saffron water extract and its constituent safranal. *Pharm Biol* 2011; 49:947-54

Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA Cell Biol* 2013; 32:50-7

Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2002; 2:7

Hosseinzadeh H, Karimi G, Niapoor M. Antidepressant effects of crocus sativus stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. *J Med Plants* 2004; 3:48-58+XVII

Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine* 2007; 14:256-62

Hosseinzadeh H, Ziaee T, Sadeghi A. The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine* 2008 $\alpha$ ; 15:491-5

Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Rahimi A. Effects of safranal on extracellular hippocampal levels of glutamate and aspartate during kainic acid treatment in anesthetized rats. *Planta Med* 2008 $\beta$ ; 74:1441-5

Hosseinzadeh H, Noraei NB. Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytother Res* 2009; 23:768-74

Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytother Res* 2012; 26:381-6

Imenshahidi M, Hosseinzadeh H, Javadpour Y. Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res* 2010; 24:990-4

Insel TR, Mueller EA, Alterman I, Linnoila M, Murphy DL. Obsessive-compulsive disorder and serotonin: is there a connection? *Biol Psychiatry* 1985; 20:1174-88

Ishizuka F, Shimazawa M, Umigai N, Ogishima H, Nakamura S, Tsuruma K, Hara H. Crocetin, a carotenoid derivative, inhibits retinal ischemic damage in mice. *Eur J Pharmacol* 2013; 703:1-10

Jagadeeswaran R, Thirunavukkarasu C, Gunasekaran P, Ramamurty N, Sakthisekaran D. In vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetin. *Fitoterapia* 2000; 71:395-9

Javitt DC. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol* 2007; 78:69-108



Jenike MA. Obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med* 2004; 350:259-65

Jessie SW, Krishnakantha TP. Inhibition of human platelet aggregation and membrane lipid peroxidation by food spice, saffron. *Mol Cell Biochem* 2005; 278:59-63

Jnaneshwari S, Hemshekhar M, Santhosh MS, Sunitha K, Thushara R, Thirunavukkarasu C, Kemparaju K, Girish KS. Crocin, a dietary colorant mitigates cyclophosphamide-induced organ toxicity by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65:604-14

Joukar S, Najafipour H, Khaksari M, Sepehri G, Shahrokhi N, Dabiri S, Gholamhoseinian A, Hasanzadeh S. The effect of saffron consumption on biochemical and histopathological heart indices of rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol* 2010; 10:66-71

Kalueff AV, Nutt DJ. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety* 2007; 24:495-517

Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: Stability and antioxidative properties. *J Agric Food Chem* 2007; 55:970-7

Kanakis CD, Tarantilis PA, Pappas C, Bariyanga J, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity. *J Photochem Photobiol B* 2009; 95:204-12

Karayorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, Gogos JA. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4572-5

Kashani L, Raisi F, Saroukhani S, Sohrabi H, Modabbernia A, Nasehi AA, Jamshidi A, Ashrafi M, Mansouri P, Ghaeli P, Akhondzadeh S. Saffron for treatment of fluoxetine-induced sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* 2013; 28:54-60

Kazi H, Qian Z. Crocetin reduces TNBS-induced experimental colitis in mice by downregulation of NFkB. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15:181-7

Kennett GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S, Forbes IT, Brown AM, Middlemiss DN, Blackburn TP. SE 242084, a selective and brain penetrant 5-HT(2C) receptor antagonist. *Neuropharmacology* 1997; 36:609-20

Keshavan MS. Development, disease and degeneration in schizophrenia: A unitary pathophysiological model. *J Psychiatr Res* 1999; 33:513-21

Keverne EB. GABA-ergic neurons and the neurobiology of schizophrenia and other psychoses. *Brain Res Bull* 1999; 48:467-73

Kilfoil T, Michel A, Montgomery D, Whiting RL. Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. *Neuropharmacology* 1989; 28:901-5

Koran LM, Gamel NN, Choung HW, Smith EH, Aboujaoude EN. Mirtazapine for obsessive-compulsive disorder: An open trial followed by double-blind discontinuation. *J Clin Psychiatry* 2005; 66:515-20

