

Η επίδραση του εκχυλίσματος του κρόκου στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε πειραματικό ζωικό πρότυπο*

Ε. Χριστοδούλου¹
Ν. Καδόγλου^{2,3}
Ν. Κωστομητσόπουλος²
Π. Μουστάδας²
Β. Μπαλάφας²
Α. Κωστάκης²
Γ. Βαλσαμή¹
Χ. Λιάπης²

Περίληψη

Σκοπός: Ο κρόκος είναι φυτικό προϊόν με πιθανές αντιαθηρωματικές δράσεις. Στην παρούσα μελέτη έγινε εκτίμηση των επιδράσεων του εκχυλίσματος του κρόκου στην εξέλιξη και σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε μυσ με γονιδιακή έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (Apo-E/-).

Μέθοδοι: 24 αρσενικοί μύες Apo-E/- έλαβαν αθηρογόνο και διαβητογόνο τροφή δυτικού τύπου για 12 εβδομάδες και στη συνέχεια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: στην πρώτη χορηγήθηκαν 60 mg/kg εκχύλισμα του κρόκου (crocus group – CRG, N=12) και στη δεύτερη χορηγήθηκε ισοδύναμος όγκος φυσιολογικού ορού (control group – COG, N=12) για 4 εβδομάδες. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, οι μύες υπεβλήθησαν σε δοκιμασία ανοχής γλυκόζης και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε αιμοληψία για τον προσδιορισμό του προφίλ λιπιδίων και γλυκόζης. Ακολούθησε ευθανασία των μυών και συνελέγησαν δείγματα μυοκαρδίου και αορτής για ιστολογική ανάλυση. Σε κάθε αορτική βαλβίδα υπολογίστηκε η μέση επιφάνεια αθηρωματικών αλλοιώσεων, η περιεκτικότητά τους σε ελαστίνη και κολλαγόνο, το πάχος της ινώδους κάψας και ο αριθμός των ρήξεων της έσω ελαστικής στιβάδας (IEL).

Αποτελέσματα: Η μέση επιφάνεια των αθηρωματικών αλλοιώσεων στην ομάδα που έλαβε εκχύλισμα κρόκου (CRG) έτεινε να είναι μικρότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($559.81 \pm 112.01 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs $732.12 \pm 105.71 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $p=0.066$). Η συγκέντρωση της γλυκόζης καθώς και η ανοχή σε αυτή υπήρξε σημαντικά βελτιωμένη στην ομάδα CRG σε σχέση με την COG ($p=0.038$ και $p=0.041$, αντίστοιχα), ενώ παράλληλα το σωματικό βάρος και το λιπιδαιμικό προφίλ δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη διαφοροποίηση ($p>0.05$). Το πιο σημαντικό εύρημα ήταν η βελτίωση της σταθερότητας των αθηρωματικών πλακών στην ομάδα που έλαβε το εκχύλισμα κρόκου. Συγκεκριμένα, οι αθηρωματικές πλάκες των μυών της ομάδας CRG χαρακτηρίζονταν από αυξημένη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο ($p<0.001$) και ελαστίνη ($p<0.001$), παχύτερη ινώδη κάψα ($p=0.023$) και μειωμένο αριθμό ρήξεων της IEL ανά mm της περιφέρειας της αορτικής βαλβίδας ($p<0.001$) σε σχέση με την ομάδα COG.

¹ Τμήμα Φαρμακευτικής,
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-
Φαρμακοκινητικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

² Κέντρο Πειραματικής
Χειρουργικής,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών
Ερευνών της Ακαδημίας
Αθηνών

³ Τμήμα Αγγειοχειρουργικής,
Νοσοκομείο «Αττικόν»,
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

* Βραβεύτηκε στο 27ο Ετήσιο Συνέδριο της ΔΕΒΕ (2013).

Συμπεράσματα: Το εκχύλισμα του κρόκου μειώνει οριακά, μη σημαντικά το μέγεθος των αθηρωματικών πλακών σε μυς Apo-E^{-/-}. Μπορεί όμως να αυξήσει αξιοσημείωτα τη σταθερότητά τους και μάλιστα η δράση αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τη ρύθμιση των κλασικών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου.

