



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Εργαστήριο Φαρμακολογίας
Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης

Διδακτορική Διατριβή

*„Ανάλυση φυτικών προϊόντων με προηγμένες μεθόδους και
διερεύνηση της επίδρασής τους στην in vivo δραστικότητα του
μεταβολικού ενζύμου CYP1A2,,*

υπό

ΜΑΡΙΑΣ ΜΠΟΥΝΙΤΣΗ

Χημικού Μηχανικού, M.Sc.

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

© 2020 Μαρία Μπουνίτση

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)** Ευτυχία **Ασπροδίνη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Ανδρέας **Τσακάλωφ**
Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Όλγα **Γκορτζή**
Καθηγήτρια Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙ
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Νικόλαος **Πιτσικάς**
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**
Καθηγητής Υγιεινής & Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δημήτριος **Κουρέτας**
Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Φωτεινή **Λάμαρη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας-Φυσικών Προϊόντων,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την καθηγήτριά μου Έφη Ασπροδίνη,
τον Ηλία, την Όλγα,
τα αδέρφια μου.

„Ανάλυση φυτικών προϊόντων με προηγμένες μεθόδους και διερεύνηση της επίδρασής τους στην in vivo δραστικότητα του μεταβολικού ενζύμου CYP1A2,,

ΜΑΡΙΑ ΜΠΟΥΝΙΤΣΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – (Επιβλέπουσα)
2. **Ανδρέας Τσακάλωφ**, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Όλγα Γκορτζή**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙ Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του φυτικού προϊόντος «Κρόκος Κοζάνης» στην *in vivo* δραστικότητα ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών στον άνθρωπο, με την χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου-δείκτη, με τους εξής επιμέρους στόχους: i) ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης (Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography, RP-HPLC) για τον προσδιορισμό της *in vivo* δραστικότητας του CYP1A2 στο σιέλο και ii) διερεύνηση της επίδρασης του κρόκου στην *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, X0 και NAT2 σε δείγματα ούρων και σιέλου. Λόγω της γνωστής σύστασης του προϊόντος, δεν έγινε ανάλυσή του με προηγμένες μεθόδους.

Για την υλοποίηση του πρώτου στόχου, απομονώθηκε η καφεΐνη και η παραξανθίνη σε δείγματα σιέλου με εκχύλιση υγρού-υγρού με την χρήση διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης 85/15 v/v. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία και ανιχνεύθηκαν στα 273 nm. Οι χρόνοι έκλουσης της καφεΐνης και της παραξανθίνης ήταν <13 λεπτά χωρίς παρεμβολές από άλλους μεταβολίτες της καφεΐνης. Η απόκριση της ανίχνευσης ήταν γραμμική (0,10–8,00μg/ml, $R^2 > 0.99$), η ανάκτηση ήταν >93% και το bias <4.47%. Η ακρίβεια εντός σειράς και μεταξύ σειρών <5,14% (n=6). Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0,10μg/ml και το όριο ανίχνευσης ήταν 0,018±0,002μg/mL για την παραξανθίνη και 0,032±0,002μg/ml για την καφεΐνη. Ο λόγος παραξανθίνης/καφεΐνης σε δείγμα 34 υγιών εθελοντών ήταν στατιστικά υψηλότερος σε καπνιστές (p<0,001). Επίσης, βρέθηκε υψηλή συσχέτιση του λόγου παραξανθίνης/καφεΐνης μεταξύ δειγμάτων σιέλου και δειγμάτων ούρων (r=0,85, p<0,001). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του ενζύμου CYP1A2 σε δείγματα σιέλου.

Για την υλοποίηση του δεύτερου στόχου ελήφθησαν δείγματα σιέλου και ούρων από 34 μη-καπνιστές εθελοντές (20 γυναίκες και 14 άνδρες) οι οποίοι κατανάλωσαν εκχύλισμα κρόκου Κοζάνης για 6 ημέρες υπό περιορισμένη διαίτα (κατά την διάρκεια της οποίας είχαν αποκλεισθεί τροφές που επηρεάζουν τα υπό μελέτη ένζυμα καθώς και τροφές που περιέχουν καροτενοειδή). Ο φαινότυπος των ενζύμων προσδιορίστηκε σε δείγματα σιέλου και ούρων με την χρήση των παρακάτω μεταβολικών λόγων: CYP1A2: 17X/137X (σιέλος) και CYP1A2: (AFMU+1U+1X)/17U, CYP2A6: 17U/(17U + 17X), X0: 1U/(1U+1X) και NAT2: AFMU/(AFMU+1U+1X) (ούρα). Μετά την κατανάλωση κρόκου, ο μεταβολικός λόγος για το CYP1A2 μειώθηκε κατά ~13,7% στα δείγματα σιέλου (προ-:

0,51 ± 0,22, μετά:- 0,44 ± 0,14; p=0,002) και ~6.0% στα δείγματα ούρων (προ:- 3,81 ± 1,20, μετά:- 3,58 ± 0,92, p=0,054). Ο μεταβολικός λόγος για το ένζυμο CYP1A2 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά μόνο στο δείγμα των ανδρών (σίελος, προ:- 0,65 ± 0,22, μετά: 0,51 ± 0,16, p=0,0001 και ούρα προ:- 4,53 ± 1,19, μετά:- 4,03 ± 0,87, p=0,017) υποδηλώνοντας σεξουαλικό διμορφισμό στην αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2.

Δεν υπήρξε επίδραση της κατανάλωσης κρόκου στους μεταβολικούς λόγους των ενζύμων CYP2A6, XO ή NAT2.

Συμπεραίνεται ότι η βραχύχρονη κατανάλωση κρόκου Κοζάνης δεν αλληλεπιδρά με συγχορηγούμενα φάρμακα που μεταβολίζονται από τα ένζυμα που μελετήθηκαν, με εξαίρεση την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ κρόκου και υποστρωμάτων του ενζύμου CYP1A2 στον ανδρικό πληθυσμό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 11 |
| 1.1 ΚΡΟΚΟΣ Ο ΗΜΕΡΟΣ, <i>Crocus sativus</i> L..... | 11 |
| <i>Ιστορικά στοιχεία του κρόκου</i> | 11 |
| <i>Βοτανικά στοιχεία του κρόκου</i> | 15 |
| <i>Γεωγραφική κατανομή και καλλιέργεια του κρόκου</i> | 16 |
| <i>Χημική σύσταση του κρόκου</i> | 19 |
| <i>Φαρμακοκινητική του κρόκου και των συστατικών του</i> | 25 |
| <i>Δράσεις του κρόκου</i> | 27 |
| 1.2 ΕΝΖΥΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ..... | 39 |
| <i>Το κυτόχρωμα P450</i> | 42 |
| <i>Το κυτόχρωμα P4501A2 (cytochrome P1A2, CYP1A2)</i> | 45 |
| <i>Το κυτόχρωμα P4502A6 (cytochrome P 2A6, CYP2A6)</i> | 49 |
| <i>Η οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO)</i> | 50 |
| <i>Η N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (N-acetyltransferase-2, NAT2)</i> | 51 |
| 1.3 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ IN VIVO ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ | 54 |
| <i>Καφεΐνη</i> | 55 |
| <i>Ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης σε βιολογικά υγρά με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)</i> | 58 |
| <i>Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2</i> | 60 |
| <i>Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6</i> | 65 |
| <i>Εκτίμηση της δραστηριότητας της Οξειδάσης της Ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO)</i> | 66 |
| <i>Εκτίμηση της δραστηριότητας της N-ακετυλοτρανσφεράσης (N- acetyltransferase 2, NAT2)</i> | 67 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ..... | 69 |
| 1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 71 |
| 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 72 |
| 2.1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ανάπτυξη και πιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου του ενζύμου CYP1A2 στο σίελο..... | 72 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 72 |
| - Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια..... | 72 |
| - Χρωματογραφικός εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες | 72 |
| - Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων | 73 |
| - Προκατεργασία των δειγμάτων | 74 |
| - Πιστοποίηση της μεθόδου..... | 75 |
| - Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε υγιείς εθελοντές..... | 76 |
| - Στατιστική ανάλυση | 78 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 80 |
| 2.2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Διερεύνηση της επίδρασης του <i>C. Sativus</i> L. στη δραστηριότητα ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών σε υγιείς εθελοντές..... | 90 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 90 |
| - Εθελοντές..... | 90 |
| - Σχεδιασμός της μελέτης | 90 |
| - Παρασκευή του ροφήματος του κρόκου | 96 |
| - Χημικά και αντιδραστήρια..... | 96 |
| - Ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στα ούρα και στον σίελο..... | 96 |
| - Στατιστική ανάλυση | 103 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 104 |
| 2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 113 |
| <i>Ανάπτυξη και πιστοποίηση μεθόδου για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2 στο σίελο</i> | 113 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Επίδραση του κρόκου στην λειτουργικότητα ενζύμων του μεταβολισμού ξενοβιοτικών.....</i> | 117 |
| 2.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 125 |

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΚΡΟΚΟΣ Ο ΗΜΕΡΟΣ, *Crocus sativus* L.

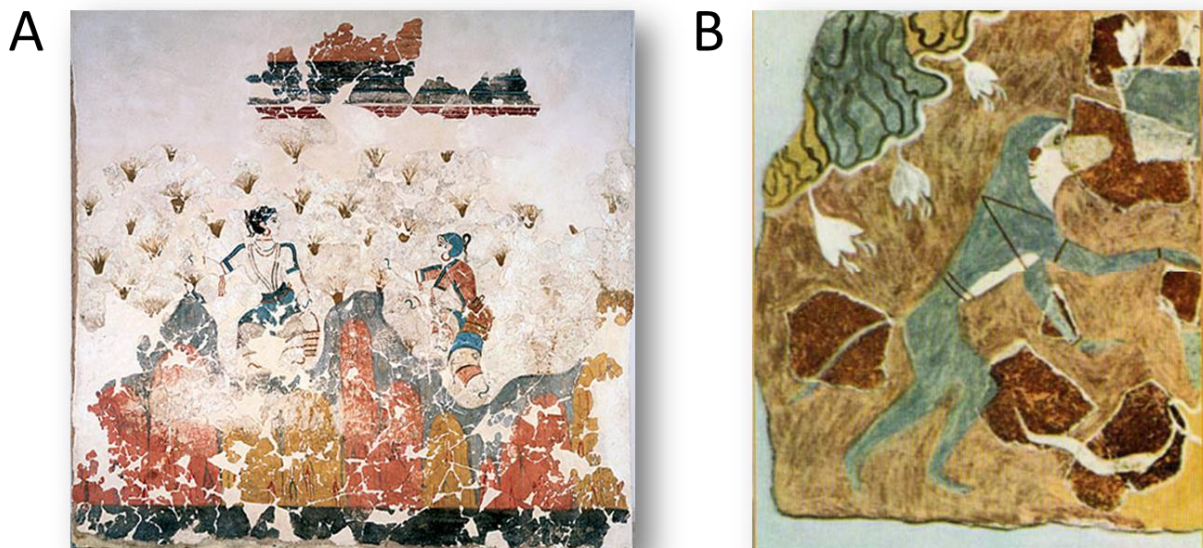
Ο κρόκος, *Crocus sativus* L., είναι καλλιεργούμενο στείρο πολυετές φυτό του οποίου τα στίγματα χρησιμοποιούνται, λόγω του χαρακτηριστικού τους χρώματος, γεύσης και αρώματος, ως καρίκευμα στην μεσογειακή, ινδική και κινέζικη μαγειρική και ως βαφική ύλη από την αρχαιότητα, αλλά και ως θεραπευτικό μέσον λόγω των πολλών δράσεών του στον ανθρώπινο οργανισμό.

Ιστορικά στοιχεία του κρόκου

Το φυτό είναι γνωστό και ως “saffron” ονομασία που προέρχεται από την αραβική λέξη “zafaran” που σημαίνει κίτρινο, ενώ η ονομασία “Crocus” αποδίδεται στην ελληνική λέξη “κρόκη” η οποία ετυμολογικά σημαίνει “νήμα” που χρησιμοποιείται για την ύφανση σε αργαλειό. Σύμφωνα με την Ελληνική Μυθολογία, ο Κρόκος ήταν ένας όμορφος νέος που ερωτεύθηκε την νύμφη Σμίλακα μέχρι που η Ήρα μετέτρεψε, από τη ζήλεια της, τον Κρόκο και την Σμίλακα στο ομώνυμο άνθος και αναριχητικό φυτό, αντίστοιχα. Αναφέρεται επίσης ότι το φυτό πήρε το όνομά του από τον νεαρό Κρόκο, φίλο του θεού Ερμή, ο οποίος κατά τη διάρκεια παιχνιδιού δισκοβολίας χτύπησε στο κεφάλι και σκοτώθηκε ενώ σταγόνες αίμα από το κεφάλι του έπεσαν επάνω στο φυτό που πήρε το όνομά του.

Η προέλευση του κλώνου *Crocus sativus* L. που απαντάται σήμερα δεν είναι επακριβώς γνωστή. Η καλλιέργεια του κρόκου χρονολογείται από το 1600 π.Χ. καθώς εμφανίζεται συγκομιδή από «κροκοσυλλέκτριες» ενός είδους κρόκου με ιδιαίτερως μακριά κόκκινα στίγματα να εξέχουν του άνθους του σε μινωϊκές τοιχογραφίες και αγγεία της Κνωσού στην Κρήτη (**Εικόνα 1Α**). Η απεικόνιση των κρόκων είναι άφθονη αφού εμφανίζονται ακόμα και στον αέρα, ενώ η σχεδίαση των στιγμάτων του άνθους είναι καταφανής λόγω της σημασίας τους. Οι τοιχογραφίες αυτές με την τελετουργική συλλογή του κρόκου καταδεικνύουν την ξεχωριστή θέση που είχε ο κρόκος την εποχή εκείνη ως βαφικό και φαρμακευτικό υλικό. Κανένα άλλο είδους κρόκου δεν εμφανίζει σε τόσο έντονο βαθμό τη χαρακτηριστική μορφολογία των στιγμάτων που εξέχουν του άνθους πέρα από τον *Crocus sativus* αν και σε ορισμένες μορφές του *Crocus cartwrightianus* τα στίγματα παρουσιάζονται να εξέχουν του περιάνθου. Βεβαίως, είναι αδύνατον να αποφανθεί κανείς αν οι Μίνωες καλλιεργούσαν τον ίδιο κλώνο *Crocus*

sativus που υπάρχει σήμερα, ή ένα είδος *Crocus cartwrightianus* το οποίο απαντάται αυτοφυώς στην Κρήτη και χαρακτηρίζεται από λευκά άνθη όπως φαίνεται και στην τοιχογραφία του κροκοσυλλέκτη πιθήκου (**Εικόνα 1B.**). Σε κάθε περίπτωση, οι Μίνωες φαίνεται να καλλιεργούσαν ένα είδος κρόκου με εξαιρετικά μεγάλα στίγματα και επομένως πολύ μεγαλύτερη απόδοση σε προϊόν σχετικά με το τοπικό αυτοφυές είδος *Crocus cartwrightianus*. Η πλέον πιθανή θεωρία για την προέλευση του κρόκου του ήμερου, *Crocus sativus*, που καλλιεργείται σήμερα είναι ότι το είδος επιλέχθηκε για καλλιέργεια λόγω των μεγάλων στιγμάτων του. Διάφορα δείγματα κρόκου προερχόμενα από γεωγραφικές περιοχές που εκτείνονται από το Κασμίρ, το Ιράν, την Τουρκία μέχρι και τη Γαλλία εμφανίζουν τέτοια ομοιομορφία στα κυτταρολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά τους ώστε να δίνεται η εντύπωση ότι έχουν κοινή πηγή προέλευσης (Mathew, 1977).



Εικόνα 1. Μέρος τοιχογραφίας (A) Μινωϊκής Εποχής κροκοσυλλεκτριών από το Ακρωτήρι, 16ος αιώνας π.Χ. (Αρχαιολογικό Μουσείο Θήρας) και (B) κροκοσυλλέκτη γαλάζιου πιθήκου, 2^η χιλιετία (Αρχαιολογικό Μουσείο Ηρακλείου).

Θεωρείται ότι το είδος *Crocus cartwrightianus* αποτελεί τον πρόγονο του τριπλοειδούς ήμερου *Crocus sativus* που καλλιεργείται ευρέως σήμερα (CAIOLA and FAORO, 2011). Το όνομα του είδους *Crocus cartwrightianus* δόθηκε από τον κληρικό βοτανολόγο William Herbert (1778-1847) προς τιμήν του φίλου του John Cartwright (1740-1824), πρόξενου της Βρετανίας στην Κωνσταντινούπολη, που του είχε προμηθεύσει αυτό το είδος κρόκου με τα χαρακτηριστικά λευκά άνθη (A history of the

species of Crocus, by Hon. William Herbert, 1847) (HERBERT (Hon.), 1847). Είναι πιθανό ότι ο *Crocus cartwrightianus* πρωτοεμφανίσθηκε στην Κρήτη, καθώς καμμία, μέχρι σήμερα, βοτανική έρευνα δεν υποστηρίζει την φημολογούμενη θεωρία ότι το είδος αυτό προέρχεται από την Κεντρική ή Δυτική Ασία.

Αναφορές στον κρόκο απαντώνται από πολύ παλιά στην Ελλάδα, όπως προκύπτει από διάφορα αρχαία κείμενα. Ο Όμηρος (800-701 π.Χ.) αναφέρει τον κρόκο στην Ιλιάδα:

[...ἢ ῥα καὶ ἀγκὰς ἔμαρπτε Κρόνου παῖς ἦν παράκοιτιν: τοῖσι δ' ὑπὸ χθῶν δῖα φύεν νεοθηλέα ποίην, λωτόν θ' ἔρσήεντα ἰδὲ **κρόκον** ἢ δ' ὑάκινθον πυκνὸν καὶ μαλακόν, ὃς ἀπὸ χθονὸς ὑψὸς ἔεργε...]

[...με αυτό ο γιος του Κρόνου έσφιξε την γυναίκα του στην αγκαλιά του. Κάτω δε από αυτούς βλάστησε η γη ένα μαξιλάρι από φρέσκο χορτάρι, με δροσοσταγή λωτό **κρόκο** και υάκινθο πυκνό και μαλακό, το οποίο τους ανύψωσε από το έδαφος...]

Όμηρος: Ιλιάδα, 14, 296

Επίσης, χρήση του κρόκου ως χρωστικό μέσον αναφέρεται επανειλημμένα σε έργα συγγραφέων της αρχαίας Ελλάδας. Ο Αισχύλος (523-456 π.Χ.) αναφέρει ότι η Ιφιγένεια προσήλθε στη θυσία της με κροκοβαμμένο ύφασμα:

[...**κρόκου βαφᾶς** δ' εἰς πέδον χέουσα ἔβαλλ' ἕκαστον θυτήρων ἀπ' ὄμματος βέλει φιλοίκτω, πρέπουσα τῶς ἓν γραφαῖς, προσεννέπειν...]

[... κι ενώ έπεφτε στη γη ο **κροκωτός χιτώνας** της, σαΐτευε με ικετευτική [240] ματιά καθέν' απ' τους θυσιαστάς της κι έμοιαζε σαν ζωγραφιά, που θέλει να μιλήσει...]

Αισχύλος: Αγαμέμνων, 240-241

ενώ στην ομώνυμη κωμωδία του Αριστοφάνη (445-386 π.Χ.), η Λυσιστράτη παροτρύνει την Κλεονίκη να φτιάξει κροκωτό αραχνοϋφαντο φόρεμα, ώστε οι άνδρες από θαυμασμό να μην μπορούν ούτε το δόρυ να σηκώσουν:

[...κᾶτ' ἔχουσα τὸν **κροκωτὸν** ἄρκτος ἦ Βραυρωνίοις· κάκανη φόρουν ποτ' οὔσα παῖς καλὴ ἄχου· ἰσχάδων ὀρμαθόν...]

[...Το χορό κατόπι της αρκούδας στα Βραυρώνεια χόρεψα, ντυμένη **κροκωτά**. Και κοπελούδα κανηφόρησα με τσαπέλα σύκα στο λαιμό. ...]

Αριστοφάνης: Λυσιστράτη, 641-647

Η κύρια χρήση του κρόκου, ωστόσο, δεν ήταν η βαφική, η αρωματική, ή η αρτυματική αλλά η ιατρική. Ο πατέρας της ιατρικής Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.) περιλαμβάνει στην "Ιπποκρατική συλλογή" του την φυτική δρόγη του κρόκου αν και τα ιπποκρατικά φάρμακα συχνά παρουσιάζουν ασάφεια καθώς δεν υπάρχει η βοτανική περιγραφή τους από τον Ιπποκράτη. Ουσιαστικά η τεκμηριωμένη μορφολογική περιγραφή των φυτών γίνεται με το Θεόφραστο και το Διοσκουρίδη. Πράγματι, ο πατέρας της βοτανικής Θεόφραστος (371-287 π.Χ.) στο VI και VII βιβλίο του «Περὶ φυτῶν ἱστορία» (**Εικόνα 2**, Theophrastus, Enquiry into plants, Sir Arthur Hort's edition,

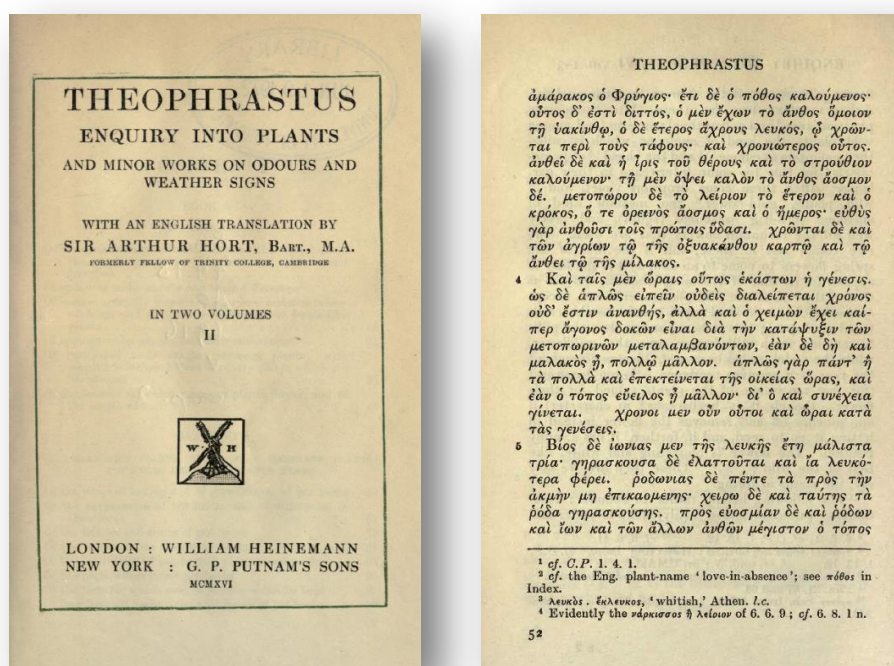
1916) (Theophrastus, 1916) περιγράφει μεταξύ άλλων την ποώδη φύση και την όψιμη βλάστηση με την παρατήρηση ότι το άνθος κρατάει μόνο λίγες ημέρες. Αναφέρεται, επίσης, στις αρωματικές ιδιότητες του φυτού:

[...Οἷς μὲν οὖν εἰς τὰ ἀρώματα χρῶνται σχεδὸν τάδε ἐστί· κασία, κινάμωμον, καρδάμωμον, νάρδος, ναῖρον, βάλσαμον, ἀσπάλαθος, στύραξ, ἴρις, νάρτη, κόστος, πάνακες, κρόκος, σμύρνα, κύπεριον, σχοῖνος, κάλαμος, ἀμάρακον, λωτὸς, ἄννητος...]

[...Αυτά σχεδόν τα αρώματα που χρησιμοποιούνται λοιπόν είναι: η κασία, η κανέλλα, το κάρδαμο...ο κρόκος, το μύρον...]

Θεόφραστος: Περὶ φυτῶν ἱστορία, 9,7,3

Ο ιατρός, βοτανολόγος και φαρμακολόγος Διοσκουρίδης (40-90 μ.Χ.) στο έργο του “Περὶ ὕλης ἰατρικῆς” και αργότερα ο Γαληνός (129-199 μ. Χ.) στο βιβλίο του “Περὶ κράσεως καὶ δυνάμεως τῶν ἀπλῶν φαρμάκων” αναφέρουν τον κρόκο ως φαρμακευτικό φυτό, τον χρησιμοποιούν ως βασικό συστατικό σε διάφορα ιατρικά σκευάσματα και τον συνιστούν ως παυσίπονο, αντιφλεγμονώδες, αντιπυρετικό, επουλωτικό, υπνωτικό και αφροδισιακό.



Εικόνα 2. Εξώφυλλο και κείμενο με αναφορά στον κρόκο του βιβλίου του Θεόφραστου «Περὶ φυτῶν ἱστορία», μετάφραση: Sir Arthur Hort, 1916 (University of Toronto Library).

Βοτανικά στοιχεία του κρόκου

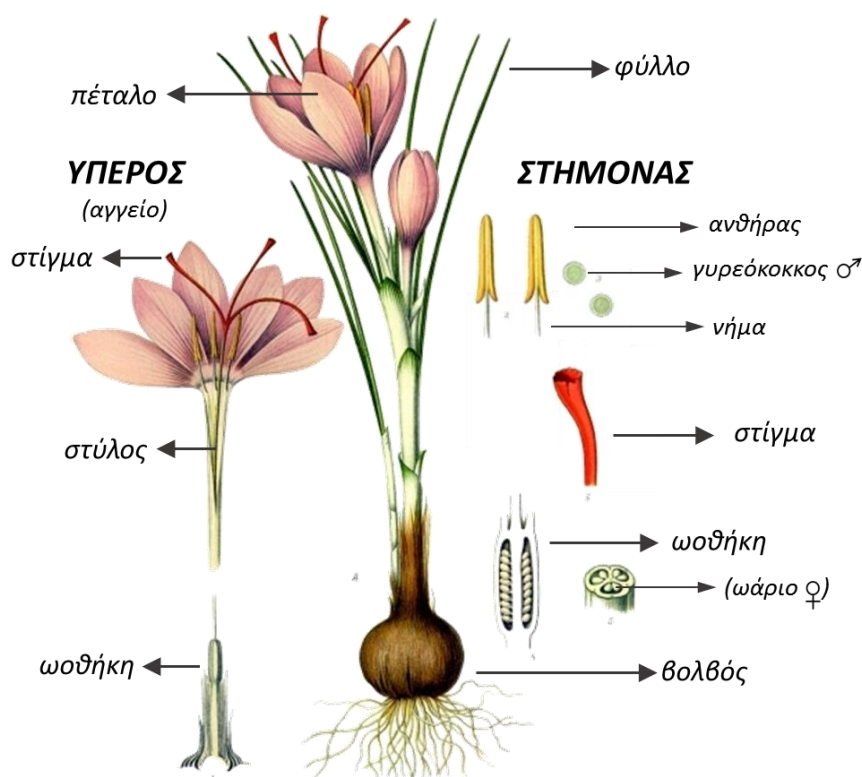
Η ύπαρξη πολλών ειδών κρόκου (~1500) καθιστά την συστηματική ταξινόμησή τους δυσχερή. Τα είδη αυτά έχουν πολύπλοκα φυσιολογικά χαρακτηριστικά και για τον λόγο αυτό αντιμετωπίζονται ως σειρά ειδών παρά ως ένα είδος (Saxena, 2010). Τα φυσιολογικά αυτά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με κυτταρολογικά και μορφολογικά στοιχεία του βολβού, των φύλλων και του άνθους βοηθούν στην συστηματική ταξινόμηση των υπο-ειδών του κρόκου. Ο κρόκος ο ήμερος φέρει την επιστημονική ονομασία *Crocus sativus* L., ή *Crocus sativus* Linnaeus σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα του Carl Linnaeus (1707-1778), και ανήκει στην οικογένεια των ιριδοειδών (Iridaceae). Η συστηματική ταξινόμηση του φυτού παρουσιάζεται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση του κρόκου του ήμερου.

| Συστηματική ταξινόμηση του κρόκου | |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| Βασίλειο: | Φυτά (<i>Plantae</i>) |
| Συνομοταξία: | Σπερματόφυτα (<i>Spermatophyta</i>) |
| Ομοταξία: | Αγγειόσπερμα (<i>Magnoliophyta</i>) |
| Τάξη: | Μονοκοτυλήδονα (<i>Monocotyledonae</i>) |
| Οικογένεια: | Ιριδοειδή (<i>Iridaceae</i>) |
| Γένος: | Κρόκος (<i>Crocus</i> L.) |
| Είδος: | Κρόκος ο ήμερος (<i>Crocus sativus</i>) |

Πρόκειται για πολυετή πόα με σφαιρικό βολβό διαμέτρου 2-4 cm ελαφρά πεπλατυσμένο στη βάση του καλυμμένο με ινώδη δικτυωτό χιτώνα που καλύπτει τον βολβό μέχρι και 5cm από τη βάση του. Ο βλαστός του είναι κοντός και λεπτός. Τα φύλλα του είναι πράσινα, 5-11 ανά βολβό, στενόμακρα, σχεδόν νηματοειδή, μήκους 30-40 cm. Τα άνθη είναι 1-3 ανά βολβό, εμφανίζονται από Σεπτέμβριο έως τον Δεκέμβριο, είναι μονήρη, ακτινόμορφα και μεγάλα αποτελούμενα από 6 πορφυροϊώδη ή λευκοϊώδη πέταλα. Τα περίφυλλα είναι άνισα λευκού χρώματος, μεμβρανώδη, με κωνικό άκρο μαλακής υφής. Στο κέντρο του άνθους υπάρχουν 3 στήμονες με νήμα μήκους 7-10mm που καταλήγουν σε κίτρινους ανθήρες μήκους 15-20mm. Ο στύλος έχει μήκος 9-10cm, αποτελεί συνέχεια της υπόγειας ωοθήκης και χωρίζεται σε 3 κατακόκκινα στίγματα μήκους 25-32mm έκαστο τα οποία εξέχουν κατά πολύ του άνθους (**Εικόνα 3**) (Mathew,

1977; Saxena, 2010). Τα αποξηραμένα κόκκινα στίγματα αποτελούν το μεγάλης αρτυματικής αξίας προϊόν (Saffron σε νήματα), για το οποίο γίνεται και η καλλιέργεια του κρόκου.



Εικόνα 3. Δομή και μορφολογία του κρόκου (Τροποποιημένη από: Köhler's Medizinal-Pflanzen, 1887).

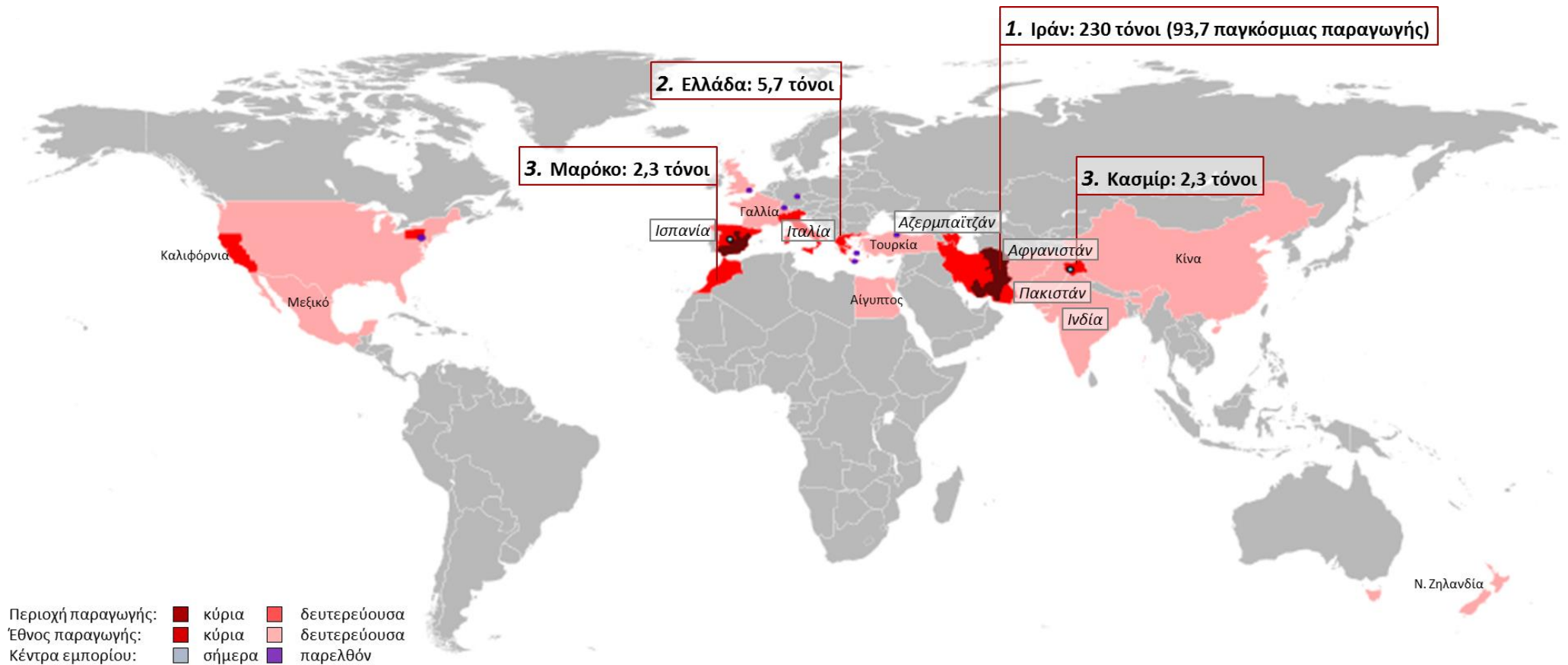
Από κυτταρολογικές μελέτες προκύπτει ότι ο κρόκος αποτελεί τριπλοειδές είδος του οποίου το γονιδίωμα παρουσιάζει $3n=24$, $x=8$ χρωμοσώματα. Η τριπλοειδία αυτή επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του φυτού, αλλά η μείωση και η ανάπτυξη των γαμετών σε τριπλοειδή φυτά δεν είναι συχνή λόγω των πολλών ανωμαλιών στην σπορογένεση και στην ανάπτυξη των γαμετοφύτων και την αδυναμία να δημιουργηθούν ζεύγη χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση (Mathew, 1977; Saxena, 2010).

Γεωγραφική κατανομή και καλλιέργεια του κρόκου

Το γένος *Crocus* (οικογένεια Iridaceae) αποτελείται από 85-100 περίπου είδη τα οποία εκφύονται σε περιοχές κυρίως γύρω από την Μεσόγειο, την Ευρώπη και τη Δυτική Ασία. Η γεωγραφική κατανομή της καλλιέργειας του φυτού συνίσταται σε χώρες της Μεσογείου όπως είναι η Ελλάδα, η Ιταλία, η Ισπανία αλλά και χώρες της Ασίας όπως το Ιράν, η Τουρκία, η Ινδία, η Κίνα (**Εικόνα 4**). Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από

ήπιους έως κρύους χειμώνες, με αρκετές βροχές κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, του χειμώνα και της άνοιξης, αυξημένη θερμοκρασία και περιορισμένες βροχές κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Ο κρόκος είναι καλά προσαρμοσμένος σε τέτοιες καιρικές συνθήκες και το φυτό αναπτύσσεται από το φθινόπωρο έως το τέλος της άνοιξης, με μικρές απαιτήσεις σε νερό, επιβιώνοντας της καλοκαιρινής ξηρασίας λόγω του υπόγειου συμπαγούς βολβού του. Η μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο αφορά στο Ιράν το οποίο είναι υπεύθυνο για το 90% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής. Στην περιοχή αυτή οι κλιματολογικές συνθήκες, κρύος χειμώνας και ζεστό καλοκαίρι, βοηθούν την καλλιέργειά του η οποία γίνεται χωρίς λιπάσματα και εντομοκτόνα. Δεύτερη στην παραγωγή κρόκου παγκοσμίως είναι η Ελλάδα με το Κασμίρ και το Μαρόκο να ακολουθούν (**Εικόνα 4**; Trade and use of saffron, <https://en.wikipedia.org/wiki/>).

Τα μοναδικά χαρακτηριστικά του φυτού όπως είναι το χρώμα, η γεύση και το άρωμά του αλλά και οι θεραπευτικές του ιδιότητες θέτουν τον κρόκο σε εξαιρετική θέση στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και ίσως, μελλοντικά, και υφαντουργίας. Περίπου 80 κιλά άνθη, δηλαδή 100.000-200.000 άνθη, τα οποία αντιστοιχούν σε 900.000 περίπου αποξηραμένα στίγματα, απαιτούνται για να αποδώσουν 1 κιλό καθαρού αποξηραμένου προϊόντος. Η απόδοση αυτή δεν είναι η ίδια σε όλες τις περιοχές καθώς εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας, συγκομιδής, αποξήρανσης και αποθήκευσης. Σε κάθε περίπτωση, η συγκομιδή και η επεξεργασία του κρόκου γίνεται χειρωνακτικά και διαρκεί μόλις 2-3 εβδομάδες. Οι συνθήκες καλλιέργειας, συγκομιδής και επεξεργασίας σε συνδυασμό με τη μικρή απόδοση του προϊόντος έχουν σαν αποτέλεσμα την ολοένα μειούμενη παραγωγή και τη συνεπακόλουθη αύξηση του κόστους του τελικού προϊόντος, με αποτέλεσμα ο κρόκος να αποκτήσει τον τίτλο του «κόκκινου χρυσού». Παράλληλα, η προώθηση νέων προϊόντων διατροφής στην αγορά έχουν οδηγήσει σε αύξηση της ζήτησης του κρόκου και συχνά στη νοθεία του προϊόντος με φυσικές ή τεχνητές πρόσθετες ύλες, όπως πάπρικα ή κουρκουμά. Για το λόγο αυτό, η αυθεντικότητα και η ποιότητα του κρόκου πιστοποιείται στην διεθνή αγορά σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Πιστοποίησης (ISO, 3632-1/2, Geneva, 2003).



Εικόνα 4. Γεωγραφική κατανομή καλλιέργειας και εμπορίας του κρόκου (Τροποποιημένη από: Trade and use of saffron, <https://en.wikipedia.org/wiki/>).

Χημική σύσταση του κρόκου

Το αποξηραμένο εμπορικό προϊόν του κρόκου αφορά στα κόκκινα στίγματα και τους κίτρινους στήμονες. Χημική ανάλυση του φυτού έδειξε ότι ο κρόκος αποτελείται από 10% νερό, 12% πρωτεΐνη, 5% λίπος, 5% άλατα κυρίως ασβέστιο, φώσφορο, κάλιο, νάτριο ψευδάργυρο και μαγνήσιο σε μικρές ποσότητες, 5% ίνες, και 63% σάκχαρα όπως άμυλο, πεντόζες, κόμμεα, πηκτίνη και δεξτρίνες (%w/w) (Melnyk *et al.*, 2010; Christodoulou *et al.*, 2015; Shahi *et al.*, 2016). Το ποσοστό περιεκτικότητας των χημικών αυτών συστατικών εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας του φυτού και την περιοχή προέλευσής του.

Χημική ανάλυση των στιγμάτων ανέδειξε την παρουσία 150 και πλέον πτητικών και μη πτητικών συστατικών στα οποία συμπεριλαμβάνονται λιπόφιλοι και υδρόφιλοι υδρογονάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, άλατα, άμυλο, κόμμεα και δύο βιταμίνες τη ριβοφλαβίνη και τη θειαμίνη. Η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2) βρίσκεται σε συγκέντρωση 56-138 µg/g και είναι η μεγαλύτερη συγκέντρωση που μπορεί να βρεθεί σε τροφή, αν και η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ μικρή σε σχέση με την ποσότητα κρόκου που πρέπει να καταναλωθεί. Η συγκέντρωση της θειαμίνης (βιταμίνη B1) είναι 0,7-4,0 µg/g και αποτελεί τη μέση συγκέντρωση που βρίσκεται στις τροφές. Στον κρόκο ανευρίσκονται, επίσης, τόσο υδατοδιαλυτά όσο και λιποδιαλυτά καροτενοειδή. Υδατοδιαλυτά καροτενοειδή είναι οι κροκίνες (γλυκοζιωμένα παράγωγα της κροκετίνης) και λιποδιαλυτά είναι το λυκοπένιο, το α- και β-καροτένιο και η ζεαξανθίνη τα οποία βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στον κρόκο (**Εικόνα 5**) (Melnyk *et al.*, 2010).

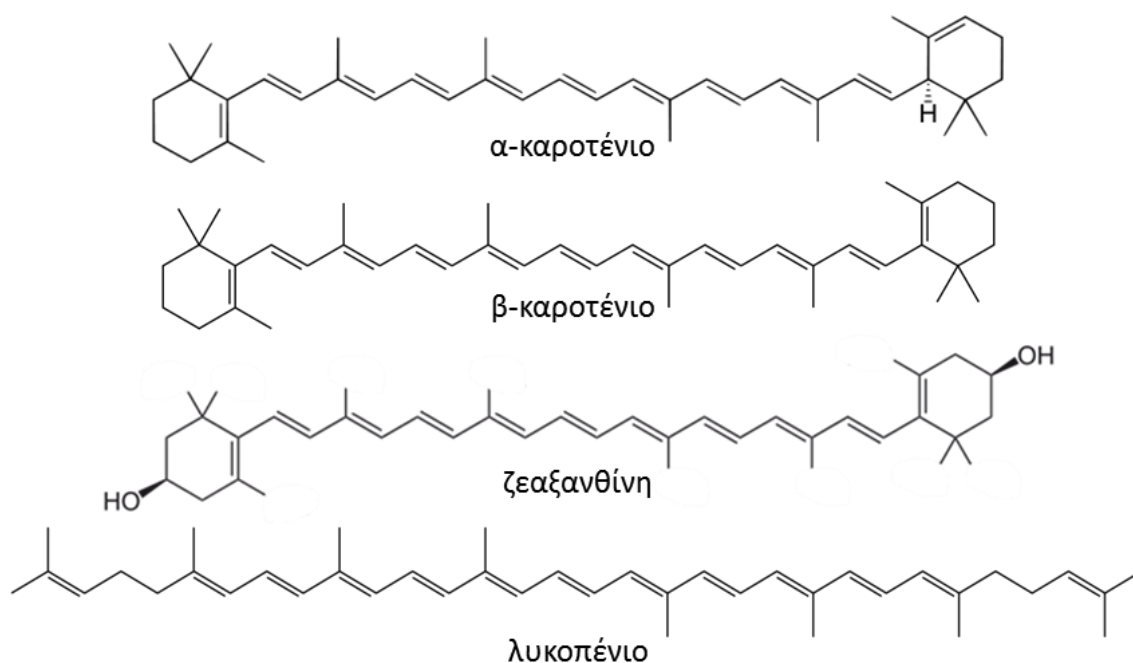
Τα κύρια συστατικά του κρόκου τα οποία προσδιορίζουν τα χαρακτηριστικά και την ποιότητα του προϊόντος είναι: α) οι κροκίνες, καροτενοειδή που προσδίδουν το χρώμα στον κρόκο (γλυκοζυλιωμένες υδατοδιαλυτές ενώσεις), β) η πικροκροκίνη, που προσδίδει στον κρόκο την χαρακτηριστική πικρή γεύση και γ) η σαφρανάλη, πτητικό έλαιο τερπένιο που προσδίδει στον κρόκο το χαρακτηριστικό του άρωμα. Στον κρόκο ανευρίσκονται επίσης και τα φλαβονοειδή κερσετίνη και καμφερόλη (Christodoulou *et al.*, 2015; Shahi *et al.*, 2016). Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται η δομή των κυριότερων συστατικών του κρόκου.

α) κροκίνη και κροκετίνη

Η κροκίνη είναι το πλέον σημαντικό καροτενοειδές που δίνει στον κρόκο το χαρακτηριστικό του χρώμα. Η αραβική ονομασία του κρόκου, σαφράν, προέρχεται από

το λέξη κίτρινο και υποδηλώνει τη μεγάλη συγκέντρωση καροτενοειδών χρωστικών στα στίγματα των ανθέων για τα οποία γίνεται και η εμπορία του κρόκου.

Η α -κροκίνη, διγεντιοβιοζυλ-εστέρας του δικαρβολικού οξέος κροκετίνης, είναι η πλέον άφθονη κροκίνη στον κρόκο με μεγάλη υδατοδιαλυτότητα η οποία οφείλεται στα σάκχαρα του μορίου της και έχει σημείο τήξης 186°C. Έχει βαθύ κόκκινο χρώμα, διαλύεται ευχερώς στο νερό και σχηματίζει διάλυμα χρώματος πορτοκαλί (Tarantilis *et al.*, 1995) και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική στα τρόφιμα. Οι υδρόφιλες κροκίνες συνιστούν το 6-16% του αποξηραμένου προϊόντος ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και επεξεργασίας του φυτού. Πέραν των χρωστικών ιδιοτήτων της, η κροκίνη δρα προστατευτικά σε κύτταρα και ιστούς ως αντιοξειδωτικό (Papandreou *et al.*, 2006).



Εικόνα 5. Χημική δομή λιποδιαλυτών καροτενίων που ανευρίσκονται στον κρόκο.

Γενικά, οι *cis*- και *trans*-κροκίνες είναι γλυκοζυλιωμένοι διεστέρες του 8, 8'-διαποκαροτένο-8,8'-διοϊκού οξέος, κροκετίνης, υδρολύονται από την β -γλυκοσιδάση και αποτελούν μια από τις λίγες οικογένειες καροτενοειδών που είναι υδατοδιαλυτές και σταθερές σε συνθήκες περιβάλλοντος (Christodoulou *et al.*, 2015). Στον κρόκο απαντώνται πολλοί εστέρες της κροκετίνης (**Εικόνα 6**).

Η κροκετίνη (8,8'-διαποκαροτένο-8,8'-διοϊκό οξύ, $C_{20}H_{24}O_4$; **Εικόνα 6**) είναι λιπόφιλο καροτενοειδές, και αποτελεί τον κεντρικό πυρήνα της δομής των κροκινών (Bolhassani *et al.*, 2014). Λόγω της βραχείας ανθρακικής αλυσίδας της αποτελούμενης

από 20 άτομα άνθρακα, η κροκετίνη θεωρείται αποκαροτενοειδής. Έχει συμμετρική διτερπενική δομή με επτά διπλούς δεσμούς, τέσσερις μεθυλομάδες και μοριακό βάρος 328. Σχηματίζει κρυστάλλους με βαθύ κόκκινο χρώμα με σημείο τήξης 285°C, ενώ σε διάλυμα έχει κίτρινο χρώμα. Έχει μικρή διαλυτότητα σε βασικό υδατικό διάλυμα, αλλά διαλύεται ευχερώς σε οργανικές βάσεις. Εάν η συγκέντρωσή της υπερβεί τη διαλυτότητά της σε υδατικό διάλυμα σχηματίζει κίτρινο ίζημα (Christodoulou *et al.*, 2015).

Η κροκετίνη που ανευρίσκεται στον κρόκο προκύπτει από την οξειδωτική διάσπαση της ζεαξανθίνης στις θέσεις 7,8 και -7',8' (**Εικόνα 6**) (Christodoulou *et al.*, 2015; Shahi *et al.*, 2016). Από την συνολική κροκετίνη στον κρόκο, το 94% απαντάται ως γλυκοζυλιωμένο μόριο, ενώ το υπόλοιπο 6% ως ελεύθερη κροκετίνη.

β) πικροκροκίνη

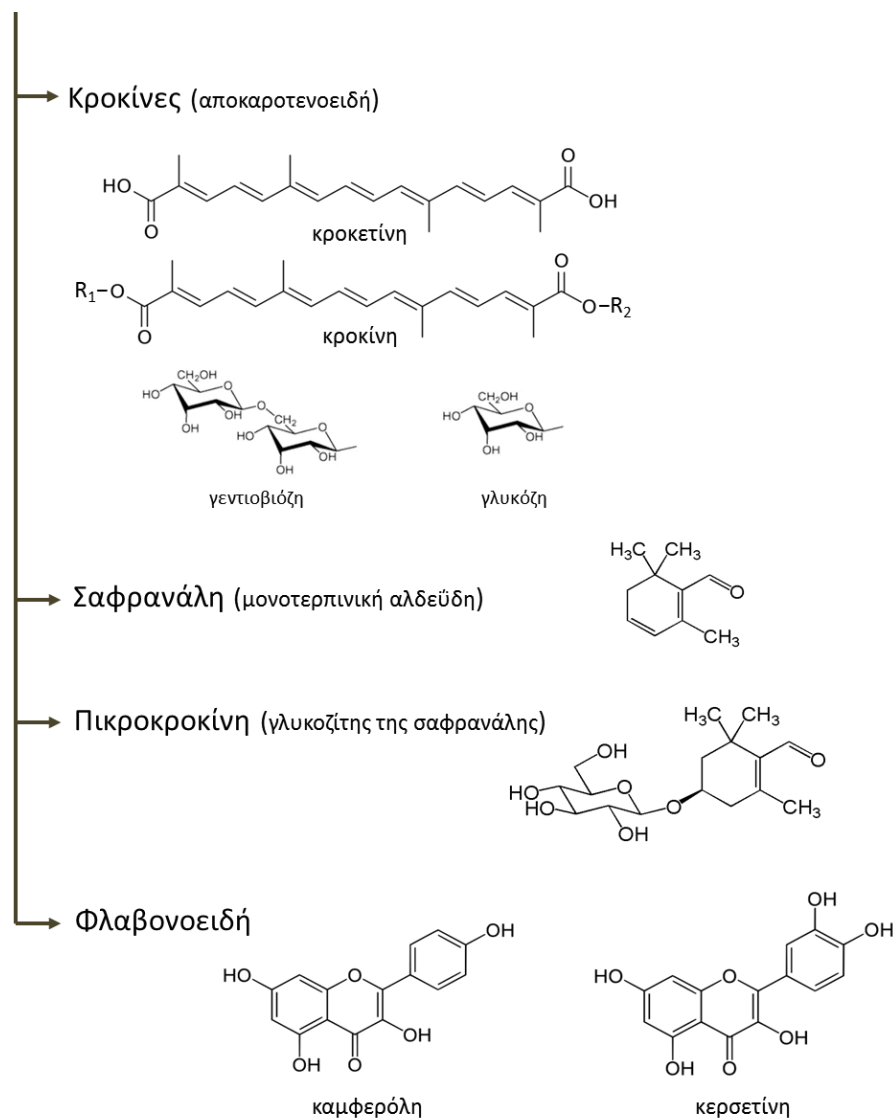
Η πικροκροκίνη (**Εικόνα 6**) είναι μια πικρή ουσία και σε αυτήν οφείλεται η χαρακτηριστική γεύση του κρόκου. Είναι γλυκοζυλιωμένη πρόδρομη ένωση της σαφρανάλης (β-D-γλυκοζίτης της υδροξυσαφρανάλης), δηλαδή αποτελεί γλυκοζίτη από τη διάσπαση (θερμική ή ενζυματική) του οποίου προκύπτει ένα μόριο γλυκόζης και το άγλυκο μέρος που ονομάζεται 4-υδροξυ-β-κυκλοκιτράλη. Το άγλυκο μέρος του μορίου όταν αποβάλει ένα μόριο νερού μετατρέπεται σε πτητική ένωση γνωστή ως σαφρανάλη (**Εικόνα 6**) (Tarantilis *et al.*, 1995; Christodoulou *et al.*, 2015).

γ) σαφρανάλη

Η σαφρανάλη (C₁₀H₁₄O) είναι μια μονοτερπενική αλδεΐδη, αποτελεί το 70% του πτητικού κλάσματος των ανθέων του κρόκου και προσδίδει στον κρόκο το χαρακτηριστικό του άρωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φρέσκα στίγματα δεν έχουν άρωμα. Το χαρακτηριστικό άρωμα του κρόκου εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της αποξήρανσης και αποθήκευσης του προϊόντος κατά την οποία η πικροκροκίνη μετατρέπεται σε σαφρανάλη, ένωση που δεν αποικοδομείται εύκολα (Christodoulou *et al.*, 2015). Ανάλογα με τις συνθήκες αποξήρανσης και αποθήκευσης μπορεί να προκύψουν ίχνη και άλλων πτητικών μονοτερπενικών ενώσεων όπως ισοφορόνης και κετοϊσοφορόνης (Lechtenberg *et al.*, 2008).

Επομένως, η αποικομιδή και οι συνθήκες αποξήρανσης και αποθήκευσης του κρόκου μπορούν να επηρεάσουν την σύνθεση και ποιότητα του προϊόντος. Καλής ποιότητας θεωρείται προϊόν με περιεκτικότητα 30% σε κροκίνες, 5-15% σε πικροκροκίνη και >0,5% πτητικής σαφρανάλης (Lechtenberg *et al.*, 2008).