Koros, E., Rosenbrock, H., Birk, G., Weiss, C., & Sams-Dodd, F. The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32:562-76

Kuratsune H, Umigai N, Takeno R, Kajimoto Y, Nakano T. Effect of crocetin from *Gardenia jasminoides* Ellis on sleep: a pilot study. *Phytomedicine* 2010; 17:840-3

Laabich A, Vissvesvaran GP, Lieu KL, Murata K, McGinn TE, Manmoto CC, Kubota R. Protective effect of crocin against blue light- and white light-mediated photoreceptor cell death in bovine and primate retinal primary cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:3156-63

Lahti AC, Weiler MA, Michaelidis T, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25:455-67

Lechtenberg M, Schepmann D, Niehues M, Hellenbrand N, Wunsch B, Hensel A. Quality and functionality of saffron: quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and sigma1 (sigma-1) receptors. *Planta Med* 2008; 74:764-72

Lee I, Lee JH, Baek N, Kim D. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of gardenia jasminoides and its metabolite crocetin. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:2106-10

Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I, Perez-Diaz F, Chapouthier G. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67:739-48

Li N, Lin G, Kwan Y, Min Z. Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 849:349-55

Li CY, Huang WF, Wang QL, Wang F, Cai E, Hu B, Du JC, Wang J, Chen R, Cai XJ, Feng J, Li HH. Crocetin induces cytotoxicity in colon cancer cells via p53-independent mechanisms. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13:3757-61

Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry* 1999; 46:729-39

Lin D, Parsons LH. Anxiogenic-like effect of serotonin1B receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71:581-7

Liu N, Yang Y, Mo S, Liao J, Jin J. Calcium antagonistic effects of chinese crude drugs: Preliminary investigation and evaluation by  $^{45}\text{Ca}$ . *Appl Radiat Isot* 2005; 63:151-5

López JF, Akil H, Watson SJ. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry* 1999; 46:1461-71

Maccarone R, Di Marco S, Bisti S. Saffron supplement maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:1254-61

Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 1995; 69:89-98

Magesh V, Vijeya Singh JP, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Mol Cell Biochem* 2006; 287:127-35

Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. NMDA receptor function and human cognition: The effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14:301-7

Marek GJ, McDougle CJ, Price LH, Seiden LS. A comparison of trazodone and fluoxetine: Implications for a serotonergic mechanism of antidepressant action. *Psychopharmacology* 1992; 109:2-11

Martin JR, Ballard TM, Higgins GA. Influence of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71:615-25

Masaki M, Aritake K, Tanaka H, Shoyama Y, Huang ZL, Urade Y. Crocin promotes non-rapid eye movement sleep in mice. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:304-8

Mathew B. *Crocus sativus* and its allies (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 1977; 128:89-103

McDougle CJ, Barr LC, Goodman WK, Price LH. Possible role of neuropeptides in obsessive compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:1-24

McDougle CJ, Epperson CN, Pelton GH, Wasyluk S, Price LH. A double-blind, placebo-controlled study of risperidone addition in serotonin reuptake inhibitor-refractory obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:794-801

Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Rev* 2000; 31:288-94

Meng L, Cui L. Inhibitory effects of crocetin on high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Arch Pharmacol Res* 2008; 31:357-63

Menzies L, Chamberlain SR, Laird AR, Thelen SM, Sahakian BJ, Bullmore ET. Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: The orbitofronto-striatal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32:525-49

Micallef J, Blin O. Neurobiology and clinical pharmacology of obsessive-compulsive disorder. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24:191-207

Mir JI, Ahmed N, Wani SH, Rashid R, Mir H, Sheikh MA. In vitro development of microcorns and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.). *Physiol Mol Biol Plants* 2010; 16:369-73

Modabbernia A, Sohrabi H, Nasehi AA, Raisi F, Saroukhani S, Jamshidi A, Tabrizi M, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of saffron on fluoxetine-induced sexual impairment in men: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Psychopharmacology* 2012; 223:381-8

