

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών  
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

**Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κουρκουμίνης με  
χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού**

**Κωνσταντίνος – Θωμάς Καζαντζής**

Επιβλέπων:  
Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

**ΑΘΗΝΑ 2017**

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών  
Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής

**Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κουρκουμίνης με  
χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού**

**Κωνσταντίνος – Θωμάς Καζαντζής**

Επιβλέπων:  
Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 30<sup>η</sup> Μαρτίου 2017

.....  
Κ. Πολιτόπουλος  
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....  
Γ. Ματσόπουλος  
Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....  
Δρ. Μ. Σαγνού  
Ερευνήτρια Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.  
Δημόκριτος

**ΑΘΗΝΑ 2017**



Κωνσταντίνος – Θωμάς Καζαντζής

Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

Copyright © Κωνσταντίνος – Θωμάς Καζαντζής, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.



## Περίληψη

Η χρήση της φωτεινής ακτινοβολίας για θεραπευτικούς σκοπούς συναντάται από την αρχαιότητα μέχρι και τη σημερινή εποχή. Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική διαδικασία, η οποία έχει τη δυνατότητα να επάγει κυτταροτοξική δράση σε κακοήθη κύτταρα. Εξαρτάται από τρεις πολύ σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι δεν είναι μεμονωμένα τοξικοί αλλά σαν συνδυασμός. Αυτοί είναι ένας φωτοευαίσθητοποιητής, δηλαδή μια ουσία που έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να προκαλεί φωτοχημική ή φωτοφυσική αντίδραση, η φωτεινή ακτινοβολία, και τέλος το οξυγόνο. Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση του φωτοευαίσθητου παράγοντα και την μετέπειτα ακτινοβολία σε μήκος κύματος αντίστοιχο της ζώνης απορρόφησης του. Στη συνέχεια, με την παρουσία του οξυγόνου, ενεργοποιείται μια φωτοχημική αντίδραση που καταλήγει στη σύνθεση ελεύθερων ριζών ή ενός προϊόντος πολύ αντιδραστικού, το οποίο δεν είναι άλλο από ένα μόριο οξυγόνου στη μονήρη κατάσταση (singlet oxygen  $^1O_2$ ). Με αυτόν τον τρόπο επάγεται και η τοξικότητα της θεραπείας απέναντι στα καρκινικά κύτταρα.

Το μέλλον της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι αλληλένδετο με την έρευνα γύρω από τις διάφορες φωτοευαίσθητες ουσίες. Εκείνες, ανάλογα με τις ιδιότητές τους, όπως είναι για παράδειγμα η επιλεκτικότητα συγκέντρωσης στους προς θεραπεία στόχους ή το χρονικό διάστημα αποβολής τους από τον οργανισμό, καθορίζουν κάθε φορά το αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η κουρκουμίνη αποτελεί μια πορτοκαλί – κίτρινη κρυσταλλική σκόνη η οποία προέρχεται από το φυτό turmeric (*curcuma longa*). Το εξαιρετικά μεγάλο και αξιοσημείωτο φάσμα των φαρμακολογικών και βιολογικών ιδιοτήτων που την χαρακτηρίζουν, της προσδίδει μια πολύ σημαντική θέση στον τομέα της θεραπείας διάφορων παθήσεων από τα αρχαία χρόνια.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην έρευνα γύρω από τη χρήση τεσσάρων συνθετικών παραγώγων κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία ενάντια του καρκίνου. Σε πρώτο στάδιο, γίνεται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του συνθετικού παραγώγου κουρκουμίνης AX-232 ( $di-NCH_3$  curcumin). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της κουρκουμίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις αλλά και σε διάφορους διαλύτες, φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού αλλά και φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και μελέτη γύρω από την ικανότητα της κουρκουμίνης για παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Το επόμενο στάδιο της εργασίας περιλαμβάνει έλεγχο της επίδρασης τεσσάρων συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης στη βιωσιμότητα κυττάρων καρκίνου του προστάτη, LNCaP, απουσία του φωτός (dark toxicity). Ακολουθεί μελέτη της επίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας σε κύτταρα της ίδιας σειράς απουσία φωτοευαίσθητης ουσίας. Το τελικό κομμάτι της διπλωματικής αναφέρεται στο χωρικό εντοπισμό των παραγώγων στα κύτταρα καθώς και στην εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε αυτά, χρησιμοποιώντας τις κουρκουμίνες ως φωτοευαίσθητοποιητές. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι αρκετά ενθαρρυντικά καθώς τα συνθετικά παράγωγα των κουρκουμίνων που εξετάστηκαν παρουσιάζουν πολύ υψηλή αλλά και πολύ γρήγορη απορρόφηση από τα καρκινικά κύτταρα και η φωτοδυναμική δράση τους αποδεικνύεται ισχυρότατη.

## Abstract

The healing properties of light have been recognized since ancient times. Photodynamic therapy is a minimally invasive therapeutic procedure which has the potential to induce a cytotoxic effect on malignant cells. It consists of three very important factors that are not individually toxic, but as a combination. These are: a photosensitizer, i.e. a substance that is able to absorb light and to induce a photochemical or photophysical reaction, light irradiation and oxygen. Photodynamic therapy involves the administration of a photosensitizing agent and subsequent irradiation at wavelengths corresponding to its absorption band. Afterwards, in the presence of oxygen, a photochemical reaction is activated and it results in the synthesis of free radicals or a very reactive product, which is no other than an oxygen molecule in the singlet state (singlet oxygen  $^1\text{O}_2$ ). In that way, the toxicity of the treatment against cancer cells is induced.

The future of photodynamic therapy and research around the various photosensitive substances are interconnected. Photosensitizers, depending on their properties, such as their ability to selectively accumulate in target areas and not in healthy tissue, or the time interval of their elimination from the body, define each time the final effect of photodynamic therapy. Curcumin is an orange – yellow crystalline powder that is extracted from the plant turmeric (*curcuma longa*). The extremely large and remarkable range of pharmacological and biological properties that characterize it, gives it a very important place in the treatment of various ailments since ancient times.

The present thesis aims to conduct a study on the potential use of four curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy against cancer. In the first stage, experiments are conducted, in order to determine the photophysical properties of the curcumin derivative AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin). The study includes spectroscopic studies of curcumin absorption at various concentrations and in various solvents, spectroscopic studies of curcumin fluorescence, as well as spectroscopic studies regarding curcumin's photobleaching. In addition, the ability of the curcumin derivative (AX-232) to produce reactive oxygen species (ROS) was examined.

In the next part of the thesis, the effect of four curcumin derivatives on cell viability in LNCaP prostate cancer cells, in the absence of light (dark toxicity) was tested. What comes after that, is a study on the effect of light radiation on cells of the same line, in the absence of a photosensitizing agent. This is followed by experiments that were conducted, in terms of the spatial localization of the four curcumin derivatives in LNCaP cells. The final stage of this diploma thesis refers to the application of photodynamic therapy to these prostate cancer cells (LNCaP), using the curcumin derivatives as photosensitizers. The results that arise, are very promising as the curcumin derivatives that were tested, revealed very high and very quick cellular uptake from cancer cells and their photodynamic efficacy was significantly strong.

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του ΕΜΠ Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την παρούσα διπλωματική εργασία. Το ενδιαφέρον και η βοήθειά του ήταν για μένα κινητήρια δύναμη καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της ερευνητικής εργασίας.

Ευχαριστώ την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) ΕΜΠ. Της οφείλω όλη μου την ευγνωμοσύνη για τη βοήθεια της. Με τη στήριξη και το ενδιαφέρον της κατάφερα να μάθω πολύτιμα πράγματα γύρω από τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας. Χωρίς την παρουσία της, την υπομονή, την καθοδήγηση της τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην ομότιμη καθηγήτρια ΕΜΠ Διδώ Γιόβα, στον αναπληρωτή καθηγητή ΕΜΠ Γιώργο Ματσόπουλο, όπως επίσης και στην επίκουρη καθηγήτρια ΕΜΠ Βάρτζελη – Νικάκη Πόπη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» και κυρίως την Δρ. Μαρίνα Σαγνού, ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών. Εκείνοι παρείχαν τόσο τις ουσίες προς μελέτη, όσο και την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες αποστέλλω επίσης στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής του ΕΜΠ, με έμφαση στους υποψήφιους διδάκτορες Κατερίνα και Τάσο για το όμορφο περιβάλλον που επικρατούσε τις ώρες που βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω με όλη μου την αγάπη τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και δεν έπαψαν ποτέ να με στηρίζουν και να πιστεύουν σε μένα. Τους γονείς μου Πηνελόπη και Γιώργο, τα αδέρφια μου Πάνο και Άρη, τον Άκη, όλη την υπόλοιπη οικογένειά μου, τη νονά μου Φώφη, τον Κωνσταντίνο, τη Δάφνη, την Ιωάννα, τη Χριστίνα, τη Ζωή, τη Νίκη και το Γιώργο. Σας ευχαριστώ για όλα.











# Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη .....	iii
Abstract.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Πίνακας Περιεχομένων.....	1
Κατάλογος Εικόνων .....	5
Κατάλογος Διαγραμμάτων .....	7
Κατάλογος πινάκων .....	9
<b>Κεφάλαιο Α: Η φωτοδυναμική θεραπεία .....</b>	<b>11</b>
A.1 Ιστορική Αναδρομή .....	12
A.2 Η φωτοδυναμική θεραπεία .....	14
A.3 Απορρόφηση του φωτός.....	16
A.3.1 Εσωτερική μετατροπή .....	17
A.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$ .....	17
A.3.3 Φθορισμός .....	17
A.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός .....	17
A.3.5 Φωσφορισμός.....	18
A.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων.....	18
A.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού .....	18
A.3.8 Φωτοχημική αντίδραση .....	18
A.4 Μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας .....	19
A.4.1 Φωτοφυσική και Φωτοχημεία.....	19
A.4.2 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου .....	21
A.4.2.1 Απόπτωση .....	21
A.4.2.2 Νέκρωση .....	22
A.4.2.3 Αυτοφαγία .....	22
A.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας .....	24
<b>Κεφάλαιο Β: Φωτοευαισθητοποιητές .....</b>	<b>28</b>
B.1 Τί είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής και ποιες προϋποθέσεις πρέπει να πληρούνται έτσι ώστε μια ένωση να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής. ....	29
B.2 Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών .....	32
B.2.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1 <sup>ης</sup> γενιάς .....	32
B.2.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς .....	33
B.2.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3 <sup>ης</sup> γενιάς .....	35
B.3 Προοπτικές για το μέλλον .....	37
<b>Κεφάλαιο Γ: Η κουρκουμίνη .....</b>	<b>38</b>
Γ.1 Εισαγωγή.....	39

Γ.2 Κουρκουμίνη και κουρκουμινοειδή .....	40
Γ.3 Χρήσεις και Εφαρμογές της κουρκουμίνης.....	42
Γ.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης.....	43
Γ.4.1 Κουρκουμίνη και καρκίνος του προστάτη.....	44
Γ.5 Κουρκουμίνη και φωτοδυναμική θεραπεία.....	45
<b>Κεφάλαιο Δ: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες .....</b>	<b>48</b>
Δ.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης.....	49
Δ.2 Πειραματικές Διατάξεις .....	51
Δ.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης .....	51
Δ.2.2 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού.....	54
Δ.2.3 Διάταξη ακτινοβόλησης.....	56
Δ.2.4 Μικροσκόπια.....	58
Δ.2.4.1 Unitron MiC – 1317.....	58
Δ.2.4.2 Μικροσκόπιο φθορισμού .....	59
Δ.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.....	62
Δ.3.1 Curcumin I (AX 126).....	62
Δ.3.2 Curcumin III (AX 186).....	62
Δ.3.3 Curcumin AX 127 .....	63
Δ.3.4 Curcumin AX 232 (di-NCH <sub>3</sub> Curcumin) .....	63
Δ.3.5 DMSO.....	63
Δ.3.6 PBS .....	64
Δ.3.7 Αιθανόλη .....	64
Δ.3.8 NADH .....	64
Δ.3.9 EDTA .....	66
Δ.3.10 FBS .....	66
Δ.3.11 Αντιβιοτικό .....	66
Δ.3.12 RPMI .....	66
Δ.3.13 Τρυψίνη.....	67
Δ.3.14 MTT.....	67
Δ.3.15 Triton X .....	67
Δ.3.16 HCl.....	68
Δ.3.17 Ισοπροπανόλη.....	68
<b>Κεφάλαιο Ε: Μεθοδολογίες και Πρωτόκολλα .....</b>	<b>69</b>
Ε.1 Κυτταρικές Καλλιέργειες .....	70
Ε.1.1: Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP.....	70
Ε.1.2: Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP .....	72
Ε.1.3 Μεθοδολογία κατάψυξης κυττάρων.....	73
Ε.1.4 Μεθοδολογία μέτρησης αριθμού κυττάρων .....	74
Ε.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμίνης AX-232 (di – NCH <sub>3</sub> curcumin).....	76
Ε.2.1 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης της κουρκουμίνης AX- 232 σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	76
Ε.2.2 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης της κουρκουμίνης .....	77
AX - 232 σε διάφορους διαλύτες .....	77
Ε.2.3 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις .....	78
Ε.2.4 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φωτολεύκανσης.....	78
Ε.2.4.1 Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο της απορρόφησης.....	78

E.2.4.2 Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού .....	79
<b>E.2.5 Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών.....</b>	<b>80</b>
E.3 Έλεγχος της τοξικότητας των τεσσάρων κουρκουμίνων στην κυτταρική σειρά LNCaP ....	83
<b>E.3.1 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων – βιοχημικός έλεγχος MTT.....</b>	<b>83</b>
E.4 Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP ....	86
E.5 Μεθοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP, με τη χρήση των τεσσάρων κουρκουμίνων ως φωτοευαίσθητες ουσίες .....	87
E.6 Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP .....	89
<b>Κεφάλαιο ΣΤ: Αποτελέσματα και Συμπεράσματα .....</b>	<b>91</b>
ΣΤ.1: Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	92
<b>ΣΤ.1.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>92</b>
<b>ΣΤ.1.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>93</b>
ΣΤ.2 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορους διαλύτες.....	96
<b>ΣΤ.2.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>96</b>
<b>ΣΤ.2.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>97</b>
ΣΤ.3 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 με χρήση του PBS ως διαλύτη.....	100
<b>ΣΤ.3.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>100</b>
<b>ΣΤ.3.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>101</b>
ΣΤ.4 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	103
<b>ΣΤ.4.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>103</b>
<b>ΣΤ.4.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>104</b>
ΣΤ.5 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης με τη μέθοδο της απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 .....	107
<b>ΣΤ.5.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>107</b>
<b>ΣΤ.5.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>108</b>
ΣΤ.6 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232 .....	109
<b>ΣΤ.6.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>109</b>
<b>ΣΤ.6.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>110</b>
ΣΤ.7 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 .....	112
<b>ΣΤ.7.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>113</b>
<b>ΣΤ.7.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>117</b>
ΣΤ.8 Έλεγχος της επαγόμενης στα κύτταρα LNCaP τοξικότητας από τις κουρκουμίνες .....	119
<b>ΣΤ.8.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>119</b>
<b>ΣΤ.8.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>120</b>
ΣΤ.9 Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP.....	121
<b>ΣΤ.9.1 Αποτελέσματα .....</b>	<b>121</b>
<b>ΣΤ.9.2 Συμπεράσματα .....</b>	<b>122</b>

ΣΤ.10 Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP .....	123
ΣΤ.10.1 Αποτελέσματα .....	123
ΣΤ.10.2 Συμπεράσματα .....	125
ΣΤ.11 Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP, με τη χρήση των τεσσάρων κουρκουμίνων ως φωτοευαίσθητες ουσίες .....	128
ΣΤ.11.1 Αποτελέσματα .....	128
ΣΤ.11.2 Συμπεράσματα .....	131
<b>Κεφάλαιο Ζ: Γενικά Συμπεράσματα .....</b>	<b>133</b>
Z.1 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των τεσσάρων παραγώγων κουρκουμίνης.....	134
Z.1.1 Απορρόφηση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς διαλύτες.....	134
Z.1.2 Εκπομπή φθορισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	135
Z.1.3 Φωτολεύκανση με τη μέθοδο της απορρόφησης και του φθορισμού.....	135
Z.1.4 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	136
Z.1.5 Τοξικότητα των παραγώγων της κουρκουμίνης στα κύτταρα της σειράς LNCaP απουσία φωτός.....	136
Z.1.6 Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP .....	137
Z.1.7 Χρήση των τεσσάρων παραγώγων της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	137
Z.1.8 Χωρικός εντοπισμός των παραγώγων της κουρκουμίνης στα κύτταρα LNCaP.....	138
Z.2 Συζήτηση και προοπτικές .....	139
Βιβλιογραφία .....	141



## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα Α. 1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας.....	14
Εικόνα Α. 2: Στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	15
Εικόνα Α. 3: Διάγραμμα Jablonski <sup>[1]</sup> .....	16
Εικόνα Α. 4: Φωτοφυσικοί & Φωτοχημικοί μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας .....	20
Εικόνα Α. 5: Τρόποι κυτταρικού θανάτου.....	23
Εικόνα Β. 1: Μηχανισμοί με τους οποίους οι φωτοευαίσθητοποιητές εκμεταλλεύονται την ενέργεια του φωτός για να βλάψουν ή να καταστρέψουν τον ιστό – στόχο.....	29
Εικόνα Β. 2: Μοριακή δομή της Photofrin .....	33
Εικόνα Γ. 1: Ιστορία της κουρκουμίνης[64].....	40
Εικόνα Γ. 2: Χημική δομή για curcumin, demethoxycurcumin και bisdemethoxycurcumin .....	41
Εικόνα Γ. 3: Ιδιότητες της κουρκουμίνης σε ιατρικό επίπεδο.....	42
Εικόνα Δ. 1: Perkin-Elmer Lambda 35, UV/VIS Spectrometer .....	51
Εικόνα Δ. 2: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης.....	52
Εικόνα Δ. 3: Υποδοχείς κυβετών του οργάνου (δείγμα και αναφορά) .....	53
Εικόνα Δ. 4: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer .....	54
Εικόνα Δ. 5: Υποδοχή κυβέτας οργάνου.....	54
Εικόνα Δ. 6: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου φθορισμού .....	55
Εικόνα Δ. 7: Bridgelux Power LED 10W .....	57
Εικόνα Δ. 8: διάταξη ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε .....	58
Εικόνα Δ. 9: Το ανάστροφο μικροσκόπιο Unitron MiC-1317 .....	59
Εικόνα Δ. 10: Σχηματικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με τη διέγερση να γίνεται με προσπίπτοντα φωτισμό.....	60
Εικόνα Δ. 11: Το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50 .....	61
Εικόνα Δ. 12: : Χημική δομή της κουρκουμίνης I (AX-126) .....	62
Εικόνα Δ. 13: Χημική δομή της Curcumin III (AX 186).....	62
Εικόνα Δ. 14: Χημική δομή της Curcumin AX 127 .....	63

Εικόνα Δ. 15: Χημική δομή της Curcumin AX 232.....	63
Εικόνα Δ. 16: : Χημική δομή του DMSO .....	63
Εικόνα Δ. 17: Χημική δομή της αιθανόλης.....	64
Εικόνα Δ. 18: Χημική δομή NAD <sup>+</sup> και NADH .....	64
Εικόνα Δ. 19: Σχηματισμός NADH από NAD <sup>+</sup> και αντίστροφα .....	65
Εικόνα Δ. 20: Απορρόφηση NAD <sup>+</sup> και NADH σε σχέση με το μήκος κύματος.....	65
Εικόνα Δ. 21: Χημική δομή EDTA .....	66
Εικόνα Δ. 22: Χημική δομή του MTT .....	67
Εικόνα Δ. 23: Χημική δομή Triton X-100 .....	67
Εικόνα Δ. 24: Χημική δομή ισοπροπανόλης.....	68
Εικόνα Ε. 1: Φιάσκες της Corning που χρησιμοποιούνται.....	71
Εικόνα Ε. 2: Πλακίδιο Neubauer .....	74
Εικόνα Ε. 3: Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων formazan του MTT & φάσματα απορρόφησης[112] .....	84
Εικόνα ΣΤ. 1: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH <sub>3</sub> curcumin) .....	102
Εικόνα ΣΤ. 2: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I).....	102
Εικόνα ΣΤ. 3: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-186 (Curcumin III).....	102
Εικόνα ΣΤ. 4: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-127.....	102
Εικόνα ΣΤ. 5: AX-126, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το μικροσκόπιο φθορισμού.....	123
Εικόνα ΣΤ. 6: AX-127, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού.....	124
Εικόνα ΣΤ. 7: AX-186, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού.....	124
Εικόνα ΣΤ. 8: AX-232, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού.....	125
Εικόνα ΣΤ. 9: AX-127, αριστερά εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού – white balance ενεργό.....	126
Εικόνα ΣΤ. 10: AX-186, αριστερά εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού – white balance ενεργό.....	126

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα Δ. 1: Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος .....	58
Διάγραμμα ΣΤ. 1: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	92
Διάγραμμα ΣΤ. 2: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 ως προς τη συγκέντρωση .....	93
Διάγραμμα ΣΤ. 3: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-126 σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	94
Διάγραμμα ΣΤ. 4: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-127 σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	94
Διάγραμμα ΣΤ. 5: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-186 (Curcumin III) σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	95
Διάγραμμα ΣΤ. 6: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορους διαλύτες .....	96
Διάγραμμα ΣΤ. 7: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I) σε διάφορους διαλύτες <sup>[1]</sup> .....	98
Διάγραμμα ΣΤ. 8: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-127 σε διάφορους διαλύτες <sup>[1]</sup> .....	98
Διάγραμμα ΣΤ. 9: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-186 (Curcumin III) σε διάφορους διαλύτες <sup>[1]</sup> .....	99
Διάγραμμα ΣΤ. 10: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 με χρήση του DMSO και του PBS ως διαλύτες.....	100
Διάγραμμα ΣΤ. 11: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις .....	103
Διάγραμμα ΣΤ. 12: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της AX-232 σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας.....	104
Διάγραμμα ΣΤ. 13: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-126 σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	105
Διάγραμμα ΣΤ. 14: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-127 σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	105
Διάγραμμα ΣΤ. 15: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-186 σε διάφορες συγκεντρώσεις <sup>[1]</sup> .....	106
Διάγραμμα ΣΤ. 16: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 .....	107
Διάγραμμα ΣΤ. 17: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186 <sup>[1]</sup> .....	108
Διάγραμμα ΣΤ. 18: Μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 .....	110
Διάγραμμα ΣΤ. 19: Μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβολήσης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186 <sup>[1]</sup> .....	111

Διάγραμμα ΣΤ. 20: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO .....	113
Διάγραμμα ΣΤ. 21: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε PBS .....	113
Διάγραμμα ΣΤ. 22: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO και ακτινοβολήση 10,72 mW/cm <sup>2</sup> .....	114
Διάγραμμα ΣΤ. 23: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO .....	115
Διάγραμμα ΣΤ. 24: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε PBS .....	115
Διάγραμμα ΣΤ. 25: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO και ακτινοβολήση 10,72 mW/cm <sup>2</sup> .....	116
Διάγραμμα ΣΤ. 26: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186, AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO.....	116
Διάγραμμα ΣΤ. 27: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με τη συγκέντρωση των κουρκουμίνων μας απουσία φωτός.....	119
Διάγραμμα ΣΤ. 28: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με τη συγκέντρωση των κουρκουμίνων μας απουσία φωτός.....	120
Διάγραμμα ΣΤ. 29: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με την ισχύ της ακτινοβολήσης .....	121
Διάγραμμα ΣΤ. 30: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με την ισχύ της ακτινοβολήσης .....	122
Διάγραμμα ΣΤ. 31: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα 6 mW/cm <sup>2</sup> , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-186 και AX-232 .....	129
Διάγραμμα ΣΤ. 32: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα 6 mW/cm <sup>2</sup> , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-186 και AX-232 .....	129
Διάγραμμα ΣΤ. 33: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα 6 mW/cm <sup>2</sup> , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-126 και AX-127 .....	130
Διάγραμμα ΣΤ. 34: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα 6 mW/cm <sup>2</sup> , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-126 και AX-127 .....	130

## Κατάλογος πινάκων

Πίνακας Β. 1: Φωτοευαισθητοποιητές 2 <sup>ης</sup> γενιάς .....	34
Πίνακας Δ. 1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W .....	57
Πίνακας Δ. 2: Κύβοι φθορισμού μικροσκοπίου Olympus BX-50 .....	61
Πίνακας ΣΤ. 1: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκος κύματος εμφάνισής της στον εκάστοτε διαλύτη .....	97
Πίνακας ΣΤ. 2: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκος κύματος εμφάνισής της .....	101
Πίνακας ΣΤ. 3: Τιμές του pH των τριών διαλυμάτων .....	101
Πίνακας ΣΤ. 4: Μέγιστος φθορισμός για κάθε διάλυμα.....	104

## **Μέρος πρώτο**

### **Θεωρητικό κομμάτι**

## Κεφάλαιο Α: Η φωτοδυναμική θεραπεία

## A.1 Ιστορική Αναδρομή

Η χρήση του φωτός ως θεραπευτικού παράγοντα στην ιατρική και τη χειρουργική μπορεί να εντοπιστεί από την αρχαιότητα μέχρι και τη σημερινή εποχή. Η εφαρμογή της φωτοθεραπείας έχει καταγραφεί στην αρχαία Ελλάδα όπου οι άνθρωποι συνήθιζαν να εκθέτουν ολόκληρο το σώμα τους στον ήλιο καθώς και στην αρχαία Αίγυπτο, Ινδία και Κίνα όπου μέσω αυτής γινόταν απόπειρα καταπολέμησης δερματικών παθήσεων σαν την ψωρίαση, τη λεύκη, τον καρκίνο και τη ραχίτιδα<sup>[1]</sup>. Στον δυτικό πολιτισμό η επιστροφή της φωτοθεραπείας στο επίκεντρο υπολογίζεται στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα μέσω του έργου του Δανού Niels Finzen όπως και των Γερμανών Oscar Raab και Herman von Tappeiner<sup>[2]</sup>.

Η χρήση ενός φωτοευαίσθητου παράγοντα σε συνδυασμό με το φως για θεραπευτικούς σκοπούς μπορεί να αποδοθεί στον Oscar Raab. Ο τελευταίος, ως φοιτητής ιατρικής και δουλεύοντας στο εργαστήριο του Herman von Tappeiner, ανακάλυψε ότι η ακτινοβολία καλλιεργείων από παραμήκια υπό την παρουσία ακριδίνης και σχετικών ενώσεων, οδηγούσε στον κυτταρικό θάνατο. Ο Raab, μαζί με τους καθηγητές του Jodlbauer, Jesionek και von Tappeiner, ανακάλυψαν ότι η ακριδίνη ήταν τελικά φωτοευαίσθητος παράγοντας. Στη συνέχεια, ο von Tappeiner και ο Jesionek χρησιμοποίησαν το 1903 ηωσίνη και φωτεινή ακτινοβολία με στόχο τη θεραπεία δερματικού καρκίνου<sup>[3], [4]</sup>. Το επόμενο βήμα που διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της φωτοδυναμικής θεραπείας ήταν οι μελέτες του Γερμανού Meyer-Betz. Το 1913, ο επιστήμονας χορήγησε στον εαυτό του 200mg αιματοπορφυρίνης και εξέθεσε το δέρμα του στην ηλιακή ακτινοβολία. Στη συνέχεια, κατέγραψε τη φωτοευαισθησία και τις φωτοτοξικές αντιδράσεις που επήλθαν. Σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν επίσης χάρη στους Auler και Banzer οι οποίοι επικεντρώθηκαν στις φωτοδυναμικές ιδιότητες των πορφυρίνων σε καρκινικούς όγκους τρωκτικών<sup>[5]</sup>. Το 1957 μέσω των Schwartz, Lipson, Baldes και Winkelman έγινε δημοσίευση εργασιών που αφορούσαν τον επιλεκτικό εντοπισμό της αιματοπορφυρίνης σε καρκινικούς ιστούς<sup>[1]</sup>. Χωρίς να υποβαθμίζεται σε καμία περίπτωση η συμβολή και το έργο των προαναφερθέντων, πατέρας της φωτοδυναμικής θεραπείας θεωρείται αδιαμφισβήτητα ο Dr. Tom Dougherty. Ο τελευταίος μελέτησε συστηματικά την αιματοπορφυρίνη και τη χρήση της στην φωτοδυναμική θεραπεία. Σε αντίθεση με τις παρελθοντικές έρευνες, η δουλειά του οδήγησε σε έναν εμπορικά διαθέσιμο φωτοευαισθητοποιητή καθώς και στη δυνατότητα για την ευρεία κυκλοφορία του. Το 1981 το καθαρό παράγωγο αιματοπορφυρίνης με την εμπορική ονομασία Photofrin διατέθηκε στην αγορά<sup>[1], [3], [4]</sup>.

Έχουν περάσει πάνω από 25 χρόνια από τότε που η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά στον τομέα της ογκολογίας. Μέχρι τότε έχει εφαρμοστεί σε χιλιάδες ασθενείς. Σε κλάδους της ιατρικής όπως είναι η δερματική ογκολογία και η οφθαλμολογία η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ευρέως διαδεδομένη. Αντίθετα, σε άλλες ειδικότητες η χρήση της παραμένει στο περιθώριο. Το μέλλον της συγκεκριμένης θεραπευτικής διαδικασίας έγκειται στην έρευνα γύρω από τη δημιουργία νέων, με μεγαλύτερη επιλεκτικότητα φωτοευαισθητοποιητών, γύρω από θέματα δοσιμετρίας όπως επίσης και τεχνολογικών εξελίξεων που επηρεάζουν το σχεδιασμό των πηγών φωτός. Είναι αδήριτη ανάγκη να υπάρξει διαθεσιμότητα σε βελτιωμένους φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι να είναι περισσότερο επιλεκτικοί καθώς και να μην προκαλούν μεγάλη χρονική διάρκεια φωτοευαισθητοποίησης του σώματος. Σε περίπτωση που τέτοιες ουσίες μπορέσουν να δημιουργηθούν, τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας όπως η



ελάχιστη επεμβατικότητα της, η ευκολία στην εφαρμογή της τόσο για τον ασθενή όσο και για το ιατρικό προσωπικό και το χαμηλό κόστος της, θα εξασφαλίσουν έναν ουσιώδη και σπουδαίο ρόλο για εκείνη στη θεραπεία του καρκίνου<sup>[3], [6]</sup>.

## A.2 Η φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μια κλινικά εγκεκριμένη για ορισμένες μορφές καρκίνου και άλλων μη νεοπλασματικών ασθενειών, ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική διαδικασία η οποία έχει τη δυνατότητα να ασκεί επιλεκτική κυτταροτοξική δράση απέναντι σε κακοήγη κύτταρα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη χορήγηση φωτοευαίσθητου παράγοντα η οποία ακολουθείται από την ακτινοβολήση σε μήκος κύματος αντίστοιχο της ζώνης απορρόφησης του φωτοευαίσθητοποιητή. Με την παρουσία του οξυγόνου, μια σειρά από γεγονότα οδηγούν τελικά σε άμεσο θάνατο των καρκινικών κυττάρων, σε βλάβη στο μικροαγγειακό δίκτυο καθώς επίσης και στην επαγωγή μιας τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης (εικόνα A.1). Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να είναι θεραπευτική ιδιαίτερα για όγκους που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο. Έχει τη δυνατότητα να παρατείνει την επιβίωση σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από καρκίνους που είναι αδύνατον να χειρουργηθούν αλλά και να βελτιώσει σε πολύ μεγάλο βαθμό την ποιότητα της ζωής. Η ελάχιστη τοξικότητα στους υγιείς ιστούς, οι αμελητέες συστηματικές επιδράσεις, η μειωμένη μακροχρόνια νοσηρότητα, η έλλειψη μηχανισμών εγγενούς η επίκτητης ανθεκτικότητας/αντίστασης, η διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των οργάνων καθώς και τα εξαιρετικά αισθητικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης θεραπείας, την καθιστούν μια πολύτιμη επιλογή σε συνδυαστικές θεραπείες (χρήση της σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία για παράδειγμα). Με τη βοήθεια της προόδου στον τομέα της τεχνολογίας, η φωτοδυναμική θεραπεία έχει την προοπτική να αποτελέσει σπουδαίο ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου<sup>[7], [8]</sup>



Εικόνα A. 1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας

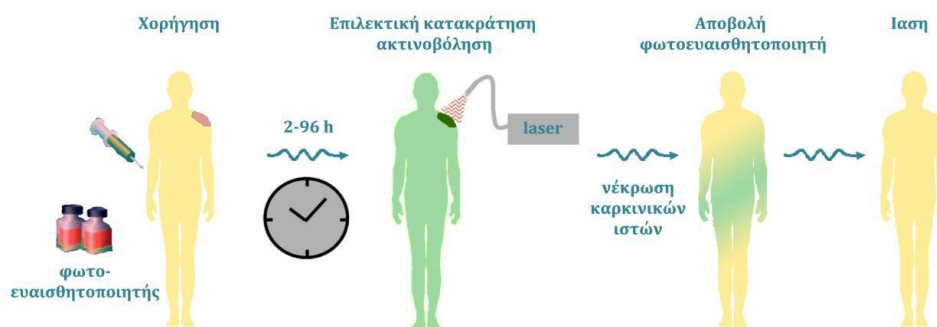
Η φωτοδυναμική θεραπεία εξαρτάται από τρεις πολύ σημαντικούς παράγοντες:

- Τη φωτοευαίσθητη ουσία ή αλλιώς φωτοευαίσθητοποιητή, που είναι μια ουσία που έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να προκαλεί φωτοχημικές και φωτοφυσικές αντιδράσεις.
- Τη φωτεινή ακτινοβολία
- Το οξυγόνο

Κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν είναι από μόνος του τοξικός. Παρόλα αυτά ο συνδυασμός τους οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας σειράς φωτοχημικών αντιδράσεων που καταλήγουν στη σύνθεση ελεύθερων ριζών ή ενός προϊόντος πολύ δραστικού, το οποίο δεν είναι άλλο από ένα μόριο οξυγόνου στη μονήρη κατάσταση (singlet oxygen  $^1O_2$ )<sup>[1], [9]</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι το οξυγόνο τις περισσότερες φορές συναντάται στην τριπλή κατάσταση (triplet oxygen  $O_2$ ), μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το οξυγόνο στη μονήρη κατάσταση είναι λιγότερο σταθερό από το οξυγόνο στην τριπλή κατάσταση, έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής (<0.04 μs), συμμετέχει σε πολύ περισσότερες χημικές αντιδράσεις και ως αποτέλεσμα χρησιμοποιείται σε ποικίλες ιατρικές εφαρμογές<sup>[7], [10]</sup>. Το συγκεκριμένο προϊόν μπορεί να προκαλέσει σημαντική τοξικότητα η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι το βιολογικό αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι φωτοχημικό και όχι θερμικό. Αυτό σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια εφαρμογής της αλλά και έπειτα από αυτή, η βλάβη στα συστατικά στοιχεία των συνδετικών ιστών (όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη) είναι μικρή<sup>[1], [10]</sup>.

Οι αντικαρκινικές επιδράσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας προέρχονται από τρεις αλληλένδετους μηχανισμούς – απευθείας κυτταροτοξικές αντιδράσεις πάνω στα κύτταρα του όγκου, άμεση δράση επί των αγγείων των όγκων και διέγερση μιας ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης, η οποία μπορεί να καταλήξει στην ανάπτυξη συστημικής ανοσίας. Η συνεισφορά του κάθε μηχανισμού εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον τύπο και την ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή που χορηγείται στον ασθενή, από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή σε αυτόν και την έκθεση του στη φωτεινή ακτινοβολία, από την ποσότητα του φωτός στο οποίο εκτίθεται, από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στον όγκο και πιθανόν και από διάφορες άλλες παραμέτρους που δεν έχουν μελετηθεί σε επιστημονικό επίπεδο μέχρι σήμερα. Ως αποτέλεσμα, ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι έργο διεπιστημονικού επιπέδου<sup>[7]</sup>.

Συνοπτικά, η φωτοδυναμική θεραπεία είναι στην ουσία μια διαδικασία που αποτελείται από τέσσερα στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται η χορήγηση της φωτοευαισθητικής ουσίας στον ασθενή. Σε δεύτερο στάδιο, γίνεται επιλεκτική κατακράτησή της από τους καρκινικούς όγκους. Μόλις επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιείται επιλεκτική ακτινοβολία του όγκου και των γύρω υγιών ιστών. Στη συνέχεια, η φωτοευαισθητική ουσία αποβάλλεται σταδιακά από όλους τους ιστούς ενώ ο όγκος αρχίζει να συρρικνώνεται. Ο όγκος καταστρέφεται γρήγορα και κάθε πιθανή βλάβη στους υγιείς ιστούς θεραπεύεται μέσα στις επόμενες 6-8 εβδομάδες (εικόνα Α.2).