Εισαγωγή

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί χρόνια αρτηριακή δυσλειτουργία που οφείλεται στη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών και φλεγμονωδών παραγόντων στο τοίχωμα των αρτηριών. Η νόσος αυτή καθώς και οι επιπλοκές που προκαλεί αποτελούν τη βασικότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως¹. Αρκετές φαρμακευτικές ουσίες, όπως οι στατίνες και οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου, έχουν προταθεί ως πρώτη ή δεύτερη γραμμή πρόληψης των καρδιαγγειακών νοσημάτων που συνδέονται με την αθηροσκλήρωση. Στις μέρες μας, ολοένα και περισσότερα στοιχεία που προέρχονται από μελέτες υποδεικνύουν τη χρήση φυτικών προϊόντων, παράγωγα ή συστατικά φυτών, ως ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο πρόληψης και αντιμετώπισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και μεταβολικών δυσλειτουργιών³. Παρά τον μεγάλο αριθμό των *in vitro* μελετών, έχουν παρουσιαστεί ελάχιστα δεδομένα γύρω από την αντιαθηρωματική δράση φυτικών προϊόντων σε *in vivo* πειραματικά πρότυπα.

Ανάμεσα στα υποψήφια θεραπευτικά φυτικά προϊόντα συγκαταλέγεται ο κρόκος (*Crocus sativus* L. – οικογένεια *Iridaceae*). Πρόκειται για ένα πολυετές ποώδες φυτό που καλλιεργείται κυρίως στη χώρα μας, ιδιαίτερα στην περιοχή της Κοζάνης, καθώς επίσης σε Ιράν και Ινδία⁴. Τα συστατικά του φυτού που θεωρούνται φαρμακολογικώς δραστικά είναι πτητικές ουσίες (π.χ. saffron – σαφρανάλη), πικρά συστατικά (π.χ. πικροκροκίνη) και χρωστικές (π.χ. κροκετίνη και κροκίνη)⁵. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα από τα δραστικά συστατικά του εκχυλίσματος του κρόκου έχουν αντικαταθλιπτική⁶, αντιφλεγμονώδη⁷, αντικαρκινική^{8,9} και αντισπασμωδική¹⁰ δράση σε ζωικά πρότυπα χοίρων. Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες υποστηρίζουν την αντιδιαβητική δράση και την ικανότητα του saffron να ενεργοποιεί την έκκριση ινσουλίνης μέσω ενός αγγειοπροστατευτικού μηχανισμού^{11,12}.

Παρά τις παραπάνω πολλά υποσχόμενες ιδιό-

τητες και δράσεις του κρόκου, δεν έχει προηγηθεί μελέτη της επίδρασής του στην ανάπτυξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης *in vivo*. Για τον λόγο αυτό, η μελέτη μας στοχεύει στην εκτίμηση της έκτασης και μορφολογίας των αθηρωματικών πλακών σε ζωικό πρότυπο μετά από τη χορήγηση εκχυλίσματος κρόκου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Είκοσι τέσσερις (24) αρσενικοί μύες με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E (apo-E^{-/-} C57BL/6J background), ηλικίας 8 εβδομάδων, βάρους 20-25 g έλαβαν δυτικού τύπου αθηρογόνο και διαβητογόνο τροφή (Harlan, Teklad; 88137) για 12 εβδομάδες με σκοπό την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών και σακχαρώδους διαβήτη. Στη συνέχεια, η διατροφή παρέμεινε η ίδια και όλοι οι μύες χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ισοδύναμες ομάδες (N=12) για 4 εβδομάδες.

Ομάδα saffron (crocus group – CRG): Χορηγήθηκε εκχύλισμα κρόκου (η παρασκευή του εκχυλίσματος περιγράφεται παρακάτω) μέσω δι-οισοφάγειου καθετήρα σε δόση 60 mg/kg βάρους την ημέρα. Βασιζόμενοι στο βάρος του κάθε μύος ο μέσος χορηγούμενος όγκος καθορίστηκε στα 200 μ L ημερησίως.

Ομάδα ελέγχου (Control Group – COG): Χορηγήθηκε μέσω δι-οισοφάγειου καθετήρα φυσιολογικός ορός σε όγκο ισοδύναμο με εκείνο της ομάδας saffron.

Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, συνελέγησαν δείγματα αίματος (μετά από ολονύχτια νηστεία) μέσω παρακέντησης του γαστροκνήμιου μύος, έπειτα από αναισθητοποίηση του ζώου με ισοφλουράνιο. Στο τέλος της μελέτης συνελέγησαν επίσης δείγματα αίματος και μετρήθηκαν σάκχαρο νηστείας, τριγλυκερίδια και επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα. Ακολούθως όλοι οι μύες θυσιάστηκαν υπό βαθιά αναισθησία μετά από ζύγιση.