Crocus sativus L.



| Υπόμνημα | R_1 - | R_2 - | Χημικός τύπος | MB | περιεκτικότητα [‡] |
|------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-----|-----------------------------|
| κροκετίνη | H | H | $C_{20}H_{24}O_4$ | 328 | |
| κροκίνη-1 | β -D-γλυκοζυλ | H | $C_{26}H_{34}O_9$ | 490 | |
| κροκίνη-2 | β -D-γεντιοβιοζυλ | H | $C_{32}H_{44}O_{14}$ | 652 | 7% |
| κροκίνη-2' | β -D-γλυκοζυλ | β -D-γλυκοζυλ | $C_{32}H_{44}O_{14}$ | 652 | |
| κροκίνη-3 | β -D-γεντιοβιοζυλ | β -D-γλυκοζυλ | $C_{38}H_{54}O_{19}$ | 814 | 26% |
| κροκίνη-4* | β -D-γεντιοβιοζυλ | β -D-γεντιοβιοζυλ | $C_{44}H_{64}O_{24}$ | 976 | trans 46%, cis 12% |

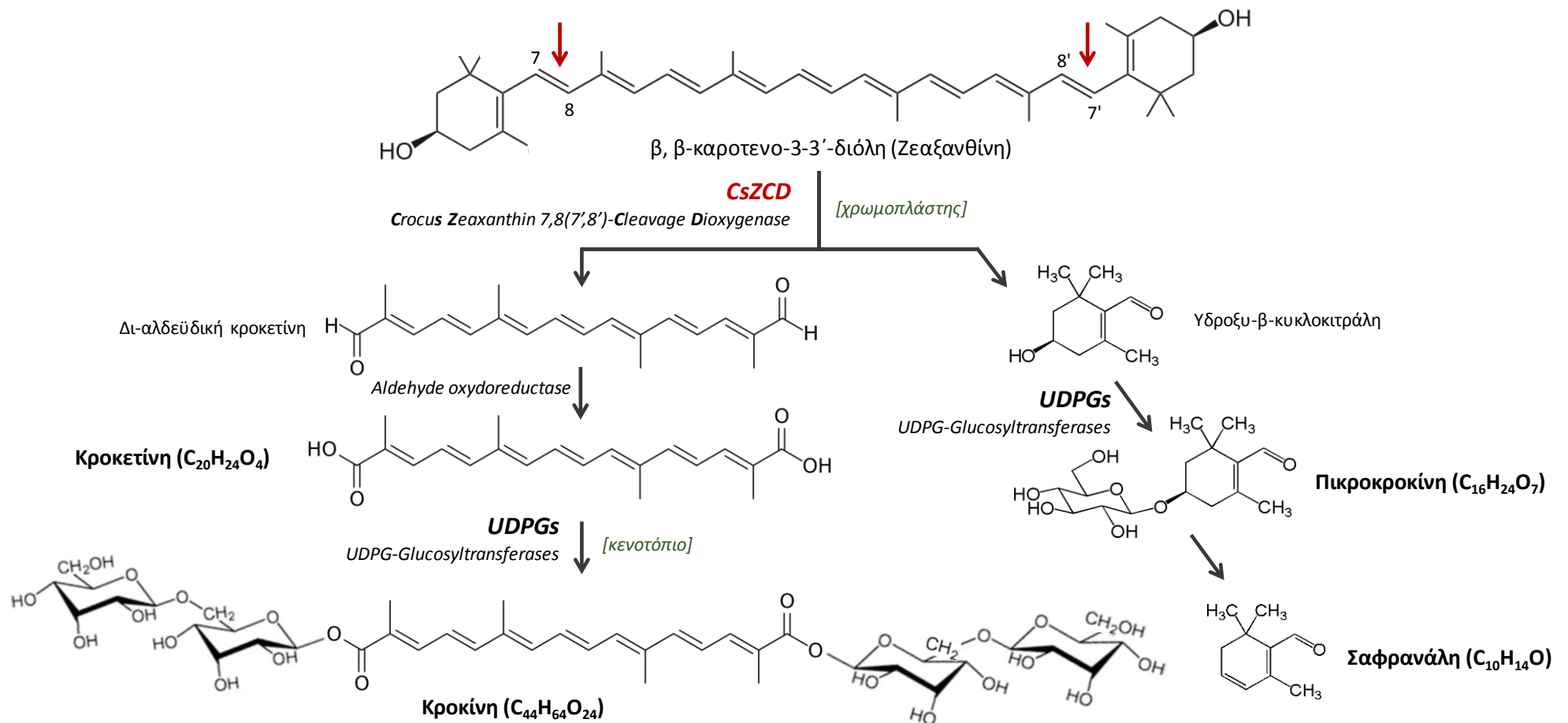
* α -κροκίνη ή κροκίνη-1 σύμφωνα με: Melnyk et al., 2010; Shahi et al., 2016.
‡σύμφωνα με Parandreu et al., 2006 σε ξηρό βάρος εκχυλίσματος.

Εικόνα 6. Χημική δομή των κύριων συστατικών του κρόκου.

Τα καροτενοειδή είναι τερπενοειδή τα οποία συντίθενται ακολουθώντας διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια. Η βιογένεση των ενεργών συστατικών του κρόκου που σχετίζονται με χρώμα και το άρωμά του ξεκινά με την οξειδωτική διάσπαση της ζεαξανθίνης από την δι-οξυγενάση της ζεαξανθίνης του κρόκου (Crocus Zeaxanthin 7,8(7',8')-Cleavage Dioxygenase, CsZCD) στις θέσεις 7,8 και -7',8' κατά την οποία παράγονται δι-αλδεϋδική κροκετίνη και πικροκροκίνη. Η πικροκροκίνη αποτελεί, επομένως, προϊόν διάσπασης του καροτενοειδούς ζεαξανθίνη αλλά και πρόδρομο μονοτερπενικό γλυκοσίδιο της σαφρανάλης. Στα στάδια του κρόκου το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης των κύριων συστατικών του αποτελεί η γλυκοζυλίωση των προϊόντων διάσπασης της ζεαξανθίνης (κροκετίνη, σαφρανάλη) με την επένεργεια του ενζύμου γλυκοσυλ-τρανσφεράσης. Το στάδιο αυτό συμβαίνει στους χρωμοπλάστες των στιγμάτων. Συνοπτικά, από τη γλυκοσυλίωση της κροκετίνης παράγονται οι κροκίνες, ενώ από τη γλυκοσυλίωση της σαφρανάλης προκύπτει η πικροκροκίνη (Bolhassani *et al.*, 2014). Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζεται η βιοσύνθεση των κυριότερων συστατικών του κρόκου.

Γενικά, τα καροτενοειδή συνιστούν μια μεγάλη οικογένεια C₄₀ πολυενίων και αποτελούν πολυ-ισοπρενοειδείς ενώσεις. Χαρακτηριστικό, δηλαδή, της χημικής τους δομής αποτελεί ένα σύστημα συζευγμένων διπλών δεσμών (ισοπρένια) που επηρεάζουν τις χημικές, βιοχημικές και φυσικές τους ιδιότητες. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) υδρογονάνθρακες των καροτενοειδών ή καροτένια και β) οξυγονωμένα παράγωγα υδρογονανθράκων γνωστά και ως ξανθοφύλλες.

Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές που απαντώνται ευρέως στη φύση και προσδίδουν σε φύλλα, φρούτα, λαχανικά και άνθη χαρακτηριστικό κίτρινο, πορτοκαλί και ενίοτε κόκκινο χρώμα. Τα έντονα αυτά χρώματα προσελκύουν την γονιμοποίηση και τη διασπορά των σπόρων. Συντίθενται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, τις αφίδες, και σε ορισμένα βακτήρια και μύκητες. Η σύνθεσή τους συμβαίνει σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια των φυτών (πλαστίδια όπως χλωροπλάστες και χρωμοπλάστες), αλλά όχι των ζώων. Από τα 600 περίπου καροτενοειδή που έχουν απομονωθεί από φυτικές πηγές, περίπου 40 είδη περιλαμβάνονται στην δίαιτα του ανθρώπου και από αυτά 20 είδη έχουν προσδιορισθεί στο αίμα και σε ιστούς (Kadian and Garg, 2012).



Εικόνα 7. Η βιοσύνθεση των συστατικών του κρόκου κροκίνη και πικροκροκίνη ξεκινά από την οξειδωτική διάσπαση της ζεαξανθίνης στα σημεία 7, 8 (7', 8') όπως υποδεικνύεται από τα κόκκινα βέλη.

Όσον αφορά στις δράσεις των καροτενοειδών στο ζωϊκό βασίλειο, τα παράγωγά τους προάγουν την υγεία, βελτιώνουν την σεξουαλική συμπεριφορά και αποτελούν αναγκαία προϋπόθεση για την αναπαραγωγή.

Με βάση όλα τα παραπάνω, τα καροτενοειδή έχουν μεγάλη εμπορική σημασία στη γεωργία, την υγεία και τη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών.

Φαρμακοκινητική του κρόκου και των συστατικών του

Γενικά, η απορρόφηση των καροτενοειδών που λαμβάνονται με την τροφή προϋποθέτει την απελευθέρωσή τους από τα διάφορα συστατικά της και την ενσωμάτωσή τους σε μικύλλια (μείγμα χολικών αλάτων και λιπιδίων). Επομένως, η απορρόφηση των καροτενοειδών απαιτεί την παρουσία λίπους (~3–5 g) στο γεύμα (Bolhassani *et al.*, 2014). Μέσα στα κύτταρα του εντέρου τα καροτενοειδή ενσωματώνονται σε χυλομικρά (λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριγλυκερίδια) και έτσι απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η απορρόφηση, και γενικά η φαρμακοκινητική, των συστατικών του κρόκου παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες σε σχέση με άλλα καροτενοειδή της διατροφής όπως αναφέρεται σε πρόσφατη ανασκόπηση (Hosseini *et al.*, 2018) και όπως περιγράφεται με λεπτομέρειες παρακάτω.

Οι Chryssanthi και συν. (2011) έδειξαν ότι κατά την κατανάλωση ροφήματος κρόκου (200 mg κρόκου σε νερό 80°C για 5', 4 υγιείς εθελοντές) οι κροκίνες που φθάνουν στο έντερο υδρολύονται σε κροκετίνη η οποία αφού απορροφηθεί εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος (εκτιμώμενο T_{max} =1 ώρα) όπου και ανιχνεύεται μέχρι και 24 ώρες μετά την κατανάλωσή του (Chryssanthi *et al.*, 2011). Φαρμακοκινητική μελέτη της κροκετίνης (7,5, 15 και 22,5 mg από του στόματος) σε 10 υγιείς εθελοντές έδειξε ότι η κροκετίνη εμφανίζεται στο πλάσμα 1 ώρα μετά τη χορήγησή της, υποδηλώνοντας ταχεία απορρόφηση από το έντερο, η συγκέντρωσή της παρουσιάζει αύξηση (T_{max}) μέχρι τις 4 ώρες, κατόπιν σταδιακή μείωση και καταλήγει στο όριο της ποσοτικοποίησής της στις 24 ώρες (Umigai *et al.*, 2011). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τον χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης του β-καροτένιου (T_{max} =30 ώρες) (Kostic *et al.*, 1995), της λουτεΐνης (T_{max} =16-30 ώρες) (Kostic *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 2002) και του λυπενίου (T_{max} =15-33 ώρες) (Gustin *et al.*, 2004). Ο χρόνος ημίσειας ζωής, $T_{1/2}$, της κροκετίνης υπολογίσθηκε στις 6,1-7,5 ώρες (Umigai *et al.*, 2011).

Οι σημαντικές αυτές μελέτες σε ανθρώπους συμπληρώνουν προηγούμενες μελέτες σε ποντίκια (Asai *et al.*, 2005) και αρουραίους (Xi *et al.*, 2007) σύμφωνα με τις οποίες η

κροκίνη μετά από χορήγησή της από του στόματος υδρολύεται σε κροκετίνη στο έντερο και αυτή στη συνέχεια απορροφάται ταχέως, ενώ η κροκίνη δεν ανιχνεύεται στο αίμα (Xi *et al.*, 2007), έτσι ώστε η κροκετίνη να θεωρείται ως ο ενεργός μεταβολίτης της από του στόματος χορηγούμενης κροκίνης (Asai *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2017). Μάλιστα, λόγω του μικρού T_{max} της κροκετίνης, μισή ώρα μετά από του στόματος χορήγηση, έχει προταθεί ότι η μεταφορά του μικρού υδρόφιλου μορίου της κροκετίνης από το έντερο στο αίμα γίνεται μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας και όχι μέσω της λέμφου (όπως γίνεται στην περίπτωση της χοληστερόλης και των προϊόντων λιπόλυσης των τριγλυκεριδίων) (Asai *et al.*, 2005). Αντίθετα, άλλα υδρόφιλα μόρια, όπως είναι τα γλυκουρονίδια της κροκετίνης που σχηματίζονται στο έντερο, μπορούν να απορροφηθούν μέσω της λέμφου.

Η σύνδεσή της κροκετίνης με την αλβουμίνη του ορού είναι αρκετά εκτεταμένη (Miller *et al.*, 1982), όμως με δεσμούς σχετικά ασθενείς (Kanakakis *et al.*, 2007) με αποτέλεσμα η κατανομή της στους ιστούς του σώματος να είναι ευρεία.

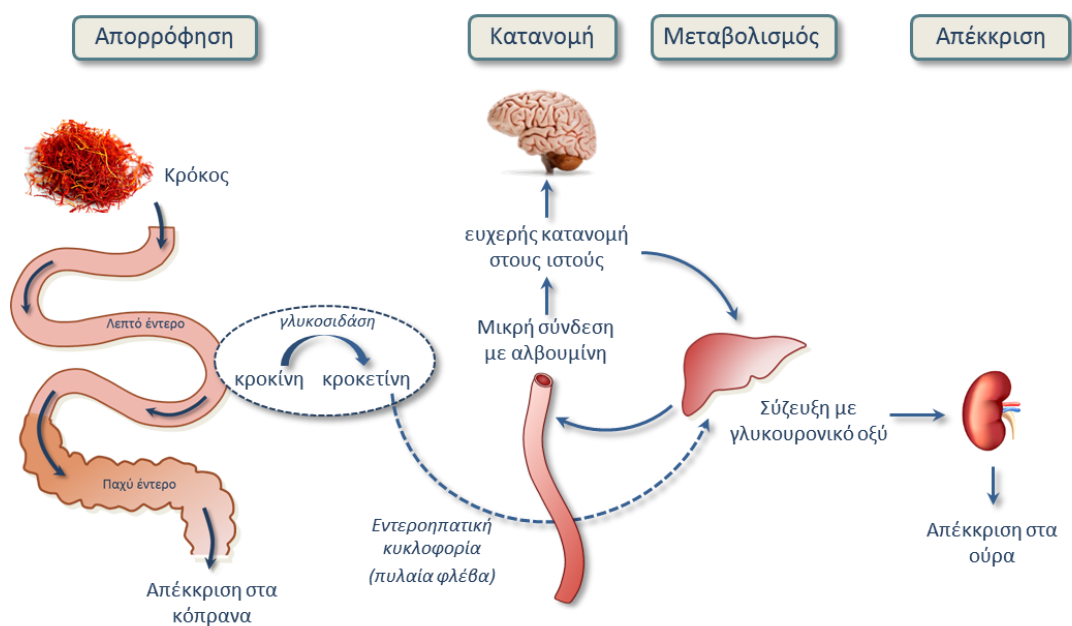
Οι διάφορες κροκίνες απογλυκοζιώνονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου ως αποτέλεσμα ενζυματικής διάσπασης, όπως από απογλυκοσιδάσες, παρά διάσπασης από το εντερικό μικροβίωμα (Lautenschläger *et al.*, 2015). Το εντερικό μικροβίωμα αποικοδομεί τα αποκαροτενοειδή σε μικρότερες μονάδες αλκυλίων. Η κροκετίνη μεταβολίζεται σε μονο- και δι-εστερικά συζευγμένα παράγωγα του γλυκουρονικού οξέος στο έντερο κατά την απορρόφησή της καθώς και στο ήπαρ μετά την απορρόφησή της (Asai *et al.*, 2005). Μάλιστα, αντίθετα με την από του στόματος χορήγηση της κροκίνης, όταν η κροκίνη χορηγείται ενδοφλέβια η συγκέντρωση της κροκετίνης στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλή γεγονός που σημαίνει ότι η μετατροπή της κροκίνης σε κροκετίνη εντοπίζεται κυρίως στο έντερο (Asai *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2017).

Η κροκίνη απεκκρίνεται κατά το μεγαλύτερο μέρος, περίπου 60%, με τα κόπρανα (Asai *et al.*, 2005), ενώ δεν ανιχνεύεται σε ούρα 24ώρου (Xi *et al.*, 2007). Ένα μέρος της συζευγμένης με γλυκουρονίδια κροκετίνης απεκκρίνεται στη χολή ή στα ούρα, ενώ ένα μεγάλο μέρος γλυκουρονιδίων της κροκετίνης αποτελούν είτε το βιοδραστικό μόριο της κροκετίνης είτε το μέσον μεταφοράς κροκετίνης στους ιστούς (Asai *et al.*, 2005). Η φαρμακοκινητική του κρόκου περιγράφεται σχηματικά στην **Εικόνα 8**.

Πρόσφατη εργασία στην οποία μελετήθηκε η φαρμακοκινητική της κροκίνης μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε ποντικούς έδειξε ότι η κροκίνη δεν υδρολύεται σε κροκίνη αλλά κατανέμεται και διέρχεται αυτούσια τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό όπου και ασκεί τις ευεργετικές της επιδράσεις με $T_{max}=30'$ και $T_{1/2}=120'$ στο πλάσμα (Karkoula *et al.*, 2018).

Μελέτες σχετικά με την σταθερότητα του κρόκου αναφέρουν ότι η ποιότητα του προϊόντος σχετίζεται με διάφορους παράγοντες και ότι η βέλτιστη θερμοκρασία αποξήρανσης του φυτού για να διατηρηθούν τα κύρια συστατικά του, κροκίνη, πικροκροκίνη και σαφρανάλη είναι μεταξύ 35-50°C για 4-7 ώρες (Sánchez *et al.*, 2011; Hosseini *et al.*, 2018). Όσον αφορά στην σταθερότητα του κρόκου κατά την παρασκευή και διατήρηση του ροφήματος, διάφοροι παράγοντες, όπως θερμοκρασία, pH, φως και οξυγόνο, μπορούν να παίξουν ρόλο στην αποδόμηση του προϊόντος η οποία ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης (Tsimidou and Tsatsaroni, 1993; del Campo *et al.*, 2010).

Η χρήση του κρόκου θεωρείται ασφαλής. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι λήψη κρόκου μέχρι 200-400mg για μια εβδομάδα (Modaghegh *et al.*, 2008; Ayatollahi *et al.*, 2014) έως και 1000mg για 8 εβδομάδες (Azimi *et al.*, 2014) δεν επιφέρει κλινικά σημαντικές αλλαγές σε καμία παράμετρο (βιοχημική, αιματολογική) που έχει μελετηθεί. Τοξικολογική μελέτη σε ποντικούς έδειξε ότι μετά από του στόματος χορήγηση το LD₅₀ του κρόκου είναι περίπου 4gr/kg (Hosseinzadeh *et al.*, 2013; Bostan *et al.*, 2017).



Εικόνα 8. Σχηματική περιγραφή της φαρμακοκινητικής του κρόκου.

Δράσεις του κρόκου

Η χρήση του κρόκου ως καρύκευμα αποτελεί σήμερα τον σημαντικότερο λόγο καλλιέργειας και εμπορίας του. Ωστόσο, ολοένα αυξανόμενη βιβλιογραφία όσον αφορά στις βιολογικές και φαρμακολογικές του δράσεις θέτουν το φυτό στο επίκεντρο της ανάπτυξης του ως φαρμακευτικό προϊόν. Πολλές, πλέον, *in vitro* και *in vivo* μελέτες που

αφορούν στην επίδραση των κυριώτερων συστατικών του κρόκου (κροκίνες, κροκετίνη, πικροκροκίνη και σαφρανάλη) διεξάγονται σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο. Οι μελέτες αυτές παρέχουν σαφείς ενδείξεις για τις ευεργετικές δράσεις του κρόκου σε γαστρεντερικές διαταραχές, προεμμηνορυσιακό σύνδρομο, άγχος, αϋπνία, κατάθλιψη, καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και μερικά είδη καρκίνου. Για πολλές από τις παθήσεις αυτές έχει ενοχοποιηθεί, ως γενεσιουργός αιτία, η παραγωγή ελεύθερων ριζών. Πράγματι, είναι σήμερα γνωστό ότι οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως ο σχηματισμός της αθηρωματώδους πλάκας, οι πνευμονικές παθήσεις που προκαλούνται από τη μόλυνση του περιβάλλοντος, οι τοξικές ή θεραπευτικές ιδιότητες διαφόρων φαρμάκων, η τοξικότητα που οφείλεται στις ακτινοβολίες, αλλά και οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (αυτοάνοσα νοσήματα όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, ψωρίαση, συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος), οι ασθένειες του Parkinson και του Alzheimer και βεβαίως ο καρκίνος. Ακολουθεί ανασκόπηση των κυριότερων επιδράσεων του κρόκου σε βιολογικά συστήματα.

i) Προκλινικές μελέτες

Αντικαρκινική δράση

Είναι γνωστό ότι τα κύτταρα των θηλαστικών και των φυτών εκτίθενται συνεχώς σε οξειδωτικούς παράγοντες οι οποίοι είτε βρίσκονται στον αέρα, την τροφή και το νερό, είτε δημιουργούνται από τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Υπερπαραγωγή των οξειδωτικών παραγόντων οδηγεί σε οξειδωτικό stress και την βλάβη μακρομορίων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA. Οι βλάβες αυτές αν δεν επιδιορθωθούν οδηγούν σε μεταλλάξεις, στη διάσπαση απλών και διπλών ελίκων, στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των αλύσεων του DNA καθώς και χρωμοσωμική βλάβη με συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιων παθήσεων (καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος) (Palozza *et al.*, 2004). Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταξύ των μηχανισμών με τους οποίους τα καροτενοειδή συστατικά του κρόκου (κροκίνη, κροκετίνη και διμεθυλοκροκετίνη) ασκούν την αντικαρκινική τους είναι είτε με απευθείας αλληλεπίδραση με το DNA (Bathaie *et al.*, 2007), είτε με την προαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα (Tavakkol-Afshari *et al.*, 2008).

Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η κροκίνη αποτελεί ίσως το σημαντικότερο συστατικό του κρόκου με αντικαρκινική δράση σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές (Abdullaev, 2002). Συγκεκριμένα, η κροκίνη υπερτερεί των άλλων συστατικών του κρόκου (κροκετίνη, πικροκροκίνη και σαφρανάλη) όσον αφορά στην ανασταλτική τους δράση

στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων της μήτρας (Escribano *et al.*, 1996) του ορθού (García-Olmo *et al.*, 1999), του μαστού (Chryssanthi *et al.*, 2007) και του εντέρου χωρίς να επηρεάζει τα υγιή κύτταρα (Aung *et al.*, 2007). Εκτός, όμως, από την κροκίνη, μελέτες έχουν αναδείξει την αντικαρκινική δράση της κροκετίνης τόσο σε κυτταρική σειρά και xenograft του παγκρέατος (Dhar *et al.*, 2009) όσο και σε κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος όπου η δράση της ήταν παρόμοια με αυτήν της σισπλατίνης (Jagadeeswaran *et al.*, 2000). Επιπλέον, η κροκετίνη έχει κυτταροτοξική δράση σε λευχαιμικά κύτταρα HL60 (Tarantilis *et al.*, 1994) και ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μέσω μειωμένης σύνθεσης του DNA, του RNA και πρωτεϊνών, αναστολή της RNA πολυμεράσης II και αλληλεπίδρασης με την ιστόνη H1 και δομές H1-DNA (Milajerdi *et al.*, 2016). Η συνδυαστική αντικαρκινική δράση των συστατικών του κρόκου παρουσιάζει, ενδεχομένως, αυξημένη αντικαρκινική δράση (Liu, 2004). Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι το εκχύλισμα του κρόκου έχει κυτταροτοξική επίδραση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του ήπατος (HepG2) και του παγκρέατος (HeLa) (Tavakkol-Afshari *et al.*, 2008).

Μεγάλος αριθμός *in vivo* μελετών έχει διεξαχθεί για τη διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης του κρόκου. Μια παλαιότερη *in vivo* μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι το χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (100 mg/kg) για 12 εβδομάδες αναστέλλει τόσο τον χρόνο ανάπτυξης σαρκώματος, που προκαλείται από χορήγηση του παράγοντα 20-μεθυλοχλωλανθρένιο, όσο και την τελική μάζα του όγκου (Salomi *et al.*, 1991). Παρομοίως, στη μελέτη τους οι Bathaie και συν. (2013) έδειξαν ότι χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος κρόκου για 50 ημέρες σε αρουραίους με αδenoκαρκίνωμα του εντέρου αναστέλλει την αύξηση του όγκου προάγοντας την απόπτωση και μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Bathaie *et al.*, 2013). Χορήγηση κροκετίνης σε αρουραίους σε χαμηλή δόση (0,1mg) για 45 εβδομάδες μειώνει ηπατοτοξικά έλκη που προκαλούνται από την αφλατοξίνη B1 (Wang *et al.*, 1991), ενώ σε υψηλότερες δόσεις (20 και 50 mg/kg) για μικρότερα διαστήματα (4 και 18 εβδομάδες, αντίστοιχα) έχει αντικαρκινική δράση έναντι του καρκίνου του πνεύμονα που προκαλείται σε ποντίκια μετά από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση βενζοπυρενίου (Magesh *et al.*, 2006, 2009).

Η αντικαρκινική δράση του κρόκου παρουσιάζεται σε μια περιεκτική πρόσφατη ανασκόπηση στην οποία γίνεται απολογισμός των επιδράσεων του εκχυλίσματος του κρόκου αλλά και του καθενός εκ των συστατικών του ξεχωριστά με ειδική μνεία σε κάθε τύπου καρκίνου και πιθανούς μηχανισμούς χημειο-προστασίας (Milajerdi *et al.*, 2016).

Προστατευτική δράση σε μοντέλα νευρεκφυλιστικών νόσων

Η νευροπροστατευτική δράση του κρόκου έχει περιγραφεί σε πειραματικό μοντέλο της νόσου του Parkinson που προκαλείται μετά από έγχυση του νευροτοξικού παράγοντα 6-OH ντοπαμίνης (6-OHDA) στο ραβδωτό σώμα των πειραματοζώων. Στη μελέτη αυτή, χορήγηση κροκετίνης για 7 ημέρες άσκησε νευροπροστατευτική δράση στο ραβδωτό σώμα καθώς βελτίωσε τους συμπεριφερικούς δείκτες κινητικής δραστηριότητας (διανυσθείσα ταχύτητα και απόσταση, στερεοτυπική συμπεριφορά) αύξησε την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, Superoxide dismutase, SOD, Glutathione peroxidase, GPx, και Glutathione S-transferases, GST), μείωσε τα επίπεδα των TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, είναι προϊόντα υπεροξειδωσής των λιπιδίων και αποτελούν δείκτη οξειδωτικού στρες), μείωσε τον αριθμό πυκνωτικών πυρήνων των νευρώνων και αύξησε τα επίπεδα ντοπαμίνης ένα μήνα μετά την βλάβη (Ahmad *et al.*, 2005). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η κροκετίνη ασκεί προστατευτική δράση αναστέλοντας την αλληλουχία των γεγονότων που οδηγούν στην εκφύλιση των νευρώνων.

Παρόμοια με την κροκετίνη, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης για 28 ημέρες άσκησε προστατευτική δράση έναντι των κινητικών ελλειμάτων και των νευροχημικών μεταβολών που προκαλούνται σε πειραματικό μοντέλο της νόσου του Parkinson που προκαλείται μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της οργανοφωσφορικής ένωσης μαλαθείου (το οποίο εκτός από αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης προκαλεί οξειδωτικό στρες και διατάραξη των λιπιδίων των μεμβρανών). Η χορήγηση κροκίνης αντέστρεψε τα κινητικά ελλείματα ανοικτού πεδίου (open field locomotor activity), κίνησης σε τροχό (rotarod test) και καταληψίας και παρόλο που δεν επανέφερε την δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στα φυσιολογικά επίπεδα στο ραβδωτό σώμα, ωστόσο αύξησε τα επίπεδα του αντιοξειδωτικού ενζύμου γλουταθειόνης (glutathione, GSH) και μείωσε δραματικά τα επίπεδα των μορίων φλεγμονής TNF α (Tumor Necrosis Factor α) και IL-6. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η νευροπροστατευτική δράση της κροκίνης διαμεσολαβείται μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες και των φλεγμονωδών κυτοκινών (Mohammadzadeh *et al.*, 2018).

Αντικαταθλιπτική δράση

Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης (12.5, 25 και 50 mg/kg) σε αρουραίους έχει παρόμοια αντικαταθλιπτική δράση με αυτή της μιπραμίνης (10 mg/kg) σε μοντέλο

εξανασκασμένης κολύμβησης καθώς μειώνει τον χρόνο ακινησίας των πειραματοζώων (Vahdati Hassani *et al.*, 2014). Η αντικαταθλιπτική αυτή δράση είναι πιθανόν να οφείλεται στις πρωτεΐνες CREB (cAMP response element binding protein), ενός μεταγραφικού παράγοντα που αυξάνει κατά την αντικαταθλιπτική θεραπεία, BDNF (brain derived neurotrophic factor) και VGF (νευροπεπτίδιο που προάγει την συναπτική πλαστικότητα του ιπποκάμπου), των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται από το CREB, καθώς η έκφρασή τους στον ιππόκαμπο αυξάνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο μετά τη χορήγηση κροκίνης (Vahdati Hassani *et al.*, 2014). Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η ενδοπεριτονιακή χορήγηση υδατικού εκχυλίσματος κρόκου (Ghasemi *et al.*, 2015).

Αντιεπιληπτική δράση

Σε φαρμακολογική μελέτη οι Hosseinzadeh και συνεργάτες έδειξαν ότι το εκχύλισμα στιγμάτων και πετάλων κρόκου έχει αντιεπιληπτική δράση σε ποντικούς (Hosseinzadeh and Talebzadeh, 2005). Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν πειραματικό μοντέλο επιληψίας επαγόμενη από την χορήγηση πεντυλενοτετραζόλης (pentylenetetrazol, PTZ, ανταγωνιστής των υποδοχέων GABA_A) και έδειξαν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σαφρανάλης (0.15 και 0.35 ml/kg) μειώνει τη διάρκεια της επιληπτικής κρίσης, αυξάνει τον χρόνο έναρξης τονικών σπασμών και μειώνει την πιθανότητα θανάτου. Αντίθετα με την κροκετίνη, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης (200 mg/kg) φαίνεται να στερείται αυτών των δράσεων (Hosseinzadeh and Talebzadeh, 2005). Σε μεταγενέστερη μελέτη τους οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι στον αρουραίο η προστατευτική δράση της σαφρανάλης παρατηρείται μόνο μετά από ενδοπεριτοναϊκή αλλά όχι μετά από ενδοκρανιακή έγχυση PTZ. Έδειξαν, μάλιστα, ότι όταν πριν από την χορήγηση σαφρανάλης προηγείται χορήγηση φλουμαζενίλης (ανταγωνιστής των βενζοδιαζεπινών) τότε αίρεται η προστατευτική δράση της σαφρανάλης οδηγώντας τους στο συμπέρασμα ότι η δράση της σαφρανάλης διαμεσολαβείται μέσω των υποδοχέων GABA_A (Hosseinzadeh and Sadeghnia, 2007).

Χρησιμοποιώντας το ίδιο μοντέλο επιληψίας (PTZ) σε ποντικούς μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η κροκίνη, χορηγούμενη από του στόματος σε δόσεις 5, 10 and 20 mg/kg, μειώνει την βαρύτητα των επιληπτικών κρίσεων (Mazumder *et al.*, 2017). Βελτίωση παρατηρήθηκε και στις γνωστικές λειτουργίες των ποντικών, όπως αυτές αξιολογήθηκαν με δοκιμασίες συμπεριφοράς αναγνώρισης και προτίμησης νέου αντικειμένου, στην ιστοπαθολογική εικόνα (χρώση Nissl) του ιπποκάμπου με χαρακτηριστική μείωση της νευρωνικής καταστροφής στην πυραμιδική στιβάδα, στους

βιοχημικούς δείκτες του ιπποκάμπου με μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), καθώς και στα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα με μείωση των επιπέδων του πυρηνικού παράγοντα κΒ (nuclear factor-κΒ, NF-κΒ) στα ζώα στα οποία χορηγήθηκε κροκίνη (Mazumder *et al.*, 2017).

Δράση του κρόκου στην μνήμη

Πρώιμες μελέτες οι οποίες διερεύνησαν την δράση του κρόκου στην μνήμη έδειξαν ότι η κροκίνη, και σε μικρότερο βαθμό η πικροκροκίνη, χορηγούμενη ενδοκρανιοκοιλιακά *in vivo* βελτιώνει την μειωμένη μακρόχρονη ενδυνάμωση (long-term potentiation, LTP) στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου αρουραίων που προκαλείται από την χορήγηση αιθανόλης (Sugiura *et al.*, 1994).

Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εκχυλισμάτων κρόκου (30 και 60 mg/kg) βελτιώνει σημαντικά το οφειλόμενο στην χορήγηση σκοπολαμίνης (ανταγωνιστής χολινεργικών μουσκαρινικών υποδοχέων) έλλειμα μνήμης αρουραίων όπως αυτή αξιολογείται με διάφορες δοκιμασίες συμπεριφοράς (αναγνώριση αντικειμένου, δοκιμασία παθητικής αποφυγής) (Pitsikas and Sakellaridis, 2006), ενώ χορήγηση κροκίνης βελτιώνει όχι μόνο την αναγνωριστική αλλά και την χωρική μνήμη, όπως αυτή αξιολογήθηκε με την δοκιμασία του κυκλικού υδατικού λαβυρίνθου, καθώς και την αποθήκευση και ανάκτηση της μνήμης (Pitsikas *et al.*, 2007). Μάλιστα, παρατηρείται συνεργική ωφέλεια στην μνήμη όταν η κροκίνη χορηγείται ταυτόχρονα με την μεμαντίνη (μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής των γλουταμινεργικών υποδοχέων τύπου NMDA που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με ελλείματα μνήμης) (Pitsikas and Tarantilis, 2018). Παρομοίως, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κροκίνης (15 και 30 mg/kg) βελτιώνει σημαντικά τα μνημονικά ελλείματα που παρουσιάστηκαν μετά την χορήγηση απομορφίνης (μεικτός αγωνιστής των ντοπαμινεργικών D1/D2 υποδοχέων ο οποίος προκαλεί συμπτώματα σχιζοφρενούς συμπεριφοράς στον αρουραίο) (Pitsikas and Tarantilis, 2017), ή κεταμίνης (αναστολέας των γλουταμινεργικών υποδοχέων τύπου NMDA που χρησιμοποιείται στην αναισθησία) (Georgiadou *et al.*, 2014). Η δράση του κρόκου και των συστατικών του στην μνήμη καθώς και σε αγχώδεις καταστάσεις και την σχιζοφρένεια περιγράφονται σε δύο πρόσφατες ανασκοπήσεις (Pitsikas, 2015, 2016).

Χρόνια χορήγηση κρόκου (60 mg/kg για 7 ημέρες) σε πειράματα συμπεριφοράς παθητικής αποφυγής με ηλικιωμένα ποντίκια έδειξε αντιστροφή των μνημονικών ελλειμάτων τους η οποία πιθανώς να οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση του κρόκου (Papandreou *et al.*, 2011), ή σε μείωση συσσωμάτωσης και εναπόθεσης πλακών β-

αμυλοειδούς (Papandreou *et al.*, 2006). Παρομοίως, χρόνια χορήγηση κρόκου (50-250 mg/kg) αλλά και κροκίνης (5-25 mg/kg) για 5 ημέρες προκάλεσε βελτίωση σε ελλείματα χωρικής μνήμης σε αρουραίους που είχαν υποστεί εγκεφαλική ισχαιμία πιθανώς λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Hosseinzadeh *et al.*, 2012). Αντίθετα, η χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου (60 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά) σε ποντίκια κατά τις τελευταίες 6 ημέρες χορήγησης χλωριούχου αλουμινίου που διήρκησε 5 εβδομάδες δεν κατάφερε να αντιστρέψει το έλλειμα μνήμης που παρουσιάστηκε στα ποντίκια αυτά (Linardaki *et al.*, 2013). Τέλος, βελτίωση της χωρικής μνήμης και μάθησης σε αρουραίους, με τη χρήση δοκιμασιών σε υδατικό λαβύρινθο του Morris, βρέθηκε σε πειράματα χρόνιου stress μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση κρόκου (30 mg/kg) και κροκίνης (15 mg/kg) (Ghadrdoost *et al.*, 2011) και σε πειράματα γνωστικής δυσλειτουργίας από στρεπτοζοτοκίνη μετά από χορήγηση κροκίνης (100 mg/kg) από του στόματος για 21 ημέρες (Naghizadeh *et al.*, 2013) πιθανώς λόγω μείωσης του οξειδωτικού stress.

Δράση του κρόκου στον διαβήτη και την αθηροσκλήρωση

Οι υπογλυκαιμικές και υπολιπιδαιμικές δράσεις του κρόκου μελετήθηκαν σε πειραματικό μοντέλο διαβήτη τύπου-2 που προκαλείται στον αρουραίο μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (streptozotocin, STZ) ενός αλκυλιωτικού παράγοντα με ιδιαίτερα τοξική δράση στα β κύτταρα του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη. Σε διαβητικά πειραματόζωα η χορήγηση κροκίνης (50 or 100 mg/kg) για 5 μήνες μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης στον ορό καθώς και μεταβολικούς δείκτες όπως τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (low-density lipoprotein, LDL) και αύξησε την υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (high-density lipoprotein, HDL) (Shirali *et al.*, 2013). Χρησιμοποιώντας το ίδιο πειραματικό μοντέλο διαβητοπάθειας, οι Konstantopoulos και συνεργάτες έδειξαν ότι η χορήγηση κρόκου (100 mg/kg) για 2 εβδομάδες επαναφέρει το γλυκαιμικό, αλλά όχι το λιπιδαιμικό, προφίλ των διαβητικών πειραματόζωων σε φυσιολογικά επίπεδα, ασκώντας ταυτόχρονα ηπατοπροστατευτική δράση καθώς βελτιώνει την ιστολογική εικόνα στεατοηπατίτιδας στα πειραματόζωα (Konstantopoulos *et al.*, 2017). Η βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ στα διαβητικά πειραματόζωα υποδηλώνει την ευεργετική επίδραση του κρόκου σε διαβητικούς ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Με αφετηρία το δεδομένο αυτό, μια πρόσφατη μελέτη διερεύνησε την πιθανή καρδιο-προστατευτική επίδραση της από του στόματος χορήγησης κροκίνης (10-20 mg/kg) για 6 εβδομάδες σε διαβητικούς (STZ) αρουραίους και σε απομονωμένα καρδιακά μυοκύτταρα καθώς και

τους μηχανισμούς που την διέπουν. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η χορήγηση κροκίνης μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των διαβητικών πειραματοζώων και αναστέλλει την υπερτροφία και την ίνωση του διαβητικού μυοκαρδίου βελτιώνοντας την συσταλτική δυσλειτουργία του. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μείωσης της απόπτωσης και εξομάλυνσης της αυτοφαγίας των κυττάρων του μυοκαρδίου (Feidantsis *et al.*, 2018). Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη τους 12 εβδομάδων οι Christodoulou και συνεργάτες έδειξαν ότι η χορήγηση κρόκου (30, 60, 90 mg/kg/ημερησίως στο πόσιμο νερό) σε ApoE knockout ποντίκια μειώνει την γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια, αλλά όχι την ολική χοληστερίνη, στο αίμα των πειραματοζώων (Christodoulou *et al.*, 2018). Συμπερασματικά, οι έως τώρα μελέτες δείχνουν ότι ο κρόκος μειώνει την γλυκόζη του αίματος σε διαβητικά πειραματόζωα, αλλά η επίδρασή του σε άλλους μεταβολικούς δείκτες διαφοροποιείται από μελέτη σε μελέτη.

Δράση του κρόκου στην σεξουαλική συμπεριφορά

Οι αφροδισιακές ιδιότητες του κρόκου και των συστατικών του σαφρανάλης και κροκίνης μελετήθηκαν σε οξέα πειράματα με αρουραίους στους οποίους έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση εκχυλισμάτων, διαφορετικών συγκεντρώσεων, των παραπάνω ουσιών. Η μελέτη έδειξε ότι ο κρόκος και η κροκίνη, αλλά όχι η σαφρανάλη, βελτίωσαν όλους τους δείκτες σεξουαλικής συμπεριφοράς με δοσοεξαρτώμενο τρόπο επιβεβαιώνοντας τις αφροδισιακές ιδιότητες του κρόκου (Hosseinzadeh *et al.*, 2008).

ii) Κλινικές μελέτες

Δράση σε αιματολογικούς, βιοχημικούς και ανοστροποποιητικούς δείκτες στο αίμα

Σε δύο τυχαίοποιημένες διπλές-τυφλές μελέτες σε υγιείς εθελοντές χορήγηση κρόκου (200–400 mg ημερησίως) για μία εβδομάδα είχε μικρή επίπτωση σε αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους χωρίς όμως κλινική σημασία (Modaghegh *et al.*, 2008; Ayatollahi *et al.*, 2014). Παρομοίως, σε τυχαίοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη έγινε σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της χορήγησης δισκίων κρόκου (100mg ημερησίως) για 6 εβδομάδες σε 45 υγιείς άνδρες και εικονικού φαρμάκου σε άλλους 44 υγιείς άνδρες σε διάφορους ανοσολογικούς, αιματολογικούς και βιοχημικούς δείκτες. Παρατηρήθηκε μια παροδική αύξηση της IgG και μείωση της IgM, μείωση του ποσοστού των βασεόφιλων και των αιμοπεταλίων, αλλά αύξηση των μονοκυττάρων κατά την 3^η εβδομάδα από την έναρξη της χορήγησης του κρόκου, ενώ οι τιμές των δεικτών επανήλθαν στα προ-χορήγησης επίπεδα στο τέλος της 6^{ης} εβδομάδας (Kianbakht and

Ghazavi, 2011). Χορήγηση δισκίων κροκίνης 20 mg σε 44 υγιείς εθελοντές για 4 εβδομάδες θεωρήθηκε ασφαλής αφού δεν άλλαξε τους αιματολογικούς, βιοχημικούς και ορμονικούς δείκτες, αλλά ούτε και παραμέτρους στα ούρα (εκτός από μικρή, μη αξιολογίσιμη κλινικά, μείωση της αμυλάσης, του συνόλου των λευκοκυττάρων και του χρόνου προθρομβίνης) (Mohamadpour *et al.*, 2013).

Αν και ο αριθμός των υγιών εθελοντών στις παραπάνω μελέτες είναι περιορισμένος, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η χορήγηση κρόκου έως και 400 mg δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές σε αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους και επομένως η χρήση του μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής.

Αντικαταθλιπτική δράση

Μεγάλος αριθμός κλινικών μελετών κυρίως από το Ιράν έχει εστιάσει την αντικαταθλιπτική δράση του κρόκου. Οι μελέτες αυτές είναι τυχαιοποιημένες διπλής-τυφλές μελέτες διάρκειας 4-8 εβδομάδων και αφορούν συνήθως σε 30-60 ασθενείς με διάφορες μορφές κατάθλιψης όπως ήπια ή μέτρια κατάθλιψη (Akhondzadeh *et al.*, 2004; Noorbala *et al.*, 2005; Moshiri *et al.*, 2006), βαριά κατάθλιψη (Talaie *et al.*, 2015), κατάθλιψη κατά την λοχεία (Kashani *et al.*, 2017; Tabeshpour *et al.*, 2017), κατάθλιψη μετά από χειρουργείο bypass (Shahmansouri *et al.*, 2014; Moazen-Zadeh *et al.*, 2018), μείζονα κατάθλιψη κατά την εμμηνόπαυση (Kashani *et al.*, 2018), συνοσηρότητα κατάθλιψης με άγχος σε διαβητικούς ασθενείς (Milajerdi, Jazayeri, Shirzadi, *et al.*, 2018). Παρακάτω παρατίθενται επιπλέον στοιχεία για μερικές από αυτές τις μελέτες.

Χορήγηση κρόκου (15-30 mg ημερησίως σε κάψουλες) για 6-8 εβδομάδες σε ασθενείς με ήπια με μέτρια κατάθλιψη επιφέρει κλινικό αποτέλεσμα συγκρίσιμο με αυτό που παρατηρείται μετά από χορήγηση ιμιπραμίνης (10 mg/ημερησίως) (Akhondzadeh *et al.*, 2004) και φλουοξετίνης (10 mg/ημερησίως) (Noorbala *et al.*, 2005), ενώ δεν παρατηρείται διαφορά στις ανεπιθύμητες ενέργειες μεταξύ του κρόκου και των φαρμάκων. Παρομοίως, σε τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη σε 40 ασθενείς με μείζονα κατάθλιψη, η χορήγηση κρόκου (30 mg/ημερησίως σε δισκία) για ένα μήνα έχει το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα με τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, SSRIs) δηλαδή την φλουοξετίνη (20 mg/ημερησίως), την σερτραλίνη (50 mg/ημερησίως), ή την σιταλοπράμη (20 mg/ημερησίως) (Talaie *et al.*, 2015).

Η αντικαταθλιπτική δράση του κρόκου αναφέρεται και σε πρόσφατες τυχαιοποιημένες διπλής-τυφλές μελέτες με πλέον των 120 ασθενών. Σε μια από αυτές

χορηγήθηκαν δισκία κρόκου (11-14 mg/δύο φορές την ημέρα για 4 εβδομάδες) σε 128 ασθενείς με συμπτώματα αρνητικών συναισθημάτων οφειλομένων σε άγχος και παρατηρήθηκε βελτίωση των συμπτωμάτων τους (Kell *et al.*, 2017). Επίσης, συγχορήγηση κρόκου με κουρκουμίνη για 12 εβδομάδες σε 123 καταθλιπτικούς ασθενείς επέφερε ευεργετικά αποτελέσματα (Lopresti and Drummond, 2017). Παρομοίως, ευεργετική δράση παρατηρήθηκε σε 68 εφήβους με κατάθλιψη στους οποίους χορηγήθηκαν δισκία κρόκου (14 mg/δύο φορές την ημέρα για 8 εβδομάδες) (Lopresti *et al.*, 2018).

Παρά το γεγονός ότι όλες οι μελέτες έχουν κοινό παρονομαστή την ευεργετική δράση του κρόκου στην κατάθλιψη, χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών, κοινό μειονέκτημα όλων των παραπάνω μελετών είναι ο περιορισμένος αριθμός συμμετεχόντων καθώς και το μικρό διάστημα χορήγησης της ουσίας.

Δράση του κρόκου στη νόσο του Alzheimer

Τέσσερις συνολικά κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί με στόχο την διερεύνηση της δράσης του κρόκου στην νόσο του Alzheimer. Τρεις από αυτές πραγματοποιήθηκαν στο Ιράν και μια στην Ελλάδα.

Στην πρώτη τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη έγινε σύγκριση μεταξύ της επίδρασης της χορήγησης δισκίων κρόκου (15mg/δύο φορές ημερησίως για 16 εβδομάδες) και εικονικού φαρμάκου σε 46 ασθενείς με ήπια νόσο και παρατηρήθηκε βελτίωση των γνωστικών τους λειτουργιών (S. Akhondzadeh *et al.*, 2010). Αμέσως μετά, η ίδια ομάδα δημοσίευσε τα αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής μελέτης που διεξήχθη σε 54 ασθενείς και έδειξε ότι η χορήγηση δισκίων κρόκου (16 mg/δύο φορές ημερησίως για 22 εβδομάδες) έχει τα ίδια αποτελέσματα με τη χορήγηση 10mg/ημερησίως donepezil (donezipil, αναστρέψιμος αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης που χορηγείται στη νόσο του Alzheimer) και μάλιστα με λιγότερες παρενέργειες (Shahin Akhondzadeh *et al.*, 2010). Ακολούθησε μια τρίτη μελέτη σε 68 ασθενείς με ήπια έως βαριά μορφή της νόσου σύμφωνα με την οποία η χορήγηση κρόκου (30 mg/ημερησίως για 12 μήνες) επέφερε την ίδια μείωση της γνωστικής επιδείνωσης με την χορήγηση 20 mg ημερησίως μεμαντίνης (μη συναγωνιστικός ανταγωνιστής των γλουταμινεργικών υποδοχέων τύπου NMDA που χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ήπιας ή μέτριας βαρύτητας νόσου του Alzheimer) (Farokhnia *et al.*, 2014). Τέλος, σε κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα βρέθηκε ότι από τους 35 ασθενείς διαγνωσθέντες με ήπια γνωστική δυσλειτουργία οι 17 ασθενείς που πήραν κρόκο για 12 μήνες είχαν βελτιωμένη γνωστική

λειτουργία σε σχέση με τους υπόλοιπους 18 ασθενείς στους οποίους δεν χορηγήθηκε κρόκος (Tsolaki *et al.*, 2016).

Επομένως, τα μέχρι τώρα κλινικά δεδομένα συγκλίνουν προς την ευεργετική δράση του κρόκου στις γνωστικές λειτουργίες ασθενών με νόσο του Alzheimer.

Δράση του κρόκου στον διαβήτη και την αθηροσκλήρωση

Ομοφωνία υπάρχει στις προκλινικές μελέτες σχετικά με την μείωση της γλυκόζης του αίματος σε διαβητικά πειραματόζωα. Αντίθετα, δύο κλινικές μελέτες προερχόμενες από διαφορετικές ομάδες ερευνητών στο Ιράν διαφωνούν ως προς την αντιδιαβητική δράση του κρόκου. Στην πρώτη μελέτη, συμμετείχαν 204 διαβητικοί ασθενείς οι οποίοι κατανάλωσαν τσάϊ με 1 g κρόκο για 8 εβδομάδες. Καμμία στατιστική διαφορά δεν βρέθηκε στην συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των ασθενών αλλά ούτε και σε άλλους μεταβολικούς δείκτες που ελέγχθηκαν (Azimi *et al.*, 2014). Αντίθετα, σε μια πρόσφατη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 54 ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, χορήγηση δισκίων κρόκου (15 mg 2 φορές ημερησίως) για το ίδιο χρονικό διάστημα, 8 εβδομάδων, μείωσε σημαντικά την γλυκόζη του αίματος χωρίς να επηρεάσει άλλους μεταβολικούς παράγοντες όπως λιπίδια του αίματος ή την αιμοσφαιρίνη (Milajerdi, Jazayeri, Hashemzadeh, *et al.*, 2018).

Είναι σαφές ότι περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών απαιτούνται για την διερεύνηση των επιδράσεων του κρόκου σε διαβητικούς ασθενείς. Η προστατευτική δράση του κρόκου στην υπερλιπιδαιμία και την αθηροσκλήρωση περιγράφεται σε πρόσφατη ανασκόπηση (Hatziahariou and Lambrou, 2018).

Δράση του κρόκου στην σεξουαλική δυσλειτουργία

Οι μελέτες που αφορούν στην επίδραση του κρόκου στη στυτική δυσλειτουργία ή σε παραμέτρους που αφορούν στην ποιότητα του σπέρματος προέρχονται όλες από ερευνητικές ομάδες του Ιράν.

Στην πρώτη μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση δισκίων κρόκου (200 mg ημερησίως) σε διάφορες παραμέτρους στυτικής λειτουργίας σε 20 ασθενείς με στυτική δυσλειτουργία. Τα αποτελέσματα της πιλοτικής αυτής μελέτης, που βασίσθηκαν σε διεθνώς αποδεκτό ερωτηματολόγιο δεικτών στυτικής λειτουργίας (International index of erectile function questionnaire, IIEF), έδειξαν ότι ακόμα και με χορήγηση κρόκου για 10 ημέρες παρουσιάσθηκε βελτίωση της στυτικής λειτουργίας με αύξηση του αριθμού και της διάρκειας των στύσεων (Shamsa *et al.*, 2009). Βελτίωση της στυτικής

δυσλειτουργίας παρατηρήθηκε σε τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη που διεξήχθη σε διαβητικούς ασθενείς οι οποίοι συμπλήρωσαν το ερωτηματολόγιο IIEF πριν και 1 μήνα μετά την τοπική εφαρμογή κρόκου υπό μορφή γέλης 1% ή εικονικού φαρμάκου (Mohammadzadeh-Moghadam *et al.*, 2015). Μια διαφορετική ομάδα Ιρανών ερευνητών διερεύνησε την επίδραση του κρόκου στη σεξουαλική δυσλειτουργία ανδρών (Modabbernia *et al.*, 2012) και γυναικών (Kashani *et al.*, 2013) που σχετίζεται με την αγωγή με φλουοξετίνη. Και στις δύο μελέτες χορηγήθηκαν δισκία κρόκου για 4 εβδομάδες (15 mg δύο φορές την ημέρα για τους άνδρες και 40 mg ημερησίως για τις γυναίκες) σε ασθενείς υπό αγωγή με φλουοξετίνη και τα αποτελέσματα, τα οποία εκτιμήθηκαν με βάση το ερωτηματολόγιο IIEF, έδειξαν ότι η χορήγηση κρόκου βελτιώνει σημαντικά την σεξουαλική δυσλειτουργία.

Αντίθετα με τις παραπάνω μελέτες, καμμία βελτίωση της στυτικής λειτουργίας, με βάση το ερωτηματολόγιο IIEF, δεν βρέθηκε σε διευρυμένη μελέτη που περιελάμβανε 346 άνδρες με στυτική δυσλειτουργία και στους οποίους χορηγήθηκε κρόκος υπό μορφή δισκίων (30 mg δύο φορές την ημέρα) για 12 εβδομάδες, ενώ στους ίδιους ασθενείς παρατηρήθηκε βελτίωση μετά τη χορήγηση σιλντεναφίλης (Viagra) (Safarinejad *et al.*, 2010). Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα ερευνητών παρουσίασαν αποτελέσματα σε 260 ασθενείς, με διαγνωσμένη ιδιοπαθή oligo-ασθενο-τερατοζωοσπερμία (oligoasthenoteratozoospermia, OAT), σύμφωνα με τα οποία η χορήγηση κρόκου (60 mg ημερησίως) για διάστημα 26 εβδομάδων δεν είχε καμμία διαφορά σε σύγκριση με την χορήγηση εικονικού φαρμάκου όσον αφορά σε διάφορους παραμέτρους της ποιότητας του σπέρματος (κινητικότητα, μορφολογία και πυκνότητα σπερματοζωαρίων) (Safarinejad *et al.*, 2011).