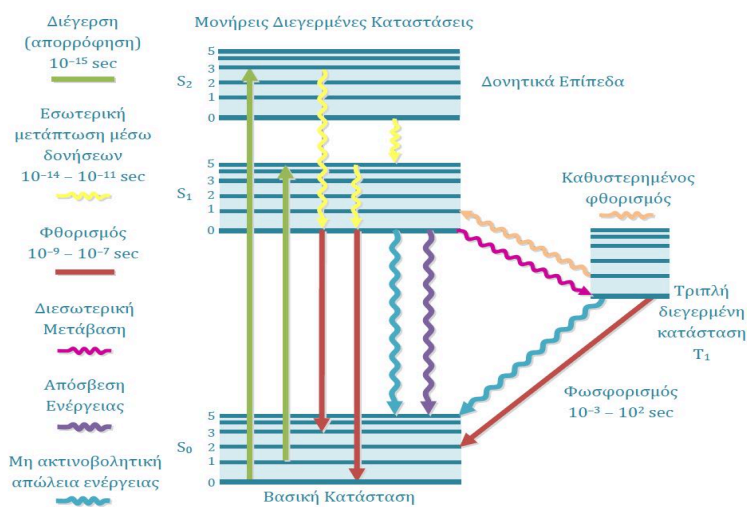


Εικόνα Α. 2: Στάδια της φωτοδυναμικής θεραπείας<sup>[1]</sup>

### A.3 Απορρόφηση του φωτός

Τα μόρια που έχουν τη δυνατότητα να απορροφούν μήκη κύματος του ορατού φωτός ονομάζονται χρωμοφόρα. Πολλές φορές ο ορισμός αυτός επεκτείνεται και για την UV και IR ακτινοβολία. Κάθε μόριο κατέχει μια σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μια χαμηλότερη σε μια υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση κβάντων φωτεινής ακτινοβολίας, ίσης ενέργειας με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Στη σταθερή τους κατάσταση, τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη βασική μονήρη κατάσταση (singlet state)  $S_0$ . Αυτή χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια αλλά από το γεγονός ότι όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα με αντιπαράλληλα spins. Η τριπλή κατάσταση αποτελεί για τα περισσότερα μόρια μια ασταθή κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν έπειτα από διέγερση. Χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση καθώς στη βασική του κατάσταση βρίσκεται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθεί μεταβαίνει στην εξαιρετικής σημασίας για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση.

Μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου από το μόριο του χρωμοφόρου, ακολουθεί μετάβαση του στην πρώτη ή δεύτερη μονήρη διεγερμένη κατάσταση ανάλογα με το εάν το φωτόνιο ανήκε στην περιοχή της ορατής ή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ εξειδικευμένη και ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας απορροφάται από συγκεκριμένες χημικές δομές. Κατά τη διάρκεια παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω συγκρούσεων σε άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Ο χρόνος ζωής αυτής είναι πολύ μικρός, της τάξης του 1 μs. Το μόριο μπορεί να επιστρέψει στη βασική του στάθμη ακολουθώντας διάφορους μηχανισμούς που περιγράφονται παρακάτω και απεικονίζονται στο διάγραμμα Jablonski που παρατίθεται<sup>[1]</sup>,<sup>[11]</sup> (εικόνα A.3).



Εικόνα Α. 3: Διάγραμμα Jablonski<sup>[1]</sup>

### A.3.1 Εσωτερική μετατροπή

Αναφέρεται στην μετάβαση του μορίου από τη διεγερμένη κατάσταση σε ένα κοντινό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης, χωρίς καμία εκπομπή ακτινοβολίας. Η ενέργεια χάνεται μέσω δονητικής αποδιέγερσης<sup>[1]</sup>.

### A.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$

Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη ( $S^*$ ) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη ( $T^*$ ). Η μετάβαση από τη βασική μονήρη στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση είναι σχεδόν απίθανη. Αντίθετα, η μετάπτωση από τη μονήρη διεγερμένη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της  $T^*$  είναι μικρότερη αυτής της  $S^*$ . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί να επανέλθει άμεσα στη βασική μονήρη κατάσταση ( $S_0$ ), αφού η επιστροφή μέσω της  $S^*$  στη βασική προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον (περίπτωση καθυστερημένου φθορισμού). Η άμεση επιστροφή στη βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξης των msec). Επίσης, η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας<sup>[11]</sup>.

### A.3.3 Φθορισμός

Η εκπομπή φθορισμού περιλαμβάνει πάντοτε μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης ( $S_0$ ) από τη βασική στάθμη της μονήρους διεγερμένης στάθμης ( $S^*$ ), με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης.

Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον<sup>[1], [11]</sup>.

### A.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός

Το μόριο έχει τη δυνατότητα να επανέλθει από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση  $T^*$  στη βασική μονήρη κατάσταση  $S_0$  μέσω της  $S^*$ . Η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη

μονήρη διεγερμένη προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον. Από την  $S^*$  το μόριο θα μεταβεί στην  $S_0$  εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια ίση με την ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών. Η διαδικασία που αναφέραμε παρουσιάζει χρόνους μεγαλύτερους από τον φθορισμό και συνεπώς καλείται καθυστερημένος φθορισμός<sup>[1], [11]</sup>.

### A.3.5 Φωσφορισμός

Ο φωσφορισμός αναφέρεται στην άμεση επιστροφή του μορίου από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση ( $T^*$ ) στη βασική μονήρη κατάσταση ( $S_0$ ) με την εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας<sup>[1], [11]</sup>.

### A.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων

Συμβαίνει όταν ένα μόριο που έχει διεγερθεί συγκρούεται με ένα άλλο μόριο το οποίο βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο. Η ενέργεια μεταφέρεται από το διεγερμένο μόριο σε αυτό που βρίσκεται σε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού<sup>[11]</sup>.

### A.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού

Η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου – διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού<sup>[11]</sup>.

### A.3.8 Φωτοχημική αντίδραση

Η ενέργεια μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη δημιουργία αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές<sup>[11]</sup>.

## A.4 Μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας

### A.4.1 Φωτοφυσική και Φωτοχημεία

Ένας φωτοευαισθητοποιητής στην θεμελιώδη κατάσταση έχει δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα spin στο χαμηλής ενέργειας μοριακό τροχιακό. Μετά την απορρόφηση των φωτονίων της φωτεινής ακτινοβολίας, ένα από τα δύο αυτά ηλεκτρόνια μεταπηδά σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας ενώ όμως διατηρεί το spin του ( $1^{\text{n}}$  διεγερμένη κατάσταση  $S_1$ ). Αυτή είναι μια κατάσταση με μικρό χρόνο ζωής (της τάξης των nanosecond) και μπορεί να χάσει την ενέργειά της μέσω εκπομπής φωτεινής ακτινοβολίας (φθορισμός) ή μέσω εσωτερικής μετατροπής σε θερμότητα. Ο φωτοευαισθητοποιητής στην  $1^{\text{n}}$  διεγερμένη κατάσταση ενδέχεται επίσης να υποστεί μια διαδικασία κατά την οποία το spin του διεγερμένου ηλεκτρονίου αντιστρέφεται για να σχηματίσει την σχετικά μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξης των microsecond) διεγερμένη τριπλή κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ηλεκτρόνια με παράλληλα spin<sup>[9]</sup>. Ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής της τριπλής αυτής κατάστασης επιτρέπει την αλληλεπίδραση του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή με τα γειτονικά μόρια και είναι αποδεκτό ότι η επαγωγή των τοξικών προϊόντων που παράγονται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία πραγματοποιείται ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής βρίσκεται σε αυτή την κατάσταση<sup>[12]</sup> (εικόνα A.4).

Αν ονομάσουμε  $S_0$  τη θεμελιώδη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή,  $S_1$  την πρώτη (μονή) διεγερμένη και  $T_1$  την διεγερμένη τριπλή κατάσταση θα έχουμε:

$S_0 + h\nu \rightarrow S_1$  (Απορρόφηση φωτονίων της φωτεινής ακτινοβολίας και μετάβαση από τη θεμελιώδη κατάσταση στην  $1^{\text{n}}$  διεγερμένη)

$S_1 \rightarrow T_1$  (Μετάβαση του φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση μέσω διασυστηματικής διασύνδεσης – intersystem crossing)

$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$  (επιστροφή από την  $1^{\text{n}}$  (μονή) διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη μέσω φθορισμού)

$S_1 \rightarrow S_0 + \text{heat}$  (επιστροφή από την  $1^{\text{n}}$  (μονή) διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη μέσω εσωτερικής μετατροπής και επαγωγής θερμότητας)

$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$  (επιστροφή από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη μέσω φωσφορισμού)

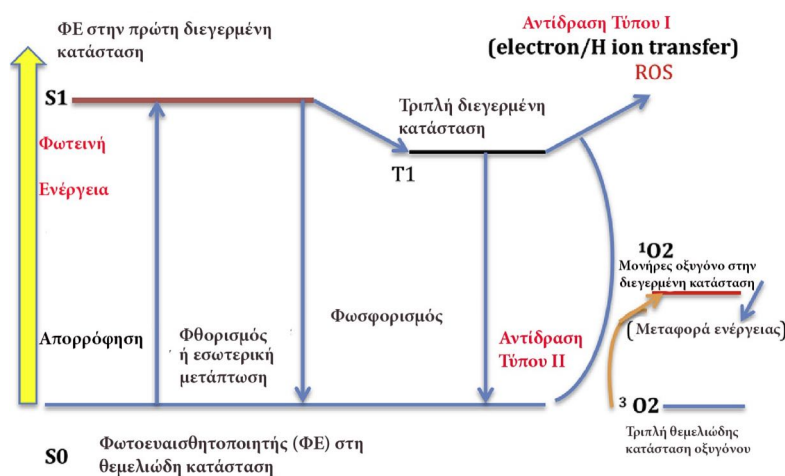
Η ενεργοποιημένη φωτοευαίσθητη ουσία στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση μπορεί να επάγει χημικές αλλαγές-αλλοιώσεις σε γειτονικά μόρια μέσω δύο οδών που είναι γνωστές ως φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και τύπου II (εικόνα A.4).

Η φωτοχημική αντίδραση τύπου I περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων (ή πρωτονίων) στο οξυγόνο ή σε κάποιο άλλο παρεμφερές μόριο με στόχο τη δημιουργία ιοντικών ριζών (ενός ανιόντος ή κατιόντος αντίστοιχα)<sup>[9], [13]</sup>. Οι τελευταίες συνήθως αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν τις λεγόμενες δραστικές μορφές οξυγόνου (radical oxygen species – ROS). Οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I συχνά καταλήγουν στο σχηματισμό ανιόντων

υπεροξειδίου μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από τον διεγερμένο στην τριπλή κατάσταση φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο<sup>[14], [15]</sup>. Το υπεροξείδιο δεν είναι ιδιαίτερα αντιδραστικό στα βιολογικά συστήματα και δεν προκαλεί αρκετή οξειδωτική καταστροφή, έχει τη δυνατότητα όμως να αντιδράσει με τον εαυτό του και να παράγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και οξυγόνο μέσα από μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοοξειδοαναγωγή (dismutation). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα καθώς μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες με ευκολία και επίσης τα κύτταρα δεν μπορούν να το αποβάλλουν<sup>[9]</sup>. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να αντιδράσει με ανιόντα υπεροξειδίου και να σχηματίσει τις πολύ δραστικές υδροξυλικές ρίζες (HO<sup>\*</sup>). Οι τελευταίες μπορούν να αποτελέσουν οξειδωτικούς παράγοντες στην καταστροφή οποιουδήποτε μορίου μέσα στα κύτταρα, και οι ενέργειες ενεργοποίησής τους είναι πολύ χαμηλές. Διαπερνούν επίσης με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες<sup>[13], [16]</sup>.

Οι φωτοτοξικές αντιδράσεις τύπου II χαρακτηρίζονται από την απ' ευθείας μεταφορά ενέργειας από τη φωτοευαίσθητη ουσία που βρίσκεται στη διεγερμένη τριπλή κατάσταση προς το μοριακό οξυγόνο. Το μοριακό οξυγόνο παρουσιάζει μια ξεχωριστή ιδιότητα, καθώς η τριπλή κατάσταση (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) αντιπροσωπεύει τη θεμελιώδη κατάσταση του μορίου. Κατά τη μεταφορά ενέργειας σε μια τέτοιου τύπου αντίδραση, σχηματίζεται το πολύ αντιδραστικό μονήρες οξυγόνο (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Ο χρόνος ζωής του τελευταίου είναι πολύ μικρός (~10-320 ns)<sup>[7]</sup>. Το δραστικό αυτό είδος οξυγόνου είναι πολύ πιο οξειδωτικό από εκείνο στη θεμελιώδη τριπλή κατάσταση και άρα αξιοσημείωτα περισσότερο ηλεκτροφιλικό, αντιδρώντας έτσι γρήγορα με ακόρεστους δεσμούς άνθρακα/άνθρακα, ουδέτερα πυρηνόφιλα όπως σουλφίδια και αμίνες καθώς επίσης και με ανιόντα<sup>[17]</sup>. Οξειδώνεται λοιπόν γρήγορα με βιομόρια<sup>[1]</sup>.

Η κυτταροτοξικότητα που επάγεται μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στις αντιδράσεις τύπου II. Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II στο τελικό αποτέλεσμα της θεραπείας εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος της φωτοευαίσθητης ουσίας, το είδος του ιστού και των κυττάρων που στοχεύονται, το pH αλλά και η συγκέντρωση του οξυγόνου<sup>[9], [11]</sup>.



Εικόνα Α. 4: Φωτοφυσικοί & Φωτοχημικοί μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας<sup>[18]</sup>



## A.4.2 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι – παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τον κυτταρικό θάνατο και η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ικανή να σηματοδοτήσει την εκκίνηση ορισμένων από αυτούς. Η συγκέντρωση, οι φυσικοχημικές ιδιότητες καθώς και οι υποκυτταρικές θέσεις συσσώρευσης της φωτοευαίσθητης ουσίας, η συγκέντρωση του οξυγόνου, το μήκος κύματος αλλά και η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας, τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε είδους κυττάρων, αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τον τρόπο αλλά και το βαθμό του κυτταρικού θανάτου κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία<sup>[19]</sup>. Οι τρεις σημαντικότεροι τρόποι καταστροφής των κυττάρων των θηλαστικών είναι η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία (εικόνα A.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και άλλοι περισσότερο πολύπλοκοι τρόποι όπως είναι ο μιτωτικός κυτταρικός θάνατος, η πολυπυρήνωση και η προγραμματισμένη νέκρωση<sup>[19]</sup>.

### A.4.2.1 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια πολύ περίπλοκη και με πολλά στάδια διαδικασία κυτταρικού θανάτου, η οποία είναι γενετικά κωδικοποιημένη σε κάθε κύτταρο του σώματος. Απαιτεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως είναι οι ενδονουκλεάσες, την αποδόμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα αλλά και την ενεργοποίηση κασπάσεων. Η ενεργοποίηση κυτταρικών υποδοχέων θανάτου αλλά και η μιτοχονδριακή απελευθέρωση του κυτοχρώματος c τελικά οδηγούν στην ενεργοποίηση κασπάσεων όπως είναι οι κασπάσες 3, 6 και 9<sup>[19], [20]</sup>. Αυτές με τη σειρά τους διασπούν τα κυτταρικά υποστρώματα και τελικά προκύπτουν χαρακτηριστικές βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές οι οποίες παρατηρούνται στα κύτταρα που πεθαίνουν<sup>[20], [21]</sup>. Η απόπτωση συνοδεύεται από συρρίκνωση των κυττάρων, την εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, την αποδιάταξη του DNA, τη διάσπαση του κυτταρικού πυρήνα και την αποσυναρμολόγησή του μέσα σε αποπτωτικά κυστίδια<sup>[22]</sup>.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της ανάπτυξης των ιστών και για την ομοιόστασή τους. Είναι μια πολύ καλά οργανωμένη διαδικασία αυτοκτονίας των κυττάρων, η οποία ελέγχεται τόσο από ενδοκυτταρικά όσο και από εξωκυτταρικά σήματα και καταλήγει σε μια χαρακτηριστική ακολουθία από μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές για τη συστηματική διάλυση του κυττάρου και την προετοιμασία των υπολειπόμενων κυτταρικών συστατικών, γνωστών ως αποπτωτικά σώματα, για την περικύκλωσή τους από μακροφάγα των ιστών ή άλλα γειτονικά κύτταρα. Η απόπτωση μειώνει τη διαρροή ενδοκυτταρικού υλικού στο γύρω περιβάλλον και κατ' αυτόν τον τρόπο προλαμβάνει τη φλεγμονή των ιστών. Η απώλεια της ικανότητας ρύθμισης της απόπτωσης οδηγεί σε ασθένεια (πχ καρκίνος)<sup>[23]</sup>.

Έχει αποδειχθεί ότι η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προκαλεί φωτοκαταστροφή στην Bcl-2 και σε άλλες παρεμφερείς αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες και έτσι να ενεργοποιεί προαποπτωτικούς παράγοντες. Επίσης οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και άρα στην ενεργοποίηση των κασπάσεων<sup>[20]</sup>.

#### A.4.2.2 Νέκρωση

Η νέκρωση αποτελεί έναν τρόπο κυτταρικού θανάτου ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια μορφή βίαιου και γρήγορου εκφυλισμού που επηρεάζει εκτεταμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Συνοδεύεται από οίδημα στο κυτταρόπλασμα, καταστροφή των οργανιδίων και διάσπαση της μεμβράνης του πλάσματος, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση ενδοκυτταρικών περιεχομένων και στη φλεγμονή<sup>[19]</sup>. Η νέκρωση αναφέρεται ως ένας τυχαίος κυτταρικός θάνατος ο οποίος οφείλεται σε φυσική ή χημική καταστροφή και θεωρείται απρογραμματίστη διεργασία. Χαρακτηρίζεται από πύκνωση του πυρήνα (ο πυρήνας συρρικνώνεται), κυτταροπλασματικό οίδημα και προοδευτική αποσύνθεση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και όλα τα παραπάνω οδηγούν στον κυτταρικό κατακερματισμό και την απελευθέρωση του υλικού στον εξωκυττάριο χώρο. Στη νέκρωση, η αποσύνθεση προκαλείται κατά κύριο λόγο μέσω πρωτεολυτικής δραστηριότητας, αλλά η ακριβής ταυτότητα των πρωτεασών και των υποστρωμάτων τους είναι γνωστή σε πολύ μικρό βαθμό<sup>[19], [20]</sup>.

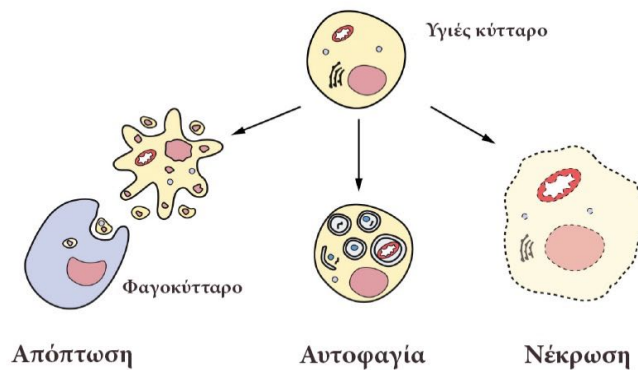
Η μελέτη των παραγόντων που προκαλούν την κυτταρική νέκρωση μετά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν είναι τόσο εύκολη όσο στην περίπτωση της απόπτωσης. Οι κρίσιμοι παράγοντες στον καθορισμό του τύπου του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση ή νέκρωση) μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία είναι το είδος των κυττάρων, η παρουσία μιας ακέραιας σειράς από μηχανισμούς απόπτωσης, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας, η δόση του φωτός που χρησιμοποιείται για την ενεργοποίησή της και η μερική πίεση του οξυγόνου. Είναι πλέον γνωστό ότι η υψηλή δόση φωτοδυναμικής θεραπείας (δηλαδή υψηλή συγκέντρωση φωτοευαίσθητης ουσίας ή υψηλή ροή φωτεινής ακτινοβολίας ή και τα δύο) τείνει να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω της νέκρωσης, ενώ η χορήγηση της θεραπείας σε μικρότερες δόσεις τείνει να προδιαθέσει τα κύτταρα προς τον αποπτωτικό θάνατο<sup>[20]</sup>. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι η φωτοδυναμική θεραπεία είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν επάγει την απόπτωση (είναι προτιμότερη η χρήση χαμηλότερων δόσεων φαρμάκου και φωτός)<sup>[23]</sup>.

#### A.4.2.3 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας καταβολικός κυτταρικός μηχανισμός που επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί μια ισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση, την αποσύνθεση-αποδόμηση αλλά και την ανακύκλωση των κυτταρικών προϊόντων. Υπάρχει μια πληθώρα από αυτοφαγικούς μηχανισμούς και όλοι περιλαμβάνουν τη λυσοσωμική αποδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων αλλά και πρωτεϊνών. Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός ακολουθεί την εξής διαδικασία: Μια δομή διπλής μεμβράνης, γνωστή ως αυτοφαγόσωμα, περικυκλώνει την στοχευμένη περιοχή και δημιουργεί ένα κυστίδιο το οποίο διαχωρίζει τα περιεχόμενά του από τα υπόλοιπα στο κυτταρόπλασμα. Αυτό το κυστίδιο στη συνέχεια μεταφέρεται και συντήκεται με το λυσόσωμα, σχηματίζοντας έτσι μια δομή που ονομάζεται αυτοφαγολυσόσωμα, τα περιεχόμενα του οποίου στη συνέχεια αποδομούνται μέσω των λυσοσωματικών υδρολασών<sup>[20]</sup>. Η αυτοφαγία ενισχύεται περισσότερο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες<sup>[1], [7]</sup>.

Γενικά, τα κύτταρα των θηλαστικών χρησιμοποιούν το μηχανισμό της αυτοφαγίας σαν άμυνα ενάντια στην καταστροφή που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ-ROS)

καθαρίζοντας το κύτταρο από τα οργανίδια που έχουν υποστεί βλάβη. Ανάλογα με τον τύπο των ΔΜΟ και το βαθμό της οξειδωτικής βλάβης, η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να ενεργοποιήσει την αυτοφαγία και εκείνη με τη σειρά της θα δράσει είτε με έναν κυτταροπροστατευτικό τρόπο είτε θα επάγει τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Η αυτοφαγία ενδέχεται να παίξει ρόλο στην επαγόμενη από τη φωτοδυναμική θεραπεία απόπτωση, αλλά οι δύο διεργασίες μπορούν να συμβούν και ανεξάρτητα η μια από την άλλη. Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει τη δυνατότητα να προκαλεί καταστροφή σε διάφορες πρωτεΐνες (πχ Bcl-2, IP3) αλλά και σε οργανίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της αυτοφαγίας όπως είναι τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα<sup>[20]</sup>. Επίσης ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η αυτοφαγία μπορεί να δράσει ως μηχανισμός για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου μετά τη φωτοδυναμική επίδραση<sup>[1], [7]</sup>. Τέλος, μπορούμε να πούμε ότι η φωτοδυναμική θεραπεία έχει τη δυνατότητα να προκαλεί άμεσα τη διεργασία της αυτοφαγίας. Αυτό είναι ανεξάρτητο από τον στόχο του φωτοευαίσθητοποιητή καθώς η αυτοφαγία παρατηρήθηκε με φωτοευαίσθητες ουσίες που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα<sup>[20]</sup>.



Εικόνα Α. 5: Τρόποι κυτταρικού θανάτου

## A.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία πρόκειται για μια ελκυστική και καινοτόμο θεραπευτική μέθοδο η οποία εφαρμόζεται με επιτυχία αλλά και είναι στενά συνδεδεμένη με την διαρκή έρευνα. Από τη μια πλευρά τα πλεονεκτήματά που παρουσιάζει αλλά και από την άλλη οι προκλήσεις, τα ερωτήματα που δημιουργούνται γύρω από εκείνη, την καθιστούν έναν τομέα που είναι στενά συνυφασμένος με τη διεπιστημονική έρευνα καθώς και την αναζήτηση τρόπων με τους οποίους η εφαρμογή της θα γίνει όσο το δυνατόν πιο βοηθητική και αποτελεσματική.

Η φωτοδυναμική θεραπεία:

- Είναι μια ελάχιστα επεμβατική θεραπεία.
- Έχει εξαιρετικά αισθητικά αποτελέσματα.
- Είναι σε μεγάλο βαθμό αποτελεσματική. Οδηγεί περίπου σε 80% κυτταρικό θάνατο.
- Έχει περιορισμένες παρενέργειες όπως επίσης και ειδική επιλεκτικότητα (συσσώρευση φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς όγκους), σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως είναι η χημειοθεραπεία ή η ραδιοθεραπεία.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε πριν είτε μετά από τη χημειοθεραπεία, τη ραδιοθεραπεία ή την εγχείρηση χωρίς να επηρεάζει τα ιατρικά αποτελέσματα των παραπάνω μεθόδων.
- Μπορεί να εφαρμοστεί όταν η χειρουργική επέμβαση είναι αδύνατη. Η φωτοδυναμική θεραπεία σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα χωρίς όμως να καταστρέφει τις δομές του κολλαγόνου των ιστών, και τα υγιή κύτταρα θα ανασυστήσουν τις δομές αυτές. Επομένως στις περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο που δεν γίνεται να αφαιρεθεί στο χειρουργείο (πχ στους άνω βρόγχους του πνεύμονα), η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να θεραπεύσει το σημείο.
- Μπορεί να εφαρμοστεί και σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον.
- Παρέχει τη δυνατότητα για αντιμετώπιση πολλαπλών καρκινωμάτων ταυτόχρονα.
- Επιτρέπει την επιλεκτική καταστροφή των όγκων αφήνοντας έτσι τους υγιείς ιστούς άθικτους.
- Έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί επανειλημμένα (σε αντίθεση με τη ραδιοθεραπεία πχ). Με τον τρόπο αυτό, προσφέρει ένα μέσο για την μακροπρόθεσμη αντιμετώπιση του καρκίνου, ακόμη και αν η πλήρης ίαση δεν είναι εφικτή<sup>[5], [6], [7], [10], [12], [18], [24]</sup>.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη διάγνωση όσο και για τη θεραπεία.

- Μπορεί να λειτουργήσει ως διαμεσολαβητής μιας ανοσολογικής αντίδρασης η οποία προκαλεί καταστροφή των κυττάρων του όγκου σε διαφορετικά σημεία.
- Χρησιμοποιεί φωτοευαίσθητοποιητές οι οποίοι στην πλειοψηφία τους δεν συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων. Έτσι η πιθανότητα η φωτοδυναμική θεραπεία να προκαλέσει αλλοιώσεις στο DNA, μεταλλάξεις και καρκινογένεση είναι πολύ μικρή.
- Έχει τη δυνατότητα, στην περίπτωση ασθενών με καρκίνο σε προηγμένο στάδιο, να βελτιώσει την ποιότητα της ζωής αλλά και να παρατείνει την επιβίωση.
- Ακόμα και αν προκαλέσει καταστροφή των γύρω υγιών ιστών, το αισθητικό αποτέλεσμα μετά από 2-3 μήνες είναι εξαιρετικό. Οι ιστοί θεραπεύονται δηλαδή σε μικρό χρονικό διάστημα.
- Χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, σε αντίθεση με άλλες διαθέσιμες θεραπείες για τον καρκίνο.
- Αποφεύγει τη συστηματική θεραπεία. Η θεραπεία λειτουργεί μόνο υπό την παρουσία φωτός και ως εκ τούτου ο ασθενής δεν υποβάλλεται σε περιττή συστηματική θεραπεία. Παρενέργειες όπως η πτώση των μαλλιών, η ναυτία αλλά και ακόμα πιο σοβαρές μπορούν να αποφευχθούν.
- Δεν απαιτεί τη διαμονή στο νοσοκομείο.
- Μέσω του φθορισμού της φωτοευαίσθητης ουσίας, επιτρέπει την ανίχνευση και τον εντοπισμό του νεοπλασματικού ιστού in vivo και παρέχει ένα εύχρηστο μέσο για τον έλεγχο της συγκέντρωσής του.
- Παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση ορισμένων περιπτώσεων καρκίνου. Τέτοιοι είναι, για παράδειγμα, ο καρκίνος του δέρματος αλλά και ο καρκίνος του οισοφάγου τύπου Barrett.
- Θέτει το έδαφος για πολύπλευρη διεπιστημονική έρευνα, εξελίσσεται διαρκώς παράλληλα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας καθώς και διαθέτει αναρίθμητες δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη.

Έχουν περάσει περισσότερα από 25 χρόνια από τότε που η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάστηκε ως πολύτιμο εργαλείο στον τομέα της ογκολογίας αλλά παρόλα αυτά ακόμα και σήμερα η χρήση της σε κλινικό επίπεδο είναι αρκετά περιορισμένη. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε ορισμένες παραμέτρους οι οποίες θα πρέπει να ερευνηθούν και να λυθούν με στόχο την εξέλιξη της συγκεκριμένης θεραπευτικής διαδικασίας αλλά και την ευρεία χρήση της. Έτσι λοιπόν, η φωτοδυναμική θεραπεία:

- Αδυνατεί να θεραπεύσει όγκους μεγάλου μεγέθους καθώς και καρκίνους που βρίσκονται σε μεταστατικό στάδιο. Αυτό συμβαίνει καθώς η ακτινοβολήση ολόκληρου του σώματος με κατάλληλες δόσεις δεν είναι δυνατή. Επίσης, η φωτεινές πηγές δεν έχουν τη δυνατότητα να διαπεράσουν μεγάλους όγκους ή να φτάσουν σε περιοχές όπου ενδέχεται να έχει παρουσιαστεί η μετάσταση.
- Ενδέχεται, ανάλογα με τη φωτοευαίσθητη ουσία που χρησιμοποιείται την εκάστοτε φορά, να προκαλέσει στο σώμα του ασθενούς αυξημένη φωτοευαισθητοποίηση για μεγάλο χρονικό διάστημα (ακόμη και μερικούς μήνες) μετά την εφαρμογή της.
- Αδυνατεί να θεραπεύσει όγκους που βρίσκονται βαθιά στο σώμα και οι οποίοι δεν είναι εύκολα προσβάσιμοι χωρίς τη χειρουργική επέμβαση λόγω της χαμηλής διείσδυσης του ορατού φωτός στους ιστούς.
- Έχει ανεπιτυχή αποτελέσματα σε όγκους που περιβάλλονται από νεκρωτικό ιστό ή σε πυκνές μάζες όγκων. Αυτό συμβαίνει καθώς η οξυγόνωση των ιστών και των όγκων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διέγερση της φωτοδυναμικής αντίδρασης.
- Παρότι έχει εφαρμοστεί σε χιλιάδες ασθενείς τα τελευταία 25-30 χρόνια, οι περισσότερες μελέτες έχουν συμπεριλάβει μόνο λίγους ασθενείς, συνήθως έχουν οδηγήσει σε ανεπίσημα αποτελέσματα και τελικά τα συμπεράσματα δεν είναι επαρκώς πειστικά για να πείσουν τους ιατρούς και τους φορείς υγειονομικών υπηρεσιών για τα οφέλη της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Παρουσιάζει δυσκολίες όσον αφορά τη διάγνωση και την αξιολόγηση της πορείας της.
- Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους γύρω ιστούς αν η δοσιμετρία δεν είναι με ακρίβεια υπολογισμένη.

Επίσης:

- Οι συνδυασμοί φωτοευαίσθητων ουσιών και πηγών φωτός που έχουν εφαρμοστεί μέχρι σήμερα δεν έχουν καταφέρει να προσφέρουν σαφή και σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με εναλλακτικές λύσεις που έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες. Το γεγονός αυτό προκύπτει πιθανόν επειδή οι συνδυασμοί φωτοευαισθητοποιητών και πηγών φωτός ενώ έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στο να εδραιώσουν τη βιωσιμότητα αλλά και τη δυνατότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας να εφαρμόζεται, δεν ήταν οι βέλτιστοι στα πλαίσια της αποτελεσματικότητας.
- Λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη συναίνεσης μεταξύ των ερευνητών σχετικά με τη συγκέντρωση του εκάστοτε φωτοευαισθητοποιητή αλλά και την ιδανική δόση του φωτός που πρέπει να χρησιμοποιείται για την ασφαλή και αποτελεσματική κλινική εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες έτσι ώστε να προσδιοριστεί το βέλτιστο πρωτόκολλο για την ευρεία εφαρμογή της.

- Οι περισσότεροι φωτοευσθητοποιητές που είναι διαθέσιμοι στις μέρες μας είναι υδρόφοβοι με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Ως εκ τούτου, συσσωματώνονται εύκολα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο ριζικά τις κβαντικές αποδόσεις της παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS). Ακόμη και στην περίπτωση τροποποιημένων φαρμάκων για αυξημένη διαλυτότητα στο νερό, η επιλεκτική συσσώρευσή τους στους ιστούς / κύτταρα στόχους παραμένει ανεπαρκής για την επιτυχή κλινική εφαρμογή της θεραπείας. Στο πλαίσιο αυτό, καθίσταται πολύ σημαντική η ανάπτυξη αποτελεσματικών συστημάτων που να ενσωματώνουν και να μεταφέρουν τους φωτοευσθητοποιητές στους ιστούς / κύτταρα στόχους για την αντιμετώπιση κρίσιμων βιολογικών φραγμών που περιορίζουν τις δυνατότητες της συμβατικής εφαρμογής της θεραπείας<sup>[5], [6], [10], [25], [26], [27]</sup>.

Συνοψίζοντας, οι περιορισμοί που προκύπτουν γύρω από τη φωτοδυναμική θεραπεία δεν σημαίνουν ότι είναι μια μη αποτελεσματική θεραπευτική μέθοδος. Αντιθέτως, το μέλλον της είναι συνυφασμένο με τη διαρκή έρευνα και αυτό διότι η πιθανή ανάπτυξή της θα προσφέρει μια καινοτόμο διαδικασία αντιμετώπισης του καρκίνου που θα μπορεί να εφαρμόζεται σε κλινικό επίπεδο ευρέως. Οι μελέτες που διεκπεραιώνονται τείνουν προς τη δημιουργία βελτιωμένων φαρμάκων – φωτοευσθητοποιητών οι οποίοι θα διακρίνονται από μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και θα μπορούν να χορηγούνται χωρίς τον κίνδυνο της παρατεταμένης φωτοευσθησίας. Εάν τέτοιου είδους ουσίες μπορέσουν να δημιουργηθούν, τότε τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας όσον αφορά την ελάχιστη επεμβατικότητα της, την ευκολία στην εφαρμογή της (τόσο για τον ασθενή όσο και για το ιατρικό προσωπικό), το χαμηλό κόστος της θα της προσδώσουν καθοριστικό ρόλο στον τομέα της ογκολογίας.

## Κεφάλαιο Β: Φωτοευαισθητοποιητές



## B.1 Τί είναι ένας φωτοευαισθητοποιητής και ποιες προϋποθέσεις πρέπει να πληρούνται έτσι ώστε μια ένωση να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαισθητοποιητής.

Όπως έχει προαναφερθεί, η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια κλινικά αποδεδειγμένη, ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική οδός η οποία μπορεί να επάγει μια επιλεκτική κυτταροτοξική αντίδραση ενάντια σε κακοήγη κύτταρα. Η διαδικασία εξαρτάται από 3 βασικούς παράγοντες – μια φωτοευαίσθητη ουσία, το φως καθώς και το οξυγόνο – και περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο τη χορήγηση της ουσίας αυτής στον ασθενή. Στην πορεία ακολουθεί ακτινοβολία σε μήκος κύματος αντίστοιχο του πεδίου απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή. Με την παρουσία του οξυγόνου, μια σειρά γεγονότων οδηγούν σε απευθείας καταστροφή των κυττάρων του όγκου, βλάβες στο μικροαγγειακό σύστημα καθώς και σε επαγωγή τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης<sup>[7]</sup>. Οι φωτοευαισθητοποιητές λοιπόν διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή της θεραπείας και έτσι η εκτενής ανάλυση τους καθίσταται αδήριτη ανάγκη.

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι ως φωτοευαισθητοποιητές θεωρούνται χημικές ενώσεις οι οποίες είναι ικανές να απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και να μετατρέπουν την τελευταία σε χρήσιμη ενέργεια. Στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας αυτό πρέπει να περιλαμβάνει την παραγωγή θανατηφόρων κυτταροτοξικών προϊόντων<sup>[12]</sup>. Τέτοιου είδους προϊόντα είναι το μονήρες οξυγόνο και οι ελεύθερες ρίζες και αυτά προκύπτουν μετά την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών αντιδράσεων τύπου I και τύπου II η οποία ακολουθεί τη διέγερση των φωτοευαισθητοποιητών από τη φωτεινή ακτινοβολία<sup>[1], [12]</sup>. Υπάρχουν εκατοντάδες φυσικές αλλά και συνθετικές χρωστικές ουσίες, από ουσίες εξαγόμενες από φυτά έως και περίπλοκες συνθετικές μακροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία. Το κυρίαρχο χαρακτηριστικό όλων αυτών είναι η ικανότητά τους να συγκεντρώνονται επιλεκτικά στους ιστούς που παρουσιάζουν πρόβλημα (ιστούς – στόχους) και στη συνέχεια να οδηγούν στην παραγωγή κυτταροτοξικών προϊόντων έτσι ώστε να επάγεται το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα<sup>[7], [12]</sup> (εικόνα Β. 1).

