



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: “Μελέτη της επίδρασης του *Crocus sativus* L. (σαφράν) στη λειτουργικότητα των ενζύμων CYP2A6, Οξειδάση της Ξανθίνης (XO) και N-ακετυλοτρανσφεράσης-2 (NAT2) σε υγιείς εθελοντές”

Μαρία Δαβίτη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Ανδρέας Τσακάλωφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φαρμακολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



UNIVERSITY OF
THESSALY

SCHOOL OF HEALTH
SCIENCE
FACULTY OF
MEDICINE



MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Effects of *Crocus sativus* L. (saffron) on the activity of CYP2A6,
Xanthine Oxidase (XO) and N-acetyltransferase-2 (NAT2) in
healthy volunteers**

By

Maria Daviti

Three-member Supervisory Committee:

- Eftihia Asproдини, Associate Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Anastasios Germanis, Professor of Immunology
- Andreas Tsakalof, Associate Professor of Chemistry

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larisa, October, 2018

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Ευτυχία Ασπροδίνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και την πολύτιμη καθοδήγησή της στη διεξαγωγή αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές Μ. Σπελέτα και Α. Τσακάλωφ που συμφώνησαν να είναι μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Μπέγα που αποτέλεσε σημαντικό αρωγό στο πειραματικό μέρος της έρευνας καθώς η συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν καθοριστική.

Τέλος, θερμά ευχαριστήρια αξίζουν η οικογένεια και οι φίλοι μου για την αμέριστη συμπαράσταση και ψυχολογική υποστήριξή που μου παρείχαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας Περιεχομένων	4
1. Περίληψη.....	6
2. Εισαγωγή	8
3. Κρόκος Κοζάνης (Σαφράν).....	9
3.1 Συστατικά του κρόκου.....	10
3.2 Θεραπευτικές ιδιότητες του κρόκου	11
3.3 Τοξικότητα του κρόκου και ανεπιθύμητες ενέργειες.....	19
4. Καροτενοειδή	20
4.1 Σύντομη επισκόπηση	21
4.2 Χημική δομή, λειτουργία και κατανομή στις μεμβράνες	22
4.3 Βιοδιαθεσιμότητα καροτενοειδών	23
4.4 Απορρόφηση και μεταφορά	24
4.5 Πηγές καροτενοειδών	25
4.5.1 Ξανθοφυλλίνες.....	25
4.5.2 Καροτένια.....	26
5. Κυτόχρωμα P450	27
5.1 CYP2A6	28
6. Οξειδάση της ξανθίνης - ΧΟ	31
7. Ν-ακετυλοτρανσφεράση-2 – NAT-2.....	33
8. Η καφεΐνη ως πρότυπο φάρμακο - δείκτης	35
9. Σκοπός	38
10. Πρωτόκολλο μελέτης	39
11. Αντιδραστήρια – Χημικές ουσίες	43
12. Συσκευές χρωματογραφίας	43
13. Χρωματογραφικές συνθήκες	44
14. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων	44
15. Επεξεργασία δειγμάτων ούρων	44
16. Ποιοτικός έλεγχος - Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης.....	45
17. Ακρίβεια - Επαναληψιμότητα	46
18. Στατιστική ανάλυση.....	48
19. Αποτελέσματα	49
19.1 CYP2A6	49
19.2 ΧΟ- Οξειδάση της Ξανθίνης	52

19.3 NAT-2.....	54
20. Συζήτηση	59
21. Συμπέρασμα.....	62
22. Βιβλιογραφία - Πηγές.....	63

1. Περίληψη

Εισαγωγή : Ο Κρόκος Κοζάνης (*Crocus sativus* L.) ή αλλιώς σαφράν αποτελεί ένα από τα πιο ακριβά μπαχαρικά. Το στίγμα του κρόκου χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μαγειρική για να δώσει χρώμα και γεύση στα φαγητά, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται και στο πλαίσιο της θεραπευτικής αγωγής ασθενειών λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Τα κύρια συστατικά του κρόκου Κοζάνης είναι η πικροκροκίνη, η σαφρανάλη, η κροκίνη και κροκετίνη. Στόχος της εργασίας μας ήταν η *in vivo* μελέτη της επίδρασης του κρόκου Κοζάνης στη λειτουργικότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών CYP2A6, XO και NAT2, καθώς, μέχρι τώρα, δεν έχουν υπάρξει αντίστοιχες έρευνες *in vivo*.

Μέθοδοι: Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε δείγμα 9 υγιών εθελοντών. Τους χορηγήθηκε ειδικό διατροφολόγιο κατά το οποίο απείχαν από τροφές που περιείχαν καροτενοειδή για 14 ημέρες, ενώ κατανάλωναν το αφέψημα του κρόκου Κοζάνης (300mg/150ml) σε καθημερινή βάση για τις τελευταίες 7 ημέρες. Ως φάρμακο-δείκτη στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η καφεΐνη και οι μεταβολικοί λόγοι της στα ούρα των εθελοντών. Συνολικά ελήφθησαν 54 δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές φάσεις του ερευνητικού πρωτοκόλλου: *φάση I:* πριν την έναρξη της δίαιτας καροτενοειδών, *φάση II:* πριν την έναρξη της χορήγησης του κρόκου Κοζάνης καθώς και *φάση III:* μετά την περίοδο χορήγησης του κρόκου. Επιπλέον, σε κάθε φάση του πρωτοκόλλου, οι εθελοντές έδιναν δύο δείγματα ούρων : στο πρώτο δείγμα συνέλλεγαν τα ούρα των πρώτων πέντε ωρών μετά τη λήψη της καφεΐνης (0-5 ώρες) και στο δεύτερο ούρα της έκτης ώρας (6^η ώρα).

Αποτελέσματα: Στα δείγματα 0-5 ώρες, οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για τα ένζυμα CYP2A6, XO και NAT2 δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Ομοίως και στα δείγματα της 6^{ης} ώρας, οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για το CYP2A6, την XO και τη NAT δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μεταβολή.

Συμπέρασμα : Η τακτική χορήγηση του αφεψήματος του κρόκου σε δοσολογία 300mg/100ml για 7 ημέρες δε φαίνεται να επιδρά στη λειτουργικότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των φαρμάκων CYP2A6, XO και NAT2 και μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής σε περιπτώσεις συγχορήγησης με άλλα φάρμακα που αποτελούν υποστρώματα αυτών των ενζύμων.

Λέξεις-κλειδιά: CYP2A6, Οξειδάση της ξανθίνης, N-Ακετυλοτρανσφεράση-2, *Crocus sativus*, καροτενοειδή, καφεΐνη, μεταβολισμός.

Abstract

Introduction: Saffron is the dried stigmas of *Crocus sativus* L. and it is one of the most expensive spices in terms of price by weight. The dried stigmas are widely used in foods as a flavoring and coloring agent, while it is also used as herbal medicine due to its medicinal properties. The main components of saffron are picrocrocin, safranal, crocin and crocetin. The aim of this study was to investigate the in vivo effect of saffron tea on the enzymatic activities of CYP2A6, XO and NAT2, as there is complete lack of in vivo evidence of its effects in humans.

Methods: The sample consisted of 9 healthy volunteers. They followed a special diet during which they abstained from carotenoid-containing foods for 14 days, while they consumed the saffron tea (300mg / 150ml) on a daily basis for the last 7 days. Caffeine was used as a metabolic probe by estimating the urinary metabolic ratios in volunteers. In total, 54 urine samples were obtained that were collected in three different stages of the protocol, *phase I*: before the onset of the carotenoid-free diet, *phase II*: before saffron's administration and *phase III*: after saffron's administration. At each phase of the protocol, two urine samples were obtained: the first sample consisted of urine collected the first five hours after caffeine consumption (0-5h) and the second sample consisted of urine collected at the sixth hour (6h).

Results: The mean values of caffeine metabolic ratios for CYP2A6, XO and NAT2 enzymes in the urine samples 0-5h did not show a statistically significant change. Similarly, the mean values of caffeine metabolic ratios for CYP2A6, XO and NAT enzymes in the 6h samples showed no statistically significant change.

Conclusion: Regular administration of the saffron tea at a dose of 300mg / 100ml per day for 7 days does not appear to affect the activity of the enzymes CYP2A6, XO and NAT2. Therefore, regular saffron tea may be considered safe either when it is consumed alone, or in combination of drugs that are substrates of the above-mentioned enzymes.

Key words: CYP2A6, xanthine oxidase, N-acetyltransferase-2, *Crocus sativus*, carotenoids, caffeine, metabolism.

2. Εισαγωγή

Τη σημερινή εποχή, μεγάλος αριθμός ανθρώπων βασίζει την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων/ασθενειών του σε παραδοσιακά φάρμακα και κυρίως στη χρήση φυτικών προϊόντων. Μεγάλο ενδιαφέρον σε αυτές τις φυτικές τροφές που χρησιμοποιούνται ως "φάρμακα" παρουσιάζουν οι θεραπείες με βότανα. Η χρήση τέτοιων βοτάνων με τη μορφή αφεψημάτων (που περιλαμβάνει συνήθως θέρμανση και εμπότιση ακατέργαστου φυτικού υλικού) ήτα ευρέως διαδεδομένη για αιώνες. Ακόμα και σήμερα, Πάροχοι Υγείας σε χώρες της Ευρώπης και της Ασίας προτείνουν αφεψήματα βοτάνων αν και τέτοιες θεραπείες βασίζονται κυρίως στην παραδοσιακή ιατρική, παρά σε τεκμηριωμένες επιστημονικά έρευνες. Ο κρόκος Κοζάνης ή αλλιώς Σαφράν (*Crocus sativus* L.), τον οποίο μελετάμε στην παρούσα εργασία, ανήκει στα πιο διαδεδομένα βότανα που χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική και έχει αποδειχτεί πως έχει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες.

3. Κρόκος Κοζάνης (Σαφράν)

Ο κρόκος Κοζάνης είναι το πιο ακριβό καλλιεργημένο φυτό στον κόσμο κυρίως ως προς την τιμή κατά βάρος. Είναι πολυετές βότανο χωρίς βλαστό που φύτεται στις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, το Ιράν, την Ινδία, το Θιβέτ και περιοχές της Κίνας. (R. Srivastava et al., 2010). Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Κοζάνης ενώ αυτοφυής συναντάται σε ακαλλιεργητους αγρούς στις Κυκλάδες και κυρίως τη Σύρο, την Μύκονο, την Τήνο, τη Δήλο και την Αστυπάλαια.

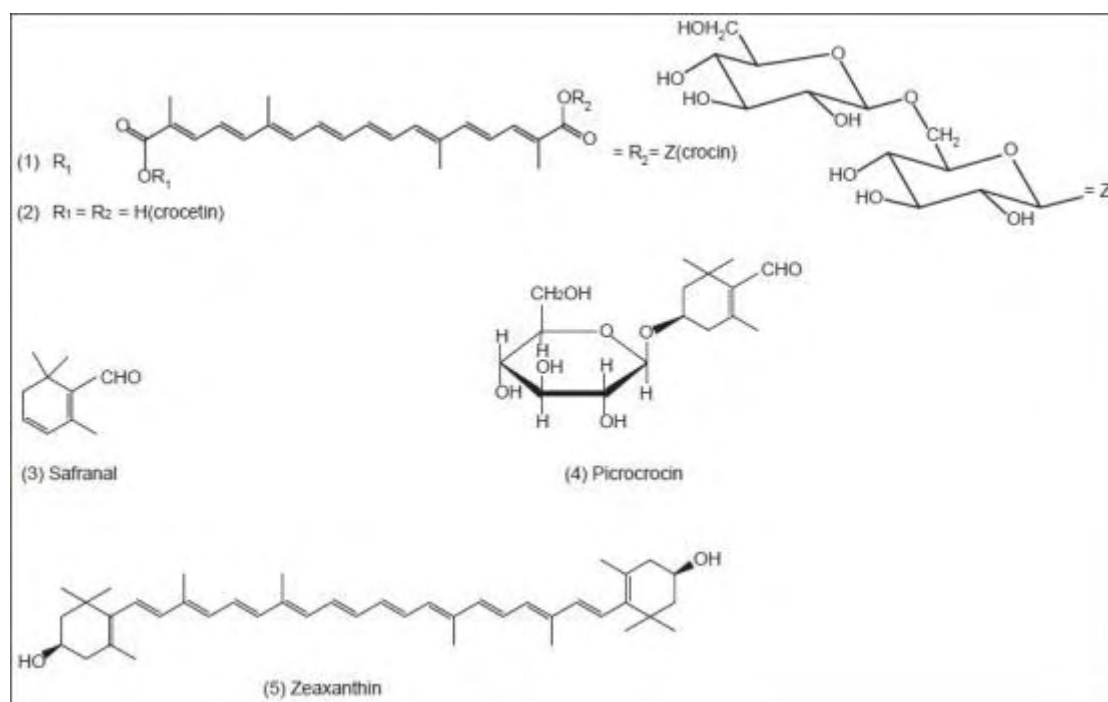


Η λέξη ‘σαφράν’ προέρχεται από το Γαλλικό όρο ‘Safran’, ο οποίος είναι παραλλαγή της Λατινικής λέξης ‘Safranum’ και έχει τις ρίζες του στην Αραβική λέξη ‘as far’ που σημαίνει “κίτρινο” (Gohari et al., 2013).

Το σαφράν φτιάχνεται από το αποξηραμένο κόκκινο στίγμα του *Crocus sativus*. Κάθε φυτό παράγει μόνο 3 στίγματα και χρειάζονται περίπου 70.000 φυτά για να παραχθούν 500γρ. σαφράν (περίπου 200.000 στίγματα) (Gohari et al., 2013). Η καλλιέργεια του κρόκου απαιτεί ξηρό και θερμό καιρό το καλοκαίρι και κρύο τον χειμώνα. Η σπορά γίνεται τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο, ενώ η συγκομιδή πραγματοποιείται 3-4 εβδομάδες στα τέλη Οκτωβρίου με αρχές Νοεμβρίου και μόνο τις πρωινές ώρες που το λουλούδι είναι πλήρως ανοιχτό. Ο κύριος λόγος του υψηλού κόστους αυτού του προϊόντος είναι ότι η συγκομιδή του σαφράν γίνεται με το χέρι από κάθε άνθος χωριστά (Samarghandian et Borji, 2014). Το ακριβό αυτό προϊόν της ελληνικής φύσης συσκευάζεται σε φακελάκια του ¼ του γραμμαρίου ή σε μικρά γυάλινα βαζάκια και διατηρείται σε δροσερό και σκοτεινό μέρος, αφού το χρώμα, το άρωμα και η γεύση του αλλοιώνονται εύκολα από το φως.

3.1 Συστατικά του κρόκου

Το σαφράν περιέχει περισσότερα από 150 πτητικά, μη-πτητικά και αρωματικά συστατικά τα οποία είναι λιπόφιλοι και υδρόφιλοι υδρογονάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, μέταλλα, βιταμίνες (κυρίως ριβοφλαβίνη και θιαμίνη) και χρωστικές (κροκίνη, ανθοκυανίνη, καροτένιο, λυκοπένιο, ζιγκζαντίνη, φλαβονοειδή, άμυλο και άλλα χημικά συστατικά). Με βάση τη χημική ανάλυση του ξηρού στίγματος του σαφράν, τα καροτενοειδή (κροκίνη και κροκετίνη), η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη είναι οι πιο σημαντικοί ενεργοί μεταβολίτες του (Saeed Samarghandian, 2014). Από αυτά, φυτοχημικοί ερευνητές ανακάλυψαν ότι το χρώμα του οφείλεται στα καροτενοειδή συστατικά του, κροκίνη και κροκετίνη, το άρωμα του στα προϊόντα οξείδωσης των καροτενοειδών και κυρίως τη σαφρανάλη, ενώ η πικρή γεύση στην πικροκροκίνη (Gohari et al., 2013). Οι χημικοί τύποι των κυριότερων συστατικών του σαφράν φαίνονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Χημικοί τύποι των σημαντικότερων συστατικών του κρόκου Κοζάνης (Gohari et al., 2013)

Η κροκίνη, με σύνθεση $C_{44}H_{64}O_4$ και μοριακό βάρος 976.96, είναι ένα υδρόφιλο καροτενοειδές ($8'$ -diapocarotene- $8,8'$ -dioic acid) το οποίο αποτελεί περίπου 6-16% του σαφράν. Το έντονο κόκκινο χρώμα της κροκίνης παρέχει το χρώμα στο σαφράν και χρησιμοποιείται ευρέως ως

φυσικό χρωματιστικό του φαγητού. Η κροκίνη 1 (ή α-κροκίνη) είναι η πιο άφθονη κροκίνη (Samarghandian et Borji, 2014).

Η κροκετίνη με σύνθεση (C₂₀H₂₄O₄), σημείο βρασμού 285°C και μοριακό βάρος 328.4, είναι ένα αμφίφιλο χαμηλού μοριακού βάρους φυτικό καροτενοειδές (8, 8'-diapo-8, 8'- carotenoic acid) το οποίο αποτελεί περίπου το 14% του ολικού σαφράν. Αποτελείται από αλυσίδα 20 ανθράκων (C-20) με 7 διπλούς δεσμούς και ένα καρβοξυλικό οξύ στο τέλος κάθε μορίου, σύνθεση η οποία παρουσιάζεται στον κεντρικό πυρήνα της κροκίνης (Samarghandian et Borji, 2014).

Η πικοκροκίνη, με σύνθεση (C₁₆H₂₆O₇) και μοριακό βάρος 330.37 g/mol, είναι το δεύτερο πιο άφθονο συστατικό του σαφράν (κατά βάρος), περίπου 1-13%.

Η σαφρανάλη απελευθερώνεται από τη απογλυκοσυλίωση της πικοκροκίνης μέσω ενζυμικής δραστηριότητας (β-γλυκοσιδάση) και αφυδάτωσης κατά την διαδικασία ξήρανσης του φυτικού προϊόντος. Αποτελεί το κύριο πτητικό έλαιο υπεύθυνο για το άρωμα του σαφράν, με σύνθεση C₁₀H₁₄O) και μοριακό βάρος 150.21 g/mol.

Χρησιμοποιείται ευρέως ως συστατικό του φαγητού που δίνει ιδιαίτερη γεύση και άρωμα, ενώ παράλληλα έχει και θεραπευτικές ιδιότητες.

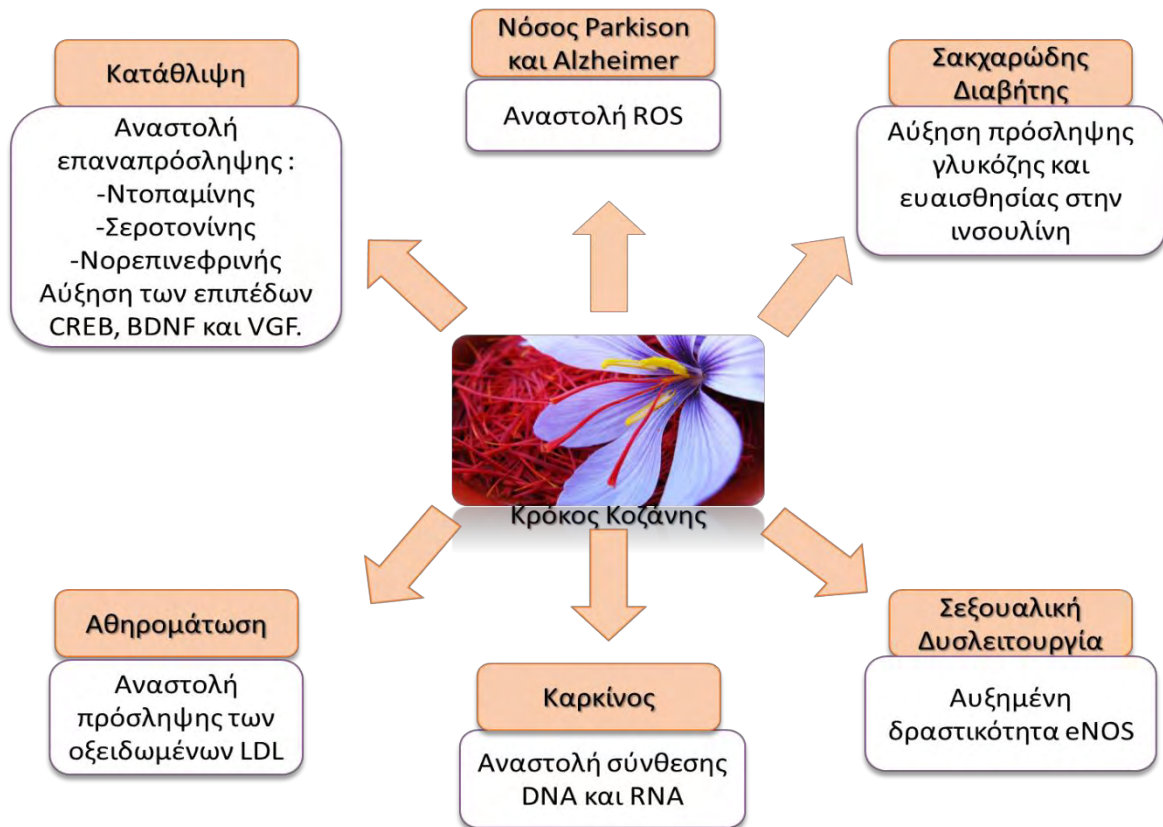
3.2 Θεραπευτικές ιδιότητες του κρόκου

Το στίγμα του κρόκου χρησιμοποιούταν ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική λόγω των ιατρικών ιδιοτήτων του ως αφροδισιακό, αντισπασμωδικό, αποχρεμπτικό, για θεραπείες ασθενειών του στομάχου μειώνοντας το κοιλιακό άλγος και ανακουφίζοντας την τάση. Στην παραδοσιακή ιατρική της Περσίας χρησιμοποιήθηκε για την κατάθλιψη. Άλλες χρήσεις του αφορούν τη θεραπεία της αϋπνίας, της ιλαράς, της δυσεντερίας, του ικτέρου, της χολέρας κ.α. Τοπικά εφαρμόζοταν με τη μορφή πάστας στο δέρμα για να θεραπεύσει ασθένειες όπως η ακμή. Επίσης, χρησιμοποιείται στην υφαντική βιομηχανία ως χρωχτική ουσία (dying agent) και στην παρασκευή διαφόρων αρωμάτων και θυμιάματος. Τέλος, θεωρείται τονωτικό της καρδιάς και του νευρικού συστήματος καθώς και για τη μείωση της εμμηνόρροιας (Bhargava 2011).