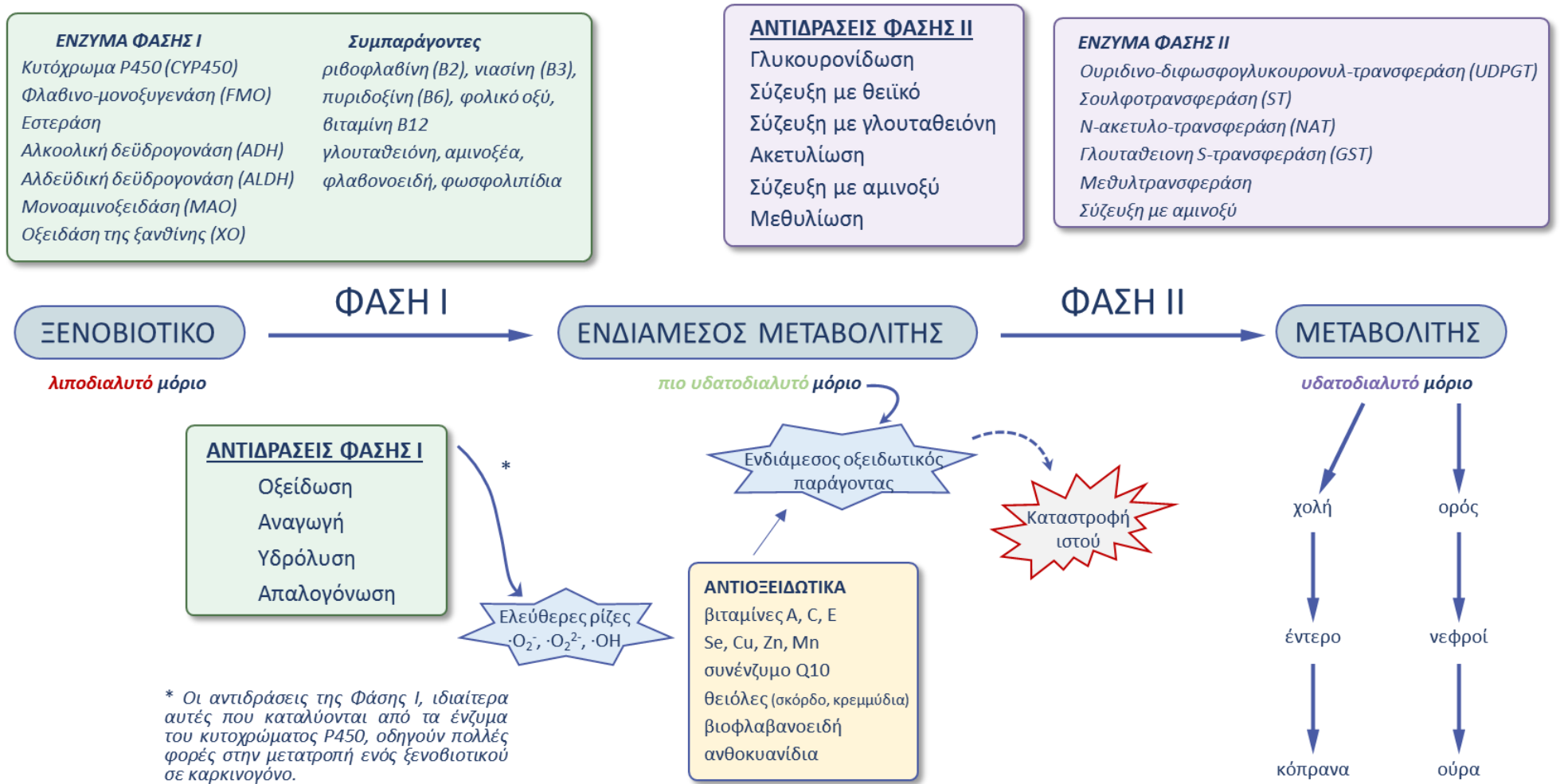
1.2 ΕΝΖΥΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων, συνίσταται στη βιομετατροπή τους από διάφορα ένζυμα με σκοπό την τροποποίηση της χημικής τους δομής ώστε αυτά να καθίστανται περισσότερο υδατοδιαλυτά και να μπορούν να αποβληθούν πιο εύκολα από τον οργανισμό (**Εικόνα 9**). Ως ξενοβιοτικά ορίζονται ουσίες ξένες προς τον οργανισμό και περιλαμβάνουν φάρμακα, μεταβολίτες φυτών ή μυκήτων που προσλαμβάνονται από τις τροφές, και μεγάλος αριθμός περιβαλλοντικών ρύπων όπως αλογονωμένοι ή πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, αρυλαμίνες, σύνθετα βιομηχανικά μείγματα, φυτοφάρμακα και πολλά άλλα (Nebert and Russell, 2002). Όσον αφορά τα φάρμακα, ο ρυθμός μεταβολισμού τους αποτελεί ένα σπουδαίο κεφάλαιο της Φαρμακολογίας καθώς ορίζει την διάρκεια και την ένταση της φαρμακολογικής τους δράσης. Σημαντικές είναι και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων καθώς αυτά αποτελούν όχι μόνο υποστρώματα, αλλά και επαγωγείς ή αναστολείς των ενζύμων μεταβολισμού. Το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο μεταβολισμού των ξενοβιοτικών.

Γενικά, οι αντιδράσεις μεταβολισμού ξενοβιοτικών χωρίζονται σε δύο φάσεις (**Εικόνες 9, 10; Πίνακας 2**):

1) Αντιδράσεις φάσης I: αφορούν την βιομετατροπή μιας ουσίας σε έναν περισσότερο πολικό μεταβολίτη με την εισαγωγή ή αποκάλυψη μιας λειτουργικής ομάδας (όπως -OH, -NH₂, -SH). Οι οξειδώσεις είναι οι πλέον συνήθεις αντιδράσεις και καταλύονται, κατά κύριο λόγο, από μία σημαντική κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται οξειδάσεις μικτής λειτουργίας (κυτόχρωμα P-450, Cytochrome P450, CYP). Στις αντιδράσεις της φάσης I περιλαμβάνονται, επίσης, οι αναγωγές και οι υδρολύσεις.

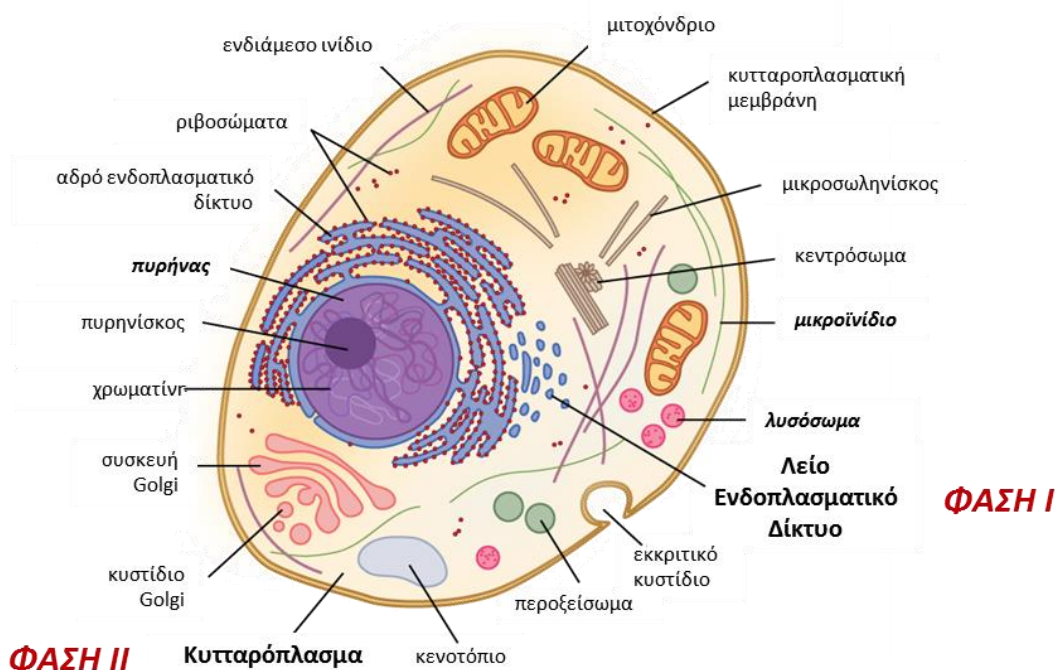
2) Αντιδράσεις φάσης II: ξενοβιοτικά ή μεταβολίτες οι οποίες δεν είναι επαρκώς πολικές μετά από τη βιομετατροπή τους από την φάση I του μεταβολισμού, προκειμένου να απεκκριθούν από τους νεφρούς, καθίστανται περισσότερο πολικές μετά από σύζευξη με ενδογενείς ουσίες του οργανισμού. Τα κυριότερα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται είναι η UDP-γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράσες (UGTs, σύζευξη με γλυκουρονικό), η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες (GSTs-σύζευξη με γλουταθειόνη), οι σουλφο-τρανσφεράσες (SULTs-σύζευξη μεθειϊκό), οι N-ακετυλο-τρανσφεράσες (NATs, σύζευξη με ακετυλομάδα), οι κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράσες (COMT, σύζευξη κατεχολαμινών με μεθυλομάδα) και οι S-μεθυλτρανσφεράσες των θειοπυρινών (TPMT, σύζευξη θειοπυρινών με μεθυλομάδα).



Εικόνα 9: Αντιδράσεις φάσης I και φάσης II μεταβολισμού των ξενοβιοτικών.

Πίνακας 2: Εντοπισμός ενζύμων Φάσης I και II.

| | ΕΝΖΥΜΑ ΦΑΣΗΣ I | ΕΝΖΥΜΑ ΦΑΣΗΣ II |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο</p> <p>μικροσώματα: κύρια εντόπιση μεταβολικών ενζύμων Φάσης I</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Κυτόχρωμα P450 ✓ φλαβινο-μονοοξυγενάση ✓ αλδεϋδο-οξειδάση ✓ καρβοξυλεστεράση ✓ υδρολάση του εποξειδίου ✓ συνθετάση των προσταγλανδινών ✓ εστεράση | <ul style="list-style-type: none"> ✓ ουριδινο-διφωσφογλυκουρονυλ- τρανσφεράση (UDPGT) ✓ γλουταθειονη S-τρανσφεράση (GST) ✓ σύζευξη με αμινοξύ |
| <p>Κυτταρόπλασμα κύρια εντόπιση μεταβολικών ενζύμων Φάσης II</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ αλκοολική δεϋδρογονάση (ADH) ✓ αλδεϋδική δεϋδρογονάση (ALDH) ✓ αλδεϋδική αναγωγάση ✓ υδρολάση του εποξειδίου ✓ εστεράση ✓ οξειδάση της ξανθίνης | <ul style="list-style-type: none"> ✓ σουλφοτρανσφεράση (ST) ✓ γλουταθειονη S-τρανσφεράση (GST) ✓ N-ακετυλο-τρανσφεράση (NAT) ✓ κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) ✓ σύζευξη με αμινοξύ |
| <p>Μιτοχόνδρια</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ μονοαμινοξειδάση (MAO) ✓ αλδεϋδική δεϋδρογονάση (ALDH) | <ul style="list-style-type: none"> ✓ N-ακετυλο-τρανσφεράση (NAT) ✓ σύζευξη με αμινοξύ |
| <p>Λυσοσώματα</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ πεπτιδάση | |
| <p>Πυρήνας (πυρηνική μεμβράνη κυττάρων ΓΕΣ)</p> | | <ul style="list-style-type: none"> ✓ ουριδινο-διφωσφογλυκουρονυλ- τρανσφεράση (UDPGT) |

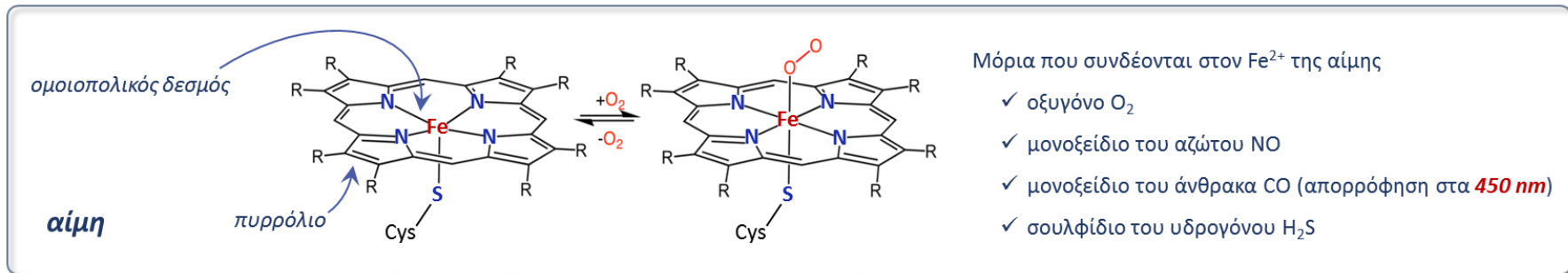
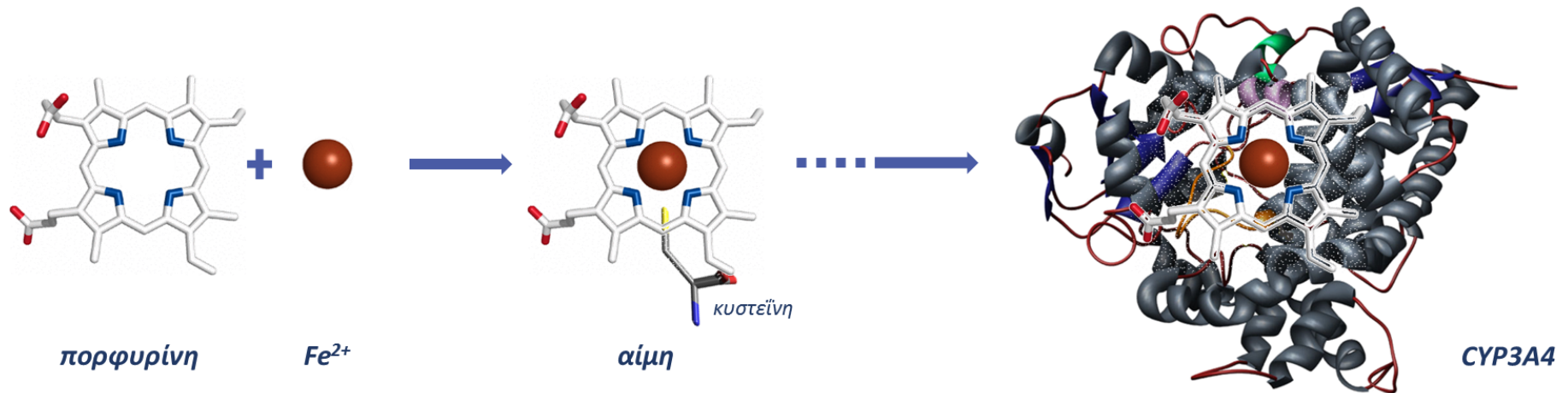


Εικόνα 10. Εντοπισμός ενζύμων Φάσης I και Φάσης II. Τα ένζυμα Φάσης I εντοπίζονται κυρίως στο Λείο Ενδοπλασματικό Δίκτυο, ενώ αυτά της Φάσης II στο κυτταρόπλασμα.

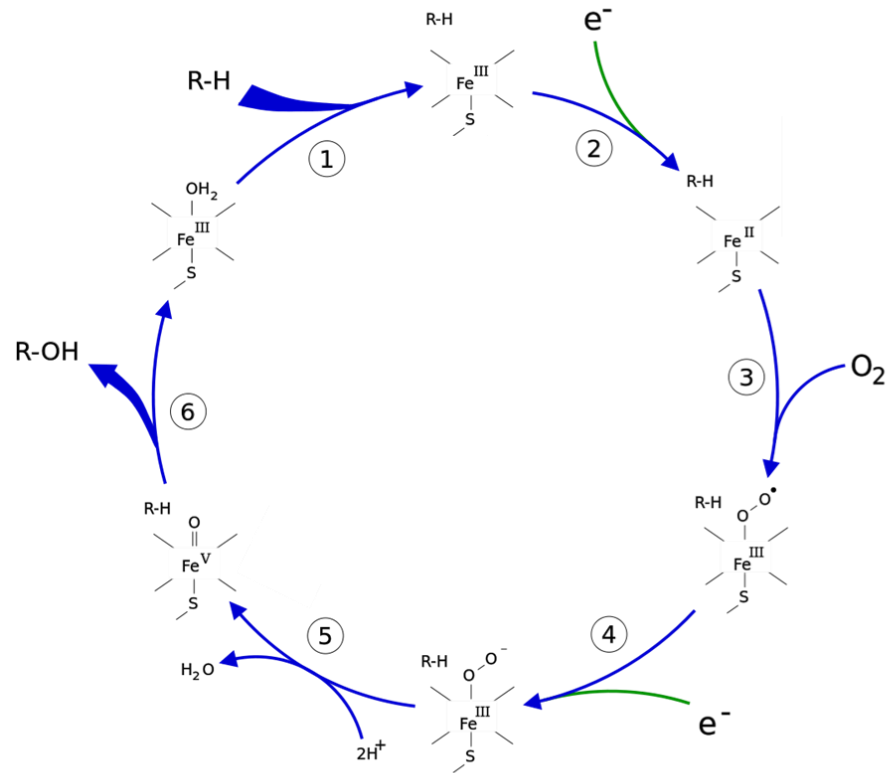
Παρακάτω γίνεται αναφορά στα ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών τα οποία θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, θα αναφερθούν από τα ένζυμα φάσης I τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 CYP1A2 και CYP2A6, καθώς και η οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO), ενώ από τα ένζυμα φάσης II η N-ακετυλο-τρανσφεράση NAT2.

Το κυτόχρωμα P450

Το κυτόχρωμα P450 (CYP) είναι μία υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών (**Εικόνα 11**), η οποία αποτελεί το τελευταίο συστατικό μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων τα οποία προέρχονται από το NADPH (**Εικόνα 12**). Το όνομα P450 οφείλεται στο γεγονός ότι παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm όταν συνδέεται με το CO. Η υπεροικογένεια αυτή των αιμοπρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού ενός μεγάλου φάσματος δομικώς διαφορετικών υποστρωμάτων και για την κατάλυση πολλών σημαντικών ενδογενών βιοχημικών διεργασιών στα θηλαστικά (Smith *et al.*, 1998). Το ποσοστό της ομοιότητας της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών του κυτοχρώματος P450 καθορίζει την διαίρεσή τους σε οικογένειες και υποοικογένειες. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων τους μεγαλύτερη από 40% και συμβολίζονται με αραβικό νούμερο (π.χ. CYP1). Στην ίδια υποοικογένεια ανήκουν ένζυμα των οποίων η ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων τους είναι μεγαλύτερη από 55% και συμβολίζονται με γράμμα (π.χ. CYP1A ή CYP1B) (Nebert and Russell, 2002). Οι 3 πρώτες οικογένειες (CYP1-3) εμπλέκονται, γενικώς, στον μεταβολισμό εξωγενών υποστρωμάτων, όπως είναι τα φάρμακα, ενώ οι οικογένειες CYP με μεγαλύτερους αριθμούς εμπλέκονται, συνήθως, στον μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων. Τα ένζυμα CYP ευθύνονται για το 75-80% του μεταβολισμού της φάσης I και για το 65-70% της κάθαρσης των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (Sim and Ingelman-Sundberg, 2010). Τα δομικώς σχετιζόμενα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 συνιστούν την οικογένεια του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP1. Τα ισόένζυμα αυτά παρουσιάζουν δομική (constitutive) έκφραση και επαγωγιμότητα. Τα CYP1A1 και CYP1B1 παρουσιάζουν 72% και 40% ομοιότητα με το CYP1A2, αντίστοιχα, όσον αφορά στην αλληλουχία των αμινοξέων τους.



Εικόνα 11: Δομή του κυτοχρώματος P450.



1: Σύνδεση του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου πλησίον του μορίου αίμης και σε σημείο αντιδιαμετρικό της πεπτιδικής αλυσίδας.

2: Η μεταβολή στην ηλεκτρονική κατάσταση του ενεργού κέντρου ευνοεί την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NAD(P)H. Αυτό συμβαίνει δια μέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και οδηγεί στην αναγωγή του σιδήρου από Fe^{3+} σε Fe^{2+} .

3: Μοριακό οξυγόνο συνδέεται ομοιοπολικά και σε αξονική θέση άπω στον σίδηρο της αίμης. Η κυστεΐνη είναι καλύτερος δότης ηλεκτρονίων από την ιστιδίνη και επομένως το O_2 ενεργοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλες αιμοπρωτεΐνες. Αυτό, όμως, έχει ενίοτε ως αποτέλεσμα την διάσπαση του δεσμού αυτού και την απελευθέρωση μιας ελεύθερης ρίζας υπεροξειδίου γεγονός το οποίο προκαλεί διακοπή του καταλυτικού κύκλου.

4: Ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων και οδηγεί στην αναγωγή της ρίζας του οξυγόνου σε μια ηλεκτραρνητική ρίζα υπεροξειδίου, ένα ενδιάμεσο προϊόν με μικρό χρόνο ζωής.

5: Η ομάδα υπεροξειδίου που σχηματίζεται στο βήμα 4 πρωτονιώνεται γρήγορα δύο φορές με μεταφορά H^+ από αμινοξέα πλευρικών αλυσίδων που ανευρίσκονται στο περιβάλλον της αντίδρασης ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται ένα μόριο H_2O και σχηματίζεται ένα εξαιρετικά δραστικό μόριο Fe^{V} -οξυγόνου.

6: Ανάλογα με το υπόστρωμα και το εμπλεκόμενο ένζυμο, τα ένζυμα P450 έχουν τη δυνατότητα να καταλύουν πολλές αντιδράσεις. Στο σχήμα παρουσιάζεται μια υδροξυλίωση. Αφού απελευθερωθεί το προϊόν μεταβολισμού από το ενεργό κέντρο, το ένζυμο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση ενώ ένα μόριο H_2O επιστρέφει και καταλαμβάνει την άπω θέση του πυρήνα του Fe.

Εικόνα 12: Ο καταλυτικός κύκλος του P450.

Το CYP εντοπίζεται στις μεμβράνες του Λείου Ενδοπλασματικού Δικτύου (Λ.Ε.Δ.) (**Εικόνα 10**) και τα υποστρώματά του είναι λιποδιαλυτές ενώσεις οι οποίες διαπερνούν το Λ.Ε.Δ. και εγκλωβίζονται σ' αυτό λόγω της λιποειδικής φύσης των μεμβρανών του. Μερικές από τις αντιδράσεις που καταλύει το σύστημα αυτό είναι απαραίτητες για τη ζωή, όπως η μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες, ο μεταβολισμός της βιταμίνης D₃, η ω-υδροξυλίωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση των χολικών οξέων, η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών από το αραχιδονικό οξύ και πιθανόν άλλες, μέχρι στιγμής άγνωστες, αντιδράσεις (Parke and Ioannides, 1981; Nebert and Russell, 2002). Άλλες πάλι αντιδράσεις του ίδιου συστήματος είναι σημαντικές για την αποτοξίνωση από ξένες προς τον οργανισμό ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) και για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. Υπολογίζεται ότι τα μισά συνήθη φάρμακα μεταβολίζονται κυρίως από τα ένζυμα του κυτοχρώματος. Το σύστημα P450, όμως, ευθύνεται και για την *in vivo* χημική ενεργοποίηση μερικών από τα πιο ισχυρά καρκινογόνα (Olson, 1994).

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος εντοπίζονται πρακτικά σε όλους τους ιστούς με μεγαλύτερη αφθονία, για τα περισσότερα από αυτά, στο ήπαρ έτσι ώστε να αποτελούν τελικά το 2% του συνόλου των μικροσωμικών πρωτεϊνών. Τα διάφορα ισοένζυμα εντοπίζονται σε ιστούς όπως το έντερο, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τα επινεφρίδια, τις γονάδες, την καρδιά, τους βλεννογόνους της μύτης και της τραχείας και στο δέρμα (Pelkonen *et al.*, 2008). Το CYP1A2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ, το CYP1A1 στους πνεύμονες, στο λάρυγγα, στα νεφρά, στα λεμφοκύτταρα και στον πλακούντα και το CYP1B1 στα νεφρά, στον προστάτη, στις ωοθήκες και στην μήτρα (Landi *et al.*, 1999).

Το κυτόχρωμα P4501A2 (cytochrome P1A2, CYP1A2)

Το CYP1A2 είναι ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ σε ποσοστό υψηλότερο του 10% του συνολικού περιεχομένου σε CYP (Pelkonen *et al.*, 2008). Το CYP1A2 είναι ένα σημαντικό ένζυμο του μεταβολισμού πολλών χημικών ουσιών. Είναι το κύριο ένζυμο μεταβολισμού της καφεΐνης αλλά και πολλών άλλων φαρμάκων (**Πίνακας 3**), ενώ συμμετέχει στον μεταβολισμό ενδογενών παραγόντων όπως της μελατονίνης προς 6-OH μελατονίνη (Facciola *et al.*, 2001) και της 17-β-οιστραδιόλης προς 2-OH και 4-OH παράγωγα (Yamazaki *et al.*, 1998). Επιπλέον, εμπλέκεται στη μετατροπή προκαρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνους μεταβολίτες. Τέτοιες ουσίες-υποστρώματα

του CYP1A2 είναι οι αρωματικές αμίνες και νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, οι N-ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες προκύπτουν από το ψήσιμο του κρέατος σε υψηλές θερμοκρασίες και στα κάρβουνα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) οι οποίοι ανευρίσκονται στο πετρέλαιο, στα κάρβουνα, στα αέρια των εξατμίσεων των αυτοκινήτων και στον καπνό του τσιγάρου (Butler *et al.*, 1992; Shimada *et al.*, 1994; Sinha *et al.*, 1994) καθώς και η καρκινογόνος μυκοτοξίνη αφλατοξίνη B1 (Gallagher *et al.*, 1994).

Γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ενδογενείς παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την δραστηριότητα του CYP1A2. Τα βασικά επίπεδα έκφρασής του ρυθμίζονται από έναν μηχανισμό, ενώ ένας δεύτερος μηχανισμός ρυθμίζει την επαγωγιμότητά του (Butler *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1994; Sinha *et al.*, 1994). Η επαγωγή του CYP1A2 είναι κυρίως μεταγραφική, εξαρτάται κυρίως από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων (Aryl hydrocarbon Receptor, AhR) και ξεκινά στο κυτταρόπλασμα με τη σύνδεση του επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα AhR. Το σύμπλοκο μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερές με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT). Το διμερές AhR-ARNT αλληλεπιδρά με έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξеноβιοτικά (Xenobiotic-Response Element, XRE) στην 5' περιοχή με συνέπεια την *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 μέσω αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου του CYP1A2 και της σύνθεσης του κατάλληλου m-RNA (Okey *et al.*, 2005). Η επαγωγή του CYP1A2 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μεταβολισμού των υποστρωμάτων του ενζύμου, στην περίπτωση, δε, των φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει μείωση των φαρμακολογικών τους δράσεων λόγω του αυξημένου μεταβολισμού τους. Επιπλέον, η επαγωγή μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ αποτοξίνωσης, λόγω της αύξησης του ρυθμού αποβολής επικίνδυνων για τον οργανισμό χημικών ουσιών, και τοξικότητας, λόγω της αύξησης ενεργοποίησης προκαρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνες ουσίες (Lin and Lu, 1998).

Η δραστηριότητα του CYP1A2 υπόκειται σε επαγωγή ή αναστολή από πλείστους παράγοντες. Γνωστοί επαγωγείς του CYP1A2 είναι τα φάρμακα ομεπραζόλη (Diaz *et al.*, 1990), φαινυτοΐνη (Wietholtz *et al.*, 1995) και ριφαμπικίνη (Wietholtz *et al.*, 1995) (**Πίνακας 3**), το κάπνισμα (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999; Begas *et al.*, 2007, 2015) και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους όπως πολυβρωμιωμένα διφαινόλια (Landi *et al.*, 1999). Επίσης, επαγωγή του CYP1A2 μπορεί να παρατηρηθεί και μετά από κατανάλωση καφέ (Tantcheva-Poór *et al.*, 1999) ή διαφόρων τροφών όπως είναι το κρέας που έχει ψηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες ή στα κάρβουνα (Sinha *et al.*, 1994), τα σταυρανθή

λαχανικά τα οποία περιέχουν ινδολ-3-καρβινόλη (μπρόκολο, λάχανο, κουνουπίδι) (Vistisen *et al.*, 1992; Kall *et al.*, 1996; Lampe *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2009), αν και υπάρχει μελέτη που δεν υποστηρίζει την επαγωγή του CYP1A2 από τα σταυρανή λαχανικά (V. Perera *et al.*, 2012).

Γνωστοί αναστολείς του CYP1A2 είναι φάρμακα όπως το αντικαταθλιπτικό φλουβοξαμίνη (εκλεκτικός αναστολέας της επαναπρόσληψης σεροτονίνης) (van Harten, 1995; Rasmussen *et al.*, 1998), τα αντιαρρυθμικά φάρμακα μεξιλετίνη (Joeres and Richter, 1987) και βεραπαμίλη (Fuhr, Woodcock, *et al.*, 1992), η φουραφυλλίνη (Eaton *et al.*, 1995), το αντιψωριασικό 5-μεθοξυψωραλένιο (Bendriss *et al.*, 1996), οι κινολόνες (Fuhr, Anders, *et al.*, 1992), η σιμετιδίνη (αναστολέας των H₂ ισταμινεργικών υποδοχέων) (Loi *et al.*, 1993), τα αντιμυκητιασικά κετοконаζόλη και τερβιναφίνη (Wahlländer and Paumgartner, 1989), καθώς και τα οιστρογόνα που χρησιμοποιούνται ως αντισυλληπτικά και ως θεραπεία υποκατάστασης στην εμμηνόπαυση (Vistisen *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 1999) (**Πίνακας 3**). Γνωστή είναι, επίσης, η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 μετά από την κατανάλωση χυμού grape-fruit (Fuhr and Kummert, 1995) και αλκοόλ (Le Marchand *et al.*, 1997). Μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί στην εγκυμοσύνη (Tsutsumi *et al.*, 2001) και στην ηπατική νόσο (Lelouët *et al.*, 2001). Επίσης, μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει αναφερθεί στις γυναίκες (Relling *et al.*, 1992; Carrillo and Benítez, 1994) και τους ηλικιωμένους (Bebia *et al.*, 2004; Parkinson *et al.*, 2004), αν και οι μελέτες δεν είναι καταληκτικές λόγω του μικρού αριθμού συμμετεχόντων και της μεγάλης διακύμανσης του ενζύμου. Πράγματι η λειτουργικότητα του CYP1A2 παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων, αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου του ανθρώπινου CYP1A2 και του μεταβολικού φαινοτύπου του ενζύμου αυτού (Jiang *et al.*, 2006), παρά τα 40 σημεία πολυμορφισμού που έχουν περιγραφεί εντός και πλησίον του γονιδίου στον άνθρωπο (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>). Ο πλέον μελετημένος μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP) είναι ο C>A με υποκατάσταση στη θέση -163 (rs762551) που εμφανίζεται στο 71% του Καυκάσιου πληθυσμού (Sachse *et al.*, 2003) και σχετίζεται με αυξημένη επαγωγιμότητα του ενζύμου (Sachse *et al.*, 1999).

Επιδημιολογικά, αυξημένη δραστηριότητας του CYP1A2 συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου (Lang *et al.*, 1994), της ουροδόχου κύστης (Tao *et al.*, 2012) και του μαστού (Hong *et al.*, 2004), ενώ μείωση της δραστηριότητας με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων (Vistisen *et al.*, 2004).

Πίνακας 3: Φάρμακα - υποστρώματα, επαγωγείς και αναστολείς του CYP1A2.

| ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ | |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Αντικαταθλιπτικά (τρικυκλικά) | |
| αμιτριπτιλίνη | (Venkatakrisnan <i>et al.</i> , 1998) |
| χλωμιπραμίνη | (Nielsen <i>et al.</i> , 1996) |
| ιμιπραμίνη | (Lemoine <i>et al.</i> , 1993) |
| μιανσερίνη | (Koyama <i>et al.</i> , 1996) |
| Αντιψυχωσικά | |
| κλοζαπίνη | (Bertilsson <i>et al.</i> , 1994) |
| Φάρμακα του καρδιαγγειακού & αντιπηκτικά | |
| λιδοκαΐνη | (Wang <i>et al.</i> , 2000; Orlando <i>et al.</i> , 2004) |
| προπρανολόλη | (Yoshimoto <i>et al.</i> , 1995) |
| τριαμτερένη | (Fuhr <i>et al.</i> , 2005) |
| βαρφαρίνη | (Limke <i>et al.</i> , 2002) |
| Αναστολείς χολινεστεράσης | |
| τακρίνη | (Spaldin <i>et al.</i> , 1995) |
| Αντιασθματικά | |
| θεοφυλλίνη | (Gu <i>et al.</i> , 1992) |
| Διεγερτικά του ΚΝΣ | |
| καφεΐνη | (Gu <i>et al.</i> , 1992) |
| ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ | |
| Αναστολείς αντλίας πρωτονίων | |
| ομεπραζόλη | (Diaz <i>et al.</i> , 1990) |
| Αντιφυματικά | |
| ριφαμπικίνη | (Wietholtz <i>et al.</i> , 1995) |
| Αντιεπιληπτικά | |
| φαινυτοΐνη | (Wietholtz <i>et al.</i> , 1989) |
| ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ | |
| Αντικαταθλιπτικά | |
| φλουβοξαμίνη | (van Harten, 1995; Rasmussen <i>et al.</i> , 1998) |
| Φάρμακα του καρδιαγγειακού | |
| μεξιλετίνη | (Joeres and Richter, 1987) |
| βεραπαμίλη | (Fuhr, Woodcock, <i>et al.</i> , 1992) |
| Αντιασθματικά | |
| φουραφυλλίνη | (Eaton <i>et al.</i> , 1995) |
| Αντιψωριακά | |
| 5-μεθοξυψωραλένιο | (Bendriss <i>et al.</i> , 1996) |
| Αντιμικροβιακά | |
| κινολόνες | (Fuhr, Anders, <i>et al.</i> , 1992) |
| Ανταγωνιστές H₂ υποδοχέων ισταμίνης | |
| σιμετιδίνη | (Loi <i>et al.</i> , 1993) |
| Αντιμυκητιασικά | |
| κετοконаζόλη | (Wahlländer and Paumgartner, 1989) |
| τερβιναφίνη | (Wahlländer and Paumgartner, 1989) |
| Αντισυλληπτικά & Θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων | |
| | (Vistisen <i>et al.</i> , 1992; Pollock <i>et al.</i> , 1999) |

Το κυτόχρωμα P4502A6 (cytochrome P 2A6, CYP2A6)

Το κυτόχρωμα CYP2A6 ανήκει στην οικογένεια του γονιδίου CYP2, την μεγαλύτερη οικογένεια P450 στα θηλαστικά (Pelkonen *et al.*, 2008) και εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ αποτελώντας το 1-10% του συνολικού P450, αλλά ανιχνεύεται και στο βλεννογόνο της μύτης (Pelkonen *et al.*, 2000). Είναι υπεύθυνο για τη βιομετατροπή (N-οξειδωση) της νικοτίνης σε κοτινίνη (Messina *et al.*, 1997) αλλά και για την 3-υδροξυλίωση της κοτινίνης (Nakajima *et al.*, 1996), καθώς και για τον μεταβολισμό περίπου του 3% των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα όπως είναι η κουμαρίνη (Pelkonen *et al.*, 2000) το βαλπροϊκό οξύ, η πιλοκαρπίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, η ταμοξιφαίνη και η προποφόλη (Di *et al.*, 2009). Επίσης, είναι υπεύθυνο για την μεταβολική ενεργοποίηση διαφόρων προμεταλλαξιογόνων και προκαρκινογόνων όπως η αφλατοξίνη B1 (Oscarson, 2001) και η 3-μεθυλινδόλη (Thornton-Manning *et al.*, 1996), καθώς και ορισμένων νιτροζαμινών του καπνού και των τροφών όπως είναι η N-νιτροζο-διαιθυλαμίνη και η 4-(μεθυλνιτροζάμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (Camus *et al.*, 1993).

Η δραστηριότητα του CYP2A6 επάγεται από φάρμακα όπως τα αντιεπιληπτικά φαινυτοΐνη, καρβαμαζεπίνη, κλοναζεπάμη και φαινοβαρβιτάλη (Sotaniemi *et al.*, 1995), αλλά και από τα βαρβιτουρικά (Nowell *et al.*, 2002a). Η επαγωγή του CYP2A6 αποδίδεται στην πρόσδεση του επαγωγικού παράγοντα με τον πυρηνικό υποδοχέα πρεγνανίου X (Pregnane X Receptor, PXR). Το σύμπλοκο σχηματίζει ετεροδιμερή τα οποία αλληλεπιδρούν με ενεργοποιητές που προσδέονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου (Pregnane X Receptor Response Element, PXRRE) και πυροδοτούν τον μεταγραφικό μηχανισμό (Pavek and Dvorak, 2008). Αντίθετα, η δραστηριότητα του CYP2A6 αναστέλλεται από το 8-μεθοξυψωραλένιο (ισχυρός αναστολέας), από τα φάρμακα πιλοκαρπίνη, τρανυλκυπρομίνη και κετοκοναζόλη (Draper *et al.*, 1997), όπως επίσης και από τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο χυμό του γκρέϊπ-φρούτ (ασθενείς αναστολείς) (Pelkonen *et al.*, 2000).

Αντίθετα με το CYP1A2, το κάπνισμα δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα του CYP2A6 (Nowell *et al.*, 2002a; Begas *et al.*, 2007; Sinues *et al.*, 2008). Όσον αφορά στο φύλο, έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα του CYP2A6 δεν διαφέρει μεταξύ ανδρών και γυναικών (Begas *et al.*, 2007). Ωστόσο, ο μεταβολισμός της νικοτίνης (Zeman *et al.*, 2002; Benowitz *et al.*, 2006), της καφεΐνης (Nowell *et al.*, 2002a) και της κουμαρίνης (Rautio *et al.*, 1992) φαίνεται να είναι υψηλότερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Επίσης, βρέθηκε ότι η έκφραση του CYP2A6 στο ήπαρ είναι υψηλότερη στις γυναίκες (Yang *et al.*, 2012) υποδηλώνοντας φυλετικό διμορφισμό στον CYP2A6-διαμεσολαβούμενο

μεταβολισμό πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκονται τα οιστρογόνα (Benowitz *et al.*, 2006).

Αυξημένη έκφραση του CYP2A6 έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε περιπτώσεις έκθεσης σε αφλατοξίνη (Kirby *et al.*, 1993), καθώς και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ορθού (Nowell *et al.*, 2002a).

Το CYP2A6 είναι πολυμορφικό ένζυμο με 90 αλληλόμορφα να έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2A6>). Τα αλληλόμορφα CYP2A6*2, CYP2A6*3, CYP2A6*4 και CYP2A6*5 κωδικοποιούν ανενεργή μορφή του ενζύμου και η συχνότητά τους κυμαίνεται 0-3% μεταξύ των Ευρωπαίων. Πολλά από τα αλληλόμορφα που έχουν ταυτοποιηθεί πρόσφατα, και τα οποία συνδέονται με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου, εμφανίζονται σε αфро-αμερικάνους (Fukami *et al.*, 2005; Piliguiian *et al.*, 2014) αλλά όχι σε καυκάσιους πληθυσμούς. Επίσης, ένα σημαντικό ποσοστό Ιαπώνων χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης (Shimada *et al.*, 1996), εύρημα που συνάδει με την υψηλή συχνότητα απαλοιφής του γονίδιου του CYP2A6 στον ιαπωνικό πληθυσμό (Nunoya *et al.*, 1998). Αλληλόμορφα όπως τα CYP2A6*9 και CYP2A6*12, τα οποία ευθύνονται για την μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου, απαντώνται με συχνότητα 2,2-5,2% στον Καυκάσιο πληθυσμό (Oscarson, 2001; von Richter *et al.*, 2004). Γενικά, λόγω της χαμηλής συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών στον καυκάσιο πληθυσμό και του περιορισμένου ρόλου του CYP2A6 στο μεταβολισμό των φαρμάκων η διερεύνηση του γονότυπου στην φαινοτυπική έκφραση του ενζύμου δεν θεωρείται σημαντική.

Η οξειδάση της ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO)

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι διαλυτό ένζυμο του κυτταροπλάσματος. Η XO είναι φλαβοπρωτεΐνη με μολυβδένιο και σίδηρο στο ενεργό της κέντρο έχει μέγιστη δραστηριότητα στο ήπαρ και στο έντερο (Krenitsky *et al.*, 1974), ενώ αφθονεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο (Kooij *et al.*, 1992; Aranda *et al.*, 2007). Είναι ένζυμο υπεύθυνο για την οξειδωση ενδογενών ενώσεων όπως είναι οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες καθώς καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης προς ξανθίνη και της ξανθίνης προς ουρικό οξύ στους νεφρούς και στο ήπαρ (Harrison, 2002). Επίσης, η XO συμμετέχει στον μεταβολισμό φαρμάκων όπως οι θειοπουρίνες μερκαπτοπουρίνη και αζαθειοπρίνη και στον μεταβολισμό των μεθυλοξανθινών όπως η καφεΐνη (Guerciolini *et al.*, 1991).

Αν και η ΧΟ δεν θεωρείται πολυμορφικό ένζυμο, η λειτουργικότητά της έχει εύρος 2-4 φορές στους ενήλικες (Guerciolini *et al.*, 1991). Μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς της Αιθιοπίας (4%) (Aklillu *et al.*, 2003), από της Ιαπωνίας (11%) (Saruwatari *et al.*, 2002) και της Ισπανίας (4%) (Carrillo and Benítez, 1994). Πρόσφατα έχουν αναφερθεί πάνω από 100 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο του ΧΟ (Scheepers *et al.*, 2016), μολονότι δεν φαίνεται οι πολυμορφισμοί αυτοί να επηρεάζουν την δραστηριότητα του ενζύμου. Ωστόσο, δύο μεταλλάξεις στο γονίδιο της Δεϋδρογονάσης της Ξανθίνης οδηγούν σε έλλειψη του ενζύμου και είναι υπεύθυνες για την αυτόσωμη υπολειπόμενη διαταραχή γνωστή ως ξανθινουρία που είναι μια σπάνια κληρονομική νόσος (Guerciolini *et al.*, 1991; Levartovsky *et al.*, 2000). Σε άτομα που πάσχουν από αυτή την σπάνια γενετική διαταραχή, δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα του ενζύμου ξανθινοξειδάση, με συνέπεια να δυσχεραίνεται ο μεταβολισμός της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ξανθίνης στο αίμα και τα αυξημένα επίπεδά της στα ούρα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό λίθων ξανθίνης στους νεφρούς. Γενικά, η δραστηριότητα της ΧΟ, όπως αυτή προσδιορίζεται φαινοτυπικά με την καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτη, ακολουθεί κανονική κατανομή στον καυκάσιο πληθυσμό (Djordjevic *et al.*, 2010) υποδηλώνοντας ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο του ενζύμου δεν έχουν επίπτωση στην λειτουργικότητα του ενζύμου.

Το κάπνισμα, το αλκοόλ και το φύλο δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστηριότητα της ΧΟ (Guerciolini *et al.*, 1991; Kalow and Tang, 1991; Chung *et al.*, 2000; Aklillu *et al.*, 2003). Η αλλοπουρινόλη αναστέλλει την ΧΟ, ενώ η ιντερφερόνη-γ, ο TNF-α και η ιντερλευκίνη-1β την επάγουν (Harrison, 2002).

H N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (N-acetyltransferase-2, NAT2)

Η N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT2) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (αντιδράσεις σύζευξης) και εντοπίζεται στο ήπαρ και στην βλεννογόνο της νήστιδας, σε αντίθεση με το NAT1 η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (Blum *et al.*, 1990). Η NAT2 καταλύει την μεταφορά μιας ακετυλοομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο-A σε ένα άτομο αζώτου υποστρωμάτων όπως οι αρυλαμίνες και οι ετεροκυκλικές αμίνες και σε ένα άτομο οξυγόνου υποστρωμάτων όπως οι αρυλδροξυλαμίνες (Hein *et al.*, 1993). Είναι πιθανόν ότι η N-ακετυλίωση αδρανοποιεί τις ενώσεις, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση του οργανισμού (Gu *et al.*, 2005), ενώ η O-

ακετυλίωση τις ενεργοποιεί προς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να επιδράσουν στο DNA και να πυροδοτήσουν την καρκινογένεση (Mitchell and Warshawsky, 2003). Εμπλέκεται, επίσης, στην ακετυλίωση πολλών φαρμάκων όπως είναι η δαψόνη, η ισονιαζίδη, η καφεΐνη, οι σουλφοναμίδες, η κλοναζεπάμη, η προκαΐναμίδη και άλλες (Evans, 1989). Θεωρείται πως η NAT2 συμμετέχει στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών, ενώ η NAT1, της οποίας η πρωτεϊνική αλληλουχία είναι ταυτόσημη κατά 81% με αυτήν της NAT2, συμμετέχει στον μεταβολισμό ενδογενών ουσιών όπως το φολικό οξύ (Boukounala and Sim, 2005).

Η δραστηριότητα της NAT2 δεν φαίνεται να επηρεάζεται από παράγοντες όπως το κάπνισμα (Le Marchand *et al.*, 1996; Saruwatari *et al.*, 2002; Benowitz *et al.*, 2003; Begas *et al.*, 2007), την ηλικία (Relling *et al.*, 1992) ή το φύλο (Tang *et al.*, 1991; Relling *et al.*, 1992; Saruwatari *et al.*, 2002). Αντίθετα, η δραστηριότητα του NAT2 παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων η οποία αντικατοπτρίζεται στην ύπαρξη δικόρυφης ή τρικόρυφης πληθυσμιακής κατανομής και ταξινομεί τα άτομα του πληθυσμού σε αργούς, ενδιάμεσους και βραδείς ακετυλιωτές (Kilbane *et al.*, 1990; Parkin *et al.*, 1997; Begas *et al.*, 2007). Η φαινοτυπική αναλογία μεταξύ βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εθνών με τον φαινότυπο του βραδέως ακετυλιωτή να κυριαρχεί στην Βόρεια Αφρική (~90%) και την Σκανδιναβία (~75-80%). Αντίθετα, οι Ιάπωνες και οι Εσκιμώοι του Καναδά παρουσιάζουν χαμηλό (~5%) ποσοστό βραδέων ακετυλιωτών, ενώ στους Καυκάσιους και τους Αφροαμερικάνους η αναλογία είναι ~60-40% (Chen *et al.*, 1998; Slattery *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Begas *et al.*, 2007). Η φυλετική αυτή οφείλεται σε γενετικούς παρά σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Dupret and Rodrigues-Lima, 2005), καθώς έχουν ταυτοποιηθεί 107 αλληλόμορφα της NAT2 τα οποία προκύπτουν από τον συνδυασμό 43 σημειακών μεταλλάξεων (Rodrigues-Lima *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2012).

Η ύπαρξη πολυμορφισμού της ακετυλίωσης και η φαινοτυπική έκφρασή του σε βραδείς και ταχείς ακετυλιωτές έχει επιπτώσεις στην κλινική πράξη. Έτσι, η χορήγηση φαρμάκων, των οποίων η κάθαρση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακετυλίωση, μπορεί να προκαλέσει σε βραδείς ακετυλιωτές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως στην περίπτωση της ισονιαζίδης σε ασθενείς με φυματίωση οι οποίοι μπορεί να εμφανίσουν περιφερική νευροπάθεια και ηπατοτοξικότητα ή σε ασθενείς που λαμβάνουν ισονιζίδη, προκαΐναμίδη ή υδραλαζίνη οι οποίοι μπορεί να εμφανίσουν συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (Sim *et al.*, 2008). Αντίθετα, ταχείς ακετυλιωτές μπορεί να παρουσιάσουν μη

θεραπευτικό αποτέλεσμα και υποτροπή της νόσου όπως στην περίπτωση της ισονιαζίδης σε ασθενείς με φυματίωση (Evans, 1989).

Επιδημιολογικά, οι φαινότυποι των ταχέων και των βραδέων ακετυλιωτών σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης συγκεκριμένων νεοπλασμάτων. Σε καρκίνους, όπως στον εξαρτώμενο από αρωματικές αμίνες καρκίνο της ουροδόχου κύστης, όπου η Ν-ακετυλίωση αποτελεί το μονοπάτι αποτοξίνωσης, ο φαινότυπος του βραδέως ακετυλιωτή βρίσκεται σε μεγαλύτερο κίνδυνο ειδικά στους καπνιστές και σ' αυτούς που εκτίθενται επαγγελματικά σε καρκινογενείς αρωματικές αμίνες (Yuan *et al.*, 2008). Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη συχνότητα βραδέων ακετυλιωτών μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα σε σχέση με τους υγιείς (Casorbi *et al.*, 1996). Ο φαινότυπος και ο γονότυπος του ταχέως ακετυλιωτή απαντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο και αδένωμα του παχέος εντέρου και ειδικότερα σ' αυτούς που καταναλώνουν κρέας ψημένο σε υψηλές θερμοκρασίες, πιθανώς λόγω της υψηλότερης έκθεσης σε καρκινογόνα ετεροκυκλικών αμινών (Hein, 2000; Voutsinas *et al.*, 2013). Έχει αναφερθεί ότι η συσχέτιση των ασθενειών με το φαινότυπο της NAT-2 είναι πιο ισχυρή στους καπνιστές από τους μη καπνιστές (Ambrosone *et al.*, 1996). Επομένως, η εμφάνιση ορισμένων καρκίνων σε διαφορετικούς πληθυσμούς μπορεί να εξηγηθεί, τουλάχιστον μερικώς, με τον συνδυασμό του γονότυπου του ενζύμου και της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

1.3 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ *IN VIVO* ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ

Γενικά, η διαδικασία φαινοτυπικού προσδιορισμού ενός ενζύμου περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: (1) τη χορήγηση μικρών δόσεων ενός φαρμάκου-δείκτη που θα χρησιμοποιηθεί ως μέσον μέτρησης, (2) την μέτρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου ή των μεταβολιτών του σε κάποιο βιολογικό υγρό (πλάσμα, ούρα, σίελος), (3) τον υπολογισμό κάποιου μεταβολικού λόγου με τη βοήθεια κάποιου μαθηματικού τύπου, και (4) τη συσχέτιση της τιμής του μεταβολικού λόγου με την δραστηριότητα του προς εξέταση ενζύμου η οποία είναι γνωστή ήδη από την βιβλιογραφία (Keller *et al.*, 2017). Η πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ενός ενζύμου είναι η κάθαρση του φαρμάκου-δείκτη ή των μεταβολιτών του και αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή απαιτεί μετρήσεις σε πολλαπλές χρονικές στιγμές, με αντίστοιχες αιμοληψίες, γεγονός που την καθιστούν πολύπλοκη, δύσκολη και επεμβατική. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται μεταβολικοί δείκτες, δηλαδή πολύπλοκοι μαθηματικοί τύποι οι οποίοι συσχετίζουν τους μεταβολίτες με την αρχική ουσία, γνωστοί και ως μεταβολικοί λόγοι.

Από την φύση του, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός ενός ενζύμου παρέχει μόνο εκτίμηση της δραστηριότητάς του (Tucker *et al.*, 1998). Μία υποψήφια μέθοδος προσδιορισμού του φαινότυπου θα πρέπει να αντανακλά την πραγματική δραστηριότητα του ενζύμου και δεν θα πρέπει να επηρεάζεται από άλλους παράγοντες. Διάφορα κριτήρια έχουν προταθεί για την εγκυρότητα μεθόδων φαινοτυπικού προσδιορισμού ενζύμων του ήπατος (Watkins, 1994; Zaigler *et al.*, 2000) και σε γενικές γραμμές διαμορφώνονται ως εξής: *i)* θα πρέπει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μεθόδου και της δραστηριότητας του ενζύμου *in vitro*, *ii)* η μέθοδος θα πρέπει να προβλέπει ορθώς την δραστηριότητα του ενζύμου σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς, *iii)* η μέθοδος θα πρέπει να αντανακλά την αναστολή ή επαγωγή του ενζύμου από διάφορους παράγοντες (έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, διατροφή, φάρμακα), *iv)* τα αποτελέσματα της μεθόδου θα πρέπει να είναι αναπαραγώγιμα και να μην επηρεάζονται από άλλους παράγοντες. Επιπλέον, η μέθοδος θα πρέπει να είναι κατά το δυνατόν μη επεμβατική, να μπορεί να υλοποιηθεί σχετικά εύκολα σε εθελοντές, να είναι χαμηλού κόστους και να χαρακτηρίζεται από αναπαραγώγιμη και εύκολη αναλυτική διαδικασία (Faber *et al.*, 2005).

Καφεΐνη

Η καφεΐνη αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο ψυχοδιεγερτικό φάρμακο παγκοσμίως (Reyes and Cornelis, 2018). Ανευρίσκεται στις τροφές είτε ως φυσικό συστατικό στον καφέ, το τσάι και στη σοκολάτα είτε ως προϊόν προσθήκης σε διάφορα τρόφιμα και ενεργειακά ποτά (Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks - Zucconi - 2013 - EFSA Supporting Publications - Wiley Online Library, n.d.). Η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση σε κατανάλωση καφεΐνης υπό την μορφή του ροφήματος καφέ (Reyes and Cornelis, 2018).