<b>Μηχανισμοί με τους οποίους οι <u>φωτοευαισθητοποιητές</u> εκμεταλλεύονται την ενέργεια του φωτός για να βλάψουν ή να καταστρέψουν τον ιστό – στόχο:</b>	
<u>Φωτοευαισθητοποιητής + Φωτεινή ακτινοβολία</u>	→ <u>Ενεργοποιημένος φωτοευαισθητοποιητής</u>
<u>Ενεργοποιημένος φωτοευαισθητοποιητής + Οξυγόνο</u>	→ <u>Φωτοευαισθητοποιητής + ενεργοποιημένο μονήρες οξυγόνο</u>
<u>Ενεργοποιημένο οξυγόνο + στόχος</u>	→ <u>Οξειδωμένος (κατεστραμμένος) στόχος</u>

Εικόνα Β. 1: Μηχανισμοί με τους οποίους οι φωτοευαισθητοποιητές εκμεταλλεύονται την ενέργεια του φωτός για να βλάψουν ή να καταστρέψουν τον ιστό – στόχο

Ποιες όμως παράμετροι καθορίζουν τον ιδανικό φωτοευαισθητοποιητή;

Οι περισσότεροι από τους φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου βασίζονται σε τετραπυρρολική δομή, παρόμοια με αυτή της πρωτοπορφυρίνης

που περιέχεται στην αιμογλομπίνη. Ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι μια καθαρή ένωση η οποία να επιτρέπει την ανάλυση ελέγχου της ποιότητάς της καθώς και να χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος παραγωγής και καλή σταθερότητα κατά την αποθήκευση<sup>[7]</sup>. Είναι απαραίτητο η ουσία αυτή να είναι εμπορικά διαθέσιμη σε παγκόσμιο επίπεδο έτσι ώστε οι ασθενείς των οποίων η κατάσταση θα βελτιωνόταν μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας, να μπορούν να την δοκιμάσουν. Επίσης ο εμπορικά διαθέσιμος και εγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής οφείλει να κατασκευάζεται με αυστηρές προδιαγραφές με στόχο να επιτρέπεται μια ενιαία αναπαραγωγή του προϊόντος. Για τον κατασκευαστή η διαδικασία τη σύνθεσης θα πρέπει να είναι αποτελεσματική και αξιόπιστη έτσι ώστε να επιτρέπεται εξαιρετική συνθετική απόδοση και να έχουμε πανομοιότυπο φωτοευαισθητοποιητή από παρτίδα σε παρτίδα. Το ίδιο το φάρμακο θα πρέπει να μπορεί να μεταφέρεται εύκολα και σε σταθερή κατάσταση, και αν χρειαστεί ανασύστασή του, θα πρέπει αυτή να είναι δυνατή από τοπικά φαρμακεία και εκπαιδευμένους φαρμακοποιούς χωρίς φυσικά την ανάγκη επιμέρους εξειδικευμένων εργαστηρίων<sup>[28], [29]</sup>. Όπως προαναφέρθηκε, το κόστος της φωτοευαισθητικής ουσίας οφείλει να μην είναι υψηλό και αυτό διότι ένα απαγορευτικά ακριβό προϊόν δεν θα επιτρέπει την ευρεία χρήση του. Σε συνέχεια των χαρακτηριστικών που δόθηκαν παραπάνω, η φωτοευαισθητική ουσία οφείλει επίσης να επιτρέψει μια θεραπεία χωρίς πόνο. Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η δυνατότητα της να διεξάγεται σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον. Σε περίπτωση, λοιπόν, ενδεχόμενης χρήσης φωτοευαισθητοποιητών που προκαλούσαν πόνο κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και μετά από αυτή η εφαρμογή της εκτός νοσοκομείου θα ήταν πολύ πιο δύσκολη<sup>[7], [30]</sup>.

Οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει επίσης να έχουν χαμηλά επίπεδα τοξικότητας (έλλειψη τοξικότητας με την απουσία ακτινοβολίας) και ο μεταβολισμός τους να μην οδηγεί στη δημιουργία νέων τοξικών παραγώγων. Είναι προφανές για παράδειγμα ότι δεν είναι επιθυμητό έπειτα από τη χορήγησή τους να προκαλούν στον ασθενή διαταραχές όπως υπόταση ή αλλεργική αντίδραση<sup>[9], [30]</sup>. Θα πρέπει επίσης να έχουν μια υψηλή κορυφή απορρόφησης στο διάστημα μεταξύ 600 – 800 nm (κόκκινο – βαθύ κόκκινο)<sup>[7]</sup>. Ζώνες απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος παρουσιάζουν πιο περιορισμένη διεισδυτικότητα στους ιστούς και είναι πιθανότερο να οδηγήσουν σε αυξημένη φωτοευαισθητοποίηση του δέρματος. Ζώνες απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (> 800 nm) είναι συνδεδεμένες με το γεγονός ότι τα φωτόνια δεν θα έχουν αρκετή ενέργεια έτσι ώστε να διεγείρουν τα μόρια του οξυγόνου και αυτά με τη σειρά τους να μεταβούν από τη θεμελιώδη κατάσταση στη μονήρη κατάσταση. Εφόσον η διεισδυτικότητα του φωτός στους ιστούς αυξάνεται με το μήκος κύματος, ουσίες με ισχυρή απορρόφηση στο βαθύ κόκκινο χρώμα, όπως είναι οι χλωρίνες, οι βακτηριοχλωρίνες και οι φθαλοκυανίνες, προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα στον έλεγχο των όγκων<sup>[7], [9], [30]</sup>.

Στη συνέχεια ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που πρέπει ο φωτοευαισθητοποιητής να πληροί είναι η επιλεκτικότητα, δηλαδή πρέπει να έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται στους ιστούς στόχους και όχι στις γύρω υγιείς περιοχές. Επίσης είναι σημαντικό η ουσία αυτή να μπορεί να διαλύεται εύκολα σε υδατικό περιβάλλον καθώς οι φωτοευαισθητοποιητές που διαλύονται εύκολα στο νερό μεταφέρονται με ευκολία στο σώμα<sup>[3], [30]</sup>. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι διεξάγονται πολυάριθμες έρευνες όσον αφορά το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων – φωτοευαισθητοποιητών (πχ μέσω νανοσωματιδίων ή λιποπρωτεϊνών) με στόχο την ενίσχυση της πρόσληψης της ουσίας

από τον εκάστοτε ιστό και επομένως την αύξηση της αποδοτικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ένα ιδανικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων θα πρέπει να επιτρέπει την επιλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή εντός του πάσχοντος ιστού καθώς και την παράδοση των θεραπευτικών συγκεντρώσεων της ουσίας στη θέση – στόχο με μικρή ή καθόλου πρόσληψη από κύτταρα μη – στόχους. Ο μεταφορέας θα πρέπει επίσης να είναι σε θέση να ενσωματώνει τον φωτοευαισθητοποιητή χωρίς απώλεια ή αλλοίωση της δραστηριότητάς του. Τέλος, λόγω της υψηλής πιθανότητας για επαναλαμβανόμενη δοσολογία, το σύστημα οφείλει επίσης να είναι βιοδιασπώμενο και να παρουσιάζει μικρή ή καθόλου ανοσογονικότητα<sup>[31], [32], [33]</sup>.

Ακόμη, η φαρμακοκινητική αποβολή της ουσίας από τον ασθενή είναι ανάγκη να είναι ταχεία (συνήθως λιγότερο από μια μέρα) με στόχο να αποφευχθεί η προστασία του μετά τη θεραπεία από την έκθεση στο φως και την παρατεταμένη φωτοευαισθησία του δέρματος<sup>[9], [30]</sup>. Ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι σε θέση να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μορφές θεραπείας όπως είναι η χειρουργική επέμβαση, η ραδιοθεραπεία και η χημειοθεραπεία. Μια ουσία που εμποδίζει την εφαρμογή των τελευταίων δεν θα έχει επιτυχία σε κλινικό επίπεδο<sup>[3], [30]</sup>.

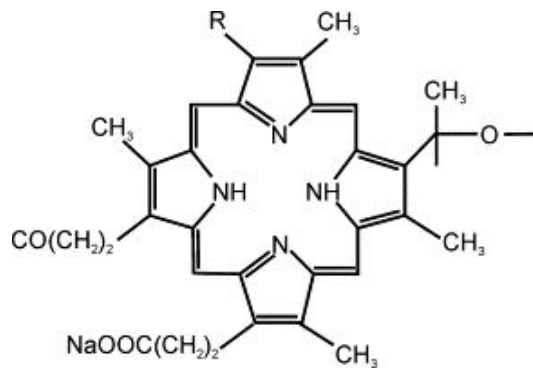
Σε τελευταίο στάδιο, πολύ σημαντικός είναι και ο ρόλος του φθορισμού. Σε αρκετούς φωτοευαισθητοποιητές, η ενέργεια του φωτός που απορροφάται μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο φαινόμενο του φθορισμού. Αυτή η ορατή απελευθέρωση φωτός έχει μια πληθώρα εποικοδομητικών χαρακτηριστικών και καθορίζει έναν επιτυχημένο φωτοευαισθητοποιητή. Πρώτον επιτρέπει την απεικόνιση του στόχου. Κάτι τέτοιο έχει τεράστια σημασία στην περίπτωση που είναι προγραμματισμένο να γίνει πρώτα εκτομή του όγκου και μετά φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης, μεταβολές στον φθορισμό μπορούν να αποτελέσουν τμήμα ενός ακριβούς και σε πραγματικό χρόνο εφαρμοσμένου συστήματος δοσιμετρίας της φωτοδυναμικής θεραπείας το οποίο επιτρέπει στον χειριστή να προσδιορίζει εάν η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν επαρκής για την καταστροφή του καρκίνου κατά τη διάρκεια της θεραπείας<sup>[3], [34], [35]</sup>.

## B.2 Κατηγορίες και γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς. Στους 1<sup>ης</sup> γενιάς ανήκουν φωτοευαισθητοποιητές οι οποίοι βασίζονται στη δομή της πορφυρίνης και συμπεριλαμβάνονται η αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγά της. Οι φωτοευαισθητοποιητές 2<sup>ης</sup> γενιάς αναπτύχθηκαν με βάση τα ελαττώματα που παρουσίασαν οι φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup> γενιάς. Έχουν διάφορες δομές όπως πορφυρίνες, διευρυμένες πορφυρίνες, παράγωγα χλωροφύλλης, χλωρίνες, φθαλοκυανίνες<sup>[3]</sup>. Οι φωτοευαισθητοποιητές 3<sup>ης</sup> γενιάς περιλαμβάνουν φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς οι οποίοι είναι συζευγμένοι με μόρια – μεταφορείς με σκοπό την πιο επιλεκτική στόχευση καρκινικών όγκων<sup>[1],[17]</sup>.

### B.2.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup> γενιάς

Οι φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup> γενιάς είναι στην ουσία τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης όπως είναι πχ η Photofrin και αποτελούν τους περισσότερο διαδεδομένους φωτοευαισθητοποιητές<sup>[36]</sup>. Η Photofrin (εικόνα B.2) είναι ένας συνδυασμός μονομερών, διμερών και ολιγομερών που προέρχονται από χημική τροποποίηση της αιματοπορφυρίνης<sup>[37]</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι στάθηκε πολύ δύσκολο για τους ερευνητές να προσδιορίσουν την ακριβή χημική δομή της ουσίας αυτής και να αναγνωρίσουν τα συστατικά της<sup>[38], [39]</sup>. Παρουσιάζονταν διάφορες αλλαγές στις παρτίδες της Photofrin και οι προσπάθειες να απομονωθούν τα μεμονωμένα μόρια από τα οποία αποτελούνταν η ουσία συνήθως κατέληγε στη σύνθεση μιγμάτων τόσο περίπλοκων όσο και η αρχική ουσία<sup>[40]</sup>. Παρότι μπορούμε με βεβαιότητα να αποφανθούμε για την ύπαρξη ολιγομερών αιματοπορφυρίνης, δεν είναι σίγουρο αν αυτά είναι κατά κύριο λόγο αιθέρες ή εστέρες. Όταν οι αβεβαιότητες αυτές συνδυάστηκαν με κάποιες επιμέρους αρνητικές συνέπειες της Photofrin, ο ενθουσιασμός για τη χρήση της σε ευρύ φάσμα εφαρμογών μειώθηκε αισθητά. Οι αρνητικές συνέπειες αυτές περιλαμβάνουν στην ουσία το γεγονός ότι το δέρμα του ανθρώπου στον οποίο έχει χορηγηθεί ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής παραμένει πολύ ευαίσθητο στην παρουσία φωτός για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση. Κάτι τέτοιο δεν είναι επιθυμητό διότι οι ασθενείς είναι κατά αυτόν τον τρόπο υποχρεωμένοι να αποφεύγουν το ηλιακό φως για χρονικό διάστημα που συνήθως φτάνει τις 6 – 12 εβδομάδες, με αποτέλεσμα να μειώνεται το επίπεδο της ζωής τους. Επίσης η ουσία αυτή παρουσιάζει πολύ μικρή απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας σε μήκος κύματος ίσο με 630 nm ενώ δεν απορροφά για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 650 nm. Η μέγιστη κορυφή απορρόφησης παρατηρείται στα 400 περίπου nm. Αν και στα 630 nm η απορρόφηση είναι μικρή, αυτό είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο, αφού σε αυτό το μήκος κύματος η διεισδυτικότητα της ακτινοβολίας στους ιστούς είναι καλή ενώ επίσης για μήκη κύματος 650 – 800 nm μπορεί να επιτευχθεί νέκρωση των κυττάρων. Το φως των 625 nm μπορεί να διεισδύσει σε μήκος 5 – 10 mm στον ιστό, ανάλογα και με τη συγκέντρωση της φωτοευαισθητικής ουσίας σε αυτόν, με ένταση ικανή να προκαλέσει τις επιθυμητές φωτοδυναμικές αντιδράσεις. Η συμβολή της στη διάγνωση των καρκινικών όγκων δεν ήταν τόσο σημαντική όσο αναμενόταν<sup>[7], [9]</sup>.



Εικόνα Β. 2: Μοριακή δομή της Photofrin

Γενικά, η Photofrin χορηγείται σε ποσότητα 2mg/kg. Περίπου 48 ώρες μετά τη χορήγησή πραγματοποιείται η έκχυση φωτεινής ακτινοβολίας. Τα κλινικά αποτελέσματα είναι πολύ ενδιαφέροντα<sup>[30]</sup>. Έχει γίνει αποδεκτή σε διάφορες χώρες για τη θεραπεία του καρκίνου στον πνεύμονα σε πρώιμο αλλά και προχωρημένο στάδιο, για την αντιμετώπιση επιφανειακού αλλά και προχωρημένου καρκίνου στον οισοφάγο, καρκίνου της ουροδόχου κύστης, επιφανειακού καρκίνου στο στομάχι καθώς και καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας σε αρχικό στάδιο. Επιπροσθέτως, η Photofrin ερευνάται ως πιθανή λύση για τη θεραπεία του σαρκώματος Karosi<sup>[41]</sup> αλλά και καρκίνων στον εγκέφαλο, τα έντερα, το μαστό, το δέρμα και το θώρακα. Άλλες περιπτώσεις αφορούν παθήσεις όπως ο οισοφάγος του Barrett, η ψωρίαση και η αρτηριακή επαναστένωση, όπου η χρήση της Photofrin μελετάται σε κλινικές δοκιμές με ικανοποιητικά αποτελέσματα<sup>[12], [30]</sup>.

## B.2.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς

Η Photofrin είναι γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες εφαρμογές. Παρόλα αυτά, τα δύο βασικά μειονεκτήματα των παραγώγων της αιματοπορφυρίνης όσον αφορά την πρόκληση της αυξημένης φωτοευαισθησίας στον ασθενή για μεγάλο χρονικό διάστημα αλλά και την χαμηλή απορρόφηση στα 630 nm και πάνω (εκεί δηλαδή όπου η διεισδυτικότητα του φωτός στους ιστούς αποκτά πολύ ικανοποιητικές τιμές) οδήγησαν τον επιστημονικό κόσμο στην αναζήτηση νέων, καταλληλότερων φωτοευαισθητοποιητών<sup>[12], [42]</sup>.

Έτσι λοιπόν μπορούμε να πούμε ότι οι φωτοευαισθητοποιητές 2<sup>ης</sup> γενιάς αποτελούν χημικές τροποποιήσεις εκείνων της 1<sup>ης</sup> γενιάς<sup>[1]</sup>. Μέσα από διάφορες μελέτες, συνθετικά τέτοιου είδους όπως μια πληθώρα πορφυρίνων, χλωρινών, βακτηριοχλωρινών, πουργουρίνων, τεξαφυρίνων, φθαλοκυανίνων<sup>[10]</sup> και άλλων χημικά παρόμοιων ενώσεων, αποδείχθηκαν ως ικανοί φωτοευαίσθητοι παράγοντες. Η ζώνη της απορρόφησης μετατοπίστηκε και σε αντίθεση με την πολύ χαμηλή απορρόφηση της Photofrin στα 630 nm, επιτεύχθηκε υψηλή απορρόφηση στο εύρος μεταξύ 660 – 800 nm. Αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς η φωτεινή ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος σκεδάζεται εύκολα από τους βιολογικούς ιστούς και διεισδύει σε πολύ μικρό ποσοστό σε αντίθεση με φωτεινή ακτινοβολία κοντά στο υπέρυθρο φως που μπορεί να εισχωρήσει σε μήκος > 1cm. Μια ακόμη πολύ σημαντική παράμετρος ήταν ότι οι νέοι αυτοί φωτοευαισθητοποιητές αποβάλλονταν γρήγορα από το κυκλοφοριακό σύστημα και το δέρμα με αποτέλεσμα να απαιτείται μόνο ένα μικρό χρονικό διάστημα (από τη στιγμή της χορήγησης της ουσίας) προστασίας των ασθενών από το φως<sup>[4]</sup>. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι υδροφοβικοί και αυτό συνδέεται με το γεγονός ότι

υφίσταται ισχυρότερη πρόσληψή τους από τους όγκους σε σχέση με αυτή από τους υγιείς ιστούς. Από την άλλη πλευρά όμως πρέπει να αναφέρουμε ότι οι φωτοευαισθητοποιητές 2<sup>ης</sup> γενιάς συγκεντρώνονται στους όγκους μέσω παθητικού μηχανισμού διάδοσης (passive diffusion mechanism). Οι υδροφοβικές ιδιότητές τους επίσης προκαλούν προβλήματα χαμηλής διαλυτότητας<sup>[43]</sup>.

Φωτοευαισθητοποιητής	Δομή	Μήκος κύματος (nm)	Εγκεκριμένος	Δοκιμές	Μορφές καρκίνων
Photofrin (HPD)	πορφυρίνη	630	Παγκοσμίως		Πνεύμονας, οισοφάγος, εγκέφαλος, ουροδόχος κύστη κ.α.
ALA	πρόδρομος πορφυρίνης	635	Παγκοσμίως		Δέρμα, ουροδόχος κύστη, οισοφάγος, εγκέφαλος
ALA esters	πρόδρομος πορφυρίνης	635	Ευρώπη		Δέρμα, ουροδόχος κύστη
Foscan (mTHPC)	χλωρίνη	652	Ευρώπη		Κεφάλι και λαιμός, πνεύμονας, εγκέφαλος, δέρμα
Verteporfin	χλωρίνη	690	Παγκοσμίως		Οφθαλμός, πάγκρεας, δέρμα
HPPH	χλωρίνη	665		ΗΠΑ	Κεφάλι και λαιμός, οισοφάγος, πνεύμονας
Purlytin (SnEt2)	χλωρίνη	660		ΗΠΑ	Δέρμα, μαστός
Talporfin, LS11, MACE, Npe6	χλωρίνη	660		ΗΠΑ	Συκώτι, εγκέφαλος, έντερο
Fotolon (PVP-Ce6), Radachlorin, Photodithazine	χλωρίνη	660		Ρωσία	Σάρκωμα, εγκέφαλος, ρινοφάρυγγας
Silicon phthalocyanine (PC4)	Φθαλοκυανίνη	675		ΗΠΑ	Δερματικό λέμφωμα κυττάρων T
Padoporfin	Βακτηριοχλωρίνη	762		ΗΠΑ	Προστάτης
Motexafin lutetium (LuTex)	Τεξαφυρίνη	732		ΗΠΑ	Μαστός

Πίνακας Β. 1: Φωτοευαισθητοποιητές 2<sup>ης</sup> γενιάς<sup>[7]</sup>

### B.2.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3<sup>ης</sup> γενιάς

Λαμβάνοντας υπόψιν όσα έχουν αναλυθεί μπορούμε να αποφανθούμε ότι η φωτοδυναμική θεραπεία απαιτεί υψηλή επιλεκτικότητα από τους φωτοευαισθητοποιητές όσον αφορά τη στόχευση των καρκινικών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, η συσσώρευση των φωτοευαίσθητων ουσιών στο δέρμα θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη και από την άλλη πλευρά είναι ανάγκη να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό συγκέντρωσης των φαρμάκων αυτών στους όγκους σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στους γύρω υγιείς ιστούς. Μέσω αυτού μπορούμε να ελαχιστοποιήσουμε την καταστροφή από το φως των ιστών που βρίσκονται στα περίξ του όγκου, ειδικά σε περιπτώσεις όπου η περιοχή ακτινοβολήσης πρέπει εκτός από τα καρκινικά κύτταρα να περιλαμβάνει και κοντινούς υγιείς ιστούς έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ολική εξάλειψη του όγκου<sup>[44], [45]</sup>.

Μια πληθώρα ερευνών έχει εστιάσει στην αναζήτηση των φωτοευαισθητοποιητών 3<sup>ης</sup> γενιάς η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων φωτοευαισθητοποιητών με στόχο τη βελτίωση των φαρμακολογικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους<sup>[1], [30]</sup>. Σε αυτού του είδους τις τροποποιήσεις ανήκουν η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών σε βιομόρια, όπως είναι για παράδειγμα τα μονοκλωνικά αντισώματα, η σύζευξη με τη χρήση λιποπρωτεϊνών καθώς και η πρόσδεση ή ο εγκλεισμός των ουσιών αυτών σε συστήματα μεταφοράς (πχ νανοσωματίδια). Ακόμη, ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητών με λιποσώματα, αιωρήματα ελαίου, βιοδιασπώμενα πολυμερή και υδρόφιλα πολυμερή χρησιμοποιείται για την αύξηση της επιλεκτικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας<sup>[1], [26], [46]</sup>.

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια σφαιρικού σχήματος στα οποία μια μεμβράνη λιπιδικής διπλοστοιβάδας που αποτελείται από αυτοσυγκροτούμενα μόρια φωσφολιπιδίων εγκλείει στο εσωτερικό ένα μέρος από την υδάτινη φάση στην οποία τα λιποσώματα διασπείρονται<sup>[47]</sup>. Χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία ως αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών. Με τη χρήση τους αυξάνεται η συγκέντρωση των φωτοευαίσθητων ουσιών στους όγκους και έτσι ελαχιστοποιείται η καταστροφή των γύρω υγιών περιοχών μετά την ακτινοβολήση<sup>[44], [46]</sup>. Επίσης μπορούν να εγκλωβίζουν τόσο υδρόφιλες ουσίες (στις εσωτερικές υδατικές δομές τους) όσο και υδρόφοβες (στις μεμβράνες τους)<sup>[1]</sup>. Όσον αφορά τώρα τα αιωρήματα ελαίου, αυτά μπορούν να διευκολύνουν προβλήματα διαλυτότητας που προκύπτουν στους υδροφοβικούς φωτοευαισθητοποιητές<sup>[46]</sup>. Επίσης, τα λεγόμενα βιοδιασπώμενα πολυμερή είναι σωματίδια που μπορούν να θεωρηθούν ως εναλλακτικά των λιποσωμάτων και έχουν φανεί χρήσιμα όσον αφορά την μεταφορά αντινεοπλασματικών παραγόντων<sup>[48]</sup>. Τα πλεονεκτήματά τους βασίζονται στη μεγάλη ποσότητα φαρμάκου που μπορούν να περιέχουν, στη δυνατότητα ελέγχου της απελευθέρωσης των ουσιών καθώς και στην πληθώρα των τρόπων κατασκευής τους<sup>[46], [49]</sup>.

Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια αρκετή προσοχή έχει εστιαστεί στην κλινική χρήση λιποπρωτεϊνών του πλάσματος καθώς υφίσταται άμεση σχέση μεταξύ του αριθμού των υποδοχέων λιποπρωτεϊνών σε διάφορους όγκους και του ποσοστού πρόσληψης φωτοευαίσθητων ουσιών από κακοήθη κύτταρα<sup>[50], [51]</sup>. Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) έχει προταθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και απελευθέρωση φωτοευαίσθητων μορίων σε κακοήθεις όγκους. Πολλά καρκινικά κύτταρα

χάνουν τον έλεγχο των ρυθμιστικών μηχανισμών τους και παρουσιάζουν σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα έναν ασυνήθιστα υψηλό αριθμό LDL υποδοχέων<sup>[46], [52]</sup>.

Η μεταφορά φωτοευαίσθητων ουσιών μέσω αντισωμάτων αποτελεί μια ακόμη απόπειρα βελτίωσης της επιλεκτικότητας που χαρακτηρίζει τη φωτοδυναμική θεραπεία. Η μέθοδος περιλαμβάνει την πρόσδεση της ουσίας με μονοκλωνικά αντισώματα (MoAb) ενάντια σε συγκεκριμένα αντιγόνα των κακοήθων κυττάρων. Θεωρητικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα υπόσχονται εποικοδομητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη διευκόλυνση της μεταφοράς διάφορων παραγόντων σε κατάλληλους κυτταρικούς στόχους λόγω των ειδικών αλληλεπιδράσεών τους με συγκεκριμένα αντιγόνα. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν χαρακτηριστικές διαφορές ανάμεσα στα καρκινικά και τα υγιή κύτταρα, όπως είναι για παράδειγμα η υψηλότερη εμφάνιση συγκεκριμένων αντιγόνων και ογκοπρωτεϊνών από τα κακοήθη κύτταρα<sup>[46], [53]</sup>.

Τέλος, αρκετό ενδιαφέρον έχει στραφεί και γύρω από τη χρησιμότητα των νανοσωματιδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα νανοσωματίδια είναι σωματίδια με διάμετρο μικρότερη από 100 nm τα οποία έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν την ουσία είτε διαλυμένη στη μήτρα είτε απορροφημένη στην επιφάνειά τους. Η χρήση τους έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια και αυτό διότι<sup>[26], [54]</sup>:

- Μπορούν να μεταφέρουν υδρόφοβες ενώσεις στο αίμα.
- Η επιφάνειά τους μπορεί να τροποποιηθεί για την απόκτηση περαιτέρω χημικών/βιοχημικών ιδιοτήτων.
- Λαμβάνονται αποτελεσματικά από τα κύτταρα.
- Η ελεγχόμενη απελευθέρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας είναι δυνατή.
- Ποικίλες στρατηγικές σύνθεσης είναι εφικτές.

Η χρήση των νανοσωματιδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: νανοσωματίδια ως παθητικοί μεταφορείς ή ως ενεργοί συμμετέχοντες στην διέγερση της φωτοευαίσθητης ουσίας.

### Παθητικά νανοσωματίδια

1. **Βιοδιασπώμενα:** Η φωτοευαίσθητη ουσία περιέχεται στη μήτρα και έχουμε δυνατότητα ελέγχου της απελευθέρωσης της μέσω της βιοδιάσπασης.
2. **Μη βιοδιασπώμενα:** Η φωτοευαίσθητη ουσία απορροφάται στο πορώδες κέλυφος.

### Ενεργητικά νανοσωματίδια

1. **Φωτοευαίσθητοποιητές:** Τα νανοσωματίδια μεταφέρουν ενέργεια από το προσπίπτον φως απ' ευθείας στο γύρω οξυγόνο.
2. **Αυτοφωτιζόμενοι (Self-illuminating):** Σπινθηρισμός στη διέγερση από ακτίνες X ενεργοποιεί τον συνημμένο φωτοευαίσθητοποιητή.
3. **Upconverting:** Μετατρέπουν το φως χαμηλής ενέργειας σε εκπομπές υψηλότερης ενέργειας, ενεργοποιούν τον συνδεδεμένο φωτοευαίσθητοποιητή<sup>[54], [55], [56], [57]</sup>.



### B.3 Προοπτικές για το μέλλον

Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια διαδικασία ιδιαίτερα περίπλοκη, η επιτυχία της οποίας βασίζεται σε μια πληθώρα από παραμέτρους. Τέτοιες είναι οι χημικές και φωτοχημικές ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών, η δοσολογία και ο τρόπος χορήγησης και μεταφοράς τους στον οργανισμό, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της χορήγησης της φωτοευαίσθητης ουσίας και της ακτινοβολήσης, το μήκος κύματος, η ισχύς, η ενέργεια και η δομή του φωτεινού παλμού, η οξυγόνωση των βιολογικών ιστών<sup>[9]</sup>. Το μέλλον των φωτοευαισθητοποιητών στον τομέα της ογκολογικής φωτοδυναμικής θεραπείας θα αποτελέσει πιθανότατα προέκταση των σημερινών κλινικών μελετών, εξετάζοντας νέες ενδείξεις και εδραιώνοντας τα σημερινά πρωτόκολλα θεραπειών<sup>[58]</sup>. Μέσα από τα όσα γνωρίζουμε σήμερα, υπάρχει ανάγκη για ακριβή μεταφορά των φωτοευαίσθητων ουσιών στους στόχους, για επιλεκτική ενεργοποίησή τους μέσα στον όγκο όπως επίσης και για την ικανότητα να μπορούμε να κρίνουμε εάν η θεραπεία είναι επιτυχής σε πραγματικό χρόνο έτσι ώστε σε περίπτωση που περαιτέρω θεραπεία απαιτείται, να μπορεί αυτή να γίνεται κατά τη διάρκεια της ίδιας συνεδρίας. Οι φωτοευαίσθητες ουσίες, λοιπόν, θα μπορούσαν να συζευχθούν με απεικονιστικούς και βιολογικούς παράγοντες έτσι ώστε να επιτρέπουν τη διάγνωση, τη θεραπεία και τη δοσιμετρία. Το φάρμακο και η πηγή φωτός θα ήταν εποικοδομητικό να σχεδιάζονται ως μια ενιαία μονάδα. Με αυτόν τον τρόπο, η ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή θα απαιτούσε πολύ χαμηλή ενέργεια, όπως για παράδειγμα 400 nm. Η χρήση των νανοσωματιδίων έχει φανεί πολύ βοηθητική και ίσως το μέλλον της φωτοδυναμικής θεραπείας να στηρίζεται σε αυτά<sup>[3], [59]</sup>.

Πολύ χρήσιμο θα ήταν, η πηγή της φωτεινής ακτινοβολίας να αποτελούσε τμήμα του νανοσωματιδίου. Με αυτόν τον τρόπο, η επαγωγή της φωτοδυναμικής αντίδρασης θα δημιουργούταν όταν ο φωτοευαισθητοποιητής θα βρισκόταν σε επαφή με τον κυτταρικό ή τον υποκυτταρικό στόχο. Οι φορείς θα βοηθούσε να ήταν παραμαγνητικοί, έτσι ώστε για παράδειγμα να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί τεχνική MRI για να απεικονίσει τον όγκο, να εντοπίσει τον φωτοευαισθητοποιητή και το σύστημα μεταφοράς και στη συνέχεια να τον ενεργοποιήσει μέσω θερμότητας ή φθορισμού. Ιδανικά, ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να απενεργοποιείται όταν ο όγκος καταστρέφεται, έχοντας έτσι μιας μορφής ενσωματωμένο έλεγχο δοσιμετρίας.

Τέλος, παρότι η φωτοδυναμική θεραπεία θεωρείται μια «τοπική» θεραπεία, φαίνεται ότι έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι λοιπόν, μέσα από έναν πιθανό, καλύτερο σχεδιασμό των φωτοευαισθητοποιητών, η φωτοδυναμική θεραπεία θα μπορούσε να λειτουργεί τόσο τοπικά, καταστρέφοντας τον κακοήθη όγκο, όσο και αντιμετωπίζοντας ή προλαμβάνοντας συστηματική ασθένεια μέσω ενός μηχανισμού τύπου εμβολίου. Είναι προφανές ότι η φωτοδυναμική θεραπεία προσφέρει εξαιρετικά αισθητικά αποτελέσματα και αποκατάσταση των ιστών. Ίσως η περαιτέρω μελέτη αυτής της ιδιότητας της να οδηγήσει στη δημιουργία μιας μεθόδου η οποία θα επιτρέπει την εκτομή του όγκου και στη συνέχεια την ενισχυμένη επούλωση του τραύματος αλλά και την αναγέννηση των ιστών<sup>[3]</sup>.

## Κεφάλαιο Γ: Η κουρκουμίνη



## Γ.1 Εισαγωγή

Το φυτό Turmeric (*Curcuma longa*) είναι ένα αιωνόβιο φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια Zingiberaceae και προέρχεται από την Ινδία και την Νοτιοανατολική Ασία. Η χρήση του στην Ασία ξεκίνησε περίπου 2000 χρόνια πριν με τις εφαρμογές που είχε στη μαγειρική, την ιατρική, την παρασκευή καλλυντικών αλλά και χρωστικών ουσιών (κυρίως για υφάσματα) <sup>[60], [61]</sup>. Η διάδοσή του στην Ευρώπη πραγματοποιήθηκε γύρω στον 14<sup>ο</sup> αιώνα μ.Χ. Το turmeric είναι αδιαμφισβήτητα ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα μπαχαρικά στον κόσμο και είναι γνωστό με διάφορα ονόματα όπως Indian saffron, kurkum, yellow ginger. Τα ριζώματα του φυτού αυτού αποτελούν και το πιο σημαντικό κομμάτι του όσον αφορά τις γαστρονομικές και φαρμακευτικές ιδιότητες που του προσδίδονται. Το πιο ενεργό συστατικό του turmeric δεν είναι άλλο από την κουρκουμίνη <sup>[60], [62]</sup>.