Το πρωτόκολλο της μελέτης έλαβε έγκριση από τις τοπικές αρχές υπεύθυνες για θέματα ηθικής και δεοντολογίας και υλοποιήθηκε στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Τα πειραματόζωα παρέμεναν σε περιβάλλον διαδοχι-

κού 12ώρου φωτός και 12ώρου συσκότισης και σε σταθερή θερμοκρασία 21°C. Σε κάθε κλωβό βρέσκονταν 5 μύες σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες για την ορθή μεταχείριση και χρήση των πειραματοζώων.

Παρασκευή του εκχυλίσματος

Τα στίγματα του φυτού *Crocus sativus L.* ήταν ευγενική χορηγία του Αναγκαστικού Συνεταιρισμού Κροκοπααραγωγών Κοζάνης. Η διαδικασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υπερκίθου νερού βαθμού HPLC. Ζυγίστηκε 1 g στίγματα κρόκου και προστέθηκαν στη φιάλη 37,5 mL νερού βαθμού καθαρότητας HPLC. Το μείγμα αφέθηκε υπό ψύξη για 72 ώρες έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η εκχύλιση. Η χαμηλή θερμοκρασία εξασφάλισε την αποφυγή ανάπτυξης μυκήτων. Μετά το πέρας της διαδικασίας εκχύλισης, το μείγμα διηθήθηκε και το υγρό εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό χαμηλή πίεση. Η φιάλη με το ξηρό εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για τουλάχιστον 24 ώρες. Η προζυγισμένη φιάλη που περιείχε το τελικό ξηρό εκχύλισμα ζυγίστηκε έτσι ώστε να υπολογιστεί το καθαρό βάρος του στερεού. Βρέθηκε ότι 1 g σιγμάτων *Crocus sativus* αποδίδει 800-850 mg ξηρού εκχυλίσματος (απόδοση 80-85%). Για τους σκοπούς του πειράματος το ξηρό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε μεμονωμένα φιαλίδια, καθένα από τα οποία περιείχε 27 mg ξηρού εκχυλίσματος, του οποίου η ανασύσταση για τη διαδικασία της χορήγησης πραγματοποιήθηκε με 3 mL ενέσιμου ύδατος (water for injection).

Test ανοχής στη γλυκόζη (Glucose Tolerance Test-GTT)

Μία εβδομάδα πριν την ευθανασία, 4-5 μύες ανά ομάδα υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη. Συγκεκριμένα, μετά από ολονύχτια νηστεία, οι μύες αναισθητοποιήθηκαν και χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση γλυκόζη (D-glucose 50% wt/vol solution), με τη χρήση βελόνας 27G και σε δόση 2 g/kg σωματικού βάρους. Μετά την έγχυση γλυκόζης δείγματα αίματος συνελέγησαν σε χρόνους 0, 30, 60, 90 και 120 min με τη μέθοδο της σταγόνας. Τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μετρήθηκαν στις προαναφερθείσες χρονικές στιγμές (Accu-Chek Advantage Glucose Monitors,

Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) και υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) με τη χρήση της μεθόδου του τραπεζίου¹³.

Ιστομορφομετρική ανάλυση

Τομές με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H&E) χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρικές μετρήσεις. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν 3 διαδοχικές τομές ανά μυ, πάχους 7 μm, στο επίπεδο της αορτικής βαλβίδας και ακολούθησε χρώση με H&E με σκοπό την ποσοτική ιστομορφομετρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της έκτασης και συσσώρευσης των αθηρωματικών πλακών και εφαρμόζεται στο εργαστήριό μας με αξιόπιστα αποτελέσματα¹⁴. Η έκταση των αθηρωματικών πλακών και η ολική επιφάνεια του αυλού του αγγείου (total lumen area – μm²) που περιγράφεται από την έσω ελαστική στιβάδα (internal elastic lamina – IEL) υπολογίστηκαν για κάθε τομή με τη χρήση ειδικού λογισμικού επεξεργασίας εικόνων (Image Pro Plus Version 4.1; Media Cybernetics). Συγκεκριμένα, η επιφάνεια της αθηρωματικής πλάκας υπολογίστηκε αφαιρώντας το υγιές (μη αθηρωματικό) τμήμα του αγγείου από τη συνολική έκταση του αυλού του αγγείου. Ο λόγος της συνολικής επιφάνειας των αθηρωματικών πλακών προς την ολική επιφάνεια του αυλού παρέχει το ποσοστό της αγγειακής στένωσης σε κάθε τομή. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος της έκτασης των αθηρωματικών πλακών και της αγγειακής στένωσης από όλες τις τομές με χρώση H&E ανά μυ. Οι μέσες (±SD) τιμές από όλους τους μύς της κάθε ομάδας χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση.