Modaghegh M, Shahabian M, Esmaeili H, Rajbai O, Hosseinzadeh H. Safety evaluation of saffron (*crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine* 2008; 15:1032-7

Modell JG, Mountz JM, Curtis GC, Greden JF. Neurophysiologic dysfunction in basal ganglia/limbic striatal and thalamocortical circuits as a pathogenetic mechanism of obsessive-compulsive disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1989; 1:27-36

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic transmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997; 17:2921-7

Mohajeri D, Mousavi G, Doustar Y. Antihyperglycemic and pancreas-protective effects of *crocus sativus* L. (saffron) stigma-ethanolic extract on rats with alloxan-induced diabetes. *J Biol Sci* 2009; 9:302-10

Monnikes H, Heymann-Monnikes I, Tache Y. CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. *Brain Res* 1992; 574:70-6

Moraga AR, Nohales PF, Pérez JAF, Gómez-Gómez L. Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *crocus sativus* stigmas. *Planta* 2004; 219:955-66

Morgan CJA, Mofeez A, Brandner B, Bromley L, Curran HV. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29:208-18

Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47:1909-13

Naghibi SM, Hosseini M, Khani F, Rahimi M, Vafae F, Rakhshandeh H, Aghaie A. Effect of Aqueous Extract of *Crocus sativus* L. on Morphine-Induced Memory Impairment. *Adv Pharmacol Sci* 2012; 2012:494367

Naghizadeh B, Mansouri SM, Mashhadian NV. Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48:2650-5

Naghizadeh B, Mansouri MT, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, Sarkaki A. Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats. *Phytomedicine* 2013; 20:537-42

Nair SC, Salomi MJ, Panikkar B, Panikkar KR. Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol* 1991; 31:75-83

Nair SC, Pannikar B, Panikkar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett* 1991; 57:109-14

Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, Jung WS, Cho KH, Park JH, Kang I, Hong JW, Lee EH. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 648:110-6.

Nemati H, Boskabady MH, Ahmadzadeh Vostakolaei H. Stimulatory effect of *Crocus sativus* (saffron) on  $\beta$ 2-adrenoceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine* 2008; 15:1038-45

Nicolini H, Arnold P, Nestadt G, Lanzagorta N, Kennedy JL. Overview of genetics and obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 2009; 170:7-14

Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol* 2005; 97:281-4

Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13:2305-9

O'Shea M, McGregor IS, Mallet PE. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar long-lasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol* 2006; 20:611-21

Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem Int* 2004; 44:321-30

Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of  $\alpha$ -tocopherol. *Neurosci Lett* 2004; 362:61-4

Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, Soeda S. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770:578-84

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52:998-1007

Olver JS, O'Keefe G, Jones GR, Burrows GD, Tochon-Danguy HJ, Ackermann U, Scott A, Norman TR. Dopamine D1 receptor binding in the striatum of patients with obsessive-compulsive disorder. *J Affect Disord* 2009; 114:321-6

Ordoudi SA, Befani CD, Nenadis N, Koliakos GG, Tsimidou MZ. Further examination of antiradical properties of *Crocus sativus* stigmas extract rich in crocins. *J Agric Food Chem* 2009; 57:3080-6



Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, Lamari FN. Inhibitory activity on amyloid- $\beta$  aggregation and antioxidant properties of crocus sativus stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem* 2006; 54:8762-8

Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50:1030-8

Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Van Tong H, Van Calsteren M. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J Agric Food Chem* 2000; 48:1455-61

Pitsikas N, Sakellaridis N. *Crocus sativus* L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* 2006; 173:112-5

Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res* 2007; 183:141-6

Pitsikas N, Boultadakis A, Sakellaridis N. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience* 2008; 154:454-60

Plessner O, Ziv M, Negbi M. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *J Plant Biotechnol* 1990; 20:89-94

Pogarell O, Hamann C, Pöpperl G, Juckel G, Choukèr M, Zaudig M, Riedel M, Möller H-, Hegerl U, Tatsch K. Elevated brain serotonin transporter availability in patients with obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 2003; 54:1406-13