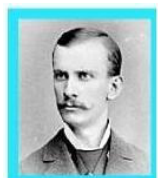
## Γ.2 Κουρκουμίνη και κουρκουμινοειδή

Το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του turmeric οφείλεται στην ουσία που απομονώθηκε για πρώτη φορά (από τις ρίζες του φυτού *curcuma longa*) από τον Vogel το 1842 και ονομάστηκε κουρκουμίνη. Η κουρκουμίνη είναι μια πορτοκαλί – κίτρινη κρυσταλλική σκόνη πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Η χημική δομή της κουρκουμίνης (curcumin ή curcumin I)  $C_{21}H_{20}O_6$  περιεγράφηκε πρώτη φορά το 1910 από τους Lampe και Milobedeska. Είναι μια πολυφαινόλη μικρού μοριακού βάρους (368.37 g/mol) με θερμοκρασία τήξης γύρω στους 183°C. Η κατά IUPAC ονομασία της είναι 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione<sup>[60], [62]</sup>. Τα λεγόμενα κουρκουμινοειδή αναφέρονται σε μια ομάδα από φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι παρούσες στο turmeric, και είναι από χημικής πλευράς συναφείς με το πρωταρχικό συστατικό κουρκουμίνη. Τα κουρκουμινοειδή που απομονώθηκαν από το turmeric ήταν τα εξής τρία: Curcumin (ή Curcumin I), demethoxycurcumin (ή Curcumin II), bisdemethoxycurcumin (ή Curcumin III) και cyclocurcumin (εικόνα Γ.2). Η κουρκουμίνη που κυκλοφορεί στο εμπόριο περιέχει Curcumin I σε ποσοστό 77%, Curcumin II σε ποσοστό 17% και Curcumin III σε ποσοστό 3% περίπου<sup>[60], [62], [63], [64]</sup>. Παρακάτω ακολουθεί μια ιστορική αναδρομή γύρω από την κουρκουμίνη καθώς και η χημική δομή των ενώσεων που προαναφέρθηκαν:



Vogel (1842)

Απομόνωση της κουρκουμίνης από τις ρίζες του turmeric



Milobedzka (1910)

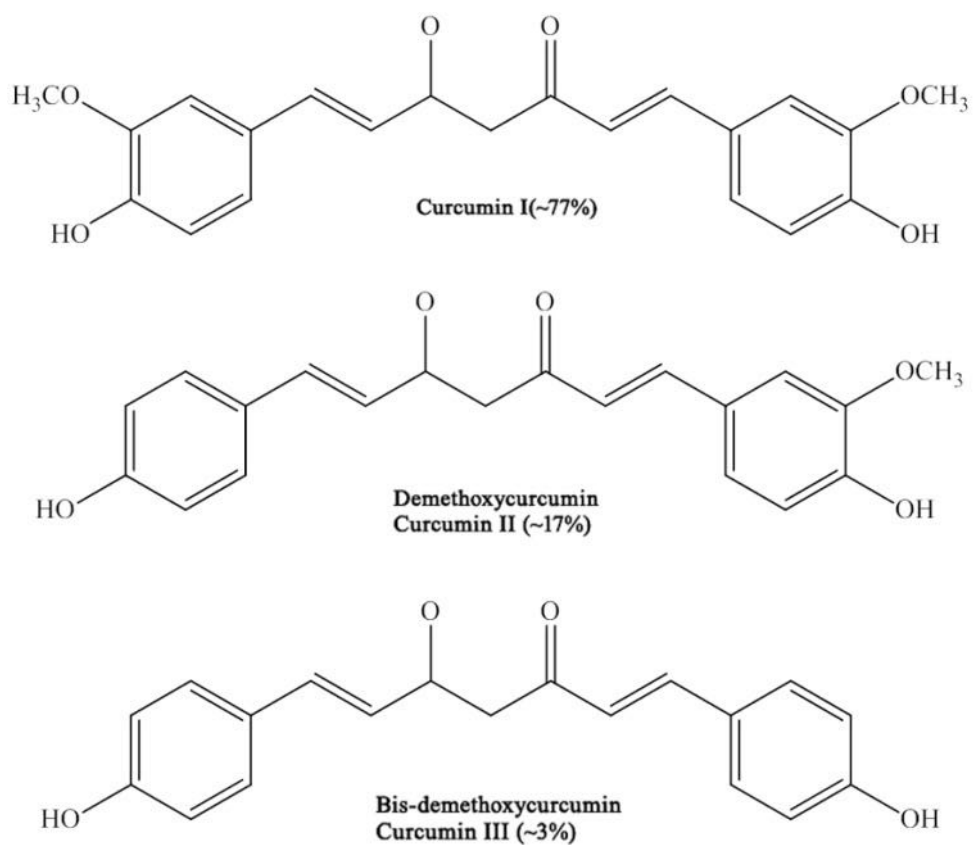
Αναγνώριση της χημικής δομής της κουρκουμίνης



Lampe (1913)

Σύνθεση της κουρκουμίνης

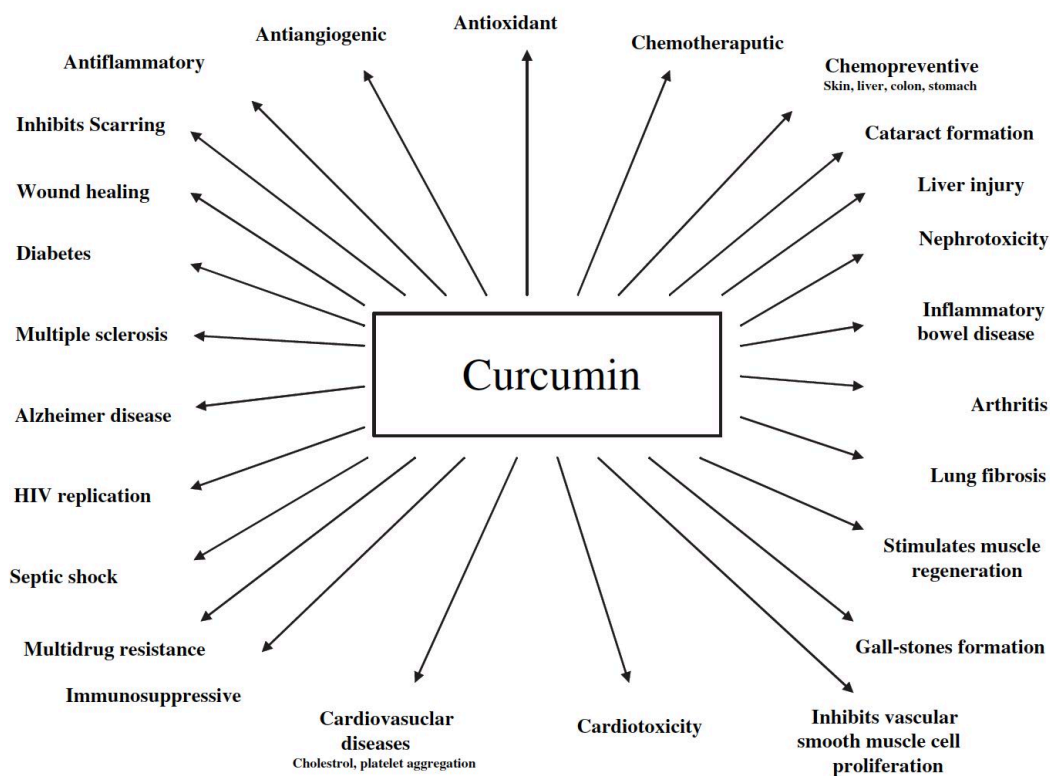
Εικόνα Γ. 1: Ιστορία της κουρκουμίνης[64]



Εικόνα Γ. 2: Χημική δομή για *curcumin*, *demethoxycurcumin* και *bisdemethoxycurcumin*<sup>[60]</sup>

### Γ.3 Χρήσεις και Εφαρμογές της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη, μια πολυφαινόλη που εξάγεται από το φυτό *Curcuma longa*, χρησιμοποιείται ευρέως όπως έχει προαναφερθεί στην νοτιοανατολική Ασία, την Κίνα και την Ινδία για λόγους γαστρονομικούς αλλά και ιατρικούς<sup>[60]</sup>. Η αξιοσημείωτη συμβολή του κουρκουμά στη θεραπεία διάφορων παθήσεων, λόγω του ευρέως φάσματος των φαρμακολογικών ιδιοτήτων που τον χαρακτηρίζουν, έχει καταγραφεί από τα αρχαία χρόνια. Η ολιστική, Ινδική ιατρική που είναι γνωστή ως Ayurveda χρησιμοποιεί το turmeric για τη θεραπεία λοιμώξεων στα μάτια, εγκαυμάτων, φλεγμονών, της ακμής, διάφορων ακόμη δερματικών παθήσεων καθώς και για την επούλωση πληγών. Στην παραδοσιακή ιατρική η κουρκουμίνη χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και για την αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος όπως είναι το άσθμα και οι αλλεργίες. Το turmeric έχει επίσης εφαρμογές όσον αφορά την θεραπεία κατά του διαβήτη, του βήχα, των ρευματισμών, της ιγμορίτιδας, της ανορεξίας και των ηπατικών διαταραχών<sup>[60], [62], [63]</sup>. Από το δεύτερο περίπου μισό του προηγούμενου αιώνα, η ουσία αυτή έχει προσελκύσει την προσοχή επιστημόνων από πολλούς διαφορετικούς κλάδους με κύριο στόχο την περαιτέρω μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της<sup>[60]</sup>. Έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη ουσία και τα παράγωγά της παρουσιάζουν ποικίλες, σημαντικές ιδιότητες όπως αντιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές καθώς και αντιαγγειογενετικές. Επίσης έχουν μελετηθεί επιδράσεις της κουρκουμίνης όσον αφορά την αντιμετώπιση του ιού HIV, αλλά και διάφορων νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι το Πάρκινσον και η νόσος Αλτσχάιμερ<sup>[60], [61]</sup> (εικόνα Γ.3).



Εικόνα Γ. 3: Ιδιότητες της κουρκουμίνης σε ιατρικό επίπεδο<sup>[65]</sup>

## Γ.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη πιθανολογείται ότι διαθέτει πολλά υποσχόμενες χημειοθεραπευτικές αλλά και προληπτικές ιδιότητες οι οποίες θα μπορούσαν αδιαμφισβήτητα να ανοίξουν δρόμους σε ποικίλες εναλλακτικές θεραπείες για διάφορες ασθένειες. Τον τελευταίο καιρό, αρκετή προσοχή έχει εστιαστεί στη μελέτη των ιατρικών εφαρμογών της κουρκουμίνης όσον αφορά τη θεραπεία διάφορων περιπτώσεων καρκίνου. Αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον η συγκεκριμένη ουσία έχει παρουσιάσει αντικαρκινικές και αποπτωτικές δράσεις ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών<sup>[66]</sup>. Στις μέρες μας έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές με τη χρήση της κουρκουμίνης για την αντιμετώπιση καρκίνων στο πάγκρεας, στα έντερα αλλά και του πολλαπλού μυελώματος.

Η επίδραση της κουρκουμίνης εξαρτάται από το είδος των κυττάρων, τη συγκέντρωση της ουσίας καθώς επίσης και από τη χρονική διάρκεια της θεραπείας. Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο εκείνη επάγει κυτταροτοξικότητα είναι η απόπτωση<sup>[64]</sup>. Έχει επίσης τη δυνατότητα να αναστέλλει την καρκινική ανάπτυξη και πρόοδο στοχεύοντας ποικίλα στάδια στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μπορεί να δρα τόσο ως παράγοντας αποκλεισμού, αναστέλλοντας έτσι το εναρκτήριο στάδιο του καρκίνου, όσο και ως μέσο καταστολής, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό κακοήθων κυττάρων κατά τη διάρκεια της προώθησης και της εξέλιξης της καρκινογένεσης<sup>[64], [67], [68], [69]</sup>. Εφαρμογές της όσον αφορά την καταστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων έχουν αποδειχθεί πάνω σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, της χολής, της υπόφυσης, του στόματος και του λειομύωματος της μήτρας<sup>[64], [70], [71], [72], [73]</sup>.

Παρακάτω γίνεται μια περαιτέρω αναφορά στις αντικαρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης.

Από την μια πλευρά εκείνη παρουσιάζει χημειοπροληπτικές ικανότητες. Η χημειοπρόληψη αποτελεί έναν ουσιαστικό τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου. Επιπροσθέτως, εφόσον η διαδικασία της καρκινογένεσης ενδέχεται να χρειαστεί δεκαετίες για να ολοκληρωθεί, είναι απόλυτα λογικό να γίνεται προσπάθεια για την πρόληψη του καρκίνου όταν αυτός είναι ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο με τη χρήση χημικών χαμηλής τοξικότητας αντί να περιμένουμε μέχρι η ασθένεια να φτάσει σε προηγμένο στάδιο εξέλιξης όπου η χορήγηση τοξικών χημικών ενώσεων καθίσταται απαραίτητη (χημειοθεραπεία). Υπάρχουν αρκετές αποδείξεις ότι η κουρκουμίνη μπορεί να φανεί χρήσιμη στην χημειοπρόληψη<sup>[74]</sup>. Αρχικά, δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα διάφορων συνηθών μορφών καρκίνου, όπως είναι αυτός του πνεύμονα, του προστάτη και του μαστού, είναι αισθητά υψηλότερη στις δυτικές χώρες σε αντίθεση με χώρες όπως είναι η Ινδία, όπου η κουρκουμίνη καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό<sup>[75]</sup>. Επίσης, έρευνες που έχουν γίνει πάνω σε τρωκτικά, δείχνουν ότι η κουρκουμίνη μπορεί να δράσει ως προληπτικός παράγοντας για καρκίνους στους πνεύμονες, στο μαστό, στο συκώτι, στο στομάχι, στον οισοφάγο. Τέλος, σε κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε πάνω σε συμμετέχοντες με προδιάθεση στον καρκίνο και στους οποίους έγινε χορήγηση της ουσίας για 3 μήνες, αποδείχθηκε ότι στους 7 από τους 25 παρουσιάστηκε ιστολογική βελτίωση των προ καρκινικών αλλοιώσεων<sup>[74], [76]</sup>.

Με ποιους μηχανισμούς όμως δρα η κουρκουμίνη προληπτικά απέναντι στον καρκίνο; Αρχικά, είναι γεγονός ότι για το σχηματισμό ενός κακοήθους όγκου είναι ανάγκη τα καρκινικά κύτταρα να παρουσιάζουν αντίσταση στην απόπτωση, και έχει παρατηρηθεί ότι η κουρκουμίνη μπορεί να παράγει μια ήπια αλλά παρόλα αυτά σημαντική ενεργοποίηση της *in vivo*<sup>[74], [77]</sup>. Η αγγειογένεση, η δημιουργία δηλαδή νέων αιμοφόρων αγγείων, είναι απαραίτητη για τη δημιουργία συμπαγών όγκων. Είναι δεδομένο ότι οι κακοήθεις όγκοι

ενεργοποιούν τη διαδικασία αυτή και διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίησή της<sup>[78]</sup>.

Από την άλλη πλευρά, γνωρίζουμε ότι η κουρκουμίνη διαθέτει και χημειοθεραπευτικές ιδιότητες. Η επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς την πρόκληση σημαντικής τοξικότητας στα υγιή κύτταρα είναι μια από τις πιο επιθυμητές ιδιότητες που πρέπει να διακρίνουν έναν χημειοθεραπευτικό παράγοντα. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η κουρκουμίνη μπορεί να σκοτώσει με επιλεκτικότητα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, το ποσοστό της απόπτωσης που προκλήθηκε από κουρκουμίνη (40μM, 24h) σε 3 καρκινικές κυτταρικές σειρές (μια από τις οποίες ήταν η HerG2 από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα) ήταν περίπου 90%, ενώ ήταν μικρότερο από 3% σε 5 διαφορετικούς τύπους από υγιή κύτταρα<sup>[74], [79], [80]</sup>.

#### Γ.4.1 Κουρκουμίνη και καρκίνος του προστάτη

Τα πειράματα που διεξάγονται στη συγκεκριμένη εργασία αφορούν παράγωγα κουρκουμίνης καθώς και καρκινικά κύτταρα LNCaP από καρκίνο του προστάτη. Για το λόγο αυτό στην παράγραφο αυτή κάνουμε μια αναφορά σε προηγούμενες μελέτες γύρω από τους ίδιους πυρήνες:

Το 2001 ανδρογενή καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP εισήχθησαν ενέσιμα υποδορίως σε ποντίκια που τρέφονταν με διαίτα περιεκτικότητας 2% σε κουρκουμίνη για χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων. Αποδείχθηκε ότι η ουσία αύξησε σημαντικά τα ποσοστά της απόπτωσης όπως επίσης και προκάλεσε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων<sup>[81]</sup>. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η κουρκουμίνη έχει δυνατότητες αναστολής της μετάστασης του καρκίνου, μειώνοντας τα μεταστατικά οζίδια έπειτα από τη χορήγησή της<sup>[82]</sup>. Σε άλλη έρευνα, καρκινικά κύτταρα του προστάτη χορηγήθηκαν ενέσιμα στην αριστερή βουβωνική περιοχή ποντικών ενώ η κουρκουμίνη εισήχθησε μέσω σωλήνα/καθετήρα. Περιορισμένη εμφάνιση στο ογκογονίδιο Mdm2 παρουσιάστηκε σε ξενομοσχεύματα στα οποία είχε χορηγηθεί κουρκουμίνη σε συνδυασμό με ακτινοβολία<sup>[83]</sup>.



## Γ.5 Κουρκουμίνη και φωτοδυναμική θεραπεία

Όπως έχει προαναφερθεί, ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να είναι μια μη τοξική ένωση η οποία να παρουσιάζει τοπική επιλεκτική τοξικότητα έπειτα από ενεργοποίησή της μέσω ακτινοβόλησης. Η κουρκουμίνη, ουσία με μια πολύ μεγάλη γκάμα θεραπευτικών ιδιοτήτων, έχει αποδειχθεί ότι είναι βιολογικά ασφαλής, χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα απορρόφησης στην περιοχή από 300 έως 500 nm (με μέγιστο απορρόφησης συνήθως γύρω στα 430 nm) και μπορεί να επάγει ισχυρές φωτοτοξικές αντιδράσεις σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις<sup>[84], [85]</sup>. Έτσι λοιπόν η κουρκουμίνη διαθέτει δυνατότητες για χρήση ως φωτοευαισθητοποιητής κατά τη θεραπεία τοπικών επιφανειακών λοιμώξεων στο στόμα και το δέρμα. Εκτός αυτού, ο συγκεκριμένος φωτοευαίσθητος παράγοντας συνοδεύεται από σημαντικά πλεονεκτήματα από οικονομικής απόψεως, καθώς έχει χαμηλό κόστος, απλό χειρισμό και σημαντική αποτελεσματικότητα<sup>[86], [87]</sup>.

Ο Tonnesen μελέτησε τις φωτοβιολογικές επιδράσεις της κουρκουμίνης πάνω σε βακτήρια<sup>[88]</sup> και απέδειξε ότι υπό την παρουσία ορατού φωτός (συγκεκριμένα ακτινοβολία στα 420 nm) εκείνη προκαλούσε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις φωτοτοξικές αντιδράσεις σε *Salmonella typhimurium* και *E. coli*. Ο Dahl διερεύνησε τη φωτοτοξικότητα της κουρκουμίνης σε μικρομοριακές ποσότητες τόσο πάνω σε βακτήρια όσο και πάνω σε κύτταρα θηλαστικών (βασεόφιλα κύτταρα λευχαιμίας από αρουραίο). Τελικά η κουρκουμίνη, μετά από την έκθεσή της σε φως, παρουσίασε και στις δυο περιπτώσεις εξαρτόμενη από το οξυγόνο φωτοτοξικότητα<sup>[60], [89]</sup>. Πρόσφατα, οι φωτοτοξικές επιδράσεις της κουρκουμίνης αξιολογήθηκαν σε κύτταρα των σιελογόνων αδένων και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν αξιοσημείωτα. Πιο συγκεκριμένα, μικρές μικρομοριακές συγκεντρώσεις της ουσίας σε συνδυασμό με χαμηλό φως ήταν αποτελεσματικές για τη θεραπεία καρκίνων του στόματος<sup>[90]</sup>. Επίσης, η κουρκουμίνη έδειξε ισχυρή τοξική αντίδραση πάνω σε κύτταρα NPC/CNE2 (κύτταρα ρινοφαρυγγικού καρκινώματος NPC) έπειτα από την επιρροή του ορατού φωτός<sup>[91]</sup>. Η φωτοτοξικότητα της κουρκουμίνης προκάλεσε συρρίκνωση των κυττάρων, αιμορραγία των μεμβρανών καθώς και απόπτωση, αποδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την πιθανή χρησιμότητα της ουσίας ως φωτοευαίσθητος ή χημειοθεραπευτικός παράγοντας.

Σε πρόσφατη έρευνα, η (ιοντική) σύζευξη της κουρκουμίνης μαζί με μεθυλένιο μπλε σε νανοσωματίδια έδειξε ότι εντείνει τη φωτοδυναμική δράση των δύο φωτοευαισθητοποιητών όπως επίσης και την κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων απέναντι σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-231<sup>[115]</sup>. Σε άλλη μελέτη, εξετάστηκε η δυνατότητα της κουρκουμίνης II (demethoxycurcumin) να επάγει αποπτωτικές και αυτοφαγικές αντιδράσεις σε κύτταρα του μαστού έπειτα από φωτοδυναμική θεραπεία<sup>[116]</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει πραγματοποιηθεί έρευνα γύρω από τα αποτελέσματα φωτοδυναμικής θεραπείας με χρήση κουρκουμίνης έναντι βακτηριακών κυττάρων από στοματική μόλυνση<sup>[117]</sup>. Παρατηρήθηκε, επιπροσθέτως, αξιοσημείωτη μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας σε κύτταρα ηπατοβλαστώματος (HuH6, HepT1) αλλά και κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepG2, HC-AFW1) κατά την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας έπειτα από 24 - 48 ώρες επώαση με κουρκουμίνη<sup>[118]</sup>. Ακόμη, έχει ερευνηθεί και η δυνατότητα του κόκκινου και μπλε φωτός σε συνδυασμό με χαμηλές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης να ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και την απόπτωση σε κερατινοκύτταρα του δέρματος<sup>[119]</sup>.

Ο μηχανισμός φωτοευαισθησίας της κουρκουμίνης δεν είναι απολύτως γνωστός αλλά έχει αποδειχθεί ότι απαιτεί το οξυγόνο<sup>[88], [92]</sup>. Έτσι λοιπόν η προσοχή έχει εστιαστεί σε φωτολυτικά παραγόμενα είδη δραστικού οξυγόνου όπως είναι το μονήρες οξυγόνο, οι υδροξυλικές ρίζες και το υπεροξειδίο του υδρογόνου<sup>[92], [93]</sup>. Τα προϊόντα λοιπόν που δημιουργούνται με την αντίδραση της διεγερμένης από το φως κουρκουμίνης και του οξυγόνου (μονήρες οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$  in  $^1\Delta_g$  state), ρίζες υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ )) είναι υπεύθυνα για τη φωτοτοξικότητα που χαρακτηρίζει την ουσία<sup>[93]</sup>. Χάρη στον πολύτιμο ρόλο του μονήρους οξυγόνου στη φωτοδυναμική θεραπεία και την ενδεχόμενη χρήση της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητου παράγοντα, πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί γύρω από την παραγωγή και τις αντιδράσεις του  $^1\text{O}_2$  με την ουσία<sup>[89]</sup>. Ο εντοπισμός της κουρκουμίνης στα βιολογικά συστήματα καθώς και το μονήρες οξυγόνο, το υπεροξειδίο καθώς και προϊόντα φωτοδιάλυσης / οξειδωσης ενδέχεται να συμμετέχουν είτε ατομικά είτε συλλογικά στη βιολογική φωτοδραστικότητα της κουρκουμίνης<sup>[93]</sup>.

## **Μέρος δεύτερο**

### **Πειραματικό κομμάτι**

## Κεφάλαιο Δ: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες

## Δ.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Στα πλαίσια της έρευνας γύρω από τη φωτοδυναμική θεραπεία πολύ σημαντικό κομμάτι αποτελεί η μελέτη της συμπεριφοράς των διάφορων φωτοευαίσθητοποιητών. Εκείνοι, παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά τα χαρακτηριστικά, τις εφαρμογές και τις ιδιότητές τους με αποτέλεσμα να ασκούν άμεση επιρροή στα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρησιμοποίησή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Σκοπό της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η συγκριτική μελέτη συνθετικών παραγώγων κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στη συνέχεια, ο σκοπός αυτός εξειδικεύεται σε επιμέρους στόχους και πιο συγκεκριμένα:

- Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των νέων φωτοευαίσθητοποιητών
- Μελέτη και βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης των ουσιών αυτών σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (LNCaP cancer cells)

Η σύνθεση των παραγώγων κουρκουμίνης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» από την Δρ. Μαρίνα Σαγνού, ερευνήτρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, και την ομάδα της.

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι φωτοφυσικές ιδιότητες των συνθετικών παραγώγων AX-126, AX-127 και AX-186 έχουν μελετηθεί στα πλαίσια προηγούμενης διπλωματικής εργασίας του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής από την Κατερίνα Κουτσονικολή.

Στα πλαίσια αυτά, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία περιλαμβάνει τις εξής μελέτες:

- Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης του συνθετικού παραγώγου της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις
- Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης του συνθετικού παραγώγου της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) σε διάφορους διαλύτες
- Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού του συνθετικού παραγώγου της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις
- Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης (απορρόφησης και φθορισμού) του συνθετικού παραγώγου της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin)
- Μελέτη της ικανότητας του συνθετικού παραγώγου της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) για παραγωγή ελεύθερων ριζών
- Μελέτη της επίδρασης των τεσσάρων συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης (AX-126, AX-127, AX-186, AX-232) στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, LNCaP, απουσία φωτός (dark toxicity)

- Μελέτη της επίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, LNCaP, απουσία φωτοευαίσθητης ουσίας (light only)
- Μελέτη του χωρικού εντοπισμού των τεσσάρων συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης (AX-126, AX-127, AX-186, AX-232) στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, LNCaP
- Μελέτη της επίδρασης φωτοδυναμικής θεραπείας στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, χρησιμοποιώντας τα τέσσερα συνθετικά παράγωγα της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες.

## Δ.2 Πειραματικές Διατάξεις

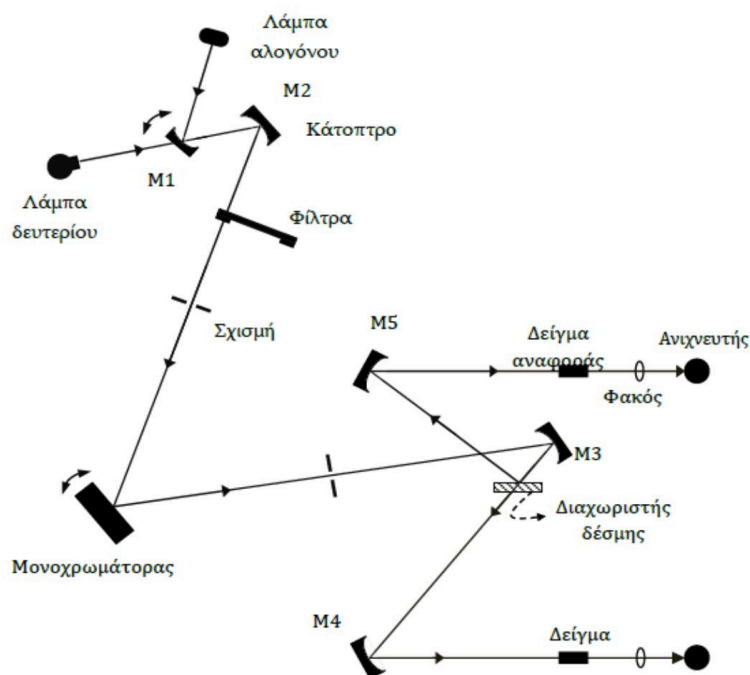
### Δ.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας τέθηκε απαραίτητη η χρήση μιας φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης. Έγινε χρήση της τόσο κατά τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης AX-232 όσο και κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς LNCaP. Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική συσκευή Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (εικόνα Δ.1). Είναι ένα ευέλικτο φασματοφωτόμετρο το οποίο λειτουργεί στις φασματικές περιοχές του υπεριώδους (UV) και του ορατού (VIS) φωτός<sup>[94]</sup>.



Εικόνα Δ. 1: Perkin-Elmer Lambda 35, UV/VIS Spectrometer

Παρακάτω ακολουθεί και το οπτικό διάγραμμα του οργάνου με την πορεία που ακολουθεί η φωτεινή δέσμη (εικόνα Δ.2):



Εικόνα Δ. 2: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης

Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο φωτεινές πηγές. Η μια είναι μια λάμπα δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400 nm) ενώ η άλλη είναι μια λάμπα αλογόνου η οποία εκπέμπει στην ορατή και την κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350-900 nm). Έτσι λοιπόν καλύπτεται όλο το εύρος των μηκών κύματος του φασματοφωτόμετρου. Για τη λειτουργία του συστήματος στην περιοχή του ορατού φως, το κάτοπτρο M1 προκαλεί την ανάκλαση του φωτός που προέρχεται από τη λάμπα αλογόνου και την οδήγησή αυτού στο κάτοπτρο M2. Την ίδια στιγμή, το κάτοπτρο M1 μπλοκάρει την ακτινοβολία από τη λάμπα δευτερίου. Κατά τη λειτουργία στην υπέρυθρη περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανασκλώνεται έτσι ώστε να επιτρέψει τη διέλευση του φωτός από τη λάμπα δευτερίου και την πρόσπτωσή του στο κάτοπτρο M2. Η αλλαγή της πηγής πραγματοποιείται αυτόματα κατά την περιστροφή του μονοχρωμάτορα.

Στη συνέχεια, η ακτινοβολία που προέρχεται από τη φωτεινή πηγή ανακλάται από το κάτοπτρο M2 και οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρων. Ένας βηματικός κινητήρας οδηγεί τον τροχό των φίλτρων έτσι ώστε αυτός να βρίσκεται σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτορα. Ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος, ο τροχός αυτός περιστρέφεται ώστε να παρεμβληθεί στην πορεία της δέσμης το κατάλληλο φίλτρο που θα φιλτράρει τη δέσμη πριν αυτή εισέλθει στο μονοχρωμάτορα. Από τον τροχό των οπτικών φίλτρων, η δέσμη περνάει στο μονοχρωμάτορα μέσω της σχισμής εισόδου του τελευταίου (σχισμή 1). Όπως προαναφέραμε, ο μονοχρωμάτορας είναι συγχρονισμένος με τον τροχό φίλτρων και κινούνται μέσω ενός βηματικού κινητήρα. Η φωτεινή δέσμη διασκορπίζεται στο φράγμα περίθλασης για να παράγει ένα φάσμα.

Η περιστροφική θέση του φράγματος αποτελεσματικά επιλέγει ένα τμήμα του φάσματος αυτού και το αντανακλά μέσω της σχισμής εξόδου του μονοχρωμάτορα (σχισμή 2) στο κάτοπτρο M3. Η σχισμή εξόδου περιορίζει το τμήμα του φάσματος σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας.



Από το κάτοπτρο M3 η φωτεινή δέσμη θα οδηγηθεί σε έναν διαχωριστή δέσμης. Το 50% της ακτινοβολίας περνάει προς το κάτοπτρο M4 ενώ το υπόλοιπο 50% ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M5. Το κάτοπτρο M4 εστιάζει την ακτινοβολία προς το δείγμα για εξέταση και εκείνη στη συνέχεια περνάει μέσω ενός κυρτού φακού στη φωτοδίοδο (ανιχνευτής). Το κάτοπτρο M5 εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα αναφοράς και με παρόμοιο τρόπο εκείνη περνάει στη συνέχεια μέσω ενός κυρτού φακού στη φωτοδίοδο. Τα δείγματα εξέτασης και αναφοράς τοποθετούνται σε δύο όμοιες κυβέττες οι οποίες εισάγονται στις κατάλληλες υποδοχές του οργάνου (εικόνα Δ.3).



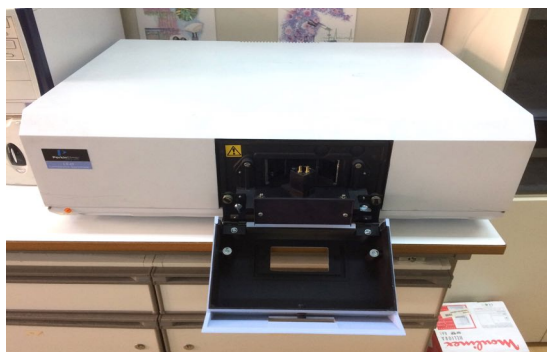
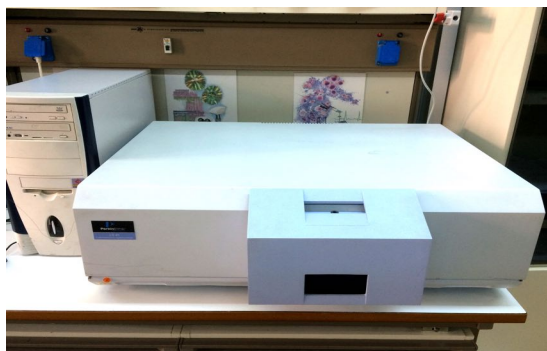
Εικόνα Δ. 3: Υποδοχές κυβεττών του οργάνου (δείγμα και αναφορά)

Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης που περιγράψαμε, ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Αυτό επιτρέπει τη ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων της εκάστοτε φασματοφωτομετρικής μέτρησης όπως επίσης και του τρόπου παρουσίασης των αποτελεσμάτων. Έτσι λοιπόν μπορούν να εκτελεστούν διεργασίες όπως:

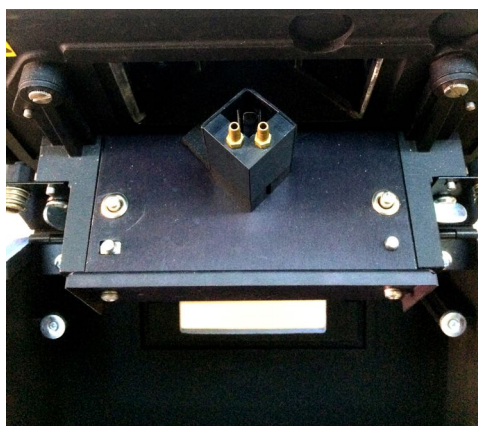
- Η επιλογή της περιοχής των μηκών κύματος για την οποία θα μετρήσουμε την απορρόφηση.
- Η επιλογή της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής του μονοχρωμάτορα.
- Ο μηδενισμός του σήματος που προέρχεται από το δείγμα αναφοράς και οφείλεται στον διαλύτη και το θόρυβο του οργάνου μέσω της επιλογής Autozero που διατίθεται.
- Η εξομάλυνση (smoothing).
- Η επεξεργασία των φασμάτων απορρόφησης που προκύπτουν<sup>[95]</sup>.

## Δ.2.2 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού

Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας χρειάστηκε επίσης η λήψη φασμάτων φθορισμού. Τα φάσματα αυτά πάρθηκαν με τη βοήθεια της φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (εικόνα Δ.4). Η συγκεκριμένη διάταξη μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειοφωταύγεια ή βιοφωταύγεια. Η μέτρηση φασμάτων φθορισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου (ή σε μέρος αυτής της περιοχής) είτε σε επιλεγμένα μήκη κύματος.

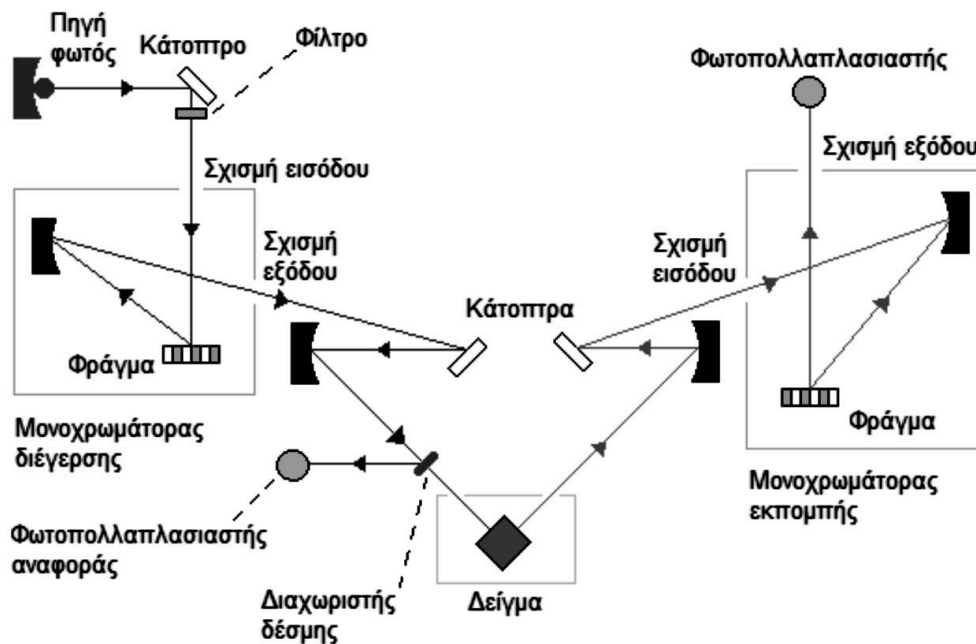


Εικόνα Δ. 4: Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer



Εικόνα Δ. 5: Υποδοχή κυβέττας οργάνου

Στη συνέχεια ακολουθεί το οπτικό διάγραμμα του οργάνου:



Εικόνα Δ. 6: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου φθορισμού

Η πηγή φωτός είναι μια λυχνία ξένου (Xenon flash tube), η οποία παράγει ένα ισχυρό παλμό μικρής χρονικής διάρκειας μέσα στο φασματικό εύρος του οργάνου. Όπως βλέπουμε και στο παραπάνω σχήμα, η ακτινοβολία από την πηγή εστιάζεται από το ελλειψοειδές κάτοπτρο και ανακλάται από το τοροειδές κάτοπτρο οδηγούμενη έτσι στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, το φράγμα 1440 γραμμών/mm, ένα σφαιρικό κάτοπτρο και τη σχισμή εξόδου. Το μονοχρωματικό φως εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου σε μια συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή με το κεντρικό μήκος κύματός της να καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Το μεγαλύτερο ποσοστό της δέσμης διέγερσης προσπίπτει με τη βοήθεια τοροειδούς κατόπτρου εστίασης στο δείγμα. Ένα μικρό μέρος ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Προκειμένου να διορθώνεται η απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, είναι αποθηκευμένη στο όργανο καμπύλη αναφοράς ροδαμίνης, η οποία διατηρεί σχεδόν σταθερή την κβαντική της απόδοση για απορρόφηση σε μήκος κύματος 230nm – 630nm και εκπομπή στα 650 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από το τοροειδές κάτοπτρο στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής. Ο μονοχρωμάτορας εκπομπής αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα σφαιρικό κάτοπτρο, ένα φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών/mm και τη σχισμή εξόδου. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, το κεντρικό μήκος κύματος της οποίας καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης (η γωνία του οποίου ελέγχεται από ένα βηματικό κινητήρα), συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή για περαιτέρω ανάλυση.

Οι μονοχρωμάτορες μπορούν να σαρώνουν είτε ανεξάρτητα είτε συνδυαστικά και για εύρος πεδίου, το οποίο κυμαίνεται για μεν το μονοχρωμάτορα διέγερσης από 200 έως 800 nm, για δε το μονοχρωμάτορα εκπομπής από 200 έως 900 nm. Επίσης υπάρχει και η δυνατότητα σύγχρονης σάρωσης, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής.

Το εύρος της σχισμής αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει τη διακριτική ικανότητα της διάταξης. Βελτίωση της διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνεται με την ελάττωση του εύρους της σχισμής, παρουσιάζοντας όμως το μειονέκτημα μείωσης του φωτός που είτε διεγείρει το δείγμα είτε συλλέγεται για καταγραφή (υποδιπλασιασμός του εύρους της σχισμής συνεπάγεται μείωση κατά τέσσερις φορές του διερχόμενου φωτός). Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισής τους<sup>[11], [96]</sup>.