Μετρήσεις κολλαγόνου, ελαστίνης και λιπιδίων

Όμοια με τη χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης, 6 τομές ανά δείγμα (7 μm) πέρασαν τη διαδικασία της χρώσης με Sirius red και orcein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany), με σκοπό τη μέτρηση της κατανομής κολλαγόνου και ελαστίνης, αντίστοιχα, στις τομές της αορτικής βαλβίδας. Για τη συγκριτική αξιολόγηση της κατανομής των δύο παραπάνω εξωκυττάρων στοιχείων υπήρξε χρώση σειριακών τομών για την ανάδειξη της εντόπισής τους. Η συγκέντρωση τόσο του κολλαγόνου όσο και της ελαστίνης σε κάθε αθηρωματική πλάκα εκ-

φράστηκαν ως εκατοστιαία αναλογία της επιφάνειας της αθηρωματικής πλάκας με θετική χρώση σε σχέση με τη συνολική της επιφάνεια. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των παραπάνω εκατοστιαίων αναλογιών ξεχωριστά σε κάθε τομή, για κάθε μν και για κάθε ομάδα. Επιπλέον, μετά τη χρώση με Sirius red, μετρήθηκε το πάχος της ινώδους κάψας κάθε αθηρωματικής πλάκας και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των ελάχιστων τιμών από όλες τις αθηρωματικές πλάκες ανά μν. Στις τομές με χρώση ορσεΐνης, προσδιορίστηκε ο αριθμός των ρήξεων (π.χ. ασυνέχειες) της IEL του αγγείου.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη χρήση του μέσου όρου \pm την τυπική απόκλιση. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος t-test για τη σύγκριση στο τέλος της μελέτης σε ό,τι αφορούσε τις τιμές σωματικού βάρους, τις τιμές του σακχάρου και τα επίπεδα των λιπιδίων. Με τη χρήση του κανόνα του τραπεζίου προσδιορίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) για την ανοχή στη γλυκόζη. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού SPSS (version 16:0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

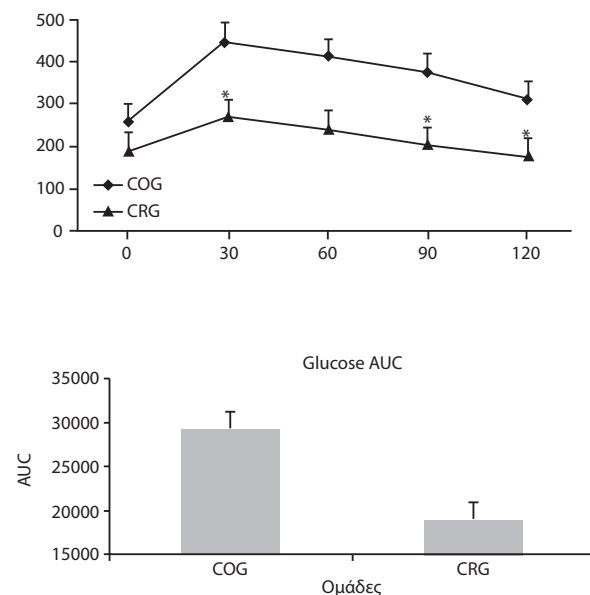
Σωματικό βάρος, βιοχημικές παράμετροι και GTT

Αρχικά, οι υπό μελέτη ομάδες μυνών δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά στο σωματικό βάρος καθώς και στα επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων στο αίμα. Το σωματικό βάρος αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0.001$) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο ομάδες. Παρόλα αυτά, η τελική τιμή σωματικού βάρους μετά το πέρας της πειραματικής διεργασίας δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p > 0.05$). Ομοίως, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$) στις τιμές ολικής χοληστερόλης πλάσματος ή της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων. Τόσο η γλυκόζη νηστείας, όσο και η κατανομή της γλυκόζης κατά τη διάρκεια του GTT υπήρξε βελτιωμένη στην ομάδα CRG συγκριτικά με την COG ($p = 0.041$). Τα παραπάνω δεδομένα συνοψίζονται στον πίνακα 1 και στο σχήμα 1.

Πίνακας 1. Σωματικό βάρος και επίπεδα λιπιδίων και γλυκόζης νηστείας στην ομάδα που έλαβε εκχύλισμα κρόκου (CRG) και στην ομάδα που έλαβε φυσιολογικό ορό (COG).

