



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ Ή ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΗΣ  
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ  
ΚΡΟΚΟΥ, ΚΡΟΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΣΑΦΡΑΝΑΛΗΣ”**

*(Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών, Μοριακού  
Modeling και σχεδιασμού Φαρμάκων του Συμεωνίδειου  
Ερευνητικού Κέντρου του Θεαγενείου Νοσοκομείου  
Θεσσαλονίκης- Υπεύθυνος: Δρ. Γεώργιος Γερομιχαλός, Ph.D.)*

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΑΛΜΠΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΕΜ 406**

**ΛΑΡΙΣΑ 2013**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ Ή ΚΑΙ  
ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ  
ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΚΡΟΚΟΥ, ΚΡΟΚΙΝΗ ΚΑΙ  
ΣΑΦΡΑΝΑΛΗ**

(Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών, Μοριακού Modeling και Σχεδιασμού Φαρμάκων του Συμεωνίδειου Ερευνητικού Κέντρου του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης – Υπεύθυνος: Δρ. Γεώργιος Γερομιγαλός, Ph.D.)

**Επιβλέπων: Δρ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**  
**Φοιτητής: ΑΛΜΠΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΕΜ: 406**

**Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:**

.....

Κουρέτας Δημήτριος

**Καθηγητής Π.Θ.**

.....

Στάγκος Δημήτριος

**Λέκτορας Π.Θ.**

.....

Αμούτζιας Γρηγόριος

**Λέκτορας Π.Θ.**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την επίβλεψη αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να την εκπονήσω στο Εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών, Μοριακού Modeling και Σχεδιασμού Φαρμάκων του Συμεωνίδειου Ερευνητικού Κέντρου του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Στη συνέχεια, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υπεύθυνο του Εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών, Μοριακού Modeling και Σχεδιασμού Φαρμάκων του Συμεωνίδειου Ερευνητικού Κέντρου του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης κ. Γερομιχαλό Γεώργιο για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε. Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας ήταν πάντα διαθέσιμος να ασχοληθεί με κάθε απορία μου σχετική με ακαδημαϊκά ζητήματα, εντός και εκτός των πλαισίων της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για τις ιδέες που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας και για όλες τις ερευνητικές συζητήσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσα στα πλαίσιά της.

Σε αυτό το σημείο θέλω να αναφέρω ανθρώπους, εκτός του στενού ακαδημαϊκού περιβάλλοντος, που υπήρξαν σημαντικοί πόλοι στη ζωή μου, προσδίδοντας την απαιτούμενη ισορροπία. Θέλω αρχικά να ευχαριστήσω την Σμπρίνη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθειά της στη δημιουργία του εξωφύλλου της παρούσας εργασίας. Βέβαια, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στα μέλη της οικογένειάς μου, των οποίων η πίστη στις δυνατότητες μου αποτέλεσε αρωγός σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου. Τους ευχαριστώ επίσης για την υπομονή τους, καθώς και για την στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των ακαδημαϊκών μου σπουδών. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους οι οποίοι ήταν και είναι πάντοτε δίπλα μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Γενικά</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Ιστορικά στοιχεία</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Συστατικά του κρόκου</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου</b> .....	<b>6</b>
1.4.1 Αντιοξειδωτική δράση .....	8
1.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση .....	8
1.4.3 Αντιυπερτασική δράση .....	8
1.4.4 Αντιεπιληπτική δράση .....	9
1.4.5 Αντιβηχική δράση .....	9
1.4.6 Αντιγονοτοξική και κυτταροτοξική δράση του κρόκου .....	10
1.4.7 Επίδραση στη σεξουαλική συμπεριφορά .....	10
1.4.8 Αγχολυτική δράση .....	11
1.4.9 Αναλγητική δράση .....	11
1.4.10 Επίδραση στη μαθησιακή συμπεριφορά και ενδυνάμωση της μακροχρόνιας μνήμης .....	12
1.4.11 Αντικαταθληπτική δράση .....	12
1.4.12 Μυοχαλαρωτική δράση .....	12
<b>1.5 Αντικαρκινικές ιδιότητες του κρόκου</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6 Καρκίνος</b> .....	<b>15</b>
1.6.1 Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των εξαλλαγμένων κυττάρων .....	16
1.6.2 Μηχανισμός προαγωγής της καρκινογένεσης .....	17
1.6.3 Μεταλλαξιγόνα .....	17
1.6.4 Αντικαρκινικά φάρμακα .....	18
1.6.5 Παρενέργειες .....	19
<b>1.7 Σκοπός</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Χειρισμός κυττάρων</b> .....	<b>21</b>

2.3	Πείραμα για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος και των συστατικών του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. ....	24
2.4	Προετοιμασία διαλυμάτων των συστατικών και εκχυλισμάτων, υδατικού και αλκοολικού, του κρόκου. ....	26
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>30</b>
3.1	Επίδραση της κροκίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	30
3.2	Επίδραση της σαφρανάλης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	33
3.3	Επίδραση της κροκετίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	37
3.4	Επίδραση του αλκοολικού εκχυλίσματος του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	41
3.5	Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	43
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση .....</b>	<b>45</b>
4.1	Για την κροκίνη .....	45
4.2	Για τη σαφρανάλη .....	45
4.3	Για την κροκετίνη .....	46
4.4	Για το αλκοολικό εκχύλισμα .....	46
4.5	Για το υδατικό εκχύλισμα .....	47
4.6	Σύγκριση δράσης κροκίνης, σαφρανάλης και κροκετίνης για κάθε κυτταρική σειρά .....	47
4.7	Σύγκριση δράσης αλκοολικού και υδατικού εκχυλίσματος για κάθε κυτταρική σειρά .....	49
<b>5.</b>	<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>50</b>

# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **Ο Μύθος του Κρόκου**

Καθώς ο Ερμής εξασκούνταν στη δισκοβολία, πλήγωσε θανάσιμα το θνητό φίλο του Κρόκο. Τι ντροπή! Πως αυτός, ένας θεός, σκότωσε έναν άνθρωπο! Ο Ερμής στεναχωρέθηκε αφάνταστα. Έτσι, αποφάσισε να χαρίσει την αθανασία στον Κρόκο μεταμορφώνοντας το άψυχο κορμί σ' ένα πανέμορφο μοβ λουλούδι και το αίμα του κρόκου σε τρία κόκκινα στίγματα στην καρδιά του λουλουδιού. Από τότε, κάθε φθινόπωρο, τα λουλούδια του Κρόκου σκεπάζουν τη γη της Κοζάνης, στη Δυτική Μακεδονία, μ' ένα μοβ χαλί και γεμίζουν τον αέρα με το λεπτό άρωμά τους.[1]

### **1.1 Γενικά**

Ο Κρόκος ο ήμερος ή *Crocus sativus* L. στην επιστημονική του ονομασία, αποτελεί ένα από τα πιο σπάνια προσφιλή και πολύτιμα μπαχαρικά καθώς και γνωστό φυτό για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Τα αποξηραμένα στίγματα του λουλουδιού αποτελούν το γνωστό σε όλους μας σαφράν ή ζαφορά ή σαφράνι, Μέσα από χρόνιες έρευνες έχουν διαπιστωθεί οι διάφορες αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές καθώς και αντικαρκινικές δράσεις του κρόκου. Παράλληλα όμως χρησιμεύει στη ζαχαροπλαστική, στην τυροκομία, στην ποτοποιία ακόμα και στη ζωγραφική.

Πιο συγκεκριμένα, ο κρόκος Κοζάνης εδώ και τριακόσια περίπου χρόνια καλλιεργείται αποκλειστικά σε μερικά χωριά του Ν. Κοζάνης, όπως οι Κρόκοι Καρυδίτσας, Αγίας Παρασκευής, Άνω και Κάτω Κώμης, Λευκοπηγής, Πετρανά κ.α. και ξεχωρίζει σαφώς για την άριστη ποιότητα του, που τον κατατάσσει στην πρώτη κατηγορία κρόκου βιολογικής καλλιέργειας σε όλο τον κόσμο [2]. Αξίζει να αναφερθεί ότι το Ιράν παράγει 300 τόνους σαφράν, η Ινδία 4 τόνους, η Ελλάδα 2,5 τόνους, Ισπανία 400 κιλά και η Ιταλία 200 κιλά. Αρα η χώρα μας είναι η τρίτη παραγωγός κρόκου σε όλο τον κόσμο [3].

Οι κάτοικοι της περιοχής φυτεύουν τον κρόκο κάθε καλοκαίρι. Με την άφιξη του φθινοπώρου, κατά τα μέσα του Οκτώβρη, τα λουλούδια που αρχίζουν να βγαίνουν

μαζεύονται από συντροφιάς γυναικών, μέσα σε ποδιές ή καλάθια και μεταφέρονται στα σπίτια τους, για τη βασική και λεπτή εργασία της ξήρανσης τους. Στη συνέχεια και μετά το τέλος της διαδικασίας της αποξηράνσης αρχίζει το ξεχώρισμα των κόκκινων στιγμάτων από τους κίτρινους στήμονες, την γύρη και τις ξένες προσμίξεις. Η εργασία αυτή γίνεται με το χέρι και διαρκεί από 20 έως και 60 ημέρες. Στη συνέχεια το ξερό προϊόν τοποθετείται χωριστά το κόκκινο από το κίτρινο σε δοχεία, έτσι ώστε να είναι έτοιμο για παράδοση στην αγορά. Αξίζει να αναφερθεί πως χρειάζονται 50.000 περίπου στίγματα για να προκύψουν μόλις 100 γραμμάρια κόκκινου κρόκου.

Ο Κρόκος συναντάται σε δύο μορφές, σε ειδικές συσκευασίες. Κατά κανόνα, με τη μορφή ευλύγιστης, χαλαρής, ελαστικής και υγροσκοπικής μάζας από ολόκληρα νήματα που προέρχονται από τα αποξηραμένα στίγματα των λουλουδιών του *Crocus Sativus* Linneaus και με την μορφή σκόνης, ύστερα από άλεσμα των κόκκινων νημάτων του. Ακόμη χώρες όπως Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία, Ελβετία, Αγγλία, Γερμανία, Σκανδιναβικές και Κάτω Χώρες, οι Η.Π.Α., η Σαουδική Αραβία, το Κουβέιτ, η Βραζιλία, Αργεντινή, Ιαπωνία και άλλες αποτελούν καταναλώτριες χώρες του κρόκου και χώρες που χρησιμοποιούν τον κρόκο κυρίως στη παραδοσιακή τους κουζίνα [2].

## 1.2 Ιστορικά στοιχεία

Η λέξη "κρόκος" αυτούσια ή σε παράγωγό της με την έννοια του φυτού, του άνθους της χρωστικής ουσίας, του μύρου ή του βοτάνου - φαρμάκου, μας είναι γνωστή από τα πρώτα ακόμα κείμενα του κόσμου. Σαν μύρο και άνθος τη συναντάμε αυτούσια στο βιβλίο παροιμιών και του άσματος Γ' της Παλαιάς Διαθήκης. Αυτούσια επίσης, με την σημασία του φυτού ή του χρωματισμού, τη βρίσκουμε στους Όμηρο, Σοφοκλή, Θεόφραστο, Αισχύλο, Αριστοφάνη και Στράβωνα.

Παράλληλα με τις παραπάνω έννοιες, η ίδια λέξη χρησιμοποιήθηκε από μερικούς κλασικούς μας ποιητές, Όμηρο, Σοφοκλή κ.α., που τους μιμήθηκαν αργότερα και ορισμένοι νεώτεροι για τη λογοτεχνική περιγραφή ή παρομοίωση κάποιου αντικειμένου, ειδικότερα δε της αυγής.

Η ίδια λέξη, με τις παραπάνω έννοιες, ήταν γνωστή και σε άλλους αρχαίους λαούς, όπως τους Αιγύπτιους, Εβραίους και Ρωμαίους (Βιργίλιο, Πλίνιο, Οβίντιο, κ.α.). Οποσδήποτε όμως διατήρησε αδιαφιλονίκητα την Ελληνικότητά της αφού ετυμολογικά προέρχεται από την επίσης Ελληνική λέξη "κρόκη" (Νήμα - Υφάδι που με την σαΐτα πλέκεται στο στημόνι) [4].

Ο κρόκος σαν φυτό χρωστική ουσία, φάρμακο, βότανο ή άρτυμα, ήταν γνωστός τόσο στην αρχαία Ελλάδα όσο και στους άλλους αρχαίους λαούς. Σχετικά όμως με την προέλευση και καλλιέργεια του φυτού, οι γνώμες όλων όσων έχουν ασχοληθεί κατ' οποιονδήποτε τρόπο μαζί του, διαφέρουν, χωρίς κανένας να υποστηρίζει με θετικά στοιχεία την άποψή του.

Ορισμένοι υποστηρίζουν πως ο κρόκος είναι ιθαγενές φυτό της Ανατολής, όπου έγινε και η πρώτη καλλιέργειά του. Από κει δε μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από τους σταυροφόρους κατά τον 13ο μ.χ. αιώνα. Άλλοι πως κατάγεται από την Ελλάδα, στην οποία και πρωτοκαλλιεργήθηκε κατά την μεσομινωϊκή περίοδο. Την άποψη αυτή ενισχύει μία τοιχογραφία εκείνης της εποχής (1600 π.χ.) "Ο ΚΡΟΚΟΣΥΛΛΕΚΤΗΣ", που βρέθηκε στα ανάκτορα της Κνωσού Κρήτης, παριστάνοντας νεαρό ή νεαρή, κατ' άλλους πίθηκο, που μαζεύει λουλούδια κρόκου σε κόνιστρο



Ακόμα υποστηρίζεται ότι με την κροκοκαλλιέργεια καταγίνονταν οι Έλληνες τόσο κατά τους Μακεδονικούς, όσο και κατά τους Βυζαντινούς χρόνους. Με τις εκστρατείες μάλιστα του Μ.Αλεξάνδρου διαδόθηκε στην Ανατολή.



Το θετικότερο που γνωρίζουμε, σχετικά με την ιστορία αυτού του φυτού, είναι ότι οι Άραβες αφού συστηματοποίησαν την καλλιέργειά του και χρησιμοποίησαν τη δρογή του όχι μόνο σαν μπαχαρικό αλλά κυρίως σαν φάρμακο, την έφεραν στην Ισπανία κατά το 960 μ.χ. από όπου μεταδόθηκε άμεσα ή έμμεσα και σε άλλα κράτη της Ευρώπης.

Η σημερινή πάντως καλλιέργεια του κρόκου στην Ελλάδα (περιοχή Κοζάνης) έχει εισαχθεί από την Αυστρία κατά το 17ο αιώνα. Πιο συγκεκριμένα, τη μετέφεραν Κοζανίτες έμποροι, που εκείνη την εποχή διατηρούσαν στενές εμπορικές σχέσεις με την Αυστρία [5].

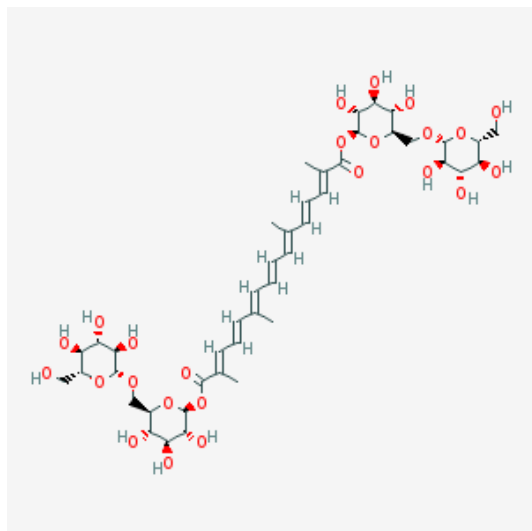


### 1.3 Συστατικά του κρόκου

Οι χρωστικές, μυρεψικές, αρτυματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου οφείλονται σε δύο βασικά (δρώντα) συστατικά του, την πικροκροκίνη και την κροκίνη και ιδιαίτερα στα άγλυκα μέρη αυτών δηλ. στην σαφραναλή του πρώτου και στην κροκετίνη του δεύτερου. Αλλα συστατικά του κρόκου αποτελούν η λυκοπίνη, η ζεαξανθίνη, το καροτένιο α-β και γ, η βιταμίνη Β και Β2, οι υδατάνθρακες και το αιθέριο έλαιο.

Από την πικροκροκίνη με ενζυματική υδρόλυση παίρνουμε το άγλυκο μέρος, που με οξείδωση σχηματίζεται σε σαφρανάλη, που είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου, όπου και οφείλεται η χαρακτηριστική μυρωδιά του κρόκου.

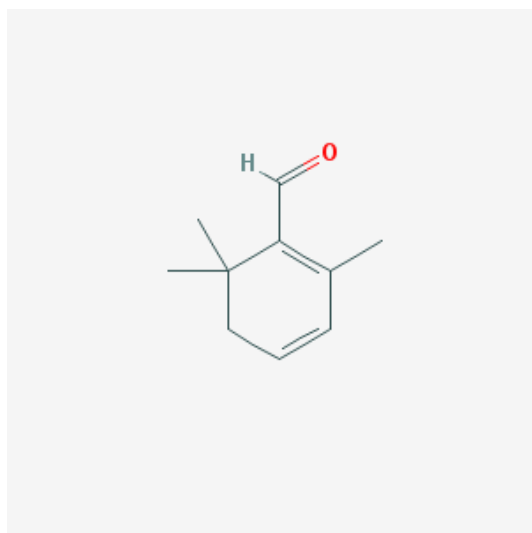
Από την κροκίνη πάλι με οξύ παίρνουμε το άγλυκο μέρος, την κροκετίνη, που αποτελεί την κύρια χρωστική ουσία του προϊόντος. Στο εμπόριο τα ποσοστά του αιθέριου ελαίου και της χρωστικής δύναμης του κρόκου (που πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερα), προσδιορίζουν βασικά την ποιότητά του [6].