Porter RHP, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, Adams DR, Sheardown MJ. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 1999; 128:13-20

Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (*crocus sativus* linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in swiss albino mice. *Phytother Res* 2003; 17:614-17

Premkumar K, Thirunavukkarasu C, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effect of saffron (*crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. *Hum Exper Toxicol* 2006; 25:79-84

Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2013; 16:206-10

Razoux F, Garcia R, Léna I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32:719-27

Richardson-Jones JW, Craige CP, Nguyen TH, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Guiard BP, Beck SG, Hen R, Leonardo ED. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci* 2011; 31:6008-18

Ruscio AM, Stein DJ, Chiu WT, Kessler RC. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the national comorbidity survey replication. *Mol Psychiatry* 2010; 15:53-63

Sams-Dodd F. Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: A possible animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol* 1996; 7:3-23

Sano K, Himeno H. In vitro proliferation of saffron (*crocus sativus* L.) stigma. *J Plant Biotechnology* 1987; 11:159-66

Sarma KS, Sharada K, Maesato K, Hara T, Sonoda Y. Chemical and sensory analysis of saffron produced through tissue cultures of *crocus sativus*. *J Plant Biotechnology* 1991; 26:11-16

Saxena S, Brody AL, Maidment KM, Dunkin JJ, Colgan M, Alborzian S, Phelps ME, Baxter Jr. LR. Localized orbitofrontal and subcortical metabolic changes and predictors of response to paroxetine treatment in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:683-93

Scarone S, Colombo C, Livian S, Abbruzzese M, Ronchi P, Locatelli M, Scotti G, Smeraldi E. Increased right caudate nucleus size in obsessive-compulsive disorder: Detection with magnetic resonance imaging. *Psychiatry Res* 1992; 45:115-21

Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr* 2007; 157:315-9

Schwartz JM. Neuroanatomical aspects of cognitive-behavioural therapy response in obsessive-compulsive disorder. an evolving perspective on brain and behaviour. *The Br J Psychiatry* 1998; (35):38-44

Shamsa A, Hosseinzadeh H, Molaei M, Shakeri MT, Rajabi O. Evaluation of *crocus sativus* L. (saffron) on male erectile dysfunction: A pilot study. *Phytomedicine* 2009; 16:690-3

Shen X, Lu Y, Qian Z. Effects of crocetin on the matrix metalloproteinases in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. *J Asian Nat Prod Res* 2006; 8:201-8

Shen X, Qian Z, Wang Y, Duan J. Crocetin attenuates norepinephrine-induced cytotoxicity in primary cultured rat cardiac myocytes by antioxidant in vitro. *J Asian Nat Prod Res* 2009; 11:417-25

Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase. *Eur J Pharmacol* 2006; 543:116-22

Sheng L, Qian Z, Shi Y, Yang L, Xi L, Zhao B, Ji H. Crocetin improves the insulin resistance induced by high-fat diet in rats. *Br J Pharmacol* 2008; 154:1016-24

Singh V, Singh SP, Chan K. Review and meta-analysis of usage of ginkgo as an adjunct therapy in chronic schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13:257-71

Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2012

Silvestre JS, Nadal R, Pallarés M, Ferré N. Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in wistar rats. *Depress Anxiety* 1997; 5:29-33

Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* 2001; 69:2887-98

Soeda S, Ochiai T, Shimeno H, Saito H, Abe K, Tanaka H, Shoyama Y. Pharmacological activities of crocin in saffron. *J Nat Med* 2007; 61:102-11

Sugiura M, Saito H, Abe K, Shoyama Y. Ethanol extract of *crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Phytother Res* 1995; 9:100-4

Swedo SE, Leonard HL, Kruesi MJP, Rettew DC, Listwak SJ, Berrettini W, Stipetic M, Hamburger S, Gold PW, Potter WZ, Rapoport JL. Cerebrospinal fluid neurochemistry in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49:29-36

Tamaddonfard E, Hamzeh-Gooshchi N. Effects of intraperitoneal and intracerebroventricular injection of crocin on acute corneal pain in rats. *Phytother Res* 2010; 24:1463-7