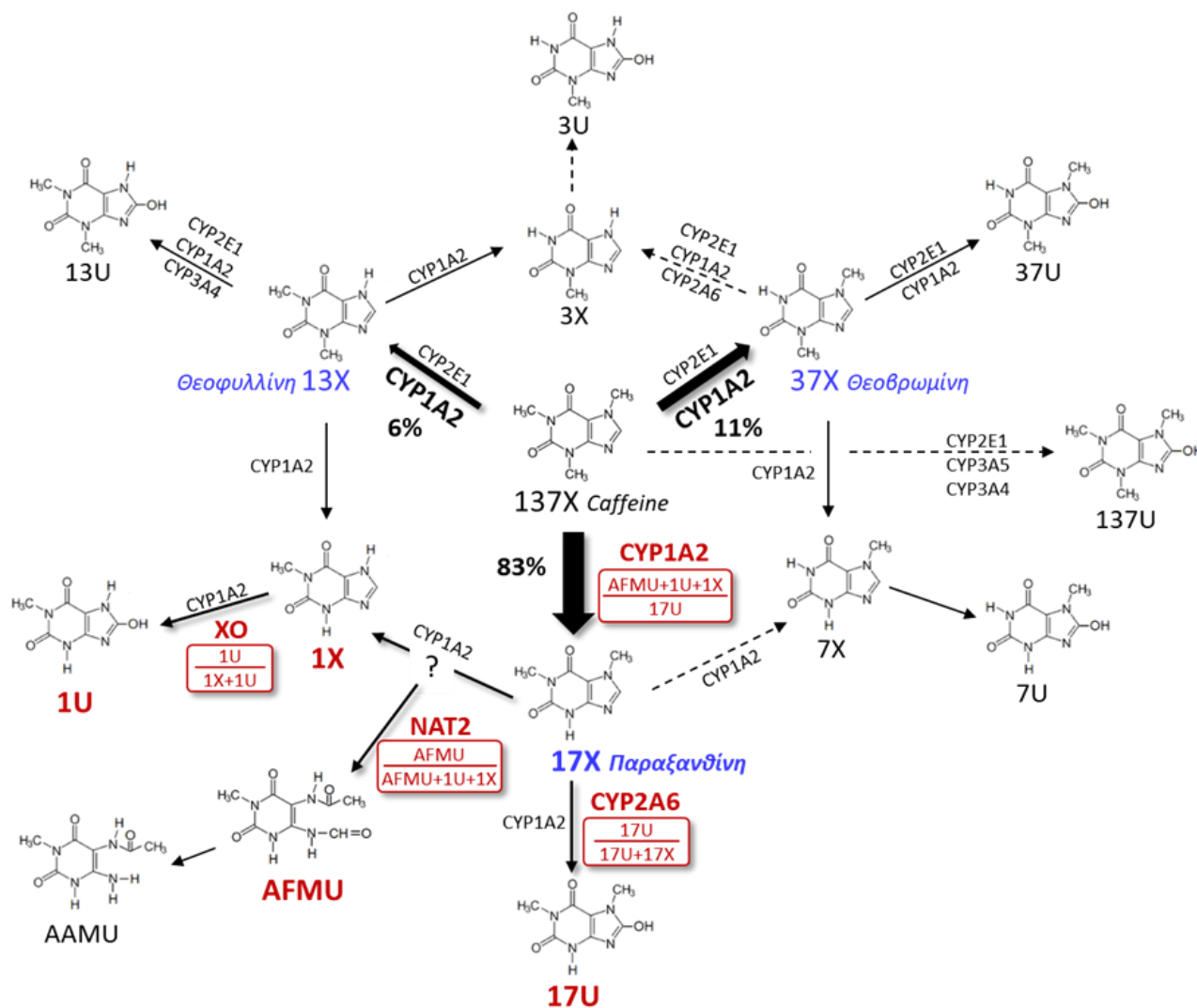
Η καφεΐνη είναι ένα αλκαλοειδές παράγωγο της ξανθίνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) το οποίο επηρεάζει αρκετά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού μέσω μη-εκλεκτικού ανταγωνισμού των A_1 και A_{2A} υποδοχέων της αδενοσίνης, αναστολής της φωσφοδιεστεράσης και σταθεροποίησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Nehlig *et al.*, 1992; Ferré, 2016). Η κατανάλωση καφεΐνης προκαλεί διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος η οποία εκδηλώνεται με βελτίωση της διάθεσης, καταπολέμηση της υπνηλίας και εγρήγορση, μείωση του αισθήματος της κόπωσης και αύξηση της ικανότητας για εργασία. Κατανάλωση καφεΐνης μέχρι 400 mg την ημέρα θεωρείται ασφαλής καθώς δεν σχετίζεται με ανεπιθύμητες ενέργειες (Nawrot *et al.*, 2003; Wikoff *et al.*, 2017), ενώ μετά από κατανάλωση υψηλών δόσεων εκδηλώνεται με ανησυχία, ευερεθιστότητα, μυϊκό τρόμο, κρίσεις και παραλήρημα. Κατανάλωση καφεΐνης μπορεί να επιφέρει συμπτώματα από το καρδιαγγειακό σύστημα, που ποικίλουν από μικρή αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της αρτηριακής πίεσης έως καρδιακές αρρυθμίες, από το γαστρεντερικό σύστημα, με την εμφάνιση ναυτίας, εμέτων και διάρροιας και από το ουροποιητικό σύστημα, με αύξηση της διούρησης (Nawrot *et al.*, 2003).

Η απορρόφηση της καφεΐνης μετά από του στόματος χορήγηση είναι ταχεία και η βιοδιαθεσιμότητά της είναι σχεδόν πλήρης (70-100%) με χρόνο μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα (T_{max}) 30'-120' (Blanchard and Sawers, 1983; Kamimori *et al.*, 2002). Ο χρόνος ημίσειας ζωής υπολογίζεται από 1,2 έως 9,9 ώρες υποδηλώνοντας μεγάλη διακύμανση της αποβολής της μεταξύ των ατόμων (Blanchard and Sawers, 1983; Martínez-López *et al.*, 2014).

Ο μεταβολισμός της καφεΐνης στον άνθρωπο καταλύεται κυρίως από το CYP1A2 και περιλαμβάνει N-1, N-3 και N-7 απομεθυλιώσεις της 1,3,7-τριμεθυλοξανθίνης προς θεοβρωμίνη (3,7-διμεθυλοξανθίνη, 37X), παραξανθίνη (1,7-διμεθυλοξανθίνη, 17X) και θεοφυλλίνη (1,3-διμεθυλοξανθίνη, 13X), αντίστοιχα. Οι απομεθυλιώσεις αυτές ευθύνονται για το 80, 11 and 4% περίπου του μεταβολισμού της καφεΐνης (**Εικόνα 13** ,

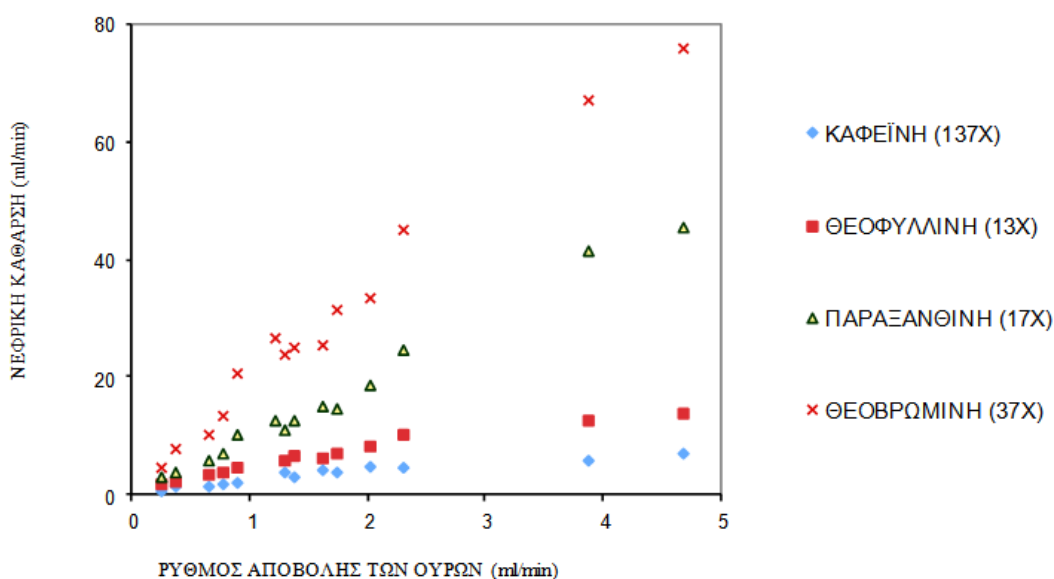
παχιά βέλη). Έτσι, το CYP1A2 ευθύνεται για το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης (Lelo *et al.*, 1986; Gu *et al.*, 1992). Οι δι-μεθυλοξανθίνες υπόκεινται σε N-απομεθυλίωση προς τις αντίστοιχες μονο-μεθυλοξανθίνες 1-μεθυλοξανθίνη (1X), 3-μεθυλοξανθίνη (3X) και 7-μεθυλοξανθίνη (7X). Η καφεΐνη και οι ξανθίνες υδροξυλιώνονται προς τα αντίστοιχα ουρικά οξέα 1,3,7-τριμεθυλ-ουρικό οξύ (137U), 1,3-διμεθυλ-ουρικό οξύ (13U), 1,7-διμεθυλ-ουρικό οξύ (17U), 3,7-διμεθυλ-ουρικό οξύ (37U), 1-μεθυλ-ουρικό οξύ (1U), 3-μεθυλ-ουρικό οξύ (3U) και 7-μεθυλ-ουρικό οξύ (7U). Το CYP2A6 καταλύει την μετατροπή της παραξανθίνης (17X) σε 17U, ενώ το ένζυμο NAT2 καταλύει τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ των ατόμων C8-N9 και την ακετυλίωση της παραξανθίνης προς 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλάμινο-3-μεθυλ-ουρακίλη (5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, AFMU) η οποία μετατρέπεται στα ούρα, μη-ενζυματικά, σε 5-ακετυλαμινο-6-αμινο-3-μεθυλ-ουρακίλη (5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil, AAMU). Η οξειδάση της ξανθίνης είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της 1X σε 1U. Μικρό μόνο ποσοστό της χορηγούμενης δόσης της καφεΐνης (1-2%) απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα λόγω του εκτεταμένου μεταβολισμού της και της υψηλής νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησής της (Arnaud, 2011). Στην **Εικόνα 13** φαίνονται με παχιά βέλη οι κύριες μεταβολικές οδοί της καφεΐνης, τα μεταβολικά ένζυμα και οι μεταβολίτες που προκύπτουν από την δραστηριότητα των ενζύμων αυτών και με διακεκομμένη γραμμή ελάσσονες μεταβολικές οδοί. Με κόκκινη γραφή παρουσιάζονται τα μεταβολικά ένζυμα, οι μεταβολίτες και οι μεταβολικοί λόγοι που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της δραστηριότητας των ενζύμων στην παρούσα εργασία.

Οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τον μεταβολισμό της καφεΐνης απεκκρίνονται από τους νεφρούς. Ο ρυθμός αποβολής της καφεΐνης και των διμεθυλιωμένων μεταβολιτών της (17X, 13X και 37X) από τους νεφρούς εξαρτάται από τον ρυθμό αποβολής των ούρων και σχετίζεται με την ποσότητα των υγρών που προσλαμβάνονται (**Εικόνα 14**). Πράγματι, όταν ο ρυθμός ροής των ούρων αυξάνεται από 0,6 σε 3,2 ml/min, τότε η νεφρική κάθαρση της καφεΐνης αυξάνεται κατά 3 ή 4 φορές (Kalow and Tang, 1993). Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση της καφεΐνης που ανιχνεύεται στα ούρα εξαρτάται από το χρόνο συλλογής του δείγματος των ούρων.



Εικόνα 13: Μεταβολικές οδοί που ενέχονται στον μεταβολισμό της καφεΐνης στο ανθρώπινο ήπαρ. Οι κύριες αντιδράσεις μεταβολισμού απεικονίζονται με παχιά βέλη, ενώ βέλη με διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνουν ελάσσονες μεταβολικές οδούς. Στην εικόνα διακρίνονται επίσης τα ένζυμα που ενέχονται σε κάθε αντίδραση. Με κόκκινη γραφή διακρίνονται οι μεταβολίτες, τα μεταβολικά ένζυμα καθώς και οι μεταβολικοί λόγοι που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της δραστηριότητας των ενζύμων στην παρούσα εργασία.

Η νεφρική απέκκριση των μονομεθυλοξανθινών, των ουρικών οξέων και του AFMU είναι μεγάλη. Επιπλέον, εξαιτίας της πολικότητάς τους δεν επαναρροφούνται από τα νεφρικά σωληνάρια, επομένως ανιχνεύονται δύσκολα στο πλάσμα αλλά πολύ εύκολα στα ούρα. Επομένως, ο προσδιορισμός των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης εκτίμησης του μεταβολισμού της καφεΐνης και κατ' επέκταση ως δείκτης εκτίμησης της δραστηριότητας των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτόν τον μεταβολισμό (Campbell, Spielberg, *et al.*, 1987; Kalow and Tang, 1993).



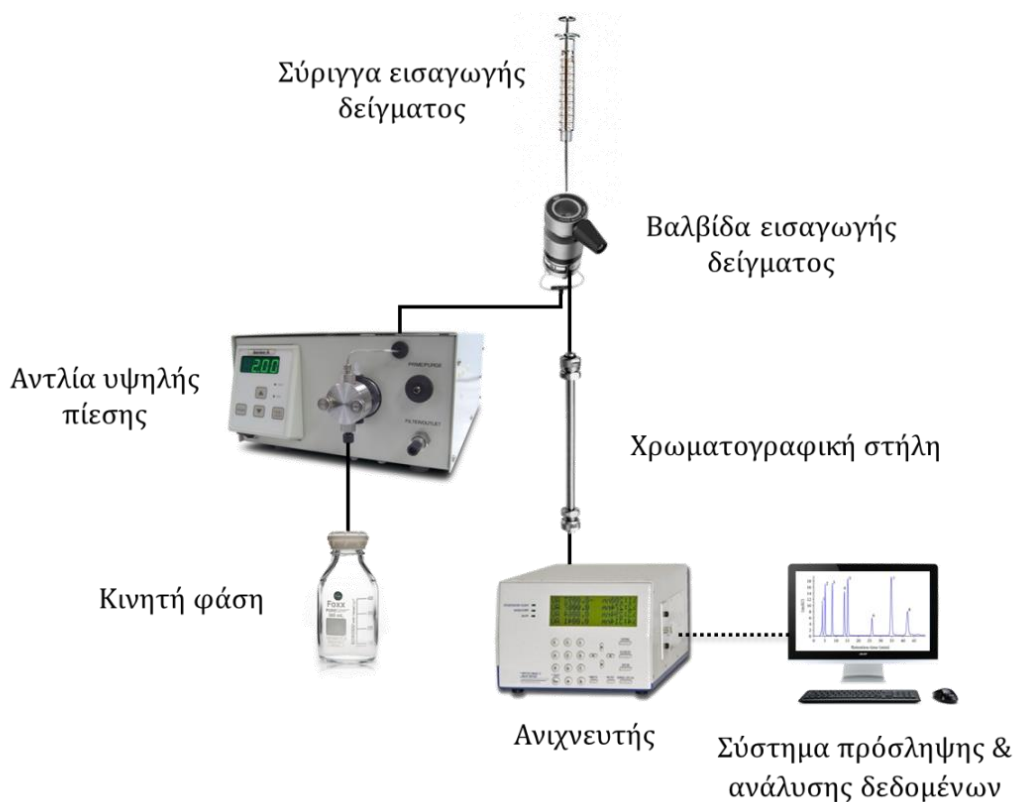
Εικόνα 14: Συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού αποβολής των ούρων και της νεφρικής κάθαρσης της καφεΐνης και των τριών διμεθυλοξανθινών μετά από χορήγηση μεμονωμένης δόσης καφεΐνης (Τροποποιημένη από Tang-Liu *et al.*, 1983).

Ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης σε βιολογικά υγρά με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η χρωματογραφία αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού ουσιών ενός μείγματος με βάση την κατανομή τους στις δύο φάσεις, στατική και κινητή, μιας χρωματογραφικής κλίνης η οποία μπορεί να έχει τη μορφή στήλης ή επιφάνειας. Η στατική φάση συνίσταται σε ένα στερεό, πορώδες, επιφανειοδραστικό υλικό υπό την μορφή μικροσκοπικών σωματιδίων ή σε μία λεπτή ταινία υγρού η οποία επενδύει μία στερεή επιφάνεια ή το τοίχωμα μίας στήλης, ενώ η κινητή φάση μπορεί να είναι αέρια (αέρια χρωματογραφία) ή υγρή (υγρή χρωματογραφία). Η ισορροπία δυνάμεων (ιοντικές δυνάμεις, παροδικά ή μόνιμα ηλεκτρικά πεδία και δυνάμεις van der Waals) μεταξύ των μορίων του συστατικού και

των μορίων της κινητής και στατικής φάσης καθορίζει την κατανομή των συστατικών του μείγματος στην κινητή ή την στατική φάση.

Κατά την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ο διαχωρισμός μεταξύ των συστατικών ενός μείγματος επιτυγχάνεται σε μικρό, σχετικά, χρονικό διάστημα λόγω των πολύ μικρών σωματιδίων που αποτελούν την στατική φάση και, ως εκ τούτου, την απαίτηση για την άσκηση υψηλής πίεσης στην κινητή φάση προκειμένου αυτή να διέλθει διαμέσου της στήλης εξ ου και το όνομα HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th Edition, n.d.). Υπό κατάλληλα επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες τα συστατικά του μείγματος σχηματίζουν ζώνες κατά μήκος της στήλης και καθώς εξέρχονται από αυτήν ανιχνεύονται από ανιχνευτή ο οποίος αναγνωρίζει τα συστατικά αυτά με βάση κάποια φυσικοχημική ιδιότητά τους, όπως την απορρόφησή τους στο ορατό-υπεριώδες, τον φθορισμό, την αγωγιμότητα ή την ικανότητα οξειδοαναγωγής. Στη συνέχεια, ο ανιχνευτής μετατρέπει την φυσικοχημική αυτή ιδιότητα σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο μεταφέρεται μετά από ψηφιοποίηση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή εφοδιασμένο με λογισμικό σύστημα πρόσληψης και ανάλυσης του σήματος (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των οργάνων και συσκευών που συνιστούν την πειραματική διάταξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

Στην HPLC ανάστροφης φάσης (Reversed Phase HPLC, RP-HPLC) μη-πολική είναι η στατική φάση, ενώ πολική είναι η κινητή φάση. Η μη πολική στατική φάση συνίσταται, κυρίως, από σφαιρικά σωματίδια σιλικόνης στον επιφανειακή έχουν προσδεθεί υδρογονανθρακικές αλυσίδες αποτελούμενες από 8 ή 18 άτομα άνθρακα. Ο διαχωρισμός των ουσιών στην RP-HPLC βασίζεται στην εκλεκτική κατακράτηση των υδρόφοβων (μη-πολικών) ενώσεων στην μη-πολική στατική φάση με αποτέλεσμα αυτές να καθυστερούν να εξέλθουν από την χρωματογραφική στήλη, αντίθετα από τις οι πολικές ενώσεις οι οποίες κατακρατούνται λιγότερο ισχυρά και εξέρχονται πρώτες σε σειρά έκλουσης (Dorsey and Dill, 1989).

Διάφορες μέθοδοι HPLC έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στα ούρα. Μία μέθοδος είναι η ισοκρατική έκλυση των ουσιών κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια της ανάλυσης (Rasmussen and Brøsen, 1996; Krul and Hageman, 1998; Bendriss *et al.*, 2000). Μια άλλη μέθοδος είναι η βαθμιδωτή έκλυση κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ανάλυσης (Georgia *et al.*, 2001; Caubet *et al.*, 2002). Πριν από την έγχυση στην χρωματογραφική στήλη, η καφεΐνη και οι μεταβολίτες απομονώνονται από τα ούρα με εκχύλιση. Μια μέθοδος εκχύλισης είναι αυτή του υγρού-υγρού (LLE) κατά την οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα συστήματα οργανικών διαλυτών, όπως χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη (D. M. Grant *et al.*, 1983; Krul and Hageman, 1998; Bendriss *et al.*, 2000) ή οξικός αιθυλεστέρας/ισοπροπανόλη (Rasmussen and Brøsen, 1996). Εναλλακτικά μπορεί να γίνει εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) κατά την οποία χρησιμοποιούνται διάφορα προσροφητικά υλικά (Georgia *et al.*, 2001; Caubet *et al.*, 2002).

Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2

Η δραστηριότητα ενζύμων μπορεί να προσδιορισθεί *ex vivo* με λειτουργικές δοκιμασίες σε ιστούς που εκφράζουν το υπό διερεύνηση ένζυμο. Όμως, το CYP1A2 δεν ανευρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια ή σε άλλο ιστό του ανθρώπου με εύκολη πρόσβαση. Επειδή το CYP1A2 εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, η δραστηριότητά του μπορεί να προσδιορισθεί με εξέταση βιοπτικού υλικού του ήπατος με προσδιορισμό του πρωτεϊνικού του περιεχομένου, με τη μέθοδο Western blot, ή τη μέτρηση του mRNA. Βεβαίως, η μέτρηση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε βιοπτικό υλικό του ήπατος *in vitro* δεν είναι βέβαιο ότι αντανακλά επακριβώς την λειτουργική ικανότητα του ήπατος

in vivo. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι ιδιαιτέρως επεμβατική και για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές μέθοδοι οι οποίες είναι απλές και λιγότερο επεμβατικές όπως είναι ο φαινοτυπικός προσδιορισμός με την χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου-δείκτη χρησιμοποιώντας διάφορα βιολογικά υγρά όπως είναι το πλάσμα, ο σίελος, η αναπνοή ή τα ούρα (Faber *et al.*, 2005).

Η καφεΐνη είναι η πλέον συνήθης ουσία που χρησιμοποιείται για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2. Αποτελεί τον καλύτερο δείκτη εκτίμησης της *in vivo* δραστηριότητας του ενζύμου αυτού καθώς, όπως προαναφέρθηκε, μεταβολίζεται σχεδόν αποκλειστικά (95%) από το ένζυμο αυτό αν και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της *in vivo* δραστηριότητας των ενζύμων CYP2A6, X0 και NAT2. Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η καφεΐνη διατίθεται από διάφορες διατροφικές πηγές (καφές, αναψυκτικά, σοκολάτες) και η χρήση της είναι σχετικά ακίνδυνη, κυρίως για τους ανθρώπους που πίνουν συχνά καφέ, ενώ η συγκέντρωσή της σε βιολογικά υγρά μπορεί να προσδιορισθεί απλά με την χρήση χρωματογραφικής μεθόδου (Fuhr and Rost, 1994a). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ανάγκη για αποχή από τρόφιμα και ποτά που περιέχουν μεθυλοξανθίνες μέχρι και 12-36 ώρες πριν και κατά τη διάρκεια της φαινοτυπικής διαδικασίας αν και το ζήτημα αυτό δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως (Vidya Perera *et al.*, 2012) καθώς έχει προταθεί ότι η αποχή να μην είναι αναγκαία (Perera *et al.*, 2011). Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι ο μεταβολισμός της καφεΐνης είναι πολύπλοκος και εμπλέκει, εκτός από CYP1A2, και άλλα ένζυμα του P450 σε μεταβολικές οδούς μικρότερης σημασίας, ενώ μερικοί από τους μεταβολίτες της καφεΐνης είναι τόσο υποστρώματα όσο και προϊόντα του CYP1A2 και η παραγωγή τους εξαρτάται από την ροή των ούρων γεγονός που καθιστά την χρονική στιγμή δειγματοληψίας ιδιαίτερα σημαντική (Faber *et al.*, 2005).

Σημαντικό ζήτημα όσον αφορά στον φαινοτυπικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 με τη χρήση της καφεΐνης ως μεταβολικού δείκτη είναι η επιλογή του βιολογικού υγρού στο οποίο θα διεξαχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός της καφεΐνης και των μεταβολιτών της. Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης, η κάθαρση της καφεΐνης από το αίμα και τον σίελο καθώς και οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στο σίελο, το πλάσμα και τα ούρα.

Η δοκιμασία αναπνοής της καφεΐνης ήταν από τις πρώτες μη επεμβατικές μεθόδους που αναπτύχθηκαν. Κατά την δοκιμασία αυτή, χορηγείται μία δόση καφεΐνης με επισημασμένο ¹³C άτομο στην 3-μεθυλική ομάδα του μορίου της και μέτρηση της δίωρης σωρευτικής εκπνοής ραδιοεπισημασμένου CO₂ (Lambert *et al.*, 1986) ή μεμονωμένης

εκπνοής μια ώρα μετά την από του στόματος χορήγηση (Park *et al.*, 2003). Σημαντικά μειονέκτηματα της δοκιμασίας αναπνοής της καφεΐνης είναι η χορήγηση ραδιοεπισημασμένου φαρμάκου και οι απαιτήσεις σε ειδικό εξοπλισμό για την μέτρηση ραδιοεπισημασμένου CO₂ στον εκπνεόμενο αέρα. Παρά τα μειονεκτήματά της, η μέθοδος θεωρήθηκε έγκυρη καθώς υπήρξε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της συσσωρευτικής ($r=0,9$) και της μεμονωμένης δοκιμασίας αναπνοής ($r=0.85$) με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης (Kotake *et al.*, 1982; Renner *et al.*, 1984). Η εγκυρότητά της επιβεβαιώθηκε και από την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει υψηλές τιμές του CYP1A2 σε καπνιστές (Kotake *et al.*, 1982), σε άτομα που λάμβαναν ομεπραζόλη (Rost *et al.*, 1992) και χαμηλές τιμές του ενζύμου σε εγκύους και σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά (Kalow and Tang, 1993) και σε ασθενείς με ηπατική νόσο (Renner *et al.*, 1984; Park *et al.*, 2003).

Η πλέον έγκυρη μέθοδος για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2, η οποία αποτελεί και την μέθοδο αναφοράς, είναι η κάθαρση της καφεΐνης από το αίμα κατά την οποία πραγματοποιούνται αλληπάλληλοι προσδιορισμοί των συγκεντρώσεων της καφεΐνης στο πλάσμα σε προσχεδιασμένα τακτικά χρονικά διαστήματα (Kalow and Tang, 1993; Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996). Ως βέλτιστη μέθοδος προτάθηκε ο υπολογισμός του λόγου παραξανθίνης/καφεΐνης (17X/137X) στο πλάσμα 6 ώρες μετά την λήψη 150 mg καφεΐνης (Fuhr *et al.*, 2007). Παρόλαυτά, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 με την κάθαρση της καφεΐνης στο αίμα παρουσιάζει μειονεκτήματα καθώς αποτελεί επεμβατική μέθοδο, είναι ιδιαίτερα χρονοβόρος και δύσκολη τόσο για τον ερευνητή όσο και για τον εθελοντή.

Φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 στα ούρα

Μη-επεμβατική μέθοδο για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 αποτελεί ο υπολογισμός των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα. Διάφοροι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα έχουν προταθεί (**Πίνακας 4**), αν και για όλοι αυτοί οι λόγοι παρουσιάζουν μειονεκτήματα καθώς οι περισσότεροι από αυτούς επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η νεφρική ροή του αίματος, η ροή των ούρων και η δραστηριότητα άλλων ενζύμων, πλέον του CYP1A2, όπως είναι τα NAT2, CYP2A6, XO και CYP2E1 (Faber *et al.*, 2005).

Ο πλέον αξιόπιστος μεταβολικός λόγος της καφεΐνης στα ούρα φαίνεται να είναι ο λόγος (1U+1X+AFMU)/17U ο οποίος προσδιορίζεται 4-5 ώρες μετά τη λήψη της καφεΐνης (Campbell, Spielberg, *et al.*, 1987). Ο λόγος αυτός παρουσιάζει καλή συσχέτιση με τη συστηματική κάθαρση της καφεΐνης (Campbell, Spielberg, *et al.*, 1987; Fuhr *et al.*,

1996) και είναι ανεξάρτητος από την ροή των ούρων (Kalow and Tang, 1993; Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996; Sinués *et al.*, 1999) και το CYP2E1 (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996).

Στη θέση του 17U, μερικές μελέτες χρησιμοποίησαν το 17X ως παρονομαστή (Streetman *et al.*, 2000). Όμως, η χρήση του 17X στον παρονομαστή δημιουργεί δύο προβλήματα: **(1)** επειδή η 17X αποτελεί τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα του CYP1A2, ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων ούρων καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική. Συνήθως, ο χρόνος δειγματοληψίας προσδιορίζεται στις 4-5 ώρες (Kalow and Tang, 1993; Sinués *et al.*, 1999), όμως, ο βέλτιστος χρόνος συλλογής των δειγμάτων μπορεί να διαφοροποιείται σε άτομα με επαγωγή του CYP1A2. **(2)** Η κάθαρση της 17X επηρεάζεται από την ροή των ούρων (D. M. Grant *et al.*, 1983). Πράγματι, μια μελέτη που χρησιμοποίησε τον λόγο $(1U+1X+AAMU)/17X$ έδειξε ότι υπάρχει διακύμανση των τιμών του CYP1A2 κατά 30 φορές μεταξύ των ατόμων η οποία αποδόθηκε στην εξάρτηση της νεφρικής κάθαρσης της 17X από την ροή των ούρων (Denaro *et al.*, 1996). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεταβολικού αυτού λόγου και της συστηματικής κάθαρσης της καφεΐνης και ότι δεν πρέπει να γίνεται χρήση αυτού του λόγου. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι ο λόγος $(1U+1X+AAMU)/17X$ εξαρτάται από την ροή των ούρων και ότι δεν παρουσιάζει καλή συσχέτιση με τον λόγο $(1U+1X+AFMU)/17U$ (ο οποίος όπως προαναφέρθηκε είναι ανεξάρτητος της ροής των ούρων) (Sinués *et al.*, 1999).

Δύο άλλοι μεταβολικοί λόγοι που έχουν προταθεί για τον φαινοτυπική εκτίμηση του CYP1A2 στα ούρα είναι οι $17X/137X$ και $(17X+17U)/137X$ οι οποίοι προσδιορίζονται 4-5 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης (Streetman *et al.*, 2000). Συσχέτιση μεταξύ αυτών των μεταβολικών λόγων και της κάθαρσης της καφεΐνης στο αίμα παρουσίασε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των μελετών (Fuhr and Rost, 1994a; Tang *et al.*, 1994; Fuhr *et al.*, 1996). Ο μεταβολικός λόγος $(1U+1X+AFMU)/17U$ βρέθηκε ότι αφενός συσχετίζεται καλύτερα, απότι ο λόγος $17X/137X$, με την συστηματική κάθαρση της καφεΐνης και αφετέρου διακρίνει καλύτερα την μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 σε γυναίκες που χρησιμοποιούν αντισυλληπτικά φάρμακα (Tang *et al.*, 1994). Επιπλέον, η χρήση του 17X σε αυτούς τους δύο μεταβολικούς λόγους δημιουργεί τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μεγάλο μειονέκτημα αυτών των μεταβολικών λόγων είναι και η εξάρτηση της κάθαρσης της 137X από την ροή των ούρων. Θα μπορούσε να υποθέσει κάποιος ότι η παρουσία μεταβλητών που εξαρτώνται από την ούρων τόσο στον αριθμητή όσο και στον παρονομαστή θα προκαλούσε απαλοιφή του προβλήματος. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν ισχύει καθώς η εξάρτηση κάθε μεταβλητής από την ροή των ούρων είναι

διαφορετική (Kalow and Tang, 1993). Σε μία μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση διαφόρων μεταβολικών λόγων στα ούρα βρέθηκε ότι όλοι οι μεταβολικοί λόγοι που περιέχουν είτε 137X είτε 17X στον παρονομαστή τους επηρεάζονται από την ροή των ούρων ανεξάρτητα από την παρουσία μιας αντίστοιχης μεταβλητής στον αριθμητή (Sinués *et al.*, 1999). Επομένως, αυτοί οι μεταβολικοί λόγοι δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται (Fuhr *et al.*, 1996; Streetman *et al.*, 2000).

Πίνακας 4: Μεταβολικοί λόγοι καφεΐνης στα ούρα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 *in vivo* (με έντονη γραφή σημειώνεται ο μεταβολικός λόγος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία).

| Μεταβολικός λόγος CYP1A2 | Αναφορά |
|---------------------------------|------------------------------------------|
| (AFMU+1X+1U)/17X | (D. M. Grant <i>et al.</i> , 1983) |
| (AFMU+1X+1U)/17U | (Campbell, Grant, <i>et al.</i> , 1987) |
| | (Begas <i>et al.</i> , 2007, 2017, 2018) |
| 17X/137X | (Kadlubar <i>et al.</i> , 1990) |
| (17X+17U)/137X | (Butler <i>et al.</i> , 1992) |
| (AFMU+1X+1U+17U+17X)/17U | (Carrillo and Benitez, 1996) |

Φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 στο σίελο

Σε παλαιότερη μελέτη, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 στο σίελο υπολογίστηκε από την κάθαρση της καφεΐνης με δύο μετρήσεις των συγκεντρώσεων του φαρμάκου-δείκτη στον σίελο (Jost *et al.*, 1987). Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ ανοσοδραστικού περιεχομένου ήπατος σε CYP1A2, την ενδογενή κάθαρση της καφεΐνης (δηλαδή 3-απομεθυλίωση προς παραξανθίνη) και διαφόρων μεταβολικών λόγων του CYP1A2 σε πλάσμα, σίελο και ούρα έδειξε ότι η βέλτιστη συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ της ενδογενούς κάθαρσης της καφεΐνης και της κάθαρσής της από τον σίελο. Ασθενέστερη συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ της ενδογενούς κάθαρσης της καφεΐνης και του μεταβολικού λόγου παραξανθίνης/καφεΐνης (17X/137X) που προσδιορίζεται στο πλάσμα ή τον σίελο 6 ώρες μετά τη χορήγηση της καφεΐνης (Fuhr and Rost, 1994a; Fuhr *et al.*, 1996). Από σύγκριση που έγινε μεταξύ έξι μεθόδων για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2, εκτός βέβαια από τη μέθοδο αναφοράς που είναι η κάθαρση της καφεΐνης στο αίμα σε σχέση με τη δραστηριότητα του CYP1A2 σε βιοπτικό υλικό ήπατος (Fuhr *et al.*, 1996), βρέθηκε ότι ο λόγος παραξανθίνη/καφεΐνη που

προσδιορίζεται στο πλάσμα ή τον σίελο πληροί όλα τα κριτήρια πιστοποίησης μιας μεθόδου (Faber *et al.*, 2005; Hakooz, 2009). Λόγω της μη-επαμβατικότητας του μεταβολικού λόγου παραξανθίνης/καφεΐνης στο σίελο, σε σχέση με το αίμα, ένας από τους σκοπούς της παρούσας εργασίας ήταν να αναπτυχθεί αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του λόγου αυτού στον σίελο.

Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6

Η κατ' εξοχήν αντίδραση για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας του CYP2A6 *in vivo* είναι η 7- υδροξυλίωση της κουμαρίνης (1,2-βενζοπυρόνη) η οποία ευθύνεται για το 95% της βιομετατροπής της ουσίας (Pasanen *et al.*, 1997; Oscarson, 2001). Εκτός από την κουμαρίνη, το CYP2A6 καταλύει την 8-υδροξυλίωση της παραξανθίνης, 17X, προς 17U με μικρή συμμετοχή του CYP1A2 (Gu *et al.*, 1992; Kimura *et al.*, 2005). Μάλιστα, σε μικρές συγκεντρώσεις 17X (0,1 mM) το CYP2A6 είναι το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση (Nowell *et al.*, 2002). Επομένως, παρόλο που η παραξανθίνη, ως παράγωγο του μεταβολισμού της καφεΐνης, παρουσιάζει μικρότερη ειδικότητα για το CYP2A6, σε σχέση με την κουμαρίνη, μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό υπόστρωμα για την *in vivo* εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6.

Διάφοροι μεταβολικοί λόγοι έχουν προταθεί για την εκτίμηση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP2A6 στον άνθρωπο. Ο πλησιέστερος στον θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης/φάρμακο» είναι ο λόγος 17U/17X (D. M. Grant *et al.*, 1983; Nowell *et al.*, 2002b) και έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της δραστηριότητας του CYP2A6 σε υγιείς εθελοντές (Begas *et al.*, 2007), καθώς και για την συσχέτιση της ηπατικής λειτουργίας, όπως αυτή αντανακλάται από τον μεταβολισμό της καφεΐνης, με την βαρύτητα της ηπατικής νόσου σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση (Bechtel *et al.*, 2000). Ο μεταβολικός αυτός λόγος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 5). Ο μεταβολικός λόγος 17U/(AFMU+1X+1U+17X+17U) εκφράζει την 8-υδροξυλίωση της 17X ως το ποσοστό παραγωγής της 17U σε σχέση με τη συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού της παραξανθίνης (17X) στα ούρα και έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της επίδρασης του φύλου, της χρήσης των από του στόματος αντισυλληπτικών και της ηλικίας (Krul and Hageman, 1998), καθώς και της χορήγησης κουρκουμίνης (Chen *et al.*, 2010) στην δραστηριότητα του CYP2A6. Ένας παρόμοιος μεταβολικός λόγος, 17U/(AFMU+1X+17X+17U), χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επίδρασης του φύλου

και της διατητικής πρόσληψης μπρόκολου στην δραστηριότητα του CYP2A6 (Hakooz and Hamdan, 2007).

Πίνακας 5: Μεταβολικοί λόγοι καφεΐνης στα ούρα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP2A6 *in vivo* (με έντονη γραφή σημειώνεται ο μεταβολικός λόγος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία).

| Μεταβολικός λόγος CYP2A6 | Αναφορά |
|--------------------------|------------------------------------|
| | (D. M. Grant <i>et al.</i> , 1983) |
| | (Bechtel <i>et al.</i> , 2000) |
| 17U/17X | (Nowell <i>et al.</i> , 2002b) |
| | (Begas <i>et al.</i> , 2007) |
| | (Djordjevic <i>et al.</i> , 2010) |
| 17U/(17X+17U) | (Begas <i>et al.</i> , 2017, 2018) |
| 17U/(AFMU+1X+1U+17X+17U) | (Krul and Hageman, 1998) |
| | (Chen <i>et al.</i> , 2010) |
| 17U/(AFMU+1X+17X+17U) | (Hakooz and Hamdan, 2007) |

Εκτίμηση της δραστηριότητας της Οξειδάσης της Ξανθίνης (Xanthine Oxidase, XO)

Η δραστηριότητα του ενζύμου XO μπορεί να εκτιμηθεί φασματοφωτομετρικά ή ραδιοχημικά με τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος που σχηματίζεται κατά την επώαση ξανθίνης με ομογενοποιημένο ηπατικό ιστό που προέρχεται από επεμβάσεις μερικής ηπατεκτομής και ανοικτή βιοψία ήπατος (Guerciolini *et al.*, 1991) ή μεταμόσχευσης ήπατος (Stirpe *et al.*, 2002). Οι μέθοδοι αυτές, όμως, δεν μπορούν να εφαρμοσθούν στην κλινική πράξη λόγω του επεμβατικού τους χαρακτήρα. Αντίθετα, η χρήση της καφεΐνης ως υποστρώματος για την XO παρέχει την δυνατότητα για τον ασφαλή και μη επεμβατικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της XO *in vivo*. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13**, η XO ευθύνεται για την σχεδόν αποκλειστική μετατροπή της 1X σε 1U, γεγονός που υποστηρίζεται από την ικανότητα της αλλοπουρινόλης, ενός ειδικού αναστολέα της XO, να αναστέλλει την μετατροπή αυτή (Grant *et al.*, 1986).

Δύο μεταβολικοί λόγοι έχουν προταθεί για την *in vivo* εκτίμηση της δραστηριότητας της XO (**Πίνακας 6**): ο πρώτος λόγος είναι ο 1U/1X ο οποίος ανταποκρίνεται στον θεωρητικό λόγο μεταβολίτης/μητρική ουσία (D. M. Grant *et al.*,

1983). Ο δεύτερος λόγος λόγος, $1U/(1U+1X)$, θεωρείται πιο αξιόπιστος καθώς εκφράζει την οξείδωση της $1X$ ως το ποσοστό του παραγομένου $1U$ στα ούρα σε σχέση με την συνολική ποσότητα των μεταβολιτών της οδού στην οποία εμπλέκεται η XO (Kalow and Tang, 1991) και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 6: Μεταβολικοί λόγοι καφεΐνης στα ούρα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της XO *in vivo* (με έντονη γραφή σημειώνεται ο μεταβολικός λόγος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία).

| Μεταβολικός λόγος XO | Αναφορά |
|------------------------|------------------------------------------|
| | (D. M. Grant <i>et al.</i> , 1983) |
| $1U/1X$ | (Rasmussen and Brøsen, 1996) |
| | (Bechtel <i>et al.</i> , 2000) |
| | (Hakooz, 2009) |
| $1U/(1X+1U)$ | (Tsutsumi <i>et al.</i> , 2001) |
| | (Begas <i>et al.</i> , 2007, 2017, 2018) |

Εκτίμηση της δραστηριότητας της N-ακετυλοτρανσφεράσης (N-acetyltransferase 2, NAT2)

Ιστορικά, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός της NAT2 έχει εκτιμηθεί με την χρήση διαφόρων φαρμάκων όπως το αντιφυματικό φάρμακο ισονιαζίδη και τα αντιμικροβιακά φάρμακα σουλφαμεθαζίνη (Evans *et al.*, 1960) και σουλφαπυριδίνη (Schröder and Evans, 1972). Λόγω, όμως, της επικινδυνότητας των φαρμάκων αυτών μετά από χορήγησή τους σε υγιείς εθελοντές, αλλά και σε ασθενείς, έχει επικρατήσει η χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου-δείκτη για την εκτίμηση του φαινότυπου της NAT2.

Αρχικά προτάθηκε ο μεταβολικός λόγος $AFMU/1X$ ο οποίος προσδιορίστηκε σε ούρα 24ώρου που συλλέχθηκαν μετά την από του στόματος χορήγηση καφεΐνης (D. M. Grant *et al.*, 1983). Ο λόγος αυτός εξέφραζε την παραγωγή του $AFMU$ ως ποσοστό όλων των μεταβολιτών της οδού της 3-απομεθυλίωσης της καφεΐνης και ορθώς διαχώριζε τον πληθυσμό σε δύο ξεκάθαρες ομάδες βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε ο απλοποιημένος λόγος $AFMU/1X$, σε ούρα 24ώρου και σε ούρα που συλλέχθηκαν 2-6 ώρες μετά την λήψη καφεΐνης, ο οποίος διέκρινε τους βραδείς από τους ταχείς ακετυλιωτές (D. M. Grant *et al.*, 1983; Grant *et al.*, 1984; Krul and Hageman, 1998).

Στη συνέχεια, προτάθηκε ο λόγος $AAMU/(AAMU+1U+1X)$ σε ολονύκτια συλλογή ούρων μετά από απογευματινή λήψη καφεΐνης (Tang *et al.*, 1987) και ο ισοδύναμος του λόγος $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ σε συγκεντρωτικά ούρα των 4 πρώτων ωρών μετά την λήψη της καφεΐνης (Relling *et al.*, 1992). Αυτοί οι λόγοι διακρίνουν καλύτερα, σε σχέση τον $AFMU/1X$, τους βραδείς από τους ταχείς ακετυλιωτές με τιμές που βρίσκονται κοντά στο σημείο διαχωρισμού των δύο κατανομών (Tang *et al.*, 1991), και κατατάσσουν ορθώς τα άτομα σε περίπτωση ηπατικής ή άλλης ασθένειας (Kalow and Tang, 1993; Bendriss *et al.*, 1998). Ο μεταβολικός λόγος $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ φαίνεται να είναι ο πλέον αξιόπιστος στην απεικόνιση της δραστηριότητας της NAT-2 καθώς σε σύγκριση με άλλους μεταβολικούς λόγους φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από την δράση άλλων παραγόντων όπως για παράδειγμα από την δράση των ενζύμων XO ή CYP1A2 (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996). Ο μεταβολικός αυτός λόγος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Μεταβολικοί λόγοι καφεΐνης στα ούρα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του NAT2 *in vivo*. (με έντονη γραφή σημειώνεται ο μεταβολικός λόγος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία).

| Μεταβολικός λόγος NAT2 | Αναφορά |
|---------------------------------------|------------------------------------------|
| | (D. M. Grant <i>et al.</i> , 1983) |
| $AFMU/1X$ | (Grant <i>et al.</i> , 1984) |
| | (Krul and Hageman, 1998) |
| $AFMU/(AFMU+1U+1X+17U+17X)$ | (Denis M. Grant <i>et al.</i> , 1983) |
| | (Rostami-Hodjegan <i>et al.</i> , 1996) |
| $AFMU/(AFMU+1U+1X)$ | (Bendriss <i>et al.</i> , 2000) |
| | (Begas <i>et al.</i> , 2007, 2017, 2018) |

1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Ως φυσικό προϊόν θεωρείται κάθε μορφή φυτού ή φυτικού προϊόντος το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει τα φύλλα, τα στελέχη, τα άνθη, τις ρίζες ή και τους σπόρους. Παρόλο που πολλά φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται ως καρυκεύματα στην μαγειρική, η χρήση τους ως συμπληρώματα διατροφής προορίζεται κυρίως για ιατρικούς σκοπούς (Bent, 2008). Λαμβάνονται ως ξηρό προϊόν ή υπό την μορφή ροφήματος όπως τσαγιού, δηλαδή εμβάπτιση του προϊόντος σε ζεστό νερό, ή αφεψήματος όπου απαιτείται βρασμός του προϊόντος σε νερό.

Ιστορικά, η ανθρωπότητα στηριζόταν σε φυσικά προϊόντα για την αντιμετώπιση των διαφόρων ασθενειών μέχρι πριν εκατό περίπου χρόνια όταν με την ανάπτυξη συνθετικών φαρμάκων τα φυσικά προϊόντα παραγκωνίστηκαν. Τα τελευταία χρόνια, όμως, παρατηρείται ραγδαία αύξηση της χρήσης φυσικών προϊόντων και συμπληρωμάτων διατροφής με περίπου 80% των ανθρώπων παγκοσμίως να βασίζονται σε τέτοια προϊόντα για την πρωτοβάθμια υγεία τους (Bodeker *et al.*, 2005). Αυτό οφείλεται, στο γεγονός ότι τα συνθετικά φάρμακα μπορεί, ενίοτε, να έχουν παρενέργειες και να μην είναι αποτελεσματικά προς απογοήτευση του ασθενούς ο οποίος αναλαμβάνει την προσωπική του θεραπεία. Παράλληλα, υπάρχει η γενική αντίληψη ότι τα φυσικά προϊόντα προωθούν την υγεία και την μακροζωία και ότι είναι ακίνδυνα λόγω της φυσικής τους προέλευσης (Ekor, 2014). Όμως, τα φυσικά προϊόντα, αντίθετα με τα φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία είναι γνωστής και σταθερής σύνθεσης, έχουν πολύπλοκη και ενίοτε άγνωστη σύνθεση με δεκάδες συστατικά. Επιπλέον, είθισται να χρησιμοποιούνται από ανθρώπους που έχουν ήδη κάποιο πρόβλημα υγείας και οι οποίοι είναι πιθανόν να βρίσκονται υπό κάποια φαρμακευτική αγωγή. Πιθανή αλληλεπίδραση κάποιου από τα συστατικά του φυσικού προϊόντος με την φαρμακευτική αγωγή (Ernst, 2000; Colombo *et al.*, 2014) μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις (Wanwimolruk and Prachayasittikul, 2014) και για το λόγο αυτό τα φυσικά προϊόντα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως φάρμακα (Zhang *et al.*, 2015).

Είναι γεγονός ότι η επιστημονική τεκμηρίωση όσον αφορά στην ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φυσικών προϊόντων είναι περιορισμένη (Bent, 2008; Feistel *et al.*, 2018). Ο βέλτιστος τρόπος για την ανάδειξη των κλινικών δράσεων ουσιών είναι οι ελεγχόμενες κλινικές μελέτες οι οποίες στην περίπτωση των φυσικών προϊόντων είναι ιδιαίτερα δυσχερείς λόγω της πολύπλοκης σύνθεσής τους και, επομένως, της δυσκολίας

να αποδοθεί οποιαδήποτε δράση σε συγκεκριμένο συστατικό. Είναι, μάλιστα, πιθανόν οι κλινικές δράσεις ενός φυσικού προϊόντος να οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στη συνεργική αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του (Williamson, 2003). Οι κλινικές δράσεις που έχουν τεκμηριωθεί περισσότερο από κάθε άλλο φυσικό προϊόν είναι αυτές του St. John's wort (*Hypericum perforatum*, υπερίκον το διάτρητον ή βαλσαμόχορτο) το οποίο χρησιμοποιείται στην ήπια κατάθλιψη (Ng *et al.*, 2017). Το St. John's wort είναι γνωστό ότι παρουσιάζει σοβαρές αλληλεπιδράσεις με διάφορα φάρμακα όπως με την βαρφαρίνη (Johns *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2004), την διγοξίνη (Henderson *et al.*, 2002), την κυκλοσπορίνη (Ruschitzka *et al.*, 2000) και τον αναστολέα της HIV-1 πρωτεάσης ιντιναβίρ (Piscitelli *et al.*, 2000) μέσω μείωσης των επιπέδων τους στο αίμα.

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να παρατηρηθεί αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικών προϊόντων και φαρμάκων. Ένας από αυτούς είναι η τροποποίηση της δραστηριότητας της P-γλυκοπρωτεΐνης (Hennessy *et al.*, 2002) και των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών μέσω αναστολής ή επαγωγής τους (Lin and Lu, 2001) που μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες ενέργειες ή τοξικότητα (Zhou *et al.*, 2003). Κλασικό παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης αποτελεί η μεγάλης χημικής συγγένειας σύνδεση της υπερφορίνης, ενεργό συστατικό του St. John's wort, με τον υποδοχέα ξενοβιοτικών της πρεγνάνης (Pregnane Xenobiotic Receptor, PXR) που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του CYP3A4 στο έντερο και στο ήπαρ με επακόλουθη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων εκείνων που αποτελούν υποστρώματα του ενζύμου (Markowitz *et al.*, 2003; Wenk *et al.*, 2004; Wanwimolruk and Prachayasittikul, 2014). Παρομοίως, η κουρκουμίνη φαίνεται να προκαλεί αναστολή του CYP1A2 και επαγωγή του CYP2A6 (Chen *et al.*, 2010) χωρίς όμως να επηρεάζει άλλα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών (Volak *et al.*, 2013).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι μελέτες με τις κλινικές χρήσεις του κρόκου παρουσιάζουν ραγδαία αύξηση τα τελευταία χρόνια με επακόλουθο την αυξανόμενη ανάγκη διεξαγωγής μελετών για τη διερεύνηση της ασφαλούς κλινικής του χρήσης. Παρά την πληθώρα των μελετών που διερευνούν την αλληλεπίδραση άλλων φυσικών προϊόντων με ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, υπάρχει παντελής έλλειψη μελετών που διερευνούν την επίδραση του κρόκου στα μεταβολικά αυτά ένζυμα.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας τη διερεύνηση της επίδρασης του κρόκου στην *in vivo* δραστικότητα ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών στον άνθρωπο, με την χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου-δείκτη, με τους εξής επιμέρους στόχους:

1. Ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης (Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography, RP-HPLC) για τον προσδιορισμό της *in vivo* δραστικότητας του CYP1A2 στο σίελο.
2. Διερεύνηση της επίδρασης του κρόκου στην *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 σε δείγματα ούρων και σιέλου.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ανάπτυξη και πιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου του ενζύμου CYP1A2 στο σίελο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Η προμήθεια των πρότυπων ουσιών 17X, 17U, 1X, 1U και του εσωτερικού προτύπου 4-ακεταμιδοφαινόλη έγινε από την εταιρεία Sigma (Steinheim, Γερμανία), της πρότυπης ουσίας 1X από την εταιρεία TCI (Zwijndrecht, Βέλγιο) και της πρότυπης ουσίας 137X από την εταιρεία Fluka (Buchs, Ελβετία). Η πρότυπη ουσία AFMU ήταν ευγενική χορηγία του Καθηγητή κ. Wolfgang Pfeleiderer (University of Konstanz, Γερμανία).

Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και η προμήθειά τους έγινε από την εταιρεία SDS (Val de Reuil, Γαλλία). Η προμήθεια του υδροχλωρικού οξέος (αναλυτικού βαθμού καθαρότητας) και του θειϊκού αμμωνίου έγινε από την εταιρεία Riedel-de Haen (Seelze, Γερμανία). Το οξεικό οξύ και η ισοπροπανόλη ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Γερμανία), ενώ το χλωροφόρμιο αγοράστηκε από την εταιρεία Chem Lab (Zeldegem, Βέλγιο). Υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα στάδια της ανάλυσης.

- Χρωματογραφικός εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες

Η χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης (137X) και των μεταβολιτών της πραγματοποιήθηκε με την χρήση μιας αντλίας υψηλής πίεσης τύπου Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη-Ελλάς). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπεριώδους-ορατού τύπου FASMA 500 μεταβλητού μήκους κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη-Ελλάς). Το μήκος κύματος του ανιχνευτή καθορίστηκε στα 273 nm. Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος ήταν τύπου Rheodyne 7125 (Rheodyne, California, ΗΠΑ) και έφερε βρόχο από ανοξείδωτο χάλυβα, όγκου 50 μl .

Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με την χρήση χρωματογραφικής στήλης τύπου Kromasil 100 C₁₈, της οποίας τα σωματίδια του υλικού πληρώσεως ήταν διαμέτρου 5 μm , και η διάμετρος των πόρων των σωματιδίων ήταν 100Å. Η στήλη είχε μήκος 250 mm και εσωτερική διάμετρο 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία) και η θερμοκρασία κατά τη λειτουργία της τέθηκε στους 30°C μέσω θερμοστάτη στήλης (Lab Alliance, State College,

PA, USA). Η συγκεκριμένη στήλη χαρακτηρίζεται ως μία από τις πλέον ενδεδειγμένες για τον διαχωρισμό όχι μόνον βασικών αλλά και μη βασικών ενώσεων λόγω της μικρής της περιεκτικότητας σε ελεύθερες επιφανειακές σιλανόλες (-SiOH) και μικρής επιμόλυνσης από μεταλλικά ιχνοστοιχεία. Οι σιλανόλες λόγω του όξινου χαρακτήρα τους προκαλούν αυξημένη κατακράτηση των βασικών ουσιών, διεύρυνση και ασυμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών τους με αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα της χρωματογραφικής στήλης όσον αφορά στον διαχωρισμό τους (Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th Edition, n.d.).