Όταν το όργανο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του φθορισμού, τότε λαμβάνουν χώρα τέσσερις ολοκληρώσεις για κάθε κύκλο συλλογής δεδομένων: Δύο ολοκληρώσεις του σήματος που προέρχεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς και δύο ολοκληρώσεις του σήματος που προέρχεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος. Οι ολοκληρώσεις αυτές πραγματοποιούνται σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα ως προς την τελευταία αναλαμπή της λυχνίας ξένου. Οι δεύτερες ολοκληρώσεις πραγματοποιούνται στους δύο φωτοπολλαπλασιαστές για τη συλλογή του σήματος υπόβαθρου (σήμα που παράγεται όταν δεν προσπίπτει φως στη φωτοκάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή, dark current), το οποίο και αφαιρείται από τα σήματα εξόδου των φωτοπολλαπλασιαστών. Τα σήματα που λαμβάνονται από τους φωτοπολλαπλασιαστές ενισχύονται και έπειτα ψηφιοποιούνται. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ο λόγος του σήματος από το φωτοπολλαπλασιαστή δείγματος ως προς τον αντίστοιχο από τον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς το θόρυβο και για τη διόρθωση λόγω διακυμάνσεων στην εκπομπή της πηγής του φωτός. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται το σήμα με την καμπύλη διόρθωσης της ροδαμίνης που είναι αποθηκευμένη στο όργανο, για τη διόρθωση της φασματικής απόκρισης των φωτοπολλαπλασιαστών και την απόκριση διέλευσης του διαχωριστή δέσμης<sup>[96], [97]</sup>.

Το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Με το λογισμικό αυτό μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης καθώς και να εκτελούνται εργασίες όπως η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής κάθε μονοχρωμάτορα, η επιλογή του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος, ο μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου φθορισμού (μέσω της κατάλληλης αφαίρεσης φάσματος φθορισμού της εν λόγω ουσίας) αλλά και η επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν<sup>[1], [98]</sup>.

### Δ.2.3 Διάταξη ακτινοβολήσης

Η διάταξη ακτινοβολήσης χρησιμοποιήθηκε αρχικά στα πλαίσια των πειραμάτων που διεξήχθησαν ως προς τη φωτολεύκανση και την ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών της κουρκουμίνης AX-232. Στη συνέχεια, έγινε χρήση της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων βιωσιμότητας κυττάρων LNCaP σε σχέση με την ισχύ ακτινοβολήσης χωρίς την παρουσία

κουρκουμίνης αλλά και κατά την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα αυτά με τη χρήση των τεσσάρων κουρκουμίνων ως φωτοευαίσθητες ουσίες.

Δημιουργήθηκε ειδική διάταξη για τις ανάγκες των πειραμάτων μας. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 10W που απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα:



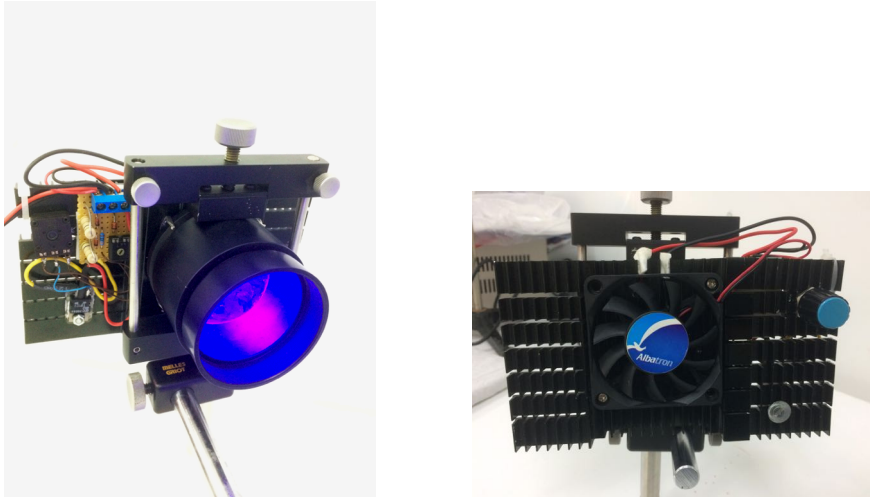
Εικόνα Δ. 7: Bridgelux Power LED 10W

Αναφέρουμε επίσης, τα τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W:

<b>Θερμοκρασία Χρώματος</b>	Actinic violet
<b>Μήκος Κύματος</b>	415 – 420 nm
<b>Voltage</b>	11V @ 1A
<b>Radiant Flux</b>	1800 – 2000mW @ 1A
<b>Μέγιστο Φορτίο</b>	1A (προτεινόμενο)
<b>Γωνία Φακού</b>	120 degrees
<b>Θερμοκρασία Λειτουργίας</b>	-20°C ~ 70°C

Πίνακας Δ. 1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W

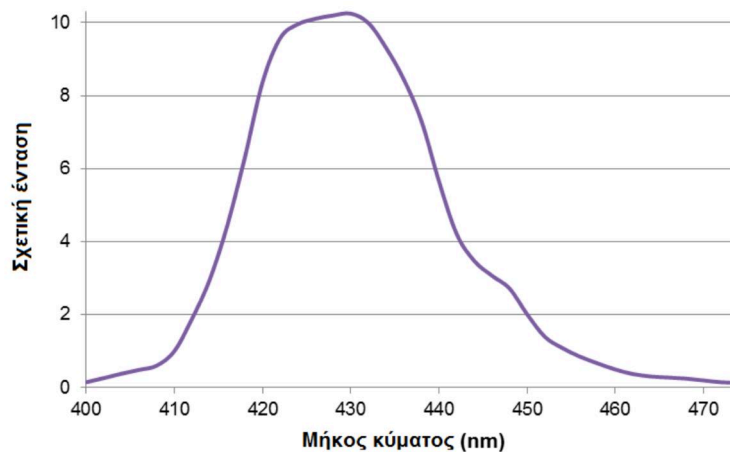
Έτσι λοιπόν, στα πλαίσια του εργαστηρίου κατασκευάστηκε διάταξη ακτινοβολήσης (εικόνα Δ.8) η οποία περιλαμβάνει την προαναφερθείσα πηγή ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W, σωλήνα για τη συγκέντρωση της ακτινοβολίας στο εκάστοτε δείγμα, ποτενσιόμετρο που είναι αναγκαίο για τη ρύθμιση της έντασης ακτινοβολήσης μέσω της αυξομείωσης της ισχύος αλλά και βάση ψύξης με ενσωματωμένο ανεμιστήρα.



Εικόνα Δ. 8: διάταξη ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε

Πριν πραγματοποιηθούν τα πειράματα ακτινοβολήσης, μετρήθηκε η ένταση ακτινοβολίας της διάταξης ως προς το μήκος κύματος. Για τη μέτρηση έγινε χρήση της πηγής, μονοχρωμάτορα, αντίστασης και πολύμετρου. Με τη βοήθεια του μονοχρωμάτορα, η προσπίπτουσα στην είσοδο του ακτινοβολία από την πηγή, αναλύεται και στην έξοδο του διαδοχικά επιλέγεται μια καθορισμένη στενή φασματική περιοχή. Η εξερχόμενη μονοχρωματική ακτινοβολία προκαλεί στη συνδεδεμένη αντίσταση την ανάπτυξη τάσης ανάλογης με την ένταση ακτινοβολήσης και η μέτρηση αυτής της τάσης πραγματοποιήθηκε με το πολύμετρο. Το φάσμα της σχετικής έντασης ακτινοβολίας της πηγής ανά μήκος κύματος απεικονίζεται παρακάτω<sup>[1]</sup>:

#### Πηγή ακτινοβολήσης πειραμάτων παραγωγής ελ. ριζών



Διάγραμμα Δ. 1: Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος

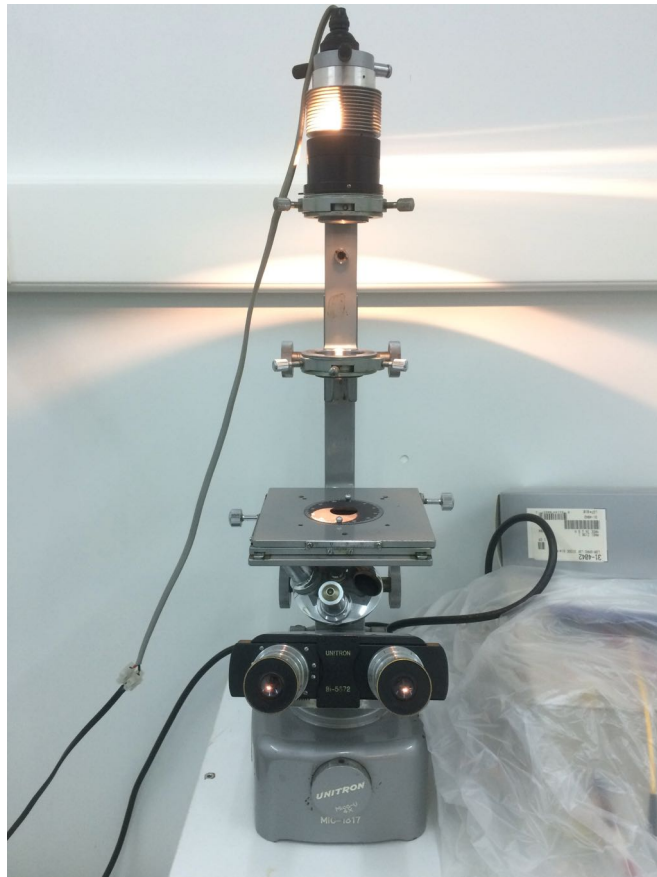
### Δ.2.4 Μικροσκόπια

#### Δ.2.4.1 Unitron MiC – 1317

Για την παρατήρηση των κυτταρικών καλλιεργειών της σειράς LNCaP χρησιμοποιείται το ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC – 1317 (εικόνα Δ.9).

Σε αντίθεση με τις κλασικές μικροσκοπικές διατάξεις, το ανάστροφο μικροσκόπιο στηρίζεται στο γεγονός ότι το φως έρχεται από πάνω, και ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται κάτω από το δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο, ο παρατηρητής βλέπει την κάτω επιφάνεια του αντικειμένου. Αυτή η λειτουργία διευκολύνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την παρατήρηση κυτταρικών καλλιεργειών διότι τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στον πυθμένα της φλάσκας ή του τριβλίου μέσα στο οποίο καλλιεργούνται.

Το ανάστροφο μικροσκόπιο του εργαστηρίου μας διαθέτει μια λάμπα αλογόνου ως πηγή φωτός αλλά και μεγεθυντικούς φακούς 10x, 20x και 40x.



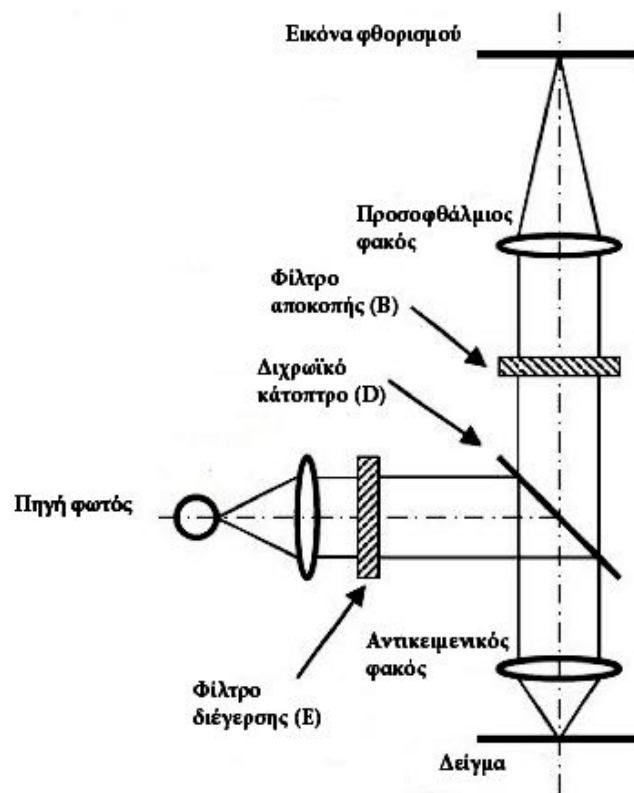
Εικόνα Δ. 9: Το ανάστροφο μικροσκόπιο Unitron MiC-1317

#### Δ.2.4.2 Μικροσκόπιο φθορισμού

Το μικροσκόπιο φθορισμού καθίσταται απαραίτητο για τη μελέτη του χρωρικού εντοπισμού των τεσσάρων κρουκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP.

Μία τέτοιου είδους διάταξη σχεδιάζεται με στόχο την εξασφάλιση της βέλτιστης συλλογής του σήματος φθορισμού από το εκάστοτε δείγμα. Αυτό προϋποθέτει και τη δυνατότητα ελαχιστοποίησης του φωτός από το υπόβαθρο, το οποίο αποτελείται τόσο από το ανεπιθύμητο φως του απευθείας φωτισμού όσο και από τον αυτοφθορισμό. Είναι επόμενο, ότι το χρωμοφόρο φθορισμού που έχει εισαχθεί στο δείγμα, πρέπει να διεγερθεί με φως σε κατάλληλο μήκος κύματος όσο το δυνατόν πιο κοντά στο μέγιστο της απορρόφησης του χρωμοφόρου και έτσι η συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού από το οπτικό σύστημα να

βελτιστοποιηθεί. Παρακάτω ακολουθεί ένα απλοποιημένο σχηματικό διάγραμμα (εικόνα Δ.10) μικροσκοπίου φθορισμού στο οποίο η διέγερση γίνεται με προσπίπτοντα φωτισμό:



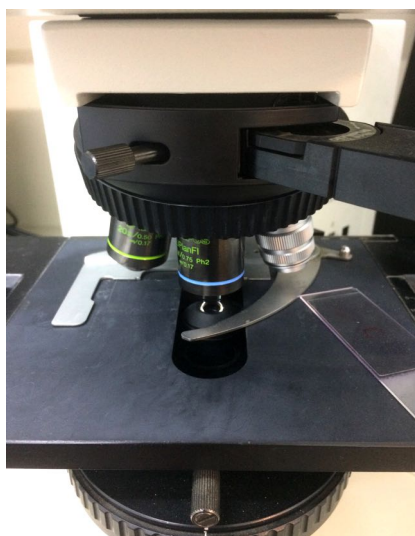
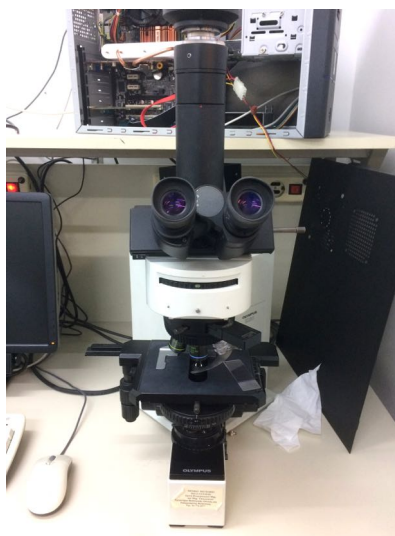
Εικόνα Δ. 10: Σχηματικό διάγραμμα μικροσκοπίου φθορισμού με τη διέγερση να γίνεται με προσπίπτοντα φωτισμό

Η εστίαση του φωτός στο δείγμα αλλά και η συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού γίνεται μέσω του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου. Η εστίαση του αντικειμενικού στο δείγμα έχει ως αποτέλεσμα τη σωστή ευθυγράμμιση του μικροσκοπίου η οποία είναι ίδια τόσο για τη διέγερση όσο και για την παρατήρηση του φθορίζοντος φωτός. Το πεδίο του δείγματος το οποίο ακτινοβολείται είναι το ίδιο με το παρατηρούμενο πεδίο. Χρησιμοποιώντας το κατάλληλο φίλτρο διέγερσης (E) τώρα, ένα η περισσότερα μήκη κύματος μπορούν να επιλεγούν για τη διέγερση του δείγματος. Το φως από τη λάμπα στη συνέχεια ανακλάται σε ένα διχρωϊκό κάτοπτρο (D), το οποίο στην ουσία ανακλά προς το δείγμα τα μικρότερα μήκη κύματος ενώ επιτρέπει τη διέλευση των μεγαλύτερων μηκών κύματος. Ορισμένες φορές, τα διχρωϊκά κάτοπτρα εμφανίζουν κατασκευαστικές ατέλειες, με αποτέλεσμα ένα μέρος του φωτός διέγερσης να ανακλάται από το δείγμα και να διέρχεται μέσω του διχρωϊκού κατόπτρου προς τον προσοφθάλμιο φακό. Το ανακλώμενο αυτό φως ενδέχεται να χαλάσει τελείως την αντίθεση της εικόνας και στην περίπτωση ακτινοβολήσης στην περιοχή του υπεριώδους να καταστρέψει τα μάτια του παρατηρητή. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η τοποθέτηση ενός επιπλέον φίλτρου αποκοπής (B), το οποίο επιτρέπει τη διέλευση μηκών κύματος μόνο μεγαλύτερων από μια τιμή.

Στην ουσία, το διχρωϊκό κάτοπτρο προκαλεί την ανάκλαση του διεγείροντος φωτός προς το δείγμα, αφού είναι μικρότερου μήκους κύματος, και επιτρέπει τη διέλευση του εκπεμπόμενου φθορισμού προς τους προσοφθάλμιους φακούς.



Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μας, έγινε χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX-50 (εικόνα Δ.11) στο οποίο η διέγερση πραγματοποιείται με φωτισμό πρόσπτωσης (epifluorescent microscope). Η διάταξη απεικονίζεται στις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα Δ. 11: Το μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50

Για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα σετ οπτικών φίλτρων-κύβων. Οι κύβοι φθορισμού με τους οποίους είναι εξοπλισμένο το μικροσκόπιο Olympus BX-50 είναι οι εξής:

Κωδικός κύβου	Φίλτρο διέγερσης (ζωνοπερατό) (nm)	Διχρωϊκό κάτοπτρο (nm)	Φίλτρο εκπομπής (υψιπερατό) (nm)
U-MWU	330-385	400	420
U-MWB	470-490	500	515
U-MWG	510-550	570	590

Πίνακας Δ. 2: Κύβοι φθορισμού μικροσκοπίου Olympus BX-50

Στα πειράματα που αφορούν στο χωρικό εντοπισμό των κουρκουμίνων στα κύτταρα LNCaP, με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά των κουρκουμίνων, γίνεται χρήση του κύβου U-MWU χωρίς την επιλογή του white balance. Για τη συλλογή των εικόνων φθορισμού χρησιμοποιείται ένας αντικειμενικός φακός 40x UPlanFL (NA=0,75), με διορθώσεις για σφαιρικές και χρωματικές εκτροπές.

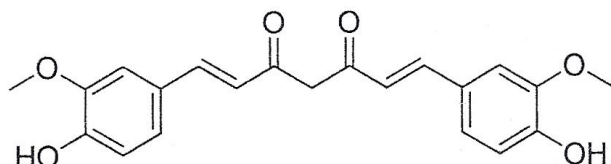
Η λήψη των εικόνων πραγματοποιείται μέσω μιας έγχρωμης CCD κάμερας (XC-30, Olympus), η οποία έχει κατάλληλα προσαρμοστεί (c-mount adapter) στην άκρη του σωλήνα φωτογραφικής καταγραφής (trinocular tube) του μικροσκοπίου, όπου με τη βοήθεια μετακινούμενου πρίσματος μπορούσε να γίνει αποκλειστική ή σύγχρονη, ως προς τους προσοφθάλμιους φακούς, παρατήρηση.

Ο έλεγχος της λήψης και μεταφοράς των εικόνων έγινε με τη χρήση του προγράμματος AnalySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions, GmbH). Τέλος, η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC.

### Δ.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

Στη συνέχεια περιγράφονται τα τέσσερα συνθετικά παράγωγα κουρκουμίνων τα οποία συντέθηκαν στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

#### Δ.3.1 Curcumin I (AX 126)



Εικόνα Δ. 12: : Χημική δομή της κουρκουμίνης I (AX-126)

#### 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione

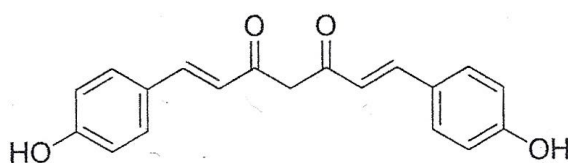
**Χημικός τύπος (chemical structure):** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

**Ακριβής μάζα (exact mass):** 368.13

**Μοριακό βάρος (molecular weight):** 368.38

Η Curcumin I είναι η πρώτη κουρκουμίνη που απομονώθηκε από το φυτό Turmeric. Είναι μια πορτοκαλί – κίτρινη κρυσταλλική σκόνη πρακτικά αδιάλυτη στο νερό. Αποτελεί μια πολυφαινόλη μικρού μοριακού βάρους με θερμοκρασία τήξης γύρω στους 183°C. Διατηρείται σε θερμοκρασίες 4 - 8°C.

#### Δ.3.2 Curcumin III (AX 186)



Εικόνα Δ. 13: Χημική δομή της Curcumin III (AX 186)

#### 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione

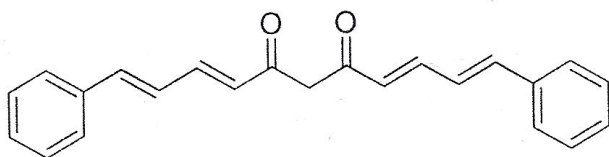
**Χημικός τύπος (chemical structure):** C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

**Ακριβής μάζα (exact mass):** 308.10

**Μοριακό βάρος (molecular weight):** 308.33

Είναι μια κίτρινη – πορτοκαλί σκόνη η οποία ανήκει στα κουρκουμινοειδή που απομονώθηκαν από το φυτό turmeric. Διατηρείται σε θερμοκρασίες 4 - 8°C.

### Δ.3.3 Curcumin AX 127



Εικόνα Δ. 14: Χημική δομή της Curcumin AX 127

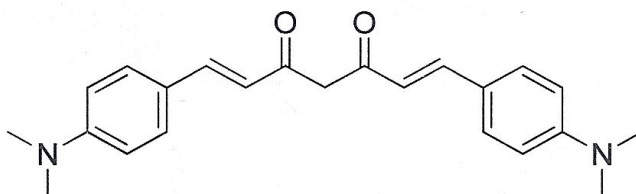
#### (1E, 3E, 8E, 10E)- 1,11-diphenylundeca-1,3,8,10-tetraene-5,7-dione

Χημικός τύπος (chemical structure):  $C_{23}H_{20}O_2$

Ακριβής μάζα (exact mass): 328.15

Μοριακό βάρος (molecular weight): 328.40

### Δ.3.4 Curcumin AX 232 (di-NCH<sub>3</sub> Curcumin)



Εικόνα Δ. 15: Χημική δομή της Curcumin AX 232

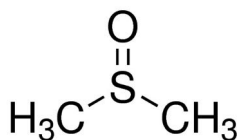
#### (1E, 6E)-1,7-bis(4-(dimethylamino)phenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione

Χημικός τύπος (chemical structure):  $C_{23}H_{26}N_2O_2$

Ακριβής μάζα (exact mass): 362.20

Μοριακό βάρος (molecular weight): 362.46

### Δ.3.5 DMSO



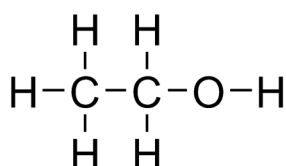
Εικόνα Δ. 16: : Χημική δομή του DMSO

Το DMSO (dimethyl sulfoxide) είναι ένας εξαιρετικός πολικός και ουσιαστικά απρωτικός διαλύτης (polar aprotic solvent). Έχει μοριακό τύπο  $C_2H_6OS$  και είναι ένα άχρωμο, εξαιρετικά υγροσκοπικό, ελαφρά ιξώδες και ελάχιστα πτητικό υγρό που διατηρείται στους 20°C<sup>[99]</sup>. Στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε ως κύριος διαλύτης των κουρκουμίνων σε όλα σχεδόν τα πειράματα. Επίσης, το DMSO είναι απαραίτητο και για την κατάψυξη των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη ουσία δεν έχει εμφανίσει τοξικότητα σε κύτταρα αν περιέχεται σε ποσοστό 1% ή και λιγότερο. Η παρουσία του σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 1% ενδέχεται να προκαλέσει τοξικές αντιδράσεις. Η εκάστοτε αντίδραση, φυσικά, εξαρτάται από το είδος των κυττάρων.

### Δ.3.6 PBS

Το PBS (Phosphate Buffered Saline) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο χρησιμοποιείται σε μια πληθώρα από εφαρμογές όσων αφορά τις κυτταρικές καλλιέργειες. Τέτοιες εφαρμογές είναι για παράδειγμα το πλύσιμο των κυττάρων, η αραίωσή τους για να γίνει στη συνέχεια μέτρηση καθώς και η μεταφορά τους<sup>[100]</sup>. Το PBS, εκτός από τη χρήση του στις κυτταρικές καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε επίσης και ως διαλύτης των κουρκουμίνων σε ορισμένα πειράματα. Διατηρείται σε θερμοκρασία 4 - 8°C.

### Δ.3.7 Αιθανόλη

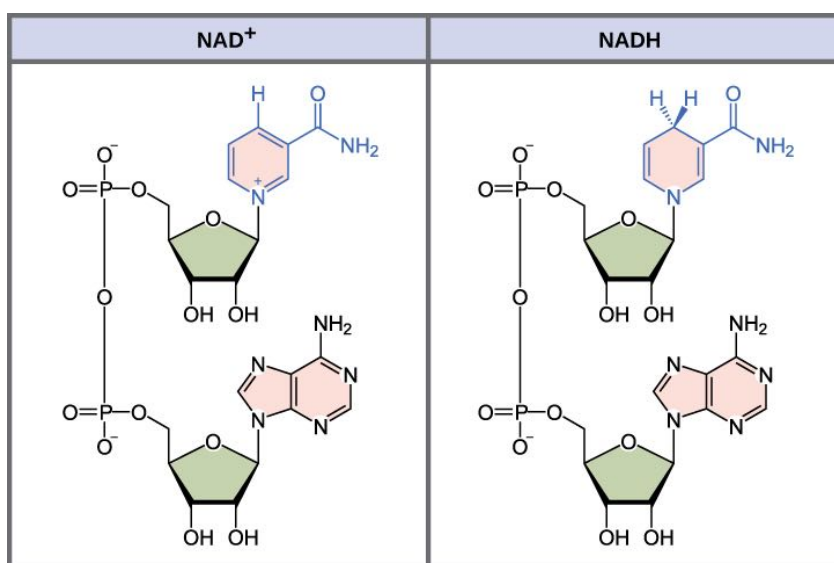


Εικόνα Δ. 17: Χημική δομή της αιθανόλης

Η αιθανόλη (Ethanol – EtOH) έχει μοριακό τύπο CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH ή C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O και είναι μια καθαρή, άχρωμη ένωση η οποία απορροφάται γρήγορα από το γαστρεντερικό σωλήνα και διανέμεται σε ολόκληρο το σώμα. Χρησιμοποιείται ευρέως ως διαλύτης αλλά και συντηρητικός παράγοντας στις φαρμακευτικές εφαρμογές<sup>[101]</sup>. Χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ως διαλύτης σε πειράματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX 232.

### Δ.3.8 NADH

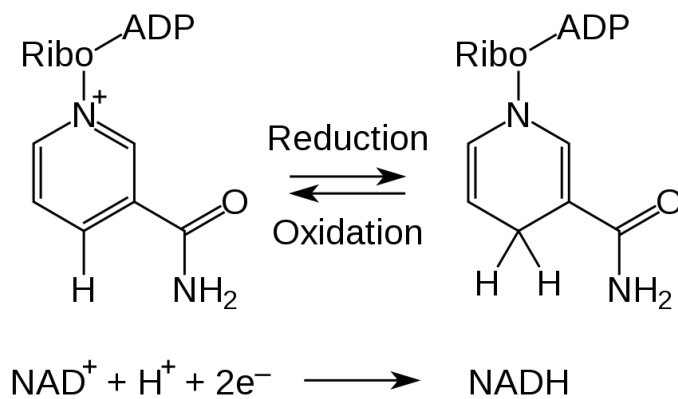
Το NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) είναι ένα σημαντικό νουκλεοτίδιο πυριδίνης το οποίο λειτουργεί ως οξειδωτικός συμπαραγοντας (cofactor) στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Βρίσκεται ευρέως στη φύση και εμπλέκεται σε ποικίλες ενζυματικές αντιδράσεις στις οποίες χρησιμεύει ως φορέας ηλεκτρονίων, όντας είτε σε οξειδωμένη κατάσταση (oxidized, NAD<sup>+</sup>) είτε σε μειωμένη (reduced, NADH)<sup>[102]</sup> (εικόνα Δ.18).



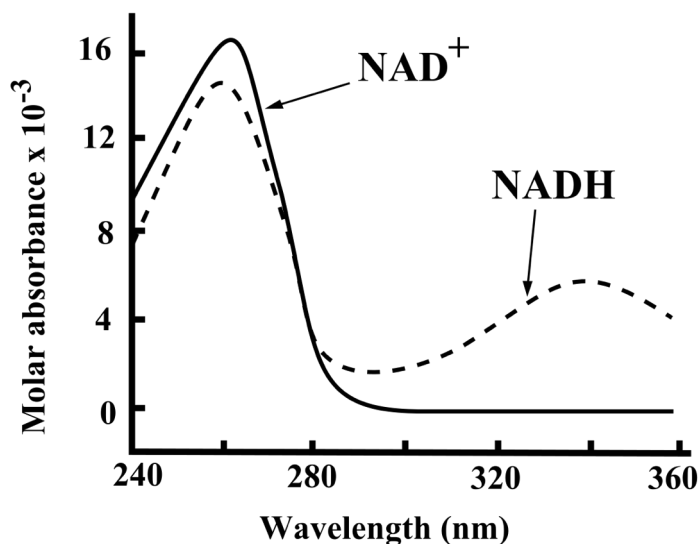
Εικόνα Δ. 18: Χημική δομή NAD<sup>+</sup> και NADH<sup>[103]</sup>

Το  $\text{NAD}^+$  είναι ένας φορέας ιόντων υδριδίων που μπορεί να σχηματίζει το  $\text{NADH}$ . Το ιόν υδριδίου απομακρύνεται ενζυματικά από ένα μόριο υποστρώματος λόγω της δράσης αφυδρογονάσων όπως είναι η μηλική αφυδρογονάση και η γαλακτική αφυδρογονάση. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάση προς το  $\text{NAD}^+$ , σχηματίζοντας έτσι το  $\text{NADH}$ . Είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι σε αντίθεση με το  $\text{NAD}^+$  το οποίο δεν παρουσιάζει απορρόφηση στα 340nm, το  $\text{NADH}$  απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η αύξηση στην απορρόφηση (που είναι επόμενη κατά το σχηματισμό του  $\text{NADH}$ ) ή η μείωση στην απορρόφηση (που είναι επόμενη κατά το σχηματισμό του  $\text{NAD}^+$ ) αποτελεί τη βάση για τη μέτρηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων στα 340nm (εικόνα Δ.20).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το  $\text{NADH}$  είναι φθορίζων σε αντίθεση με το  $\text{NAD}^+$ . Η διαφορά αυτή ως προς τον φθορισμό μας παρέχει μια ευαίσθητη μέτρηση του φθορισμού άρα και της δημιουργίας των οξειδωμένων ή μειωμένων νουκλεοτιδίων πυριδίνης σε συγκεντρώσεις ακόμη και της τάξης των  $10^{-7}\text{M}$ <sup>[104]</sup>.



Εικόνα Δ. 19: Σχηματισμός  $\text{NADH}$  από  $\text{NAD}^+$  και αντίστροφα

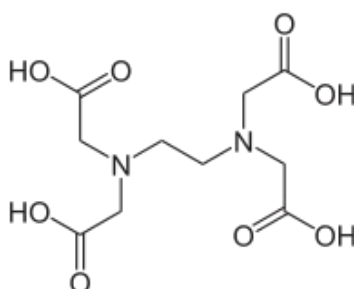


Εικόνα Δ. 20: Απορρόφηση  $\text{NAD}^+$  και  $\text{NADH}$  σε σχέση με το μήκος κύματος

Έγινε χρήση του  $\text{NADH}$  στα πειράματα για έλεγχο παραγωγής ελευθέρων ριζών από την κουρκουμίνη AX-232.

### Δ.3.9 EDTA

Το EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) και στα ελληνικά αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ  $C_{10}H_{16}N_2O_8$  είναι ο γνωστότερος και πλέον τυπικός εκπρόσωπος μιας σειράς ενώσεων, οι οποίες γενικά ονομάζονται αμινοπολυκαρβοξυλικά οξέα και χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά έντονη συμπλεκτική ικανότητα ως προς τα περισσότερα μεταλλοίοντα. Πρόκειται για ένα λευκό κρυσταλλικό άοσμο και διαλυτό στο νερό στερεό. Η χρησιμότητά του έγκειται στο ρόλο του ως εξασοντωτή συνδέτη και χηλικού παράγοντα, δηλαδή στην ικανότητά του να αποσπά μεταλλικά ιόντα όπως είναι τα  $Ca^{2+}$  και  $Fe^{3+}$ . Εφόσον αυτά δεσμευτούν από το EDTA, παραμένουν στο διάλυμα αλλά παρουσιάζουν μειωμένη αντιδραστικότητα. Το EDTA παράγεται ως διάφορα άλατα, κυρίως ως δινάτριο EDTA (disodium EDTA) και ασβεστιοδινάτριο EDTA (calcium disodium EDTA)<sup>[105]</sup>.



Εικόνα Δ. 21: Χημική δομή EDTA

Το EDTA χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με το NADH κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσον αφορά τον έλεγχο για την ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών από την κουρκουμίνη AX-232.

### Δ.3.10 FBS

Το FBS (Fetal Bovine Serum) είναι το περισσότερο διαδεδομένο συμπλήρωμα ανάπτυξης για προσθήκη στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε εμβρυικούς αυξητικούς παράγοντες. Όταν χρησιμοποιείται σε κατάλληλες συγκεντρώσεις παρέχει πολυάριθμα συστατικά που έχει αποδειχθεί ότι πληρούν ειδικές μεταβολικές ανάγκες για την καλλιέργεια των κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού μέσου για τα κύτταρα<sup>[106]</sup>.

### Δ.3.11 Αντιβιοτικό

Στις κυτταρικές καλλιέργειες, απαραίτητη είναι επίσης και η παρουσία αντιβιοτικού. Κάνουμε χρήση του προϊόντος Gibco Antibiotic-Antimycotic που βοηθάει στην αποφυγή βακτηριακής ή μυκητιακής μόλυνσης. Περιέχει πενικιλίνη (10000 units/mL), στρεπτομυκίνη (10000  $\mu$ g/mL) καθώς και Gibco αμφοτερικίνη B (25 $\mu$ g/mL).

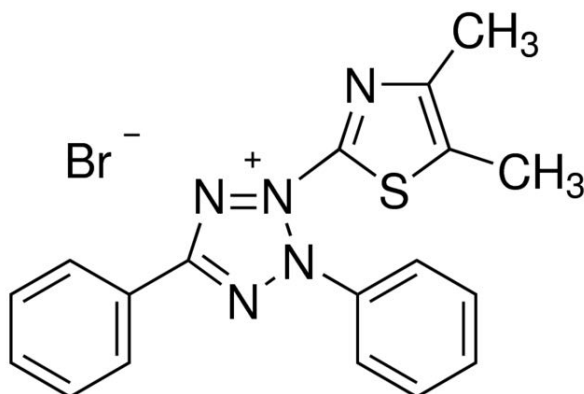
### Δ.3.12 RPMI

Έγινε χρήση του RPMI 1640 (LGC Standards) ως θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνεται στο πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ). Το ΠΘΜ περιλαμβάνει στην ουσία RPMI 1640, FBS καθώς και αντιβιοτικό. Το RPMI πρέπει να διατηρείται στους 2-8°C και στο σκοτάδι.

### Δ.3.13 Τρυψίνη

Η τρυψίνη είναι απαραίτητη για την αφαίρεση των προσκολλημένων κυττάρων από την φλάσκα της εκάστοτε καλλιέργειας. Χρησιμοποιούμε την τρυψίνη Trypsin – EDTA solution της Gibco. Η συγκέντρωση της τρυψίνης που χρειάζεται για να προκαλέσει την προσκόλληση των κυττάρων εξαρτάται κυρίως από τον τύπο των κυττάρων αλλά και την “ηλικία” της καλλιέργειας.

### Δ.3.14 MTT

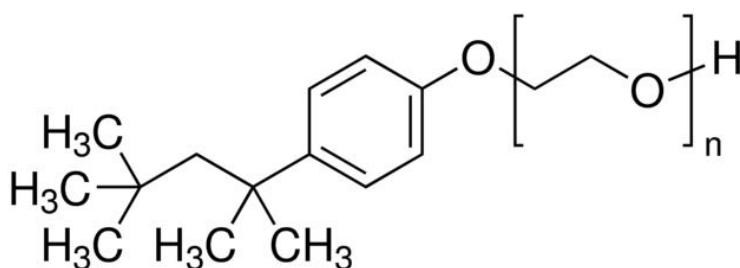


Εικόνα Δ. 22: Χημική δομή του MTT

Το MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) αποτελεί ένα δείκτη χρωματομετρικής μεταβολικής δραστηριότητας κατά τη διεξαγωγή αναλύσεων βιωσιμότητας κυττάρων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παράγει ένα κιτρινωπό διάλυμα το οποίο μετατρέπεται σε σκούρο μπλέ-μώβ σύμπλοκο φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων<sup>[107]</sup>.