Ο Charaka χρησιμοποίησε τα κονιοποιημένα στίγματα ως ένα από τα φάρμακα για τη θεραπεία του καταρράκτη, της νυχτερινής τύφλωσης και γενικά της κακής όρασης. Ο Sushruta το χρησιμοποίησε ως αντιπηκτικό και για τη θεραπεία διαβρώσεων του δέρματος. Παραδοσιακά χρησιμοποιήθηκε επίσης και ως αντιβακτηριακός, αντισηπτικός, αντιμυκητιασικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Bhargava 2011).

Το σαφράν χρησιμοποιήθηκε επίσης ως ηρεμιστικό του νευρικού συστήματος, ως εμμηνογόνο, όπως επίσης και για τη θεραπεία του πυρετού, της μελαγχολίας και της διόγκωσης του ήπατος. Άλλες δράσεις του είναι ως αναλγητικό, διουρητικό, διεγερτικό του ανοσοποιητικού συστήματος, επαγωγέα της ιντερφερόνης και αντιθρομβωτικό. Σε χαμηλές δόσεις, προκαλεί διέγερση της μήτρας της εγκυμονούσας και σε μεγαλύτερες ποσότητες, μπορεί να προκαλέσει σύσπαση και σπασμό (Bhargava 2011).

Ο κρόκος έχει επίσης ρόλο ως προστατευτικός παράγοντας κατά της χρωμοσωματικής βλάβης, ως ρυθμιστής της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και ως αντιεπιληπτικό, μειώνει επιπλέον την αρτηριακή πίεση, ενώ χρησιμοποιήθηκε και στη θεραπεία της ψωρίασης (Bhargava 2011).



Σχήμα 1: Πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές του κρόκου Κοζάνης (Τροποποιημένο από: Sheila Leone et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, οι φαρμακολογικές δράσεις του κρόκου είναι :

1. Αντι-οξειδωτική.

Η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία των κυττάρων. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη και συνεχής αύξηση των επιπέδων ROS στον οργανισμό οδηγεί σε οξειδωτικό stress, το οποίο θεωρείται η κύρια αιτία πολλών ασθενειών. Τα καροτενοειδή είναι γνωστό ότι είναι πολύ αποτελεσματικοί φυσικοί και χημικοί καταστολείς του απλού οξυγόνου, καθώς και ισχυροί συλλέκτες των ROS. Επομένως, μπαχαρικά που περιέχουν τέτοια συστατικά εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιούνται συχνά ως αντιοξειδωτικά συμπληρώματα των τροφών. Η αντιοξειδωτική δράση του *Crocus sativus* οφείλεται κυρίως στα δραστικά συστατικά του, τη σαφρανάλη, την κροκίνη, την κροκετίνη και την καροτίνη. Από αυτά, η κροκίνη θεωρείται το πιο ισχυρό συστατικό έναντι του οξειδωτικού stress και αυτό λόγω του τμήματος ζάχαρης που περιέχει στο μόριό της παίζοντας ζωτικό ρόλο στη χημική δραστηριότητά της (Fiedor and Burda, 2014; Christodoulou et al., 2015; Bukhari et al., 2018).

2. Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική

Τα υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα του κρόκου φαίνεται πως διαθέτουν και αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η αναλγητική δράση επιβεβαιώθηκε ύστερα από μελέτες με δοκιμασία θερμαινόμενης επιφάνειας (hot-plate test), ενώ η αντιφλεγμονώδης μελετήθηκε με βάση τα αποτελέσματά της σε προκαλούμενο ωτικό οίδημα με ξυλένιο στα ποντίκια και σε προκαλούμενο οίδημα στο πέλμα αρουραίου από φορμαλίνη (Hosseinzadeh and Younesi, 2002, Bhargava et al., 2011). Έχει βρεθεί ότι το σαφράν και η κροκίνη εμφανίζουν αποτελέσματα περιορισμού της αρθρίτιδας ρυθμίζοντας τα ένζυμα που βλάπτουν το χόνδρο, διάφορους φλεγμονώδεις μεσολαβητές (π.χ. COX1 και COX2), τα υπεύθυνα για την οστεοαρθρίτιδα ένζυμα (MMP'S) και το αντιοξειδωτικό στρες.

Είναι γνωστό πως με τη φλεγμονή σχετίζεται και η αρθρίτιδα/ ρευματοειδής αρθρίτιδα, ώστε η αντιφλεγμονώδης δράση του σαφράν και των συστατικών του να έχουν, κατά συνέπεια, και θετικό αποτέλεσμα στη θεραπεία της αρθρίτιδας (Bukhari et al., 2018).

3. Αντικαταθλιπτική.

Πολλές έρευνες έχουν δείξει το θετικό αποτέλεσμα του υδατικού και αιθανολικού εκχυλίσματος του σαφράν και κυρίως της κροκίνης στη θεραπεία της κατάθλιψης. Ως πιθανός τρόπος δράσης, έχει προταθεί η λειτουργική αλληλεπίδραση της κροκίνης με το σεροτονινεργικό σύστημα. Παρότι και η σαφρανάλη έχει υποστηριχθεί πως παρουσιάζει σημαντική αντικαταθλιπτική δράση, το κύριο υπεύθυνο συστατικό του κρόκου με αυτή τη δράση είναι η κροκίνη. Σε ήπια προς μέτρια κατάθλιψη είναι σχεδόν ανάλογο με την ιμιπραμίνη και την φλουοξετίνη (Bhargava et al. 2011; Bukhari et al. 2018).

4. Έναντι των νευροεκφυλιστικών νοσών (Alzheimer και Parkinson).

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από την παθολογική εναπόθεση των ινιδίων του β-Αμυλοειδούς (Αβ), των οποίων ο σχηματισμός ενισχύεται σε καταστάσεις οξειδωσης. Το κύριο καροτενοειδές συστατικό trans-κρονίνη-4 αναστέλλει το σχηματισμό των ινιδίων Αβ, σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη διμεθυλοκροκετίνη, αποκαλύπτοντας έτσι ότι η δράση των καροτενοειδών βελτιώνεται από την παρουσία των μορίων ζάχαρης. Το εκχύλισμα νερό: μεθανόλη (50:50, v/v) του κρόκου Κοζάνης αναστέλλει το σχηματισμό ινιδίων Αβ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη μεθυλοκροκετίνη (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

Στην περίπτωση της νόσου Parkinson (που χαρακτηρίζεται κυρίως από τον εκφυλισμό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας), η ενίσχυση του αντιοξειδωτικού συστήματος μαζί με την μείωση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) από την κροκετίνη έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των επιβλαβών επιδράσεων των ενώσεων που εμπλέκονται με την πρόκληση της νόσου όπως η 6-υδροξυ ντοπαμίνη καθώς επίσης και τη μείωση της χρήσης ντοπαμίνης από τους ιστούς (Bukhari et al., 2018).

Με βάση τη βιβλιογραφία, τα ευεργετικά αποτελέσματα του σαφράν και των συστατικών του στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson οφείλονται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις τους με τα χολινεργικά, τα ντοπαμινεργικά και τα γλουταματεργικά συστήματα (Bhargava et al., 2011; Christodoulou et al., 2015; Bukhari et al., 2018).

5. Αντιεπιληπτική.

Βρέθηκε ότι η σαφρανάλη σε περιφερική χορήγηση σε κουνέλια προάγει δοσοεξαρτώμενη μείωση τόσο των εστιακών κλονικών σπασμών όσο και της γενικευμένης τονικο-κλονικής κρίσης που προκαλείται μετά από χορήγηση τετραζόλης.

Αυτό το αποτέλεσμα θεωρείται πως προκαλείται μέσω του συμπλέγματος των υποδοχέων GABA (A)-βενζοδιαζεπίνης (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

6. Υπολιπιδαιμική.

Έχει παρατηρηθεί ότι η κροκίνη παρουσιάζει υπολιπιδαιμική δράση όταν χορηγείται σε δόση από 25 mg/kg έως 100mg/kg σε κουνέλια στα οποία επάχθηκε η υπερλιπιδαιμία μέσω διατροφής. Αυτό το πραγματοποιεί αναστέλλοντας την παγκρεατική λιπάση και οδηγώντας έτσι σε δυσαπορρόφηση του λίπους και της χοληστερόλης. Επιπλέον, η κροκίνη και η σαφρανάλη έδειξε δοσοεξαρτώμενη μείωση της αρτηριακής υπέρτασης, με τη σαφρανάλη να είναι πιο ισχυρή στο υποτασικό αποτέλεσμα από την κροκίνη. Η θεραπεία με κροκετίνη οδήγησε επίσης σε μείωση της ολικής χοληστερόλης ορού, της LDL και των τριγλυκεριδίων. Το σαφράν βέβαια βρέθηκε πως είναι πιο αποτελεσματικό στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών και στη βελτίωση του υπερλιπιδαιμικού προφίλ συγκριτικά με το κάθε συστατικό από μόνο, πιθανότατα λόγω του συνεργικού αποτελέσματος των συστατικών αυτού (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

7. Ρόλος στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και την αθηροσκλήρωση.

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι μία οξεία κατάσταση νέκρωσης του μυοκαρδίου εξαιτίας διαταραχής της σχέσης των καρδιακών αναγκών και της αιμάτωσης των στεφανιαίων αγγείων. Στις βιοχημικές αλλαγές που προκαλούν αυτή την κατάσταση ανήκουν: η υπεροξειδωση των λιπιδίων, η υπερλιπιδαιμία, οι βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και η υπεργλυκαιμία. Αλλαγές δηλαδή που όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω βελτιώνονται από την κατανάλωση του σαφράν. Το κύριο συστατικό του σαφράν, η κροκετίνη, βρέθηκε πως μειώνει τα επίπεδα των καρδιακών δεικτών, όπως η LDH και η CK, ενώ παράλληλα αυξάνει το μιτοχονδριακό δυναμικό των καρδιακών μυϊκών ινών που θεραπεύονται με νοραδρεναλίνη, προτείνοντας την καρδιοπροστατευτική της δράση.

Όσο αναφορά την αθηροσκλήρωση, κύριος επιβαρυντικός παράγοντας θεωρείται επίσης ο μεταβολισμός των λιπιδίων, ώστε η μείωση των επιπέδων τους στο αίμα από τα συστατικά του σαφράν να παίζει καθοριστικό ρόλο στη σοβαρότητα της αθηρωμάτωσης. Γενικά, πιστεύεται πως το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα του σαφράν οφείλεται στην αντιοξειδωτική του δραστηριότητα μέσω ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και στον αποκλεισμό των διαύλων ασβεστίου του καρδιακού μυός με αποτέλεσμα τη μείωση της καρδιακής συχνότητας, της συσταλτικότητας, και κατά συνέπεια ολόκληρου του καρδιακού έργου, ώστε να

προλαμβάνεται οποιοδήποτε καρδιακό πρόβλημα (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

8. Αντι-διαβητική.

Αρκετές μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει το θετικό αποτέλεσμα της κροκετίνης στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στις βλάβες που αυτή προκαλεί. Βελτιώνει τη μη ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη και την επηρεασμένη έκφραση της αδιπονεκτίνης, του TNF- α και της λεπτίνης.

Επιπλέον, η κροκετίνη προτείνεται σαν πιθανή θεραπεία στις αγγειακές βλάβες του διαβήτη λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης και του ανταγωνιστικού της χαρακτήρα στους διαύλους ασβεστίου.

Τέλος, έρευνα σε ποντίκια με διαβητική εγκεφαλοπάθεια απέδειξε τον προστατευτικό χαρακτήρα του εκχυλίσματος του σαφράν (40-80 mg/kg) στην υπεργλυκαιμία, την υπερλιπιδαιμία και στη μείωση του οξειδωτικού στρες (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

9. Ρόλος στην παθολογία του πνεύμονα και στο αναπνευστικό σύστημα.

Έρευνες σε γουρούνια έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα του σαφράν και της σαφρανάλης μπορούν να βοηθήσουν στην πρόληψη της παθολογίας του πνεύμονα κατά τη διάρκεια φλεγμονής. Αυτό προκύπτει από το συνδυασμό της αντιφλεγμονώδους δράσης της σαφρανάλης μαζί με την αντιοξειδωτική (μέσω μείωσης των επιπέδων των iNOS) και την πρόληψη της απόπτωσης των κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου (Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

Τέλος, το σαφράν παρουσιάζει και αντιβηχική δράση. Το αιθανολικό εκχύλισμά του και του συστατικού της σαφρανάλης βρέθηκε ότι μειώνει το βήχα σε γουρούνια όταν χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά όπου νεφελωποιημένο κιτρικό οξύ (20%) χρησιμοποιήθηκε ουσιαστικά για να επάγει το βήχα (Bhargava et al., 2011).

10. Ρόλος στη βελτίωση της όρασης.

Ο κρόκος Κοζάνης χορηγήθηκε ως συμπληρωματικό διατροφή σε ποντίκια που λόγω της συνεχούς έκθεσής τους στο φως εμφάνισαν βλάβες στους φωτοϋποδοχείς και στον αμφιβληστροειδή τους με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των παραπάνω βλαβών κυρίως μέσω ρύθμισης της απόπτωσης των κυττάρων από τα συστατικά του κρόκου. Η κροκίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης PI3K/AKT και η χρήση της στην ισχαιμική αμφιβληστροειδοπάθεια αύξησε την αιμάτωση του

αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς χιτώνα. Επιπλέον, η κροκετίνη επιδρά στη θετικά έναντι της φθοράς του αμφιβληστροειδούς λόγω οξειδωτικού και ενδοπλασματικού στρες. Τέλος ο κρόκος Κοζάνης βοηθάει στη βελτίωση της ηλικιο-εξαρτώμενης εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (Maccarone et al., 2008; Bhargava et al., 2011; Bukhari et al., 2018).

11. Αντικαρκινική και προστασία από γονιδιοτοξικότητα.

Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι τα εκχυλίσματα του κρόκου εμφανίζουν κυτταροτοξική, αντικαρκινική και αντιμιτωτική ιδιότητα αναστέλλοντας ή επιβραδύνοντας μια μεγάλη ποικιλία νεοπλασμάτων. Μάλιστα η υδατοδιαλυτή μορφή των καρτενοειδών του κρόκου να καθιστά κατάλληλα για από του στόματος χορήγηση. Η εφαρμογή του εκχυλίσματος του κρόκου, είτε τοπικά (100mg/kg βάρους σώματος), είτε *per os*, είτε ενδοφλέβια, έδειξε σημαντική βελτίωση του καρκίνου του δέρματος, μειώνοντας το διμεθυλοβενζόλιο [α] ανθρακενίου (DMBA) και το έλαιο κροτονίου που προάγουν αυτήν την καρκινογένεση.

Επιπλέον, η χρήση κροκετίνης στον καρκίνο του πνεύμονα βρέθηκε να μειώνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τα ένζυμα που μεταβολίζουν τη γλουταθειόνη καθώς και να αναστρέφουν ιστολογικά την ανάπτυξη του όγκου.

Παράλληλα το υδατικό εκχύλισμα του κρόκου και της ίδιας της κροκετίνης προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του γαστρικού στομάχου σε ποντίκια με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και οι κροκίνες αποδείχθηκαν ισχυροί προστατευτικοί παράγοντες εναντίον των ηπατοκαρκινογόνων των ποντικών.

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την κατανόηση της αντικαρκινικής δράσης του σαφράν. Από αυτούς, έχουν επικρατήσει η ανασταλτική επίδραση των συστατικών του κρόκου στην κυτταρική σύνθεση του DNA και RNA, η επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης και η ήδη αναφερθείσα αντιοξειδωτική δράση του μέσω της καταστροφής των παραγόμενων ελευθέρων ριζών.

Το υδατικό εκχύλισμα σαφράν έχει βρεθεί ότι εμποδίζει ορισμένα φάρμακα (σισπλατίνη, ουρεθάνη, κυκλοφωσφαμίδη και μιτομυκίνη C) να οδηγήσουν σε γονιδιοτοξικότητα στα ποντίκια. Το οξειδωτικό στρες που προκαλούν αυτά τα φάρμακα αποτρέπεται μέσω της ρύθμισης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και της ταυτόχρονης αύξησης των ηπατικών ενζύμων όπως η υπεροξειδιομαντάση, η καταλάση και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών.

Οι μελέτες υποδηλώνουν ότι το σαφράν διαμεσολαβεί ρόλο ενός ελπιδοφόρου χημειοπροστατευτικού παράγοντα και η χορήγησή του μαζί με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες θα μπορούσε να αποδειχθούν αποτελεσματική στην αναστολή του σχηματισμού μεταστάσεων και της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων σε σύγκριση με μόνο του τον αντικαρκινικό παράγοντα (Bhargava et al., 2011; Christodoulou et al., 2015; Koul and Abraham, 2017; Bukhari et al., 2018).

12. Αντικνηδωτική και ενυδατική.

Βρέθηκε πως ο κρόκος Κοζάνης σε τοπική εφαρμογή συγκέντρωσης 0,025% v/w έχει θετικά αποτελέσματα στην ατοπική δερματίτιδα, την ιχθύαση και άλλες ασθένειες υπερκεράτωσης μέσης βαρύτητας (Bhargava et al., 2011).

13. Στη θεραπεία της ψωρίασης.

Σε ασθενείς με χρόνιες ψωριασικές πλάκες εφαρμόστηκε ένα διατροφικό πρωτόκολλο σε συνδυασμό με την ήδη λαμβανόμενη φαρμακευτική τους αγωγή. Το πρωτόκολλο αυτό συμπεριλάμβανε και την καθημερινή κατανάλωση ενός αφεψήματος κρόκου, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα πως και το σαφράν ενδέχεται να φέρει αντιψωριασική δράση και έχει θέση στη θεραπεία της ψωρίασης (Brown et al., 2004).

14. Θεραπεία του εγκαύματος.

Σε έρευνα που έγινε σε ποντίκια υποστηρίχθηκε η υπόθεση ότι το σαφράν (αλοιφή 20%) μπορεί να αποτελέσει μια ιδανική επιλογή στην επούλωση των εγκαυματικών πληγών. Ουσιαστικά, ο κρόκος βελτίωσε σημαντικά την αγγείωση του δέρματος καθώς και τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ινοβλαστών σε αυτό. Τα κύρια ευρήματα που επιβεβαιώνουν τον ωφέλιμο χαρακτήρα του σαφράν στη θεραπεία του εγκαύματος είναι: η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του, ο αυξημένος ρυθμός που έκλεισαν οι πληγές, η επανεπιθηλίωση και ο ρόλος του εναντίον της δημιουργίας ουλών (Alemzadeh and Oryan, 2018).

15. Αφροδισιακή.

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υδατικών εκχυλισμάτων κρόκου, κροκίνης και σαφρανάλης σε αρσενικά ποντίκια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κροκίνη βελτιώνει τη σεξουαλική τους συμπεριφορά με τη σαφρανάλη να μην εμφανίζει κανένα αφροδισιακό αποτέλεσμα (Christodoulou et al., 2015).

3.3 Τοξικότητα του κρόκου και ανεπιθύμητες ενέργειες

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της τοξικότητας, ουσίες με βαθμό 1-5g/kg στην κλίμακα LD50 θεωρούνται χαμηλής τοξικότητας, ενώ αυτές με LD50>5g/kg θεωρούνται πρακτικά μη τοξικές. Όσον αναφορά το σαφράν, σε δόση 1,5 g/day θεωρείται ασφαλές, σε δόση 5g/day τοξικό με τη θανατηφόρο δόση να ανέρχεται στα 20g/day. Η υδατοδιαλυτή μορφή του σαφράν και των συστατικών του είναι πιθανότατα ο λόγος που το καθιστούν ασφαλές και μη τοξικό σε υψηλές δόσεις. Ωστόσο, η συνεχιζόμενη χορήγηση του σαφράν σε δόση πάνω των 10g ήταν αρκετή για να προκαλέσει την αποβολή του εμβρύου σε εγκυμονούσες. Επομένως, οι έγκυες γυναίκες προτείνεται να μην καταναλώνουν τον κρόκο εξαιτίας αυτής της ανεπιθύμητης ενέργειας και της δυνατότητάς του να προκαλέσει συσπάσεις τις μήτρας (Samarghandian et Borji, 2014; Bukhari et al., 2018). Έχουν αναφερθεί και ορισμένες άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η παραρρινοκολπίδα, το βρογχικό άσθμα, ο κνησμός και μία περίπτωση αναφυλακτικής αντίδρασης (Gohari et al., 2013).

Άτομα με χρόνια ιατρικά προβλήματα θα πρέπει να προσέχουν πριν καταναλώσουν τον κρόκο Κοζάνης (Samarghandian et Borji, 2014).