#### Εικ.1.1 Κροκίνη

Γνωστή και ως: alpha-Crocin, Gardenia Yellow, Crocin 1, Saffron, Crocetin digentiobiose ester, Crocetin bis(gentiobiosyl) ester, CCRIS 678, CCRIS 7705

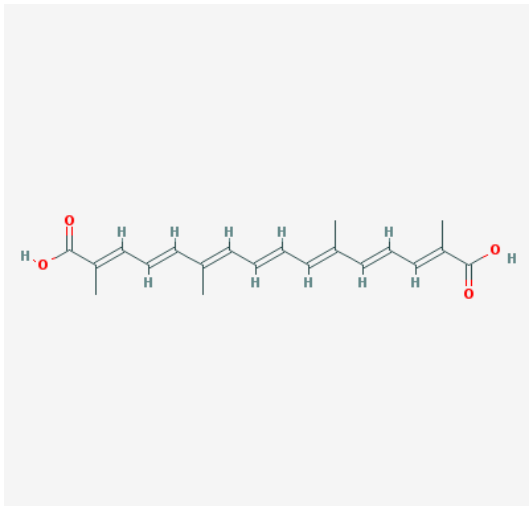
Μοριακός Τύπος:  $C_{44}H_{64}O_{24}$  Μοριακό Βάρος: 976.96456 [7]



#### Εικ.1.2 Σαφρανάλη

Γνωστή και ως: Dehydro-beta-cyclocitral, 2,3-Dihydro-2,2,6-trimethylbenzaldehyde, 1,3-CYCLOHEXADIENE-1-CARBOXALDEHYDE, 2,6,6-TRIMETHYL-, FEMA No. 3389

Μοριακός Τύπος:  $C_{10}H_{14}O$  Μοριακό Βάρος: 150.21756 [8]



### Εικ.1.3 Κροκετίνη

**Γνωστή και ως:** 8,8'-Diapocarotenedioic acid, trans-Crocetin, Natural yellow 6, CHEBI:3918, 8,8'-Diapocarotene-8,8'-dioic acid

**Μοριακός Τύπος:** C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> **Μοριακό Βάρος:** 328.40216 [9]

## 1.4 Φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου

Για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου μίλησε σε ημερίδα με θέμα «Καρδιά και διατροφή» στο Ηράκλειο της Κρήτης, που πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2004 από το Ελληνικό Ίδρυμα Καρδιολογίας, τον Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Σύλλογο και τον Φαρμακευτικό Σύλλογο Ηρακλείου, ο καθηγητής Αιματολογίας του Α.Π.Θ. κ Ζαχαρίας Σινάκος, καθώς και ο Δρ. Γεώργιος Γερομιχαλός στο 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φαρμακολογικό Συνέδριο, που πραγματοποιήθηκε το Μάιο του 2012 στη Θεσσαλονίκη και στο 23ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, που διεξήχθη το Νοέμβριο του 2012 στη Θεσσαλονίκη. «Ο κρόκος θεωρείται ένα από τα πιο ενδιαφέροντα φαρμακευτικά φυτά. Για τις θεραπευτικές του εφαρμογές υπάρχουν αναφορές ήδη 1.500 χρόνια π.χ. σε Αιγυπτιακό πάπυρο. Ο Ιπποκράτης, ο Γαληνός, ο Διοσκουρίδης και άλλοι στην αρχαιότητα τον συνιστούν ως παυσίπονο, αντιπυρετικό, υπναγωγό, εμμηναγωγό, επουλωτικό. Στην Κίνα χρησιμοποιείται και σήμερα εμπειρικά σε πυρετό, αμηνόρροια, φλεβική στάση, έλκη, στηθάγχη.

Η σύγχρονη ιατρική έδειξε μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου.

Η σχετική έρευνα είναι συνεχής και πολύπλευρη. Και η βιβλιογραφία εμπλουτίζεται συνεχώς από ενδιαφέρουσες πειραματικές παρατηρήσεις.

Εν τούτοις όπως αναφέρουν οι «Fatechi et al», οι δραστικές ουσίες δεν είναι στο σύνολο τους γνωστές και ο μηχανισμός δράσης τους σε πολλά σημεία αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας. Οπωσδήποτε τα πιο γνωστά παράγωγα του κρόκου είναι η κροκίνη, η κροκετίνη, η πικρο- κροκίνη και η σαφρανάλη, από τα παράγωγα αυτά το πιο μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κροκίνες λόγω και της μεγάλης υδατοδιαλυτότητάς τους.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η βιβλιογραφία είναι πλούσια σε παρατηρήσεις που περιγράφουν βιολογικές δραστηριότητες του κρόκου. Μια κατ' αρχήν προσπάθεια κωδικοποίησης των δράσεων αυτών, των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του κρόκου, θα επιχειρήσουμε στη σύντομη αυτή ανασκόπηση.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ιδιότητες αυτές στις περισσότερες περιπτώσεις χρεώνονται στο σύνολο του κρόκου (κόκκινα στίγματα) (saffron). Σε μικρό αριθμό παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο παράγωγο και κυρίως οι κροκίνες, λόγω και της υδατοδιαλυτότητάς τους. Αυτό αποτελεί ίσως και μια από τις βασικές αιτίες που δυσχεραίνει τη διακρίβωση του μηχανισμού δράσης του κρόκου.

Οι πιο γνωστές και χαρακτηριστικές ιδιότητες του κρόκου είναι:

- Ασκήν αντιοξειδωτική δράση
- Ασκήν αντιφλεγμονώδη δράση
- Ασκήν αγγειοδιασταλτική δράση
- Αναστέλλει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων
- Αναστέλλει την δράση της τοποϊσομεράσης
- Αναστέλλει την δράση της τυροσινάσης
- Βελτιώνει την εγκεφαλική λειτουργία

Κάθε μια από τις ιδιότητες αυτές χωριστά, ή και σε συνδυασμό, προσδιορίζει και τις διαπιστωμένες σε πειραματικά επίπεδο θεραπευτικές δράσεις του κρόκου».

Παρακάτω ακολουθεί σύντομη αναφορά σε μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές φαρμακευτικές ιδιότητες του κρόκου.

#### **1.4.1 Αντιοξειδωτική δράση**

Ως πιο ενδιαφέρουσα από τις βιολογικές ιδιότητες του κρόκου θα μπορούσε να χαρακτηριστεί η αντιοξειδωτική. Είναι γνωστό πόση σημασία αποδίδει σήμερα η ιατρική στο «οξειδωτικό stress» και γενικότερα στις ελεύθερες ρίζες. Σειρά από παθολογικές καταστάσεις συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με την παρέμβαση, την συμμετοχή των ριζών αυτών. Γι' αυτό είναι και μεγάλο το ενδιαφέρον για τη αναστολή τους.

#### **1.4.2 Αντιφλεγμονώδης δράση**

Οι επιδράσεις του υδατικού και αλκοολικού εκχυλίσματος από στίγματα και πέταλα κρόκου μελετήθηκαν σε ποντίκια. Η αντιφλεγμονώδης δράση των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται στο περιεχόμενό τους σε φλαβονοειδή, τανίνες, ανθοκυανίνες, αλκαλοειδή και σαπωνίνες. Μόνο τα εκχυλίσματα από στίγματα κρόκου παρουσίασαν ασθενή έως μέτρια δράση απέναντι σε οξεία φλεγμονή. Για την περίπτωση της χρόνιας φλεγμονής το υδατικό και αλκοολικό εκχύλισμα από στίγματα, καθώς και το αλκοολικό εκχύλισμα από πέταλα κρόκου, άσκησαν αντιφλεγμονώδη δράση, σε αντίθεση με το υδατικό εκχύλισμα από πέταλα το οποίο δεν παρουσίασε καμία σημαντική δράση. Σε υψηλότερες δόσεις το υδατικό και αλκοολικό εκχύλισμα από στίγματα επέδειξε σημαντική δράση απέναντι στην οξεία φλεγμονή. Το συμπέρασμα λοιπόν που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι τα υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα από στίγματα και πέταλα κρόκου παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση ενάντια σε περιπτώσεις οξείας ή / και χρόνιας φλεγμονής.

#### **1.4.3 Αντιυπερτασική δράση**

Οι Fatehi and others ερεύνησαν την επίδραση του εκχυλίσματος πετάλων του κρόκου σε σχέση με την αρτηριακή πίεση σε αναισθητοποιημένα ποντίκια, όπως επίσης

εξέτασαν την απόκριση του απομονωμένου σπερματικού πόρου επίμυος και ειλεού ινδικού χοιριδίου που προκαλείται από διέγερση ηλεκτρικού πεδίου (EFS). Το υδατικό και αλκοολικό εκχύλισμα των πετάλων του κρόκου μείωσε την αρτηριακή πίεση με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Χορήγηση 50 mg/g από το υδατικό εκχύλισμα άλλαξε την τιμή της αρτηριακής πίεσης από  $133.5 \pm 3.9$  σε  $117 \pm 2.1$  (mmHg). Αυτή η μείωση μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του εκχυλίσματος των πετάλων είτε στην καρδιά καθαυτή, είτε στην ολική περιφερική αντίδραση, είτε και στα δύο. Οι επιπτώσεις του εκχυλίσματος στην ολική περιφερική αντίδραση φαίνεται να είναι πιο σημαντικές. Στον απομονωμένο σπερματικό πόρο επίμυος, οι συστατικές αποκρίσεις στην EFS μειώθηκαν λόγω της χρήσης του εκχυλίσματος των πετάλων. Επιπλέον οι συσπάσεις του σπερματικού πόρου μετριάζονται μέσω ενός συνδυασμού νοραδρεναλίνης και απελευθέρωσης ATP ως συνδιαβιβαστές από τα συμπαθητικά νεύρα. Το αλκοολικό εκχύλισμα επάγει μεγαλύτερες αλλαγές στην EFS στον απομονωμένο σπερματικό πόρο επίμυος και τον ειλεό ινδικού χοιριδίου από το υδατικό εκχύλισμα.

#### **1.4.4 Αντιεπιληπτική δράση**

Οι αντιεπιληπτικές δράσεις των συστατικών των στιγμάτων του κρόκου, σαφρανάλης και κροκίνης, αξιολογήθηκαν σε ποντίκια με την πρόκληση σπασμών προκαλούμενων από πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Η σαφρανάλη (0.15 και 0.35 ml/kg σωματικού βάρους, i.p.) μείωσε τη διάρκεια των επιληπτικών κρίσεων, καθυστέρησε την έναρξη των τονικών σπασμών, και απέτρεψε τον θάνατο των ποντικών. Η κροκίνη (22 mg/kg, i.p.) δεν έδειξε καμία αντιεπιληπτική δράση.

#### **1.4.5 Αντιβηχική δράση**

Η αντιβηχική δράση των εκχυλισμάτων των στιγμάτων και των πετάλων του κρόκου και των συστατικών του, σαφρανάλης και κροκίνης, αξιολογήθηκε με βάση τη χρήση του nebolized διαλύματος κιτρικού οξέος 20% σε ινδικά χοιρίδια. Το αλκοολικό εκχύλισμα του κρόκου (100-800 mg/kg) και η σαφρανάλη (0.25-0.75 ml/kg) μείωσαν τον αριθμό του βήχα. Το αλκοολικό και το υδατικό εκχύλισμα των πετάλων και της κροκίνης δεν έδειξαν καμία αντιβηχική δράση.

#### **1.4.6 Αντιγονοτοξική και κυτταροτοξική δράση του κρόκου**

Η γνωστή και περισσότερο μελετημένη θεραπευτική δράση του κρόκου, που συνδέεται ενδεχομένως με την αντιοξειδωτική δράση του, είναι η αντικαρκινική. Οι σχετικές αναφορές είναι πράγματι πολλές τόσο σε κυτταρικό επίπεδο (9), όσο και σε πειραματικές νεοπλασίες (in vivo). Ασκίτης από «σάρκωμα 180», ασκίτης από καρκίνο του Ehrlich, ασκίτης από λέμφωμα (6), αδenoκαρκίνωμα του εντέρου (10), κ.α. απαντούν στην χορήγηση του κρόκου ή κροκίνης [10]. Η αντιμεταλλαξιγόνος, η μεταλλαξιγόνος και η κυτταροτοξική δράση του κρόκου εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας το τεστ Ames/Salmonella, δυο γνωστά μεταλλαξιγόνα (BP, 2AA), την in vitro διαδικασία σχηματισμού αποικίας, και τέσσερις διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές δυο φυσιολογικές (CCD-18LU) και δυο κακοήθεις (Hela,a-204 and Herg2). Όταν χρησιμοποιήθηκε το TA98 στέλεχος στο τεστ Ames/Salmonella, ο κρόκος έδειξε μη μεταλλαξιγόνο καθώς και μη αντιμεταλλαξιγόνο δράση ενάντια στην επαγόμενη από BP μεταλλαξιγένεση και επιπλέον επέδειξε δόσοεξαρτώμενη συν-μεταλλαξιγόνο δράση στην επαγόμενη από 2-AA αντι-μεταλλαξιγόνο δράση. Το υπεύθυνο συστατικό για αυτή την ασυνήθη συν-μεταλλαξιγόνο δράση ήταν η σαφρανάλη. Στην in vitro δοκιμασία σχηματισμού αποικίας, ο κρόκος επέδειξε μια δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική επίδραση μόνο απέναντι στα κακοήθη κύτταρα. Όλα τα απομονωμένα καροτενοειδή συστατικά του κρόκου καταδεικνύουν κυτταροτοξική δράση ενάντια σε in vitro κύτταρα όγκου. Τα παράγωγα της κροκίνης είχαν ισχυρότερη ανασταλτική δράση στον σχηματισμό αποικιών από καρκινικά κύτταρα. Η συνολική εκτίμηση για τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι ο κρόκος καθαυτός καθώς και τα καροτενοειδή συστατικά του μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας εν δυνάμει αντικαρκινικός παράγοντας.

#### **1.4.7 Επίδραση στη σεξουαλική συμπεριφορά**

Οι αφροδισιακές επιδράσεις του υδατικού εκχυλίσματος των στιγμάτων του κρόκου καθώς και των συστατικών του, σαφρανάλης και κροκίνης, αξιολογήθηκαν σε αρσενικά ποντίκια. Υδατικό εκχύλισμα (80, 160, και 320 mg/kg σωματικού βάρους), κροκίνη (100, 200, και 400 mg/kg σωματικού βάρους), σαφρανάλη (0.1, 0.2, και 0.4 ml/kg), sildenafil (60 mg/kg σωματικού βάρους, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας), και saline χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε αρσενικά ποντίκια. Η συχνότητα ζευγαρώματος (MF), mount latency (ML), intromission latency (IL), and

ejaculation latency (EL) αποτέλεσαν παράγοντες που αξιολογήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης της σεξουαλικής συμπεριφοράς. Η κροκίνη, σε όλες τις δόσεις, και το εκχύλισμα, ειδικά σε δόσεις των 160 και 320 mg/kg σωματικού βάρους, αύξησαν τις MF, IF, και EF συμπεριφορές και μείωσαν τις EL, IL, και ML παραμέτρους. Η σαφρανάλη δεν επέδειξε κάποια αφροδισιακή δράση. Η μελέτη παρουσίασε την αφροδισιακή δράση του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου καθώς και της κροκίνης.

#### **1.4.8 Αγγολυτική δράση**

Η συγκεκριμένη μελέτη σχεδιάστηκε για τη διερεύνηση των πιθανών αγγολυτικών ιδιοτήτων των κροκινών σε τρωκτικά. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε το light/dark test. Είτε η κροκίνη, σε δόση που δεν επηρεάζει την κινητική δραστηριότητα των ζώων (50 mg/kg), είτε η διαζεπάμη (1.5 mg/kg), αύξησαν την καθυστέρηση της εισόδου στο σκοτεινό διαμέρισμα και επιμήκυναν το χρόνο παραμονής στο φωτεινό θάλαμο για τους αρουραίους. Αντιθέτως, χαμηλότερες δόσεις κροκίνης (15-30 mg/kg) δεν τροποποίησαν τη συμπεριφορά των ζώων. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι η αγωγή με τα συγκεκριμένα δραστικά συστατικά του κρόκου επάγουν αγγολυτικές επιδράσεις σε αρουραίους.

#### **1.4.9 Αναλγητική δράση**

Οι επιδράσεις του υδατικού και αλκοολικού εκχυλίσματος από στίγματα και πέταλα κρόκου μελετήθηκαν σε ποντίκια. Η αναλγητική δράση των εκχυλισμάτων μπορεί αν οφείλεται στο περιεχόμενό τους σε φλαβονοειδή, τανίνες, ανθοκυανίνες, αλκαλοειδή και σαπωνίνες. Η αναλγητική δράση διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας δοκιμασίες όπως αυτές της θερμής πλάκας και writhing test. Στη δοκιμασία θερμής πλάκας το υδατικό και το αλκοολικό εκχύλισμα δεν επέδειξαν κάποια αξιοσημείωτη αναλγητική δράση, παρουσίασαν όμως αναλγητική δράση απέναντι σε με το writhing test μετά από επαγωγή με οξικό οξύ. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι το υδατικό και αλκοολικό εκχύλισμα από στίγματα και πέταλα κρόκου επιδεικνύει αναλγητική δράση απέναντι σε δοκιμασίες που επάγουν χημικά το αίσθημα του πόνου.



#### **1.4.10 Επίδραση στη μαθησιακή συμπεριφορά και ενδυνάμωση της μακροχρόνιας μνήμης**

Το εκχύλισμα του κρόκου και δυο από τα κύρια συστατικά του, κροκίνη και κροκετίνη, βελτίωσαν τη μνήμη και τις μαθησιακές ικανότητες σε διαταραχές μαθησιακής συμπεριφοράς που προκλήθηκαν από τη χρήση αιθανόλης σε ποντικούς και αρουραίους. Η στοματική χορήγηση του κρόκου μπορεί να αποβεί χρήσιμη στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών διαταραχών και σε βλάβες που σχετίζονται με τη μνήμη

#### **1.4.11 Αντικαταθληπτική δράση**

Αριθμός προσφάτων προκλινικών και κλινικών ερευνών έχουν υποδείξει ότι τα στίγματα και τα πέταλα του κρόκου παρουσιάζουν αντικαταθληπτική δράση. Τα κλινικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο κρόκος είναι ένα ασφαλές και αποτελεσματικό αντικαταθληπτικό.