### Δ.3.15 Triton X

Το Triton X-100 (Sigma) αποτελεί μια μη ιονική επιφανειοδραστική ουσία αλλά και ένα γαλακτοματοποιητή που χρησιμοποιείται συχνά σε βιοχημικές εφαρμογές για τη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται στο εργαστήριο ως συστατικό του διαλύτη του MTT<sup>[108]</sup>.



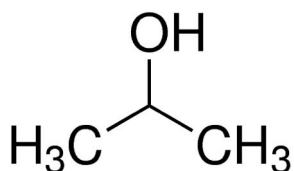
Εικόνα Δ. 23: Χημική δομή Triton X-100

### Δ.3.16 HCl

Το υδροχλωρικό οξύ είναι υδατικό διάλυμα του αερίου υδροχλωρίου με το οποίο έχει και τον ίδιο χημικό τύπο. Χρησιμοποιήθηκε και αυτό ως συστατικό του διαλύτη του ΜΤΤ.

### Δ.3.17 Ισοπροπανόλη

Η ισοπροπανόλη είναι μια καθαρή, άχρωμη, πολική οργανική ένωση η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια χημείας και μοριακής βιολογίας. Μπορεί να διαλύσει μια πληθώρα χημικών ουσιών και εξατμίζεται γρήγορα. Γίνεται χρήση της τόσο στον καθαρισμό και την αποστείρωση του εργαστηρίου όσο και σαν συστατικό του διαλύτη του ΜΤΤ<sup>[109]</sup>.



Εικόνα Δ. 24: Χημική δομή ισοπροπανόλης



## Κεφάλαιο Ε: Μεθοδολογίες και Πρωτόκολλα

## E.1 Κυτταρικές Καλλιέργειες

### E.1.1: Μεθοδολογία απόψυξης κυτταρικής σειράς LNCaP

Η αποθήκευση και η διατήρηση των κυττάρων γίνεται μέσα στο δοχείο υγρού αζώτου. Το τελευταίο περιέχει θήκες όπου τοποθετούνται τα φιαλίδια που περιέχουν τα κύτταρα. Για την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται σε πρώτο στάδιο η παρασκευή δύο διαλυμάτων:

#### 1) Διάλυμα ξεπλύματος κυττάρων μετά το ξεπάγωμα για αναστολή της δράσης του DMSO

Για διάλυμα με τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}} = 10\text{ml}$  τοποθετούνται με τη χρήση πιπέττας τα εξής:

PBS = 9ml

FBS = 1ml

Αντιβιοτικό = 80μl

#### 2) Πλήρες Θρεπτικό Μέσο (ΠΘΜ)

Για διάλυμα με τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}} = 15\text{ml}$  τοποθετούνται με τη χρήση πιπέττας τα εξής:

RPMI =  $3 \times 4,5 \text{ ml} = 13,5 \text{ ml}$

FBS =  $3 \times 0,5 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$

Αντιβιοτικό =  $3 \times 40 \text{ μl} = 120 \text{ μl}$

Στη συνέχεια ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Τοποθετείται ένα μπουκαλάκι ζέσεως με απιονισμένο νερό μέσα στον κλίβανο. Όταν το τελευταίο αποκτήσει τη θερμοκρασία του κλιβάνου, προστίθεται σε αυτό ένα φιαλίδιο με κύτταρα που έχουν παρθεί από το υγρό άζωτο. Αυτό γίνεται με στόχο να ξεπαγώσουν τα κύτταρα.
- Λαμβάνεται με την πιπέττα 1ml από το 1<sup>ο</sup> διάλυμα (διάλυμα ξεπλύματος κυττάρων μετά το ξεπάγωμα για αναστολή της δράσης του DMSO). Στη συνέχεια, αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν, αδειάζονται στο 1<sup>ο</sup> διάλυμα. Έπειτα, με το 1ml στην πιπέττα πραγματοποιούνται 2 ξεπλύματα στο μικρό φιαλίδιο. Προστίθεται το υγρό στο 1<sup>ο</sup> διάλυμα και γίνονται 2-3 pipetting ώστε αυτό να γίνει ομογενές. Έτσι λοιπόν, μέσα στο tube θα υπάρχουν τώρα 10ml διαλύματος ξεπλύματος κυττάρων μετά το ξεπάγωμα για αναστολή της δράσης του DMSO μαζί με τα κύτταρα.
- Το tube εισάγεται στη φυγόκεντρο για 7 λεπτά στις 1200rpm, δηλαδή στο 60%.

- Τώρα πρέπει να γίνει προετοιμασία της φλάσκας έτσι ώστε αυτή να δεχτεί τα κύτταρα και να ξεκινήσει η νέα καλλιέργεια. Στην περίπτωση μικρής φλάσκας (25cm<sup>2</sup>) τοποθετούνται 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου (ΠΘΜ) σε αυτήν ενώ στην περίπτωση μεγάλης (75cm<sup>2</sup>) τοποθετούνται 10ml ΠΘΜ.
- Με την προϋπόθεση ότι έχει τελειώσει η φυγοκέντρηση, αφαιρείται από το tube το υπερκείμενο ώστε να μείνουν μόνο τα κύτταρα. Αυτό γίνεται με μια μόνο κίνηση. Αν υπάρχει παλινδρόμηση μπορεί να ξεκολλήσει το pellet με τα κύτταρα. Το υπερκείμενο πετιέται σε δοχείο απόρριψης.
- Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, εισάγονται στο tube που έχει τώρα μόνο τα κύτταρα, 5 ml ΠΘΜ. Πραγματοποιείται, στη συνέχεια, πολύ καλό pipetting για να σπάσουν τα συσσωματώματα.
- Με την πιπέττα και με μαλακές κινήσεις, εισάγονται τα κύτταρα μέσα στη φλάσκα. Εκεί, διαχέονται έτσι ώστε να πάνε παντού.
- Πριν το κλείσιμο της φλάσκας, γίνεται αποστείρωση του στομίου τόσο έξω όσο και από μέσα.
- Παρατηρείται η φλάσκα στο μικροσκόπιο, για να ελεγχθεί εάν όλα πήγαν καλά.



Εικόνα Ε. 1: Φλάσκες της Corning που χρησιμοποιούνται

## E.1.2: Μεθοδολογία ανακαλλιέργειας κυτταρικής σειράς LNCaP

Σε πρώτο στάδιο απαιτείται η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

### 1) Διάλυμα για αναστολή δράσης τρυψίνης

Χρειάζονται 10 ml διαλύματος για μεγάλη φλάσκα και 5ml για τη μικρή. Η σύσταση του διαλύματος για τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}} = 10\text{ml}$  έχει ως εξής:

$$\text{PBS} = 2 \times 4,5\text{ml} = 9\text{ml}$$

$$\text{FBS} = 2 \times 0,5 = 1\text{ml}$$

$$\text{Αντιβιοτικό} = 2 \times 40\mu\text{l} = 80\mu\text{l}$$

### 2) ΠΘΜ

Χρειάζονται 15ml για τη μεγάλη φλάσκα και 5ml για τη μικρή. Η σύσταση του ΠΘΜ μπορεί να βρεθεί στην ενότητα E.1.1.

### 3) Διάλυμα για ξέπλυμα

Η σύσταση του διαλύματος για  $V_{\text{τελ}} = 10\text{ml}$  είναι η εξής:

$$\text{PBS} = 10\text{ml}, \text{Αντιβιοτικό} = 80\mu\text{l}$$

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν η πληρότητα σε κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας υπερβαίνει το 70%.
- Απορρίπτεται το παλιό μέσο. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την απόρριψη του υγρού από τη φλάσκα ή την προσθήκη υγρού σε αυτήν. Πάντα πρέπει να γίνεται από το πλάι και αυτό διότι εάν δεν γίνει από το πλάι υπάρχει κίνδυνος να χαθούν κύτταρα.
- Η φλάσκα ξεπλένεται με 2ml από το διάλυμα 3 εάν αυτή είναι μεγάλη ή με 1ml εάν είναι μικρή.
- Το ξέπλυμα επαναλαμβάνεται με 2ml ή 1ml αντίστοιχα.
- Προστίθενται 2ml τρυψίνης εάν η φλάσκα είναι μεγάλη ή 1ml εάν είναι μικρή. Αυτό πραγματοποιείται ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Στη συνέχεια γίνεται καλή ανακίνηση σε συνδυασμό με μερικά μικρά χτυπήματα. Η παραμονή της τρυψίνης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 2-3 λεπτά γιατί προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Η φλάσκα παρατηρείται και στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί εάν όντως επιτεύχθηκε η αποκόλληση.

- Προστίθενται 6ml διαλύματος αναστολής δράσης τρυψίνης στην περίπτωση μεγάλης φιάσκας και 3ml στην περίπτωση μικρής. Γίνεται καλή ανακίνηση. Έπειτα, το περιεχόμενο της φιάσκας εισάγεται σε ένα tube.
- Προστίθενται ακόμη 4ml διαλύματος αναστολής δράσης τρυψίνης (μεγάλη φιάσκα) ή 2ml (μικρή φιάσκα), γίνεται καλή ανακίνηση και τέλος εισάγεται το περιεχόμενο της φιάσκας στο ίδιο tube με το προηγούμενο στάδιο.
- Το tube τοποθετείται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται για 7 λεπτά στις 1200rpm (60%).
- Με την προϋπόθεση ότι έχει τελειώσει η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά με μια κίνηση. Πιθανή παλινδρόμηση μπορεί να ξεκολλήσει το pellet των κυττάρων.
- Αφού το υπερκείμενο αφαιρεθεί, εισάγονται στο tube που έχει τώρα μόνο τα κύτταρα 5ml ΠΘΜ (για μεγάλη φιάσκα). Πραγματοποιείται στη συνέχεια πολύ καλό pipetting για να σπάσουν τα συσσωματώματα.
- Με την πιπέτα και με μαλακές κινήσεις τα κύτταρα τοποθετούνται μέσα στην καινούργια φιάσκα, στην οποία έχουν προηγουμένως εισαχθεί 10ml ΠΘΜ (φιάσκα μεγάλη – 75cm<sup>2</sup>). Τα κύτταρα διαχέονται να πάνε παντού.
- Πριν το κλείσιμο της φιάσκας, γίνεται αποστείρωση του στομίου τόσο έξω όσο και μέσα.
- Η φιάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και στη συνέχεια εισάγεται στον κλίβανο για να γίνει η επώαση των κυττάρων.

### E.1.3 Μεθοδολογία κατάψυξης κυττάρων

Η κατάψυξη των κυττάρων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρησή τους. Πραγματοποιείται στο δοχείο υγρού αζώτου όπου η θερμοκρασία ανέρχεται στους -196°C. Αρχικά, γίνεται η παρασκευή του διαλύματος κατάψυξης κυττάρων το οποίο έχει την εξής σύσταση για τελικό όγκο  $V_{\text{τελ}} = 1\text{ml}$ :

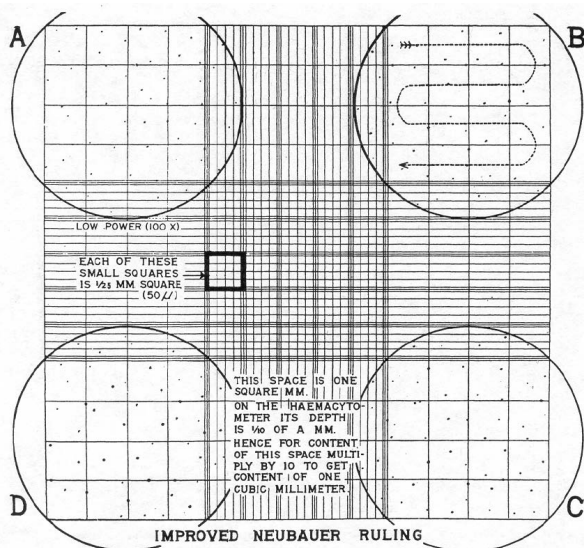
RPMI = 800μl  
 FBS = 200μl  
 Αντιβιοτικό = 8μl

Στο παραπάνω διάλυμα, το οποίο βρίσκεται στο κατάλληλο για κατάψυξη φιαλίδιο, προστίθενται τα κύτταρα που έχουν συλλεχθεί. Σε κάθε φιαλίδιο εισάγονται επιπροσθέτως 70μl DMSO. Το DMSO αποτρέπει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη τους. Η κατάψυξη στη συνέχεια γίνεται σε δύο στάδια. Πρώτα τοποθετείται το φιαλίδιο στον υπερκαταψύκτη, ο οποίος έχει θερμοκρασία -80°C. Μόλις

περάσουν 24 ώρες το φιαλίδιο μεταφέρεται στο δοχείο υγρού αζώτου όπου και μπορεί να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα.

#### E.1.4 Μεθοδολογία μέτρησης αριθμού κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων καθίσταται απαραίτητη για την επίτευξη ακρίβειας στα πειράματα που διεξάγονται. Όταν χρειάζεται να φτιαχτούν τριβλία με κύτταρα, θα πρέπει αυτά να έχουν τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού γίνεται με τη βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου (πλακίδιο) Neubauer (εικόνα E.2). Το πλακίδιο αυτό είναι στην ουσία μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Από τα 9 κύρια τετράγωνα, μόνο τα 4 που βρίσκονται στις γωνίες του τετράγωνου πλέγματος χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των κυττάρων. Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη επιφάνεια αυτή μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια<sup>[110]</sup>.



Εικόνα E. 2: Πλακίδιο Neubauer<sup>[111]</sup>

Η διαδικασία της μέτρησης είναι η εξής:

- Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση σε ένα μικρό και αντιπροσωπευτικό όγκο κυττάρων. Συνήθως, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ένα tube μαζί με 4ml ΠΘΜ. Από αυτό το διάλυμα, λαμβάνονται 50μl και προστίθενται σε 200μl PBS (αραιώση 1 : 5).
- Στη συνέχεια, ο κυτταρομετρητής καθαρίζεται με διάλυμα ισοπροπανόλης – απιονισμένου νερού (αναλογία 70% | 30%).
- Τοποθετούνται στον κυτταρομετρητή 9μl του διαλύματος που παρασκευάστηκε προηγουμένως με 50μl κυττάρων-ΠΘΜ και 200μl PBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που περιέχονται στα 4 τετράγωνα στις γωνίες του πλακιδίου.
- Υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων από τα 4 τετράγωνα (ΜΟ). Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων = Μέσος όρος (ΜΟ) × 10.000 × αριθμός αραιώσης × αρχικός όγκος διαλύματος που περιέχονται τα κύτταρα. Έτσι λοιπόν, στη συγκεκριμένη περίπτωση θα είναι: (ΜΟ) × 10.000 × 5 (αριθμός αραιώσης) × 4 (4ml είναι ο αρχικός όγκος του διαλύματος όπου περιέχονται τα κύτταρα).

## E.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμίνης AX-232 (di – NCH<sub>3</sub> curcumin)

### E.2.1 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις

Η κουρκουμίνη AX-232 βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Έτσι λοιπόν, σε αρχικό στάδιο θα πρέπει να φτιαχτεί το μητρικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό θα γίνει σε DMSO. Τοποθετούνται 1,5mg της ουσίας σε 1,5ml DMSO. Έτσι λοιπόν από τον τύπο  $C = \frac{m \times 1000}{V \times M_r}$ , όπου m είναι σε gr και V σε ml, προκύπτει ότι θα σχηματιστεί μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης  $C = 2,76 \times 10^{-3} M$  (σε DMSO).

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιείται λήψη των φασμάτων απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διαλύματα με συγκεντρώσεις  $2 \times 10^{-5} M$  (20μM),  $10^{-5} M$  (10μM),  $5 \times 10^{-6} M$  (5μM),  $10^{-6} M$  (1μM) και  $5 \times 10^{-7} M$  (0,5μM). Για το λόγο αυτό πρέπει να γίνουν οι απαραίτητες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα. Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Σημειώνεται επίσης ότι ο όγκος των διαλυμάτων στα οποία μετρείται η απορρόφηση πρέπει να είναι 3ml.

Για τη διεξαγωγή των μελετών απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (ενότητα Δ.2.1).

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχνονται τα διαλύματα με συγκέντρωση  $2 \times 10^{-5} M$  (20μM),  $10^{-5} M$  (10μM),  $5 \times 10^{-6} M$  (5μM),  $10^{-6} M$  (1μM) και  $5 \times 10^{-7} M$  (0,5μM). Τα διαλύματα των 3ml εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ένα ζεύγος κυβεττών οι οποίες περιέχουν 3ml DMSO η καθεμία έτσι ώστε να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Επιλέγεται προηγουμένως η επιλογή Autozero. Το σήμα αυτό, μέσω της επιλογής Autozero, αφαιρείται κάθε φορά από όλα τα ακόλουθα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων. Έτσι, επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.
- Στη θέση «δείγμα» του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης τοποθετούνται τώρα ένα ένα τα διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις που πρέπει να μελετηθούν και τα οποία βρίσκονται στις κατάλληλες κυβέττες. Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετρείται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.



## E.2.2 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης της κουρκουμίνης AX - 232 σε διάφορες διαλύτες

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιείται μελέτη της απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορους διαλύτες. Ως διαλύτες χρησιμοποιούνται το DMSO, η αιθανόλη (EtOH) καθώς και το PBS. Η επιθυμητή συγκέντρωση της κουρκουμίνης στα τρία διαλύματα επιλέγεται να είναι  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M).

Το μητρικό διάλυμα της AX-232 που είναι διαθέσιμο έχει συγκέντρωση  $C = 2,76 \times 10^{-3}M$  (σε DMSO). Από αυτό το διάλυμα, μέσω αραιώσεως σε DMSO, δημιουργείται ένα νέο διάλυμα με συγκέντρωση  $C = 2 \times 10^{-5}M$ . Από το τελευταίο, σχηματίζεται ένα διάλυμα συγκέντρωσης  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M) με αραιώση σε αιθανόλη (EtOH).

Στη συνέχεια, με δύο αραιώσεις σε PBS, από το μητρικό διάλυμα με  $C = 2,76 \times 10^{-3}M$  (1<sup>η</sup> αραιώση για να φτιαχτεί διάλυμα με  $C = 2 \times 10^{-5}M$  και 2<sup>η</sup> αραιώση για να φτιαχτεί διάλυμα με  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M)) προκύπτει το ζητούμενο διάλυμα συγκέντρωσης  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M) σε PBS.

Η απορρόφηση του διαλύματος με  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M) σε DMSO έχει εξεταστεί στην ενότητα E.2.1.

Για τη διεξαγωγή των μελετών απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (ενότητα Δ.2.1).

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχνονται τα 3 διαλύματα, χρησιμοποιώντας DMSO, αιθανόλη (EtOH) και PBS ως διαλύτες, με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Τα διαλύματα των 3ml εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του εκάστοτε διαλύτη. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ένα ζεύγος κυβεττών οι οποίες περιέχουν 3ml DMSO, αιθανόλης (EtOH) ή PBS (ανάλογα με το πείραμα) η καθεμία έτσι ώστε να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Επιλέγεται προηγουμένως η επιλογή Autozero. Το σήμα αυτό, μέσω της επιλογής Autozero, αφαιρείται κάθε φορά από όλα τα ακόλουθα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων. Έτσι, επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.
- Στη θέση «δείγμα» του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης τοποθετούνται τώρα ένα ένα τα διαλύματα που πρέπει να μελετηθούν και τα οποία βρίσκονται στις κατάλληλες κυβέττες. Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.

### Ε.2.3 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιείται η μελέτη του φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO και κατασκευάζονται διαλύματα της AX-232 με συγκεντρώσεις  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  (0,5 $\mu\text{M}$ ),  $10^{-7} \text{M}$  (0,1 $\mu\text{M}$ ),  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (0,05 $\mu\text{M}$ ) και  $10^{-8} \text{M}$  (0,01 $\mu\text{M}$ ) (σε DMSO). Τα διαλύματα διεγείρονται στο μέγιστο της απορρόφησής τους.

Για τη διεξαγωγή των μελετών φθορισμού χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα Δ.2.2).

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχνονται τα διαλύματά με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας DMSO ως διαλύτη. Τα διαλύματα των 3ml εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου φθορισμού με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση για το φθορισμό των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενου φθορισμού του διαλύτη DMSO. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού μια κυβέττα η οποία περιέχει 3ml DMSO έτσι ώστε να καταγραφεί το σήμα λόγω του φθορισμού του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Στη συνέχεια, το αρχείο αποθηκεύεται (Realtime options  $\rightarrow$  Auto Background Subtract  $\rightarrow$  πληκτρολογείται το όνομα του αρχείου αναφοράς), έτσι ώστε το σήμα που έχει καταγραφεί να αφαιρείται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.
- Στην κατάλληλη εσοχή του φασματοφωτόμετρου φθορισμού τοποθετούνται τώρα ένα ένα τα διαλύματα που πρέπει να μελετηθούν και τα οποία βρίσκονται στις κατάλληλες κυβέττες. Η διέγερση (excitation) ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης (497nm). Τα φάσματα φθορισμού κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην περιοχή μεταξύ 520 και 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης αλλά και εκπομπής επιλέγεται να είναι 10nm.

### Ε.2.4 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φωτολεύκανσης

#### Ε.2.4.1 Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο της απορρόφησης

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιούνται πειράματα όσον αφορά τη φωτολεύκανση της κουρκουμίνης AX-232 μέσω μέτρησης της εξέλιξης του φάσματος απορρόφησης της ουσίας έπειτα από ακτινοβολήση. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO και από το μητρικό διάλυμα της AX-232 ( $C = 2,76 \times 10^{-3} \text{M}$ ) κατασκευάζεται διάλυμα με  $C = 10^{-5} \text{M}$  (10 $\mu\text{M}$ ).

Για τη διεξαγωγή των μελετών της φωτολεύκανσης απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1).

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχνεται το διάλυμα της AX-232 με την προαναφερθείσα συγκέντρωση (10μM), χρησιμοποιώντας DMSO ως διαλύτη. Το διάλυμα των 3ml εισάγεται σε κυβέττα φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ένα ζεύγος κυβεττών οι οποίες περιέχουν 3ml DMSO η καθεμία έτσι ώστε να καταγραφεί το σήμα λόγω της απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Επιλέγεται προηγουμένως η επιλογή Autozero. Το σήμα αυτό, μέσω της επιλογής Autozero, αφαιρείται κάθε φορά από όλα τα ακόλουθα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων. Έτσι, επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.
- Ξεκινάει η ακτινοβολήση του διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 και κάθε φορά που αυτή τελειώνει, τοποθετείται στη θέση «δείγμα» του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης το ακτινοβολημένο διάλυμα του οποίου το φάσμα απορρόφησης πρέπει να καταγραφεί. Το διάλυμα βρίσκεται στην κατάλληλη κυβέττα και ακτινοβολείται με ισχύ  $12,5 \text{ mW/cm}^2$  χρησιμοποιώντας τη διάταξη που περιγράφεται στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβολήση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα. Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 0min – 10min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 10min – 30min. Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.
- Κάθε φορά γίνεται καταγραφή της μέγιστης απορρόφησης που παρουσιάζεται στο φάσμα.

#### Ε.2.4.2 Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιούνται πειράματα όσον αφορά τη φωτολεύκανση της κουρκουμίνης AX-232 μέσω μέτρησης της εξέλιξης του φάσματος φθορισμού της ουσίας έπειτα από ακτινοβολήση. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το DMSO και από το μητρικό διάλυμα της AX-232 ( $C = 2,76 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) κατασκευάζεται διάλυμα με  $C = 5 \times 10^{-7} \text{ M}$  (0,5μM).

Για τη διεξαγωγή των μελετών της φωτολεύκανσης φθορισμού χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα Δ.2.2).

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχεται το διάλυμα της AX-232 με την προαναφερθείσα συγκέντρωση (0,5μM), χρησιμοποιώντας DMSO ως διαλύτη. Το διάλυμα των 3ml εισάγεται σε κυβέττα φασματοφωτόμετρου φθορισμού με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση για το φθορισμό των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενου φθορισμού του διαλύτη DMSO. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού μια κυβέττα η οποία περιέχει 3ml DMSO έτσι ώστε να καταγραφεί το σήμα λόγω του φθορισμού του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Αποθηκεύεται στη συνέχεια το αρχείο αυτό (Realtime options → Auto Background Subtract → πληκτρολόγηση του ονόματος του αρχείου αναφοράς), έτσι ώστε το σήμα που έχει καταγραφεί να αφαιρείται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.
- Ξεκινάει η ακτινοβόληση του διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 και κάθε φορά που αυτή τελειώνει, τοποθετείται στην κατάλληλη εσοχή του φασματοφωτόμετρου φθορισμού το ακτινοβολημένο διάλυμα του οποίου το φάσμα φθορισμού πρέπει να καταγραφεί. Το διάλυμα βρίσκεται στην κατάλληλη κυβέττα και ακτινοβολείται με ισχύ  $12,5 \text{ mW/cm}^2$  χρησιμοποιώντας τη διάταξη που περιγράφεται στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβόληση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα. Το φάσμα φθορισμού καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0min – 10min και ανά 5 λεπτά ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 10min – 30min. Η διέγερση (excitation) ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης της ουσίας. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης αλλά και εκπομπής επιλέγεται να είναι 10nm.
- Κάθε φορά γίνεται καταγραφή της μέγιστης τιμής φθορισμού που παρουσιάζεται στο φάσμα.

### E.2.5 Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιείται η μελέτη της ικανότητας της AX-232 για παραγωγή ελευθέρων ριζών. Είναι εξαιρετικά σημαντικό ο φωτοευαίσθητοποιητής που χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία να έχει υψηλή ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών έτσι ώστε να επιτευχθεί η τοξικότητα της θεραπείας απέναντι στα καρκινικά κύτταρα.

Τα πειράματα που διεξάγονται αφορούν διάλυμα κουρκουμίνης AX-232 με συγκέντρωση  $10^{-5}\text{M}$  (10μM). Το τελευταίο σχηματίζεται από το μητρικό διάλυμα της ουσίας σε DMSO με συγκέντρωση  $2,76 \times 10^{-3}\text{M}$ . Επίσης, το τελικό προς ακτινοβόληση διάλυμα περιλαμβάνει εκτός από κουρκουμίνη σε συγκέντρωση  $10^{-5}\text{M}$ , NADH σε συγκέντρωση 100μM καθώς και EDTA σε συγκέντρωση 0,1mM. Έχει όγκο 3ml.

Στο πρώτο πείραμα, το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε DMSO. Η πρώτη αραιώση αφορά τη δημιουργία διαλύματος με  $C = 2 \times 10^{-5}M$  από το μητρικό διάλυμα ( $2,76 \times 10^{-3}M$ ), ενώ η δεύτερη τη δημιουργία διαλύματος με  $C = 10^{-5}M$  από το διάλυμα με  $C = 2 \times 10^{-5}M$ . Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται στα  $4,77 \text{ mW/cm}^2$ .

Στο δεύτερο πείραμα το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε PBS. Σημειώνεται ότι το μητρικό διάλυμα είναι σε DMSO. Η πρώτη αραιώση αφορά τη δημιουργία διαλύματος με  $C = 2 \times 10^{-5}M$  από το μητρικό διάλυμα ( $2,76 \times 10^{-3}M$ , σε DMSO), ενώ η δεύτερη τη δημιουργία διαλύματος με  $C = 10^{-5}M$  από το διάλυμα με  $C = 2 \times 10^{-5}M$ . Και οι δύο αυτές αραιώσεις γίνονται σε PBS. Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται στα  $4,77 \text{ mW/cm}^2$ .

Στο τρίτο πείραμα, το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε DMSO. Ο τρόπος παρασκευής του είναι ακριβώς ο ίδιος που περιγράφηκε στο πρώτο πείραμα. Το μόνο που διαφέρει εδώ είναι ότι η ακτινοβολήση γίνεται στα  $10,72 \text{ mW/cm}^2$ .

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της κουρκουμίνης AX-232 χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1).

Σε κάθε πείραμα ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Φτιάχνεται κάθε φορά το διάλυμα της AX-232 με συγκέντρωση  $10^{-5}M$  (αραιώσεις σε PBS ή DMSO), το οποίο περιλαμβάνει NADH ( $100\mu M$ ) και EDTA ( $0,1mM$ ). Το διάλυμα αυτό, που έχει όγκο 3ml, εισάγεται σε κυβέττα φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με χωρητικότητα 4,5ml.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη. Για το λόγο αυτό, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ένα ζεύγος κυβεττών οι οποίες περιέχουν στο μεν 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> πείραμα 3ml DMSO η καθεμία στο δε 2<sup>ο</sup> πείραμα 3ml PBS, έτσι ώστε να καταγραφεί κάθε φορά το σήμα λόγω της απορρόφησης του διαλύτη αλλά και του θορύβου του οργάνου. Επιλέγεται προηγουμένως η επιλογή Autozero. Το σήμα αυτό, μέσω της επιλογής Autozero, αφαιρείται κάθε φορά από όλα τα ακόλουθα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων. Έτσι, επιτυγχάνεται η αποφυγή των σφαλμάτων.

- Ξεκινάει η ακτινοβολήση του εκάστοτε διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 (παρουσία NADH και EDTA φυσικά) και κάθε φορά που αυτή τελειώνει, τοποθετείται στη θέση «δείγμα» του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης το ακτινοβολημένο διάλυμα του οποίου το φάσμα απορρόφησης πρέπει να καταγραφεί. Το διάλυμα βρίσκεται στην κατάλληλη κυβέττα και ακτινοβολείται με ισχύ  $4,77 \text{ mW/cm}^2$  στα δύο πρώτα πειράματα και  $10,72 \text{ mW/cm}^2$  στο τρίτο πείραμα χρησιμοποιώντας τη διάταξη που περιγράφεται στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβολήση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα. Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 0min – 10min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 10min – 20min. Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.
- Κάθε φορά γίνεται καταγραφή της απορρόφησης που παρουσιάζεται για μήκος κύματος 340nm, καθώς εκεί εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του NADH.

## Ε.3 Έλεγχος της τοξικότητας των τεσσάρων κουρκουμίνων στην κυτταρική σειρά LNCaP

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιείται ο έλεγχος της τοξικότητας των συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP, απουσία φωτός. Αυτό είναι απαραίτητο να διεκπεραιωθεί καθώς κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας καθίσταται αναγκαίο να γίνει χρήση μιας τιμής συγκέντρωσης ουσίας η οποία να μην είναι από μόνη της τοξική για τα κύτταρα. Αναφέρεται ότι κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων βιωσιμότητας κυττάρων ακολουθείται το πρωτόκολλο της μεθόδου του MTT (πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT). Η μεθοδολογία θα αναπτυχθεί εκτενώς παρακάτω.

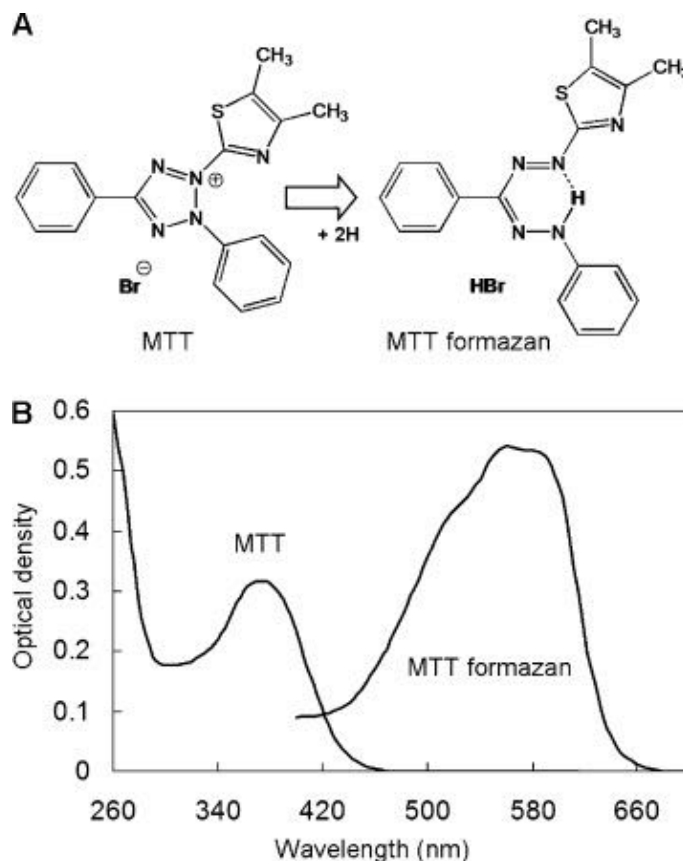
Στα πειράματα της συγκεκριμένης ενότητας ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αρχικά ετοιμάζονται τα τριβλία που θα χρειαστούν. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης των κυττάρων (ενότητα Ε.1.4), φτιάχνεται από την υπάρχουσα φλάσκα ο κατάλληλος αριθμός τριβλίων τα οποία πρέπει να περιέχουν 200.000 κύτταρα το καθένα. Τα τριβλία αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο για 24 ώρες.
- Φτιάχνονται διαλύματα των παραγώγων κουρκουμίνης σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Αυτά πρέπει να περιέχουν τις ουσίες με συγκεντρώσεις 1μΜ, 3μΜ και 5μΜ. Μόλις περάσουν οι 24 ώρες που αναφέρθηκαν παραπάνω, απορρίπτεται από τα τριβλία το παλιό θρεπτικό μέσο και εισάγονται τα διαλύματα αυτά. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε κουρκουμίνη και τιμή συγκέντρωσης χρειάζονται 3 τριβλία. Έτσι λοιπόν για μια κουρκουμίνη θα χρειαστούν εννέα τριβλία. Τρία θα περιέχουν διάλυμα της ουσίας με συγκέντρωση 1μΜ, τρία θα περιέχουν διάλυμα της ουσίας με συγκέντρωση 3μΜ και άλλα τρία διάλυμα της ουσίας με συγκέντρωση 5μΜ. Χρειάζονται επίσης επιπλέον τρία τριβλία στα οποία απορρίπτεται το χθεσινό μέσο και εισάγεται νέο χωρίς αυτό να περιέχει κουρκουμίνη. Τα τριβλία αυτά είναι απαραίτητα για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από την απορρόφηση των ουσιών από τα κύτταρα. Αφού τελειώσει η διαδικασία αυτή, τα τριβλία αφήνονται να επωαστούν για 24 ώρες στον κλίβανο.
- Αφού τα κύτταρα επωαστούν για 24 ώρες απορρίπτεται το πλήρες θρεπτικό μέσο με τις κουρκουμίνες και το κάθε τριβλίο πλένεται με 1ml PBS. Στη συνέχεια εισάγονται 2,5ml νέου πλήρους θρεπτικού μέσου στο καθένα.
- Αφού τα τριβλία αφεθούν να επωαστούν για 24 ώρες ξεκινάει η διαδικασία ελέγχου βιωσιμότητας MTT. Παρακάτω ακολουθεί η περιγραφή της.

### Ε.3.1 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων – βιοχημικός έλεγχος MTT

Κατά τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων γίνεται χρήση του MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). Το τελευταίο, έπειτα από διάλυση σε PBS, δίνει ένα κιτρινωπό υδατικό διάλυμα, το οποίο, αντιδρώντας με τις μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες των μεταβολικά ενεργών κυττάρων,

παράγει βιολετί - μώβ κρυστάλλους formazan (εικόνα Ε.3)<sup>[112]</sup>. Οι κρύσταλλοι αυτοί στη συνέχεια διαλύονται σε κατάλληλο διάλυμα που περιέχει ισοπροπανόλη, Triton X και υδροχλωρικό οξύ και του οποίου η σύσταση θα αναφερθεί παρακάτω, και έτσι η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Είναι αποδεκτό ότι η ποσότητα των κρυστάλλων formazan είναι αντιπροσωπευτική του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν μιτοχονδριακή δραστηριότητα και επομένως δεν μπορούν να σηματοδοτήσουν το σχηματισμό των κρυστάλλων formazan.



Εικόνα Ε. 3: Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων formazan του MTT & φάσματα απορρόφησης[112]

Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά, φτιάχνεται το κιτρινωπό διάλυμα του MTT που αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό ακολουθεί τη σύσταση: 5mg σκόνης MTT σε 1ml PBS. Επίσης, φτιάχνεται και ο διαλύτης του MTT με σύσταση για 100 ml: 89,2ml ισοπροπανόλη, 10ml Triton X και 0,8ml HCl.
- Απορρίπτεται από τα διαθέσιμα την εκάστοτε φορά τριβλία το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ) και εισάγεται σε αυτά το διάλυμα του MTT. Για κάθε τριβλίο χρειάζονται 130ml διαλύματος MTT και 1170ml PBS. Τα τριβλία αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο για τρεις ώρες.