Tamaddonfard E, Hamzeh Gooshchi N, Seidnejad-Yamchi S. Central effect of crocin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Pharmacol Rep* 2012; 64:94-101

Tang FT, Qian ZY, Liu PQ, Zheng SG, He SY, Bao LP, Huang HQ. Crocetin improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta in hypercholesterolemic rabbit by increasing eNOS activity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:558-65

Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 1994; 664:55-61

Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *crocus sativus* L. *Anticancer Res* 1994;14:1913-18

Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:3443-7

Théberge J, Bartha R, Drost DJ, Menon RS, Malla A, Takhar J, Neufeld RW, Rogers J, Pavlosky W, Schaefer B, Densmore M, Al-Semaan Y, Williamson PC. Glutamate and glutamine measured with 4.0 T proton MRS in never-treated patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Am J Psychiatry* 2002; 159:1944-6

Thushara RM, Hemshekhar M, Santhosh MS, Jnaneshwari S, Nayaka SC, Naveen S, Kemparaju K, Girish KS. Crocin, a dietary additive protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis and inhibits platelet aggregation. *Mol Cell Biochem* 2013; 373:73-83

Tibbo P, Kroetsch M, Chue P, Warneke L. Obsessive-compulsive disorder in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2000; 34(2):139-46.

Tsantarliotou MP, Poutahidis T, Markala D, Kazakos G, Sapanidou V, Lavrentiadou S, Zervos I, Taitzoglou I, Sinakos Z. Crocetin administration ameliorates endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Blood Coagul Fibrinol* 2013; 24:305-10

Tseng T, Chu C, Huang J, Shioh S, Wang C. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett* 1995; 97:61-7

Ulas J, Cotman CW. Excitatory amino acid receptors in schizophrenia. *Schizophr Bull* 1993; 19:105-17

Umigai N, Murakami K, Ulit MV, Antonio LS, Shirotori M, Morikawa H, Nakano T. The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration. *Phytomedicine* 2011; 18:575-8

Vakili A, Einali MR, Bandegi AR. Protective Effect of crocin against cerebral ischemia in a dose-dependent manner in a rat model of ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2012

Van Wimersma Greidanus TB, Kroodsma JM, Pot MLH, Stevens M, Maigret C. Neurohypophyseal hormones and excessive grooming behaviour. *Eur J Pharmacol* 1990; 187:1-8

Venkatraman M, Konga D, Peramaiyan R, Ganapathy E, Dhanapal S. Reduction of mitochondrial oxidative damage and improved mitochondrial efficiency by administration of crocetin against benzo[a]pyrene induced experimental animals. *Biol Pharm Bull* 2008; 31:1639-45

Verma SK, Bordia A. Antioxidant property of Saffron in man. *Indian J Med Sci* 1998; 52:205-7

Vermetten E, Bremner JD. Circuits and systems in stress. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 2002; 16:14-38

Wang C, Hsu J, Lin J. Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoid). *Carcinogenesis* 1991; 12:1807-10

Wang C, Shiah H, Lin J. Modulatory effect of crocetin on aflatoxin B1 cytotoxicity and DNA adduct formation in C3H10T 1 2 fibroblast cell. *Cancer Lett* 1991; 56:1-10

Wang Y, Han T, Zhu Y, Zheng CJ, Ming QL, Rahman K, Qin LP. Antidepressant properties of bioactive fractions from the extract of *Crocus sativus* L. *J Nat Med* 2010; 64:24-30

Whiteside SP, Port JD, Abramowitz JS. A meta-analysis of functional neuroimaging in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 2004; 132:69-79

Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine* 2007; 14:633-36

Xi L, Qian Z, Xu G, Zheng S, Sun S, Wen N, Zhang Y. Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose-fed rats. *J Nutr Biochem* 2007; 18:64-72

Xiang M, Yang M, Zhou C, Liu J, Li W, Qian Z. Crocetin prevents AGEs-induced vascular endothelial cell apoptosis. *Pharmacol Res* 2006; 54:268-74