Η κινητή φάση στην περίπτωση δειγμάτων σιέλου αποτελούνταν από 0,1% οξικού οξέος-μεθανόλης-ακετονιτριλίου 80:20:2 v/v και διέτρεχε την στήλη με ταχύτητα 0,8 mL/min. Στην περίπτωση δειγμάτων ούρων, η κινητή φάση αποτελούνταν από 0,1% οξικού οξέος-μεθανόλης-ακετονιτριλίου 92:4:5 v/v και διέτρεχε την στήλη με ταχύτητα ροής 0,7 ml/min για το χρονικό διάστημα 0-5 min και 1,1 ml/min για το χρονικό διάστημα από 5-20 min (Begas *et al.*, 2007). Η κινητή φάση απαερώθηκε από σύστημα απαερωτή (ERC Inc., Kawaguchi City, Ιαπωνία).

Η πρόσληψη και ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Chrom&Spec (Ampersand Ltd, Moscow, Ρωσία).

- Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων 17X και 137X

Πυκνά διαλύματα της καφεΐνης (100μg/mL), της παραξανθίνης (17X, 100μg/mL), και του εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS; 4-ακεταμιδοφαινόλη, 10μg/mL) παρασκευάστηκαν με νερό βαθμού καθαρότητας HPLC και διατηρήθηκαν στους -20°C.

Τα δείγματα βαθμονόμησης (matrix calibrators) και του ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν με την προσθήκη κατάλληλα αραιωμένων πυκνών διαλυμάτων της καφεΐνης και της παραξανθίνης σε δείγματα σιέλου υγιών εθελοντών που δεν κατανάλωναν καφέ και, επιπλέον, είχαν κάνει αποχή από τροφές και ροφήματα που περιείχαν μεθυλοξανθίνες για διάστημα τουλάχιστον 24 ωρών πριν την δειγματοληψία. Τα δείγματα των εθελοντών πιστοποιήθηκαν ως ελεύθερα μεθυλοξανθινών καθώς δεν υπήρχαν χρωματογραφικές παρεμβολές ούτε από 137X ούτε από μεταβολίτες της.

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων AFMU, 1U, 1X και 17U

Πυκνά διαλύματα των μεταβολιτών της καφεΐνης 1X, 17U, 1U, AFMU και του εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS; 4-ακεταμιδοφαινόλη, 10μg/mL) παρασκευάστηκαν, το καθένα, σε συγκέντρωση 5,0 mM και διατηρήθηκαν στους -20°C.

Τα διαλύματα της 1X και της 1U παρασκευάστηκαν σε 5,0 mM NaOH, της 17U σε 2,5 mM NaOH και της AFMU σε 0,1% οξικό οξύ. Το πυκνό διάλυμα της 4-ακεταμιδοφαινόλης (IS) παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 10 mM με 0,1% οξικό οξύ.

- Προκατεργασία των δειγμάτων

Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου

Τα δείγματα σιέλου (~1–5 mL) φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 4'. Κατόπιν, από το υπερκείμενο υγρό λήφθηκε ένα δείγμα όγκου 200 µL το οποίο κορέσθηκε με 250 mg θειϊκού αμμωνίου και στο οποίο προστέθηκαν 100 µL από διάλυμα 10 µg/mL εσωτερικού προτύπου, IS. Η εκχύλιση των αναλυτών από το δείγμα έγινε με την βοήθεια 4 mL μείγματος χλωροφορμίου-ισοπροπανόλης 85:15, v/v σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Carrillo *et al.*, 2000). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 4', και έγινε διαχωρισμός της υδατικής από την οργανική φάση με διαχωριστική χοάνη. Η εξάτμιση της οργανικής φάσης πραγματοποιήθηκε σε συσκευή συμπύκνωσης δειγμάτων (Techne Dri-Block, UK) υπό ήπιο ρεύμα αζώτου στους 45°C. Το στερεό υπόλοιπο που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 µL κινητής φάσης, φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm και 50 µL από το διάλυμα εισήχθησαν στην χρωματογραφική στήλη.

Η επεξεργασία των δειγμάτων βαθμονόμησης (spiked calibration standards) και ποιοτικού ελέγχου (quality controls) έγινε με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν από δείγματα σιέλου όγκου 200 µL στο οποίο προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες πυκνού διαλύματος 17X και 137X ώστε να αποφέρουν την επιθυμητή τελική συγκέντρωση.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων

Η προκατεργασία των δειγμάτων ούρων έγινε σύμφωνα με μέθοδο που είχε ήδη αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας (Begas *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, σε δείγμα ούρων όγκου 200 µL προστέθηκαν με 250 mg θειϊκού αμμωνίου, για την κατακρήμνιση των ενυπαρχουσών πρωτεϊνών, 200 µL διαλύματος οξικού οξέος 0,1% και 20 µL διαλύματος του εσωτερικού προτύπου. Το δείγμα αναδεύθηκε ισχυρά για 30'', ακολούθησε εκχύλιση των μεταβολιτών της καφεΐνης και του εσωτερικού προτύπου με 6 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης σε αναλογία όγκων 85/15 v/v και φυγοκέντρωση για 2' στις 5000 rpm ώστε να διασπασθεί τυχόν δημιουργηθέν γαλάκτωμα. Η υδατική φάση διαχωρίστηκε από την οργανική με την χρήση διαχωριστικής χοάνης και η εναπομείνουσα οργανική φάση εξατμίσθηκε μέχρι ξηρού με

θέρμανση στους 45°C υπό ήπιο ρεύμα αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μl οξικού οξέος 0,1%, αναδεύθηκε ισχυρά για 15", διηθήθηκε με πλαστικό φίλτρο σύριγγας διαμέτρου πόρων 0,2 μm και 20 μL του διαλύματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ούρων, ελεύθερα μεθυλοξανθινών, όγκου 200 μL στα οποία προστέθηκαν 200 μL των προτύπων μειγμάτων των μεταβολιτών της καφεΐνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, καθώς και 20 μL του διαλύματος του εσωτερικού προτύπου και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 150, 300 και 500 μM παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με πυκνά διαλύματα των 5 μεταβολιτών στις ανωτέρω συγκεντρώσεις και περαιτέρω προσθήκη του εσωτερικού προτύπου.

- Πιστοποίηση της μεθόδου

Η μέθοδος πιστοποιήθηκε όσον αφορά στην ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ειδικότητα, στην γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης και στο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τις προβλεπόμενες διαδικασίες και τις κατευθυντήριες οδηγίες (Guidances (Drugs), n.d.; Tsakalof *et al.*, 2003) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Παράμετροι πιστοποίησης μεθόδου.

| Παράμετροι πιστοποίησης μεθόδου | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Ακρίβεια | Accuracy |
| Επαναληψιμότητα | Precision |
| Ειδικότητα | Specificity |
| Γραμμικότητα απόκρισης ανιχνευτή | Linearity of detector response |
| Όριο ανίχνευσης | Limit of Detection |
| Όριο ποσοτικοποίησης | Limit of Quantification |

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας 6 συγκεντρώσεις των αναλυτών με σκοπό να ελεγχθεί η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των λόγων [ύψος χρωματογραφικής κορυφής των υπό εξέταση ουσιών]/[ύψος κορυφής του IS] και των αντιστοίχων συγκεντρώσεων των μεταβολιτών της καφεΐνης. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 0,10-8,00μg/mL παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη δειγμάτων σιέλου ελευθέρων μεθυλοξανθινών με πυκνά διαλύματα των ουσιών και

προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Παρασκευάστηκαν επίσης 3 δείγματα ποιοτικού ελέγχου σε μικρή, μεσαία και μεγάλη συγκέντρωση με βάση το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης. Τα δείγματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης σύμφωνα με την εξίσωση $y=ax+b$. Η γραμμικότητα των προτύπων καμπυλών πιστοποιήθηκε από την τιμή των συντελεστών (r^2) της παλινδρόμησης και μέσω του εκ νέου υπολογισμού των συγκεντρώσεων των δειγμάτων βαθμονόμησης βάσει των ήδη υπολογισθεισών εξισώσεων.

- Εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 σε υγιείς εθελοντές

Στη μελέτη συμμετείχαν 34 εθελοντές εκ των οποίων οι 17 ήταν άνδρες και οι 17 ήταν γυναίκες (**Πίνακας 9**). Οι εθελοντές θεωρήθηκαν υγιείς σύμφωνα με το ιατρικό τους ιστορικό (**Εικόνα 16**) και τον πρόσφατο αιματολογικό και βιοχημικό τους έλεγχο. Κανένας εκ των εθελοντών δεν λάμβανε κάποιο φάρμακο, ενώ καμία γυναίκα δεν έκανε χρήση αντισυλληπτικών φαρμάκων. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες σε καπνιστές (συνολικά 16 εθελοντές εκ των οποίων 11 ήταν άνδρες και 5 γυναίκες) και σε μη καπνιστές (συνολικά 18 εθελοντές εκ των οποίων 6 ήταν άνδρες και 12 γυναίκες).

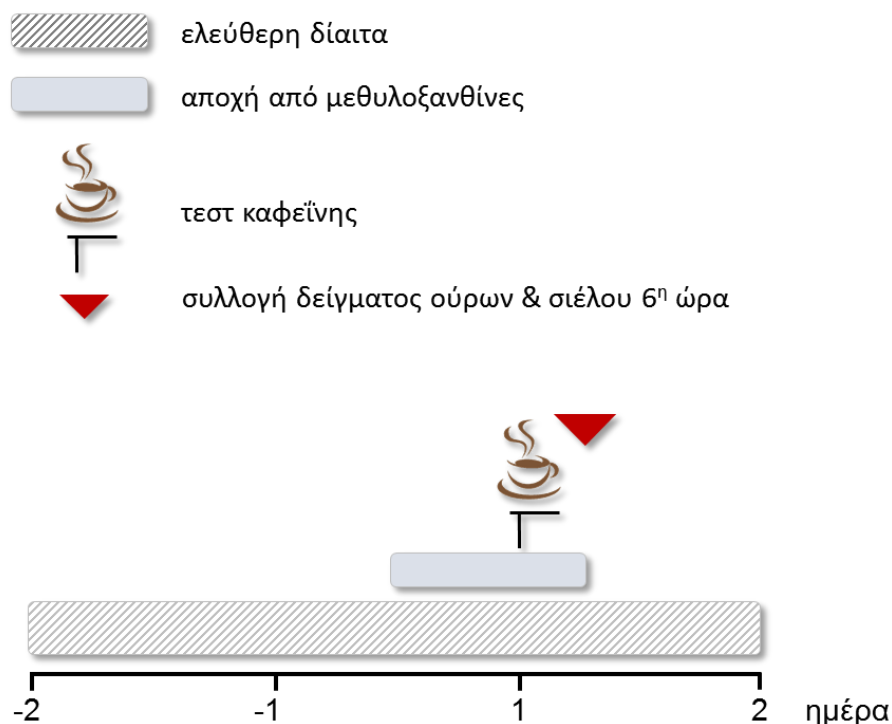
Το πρωτόκολλο της δοκιμασίας της καφεΐνης φαίνεται διαγραμματικά στην **Εικόνα 17**. Για την πραγματοποίησή του ζητήθηκε από τους εθελοντές να απέχουν από ροφήματα και τρόφιμα που περιέχουν μεθυλοξανθίνες για 12 ώρες, τουλάχιστον, πριν αλλά και κατά την διάρκεια της δοκιμασίας (γκρίζο τετράγωνο). Την ημέρα της δοκιμασίας της καφεΐνης οι εθελοντές κατανάλωσαν ~200 mL καφέ φίλτρου ή στιγμιαίου καφέ των οποίων η περιεκτικότητα σε καφεΐνη, σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη, ήταν ~118 and ~106 mg, αντίστοιχα (Barone and Roberts, 1996). Δείγματα σιέλου και ούρων συλλέχθηκαν 6 ώρες αργότερα (κόκκινο τρίγωνο), κωδικοποιήθηκαν με νούμερο και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν χρωματογραφικά. Η συλλογή των δειγμάτων σιέλου έγινε χωρίς προηγούμενη διέγερση (με παραφίνη ή άλλου μέσου μάσησης) σε πλαστικούς σωλήνες μετά από σύντομη έκπλυση του στόματος. Η συλλογή των δειγμάτων ούρων έγινε σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες με άμεση ρύθμιση του pH στο 3,5 προς αποφυγή της μετατροπής του AFMU σε AAMU. Ακολούθησε διαμερισμός του δείγματος των ούρων σε πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf και αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και χρωματογραφική τους ανάλυση.

ΑΠΟΓΡΑΦΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ

| | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| Όνοματεπώνυμο: | | | |
| Τόπος Κατοικίας : Πόλη: Οδός-αριθμός: Χωριό: | | | |
| Αριθμός Τηλεφώνου: | | | |
| Φύλο: Άνδρας † Γυναίκα † | Ηλικία: | Βάρος: | Ύψος: |
| Κάπνισμα: Όχι † | | | |
| Ναι † | (# Τσιγάρων): | Τύπος τσιγάρων: Ελαφριά † Κανονικά † Βαριά † | |
| Διακοπή καπνίσματος: † | | Ημερομηνία: | |
| Έκθεση σε παθητικό κάπνισμα (στην οικογένεια) : Ναι † Όχι † | | | |
| Κατανάλωση Καφέ (Ημερήσια ποσότητα): | | Είδος Καφέ: | |
| Κατανάλωση τροφών (κατά τη διάρκεια αποχής από καφέ): Λάχανο: Κουνουπίδι: Μπρόκολο: Γκρέϊπ Φρουτ: Κρέας στα κάρβουνα: | | | |
| Κατανάλωση αλκοόλ (συχνότητα-ποσότητα): | | | |
| Επάγγελμα: | | Έκθεση σε: Καύσιμα † Διαλύτες † Φυτοφάρμακα † Άλλες χημικές ουσίες † | |
| Έναρξη εμμήνου ρύσεως: | Φάση εμμηνορρυσιακού κύκλου: | Εμμηνόπαυση † Ηλικία εμμηνόπαυσης: | |
| Ασθένειες | | Φαρμακευτική αγωγή | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Εικόνα 16: Απογραφικό δελτίο εθελοντών που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη.

Η μελέτη έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (αριθμός έγκρισης 812015679). Όλοι οι εθελοντές που συμμετείχαν στην μελέτη έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους. Το ερευνητικό πρωτόκολλο υλοποιήθηκε σύμφωνα με τη διακήρυξη της Παγκόσμιας Ιατρικής Εταιρείας στο Ελσίνκι σχετικά με ζητήματα ηθικής κατά την έρευνα σε ανθρώπους.



Εικόνα 17: Πρωτόκολλο δοκιμασίας της καφεΐνης.

- Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση μέσου όρου. Η κανονικότητα της κατανομής των τιμών ελέγχθηκε με την δοκιμασία Kolmogorov Smirnov, ενώ διαφορές μεταξύ μέσων τιμών εξετάστηκαν με την δοκιμασία Mann-Whitney χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS (έκδοση 24). Οποιαδήποτε συσχέτιση με τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης προσδιορίστηκε από ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

Πίνακας 9: Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών που συμμετείχαν στην μελέτη.

| α/α | Κάπνισμα | Ηλικία | Βάρος | Ύψος | BMI |
|-----------------|----------|--------|-------|------|------|
| Γυναίκες | | | | | |
| 1 | OXI | 40 | 68 | 1,63 | 25,6 |
| 2 | OXI | 31 | 60 | 1,65 | 22,0 |
| 3 | OXI | 26 | 66 | 1,65 | 24,2 |
| 4 | OXI | 27 | 75 | 1,71 | 25,6 |
| 5 | OXI | 25 | 55 | 1,60 | 21,5 |
| 6 | OXI | 52 | 60 | 1,60 | 23,4 |
| 7 | OXI | 47 | 53 | 1,60 | 20,7 |
| 8 | OXI | 54 | 53 | 1,58 | 21,2 |
| 9 | OXI | 52 | 68 | 1,70 | 23,5 |
| 10 | OXI | 50 | 77 | 1,63 | 29,0 |
| 11 | OXI | 52 | 47 | 1,56 | 19,3 |
| 12 | OXI | 47 | 70 | 1,61 | 27,0 |
| 13 | NAI | 44 | 53 | 1,63 | 19,9 |
| 14 | NAI | 39 | 90 | 1,77 | 28,7 |
| 15 | NAI | 41 | 54 | 1,52 | 23,4 |
| 16 | NAI | 50 | 60 | 1,70 | 20,8 |
| 17 | NAI | 34 | 80 | 1,70 | 27,7 |
| Άνδρες | | | | | |
| 1 | OXI | 45 | 77 | 1,76 | 24,9 |
| 2 | OXI | 52 | 83 | 1,79 | 25,9 |
| 3 | OXI | 53 | 83 | 1,78 | 26,2 |
| 4 | OXI | 47 | 73 | 1,71 | 25,0 |
| 5 | OXI | 55 | 93 | 1,68 | 33,0 |
| 6 | OXI | 54 | 100 | 1,88 | 28,3 |
| 7 | NAI | 41 | 75 | 1,77 | 23,9 |
| 8 | NAI | 45 | 75 | 1,72 | 25,4 |
| 9 | NAI | 40 | 78 | 1,80 | 24,1 |
| 10 | NAI | 38 | 110 | 2,05 | 26,2 |
| 11 | NAI | 25 | 98 | 1,91 | 26,9 |
| 12 | NAI | 39 | 102 | 1,89 | 28,6 |
| 13 | NAI | 23 | 75 | 1,78 | 23,7 |
| 14 | NAI | 42 | 70 | 1,72 | 23,7 |
| 15 | NAI | 43 | 150 | 1,85 | 43,8 |
| 16 | NAI | 30 | 90 | 1,82 | 27,2 |
| 17 | NAI | 45 | 80 | 1,77 | 25,6 |

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πιστοποίηση της μεθόδου

Ειδικότητα

Η ειδικότητα προσδιορίστηκε από την ανάλυση των δειγμάτων σιέλου ελεύθερα μεθυλοξανθινών έξι εθελοντών. Δεν εμφανίσθηκε καμμία ενδογενής κορυφή που θα μπορούσε να προκαλέσει παρεμβολή με την έκλυση των κορυφών της 17X και της 137X και του εσωτερικού προτύπου IS (**Εικόνα 18**). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε παρουσίασε επαρκή διαχωρισμό της 137X από τους κύριους μεταβολίτες της 17X, 37X, 13X και το IS καθώς οι συντελεστές διαχωρισμού ήταν $>2,80$. Δύο κορυφές θεωρούνται επαρκώς διαχωρισμένες όταν ο συντελεστής διαχωρισμού είναι $\geq 1,5$ (Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th Edition, n.d.). Οι χρόνοι κατακράτησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10** ($n=50$).

Πίνακας 10: Χρόνοι κατακράτησης της καφεΐνης, των μεταβολιτών της και του IS.

| Ουσία | Χρόνος κατακράτησης (min) | n |
|-------|---------------------------|-----|
| 13X | 5,06 \pm 0,07 | 34 |
| IS | 6,00 \pm 0,09 | 50 |
| 17X | 7,24 \pm 0,10 | 50 |
| 37X | 8,25 \pm 0,15 | 34 |
| 137X | 12,68 \pm 0,20 | 50 |

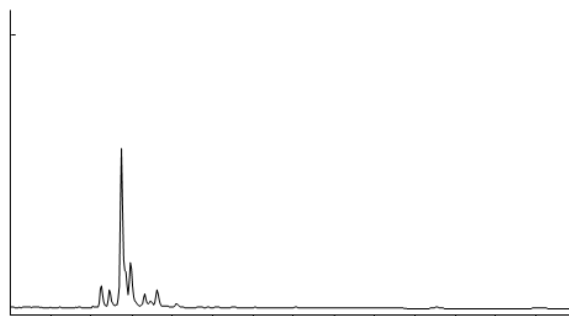
Ανάκτηση

Η ανάκτηση των 137X και 17X προσδιορίστηκε από την σύγκριση μεταξύ των εμβαδών των κορυφών δειγμάτων σιέλου που περιείχαν προκαθορισμένες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών και των εμβαδών των αντιστοιχών προτύπων διαλυμάτων σε συγκεντρώσεις 0,30, 1,35, και 6,00 $\mu\text{g/mL}$ (**Πίνακας 11**). Η ποσοστιαία ανάκτηση του IS ήταν 89,66 \pm 2,97 ($n= 62$).

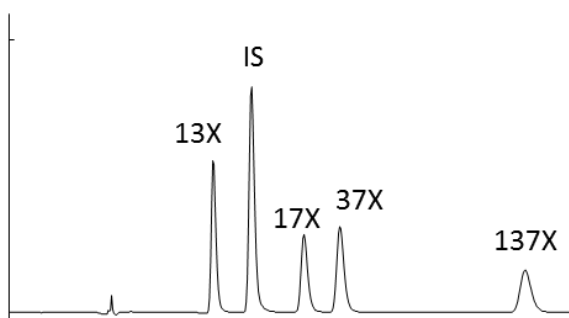
Πίνακας 11: Ποσοστά ανάκτησης της καφεΐνης, των μεταβολιτών της και του IS.

| Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$) | 17X ($n=11$) | 137X ($n=11$) |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| 0,30 | 95,97 \pm 3,26 | 98,99 \pm 3,83 |
| 1,35 | 96,72 \pm 2,71 | 93,82 \pm 3,35 |
| 6,00 | 94,93 \pm 2,74 | 93,28 \pm 3,48 |

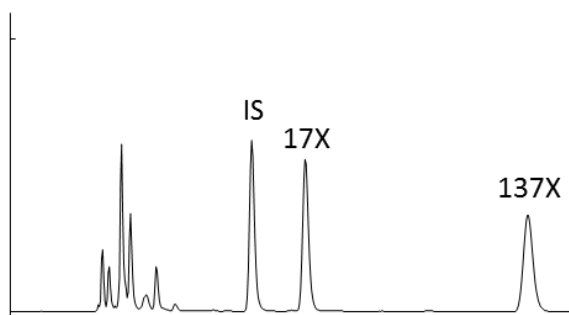
A Δείγμα σιέλου εθελοντή που δεν έχει καταναλώσει καφεΐνη



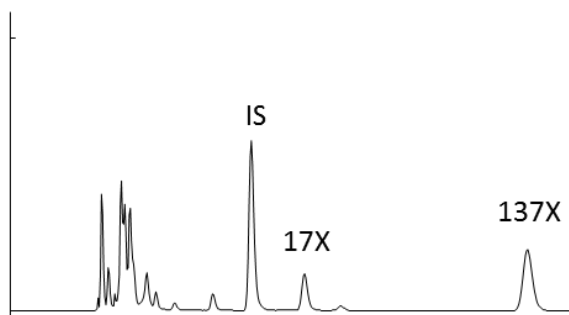
B Πρότυπο μείγμα αναλυτών



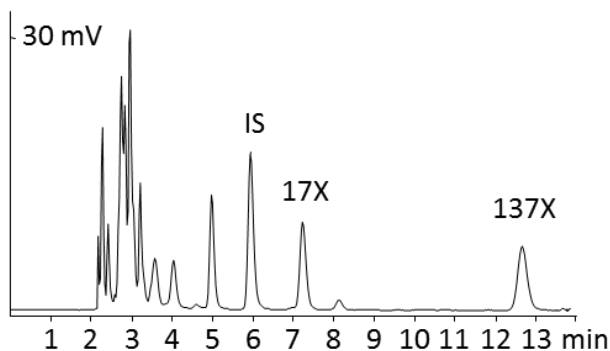
Γ Δείγμα σιέλου στο οποίο έχουν προστεθεί 17X, 137X στο LLOQ και εσωτερικό πρότυπο



Δ Δείγμα σιέλου μη καπνιστή 6 ώρες μετά την κατανάλωση καφεΐνης



Ε Δείγμα σιέλου καπνιστή 6 ώρες μετά την κατανάλωση καφεΐνης



Εικόνα 18: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων σιέλου.

Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των 137X και 17X

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάσθηκαν με σκοπό τον έλεγχο της γραμμικότητας της συσχέτισης μεταξύ των λόγων του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής των 137X και 17X προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου ($E[137X+17X]/E[IS]$), έναντι των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων των ανωτέρω ουσιών σε δείγματα σιέλου ελεύθερα μεθυλοξανθινών (blank spiked samples).

Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τις μεθυλοξανθίνες 17X και 137X ήταν γραμμικές στο εύρος συγκεντρώσεων 0,10-8,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και περιγράφονταν από τις εξισώσεις που φαίνονται στον **Πίνακα 12** με συντελεστές παλινδρόμησης $>0,99$. Και οι δύο καμπύλες είχαν σημείο τομής με τον άξονα των y το οποίο δεν διέφερε σημαντικά από το μηδέν (17X: $p=0,599$ και 137X: $p=0,477$).

Πίνακας 12: Εξισώσεις προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης και συντελεστές παλινδρόμησης στο σιέλο.

| | $y = ax + b$ | R^2 |
|------|----------------------------------------------|--------|
| 17X | $y = (0.522 \pm 0.007)x + (0.015 \pm 0.027)$ | 0.9972 |
| 137X | $y = (0.508 \pm 0.008)x + (0.024 \pm 0.032)$ | 0.9956 |

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης υπολογίσθηκαν εκ νέου σύμφωνα με τις οδηγίες πιστοποίησης βιο-αναλυτικών μεθόδων που έχουν τεθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) χρησιμοποιώντας τις παραπάνω εξισώσεις. Το σφάλμα και η διακύμανση των μετρήσεων δεν υπερέβη το 12,4% (**Πίνακας 13**).

Πίνακας 13: Ακρίβεια & επαναληψιμότητα των βαθμονομητών 17X και 137X στο σιέλο.

| [βαθμονομητή] μg/mL | 17X | | | 137X | | |
|------------------------|-----------------------|------|--------|-----------------------|-------|--------|
| | [μετρηθείσα] μg/mL | CV % | Bias % | [μετρηθείσα] μg/mL | CV % | Bias % |
| 0,10 (LLOQ, n=6) | 0,095 | 7,13 | -4,60 | 0,088 | 11,29 | -12,40 |
| 0,50 (n=2) | 0,49 | 1,43 | -2,00 | 0,53 | 0,78 | 6,60 |
| 1,00 (n=2) | 1,02 | 4,02 | 2,10 | 1,03 | 2,20 | 2,70 |
| 2,00 (n=2) | 1,95 | 0,14 | -2,55 | 2,07 | 0,13 | 3,60 |
| 4,00 (n=2) | 3,98 | 0,85 | -0,32 | 3,75 | 0,30 | -6,35 |
| 8,00 (n=2) | 7,78 | 1,05 | -2,75 | 7,84 | 1,24 | -2,00 |

Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου

Τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control samples, QC) με χαμηλή (0,30 μg/mL), μεσαία (1,35 μg/mL) και υψηλή (6,00 μg/mL) συγκέντρωση των 17X, 137X και IS παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη κατάλληλα αραιωμένου πυκνού διαλύματος των ουσιών σε δείγμα σιέλου ατόμου στο οποίο δεν είχε καταναλώσει μεθυλοξανθίνες (spiked samples). Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα εντός σειράς (intra-day) και μεταξύ σειρών (inter-day) ελέγχθηκε με ανάλυση έξι αντιγράφων καθενός από τα τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου (**Πίνακας 14**). Για κάθε δείγμα ποιοτικού ελέγχου η συγκέντρωση της κάθε ουσίας υπολογίσθηκε εκ νέου με βάση την εξίσωση της καμπύλης γραμμικής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα πιστοποίησης της μεθόδου για τα δείγματα εντός σειράς (intra-day, n=6) και μεταξύ σειρών (inter-day, n=6) εμφανίζονται στον **Πίνακα 14**.

Η ακρίβεια της μεθόδου ορίσθηκε ως % σφάλμα (bias %) και υπολογίσθηκε από την εκατοστιαία διαφορά μεταξύ της μετρηθείσας έναντι της γνωστής συγκέντρωσης κάθε δείγματος σε σχέση με την γνωστή συγκέντρωση σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Bias} = 100 \times \frac{\text{μετρηθείσα συγκέντρωση} - \text{γνωστή συγκέντρωση}}{\text{γνωστή συγκέντρωση}}$$

Η επαναληψιμότητα (precision) υπολογίσθηκε από τον εκατοστιαίο συντελεστή διακύμανσης των έξι μετρήσεων (% Coefficient of variation - CV%) βάσει του τύπου:

$$\% CV = \frac{SD}{mean} \times 100$$

Η μέθοδος αποδείχθηκε αναπαραγωγίμη με συντελεστή διακύμανσης <5,14% για τις 17X και 137X. Οι τιμές του % σφάλματος κυμάνθηκαν για την 17X μεταξύ -3,38 και 2,22% και για την 137X μεταξύ 3,24 και 4,47%. Οι μεταβολικοί λόγοι 17X/137X που προέκυψαν ήταν επίσης αναπαραγωγίμοι με συντελεστή διακύμανσης <5,51% και % σφάλμα που κυμάνθηκε μεταξύ 5,09 και 2,74%.

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού καθορίστηκε, σύμφωνα με τον EMA, ως η ελάχιστη ποσότητα ουσίας που μπορούσε να προσδιορισθεί αξιόπιστα σε δείγμα με ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα (μεγαλύτερη του 80%, ή αλλιώς με απόκλιση <20%) και ταυτίζεται με την κατώτατη συγκέντρωση εκ των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης. Επομένως, το LLOQ της μεθόδου ορίστηκε ως το σημείο της μικρότερης συγκέντρωσης που εμφανίζεται στην καμπύλη βαθμονόμησης δηλαδή 0,10 µg/mL (Πίνακας 13).

Το όριο ανιχνευσιμότητας, το οποίο περιγράφει τη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση ουσίας που μπορεί να εντοπιστεί σε ένα δείγμα, καθορίστηκε ως η συγκέντρωση της ουσίας με λόγο σήματος/θορύβου ίσο με 3. Το LOD προσδιορίστηκε μετά από πολλαπλές (n=3) εγχύσεις των 17X και 137X στη χρωματογραφική στήλη σε συγκέντρωση 0,03 µg/mL μετά από προηγηθείσα χρωματογραφική έκπλυση για μεγάλο χρονικό διάστημα για τον ορισμό της γραμμής αναφοράς (baseline) του χρωματογραφήματος. Ως όριο θορύβου ορίστηκε η απόσταση μεταξύ μέγιστων και ελάχιστων τιμών του σήματος της χρωματογραφικής γραμμής αναφοράς (Sadek, 1999). Το όριο ανιχνευσιμότητας το οποίο υπολογίστηκε με την μέθοδο αυτή ήταν 0,018±0,002 µg/mL για την 17X και 0,032±0,002 µg/mL για την 137X.

Πίνακας 14: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου των 17X και 137X στο σίελο καθώς και του λόγου 17X/137X σε δείγματα σιέλου.

| [προστεθείσα συγκέντρωση]* μg/mL | 1X | | | 137X | | | Αναμενόμενος λόγος 17X/137X = 1,08 | | |
|----------------------------------------|-----------------------|------|--------|-----------------------|------|--------|------------------------------------|------|--------|
| | [μετρηθείσα] μg/mL | CV % | Bias % | [μετρηθείσα] μg/mL | CV % | Bias % | Μετρηθείς λόγος | CV % | Bias % |
| <i>Εντός σειράς (intra-day, n=6)</i> | | | | | | | | | |
| 0,30 | 0,29 | 2,46 | -3,38 | 0,30 | 2,37 | 1,24 | 1,03 | 3,11 | -5,09 |
| 1,35 | 1,38 | 2,21 | 2,22 | 1,36 | 1,76 | 0,83 | 1,09 | 2,94 | 1,30 |
| 6,00 | 6,12 | 2,18 | 2,00 | 6,27 | 2,12 | 4,47 | 1,05 | 3,84 | -2,70 |
| <i>Μεταξύ σειρών (inter-day, n=6)</i> | | | | | | | | | |
| 0,30 | 0,30 | 3,85 | -0,71 | 0,29 | 4,44 | -3,24 | 1,11 | 4,83 | 2,74 |
| 1,35 | 1,34 | 1,07 | -0,86 | 1,32 | 5,14 | -2,28 | 1,10 | 4,89 | 1,58 |
| 6,00 | 6,03 | 2,44 | 0,58 | 5,93 | 3,30 | -1,12 | 1,10 | 5,51 | 1,81 |

*17X ή 137X

Αποτελέσματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου σε δείγματα ούρων

Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης που προέκυψαν μετά από την ανάλυση των δειγμάτων βαθμονόμησης συγκεντρώσεων 10, 20, 50, 150, 300 και 500 μM στα ούρα εμφανίζονται στον **Πίνακα 15**.

Πίνακας 15: Εξισώσεις προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης και συντελεστές παλινδρόμησης στα ούρα.

| | $y = ax + b$ | R^2 |
|------|------------------------|--------|
| AFMU | $y = 0,0097x + 0,0019$ | 0,9998 |
| 1U | $y = 0,0063x + 0,0531$ | 0,9995 |
| 1X | $y = 0,0041x + 0,0245$ | 0,9999 |
| 17U | $y = 0,0034x + 0,0112$ | 0,9999 |

Ο ποιοτικός έλεγχος έγινε με την ανάλυση δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου 40 μM και 400 μM για την παρακολούθηση της διακύμανσης των μετρήσεων μεταξύ τριών ημερών κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων των εθελοντών. Τα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου εμφανίζονται στον **Πίνακα 16**.

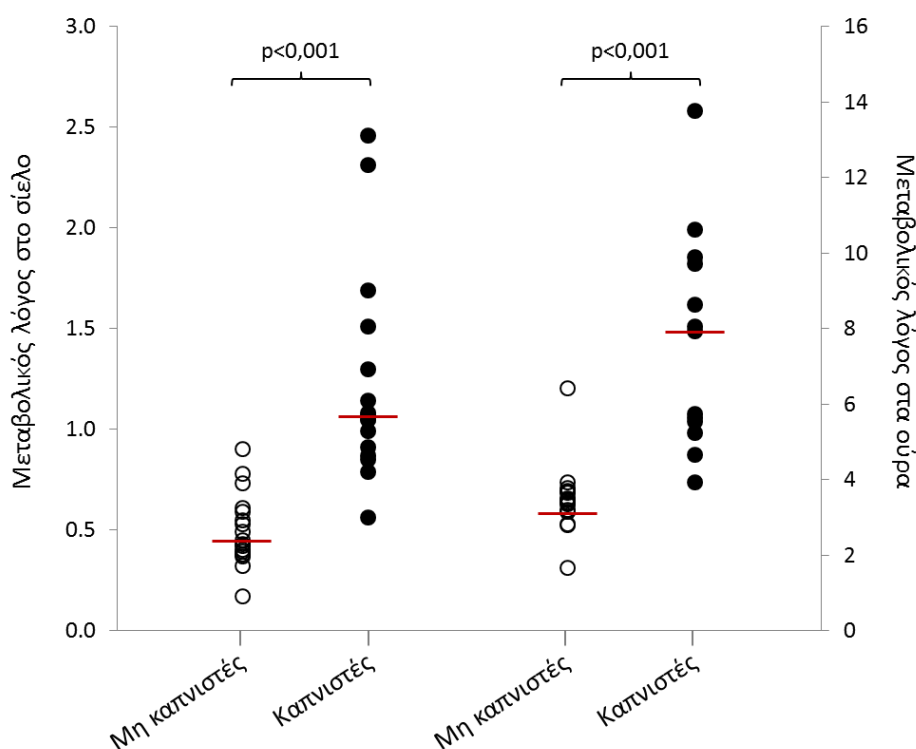
Πίνακας 16: Ακρίβεια & επαναληψιμότητα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου AFMU, 1U, 1X και 17U στα ούρα.

| Προσθεθείσα συγκέντρωση | 40 μM | | | 400 μM | | |
|----------------------------|---------------------------------------|-------|--------|---------------------------------------|--------|--------|
| | [μέση μετρηθείσα] μM | CV % | Bias % | [μέση μετρηθείσα] μM | CV % | Bias % |
| | AFMU | 40,52 | 6,77 | 1,3 | 387,25 | 4,15 |
| 1U | 42,16 | 2,27 | 5,4 | 398,31 | 0,41 | -0,42 |
| 1X | 40,12 | 3,36 | 0,3 | 399,24 | 1,78 | -0,19 |
| 17U | 40,85 | 0,88 | 2,13 | 403,31 | 0,31 | 0,83 |

Εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου σε υγιείς εθελοντές

Η χρωματογραφική μέθοδος RP-HPLC που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε στον φαινοτυπικό προσδιορισμό 34 υγιών εθελοντών (**Πίνακας 9**). Εξ αυτών, οι 17 ήταν άνδρες (6 μη καπνιστές και 11 καπνιστές) με μέσο όρο ηλικίας $41,7 \pm 8,4$ έτη (εύρος τιμών 23–55 έτη) και οι 17 ήταν γυναίκες (12 μη καπνίστριες και 5 καπνίστριες) με μέσο όρο ηλικίας $41,0 \pm 9,3$ έτη (εύρος τιμών 25–52 έτη).

Η αποτίμηση της επίδρασης του καπνίσματος στην δραστηριότητα του CYP1A2 έγινε με σύγκριση των μεταβολικών λόγων μεταξύ των μη καπνιστών και των καπνιστών σε σίελο και ούρα. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα ενός μη καπνιστή και ενός καπνιστή φαίνονται στην **Εικόνα 18Δ** και **18Ε**. Η μέση τιμή των μεταβολικών λόγων 17X/137X στο σίελο ήταν για τους μη καπνιστές 0,44 (εύρος τιμών 0,17-0,90) και για τους καπνιστές 1,15 (εύρος τιμών 0,60-2,66). Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (Mann–Whitney $p < 0,001$; **Εικόνα 19**, **Πίνακας 17**). Η μέση τιμή των μεταβολικών λόγων (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα ήταν για τους μη καπνιστές 3,43 (εύρος τιμών 1,67-6,43) και για τους καπνιστές 7,94 (εύρος τιμών 3,94-13,77). Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (Mann–Whitney $p < 0,001$; **Εικόνα 19**, **Πίνακας 17**).



Εικόνα 19: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης σε σίελο 17X/137X και ούρα (AFMU+1U+1X)/17U 34 υγιών εθελοντών. Οι οριζόντιες γραμμές υποδηλώνουν μέσες τιμές της κάθε ομάδας.

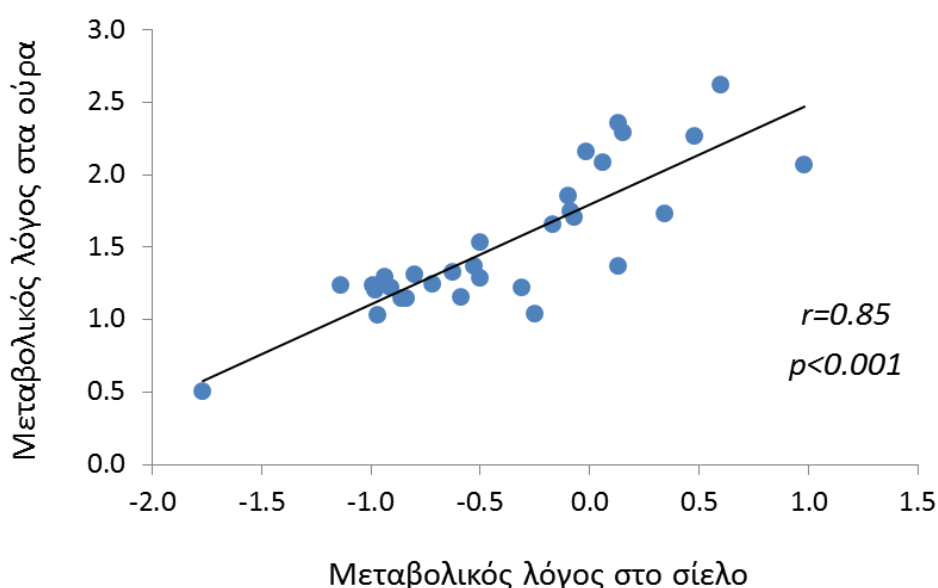
Πίνακας 17: Μέση τιμή συγκεντρώσεων της καφεΐνης και των μεταβολιτών της, καθώς και των μεταβολικών λόγων σε ούρα και σίελο των υγιών εθελοντών.

| | Μη καπνιστές | | Καπνιστές | |
|-------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | Μέσος | Εύρος | Μέσος | Εύρος |
| Ούρα | | | | |
| Συγκέντρωση (μmol/L) | | | | |
| AFMU | 26,40 | 4,60–188,90 | 133,30 | 21,70–632,70 |
| 1U | 88,10 | 28,50–259,50 | 343,80 | 141,30–748,50 |
| 1X | 61,20 | 29,80–154,70 | 220,70 | 81,80–528,80 |
| 17U | 68,40 | 16,70–136,60 | 85,29 | 30,40–321,20 |
| Μεταβολικός λόγος (AFMU+1U+1X)/17U | 3,43 | 1,67–6,43 | 7,94* | 3,94–13,77 |
| Σίελος | | | | |
| Συγκέντρωση (μmol/L) | | | | |
| 17X | 3,91 | 0,67–8,01 | 3,38 | 1,46–7,13 |
| 137X | 7,45 | 1,68–25,99 | 3,26 | 0,65–8,44 |
| Μεταβολικός λόγος 17X/137X | 0,44 | 0,17–0,90 | 1,15* | 0,60–2,66 |

* $p < 0,001$ σε σύγκριση με τους μη καπνιστές, δοκιμασία Mann–Whitney.

Επομένως, ανεξάρτητα από το βιολογικό υγρό, σίελο ή ούρα, που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα φαινοτυπικού προσδιορισμού του CYP1A2 η δραστηριότητα του ενζύμου είναι περισσότερο από το διπλάσιο στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές.

Για τη συσχέτιση των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης μεταξύ ούρων και σιέλου, έγινε αρχικά μετατροπή των τιμών σε λογαριθμική κλίμακα. Οι μεταβολικοί λόγοι στο σίελο επέδειξαν σημαντική συσχέτιση με τους μεταβολικούς λόγους στα ούρα με συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson 0,85 και τιμή $p < 0,001$ (Εικόνα20).



Εικόνα 20: Γραφική παράσταση συσχέτισης μεταξύ των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U και στο σίελο 17X/137X σε 34 υγιείς εθελοντές.

2.2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Διερεύνηση της επίδρασης του *C. Sativus* L. στη δραστηριότητα ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών σε υγιείς εθελοντές

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Εθελοντές

Στη μελέτη συμμετείχαν 34 μη καπνιστές υγιείς εθελοντές, εκ των οποίων 20 ήταν γυναίκες και 14 ήταν άνδρες (**Πίνακας 18**). Οι εθελοντές θεωρήθηκαν υγιείς σύμφωνα με το ιατρικό τους ιστορικό που ελήφθη και συμπληρώθηκε σε Ερωτηματολόγιο που εμφανίζεται στο Κεφάλαιο 1 (**Εικόνα 16**) και με πρόσφατο βιοχημικό και αιματολογικό έλεγχο. Οι εθελοντές δεν είχαν ιστορικό κάποιας ασθένειας (όπως καρδιοπάθεια, φλεγμονώδες ή αυτοάνοσο νόσημα, διαβήτη, νόσο του θυρεοειδούς ή άλλων ενδοκρινών αδένων). Επίσης, οι εθελοντές δεν ελάμβαναν, τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της μελέτης, φάρμακα, βιταμίνες ή άλλα συμπληρώματα διατροφής που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την λειτουργικότητα των ενζύμων που διερευνήθηκαν στη μελέτη.

Το πρωτόκολλο της μελέτης έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (αριθμός έγκρισης 42396). Όλοι οι εθελοντές που συμμετείχαν στην μελέτη έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους μετά από πλήρη πληροφόρησή τους για τους σκοπούς της μελέτης και την πειραματική διαδικασία. Το ερευνητικό πρωτόκολλο υλοποιήθηκε σύμφωνα με τη διακήρυξη της Παγκόσμιας Ιατρικής Εταιρείας στο Ελσίνκι σχετικά με ζητήματα ηθικής κατά την έρευνα σε ανθρώπους.

- Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη ήταν ανοικτής επισήμανσης (open-label), πριν-και-μετά κλινική δοκιμή κατά την οποία ο κάθε εθελοντής χρησίμευσε ως μάρτυρας του εαυτού του. Ο σχεδιασμός της μελέτης παρουσιάζεται διαγραμματικά στην **Εικόνα 21**. Η συνολική διάρκεια της μελέτης ήταν 17 ημέρες. Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 διενεργήθηκε στις ακόλουθες ημέρες:

ημέρα 1: μετά από ελεύθερη διαίτα

ημέρα 8: μετά από περιορισμένη διαίτα, πριν την κατανάλωση κρόκου

ημέρα 15: μετά από περιορισμένη διαίτα και καθημερινή κατανάλωση κρόκου

Δοκιμασία της καφεΐνης

Τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των ενζύμων προηγήθηκε αποχή 36 ωρών από ροφήματα και τροφές που περιείχαν μεθυλοξανθίνες δηλαδή από τις 8:00 μμ δύο ημέρες πριν την δοκιμασία καφεΐνης μέχρι τις 8:00 πμ της ημέρας της δοκιμασίας της καφεΐνης. Το πρωί των ημερών 1, 8 και 15 οι εθελοντές ακολούθησαν το πρωτόκολλο της δοκιμασίας της καφεΐνης, δηλαδή, αφού άδειασαν την κύστη τους, κατανάλωσαν μια κάψουλα περιεκτικότητας 200mg καφεΐνης και συνέχισαν την αποχή από μεθυλοξανθίνες. Για τις επόμενες πέντε ώρες έκαναν συλλογή ούρων (0-5 ώρες), ενώ την 6^η ώρα μετά από την κατανάλωση της κάψουλας καφεΐνης συνέλεξαν ένα δείγμα ούρων σε ουροσυλλέκτη και δείγμα σιέλου (χωρίς προηγούμενη διέγερση σιελόροιας με κάποιο τεχνητό μέσον και μετά από μικρή έκπλυση του στόματός τους) σε δοκιμαστικό σωλήνα. Τα ούρα οξινίσθηκαν με υδροχλωρικό οξύ σε τελικό pH=3,5 προς αποφυγή της μετατροπής του AFMU σε AAMU. Τα δείγματα σιέλου (1-2mL) καθώς και διαμερισμένα δείγματα ούρων (1mL) κωδικοποιήθηκαν με αριθμούς και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Διατητικές απαιτήσεις του ερευνητικού πρωτοκόλλου

Το πρωί της ημέρας 1 οι εθελοντές ακολούθησαν το πρωτόκολλο της δοκιμασίας της καφεΐνης και ξεκίνησαν περιορισμένη δίαιτα ελεύθερης καροτενοειδών διάρκειας 14 ημερών, μέχρι δηλαδή την ολοκλήρωση της μελέτης. Ο στόχος του αποκλεισμού των καροτενοειδών από την διατροφή ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των καροτενοειδών που περιέχονται στον κρόκο ανεπηρέαστα από τα καροτενοειδή που περιέχονται στη διατροφή. Επομένως, κατά την διάρκεια της περιορισμένης δίαιτας ελεύθερης καροτενοειδών αποκλείστηκαν τα ακόλουθα φρούτα και λαχανικά: ντομάτες, πιπεριές, καρώτα, κολοκύθια, σπανάκι, μαρούλι, μπιζέλια, σταυρανθή λαχανικά, σέλινο, σπαράγγια, πατζάρια, κρεμμύδια, ρόδια, βερίκοκα, ροδάκινα, κεράσια, καρπούζι, πεπόνι, πορτοκάλια, μανταρίνια, γκρέϊπφρουτ και μήλα. Αποκλείστηκαν επίσης τα κόκκινα ψάρια (σολωμός, μπαρμπούνι). Κατά την διάρκεια της περιορισμένης δίαιτας οι εθελοντές δεν έπρεπε να καταναλώνουν επίσης μπαχαρικά, αρωματικά βότανα, αλκοόλ και κρέας ψημένο στα κάρβουνα ή σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι τροφές που μπορούσαν να καταναλώνουν οι εθελοντές ήταν: κόκκινο κρέας, κοτόπουλο ή ψάρι, λίπη και έλαια, το ασπράδι του αυγού, δημητριακά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, άσπρο ψωμί, μακαρόνια και πατάτες, όλα όλα βρασμένα ή ψημένα σε χαμηλή θερμοκρασία.

Πίνακας 18: Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών που συμμετείχαν στην μελέτη.

| α/α | Φύλο | Ηλικία | Βάρος | Ύψος | ΔΜΣ |
|-----|------|--------|-------|------|-------|
| 1 | Γ | 21 | 53 | 1.62 | 20.20 |
| 2 | Γ | 47 | 53 | 1.60 | 20.70 |
| 3 | Γ | 22 | 53 | 1.61 | 20.45 |
| 4 | Γ | 23 | 62 | 1.72 | 20.96 |
| 5 | Γ | 45 | 69 | 1.72 | 23.32 |
| 6 | Γ | 52 | 52 | 1.67 | 18.65 |
| 7 | Γ | 22 | 54 | 1.63 | 20.32 |
| 8 | Γ | 34 | 58 | 1.66 | 21.05 |
| 9 | Γ | 51 | 58 | 1.62 | 22.10 |
| 10 | Γ | 22 | 55 | 1.62 | 20.96 |
| 11 | Γ | 45 | 68 | 1.65 | 24.98 |
| 12 | Γ | 52 | 69 | 1.70 | 23.70 |
| 13 | Γ | 57 | 63 | 1.65 | 23.14 |
| 14 | Γ | 54 | 53 | 1.58 | 21.23 |
| 15 | Γ | 52 | 60 | 1.61 | 23.15 |
| 16 | Γ | 52 | 60 | 1.60 | 23.44 |
| 17 | Γ | 56 | 75 | 1.63 | 28.23 |
| 18 | Γ | 54 | 58 | 1.57 | 23.53 |
| 19 | Γ | 54 | 67 | 1.66 | 24.31 |
| 20 | Γ | 50 | 72 | 1.67 | 25.82 |
| 21 | A | 25 | 92 | 1.88 | 26.03 |
| 22 | A | 54 | 84 | 1.89 | 23.52 |
| 23 | A | 26 | 84 | 1.82 | 25.36 |
| 24 | A | 42 | 83 | 1.75 | 27.10 |
| 25 | A | 33 | 89 | 1.90 | 24.65 |
| 26 | A | 25 | 67 | 1.88 | 18.96 |
| 27 | A | 62 | 95 | 1.83 | 28.37 |
| 28 | A | 52 | 83 | 1.78 | 26.20 |
| 29 | A | 19 | 80 | 1.76 | 25.83 |
| 30 | A | 24 | 75 | 1.80 | 23.15 |
| 31 | A | 22 | 73 | 1.62 | 27.82 |
| 32 | A | 24 | 75 | 1.63 | 28.23 |
| 33 | A | 22 | 80 | 1.77 | 25.54 |
| 34 | A | 24 | 130 | 1.85 | 37.98 |



Εικόνα 21: Σχηματικό διάγραμμα του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολούθησαν οι εθελοντές κατά τη δοκιμασία της καφεΐνης. Σε κόκκινο και γαλάζιο πλαίσιο εμφανίζονται οι τροφές και τα ροφήματα που απαγορεύονται και επιτρέπονται, αντίστοιχα.