	Ομάδα κρόκου (N=12)	Ομάδα ελέγχου (N=12)	p
Βάρος	32.7 \pm 6.12	33.1 \pm 4.34	0.765
Γλυκόζη	208.1 \pm 20.17	266 \pm 28.52	0.038
Τριγλυκερίδια	107.3 \pm 18.4	99.8 \pm 16.9	0.855
Ολική χοληστερόλη	633.8 \pm 43.1	669.2 \pm 45.1	0.531

* $p < 0.05$, σύγκριση μεταξύ ομάδων, AUC, περιοχή κάτω από την καμπύλη.



Σχήμα 1. Αποτελέσματα δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης στην ομάδα του κρόκου (CRG) και στην ομάδα ελέγχου (COG).

Μορφομετρική ανάλυση των αθηρωματικών πλακών

Όλες οι τομές που πραγματοποιήθηκαν στον μικροτόμο πέρασαν από τη διαδικασία χρώσης με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E) και ακολούθησε παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ελήφθησαν οι κατάλληλες φωτογραφίες και υπολογίστηκε η έκταση των αθηρωματικών πλακών σε όλα τα πειραματόζωα και των 2 ομάδων. Στον πίνακα 2 καταγράφονται τα ιστομορφολογικά δεδομένα. Στο τέλος της μελέ-

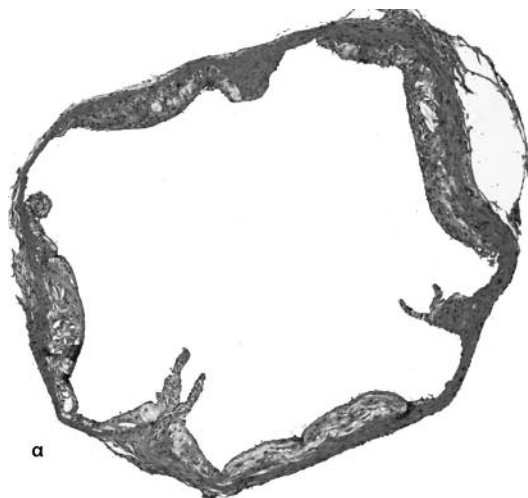
Πίνακας 2. Ιστοχημική ανάλυση των αθηρωματικών αλλοιώσεων στις ομάδες του κρόκου και ελέγχου στο τέλος της μελέτης. Η ποσοτική ανάλυση εκφράζεται ως εκατοστιαία αναλογία της επιφάνειας των αθηρωματικών αλλοιώσεων με θετική χρώση σε σχέση με τη συνολική τους επιφάνεια.

Μεταβλητές	Ομάδα κρόκου (N=12)	Ομάδα ελέγχου (N=12)	p
Επιφάνεια πλακών	559.81±112.01	732.12±105.71	0.066
Αγγειακή στένωση (%)	25.44±6.63	38.21±7.98	0.058
Ρήξεις IEL ανά mm περιφέρειας αορτής	0.5±0.12	1.1 ± 0.13	<0.001
Πάχος ινώδους κάψας (μm)	2.88±0.92	1.28±0.48	0.023
Ελασίνη (%)	28.1±4.96	16.1±5.54	<0.001
Κολλαγόνο (%)	33.54±6.89	20.8±5.11	<0.001

της, η ομάδα των μυών στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα του κρόκου είχε χαμηλότερο ποσοστό αγγειακής στένωσης (25.44±6.63%) από την ομάδα των μυών που δεν έλαβε το εκχύλισμα (38.21±7.98%, p=0.058). Παρόλα αυτά η παραπάνω διαφορά πλησίαζε τα όρια στατιστικής σημαντικότητας (Εικ. 1).

Ιστολογική ανάλυση της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας

Η χρώση Sirius red (ανίχνευση κολλαγόνου) στα δείγματα που ελήφθησαν από την αορτική βαλβίδα των μυών της ομάδας που έλαβε κρόκο έδειξε στατιστικά σημαντικά αυξημένη περιεκτικότητα των αθηρωματικών αλλοιώσεων σε κολλαγόνο από αυτή των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου (p<0.001). Επιπλέον, οι μύες που έλαβαν κρόκο εί-



α



β

Εικόνα 1. α. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός που έλαβε αγωγή με κρόκο (Χρώση H&E – αριστερά). β. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός της ομάδας ελέγχου (Χρώση H&E – δεξιά).