Xiang M, Qian Z, Zhou C, Liu J, Li W. Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *J Ethnopharmacol* 2006; 107:25-31

Xie Z, Commissaris RL. Anxiolytic-like effects of the noncompetitive NMDA antagonist MK 801. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43:471-7

Xu G, Qian Z, Yu S, Gong Z, Shen X. Evidence of crocin against endothelial injury induced by hydrogen peroxide in vitro. *J Asian Nat Prod Res* 2006; 8:79-85

Xu G, Gong Z, Yu W, Gao L, He S, Qian Z. Increased expression ratio of bcl-2/bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100:31-5

Xu G, Li G, Ma H, Zhong HAI, Llu FEI, Ao G. Preventive effect of crocin in inflamed animals and in LPS-challenged RAW 264.7 cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57:8325-30

Yamauchi M, Tsuruma K, Imai S, Nakanishi T, Umigai N, Shimazawa M, Hara H. Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur J Pharmacol* 2011; 650:110-19

Yamada S, Yamauchi K, Yajima J, Hisadomi S, Maeda H, Toyomasu K, Tanaka M. Saliva level of free 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) as a biological index of anxiety disorders. *Psychiatry Res* 2000; 93:217-23

Yan J, Qian Z, Sheng L, Zhao B, Yang L, Ji H, Han X, Zhang R. Effect of crocetin on blood pressure restoration and synthesis of inflammatory mediators in heart after hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Shock* 2010; 33:83-7

Yang R, Tan X, Thomas AM, Shen J, Qureshi N, Morrison DC, Van Way CW. Crocetin inhibits mRNA expression for tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic shock. *J Parent Enter Nutr.* 2006; 30:297-301

Yang L, Qian Z, Yang Y, Sheng L, Ji H, Zhou C, Kazi HA. Involvement of Ca<sup>2+</sup> in the inhibition by crocetin of platelet activity and thrombosis formation. *J Agric Food Chem* 2008; 56:9429-33



Yang L, Qian Z, Ji H, Yang R, Wang Y, Xi L, Sheng L, Zhao B, Zhang X. Inhibitory effect on protein kinase C  $\theta$  by crocetin attenuates palmitate-induced insulin insensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 2010; 642:47-55

Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology of schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:2011–35

Young R, Johnson DN. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 1991; 40:739-43

Zanoli P, Rivasi M, Baraldi C, Baraldi M. Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats. *Behav Pharmacol* 2002; 13:645-51

Zhang R, Qian Z, Han X, Chen Z, Yan J, Hamid A. Comparison of the effects of crocetin and crocin on myocardial injury in rats. *Chin J Nat Med* 2009; 7:223-7

Zhang XY, Yao JK. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013 Mar 21

Zheng S, Qian Z, Tang F, Sheng L. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol* 2005; 70:1192-9

Zheng S, Qian Z, Sheng L, Wen N. Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47:70-6

Zheng S, Qian Z, Wen N, Xi L. Crocetin suppresses angiotensin II-induced vascular smooth-muscle cell proliferation through inhibition of ERK1/2 activation and cell-cycle progression. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50:519-25

Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, Xu L. Effects and mechanism of Weinaokang on reperfusion-induced vascular injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Chin J Integr Med* 2010; 16:145-50

Zhou C, Qian Z, Zheng S, Xiang M. ERK1/2 pathway is involved in the inhibitory effect of crocetin on angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacology* 2006; 535:61-8

Zhou CH, Xiang M, He SY, Qian ZY. Crocetin inhibits cell cycle G1/S transition through suppressing cyclin D1 and elevating p27kip1 in vascular smooth muscle cells. *Phytother Res* 2010; 24:975-81

Zhou CH, Xiang M, He SY, Qian ZY. Protein kinase C pathway is involved in the inhibition by crocetin of vascular smooth muscle cells proliferation. *Phytother Res* 2010; 24:1680-6

Zohar J, Mueller EA, Insel TR, Zohar-Kadouch RC, Murphy DL. Serotonergic responsivity in obsessive-compulsive disorder comparison of patients and healthy controls. *Arch Gen Psychiatry* 1987; 44:946-51