4. Καροτενοειδή

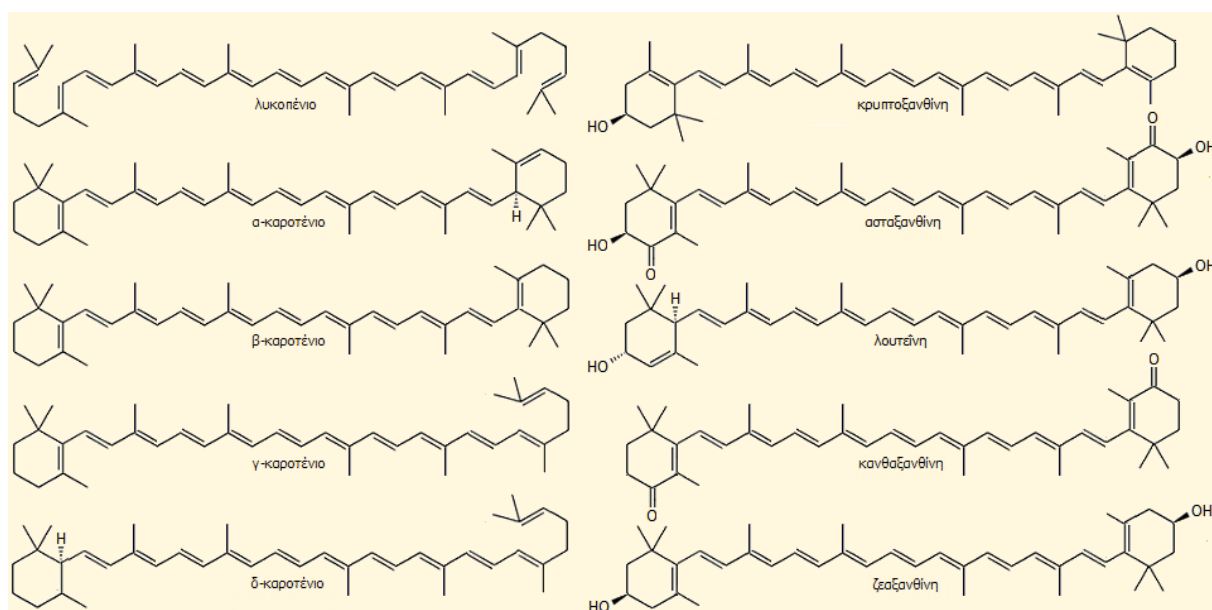
Τα καροτενοειδή (Crts) αποτελούν ομάδα φυσικών χρωστικών του τύπου πολυαινών με ποικίλα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Εμφανίζονται σε όλους τους οργανισμούς που είναι ικανοί να φωτοσυνθέτουν, διαδικασία στην οποία το ηλιακό φως μετατρέπεται αποτελεσματικά σε χημική ενέργεια. Επιπλέον, είναι σημαντικά συστατικά των φωτοσυνθετικών οργανιδίων διαφόρων φυτών, βρύων, φτερών και αλγών, ενώ παράλληλα απαντώνται στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες των φωτοτροπικών βακτηρίων και κυανοβακτηρίων. Παρότι δε συντίθενται από τους ανθρώπινους και ζωικούς οργανισμούς, είναι παρόντα στο αίμα και στους ιστούς τους και έχουν δράση προ-βιταμίνης A (μετατρέπονται σε ρετινάλη, μία πρόδρομη ουσία της ρετινόλης (βιταμίνη A)). Ωστόσο, η κύρια λειτουργία τους σε όλους τους μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς φαίνεται να είναι η φωτο-προστασία. Επιπλέον, τα καροτενοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση μέσω της ικανότητάς τους να συλλέγουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αυτό διότι η ανεξέλεγκτη παραγωγή και η ταυτόχρονη αύξηση του επιπέδου ROS στο σώμα οδηγεί σε «οξειδωτικό στρες», που αποτελεί βασικό παράγοντα τις παθογόνες διεργασίες πολλών ασθενειών (Joanna Fiedor and Kνětoslava Burda, 2014 – Σχήμα 2).



Σχήμα 2 : Δράσεις των καροτενοειδών, κυρίως μέσω μείωσης των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Τροποποιημένο από: Fiedor and Burda, 2014).

4.1 Σύντομη επισκόπηση

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερα από 700 καροτενοειδή, από τα οποία περίπου 50 αποτελούν συστατικά της ανθρώπινης διατροφής ενώ μόνο 20 περίπου υπάρχουν στο ανθρώπινο αίμα και στους ιστούς. Από αυτά, τα πιο σημαντικά είναι τα εξής: λυκοπένιο, α-καροτένιο, β-καροτένιο, γ-καροτένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, β-κρυπτοξανθίνη, α-κρυπτοξανθίνη, νευροσπορένιο, ζ-καροτένιο, φυτοφλουένιο και φυτοένιο (Fiedor and Burda, 2014) (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Χημικοί Τύποι των πιο σημαντικών καροτενοειδών (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου, 2013)

Υπάρχουν δύο (2) κύριες κατηγορίες καροτενοειδών: τα καροτένια και οι ξανθοφυλλίνες. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών είναι χημική. Οι ξανθοφυλλίνες περιέχουν οξυγόνο, ενώ τα καροτένια είναι υδρογονάνθρακες που δεν περιέχουν οξυγόνο. Επιπλέον, απορροφούν διαφορετικό μήκος κύματος φωτός κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ώστε οι ξανθοφυλλίνες είναι πιο κίτρινες ενώ τα καροτένια είναι πορτοκαλί. Τα καροτενοειδή με ανθρακική αλυσίδα μικρότερη των 40C ονομάζονται από καροτενοειδή.

Διατροφικά, υπάρχει μία άλλη πιο χρήσιμη κατηγοριοποίηση των καροτενοειδών: προβιταμίνης Α και μη προβιταμίνης Α. Τα προβιταμίνης Α καροτενοειδή μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη Α (ρετινόλη) στον εντερικό σωλήνα και στο ήπαρ, ένα σημαντικό στοιχείο της υγείας του

ανθρώπου. Το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη είναι προβιταμίνης Α καροτενοειδή, ενώ η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και το λυκοπένιο δεν είναι (Jessie Szalay, 2015).

4.2 Χημική δομή, λειτουργία και κατανομή στις μεμβράνες

Τα περισσότερα καροτενοειδή χαρακτηρίζονται ως τετρατερπένια που σχηματίζονται από δύο αλυσίδες των 20 ατόμων C (C20). Ο γραμμικός σκελετός των C40 υδρο11γονανθράκων είναι ευαίσθητος σε διάφορες δομικές τροποποιήσεις, όπως υδρογόνωση, cis-trans ισομερισμό, κυκλοποίηση σε ένα ή και τα δύο άκρα ή την προσθήκη πλευρικών ομάδων (που συχνά περιέχουν οξυγόνο) με μετέπειτα γλυκοσυλίωση/ακετυλίωση. Πιο εξελιγμένες τροποποιήσεις σχετίζονται με τη σμίκρυνση ή μεγέθυνση του ανθρακικού σκελετού (C50-Crts). Τα C30-Crts μπορεί να σχηματιστούν ως αποτέλεσμα συμπύκνωσης δύο μονάδων φαρνεσυλίου.

Τα καροτενοειδή είναι υπεύθυνα για το χρωματισμό διαφόρων οργανισμών, μέσω απορρόφησης του φωτός από το εκτεταμένο σύστημα συζυγών διπλών δεσμών που διαθέτουν. Ουσιαστικά, η παρουσία αυτής της αλυσίδας συζυγών διπλών δεσμών βοηθάει στην απορρόφηση του φωτός από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και στη φωτο-προστασία σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. Πιστεύεται επίσης ότι τα καροτενοειδή συμμετέχουν: (i) στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, (ii) τη διαμόρφωση ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης, (iii) τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, (iv) τη διαφοροποίηση των αυξητικών παραγόντων, (v) την κυτταρική διαφοροποίηση και (vi) τη διαμόρφωση διαφόρων τύπων υποδοχέων ή μορίων προσκόλλησης και πολλών άλλων φυσιολογικά σημαντικών διαδικασιών.

Τα καροτενοειδή, ως ιδιαίτερα λιπόφιλα μόρια, βρίσκονται συνήθως μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες. Καθαροί υδρογονάνθρακες, όπως το β-καροτένιο ή το λυκοπένιο, είναι διατεταγμένοι αποκλειστικά από την εσωτερική πλευρά της λιπιδικής διπλοστιβάδας. "Περισσότερο" πολικά μόρια χρωστικών, που περιέχουν προσαρτημένα άτομα οξυγόνου (π.χ. λουτεΐνη, ζεαξανθίνη) προσανατολίζονται σχεδόν κάθετα στην επιφάνεια της μεμβράνης, εκθέτοντας την υδρόφιλη μεριά τους στο υδατικό περιβάλλον. Η ενσωμάτωση των καροτενοειδών στις μεμβράνες μπορεί να επηρεάσει αισθητά τις ιδιότητές τους (ακαμψία, μηχανική αντοχή, πάχος, ρευστότητα ή διαπερατότητα), οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για τη

σωστή λειτουργία τους, όπως για παράδειγμα την τροποποίηση της μεταγωγής σήματος, μίας μεμβρανοεξαρτώμενης διεργασίας. Επιπλέον αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική ενίσχυση της αντοχής των μεμβρανών ως προς τα ROS (Δραστικές μορφές οξυγόνου), τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο στο μοριακό μηχανισμό πολλών χρόνιων ασθενειών (Fiedor and Burda, 2014).

4.3 Βιοδιαθεσιμότητα καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή βρίσκονται σε αφθονία στα φρέσκα φρούτα και λαχανικά. Τα κίτρινα-πορτοκαλί-κόκκινα φρούτα και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα πλούσια σε θρεπτικά καροτενοειδή.

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των καροτενοειδών, την απορρόφηση, καταστροφή, μεταφορά και αποθήκευσή τους. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι : ο τύπος, η ποσότητα και το περιβάλλον στο οποίο αυτά ενσωματώνονται. Με άλλα λόγια, τα καροτενοειδή που απελευθερώνονται από τα εκάστοτε τρόφιμα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την κατάσταση τους, όπως επίσης και από τη σύνδεσή τους με άλλες ενώσεις (π.χ. πρωτεΐνες). Η μικροκρυσταλλική μορφή μερικών καροτενοειδών (όπως το λυκοπένιο στη ντομάτα ή το β-καροτένιο στο καρότο) τα καθιστά λιγότερο διαθέσιμα σε σύγκριση με αυτά τα οποία είναι εντελώς βυθισμένα σε σταγονίδια λιπιδίων. Προτείνεται ότι μόνο το 5% περίπου των καροτενοειδών στο σύνολό τους απορροφώνται από το έντερο, ενώ από αυτά, >50% προέρχονται από μικκυλιακό διάλυμα. Για αυτό το λόγο, τα καροτενοειδή πρέπει να καταναλώνονται μαζί με λίπος ώστε να απορροφηθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Σε αρκετές μελέτες, η θερμική επεξεργασία των καροτενοειδών έδειξε ότι αυξάνει την προσπελασιμότητα τους, λόγω της διάσπασης των κυτταρικών τοιχωμάτων και χαλάρωσης των δεσμών τους. Επιπλέον παράγοντες που καθορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των καροτενοειδών θεωρούνται οι γενετικοί, η διατροφική κατάσταση, το φύλο, η γήρανση ή κάποια λοίμωξη. Είναι παγιωμένο ότι οποιαδήποτε ασθένεια, που έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη απορρόφηση του λίπους από τον πεπτικό σωλήνα, επηρεάζει σημαντικά και την απορρόφηση των καροτενοειδών. Οι αλληλεπιδράσεις με φάρμακα (π.χ. σουλφοναμίδια ή ασπιρίνη) έδειξαν επίσης ότι μειώνουν την διαθεσιμότητα της β-καροτίνης. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών τύπων

καροτενοειδών και άλλων συστατικών των τροφίμων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Τα καροτενοειδή μπορεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κατά την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την κάθαρση του ορού, όπως αποδείχθηκε κατά τη διάρκεια χορήγησης της β-καροτίνης και λουτεΐνης στους ανθρώπους. Ενώ, εξίσου σημαντική είναι η "θετική" συνεργασία μεταξύ καροτενοειδών και βιταμίνης E καθώς απορροφώνται με τον ίδιο τρόπο (Fiedor and Burda, 2014).

4.4 Απορρόφηση και μεταφορά

Η εντερική απορρόφηση των καροτενοειδών, που είναι εξαιρετικά υδρόφοβα μόρια, περιλαμβάνει παρόμοια στάδια όπως αυτά των διαιτητικών λιπιδίων ή των λιποδιαλυτών βιταμινών (όπως η βιταμίνη E). Σχηματίζουν μικκύλια με χολικά οξέα και προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του εντερικού αυλού. Η παρουσία λίπους βελτιώνει την απορρόφησή τους, καθώς τα λίπη διεγείρουν την έκκριση χολής αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητα των σχηματιζόμενων μικκυλίων και βοηθώντας στην απορρόφηση περισσότερων καροτενοειδών. Όσα καροτενοειδή δεν έχουν διασπαστεί, ενσωματώνονται στα χυλομικρά και απελευθερώνονται στη λέμφο. Στη συνέχεια, τα καροτενοειδή μεταφέρονται στο πλάσμα και διανέμονται περαιτέρω στον οργανισμό κυρίως μέσω των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας ((V) LDL). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) να εμφανίζουν, μεταξύ άλλων, την υψηλότερη συγκέντρωση των καροτενοειδών στο πλάσμα. Τα καροτενοειδή κυρίως υπάρχουν στο ήπαρ και στους λιπώδεις ιστούς, αν και σχετικά υψηλή ποσότητά τους έχει παρατηρηθεί επίσης στα επινεφρίδια, στο ωχρό σωματίο, στους όρχεις, στο δέρμα και στον αμφιβληστροειδή (ωχρά κηλίδα). Στον ιστό του εγκεφαλικού στελέχους, η συγκέντρωσή τους ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Πίνακας 1: Κατηγορίες Καροτενοειδών

	Καροτενοειδή
Καροτένια (C40)	α-καροτένιο, β-καροτένιο, γ-καροτένιο, δ-καροτένιο, ε-καροτένιο, ζ-καροτένιο, Λυκοπένιοι, Νευροσπορίνη, Φυτοεΐνη, Φυτοφλουΐνη, Τορουλίνη, Λυκοπερσίνη
Ξανθοφυλλίνες (C40)	Ανθεραξανθίνη, Ασταξανθίνη, Κανθαξανθίνη, Κιτραξανθίνη, Κρυπτοξανθίνη, Διαδινοξανθίνη, Διατοξανθίνη, Δινοξανθίνη, Εχινενόνη, Φλαβοξανθίνη, Φουκοξανθίνη, Λουτεΐνη, Νεοξανθίνη, Ροδοξανθίνη, Ρουβιξανθίνη, Βιολαξανθίνη, Ζεαξανθίνη, Ζινοξανθίνη
Αποκαροτενοειδή (C<40)	Αμπισσικό οξύ, Αποκαροτενάλη, Μπιξίνη, Κροκετίνη, Ιονόνες, Περιδινίνη
Βιταμίνης Α ρετινοειδή (C20)	Ρετινάλη, Ρετινοϊκό οξύ, Ρετινόλη
Ρετινοειδή φάρμακα	Ακιτρετίνη, Αλιτρετινοΐνη, Μπεξαροτένη, Ετρετινάτη, Φενρετινίδη, Ισοτρετινοΐνη, Ταζαροτίνη, Τεμαροτίνη, Τρετινοΐνη, Οξική Ζουρετινόλη

4.5 Πηγές καροτενοειδών

4.5.1 Ξανθοφυλλίνες

Λουτεΐνη και ζεαξανθίνη

Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη συνδέονται έντονα με την υγεία του οφθαλμού και δε διαχωρίζονται στις διάφορες μελέτες διότι είναι τα μόνα που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Επιπλέον, η λουτεΐνη είναι γνωστό ότι εμποδίζει το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών έχοντας αντιοξειδωτικό ρόλο έναντι στη χοληστερόλη (Jessie Szalay, 2015).

Πηγές λουτεΐνης και ζεαξανθίνης είναι το καλαμπόκι, το σπανάκι, τα πράσινα γογγύλια, τα κολοκυθάκια, το κολοκύθα, η πάπρικα, τα κίτρινα φρούτα και το αβοκάντο. Πηγή πλούσια σε λουτεΐνη είναι και τα αυγά (Jessie Szalay, 2015).

Β-κρυπτοξανθίνη

Η β-κρυπτοξανθίνη είναι μια προβιταμίνη Α και αποτελεί πηγή βιταμίνης Α. Μελέτες έδειξαν πως η β-κρυπτοξανθίνη είναι αποτελεσματική στην πρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα. (40) Επιπλέον, η β-κρυπτοξανθίνη χρησιμεύει στη μείωση της εμφάνισης φλεγμονώδους πολυαρθρίτιδας, συμπεριλαμβανομένης και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και αυτό λόγω των

αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της που μπορούν να περιορίσουν τη χρόνια φλεγμονή. Πηγές πλούσιες σε β-κρυπτοξανθίνη είναι η παπάγια, το μάνγκο, τα πορτοκάλια, το καλαμπόκι, οι πιπεριές, οι κρόκοι αυγών και το βούτυρο (Jessie Szalay, 2015).

4.5.2 Καροτένια

Β-καροτένιο

Από τα καροτενοειδή της κατηγορίας προβιταμίνης Α, το β-καροτένιο είναι η καλύτερη πηγή βιταμίνης Α. Το β-καροτένιο προσφέρει φωτοπροστασία μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ηλιακού εγκαύματος. Παράλληλα, μειώνει τον κίνδυνο μεταβολικού συνδρόμου στους άνδρες μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας. Ο ορισμός του μεταβολικού συνδρόμου περιλαμβάνει υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλή γλυκόζη του αίματος, παθολογικά επίπεδα χοληστερόλης και αυξημένη εναπόθεση λίπους στη μέση (Jessie Szalay, 2015).

Η κανέλλα, τα μάνγκο, η παπάγια, τα καρότα, οι γλυκοπατάτες, το σπανάκι, το καλαμπόκι και η κολοκύθα είναι καλές πηγές βήτα-καροτενίου. Το βήτα-καροτένιο δίνει το χρώμα στα πορτοκαλί τρόφιμα. Στην πραγματικότητα, η λέξη καροτένιο προέρχεται από τη λατινική λέξη για το καρότο (carota) (Jessie Szalay, 2015).

Α-καροτένιο

Το α-καροτένιο ανήκει κ αυτό στα καροτενοειδή προβιταμίνης Α. έχει συνδεθεί με τη μείωση του θανάτου από καρκίνο και καρδιαγγειακής νόσου. Μαζί με το λυκοπένιο, έχουν συσχετιστεί με μείωση του καρκίνου του πνεύμονα.

Καλές πηγές α-καροτενίου είναι η κολοκύθα, τα καρότα, οι ντομάτες, τα μανταρίνια, τα κολοκυθάκια και τα μπιζέλια (Jessie Szalay, 2015).

Λυκοπένιο

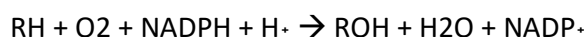
Το λυκοπένιο είναι μια κόκκινη χρωστική που είναι υπεύθυνη για το χρώμα των καρπουζιών, των ντοματών, των γκουάβα και του γκρέιπφρουτ. Άλλες καλές πηγές αποτελούν η παπάγια, τα καρότα, τα σπαράγγια, το κόκκινο λάχανο, οι κόκκινες πιπεριές και ο μαϊντανός.

Το λυκοπένιο είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και θεωρείται το πιο αποτελεσματικό στην αδρανοποίηση του μονοξειδίου και γενικότερα των ελεύθερων ριζών. Επίσης, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, καρκίνου του πνεύμονα και εγκεφαλικών επεισοδίων, ενώ βελτιώνει και την υγεία των οστών εμποδίζοντας την ανάπτυξη οστεοπόρωσης (Jessie Szalay, 2015).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της *in vivo* επίδρασης του ροφήματος του κρόκου Κοζάνης (σαφράν) στη δραστικότητα των ανθρώπινων ενζύμων CYP2A6, οξειδάση της ξανθίνης (XO) και N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT2) σε υγιείς εθελοντές. Στη συνέχεια αναφέρονται μερικά γενικά χαρακτηριστικά για τα ανωτέρω ένζυμα.

5. Κυτόχρωμα P450

Κυτόχρωμα P450 ή CYP ονομάζεται μία υπεροικογένεια πρωτεϊνών που περιέχουν αίμη ως συμπαράγοντα και συνεπώς ανήκουν στην κατηγορία των αιμοπρωτεϊνών. Το CYP χρησιμοποιεί μια ποικιλία δομικά διαφορετικών μορίων ως υποστρώματα για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού. Τα υποστρώματα αυτά αποτελούν τα τελικά ένζυμα σε μία αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH. Ο όρος "P450" προέρχεται από την φασματοφωτομετρική κορυφή του μέγιστου μήκους κύματος απορρόφησης του ενζύμου (450 nm) όταν βρίσκεται σε μειωμένη δραστικότητα και είναι συνδεδεμένο με μονοξείδιο του άνθρακα. Τα περισσότερα CYPs απαιτούν από μια πρωτεΐνη ως συνεργάτη για να μεταφέρουν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια ώστε να μειώσουν το σίδηρο (και τελικά το μοριακό οξυγόνο). Με βάση τη φύση των πρωτεϊνών μεταφοράς ηλεκτρονίων, τα CYPs ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες, όπως μικροσωματικά, μιτοχονδριακά κ.α. Η συνηθέστερη αντίδραση που καταλύεται από τα κυτοχρώματα P450 είναι μία αντίδραση μονοοξυγενάσης, όπου εισάγεται ένα άτομο οξυγόνου στην αλειφατική θέση ενός οργανικού υποστρώματος (RH) ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου ανάγεται σε νερό:



Επιπλέον, πολλές αντιδράσεις υδροξυλίωσης (ενσωμάτωση ομάδων υδροξυλίου) καταλύονται από τα ένζυμα CYP.