#### **1.4.12 Μυοχαλαρωτική δράση**

Για να διαπιστωθεί η μυοχαλαρωτική δράση του κρόκου πραγματοποιήθηκαν μελέτες της επίδραση του αλκοολικού και υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου σε τραχειακές αλυσίδες ινδικών χοιριδίων. Η μυοχαλαρωτική δράση του εκχυλίσματος μπορεί να οφείλεται στη σαφρανάλη, η οποία αποτελεί συστατικό του κρόκου. Τα αποτελέσματα των μελετών υπέδειξαν ότι η σαφρανάλη ήταν όντως, ή τουλάχιστον εν μέρει, υπεύθυνη για τη μυοχαλαρωτική δράση του κρόκου

### **1.5 Αντικαρκινικές ιδιότητες του κρόκου**

Εφόσον ο καρκίνος αποτελεί την πιο κοινή αιτία θανάτου στον κόσμο, η πιθανότητα χρήσης φυσικών ουσιών από φυτά, λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά, οι οποίες είναι και άμεσα διαθέσιμες, μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική στην πρόληψη του καρκίνου. Συνεπώς μια πιο προσεκτική εξέταση αυτών των ουσιών κρίνεται επιτακτική. Ένας αυξανόμενος όγκος ερευνών μας δείχνει πως το εκχύλισμα του κρόκου καθώς και τα

κύρια συστατικά του, τα καροτενοειδή, κατέχουν χημειοθεραπευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου. Σήμερα μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την πρόληψη του καρκίνου είναι η χημειοπρόληψη, η οποία ορίζεται ως η χρήση συνθετικών ή φυσικών παραγόντων (ξεχωριστά ή σε συνδυασμό) για την αναστολή της ανάπτυξης καρκίνου στους ανθρώπους.

Οι έρευνες σχετικά με την δράση του κρόκου απέναντι σε νεοπλασματικά κύτταρα έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά την τελευταία δεκαετία, και ο αυξανόμενος όγκος των αποτελεσμάτων δείχνει ότι ο κρόκος και τα χαρακτηριστικά συστατικά του εμπλέκονται σε δράσεις ενάντια διαφόρων τύπου καρκίνου και όγκων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Το εκχύλισμα κρόκου έχει δείξει πως διαθέτει την ικανότητα να αναστέλλει και / ή να επιβραδύνει την ογκογένεση σε μια ποικιλία πειραματικών μοντέλων *in vivo* [11].

Διάφορες υποθέσεις για τους τρόπους αντικαρκινικής και ογκοκατασταλτικής δράσης του κρόκου έχουν προταθεί. Ένας από αυτούς υποδεικνύει πως υπεύθυνη για την αντικαρκινική και ογκοκατασταλτική δράση είναι η ανασταλτική δράση στο κυκλικό DNA και στη σύνθεση RNA, όχι όμως στην πρωτεϊνοσύνθεση. Έναν δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό αποτελεί η ανασταλτική δράση του κρόκου και των συστατικών του στις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, καθώς τα περισσότερα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά και μπορεί να δρουν ως υψηλής αποδοτικότητας μεβρανοσύνδετοι συλλέκτες ελευθέρων ριζών, γεγονός που συνδέεται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Ένας τρίτος μηχανισμός μέσω του οποίου το εκχύλισμα κρόκου ασκεί ογκοκατασταλτική δράση είναι η μεταβολική μετατροπή των καροτενοειδών, που θα προέκυπταν φυσιολογικά, σε ρετινοειδή. Πρόσφατα όμως έγινε γνωστό πως η μετατροπή των καροτενοειδών σε βιταμίνη A, δεν αποτελεί προαπαιτούμενο για εκδήλωση αντικαρκινικής δράσης. Επιπλέον ένας τέταρτος μηχανισμός προτείνει ότι η κυτταροτοξική δράση του κρόκου συνδέεται με την αλληλεπίδραση των καροτενοειδών με την DNA τοποισομεράση II, ένα ένζυμο που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση cDNA – πρωτεΐνης.

Πρόσφατα, διάφοροι άλλοι μηχανισμοί για την αντικαρκινική δράση του κρόκου και των συστατικών του έχουν προταθεί. Έχει καταδειχθεί ότι ένας νέος glucosconjugate,

ο οποίος απομονώθηκε από εκχύλισμα βολβού και callus κρόκου, προκαλούσε διόγκωση και τοπική προβολή στην πλασματική μεμβράνη. Προτάθηκε λοιπόν ότι η κυτταροτοξικότητα προέρχεται μέσω εξωκυτταρικής πρόσληψης υγρών. Επιπλέον αναφέρθηκε ότι ο κρόκος περιέχει λεκτίνες, οι οποίες έχουν προταθεί ως υπεύθυνες για την ογκοκατασταλτική του δράση. Η βιβλιογραφία επίσης περιέχει αναφορές ότι το εκχύλισμα και/ή τα συστατικά του κρόκου αναστέλλουν τη λειτουργία διαφόρων κυτταρικών ενζύμων. Με βάση αυτό το γεγονός προτάθηκε πως η αντικαρκινική δράση αυτών των παραγόντων μπορεί να σχετίζεται με την επίδραση που έχουν στις λειτουργίες των συγκεκριμένων ενζύμων. Η θεραπεία των καρκινικών κυττάρων με κρόκο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των ενδοκυτταρικών σουλφυδρυλικών συμπλόκων, δίνοντας μια πιθανή εξήγηση στην ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας του κρόκου. Ένας ακόμη προτεινόμενος μηχανισμός βασίζεται στην υπόθεση ότι το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα των καροτενοειδών του κρόκου προάγεται μέσω της απόπτωσης.

Ενδιαφέρουσες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενθυλάκωση σε άμορφα πολυμερή στρώματα των συστατικών του κρόκου ή των καροτενοειδών του, βελτιώνει σημαντικά τη σταθερότητά τους και ενισχύει την αντικαρκινική τους δράση. Προσφάτως αποδείχθηκε ότι η γ-ακτινοβολία, η οποία είναι απαραίτητη για την μικροβιακή απολύμανση, δεν παράγει σημαντικές ποιοτικές διαφορές στα βασικά πτητικά συστατικά του κρόκου. Αντίθετα προκάλεσε μια μικρή μείωση στις γλυκοσίδια και μια αύξηση στο άγλυκο περιεχόμενο των συστατικών των καροτενίων του κρόκου. Αυτή η σχετική σταθερότητα του κρόκου στην ακτινοβολία θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στην έρευνα για την εξήγηση της χημειοπροφυλακτικής ικανότητας αυτού του καρυκεύματος.

Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει αρκετές υποθέσεις, ο ακριβής ή οι ακριβείς μηχανισμοί της αντικαρκινικής δράσης του κρόκου και των συστατικών του δεν είναι γνωστοί προς το παρόν.

## 1.6 Καρκίνος

Κάθε χρόνο, διαγιγνώσκονται στην Ευρώπη 3,2 εκατομμύρια καρκίνοι, κυρίως του μαστού, του παχέος εντέρου και του ορθού ή του πνεύμονα. Παρά την πρόοδο που σημειώνεται στην έρευνα και τη θεραπεία της ασθένειας αυτής, ο καρκίνος παραμένει σοβαρή μάστιγα για την υγεία.

Η γενική υγεία μπορεί να βελτιωθεί, και ως εκ τούτου να αποφευχθούν ορισμένα είδη καρκίνου, με την υιοθέτηση υγιεινότερου τρόπου ζωής. Σημαντικό ρόλο στην έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπεία της ασθένειας παίζει επίσης η εφαρμογή προγραμμάτων προσυμπτωματικού ελέγχου [12].

Η κυτταρική εξαλλαγή μπορεί να οριστεί ως η εισαγωγή κληρονομήσιμων αλλαγών σε ένα κύτταρο οι οποίες προκαλούν μεταβολές στο πρότυπο ανάπτυξης του κυττάρου και προσδίδουν σε αυτό την ικανότητα να αναπαράγεται πρακτικά επ' άπειρον. Η εξαλλαγή μπορεί να είναι ανώδυνη, δηλαδή να προκαλεί αλλοίωση ορισμένων κυτταρικών χαρακτηριστικών χωρίς όμως άλλες συνέπειες για τη ζωή του οργανισμού (π.χ. νεοπλασία και σχηματισμός ογκιδίων χωρίς περαιτέρω εξέλιξη) ή αντίθετα να αποτελεί την προβαθμίδα για περαιτέρω δυσμενείς εξελίξεις στον οργανισμό. Οι τελευταίες μπορεί να είναι η μετάπτωση ενός όγκου (μάζας κυττάρων) από την καλοήθη στην κακοήθη κατάσταση.

Η εμφάνιση κυτταρικής εξαλλαγής (καρκινογένεση) δεν είναι μια αυτόματη διαδικασία, αλλά απαιτεί συσσώρευση μεταλλαγών που σιγά-σιγά θα έχει ως αποτέλεσμα να υπερπηδηθούν οι μηχανισμοί ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλαγές αυτές μπορεί να αφορούν είτε

(α) Κακή λειτουργία των κεντρικών διακοπών λήψης αποφάσεων (π.χ. πρωτεΐνη p53)

(β) υπερ-λειτουργία ή αναστολή λειτουργίας των μορίων που μεταφέρουν την πληροφορία στο κεντρικό σύστημα ελέγχου ή που μεταδίδουν τις «αποφάσεις» του.

### 1.6.1 Χαρακτηριστικά ανάπτυξης των εξαλλαγμένων κυττάρων

Τα γενικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων είναι τα ακόλουθα:

- Η πυκνότητα κορεσμού είναι πολύ μεγάλη ή και άπειρη. Αυτό σημαίνει ότι μια μάζα εξαλλαγμένων κυττάρων εφόσον δεν αντιμετωπίζει διατροφικό ή άλλο πρόβλημα μπορεί να αναπτύσσεται συνεχώς
- In vitro τα εξαλλαγμένα κύτταρα δείχνουν μειωμένη ανάγκη για προσθήκη ορού στο καλλιεργητικό υλικό
- Όταν αναπτύσσονται σε στερεό υπόστρωμα (π.χ. άγαρ) δείχνουν μειωμένη ανάγκη για προσκόλληση σε αυτό
- Όταν ενεθούν σε πειραματόζωα προκαλούν ανάπτυξη όγκων
- Δεν εμφανίζουν το φαινόμενο της αναστολής αύξησης εξ επαφής
- Η ανάπτυξή τους δεν είναι πολύ εξειδικευμένη σε ότι αφορά τα χαρακτηριστικά τους
- Όταν γεμίσουν το διαθέσιμο χώρο σχηματίζουν σωρούς από κύτταρα (πολλές στιβάδες κυττάρων), ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται μόνο σε κυτταρικές μονοστιβάδες
- Εμφανίζουν ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στην έκφραση μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων
- Σχηματίζουν παραλλαγμένες αποφρακτικές ζώνες
- Εκφράζουν το εμβρυονικό αντιγόνο
- Εμφανίζουν διαφοροποιημένες ιδιότητες χρώσης
- Ο μεταβολισμός του είναι αυξημένος και εμφανίζουν εντονότερη ενδοκυττάρια μετακίνηση ουσιών
- Εμφανίζουν αυξημένη έκκριση πρωτεασών, π.χ. μεταλλοένζυμα που είναι πολύ «διαβρωτικά» και καταστρέφουν τις βασικές μεμβράνες
- Εμφανίζουν μεταβολές στη σύσταση και τρισδιάστατη οργάνωση του κυτταροσκελετού
- Διακρίνονται από αλλαγές στα μόρια που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος (κυκλικά νουκλεοτίδια, φωσφοϊνοσιτίδια κ.λ.π.)

### 1.6.2 Μηχανισμός προαγωγής της καρκινογένεσης

Παρατηρήσεις in vivo αλλά και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η εξαλλαγή αποτελεί πολυσταδιακή διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

**α) έναρξη**

**β) προαγωγή**

**γ) πρόοδο-ανάπτυξη του όγκου**

Τα στάδια αυτά σχετίζονται με την εμφάνιση συγκεκριμένων αλλαγών-αλλοιώσεων που ωθούν το κύτταρο τελικά στην εμφάνιση εξαλλαγμένου φαινότυπου. Η συχνότητα, ο ρυθμός και η μαζικότητα εμφάνισης των μεταλλαγών αυτών μπορεί να περιγραφεί συνοπτικά με τα τρία παρακάτω μοντέλα:

1. Το πρώτο μοντέλο αφορά την εμφάνιση νεοπλασματικού χαρακτήρα αφού το κύτταρο έχει περάσει διαδοχικά από συγκεκριμένες μεταλλαγές
2. Στο δεύτερο μοντέλο συνυπάρχουν μερικοί επιβαρυντικοί παράγοντες-μεταλλάξεις οι οποίοι κατά τρόπο συνεργιστικό ωθούν το κύτταρο να εμφανίσει νεοπλασματικό χαρακτήρα σε λιγότερες ενδιάμεσες φάσεις
3. Σύμφωνα με το τρίτο μοντέλο υπάρχει σταδιακή αλλαγή του κυττάρου όπως και στην πρώτη περίπτωση αλλά επί πλέον το αποφασιστικό βήμα προς τη νεοπλασία γίνεται παρουσία τόσο των δυο πρώτων μεταλλαγών όσο και μιας νέας τρίτης μεταλλαγής

Αρχικά, πρέπει να γίνει ένα πρώτο βήμα το οποίο θα βάλει το κύτταρο στην τροχιά της νεοπλασίας. Έτσι, για παράδειγμα μπορεί να προκληθεί χημικά επαγόμενη καρκινογένεση με την επάλειψη της επιδερμίδας αρουραίων με πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν το ογκογνίδιο ras. Η ενεργοποίησή αυτή αποτελεί μη αντιστρεπτό φαινόμενο και είναι φαινοτυπικά απαρατήρητη. Η προαγωγή του καρκινικού φαινοτύπου από περιβαλλοντικού παράγοντες μπορεί να πάρει αρκετό καιρό (εβδομάδες, μήνες ή και χρόνια) χωρίς ενδιάμεσως να γίνεται φανερή οποιαδήποτε φαινοτυπική αλλαγή.

### 1.6.3 Μεταλλαξιγόνα

Το γενετικό υλικό των κυττάρων, που αποτελείται από την αλληλουχία των βάσεων του DNA, αν και προφυλαγμένο μέσα στον πυρήνα του κυττάρου υπόκειται σε σημαντικές τροποποιήσεις-βλάβες. Οι βλάβες αυτές μπορεί να είναι από ελάχιστες

και κατ' επέκταση επιδιορθώσιμες μέχρι πολύ εκτεταμένες και μη αντιστρεπτές. Μπορεί επίσης να είναι μακροπρόθεσμης εμβέλειας, οπότε παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των οργανισμών, περνώντας από γενιά σε γενιά, ή να περιορίζονται στο χρονικό ορίζοντα της ζωής του οργανισμού. Στην τελευταία περίπτωση αν οι βλάβες αφορούν «σημαντικά» γονίδια του οργανισμού αναφερόμαστε στο φαινόμενο της καρκινογένεσης δηλαδή της κυτταρικής εξαλλαγής που προωθείται λόγω συσσώρευσης μεταλλαγών στο DNA.

Οι παραπάνω αλλαγές μπορούν θεωρητικά να προκύψουν από οποιαδήποτε άμεση ή έμμεση επίδραση διαφόρων παραγόντων στο γενετικό υλικό, δηλαδή στις βάσεις του DNA.

#### **1.6.4 Αντικαρκινικά φάρμακα**

Για τη θεραπεία του καρκίνου χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες στρατηγικές. Αρχικά πραγματοποιείται ειδική ιστολογική διάγνωση, η οποία είναι απαραίτητη για να καθοριστεί αν θα έχουμε «ανακουφιστική» ή «θεραπευτική» αντιμετώπιση. Έπειτα καθορίζεται ένα ακριβές σύστημα σταδιοποίησης κάθε τύπου καρκίνου, ιδιαίτερα κλινικά και ανατομικά χαρακτηριστικά-βιοχημικά, κυτταρολογικά, μοριακά βιολογικά καθοριστικά μέσα.

Τα κυριότερα μέσα αντιμετώπισης του καρκίνου είναι:

- Χειρουργική επέμβαση
- Ακτινοβολία
- Χημειοθεραπευτικές-φαρμακευτικές αγωγές

Κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων

- Αντιμεταβολίτες
- Αλκυλιούντες παράγοντες
- Αναστολείς μικροσωληνίσκων
- Αντινεοπλασματικά αντιβιοτικά
- Φάρμακα που δρουν σε τοποϊσομεράσες

Η θεωρία της «λογαριθμικής καταστροφής» των καρκινικών κυττάρων (log kill) υποστηρίζει ότι τα φάρμακα θανατώνουν ένα σταθερό κλάσμα καρκινικών κυττάρων (που σχετίζονται με τον αριθμό των κυττάρων σε log κλίμακα) και όχι ένα σταθερό αριθμό κυττάρων. Ένα ποσοστό κυττάρων σε ένα καρκίνο, μπορεί να επιβιώσει τυχαία κατά τη διάρκεια μιας θεραπείας χωρίς να παρουσιάζει ειδική φαρμακευτική αντίδραση. Ως εκ τούτου κάθε φάρμακο ή συνδυασμός φαρμάκων έχει μια συγκεκριμένη κυτταροτοξική ικανότητα. Συνεπώς, η θεραπεία συνδυασμού έχει περισσότερες πιθανότητες για επίτευξη ίασης, από ότι η θεραπεία με ένα μόνο φάρμακο.

Οι συνδυασμοί των αντικαρκινικών φαρμάκων εισήχθησαν στη θεραπευτική διότι διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση ενός μόνο φαρμάκου, δεν επέφερε σημαντικού βαθμού ύφεση ή ίαση, εκτός από την περίπτωση του χοριοκαρκινώματος.

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς θα πρέπει :

1. Να είναι αποτελεσματικά όταν χρησιμοποιούνται μεμονωμένα
2. Να προκαλούν κατά προτίμηση ένα υψηλό ποσοστό «πλήρους ανταπόκρισης» (η οποία καθορίζεται σαν το 100% ποσοστό θανάτου των κυττάρων ενός όγκου) παρά μια μερική ανταπόκριση (π.χ. θάνατο σε ποσοστό λιγότερο από το 50% των κυττάρων)
3. Να δρουν με διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς σε όγκους που περιέχουν ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων
4. Να μην εμφανίζουν παρόμοιες ανεπιθύμητες ενέργειες, γεγονός που επιβάλλει τη μείωση της δόσης, με συνέπεια την απώλεια του προστιθέμενου οφέλους από τον συνδυασμό

### **1.6.5 Παρενέργειες**

Πέρα όμως από τα οφέλη, η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και ακτινοβολίας ως μέσα αντιμετώπισης του καρκίνου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες παρενέργειες. Οι πιο κύριες είναι η γοναδική δυσλειτουργία και ο σχηματισμός δευτερογενών καρκίνων.

Οι θεραπείες του καρκίνου που έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλέσουν γοναδική δυσλειτουργία είναι οι αλκυλιούντες παράγοντες και η ακτινοβολία, και



σχετίζονται με τη δοσολογία. Η γοναδική δυσλειτουργία είναι λιγότερο σοβαρή και περισσότερο αναστρέψιμη στα παιδιά της προεφηβικής ηλικίας, πλην όμως τα αγόρια κατά την εφηβεία φαίνεται ότι είναι περισσότερο ευπρόσβλητα από οποιαδήποτε άλλη ομάδα ασθενών.

Ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από καρκινογόνες χημικές ουσίες, αλλά και από μερικά φάρμακα. Ένας κοινός παράγοντας του μηχανισμού της δράσεως τους, είναι η αλληλεπίδρασή τους με το DNA. Τα φάρμακα έχουν υψηλού, χαμηλού ή άγνωστου βαθμού κινδύνους, ως προς την πρόκληση κακοηθειών και τα αντικαρκινικά φάρμακα είναι τα πλέον σχετιζόμενα με τον φαρμακογενή καρκίνο.

## **1.7 Σκοπός**

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής άσκησης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των δυο συστατικών του κρόκου, κροκίνης και σαφρανάλης, καθώς και της κροκετίνης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ανθρώπινες και από ποντικό, *in vitro*. Επιπλέον, στις ίδιες σειρές χορηγήθηκε αλκοολικό και υδατικό εκχύλισμα του στίγματος του κρόκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με σκοπό τη διερεύνηση της κυτταροτοξικής / αντικαρκινικής τους δράσης. Τα πιθανά θετικά αποτελέσματα ενδεχομένως να δώσουν μεγαλύτερη έμφαση στη χρήση των συστατικών του κρόκου ενάντια στον καρκίνο. Τα πλεονεκτήματα είναι σημαντικά καθώς από τη χρήση φυσικών ουσιών μπορούν να δημιουργηθούν καινούρια αντικαρκινικά σχήματα τα οποία θα περιέχουν συνδυασμούς φυτικών ουσιών και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Κάτι τέτοιο μπορεί να έχει ως συνέπεια τη μείωση της δόσης ισχυρών χημειοθεραπευτικών που εμφανίζουν έντονη κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, πλεονέκτημα μπορεί να αποτελέσει και η καλύτερη στόχευση των αντικαρκινικών σχημάτων, τα οποία θα επικεντρώνουν στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά κύτταρα.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές**

Τα κύτταρα διατηρούνται σε stock σε υγρό άζωτο, και έχουν προέλθει από την ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ανθρώπινες και από ποντίκια, καρκινικές ή φυσιολογικές αθανατοποιημένες, και είναι οι εξής:

#### **Ανθρώπινες:**

- HeLa: αδenoκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, επιθηλιακός τύπος κυττάρου
- T 24: κύτταρα καρκίνου του προστάτη
- MCF-7: αδenoκαρκίνωμα μαστικού αδένου, επιθηλιακός τύπος κυττάρου
- HepG2: κύτταρα από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
- Colo 205: αδenoκαρκίνωμα παχέως εντέρου
- MRC-5: φυσιολογική αθανατοποιημένη ινοβλαστική κυτταρική σειρά του πνεύμονα
- A-549: καρκίνωμα του πνεύμονα
- LNCaP: κύτταρα καρκίνου του προστάτη

#### **Ποντικού:**

- N2a: ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού
- 4T1: κύτταρα καρκίνου του μαστού ποντικού

Τα κύτταρα όλων των παραπάνω σειρών είναι κύτταρα προερχόμενα από συμπαγείς όγκους που προσκολλώνται (adherent) και σχηματίζουν ταπήτιο κυττάρων.

### **2.2 Χειρισμός κυττάρων**

#### **Ανάνηψη (ξεπάγωμα) κυττάρων από υγρό άζωτο**

- Τα cryovials που περιέχουν τα κύτταρα απομακρύνθηκαν από το υγρό άζωτο, και τοποθετήθηκαν σε νερό θερμοκρασίας 37°C. Τα κύτταρα δεν έπρεπε να μείνουν έτσι για πάνω από 10 min, γιατί βρίσκονταν σε διάλυμα που περιέχει 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO). Πρόκειται για μία οργανοσουλφονυλική

ένωση που δημιουργεί μεμβράνη γύρω από τα κύτταρα και τα προστατεύει σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες όταν βρίσκονται στο υγρό άζωτο (-196°C). Ωστόσο σε θερμοκρασία δωματίου το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα.

- Το διάλυμα των κυττάρων τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε σωληνάκια Falcon με 10 mL θρεπτικό (Dulbecco's Modified Eagle Medium, με 10% Fetal Bovine Serum και 1/50 διάλυμα αντιβιοτικών με περιεκτικότητα σε πενικιλίνη 100 u/mL και στρεπτομυκίνη 100 µg/mL).
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000-1200 rpm για 5 min, και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Το ίζημα ανασυστάθηκε με θρεπτικό και μεταφέρθηκε σε φλάσκες T-25. Προστέθηκε επίσης FBS (Fetal Bovine Serum) έτσι ώστε να η συγκέντρωσή του να είναι 20% στον τελικό όγκο. Αυτό βοηθά τα κύτταρα να ανακάμψουν γρηγορότερα.
- Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στον κλίβανο, όπου οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37°C, και ατμόσφαιρα με 95% αέρα, 5% CO<sub>2</sub> και 100 % υγρασία.

Όταν τα κύτταρα ανέκαμψαν μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερες φλάσκες (T-75), ενώ για να συνεχίσουν να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται πραγματοποιούνταν συνεχείς ανακαλλιέργειες.

#### Ανακαλλιέργεια κυττάρων συμπαγούς όγκου

- Αρχικά απομακρύνθηκε το παλιό θρεπτικό από τη φλάσκα στην οποία αναπτύσσονταν τα κύτταρα.
- Ακολούθησε πλύση της φλάσκας με 5 mL PBS (διάλυμα με NaCl 8% w/v, KCl 0,2% w/v, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15% w/v και KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2% w/v) για να απομακρυνθούν τα μεταβολικά παραπροϊόντα των κυττάρων.
- Μετά την απομάκρυνση του PBS προστέθηκαν 3 mL διαλύματος βερσίνης-τρυψίνης 2:1, και οι φλάσκες τοποθετήθηκαν πίσω στον κλίβανο για 3-5 min.

Η βερσίνη είναι διάλυμα PBS με προσθήκη EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,2% w/v και phenol red 1% v/v. Το EDTA είναι συμπλοκοποιητής, ο οποίος συνδέεται με ιόντα Ca και Mg, δεσμευοντάς τα και καθιστώντας τα μη διαθέσιμα για τα κύτταρα. Χωρίς τα ιόντα αυτά τα κύτταρα δε μπορούν να μείνουν συνδεδεμένα στο ταπήτιο και απελευθερώνονται στο εναιώρημα.

Η τρυψίνη είναι μια υδρολάση που μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων. Έτσι τα κύτταρα αποκολλούνται το ένα από το άλλο.

- Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε έντονο πιπετάρισμα του διαλύματος που πλέον περιείχε τα κύτταρα που είχαν αποκολληθεί (χωρίς όμως να υποστούν μηχανική βλάβη τα κύτταρα), ώστε να προκύψει εναιώρημα με μονήρη κύτταρα (single cell suspension).
- Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε αραίωση των κυττάρων απομακρύνοντας μέρος του εναιωρήματος.
- Τέλος έγινε προσθήκη ανάλογης ποσότητας θρεπτικού, συνήθως 20 mL, αν επρόκειτο για T-75 φλάσκα.

Μία καλλιέργεια κυττάρων θεωρούταν ακατάλληλη για πειράματα όταν είχε πλέον υποστεί πάνω από 25 ανακαλλιέργειες, καθώς μετά από το σημείο αυτό θεωρείται ότι τα κύτταρα αρχίζουν να εμφανίζουν μεγάλη χρωμοσωμική αστάθεια και να εκφυλίζονται. Ο αριθμός των ανακαλλιεργειών εξαρτάται ωστόσο και από την κυτταρική σειρά.

#### Διατήρηση κυττάρων στο υγρό άζωτο

- Για να συντηρηθούν για μελλοντική χρήση κύτταρα που μέχρι τώρα αναπτύσσονταν στον κλίβανο, αφαιρέθηκε αρχικά το θρεπτικό της φλάσκας, και τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το ταπήτιο με προσθήκη διαλύματος βερσίνης-τρυψίνης, όπως περιγράφηκε και κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας.
- Δημιουργήθηκε εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων με επαναλαμβανόμενη διέλευση των κυττάρων από το ρύγχος πιπέτας, και τα ζωντανά κύτταρα μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, για να υπολογιστεί ο όγκος του διαλύματος που έπρεπε να εισαχθεί σε κάθε cryovial. Με τον τρόπο αυτό ο αριθμός των κυττάρων που εισαγόταν σε κάθε cryovial ήταν συγκεκριμένος, και συνήθως αποφασιζόταν με βάση τους ρυθμούς ανάπτυξης και τις ανάγκες της κάθε κυτταρικής σειράς. Έτσι όταν τα κύτταρα θα εξάγονταν από το υγρό άζωτο στο μέλλον θα έδιναν μια καλλιέργεια που θα ανέκαμπτε γρήγορα και θα παρουσίαζε υψηλή βιωσιμότητα κυττάρων (π.χ. αν η συγκέντρωση των

κυττάρων στο διάλυμα είναι χαμηλή, τότε η βιωσιμότητά τους θα είναι μειωμένη).

- Το διάλυμα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε στις 1500 rpm, για 5 min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, ενώ η ανασύσταση του ιζήματος πραγματοποιήθηκε με συγκεκριμένο όγκο Recovery Cell Culture Freezing Medium (10% DMSO και 10% FBS σε DMEM). Ιδιαίτερης σημασίας ήταν η παρουσία πάγου ακόμη και κατά την ανασύσταση, για να αποφευχθούν οι τοξικές για τα κύτταρα ιδιότητες του DMSO σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια έγινε είσοδος συγκεκριμένου όγκου του διαλύματος σε cryovials, και ακολούθως σε πάγο.
- Τα cryovials δεν τοποθετήθηκαν κατευθείαν στο υγρό άζωτο αλλά στην κατάψυξη (-20°C) και μέσα σε διάλυμα ισοπροπανόλης, έτσι ώστε η θερμοκρασία τους να μην πέφτει γρηγορότερα από 1-2°C/min. Τα κύτταρα έπρεπε να μείνουν στην κατάψυξη για τουλάχιστον 24 h, ενώ μπορούσαν να διατηρηθούν έτσι για μερικές εβδομάδες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο.

### **2.3 Πείραμα για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος και των συστατικών του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.**

Αρχικά επιστρώθηκαν σε τριβλία μικροτιλοδότησης καρκινικά κύτταρα, σε ασηπτικές συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές T 24, HeLa, HepG2, Colo 205, N2a, MCF-7, MRC-5, A-549, 4T1 και LNCaP. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με διάλυμα βερσίνης-τρυψίνης 2:1, και με τη μέθοδο Neubauer μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο, για να επιστρωθεί ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων (5.000-10.000 κύτταρα ανά well, ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης και τις ιδιότητες της κάθε σειράς). Σε κάθε τριβλίο επιστρώθηκαν κύτταρα μιας κυτταρικής σειράς, και όλα τα wells ενός τριβλίου περιείχαν τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Σε κάθε well έγινε προσθήκη διαλύματος κυττάρων όγκου 100  $\mu$ L. Στα περιφερειακά wells των μικροπλακών (microplates) δεν επιστρώθηκαν κύτταρα αλλά αποστειρωμένο PBS, έτσι ώστε να εξατμίζεται αυτό κι όχι το θρεπτικό των κυττάρων, μέσα στον κλίβανο. Μετά την επίστρωση, τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 24 h, και στη συνέχεια σε ασηπτικές συνθήκες προστέθηκαν σε κάθε μικροπλάκα τα υπό διερεύνηση συστατικά καθώς και τα εκχυλίσματα του κρόκου 100  $\mu$ L σε κάθε well, διαφορετικής συγκέντρωσης σε κάθε στήλη.

Συγκεκριμένα, η πρώτη στήλη του τριβλίου μικροτιτλοδότησης χρησίμευσε ως control, δηλαδή έγινε προσθήκη μόνο θεραπευτικού υλικού. Στις υπόλοιπες στήλες προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από τα διαλύματα κάθε συστατικού και εκχυλίσματος ξεκινώντας από την αραιότερη και πηγαίνοντας προς την πυκνότερη. Το διάλυμα του κάθε συστατικού καθώς και των δυο εκχυλισμάτων, αλκοολικού και υδατικού, που προστέθηκε υπέστη ακόμη μια αραιώση 1:2, καθώς σε κάθε well υπήρχαν ήδη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος κυττάρων με θεραπευτικό. Οι αραιώσεις από το αρχικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη Dulbecco's Modified Eagle Medium.

Αφού πέρασαν 48 h από την προσθήκη των συστατικών και των εκχυλισμάτων του κρόκου, πραγματοποιήθηκε μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων με τη μέθοδο SRB. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής sulforhodamine B (SRB) να δεσμεύεται ηλεκτροστατικά και εξαρτώμενα από το pH, σε κατάλοιπα βασικών πρωτεϊνικών αμινοξέων, από μονιμοποιημένα με τριγλωροξικό οξύ κύτταρα. Κάτω από ήπια όξινες συνθήκες προσδένεται στα κύτταρα, και κάτω από ήπια βασικές συνθήκες μπορεί να εκχυλιστεί και να διαλυτοποιηθεί για μέτρηση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Αρχικά απομακρύνθηκε το θεραπευτικό με αποστράγγιση των plates.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  10% ψυχρού τριγλωροξικού οξέος (TCA) σε κάθε well, για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα, και τα plates τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4  $^{\circ}\text{C}$ ) για 30 min.
- Ακολούθησαν 5 πλύσεις με νερό βρύσης. Το νερό έπεφτε πλάγια και στην άκρη των plates, ώστε να μην ξεκολλήσουν τα μονιμοποιημένα κύτταρα.
- Τα plates στραγγίστηκαν ελαφρώς και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 70  $\mu\text{L}$  0,4% SRB σε διάλυμα 1% οξικού οξέος, σε κάθε well.
- 20 min μετά, πραγματοποιήθηκαν 5 πλύσεις με 1% οξικό οξύ, έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλη η χρωστική που δεν είχε προσδεθεί στα κύτταρα.
- Τα plates αφέθηκαν να στεγνώσουν για 24 h.
- Για την εκχύλιση της χρωστικής προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  10 mM Tris-base/well, και τα plates τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα για 10 min.

- Αμέσως μετά την ανάδευση πραγματοποιήθηκε μέτρηση των απορροφήσεων στα 492 nm, με υπόβαθρο 630 nm, με το φωτόμετρο Anthos ht11, ώστε να μετρηθούν οι οπτικές πυκνότητες του περιεχομένου των wells.

Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης ήταν γνωστός ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας των wells κάθε στήλης, δηλαδή ο μέσος όρος από 6 δείγματα που δέχθηκαν την ίδια αραιώση του εκχυλίσματος. Ο μέσος όρος της οπτικής πυκνότητας των wells της κάθε στήλης από την 3 έως την 11 διαιρέθηκε με το μέσο όρο της στήλης 2, δηλαδή των control. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε το survival fraction (SF) των κυττάρων για κάθε αραιώση των συστατικών και των εκχυλισμάτων του κρόκου. Τοποθετώντας τα SF με τις αντίστοιχες αραιώσεις της κροκίνης, της σαφρανάλης και της κροκετίνης, καθώς και των εκχυλισμάτων σε ένα διάγραμμα, προέκυψε η καμπύλη επιβίωσης των κυττάρων. Αυτή η καμπύλη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της 50% ανασταλτικής συγκέντρωσης ( $IC_{50}$ ) κάθε κυτταρικής σειράς, για τα συστατικά και τα εκχυλίσματα του κρόκου. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω του υπολογισμού της  $IC_{50}$  από το διάγραμμα, οι τιμές που παίρνει σε κάθε περίπτωση είναι κατά προσέγγιση.

#### **2.4 Προετοιμασία διαλυμάτων των συστατικών και εκχυλισμάτων, υδατικού και αλκοολικού, του κρόκου.**

##### **Διαλύματα κροκίνης, σαφρανάλης και κροκετίνης**

Τα αρχικά διαλύματα (stock solutions) που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε συστατικό είναι τα εξής:

- **Κροκίνη** 40 mM (η διάλυση της κροκίνης έγινε σε αποσταγμένο νερό και σε τελικό όγκο 2,047 ml)
- **Σαφρανάλη** 400 mM (η διάλυση της σαφρανάλης έγινε σε απόλυτη αιθανόλη και σε τελικό όγκο 20 ml)
- **Κροκετίνη** 6,09 mM (η διάλυση της κροκετίνης έγινε σε αποσταγμένο νερό και σε τελικό όγκο 5 ml)

Η επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν μετά από έρευνα σε σχετική βιβλιογραφία. Οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις (σε  $\mu\text{M}$ ) ήταν οι εξής:

Final dilutions ( $\mu\text{M}$ ):

- **Για την κροκίνη και την σαφρανάλη**  
100, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1600, 1800, 2000
- **Για την κροκετίνη**  
25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 800, 1600

Για την επίτευξη των παραπάνω συγκεντρώσεων αρχικά παρασκευάστηκαν οι διπλάσιες, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι συγκεντρώσεις υφίστανται επιπλέον αραιώση 1/2 όταν 100 ml από κάθε μια εισάγεται σε κάθε well της μικροπλάκας που υπάρχει ήδη 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος κυττάρων με θρεπτικό υλικό.

Initial dilutions ( $\mu\text{M}$ ):

- **Για την κροκίνη και την σαφρανάλη**  
200, 400, 800, 1600, 2000, 2400, 3200, 3600, 4000
- **Για την κροκετίνη**  
50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1600, 3200

Έπειτα από υπολογισμό του συνολικού όγκου που απαιτούσε η πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν για την κροκίνη και τη σαφρανάλη 7 ml για όλες τις συγκεντρώσεις. Αρχικά παρασκευάστηκαν οι πιο πυκνές συγκεντρώσεις, συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις 2400, 3200, 3600 και 4000. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρασκευάστηκαν με αραιώσεις των προηγούμενων συγκεντρώσεων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για τον σχηματισμό όλων των αρχικών συγκεντρώσεων καθώς και για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium.

Η αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κροκετίνη με τη διαφορά ότι λόγω της περιορισμένης ποσότητας του αρχικού (stock) διαλύματος για κάθε συγκέντρωση παρασκευάστηκαν 6 ml. Οι συγκεντρώσεις που παρασκευάστηκαν αρχικά ήταν οι 3200 και 600  $\mu\text{M}$  και έπειτα με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν και οι υπόλοιπες.