Εικόνα 22: Αντίγραφο πρωτοκόλλου συλλογής δειγμάτων που δόθηκε στους εθελοντές.

| | |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ημέρα 1 ^η : | Από το μεσημέρι και μετά αποχή από: <ul style="list-style-type: none"> ▶ καφέ, σοκολάτα, κακάο, τσάι και τα ροφήματα αυτών, κόκα-κόλα, σπράιτ ▶ Αλκοολούχα ποτά ▶ Depon, Panadol, Mesulid |
| Ημέρα 2 ^η : | Όμοια με την 1 ^η ημέρα |
| Ημέρα 3 ^η : | Λήψη καφεΐνης μετά την πρωινή έγερση και ούρηση, και συνέχιση της αποχής από τα προαναφερθέντα. Συλλογή των ούρων τις πρώτες 5 ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης σε μπουκάλι. Συλλογή των ούρων μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης σε ουροσυλλέκτη. Συλλογή σιέλου στο τέλος της 6^η ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης, σε συλλέκτη. Διατήρηση των δειγμάτων σε ψυγείο μέχρι την προσκόμιση τους στο εργαστήριο. |
| Ημέρα 4 ^η : | Ελεγχόμενη δίαιτα (6 ημερών) με τροφές που δεν περιέχουν καροτενοειδή. Επιτρεπόμενες τροφές: κόκκινο κρέας, πουλερικά, ψάρια – θαλασσινά, (κρέατα, πουλερικά και ψάρια βρασμένα και όχι ψημένα) ασπράδι αυγού, ξηροί καρποί και κάστανα, εδώδιμα λίπη και έλαια, μέλι, ζάχαρη, ζυμαρικά, ρύζι, πατάτες, δημητριακά, τυροκομικά. Μη επιτρεπόμενες: ντομάτα, πιπεριές, καρότα, σπανάκι, νεροκολοκύθες, μπιζέλια, λαχανίδα, μπρόκολο, σέλινο, κουνουπίδι, λαχανάκια βρυξελλών, σπαράγγια, παντζάρια, ρόδι, βερίκοκα, ροδάκινα, πεπόνι, πορτοκάλια, μανταρίνια, καρπούζι, γκρέιπ φρουτ, εντόσθια ζώων. |
| Ημέρα 5 ^η : | Όμοια με την 4 ^η ημέρα |
| Ημέρα 6 ^η : | Όμοια με την 4 ^η ημέρα |
| Ημέρα 7 ^η : | Όμοια με την 4 ^η ημέρα |
| Ημέρα 8 ^η : | Όμοια με την 4 ^η ημέρα. Επιπλέον από το απόγευμα αυτής της ημέρας αποχή και από: <ul style="list-style-type: none"> ▶ καφέ, σοκολάτα, κακάο, τσάι και τα ροφήματα αυτών, κόκα-κόλα, σπράιτ ▶ Αλκοολούχα ποτά ▶ Depon, Panadol, Mesulid |
| Ημέρα 9 ^η : | Όμοια με την 8 ^η ημέρα |
| Ημέρα 10 ^η : | Λήψη καφεΐνης μετά την πρωινή έγερση και ούρηση, και συνέχιση της αποχής από τα προαναφερθέντα. Συλλογή των ούρων τις πρώτες 5 ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης σε μπουκάλι. Συλλογή των ούρων μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης σε ουροσυλλέκτη. Συλλογή σιέλου στο τέλος της 6^η ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης, σε συλλέκτη. Διατήρηση των δειγμάτων σε ψυγείο μέχρι την προσκόμιση τους στο εργαστήριο. |

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ημέρα 11 ^η : | <p>Ελεγχόμενη δίαιτα (6 ημερών) με τροφές που δεν περιέχουν καροτενοειδή και ταυτόχρονη λήψη εκχυλίσματος κρόκου (300 mg).</p> <p>Επιτρεπόμενες τροφές: κόκκινο κρέας, πουλερικά, ψάρια – θαλασσινά, (κρέατα, πουλερικά και ψάρια βρασμένα και όχι ψημένα) ασπράδι αυγού, ξηροί καρποί και κάστανα, εδώδιμα λίπη και έλαια, μέλι, ζάχαρη, ζυμαρικά, ρύζι, πατάτες, δημητριακά, τυροκομικά.</p> <p>Μη επιτρεπόμενες: ντομάτα, πιπεριές, καρότα, σπανάκι, νεροκολοκύθες, μπιζέλια, λαχανίδα, μπρόκολο, σέλινο, κουνουπίδι, λαχανάκια βρυξελλών, σπαράγγια, παντζάρια, ρόδι, βερίκοκα, ροδάκινα, πεπόνι, πορτοκάλια, μανταρίνια, καρπούζι, γκρέιπ φρουτ, εντόσθια ζώων.</p> <p>Στο διάστημα αυτών των 6 ημερών γίνεται ταυτόχρονα λήψη του εκχυλίσματος του κρόκου.</p> <p>Παρασκευή του εκχυλίσματος του κρόκου: Ο κρόκος προστίθεται σε 100 ml ζεστό νερό (Θερμοκρασία 70-80° C) και παραμένει για 12 ώρες περίπου (όλο το βράδυ σε κλειστό ντουλάπι). Το ρόφημα αυτό διηθείται και καταναλώνεται μετά την πρωινή έγερση και ούρηση.</p> |
| Ημέρα 12 ^η : | Όμοια με την 11 ^η ημέρα |
| Ημέρα 13 ^η : | Όμοια με την 11 ^η ημέρα |
| Ημέρα 14 ^η : | Όμοια με την 11 ^η ημέρα |
| Ημέρα 15 ^η : | <p>Όμοια με την 11^η ημέρα</p> <p>Επιπλέον από το απόγευμα αυτής της ημέρας αποχή και από:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ καφέ, σοκολάτα, κακάο, τσάι και τα ροφήματα αυτών, κόκα-κόλα, σπράιτ ▶ Αλκοολούχα ποτά ▶ Depon, Panadol, Mesulid |
| Ημέρα 16 ^η : | Όμοια με την 15 ^η ημέρα |
| Ημέρα 17 ^η : | <p>Λήψη καφεΐνης μετά την πρωινή έγερση και ούρηση, και συνέχιση της αποχής από τα προαναφερθέντα.</p> <p>Συλλογή των ούρων τις πρώτες 5 ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης σε μπουκάλι.</p> <p>Συλλογή των ούρων μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης σε ουροσυλλέκτη.</p> <p>Συλλογή σιέλου στο τέλος της 6^{ης} ώρας μετά την λήψη της καφεΐνης, σε συλλέκτη.</p> <p>Διατήρηση των δειγμάτων σε ψυγείο μέχρι την προσκόμιση τους στο εργαστήριο.</p> |

Στην **Εικόνα 21** απεικονίζεται το ερευνητικό πρωτόκολλο με τις διαιτητικές του απαιτήσεις και στην **Εικόνα 22** παρουσιάζεται αντίγραφο των οδηγιών που δόθηκε στους εθελοντές.

Το βράδυ της ημέρας 8 οι εθελοντές παρασκεύασαν το πρώτο ρόφημα κρόκου το οποίο κατανάλωσαν το πρωί της ημέρας 9 και το ίδιο συνεχίσθηκε για τις επόμενες 5 ημέρες. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να καταγράψουν κάθε πιθανή ανεπιθύμητη ενέργεια από την κατανάλωση του κρόκου όπως πονοκέφαλος, ναυτία, ζάλη, λιποθυμία, βήχας, δύσπνοια, ταχυκαρδία, εξάντληση, δυσουρία, αλλαγές στην όρεξη και διαταραχές του γαστρεντερικού.

- Παρασκευή του ροφήματος του κρόκου

Χρησιμοποιήθηκε κρόκος σε σκόνη (300mg) ο οποίος διαλυτοποιήθηκε σε ~150 mL νερού βρύσης προθερμασμένου σε θερμοκρασία περίπου 70°-80°C. Το διάλυμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος και καταναλώθηκε την επόμενη ημέρα. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε βιολογικός Κρόκος Κοζάνης ο οποίος αγοράστηκε από την τοπική αγορά της Λάρισας. Το προϊόν διανέμεται υπό την επωνυμία «Κρόκος Κοζάνης» και παράγεται από τον Συνεταιρισμό Κροκοπαραγωγών Κοζάνης. Ο συνεταιρισμός αυτός διαθέτει πιστοποιημένη βιολογική καλλιέργεια κρόκου (ISO 9001, 1997).

- Χημικά και αντιδραστήρια

Οι χημικές ουσίες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στη μεθοδολογία του Κεφαλαίου 1.

- Ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στα ούρα και στον σίελο

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν (χρωματογραφική στήλη, αντλία, ανιχνευτής, λογισμικό πρόσληψης και ανάλυσης δεδομένων) και οι χρωματογραφικές συνθήκες (κινητή φάση, θερμοκρασία, ταχύτητα ροής, μήκος κύματος ανίχνευσης) είναι πανομοιότυπες με αυτές που αναφέρονται στη μεθοδολογία του Κεφαλαίου 1. Το ίδιο ισχύει και για την προκατεργασία των δειγμάτων (εκχύλιση υγρού-υγρού, εξαέρωση των δειγμάτων, απαναδιαλυτοποίηση του στερεού υπολείμματος).

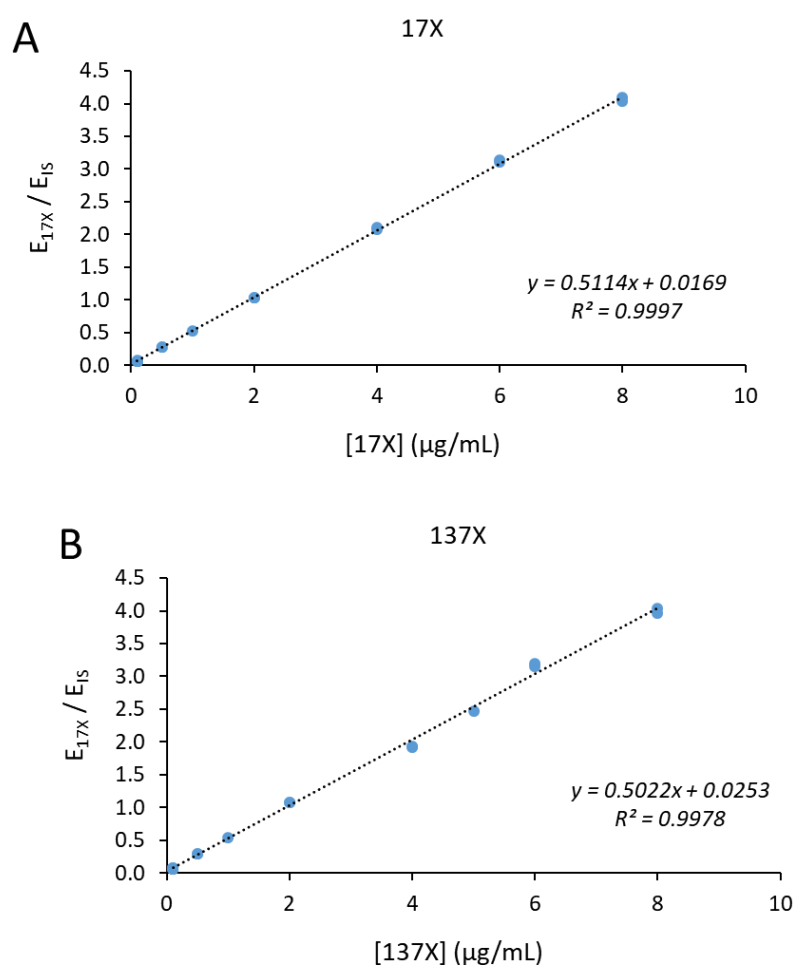
Αντιπροσωπευτική καμπύλη βαθμονόμησης της 17X και της 137X στο σίελο

Στον **Πίνακα 19** εμφανίζονται οι πρότυπες καμπύλες της 17X και της 137X οι οποίες κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων σιέλου των

εθελοντών που συμμετείχαν στη μελέτη του κρόκου. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης 17X και 137X εμφανίζονται στην **Εικόνα 23**. Η ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου εμφανίζονται στον **Πίνακα 20**. Το σφάλμα και η διακύμανση των μετρήσεων ήταν μικρότερες του 10%.

Πίνακας 19: Εξισώσεις προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης και συντελεστές παλινδρόμησης της 17X και της 137X στο σίελο.

| | $y = ax + b$ | R^2 |
|------|----------------------|--------|
| 17X | $y = 0,521x + 0,014$ | 0,9972 |
| | $y = 0,511x + 0,017$ | 0,9977 |
| 137X | $y = 0,508x + 0,024$ | 0,9956 |
| | $y = 0,502x + 0,025$ | 0,9978 |



Εικόνα 23: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης **A.** 17X και **B.** 137X.

Πίνακας 20: Ακρίβεια & επαναληψιμότητα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου 17X και 137X στο σίελο κατά τη διάρκεια της μελέτης (n=6).

| Προσθεθείσα συγκέντρωση | 0,3 µg/mL | | | 6,0 µg/mL | | |
|----------------------------|-------------------------------|------|--------|-------------------------------|------|--------|
| | [μέση μετρηθείσα] µg/mL | CV % | Bias % | [μέση μετρηθείσα] µg/mL | CV % | Bias % |
| 17X | 0,32 | 3,76 | 7,32 | 5,91 | 6,19 | -1,54 |
| 137X | 0,31 | 3,96 | 4,97 | 5,85 | 5,76 | -2,56 |

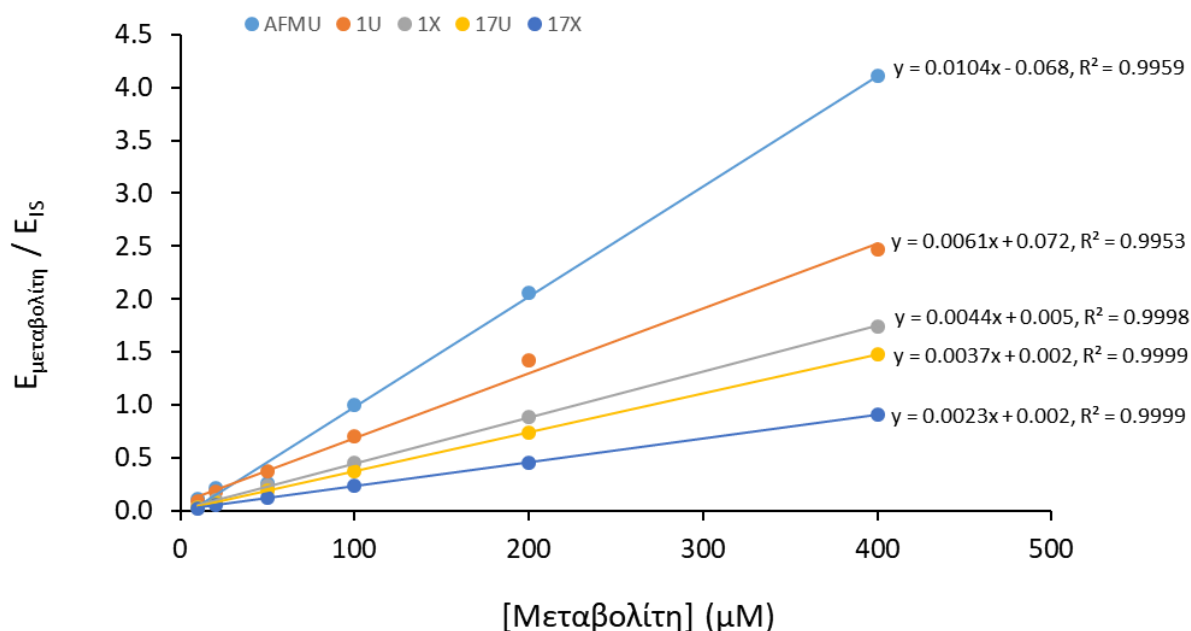
Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των μεταβολιτών AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X στα ούρα

Στον **Πίνακα 21** εμφανίζονται οι πρότυπες καμπύλες των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X οι οποίες κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων ούρων των εθελοντών που συμμετείχαν στη μελέτη του κρόκου. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X εμφανίζονται στην **Εικόνα 24**.

Πίνακας 21: Εξισώσεις προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης και συντελεστές παλινδρόμησης των μεταβολιτών AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X στα ούρα.

| | $y = ax + b$ | R^2 |
|------|-----------------------|--------|
| AFMU | $y = 0,0104x - 0,068$ | 0,9959 |
| | $y = 0,0106x + 0,099$ | 0,9960 |
| | $y = 0,0112x + 0,007$ | 0,9959 |
| | $y = 0,0118x + 0,057$ | 0,9991 |
| | $y = 0,0099x + 0,017$ | 0,9966 |
| 1U | $y = 0,0061x + 0,072$ | 0,9953 |
| | $y = 0,0061x + 0,091$ | 0,9951 |
| | $y = 0,0067x + 0,038$ | 0,9953 |
| | $y = 0,0061x + 0,072$ | 0,9972 |
| | $y = 0,0068x + 0,091$ | 0,9987 |

| | | |
|-----|-----------------------|--------|
| 1X | $y = 0,0043x + 0,013$ | 0,9999 |
| | $y = 0,0044x + 0,005$ | 0,9998 |
| | $y = 0,0045x + 0,012$ | 0,9992 |
| | $y = 0,0054x + 0,009$ | 0,9924 |
| | $y = 0,0043x + 0,012$ | 0,9992 |
| 17U | $y = 0,0037x + 0,007$ | 0,9999 |
| | $y = 0,0037x + 0,002$ | 0,9999 |
| | $y = 0,0039x + 0,001$ | 0,9989 |
| | $y = 0,0042x + 0,018$ | 0,9921 |
| | $y = 0,0037x + 0,003$ | 0,9919 |
| 17X | $y = 0,0022x + 0,003$ | 0,9999 |
| | $y = 0,0023x + 0,002$ | 0,9999 |
| | $y = 0,0024x + 0,003$ | 0,9993 |
| | $y = 0,0026x + 0,005$ | 0,9920 |
| | $y = 0,0022x + 0,001$ | 0,9999 |



Εικόνα 24: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες βαθμονόμησης των AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X στα ούρα.

Η ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου εμφανίζονται στον **Πίνακα 22**. Το σφάλμα και η διακύμανση των μετρήσεων ήταν μικρότερες του 10%.

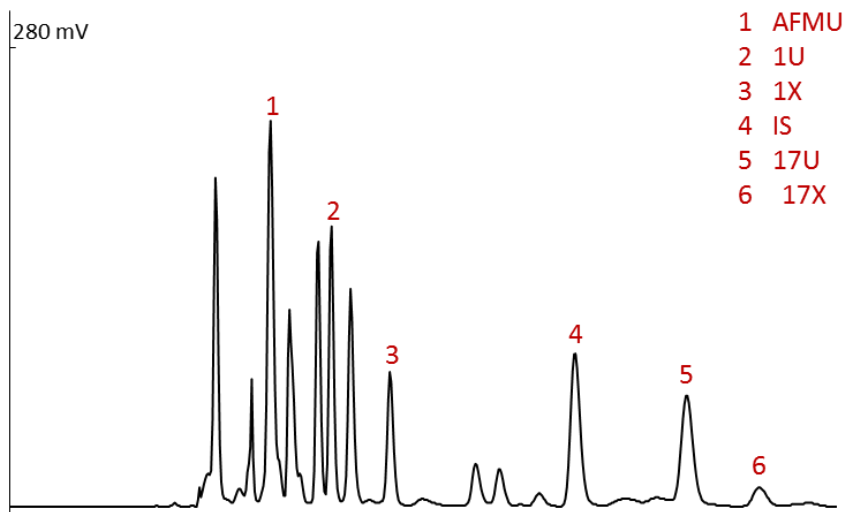
Πίνακας 22: Ακρίβεια & επαναληψιμότητα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου AFMU, 1U, 1X, 17U και 17X στα ούρα κατά τη διάρκεια της μελέτης (n=20).

| Προστεθείσα συγκέντρωση | 30 μ M | | | 300 μ M | | |
|----------------------------|------------------------------------|------|--------|------------------------------------|------|--------|
| | [μέση μετρηθείσα] μ g/mL | CV % | Bias % | [μέση μετρηθείσα] μ g/mL | CV % | Bias % |
| AFMU | 30,36 | 5,19 | 1,20 | 294,74 | 5,88 | -1,75 |
| 1U | 30,75 | 9,01 | 2,49 | 301,62 | 4,64 | 0,54 |
| 1X | 30,62 | 5,00 | 2,05 | 298,50 | 3,94 | -0,50 |
| 17U | 30,39 | 6,90 | 1,29 | 299,68 | 4,61 | -0,11 |
| 17X | 30,18 | 6,76 | 0,58 | 295,65 | 4,97 | -1,45 |

Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων σιέλου και ούρων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 25** και στην **Εικόνα 26**, αντίστοιχα.

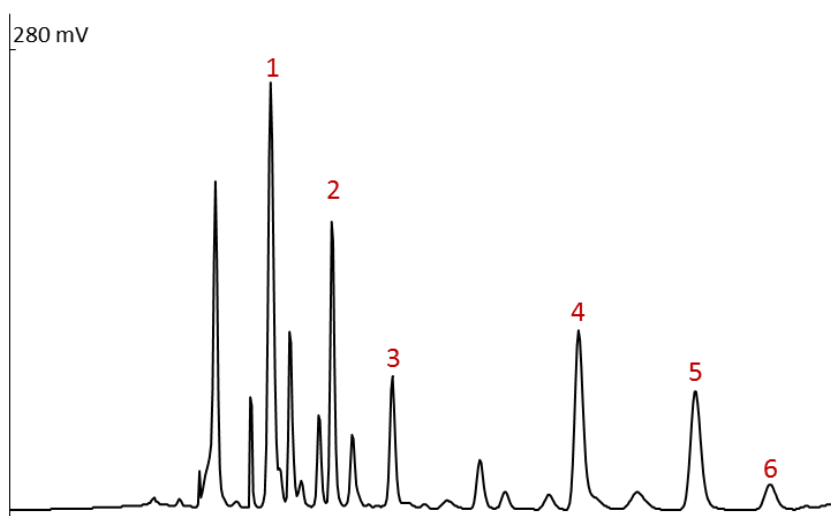
Α. Ελεύθερη διαίτα

| | |
|--------|------|
| CYP1A2 | 4,07 |
| CYP2A6 | 0,77 |
| XO | 0,61 |
| NAT2 | 0,32 |

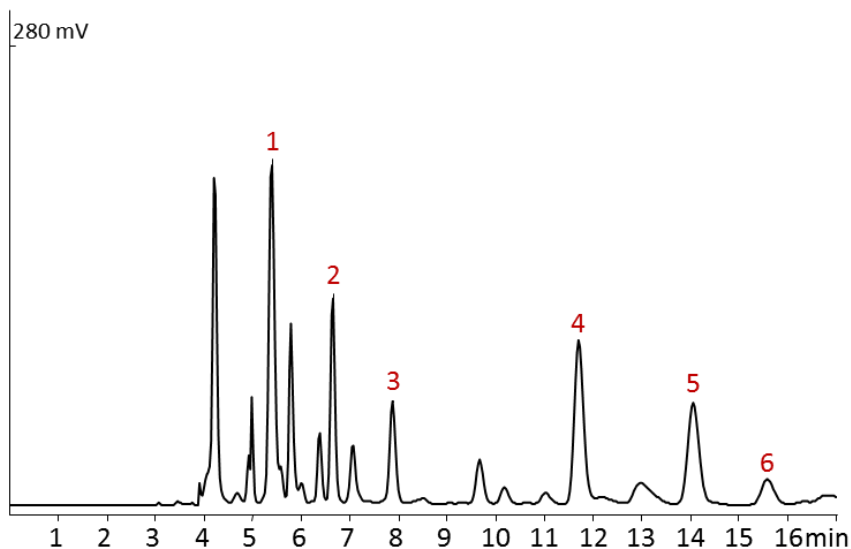


Β. Περιορισμένη διαίτα

| | |
|--------|------|
| CYP1A2 | 3,79 |
| CYP2A6 | 0,74 |
| XO | 0,63 |
| NAT2 | 0,33 |

Γ. Περιορισμένη διαίτα
+ *C. sativus*

| | |
|--------|------|
| CYP1A2 | 3,41 |
| CYP2A6 | 0,71 |
| XO | 0,60 |
| NAT2 | 0,36 |



Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων ούρων. Αριστερά εμφανίζονται οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για τα διάφορα ένζυμα.

- Προδιορισμός των μεταβολικών λόγων

Οι μεταβολικοί λόγοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των CYP1A2 (σίελος και ούρα), CYP2A6, XO και NAT2 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 23**

Πίνακας 23: Μεταβολικοί λόγοι φαινοτυπικού προσδιορισμού των ενζύμων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

| | Μεταβολικός λόγος | Αναφορά |
|---------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| CYP1A2 σίελος | 17X/137X | (Fuhr and Rost, 1994b; Begas <i>et al.</i> , 2015) |
| CYP1A2 ούρα | (AFMU+1X+1U)/17U | (Campbell, Grant, <i>et al.</i> , 1987) (Begas <i>et al.</i> , 2007) |
| CYP2A6 | 17U/(17U+17X) | (D. M. Grant <i>et al.</i> , 1983) (Begas <i>et al.</i> , 2017) |
| XO | 1U/(1U+1X) | (Kalow and Tang, 1991) |
| NAT2 | AFMU/(AFMU+1U+1X) | (Rostami-Hodjegan <i>et al.</i> , 1996) |

- Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student t-test. Για σύγκριση τιμών που προήλθαν από το ίδιο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το Student t-test κατά ζεύγη (paired), ενώ για σύγκριση τιμών που προήλθαν από διαφορετικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η απλή (unpaired) μορφή του Student t-test. Ως n ορίστηκε το πλήθος των τιμών. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS v24 (IBM, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι 34 εθελοντές ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο της μελέτης χωρίς να εμφανίσουν ανεπιθύμητες ενέργειες γεγονός που σημαίνει ότι η κατανάλωση του κρόκου ήταν καλώς ανεκτή.

Οι τιμές των μεταβολικών λόγων που υπολογίσθηκαν για τον κάθε εθελοντή και που αντανακλούν την δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2 (σίελοσ και ούρα), CYP2A6, XO και NAT2 κατά την ελεύθερη δίαιτα, και πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου κατά την διάρκεια της περιορισμένης διαίτας παρουσιάζονται στον **Πίνακα 24** (δειγματοληψία 6^η ώρας) και στον **Πίνακα 25** (δειγματοληψία ούρων 0-5 ώρες) και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω. Δώδεκα δείγματα σιέλου καταστράφηκαν εξ αιτίας διακοπής ρεύματος στις εγκαταστάσεις φύλαξης των δειγμάτων και επομένως δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Μεταβολικοί λόγοι του CYP1A2 στον σίελο

Ο μεταβολικός λόγος του CYP1A2 στο σίελο επέδειξε στο σύνολο των εθελοντών στατιστικά σημαντική μείωση της τάξης του 8,2% μετά την κατανάλωση κρόκου (πριν: $0,51 \pm 0,22$, μετά: $0,44 \pm 0,14$; $p=0.002$, **Εικόνες 27 και 28A**). Το εύρος της μεταβολής του μεταβολικού λόγου ήταν -36.0 έως $+68.8.0$. Συγκεκριμένα, μείωση του μεταβολικού λόγου σημειώθηκε σε 21 εθελοντές, αύξηση σε 8 εθελοντές, ενώ σε έναν εθελοντή ο μεταβολικός λόγος παρέμεινε ο ίδιος. Η μείωση του μεταβολικού λόγου μπορεί να αποδοθεί στους άνδρες εθελοντές, καθώς όταν πληθυσμός διαχωρίσθηκε σε άνδρες και γυναίκες βρέθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στους άνδρες μετά την κατανάλωση κρόκου (πριν: $0,65 \pm 0,22$, μετά: $0,51 \pm 0,16$; $p=0,0001$) (**Εικόνα 28B, Πίνακας 26**), αλλά όχι στις γυναίκες (πριν: $0,39 \pm 0,13$, μετά: $0,38 \pm 0,10$; $p=0,67$) (**Εικόνα 28Γ, Πίνακας 26**). Αυτός ο διμορφισμός ο οποίος φαίνεται να σχετίζεται με το φύλο αποτυπώνεται και από το γεγονός ότι η μείωση του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 μετά την κατανάλωση κρόκου ήταν στους άνδρες ~90%, ενώ αντίθετα στις γυναίκες ~50% (**Εικόνα 27**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολικός λόγος του CYP1A2 στο σίελο ήταν μεγαλύτερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες υπό όλες τις συνθήκες διαίτας (**Πίνακας 26**). Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η μετάβαση από την ελεύθερη προς την περιορισμένη δίαιτα δεν επέφερε μεταβολή στο μεταβολικό λόγο του CYP1A2.

Πίνακας 24: Μεταβολικοί λόγοι των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 προσδιορισθέντων στον σίελο και στα ούρα πριν και μετά την κατανάλωση ροφήματος *C. Sativus* (δείγματα που λήφθηκαν 6 ώρες μετά την δοκιμασία καφεΐνης).

| α/α | φύλο | CYP1A2 | | | | | | CYP2A6 | | | XO | | | NAT2 | | | | | |
|-----|------|--------|------|-------|------|------|------|--------|------|------|------|------|------|----------------|------|------|---------------|------|------|
| | | σίελος | | | ούρα | | | ούρα | | | ούρα | | | ούρα "βραδείς" | | | ούρα "ταχείς" | | |
| | | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά |
| 1 | Γ | 0,37 | 0,32 | 0,30 | 3,18 | 3,24 | 2,89 | 0,51 | 0,36 | 0,44 | 0,51 | 0,50 | 0,49 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | | | |
| 2 | Γ | 0,21 | 0,16 | 0,27 | 1,59 | 1,32 | 1,90 | 0,58 | 0,67 | 0,57 | 0,54 | 0,42 | 0,53 | | | | 0,36 | 0,35 | 0,42 |
| 3 | Γ | 0,28 | 0,34 | 0,30 | 2,52 | 3,62 | 3,43 | 0,43 | 0,28 | 0,29 | 0,51 | 0,46 | 0,35 | 0,08 | 0,09 | 0,08 | | | |
| 4 | Γ | | | | 4,90 | 4,70 | 5,53 | 0,29 | 0,36 | 0,58 | 0,58 | 0,64 | 0,63 | | | | 0,35 | 0,40 | 0,38 |
| 5 | Γ | 0,33 | 0,45 | 0,48 | 2,72 | 3,59 | 2,54 | 0,62 | 0,35 | 0,42 | 0,63 | 0,58 | 0,59 | | | | 0,54 | 0,53 | 0,48 |
| 6 | Γ | 0,26 | 0,23 | 0,24 | 3,71 | 2,51 | 2,54 | 0,38 | 0,38 | 0,45 | 0,39 | 0,49 | 0,43 | | | | 0,40 | 0,37 | 0,33 |
| 7 | Γ | 0,43 | 0,50 | 0,38 | 3,27 | 4,17 | 2,88 | 0,36 | 0,49 | 0,47 | 0,54 | 0,49 | 0,54 | 0,11 | 0,12 | 0,10 | | | |
| 8 | Γ | 0,33 | 0,29 | 0,29 | 3,48 | 3,29 | 3,49 | 0,61 | 0,68 | 0,66 | 0,57 | 0,57 | 0,56 | 0,10 | 0,09 | 0,08 | | | |
| 9 | Γ | 0,42 | 0,43 | 0,44 | 3,04 | 2,80 | 3,29 | 0,78 | 0,71 | 0,57 | 0,60 | 0,51 | 0,58 | 0,08 | 0,06 | 0,09 | | | |
| 10 | Γ | | | | 2,09 | 2,14 | 2,59 | 0,49 | 0,59 | 0,58 | 0,54 | 0,57 | 0,57 | 0,09 | 0,08 | 0,08 | | | |
| 11 | Γ | 0,50 | 0,56 | 0,42 | 3,47 | 4,59 | 3,72 | 0,31 | 0,39 | 0,52 | 0,51 | 0,50 | 0,52 | 0,06 | 0,05 | 0,07 | | | |
| 12 | Γ | 0,39 | 0,29 | 0,27 | 3,50 | 3,16 | 3,16 | 0,46 | 0,58 | 0,55 | 0,51 | 0,56 | 0,57 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | | | |
| 13 | Γ | 0,41 | 0,50 | 0,32 | 3,38 | 3,04 | 2,85 | 0,65 | 0,70 | 0,62 | 0,57 | 0,59 | 0,57 | | | | 0,52 | 0,48 | 0,53 |
| 14 | Γ | | | | 3,28 | 3,19 | 3,06 | 0,39 | 0,59 | 0,65 | 0,56 | 0,54 | 0,55 | 0,10 | 0,06 | 0,10 | | | |
| 15 | Γ | | | | 2,99 | 2,55 | 2,72 | 0,38 | 0,74 | 0,76 | 0,50 | 0,53 | 0,55 | | | | 0,47 | 0,45 | 0,36 |
| 16 | Γ | 0,28 | 0,34 | 0,50 | 3,35 | 2,98 | 4,40 | 0,51 | 0,48 | 0,62 | 0,53 | 0,60 | 0,61 | 0,12 | 0,09 | 0,10 | | | |
| 17 | Γ | 0,51 | 0,53 | 0,58 | 3,21 | 2,89 | 2,64 | 0,63 | 0,52 | 0,73 | 0,59 | 0,64 | 0,61 | 0,06 | 0,08 | 0,07 | | | |
| 18 | Γ | 0,47 | 0,44 | 0,43 | 4,42 | 3,86 | 3,65 | 0,40 | 0,46 | 0,68 | 0,63 | 0,59 | 0,63 | 0,10 | 0,06 | 0,10 | | | |
| 19 | Γ | 0,50 | 0,26 | 0,35 | 4,62 | 3,19 | 3,23 | 0,44 | 0,34 | 0,37 | 0,50 | 0,50 | 0,52 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | | | |
| 20 | Γ | 0,54 | 0,58 | 0,49 | 4,78 | 5,37 | 4,71 | 0,63 | 0,56 | 0,63 | 0,59 | 0,59 | 0,57 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | | | |
| 21 | A | 0,81 | 0,64 | 0,46 | 5,54 | 5,37 | 5,42 | 0,42 | 0,45 | 0,58 | 0,56 | 0,51 | 0,58 | | | | 0,50 | 0,41 | 0,36 |
| 22 | A | 0,62 | 0,71 | 0,53 | 4,07 | 3,79 | 3,41 | 0,77 | 0,74 | 0,71 | 0,61 | 0,63 | 0,60 | | | | 0,32 | 0,33 | 0,36 |
| 23 | A | 0,46 | 0,65 | 0,61 | 3,92 | 4,97 | 4,42 | 0,52 | 0,80 | 0,59 | 0,46 | 0,48 | 0,44 | 0,16 | 0,17 | 0,13 | | | |
| 24 | A | 0,28 | 0,25 | 0,24 | 3,80 | 3,32 | 3,23 | 0,58 | 0,76 | 0,64 | 0,61 | 0,67 | 0,64 | | | | 0,42 | 0,39 | 0,34 |
| 25 | A | 0,63 | 0,72 | 0,53 | 4,11 | 3,91 | 3,27 | 0,68 | 0,74 | 0,74 | 0,48 | 0,55 | 0,54 | 0,07 | 0,09 | 0,09 | | | |
| 26 | A | 0,69 | 0,63 | 0,43 | 6,09 | 4,99 | 3,84 | 0,30 | 0,62 | 0,68 | 0,49 | 0,47 | 0,47 | 0,10 | 0,12 | 0,12 | | | |
| 27 | A | 0,64 | 0,70 | 0,52 | 4,56 | 4,16 | 3,64 | 0,65 | 0,64 | 0,74 | 0,64 | 0,62 | 0,65 | | | | 0,32 | 0,42 | 0,38 |
| 28 | A | 0,35 | 0,47 | 0,41 | 3,33 | 3,29 | 3,74 | 0,65 | 0,61 | 0,38 | 0,55 | 0,57 | 0,57 | | | | 0,47 | 0,50 | 0,53 |
| 29 | A | 1,26 | 0,99 | 0,78 | 7,25 | 5,72 | 5,56 | 0,45 | 0,54 | 0,78 | 0,49 | 0,52 | 0,56 | | | | 0,37 | 0,35 | 0,42 |
| 30 | A | 0,71 | 0,57 | 0,59 | 4,37 | 4,08 | 4,02 | 0,52 | 0,63 | 0,65 | 0,46 | 0,51 | 0,54 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | | | |
| 31 | A | 0,44 | 0,39 | 0,30 | 4,21 | 3,61 | 2,97 | 0,48 | 0,58 | 0,45 | 0,63 | 0,60 | 0,62 | | | | 0,26 | 0,27 | 0,26 |
| 32 | A | 0,67 | 1,02 | 0,69 | 4,82 | 7,70 | 5,48 | 0,44 | 0,39 | 0,51 | 0,53 | 0,55 | 0,58 | | | | 0,29 | 0,24 | 0,30 |
| 33 | A | 0,48 | 0,48 | 0,33 | 4,87 | 3,70 | 3,87 | 0,78 | 0,88 | 0,67 | 0,50 | 0,54 | 0,52 | 0,12 | 0,09 | 0,09 | | | |
| 34 | A | 1,49 | 0,94 | 0,66 | 5,56 | 4,87 | 3,50 | 0,59 | 0,59 | 0,50 | 0,58 | 0,57 | 0,54 | 0,11 | 0,10 | 0,10 | | | |
| | M.O. | 0,53 | 0,51 | 0,44* | 3,94 | 3,81 | 3,58 | 0,52 | 0,56 | 0,58 | 0,54 | 0,55 | 0,55 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,40 | 0,39 | 0,39 |
| | T.A. | 0,28 | 0,22 | 0,14 | 1,15 | 1,20 | 0,92 | 0,14 | 0,15 | 0,12 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,09 | 0,08 | 0,08 |

Πίνακας 25: Μεταβολικοί λόγοι των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 προσδιορισθέντων στα ούρα πριν και μετά την κατανάλωση ροφήματος *C. sativus* (δείγματα που λήφθηκαν κατά το διάστημα 0-5 ώρες μετά την δοκιμασία καφεΐνης).

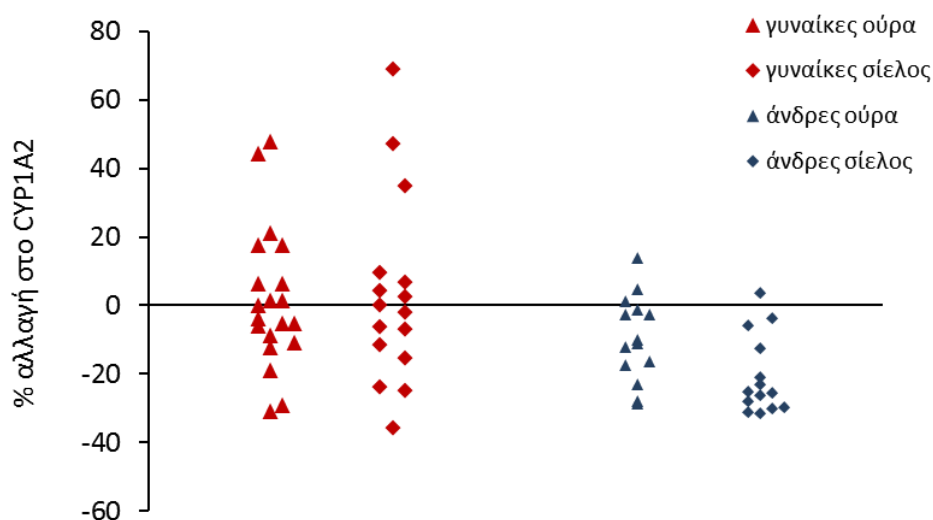
| α/α | φύλο | CYP1A2 | | | CYP2A6 | | | XO | | | NAT2 βραδείς | | | NAT2 ταχείς | | |
|-----|------|--------|------|------|--------|------|------|------|------|------|--------------|------|------|-------------|------|------|
| | | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά | free | πριν | μετά |
| 1 | Γ | 2,54 | 2,47 | 2,51 | 0,30 | 0,34 | 0,54 | 0,35 | 0,36 | 0,45 | 0,10 | 0,10 | 0,08 | | | |
| 2 | Γ | 2,19 | 1,43 | 1,71 | 0,42 | 0,54 | 0,48 | 0,54 | 0,42 | 0,52 | | | | 0,44 | 0,36 | 0,45 |
| 3 | Γ | 2,66 | 3,46 | 2,82 | 0,41 | 0,22 | 0,36 | 0,34 | 0,28 | 0,26 | 0,10 | 0,12 | 0,11 | | | |
| 4 | Γ | 4,20 | 4,89 | 4,13 | 0,21 | 0,38 | 0,64 | 0,56 | 0,63 | 0,61 | | | | 0,28 | 0,36 | 0,37 |
| 5 | Γ | 2,19 | 3,16 | 3,03 | 0,43 | 0,31 | 0,32 | 0,43 | 0,49 | 0,41 | | | | 0,63 | 0,56 | 0,59 |
| 6 | Γ | 4,13 | 2,87 | 3,25 | 0,40 | 0,42 | 0,29 | 0,57 | 0,58 | 0,22 | | | | 0,33 | 0,26 | 0,27 |
| 7 | Γ | 3,39 | 3,62 | 2,97 | 0,39 | 0,36 | 0,46 | 0,48 | 0,37 | 0,53 | 0,09 | 0,12 | 0,08 | | | |
| 8 | Γ | 3,11 | 2,57 | 3,37 | 0,55 | 0,61 | 0,69 | 0,53 | 0,52 | 0,60 | 0,08 | 0,09 | 0,06 | | | |
| 9 | Γ | 2,98 | 2,87 | 3,85 | 0,48 | 0,53 | 0,43 | 0,58 | 0,55 | 0,52 | 0,09 | 0,07 | 0,10 | | | |
| 10 | Γ | 2,03 | 1,97 | 2,14 | 0,46 | 0,39 | 0,59 | 0,51 | 0,60 | 0,51 | 0,09 | 0,09 | 0,07 | | | |
| 11 | Γ | 3,06 | 4,33 | 4,12 | 0,23 | 0,52 | 0,48 | 0,34 | 0,52 | 0,49 | 0,07 | 0,05 | 0,05 | | | |
| 12 | Γ | 2,52 | 2,86 | 2,87 | 0,51 | 0,48 | 0,52 | 0,42 | 0,54 | 0,47 | 0,11 | 0,09 | 0,07 | | | |
| 13 | Γ | 3,77 | 3,44 | 2,91 | 0,56 | 0,55 | 0,58 | 0,59 | 0,64 | 0,60 | | | | 0,50 | 0,49 | 0,48 |
| 14 | Γ | 2,33 | 2,74 | 2,69 | 0,54 | 0,57 | 0,51 | 0,51 | 0,53 | 0,48 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | | | |
| 15 | Γ | 2,57 | 2,37 | 3,43 | 0,59 | 0,68 | 0,56 | 0,55 | 0,51 | 0,52 | | | | 0,40 | 0,42 | 0,36 |
| 16 | Γ | 2,66 | 3,06 | 4,59 | 0,36 | 0,50 | 0,51 | 0,37 | 0,61 | 0,61 | 0,13 | 0,10 | 0,10 | | | |
| 17 | Γ | 2,62 | 2,87 | 2,70 | 0,55 | 0,53 | 0,70 | 0,47 | 0,55 | 0,61 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | | | |
| 18 | Γ | 3,78 | 3,60 | 3,16 | 0,39 | 0,41 | 0,54 | 0,61 | 0,62 | 0,54 | 0,08 | 0,08 | 0,10 | | | |
| 19 | Γ | 4,38 | 2,98 | 3,18 | 0,37 | 0,31 | 0,37 | 0,54 | 0,55 | 0,52 | 0,09 | 0,14 | 0,09 | | | |
| 20 | Γ | 3,71 | 5,07 | 4,72 | 0,73 | 0,40 | 0,42 | 0,54 | 0,54 | 0,41 | 0,08 | 0,11 | 0,17 | | | |
| 21 | A | 4,92 | 5,44 | 5,64 | 0,29 | 0,46 | 0,53 | 0,54 | 0,55 | 0,56 | | | | 0,47 | 0,38 | 0,40 |
| 22 | A | 3,88 | 3,75 | 3,91 | 0,73 | 0,75 | 0,70 | 0,61 | 0,68 | 0,61 | | | | 0,32 | 0,37 | 0,29 |
| 23 | A | 3,83 | 3,79 | 4,28 | 0,53 | 0,60 | 0,55 | 0,47 | 0,43 | 0,44 | 0,15 | 0,12 | 0,11 | | | |
| 24 | A | 3,89 | 3,60 | 3,11 | 0,60 | 0,69 | 0,57 | 0,67 | 0,69 | 0,62 | | | | 0,37 | 0,42 | 0,35 |
| 25 | A | 5,19 | 4,23 | 3,51 | 0,76 | 0,73 | 0,75 | 0,54 | 0,54 | 0,55 | 0,07 | 0,09 | 0,09 | | | |
| 26 | A | 5,62 | 5,26 | 4,15 | 0,36 | 0,54 | 0,64 | 0,46 | 0,48 | 0,47 | 0,10 | 0,11 | 0,11 | | | |
| 27 | A | 3,70 | 3,13 | 3,05 | 0,64 | 0,60 | 0,50 | 0,68 | 0,58 | 0,65 | | | | 0,36 | 0,26 | 0,31 |
| 28 | A | 3,58 | 3,32 | 4,68 | 0,57 | 0,46 | 0,31 | 0,68 | 0,56 | 0,54 | | | | 0,44 | 0,47 | 0,52 |
| 29 | A | 6,05 | 5,16 | 4,96 | 0,47 | 0,42 | 0,73 | 0,49 | 0,49 | 0,54 | | 0,10 | 0,08 | 0,32 | 0,33 | 0,40 |
| 30 | A | | 4,91 | 3,71 | | 0,62 | 0,66 | | 0,50 | 0,54 | | | | | | |
| 31 | A | 3,35 | 2,91 | 2,64 | 0,46 | 0,62 | 0,50 | 0,51 | 0,53 | 0,51 | | | | 0,24 | 0,27 | 0,28 |
| 32 | A | 4,43 | 4,73 | 5,17 | 0,29 | 0,36 | 0,41 | 0,46 | 0,49 | 0,57 | | | | 0,26 | 0,28 | 0,29 |
| 33 | A | 5,56 | 4,14 | 3,92 | 0,62 | 0,78 | 0,69 | 0,51 | 0,53 | 0,53 | 0,11 | 0,10 | 0,09 | | | |
| 34 | A | 4,81 | 5,40 | 3,41 | 0,55 | 0,61 | 0,51 | 0,55 | 0,55 | 0,52 | 0,10 | 0,10 | 0,08 | | | |
| | M.O. | 3,63 | 3,60 | 3,54 | 0,48 | 0,51 | 0,53 | 0,52 | 0,53 | 0,52 | 0,10 | 0,10 | 0,09 | 0,38 | 0,37 | 0,38 |
| | T.A. | 1,08 | 1,04 | 0,89 | 0,14 | 0,14 | 0,12 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,11 | 0,09 | 0,10 |

Πίνακας 26: Μέσοι όροι (\pm τυπική απόκλιση) των μεταβολικών λόγων του CYP1A2 σε δείγματα σιέλου και ούρων που έχουν προσδιορισθεί υπό ελεύθερη διαίτα και πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου υπό περιορισμένη διαίτα.

| | Ελεύθερη δίαιτα | Περιορισμένη δίαιτα | Περιορισμένη δίαιτα + <i>C. sativus</i> | |
|---------------|--------------------|------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| σίελος | | | | p** |
| άνδρες | 0.68 \pm 0.33 | 0.65 \pm 0.22 | 0.51 \pm 0.16 | 0,0001 |
| γυναίκες | 0.39 \pm 0.10 | 0.39 \pm 0.13 | 0.38 \pm 0.10 | 0,6673 |
| p* | 0.0023 | 0.0003 | 0.0120 | |
| ούρα | | | | |
| άνδρες | 4.75 \pm 1.05 | 4.53 \pm 1.19 | 4.03 \pm 0.87 | 0,0174 |
| γυναίκες | 3.37 \pm 0.84 | 3.31 \pm 0.93 | 3.26 \pm 0.84 | 0,7415 |
| p* | 0.00018 | 0.0020 | 0.0151 | |

p* διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών

p** διαφορά μεταξύ πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου υπό περιορισμένη διαίτα

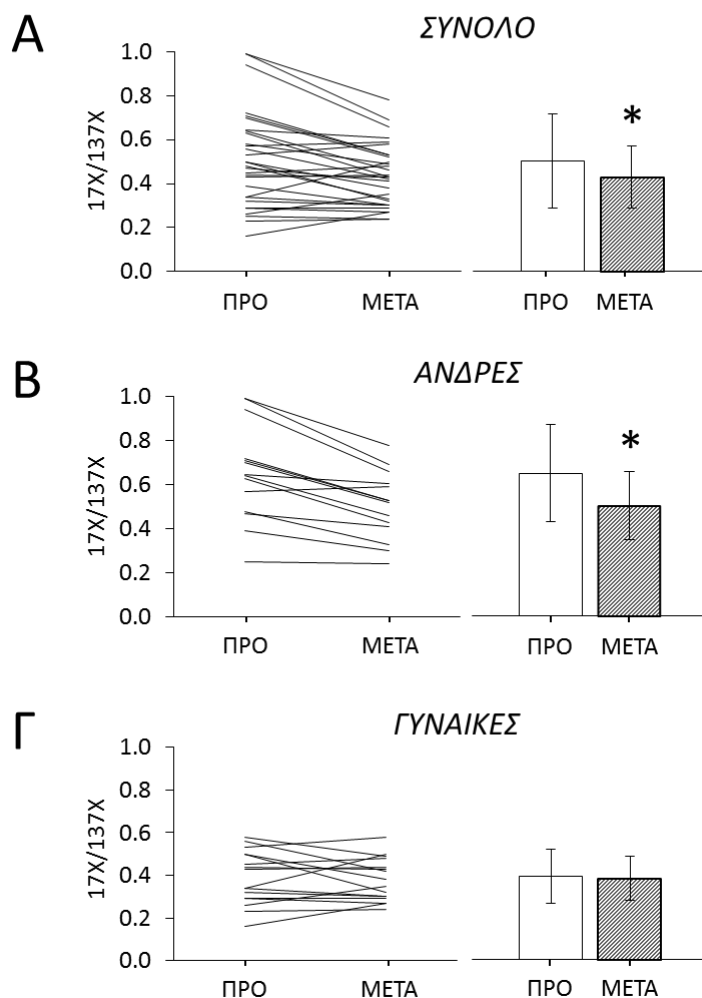


Εικόνα 27: % Μεταβολή του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 στο σίελο και στα ούρα μετά την κατανάλωση κρόκου στους άνδρες και στις γυναίκες.

Μεταβολικοί λόγοι του CYP1A2 στα ούρα

Ο μεταβολικός λόγος του CYP1A2 στα ούρα (6^η ώρα) σημείωσε μικρή μείωση (3,1%) μετά την κατανάλωση κρόκου στο σύνολο των εθελοντών η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (πριν: 3,81 \pm 1,20, μετά: 3,58 \pm 0,92; p=0.054, **Εικόνα 29A**). Το εύρος της μεταβολής του μεταβολικού λόγου ήταν -30,9 έως +47,0. Συγκεκριμένα, μείωση του μεταβολικού λόγου σημειώθηκε σε 21 εθελοντές, αύξηση σε 13 εθελοντές.

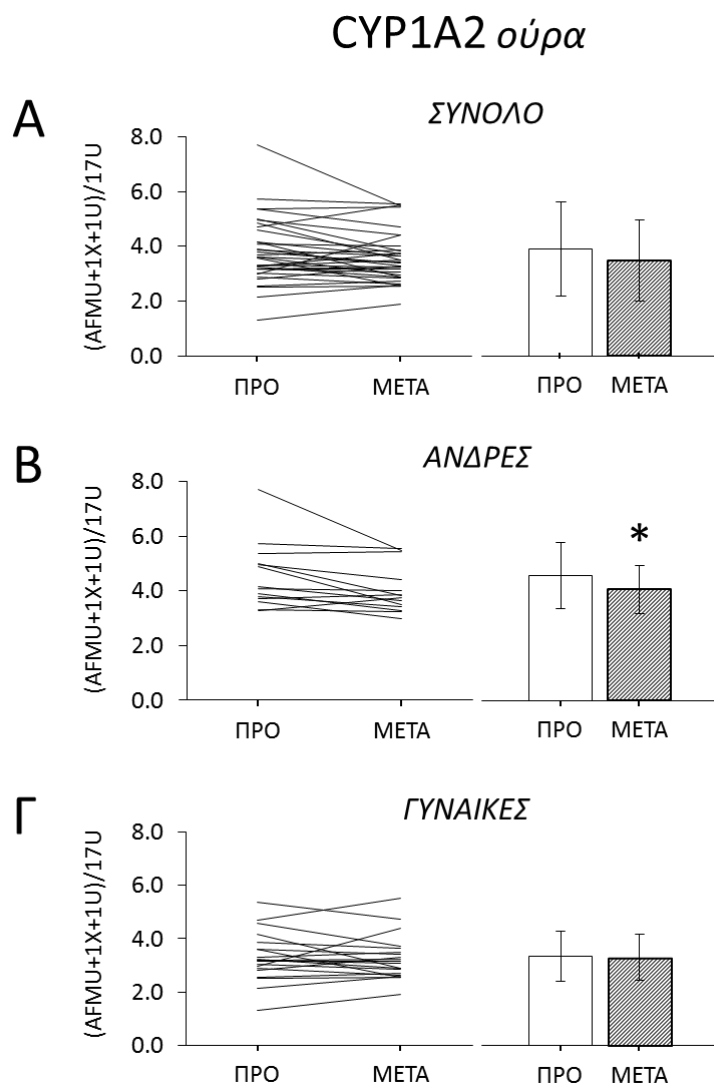
CYP1A2 σίελος



Εικόνα 28: Μεμονομένα (αριστερά) και αθροιστικά (δεξιά) αποτελέσματα του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 στο σίελο πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου **A.** στο συνολικό δείγμα **B.** σε άνδρες και **Γ.** σε γυναίκες.

Κατά αναλογία με τα ευρήματα του σιέλου, όταν έγινε διαχωρισμός του πληθυσμού σε άνδρες και γυναίκες βρέθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στους άνδρες μετά την κατανάλωση κρόκου (πριν: $4,53 \pm 1,19$, μετά: $4,03 \pm 0,87$; $p=0,017$) (**Εικόνα 29B, Πίνακας 26**), αλλά όχι στις γυναίκες (πριν: $3,31 \pm 0,93$, μετά: $3,26 \pm 0,84$; $p=0,74$) (**Εικόνα 29Γ, Πίνακας 26**). Όπως και στον σίελο, ο διμορφισμός αυτός φαίνεται να σχετίζεται με το φύλο καθώς η μείωση του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 μετά την κατανάλωση κρόκου ήταν μεγαλύτερη στους άνδρες (~85%) σε σχέση με στις γυναίκες (~50%) (**Εικόνα 27**), και αυτό παρατηρήθηκε υπό όλες τις συνθήκες διαίτας (**Πίνακας 26**). Η μετάβαση από την ελεύθερη προς την περιορισμένη διαίτα δεν επέφερε μεταβολή στο μεταβολικό λόγο του CYP1A2.

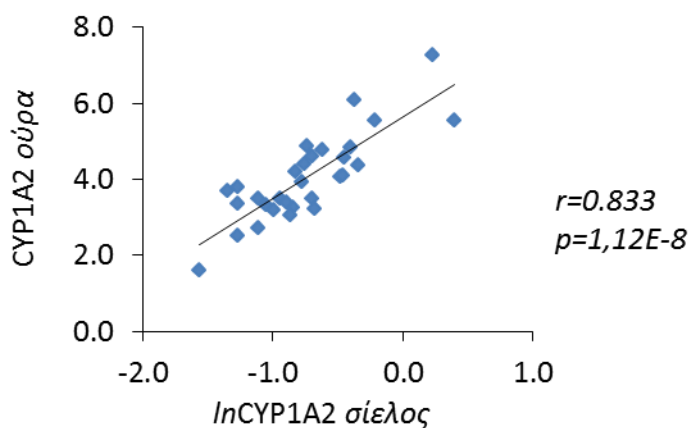
Ο μεταβολικός λόγος του CYP1A2 στα δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν κατά την 0-5^η ώρα δεν παρουσίασε καμμία αλλαγή υπό όλες τις συνθήκες διαίτας (**Πίνακας 25**).