Τα ανθρώπινα CYPs είναι κυρίως πρωτεΐνες που συνδέονται στις μεμβράνες και πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται είτε στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων είτε στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων. Μεταβολίζουν ενδογενείς και εξωγενείς χημικές ουσίες με ορισμένα κυτοχρώματα να έχουν ένα μόνο υπόστρωμα, ενώ άλλα πολλά περισσότερα. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 είναι παρόντα σε όλους σχεδόν τους ιστούς και παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη σύνθεση όσο και στη διάσπαση των ορμονών (συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων και της τεστοστερόνης), στη σύνθεση χοληστερόλης και στο μεταβολισμό των

λιπαρών οξέων και της βιταμίνης D. Επιπλέον, συμβάλλουν στο μεταβολισμό δυνητικά τοξικών ουσιών, όπως τα φάρμακα, καθώς και ενδογενών προϊόντων του μεταβολισμού κυρίως του ήπατος, όπως η χολερυθρίνη (Pelkonen, 2008; Begas, 2016).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί τουλάχιστον 57 κυτοχρώματα και 29 ψευδογονίδια, τα οποία οργανώνονται σε 18 οικογένειες και 43 υποοικογένειες. Τα πιο σημαντικά από αυτά για το μεταβολισμό των φαρμάκων είναι τα κυτοχρώματα των πρώτων οικογενειών (CYP1, CYP2, CYP3), ενώ τα υπόλοιπα με μεγαλύτερους αριθμούς εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό των ενδογενών υποστρωμάτων. Τα CYPs και πιο συγκεκριμένα τα CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 and CYP2B6 είναι υπεύθυνα για το 75% της φάσης I του μεταβολισμού των κλινικά χρησιμοποιούμενων φαρμάκων. Αυτό εκτιμάται σε περίπου 60% του μεταβολισμού και της κάθαρσης όλων των φαρμάκων. (Sim and Ingelman-Sundberg, 2010).

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εξωγενών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και τη δραστικότητα των ενδογενών κυτοχρωμάτων. Σε αυτούς ανήκουν: η διατροφή, η έκθεση σε άλλα φάρμακα, το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ. Μία άλλη περιοχή ισχυρού ενδιαφέροντος αποτελεί η ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων και άλλων γονιδιοτοξικών ξενοβιοτικών ουσιών. Πιστεύεται πως τα κυτοχρώματα P450 συμβάλλουν στην καρκινογένεση διευκολύνοντας την παραγωγή αντιδραστικών μεταβολιτών που συνδέονται σε κυτταρικά μακρομόρια, όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες. Εναλλακτικά, τα P450s προκαλούν βλάβη των κυτταρικών μακρομορίων με το σχηματισμό αντιδραστικών προϊόντων όπως οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και τα υπεροξειδία (Danielson, 2002).

5.1 CYP2A6

Το κυτόχρωμα CYP2A6 είναι μέλος της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450, που λόγω γενετικού πολυμορφισμού, παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων. Εκφράζεται στο ήπαρ του ανθρώπινου οργανισμού σε ποσοστό περίπου ~10% του συνόλου των κυτοχρωμάτων (Pelkonen et al., 2000). Εκτός του ήπατος, CYP2A6 έχει βρεθεί στον πνεύμονα, στο ρινικό βλεννογόνο, όπως και στα κερατινοκύτταρα του δέρματος (Petr Pavek and Zdenek Dvorak, 2008). Το γονίδιο του CYP2A6 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 494 αμινοξέων που συμβάλλει στο μεταβολισμό της φάσης I περισσότερων από 30 φαρμάκων από

διάφορες θεραπευτικές κατηγορίες (όπως για παράδειγμα το βαλπροϊκό οξύ, η τεγκαφούρη, η λετροζόλη, η κυκλοφωσφαμίδη, η πιλοκαρπίνη, η προποφόλη και η ταμοξιφαίνη). Παίζει κύριο ρόλο στο μεταβολισμό της νικοτίνης σε κοτινίνη (90%) και της κοτινίνης σε trans-3-υδροξυκοτινίνη (100%) (Pelkonen et al., 2008, Yuan Ming Di et al., 2009). Βέβαια, η 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης καταλύεται αποκλειστικά από το CYP2A6, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως πρότυπο υπόστρωμα για την εκτίμηση της δραστικότητας του συγκεκριμένου ενζύμου. Επίσης, εμπλέκεται στο μεταβολισμό μερικών προκαρκινογόνων όπως η αφλατοξίνη B1, 1,3-βουταδιένη και κάποιες νιτροζαμίνες που σχετίζονται με το κάπνισμα (N-νιτροζονορνικοτίνη, NNN και 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη, NNK) (Tanner and Tyndale, 2017; Pavek and Dvorak, 2008).

Η γνώση αυτή βοήθησε στη συσχέτιση της CYP2A6 ενεργότητας με την εμφάνιση καρκίνου των πνευμόνων. Καπνιστές με χαμηλή δραστικότητα του CYP2A6 έχουν μικρότερη ενεργοποίηση των σχετιζόμενων με το κάπνισμα νιτροζαμινών, μειώνοντας έτσι την έκθεση του οργανισμού στα καρκινογόνα που δρουν στον πνεύμονα. (Julie-Anne Tanner and Rachel F. Tyndale, 2017). Τέλος, φαινότυποι με καθόλου ενζυμική δραστηριότητα (CYP2A6*4a, CYP2A6*4B και CYP2A6*4D) προστατεύονται από καρκίνους που οφείλονται σε προκαρκινογόνα που αποτελούν υποστρώματα του CYP2A6 (Imadeldin Elfaki et al., 2018). Σε μετα-ανάλυση οχτώ ερευνών οι οποίες συσχετίζουν το γονότυπο CYP2A6 των πληθυσμών με τον αριθμό τσιγάρων ανά μέρα, βρέθηκε πως όσοι εμφάνιζαν μειωμένη μεταβολική ικανότητα (άτομα με ένα ή περισσότερα αλληλία CYP2A6*2, CYP2A6*4, CYP2A6*7, CYP2A6*9, CYP2A6*10, CYP2A6*12, CYP2A6*17, CYP2A6*20, CYP2A6*23, CYP2A6*24, CYP2A6*25, CYP2A6*26, CYP2A6*27, CYP2A6*28, CYP2A6*35) κάπνιζαν σημαντικά λιγότερα τσιγάρα ανά μέρα συγκριτικά με αυτούς που είχαν γονότυπο CYP2A6*1/*1 και είχαν φυσιολογικό ρυθμό μεταβολισμού της καφεΐνης (Pan, 2015). Εκτός από τον καρκίνο του πνεύμονα, ο πολυμορφισμός του CYP2A6 έχει συσχετιστεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Pavek and Dvorak, 2008)

Γενικά υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων που καθορίζουν τη δραστικότητα του CYP2A6 είτε επαγωγικά είτε κατασταλτικά. Στις επαγωγικές ουσίες ανήκουν: α) τα φάρμακα φαινοβαρβιτάλη, δεξαμεθαζόνη και ριφαμπικίνη μέσω ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων, β) τα ενδογενή ιοτρογόνα, μέσω διενεργοποίησης του γονιδίου CYP2A6, με τις γυναίκες να παρουσιάζουν ταχύτερη ενεργοποίηση του CYP2A6 σε σχέση με τους άνδρες και γ) το μπρόκολο, όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες (500g για 6ημέρες). Ανασταλτικοί

παράγοντες του ενζύμου θεωρούνται: α) τα φάρμακα, 8-μεθοξυψωραλένη, σελεγιλίνη, τρανυλκυπρομίνη, κετοκοναζόλη μέσω συναγωνιστικής αναστολής ή ανάστροφης αναστολής λόγω συσσώρευσης των τελικών μεταβολιτών, β) η ενδογενής τρυπταμίνη, ένα αλκαλοειδές ινδόλης που βρίσκεται σε χαμηλές ποσότητες στον εγκέφαλο και γ) διάφορες ουσίες που λαμβάνονται από τις τροφές όπως η μενθόλη, οι πολυφαινόλες (καφεϊκό οξύ και π-κουμαρινικό οξύ), το φλαβονοειδές κουερσετίνη και η κινναμαλδεΐδη. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του CYP2A6 είναι: α) η ηλικία, ώστε οι άνω των 65 ετών να εμφανίζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, πιθανότατα λόγω φυσιολογικών μεταβολών του οργανισμού όπως είναι η μειωμένη ροή του αίματος στο ήπαρ, β) τα επίπεδα και η δραστηριότητα της ρεδοκτάσης του κυτοχρώματος (P450 oxidoreductase - POR) , η οποία παίζει ζωτικό ρόλο στην κατάλυση των διαφόρων φαρμάκων από τα CYPs και γ) η αλδο-κετο ρεδοκτάση 1D1 (AKR1D1) η οποία εμπλέκεται στη σύνθεση των χολικών οξέων και στη μείωση κάποιων στεροειδών ορμονών, που ενεργοποιούν τους πυρηνικούς υποδοχείς (PXR και CAR) καθορίζοντας έτσι τη μεταγραφή των CYPs (Tanner and Tyndale, 2017).

Η ενεργοποίηση των γονιδίων της οικογένειας CYP2 πραγματοποιείται μέσω των πυρηνικών υποδοχέων που συνδέονται με το προσδέτη (ligand-activated nuclear receptors, NRs) Pregnane X Receptor (PXR, NR1I2), Constitutive Androstane receptor (CAR, NR1I3) και Glucocorticoid receptor (GR, NR3C1). Από αυτούς, τον κύριο ρόλο για την επαγωγή του CYP2A6 έχει ο PXR. Ο επαγωγικός παράγοντας προσδένεται στο κυτταρόπλασμα και το σύμπλεγμα εισέρχεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται με τους πυρηνικούς υποδοχείς RXR (Retinoid X Receptor). Εκεί σχηματίζουν ετεροδιμερή και επιστρατεύουν ενεργοποιητές που προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου (PXRRE) και πυροδοτούν την έναρξη του μεταγραφικού μηχανισμού. Επιπλέον, αποδείχτηκε πως και ο GR ελέγχει την έκφραση του CYP2A6 στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα παρά την απουσία ενός λειτουργικού GR (GRE) στην πυροδότηση του μηχανισμού (Pavek and Dvorak, 2008).

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία της ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2A6 μεταξύ των ατόμων και επομένως και του ρυθμού μεταβολισμού των υποστρωμάτων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CYP2A6 εμφανίζει μεγάλο πολυμορφισμό. Έχουν καταγραφεί περίπου 40 αλληλόμορφα με αρκετές διαφορές στο γονότυπο των φυλών. Η γενετική ποικιλομορφία του CYP2A6 είναι η κύρια αιτία των πολλαπλών παραλλαγών της δραστηριότητας του ενζύμου με πιο συχνό αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης και/ή της δραστηριότητας του. Μερικά CYP2A6 αλληλία είναι πιο κοινά, ενώ

μερικά εμφανίζονται σε συγκεκριμένες φυλές. Για παράδειγμα, το CYP2A6*7 αλληλίο έχει βρεθεί κυρίως στους Ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ τα CYP2A6*17, *20, *23-25 και *28 έχουν ταυτοποιηθεί στην Αφρικάνικη φυλή. Το αλληλίο CYP2A6*4 εμφανίζεται με συχνότητα σχεδόν 15% στην Ασιατική φυλή, συγκριτικά με το 1% στην καυκάσια φυλή. Αντίστοιχα, η συχνότητα του CYP2A6*10 είναι 2% στους Ασιάτες, αλλά δεν εμφανίζεται στη Λευκή φυλή. Τέλος, το αλληλίο CYP2A6*2 είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση ενός ανενεργού ενζύμου, εφόσον δεν μπορεί να συνδεθεί με το δακτύλιο της αίμης. Το συγκεκριμένο αλληλίο απαντάται στην Καυκάσια φυλή σε συχνότητα 1-3% (Oscarson, 2001; Raunio and Rahnasto-Rilla, 2012; Tanner and Tyndale, 2017).

6. Οξειδάση της ξανθίνης - XO

Η οξειδάση της ξανθίνης (XOD) μαζί με τη δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) αποτελούν δύο διαφορετικές αλλά αλληλομετατρέπόμενες μορφές του ίδιου γονιδίου της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης. Η XDH μπορεί να μετατραπεί προς XOD αντιστρεπτά με οξείδωση ή μη αντιστρεπτά με πρωτεόλυση (Levartovsky et al., 2000).

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος που εμπλέκεται στην οξείδωση ενδογενών πουρινών και πυριμιδινών, καθώς επίσης και στο μεταβολισμό φαρμάκων όπως οι θειοπουρίνες και οι μεθυλοξανθίνες. Η κύρια δράση του ενζύμου βρίσκεται στο ήπαρ, τον εντερικό σωλήνα (Guercioli et al., 1991), τα επινεφρίδια και το συνδετικό ιστό των οργάνων (Hae Young Chung, 1997). Χρησιμοποιεί την υποξανθίνη και την ξανθίνη ως υποστρώματα και το οξυγόνο (O_2) ως συμπαράγοντα για να παράγει υπεροξείδιο και ουρικό οξύ (Hae Young Chung, 1997). Επιπλέον, μετατρέπει την 1-μεθυλοξανθίνη (ένα μεταβολίτη της καφεΐνης) σε 1-μεθυλοουρικό οξύ (Miners and Birkett, 1996). Η XO έχει αναφερθεί πως καταλύει τη μείωση του οργανικού νιτρικού άλατος υπό αναερόβιες συνθήκες (Li et al., 2005). Γενικά είναι αποδεκτό πως το κάπνισμα (Aklillu et al., 2003) και το φύλο (Kalow and Tang, 1991; Aklillu et al., 2003) δεν έχει επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου (BEGAS 2007). Αυξημένη δραστηριότητα της XO παρατηρήθηκε στα παχύσαρκα παιδιά, ύστερα από μελέτες υπολογισμού του ρυθμού κάθαρσης φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου (αζεπίνη, τριαζολάμη, μεθυλπρεδνιζολόνη) (Manoj et al., 2011).

Η πρωτεΐνη XO έχει μοριακό βάρος 270 kDa και αποτελείται από 2 μόρια φλαβίνης, 2 άτομα μολυβδαινίου και 8 άτομα σιδήρου συνδεδεμένα ανά ενζυματική μονάδα. Τα άτομα σιδήρου

είναι μέρος της [2Fe-2S] φερρεδοξίνης (σύμπλεγμα σιδήρου-θείου) και συμμετέχουν στις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα άτομα μολυβδαινίου περιλαμβάνονται στους συμπαράγοντες μολυβδοπτερίνης και είναι οι δραστικές θέσεις του ενζύμου. Η ενεργός αυτή θέση αποτελείται από τη μονάδα μολυβδοπτερίνης με το άτομο του μολυβδενίου συνδεδεμένα με άτομα θείου, ένα τελικό οξυγόνο και ένα τελικό υδροξείδιο. Στην αντίδραση με την ξανθίνη για το σχηματισμό του ουρικού οξέος, ένα άτομο οξυγόνου μεταφέρεται από το μολυβδαίνιο στην ξανθίνη, ενώ ποικίλοι διαμεσολαβητές θεωρείται ότι εμπλέκονται. Ο ανασχηματισμός του ενεργού κέντρου του μολυβδαινίου γίνεται με την προσθήκη νερού. Όπως και σε άλλες γνωστές οξειδοαναγωγάσες που περιέχουν μολυβδαίνιο, το άτομο οξυγόνου που εισάγεται στο υπόστρωμα με την XO προέρχεται από μόριο νερού και όχι από διοξείδιο (Hille, 2014).

Υψηλά επίπεδα XO έχουν συσχετιστεί με βλάβη των ιστών σε διάφορες ασθένειες. Θεωρείται ότι η οξειδάση της ξανθίνης οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη των κυττάρων μέσω παραγωγής κυτταροτοξικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες αποτελούν σημαντικό μεσολαβητή σε ποικίλες κλινικές βλάβες, συμπεριλαμβανομένων της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης των ιστών, του καρδιακού εμφράγματος, του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, της υπέρτασης και της αθηροσκλήρωσης (Hae Young Chung, 1997). Επιπλέον, η παρουσία της XO στα ηπατοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος όταν ο ηπατικός ιστός έχει υποστεί σοβαρή βλάβη. Έτσι, παρατηρείται αύξηση της κυκλοφορούσας XO στην ηπατική κίρρωση (Lelouet et al., 2001). Αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου παρατηρείται επίσης σε λοίμωξη από τον ιό Influenza A, καθώς η XO βρίσκεται και στον ορό και στους πνεύμονες. Η πλήρης έλλειψη της οξειδάσης της ξανθίνης αποτελεί μία σπάνια γενετική διαταραχή που ονομάζεται ξανθινουρία.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί το μεταβολικό μονοπάτι σχηματισμού ουρικού οξέος, επομένως η αλλοπουρινόλη, που αναστέλλει τη λειτουργία της, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ουρικής νόσου (Pacher et al., 2006). Επιπλέον, στους αναστολείς της XO ανήκουν η οξυπουρινόλη (Spector, 1988), το φυτικό οξύ (Muraoka and Miura, 2004) και τα φλαβονοειδή (Cos et al., 1998).

7. N-ακετυλοτρανσφεράση-2 – NAT-2

Η N-ακετυλοτρανσφεράση 2, γνωστή επίσης και ως NAT2, αποτελεί ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού και κωδικοποιείται από το γονίδιο NAT2. Μία δεύτερη ακετυλοτρανσφεράση, η NAT1, κωδικοποιείται από το γονίδιο της N-ακετυλοτρασφεράσης 1 το οποίο βρίσκεται δίπλα από το γονίδιο της NAT2. Τα δύο αυτά γονίδια (της NAT1 και NAT2) εντοπίζονται και τα δύο στο χρωμόσωμα 8, παρουσιάζουν μία κωδικοποιούσα περιοχή 870 ζευγών βάσεων χωρίς ιντρόνια και η πρωτεϊνική τους αλληλουχία είναι ταυτόσημη κατά 81%. (NAT1 on 8p21.3–23.1 and NAT2 on 8p21.3–23.1 and 8p22) (Atmane et al., 2003; Boukouvala and Sim, 2005). Η NAT2 απαντάται κυρίως στο ήπαρ και στο γαστρεντερικό σωλήνα σε αντίθεση με τη NAT1 που βρίσκεται σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, του εντερικού σωλήνα, του πλακούντα και της ουροδόχου κύστεως. Και τα δύο ένζυμα (NAT1 και NAT2) παίρνουν μέρος στις αντιδράσεις της σύζευξης (φάση II του μεταβολισμού) των φαρμάκων και καταλύουν την N-ακετυλίωση (μεταφορά μιας ακετυλομάδας από το ακετυλοσυνένζυμο-A σε ένα άτομο αζώτου) και την O-ακετυλίωση (μεταφορά μιας ακετυλομάδας σε ένα άτομο οξυγόνου) των αρωματικών και ετεροκυκλικών αμινών. Η N-ακετυλίωση συμβάλλει στην αδρανοποίηση των υποστρωμάτων και κατά συνέπεια στην αποτοξίνωση του οργανισμού, ενώ η O-ακετυλίωση αποτελεί οδό ενεργοποίησης των υποστρωμάτων σε ενώσεις που επιδρούν στο DNA και μπορούν να αποτελέσουν δυνητικά καρκινογόνα. Γενικά, τα υποστρώματα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες των ενδογενών ουσιών και των ξενοβιοτικών. Αυτές μεταβολίζονται αντίστοιχα από τα NAT1 και NAT2 ισoenζυμα (Boukouvala and Sim, 2005).

Το γονίδιο της N-ακετυλοτρανσφεράσης-2 εμφανίζει μεγάλο πολυμορφισμό. Συνολικά, έχουν βρεθεί 43 σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται για τα 107 αλληλόμορφα που έχουν ταυτοποιηθεί. Τα αλληλία αυτά εκφράζονται φαινοτυπικά ως βραδείς, ταχείς αλλά και ενδιάμεσοι ακετυλιωτές και ουσιαστικά αντικατοπτρίζουν το ρυθμό της N-ακετυλίωσης των ξενοβιοτικών.

Η ταξινόμηση των ακετυλιωτών σε βραδείς και ταχείς έχει μεγάλη κλινική σημασία ως προς τη χορήγηση και τοξικότητα των φαρμάκων που μεταβολίζονται από το ένζυμο της NAT2. Οι βραδείς ακετυλιωτές χρειάζονται μικρότερη δόση φαρμάκων για το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα ενώ παράλληλα είναι πιο επιρρεπείς στις ανεπιθύμητες αντιδράσεις των χορηγούμενων ουσιών.

Αντίθετα, οι ταχείς ακετυλιωτές μπορεί να χρειαστούν μεγαλύτερη δόση του φαρμάκου ώστε να υπάρξει κλινικό αποτέλεσμα. Στον πίνακα 2 εμφανίζονται ορισμένοι γονότυποι και οι αντίστοιχοι φαινότυποι βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών.

Πίνακας 2 : Παραδείγματα φαινοτύπων με αντίστοιχων γονοτύπων (Ruiz et al. 2012)

Φαινότυπος	Γονότυπος
Υπερβολικά Ταχείς	NAT2*4/any
Ταχείς	NAT2*4/*4
Ταχείς - Ενδιάμεσοι	NAT2*4/*5
Ταχείς - Ενδιάμεσοι	NAT2*4/*6
Βραδείς	NAT2*5/*5
Βραδείς	NAT2*5/*6
Βραδείς	NAT2*6/*6

Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί της NAT2 σχετίζονται με διαφορετικό κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων τύπων καρκίνου. Οι βραδείς ακετυλιωτές (ιδιαίτερα όσοι εκτίθενται στον καπνό του τσιγάρου ή σε αρυλαμίνες) συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Sanderson et al., 2007; Yuan et al., 2008). Αντιθέτως, οι ταχείς ακετυλιωτές, και ειδικότερα αυτοί που καπνίζουν ή καταναλώνουν κρέας, έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Voutsinas et al., 2013; Hein, 2000).

Υπολογίζεται πως οι βραδείς ακετυλιωτές στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό αποτελούν ένα 50-60% (Rodrigues-Lima, 2008). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το ποσοστό αυτό επιβεβαιώνεται σε διάφορους Καυκάσιους πληθυσμούς. Στους Καναδούς (Tang et al., 1991), στους Γάλλους (Pontes et al., 1993), στους Ισπανούς (Carrillo and Benitez, 1994), στους Έλληνες (Asproдини et al., 1998) και στους Γερμανούς (Cascorbi et al., 1995; Jetter et al., 2004), το ποσοστό των βραδέων ακετυλιωτών είναι αντίστοιχα 41, 38.7, 34.6, 33.7, 44.9 και 45.3% και των ταχέων 59, 61.3, 65.4, 66.3, 55.1 και 54.7% (Begas et al, 2009).