### Αλκοολικό διάλυμα

Για την παρασκευή του αλκοολικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν στίγματα κρόκου βάρους 0,3347 gr. Τα στίγματα τοποθετήθηκαν σε δοχείο, το οποίο προφύλασσε το διάλυμα από το φως, μαζί με 2 ml απόλυτης αιθανόλης και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για τέσσερις μέρες. Η παραπάνω διαδικασία οδήγησε στην παρασκευή του αρχικού διαλύματος του οποίου η συγκέντρωση υπολογίζεται ως εξής:

0,16735 gr / ml ή 167,35 mg / ml

Η επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία επιλέχθηκαν μετά από έρευνα σε σχετική βιβλιογραφία. Οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις (σε mg / ml) ήταν οι εξής:

Final dilutions:

0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6

Για την επίτευξη των παραπάνω συγκεντρώσεων αρχικά παρασκευάστηκαν οι διπλάσιες ( Initial dilutions: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12), καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι συγκεντρώσεις υφίστανται επιπλέον αραιώση 1/2 όταν 100 ml από κάθε μια εισάγεται σε κάθε well της μικροπλάκας που υπάρχει ήδη 100 μL διαλύματος κυττάρων με θρεπτικό υλικό. Είναι σημαντικό αν αναφερθεί ότι οι ίδιες συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν και για το υδατικό διάλυμα του κρόκου.

Ο όγκος που παρασκευάστηκε για κάθε συγκέντρωση ήταν 10ml. Αρχικά παρασκευάστηκε οι πιο πυκνές επιθυμητές συγκεντρώσεις (12 mg /ml και 8 mg /ml ) και έπειτα με διαδοχικές αραιώσεις 1/2 παρασκευάστηκαν και οι υπόλοιπες. Συγκεκριμένα σε 1,033 ml από το αρχικό αλκοολικό διάλυμα συγκέντρωσης 167,35 mg / ml προστέθηκαν 13,367 ml θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο 14,4 ml διαλύματος συγκέντρωσης 12 mg /ml. Αντίστοιχα σε 0,688 ml από το αρχικό αλκοολικό διάλυμα συγκέντρωσης 167,35 mg / ml προστέθηκαν 13,712 ml θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium, δίνοντας 14,4 ml διαλύματος συγκέντρωσης 8 mg /ml.

### Υδατικό διάλυμα

Για την παρασκευή του υδατικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν στίγματα κρόκου βάρους 0,3152 gr, τα οποία αρχικά υπέστησαν βρασμό για 2-3 λεπτά. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε δοχείο, το οποίο ήταν διαμορφωμένο κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην επιτρέπει την είσοδο φωτός, και συμπληρώθηκε ο όγκος του διαλύματος με απεσταγμένο νερό μέχρι να φτάσει τα 0,525 ml. Το περιεχόμενο του δοχείου αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τέσσερις μέρες. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος υπολογίζεται ως εξής:

0,60038 gr / ml ή 600.38 mg/ml

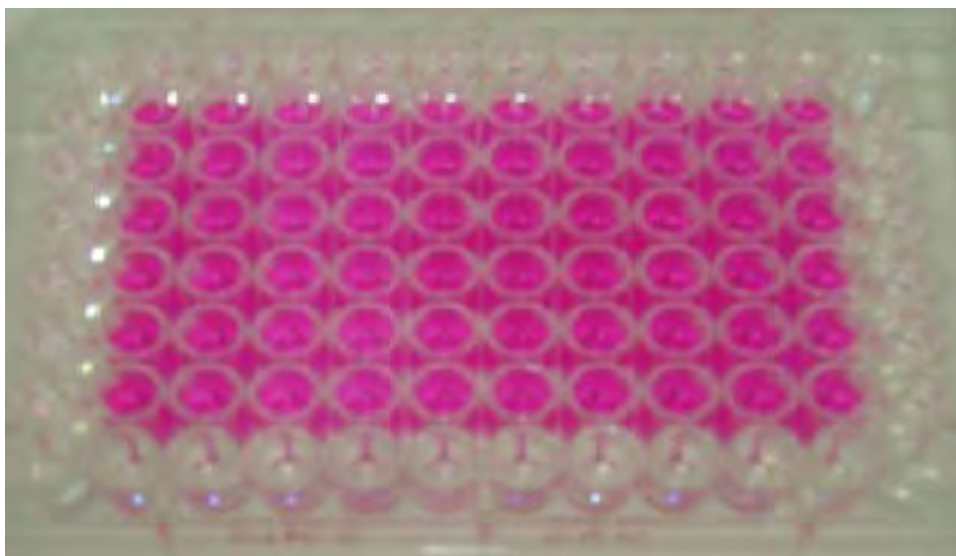
Η επιλογή και διαδικασία παρασκευής των επιθυμητών συγκεντρώσεων είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε για το αλκοολικό διάλυμα. Η μόνη διαφοροποίηση είναι ότι για την παρασκευή των συγκεντρώσεων 12 mg /ml και 8 mg /ml χρησιμοποιήθηκαν, στην πρώτη περίπτωση, 0,288 ml από το αρχικό υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 600,31 mg/ ml στα οποία προστέθηκαν 14,112 ml θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium και 0,192 ml από το αρχικό υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 600,31 mg/ ml στα οποία προστέθηκαν 14,208 ml θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium, για τη δεύτερη περίπτωση.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1. Επίδραση της κροκίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές**

Αρχικά για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια επίδραση της κροκίνης στα καρκινικά κύτταρα, επιστρώθηκαν κύτταρα σε τριβλία μικροτιλοδότησης, και αφού αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 24 h ακολούθησε χορήγηση κροκίνης, διαφορετικών αραιώσεων σε κάθε στήλη. Μετά από 72 h τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο.

Στη συνέχεια τα κύτταρα που ήταν ακόμη ζωντανά μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με τη χρωστική SRB. Τα μόρια χρωστικής που δεν προσδέθηκαν στα μονιμοποιημένα κύτταρα απομακρύνθηκαν, ενώ η χρωστική που είχε προσδεθεί σ' αυτά εκχylίστηκε την επόμενη μέρα, και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίστηκε το ποσοστό επιβίωσης SF των κυττάρων, όταν στο θεραπευτικό τους υπήρχε συγκεκριμένη συγκέντρωση κροκίνης. Για να γίνει ο υπολογισμός αυτός θεωρήθηκε ότι τα control είχαν ποσοστό επιβίωσης 100%.



Εικόνα 3.1 Μικροπλάκα 96 θέσεων. Χρώση SRB σε κυτταρική σειρά MRC 5 μετά από τη δράση διαλύματος κροκίνης (72h) διαφορετικών συγκεντρώσεων.

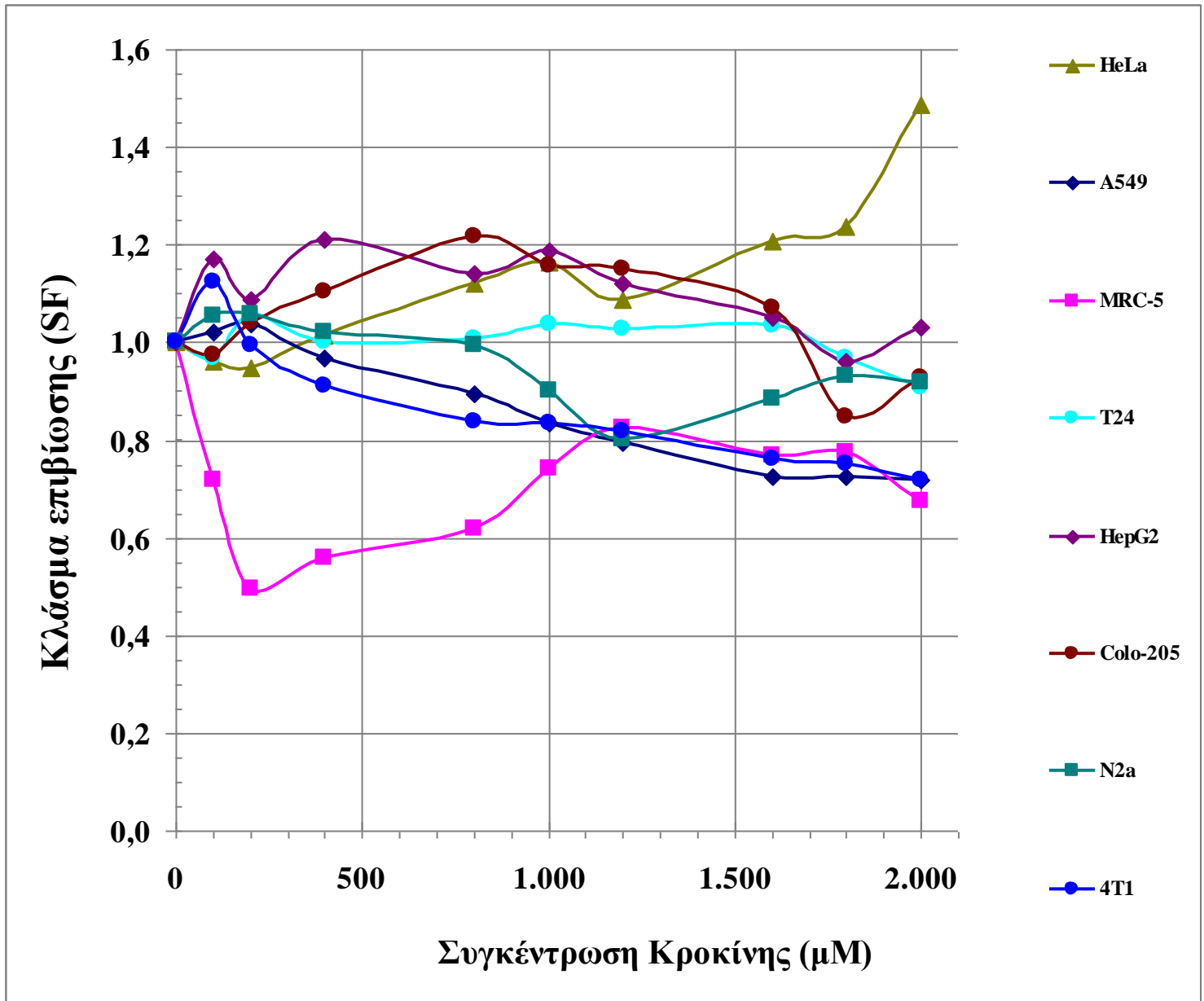
Τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, όπου φαίνονται τα επί τοις % ποσοστά επιβίωσης κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση κροκίνης. Οι τιμές αυτές προέρχονται από το μέσο όρο των φωτομετρήσεων των έξι wells μιας στήλης, και τα αποτελέσματα αυτά επανελήφθησαν σε τρία τουλάχιστον διαφορετικά πειράματα. Επίσης στον πίνακα αναγράφονται και οι IC<sub>50</sub> όπου υπάρχουν. Όπως φαίνεται λοιπόν από τον πίνακα όλες οι κυτταρικές σειρές επέδειξαν ανθεκτικότητα στην κροκίνη, με αποτέλεσμα να μην επιτευχθεί IC<sub>50</sub> στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Εξαίρεση αποτέλεσε η κυτταρική σειρά MRC-5 η οποία παρουσίασε IC<sub>50</sub> ίση με 192μΜ

Final (μΜ)	Survival fraction (SF)							
	HeLa	A549	MRC-5	T24	HepG2	Colo-205	N2a	4T1
0	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0,961	1,022	0,717	0,969	1,170	0,975	1,055	1,124
200	0,948	1,038	0,495	1,059	1,089	1,040	1,058	0,996
400	1,013	0,967	0,558	1,002	1,211	1,106	1,022	0,913
800	1,120	0,896	0,620	1,007	1,141	1,219	0,995	0,837
1.000	1,165	0,835	0,743	1,037	1,187	1,159	0,902	0,835
1.200	1,088	0,794	0,826	1,029	1,121	1,150	0,801	0,819
1.600	1,206	0,724	0,769	1,033	1,050	1,071	0,885	0,761
1.800	1,238	0,726	0,775	0,969	0,961	0,848	0,931	0,753
2.000	1,487	0,717	0,675	0,909	1,030	0,929	0,919	0,717
	IC50= (μΜ)	IC50= (μΜ)	IC50=192 (μΜ)	IC50= (μΜ)	IC50= (μΜ)	IC50= (μΜ)	IC50= (μΜ)	IC50= (μΜ)

**Πίνακας 3.1:** SF κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση κροκίνης. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 6 τεχνητών επαναλήψεων στο ίδιο πείραμα. Στην τελευταία σειρά αναγράφεται η IC<sub>50</sub> που προκύπτει από το Διάγραμμα 3.2 το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές του συγκεκριμένου πίνακα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά well είναι 5.000 για όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από την κυτταρική σειρά HepG2 στην οποία ο αριθμός κυττάρων ανά well είναι 10.000.

Με τα ίδια αποτελέσματα σχεδιάστηκε επίσης το διάγραμμα 3.1, όπου παρατηρείται η βιωσιμότητα όλων των κυτταρικών σειρών σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης της κροκίνης. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι η βιωσιμότητας κάθε κυτταρικής σειράς φαίνεται να παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο και ρυθμό από τις υπόλοιπες.

Το διάγραμμα 3.1 χρησίμευσε επίσης στην κατά προσέγγιση εύρεση της  $IC_{50}$  συγκέντρωσης κροκίνης για την κάθε κυτταρική σειρά. Σύμφωνα δηλαδή με την χαρακτηριστική για την κάθε σειρά καμπύλη, βρέθηκε πάνω στο διάγραμμα η συγκέντρωση της κροκίνης στην οποία το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων είναι 50%. Η συγκεντρώσεις αυτές αναγράφονται στον Πίνακα 3.1.



Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της επίδρασης της κροκίνης στις κυτταρικές σειρές. Από τα δεδομένα του διαγράμματος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά

### 3.2. Επίδραση της σαφρανάλης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η αντίστοιχη διαδικασία, όπως και για την κροκίνη, ακολουθήθηκε και για τη σαφρανάλη. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από αντιπροσωπευτικές κυτταρικές σειρές, στις οποίες φαίνεται η διαφορά μεταξύ των control (κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε σαφρανάλη) και των κυττάρων στα οποία έχουν χορηγηθεί διάφορες αραιώσεις από το αρχικό εκχύλισμα.

#### 4T1

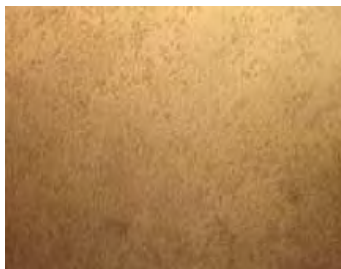


Control



SFR 100 μM vs 4T1 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

#### HeLa



Control



SFR 200 μM vs HeLa 5,000 cpw 72 h SRB  
(1st exp w crocus constit)



SFR 800 μM vs HeLa

#### N2a



Control



SFR 200 μM vs N2a 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## T24



Control

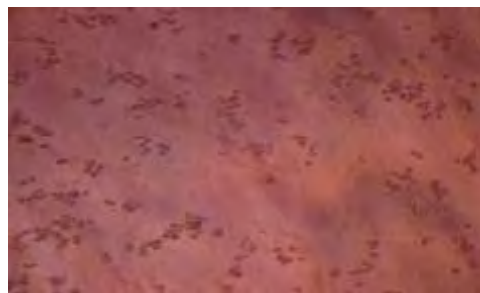


SFR 200  $\mu$ M vs T24 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## HepG2

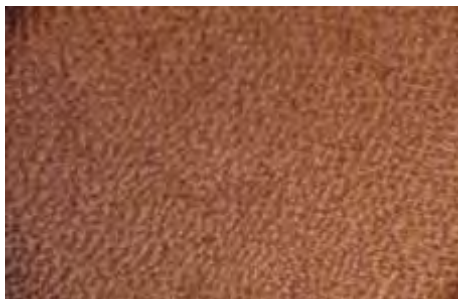


Control

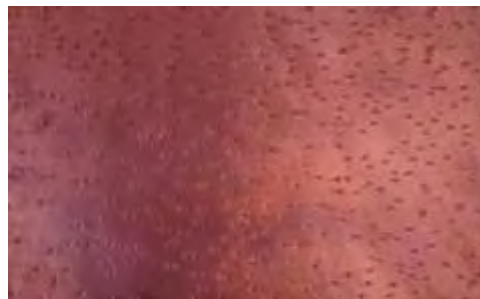


SFR 400  $\mu$ M vs HepG2 10,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## MRC-5

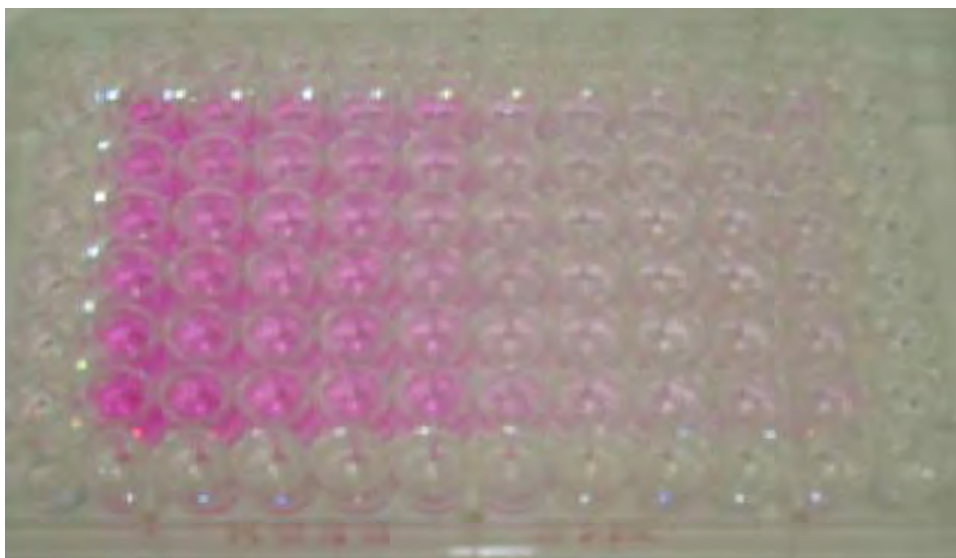


Control



SFR 400  $\mu$ M vs MRC5 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

**Εικόνα 3.2:** Φωτογραφίες κυττάρων από wells διαφορετικών στηλών, 72 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών αραιώσεων του αρχικού εκχυλίσματος σαφρανάλης. Για κάθε κυτταρική σειρά φαίνονται εδώ αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες. Αριστερά παρουσιάζονται τα control κύτταρα του πειράματος, ενώ δεξιά κύτταρα που δέχθηκαν μεγαλύτερης ή μικρότερης αραιώσεως διάλυμα. Μεγέθυνση μικροσκοπίου 10x.