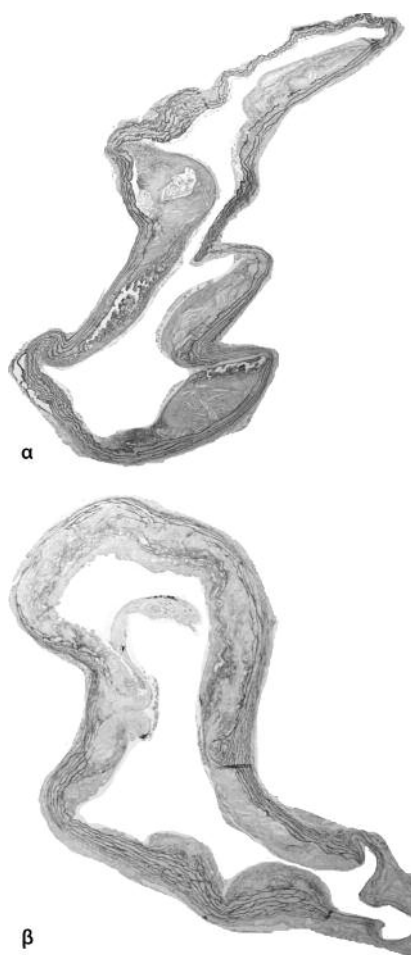


α



β

Εικόνα 2. α. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός που έλαβε χορήγηση κρόκου (Χρώση Sirius Red – αριστερά). β. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός της ομάδας ελέγχου (Χρώση Sirius Red – δεξιά).



Εικόνα 3. α. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός που έλαβε χορήγηση κρόκου (Χρώση Orcein – αριστερά). β. Τομή αορτικής βαλβίδας μνός της ομάδας ελέγχου (Χρώση Orcein – δεξιά).

χαν πολύ αυξημένο πάχος ινώδους κάψας στις αθηρωματικές πλάκες σε σχέση με την ομάδα CO ($p=0.023$). Παράλληλα, η ποσοτική ανάλυση έδειξε αυξημένη επιφάνεια στις αθηρωματικές πλάκες θετικές για χρώση με ελαστίνη (χρώση με ορσεΐνη) στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία ($p<0.001$) (Πίν. 2). Πέρα από αυτά τα στοιχεία, η εξέλιξη της αθηρωμάτωσης κατέληξε σε πολλαπλές ρήξεις της IEL, κυρίως στα σημεία κάτω από την αθηρωματική πλάκα (Εικ. 2 & 3).

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση κρόκου, για 4 εβδομάδες, σε μυσ Apo-E/- που έχουν ήδη λάβει αθηρογόνο-διαβητογόνο τροφή, έτεινε να

μειώσει την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών στην αορτική βαλβίδα. Η δράση αυτή συνδυάστηκε με ευεργετικά αποτελέσματα στη σύσταση του αθηρώματος, με παράλληλη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου. Από την άλλη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο λιπιδαιμικό προφίλ και το σωματικό βάρος.

Με βάση τα ως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, πρόκειται για την πρώτη μελέτη γύρω από τις μακροπρόθεσμες δράσεις του φυτού *Crocus sativus* στην ανάπτυξη και την υφή των αθηρωματικών πλακών σε έγκυρο ζωικό πρότυπο αθηρωμάτωσης. Μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας παρουσιάστηκε τάση μείωσης της αθηρωμάτωσης στους μυσ Apo-E/-, παρά την απουσία αλλαγών στο λιπιδαιμικό προφίλ του αίματος και στο σωματικό βάρος. Πρόκειται για σημαντικό εύρημα και η κλινική του επιβεβαίωση αναμένεται. Εντούτοις είναι εξίσου σημαντικό να αναφερθεί ότι, ενώ η διαδικασία αθηρογένεσης παρουσιάζει πολλές ομοιότητες μεταξύ ανθρώπων και Apo-E/- μυών, η αναγωγή των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο, όσον αφορά τις αλλαγές στην έκταση της αθηρωμάτωσης στο ζωικό πρότυπο, πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Αναζητώντας τους υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς είναι πιθανόν ο κρόκος με βάση της *in vitro* ιδιότητές του να επηρεάζει τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και τη διαταραχή ισορροπίας της εξωκυττάριας ουσίας, οι οποίοι αποτελούν δομικούς παράγοντες αθηρωμάτωσης. Δυστυχώς, η παρούσα μελέτη είναι πιλοτική και επικεντρώθηκε κυρίως στη βελτιστοποίηση των μεθόδων προετοιμασίας του εκχυλίσματος και στην ανίχνευση πιθανών δράσεων στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και όχι στους υποκείμενους μηχανισμούς της νόσου. Μελλοντικές κλινικές μελέτες θα δώσουν ευρύτερη εικόνα και μεγαλύτερη γνώση για τη χορήγηση του κρόκου και την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αθηρωματικές πλάκες των μυών Apo-E/- (φαινότυπος) παρουσιάζουν παρόμοια, με τον άνθρωπο, στοιχεία που συνηγορούν στην εξέλιξη και αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών αλλοιώσεων¹⁵. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει επίσης το γεγονός ότι οι μύες που έλαβαν θεραπεία με το εκχύλισμα του κρόκου ανέπτυξαν πολύ πιο σταθερό φαινότυπο