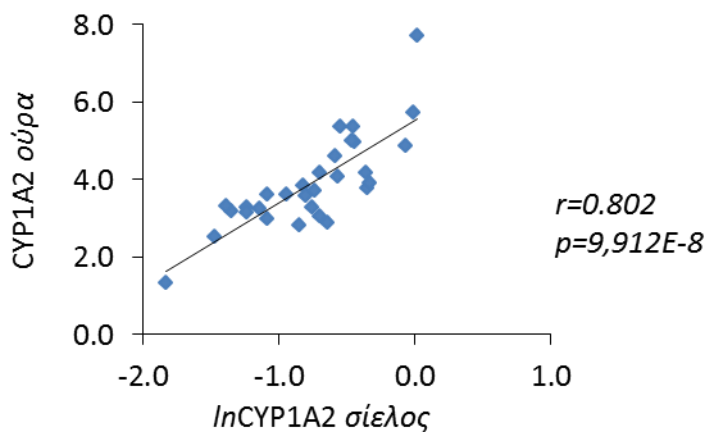
Εικόνα 29: Μεμονομένα (αριστερά) και αθροιστικά (δεξιά) αποτελέσματα του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 στα ούρα πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου **A.** στο συνολικό δείγμα **B.** σε άνδρες και **Γ.** σε γυναίκες.

Στους εθελοντές 5, 17, 21, 28, 30 και 33 οι μεταβολικοί λόγοι του CYP1A2 μεταβλήθηκαν προς την αντίθετη κατεύθυνση μεταξύ ούρων και σιέλου μετά την κατανάλωση κρόκου. Γενικά, όμως, οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στα ούρα έδειξαν καλή συσχέτιση με τους λόγους στον σίελο σε συνθήκες ελεύθερης διαίτας. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα συσχέτισης πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου σε συνθήκες περιορισμένης διαίτας. Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson καθώς και η στατιστική σημαντικότητα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 30**.

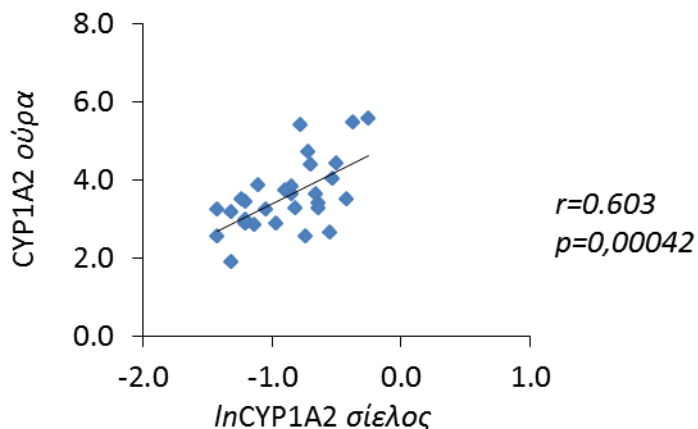
Ελεύθερη διαίτα



Περιορισμένη διαίτα



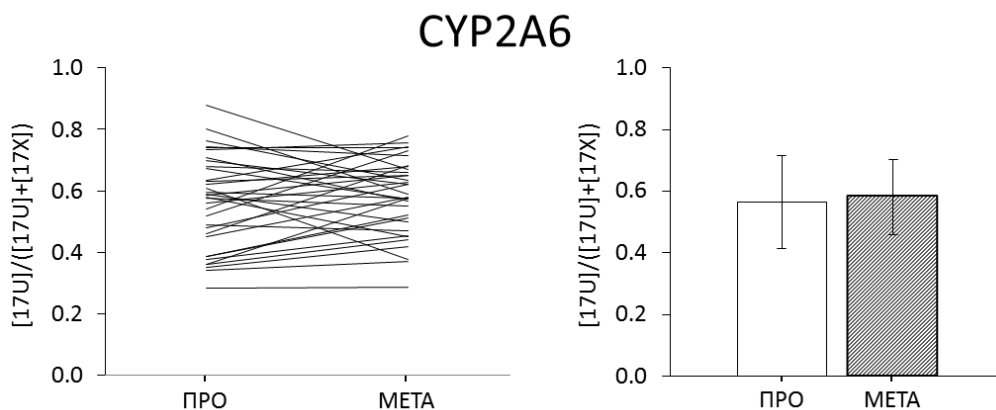
Περιορισμένη διαίτα + *C. sativus*



Εικόνα 30: Γραφικές παραστάσεις συσχέτισης μεταξύ των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U και στο σίελο 17X/137X σε 34 εθελοντές υπό διάφορες συνθήκες διαίτας.

Μεταβολικοί λόγοι του CYP2A6 στα ούρα

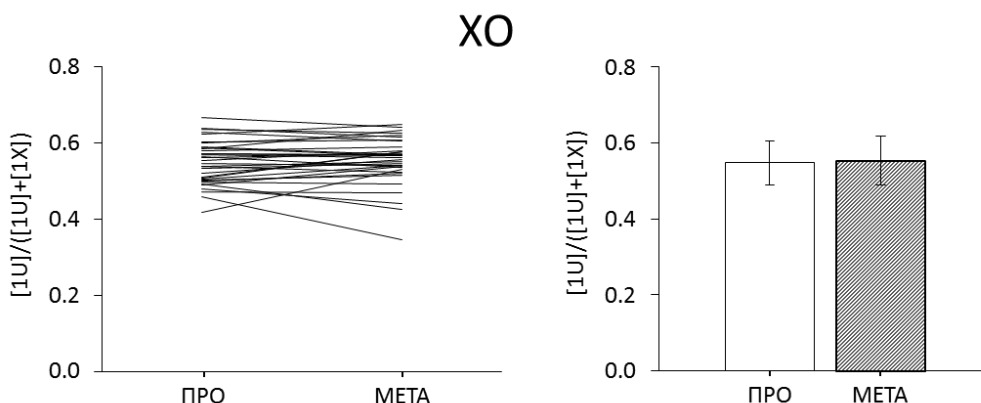
Οι μεταβολικοί λόγοι του CYP2A6 στα ούρα δεν μεταβλήθηκαν μετά την κατανάλωση του κρόκου. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων συλλογής 6^{ης} ώρας (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 31: Μεμονομένα (αριστερά) και αθροιστικά (δεξιά) αποτελέσματα του μεταβολικού λόγου του CYP2A6 στα ούρα (6^η ώρα) πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου.

Μεταβολικοί λόγοι της ΧΟ στα ούρα

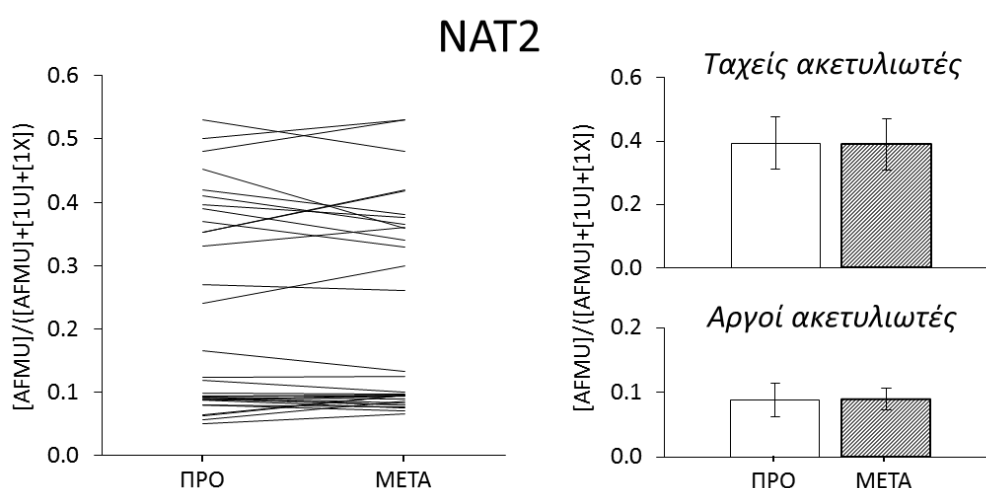
Οι μεταβολικοί λόγοι της ΧΟ στα ούρα δεν μεταβλήθηκαν μετά την κατανάλωση του κρόκου. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων συλλογής 6^{ης} ώρας (**Εικόνα 32**).



Εικόνα 32: Μεμονομένα (αριστερά) και αθροιστικά (δεξιά) αποτελέσματα του μεταβολικού λόγου της ΧΟ στα ούρα (6^η ώρα) πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου.

Μεταβολικοί λόγοι της NAT2 στα ούρα

Η δραστηριότητα της NAT2 καθορίζεται κυρίως γενετικά και παρουσιάζει δικόρυφη κατανομή στις διάφορες εθνικές ομάδες (Sim *et al.*, 2012). Επομένως, πιθανές μεταβολές στην δραστηριότητα της NAT2 μετά την κατανάλωση κρόκου εξετάστηκαν χωριστά στους βραδείς και ταχείς ακετυλιωτές. Ο διαχωρισμός των δύο φαινοτύπων έγινε στην τιμή 0,25 η οποία σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου διαχωρίζει τους αργούς από τους ταχείς ακετυλιωτές στον ελληνικό πληθυσμό (Begas *et al.*, 2007). Με βάση αυτή την τιμή διαχωρισμού, 20 άτομα ταξινομήθηκαν ως αργοί και 14 άτομα ως ταχείς ακετυλιωτές. Η κατανάλωση κρόκου δεν επέφερε καμία μεταβολή στη δραστηριότητα της NAT2 ούτε στους αργούς, αλλά ούτε και στους ταχείς ακετυλιωτές. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων συλλογής 6^{ης} ώρας (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Μεμονομένα (αριστερά) και αθροιστικά (δεξιά) αποτελέσματα του μεταβολικού λόγου της NAT2 στα ούρα (6^η ώρα) πριν και μετά την κατανάλωση κρόκου.

2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανάπτυξη και πιστοποίηση μεθόδου για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2 στο σίελο

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη και απλή χρωματογραφική μέθοδος RP-HPLC για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2. Ταυτόχρονα, έγινε σύγκριση μεταξύ του προσδιορισθέντος μεταβολικού λόγου 17X/137X στο σίελο με τον μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα που χρησιμοποιείται ευρέως στην βιβλιογραφία. Σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας αναπτύχθηκε και πιστοποιήθηκε μέθοδος η οποία επέτρεψε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δραστηριοτήτων των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 στα ούρα χρησιμοποιώντας την καφεΐνη ως μεταβολικό δείκτη (Begas *et al.*, 2007). Η δραστηριότητα του CYP1A2 προσδιορίσθηκε χρησιμοποιώντας τον αξιόπιστο μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U (Sinués *et al.*, 1999). Αυτός ο μεταβολικός λόγος, όμως, κάνει χρήση του 17U το οποίο αποτελεί όχι μόνον προϊόν μεταβολισμού της καφεΐνης αλλά και υπόστρωμα μεταβολισμού άλλων ενζύμων, πλέον του CYP1A2. Ως εκ τούτου, η χρήση του παραπάνω μεταβολικού λόγου μπορεί να μην αντανακλά επακριβώς την δραστηριότητα του CYP1A2 (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996). Αντίθετα, μέθοδοι προσδιορισμού της δραστηριότητας του CYP1A2 στο πλάσμα ή στο σίελο θεωρούνται περισσότερο αξιόπιστες, σε σχέση με τα ούρα, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιούν τον μεταβολικό λόγο 17X/137X. Στον λόγο αυτό συμμετέχει η 17X η οποία αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη της 137X και παράγεται αποκλειστικά από την καταλυτική δραστηριότητα του CYP1A2 (Arnaud, 2011). Ο σίελος θεωρείται αξιόπιστο βιολογικό υγρό για τον προσδιορισμό του CYP1A2 καθώς τόσο η 137X όσο και οι πρωταρχικοί μεταβολίτες της 17X, 37X και 13X κατανέμονται ευχερώς σε αυτό (Rodopoulos and Norman, 1996). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του σιέλου ως βιολογικό υπόστρωμα είναι ότι η διαδικασία συλλογής του είναι απλή, φθηνή και κυρίως, αντίθετα με το πλάσμα, δεν είναι επεμβατική και ως εκ τούτου δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για την λήψη του. Μια άλλη μέθοδος δειγματοληψίας, με μικρή επεμβατικότητα, είναι οι αποξηραμένες σταγόνες αίματος η οποία αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα ως μέθοδος προσδιορισμού του CYP1A2 εναλλακτική ως προς το πλάσμα (De Kesel *et al.*, 2014).

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία παρέχει ένα αξιόπιστο αναλυτικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 στον άνθρωπο καθώς παρουσιάζει καλή ανάκτηση, μικρή μεταβλητότητα (<5,51%) και μικρές τιμές LOD και LLOQ για τις μεθυλοξανθίνες 17X και 137X. Ο συνδυασμός της αναλυτικής στήλης και της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε επέτρεψε όχι μόνο τον πλήρη διαχωρισμό των 17X, 137X και IS, αλλά και τον διαχωρισμό των 37X και 13X με συντελεστές διαχωρισμού >2,8. Οι δύο τελευταίες ουσίες είναι πρωτογενείς μεταβολίτες της 137X και μαζί με την 137X και την 17X εντοπίζονται στα δείγματα σιέλου (Rodopoulos and Norman, 1996). Επομένως, ο χρωματογραφικός τους διαχωρισμός αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την ακριβή ποσοτικοποίηση των 137X και 17X. Αντίθετα με την παρούσα εργασία, σε μια προηγούμενη μελέτη η έκλυση της 137X συνέπιπτε με αυτήν της 17X παρά τις μεθοδολογικές προσπάθειες που κατάβαλαν οι συγγραφείς (Perera *et al.*, 2010). Το μεθοδολογικό αυτό μειονέκτημα μπορεί να αποβεί αρκετά σημαντικό καθώς παρεμποδίζει τον ακριβή προσδιορισμό της 17X στα δείγματα σιέλου. Επιπλέον, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των 13X και 37X επιτρέπει πιθανώς την διερεύνηση μικρότερων μεταβολικών οδών της 137X στις οποίες εμπλέκονται άλλα ισοένζυμα του CYP όπως το CYP2E1 το οποίο καταλύει τον σχηματισμό των δύο αυτών μεταβολιτών από την 137X (Ha *et al.*, 1996).

Η 137X και ο μεταβολίτης της 17X απομονώθηκαν από τα δείγματα σιέλου με εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιώντας μείγμα χλωροφορμίου-ισοπροπανόλης 85:15 v/v. Ο συγκεκριμένος λόγος διαλυτών επιτρέπει την ικανοποιητική ανάκτηση των δύο ουσιών και του IS σε μικρό, σχετικά, διάστημα των 9' εξαιρουμένου, βέβαια, του σταδίου της ξήρανσης του δείγματος. Επιπλέον, στους χρόνους έκλυσης των 137X, 17X και IS δεν εμφανίσθηκε καμμία άλλη κορυφή και η ανάκτηση ήταν >93% τόσο για την 137X όσο και για την 17X. Αντίθετα, σε προηγούμενη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε οξεικός αιθυλεστέρας ως μέσον εκχύλισης σε δείγματα σιέλου, η συνολική διάρκεια εκχύλισης ήταν 15' και οι ανακτήσεις ήταν 72 και 73% για την 137X και για την 17X, αντίστοιχα (Perera *et al.*, 2010).

Η χρωματογραφική μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό των 137X και 17X σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (0,10–8,00 µg/mL). Αν και έχει αναφερθεί στο παρελθόν παρόμοιο LOQ <0,10 µg/mL (Perera *et al.*, 2010), η συγκέντρωση των 17X και 137X που μετρήθηκε στα δείγματά μας είχαν εύρος μεταξύ 0,12 και 1,44 µg/mL για την 17X και μεταξύ 0,13 και 5,05 µg/mL για την 137X. Επομένως, όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν ενέπιπταν στο εύρος της μεθόδου και δεν

υπήρχε ανάγκη συμπύκνωσης ή αραίωσης του δείγματος. Τέλος, ο χρόνος δειγματοληψίας στην παρούσα μελέτη, δηλαδή 6 ώρες μετά την κατανάλωση της 137X, αντανακλά επακριβώς την κάθαρση της 137X (Fuhr and Rost, 1994a).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο αξιόπιστοι δείκτες της δραστηριότητας του CYP1A2, δηλαδή ο λόγος 17X/137X στο σίελο (Fuhr and Rost, 1994a; Tantcheva-Poór *et al.*, 1999) και τον λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996; Sinués *et al.*, 1999) για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP1A2 στο ίδιο δείγμα εθελοντών. Στους 34 εθελοντές που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι και με τους δύο μεταβολικούς λόγους, στον σίελο και στα ούρα, οι καπνιστές είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα του CYP1A2 σε σχέση με τους μη καπνιστές. Η επαγωγική επίδραση του καπνίσματος στην παρούσα εργασία συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν μεγαλύτερη δραστηριότητα του CYP1A2 στους καπνιστές χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μεταβολικούς λόγους και βιολογικά υποστρώματα (Fuhr and Rost, 1994a; Bozikas *et al.*, 2004; Wenk *et al.*, 2004; Woolridge *et al.*, 2004; Kukongviriyapan *et al.*, 2006). Η αξιοπιστία της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία ενισχύεται και επιβεβαιώνεται από την υψηλή συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ του μεταβολικού λόγου 17X/137X στον σίελο και του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα.

Σε αυτό το μέρος της παρούσας εργασίας ζητήθηκε από τους εθελοντές να απέχουν από μεθυλοξανθίνες τουλάχιστον 12 ώρες πριν από την δοκιμασία της καφεΐνης. Είναι πιθανόν τα δείγματα που συλλέχθηκαν να έχουν υπολείμματα μεθυλοξανθινών κυρίως σε εθελοντές στους οποίους ο χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης είναι μεγαλύτερος των 3 ωρών. Η μικρή αυτή περίοδος αποχής που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία βασίστηκε σε ήδη δημοσιευμένες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες μικρές περιόδους αποχής από μεθυλοξανθίνες όπως μόνο κατά τη διάρκεια της νύχτας (Fuhr and Rost, 1994a) ή και καθόλου αποχή (Nordmark *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2011) δεν επηρεάζουν την εγκυρότητα των μεταβολικών λόγων στον σίελο και στα ούρα ως αξιόπιστοι δείκτες της δραστηριότητας του CYP1A2. Επιπλέον, σύμφωνα με προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου, οι 12 ώρες αποχή από μεθυλοξανθίνες συνιστά έναν συνετό συμβιβασμό ανάμεσα στην αξιοπιστία της μεθόδου και στην συμμόρφωση των εθελοντών και την τήρηση της εφαρμογής του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Κλινική σημασία των αποτελεσμάτων

Η χρήση των δειγμάτων σιέλου στον φαινοτυπικό προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2 μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην κλινική πράξη. Από

επιδημιολογικές μελέτες έχει φανεί ότι ο προσδιορισμός του φαινοτύπου του CYP1A2 μπορεί να διαχωρίσει τους ασθενείς που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν κάποιες ασθένειες. Πράγματι, προηγούμενες μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολικοί λόγοι της 137X στα ούρα για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2, έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ παραγόντων που επάγουν το CYP1A2, όπως είναι το κάπνισμα, και της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου του ορθού και της ουροδόχου κύστης (Lang *et al.*, 1994; Le Marchand *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2012). Βέβαια, υπάρχει και άλλη μελέτη σύμφωνα με την οποία μειωμένη, και όχι αυξημένη, δραστηριότητα του CYP1A2 σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου των όρχεων (Vistisen *et al.*, 2004). Μια άλλη σημαντική κλινική χρήση του φαινοτυπικού προσδιορισμού του CYP1A2 στον σίελο θα μπορούσε να αποδειχθεί η προσαρμογή της δόσης φαρμάκων που μεταβολίζονται από το CYP1A2 και πρόκειται να χορηγηθούν σε ασθενείς που καπνίζουν ή εκτίθενται σε επαγωγείς του ενζύμου, όπως είναι οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, ή σε ασθενείς που ήδη λαμβάνουν φάρμακα που μεταβολίζονται από το CYP1A2. Ομοίως, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 στο σίελο μπορεί να βοηθήσει σε περιπτώσεις στις οποίες η θεραπευτική δόση φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα του CYP1A2 δεν είναι γνωστή, ή σε περιπτώσεις εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών ή έλλειψη ανταπόκρισης στην θεραπευτική αγωγή. Τέλος, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός του CYP1A2 μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας ή την παρουσία ηπατοπάθειας, καθώς είναι γνωστό ότι το CYP1A2 εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ (Tarantino, 2009). Υπό αυτή την έννοια, η μέθοδος που αναπτύχθηκε, λόγω της ευκολίας και της αξιοπιστίας της, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως στην κλινική πράξη για την εκτίμηση της εφεδρείας της ηπατικής λειτουργίας σε διάφορες μορφές χρόνιας ηπατοπάθειας.

Συμπερασματικά, το μεταβολικός λόγος 17X/137X προσδιορίσθηκε με ακρίβεια σε δείγματα σιέλου υγείων εθελοντών χρησιμοποιώντας μια απλή, φθηνή και αξιόπιστη χρωματογραφική μέθοδο. Η μέθοδος επέδειξε υψηλή συσχέτιση με τον μεταβολικό λόγο (AFMU+1U+1X)/17U στα ούρα και αμφότεροι οι μεταβολικοί λόγοι, στον σίελο και στα ούρα, διέγνωσαν ορθώς την επαγωγή του CYP1A2 στους καπνιστές. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθυσμιακές μελέτες για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό του CYP1A2 την λειτουργική ικανότητα του ήπατος. Επιπλέον, μπορεί να βοηθήσει στην εξατομίκευση της φαρμακοθεραπείας σε περιπτώσεις που αυτή επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενδογενείς αλλαγές και αλληλεπιδράσεις φαρμάκων. Τέλος, μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμη στην εκτίμηση της μείωσης της λειτουργικότητας

του CYP1A2 σε ασθενείς με ηπατοπάθεια και στην διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου σε άτομα που εκτίθενται σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα.

Επίδραση του κρόκου στην λειτουργικότητα ενζύμων του μεταβολισμού ξενοβιοτικών

Αρχίζει και γίνεται ευρέως αντιληπτό ότι τα φυσικά προϊόντα μπορούν να τροποποιήσουν την δραστηριότητα των ενζύμων των ξενοβιοτικών με αποτέλεσμα την εμφάνιση φαρμακοκινητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυσικού προϊόντος και άλλων υποστρωμάτων των ενζύμων. Στην περίπτωση που τα υποστρώματα αυτά είναι φάρμακα υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης κλινικών επιπτώσεων. Με δεδομένο το αυξημένο ενδιαφέρον όσον αφορά στις ιατρικές χρήσεις του κρόκου, η επίδραση του προϊόντος σε ένζυμα βιομετατροπής των ξενοβιοτικών αποκτά ιδιαίτερες διαστάσεις. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση ροφήματος κρόκου για το σύντομο διάστημα των έξι ημερών μειώνει τον μεταβολικό λόγο του CYP1A2 σε δείγματα ούρων και σιέλου, ενώ δεν επηρεάζει τους μεταβολικούς λόγους των ενζύμων CYP2A6, XO ή NAT2 που υπολογίσθηκαν δείγματα ούρων. Η μείωση του μεταβολικού λόγου του CYP1A2 οφείλεται στην εκλεκτική μείωση σε άνδρες εθελοντές.

Μερικές μόνο μελέτες στην βιβλιογραφία αναφέρουν την επίδραση φυσικών προϊόντων στην δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO ή NAT2 στον άνθρωπο με την χρήση της καφεΐνης ως μεταβολικού δείκτη. Σημαντική μείωση στην δραστηριότητα του CYP1A2 έχει αναφερθεί για την κερσετίνη (Chen *et al.*, 2009), την κουρκουμίνη (Chen *et al.*, 2010), την γενιστεΐνη (Chen *et al.*, 2011), το φυτό *Angelicae dahuricae radix* (Yi *et al.*, 2009) και το φυτό *Keishi-bukuryo-gan* (Saruwatari *et al.*, 2012). Αντίθετα, καμμία επίδραση στην δραστηριότητα του CYP1A2 δεν φαίνεται να έχουν το έλαιο του σκόρδου, τα φυτά *Ginkgo biloba* και *Panax ginseng* (Gurley *et al.*, 2002, 2005), το τσάι μέντας (Begas *et al.*, 2017), ή το τσάι του βουνού (Begas *et al.*, 2018). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το φυτό *St John's wort* δεν έχει επίδραση στην δραστηριότητα του CYP1A2 (Wang *et al.*, 2001; Gurley *et al.*, 2005), ενώ άλλες αναφέρουν αύξηση της δραστηριότητάς του (Gurley *et al.*, 2002; Wenk *et al.*, 2004). Η δραστηριότητα του ενζύμου CYP2A6 αυξάνεται από την κερσετίνη (Chen *et al.*, 2009), την κουρκουμίνη (Chen *et al.*, 2010) και την γενιστεΐνη (Chen *et al.*, 2011), μειώνεται στους άνδρες από τον σιδηρίτη (Begas *et al.*, 2018), ενώ το φυτό *Keishi-bukuryo-gan* (Saruwatari *et al.*, 2012) και το τσάι

μέντας (Begas *et al.*, 2017) δεν έχουν καμμία επίδραση στο ένζυμο αυτό. Η δραστηριότητα της XO αυξάνει από την κερσετίνη (Chen *et al.*, 2009), μειώνεται από την γενιστεΐνη (Chen *et al.*, 2011) αλλά δεν επηρεάζεται από το φυτό St John's wort (Wenk *et al.*, 2004), την κουρκουμίνη (Chen *et al.*, 2010), το φυτό Keishi-bukuryo-gan (Saruwatari *et al.*, 2012), το τσάι μέντας (Begas *et al.*, 2017) και τον σιδερίτη (Begas *et al.*, 2018). Η δραστηριότητα του ενζύμου NAT2 δεν επηρεάζεται από το φυτό St John's wort (Wenk *et al.*, 2004), την κουρκουμίνη (Chen *et al.*, 2010), την γενιστεΐνη (Chen *et al.*, 2011), το φυτό Keishi-bukuryo-gan (Saruwatari *et al.*, 2012) και τον σιδερίτη (Begas *et al.*, 2018) με εξαίρεση το τσάι μέντας το οποίο μειώνει την δραστηριότητά του (Begas *et al.*, 2017). Αντίθετα, η κερσετίνη επάγει την δραστηριότητα του ενζύμου NAT2 κατά περίπου 89% (Chen *et al.*, 2009). Το σύνολο των ευρημάτων στην βιβλιογραφία υποδηλώνει ότι διάφορα φυσικά προϊόντα έχουν ποικίλες επιδράσεις στην δραστηριότητα των ενζύμων.

Η διαφοροποίηση της επίδρασης των φυσικών προϊόντων, μεταξύ ανδρών και γυναικών, όσον αφορά στην δραστηριότητα του CYP έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες που έγιναν τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι κατανάλωση του προϊόντος St John's Wort για χρονικό διάστημα 28 ημερών επιφέρει 74% μεγαλύτερη επαγωγή του ενζύμου CYP3A4 στις γυναίκες απότι στους άνδρες (Gurley *et al.*, 2002). Επίσης, η δραστηριότητα του ενζύμου CYP2A6 μειώνεται σημαντικά μόνο στους άνδρες μετά την κατανάλωση ροφήματος *Sideritis scardica* για μια εβδομάδα (Begas *et al.*, 2018). Μακρόχρονη χορήγηση πολυφαινολών που βρίσκονται στο τσάι επιφέρει αύξηση του ηπατικού περιεχομένου P450 ειδικά σε αρσενικούς αρουραίους (Liu *et al.*, 2003), ενώ το φλαβονοειδές κερσετίνη αναστέλλει του ενζύμου CYP2E1 *in vitro* μόνο σε μικροσώματα αρσενικών χοίρων (Ekstrand *et al.*, 2015).

Αν και η προέλευση αυτής της διαφοροποιημένης επίδρασης του κρόκου στη δραστηριότητα του CYP1A2 μεταξύ ανδρών και γυναικών δεν διερευνήθηκε στην παρούσα μελέτη, η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευθεί υπό το πρίσμα του σεξουαλικού διμορφισμού σε διάφορες φυσιολογικές και μοριακές παραμέτρους που αφορούν στη φαρμακοθεραπεία. Πρώτον, οι γυναίκες χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς, σε σχέση με τους άνδρες, φυσιολογικούς παράγοντες όπως η οξύτητα του στομάχου, η κινητικότητα του εντέρου, το σωματικό βάρος και η σύνθεσή του, το μέγεθος των οργάνων, ο όγκος αίματος και η νεφρική απέκκριση οι οποίοι είναι δυνατόν να επηρεάσουν τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους των χορηγούμενων φαρμάκων (Marazziti *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2017). Δεύτερον, υπάρχει σεξουαλικός διμορφισμός σε

μοριακούς παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την αποβολή φαρμάκων, όπως για παράδειγμα ένζυμα βιομετατροπής και μεταφοράς φαρμάκων, και οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση της αποβολής φαρμάκων μεταξύ ανδρών και γυναικών (Meibohm *et al.*, 2002). Για παράδειγμα, η ολανζαπίνη, ένα αντιψυχωσικό φάρμακο που μεταβολίζεται από το CYP1A2, φθάνει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (Kelly *et al.*, 1999, 2006) και αποβάλλεται κατά 38% πιο αργά (Bigos *et al.*, 2008) σε γυναίκες παρά σε άνδρες. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να αποδοθούν, τουλάχιστον εν μέρει, και σε διαφορές μεταξύ των ανδρών και των γυναικών όσον αφορά στην βασική ενδογενή δραστηριότητα CYP1A2. Πράγματι, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η δραστηριότητα CYP1A2 είναι μεγαλύτερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες (Relling *et al.*, 1992; Bock *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994; Kashuba *et al.*, 1998; Tantcheva-Roóρ *et al.*, 1999; Ou-Yang *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά τα ευρήματα της βιβλιογραφίας καθώς φάνηκε ότι οι γυναίκες χαρακτηρίζονται από στατιστικά μικρότερο μεταβολικό λόγο του CYP1A2 υπό όλες τις συνθήκες διαίτας (ελεύθερη, περιορισμένη και περιορισμένη υπό κρόκο). Ενδιαφέρον προκαλεί και το εύρημα που αφορά στο πρότυπο αλλαγών στην δραστηριότητα CYP1A2 μεταξύ ανδρών και γυναικών. Ενώ, δηλαδή, σχεδόν όλοι οι άνδρες παρουσίασαν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, η φορά της αλλαγής στις γυναίκες ήταν πιο απρόβλεπτη δηλαδή μείωση, αύξηση και καμμία επίδραση. Το εύρημα αυτό μπορεί να ερμηνευθεί υπό το πρίσμα της διακύμανσης της δραστηριότητας του CYP1A2 κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου της γυναίκας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η δραστηριότητα του CYP1A2 φθάνει στο κατώτατο σημείο κατά την διάρκεια της ύστερης ωοθηλακικής φάσης (Nagata *et al.*, 1997; Kamimori *et al.*, 1999; Asproдини *et al.*, 2019). Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η φάση αυτή συμπίπτει χρονικά με την υψηλότερη συγκέντρωση καφεΐνης στον ορό (Schlier *et al.*, 2016) γεγονός που υποδηλώνει μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου. Εφόσον στην παρούσα μελέτη δεν λάβαμε υπ'όψη τον εμμηνορυσιακό κύκλο, είναι πιθανόν ότι η φάση του κύκλου στην οποία βρισκόταν η εθελόντρια κατά την δειγματοληψία πριν και μετά την χορήγηση κρόκου να επηρέασε τη φορά μεταβολής στην δραστηριότητα του CYP1A2.

Ένα επίσης ενδιαφέρον εύρημα είναι και το γεγονός ότι αν και βρέθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στη δραστηριότητα του CYP1A2 στους άνδρες τόσο στα δείγματα σιέλου όσο και στα δείγματα ούρων, όταν συνυπολογίσθηκε ο μέσος όρος όλων των εθελοντών βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα μόνο στα δείγματα σιέλου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης στο σίελο

εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση αλλαγών στην δραστηριότητα του CYP1A2 σε σχέση με αυτούς στα ούρα. Πράγματι, ο μεταβολικός λόγος παραξανθίνης/καφεΐνης στο σίελο θεωρείται ως ο πλέον κατάλληλος δείκτης δραστηριότητας του CYP1A2 καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την συστηματική κάθαρση της καφεΐνης (Fuhr and Rost, 1994a). Αντίθετα, οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης που προσδιορίζονται στα ούρα βασίζονται σε δευτεροταγείς ή και τριτοταγείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται και από άλλα ένζυμα εκτός από το CYP1A2, ενώ μπορεί να επηρεάζονται και από την νεφρική κάθαρση (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1996).

Όπως όλα τα φυσικά προϊόντα, έτσι και ο κρόκος αποτελείται από ένα περίπλοκο μείγμα πολλών συστατικών. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστό ποιο, ή ποια, από όλα τα συστατικά του κρόκου είναι υπεύθυνο για την μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 που βρέθηκε στους άνδρες εθελοντές. Γενικά, λόγω του πλήθους των συστατικών που περιέχονται σε ένα φυσικό προϊόν είναι πολύ δύσκολο να συσχετίσει κανείς συγκεκριμένα συστατικά με την επίδραση που μπορούν αυτά να έχουν στη δραστηριότητα των ενζύμων. Το θέμα αυτό περιπλέκεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι η βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του κρόκου στον άνθρωπο δεν είναι γνωστή. Στην βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια μελέτη που έγινε σε τέσσερις υγιείς εθελοντές και σε αυτούς βρέθηκε ότι μετά την χορήγηση κρόκου Κοζάνης παρατηρήθηκε αύξηση της κροκετίνης στο αίμα χωρίς όμως να αναφέρονται άλλα συστατικά του κρόκου (Chryssanthi *et al.*, 2011). Προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα υδατοδιαλυτά, μη-απορροφήσιμα, συστατικά του κρόκου, όπως είναι τα γλυκοσίδια τύπου κροκίνης, βιομετατρέπονται στα άγλυκα προϊόντα τους, όπως είναι στην περίπτωση αυτή η κροκετίνη, από τις β-γλυκοσιδάσες που βρίσκονται είτε στα επιθηλιακά κύτταρα είτε στο μικροβίωμα του εντέρου προτού απορροφηθούν στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση (Asai *et al.*, 2005; Xi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017). Αντίστοιχα, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του γλυκοσιδίου πικροκροκίνης (Kyriakoudi *et al.*, 2015) ενισχύεται μετά από την μετατροπή της στο άγλυκο προϊόν, την σαφρανάλη, από πεπτικά ένζυμα ή από μεταβολισμό στο μικροβίωμα *in vivo* (Marín *et al.*, 2015). Αν και ευρήματα προκλινικών μελετών δεν είναι κατ' ανάγκη εφαρμόσιμα στον άνθρωπο, είναι πολύ πιθανό ότι το βιοδραστικό μόριο μετά από την κατανάλωση κρόκου να είναι η κροκετίνη παρά η κροκίνη, αν και η απορρόφηση της κροκίνης όπως και άλλων συστατικών του κρόκου όπως η σαφρανάλη ή η καμφερόλη δεν μπορεί να αποκλεισθεί.

Πολλοί επιστήμονες πιστεύουν ότι η λήψη εκχυλίσματος ενός ακατέργαστου φυσικού προϊόντος υπερτερεί από την λήψη καθαρών συστατικών λόγω της συνεργικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών του προϊόντος (Williamson, 2001; Li, 2002). Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι, λόγω αυτής της συνέργειας, οι συγκεντρώσεις των συστατικών για να εκδηλωθεί η ιατρική επίδρασή ενός προϊόντος είναι πολύ μικρές (Bode and Dong, 2009). Στενά συνδεδεμένη με αυτή την ολιστική προσέγγιση των φυσικών προϊόντων είναι και η ίσως άνευ σημασίας συσχέτιση μεταξύ μεμονομένων συστατικών ενός φυσικού προϊόντος και της επίδρασής τους στον οργανισμό καθώς μια τέτοια συσχέτιση θα ακύρωνε το εξαιρετικό πλεονέκτημα της συνέργειας μεταξύ των συστατικών του φυσικού προϊόντος. Παρόλαυτα, αρκετές μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν εξετάσει την δράση μεμονωμένων συστατικών του κρόκου σε ένζυμα βιομετατροπής των φαρμάκων. Η κροκίνη μειώνει την δραστηριότητα των ενζύμων CYP2B, CYP2C11, CYP3A4 και CYP2E1 σε μικροσώματα ήπατος (Dovrtěloná *et al.*, 2015) και την δραστηριότητα του ενζύμου CYP2E1 σε μικροσώματα νεφρού (Hassan *et al.*, 2015) στον αρουραίο. Το καροτενοϊδές λυκοπένιο, το οποίο ανευρίσκεται σε μικρές ποσότητες στον κρόκο, αναστέλλει την δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A1 και CYPB1 *in vitro* (Wang and Leung, 2010), όπως επίσης και του ενζύμου CYP2E1, αλλά όχι του CYP1A2, σε μικροσώματα ήπατος αρουραίου (Louisa *et al.*, 2009). Επίσης, έμμεσες ενδείξεις υπάρχουν για αναστολή του ενζύμου CYP1A2 από το λυκοπένιο καθώς αυτό μειώνει την δυνατότητα μεταλλαξιγέννεσης της PhIP, μιας ετεροκυκλικής αμίνης η οποία υπόκειται σε μεταβολική ενεργοποίηση από το CYP1A2 (Weisburger *et al.*, 1998). Παρόλαυτα, η ανασταλτική δράση του λυκοπενίου η οποία έχει βρεθεί σε *in vitro* πειράματα δεν υποστηρίζεται από *in vivo* μελέτες σε ζώα καθώς χορήγηση λυκοπενίου δεν επιφέρει αλλαγές στην δραστηριότητα των ισοενζύμων CYP1A1 ή CYP1A2 στον αρουραίο (Jewell and O'Brien, 1999). Συμπερασματικά, η κροκίνη και το λυκοπένιο αναστέλλουν την δραστηριότητα διαφόρων CYPs σε τρωκτικά, αν και η δράση τους παραμένει ακόμα απροσδιόριστη. Η δραστηριότητα της ΧΟ έχει αναφερθεί ότι μειώνεται στους νεφρούς διαβητικών αρουραίων στους οποίους χορηγείται κροκίνη από του στόματος (Altinoz *et al.*, 2015) και στους σκελετικούς μύες μετά από εξαντλητική άσκηση αρουραίων στους οποίους έχει χορηγηθεί λυκοπένιο (Liu *et al.*, 2005). Βιβλιογραφία σχετική με την επίδραση της κροκίνης ή του λυκοπενίου στην δραστηριότητα των ενζύμων CYP2A6 ή NAT2 δεν υπάρχει. Επίσης, δεν υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες σχετικά με την επίδραση της σαφρανάλης, ή του γλυκοσιδίου της πικροκροκίνης, στην δραστηριότητα των ενζύμων μεταβολισμού των ξеноβιοτικών εκτός από μια μελέτη η

οποία αναφέρει ότι η σαφρανάλη αυξάνει την δραστηριότητα των ενζύμων CYP2B, CYP2C11 και CYP3A σε μικροσώματα ήπατος αρουραίου (Dovrtělová *et al.*, 2015). Τέλος, η καμφερόλη, ένα φλαβονοειδές που έχει ταυτοποιηθεί στα στίγματα του κρόκου Κοζάνης (Tarantilis *et al.*, 1995), είναι ισχυρός αναστολέας της δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2 (Shimada *et al.*, 2010), XO (NAGAO *et al.*, 1999) και σε μικρότερη κλίμακα NAT2 (Kukongviriyapan *et al.*, 2006) και CYP2A6 (Tiong *et al.*, 2010) *in vitro*. Παρόλαυτα, η *in vivo* δράση της καμφερόλης έχει αμφισβητηθεί λόγω της πτωχής της βιοδιαθεσιμότητας και του εκτεταμένου μεταβολισμού της (Zabela *et al.*, 2016). Συνοπτικά, τα βιοδραστικά συστατικά του κρόκου έχουν μικρή επίδραση στην δραστηριότητα των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2. Η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου CYP1A2 που παρατηρήθηκε στους άνδρες στην παρούσα μελέτη μπορεί να αντανακλά την συνδυασμένη δράση, συνεργική και ανασταλτική, όλων των συστατικών του κρόκου.

Πιθανό μειονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι η έλλειψη ανάλυσης της σύστασης του προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε. Όπως όλα τα φυσικά προϊόντα, η επακριβής ποσότητα των συστατικών του κρόκου μπορεί να ποικίλει όχι μόνο σε σχέση με την γεωγραφική του προέλευση, αλλά ακόμα μεταξύ παρτίδων προϊόντος που προέρχεται από τον ίδιο τόπο όπως στην παρούσα μελέτη. Μικρές διαφορές στις διαφορετικές παρτίδες θα μπορούσαν να επηρεάζουν την επίδρασή τους στα ένζυμα μεταβολισμού. Όμως, αυτό το μειονέκτημα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα μικρό καθώς αρκετές μελέτες στο παρελθόν έχουν αναδείξει μικρές διαφορές στην ποσοτική σύνθεση του προϊόντος (Papandreou *et al.*, 2006; García-Rodríguez *et al.*, 2017; Karkoula *et al.*, 2018), παρά την αναπόφευκτη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων. Ένα δεύτερο μειονέκτημα είναι το σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα χορήγησης του κρόκου το οποίο θα ήταν ανεπαρκές σε κλινικές περιπτώσεις όπως η κατάθλιψη ή άλλες χρόνιες ασθένειες στις οποίες θα μπορούσε να βρει εφαρμογή το προϊόν (Tsolaki *et al.*, 2016; Lopresti and Drummond, 2017). Σε περίπτωση μακρόχρονης χορήγησης θα ήταν ενδιαφέρον να αξιολογηθεί το χρονοδιάγραμμα της πιθανής μεταβολής στην δραστηριότητα του CYP1A2 καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η επίδραση ενός φυσικού προϊόντος στην δραστηριότητα ενζύμων μπορεί να αλλάζει κατά την διάρκεια χορήγησής του. Για παράδειγμα, η επαγωγή του ενζύμου CYP1A2 από το φυτό St John's wort παρατηρείται μετά από 28 (Uchida *et al.*, 2006), αλλά όχι μετά από 8 ή 14 (Wang *et al.*, 2001) ημέρες χορήγησης.

Ένα σημαντικό στοιχείο των φυσικών προϊόντων στην προαγωγή υγείας του ανθρώπου και την πρόληψη ασθενειών είναι η μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών της φάσης I, τα οποία ευθύνονται για την ενεργοποίηση προκαρκινογόνων ουσιών, ή/και η αύξηση της δραστηριότητας ενζύμων της φάσης II, τα οποία είναι ένζυμα αποτοξίνωσης (Moon *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2017). Επομένως, εφόσον το ένζυμο CYP1A2 συμμετέχει στην μεταβολική ενεργοποίηση διαφόρων περιβαλλοντικών προκαρκινογόνων ουσιών, όπως είναι οι αρωματικές και οι ετεροκυκλικές αμίνες (Landi *et al.*, 1999; Faber *et al.*, 2005; Pelkonen *et al.*, 2008), τροποποίηση της δραστηριότητάς του αναμένεται να επηρεάσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε άτομα που εκτίθενται σε καρκινογόνα. Η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στους άνδρες αποτελεί δυνητικό μηχανισμό προστασίας έναντι εμφάνισης καρκίνου. Επειδή η δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων (Koonrungsombhoon *et al.*, 2018) η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την προστατευτική δράση του κρόκου στους άνδρες πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς απαιτούνται καλοσχεδιασμένες μελέτες με μεγάλο αριθμό εθελοντών.

Πολλές κλινικές μελέτες έχουν αναδείξει τις θεραπευτικές ωφέλειες του κρόκου στον άνθρωπο. Για παράδειγμα, χορήγηση κρόκου σε ασθενείς με διαταραχές του εγκεφάλου όπως η κατάθλιψη ή η νόσος του Alzheimer (Lopresti and Drummond, 2014; Tsolaki *et al.*, 2016; Leone *et al.*, 2018; Shafiee *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018), εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς (Bisti *et al.*, 2014; Lashay *et al.*, 2016), καρδιαγγειακές παθήσεις (Kamalipour and Akhondzadeh, 2011; Hatziagapiou and Lambrou, 2018) ή διαβήτη (Milajerdi, Jazayeri, Hashemzadeh, *et al.*, 2018; Yaribeygi *et al.*, 2019) είχε θετικά αποτελέσματα. Μάλιστα, στις κλινικές οδηγίες του Καναδικού Δικτύου για την Αντιμετώπιση του Άγχους (Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments) συμπεριλαμβάνεται ο κρόκος ως τρίτης γραμμής μονοθεραπείας για την αντιμετώπιση ήπιας ή μέτριας μείζονας κατάθλιψης (Ravindran *et al.*, 2016). Όμως, παρά την εκτεταμένη βιβλιογραφία που αφορούν στις κλινικές επιδράσεις του κρόκου, δεν υπάρχουν πληροφορίες για πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κρόκου και χορηγούμενων φαρμάκων. Αυτό είναι ένα σημαντικό ζήτημα καθώς παρά την ασφάλεια που παρουσιάζουν τα φάρμακα και τα φυσικά προϊόντα όταν χορηγούνται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, η συγχορήγησή τους μπορεί να οδηγήσει σε πιθανές αλληλεπιδράσεις με σημαντικές κλινικές επιπτώσεις (Zhou *et al.*, 2003; Bent, 2008; Zhang *et al.*, 2015). Επιπλέον, άτομα που χρησιμοποιούν φυσικά προϊόντα καταναλώνουν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό φαρμάκων σε σχέση με ανθρώπους που δεν χρησιμοποιούν φυσικά

προϊόντα με αποτέλεσμα να αυξάνει η πιθανότητα αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυσικών προϊόντων και φαρμάκων (Klepser *et al.*, 2000). Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυσικών προϊόντων και φαρμάκων είναι αναγκαία για την αξιολόγηση και ελαχιστοποίηση κλινικών επιπτώσεων.

Συμπερασματικά, το προϊόν *C. sativus* χρησιμοποιείται ολόένα και περισσότερο λόγω των ιατρικών του ιδιοτήτων και έχει κερδίσει το ενδιαφέρον τόσο των ερευνητών όσο και του κοινού λόγω των πολλαπλών ωφελειών του στην υγεία. Μια σημαντική επίπτωση της αύξησης των ιατρικών χρήσεων του κρόκου είναι οι πιθανές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχει το προϊόν αυτό μεταξύ των φυτοχημικών συστατικών του και της δραστηριότητας των ενζύμων που ενέχονται στη βιομετατροπή των χορηγούμενων φαρμάκων. Η παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας την καφεΐνη ως μεταβολικό δείκτη, έδειξε για πρώτη φορά ότι η κατανάλωση ροφήματος κρόκου Κοζάνης μπορεί να επηρεάσει την *in vivo* δραστηριότητα ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση κρόκου για έξι ημέρες μειώνει την δραστηριότητα του CYP1A2 σε άνδρες υγιείς εθελοντές, ενώ δεν επηρεάζει την δραστηριότητα των ενζύμων CYP2A6, XO και NAT2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η κατανάλωση κρόκου είναι πιθανόν ότι δεν συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυσικού προϊόντος και φαρμάκων τα οποία μεταβολίζονται από τα εν λόγω ένζυμα, με εξαίρεση την πιθανή αλληλεπίδραση με φάρμακα που μεταβολίζονται από το CYP1A2 στους άνδρες.

2.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdullaev FI (2002) Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med Maywood NJ* **227**:20–25.
- Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, and Islam F (2005) Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav* **81**:805–813.
- Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi A-H, and Khalighi-Cigaroudi F (2004) Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816]. *BMC Complement Altern Med* **4**:12.
- Akhondzadeh S., Sabet MS, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Zare F, and Moradi A (2010) Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther* **35**:581–588.
- Akhondzadeh Shahin, Shafiee Sabet M, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Rezazadeh S-A, Yousefi A, Zare F, Moradi A, and Vossoughi A (2010) A 22-week, multicenter, randomized, double-blind controlled trial of *Crocus sativus* in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **207**:637–643.
- Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L, and Ingelman-Sundberg M (2003) Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians. *Eur J Clin Pharmacol* **59**:533–536.
- Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Cigremis Y, and Turkoz Y (2015) Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* **34**:127–134.
- Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, and Shields PG (1996) Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *JAMA* **276**:1494–1501.
- Aranda R, Doménech E, Rus AD, Real JT, Sastre J, Viña J, and Pallardó FV (2007) Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res* **41**:1195–1200.
- Arnaud MJ (2011) Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol* 33–91.
- Asai A, Nakano T, Takahashi M, and Nagao A (2005) Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem* **53**:7302–7306.
- Asprodini E, Tsiokou V, Begas E, Kilindris T, Kouvaras E, Samara M, and Messinis I (2019) Alterations in Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Activities across Menstrual Cycle in Healthy Volunteers. *J Pharmacol Exp Ther* **368**:262–271.

- Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, Shoyama CY, and Yuan CS (2007) Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Exp Oncol* **29**:175–180.
- Ayatollahi H, Javan AO, Khajedaluae M, Shahroodian M, and Hosseinzadeh H (2014) Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) on coagulation and anticoagulation systems in healthy volunteers. *Phytother Res PTR* **28**:539–543.
- Azimi P, Ghiasvand R, Feizi A, Hariri M, and Abbasi B (2014) Effects of Cinnamon, Cardamom, Saffron, and Ginger Consumption on Markers of Glycemic Control, Lipid Profile, Oxidative Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes Patients. *Rev Diabet Stud RDS* **11**:258–266.
- Barone JJ, and Roberts HR (1996) Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **34**:119–129.
- Bathaie SZ, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, and Moosavi-Movahedi A-A (2007) Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)₁₅, and Oligo (dA.dT)₁₅. *DNA Cell Biol* **26**:533–540.
- Bathaie SZ, Miri H, Mohagheghi M-A, Mokhtari-Dizaji M, Shahbazfar A-A, and Hasanzadeh H (2013) Saffron Aqueous Extract Inhibits the Chemically-induced Gastric Cancer Progression in the Wistar Albino Rat. *Iran J Basic Med Sci* **16**:27–38.
- Bebia Z, Buch SC, Wilson JW, Frye RF, Romkes M, Cecchetti A, Chaves-Gnecco D, and Branch RA (2004) Bioequivalence revisited: influence of age and sex on CYP enzymes. *Clin Pharmacol Ther* **76**:618–627.
- Bechtel YC, Haffen E, Lelouët H, Brientini MP, Paintaud G, Miguet JP, and Bechtel PR (2000) Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**:467–475.
- Begas E, Kilindris T, Kouvaras E, Tsioutsoumi A, Kouretas D, and Asproдини EK (2018) Dietary effects of *Sideritis scardica* “mountain tea” on human in vivo activities of xenobiotic metabolizing enzymes in healthy subjects. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **122**:38–48.
- Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, and 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. *Biomed Chromatogr* **21**:190–200.
- Begas E, Kouvaras E, Tsakalof AK, Bounitsi M, and Asproдини EK (2015) Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomed Chromatogr BMC* **29**:1657–1663.
- Begas E, Tsioutsouliti A, Kouvaras E, Haroutounian SA, Kasiotis KM, Kouretas D, and Asproдини E (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 Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **100**:80–89.

- Bendriss EK, Bechtel Y, Bendriss A, Humbert PH, Paintaud G, Magnette J, Agache P, and Bechtel PR (1996) Inhibition of caffeine metabolism by 5-methoxypsoralen in patients with psoriasis. *Br J Clin Pharmacol* **41**:421–424.
- Bendriss EK, Bechtel YC, Paintaud G, Brientini MP, Manton G, Miguet JP, Bennani A, and Bechtel PR (1998) Acetylation polymorphism expression in patients before and after liver transplantation: influence of host/graft genotypes. *Pharmacogenetics* **8**:201–209.
- Bendriss EK, Markoglou N, and Wainer IW (2000) Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci App* **746**:331–338.
- Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE, and Jacob P (2006) Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **79**:480–488.
- Benowitz NL, Peng M, and Jacob P (2003) Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **74**:468–474.
- Bent S (2008) Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. *J Gen Intern Med* **23**:854–859.
- Bertilsson L, Carrillo JA, Dahl ML, Llerena A, Alm C, Bondesson U, Lindström L, Rodriguez de la Rubia I, Ramos S, and Benitez J (1994) Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J Clin Pharmacol* **38**:471–473.
- Bigos KL, Pollock BG, Coley KC, Miller DD, Marder SR, Aravagiri M, Kirshner MA, Schneider LS, and Bies RR (2008) Sex, race, and smoking impact olanzapine exposure. *J Clin Pharmacol* **48**:157–165.
- Bisti S, Maccarone R, and Falsini B (2014) Saffron and retina: neuroprotection and pharmacokinetics. *Vis Neurosci* **31**:355–361.
- Blanchard J, and Sawers SJA (1983) The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* **24**:93–98.
- Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, and Meyer UA (1990) Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol* **9**:193–203.
- Bock KW, Schrenk D, Forster A, Griese EU, Mörike K, Brockmeier D, and Eichelbaum M (1994) The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics* **4**:209–218.
- Bode AM, and Dong Z (2009) Epigallocatechin 3-Gallate and Green Tea Catechins: United They Work, Divided They Fail. *Cancer Prev Res Phila Pa* **2**:514–517.

- Bodeker G, Ong C-K, Grundy C, Burford G, Shein K, Medicine WHOP on T, and WHO Centre for Health Development (Kobe J (2005) *WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine*, Kobe, Japan : WHO Centre for Health Development, Kobe, Japan.
- Bolhassani A, Khavari A, and Bathaie SZ (2014) Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta* **1845**:20–30.
- Bostan HB, Mehri S, and Hosseinzadeh H (2017) Toxicology effects of saffron and its constituents: a review. *Iran J Basic Med Sci* **20**:110–121.
- Boukouvala S, and Sim E (2005) Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **96**:343–351.
- Bowen PE, Herbst-Espinosa SM, Hussain EA, and Stacewicz-Sapuntzakis M (2002) Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J Nutr* **132**:3668–3673.
- Bozikas VP, Papakosta M, Niopas I, Karavatos A, and Mirtsou-Fidani V (2004) Smoking impact on CYP1A2 activity in a group of patients with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* **14**:39–44.
- Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, Teitel CH, Massengill JP, Lawsen MF, and Kadlubar FF (1992) Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* **2**:116–127.
- CAIOLA MG, and FAORO F (2011) Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathol Mediterr* **50**:175–182.
- Campbell ME, Grant DM, Inaba T, and Kalow W (1987) Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **15**:237–249.
- Campbell ME, Spielberg SP, and Kalow W (1987) A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* **42**:157–165.
- Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Béréziat JC, Henderson CJ, Wolf CR, Bartsch H, and Lang MA (1993) High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* **7**:268–275.
- Carrillo JA, and Benítez J (1994) Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clin Pharmacol Ther* **55**:293–304.
- Carrillo JA, and Benitez J (1996) CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* **41**:605–608.