- Αφού περάσουν οι τρεις ώρες, το υπερκείμενο των τριβλίων μας συλλέγεται σε RIA και γίνεται φυγοκέντρηση για επτά λεπτά στις 1200 στροφές ανά λεπτό (rpm).
- Σε κάθε τριβλίο εισάγεται 1ml διαλύτη MTT. Αυτό διότι τα τριβλία περιέχουν τα κύτταρα που δεν έχουν ξεκολλήσει. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο των RIA απορρίπτεται και εισάγεται σε αυτά 1ml διαλύτη MTT.
- Αφού γίνει καλό pipetting στα RIA και στα τριβλία, το περιεχόμενο των τριβλίων προστίθεται στα RIA. Τα τελευταία καλύπτονται με αλουμινόχαρτο και φυλάγονται στο ψυγείο μέχρι να γίνει η μέτρηση.
- Πριν ξεκινήσει η μέτρηση της απορρόφησης, γίνεται φυγοκέντρηση στα RIA και το υπερκείμενο εισάγεται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Σε κάθε κυβέττα – δείγμα προστίθεται 1ml διαλύτη MTT έτσι ώστε αυτό να γίνει 3ml.
- Τα φάσματα απορρόφησης μετρούνται από τα 380 έως τα 700nm και κάθε φορά καταγράφεται η απορρόφηση στα 565nm όπως επίσης και στα 690nm. Πρέπει να υπολογιστεί η τιμή της διαφοράς τους, δηλαδή η ποσότητα  $A_{565} - A_{690}$ . Το  $A_{565}$  αναφέρεται στο μέγιστο της απορρόφησης των κρυστάλλων formazan, ενώ το  $A_{690}$  στον θόρυβο που υφίσταται.

## Ε.4 Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP

Πριν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας καθίσταται απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση που προκαλεί η ακτινοβολία διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτό διότι κατά τη διάρκεια της θεραπείας καθίσταται αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί μια δόση ενέργειας φωτός η οποία να μην είναι από μόνη της τοξική για τα κύτταρα.

Επιλέγονται τρεις διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από συνολική δόση ενέργειας  $180 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ , η δεύτερη από συνολική δόση ενέργειας  $360 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ , ενώ η τρίτη από  $540 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ . Για να εξηγηθεί το πως προκύπτουν αυτές οι τιμές θα γίνει μια αναφορά στο ρυθμό ροής ισχύος ακτινοβολίας. Αυτός, μετριέται σε  $\text{mW}/\text{cm}^2$  και δίνεται από τον εξής τύπο:

$$\text{fluence rate} = \frac{\text{ισχύς ακτινοβολίας διέγερσης η οποία μεταφέρει το φως διέγερσης}}{\text{εμβαδόν επιφάνειας σένσορα στην επιφάνεια ακτινοβολήσης}}$$

Η συνολική δόση ενέργειας τώρα προκύπτει ως το γινόμενο του ρυθμού ροής ισχύος ακτινοβολίας επί τη χρονική διάρκεια της ακτινοβολήσης.

Στην παρούσα ενότητα, επιλέγεται τιμή του ρυθμού ροής ισχύος ακτινοβολίας  $3 \text{ mW} / \text{cm}^2$ ,  $6 \text{ mW} / \text{cm}^2$  και  $9 \text{ mW} / \text{cm}^2$ . Οι συνολικές δόσεις ενέργειας  $180 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ ,  $360 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  και  $540 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  προκύπτουν από ακτινοβολήση 60 δευτερολέπτων.

Ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αρχικά ετοιμάζονται τα τριβλία που θα χρειαστούν. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης των κυττάρων (ενότητα Ε.1.4), φτιάχνεται από την υπάρχουσα φλάσκα ο κατάλληλος αριθμός τριβλίων τα οποία πρέπει να περιέχουν 200.000 κύτταρα το καθένα. Τα τριβλία αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο για 24 ώρες.
- Μόλις περάσουν οι 24 ώρες αφαιρείται από τα τριβλία το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο. Η ακτινοβολήση πρέπει να γίνει παρουσία 300μl PBS και για το λόγο αυτό εισάγεται η συγκεκριμένη ποσότητα της ουσίας στα τριβλία.
- Στη συνέχεια εκκινεί η ακτινοβολήση. Για κάθε τιμή συνολικής δόσης ενέργειας πρέπει να υπάρχουν 3 τριβλία (επαναληψιμότητα πειράματος). Αφού αυτή ολοκληρωθεί, εισάγονται σε κάθε τριβλίο 2,2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και τα τριβλία τοποθετούνται στον κλίβανο να επωαστούν για 24 ώρες. Σημειώνεται τέλος ότι χρειάζονται και τρία τριβλία στα οποία απορρίπτεται το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο και εισάγονται 300μl PBS + 2,2ml νέου ΠΘΜ. Σε αυτά δεν γίνεται ακτινοβολήση καθώς είναι απαραίτητα για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP έπειτα από τη διέγερση του φωτός.
- Μόλις περάσουν οι 24 ώρες της επώασης, πραγματοποιείται ο βιοχημικός έλεγχος της βιωσιμότητας MTT που περιγράφεται στην ενότητα Ε.3.1.

## E.5 Μεθοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP, με τη χρήση των τεσσάρων κουρκουμίνων ως φωτοευαίσθητες ουσίες

Στο κεφάλαιο αυτό μελετώνται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP. Ως φωτοευαίσθητες ουσίες θα χρησιμοποιηθούν οι κουρκουμίνες AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232. Η τιμή της συγκέντρωσης των ουσιών που επιλέγεται είναι τα 3μM. Επίσης, γίνεται εφαρμογή ακτινοβολίας με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW / cm<sup>2</sup>. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων τοξικότητας των κουρκουμίνων απουσία φωτός (dark toxicity) και της επίδρασης του φωτός μόνο (light only) αντίστοιχα, ώστε κάθε μια από τις παραμέτρους αυτές να μην επηρεάζει τα κύτταρα. Η χρονική διάρκεια ακτινοβολήσης είναι 60 δευτερόλεπτα, 120 δευτερόλεπτα και 180 δευτερόλεπτα. Επομένως, η ακτινοβολήση θα χαρακτηρίζεται από συνολική δόση ενέργειας 360 mJ/cm<sup>2</sup>, 720 mJ/cm<sup>2</sup> και 1080 mJ/cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Η διάταξη ακτινοβολήσης που χρησιμοποιείται είναι αυτή που περιγράφεται στην ενότητα Δ.2.3.

Ακολουθείται η εξής μεθοδολογία:

- Αρχικά ετοιμάζονται τα τριβλία που θα χρειαστούν. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης των κυττάρων (ενότητα E.1.4), φτιάχνεται από την υπάρχουσα φλάσκα ο κατάλληλος αριθμός τριβλίων τα οποία πρέπει να περιέχουν 200.000 κύτταρα το καθένα. Τα τριβλία αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο για 24 ώρες.
- Από τα μητρικά σε DMSO διαλύματα των κουρκουμίνων φτιάχνονται διαλύματα με συγκέντρωση ουσίας 3μM σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Μόλις περάσουν οι 24 ώρες που προαναφέρθηκαν, απορρίπτεται από τα τριβλία το παλιό πλήρες θρεπτικό μέσο και εισάγονται τα διαλύματα που φτιάχτηκαν. Για κάθε κουρκουμίνη χρειάζονται 9 τριβλία. 3 από αυτά θα ακτινοβοληθούν με δόση φωτός 360 mJ / cm<sup>2</sup>, 3 με 720 mJ / cm<sup>2</sup> και άλλα 3 με 1080 mJ / cm<sup>2</sup>, για λόγους επαναληψιμότητας των πειραμάτων που διεξάγονται.
- Στη συνέχεια, τα τριβλία που τώρα περιέχουν κύτταρα LNCaP και τα διαλύματα 3μM των παραγώγων της κουρκουμίνης, αφήνονται να επωαστούν στον κλίβανο για μια ώρα. Σημειώνεται, ότι θα χρειαστούν και 3 τριβλία στα οποία απορρίπτεται το χθεσινό ΠΘΜ και εισάγεται νέο, χωρίς αυτό να περιέχει κουρκουμίνη. Τα τριβλία αυτά δεν θα ακτινοβοληθούν και είναι αναγκαία ως μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από την φωτοδυναμική θεραπεία.
- Μόλις περάσει η μια ώρα επώασης, απορρίπτεται το περιεχόμενο των τριβλίων και εισάγονται σε αυτά 300μl PBS (αυτό διότι η ακτινοβολήση πρέπει να γίνει παρουσία 300μl PBS). Ξεκινάει η ακτινοβολήση και αυτή πραγματοποιείται ανά τριάδες τριβλίων για την κάθε κουρκουμίνη και χρονική διάρκεια (60s, 120s και 180s αντίστοιχα). Όταν ολοκληρώνεται και αυτή εισάγονται στο κάθε τριβλίο 2,2ml ΠΘΜ και τα τριβλία αφήνονται για επώαση 24 ωρών στον κλίβανο.

- Μόλις περάσουν οι 24 ώρες της επώασης, πραγματοποιείται ο βιοχημικός έλεγχος της βιωσιμότητας ΜΤΤ που περιγράφεται στην ενότητα Ε.3.1.

## E.6 Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP

Πριν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, απαραίτητος καθίσταται και ο έλεγχος γύρω από τον χωρικό εντοπισμό των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP που καλλιεργούνται στο εργαστήριο. Αυτό διότι η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι στενά συνδεδεμένη με την υποκυτταρική θέση συγκέντρωσης του φωτοευαίσθητοποιητή.

Έπειτα από τη χορήγηση, η εκάστοτε φωτοευαίσθητη ουσία ενδέχεται να συσσωρευτεί σε συγκεκριμένα οργανίδια των κυττάρων, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, οι μεμβράνες πλάσματος. Το σημείο συγκέντρωσης της ουσίας εξαρτάται από τις φυσικοχημικές και δεσμευτικές της ιδιότητες, όπως είναι για παράδειγμα η λιποφιλικότητα, η υδροφιλικότητα, το φορτίο και η χημική δομή. Στην πραγματικότητα, η θέση συγκέντρωσης του φωτοευαίσθητοποιητή μέσα στο κύτταρο σχετίζεται άμεσα με έναν συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου<sup>[113]</sup>. Οι περισσότεροι επιθυμητοί στόχοι έχει αποδειχθεί ότι είναι τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο<sup>[114]</sup>. Ουσίες που συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων, εκεί δηλαδή όπου βρίσκεται το γενετικό υλικό, ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο DNA και να οδηγήσουν σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, όπως είναι οι μεταλλάξεις καθώς και πιθανή νέα καρκινογένεση.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο ενδοκυτταρικό στόχο της φωτοδυναμικής θεραπείας και αυτό διότι διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παροχή ενέργειας για τα κύτταρα όπως επίσης και στη ρύθμιση της απόπτωσης. Οι περισσότερες ουσίες που έχουν τη δυνατότητα συσσώρευσης στα μιτοχόνδρια, βασίζονται στη δομή κατιονικών μορίων και αυτό διότι τα αρνητικά φορτία στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων επιτρέπουν την ιονική αλληλεπίδραση με τέτοιου είδους φωτοευαίσθητες ουσίες. Έπειτα από τη φωτοενεργοποίηση παρατηρείται απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα συγκεκριμένα οργανίδια, κάτι το οποίο οδηγεί τελικά σε ταχεία επαγωγή απόπτωσης<sup>[113]</sup>.

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού των κουρκουμίνων AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) στα κύτταρα LNCaP πραγματοποιείται με τη βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού Olympus BX50 (ενότητα Δ.2.4.2). Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά ετοιμάζονται τα τριβλία που θα χρειαστούν. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης των κυττάρων (ενότητα E.1.4), φτιάχνεται από την υπάρχουσα φλάσκα ο κατάλληλος αριθμός τριβλίων τα οποία πρέπει να περιέχουν 150.000 κύτταρα το καθένα. Σε κάθε τριβλίο εισάγεται και μια ειδική καλυπτρίδα η οποία είναι απαραίτητη για την μετέπειτα παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Τα τριβλία τοποθετούνται στη συνέχεια στον κλίβανο και αφήνονται να επωαστούν για 24 ώρες.

- Μόλις περάσει το χρονικό διάστημα που προαναφέρθηκε, θα πρέπει να εισαχθούν στα τριβλία τα διαλύματα των διαθέσιμων προς μελέτη κουρκουμίνων. Επιλέγεται τιμή συγκέντρωσης ουσίας 3μM και αυτό διότι η συγκεκριμένη τιμή δεν έχει δείξει σημαντική τοξικότητα στα πειράματα της ενότητας E.3 για όλα τα παράγωγα της κουρκουμίνης. Έτσι λοιπόν, από τα μητρικά διαλύματα των ουσιών σε DMSO φτιάχνονται τα επιθυμητά διαλύματα σε πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ). Αυτό γίνεται σε δύο αραιώσεις. Τα μητρικά διαλύματα που είναι διαθέσιμα είναι τάξης μεγέθους συγκέντρωσης  $10^{-3}M$ . Από αυτά πραγματοποιείται αραιώση σε PBS για να προκύψουν διαλύματα με  $C = 5 \times 10^{-5}M$ . Στη συνέχεια, με δεύτερη αραιώση που πραγματοποιείται σε ΠΘΜ, προκύπτουν τα διαλύματα των ουσιών με  $C = 3\mu M$ . Εισάγονται λοιπόν σε καθένα από τα τριβλία 2,5ml διαλύματος 3μM της εκάστοτε κουρκουμίνης σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Τέλος, τα τριβλία τοποθετούνται στον κλίβανο και αφήνονται να επωαστούν για μια ώρα.
- Μετά το πέρας της μιας ώρας τα τριβλία βγαίνουν από τον κλίβανο. Το καθένα πλένεται δύο φορές με 1ml PBS. Στη συνέχεια, βγαίνει και η καλυπτρίδα πάνω στην οποία έχουν κολλήσει κύτταρα LNCaP που έχουν απορροφήσει κουρκουμίνη. Η καλυπτρίδα τοποθετείται τέλος πάνω σε κατάλληλο πλακίδιο μικροσκοπίου με την παρουσία 100μl PBS, έτσι ώστε να παρατηρηθεί.
- Στο μικροσκόπιο φθορισμού, επιλέγεται ο κύβος U-MWU και δεν χρησιμοποιείται το white balance. Αυτό διότι γίνεται προσπάθεια να μην αυξηθεί παραπάνω ο χρόνος απόκτησης εικόνας. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος αυτός, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ποσοστό φωτοκαstroφής. Το whitefield ορίζεται στα 50ms ενώ το exposure time στα 2s. Ο έλεγχος της λήψης και μεταφοράς των εικόνων γίνεται με τη χρήση του προγράμματος AnalySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions, GmbH). Τέλος, η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC.

## Κεφάλαιο ΣΤ: Αποτελέσματα και Συμπεράσματα

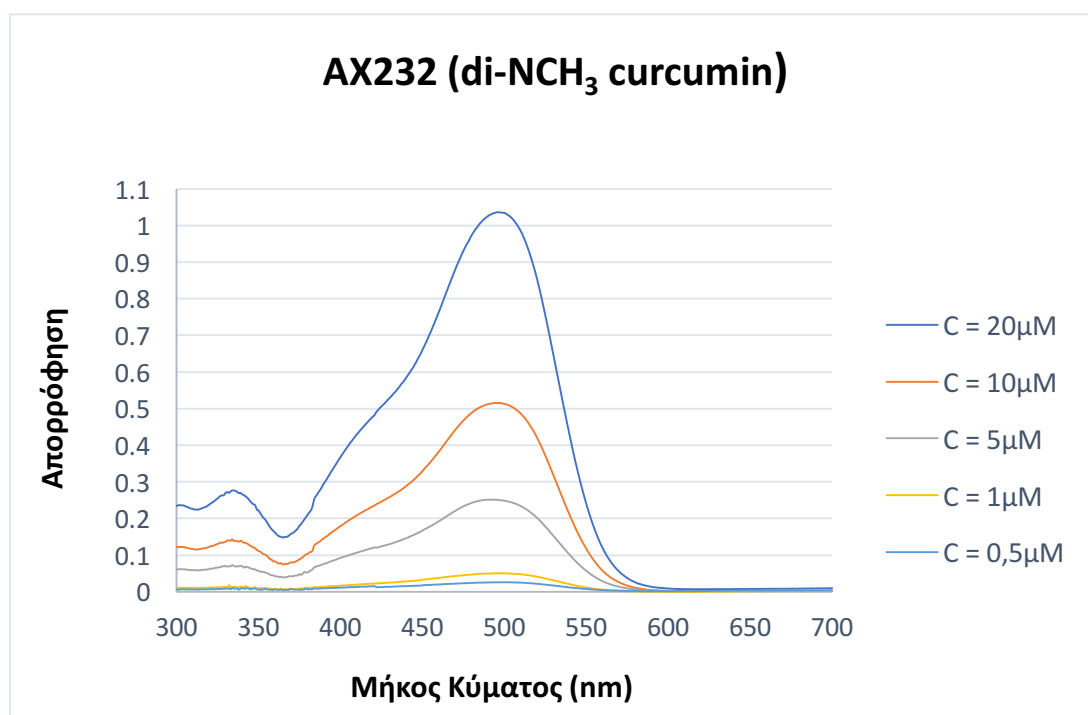
## ΣΤ.1: Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.1. Από το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 φτιάχνονται 5 διαλύματα με συγκέντρωση  $2 \times 10^{-5} \text{M}$  (20 $\mu\text{M}$ ),  $10^{-5} \text{M}$  (10 $\mu\text{M}$ ),  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  (5 $\mu\text{M}$ ),  $10^{-6} \text{M}$  (1 $\mu\text{M}$ ) και  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  (0,5 $\mu\text{M}$ ). Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Στη συνέχεια, τα διαλύματά αυτά, που έχουν όγκο 3ml, εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, πραγματοποιείται μέσω της επιλογής Autozero ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Για τη διεξαγωγή των μελετών απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (ενότητα Δ.2.1). Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.

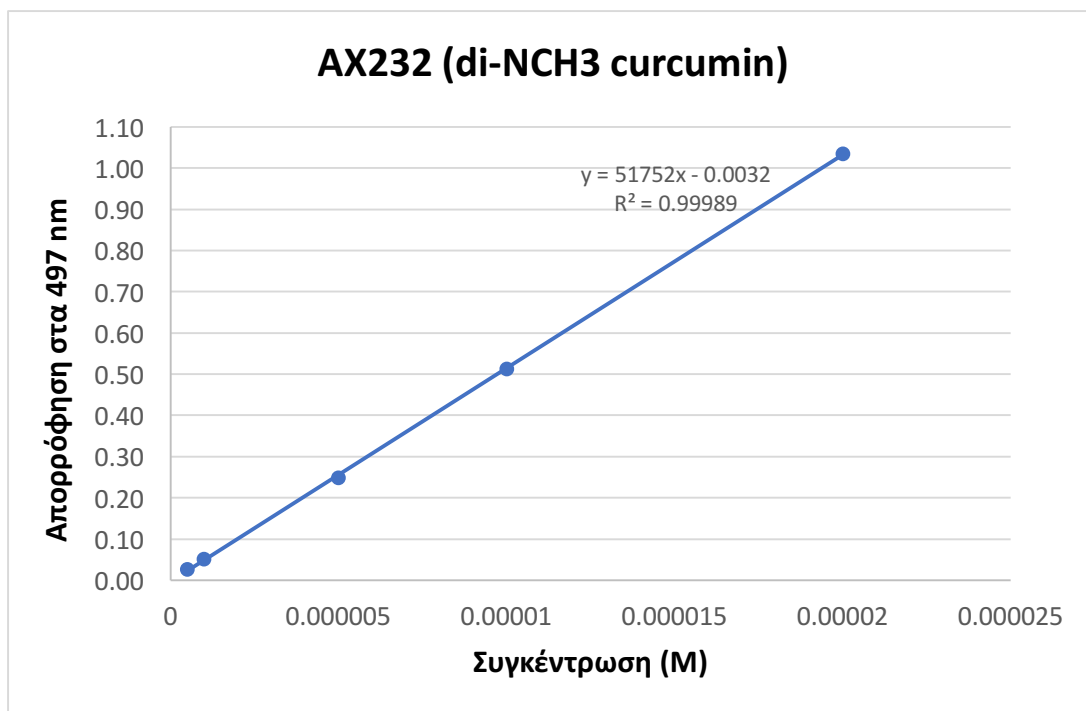
### ΣΤ.1.1 Αποτελέσματα

Στο σημείο αυτό παρατίθεται το φάσμα της απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 στις τιμές συγκεντρώσεων που προαναφέρθηκαν (διάγραμμα ΣΤ.1). Επίσης, προστίθεται και η γραφική παράσταση της μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση (διάγραμμα ΣΤ.2).



Διάγραμμα ΣΤ. 1: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις





Διάγραμμα ΣΤ. 2: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 ως προς τη συγκέντρωση

### ΣΤ.1.2 Συμπεράσματα

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ο τύπος που περιγράφει το νόμο των Lambert – Beer. Αυτός είναι:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times b \times c$$

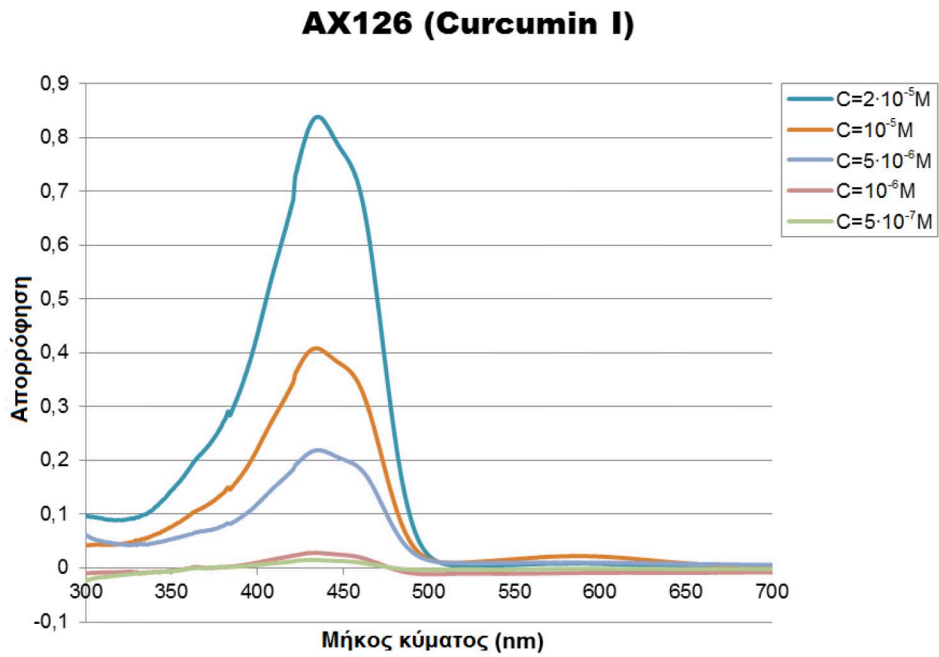
όπου A είναι η απορρόφηση,  $I_0$  είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας,  $\epsilon$  η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης ( $l/mol \times cm$ ), b το πάχος της κυβέτας (σε cm) και c η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (σε mol/l)<sup>[3]</sup>.

Από το παραπάνω διάγραμμα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης AX-232 μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση με βάση τη σχέση:

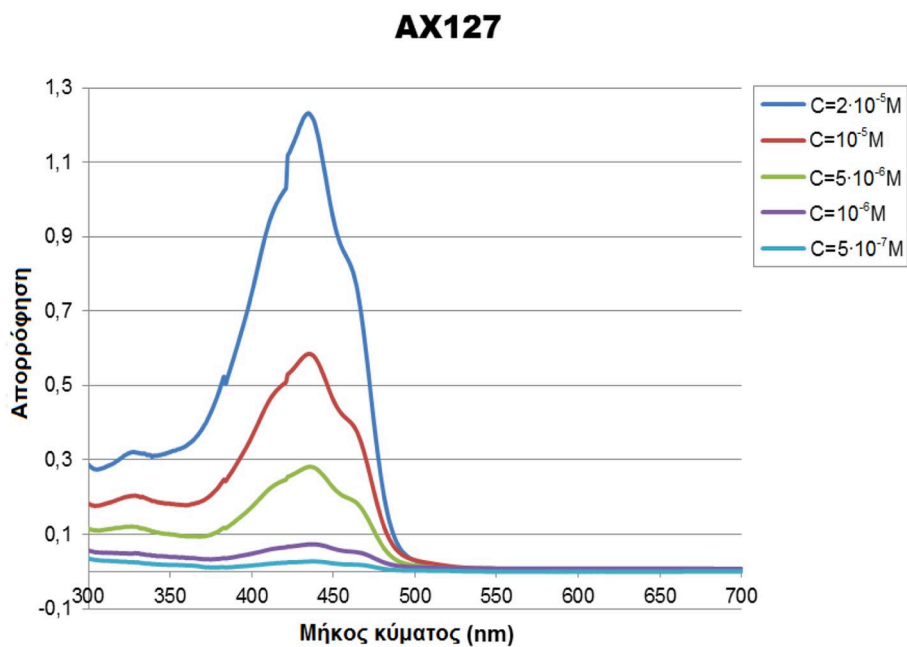
$$y = 51752x - 0.0032 \text{ με } R^2 = 0,99989$$

Επομένως, παρατηρείται ότι η μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της AX-232 σε σχέση με τη συγκέντρωση είναι γραμμική και ικανοποιεί απόλυτα της προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Από τον τελευταίο προκύπτει ότι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της AX-232 είναι  $\epsilon = 51752 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Τα διαλύματα της ουσίας σε DMSO παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος κοντά στα 497nm και η απορρόφηση αυξάνεται προφανώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση.

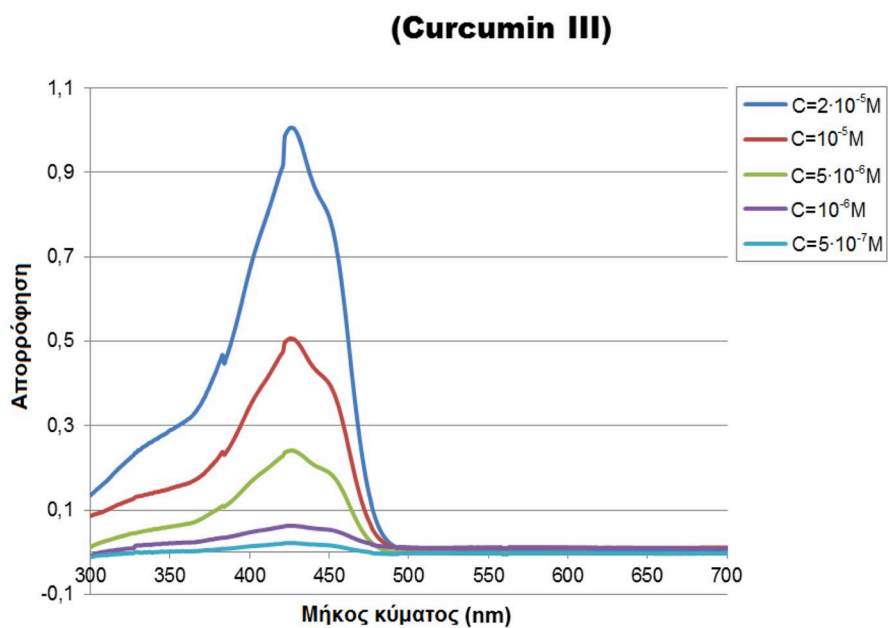
Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης που έχουν προκύψει για τις άλλες τρεις κουρκουμίνες (διαγράμματα ΣΤ.3, ΣΤ.4, ΣΤ.5<sup>[1]</sup>):



Διάγραμμα ΣΤ. 3: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-126 σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>



Διάγραμμα ΣΤ. 4: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-127 σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>



Διάγραμμα ΣΤ. 5: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-186 (Curcumin III) σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>

Προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Οι κουρκουμίνες που εμφανίζουν την πιο έντονη απορρόφηση είναι η AX-127 και η AX-232, με την AX-127 να υπερέχει λίγο. Η απορρόφηση της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I) είναι η μικρότερη.
- Η εμφάνιση της μέγιστης απορρόφησης στο φάσμα προκύπτει για τις κουρκουμίνες AX-126 και AX-127 στα 435nm, για την AX-186 στα 425nm, ενώ για την AX-232 στα 497 περίπου nm. Παρατηρείται λοιπόν ότι στην περίπτωση της τελευταίας, το μήκος κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης μετατοπίζεται κοντά στα 500nm και είναι μεγαλύτερο απ' ό τι στις άλλες τρεις ουσίες. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι πολύ σημαντικό για έναν φωτοευαίσθητοποιητή καθώς μεγαλύτερο μήκος κύματος διέγερσης αντιστοιχεί σε μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης άρα βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας.

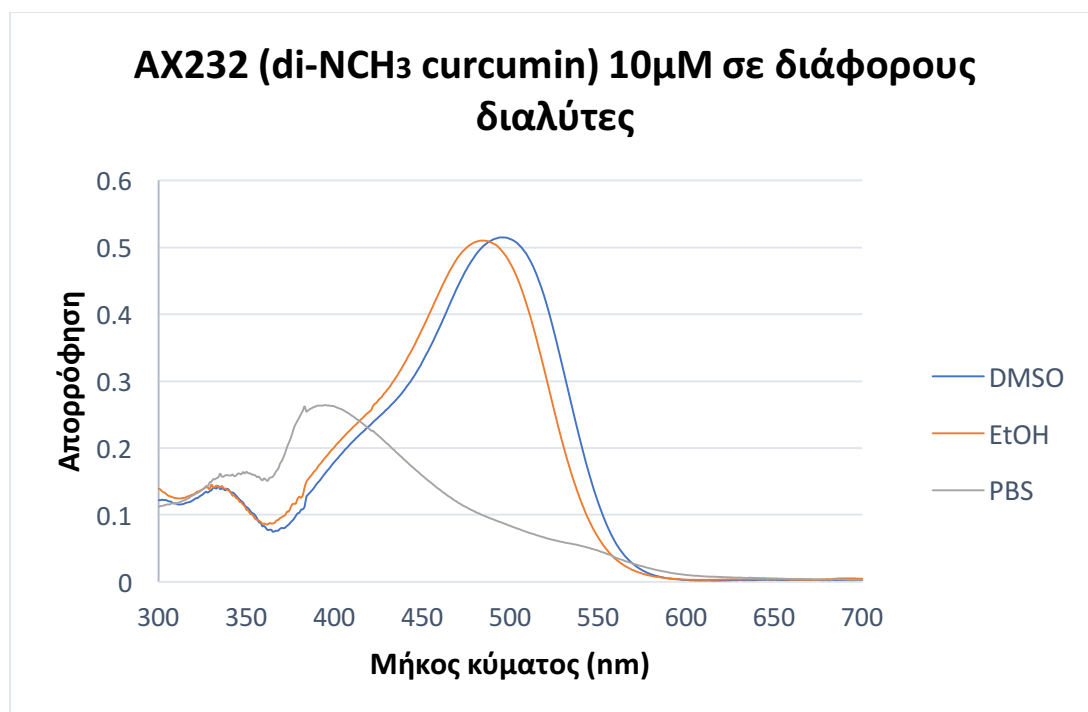
## ΣΤ.2 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορους διαλύτες

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.2. Από το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 φτιάχνονται τα 3 διαλύματα με συγκέντρωση  $10^{-5}\text{M}$  (10 $\mu\text{M}$ ) και διαλύτες το DMSO, την αιθανόλη (EtOH) και το PBS αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα διαλύματα αυτά, που έχουν όγκο 3ml, εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, πραγματοποιείται μέσω της επιλογής Autozero ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Για τη διεξαγωγή των μελετών απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (ενότητα Δ.2.1). Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.

### ΣΤ.2.1 Αποτελέσματα

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης που προκύπτουν για την κουρκουμίνη AX-232 στους 3 διαλύτες που προαναφέρθηκαν (διάγραμμα ΣΤ.6):



Διάγραμμα ΣΤ. 6: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορους διαλύτες

## ΣΤ.2.2 Συμπεράσματα

Αρχικά, παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται για καθένα από τα τρία διαλύματα η μέγιστη τιμή της απορρόφησης καθώς και το μήκος κύματος εμφάνισής της:

Διάλυμα με $C = 10^{-5} M$ και διαλύτη:	Μήκος κύματος εμφάνισης μέγιστης απορρόφησης (nm)	Μέγιστη απορρόφηση
DMSO	495	0,51497
Αιθανόλη (EtOH)	485	0,51009
PBS	394	0,26388

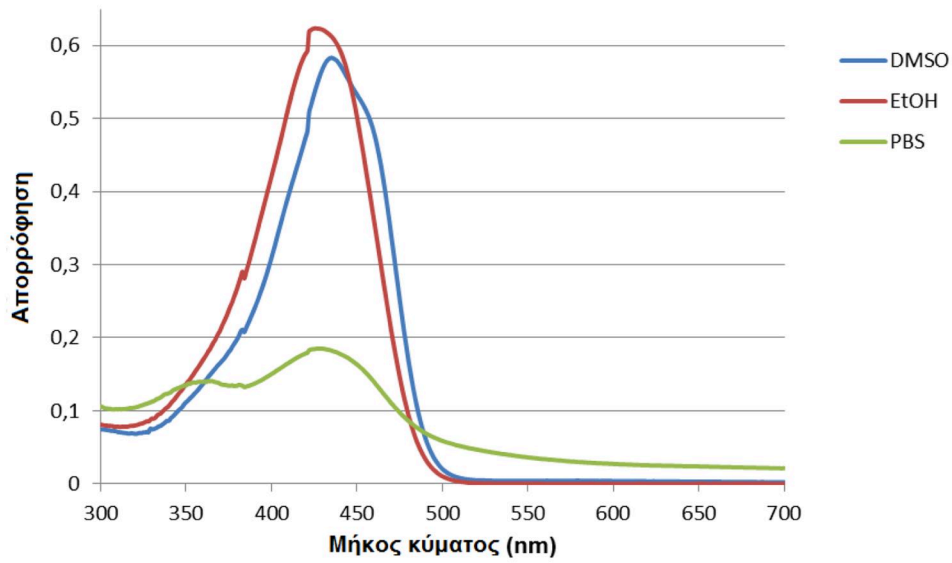
Πίνακας ΣΤ. 1: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκος κύματος εμφάνισής της στον εκάστοτε διαλύτη

Ως αποτέλεσμα, όταν χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMSO και EtOH τα φάσματα απορρόφησης είναι παραπλήσια. Η κορυφή απορρόφησης παρατηρείται για το μεν διάλυμα σε DMSO σε μήκος κύματος 495nm και με τιμή 0,51497, ενώ για το δε διάλυμα σε αιθανόλη (EtOH) σε μήκος κύματος 485nm και με τιμή 0,51009. Υπάρχει δηλαδή μια απόκλιση της τάξης των 10nm.

Αντίθετα, το διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 σε PBS εμφανίζει μια τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Αυτή, είναι επόμενο να οδηγεί σε ερωτήματα που απαιτούν περαιτέρω μελέτη για την απάντησή τους και ακολουθούν στη συνέχεια της ερευνητικής εργασίας. Το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος της ουσίας σε PBS παρουσιάζει μετατόπιση (shift) της κορυφής του προς τα αριστερά. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή του διαγράμματος εμφανίζεται στα 394nm. Επίσης, η τιμή της μέγιστης απορρόφησης είναι αισθητά χαμηλότερη απ' ότι στα άλλα δύο διαλύματα. Πέφτει στο 0,26388 σε αντίθεση με την τιμή 0,51497 και 0,51009 που παρουσίαζε το φάσμα απορρόφησης σε DMSO και αιθανόλη (EtOH) αντίστοιχα.