Εικόνα 3.3 Μικροπλάκα 96 θέσεων. Χρώση SRB σε κυτταρική σειρά A 549 μετά από τη δράση διαλύματος σαφρανάλης (72h) διαφορετικών συγκεντρώσεων.

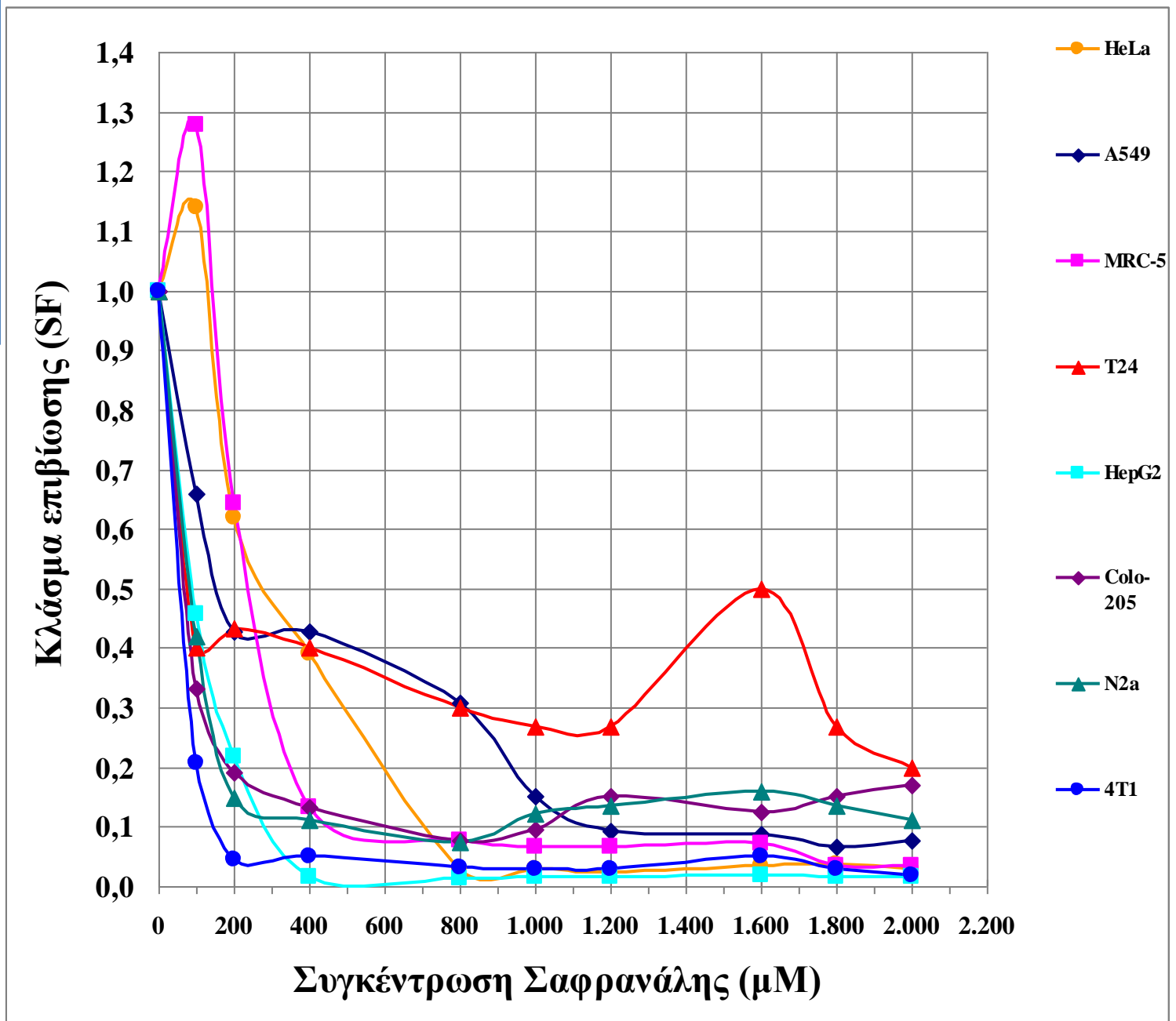
Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τα επί τοις % ποσοστά επιβίωσης κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση σαφρανάλης.

Final ( $\mu\text{M}$ )	Survival fraction (SF)							
	HeLa	A549	MRC-5	T24	HepG2	Colo-205	N2a	4T1
0	1	1	1	1	1	1	1	1
100	1,139	0,659	1,279	0,400	0,456	0,333	0,420	0,208
200	0,619	0,429	0,642	0,433	0,219	0,190	0,148	0,044
400	0,391	0,429	0,134	0,400	0,016	0,133	0,111	0,050
800	0,029	0,309	0,078	0,300	0,013	0,076	0,074	0,033
1.000	0,029	0,152	0,067	0,267	0,017	0,095	0,123	0,028
1.200	0,025	0,092	0,067	0,267	0,017	0,152	0,136	0,030
1.600	0,034	0,088	0,073	0,500	0,019	0,124	0,160	0,050
1.800	0,038	0,066	0,034	0,267	0,016	0,152	0,136	0,030
2.000	0,029	0,078	0,034	0,200	0,017	0,171	0,111	0,019
	IC50=274 ( $\mu\text{M}$ )	IC50=152 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 237 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 71 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 88 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 68 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 82 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 57 ( $\mu\text{M}$ )

Πίνακας 3.2: SF κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση σαφρανάλης. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 6 τεχνητών επαναλήψεων στο ίδιο πείραμα. Στην τελευταία σειρά αναγράφεται η  $IC_{50}$  που προκύπτει από το διάγραμμα 3.2 το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές του συγκεκριμένου πίνακα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά well είναι 5.000 για όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από την κυτταρική σειρά HepG2 στην οποία ο αριθμός κυττάρων ανά well είναι 10.000.



Με βάση τις τιμές του Πίνακα 3.2 κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα



Διάγραμμα 3.2: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της επίδρασης της σαφρανάλης στις κυτταρικές σειρές. Από τα δεδομένα του διαγράμματος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά

Από τις τιμές που αναγράφονται στον πίνακα 3.2, καθώς και από το διάγραμμα 3.2, φαίνεται ότι η σαφρανάλη ήταν αρκετά δραστική απέναντι σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη σαφρανάλη επέδειξε η κυτταρική σειρά 4T1 τις οποίας η  $IC_{50}$  υπολογίστηκε μέσω του διαγράμματος στα 57μM. Αντίθετα περισσότερο ανθεκτική από όλες τις σειρές ήταν η HeLa η οποία παρουσίασε  $IC_{50}$  ίση με 274μM.

### 3.3. Επίδραση της κροκετίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η αντίστοιχη διαδικασία, όπως για την κροκίνη και τη σαφρανάλη, ακολουθήθηκε και για τη κροκετίνη. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από αντιπροσωπευτικές κυτταρικές σειρές, στις οποίες φαίνεται η διαφορά μεταξύ των control (κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε κροκετίνη) και των κυττάρων στα οποία έχουν χορηγηθεί διάφορες αραιώσεις από το αρχικό εκχύλισμα

#### 4T1



Control



CRT 800  $\mu$ M vs 4T1 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

#### HeLa



Control



CRT 50  $\mu$ M vs HeLa 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

#### N2a



Control



CRT 800  $\mu$ M vs N2a 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## T24



Control

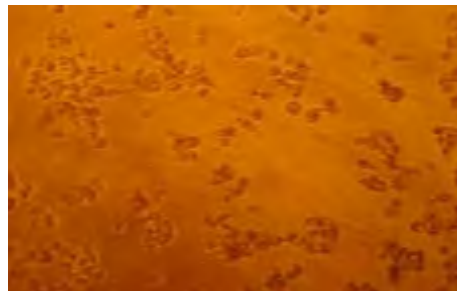


CRT 150  $\mu$ M vs T24 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## HepG2

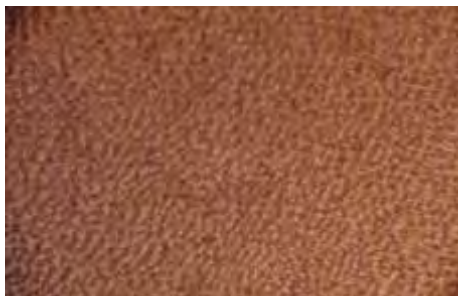


Control



CRT 800  $\mu$ M vs HepG2 10,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## MRC-5



Control



CRT 100  $\mu$ M vs MRC5 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

## A549

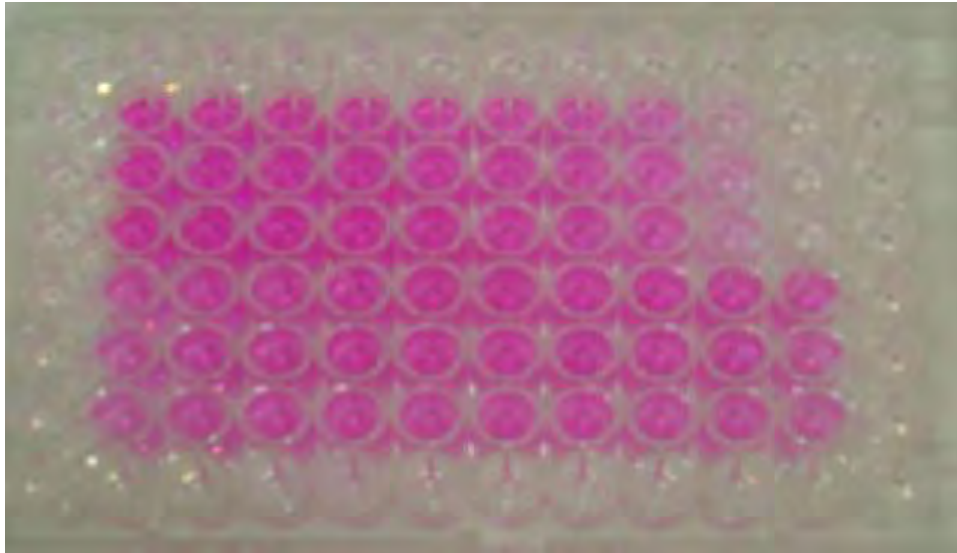


Control



CRT 300  $\mu$ M vs A549 5,000 cpw 72 h SRB (1st exp w crocus constit)

**Εικόνα 3.4:** Φωτογραφίες κυττάρων από wells διαφορετικών στηλών, 72 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών αραιώσεων του αρχικού εκχυλίσματος κροκετίνης. Για κάθε κυτταρική σειρά φαίνονται εδώ αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες. Αριστερά παρουσιάζονται τα control κύτταρα του πειράματος, ενώ δεξιά κύτταρα που δέχθηκαν μεγαλύτερης ή μικρότερης αραιώσεως διάλυμα. Μεγέθυνση μικροσκοπίου 10x.



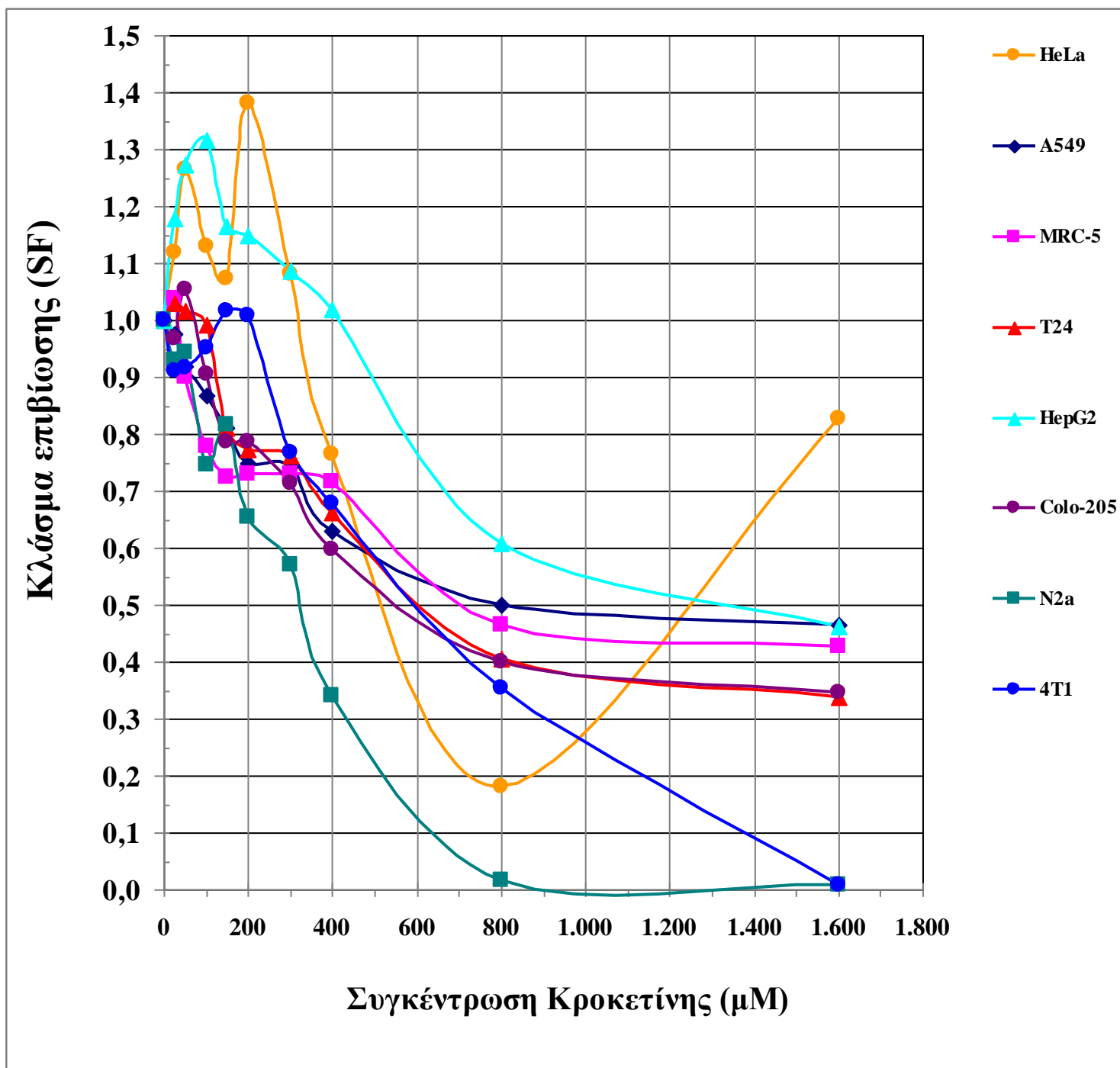
Εικόνα 3.5 Μικροπλάκα 96 θέσεων. Χρώση SRB σε κυτταρική σειρά T 24 μετά από τη δράση διαλύματος κροκετίνης (72h) διαφορετικών συγκεντρώσεων

Τα κλάσματα επιβίωσης (SF) που προέκυψαν για κάθε κυτταρική σειρά καθώς και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

	Survival fraction (SF)							
Final ( $\mu\text{M}$ )	HeLa	A549	MRC-5	T24	HepG2	Colo-205	N2a	4T1
0	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1,118	0,975	1,038	1,030	1,178	0,967	0,931	0,911
50	1,264	0,920	0,900	1,015	1,272	1,055	0,942	0,916
100	1,130	0,868	0,779	0,991	1,317	0,905	0,747	0,952
150	1,074	0,810	0,723	0,810	1,165	0,786	0,817	1,017
200	1,382	0,750	0,731	0,773	1,149	0,786	0,654	1,009
300	1,081	0,742	0,731	0,761	1,087	0,713	0,569	0,767
400	0,766	0,631	0,717	0,662	1,020	0,596	0,340	0,678
800	0,182	0,501	0,465	0,405	0,607	0,399	0,017	0,354
1.600	0,827	0,464	0,426	0,338	0,463	0,347	0,008	0,009
	IC50=516 ( $\mu\text{M}$ )	IC50=800 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 699 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 598 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 1326( $\mu\text{M}$ )	IC50= 544 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 325 ( $\mu\text{M}$ )	IC50= 592 ( $\mu\text{M}$ )

Πίνακας 3.3: SF κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση κροκετίνης. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 6 τεχνητών επαναλήψεων στο ίδιο πείραμα. Στην τελευταία σειρά αναγράφεται η  $\text{IC}_{50}$  που προκύπτει από το διάγραμμα 3.3 το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές του συγκεκριμένου πίνακα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά well είναι 5.000 για όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από την κυτταρική σειρά HepG2 στην οποία ο αριθμός κυττάρων ανά well είναι 10.000.

Με βάση τα δεδομένα του πίνακα σχεδιάστηκε το διάγραμμα 3.3, από το οποίο υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για όλες τις κυτταρικές σειρές.



Διάγραμμα 3.3: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της επίδρασης της κροκετίνης στις κυτταρικές σειρές. Από τα δεδομένα του διαγράμματος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά

Ομοίως όπως και για την κροκίνη και τη σαφρανάλη, έτσι και για την κροκετίνη από τις τιμές που αναγράφονται στον πίνακα 3.3, καθώς και από το διάγραμμα 3.3,

φαίνεται ότι η κροκετίνη ήταν δραστική απέναντι σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη κροκετίνη επέδειξε η κυτταρική σειρά N2a τις οποίες η IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε μέσω του διαγράμματος στα 325μΜ. Αντίθετα περισσότερο ανθεκτική από όλες τις σειρές ήταν η HepG2 η οποία παρουσίασε IC<sub>50</sub> ίση με 1326μΜ.