Σύμφωνα με άλλη έρευνα, η δραστηριότητα της NAT2 είναι αυξημένη στα παχύσαρκα παιδιά (Chiney, 2011).

Μερικά από τα φάρμακα που ακετυλιώνει η NAT2 είναι το αντιαρρυθμικό προκαϊναμίδη, το αντιυπερτασικό υδραλαζίνη, το αντιφλεγμονώδες διπυρόνη, το αντιεπιληπτικό κλοναζεπάμη, το αντιφυματικό ισονιαζίδη, το αντιμικροβιακό σουλφοναμίδες, το αντιλεπρικό δαψόνη, και η καφεΐνη. Επομένως, μερικές από τις ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανίσουν αυτά τα φάρμακα σε βραδείς κυρίως ακετυλιωτές είναι 1) η υπόταση στην περίπτωση της υδραλαζίνης, 2) ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ) στις περιπτώσεις της ισονιαζίδης, της προκαϊναμίδης και της υδραλαζίνης και 3) η περιφερική νευροπάθεια και η ηπατοτοξικότητα στην περίπτωση της ισονιαζίδης (Hakooz, 2009; Evans, 1989).

8. Η καφεΐνη ως πρότυπο φάρμακο - δείκτης

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137MX) περιέχεται σε αρκετά ροφήματα που καταναλώνονται καθημερινά, όπως ο καφές, το τσάι, η σοκολάτα και η κόκα-κόλα. Χρησιμοποιείται συχνά ως φάρμακο-δείκτης για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου ποικίλων ενζύμων που μεταβολίζουν φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων του CYP2A6, της N-ακετυλοτρανσφεράσης 2 και της οξειδάσης της ξανθίνης. Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 17 μεταβολίτες και 5 κύρια μεταβολικά μονοπάτια που οδηγούν σε κάθαρση της καφεΐνης. Η N3 απομεθυλίωση για το σχηματισμό της παραξανθίνης (1,7-διμεθυλοξανθίνη, 17X) ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό του μεταβολισμού της καφεΐνης (80%). Η N1 απομεθυλίωση που σχηματίζει θεοβρωμίνη (3,7-διμεθυλοξανθίνη, 37X) αντικατοπτρίζει το 11%, ενώ η N7 απομεθυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό θεοφυλλίνης (1,3-διμεθυλοξανθίνη, 13X) ευθύνεται για το 4% της κάθαρσης της καφεΐνης (Hakooz, 2009). Η υπόλοιπη <5% καφεΐνη αποβάλλεται μέσω ενός C8-υδροξυλιωμένου μεταβολίτη, του 1,3,7-τριμεθυλουρικού οξέως (137U) και μιας 6-αμινο-5-(N-φορμυλομεθυλαμινο)-1,3-διμεθυλουρακίλης.

Στη συνέχεια, κάθε μία από τις σχηματιζόμενες διμεθυλοξανθίνες (17X, 37X και 13X) υπόκεινται σε δύο επιπλέον αντιδράσεις μονοαπομεθυλίωσης ώστε να σχηματιστεί η αντίστοιχη μονομεθυλοξανθίνη. Επιπλέον οξείδωση της 1- και 7- μεθυλοξανθίνης (αλλά όχι της 3-μεθυλοξανθίνης) οδηγεί στο σχηματισμό της 1- και 7- μεθυλουρικού οξέως (1U, 7U), αντίστοιχα. Όλες οι διμεθυλοξανθίνες που προκύπτουν από το μεταβολισμό της καφεΐνης υποβάλλονται σε 8-υδροξυλίωση σχηματίζοντας διμεθυλουρικό οξύ. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η μετατροπή του 17X σε 1-μεθυλοξανθίνη (1X) και 5-ακετυλαμινο-6φορμυλαμινο-3-μεθυλουρακίλη (AFMU).

Μετατροπή του AFMU μπορεί να συμβεί αυθόρμητα και μη ενζυματικά στα ούρα σχηματίζοντας την 5-ακετυλο-6-αμινο-3-μεθυλουρακίλη (AAMU).

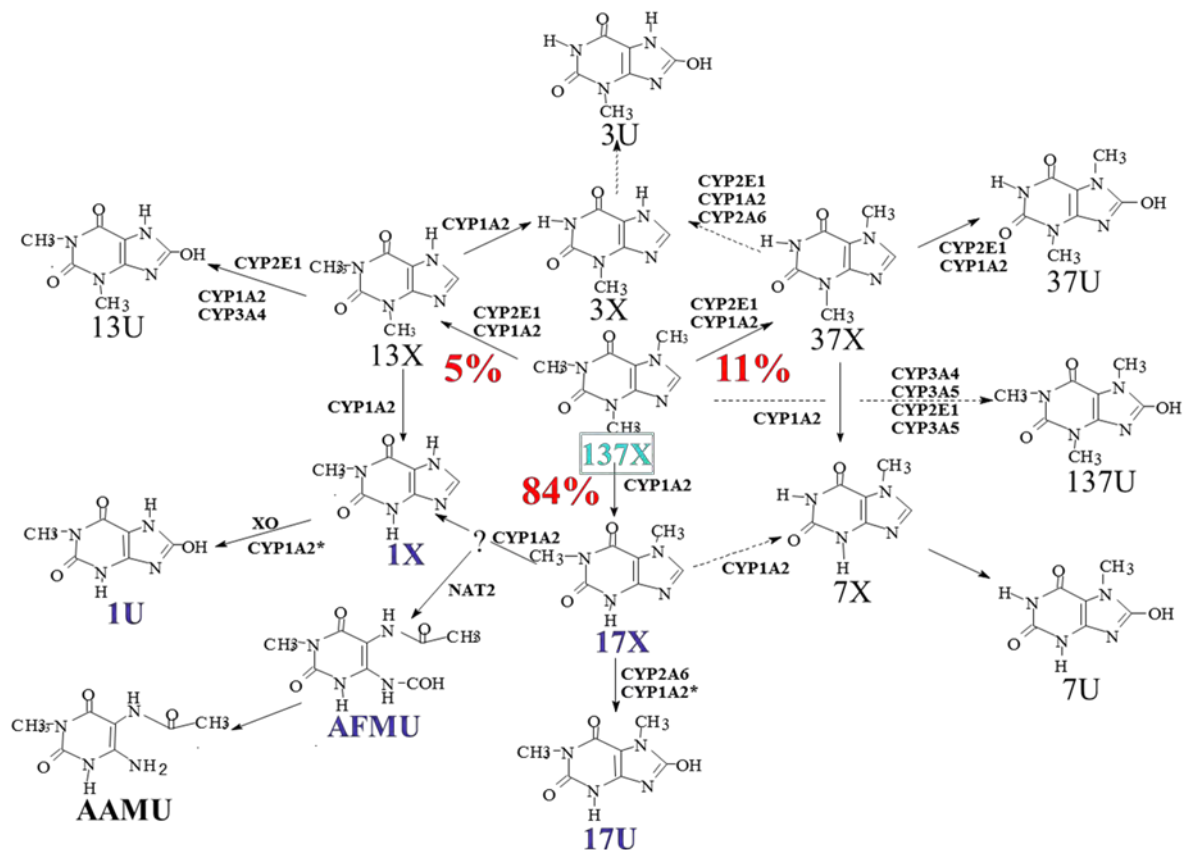
Η N³-απομεθυλίωση πραγματοποιείται αποκλειστικά από το ένζυμο του ήπατος CYP1A2, ώστε περισσότερο από το 95% της προσλαμβανόμενης καφεΐνης να μεταβολίζεται από το ένζυμο CYP1A2 (Hakooz, 2009). Ένα άλλο ένζυμο του κυτοχρώματος που καταλύει σε πολύ μικρό ποσοστό το σχηματισμό της θεοφυλλίνης και της θεοβρωμίνης είναι το CYP2E1.

Το ένζυμο του κυτοχρώματος CYP2A6 καταλύει την υδροξυλίωση του μεταβολίτη 17X σε 17U, ώστε ο μεταβολικός λόγος 17U/17X στα ούρα να αντανακλά τη δραστικότητα του CYP2A6. Αύξηση του παραπάνω λόγου υποδεικνύει αύξηση της δραστικότητας του (Nowell, 2002). Παρόλ'αυτά, για τον έλεγχο της λειτουργικότητας του CYP2A6 χρησιμοποιήθηκε ο λόγος 17U/(17U+17X) ως παραλλαγή του λόγου 17U/17X. Η οξειδάση της ξανθίνης διασπά με υδροξυλίωση την 1X σε 1U, ώστε για τον έλεγχο της δραστικότητάς της να έχει προταθεί ο μεταβολικός λόγος 1U/1X (Lelouet, 2001). Όμως, και αυτός ο λόγος τροποποιήθηκε και προτάθηκε ο μεταβολικός λόγος 1U/1U + 1X (Carrillo and Benitez, 1994; Krul and Hageman, 1998; Begas et al., 2007). Οι τροποποιημένοι αυτοί λόγοι εκφράζουν τη συγκέντρωση του 17U και της 1U ως ποσοστά της συνολικής μεταβολικής οδού του CYP2A6 και της XO, αντίστοιχα. Επιπλέον, παρουσίασαν μικρότερες μεταβολές σε βάθος χρόνου σε υγιείς εθελοντές γι'αυτό και προτιμήθηκε η χρήση τους έναντι των αρχικών (Begas et al., 2017).

Τέλος, η 7-απομεθυλίωση της 17X από το CYP1A2 σχηματίζει ένα ασταθές ενδιάμεσο το οποίο είτε υφίσταται περαιτέρω ακετυλίωση μέσω της NAT2 και οδηγεί στο σχηματισμό του AFMU, είτε σχηματίζει την 1X με εσωτερική αναδιάταξη (Tang et al., 1983; Lelo et al., 1989). Έχουν προταθεί τέσσερις διαφορετικοί μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα της NAT2 : AFMU/(AFMU + 1U + 1X) (Rostami-Hodjegan et al., 1996; Miners and Brickett, 1996; Begas et al., 2007), AFMU/1X (Krul and Hageman, 1998), AAMU/(AAMU + 1X + 1U) (Tang et al., 1991), (AFMU + AAMU)/(AFMU + AAMU + 1X + 1U) (Jetter et al., 2004; Hakooz, 2009). Με βάση την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων προηγούμενων ερευνών, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε το λόγο AFMU/(AFMU+1MU+1MX) για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου NAT2.

Ο μεταβολισμός της καφεΐνης είναι δόσοεξαρτώμενος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει γραμμική συσχέτιση του μεταβολισμού με τη συγκέντρωση των μεθυλοξανθινών στον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλωστε, έχει αποδειχτεί σημαντική μείωση της κάθαρσης της καφεΐνης όταν αυξάνει η δόση από τα 70mg στα 300mg, επιβεβαιώνοντας το δόσοεξαρτώμενο κορεσμό της μεταβολικής οδού. Για το λόγο αυτό, στις μελέτες των φαινοτύπων προτείνεται η χρήση μιας

χαμηλής χορηγούμενης από το στόμα δόσης καφεΐνης (≤ 3 mg/kg) με τη δόση των 1-2 mg/kg να έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ακρίβειας του φαινοτυπικού τεστ. Η ευελιξία αυτή στη δοσολογία του σκευάσματος καφεΐνης αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση της καφεΐνης ως πρότυπο φάρμακο-δείκτη, επιτρέποντας τη χορήγησή της και σε ιδιαίτερες πληθυσμιακές κατηγορίες, όπως για παράδειγμα το παιδιατρικό πληθυσμό (Hakooz, 2009).



Εικόνα 2: Μονοπάτια μεταβολισμού της καφεΐνης. Καφεΐνη - 1,3,7 τριμεθυλ-ξανθίνη (137X). 1,3,7 τριμεθυλ-ουρικό οξύ (137U). 3,7-διμεθυλ-ξανθίνη (37X) (θεοβρωμίνη). 1,3-διμεθυλ-ξανθίνη (13X) (θεοφυλλίνη). 1,7-διμεθυλ-ξανθίνη (17X) (παραξανθίνη). 1,3-διμεθυλ-ουρατη (13U). 3,7-διμεθυλ-ουρατη (37U). 1,7-διμεθυλ-ουρατη (17U). 1-μεθυλοξανθίνη (1X). 3-μεθυλοξανθίνη (3X). 7-μεθυλοξανθίνη (7X). 1-μεθυλουρατη (1U). 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλουρακιλη (AFMU). 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλουρακιλη (AAMU). N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (NAT2). Οξειδάση της ξανθίνης (XO) (Hakooz, 2009).

9. Σκοπός

Η παρούσα εργασία στόχευε στον έλεγχο της *in vivo* δραστικότητας των ενζύμων CYP2A6, NAT2, XO σε υγιείς εθελοντές μετά από κατανάλωση αφεψήματος κρόκου Κοζάνης.

Ως φάρμακο-δείκτης (probe-drug) χρησιμοποιήθηκε η καφεΐνη καθώς ,με βάση το μοντέλο μεταβολισμού της, προσφέρει αξιοπιστία και μπορούσε να χορηγηθεί με ασφάλεια στους υγιείς εθελοντές. Επίσης, για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των υπό εξέταση ενζύμων εκμεταλλευτήκαμε την παρουσία των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα, γεγονός που καθιστά την όλη διαδικασία ανώδυνη και μη επεμβατική.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10. Πρωτόκολλο μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν 9 εθελοντές κλινικά υγιείς με ελεύθερο ατομικό ιστορικό. Στον Πίνακα 2 παρατίθενται κάποια δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών. Ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν συγκεκριμένο διατροφολόγιο κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου καθώς επίσης και η αποχή από συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες. Εάν υπήρχε σοβαρή ανάγκη λήψης κάποιας φαρμακευτικής ουσίας, οι εθελοντές απαγορευόταν να λάβουν σκευάσματα που περιείχαν παρακεταμόλη (π.χ. Depon, Norgesic, Apotel, Lonarid-N κτλ).

Επιπλέον, συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο που αφορούσε βασικά χαρακτηριστικά τους όπως ύψος, βάρος, πιθανές ασθένειες και χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Ενώ αναφέρονταν επίσης και καθημερινές συνήθειες και τρόπος ζωής όπως κάπνισμα, αλκοόλ, επάγγελμα και έκθεση σε χημικές ουσίες. Τα δείγματα ούρων και σιέλου συλλέχτηκαν έπειτα από ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεση των εθελοντών σύμφωνα με το δοθέν πρωτόκολλο:

1. Την πρώτη μέρα παραλάβαμε δείγματα ούρων ενώ η δίαιτα ήταν ελεύθερη και οι εθελοντές δεν είχαν στερηθεί τίποτα από τη διατροφή τους. Η λήψη των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο καφεΐνης (σχήμα 4):

Οι εθελοντές απέχουν μόνο από

- 1,3,7 τριμεθυλοξανθίνη (καφεΐνη) , δηλαδή από καφέ, σοκολάτα, κακάο, τσάι και τα ροφήματα αυτών, κόκα-κόλα, σπράιτ,
- αλκοολούχα ποτά για 14 ώρες (18:00 προηγούμενης ημέρας – 8:00 το πρωί της ημέρας του πρωτοκόλλου καφεΐνης)
- παρακεταμόλη (Depon, Panadol, Norgesic, Apotel, Lonarid-N κλπ)

Κατανάλωσαν κάψουλα καφεΐνης (200 mg) την ημέρα της δοκιμασίας μετά την έγερση (8:00), άδειασαν την ουροδόχο κύστη τους από ούρα, και συνέχισαν την αποχή από καφεΐνη.

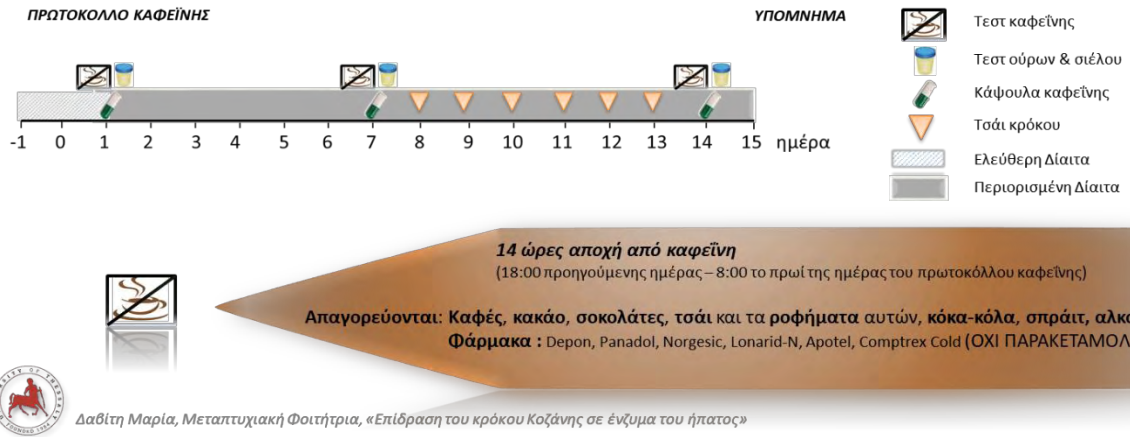
Συνέλεξαν τα ούρα των πρώτων 5 ωρών μετά την λήψη της καφεΐνης σε μπουκάλι και τα ούρα μεταξύ 5ης και 6ης ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης σε ουροσυλλέκτη.

Αμέσως μετά την λήψη των ούρων, προστέθηκε διάλυμα HCl 6N ώστε να ρυθμιστεί το pH στην τιμή 3-3,5 περίπου, με σκοπό να μην διασπαστεί το AFMU (Wong et al., 2002). 4 δείγματα του 1 ml αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

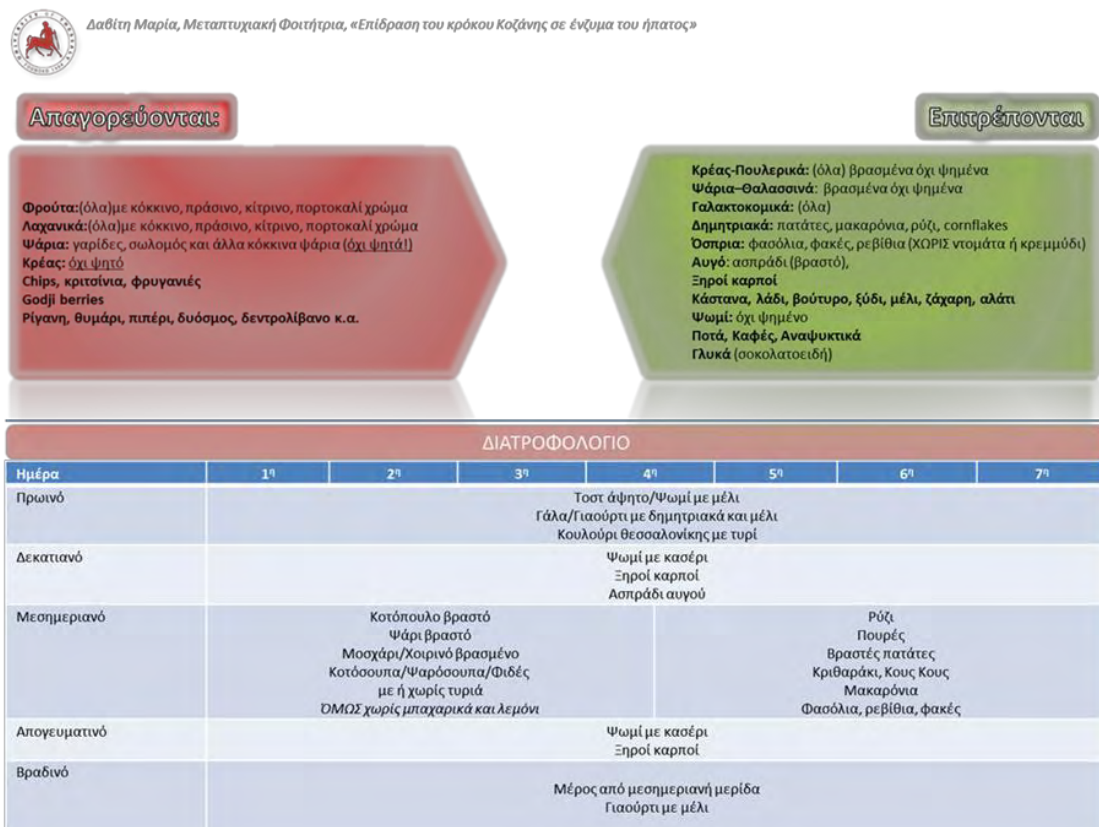
2. Στη συνέχεια, για επτά (7) ημέρες, οι εθελοντές ακολούθησαν ένα συγκεκριμένο διατροφολόγιο (σχήμα 5) και το απόγευμα της έκτης ημέρας, ακολούθησαν, για δεύτερη φορά, το πρωτόκολλο της καφεΐνης. Την έβδομη ημέρα συλλέχθηκαν τα δείγματα με την αναφερθείσα διαδικασία.
3. Η αποχή από τρόφιμα με καροτενοειδή (σχήμα 5) συνεχίστηκε για άλλες επτά (7) μέρες και ταυτόχρονα προστέθηκε και η κατανάλωση ροφήματος κρόκου. Αυτό παράχθηκε ως εξής : Σε ζεστό νερό (θερμοκρασία ~ 70-80°C) προστίθενται 300 mg κρόκου και παραμένουν για 12 ώρες περίπου (όλο το βράδυ) σε κλειστό ντουλάπι διότι ο κρόκος είναι φωτοευαίσθητος. Μετά την πρωινή ούρηση, το εκχύλισμα διηθείται και καταναλώνεται το ρόφημα. Συνολικά καταναλώθηκαν έξι (6) ροφήματα κρόκου
4. Τη δέκατη τρίτη (13) ημέρα προστέθηκε εκ νέου το πρωτόκολλο καφεΐνης και τη δέκατη τέταρτη (14) ημέρα, οι εθελοντές συνέλεξαν τα δείγματα εφόσον άδειασαν την κύστη τους και παρέλαβαν την κάψουλα καφεΐνης, σύμφωνα με τη διαδικασία (1) (σχήμα 4).