- Carrillo JA, Christensen M, Ramos SI, Alm C, Dahl ML, Benitez J, and Bertilsson L (2000) Evaluation of caffeine as an in vivo probe for CYP1A2 using measurements in plasma, saliva, and urine. *Ther Drug Monit* **22**:409–417.
- Cascorbi I, Brockmüller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, and Roots I (1996) Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res* **56**:3961–3966.
- Caubet M-S, Elbast W, Dubuc M-C, and Brazier J-L (2002) Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. *J Pharm Biomed Anal* **27**:261–270.
- Chen J, Stampfer MJ, Hough HL, Garcia-Closas M, Willett WC, Hennekens CH, Kelsey KT, and Hunter DJ (1998) A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* **58**:3307–3311.
- Chen Y, Liu W-H, Chen B-L, Fan L, Han Y, Wang G, Hu D-L, Tan Z-R, Zhou G, Cao S, and Zhou H-H (2010) Plant polyphenol curcumin significantly affects CYP1A2 and CYP2A6 activity in healthy, male Chinese volunteers. *Ann Pharmacother* **44**:1038–1045.
- Chen Y, Xiao C-Q, He Y-J, Chen B-L, Wang G, Zhou G, Zhang W, Tan Z-R, Cao S, Wang L-P, and Zhou H-H (2011) Genistein alters caffeine exposure in healthy female volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **67**:347–353.
- Chen Y, Xiao P, Ou-Yang D-S, Fan L, Guo D, Wang Y-N, Han Y, Tu J-H, Zhou G, Huang Y-F, and Zhou H-H (2009) Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**:828–833.
- Christodoulou E, Kadoglou NPE, Kostomitsopoulos N, and Valsami G (2015) Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *J Pharm Pharmacol* **67**:1634–1649.
- Christodoulou E, Kadoglou NPE, Stasinopoulou M, Konstandi OA, Kenoutis C, Kakazanis ZI, Rizakou A, Kostomitsopoulos N, and Valsami G (2018) Crocus sativus L. aqueous extract reduces atherogenesis, increases atherosclerotic plaque stability and improves glucose control in diabetic atherosclerotic animals. *Atherosclerosis* **268**:207–214.
- Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, and Cordopatis P (2011) A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma-- application after saffron tea consumption. *J Pharm Biomed Anal* **55**:563–568.
- Chryssanthi DG, Lamari FN, Iatrou G, Pylara A, Karamanos NK, and Cordopatis P (2007) Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different Crocus species. *Anticancer Res* **27**:357–362.
- Chung WG, Kang JH, Park CS, Cho MH, and Cha YN (2000) Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase activities in Koreans: determination by caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **67**:258–266.

- Colombo D, Lunardon L, and Bellia G (2014) Cyclosporine and herbal supplement interactions. *J Toxicol* **2014**:145325.
- De Kesel P, Lambert W, and Stove C (2014) Why dried blood spots are an ideal tool for CYP1A2 phenotyping. *Clin Pharmacokinet* **53**:763–771.
- del Campo CP, Carmona M, Maggi L, Kanakis CD, Anastasaki EG, Tarantilis PA, Polissiou MG, and Alonso GL (2010) Effects of mild temperature conditions during dehydration procedures on saffron quality parameters. *J Sci Food Agric* **90**:719–725.
- Denaro CP, Wilson M, Jacob P, and Benowitz NL (1996) The effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. *Clin Pharmacol Ther* **59**:624–635.
- Dhar A, Mehta S, Dhar G, Dhar K, Banerjee S, Van Veldhuizen P, Campbell DR, and Banerjee SK (2009) Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. *Mol Cancer Ther* **8**:315–323.
- Di YM, Chow VD-W, Yang L-P, and Zhou S-F (2009) Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Curr Drug Metab* **10**:754–780.
- Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint Aubert B, Bories P, Michel H, and Maurel P (1990) Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* **99**:737–747.
- Djordjevic N, Carrillo JA, Gervasini G, Jankovic S, and Aklillu E (2010) In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *Eur J Clin Pharmacol* **66**:571–578.
- Dorsey JG, and Dill KA (1989) The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Chem Rev* **89**:331–346.
- Dovrtělová G, Nosková K, Juřica J, Turjap M, and Zendulka O (2015) Can bioactive compounds of *Crocus sativus* L. influence the metabolic activity of selected CYP enzymes in the rat? *Physiol Res* **64 Suppl 4**:S453-458.
- Draper AJ, Madan A, and Parkinson A (1997) Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **341**:47–61.
- Dupret J-M, and Rodrigues-Lima F (2005) Structure and regulation of the drug-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases. *Curr Med Chem* **12**:311–318.
- Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, and Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* **5**:259–274.
- Ekor M (2014) The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* **4**:177.
- Ekstrand B, Rasmussen MK, Woll F, Zlabek V, and Zamaratskaia G (2015) In vitro gender-dependent inhibition of porcine cytochrome p450 activity by selected flavonoids and phenolic acids. *BioMed Res Int* **2015**:387918.

- Ernst E (2000) Herb-drug interactions: potentially important but woefully under-researched. *Eur J Clin Pharmacol* **56**:523–524.
- Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, and Fernandez JA (1996) Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* **100**:23–30.
- Evans DA (1989) N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* **42**:157–234.
- Evans DA, Manley KA, and McKUSICK VA (1960) Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* **2**:485–491.
- Faber MS, Jetter A, and Fuhr U (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**:125–134.
- Facciolá G, Hidestrand M, von Bahr C, and Tybring G (2001) Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol* **56**:881–888.
- Farokhnia M, Shafiee Sabet M, Iranpour N, Gougol A, Yekehtaz H, Alimardani R, Farsad F, Kamalipour M, and Akhondzadeh S (2014) Comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: a double-blind randomized clinical trial. *Hum Psychopharmacol* **29**:351–359.
- Feidantsis K, Mellidis K, Galatou E, Sinakos Z, and Lazou A (2018) Treatment with crocin improves cardiac dysfunction by normalizing autophagy and inhibiting apoptosis in STZ-induced diabetic cardiomyopathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD* **28**:952–961.
- Feistel B, Wegener T, Rzymiski P, and Pischel I (2018) Assessment of the Acute and Subchronic Toxicity and Mutagenicity of *Sideritis scardica* Griseb. Extracts. *Toxins* **10**.
- Ferré S (2016) Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: Implications for substance use disorders. *Psychopharmacology (Berl)* **233**:1963–1979.
- Fuhr U, Anders EM, Mahr G, Sörgel F, and Staib AH (1992) Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:942–948.
- Fuhr U, Jetter A, and Kirchheiner J (2007) Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach. *Clin Pharmacol Ther* **81**:270–283.
- Fuhr U, Kober S, Zaigler M, Mutschler E, and Spahn-Langguth H (2005) Rate-limiting biotransformation of triamterene is mediated by CYP1A2. *Int J Clin Pharmacol Ther* **43**:327–334.
- Fuhr U, and Kummert AL (1995) The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* **58**:365–373.

- Fuhr U, and Rost KL (1994a) Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* **4**:109–116.
- Fuhr U, and Rost KL (1994b) Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* **4**:109–116.
- Fuhr U, Rost KL, Engelhardt R, Sachs M, Liermann D, Belloc C, Beaune P, Janezic S, Grant D, Meyer UA, and Staib AH (1996) Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations. *Pharmacogenetics* **6**:159–176.
- Fuhr U, Woodcock BG, and Siewert M (1992) Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol* **42**:463–464.
- Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, McLeod HL, and Yokoi T (2005) A novel CYP2A6*20 allele found in African-American population produces a truncated protein lacking enzymatic activity. *Biochem Pharmacol* **70**:801–808.
- Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, and Eaton DL (1994) Role of Human Microsomal and Human Complementary DNA-expressed Cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the Bioactivation of Aflatoxin B1. *Cancer Res* **54**:101–108.
- García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontañón J, Fernandez JA, Atiénzar M, and García-Olmo D (1999) Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. *Nutr Cancer* **35**:120–126.
- García-Rodríguez MV, López-Córcoles H, Alonso GL, Pappas CS, Polissiou MG, and Tarantilis PA (2017) Comparative evaluation of an ISO 3632 method and an HPLC-DAD method for safranal quantity determination in saffron. *Food Chem* **221**:838–843.
- Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks - Zucconi - 2013 - EFSA Supporting Publications - Wiley Online Library (n.d.).
- Georgia KA, Samanidou VF, and Papadoyannis IN (2001) Use of novel solid-phase extraction sorbent materials for high-performance liquid chromatography quantitation of caffeine metabolism products methylxanthines and methyluric acids in samples of biological origin. *J Chromatogr B Biomed Sci App* **759**:209–218.
- Georgiadou G, Grivas V, Tarantilis PA, and Pitsikas N (2014) Crocins, the active constituents of *Crocus Sativus* L., counteracted ketamine-induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **231**:717–726.
- Ghadrdooost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, Haghghi S, Sameni HR, and Pahlvan S (2011) Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol* **667**:222–229.

- Ghasemi T, Abnous K, Vahdati F, Mehri S, Razavi BM, and Hosseinzadeh H (2015) Antidepressant Effect of Crocus sativus Aqueous Extract and its Effect on CREB, BDNF, and VGF Transcript and Protein Levels in Rat Hippocampus. *Drug Res* **65**:337–343.
- Grant DM, Tang BK, Campbell ME, and Kalow W (1986) Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *Br J Clin Pharmacol* **21**:454–458.
- Grant DM, Tang BK, and Kalow W (1984) A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* **17**:459–464.
- Grant Denis M., Tang BK, and Kalow W (1983) Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite. *Clin Pharmacol Ther* **33**:355–359.
- Grant D. M., Tang BK, and Kalow W (1983) Variability in caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **33**:591–602.
- Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C, and Wu X (2005) Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians. *Mutat Res* **581**:97–104.
- Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, and Tang BK (1992) Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* **2**:73–77.
- Guerciolini R, Szumlanski C, and Weinshilboum RM (1991) Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther* **50**:663–672.
- Guidances (Drugs) (n.d.).
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, and Ang CYW (2005) Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, Panax ginseng and Ginkgo biloba. *Drugs Aging* **22**:525–539.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, and Ang CYW (2002) Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther* **72**:276–287.
- Gustin DM, Rodvold KA, Sosman JA, Diwadkar-Navsariwala V, Stacewicz-Sapuntzakis M, Viana M, Crowell JA, Murray J, Tiller P, and Bowen PE (2004) Single-dose pharmacokinetic study of lycopene delivered in a well-defined food-based lycopene delivery system (tomato paste-oil mixture) in healthy adult male subjects. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **13**:850–860.
- Ha HR, Follath F, Chen J, and Krähenbühl S (1996) Biotransformation of caffeine by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Eur J Clin Pharmacol* **49**:309–315.
- Hakooz N, and Hamdan I (2007) Effects of dietary broccoli on human in vivo caffeine metabolism: a pilot study on a group of Jordanian volunteers. *Curr Drug Metab* **8**:9–15.

- Hakooz NMK (2009) Caffeine metabolic ratios for the in vivo evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, xanthine oxidase and CYP2A6 enzymatic activities. *Curr Drug Metab* **10**:329–338.
- Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* **33**:774–797.
- Hassan MH, Bahashawan SA, Abdelghany TM, Abd-Allah GM, and Ghobara MM (2015) Crocin Abrogates Carbon Tetrachloride-Induced Renal Toxicity in Rats via Modulation of Metabolizing Enzymes and Diminution of Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammatory Cytokines. *J Biochem Mol Toxicol* **29**:330–339.
- Hatziagapiou K, and Lambrou GI (2018) The Protective Role of Crocus Sativus L. (Saffron) Against Ischemia- Reperfusion Injury, Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Nature Opposing Cardiovascular Diseases. *Curr Cardiol Rev* **14**:272–289.
- Hein DW (2000) N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicol Lett* **112–113**:349–356.
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ, and Grant DM (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* **14**:1633–1638.
- Henderson L, Yue QY, Bergquist C, Gerden B, and Arlett P (2002) St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *Br J Clin Pharmacol* **54**:349–356.
- Hennessy M, Kelleher D, Spiers JP, Barry M, Kavanagh P, Back D, Mulcahy F, and Feely J (2002) St John's Wort increases expression of P-glycoprotein: Implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* **53**:75–82.
- HERBERT (Hon.) W (1847) *A History of the species of crocus. [Edited by J. Lindley. Originally printed in the Journal of the Horticultural Society.]*, W. Clowes and Sons.
- Hong C-C, Tang B-K, Rao V, Agarwal S, Martin L, Trichler D, Yaffe M, and Boyd NF (2004) Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res BCR* **6**:R338-351.
- Hosseini A, Razavi BM, and Hosseinzadeh H (2018) Pharmacokinetic Properties of Saffron and its Active Components. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **43**:383–390.
- Hosseinzadeh H, Sadeghi Shakib S, Khadem Sameni A, and Taghiabadi E (2013) Acute and subacute toxicity of safranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *Iran J Pharm Res IJPR* **12**:93–99.
- Hosseinzadeh H, and Sadeghnia HR (2007) Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **14**:256–262.

- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, and Mohajeri SA (2012) Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phytother Res PTR* **26**:381–386.
- Hosseinzadeh H, and Talebzadeh F (2005) Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia* **76**:722–724.
- Hosseinzadeh H, Ziaee T, and Sadeghi A (2008) The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **15**:491–495.
- Islam MM, Iqbal U, Walther BA, Nguyen P-A, Li Y-CJ, Dubey NK, Poly TN, Masud JHB, Atique S, and Syed-Abdul S (2017) Gender-based personalized pharmacotherapy: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet* **295**:1305–1317.
- Jagadeeswaran R, Thirunavukkarasu C, Gunasekaran P, Ramamurty N, and Sakthisekaran D (2000) In vitro studies on the selective cytotoxic effect of crocetin and quercetin. *Fitoterapia* **71**:395–399.
- Jewell C, and O'Brien NM (1999) Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *Br J Nutr* **81**:235–242.
- Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, von Richter O, Jin L, and Nebert DW (2006) Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenet Genomics* **16**:359–367.
- Joeres R, and Richter E (1987) Mexiletine and caffeine elimination. *N Engl J Med* **317**:117.
- Johne A, Brockmöller J, Bauer S, Maurer A, Langheinrich M, and Roots I (1999) Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* **66**:338–345.
- Jost G, Wahlländer A, von Mandach U, and Preisig R (1987) Overnight salivary caffeine clearance: a liver function test suitable for routine use. *Hepatol Baltim Md* **7**:338–344.
- Kadlubar FF, Talaska G, Butler MA, Teitel CH, Massengill JP, and Lang NP (1990) Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites. *Prog Clin Biol Res* **340B**:107–114.
- Kall MA, Vang O, and Clausen J (1996) Effects of dietary broccoli on human in vivo drug metabolizing enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism. *Carcinogenesis* **17**:793–799.
- Kalow W, and Tang BK (1993) The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin Pharmacol Ther* **53**:503–514.

- Kalow W, and Tang BK (1991) Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* **50**:508–519.
- Kamalipour M, and Akhondzadeh S (2011) Cardiovascular effects of saffron: an evidence-based review. *J Tehran Heart Cent* **6**:59–61.
- Kamimori GH, Joubert A, Otterstetter R, Santaromana M, and Eddington ND (1999) The effect of the menstrual cycle on the pharmacokinetics of caffeine in normal, healthy eumenorrheic females. *Eur J Clin Pharmacol* **55**:445–449.
- Kamimori GH, Karyekar CS, Otterstetter R, Cox DS, Balkin TJ, Belenky GL, and Eddington ND (2002) The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *Int J Pharm* **234**:159–167.
- Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, and Polissiou MG (2007) Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. *J Agric Food Chem* **55**:970–977.
- Karkoula E, Angelis A, Koulakiotis N-S, Gikas E, Halabalaki M, Tsarbopoulos A, and Skaltsounis A-L (2018) Rapid isolation and characterization of crocins, picrocrocetin, and crocetin from saffron using centrifugal partition chromatography and LC-MS. *J Sep Sci* **41**:4105–4114.
- Kashani L, Esalatmanesh S, Eftekhari F, Salimi S, Foroughifar T, Etesam F, Safiaghdam H, Moazen-Zadeh E, and Akhondzadeh S (2018) Efficacy of *Crocus sativus* (saffron) in treatment of major depressive disorder associated with post-menopausal hot flashes: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gynecol Obstet* **297**:717–724.
- Kashani L, Esalatmanesh S, Saedi N, Niroomand N, Ebrahimi M, Hosseinian M, Foroughifar T, Salimi S, and Akhondzadeh S (2017) Comparison of Saffron versus Fluoxetine in Treatment of Mild to Moderate Postpartum Depression: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Pharmacopsychiatry* **50**:64–68.
- Kashani L, Raisi F, Saroukhani S, Sohrabi H, Modabbernia A, Nasehi A-A, Jamshidi A, Ashrafi M, Mansouri P, Ghaeli P, and Akhondzadeh S (2013) Saffron for treatment of fluoxetine-induced sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* **28**:54–60.
- Kashuba ADM, Bertino JS, Kearns GL, Leeder JS, James AW, Gotschall R, and Nafziger AN (1998) Quantitation of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* **63**:540–551.
- Kell G, Rao A, Beccaria G, Clayton P, Inarejos-García AM, and Prodanov M (2017) affron® a novel saffron extract (*Crocus sativus* L.) improves mood in healthy adults over 4 weeks in a double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med* **33**:58–64.

- Keller GA, Gago MLF, Diez RA, and Di Girolamo G (2017) In vivo Phenotyping Methods: Cytochrome P450 Probes with Emphasis on the Cocktail Approach. *Curr Pharm Des* **23**:2035–2049.
- Kelly DL, Conley RR, and Tamminga CA (1999) Differential olanzapine plasma concentrations by sex in a fixed-dose study. *Schizophr Res* **40**:101–104.
- Kelly DL, Richardson CM, Yu Y, and Conley RR (2006) Plasma concentrations of high-dose olanzapine in a double-blind crossover study. *Hum Psychopharmacol* **21**:393–398.
- Kianbakht S, and Ghazavi A (2011) Immunomodulatory effects of saffron: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res PTR* **25**:1801–1805.
- Kilbane AJ, Silbart LK, Manis M, Beitins IZ, and Weber WW (1990) Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin Pharmacol Ther* **47**:470–477.
- Kirby GM, Wolf CR, Neal GE, Judah DJ, Henderson CJ, Srivatanakul P, and Wild CP (1993) In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis* **14**:2613–2620.
- Klepser TB, Doucette WR, Horton MR, Buys LM, Ernst ME, Ford JK, Hoehns JD, Kautzman HA, Logemann CD, Swegle JM, Ritho M, and Klepser ME (2000) Assessment of patients' perceptions and beliefs regarding herbal therapies. *Pharmacotherapy* **20**:83–87.
- Konstantopoulos P, Doulamis IP, Tzani A, Korou M-L, Agapitos E, Vlachos IS, Pergialiotis V, Verikokos C, Mastorakos G, Katsilambros NL, and Perrea DN (2017) Metabolic effects of *Crocus sativus* and protective action against non-alcoholic fatty liver disease in diabetic rats. *Biomed Rep* **6**:513–518.
- Kooij A, Schijns M, Frederiks WM, Van Noorden CJ, and James J (1992) Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues--a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **63**:17–23.
- Koonrungsesomboon N, Khatsri R, Wongchompoo P, and Teekachunhatean S (2018) The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* **18**:760–768.
- Kostic D, White WS, and Olson JA (1995) Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr* **62**:604–610.
- Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker AL, Schaffer DD, and Josephs H (1982) The caffeine CO₂ breath test: dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* **32**:261–269.
- Koyama E, Chiba K, Tani M, and Ishizaki T (1996) Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* **278**:21–30.

- Krenitsky TA, Tuttle JV, Cattau EL, and Wang P (1974) A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol B* **49**:687–703.
- Krul C, and Hageman G (1998) Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App* **709**:27–34.
- Kukongviriyapan V, Phromsopha N, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan U, Sripa B, Hahnvajanawong V, and Bhudhisawasdi V (2006) Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* **36**:15–28.
- Kyriakoudi A, O'Callaghan YC, Galvin K, Tsimidou MZ, and O'Brien NM (2015) Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *J Agric Food Chem* **63**:8662–8668.
- Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, and Hay D (1986) The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev Pharmacol Ther* **9**:375–388.
- Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, and Potter JD (2000) Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* **21**:1157–1162.
- Landi MT, Sinha R, Lang NP, and Kadlubar FF (1999) Human cytochrome P4501A2. *IARC Sci Publ* 173–195.
- Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, and Kadlubar FF (1994) Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **3**:675–682.
- Lashay A, Sadough G, Ashrafi E, Lashay M, Movassat M, and Akhondzadeh S (2016) Short-term Outcomes of Saffron Supplementation in Patients with Age-related Macular Degeneration: A Double-blind, Placebo-controlled, Randomized Trial. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol J* **5**:32–38.
- Lautenschläger M, Sendker J, Hüwel S, Galla HJ, Brandt S, Düfer M, Riehemann K, and Hensel A (2015) Intestinal formation of trans-crocin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and in vitro permeation through intestinal and blood brain barrier. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **22**:36–44.
- Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, and Cooney RV (1997) Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* **7**:11–19.
- Le Marchand L, Hankin JH, Pierce LM, Sinha R, Nerurkar PV, Franke AA, Wilkens LR, Kolonel LN, Donlon T, Seifried A, Custer LJ, Lum-Jones A, and Chang W (2002)

- Well-done red meat, metabolic phenotypes and colorectal cancer in Hawaii. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* **506–507**:205–214.
- Le Marchand L, Sivaraman L, Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Lau AF, and Cooney RV (1996) Predictors of N-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **5**:449–455.
- Lechtenberg M, Schepmann D, Niehues M, Hellenbrand N, Wunsch B, and Hensel A (2008) Quality and functionality of saffron: quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and sigma1 (sigma-1) receptors. *Planta Med* **74**:764–772.
- Lelo A, Miners JO, Robson RA, and Birkett DJ (1986) Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br J Clin Pharmacol* **22**:183–186.
- Lelouët H, Bechtel YC, Paintaud G, Brientini MP, Miguët JP, and Bechtel PR (2001) Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *Int J Clin Pharmacol Ther* **39**:25–32.
- Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, and Leroux JP (1993) Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol* **43**:827–832.
- Leone S, Recinella L, Chiavaroli A, Orlando G, Ferrante C, Leporini L, Brunetti L, and Menghini L (2018) Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L. (Saffron) and its potential applications: A brief overview. *Phytother Res PTR* **32**:2364–2375.
- Levartovsky D, Lagziel A, Sperling O, Liberman U, Yaron M, Hosoya T, Ichida K, and Peretz H (2000) XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: a second report. *Kidney Int* **57**:2215–2220.
- Li W (2002) Botanical drugs: a future for herbal medicines. *J Contemp Health Law Policy* **19**:117–149.
- Limke KK, Shelton AR, and Elliott ES (2002) Fluvoxamine interaction with warfarin. *Ann Pharmacother* **36**:1890–1892.
- Lin JH, and Lu AY (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **35**:361–390.
- Lin JH, and Lu AY (2001) Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:535–567.
- Linardaki ZI, Orkoula MG, Kokkosis AG, Lamari FN, and Margaritis M (2013) Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L.) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **52**:163–170.
- Liu C-C, Huang C-C, Lin W-T, Hsieh C-C, Huang S-Y, Lin S-J, and Yang S-C (2005) Lycopene supplementation attenuated xanthine oxidase and myeloperoxidase

- activities in skeletal muscle tissues of rats after exhaustive exercise. *Br J Nutr* **94**:595–601.
- Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* **134**:3479S-3485S.
- Liu T-T, Liang N-S, Li Y, Yang F, Lu Y, Meng Z-Q, and Zhang L-S (2003) Effects of long-term tea polyphenols consumption on hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes and liver function in Wistar rats. *World J Gastroenterol* **9**:2742–2744.
- Liu TZ, and Qian ZY (2002) [Pharmacokinetics of crocetin in rats]. *Yao Xue Xue Bao* **37**:367–369.
- Loi CM, Parker BM, Cusack BJ, and Vestal R (1993) Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on theophylline metabolism in male nonsmokers. *Br J Clin Pharmacol* **36**:195–200.
- Lopresti AL, and Drummond PD (2017) Efficacy of curcumin, and a saffron/curcumin combination for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *J Affect Disord* **207**:188–196.
- Lopresti AL, and Drummond PD (2014) Saffron (*Crocus sativus*) for depression: a systematic review of clinical studies and examination of underlying antidepressant mechanisms of action. *Hum Psychopharmacol* **29**:517–527.
- Lopresti AL, Drummond PD, Inarejos-García AM, and Prodanov M (2018) affron®, a standardised extract from saffron (*Crocus sativus* L.) for the treatment of youth anxiety and depressive symptoms: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *J Affect Disord* **232**:349–357.
- Louisa M, Suyatna FD, Setiawati A, and Jusman SWA (2009) The effect of lycopene on the total cytochrome P450, CYP1A2 and CYP2E1. *Med J Indones* **18**:233–8.
- Magesh V, DurgaBhavani K, Senthilnathan P, Rajendran P, and Sakthisekaran D (2009) In vivo protective effect of crocetin on benzo(a)pyrene-induced lung cancer in Swiss albino mice. *Phytother Res PTR* **23**:533–539.
- Magesh V, Singh JPV, Selvendiran K, Ekambaram G, and Sakthisekaran D (2006) Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Mol Cell Biochem* **287**:127–135.
- Marazziti D, Baroni S, Picchetti M, Piccinni A, Carlini M, Vatteroni E, Falaschi V, Lombardi A, and Dell'Osso L (2013) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. *CNS Spectr* **18**:118–127.
- Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, and Lombó F (2015) Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Res Int* **2015**:905215.
- Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL, Taylor RM, Ruan Y, Wang J-S, and Chavin KD (2003) Effect of St John's Wort on Drug Metabolism by Induction of Cytochrome P450 3A4 Enzyme. *JAMA* **290**:1500–1504.

- Martínez-López S, Sarriá B, Baeza G, Mateos R, and Bravo-Clemente L (2014) Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in plasma and urine after consuming a soluble green/roasted coffee blend by healthy subjects. *Food Res Int* **64**:125–133.
- Mathew B (1977) *Crocus sativus* and its allies (Iridaceae). *Plant Syst Evol* **128**:89–103.
- Mazumder AG, Sharma P, Patial V, and Singh D (2017) Crocin Attenuates Kindling Development and Associated Cognitive Impairments in Mice via Inhibiting Reactive Oxygen Species-Mediated NF- κ B Activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **120**:426–433.
- Meibohm B, Beierle I, and Derendorf H (2002) How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet* **41**:329–342.
- Melnyk JP, Wang S, and Marccone MF (2010) Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res Int* **43**:1981–1989.
- Messina ES, Tyndale RF, and Sellers EM (1997) A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:1608–1614.
- Milajerdi A, Jazayeri S, Hashemzadeh N, Shirzadi E, Derakhshan Z, Djazayeri A, and Akhondzadeh S (2018) The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) hydroalcoholic extract on metabolic control in type 2 diabetes mellitus: A triple-blinded randomized clinical trial. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* **23**:16.
- Milajerdi A, Jazayeri S, Shirzadi E, Hashemzadeh N, Azizgol A, Djazayeri A, Esmailzadeh A, and Akhondzadeh S (2018) The effects of alcoholic extract of saffron (*Crocus sativus* L.) on mild to moderate comorbid depression-anxiety, sleep quality, and life satisfaction in type 2 diabetes mellitus: A double-blind, randomized and placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med* **41**:196–202.
- Miller TL, Willett SL, Moss ME, Miller J, and Belinka BA (1982) Binding of crocetin to plasma albumin. *J Pharm Sci* **71**:173–177.
- Mitchell KR, and Warshawsky D (2003) Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol Lett* **139**:11–23.
- Moazen-Zadeh E, Abbasi SH, Safi-Aghdam H, Shahmansouri N, Arjmandi-Beglar A, Hajhosseinn Talasaz A, Salehiomran A, Forghani S, and Akhondzadeh S (2018) Effects of Saffron on Cognition, Anxiety, and Depression in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *J Altern Complement Med N Y N* **24**:361–368.
- Modabbernia A, Sohrabi H, Nasehi A-A, Raisi F, Saroukhani S, Jamshidi A, Tabrizi M, Ashrafi M, and Akhondzadeh S (2012) Effect of saffron on fluoxetine-induced sexual impairment in men: randomized double-blind placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* **223**:381–388.
- Modaghegh M-H, Shahabian M, Esmaeili H-A, Rajbai O, and Hosseinzadeh H (2008) Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **15**:1032–1037.

- Mohamadpour AH, Ayati Z, Parizadeh M-R, Rajbai O, and Hosseinzadeh H (2013) Safety Evaluation of Crocin (a constituent of saffron) Tablets in Healthy Volunteers. *Iran J Basic Med Sci* **16**:39–46.
- Mohammadzadeh L, Hosseinzadeh H, Abnous K, and Razavi BM (2018) Neuroprotective potential of crocin against malathion-induced motor deficit and neurochemical alterations in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* **25**:4904–4914.
- Mohammadzadeh-Moghadam H, Nazari SM, Shamsa A, Kamalinejad M, Esmaeeli H, Asadpour AA, and Khajavi A (2015) Effects of a Topical Saffron (*Crocus sativus* L) Gel on Erectile Dysfunction in Diabetics: A Randomized, Parallel-Group, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Evid-Based Complement Altern Med* **20**:283–286.
- Moon YJ, Wang X, and Morris ME (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* **20**:187–210.
- Moshiri E, Basti AA, Noorbala A-A, Jamshidi A-H, Hesameddin Abbasi S, and Akhondzadeh S (2006) *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **13**:607–611.
- Mueller SC, Uehleke B, Woehling H, Petzsch M, Majcher-Peszynska J, Hehl E-M, Sievers H, Frank B, Riethling A-K, and Drewelow B (2004) Effect of St John's wort dose and preparations on the pharmacokinetics of digoxin. *Clin Pharmacol Ther* **75**:546–557.
- NAGAO A, SEKI M, and KOBAYASHI H (1999) Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**:1787–1790.
- Nagata K, Ishitobi K, Yamamoto Y, Ikeda T, Hori S, Matsumoto Y, and Sasaki T (1997) Increased theophylline metabolism in the menstrual phase of healthy women. *J Allergy Clin Immunol* **100**:39–43.
- Naghizadeh B, Mansouri MT, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, and Sarkaki A (2013) Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **20**:537–542.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, and Kuroiwa Y (1996) Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:1010–1015.
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, and Feeley M (2003) Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* **20**:1–30.
- Nebert DW, and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet Lond Engl* **360**:1155–1162.
- Nehlig A, Daval JL, and Debry G (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* **17**:139–170.

- Ng QX, Venkatanarayanan N, and Ho CYX (2017) Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *J Affect Disord* **210**:211–221.
- Nielsen KK, Flinois JP, Beaune P, and Brøsen K (1996) The biotransformation of clomipramine in vitro, identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:1659–1664.
- Noorbala AA, Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, and Jamshidi AH (2005) Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol* **97**:281–284.
- Nordmark A, Lundgren S, Cnattingius S, and Rane A (1999) Dietary caffeine as a probe agent for assessment of cytochrome P4501A2 activity in random urine samples. *Br J Clin Pharmacol* **47**:397–402.
- Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF, and Lang NP (2002a) CYP2A6 activity determined by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **11**:377–383.
- Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF, and Lang NP (2002b) CYP2A6 activity determined by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **11**:377–383.
- Nunoya K, Yokoi T, Kimura K, Inoue K, Kodama T, Funayama M, Nagashima K, Funae Y, Green C, Kinoshita M, and Kamataki T (1998) A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502). *Pharmacogenetics* **8**:239–249.
- Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M, Tuomisto J, and Pohjanvirta R (2005) Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: The case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**:43–51.
- Olson JM (1994) *Clinical pharmacology made ridiculously simple*, MedMaster.
- Orlando R, Piccoli P, De Martin S, Padrini R, Floreani M, and Palatini P (2004) Cytochrome P450 1A2 is a major determinant of lidocaine metabolism in vivo: effects of liver function. *Clin Pharmacol Ther* **75**:80–88.
- Oscarson M (2001) Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **29**:91–95.
- Ou-Yang DS, Huang SL, Wang W, Xie HG, Xu ZH, Shu Y, and Zhou HH (2000) Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. *Br J Clin Pharmacol* **49**:145–151.

- Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, and Calviello G (2004) Modulation of apoptotic signalling by carotenoids in cancer cells. *Arch Biochem Biophys* **430**:104–109.
- Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, and Lamari FN (2006) Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem* **54**:8762–8768.
- Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, and Margarity M (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav Brain Res* **219**:197–204.
- Park GJ-H, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Le Couteur DG, and Ngu MC (2003) Validity of the ¹³C-caffeine breath test as a noninvasive, quantitative test of liver function. *Hepatology* **38**:1227–1236.
- Parke DV, and Ioannides C (1981) Role of mixed-function oxidases in the formation of biological reactive intermediates. *Adv Exp Med Biol* **136 Pt A**:23–38.
- Parkin DP, Vandenplas S, Botha FJ, Vandenplas ML, Seifart HI, van Helden PD, van der Walt BJ, Donald PR, and van Jaarsveld PP (1997) Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **155**:1717–1722.
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, and Carroll KM (2004) The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:193–209.
- Pavek P, and Dvorak Z (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* **9**:129–143.
- Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, and Pasanen M (2000) CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* **144**:139–147.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, and Raunio H (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* **82**:667–715.
- Perera V, Gross AS, and McLachlan AJ (2010) Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomed Chromatogr BMC* **24**:1136–1144.
- Perera V., Gross AS, and McLachlan AJ (2012) Influence of environmental and genetic factors on CYP1A2 activity in individuals of South Asian and European ancestry. *Clin Pharmacol Ther* **92**:511–519.
- Perera Vidya, Gross AS, and McLachlan AJ (2012) Measurement of CYP1A2 activity: a focus on caffeine as a probe. *Curr Drug Metab* **13**:667–678.

- Perera V, Gross AS, Xu H, and McLachlan AJ (2011) Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *J Pharm Pharmacol* **63**:1161–1168.
- Peterson S, Schwarz Y, Li SS, Li L, King IB, Chen C, Eaton DL, Potter JD, and Lampe JW (2009) CYP1A2, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and diet effects on CYP1A2 activity in a crossover feeding trial. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **18**:3118–3125.
- Piliguian M, Zhu AZX, Zhou Q, Benowitz NL, Ahluwalia JS, Sanderson Cox L, and Tyndale RF (2014) Novel CYP2A6 variants identified in African Americans are associated with slow nicotine metabolism in vitro and in vivo. *Pharmacogenet Genomics* **24**:118–128.
- Piscitelli SC, Burstein AH, Chaitt D, Alfaro RM, and Falloon J (2000) Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet Lond Engl* **355**:547–548.
- Pitsikas N (2016) Constituents of Saffron (*Crocus sativus* L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia. *Mol Basel Switz* **21**:303.
- Pitsikas N (2015) The Effect of *Crocus sativus* L. and Its Constituents on Memory: Basic Studies and Clinical Applications. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* **2015**:926284.
- Pitsikas N, and Sakellaridis N (2006) *Crocus sativus* L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* **173**:112–115.
- Pitsikas N, and Tarantilis PA (2017) Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L., counteracted apomorphine-induced performance deficits in the novel object recognition task, but not novel object location task, in rats. *Neurosci Lett* **644**:37–42.
- Pitsikas N, and Tarantilis PA (2018) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L. crocins and their combination with memantine on recognition memory in rats. *Behav Pharmacol* **29**:400–412.
- Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, and Sakellaridis N (2007) Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res* **183**:141–146.
- Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA, Folan MM, and Condifer KA (1999) Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *J Clin Pharmacol* **39**:936–940.
- Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th Edition (n.d.).
- Rasmussen BB, and Brøsen K (1996) Determination of urinary metabolites of caffeine for the assessment of cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activity in humans. *Ther Drug Monit* **18**:254–262.
- Rasmussen BB, Nielsen TL, and Brøsen K (1998) Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro. *Pharmacol Toxicol* **83**:240–245.

- Rautio A, Kraul H, Kojo A, Salmela E, and Pelkonen O (1992) Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* **2**:227–233.
- Ravindran AV, Balneaves LG, Faulkner G, Ortiz A, McIntosh D, Morehouse RL, Ravindran L, Yatham LN, Kennedy SH, Lam RW, MacQueen GM, Milev RV, Parikh SV, and CANMAT Depression Work Group (2016) Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 5. Complementary and Alternative Medicine Treatments. *Can J Psychiatry Rev Can Psychiatr* **61**:576–587.
- Relling MV, Lin JS, Ayers GD, and Evans WE (1992) Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther* **52**:643–658.
- Renner E, Wietholtz H, Huguenin P, Arnaud MJ, and Preisig R (1984) Caffeine: a model compound for measuring liver function. *HepatoL Baltim Md* **4**:38–46.
- Reyes CM, and Cornelis MC (2018) Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and Guidelines. *Nutrients* **10**.
- Rodopoulos N, and Norman A (1996) Assessment of dimethylxanthine formation from caffeine in healthy adults: comparison between plasma and saliva concentrations and urinary excretion of metabolites. *Scand J Clin Lab Invest* **56**:259–268.
- Rodrigues-Lima F, Dairou J, and Dupret J-M (2008) Effect of environmental substances on the activity of arylamine N-acetyltransferases. *Curr Drug Metab* **9**:505–509.
- Rost KL, Brösicke H, Brockmöller J, Scheffler M, Helge H, and Roots I (1992) Increase of cytochrome P450IA2 activity by omeprazole: evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* **52**:170–180.
- Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, and Tucker GT (1996) Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* **6**:121–149.
- Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher TF, and Noll G (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet Lond Engl* **355**:548–549.
- Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ, and Colorectal Cancer Study Group (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **55**:68–76.
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, and Roots I (1999) Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* **47**:445–449.
- Sadek PC (1999) *Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual*, Wiley-Interscience, New York.

- Safarinejad MR, Shafiei N, and Safarinejad S (2011) A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Phytother Res PTR* **25**:508–516.
- Safarinejad MR, Shafiei N, and Safarinejad S (2010) An open label, randomized, fixed-dose, crossover study comparing efficacy and safety of sildenafil citrate and saffron (*Crocus sativus* Linn.) for treating erectile dysfunction in men naïve to treatment. *Int J Impot Res* **22**:240–250.
- Salomi MJ, Nair SC, and Panikkar KR (1991) Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer* **16**:67–72.
- Sánchez AM, Carmona M, Jarén-Galán M, Mosquera MIM, and Alonso GL (2011) Picrocrocin kinetics in aqueous saffron spice extracts (*Crocus sativus* L.) upon thermal treatment. *J Agric Food Chem* **59**:249–255.
- Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, and Ishizaki T (2002) A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin Pharmacol Ther* **72**:200–208.
- Saruwatari J, Takaishi C, Yoshida K, Takashima A, Fujimura Y, Umemoto Y, Abe T, Kitamado M, Shimomasuda M, Muramoto Y, and Nakagawa K (2012) A herbal-drug interaction study of keishi-bukuryo-gan, a traditional herbal preparation used for menopausal symptoms, in healthy female volunteers. *J Pharm Pharmacol* **64**:670–676.
- Saxena RB (2010) Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus sativus* series. *Ayu* **31**:374–381.
- Scheepers LEJM, Wei F-F, Stolarz-Skrzypek K, Malyutina S, Tikhonoff V, Thijs L, Salvi E, Barlassina C, Filipovský J, Casiglia E, Nikitin Y, Kawecka-Jaszcz K, Manunta P, Cusi D, Boonen A, Staessen JA, and Arts ICW (2016) Xanthine oxidase gene variants and their association with blood pressure and incident hypertension: a population study. *J Hypertens* **34**:2147–2154.
- Schliep KC, Schisterman EF, Wactawski-Wende J, Perkins NJ, Radin RG, Zarek SM, Mitchell EM, Sjaarda LA, and Mumford SL (2016) Serum caffeine and paraxanthine concentrations and menstrual cycle function: correlations with beverage intakes and associations with race, reproductive hormones, and anovulation in the BioCycle Study. *Am J Clin Nutr* **104**:155–163.
- Schröder H, and Evans DA (1972) The polymorphic acetylation of sulphapyridine in man. *J Med Genet* **9**:168–171.
- Shafiee M, Arekhi S, Omranzadeh A, and Sahebkar A (2018) Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action. *J Affect Disord* **227**:330–337.

- Shahi T, Assadpour E, and Jafari SM (2016) Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron. *Trends Food Sci Technol* **58**:69–78.
- Shahmansouri N, Farokhnia M, Abbasi S-H, Kassaian SE, Noorbala Tafti A-A, Gougol A, Yekehtaz H, Forghani S, Mahmoodian M, Saroukhani S, Arjmandi-Beglar A, and Akhondzadeh S (2014) A randomized, double-blind, clinical trial comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with fluoxetine for improving mild to moderate depression in post percutaneous coronary intervention patients. *J Affect Disord* **155**:216–222.
- Shamsa A, Hosseinzadeh H, Molaei M, Shakeri MT, and Rajabi O (2009) Evaluation of *Crocus sativus* L. (saffron) on male erectile dysfunction: a pilot study. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **16**:690–693.
- Shimada H, Eto M, Ohtaguro M, Ohtsubo M, Mizukami Y, Ide T, and Imamura Y (2010) Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein. *J Biochem Mol Toxicol* **24**:230–234.
- Shimada T, Yamazaki H, and Guengerich FP (1996) Ethnic-related differences in coumarin 7-hydroxylation activities catalyzed by cytochrome P4502A6 in liver microsomes of Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* **26**:395–403.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:414–423.
- Shirali S, Zahra Bathaie S, and Nakhjavani M (2013) Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res PTR* **27**:1042–1047.
- Sim E, Fakis G, Laurieri N, and Boukouvala S (2012) Arylamine N-acetyltransferases--from drug metabolism and pharmacogenetics to identification of novel targets for pharmacological intervention. *Adv Pharmacol San Diego Calif* **63**:169–205.
- Sim E, Lack N, Wang C-J, Long H, Westwood I, Fullam E, and Kawamura A (2008) Arylamine N-acetyltransferases: structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology* **254**:170–183.
- Sim SC, and Ingelman-Sundberg M (2010) The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics* **4**:278–281.
- Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, Levander OA, Knize MG, Lang NP, and Kadlubar FF (1994) Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Res* **54**:6154–6159.

- Sinues B, Fanlo A, Mayayo E, Carcas C, Vicente J, Arenaz I, and Cebollada A (2008) CYP2A6 activity in a healthy Spanish population: effect of age, sex, smoking, and oral contraceptives. *Hum Exp Toxicol* **27**:367–372.
- Sinués B, Sáenz MA, Lanuza J, Bernal ML, Fanlo A, Juste JL, and Mayayo E (1999) Five caffeine metabolite ratios to measure tobacco-induced CYP1A2 activity and their relationships with urinary mutagenicity and urine flow. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **8**:159–166.
- Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Bigler J, Caan B, and Leppert M (1998) NAT2, GSTM-1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* **7**:1079–1084.
- Sotaniemi EA, Rautio A, Bäckstrom M, Arvela P, and Pelkonen O (1995) CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* **39**:71–76.
- Spaldin V, Madden S, Adams DA, Edwards RJ, Davies DS, and Park BK (1995) Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity in vitro use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **23**:929–934.
- Stirpe F, Ravaioli M, Battelli MG, Musiani S, and Grazi GL (2002) Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *Am J Gastroenterol* **97**:2079–2085.
- Streetman DS, Bertino JS, and Nafziger AN (2000) Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* **10**:187–216.
- Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, and Abe K (1994) Crocin (crocetin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **271**:703–707.
- Tabeshpour J, Sobhani F, Sadjadi SA, Hosseinzadeh H, Mohajeri SA, Rajabi O, Taherzadeh Z, and Eslami S (2017) A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of saffron stigma (*Crocus sativus* L.) in mothers suffering from mild-to-moderate postpartum depression. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **36**:145–152.
- Talaei A, Hassanpour Moghadam M, Sajadi Tabassi SA, and Mohajeri SA (2015) Crocin, the main active saffron constituent, as an adjunctive treatment in major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot clinical trial. *J Affect Disord* **174**:51–56.
- Tang BK, Kadar D, and Kalow W (1987) An alternative test for acetylator phenotyping with caffeine. *Clin Pharmacol Ther* **42**:509–513.
- 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. *Clin Pharmacol Ther* **49**:648–657.

- Tang BK, Zhou Y, Kadar D, and Kalow W (1994) Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* **4**:117–124.
- Tantcheva-Poór I, Zaigler M, Rietbrock S, and Fuhr U (1999) Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test. *Pharmacogenetics* **9**:131–144.
- Tao L, Xiang Y-B, Chan KK, Wang R, Gao Y-T, Yu MC, and Yuan J-M (2012) Cytochrome P4501A2 phenotype and bladder cancer risk: The Shanghai bladder cancer study. *Int J Cancer* **130**:1174–1183.
- Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, and Manfait M (1994) Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Res* **14**:1913–1918.
- Tarantilis PA, Tsoupras G, and Polissiou M (1995) Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **699**:107–118.
- Tarantino G (2009) Could quantitative liver function tests gain wide acceptance among hepatologists? *World J Gastroenterol WJG* **15**:3457–3461.
- Tavakkol-Afshari J, Brook A, and Mousavi SH (2008) Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **46**:3443–3447.
- Taylor JA, Umbach DM, Stephens E, Castranio T, Paulson D, Robertson C, Mohler JL, and Bell DA (1998) The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction. *Cancer Res* **58**:3603–3610.
- Theophrastus (1916) *Enquiry Into Plants and Minor Works on Odours and Weather Signs*, W. Heinemann.
- Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ, and Yost GS (1996) Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *J Pharmacol Exp Ther* **276**:21–29.
- Tiong KH, Yiap BC, Tan EL, Ismail R, and Ong CE (2010) In vitro modulation of naturally occurring flavonoids on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) activity. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* **40**:458–466.
- Tsakalof A, Bairachtari K, and Georgarakis M (2003) Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **783**:425–432.
- Tsimidou M, and Tsatsaroni E (1993) Stability of Saffron Pigments in Aqueous Extracts. *J Food Sci* **58**:1073–1075.

- Tsolaki M, Karathanasi E, Lazarou I, Dovas K, Verykouki E, Karacostas A, Georgiadis K, Tsolaki A, Adam K, Kompatsiaris I, and Sinakos Z (2016) Efficacy and Safety of *Crocus sativus* L. in Patients with Mild Cognitive Impairment: One Year Single-Blind Randomized, with Parallel Groups, Clinical Trial. *J Alzheimers Dis JAD* **54**:129–133.
- Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, Kuranari M, Miyakawa I, and Nakano S (2001) The effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activities in humans. *Clin Pharmacol Ther* **70**:121–125.
- Tucker GT, Rostami-Hodjegan A, and Jackson PR (1998) Determination of drug-metabolizing enzyme activity in vivo: pharmacokinetic and statistical issues. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* **28**:1255–1273.
- Uchida S, Yamada H, Li XD, Maruyama S, Ohmori Y, Oki T, Watanabe H, Umegaki K, Ohashi K, and Yamada S (2006) Effects of Ginkgo biloba extract on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and midazolam in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **46**:1290–1298.
- Umigai N, Murakami K, Ulit MV, Antonio LS, Shirotori M, Morikawa H, and Nakano T (2011) The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **18**:575–578.
- Vahdati Hassani F, Naseri V, Razavi BM, Mehri S, Abnous K, and Hosseinzadeh H (2014) Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci* **22**:16.
- van Harten J (1995) Overview of the pharmacokinetics of fluvoxamine. *Clin Pharmacokinet* **29 Suppl 1**:1–9.
- Venkatakrishnan K, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, and Shader RI (1998) Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP 2C19 and 3A4. *J Clin Pharmacol* **38**:112–121.
- Vistisen K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, and Poulsen HE (2004) Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis* **25**:923–929.
- Vistisen K, Poulsen HE, and Loft S (1992) Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* **13**:1561–1568.
- Volak LP, Hanley MJ, Masse G, Hazarika S, Harmatz JS, Badmaev V, Majeed M, Greenblatt DJ, and Court MH (2013) Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **75**:450–462.
- von Richter O, Pitarque M, Rodríguez-Antona C, Testa A, Mantovani R, Oscarson M, and Ingelman-Sundberg M (2004) Polymorphic NF-Y dependent regulation of human nicotine C-oxidase (CYP2A6). *Pharmacogenetics* **14**:369–379.

- Voutsinas J, Wilkens LR, Franke A, Vogt TM, Yokochi LA, Decker R, and 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**:416–422.
- Wahländer A, and Paumgartner G (1989) Effect of ketoconazole and terbinafine on the pharmacokinetics of caffeine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **37**:279–283.
- Wang CJ, Hsu JD, and Lin JK (1991) Suppression of aflatoxin B1-induced hepatotoxic lesions by crocetin (a natural carotenoid). *Carcinogenesis* **12**:1807–1810.
- Wang H, and Leung LK (2010) The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* **26**:1181–1187.
- Wang JS, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, and Kivistö KT (2000) Involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in lidocaine N-deethylation and 3-hydroxylation in humans. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **28**:959–965.
- Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, and Hall SD (2001) The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* **70**:317–326.
- Wanwimolruk S, and Prachayasittikul V (2014) Cytochrome P450 enzyme mediated herbal drug interactions (Part 1). *EXCLI J* **13**:347–391.
- Watkins PB (1994) Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* **4**:171–184.
- Weisburger JH, Dolan L, and Pittman B (1998) Inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein. *Mutat Res* **416**:125–128.
- Wenk M, Todesco L, and Krähenbühl S (2004) Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *Br J Clin Pharmacol* **57**:495–499.
- Wietholtz H, Zysset T, Kreiten K, Kohl D, Büchsel R, and Matern S (1989) Effect of phenytoin, carbamazepine, and valproic acid on caffeine metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* **36**:401–406.
- Wietholtz H, Zysset T, Marschall HU, Generet K, and Matern S (1995) The influence of rifampin treatment on caffeine clearance in healthy man. *J Hepatol* **22**:78–81.
- Wikoff D, Welsh BT, Henderson R, Brorby GP, Britt J, Myers E, Goldberger J, Lieberman HR, O'Brien C, Peck J, Tenenbein M, Weaver C, Harvey S, Urban J, and Doepker C (2017) Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **109**:585–648.
- Williamson EM (2003) Drug interactions between herbal and prescription medicines. *Drug Saf* **26**:1075–1092.

- Williamson EM (2001) Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **8**:401–409.
- Woolridge H, Williams J, Cronin A, Evans N, and Steventon GB (2004) CYP1A2 in a smoking and a non-smoking population; correlation of urinary and salivary phenotypic ratios. *Drug Metabol Drug Interact* **20**:247–261.
- Wu J-C, Lai C-S, Tsai M-L, Ho C-T, Wang Y-J, and Pan M-H (2017) Chemopreventive effect of natural dietary compounds on xenobiotic-induced toxicity. *J Food Drug Anal* **25**:176–186.
- Xi L, Qian Z, Du P, and Fu J (2007) Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* **14**:633–636.
- Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP, and Shimada T (1998) Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol* **11**:659–665.
- Yang L, Li Y, Hong H, Chang C-W, Guo L-W, Lyn-Cook B, Shi L, and Ning B (2012) Sex Differences in the Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. *J Drug Metab Toxicol* **3**:1000119.
- Yang X, Chen X, Fu Y, Luo Q, Du L, Qiu H, Qiu T, Zhang L, and Meng H (2018) Comparative efficacy and safety of *Crocus sativus* L. for treating mild to moderate major depressive disorder in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neuropsychiatr Dis Treat* **14**:1297–1305.
- Yaribeygi H, Zare V, Butler AE, Barreto GE, and Sahebkar A (2019) Antidiabetic potential of saffron and its active constituents. *J Cell Physiol* **234**:8610–8617.
- Yi S, Cho J-Y, Lim KS, Kim K, Kim J, Kim B-H, Hong J, Jang I-J, Shin S-G, and Yu K-S (2009) Effects of *Angelicae tenuissima radix*, *Angelicae dahuricae radix* and *Scutellariae radix* extracts on cytochrome P450 activities in healthy volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **105**:249–256.
- Yoshimoto K, Echizen H, Chiba K, Tani M, and Ishizaki T (1995) Identification of human CYP isoforms involved in the metabolism of propranolol enantiomers--N-desisopropylation is mediated mainly by CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* **39**:421–431.
- Yuan J-M, Chan KK, Coetzee GA, Castelao JE, Watson MA, Bell DA, Wang R, and Yu MC (2008) Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* **29**:1386–1393.
- Zabela V, Sampath C, Oufir M, Moradi-Afrapoli F, Butterweck V, and Hamburger M (2016) Pharmacokinetics of dietary kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenylacetic acid in rats. *Fitoterapia* **115**:189–197.
- Zaigler M, Tantcheva-Poór I, and Fuhr U (2000) Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**:1–9.

- Zeman MV, Hiraki L, and Sellers EM (2002) Gender differences in tobacco smoking: higher relative exposure to smoke than nicotine in women. *J Womens Health Gen Based Med* **11**:147–153.
- Zhang J, Onakpoya IJ, Posadzki P, and Eddouks M (2015) The safety of herbal medicine: from prejudice to evidence. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* **2015**:316706.
- Zhang Y, Fei F, Zhen L, Zhu X, Wang J, Li S, Geng J, Sun R, Yu X, Chen T, Feng S, Wang P, Yang N, Zhu Y, Huang J, Zhao Y, Aa J, and Wang G (2017) Sensitive analysis and simultaneous assessment of pharmacokinetic properties of crocin and crocetin after oral administration in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1044–1045**:1–7.
- Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, and Paxton JW (2003) Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab Rev* **35**:35–98.