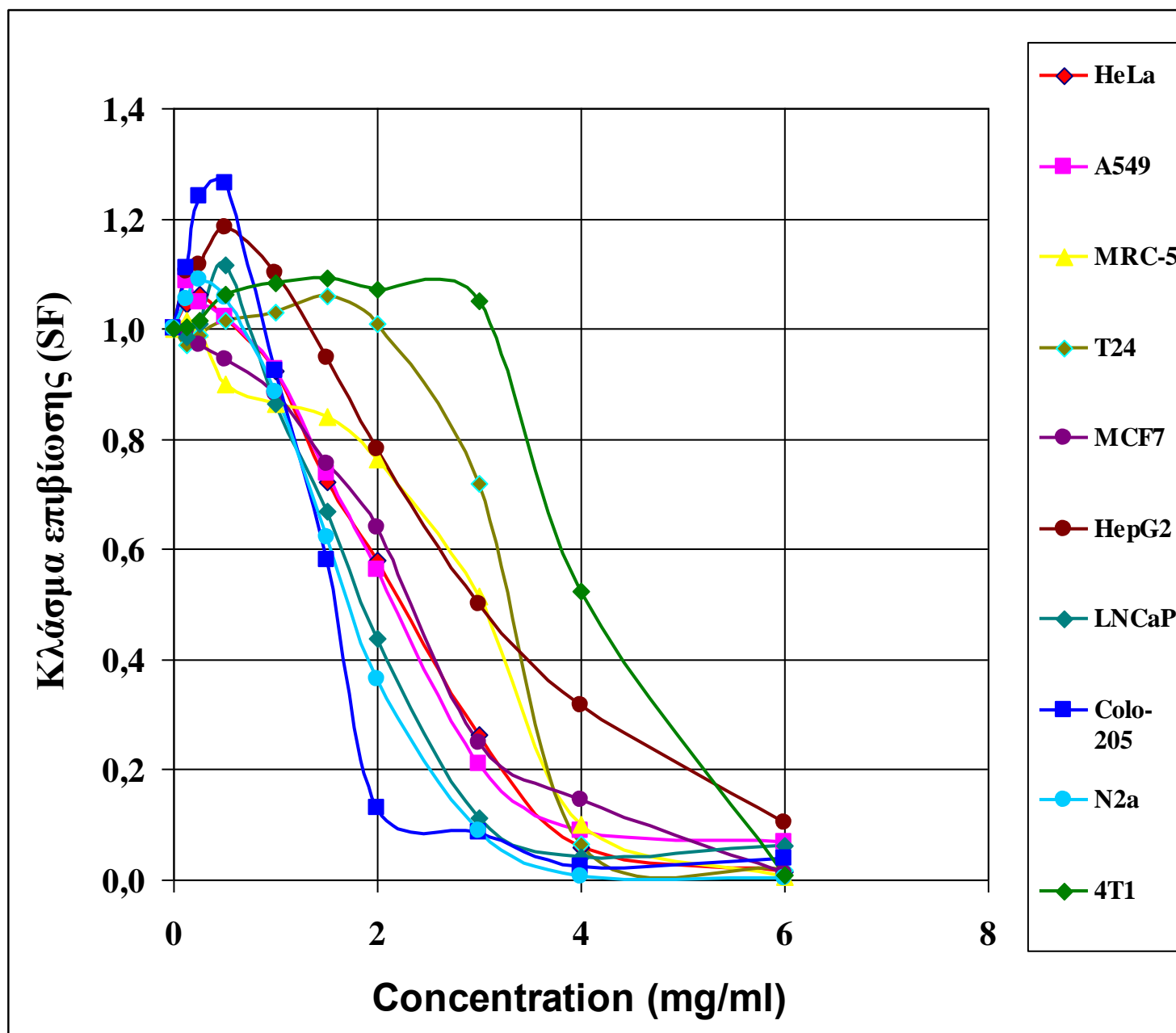
### 3.4. Επίδραση του αλκοολικού εκχυλίσματος του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην περίπτωση του αλκοολικού εκχυλίσματος είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Οι τιμές των κλασμάτων επιβίωσης (SF) κάθε κυτταρικής σειράς σε σχέση με τις συγκεντρώσεις του αλκοολικού εκχυλίσματος αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Final (mg/ml)	Survival fraction (SF)									
	HeLa	A549	MRC-5	T24	MCF7	HepG2	LNCaP	Colo-205	N2a	4T1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,125	1,046	1,085	1,015	0,972	0,994	1,103	0,985	1,109	1,055	1,003
0,25	1,063	1,047	0,999	0,988	0,970	1,117	1,010	1,240	1,089	1,015
0,5	1,017	1,021	0,901	1,014	0,943	1,184	1,117	1,263	1,057	1,063
1	0,924	0,926	0,864	1,031	0,883	1,101	0,863	0,922	0,886	1,082
1,5	0,722	0,736	0,842	1,061	0,755	0,947	0,670	0,581	0,623	1,093
2	0,581	0,561	0,765	1,009	0,638	0,782	0,437	0,131	0,365	1,072
3	0,263	0,210	0,514	0,720	0,249	0,501	0,112	0,085	0,090	1,052
4	0,059	0,089	0,100	0,065	0,146	0,318	0,041	0,023	0,007	0,524
6	0,014	0,068	0,006	0,019	0,012	0,104	0,061	0,039	0,004	0,008
	IC50= 2,25 mg/ml	IC50= 2,16 mg/ml	IC50= 3,04 mg/ml	IC50= 3,3 mg/ml	IC50= 2,34 mg/ml	IC50= 3 mg/ml	IC50= 1,85 mg/ml	IC50= 1,58 mg/ml	IC50= 1,71 mg/ml	IC50= 4,07 mg/ml

**Πίνακας 3.4:** SF κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση αλκοολικού εκχυλίσματος. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 6 τεχνητών επαναλήψεων στο ίδιο πείραμα. Στην τελευταία σειρά αναγράφεται η IC<sub>50</sub> που προκύπτει από το Διάγραμμα 3.4 το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές του συγκεκριμένου πίνακα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά well είναι 5.000 για όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από τις κυτταρικές σειρές HepG2, MCF 7 και LNCaP στις οποίες ο αριθμός κυττάρων ανά well είναι 10.000.

Από τις τιμές του Πίνακα 3.4 κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα με βάση το οποίο βρέθηκαν κατά προσέγγιση οι  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά. Επιπλέον όλες οι  $IC_{50}$  αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα.



Διάγραμμα 3.4: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της επίδρασης του αλκοολικού εκχυλίσματος στις κυτταρικές σειρές. Από τα δεδομένα του διαγράμματος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά

Με μια πρώτη ματιά είναι φανερό πως το αλκοολικό εκχύλισμα είναι εμφανίζει δραστηριότητα απέναντι σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Τη μεγαλύτερη ευαισθησία επέδειξε η κυτταρική σειρά Colo-205 ( $IC_{50}$  1,58 mg/ml), ενώ τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε η σειρά 4T1 ( $IC_{50}$  4,07 mg/ml).

### 3.5. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος του κρόκου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

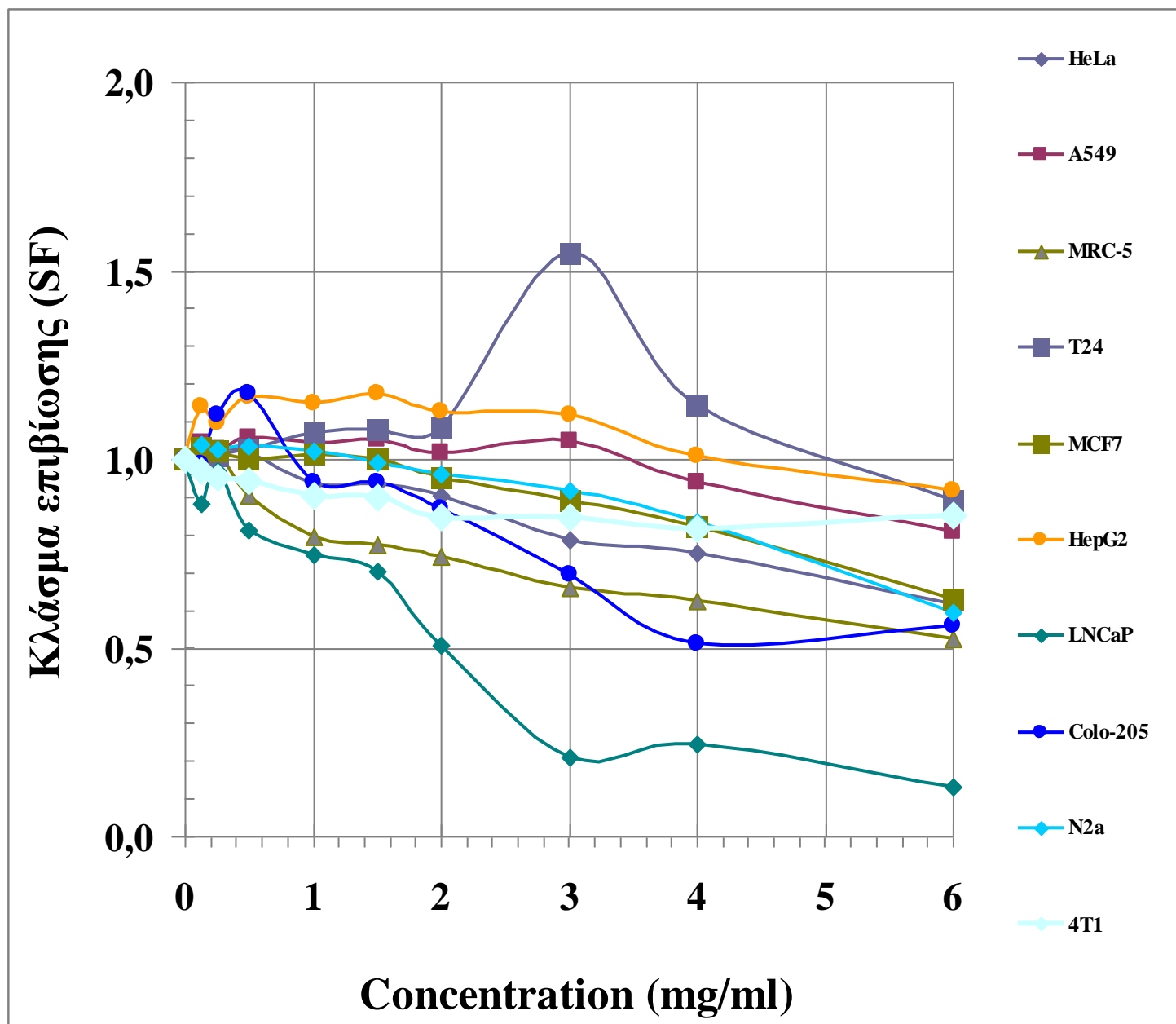
Εφαρμόζοντας την πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω προέκυψαν συγκεκριμένες τιμές κλασμάτων επιβίωσης (SF) για κάθε κυτταρική σειρά. Οι τιμές SF σε σχέση με τις αραιώσεις που παρασκευάστηκαν από το αρχικό διάλυμα καταγράφονται στον Πίνακα 3.5.

Final (mg/ml)	Survival fraction (SF)									
	HeLa	A549	MRC-5	T24	MCF7	HepG2	LNCaP	Colo-205	N2a	4T1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,125	0,991	1,044	1,007	0,985	1,032	1,139	0,882	0,988	1,040	0,969
0,25	1,021	1,028	1,024	1,008	1,023	1,097	0,968	1,120	1,027	0,953
0,5	1,019	1,057	0,904	1,028	1,002	1,165	0,814	1,174	1,035	0,944
1	0,936	1,044	0,796	1,068	1,011	1,150	0,747	0,940	1,023	0,902
1,5	0,936	1,052	0,773	1,080	0,998	1,174	0,701	0,940	0,992	0,898
2	0,906	1,019	0,742	1,082	0,952	1,126	0,507	0,868	0,960	0,848
3	0,786	1,050	0,660	1,548	0,891	1,117	0,208	0,695	0,916	0,848
4	0,752	0,939	0,624	1,145	0,819	1,007	0,244	0,509	0,834	0,815
6	0,615	0,806	0,526	0,893	0,627	0,917	0,131	0,557	0,592	0,851
	IC50=	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50=2,02 (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)	IC50= (mg/ml)

**Πίνακας 3.5:** SF κάθε κυτταρικής σειράς για κάθε συγκέντρωση υδατικού εκχυλίσματος. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 6 τεχνητών επαναλήψεων στο ίδιο πείραμα. Στην τελευταία σειρά αναγράφεται η IC<sub>50</sub> που προκύπτει από το Διάγραμμα 3.5 το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις τιμές του συγκεκριμένου πίνακα. Ο αριθμός των κυττάρων ανά well είναι 5.000 για όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από τις κυτταρικές σειρές HepG2, MCF 7 και LNCaP στις οποίες ο αριθμός κυττάρων ανά well είναι 10.000.

Οι τιμές του παραπάνω πίνακα οδήγησαν στην δημιουργία του Διαγράμματος 3.5 με βάση το οποίο υπολογίστηκαν οι IC<sub>50</sub> για κάθε κυτταρική σειρά





Διάγραμμα 3.5: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της επίδρασης του υδατικού εκχυλίσματος στις κυτταρικές σειρές. Από τα δεδομένα του διαγράμματος υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η  $IC_{50}$  για κάθε κυτταρική σειρά

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι φανερό πως το υδατικό εκχύλισμα δεν είχε μεγάλη επίδραση, σε ορισμένες περιπτώσεις και σχεδόν καθόλου, στις κυτταρικές σειρές καθώς για το σύνολο των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν δεν επιτεύχθηκε  $IC_{50}$ . Εξάιρεση αποτελεί η κυτταρική σειρά LNCaP, η οποία παρουσίασε  $IC_{50}$  ίση με 2,02 mg/ml.

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **4.1 Για την κροκίνη**

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.1 και το Διάγραμμα 3.1 όλες οι κυτταρικές σειρές, ανθρώπινες και από ποντίκι, ήταν ανθεκτικές στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήσαμε για την κροκίνη. Εξαιρέση αποτέλεσε η κυτταρική σειρά MRC-5 η οποία παρουσίασε  $IC_{50}$  ίση με 192  $\mu M$ . Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σειρά MRC-5 αποτελείται από φυσιολογικά κύτταρα πνεύμονα ανθρώπου. Ακόμα όμως και στις σειρές που εμφάνισαν ανθεκτικότητα απέναντι στην κροκίνη παρατηρούνται διαφοροποιήσεις. Υπάρχει, δηλαδή, μια ομάδα από κυτταρικές σειρές, συγκεκριμένα οι HeLa, T24, HepG2, Colo-205, N2a, οι οποίες φαίνεται να μην επηρεάζονται καθόλου από την παρουσία της κροκίνης, καθώς ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε κάθε well της μικροπλάκας παραμένει σχεδόν ο ίδιος, ανεξάρτητα από την προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης της κροκίνης. Επίσης παρατηρείται και μια δεύτερη ομάδα από κυτταρικές σειρές, συγκεκριμένα οι A549 και 4T1, στις οποίες μπορεί να μην επιτεύχθηκε  $IC_{50}$  στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων, παρόλα αυτά παρατηρήθηκε αισθητή μείωση στο αριθμό των ζωντανών κυττάρων όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της κροκίνης. Ενδεχομένως αν είχαν χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες δηλαδή από 2000 $\mu M$ , κροκίνης να ήταν δυνατό να επιτευχθεί  $IC_{50}$  και γι' αυτές τις κυτταρικές σειρές.

### **4.2 Για τη σαφρανάλη**

Αυτό που μπορεί να παρατηρήσει κανείς με μια πρώτη ματιά για την σαφρανάλη είναι ότι, στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν πολύ δραστική απέναντι στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 3.2 και του Διαγράμματος 3.2. Μεγαλύτερη ευαισθησία εμφάνισε η κυτταρική σειρά 4T1 καθώς παρουσιάζει  $IC_{50}$  μόλις 57 $\mu M$ . Είναι αξιοσημείωτο ότι η  $IC_{50}$  επιτεύχθηκε κάτω από την μικρότερη συγκέντρωση σαφρανάλης (100 $\mu M$ ) του εύρους των συγκεντρώσεων που

χρησιμοποιήθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισαν και οι κυτταρικές σειρές N2a (IC<sub>50</sub> 82μM), Colo-205 (IC<sub>50</sub> 68μM), HepG2(IC<sub>50</sub> 88μM) και T24 (IC<sub>50</sub> 71μM). Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη σαφρανάλη από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν επέδειξε η σειρά HeLa, της οποίας το IC<sub>50</sub> υπολογίστηκε με βάση το Διάγραμμα 3.2 περίπου στα 274μM. Στα ίδια επίπεδα κυμάνθηκαν και οι σειρές MRC-5 η οποία εμφάνισε IC<sub>50</sub> περίπου στα 237μM, καθώς και η σειρά A549, η οποία εμφάνισε IC<sub>50</sub> στα 152μM. Από τα αποτελέσματα και τον υπολογισμό των IC<sub>50</sub> οι κυτταρικές σειρές μπορούν να καταταχθούν με βάση την ευαισθησία του στη σαφρανάλη ως εξής:

4T1>Colo-205>T24>N2a>HepG2>A549>MRC-5>HeLa

### 4.3 Για την κροκετίνη

Όσον αφορά την κροκετίνη, τα αποτελέσματα δείχνουν πως εμφανίζει δραστηριότητα σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη ευαισθησία επέδειξε η κυτταρική σειρά N2a (IC<sub>50</sub> 325 μM), ενώ περισσότερο ανθεκτική παρουσιάζεται η σειρά HepG2 (IC<sub>50</sub> 1326 μM). Για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές μπορούμε να παρατηρήσουμε πως η IC<sub>50</sub> κυμαίνεται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 500 μέχρι 800 μM (οι IC<sub>50</sub> όλων των κυτταρικών σειρών βρίσκονται στον Πίνακα 3.3). Από τα αποτελέσματα και τον υπολογισμό των IC<sub>50</sub> οι κυτταρικές σειρές μπορούν να καταταχθούν με βάση την ευαισθησία του στη κροκετίνη ως εξής:

N2a > HeLa > Colo-205> 4T1> T24> MRC-5> A549> HepG2

### 4.4 Για το αλκοολικό εκχύλισμα

Από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας γίνεται εμφανές ότι το αλκοολικό εκχύλισμα είναι δραστικό σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Μεγαλύτερη ευαισθησία εμφάνισε η κυτταρική σειρά Colo-205 (IC<sub>50</sub> 1,58 mg/ml), ενώ τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε η σειρά 4T1 (IC<sub>50</sub> 4,07 mg/ml). Από τα αποτελέσματα και τον υπολογισμό των IC<sub>50</sub> οι κυτταρικές σειρές μπορούν να καταταχθούν με βάση την ευαισθησία του στη κροκετίνη ως εξής:

Colo-205 > N2a > LNCaP > A549> HeLa > MCF-7> HepG2> MRC-5 > T24 >4T1

#### 4.5 Για το υδατικό εκχύλισμα

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.5 και το Διάγραμμα 3.5 όλες οι κυτταρικές σειρές, ανθρώπινες και από ποντίκι, ήταν ανθεκτικές στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήσαμε για την κροκίνη. Εξαιρέση αποτέλεσε η κυτταρική σειρά LNCaP η οποία παρουσίασε  $IC_{50}$  ίση με 2,02 mg/ml. Η σειρά LNCaP αποτελείται από κύτταρα αδενοκαρκινώματος προστάτη ανθρώπου. Για τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές φαίνεται πως ορισμένες από αυτές, A549, T24, HepG2 και 4T1, παρέμειναν σχεδόν ανεπηρέαστες από την παρουσία του υδατικού διαλύματος του κρόκου, καθώς ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε κάθε well της μικροπλάκας παραμένει σχεδόν ο ίδιος, ανεξάρτητα από την προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του υδατικού διαλύματος. Στις υπόλοιπες, HeLa, MRC-5, MCF7, Colo-205 και N2a, ενώ παρουσιάζεται ξεκάθαρα ευαισθησία στο υδατικό διάλυμα με βάση τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν επιτεύχθηκε  $IC_{50}$ . Πιθανότατα με τη χρήση μεγαλύτερης συγκέντρωσης από τα 6 mg/ml οι συγκεκριμένες σειρές να παρουσίαζαν  $IC_{50}$ .