Πίνακας 3: Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών.

α/α	Φύλο	Ηλικία	Βάρος (kg)	Ύψος (m)	ΔΜΣ	Καπνιστής/στρία
1	A	33	89	1.90	24.7	ΟΧΙ
2	A	22	80.3	1.77	25.6	ΟΧΙ
3	A	19	80	1.76	25.8	ΟΧΙ
4	A	26	84	1.82	25.4	ΟΧΙ
5	A	24	75	1.80	23.1	ΟΧΙ
6	A	25	67	1.88	19	ΟΧΙ
7	A	25	92	1.88	26	ΟΧΙ
8	A	24	130	1.85	38	ΟΧΙ
9	Θ	57	63	1.65	23.1	ΟΧΙ
Μέση Τιμή		28.33	84.48	1.81	25.63	
Τυπική Απόκλιση		11.38	19.51	0.08	5.13	



Σχήμα 4: Πρωτόκολλο Καφεΐνης. Το πρωτόκολλο δόθηκε σε όλους τους εθελοντές υπό μορφή κάρτας κατά την εισαγωγή τους στην μελέτη ώστε να έχουν συνεχή αναφορά σε όλα τα βήματα της μελέτης.



Σχήμα 5: Διατροφολόγιο Εθελοντών. Όπως και στο σχήμα 4, το διατροφολόγιο δόθηκε σε όλους τους εθελοντές υπό μορφή εκτυπωμένης κάρτας κατά την εισαγωγή τους στην μελέτη ώστε να έχουν λεπτομερή και πλήρη αναφορά σε όλα τα βήματα της μελέτης.

11. Αντιδραστήρια – Χημικές ουσίες

Ο κρόκος Κοζάνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν συσκευασμένος σε φακελάκια των 250mg και η προμήθειά του έγινε από τα σημεία πώλησης βιολογικών προϊόντων της Λάρισας και προέρχεται από την περιοχή της Κοζάνης.

Τα αντιδραστήρια και οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήσαμε τις προμηθευτήκαμε από χώρες της Ευρώπης. Πιο αναλυτικά, οι πρότυποι μεταβολίτες της καφεΐνης 137MX, 17MX, 17MU, 1MU και η παρακεταμόλη προέρχονται από την εταιρία Sigma της Γερμανίας και ο μεταβολίτης 1MX από τη βελγική εταιρία TCI. Η Chem-Lab του Βελγίου μας προμήθευσε το ακετονιτρίλιο και τη μεθανόλη και η Fisher Scientific της Μ. Βρετανίας την ισοπροπανόλη. Από την Ελβετία (Fluca) προμηθευτήκαμε την καφεΐνη και από τη Γαλλία (CARLO ERBA) το θειικό αμμώνιο και το χλωροφόρμιο. Το οξικό οξύ (άνυδρο) προέρχεται από τη γερμανική εταιρία Merck, ενώ το υδροχλωρικό οξύ ($\geq 37\%$) από τη γερμανική Sigma-Aldrich. Τέλος, το AFMU (98% καθαρότητας) ήταν ευγενής χορηγία του κ.W.Pfleiderer από το Πανεπιστήμιο Konstanz της Γερμανίας.

12. Συσσκευές χρωματογραφίας

Για τη χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης χρησιμοποιήσαμε συσκευές χρωματογραφίας που αποτελούνταν από τα εξής:

- α) αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη),
- β) ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού φωτός FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη) και
- γ) βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7125 (Rheodyne, California, ΗΠΑ) με την οποία ήταν συνδεδεμένοι βρόχοι σταθερού όγκου, 20 μ L και 50 μ L, κατά περίπτωση.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη Kromasil 100 C18 με διάμετρο σωματιδίων πλήρωσης 5 μ m, μήκος 250 mm και εσωτερική διάμετρο 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία). Η στήλη αυτή βρισκόταν μέσα σε θερμοστατούμενο κλίβανο με θερμοκρασία 30°C και ο διαλελυμένος στην κινητή φάση αέρας αποβαλλόταν με τη χρήση ενός απαερωτή συνδεδεμένου εν σειρά (ERC, Ιαπωνία). Τέλος, το λογισμικό πρόγραμμα Chrom & Spec (Ampersand Ltd, Ρωσία) χρησιμοποιήθηκε για την πρόσληψη και ανάλυση των δεδομένων.

13. Χρωματογραφικές συνθήκες

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα έγινε με ήδη ανεπτυγμένη μέθοδο (Begas et al. (2007)). Πιο αναλυτικά:

Μείγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου (92/4/5 αναλογίες όγκου) αποτελεί την κινητή φάση, η οποία διοχετεύεται αρχικά στη στήλη με ταχύτητα 0,7 mL/min. Αυτή η ταχύτητα ροής παραμένει για τα πρώτα 5 λεπτά της ανάλυσης και στη συνέχεια αυξάνεται σε 1,1mL/min για τα υπόλοιπα 15 λεπτά. Το μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφική μελέτη για την ανίχνευση των ουσιών είναι 280 nm.

14. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε παρασκευάστηκαν με τις αντίστοιχες πρότυπες ουσίες. Αυτές ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό Gibertini ευαισθησίας 0,1 mg (Gibertini Elettronica s.r.l. – Μιλάνο, Ιταλία) και στη συνέχεια διαλύθηκαν στην κατάλληλη ποσότητα διαλύτη.

Όλα τα διαλύματα των μεταβολιτών καφεΐνης παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 5 mM. Για τους μεταβολίτες 17MU, 1MX και 1MU, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NaOH (2,5 mM). Το 17MX διαλύθηκε σε υπερκαθαρό νερό, ενώ το AFMU σε 0,1% οξικό οξύ. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (ακεταμινοφαΐνη, συγκέντρωσης 10mM) παρασκευάστηκε σε 0,1% οξικό οξύ. Η αποθήκευση όλων αυτών των πυκνών διαλυμάτων έγινε στους -20°C. Μείγμα των μεταβολιτών αυτών σε συγκέντρωση 800 μM χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου κατόπιν ανάμιξης με ούρα υγιούς ατόμου.

15. Επεξεργασία δειγμάτων ούρων

Η επεξεργασία των δειγμάτων ούρων έγινε ως εξής:

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν:

- 1) 200μl ούρων εθελοντών,
- 2) 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών,
- 3) 200 μl διαλύματος οξικού οξέος 0,1%, και
- 4) 20 μl διαλύματος εσωτερικού προτύπου (ακεταμινοφαΐνη, 10mM).

Το δείγμα ανακινήθηκε κάποια δευτερόλεπτα με Vortex.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης περίπου σε αναλογία όγκων 85/15 και ακολούθησε ανακίνηση με Vortex για ένα (1) λεπτό.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για ένα (1) λεπτό στις 5000rpm και σκοπός αυτής ήταν η διάσπαση του γαλακτώματος που δημιουργήθηκε, η κατακρήμνιση του ιζήματος και ο διαχωρισμός των δύο φάσεων.

Μετά τη φυγοκέντρηση, διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις (υδατική και οργανική) με τη χρήση της διαχωριστικής χοάνης. Έγινε εξάτμιση της οργανικής φάσης με ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (που όπως αναφέρθηκε αποτελείται από 0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, σε όγκους 92/4/5). Τέλος, το δείγμα ανακινήθηκε εκ νέου με Vortex και 60μL αυτού εισήχθησαν στη χρωματογραφική στήλη.

Τα δείγματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου προετοιμάστηκαν αναμιγνύοντας 200μL ούρων υγιούς ατόμου, που δεν κατανάλωσε καφεΐνη, με 200μL μείγματος των προτύπων διαλυμάτων των μεταβολιτών της καφεΐνης.

16. Ποιοτικός έλεγχος - Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης

Η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της γραμμικής συσχέτισης του λόγου “ύψος κορυφής μεταβολίτη/ύψος κορυφής εσωτερικού προτύπου” με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών στα ούρα υγιούς εθελοντή χωρίς τη λήψη καφεΐνης. Έτσι, κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης και επιβεβαιώθηκε η γραμμικότητα των αποτελεσμάτων. Η παρασκευή των δειγμάτων βαθμονόμησης (συγκεντρώσεων 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM) έγινε με την ανάμιξη των πρότυπων μειγμάτων των 5 μεταβολιτών καφεΐνης και του εσωτερικού προτύπου (ΕΠ) με ούρα ελεύθερα από μεθυλοξανθίνες. Τα δείγματα αυτά επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με την παραπάνω αναφερθείσα διαδικασία (Πίνακας 3).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα εξισώσεων γραμμικής παλινδρόμησης ($y=ax+\beta$) για τους μεταβολίτες καφεΐνης στα ούρα.

Μεταβολίτες	A	β	R ²	Συγκέντρωση (μM)
AFMU	0,0083	-0,0123	0,9965	10-400
1MU	0,0085	0,0205	0,9973	10-400
1MX	0,0045	-0,0004	0,9987	10-400
17MU	0,0038	-0,0271	0,9924	10-400
17MX	0,0022	0,014	0,9954	10-400

17. Ακρίβεια - Επαναληψιμότητα

Για τον έλεγχο της ακρίβειας και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, παρασκευάσαμε δύο δείγματα συγκεντώσεων 30μM και 300μM αντίστοιχα για κάθε μεταβολίτη. Τα δείγματα αυτά παρασκευάστηκαν με την πρόσμιξη ενός πρότυπου διαλύματος των πέντε (5) μεταβολιτών σε ούρα που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες και αποτέλεσαν τη βάση για τον ποιοτικό έλεγχο των δεδομένων μας (QC-Quality Control).

Έχοντας εννιά (9) εθελοντές από έξι (6) δείγματα ούρων (1. ελεύθερη διαίτα, 2.περιορισμένη διαίτα και 3. περιορισμένη διαίτα μετά τη λήψη κρόκου, 0-5h και 6h) ο καθένας, συνολικά συλλέξαμε πενήντα τέσσερα (54) δείγματα ούρων προς ανάλυση. Κάθε ημέρα, πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων των εθελοντών μας, κάναμε ανάλυση ενός δείγματος QC 30μM και ενός QC 300μM.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε μεταβολίτη σε κάθε δείγμα QC χρησιμοποιήσαμε τις αντίστοιχες εξισώσεις των ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης.

Πίνακας 5: Ακρίβεια - Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (n=5).

<u>Μεταβολίτης</u> <u>καφεΐνης στα ούρα</u>	<u>Συγκεντώσεις (μM)</u>				<u>Συγκεντώσεις (μM)</u>			
	<u>Προσθεθείσα</u>	<u>Μέση</u> <u>μετρηθείσα</u>	<u>Σφάλμα</u> <u>(%)</u>	<u>Διακύμανση</u> <u>(CV%)</u>	<u>Προσθεθείσα</u>	<u>Μέση</u> <u>μετρηθείσα</u>	<u>Σφάλμα</u> <u>(%)</u>	<u>Διακύμανση</u> <u>(CV%)</u>
<u>AFMU</u>	<u>30,00</u>	<u>29.41</u>	<u>-1.97</u>	<u>9.15</u>	<u>300,00</u>	<u>299.75</u>	<u>-0.08</u>	<u>5.72</u>
<u>1MU</u>	<u>30,00</u>	<u>30.26</u>	<u>0.87</u>	<u>7.97</u>	<u>300,00</u>	<u>306.09</u>	<u>2.03</u>	<u>5.80</u>
<u>1MX</u>	<u>30,00</u>	<u>29.96</u>	<u>-0.13</u>	<u>6.84</u>	<u>300,00</u>	<u>307.34</u>	<u>2.45</u>	<u>3.38</u>
<u>17MU</u>	<u>30,00</u>	<u>30.14</u>	<u>0.47</u>	<u>6.22</u>	<u>300,00</u>	<u>302.16</u>	<u>0.72</u>	<u>7.34</u>
<u>17MX</u>	<u>30,00</u>	<u>29.80</u>	<u>-0.67</u>	<u>8.21</u>	<u>300,00</u>	<u>295.61</u>	<u>-1.46</u>	<u>9.32</u>

18. Στατιστική ανάλυση

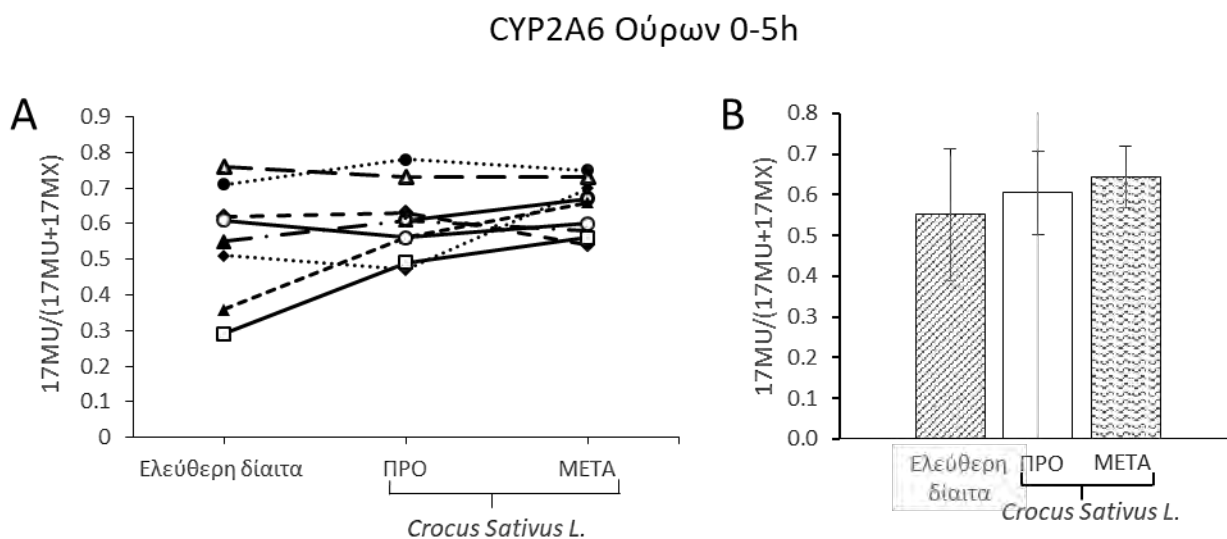
Οι τιμές των μεταβολικών καφεΐνης στα ούρα υγιών εθελοντών αποτέλεσαν τη βάση για τον υπολογισμό των μεταβολικών λόγων δραστηριότητας των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2. Από αυτές τις τιμές, προσδιορίστηκαν οι μέσες τιμές (μ) και οι τυπικές αποκλίσεις (σ) τους. Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης. Ο έλεγχος των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των αποτελεσμάτων (ελεύθερης δίαιτας, περιορισμένης δίαιτας χωρίς τη λήψη καροτενοειδών και περιορισμένης δίαιτας με χορήγηση ροφήματος κρόκου Κοζάνης) έγινε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated Measures ANOVA). Στην περίπτωση που δεν υπήρχε κανονική κατανομή του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρική μέθοδος διερεύνησης των διαφορών (ANOVA on Ranks). Τυχόν διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Τέλος, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε το στατιστικό λογισμικό SPSS 23.0.

19. Αποτελέσματα

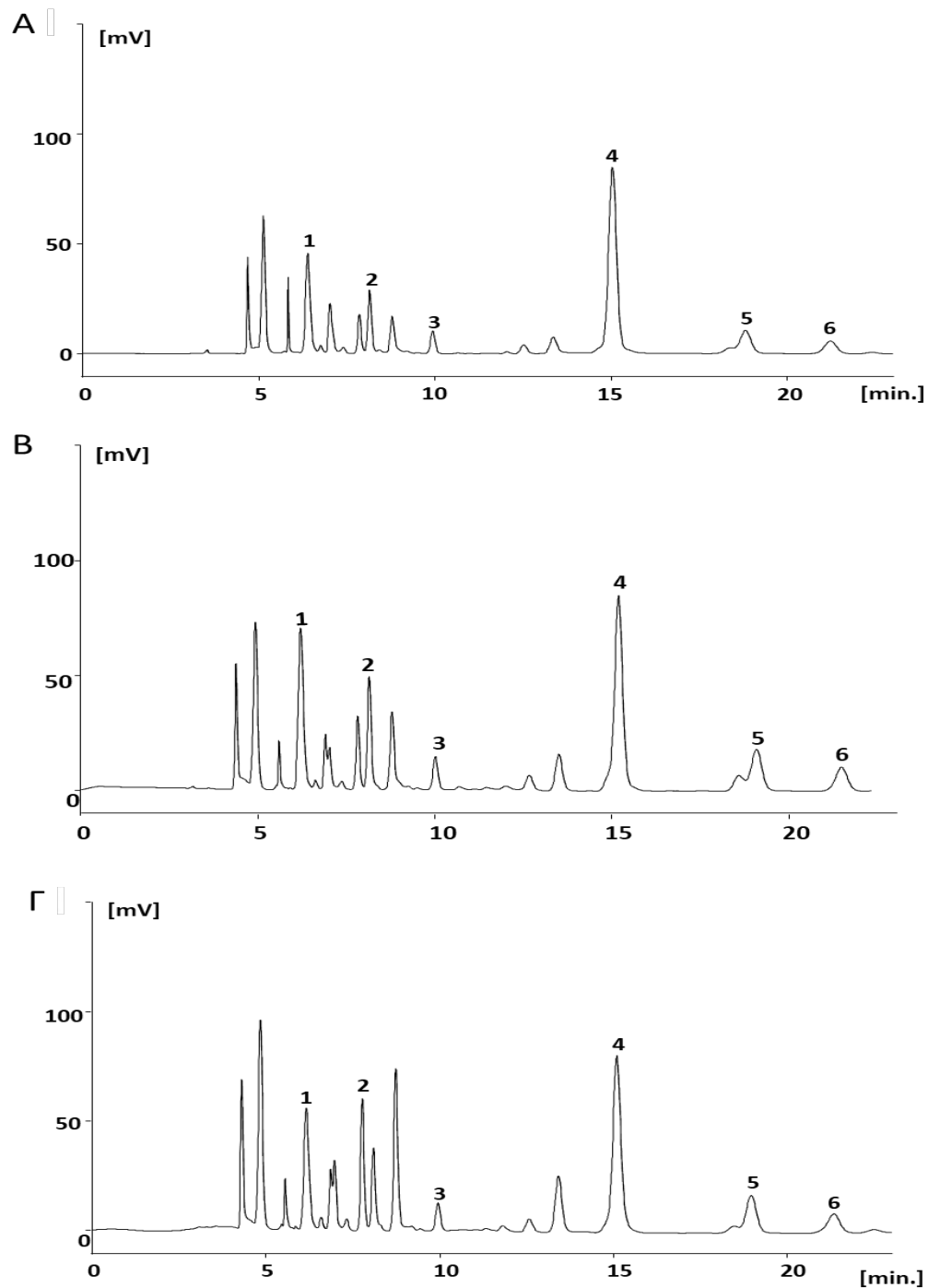
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα που αφορούν την περίοδο ελεύθερης διαίτας, της περιορισμένης από καροτενοειδή διαίτας, και της περιορισμένης διαίτας με χορήγηση κρόκου Κοζάνης φαίνονται στο σχήμα 6.

19.1 CYP2A6

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου $17\text{MU}/(17\text{MU}+17\text{MX})$ στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις ελεύθερης διαίτας (φάση I), περιορισμένης διαίτας χωρίς καροτενοειδή (φάση II) και περιορισμένης διαίτας μετά τη χορήγηση κρόκου (φάση III), για το διάστημα συλλογής ούρων 0-5 ώρες, ήταν $0,55\pm 0,16$, $0,60\pm 0,10$ και $0,64\pm 0,08$ αντίστοιχα (Πίνακας 6). Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ($p=0,106$) (Σχήμα 7).

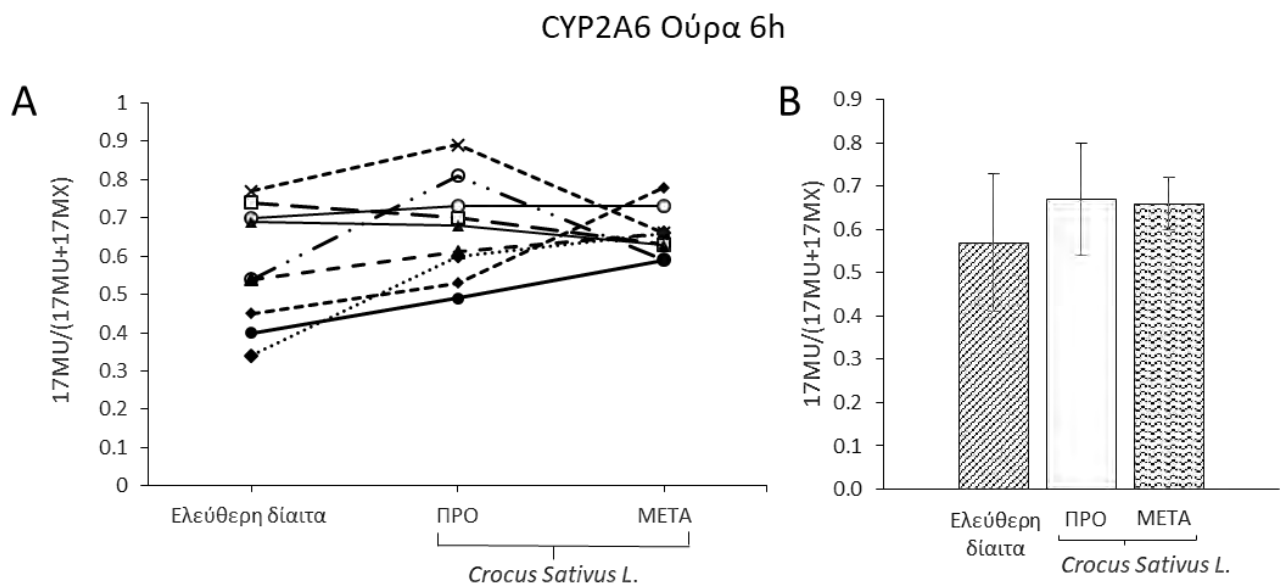


Σχήμα 7: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα του CYP2A6 στα ούρα 0-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων του CYP2A6 για τις πρώτες 5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (δεξιά).