αθηρωμάτωσης, γεγονός που αποδεικνύεται από την αυξημένη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και ελαστίνη σε συνδυασμό με το αυξημένο πάχος της ινώδους κάψας. Παρά το γεγονός ότι ο βαθμός στένωσης του αρτηριακού αυλού παραμένει το βασικό κριτήριο της επεμβατικής επαναϊμάτωσης των αθηρωματικών αγγείων, ολοένα και περισσότερο στοιχεία αναδεικνύουν τη σημασία της σταθεροποίησης των αθηρωματικών πλακών¹⁶. Πολυάριθμες μελέτες έχουν καταγράψει τη συσχέτιση μεταξύ σταθερού φαινοτύπου αθηρωματικών πλακών και χαμηλού ποσοστού εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων¹⁷. Επιπρόσθετα, η βελτίωση της σύστασης της αθηρωματικής πλάκας έναντι της υποστρώφης της προτείνεται πλέον ως περισσότερο αποτελεσματική μετά από φαρμακευτικές παρεμβάσεις. Με βάση την τελευταία υπόθεση πολλοί ερευνητές ερμηνεύουν τα δυσανάλογα μεγάλα οφέλη της επιθετικής θεραπείας με στατίνες σε ασθενείς με στεφανιαία και καρωτιδική αθηρωμάτωση, όταν μάλιστα η μεταβολή στην έκταση της αθηρωμάτωσης είναι ασήμαντη^{18,19}. Για τους λόγους αυτούς, οι ερευνητές αποδίδουν τα καρδιαγγειακά οφέλη της σταθεροποίησης των αθηρωματικών πλακών σε μια πληθώρα «πλειοτροπικών» δράσεων των φαρμακευτικών ουσιών που δεν σχετίζονται μόνο με τη συσσώρευση λιπιδίων. Στη μελέτη μας, τα αποτελέσματα που καταγράφησαν ήταν ανεξάρτητα από τα λιπίδια και τις αλλαγές στο σωματικό βάρος.

Σε συνδυασμό με προηγούμενη μελέτη, η χορήγηση του εκχυλίσματος κρόκου συνέβαλε σε σημαντική βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης¹¹. Παρά την απουσία άμεσης συσχέτισης μεταξύ της μείωσης των επιπέδων γλυκόζης και της σταθεροποίησης των αθηρωματικών πλακών στην παρούσα μελέτη, το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει έναν σοβαρό αγγειοπροστατευτικό μηχανισμό. Περαιτέρω μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της τροποποίησης διαφόρων μεταβολικών παραγόντων σε συνδυασμό με τυχόν αλλαγές στη σύσταση της αθηρωματικής πλάκας μετά από χορήγηση κρόκου κρίνονται αναγκαίες και μπορεί να συμβάλουν στη μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Η παρούσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς. Αν και οι μύες Apo-E-/- που σιτίζονται με

αθηρογόνο τροφή αποτελούν αξιόπιστο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της αθηρωμάτωσης, δεν παρατηρείται συχνά ρήξη της αθηρωματικής πλάκας κατ'αντιστοιχία με τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, οι αθηρωματικές πλάκες που εμφανίζονται στους μύς προσομοιάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό στη μορφολογία αυτών του ανθρώπου. Τέλος, στη μελέτη μας δεν εκτιμήθηκε η επίδραση του κρόκου σε υποκείμενους μηχανισμούς για την αθηρωμάτωση, γεγονός που θα παρείχε σημαντική γνώση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν την ευεργετική δράση της μακροχρόνιας χορήγησης κρόκου στην εξέλιξη και κυρίως στη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών σε μύς Apo-E-/. Αναμένεται η περαιτέρω ανάλυση των υποκείμενων μηχανισμών και κυρίως η κλινική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών σε ασθενείς με χρόνια αθηροσκλήρωση.

Abstract

Christodoulou E, Kadoglou NPE, Kostomitsopoulos N, Moustardas P, Balafas V, Kostakis A, Valsami G, Liapis CD. The impact of Saffron administration on atherosclerosis development in an experimental animal model. *Hellenic Diabetol Chron* 2013; 4: 253-261.

Aim: Saffron constitutes a herbal derivative with potential anti-atherosclerotic properties. In the present study we assessed the effects of saffron on the development and stability of atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein-E deficient (Apo-E-/-) mice.