#### 4.6 Σύγκριση δράσης κροκίνης, σαφρανάλης και κροκετίνης για κάθε κυτταρική σειρά

Όπως ήταν αναμενόμενο η κάθε κυτταρική σειρά επέδειξε διαφορετική ευαισθησία στα τρία υπό εξέταση συστατικά. Σε αυτή την παράγραφο επιχειρείται μια σύγκριση ανάμεσα στις  $IC_{50}$ , καθώς αυτή αντανακλά την κυτταροτοξική δράση του κάθε συστατικού, για κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά. Συγκεκριμένα:

- **HeLa:** Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα κύτταρα της σειράς HeLa ήταν πιο ευαίσθητα στη σαφρανάλη και πιο ανθεκτικά στην κροκίνη, καθώς για την κροκίνη δεν επιτεύχθηκε  $IC_{50}$ . Συγκρίνοντας τις  $IC_{50}$  για την κροκετίνη και για τη σαφρανάλη προκύπτει πως η σαφρανάλη ήταν 1,88 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.

- **A549:** Τα κύτταρα A549 ήταν πιο ευαίσθητα στη σαφρανάλη, ενώ επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην κροκίνη, για την οποία δεν επιτεύχθηκε IC<sub>50</sub>. Από τον λόγο των IC<sub>50</sub> της κροκετίνης και της σαφρανάλης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η σαφρανάλη ήταν 5,26 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.
- **MRC-5:** Η κυτταρική σειρά MRC-5 ήταν η μοναδική σειρά για την οποία επιτεύχθηκε IC<sub>50</sub> και για τα τρία συστατικά. Με βάση τα αποτελέσματα τα κύτταρα MRC-5 ήταν πιο ανθεκτικά στην κροκετίνη και πιο ευαίσθητα στην κροκίνη. Συγκεκριμένα η κροκίνη ήταν 3,64 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη και 1,23 φορές πιο δραστική από τη σαφρανάλη. Σύγκριση μπορεί να γίνει επίσης και ανάμεσα στην κροκετίνη και τη σαφρανάλη. Σε αυτή την περίπτωση η σαφρανάλη ήταν 2,95 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.
- **T24:** Τα κύτταρα T24 ήταν πιο ευαίσθητα στη σαφρανάλη και πιο ανθεκτικά στην κροκίνη (δεν επιτεύχθηκε IC<sub>50</sub>). Ο λόγος των IC<sub>50</sub> της κροκετίνης και της σαφρανάλης δείχνει πως η σαφρανάλη ήταν 8,44 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.
- **HepG2:** Η κυτταρική σειρά HepG2 ήταν πιο ευαίσθητη απέναντι στη σαφρανάλη και πιο ανθεκτική απέναντι στην κροκίνη. Συγκρίνοντας τις IC<sub>50</sub> για την κροκετίνη και για τη σαφρανάλη προκύπτει πως η σαφρανάλη ήταν 15,07 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.
- **Colo 205:** Τα κύτταρα της σειράς Colo 205 επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στη σαφρανάλη και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην κροκίνη, καθώς για την κροκίνη δεν επιτεύχθηκε IC<sub>50</sub>. Η σύγκριση μεταξύ των IC<sub>50</sub> δείχνει πως η σαφρανάλη ήταν 8 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.
- **N2a:** Τα κύτταρα N2a ήταν πιο ευαίσθητα απέναντι στη σαφρανάλη και πιο ανθεκτικά απέναντι στην κροκίνη (δεν επιτεύχθηκε IC<sub>50</sub>). Για την κροκετίνη και τη σαφρανάλη, έπειτα από σύγκριση των IC<sub>50</sub> που παρουσίασαν, προκύπτει ότι η σαφρανάλη ήταν 3,96 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.

- **4T1:** Η κυτταρική σειρά 4T1 ήταν πιο ευαίσθητη απέναντι στη σαφρανάλη και πιο ανθεκτική απέναντι στην κροκίνη, καθώς για την κροκίνη δεν επιτεύχθηκε  $IC_{50}$ . Ο λόγος των  $IC_{50}$  της κροκετίνης και της σαφρανάλης δείχνει πως η σαφρανάλη ήταν 10,39 φορές πιο δραστική από την κροκετίνη.

#### **4.7 Σύγκριση δράσης αλκοολικού και υδατικού εκχυλίσματος για κάθε κυτταρική σειρά**

Η μοναδική σύγκριση που μπορεί να γίνει ανάμεσα στα δυο εκχυλίσματα του κρόκου, αλκοολικό και υδατικό, σε επίπεδο σειράς είναι μόνο για την κυτταρική σειρά LNCaP. Το γεγονός αυτό προκύπτει καθώς μόνο για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά ήταν δυνατή η επίτευξη  $IC_{50}$  και για τα δυο εκχυλίσματα. Στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές  $IC_{50}$  επιτεύχθηκε μόνο για το αλκοολικό εκχύλισμα. Συγκεκριμένα τα κύτταρα LNCaP επέδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στο αλκοολικό εκχύλισμα ενώ ήταν πιο ανθεκτικά απέναντι στο υδατικό εκχύλισμα. Έπειτα από σύγκριση ανάμεσα στις δυο  $IC_{50}$  προκύπτει πως το αλκοολικό εκχύλισμα ήταν 1,09 φορές πιο δραστικό από το υδατικό εκχύλισμα.

## ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- [1] <http://www.safran.gr/history.asp?s=1>
- [2] <http://www.foodzine.gr/home/635081138193.html>
- [3] <http://www.tovima.gr/finance/article/?aid=179168>
- [4] <http://www.safran.gr/history.asp>
- [5] <http://www.safran.gr/origin.asp>
- [6] <http://www.safran.gr/properties.asp>
- [7] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281233#x27>
- [8] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=61041>
- [9] [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281232&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281232&loc=ec_rcs)
- [10] [http://giapraki.com/e107\\_plugins/content/content.php?content.469](http://giapraki.com/e107_plugins/content/content.php?content.469)
- [11] <http://ebm.rsmjournals.com/content/227/1/20.full>
- [12] [http://ec.europa.eu/health-eu/health\\_problems/cancer/io\\_el.htm#tab\\_international\\_organisation](http://ec.europa.eu/health-eu/health_problems/cancer/io_el.htm#tab_international_organisation)

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Γ. Γερομιχαλός, Φ. Παπαδόπουλος, Ζ. Σινάκος. Η σαφρανάλη, συστατικό του κρόκου (*crocus sativus* L.), αναστέλλει την ανάπτυξη των K-562 κυττάρων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Μελέτη in silico και in vitro. Ομιλία στο 23ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 22-24, Νοεμβρίου 2012, Αίμα (Haema) - The Journal of the Hellenic Society of Haematology October-December 2012, Nr. 19, p.29.
- 2.Γεώργιος Γερομιχαλός, Θεοδώρα Φαρμάκη, Μαρία Δίτσα, Φωτεινή Λάμαρη, Δήμητρα Μαρκάλα, Παναγιώτης Δαλέζης, Αθανάσιος Παπαεωργίου, Ζαχαρίας Σινάκος. Τα καροτενοειδή κροκίνη και κροκετίνη αναστέλλουν τη δράση του παράγοντα X της πήξης. Μελέτη in silico και in vitro. Ομιλία στο 20ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 4-7 Νοεμβρίου 2009, Ηράκλειο, Κρήτη, Αίμα (Haema) - The Journal of the Hellenic Society of Haematology November 2009, Nr. 80, p.111-112
- 3.Δίτσα Μ, Γερομιχαλού Ε, Μαρκάλα Δ, Γερομιχαλός Γ, Δαλέζης Π, Τραφαλής Δ, Παπαεωργίου Α, Σινάκος Ζ. In vitro και in silico μελέτη τη επίδρασης της

επίδρασης της κροκίνης και της σαφρανάλης στο μηχανισμό πήξης του ανθρώπου. Ομιλία στην Ημερίδα της Αιματολογικής Εταιρείας Θεσσαλονίκης, Απρίλιος 2009.

4. Φωτεινή Ν Λάμαρη, Γεώργιος Δ Γερομιχαλός, Μαγδαληνή Α Παπανδρέου, Δημήτριος Τ Τραφαλής, Μαριγούλα Μαργαρίτη, Αθανάσιος Παπαγεωργίου, Ζαχαρίας Σινάκος. Αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης από την κροκετίνη και άλλα συστατικά του κρόκου Κοζάνης: In vitro και in silico μελέτες μοριακής πρόσδεσης. Βιβλίο Περιλήψεων, Αναρτημένη ανακοίνωση, σελ. 52. Στο 7ο Πανελλήνιο Ιατρικό-Διεπιστημονικό Συνέδριο Νόσου Alzheimer & Συγγενών Διαταραχών, Θεσσαλονίκη, 16-20 Φεβρουαρίου 2011.
5. Abdullaev F I, Frenkel G D. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis, *Bio Factors*, Vol: 3(3): 43-45, 201–204, (1992).
6. Abdullaev F I, Gonzalez de Mejia E. Inhibition of colony formation of Hela cells by naturally occurring and synthetic agents, *BioFactors*, Vol: 5(3):133-138, (1995-96).
7. Abdullaev F I, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R, et al. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effect of saffron (*Crocus sativus*) *Toxicol In Vitro*. 2003;17:731–6. [[PubMed](#)]
8. Abe K, Saito H. Effects of saffron and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytother Res*. 2000;14:149–52. [[PubMed](#)]
9. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytother Res*. Vol 14:149-52. (2000).
10. Akhondzadeh Basti A, Moshiri E, Noorbala AA, et al. Comparison of petal of *Crocus sativus* L and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Vol Dec, (2006).
11. *Cancer Lett*. Feb 27, Vol:100: 23-30, (1996).
12. Dalezis P, Papageorgiou A, Geromichalou E, Geromichalos G, Trafalis DTP, Sinakos Z. Antitumor activity of crocin, crocetin and safranal on murine P388 leukemia bearing mice, in 3rd International Symposium on Saffron, held in Krokos, Kozani, Greece 20-23 May 2009, Book of Abstracts, P3-12, p. 58-59.
13. Ditsa M, Geromichalou E, Markala D, Geromichalos G, Dalezis P, Trafalis DTP, Papageorgiou A, Sinakos Z. In vitro and in silico study of the effect of crocin and safranal on human plasma coagulation, in 3rd International Symposium on Saffron, held in Krokos, Kozani, Greece 20-23 May 2009, Book of Abstracts, Nr. P3-13, p. 59 (oral presentation).
14. Escribano J, Diaz-Guerra MJ, Riese H H, Ontanon J, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Rubio A, Fernandez JA, In vitro activation of macrophages from corms of *Crocus sativus* L, *Cancer Lett*, vol 144(1):107–114, (1999).



15. Escribano J, Diaz-Guerra M J, Riese H H, Alvarez A, Proenza R, Fernandez J A, The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted from corms of saffron plant (*Crocus sativus*) on human cell lines in culture, *Planta Med* 66(2):157–162, (2000).
16. Escribano J, Rios J, Fernandez JA. Isolation and cytotoxic properties of novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.), *Biochim Biophys Acta*, Vol: 1426 (1) : 217–222, (1999).
17. Escribano J, Piqueras A, Medina J, Rubio A, Alvarez-Orti M, Fernandez JA, Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.), *J Biotechnol*, Vol 73(1):53–59, (1999).
18. Fatehi M, Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on response induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacology*. 2003;84:199–203
19. Fernandez J A, Escribano J, Piqueras A, Medina J. A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability, *J Exp Bot*, Vol 51:731–737, (2000).
20. Fernandez J A, Escribano J, Piqueras A, Medina J. A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell, *Sci Congr*, Vol 3:125–126, (1990).
21. Garcia-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontanon J, Fernandez JA, Atienzar M, Garcia-Olmo D. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rats. *Nutr. Cancer* Vol: 35(2): 120–126, (1999).
22. G.D. Geromichalos, D.T. Trafalis. In silico virtual high-throughput screening approach in profiling the drug potency of various saffron bioactive constituents. Ομιλία στο 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακολογίας, 18 Μαΐου 2012, Θεσσαλονίκη. *Hippokratia* 2012, 16 (Suppl 1), 7th Panhellenic Congress of Pharmacology, Thessaloniki, 18-20 May 2012, Book of Abstracts, Oral presentation, O5, p.7.
23. Geromichalos GD, Lamari FN, Papandreou MA, Trafalis DT, Margarity M, Papageorgiou A, Sinakos Z. Saffron as a source of novel acetylcholinesterase inhibitors: Molecular Docking & In Vitro Enzymatic Studies. *J Agric Food Chem* 60(24); 6131-8 (2012).
24. Geromichalos G, Trafalis D, Papageorgiou A, Sinakos Z, Dalezis P, Kartsionis V, Athanassiou A. In silico study of the protein kinase inhibitory profiling and antihyperlipidemic and antitumor activity of various saffron extracts and flavonoids using molecular docking techniques. At the 1st International Conference on drug design & discovery, February 4-7, 2008, Dubai, UAE.

25. George D Geromichalos, Fotini N Lamari, Magdalini A. Papandreou, Dimitrios T Trafalis, Marigoula Margarity, Athanasios Papageorgiou, Zacharias Sinakos. Inhibition of Acetylcholinesterase by Saffron Constituents: Molecular Docking & In Vitro Studies. Abstract Book, Poster. At the 25th Hellenic Society for Neuroscience Meeting November 25 - 26, 2011, Patra, Greece
26. Hosseinzadeh H, Ghenaati J. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*. 2006;77:446–8. [[PubMed](#)]
27. Hosseinzadeh H, Talebzadeh F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia*. 2005;76:722–4. [[PubMed](#)]
28. Hosseinzadeh H, Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol*. 2002;2:7. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
29. 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;15:491–5. [[PubMed](#)]
30. Hoyle CH, Burnstock G. ATP receptors and their physiological roles. In: Stone TW, editor. *Adenosine in the Nervous system*. London: Academic Press; 1991. pp. 43–76.
31. *Indian medical plants, a companion of 500 species, Volume 2*, Arya Vaidya Sala: 212.
32. Karimi G, Hosseinzadeh H, Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2001;4:11–5
33. M. Ditsa, G. Geromichalos, E. Tragoulia, D. Markala, Ch. Meleti, Z. Sinakos. In vitro and in vivo study of the effect of crocin and safranal on human plasma coagulation. *Thrombosis Research*, 130, c0135, s167, 2012 (IF: 2.440) (Abstracts and Proceedings of the 22nd International Congress on Thrombosis, Nice, France, 6-9 October, 2012).
34. Morjani H, Tarantilis P, Polissiou M, Manfait M. Growth inhibition and induction of erythroid differentiation activity by crocin, dimethylcrocetin and  $\beta$ -carotene on K562 tumor cells, *Anticancer Res*, Vol 10: 1398– 1406, (1990).
35. Moshiri E, Basti AA, Noorbala AA, Jamshidi AM, Abbasi SH, Akhondzadeh S. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomised and placebo-controlled trial. *Phytomedicine*. 2006;13:607–11. [[PubMed](#)]
36. Nair S.C, Kurumboor S.K, Hasegawa J.H, Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review, *Cancer Biother*, Vol 10(4):257–264, (1995).

37. Nair S C, Pannikar B, Pannikar K R, Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*), *Cancer Lett*, Vol 57(2):109–114, (1991).
38. Nair S C, Salomi M J, Panikkar B, Pannikar K R, Modulatory effects of *Crocus-sativus* and *Nigella-sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice, *J Ethnopharmacol*, Vol 5: 67–84, (1991).
39. Nemati H, Boskabady MH, Ahmadzadeh Vortakolaei H. Stimulatory effects of *Crocus sativus* (Saffron) on  $\beta_2$  adrenoreceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine*. 2008;15:1038–45. [[PubMed](#)]
40. Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tamacebi-Pour N, Jamshedi 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. [[PubMed](#)]
41. P. Dalezis, A. Papageorgiou, E. Chrysogelou, E. Stergiou, G. Geromichalos, D. Trafalis, A.E Athanassiou. Crocetin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibits the growth of murine leukemia P388. At the 6th Congress of Balkan Union of Oncology held in Sofia, Bulgaria in 13-16 September 2006, Proceedings OP206, p.94
42. Pitsikas N, Boultadakis A, Gergiadou G, Tarantilis PA, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L. in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*. 2008;15:1135–9. [[PubMed](#)]
43. Sigiura M, Saito H, Abe K. Ethanol extract of *Crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Phytother Res*. 1995;9:100–4.
44. Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M. Inhibition of growth and induction of differentiation promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L, *Anticancer Res*, Vol: 14(5A):1913–1918, (1994)
45. Verma SK, Bordia A. Antioxidant property of saffron in man. *Indian J Med Sci*. 1998;52:205–7. [[PubMed](#)]
46. Vida JA, Foye WO, Lemke TL, Williams DA, eds. *Principles of Medicinal Chemistry*. London: Williams and Wilkins; 1995.
47. Voigt, W. 2005, "Sulforhodamine B assay and chemosensitivity", *Methods in Molecular Medicine*, vol. 110, pp. 39-48.
48. Xuan B. Effects of crocin analogs on ocular flow and retinal function. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1999;15:143–52. [[PubMed](#)]