Σχήμα 6: HPLC χρωματογραφήματα των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα. A: Δίαιτα ελεύθερη, δείκτες δραστικότητας CYP2A6=0,54, XO=0,47 και NAT2=0,10. B: Δίαιτα ελεύθερη από καροτενοειδή, δείκτες δραστικότητας CYP2A6=0,61, XO=0,51 και NAT2=0,10. Γ: Δίαιτα με τη χορήγηση κρόκου Κοζάνης, δείκτες δραστικότητας CYP2A6=0,66, XO=0,55 και NAT2=0,09. 1= AFMU, 2= 1MU, 3= 1MX, 4= ΕΠ, 5= 17MU, 6= 17MX.

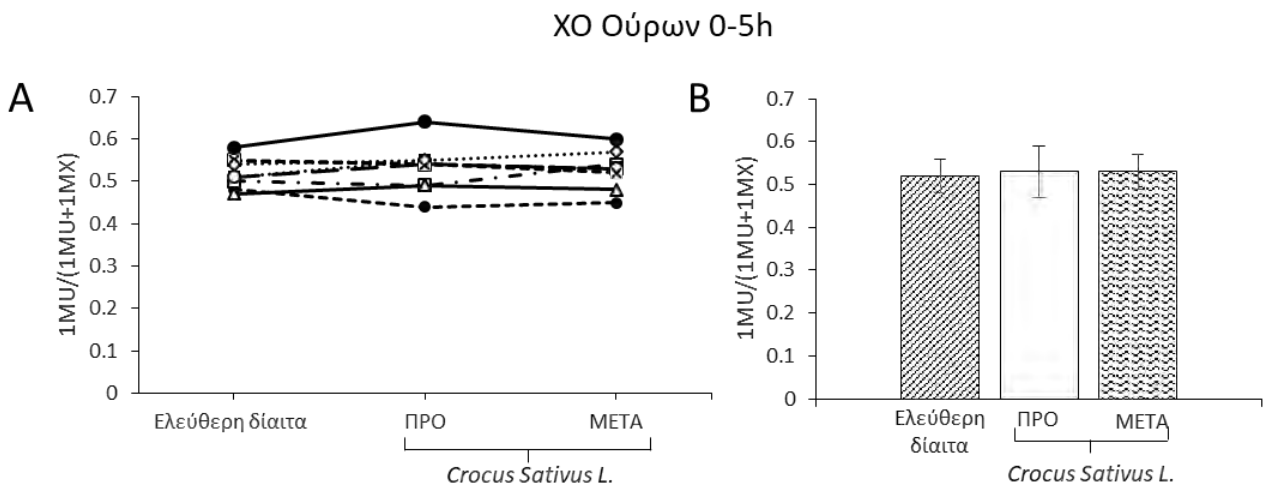
Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου $17\text{MU}/(17\text{MU}+17\text{MX})$ στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις I, II και III, για την 6η ώρα μετά τη χορήγηση καφεΐνης, ήταν $0,57\pm 0,16$, $0,67\pm 0,13$ και $0,66\pm 0,06$ αντίστοιχα (Πίνακας 7). Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ($p=0,127$) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα του CYP2A6 στα ούρα την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων του CYP2A6 την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (δεξιά).

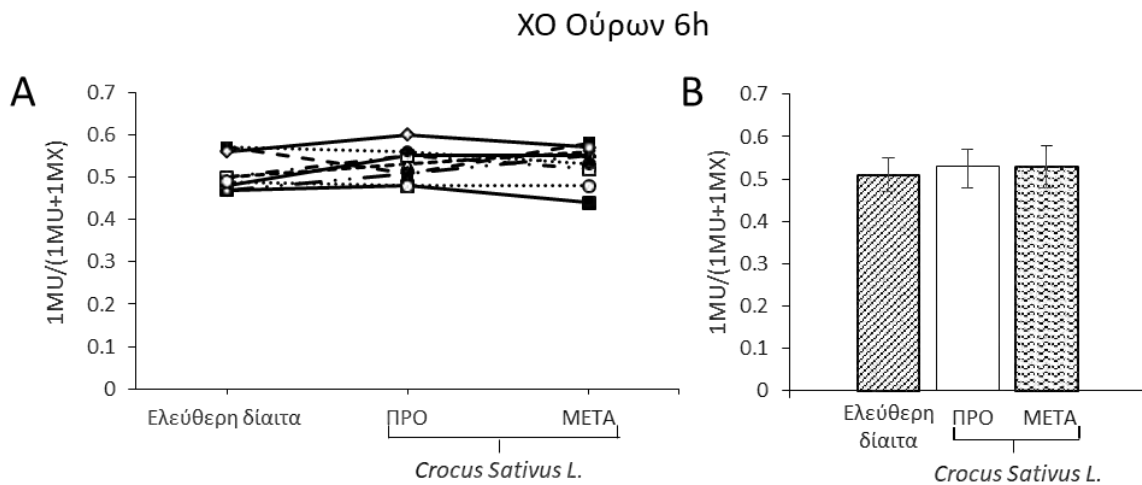
19.2 ΧΟ- Οξειδάση της Ξανθίνης

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου $1MU/(1MU+1MX)$ στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις I, II και III, για το διάστημα συλλογής ούρων 0-5 ώρες, ήταν $0,52\pm 0,04$, $0,53\pm 0,06$ και $0,53\pm 0,04$ αντίστοιχα (Πίνακας 6). Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ($p=0,781$) (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα της ΧΟ στα ούρα 0-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων της ΧΟ για τις πρώτες 5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (δεξιά).

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου $1MU/(1MU+1MX)$ στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις I, II και III, για την 6η ώρα μετά τη χορήγηση καφεΐνης, ήταν $0,51\pm 0,04$, $0,53\pm 0,04$ και $0,53\pm 0,05$ αντίστοιχα (Πίνακας 7). Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ($p=0,316$) (Σχήμα 10).

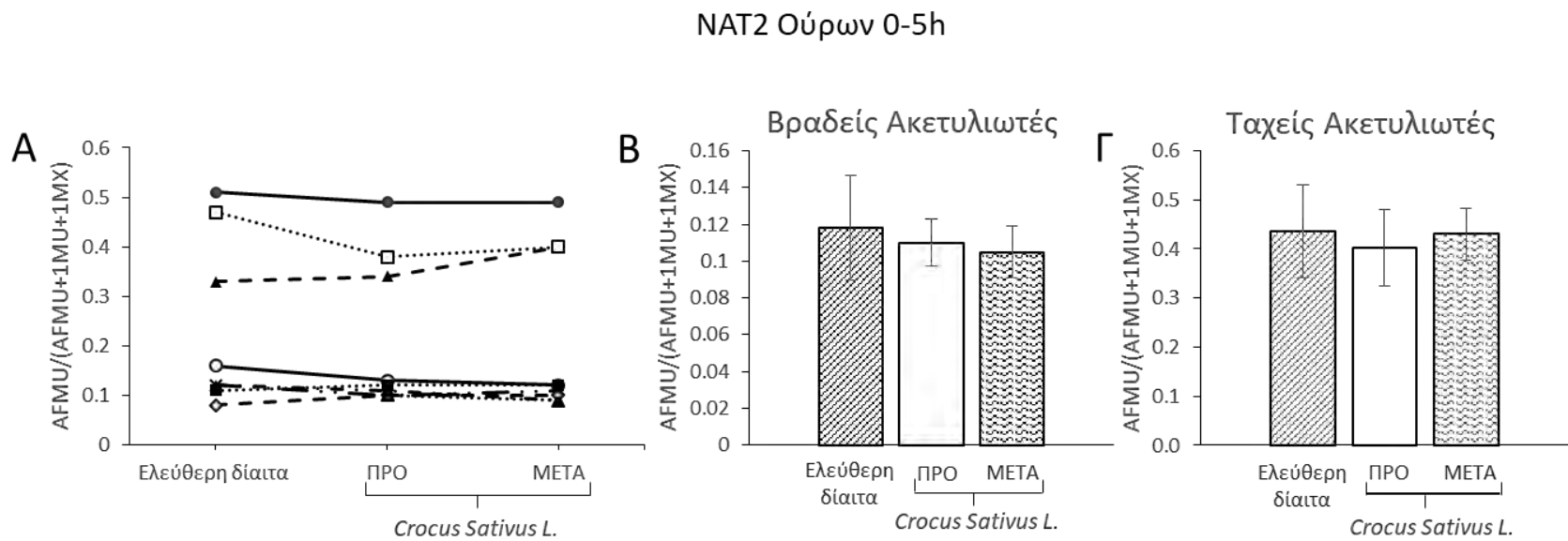


Σχήμα 10: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστηριότητα της ΧΟ στα ούρα την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων της ΧΟ την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (δεξιά).

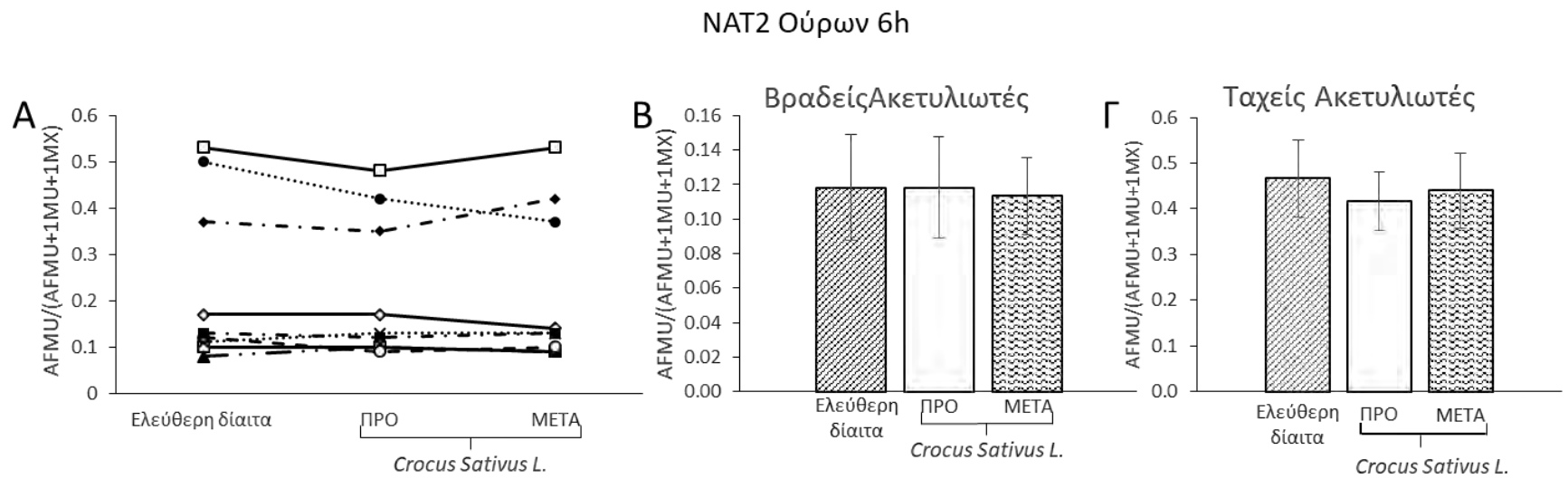
19.3 NAT-2

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1MU+1MX) στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις I,II και III, για το διάστημα συλλογής ούρων 0-5 ώρες, ήταν $0,24\pm 0,17$, $0,21\pm 0,15$ και $0,21\pm 0,17$ αντίστοιχα (Πίνακας 6). Οι ατομικές τιμές των εθελοντών δεν παρουσίασαν κανονική κατανομή και έτσι χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρική μέθοδος για τη διερεύνηση των διαφορών (Analysis of Variance on Ranks). Με βάση τη διαδικασία αυτή δεν αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιάμεσων τιμών για τις τρεις φάσεις ($0,14$, $0,12$, $0,12$ αντίστοιχα, $p=0,654$). Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της διακύμανσης των τιμών με βάση το φαινότυπο του βραδέως και ταχέως ακετυλιωτή. Η τιμή του μεταβολικού λόγου με βάση την οποία γίνεται ο φαινοτυπικός διαχωρισμός καθορίστηκε ως $0,25$, η οποία έχει εφαρμογή στον πληθυσμό της Ελλάδας σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Begas et al., 2007). Το δείγμα διαχωρίστηκε σε έξι (6) βραδείς και τρεις (3) ταχείς ακετυλιωτές. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά των μέσων τιμών για τις τρεις φάσεις της μελέτης τόσο για τους βραδείς ($0,12\pm 0,03$, $0,11\pm 0,01$, $0,10\pm 0,01$, $p=0,480$) όσο και για τους ταχείς ($0,44\pm 0,09$, $0,40\pm 0,08$, $0,43\pm 0,05$, $p=0,569$) (Σχήμα 11).

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου AFMU/(AFMU+1MU+1MX) στα ούρα των εθελοντών, κατά τις φάσεις I,II και III, για την 6η ώρα μετά τη χορήγηση καφεΐνης, ήταν $0,23\pm 0,18$, $0,22\pm 0,15$ και $0,22\pm 0,17$ αντίστοιχα (Πίνακας 7). Οι τιμές αυτές δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά όπως διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ($p=0,461$). Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της διακύμανσης των τιμών με βάση το φαινότυπο του βραδέως και ταχέως ακετυλιωτή. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά των μέσων τιμών για τις τρεις φάσεις της μελέτης τόσο για τους βραδείς ($0,12\pm 0,03$, $0,12\pm 0,03$, $0,11\pm 0,02$, $p=0,734$) όσο και για τους ταχείς ($0,47\pm 0,09$, $0,42\pm 0,07$, $0,44\pm 0,08$, $p=0,501$) (Σχήμα 12).



Σχήμα 11: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα της NAT2 στα ούρα 0-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων της NAT2 για τις πρώτες 5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (δεξιά).



Σχήμα 12: Οι μεταβολικοί λόγοι για τη δραστικότητα της NAT2 στα ούρα την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (Αριστερά). Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μεταβολικών λόγων της NAT2 την 6^η ώρα μετά τη λήψη της καφεΐνης (Δεξιά).

Πίνακας 6: Μεταβολικοί λόγοι δραστηριότητας των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2 στα ούρα υγιών εθελοντών. Λήψη 0-5H μετά την πρόσληψη κάψουλας καφεΐνης.

A/A	CYP2A6			Οξειδάση της Ξανθίνης			N-ακετυλοτρανσφεράση 2		
	Φάση I	Φάση II	Φάση III	Φάση I	Φάση II	Φάση III	Φάση I	Φάση II	Φάση III
1	0,55	0,61	0,58	0,48	0,44	0,45	0,16	0,13	0,12
2	0,51	0,47	0,70	0,50	0,49	0,54	0,33	0,34	0,40
3	--	0,61	0,67	--	0,51	0,55	--	0,10	0,09
4	0,76	0,73	0,73	0,55	0,54	0,53	0,08	0,10	0,10
5	0,71	0,78	0,75	0,51	0,54	0,53	0,12	0,10	0,11
6	0,62	0,63	0,54	0,55	0,54	0,52	0,12	0,11	0,09
7	0,36	0,56	0,66	0,47	0,49	0,48	0,11	0,12	0,12
8	0,29	0,49	0,56	0,54	0,55	0,57	0,47	0,38	0,40
9	0,61	0,56	0,60	0,58	0,64	0,60	0,51	0,49	0,49
MT	0,55	0,60	0,64	0,52	0,53	0,53	0,24	0,21	0,21
±T.A.	0,16	0,10	0,08	0,04	0,06	0,04	0,17	0,15	0,16

$$CYP2A6 = 17MU / (17MU + 17MX)$$

$$XO = 1MU / (1MU + 1MX)$$

$$NAT2 = AFMU / (AFMU + 1MU + 1MX)$$

Πίνακας 7: Μεταβολικοί λόγοι δραστηριότητας των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2 στα ούρα υγιών εθελοντών. Από δείγματα που ελήφθησαν 6H μετά τη χορήγηση καφεΐνης.

A/A	CYP2A6			Οξειδάση της Ξανθίνης			N-ακετυλοτρανσφεράση 2		
	Φάση I	Φάση II	Φάση III	Φάση I	Φάση II	Φάση III	Φάση I	Φάση II	Φάση III
1	0,54	0,81	0,59	0,47	0,48	0,44	0,17	0,17	0,14
2	0,45	0,53	0,78	0,50	0,53	0,56	0,37	0,35	0,42
3	0,54	0,61	0,66	0,47	0,51	0,55	0,10	0,10	0,09
4	0,70	0,73	0,73	0,48	0,55	0,55	0,08	0,10	0,09
5	0,77	0,89	0,66	0,50	0,55	0,52	0,12	0,09	0,10
6	0,74	0,70	0,63	0,57	0,56	0,53	0,13	0,12	0,13
7	0,34	0,60	0,66	0,49	0,48	0,48	0,11	0,13	0,13
8	0,40	0,49	0,59	0,57	0,51	0,58	0,50	0,42	0,37
9	0,69	0,68	0,63	0,56	0,60	0,57	0,53	0,48	0,53
MT	0,57	0,67	0,66	0,51	0,53	0,53	0,23	0,22	0,22
±T.A.	0,16	0,13	0,06	0,04	0,04	0,05	0,18	0,15	0,17

$CYP2A6 = 17MU / (17MU + 17MX)$

$XO = 1MU / (1MU + 1MX)$,

$NAT2 = AFMU / (AFMU + 1MU + 1MX)$

20. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία από τις ελάχιστες εργασίες που υπάρχουν πάνω στην *in vivo* επίδραση του κρόκου Κοζάνης στη δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων της φάσης I των ξενοβιοτικών ουσιών (CYP2A6 και XO) και της φάσης II (NAT2) στον άνθρωπο. Η καφεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως μεταβολικό πρότυπο (φάρμακο-δείκτης) για την εξέταση αυτής της ενζυμικής δραστικότητας.

Η παρούσα εξέταση διενεργήθηκε σε τρεις φάσεις: την πρώτη φάση της ελεύθερης δίαιτας, τη δεύτερη φάση της περιορισμένης δίαιτας χωρίς καροτενοειδή και την τρίτη φάση της περιορισμένης δίαιτας με χορήγηση κρόκου. Οι δραστικότητες των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2 προσδιορίστηκαν στο τέλος της κάθε φάσης.

Στην παρούσα εργασία, οι μεταβολικοί λόγοι των υπό μελέτη ενζύμων στα ούρα, μετά από βήμερη χορήγηση κρόκου, έδειξαν μικρή μείωση σε σχέση με τις πρότυπες αρχικές τιμές των εκάστοτε λόγων. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Για τη διαδικασία παρασκευής του ροφήματος του κρόκου Κοζάνης, χρησιμοποιήσαμε 300 mg σαφράν τα οποία τα προσθέσαμε σε ζεστό νερό (θερμοκρασία ~ 70-80°C) και τα αφήσαμε για 12 ώρες περίπου (όλο το βράδυ) σε κλειστό βουτάκι. Μετά την πρωινή ούρηση, οι εθελοντές διήθησαν το εκχύλισμα και κατανάλωσαν το ρόφημα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και από τους Chryssanthi et al. με τη διαφορά πως το τσάι του κρόκου παρασκευάστηκε από 200mg σαφράν τα οποία εμβάπτιστηκαν στο 150ml ζεστό νερό για μόλις πέντε λεπτά (Chryssanthi et al. 2011). Σύμφωνα με την αγγλική ορολογία, ο όρος έγχυση (infusion) αναφέρεται στην εμβάπτιση του ξηρού στίγματος σε ζεστό νερό σε αντίθεση με τον όρο αφέψημα (decoction) που αναφέρεται στο σύντομο βρασμό του προϊόντος και παραμονή του στο νερό για λίγα λεπτά πριν την κατανάλωση.

Τα συστατικά του κρόκου Κοζάνης περιγράφηκαν σε προηγούμενες εργασίες (Chryssanthi et al. 2011) οι οποίες έδειξαν πως το εκχύλισμα του κρόκου περιέχει πικοκροκίνη, γλυκοζίτη σαφρανάλη, *cis*-κροκίνες και *trans*-κροκίνες. Επιπλέον, δείχθηκε πως η συνολική κροκετίνη, η αγλυκονική κροκίνη, ήταν παρούσα στο ανθρώπινο αίμα, 2 ώρες μετά την κατανάλωση του ροφήματος του κρόκου, σε συγκεντώσεις από 1,24 έως 3,67 μΜ. Όσο αναφορά την πικοκροκίνη, δείχθηκε *in vitro*, ότι η βιοδιαθεσιμότητά της είναι πολύ χαμηλή, πιθανότατα λόγω της παρουσίας μορίων ζάχαρης (Kyriakoudi et al., 2015). Ωστόσο, η απορρόφηση των γλυκοσιδίων μπορεί να βελτιωθεί από την

παρουσία των πεπτικών ενζύμων ή από το μεταβολισμό της μικροχλωρίδας *in vivo*, βοηθώντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα της πικροκροκίνης στη μορφή του αγλυκονικού παραγώγου της, της σαφρανάλης. (Marin et al., 2015). Πράγματι, έχει πρόσφατα διαπιστωθεί πως η από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος του σαφράν και του συστατικού της σαφρανάλης σε γουρούνια και ποντίκια είχε αποτέλεσμα πρόληψης της πνευμονικής φλεγμονής και του γονιδιοτοξικού stress (Boskababy et al., 2012; Koul and Abraham, 2017), υποδεικνύοντας επαρκή βιοδιαθεσιμότητα της σαφρανάλης.

Για την εκτίμηση της *in vivo* δραστικότητας των μεταβολικών ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2 έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137X) ως φάρμακο-δείκτης. Έχει ήδη αποδειχθεί *in vivo* και *in vitro* ότι το 95% του μεταβολισμού της καφεΐνης καταλύεται από το CYP1A2 (Carrillo, 2000; Gu, 1992; Kot and Daniel, 2008).