Methods: 24 male Apo-E-/- mice were fed western-type diabetogenic diet for 12 weeks and then they were randomized to receive either saffron 60 mg/kg (saffron group – SFG, n=12) or equivalent volume of sterile water/water for injection (control group – COG, n=12) for 4 weeks. After this period, all mice underwent a glucose tolerance test and the area under the curve (AUC) was calculated. Then, mice were euthanatized and blood samples were obtained to assay lipid and glucose profile. Moreover, each aortic valve was analyzed for the mean plaque area, the plaque content of elastin and collagen, the thickness of fibrous cap and the number of internal elastic lamina (IEL) ruptures.

Results: The mean plaque area tended to be smaller in SFG than CO-group ($559.81 \pm 112.01 \times$

$10^3\mu\text{m}^2$ vs $732.12\pm 105.71 \times 10^3\mu\text{m}^2$, $p=0.058$). Glucose tolerance was notably improved in SFG compared to COG ($p=0.021$), while body weight and lipid profile did not significantly change ($p>0.05$). Notably, saffron treatment seemed to promote plaque stability. In particular, atherosclerotic lesions derived from saffron-treated mice showed increased collagen ($p<0.001$) and elastin ($p<0.001$) content, thicker fibrous caps ($p=0.023$) and reduced number of IEL ruptures per mm of arterial girth ($p<0.001$) when compared to COG.

Conclusions: Saffron reduces atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in ApoE-/- mice. The plaque-stabilizing effects of saffron administration might be of clinical relevance independent of the modification of traditional cardiovascular risk factors.

Βιβλιογραφία

1. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, Kostakis A, Liapis CD. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice: dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; 26: 367-74.
2. Kataoka Y, Shao M, Wolski K, Uno K, Puri R, Tuzcu EM, Nissen SE, Nicholls SJ. Multiple risk factor intervention and progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Prev Cardiol* 2013; 20: 209-17.
3. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One*. 2011; 6: e18683.
4. Hosseinzadeh H, Hadhi Modaghegh M, Saffari Z. *Crocus Sativus L.* (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *eCAM* 2009; 6: 343-50.
5. Rios JL, Recio MC, Ginger RM, Manz S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 1996; 10: 189-93.
6. Hosseinzadeh H, Karimi Gh, Niapoor M. Antidepressant effects of *Crocus sativus* stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Acta Hort (ISHS)* 2004; 650: 435-45.
7. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus L.* stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2002; 2: 1-8.
8. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus L.*) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett*, 1996; 100: 23-30.
9. Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS, Daoud S. Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 54: 857-67.
10. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus L.* stigmas in mice. *Arch Irr Med* 2002; 5: 44-7.
11. Kang C, Lee H, Jung ES, Seyedian R, Jo M, Kim J, Kim JS, Kim E. Saffron (*Crocus sativus L.*) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms. *Food Chem* 2012; 135: 2350-8.
12. Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2013; 16: 206-10.
13. Hofmann SM, Perez-Tilve D, Greer TM, Coburn BA, Grant E, Basford JE, et al. Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes* 2008; 57: 5-12.
14. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, Kostakis A, Liapis CD. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice: dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; 26: 367-74.
15. Ylä-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, Hoefler I, Jukema JW, Krams R, Kwak BR, Marx N, Naruszewicz M, Newby A, Pasterkamp G, Serruys PW, Waltenberger J, Weber C, Tokgözoğlu L. Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology Working Group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost* 2011; 106: 1-19.
16. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Kapelouzou A, Moutzouoglou A, Avgerinos ED, Kakisis JD, Karayannacos PE, Liapis CD. Beneficial changes of serum calcification markers and contralateral carotid plaques echogenicity after combined carotid artery stenting plus intensive lipid-lowering therapy in patients with bilateral carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010; 39: 258-65.

17. *Kostapanos MS, Milionis HJ, Elisaf MS*. An overview of the extra-lipid effects of rosuvastatin. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008; 13: 157-74.
18. *Dorresteijn JA, Boekholdt SM, van der Graaf Y, Kastelein JJ, LaRosa JC, Pedersen TR, DeMicco DA, Ridker PM, Cook NR, Visseren FL*. High-dose statin therapy in patients with stable coronary artery disease: treating the right patients based on individualized prediction of treatment effect. *Circulation* 2013; 127: 2485-93.
19. *Kadoglou NP, Sailer N, Moumtzouglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD*. Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *J Vasc Surg* 2010; 51: 114-21.

Λέξεις-κλειδιά:

Κρόκος
Αθηροσκλήρωση
Σταθερότητα αθηρωματικής πλάκας

Key-words:

Saffron
Atherosclerosis
Plaque stability