Παρολ'αυτά, ένα μικρό μέρος του μεταβολισμού της καφεΐνης καταλύεται από το CYP2A6 και πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό καταλύει την 8-υδροξυλίωση της 17X προς 17U (σε μικρότερο πάντα βαθμό από το CYP1A2). Όμως, σε μικρές συγκεντρώσεις των 0,1mM της 17X, το CYP2A6 είναι το μοναδικό που καταλύει την αναφερθείσα αντίδραση. Εκμεταλλευόμενοι αυτή την πληροφορία, χρησιμοποιήσαμε την καφεΐνη ως υπόστρωμα για τον έλεγχο της δραστικότητας του CYP2A6 σε ανθρώπινους οργανισμούς και το μεταβολικό λόγο 17U/ (17U+17X) ως δείκτη της παραπάνω δραστικότητας. Η καφεΐνη επίσης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των ενζύμων XO και NAT2 με τους ήδη αναφερθέντες μεταβολικούς λόγους 1MU/(1MU+1MX) και AFMU/(AFMU+1MU+1MX) αντίστοιχα.

Η δόση της καφεΐνης ανέρχεται στα 200mg/day με βάση την προτεινόμενη δοσολογία των 1-2 mg/kg ώστε να παραμένει αξιόπιστο το φαινοτυπικό τεστ (Hakooz, 2009). Η επιλογή των ωρών δειγματοληψίας σε δύο φάσεις (0-5h και 6h) μετά τη λήψη της κάψουλας της καφεΐνης έγινε με βάση το χρόνο ημίσειας ζωής της καφεΐνης στο αίμα (5ώρες) καθώς επίσης και σύμφωνα με τις δειγματοληψίες προηγούμενων ερευνών που χρησιμοποιούσαν την καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτη (Sinués et al. 2002; Woolridge et al. 2004; Kot et al. 2008; Hakooz 2009). Έτσι, προσπαθήσαμε να διαπιστώσουμε την αξιοπιστία των δειγματοληψιών όλων αυτών των ερευνών και την ιδανικότερη ώρα λήψης των δειγμάτων ούρων.

Η λειτουργικότητα και των τριών ενζύμων δε φάνηκε να επηρεάζεται από την κατανάλωση του *Crocus sativus L.* και των καρτενοειδών που περιέχει. Γενικά, η κροκίνη και το λυκοπένιο θεωρούνται ότι δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα της ΧΟ, ενώ δεν υπάρχουν ανάλογες μελέτες για την επίδραση αυτών των συστατικών στα ένζυμα CYP2A6 και NAT2. Σε μία μελέτη, όπου ερευνάται η επίδραση του all-trans-ρετινοϊκού οξέως (ATRA), το οποίο σχετίζεται δομικά με τα καρτενοειδή, στη λειτουργικότητα των ενζύμων που παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό των φαρμάκων, δείχθηκε πως το ATRA προκαλεί επαγωγή του NAT2 των ταχέων ακετυλιωτών κατά 29%. Ωστόσο, η ημερήσια δόση του ATRA ήταν 150mg/m² καθημερινά, η οποία είναι σχεδόν ισότιμη με 250-300 mg της ουσίας (Adedoyin et al., 1998). Επιπλέον, η μέση περιεκτικότητα του ελληνικού σαφράν σε κροκίνη υπολογίζεται να φτάνει το 5,2% του βάρους του στίγματος (Gonda et al., 2012). Ακόμα και αν υποθέταμε πως η κροκίνη και το ρετινοϊκό οξύ (ATRA) επιδρούν παρόμοια στη δραστηριότητα της NAT2, είναι μάλλον αμφίβολο η ποσότητα της κροκίνης που περιέχεται στα 300mg του χορηγούμενου σαφράν (δηλ. ≈15,6mg) να έχει ορατό αντίκτυπο στη λειτουργικότητα του εκάστοτε ενζύμου.

Όσο αναφορά τη σαφρανάλη και το γλυκοσίδιό της πικροκροκίνη, δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν την *in vivo* επίδρασή τους στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Ένα δομικά ανάλογο του σαφρανάλ, η β-ιονόνη, έχει δειχθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του CYP2A3 στους πνεύμονες των ποντικών, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Το CYP2A3 των ποντικών θεωρείται ορθολογικά ανάλογο του ανθρώπινου CYP2A6 (Robottom-Ferreira et al., 2003). Παρόλα αυτά, καμία άμεση συσχέτιση δεν μπορεί να γίνει μεταξύ πειραματικών ερευνών σε ανθρώπους και ζώα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν μελέτες, ούτε *in vivo* αλλά ούτε και *in vitro*, για την επίδραση του σαφράν και των συστατικών του στη λειτουργικότητα των ενζύμων CYP2A6, ΧΟ και NAT2.

Στη δική μας μελέτη, καμία στατιστική διαφορά δεν παρουσιάστηκε στη λειτουργικότητα των παραπάνω ενζύμων σε σχέση με την 7ήμερη κατανάλωση του σαφράν από υγιείς εθελοντές.

Περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί όσο αναφορά την ημέρα και ώρα λήψης του τελευταίου δείγματος ούρων.

21. Συμπέρασμα

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την επίδραση του αφεψήματος του κρόκου Κοζάνης στην *in vivo* λειτουργικότητα των μεταβολικών ενζύμων του ανθρώπινου οργανισμού CYP2A6, XO και NAT2. Με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη δραστικότητα των παραπάνω ενζύμων μετά την ημερήσια χορήγηση 300mg σαφράν σε μορφή ροφήματος, γεγονός που ενισχύει την άποψη για την ασφαλή συγχορήγηση του κρόκου Κοζάνης με άλλα φάρμακα που μεταβολίζονται από τα ένζυμα των ξενοβιοτικών CYP2A6, XO και NAT2.

Περισσότερες μελέτες με τη συμμετοχή μεγαλύτερου αριθμού εθελοντών επιβάλλεται να πραγματοποιηθούν αξιολογώντας την ασφαλή αυτή συγχορήγηση του σαφράν με φαρμακευτικά υποστρώματα για το CYP2A6, XO και NAT2.

22. Βιβλιογραφία - Πηγές

1. Adedoyin, A., Stiff, D.D., Smith, D.C., Romkes, M., Bahnson, R.C., Day, R., Hofacker, J., Branch, R.A., & Trump, D.L. (1998). All-trans-retinoic acid modulation of drug-metabolizing enzyme activities: investigation with selective metabolic drug probes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 41(2), 133-139.
2. Ahmad Reza Gohari, Soodabeh Saeidnia, and Mahdie Kourepaz Mahmoodabadi (Jan-Jun 2013). An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacogn Rev.* 7(13): 61-66
3. Altinoz, E., Oner, Z., Elbe, H., Cigremis, Y., & Turkoz, Y. (2015). Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Human & Experimental Toxicology*, 34(2),127-134.
4. Alemzadeh E, Oryan A. (May 2018). Effectiveness of a Crocus sativus Extract on Burn Wounds in Rats. *Planta Med.* 23. doi: 10.1055/a-0631-3620.
5. Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. (Oct 2003). Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians. *Eur J Clin Pharmacol.*;59(7):533-6.
6. Eleni Aklillu & Juan Antonio Carrillo & Eyasu Makonnen & Leif Bertilsson & Natasa Djordjevic (2018). N-Acetyltransferase-2 (NAT2) phenotype is influenced by genotype-environment interaction in Ethiopians. *European Journal of Clinical Pharmacology* 74:903–911 <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2448-y>
7. Atmane, N., Dairou, J., Paul, A., Dupret, J-M., Rodrigues-Lima, F. (2003). Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.35086-35092.
8. Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I, Benakis A. (Oct-Dec 1998). Determination of N-acetylation phenotyping in a Greek population using caffeine as a metabolic probe. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*;23(4):501-6.
9. Basker D, Negbi M. (1983). The use of saffron. *Econ Bot.* 37:228–236.
10. BHARGAVA K VIJAYA (2011). MEDICINAL USES AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF CROCUS SATIVUS LINN (SAFFRON). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491 Vol 3, Suppl 3.

11. Begas, E., Kouvaras, E., Tsakalof, A., Papakosta, S., Asproдини, EK. (2007). In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomedical Chromatography*, 21, pp.190-200.
12. Begas E, Tsioutsouliti A, Kouvaras E, Haroutounian SA, Kasiotis KM, Kouretas D, Asproдини E. (Feb 2017). Effects of peppermint tea consumption on the activities of CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase, N-acetyltransferase-2 and UDP-glucuronosyltransferases-1A1/1A6 in healthy volunteers. *Food and Chemical Toxicology*, 100:80-89. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.021.
13. Boskabady, M.H., Tabatabaee, A., & Byrami, G. (2012). The effect of the extract of *Crocus sativus* and its constituent safranal, on lung pathology and lung inflammation of ovalbumin sensitized guinea-pigs. *Phytomedicine*, 19(10), 904-11.
14. Boukouvala, S. and Sim, E. (2005) Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, pp.343-351.
15. Brown AC, Hairfield M, Richards DG, McMillin DL, Mein EA, Nelson CD, authors (2004). Medical nutrition therapy as a potential complementary treatment for psoriasis: Five case reports. *Alternative Medicine Review*, 9:297–307.
16. Bukhari Syed Imran, Mahreen Manzoor, M.K. Dhar (February 2018). A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 98, Pages 733-745. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.090>
17. Carrillo JA and Benitez J (1994). Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-Acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 55: 293–304.
18. Carrillo, JA., Christensen, M., Ramos, SI., Alm, C., Dahl, M-L., Benitez, J. et al. (2000). Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22, pp.409-417.
19. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K and Roots I. (1995). Arylamine N-acetyltransferase (NAT-2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *American Journal of Human Genetics*, 57: 581–592.

20. Eirini Christodoulou, Nikolaos PE Kadoglou, Nikolaos Kostomitsopoulos, Georgia Valsami (Aug 2015). Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications.. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 19. <https://doi.org/10.1111/jphp.12456>
21. Chryssanthi, D.G., Lamari, F.N., Georgakopoulos, C.D., & Cordopatis, P. (2011). A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma--application after saffron tea consumption. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(3), 563-568.
22. Chung Hae Young, Bong Sook Baek, Sang Ho Song, Myoung Sook Kim, Jung Im Huh, Kyung Hee Shim, Kyu Won Kim and Kyung Hee Lee (1997). XANTHINE DEHYDROGENASE/XANTHINE OXIDASE AND OXIDATIVE STRESS. *Age*, Vol. 20, 127-140.
23. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (Jan 1998). "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers". *Journal of Natural Products*. 61 (1): 71–6.
24. P.B. Danielson (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3, 561-597.
25. Di Yuan Ming, Vivian Deh-Wei Chow, Li-Ping Yang and Shu-Feng Zhou (2009). Structure, Function, Regulation and Polymorphism of Human Cytochrome P450 2A6 *Current Drug Metabolism*, 10, 754-780 1389-2002/09.
26. Dovrtělová, G., Nosková, K., Juřica, J., Turjap, M., & Zendulka, O. (2015). Can bioactive compounds of *Crocus sativus* L. influence the metabolic activity of selected CYP enzymes in the rat? *Physiological Research*, 64 Suppl 4, S453-458.
27. Evans DAP (1989). N-acetyltransferase. *Pharmacology and Therapeutics*, 42: 157–234.
28. Joanna Fiedor and Květoslava Burda (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease Department of Medical Physics and Biophysics, Faculty of Physics and Applied Computer Science, *Nutrients*, 6, 466-488; doi:10.3390/nu6020466
29. Gonda, S., Parizsa, P., Surányi, G., Gyémánt, & G., Vasas, G. (2012). Quantification of main bioactive metabolites from saffron (*Crocus sativus*) stigmas by a micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 68-74.
30. Gu, L., Gonzales, F.J., Kalow, W., Tang, BK. (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 2, pp.73-77.

31. Nancy M. Kh. Hakooz (2009). Caffeine Metabolic Ratios for the In Vivo Evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, Xanthine Oxidase and CYP2A6 Enzymatic Activities. *Current Drug Metabolism*, 10, 329-338
32. Hassan, M.H., Bahashawan, S.A., Abdelghany, T.M., Abd-Allah, G.M., & Ghobara, M.M. (2015). Crocin Abrogates Carbon Tetrachloride-Induced Renal Toxicity in Rats via Modulation of Metabolizing Enzymes and Diminution of Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammatory Cytokines. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(7),330-339.
33. Hein, DW. (2000). N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 112-113, pp.349-356.
34. Hille R, Hall J, Basu P (April 2014). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes". *Chemical Reviews*. 114 (7): 3963–4038. doi:10.1021/cr400443z. PMC 4080432 Freely accessible. PMID 24467397.
35. Hosseinzadeh H, Younesi HM (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2:7.
36. Imadeldin Elfaki, Rashid Mir, Fahad M Almutairi, Faisal M Abu Duhier (August 2018). Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer,Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Article 3, Volume 19, Issue 8, Page 2057-2070.
37. Ingelman-Sundberg M, Sim SC (May 2010). Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396:90-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.162.
38. Jetter, A.; Kinzig-Schippers, M.; Illauer, M.; Hermann, R.; Erb, K.; Borlak, J.; Wolf, H.; Smith, G.; Cascorbi, I.; Sorgel, F.; Fuhr, U. Phenotyping of N-acetyltransferase type 2 by caffeine from uncontrolled dietary exposure. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 60, 17-21.
39. Kalow, W. and Tang, B-K. (1993). The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 53, pp.503-514.
40. Maryam Kamalipour and Shahin Akhondzadeh (2011). Cardiovascular Effects of Saffron: An Evidence-Based Review. *The Journal of Tehran University Heart Center*, 6(2): 59–61.
41. Kot, M. and Daniel, WA. (2008). The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), pp.543-551.

42. Kot M, Daniel WA. (Nov-Dec 2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacology Reports*, 60(6):789-97.
43. Koul, A., & Abraham, S.K. (Jan 2018). Efficacy of crocin and safranal as protective agents against genotoxic stress induced by gamma radiation, urethane and procarbazine in mice. *Human & Experimental Toxicology*, 37(1):13-20, doi: 10.1177/0960327116689715.
44. Krul C., Hageman, G. (1998). Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 709, 27-34.
45. Kyriakoudi, A., O'Callaghan, Y.C., Galvin, K., Tsimidou, M.Z., & O'Brien, N.M. (2015). Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocine (4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(39), 8662-8668.
46. Lelouet, H., Bechtel, YC., Paitaud, G., Brientini, MP., Miguet, JP., Bechtel, P.R. (2001). Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 39, pp.25-32.
47. Sheila Leone, Lucia Recinella, Annalisa Chiavaroli, Giustino Orlando, Claudio Ferrante, Lidia Leporini, Luigi Brunetti, Luigi Menghini (Aug 2018). Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L. (Saffron) and its potential applications: A brief overview. *Phytotherapy Research*, August 2018. DOI: 10.1002/ptr.6181
48. Liu, C.C., Huang, C.C., Lin, W.T., Hsieh, C.C., Huang, S.Y., Lin, S.J., & Yang, S.C. (2005). Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *British Journal of Nutrition*, 94(4), 595-601.
49. Louisa, M., Suyatna, F.D., Setiawati, A., & Jusman, S.W.A (2009). The effect of lycopene on the total cytochrome P450, CYP1A2 and CYP2E1. *Medical Journal of Indonesia*, 18(4), 233-238.
50. Maccarone R, Di Marco S, Bisti S. (Mar 2008). Saffron supplement maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina. *Invest Ophthalmology and Visual Science*, 49(3):1254-61.
51. Männistö S1, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, van den Brandt PA, Cerhan JR, Colditz G, Feskanich D, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Rohan TE, Virtamo J, Willett WC, Hunter DJ. (Jan 2004). Dietary carotenoids and

- risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 13(1):40-8.
52. Manoj S. Chiney, Sarah J. Schwarzenberg & L'Aurelle A (Jul 2011). Johnson Altered xanthine oxidase and N-acetyltransferase activity in obese children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(1):109-15. DOI:10.1111/j.1365-2125.2011.03959.
 53. Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 905215, 18 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/905215>
 54. Miners JO, Birkett DJ (1996). The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *General Pharmacology*, 27:245–249.
 55. M. Moshiri, M. Vahabzadeh, H. Hosseinzadeh (Jun 2015). Clinical Applications of Saffron (*Crocus sativus*) and its Constituents: A Review *Drug Research (Stuttgart)*, 65(6):287-95. doi: 10.1055/s-0034-1375681. Epub 2014 May 21.
 56. Muraoka S, Miura T (February 2004). "Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action". *Life Sciences*. 74 (13): 1691–700. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.040.
 57. Susan Nowell, Carol Sweeney, George Hammons, Fred F. Kadlubar, and Nicholas P. Lang (April 2002). CYP2A6 Activity Determined by Caffeine Phenotyping: Association with Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 11, 377–383,
 58. Oscarson, M. (2001). Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, pp.91-95.
 59. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C (March 2006). "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol". *Pharmacological Reviews*, 58 (1): 87–114. doi:10.1124/pr.58.1.6.
 60. Pan L, Yang X, Li S, Jia C (Apr 2015). Association of CYP2A6 gene polymorphisms with cigarette consumption: a meta-analysis. *Drug Alcohol Dependence*, 149:268-71. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.032.
 61. Olavi Pelkonena, Arja Rautio, Hannu Raunio, Markku Pasanenb (April 2000). CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, Volume 144, Issues 1–3, Pages 139-147

62. Olavi Pelkonen, Miia Turpeinen, Jukka Hakkola, Paavo Honkakoski, Janne Hukkanen, Hannu Raunio (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82:667–715. DOI 10.1007/s00204-008-0332-8.
63. Pontes ZB, Vincent-Viry M, Gueguen R, Galteau MM and Siest G (1993). Acetylation phenotypes and biological variation in a French Caucasian population. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31: 59– 68.
64. Hannu Raunio, Arja Rautio, Harriet Gullstén, and Olavi Pelkonen (Oct 2001). Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(4): 357–363. doi: 10.1046/j.0306-5251.2001.01500
65. Robottom-Ferreira, A.B., Aquino, S.R., Queiroga, R., Albano, R.M., & Ribeiro Pinto, L.F. (2003). Expression of CYP2A3 mRNA and its regulation by 3-methylcholanthrene, pyrazole, and beta-ionone in rat tissues. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(7), 839-844.
66. Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Dupret, JM. (2008). Effect of environmental substances on the activity of arylamine N-acetyltransferases. *Current Drug Metabolism*, 9(6), pp.505-9.
67. Rostami-Hodjegan, A., Nurminen, S., Jackson, PR., Tucker, GT. (1996). Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics*, 6, pp.121-149.
68. Jhon D. Ruiz, Carmen Martínez, Kristin Anderson, Myron Gross, Nicholas P. Lang, Elena García-Martín, and José A. G. Agúndez (2012). The Differential Effect of NAT2 Variant Alleles Permits Refinement in Phenotype Inference and Identifies a Very Slow Acetylation Genotype. *PLoS One*, 7(9): e 44629.
69. Saeed Samarghandian, Abasalt Borji (Apr-Jun 2014). Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Research*, 6(2): 99-107.
70. Sanderson S, Salanti G, Higgins J (2007). "Joint effects of the N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis". *American Journal of Epidemiology*, 166 (7): 741–51.
71. Sinués B1, Fanlo A, Bernal ML, Mayayo E, Soriano MA, Martínez-Ballarín E (Dec 2002). Influence of the urine flow rate on some caffeine metabolite ratios used to assess CYP1A2 activity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(6):715-21.
72. Jessie Szalay (Oct 2015). What Are Carotenoids?. Live Science Contributor. <https://www.livescience.com/52487-carotenoids.html>

73. Spector T (Jan 1988). "Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalyzed production of superoxide radical". *Biochemical Pharmacology*. 37 (2): 349–52. doi:10.1016/0006-2952(88)90739-3.
74. R. Srivastava, H. Ahmed, R. K. Dixit, Dharamveer, and S. A. Saraf. (Jul-Dec 2010). *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 200–208. doi: 10.4103/0973-7847.70919
75. Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J and Kalow W (1991). Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49: 648–657.
76. Julie-Anne Tanner and Rachel F. Tyndale (2017). Variation in CYP2A6 Activity and Personalized Medicine. *Journal of Personalized Medicine*, 7(4), 18. doi:10.3390/jpm7040018
77. Vatsis, K.P., Martell, K.J. and Weber, W.W (1991). Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 6333-6337.
78. Voutsinas, J., Wilkens, LR., Franke, A., Vogt, TM., Yokochi, LA., Decker, R., Le Marchand, L. (2013). Heterocyclic amine intake, smoking, cytochrome P450 1A2 and N-acetylation phenotypes, and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Gut*, 62(3), pp.416-422.
79. Wang, H., & Leung, L.K. (2010). The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition*, 26(11-12), 1181-1187.
80. Weisburger, J.H., Dolan, L., & Pittman, B. (1998). Inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein. *Mutation Research*, 416(1-2),125-128.
81. Woolridge H1, Williams J, Cronin A, Evans N, Steventon GB (2004). CYP1A2 in a smoking and a non-smoking population; correlation of urinary and salivary phenotypic ratios. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 20(4):247-61.
82. Yuan, JM., Chan, KK., Coetzee, GA., Castelao, JE., Watson, MA., Bell, DA., Wang, R., Yu, MC. (2008). Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis*, 29(7), pp.1386-1393.
83. Θανάσης Βαλαβανίδης και Κωνσταντίνος Ευσταθίου(Απρίλιος 2013). Η χημική ένωση του μήνα. http://195.134.76.37/chemicals/chem_lycopene.htm

84. Δημήτρης Γρηγοράκης. Η δράση των κροκινών, παραγώγων του *Crocus Sativus L.*, στην υγεία.
<https://www.elde.gr/drasi-krokinwn-paragwgn-crocus-sativus-ygeia/>
85. Μόσχος Γ. Πολυσίου. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΣΤΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΚΡΟΚΟΣ (*Crocus sativus L.*). <http://www.iama.gr/ethno/crocus/pls.html>