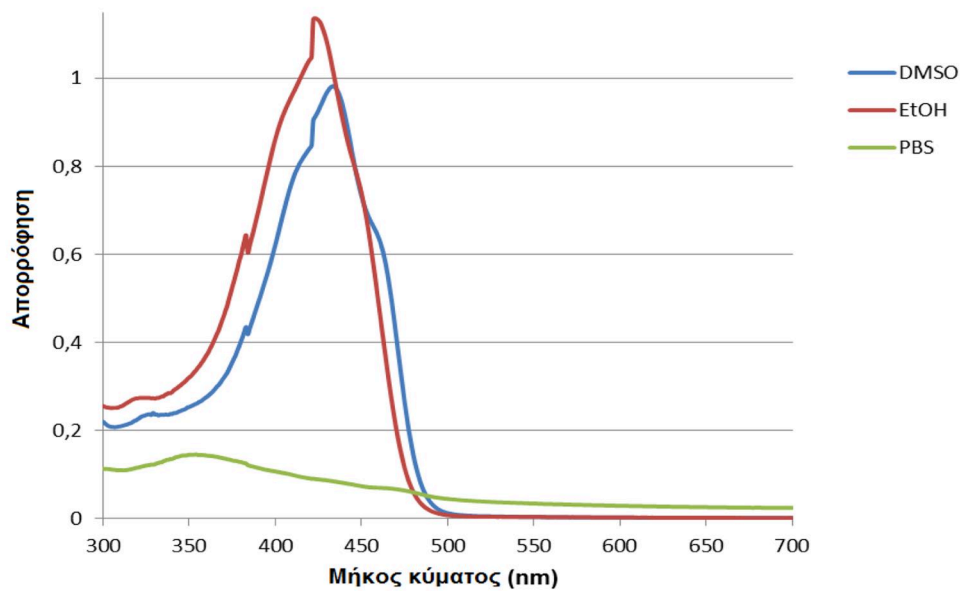
Με βάση όλα όσα προαναφέρθηκαν καθίσταται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της συμπεριφοράς των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 σε PBS. Ακολουθεί λοιπόν το πείραμα της επόμενης ενότητας στο οποίο μελετώνται 2 διαλύματα της ουσίας σε PBS, τα οποία όπως θα εξηγηθεί παρακάτω διαφέρουν ως προς τις αραιώσεις που μεσολαβούν για τη δημιουργία τους. Πριν τη μετάβαση όμως στην επόμενη ενότητα, παρατίθενται τα αποτελέσματα ως προς την απορρόφηση σε διαφορετικούς διαλύτες που έχουν προκύψει από τις άλλες τρεις κουρκουμίνες (διαγράμματα ΣΤ.7, ΣΤ.8, ΣΤ.9<sup>[1]</sup>):

### ΑΧ126 (10μΜ) σε διάφορους διαλύτες



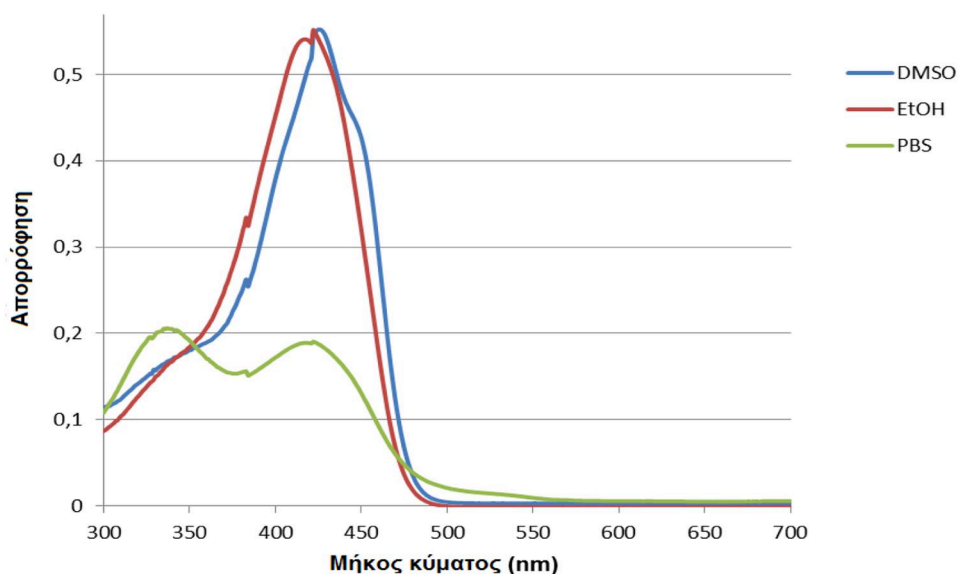
Διάγραμμα ΣΤ. 7: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης ΑΧ-126 (Curcumin I) σε διάφορους διαλύτες<sup>[1]</sup>

### ΑΧ127 (10μΜ) σε διάφορους διαλύτες



Διάγραμμα ΣΤ. 8: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης ΑΧ-127 σε διάφορους διαλύτες<sup>[1]</sup>

### ΑΧ-186 (10μΜ) σε διάφορους διαλύτες



Διάγραμμα ΣΤ. 9: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης ΑΧ-186 (Curcumin III) σε διάφορους διαλύτες<sup>[1]</sup>

Προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Και οι τέσσερις κουρκουμίνες παρουσιάζουν μια κοινή συμπεριφορά όταν υφίστανται διάλυση σε DMSO και αιθανόλη (EtOH). Οι δύο αυτοί διαλύτες είναι οργανικοί και όπως είναι φανερό στα διαγράμματα τα φάσματα των ουσιών διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή τους. Παρατηρείται μια πολύ μικρή μετατόπιση της κορυφής των φασμάτων αυτών.
- Τα δεδομένα αλλάζουν όταν οι ουσίες υφίστανται διάλυση σε PBS. Το PBS αποτελεί ένα υδατικό μέσο και βλέποντας τα διαγράμματα μπορούμε να πούμε ότι μετά από διάλυση σε αυτό τα φάσματα απορρόφησης των ουσιών εμφανίζουν μια διαφορετική, απ' ότι προηγουμένως, συμπεριφορά. Πιο συγκεκριμένα, οι κορυφές απορρόφησης πέφτουν σε πολύ μεγάλο βαθμό. Επίσης, εκτός από την πτώση αυτή, παρατηρείται και μια μετατόπιση (shift) στην τιμή του μήκους κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης, η οποία είναι περισσότερο ευδιάκριτη στο φάσμα της κουρκουμίνης ΑΧ-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin). Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται με την τάση των μορίων της κουρκουμίνης να σχηματίζουν συσσωματώματα μέσα σε υδατικά μέσα.

### ΣΤ.3 Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 με χρήση του PBS ως διαλύτη

Στο κεφάλαιο αυτό φτιάχνονται αρχικά 3 διαλύματα της κουρκουμίνης AX-232. Χρησιμοποιείται ως βάση το μητρικό διάλυμα της ουσίας που έχει συγκέντρωση  $C = 2,76 \times 10^{-3} \text{M}$  (σε DMSO). Από το διάλυμα αυτό γίνονται δύο αραιώσεις με στόχο να προκύψει τελικό διάλυμα συγκέντρωσης  $C = 10^{-5} \text{M}$  (10 $\mu\text{M}$ ). Η ενδιάμεση αραιώση οδηγεί στην παρασκευή διαλύματος με  $C = 2 \times 10^{-5} \text{M}$ .

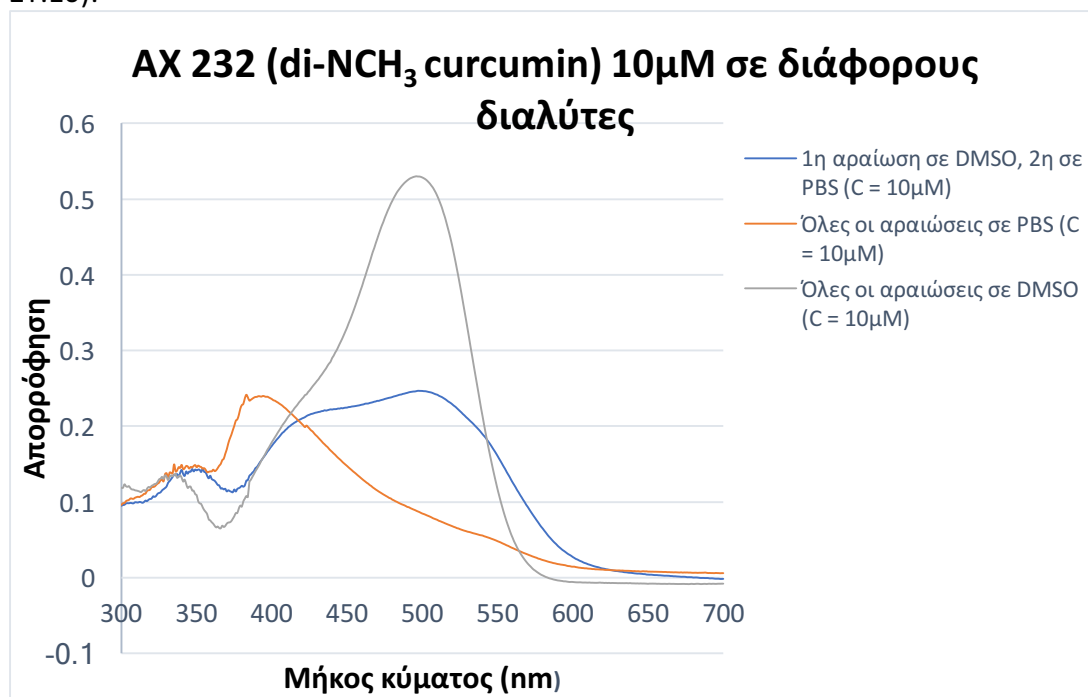
Στο πρώτο διάλυμα και οι δύο αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Στο δεύτερο διάλυμα και οι δύο αραιώσεις γίνονται σε PBS. Στο τρίτο διάλυμα, η πρώτη αραιώση γίνεται σε DMSO και η δεύτερη σε PBS.

Στη συνέχεια, τα διαλύματά αυτά, που έχουν όγκο 3ml, εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, πραγματοποιείται μέσω της επιλογής Autozero ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO ή PBS.

Για τη διεξαγωγή των μελετών απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (ενότητα Δ.2.1). Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετρείται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.

#### ΣΤ.3.1 Αποτελέσματα

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης που προέκυψαν (διάγραμμα ΣΤ.10):



Διάγραμμα ΣΤ. 10: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 με χρήση του DMSO και του PBS ως διαλύτες



### ΣΤ.3.2 Συμπεράσματα

Αρχικά, παρατίθεται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται για καθένα από τα τρία διαλύματα η μέγιστη τιμή της απορρόφησης καθώς και το μήκος κύματος εμφάνισής της (πίνακας ΣΤ.2):

Διάλυμα με $C = 10^{-5}M$	Μήκος κύματος εμφάνισης μέγιστης απορρόφησης (nm)	Μέγιστη απορρόφηση
Όλες οι αραιώσεις σε DMSO	496	0,53056
Όλες οι αραιώσεις σε PBS	383	0,24185
1 <sup>η</sup> αραιώση σε DMSO 2 <sup>η</sup> σε PBS	497	0,24647

Πίνακας ΣΤ. 2: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκος κύματος εμφάνισής της

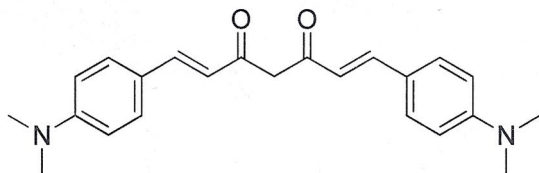
Παρατηρείται λοιπόν ότι η μετατόπιση (shift) προς τα αριστερά του φάσματος απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 εμφανίζεται μόνο στην περίπτωση που γίνονται και οι δύο αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα σε PBS (Διάλυμα 2). Στις άλλες δύο περιπτώσεις, οι τιμές των μηκών κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης είναι παραπλήσιες. Συγκεκριμένα, το διάλυμα που προκύπτει με 2 αραιώσεις σε DMSO (Διάλυμα 1) εμφανίζει την κορυφή απορρόφησης του στα 496nm ενώ το διάλυμα που προκύπτει με την πρώτη αραιώση σε DMSO και τη δεύτερη σε PBS (Διάλυμα 3) στα 497nm. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τιμή της μέγιστης απορρόφησης είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση του διαλύματος 1 (0,53056). Στα διαλύματα 2 και 3 η τιμή αυτή μειώνεται αισθητά και πέφτει λοιπόν στο 0,24185 και 0,24647 αντίστοιχα.

Στην προσπάθεια εξήγησης της μετατόπισης της κορυφής απορρόφησης που παρουσιάζεται, μετρήθηκε με τη βοήθεια πεχάμετρου, το pH των τριών διαλυμάτων. Παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα τα αποτελέσματα που προέκυψαν (πίνακας ΣΤ.3):

Διαλύματα	Τιμή pH
1 <sup>ο</sup> : όλες οι αραιώσεις σε DMSO	11,23
2 <sup>ο</sup> : 1 <sup>η</sup> αραιώση σε DMSO, 2 <sup>η</sup> σε PBS	9,55
3 <sup>ο</sup> : όλες οι αραιώσεις σε PBS	7,15

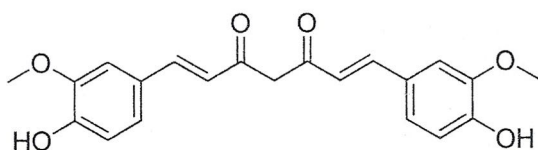
Πίνακας ΣΤ. 3: Τιμές του pH των τριών διαλυμάτων

Σε πρώτο στάδιο παρατηρείται ότι το pH των δύο πρώτων διαλυμάτων είναι βασικό (11,23 και 9,55 αντίστοιχα). Το τρίτο διάλυμα που παρουσιάζει και τη μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης του διακρίνεται από τιμή pH 7,15, η οποία πάει προς το ουδέτερο. Υπενθυμίζεται η χημική δομή της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) (εικόνα ΣΤ.1):

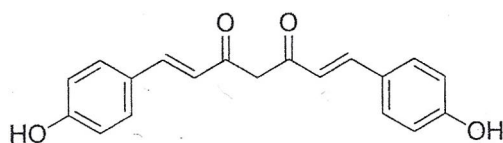


Εικόνα ΣΤ. 1: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin)

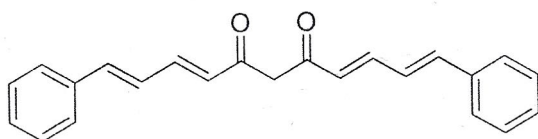
Μπορεί να ειπωθεί ότι όταν το pH του διαλύματός μας είναι βασικό, οι αμίνες (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) στις άκρες θα είναι αποπρωτονιωμένες. Όταν το pH βρίσκεται στην τιμή 7,15, μερικά από τα μόρια θα έχουν πρωτονιωθεί στις αμίνες και έτσι θα φέρουν ένα θετικό φορτίο το οποίο θα αλλάζει τόσο τη ροή των ηλεκτρονίων όσο και τις διεγέρσεις τους. Το γεγονός αυτό, κατά πάσα πιθανότητα, προκαλεί και την παρατηρούμενη μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης στα 383 περίπου nm. Οι υπόλοιπες κουρκουμίνες δεν διαθέτουν αμίνες στις άκρες τους και επομένως δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές στην τιμή του pH. (εικόνες ΣΤ.2, ΣΤ.3, ΣΤ.4)



Εικόνα ΣΤ. 2: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I)



Εικόνα ΣΤ. 3: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-186 (Curcumin III)



Εικόνα ΣΤ. 4: Χημική δομή της κουρκουμίνης AX-127

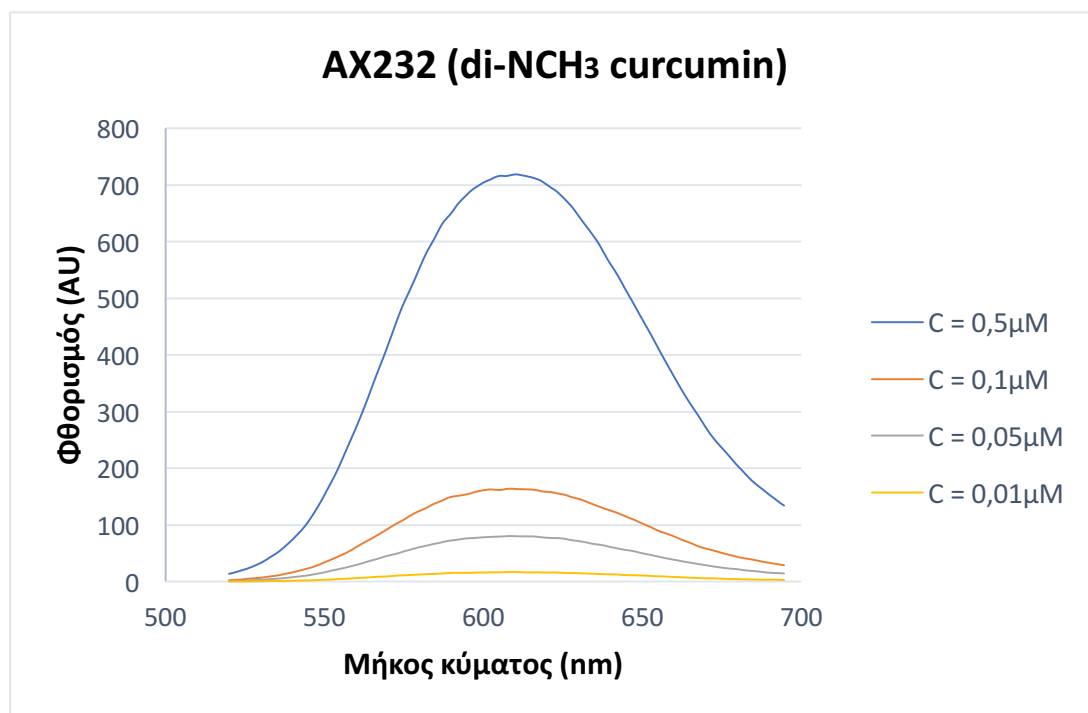
## ΣΤ.4 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.3. Από το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 φτιάχνονται 4 διαλύματα με συγκέντρωση  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  (0,5 $\mu\text{M}$ ),  $10^{-7} \text{M}$  (0,1 $\mu\text{M}$ ),  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (0,05 $\mu\text{M}$ ) και  $10^{-8} \text{M}$  (0,01 $\mu\text{M}$ ) αντίστοιχα. Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Στη συνέχεια, τα διαλύματά αυτά, που έχουν όγκο 3ml, εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου φθορισμού. Πριν ξεκινήσει η μέτρηση για το φθορισμό των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232 πραγματοποιείται ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενου φθορισμού του διαλύτη DMSO. Η διέγερση (excitation) ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης (497nm).

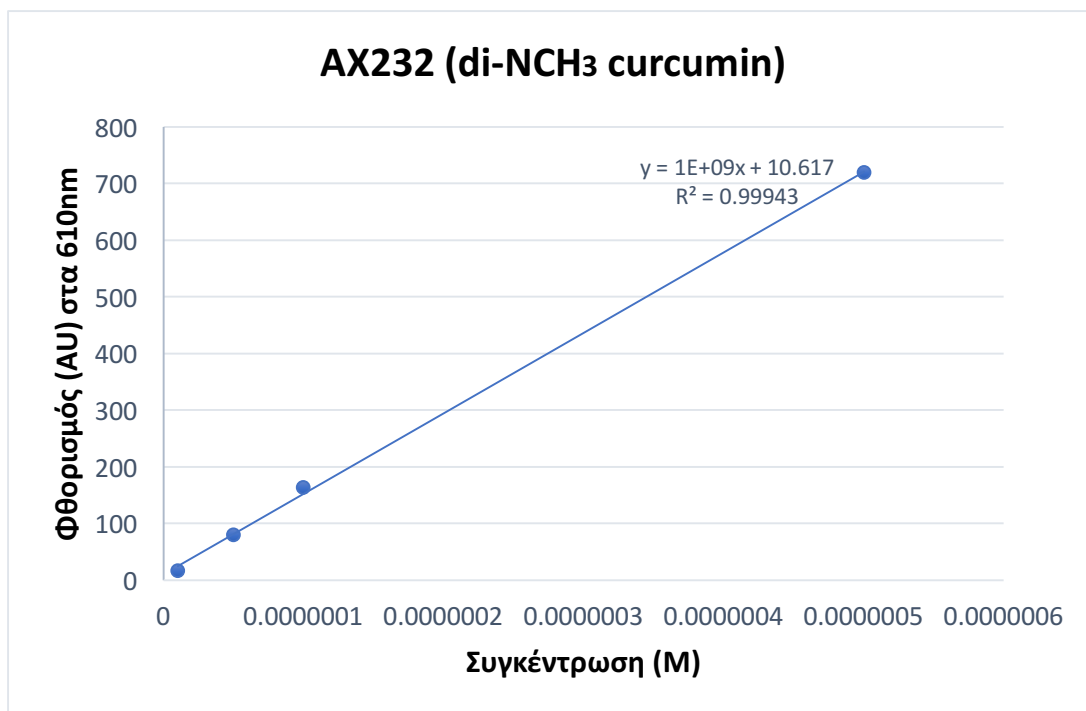
Για τη διεξαγωγή των μελετών φθορισμού χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα Δ.2.2). Τα φάσματα φθορισμού κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην περιοχή μεταξύ 520 και 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης αλλά και εκπομπής επιλέγεται να είναι 10nm.

### ΣΤ.4.1 Αποτελέσματα

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα φάσματα που προέκυψαν από το φασματοφωτόμετρο φθορισμού (διαγράμματα ΣΤ.11, ΣΤ.12):



Διάγραμμα ΣΤ. 11: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-232 σε διάφορες συγκεντρώσεις



Διάγραμμα ΣΤ. 12: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της AX-232 σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας

#### ΣΤ.4.2 Συμπεράσματα

Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται τα φάσματα φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232 για τα διαλύματα με τις συγκεντρώσεις που προαναφέρθηκαν. Η διέγερση επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί στο μήκος κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης (497nm). Έτσι λοιπόν στα 497nm η ουσία απορροφά το μέγιστο δυνατό αριθμό φωτονίων και επομένως παρατηρείται μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός.

Στο δεύτερο διάγραμμα απεικονίζεται η καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της ουσίας.

Ο μέγιστος φθορισμός εντοπίζεται για τιμή μήκους κύματος 610nm και λαμβάνει τις εξής τιμές:

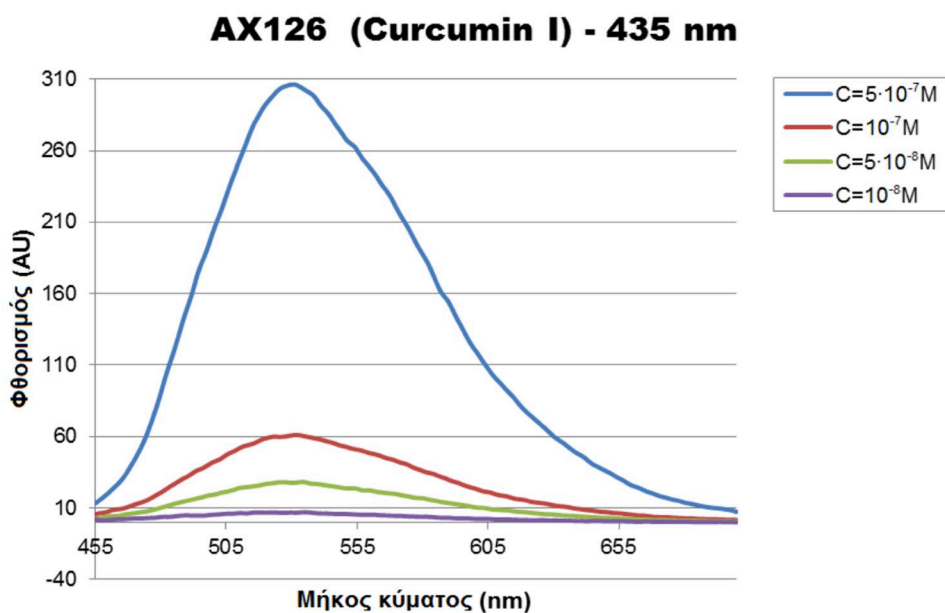
Διάλυμα με συγκέντρωση:	Μέγιστος φθορισμός στα 610nm
C = 0,5μM	719,37
C = 0,1μM	163,57
C = 0,05μM	80,13
C = 0,01μM	17,41

Πίνακας ΣΤ. 4: Μέγιστος φθορισμός για κάθε διάλυμα

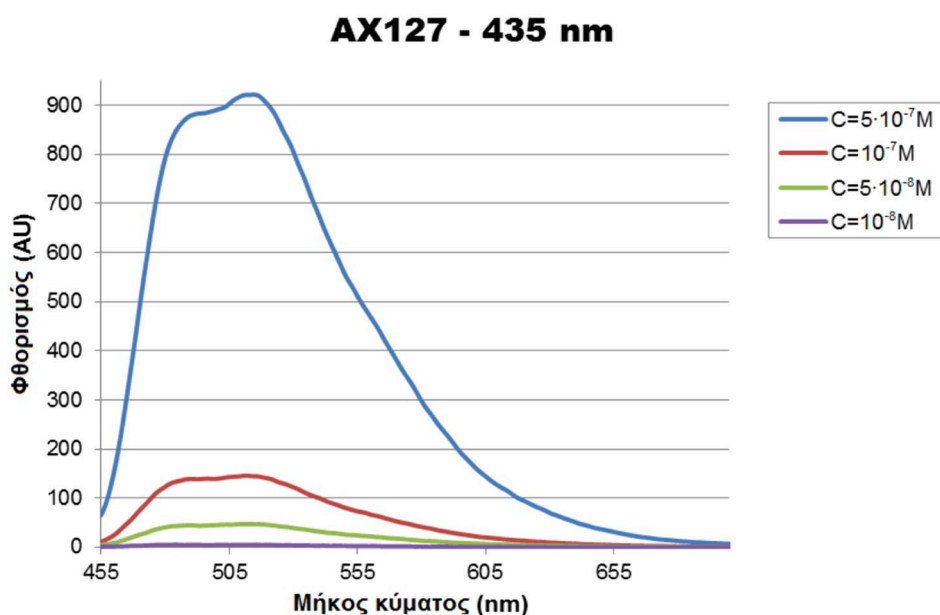
Η καμπύλη μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της ουσίας περιγράφεται από την εξίσωση  $y = 1E + 0,9x + 10,617$ , όπου  $y$  είναι το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα διαλύματα με συγκέντρωση  $x$ .

Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων που μετρήθηκαν.

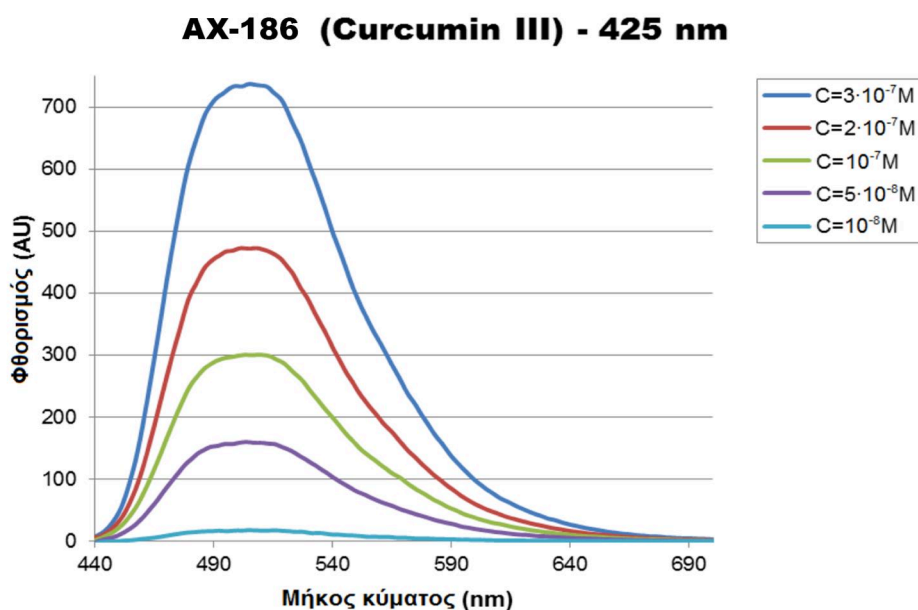
Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα φάσματα εκπομπής-φθορισμού που έχουν προκύψει για τις τρεις άλλες κουρκουμίνες (διαγράμματα ΣΤ.13, ΣΤ.14, ΣΤ.15<sup>[1]</sup>):



Διάγραμμα ΣΤ. 13: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-126 σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>



Διάγραμμα ΣΤ. 14: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-127 σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>



Διάγραμμα ΣΤ. 15: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης AX-186 σε διάφορες συγκεντρώσεις<sup>[1]</sup>

Σημειώνεται ότι η διέγερση στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού έχει οριστεί στο μέγιστο της απορρόφησης της κάθε ουσίας. Για την AX-126 και AX-127 είναι τα 435nm, για την AX-186 τα 425nm και για την AX-232 τα 497nm.

Εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η τιμή μήκους κύματος εμφάνισης μέγιστου φθορισμού είναι η εξής: Για την AX-126 (Curcumin I) τα 531nm, για την AX-127 τα 514nm, για την AX-186 (Curcumin III) τα 504nm και για την AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) τα 610nm.
- Μεγαλύτερες τιμές φθορισμού παρουσιάζουν οι κουρκουμίνες AX-127, AX-186 και AX-232. Η κουρκουμίνη AX-126 εμφανίζει σημαντικά μικρότερες τιμές.

## ΣΤ.5 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης με τη μέθοδο της απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232

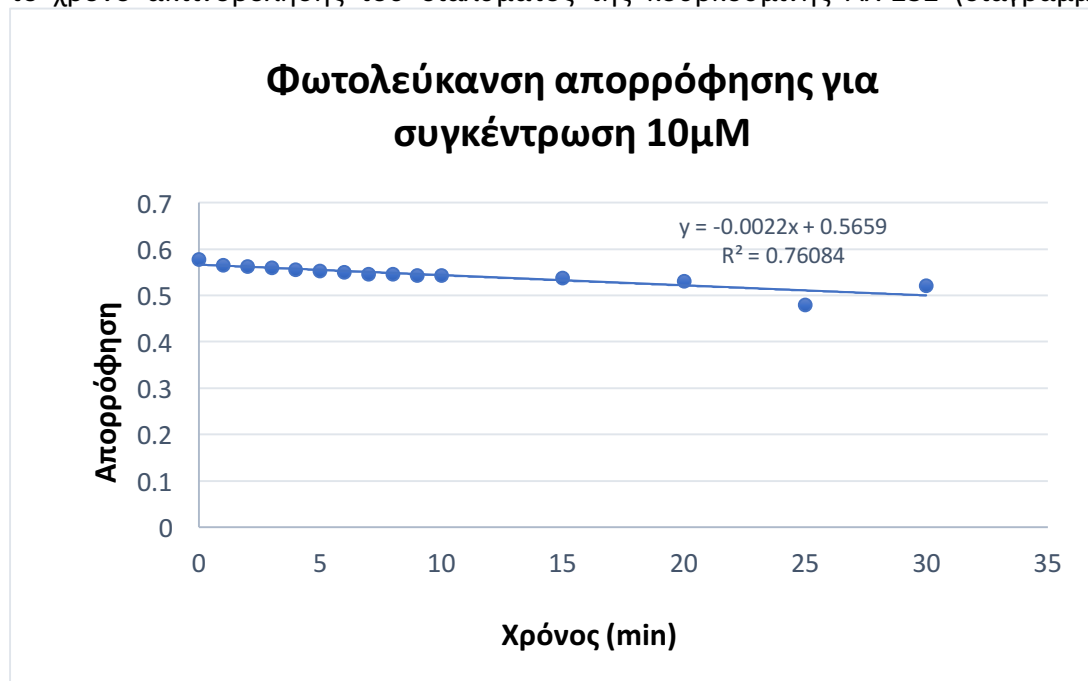
Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.4.1. Αρχικά φτιάχνεται το διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με συγκέντρωση  $C = 10^{-5}M$  (10 $\mu$ M). Το τελευταίο προκύπτει από το μητρικό διάλυμα της ουσίας με  $C = 2,76 \times 10^{-3}M$ , χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το DMSO. Το διάλυμα εισάγεται στη συνέχεια στην κατάλληλη κυβέττα φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, πραγματοποιείται μέσω της επιλογής Autozero ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Στη συνέχεια, το δείγμα ακτινοβολείται με ισχύ 12,5 mW / cm<sup>2</sup>, κάνοντας χρήση της διάταξης που έχει περιγραφεί στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβολήση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα. Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 0min – 10min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 10min – 30min.

Για τη διεξαγωγή των μελετών της φωτολεύκανσης απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1). Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετρείται από τα 300 έως τα 700nm. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min.

### ΣΤ.5.1 Αποτελέσματα

Παρατίθεται στο παρακάτω διάγραμμα η μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης του διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 (διάγραμμα ΣΤ.16).



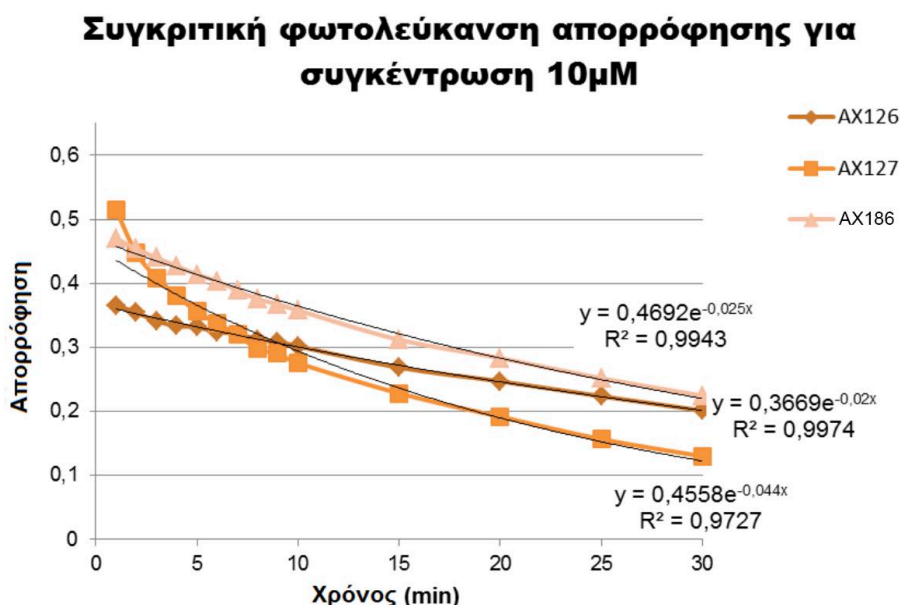
Διάγραμμα ΣΤ. 16: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232

## ΣΤ.5.2 Συμπεράσματα

Η παραπάνω καμπύλη περιγράφεται από την εξίσωση  $y = -0,0022x + 0,5659$  με  $R^2 = 0,7608$ , όπου  $y$  είναι το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα, έπειτα από ακτινοβόληση, δείγματα και  $x$  ο χρόνος της εκάστοτε αυτής ακτινοβόλησης. Παρατηρείται λοιπόν ότι η απορρόφηση του διαλύματος της AX-232 με συγκέντρωση  $10^{-5}M$  ( $10\mu M$ ) παρουσιάζει μια γραμμική πτώση ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης.

Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη απορρόφηση πριν την έναρξη της ακτινοβόλησης έχει την τιμή 0,57725 ενώ έπειτα από ακτινοβόληση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 0,52142. Υφίσταται δηλαδή μια πτώση της τάξης του 9,67% στην μέγιστη απορρόφηση στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά. Παρατηρείται λοιπόν μια αργή πτώση της απορρόφησης της ουσίας, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η AX-232 χαρακτηρίζεται από αντοχή ως προς τη φωτολεύκανση.

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις άλλες τρεις κουρκουμίνες (διάγραμμα ΣΤ.17<sup>[1]</sup>):



Διάγραμμα ΣΤ. 17: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186<sup>[1]</sup>

Εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Στην περίπτωση των κουρκουμίνων AX-126, AX-127 και AX-186 η μέγιστη απορρόφηση παρουσιάζει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο.
- Μέγιστη φωτολεύκανση απορρόφησης εμφανίζει η κουρκουμίνη AX-127. Οι AX-126 και AX-186 παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα. Η κουρκουμίνη AX-232 χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη φωτολεύκανση, επομένως είναι περισσότερο φωτοσταθερή, συγκρινόμενη με τις άλλες τρεις κουρκουμίνες.



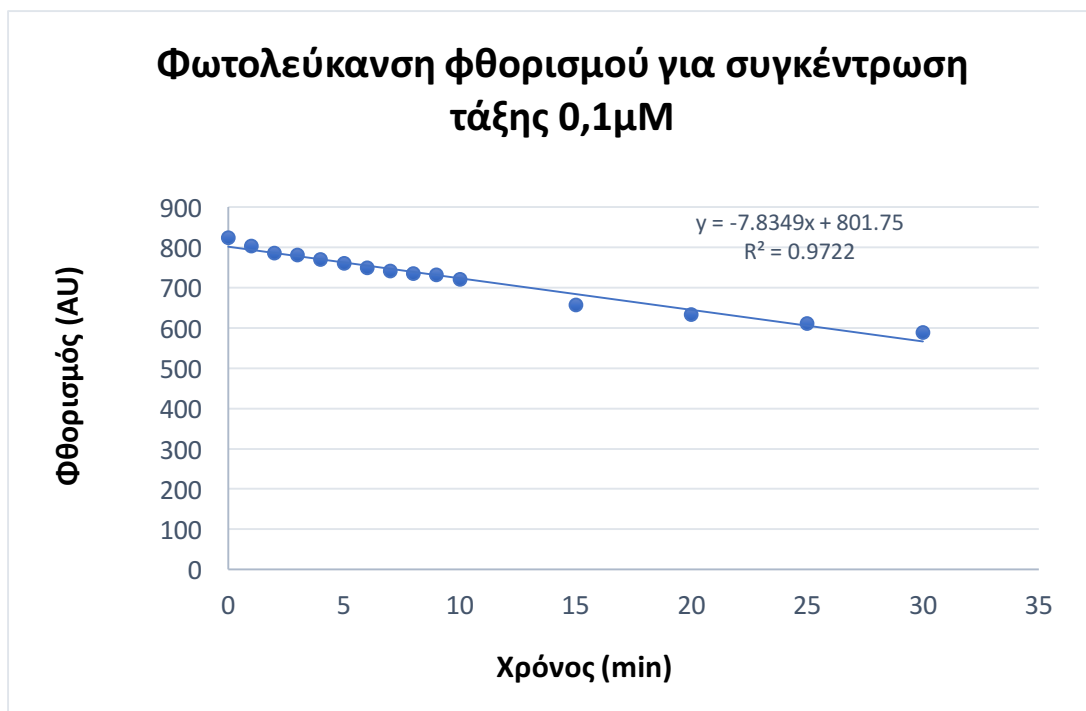
## ΣΤ.6 Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού της κουρκουμίνης AX-232

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.4.2. Αρχικά φτιάχνεται το διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με συγκέντρωση  $C = 5 \times 10^{-7} \text{M}$  (0,5μM). Το τελευταίο προκύπτει από το μητρικό διάλυμα της ουσίας με  $C = 2,76 \times 10^{-3} \text{M}$ , χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το DMSO. Το διάλυμα εισάγεται στη συνέχεια στην κατάλληλη κυβέττα φασματοφωτόμετρου φθορισμού. Πριν ξεκινήσει η μέτρηση για το φθορισμό του διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 πραγματοποιείται ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενου φθορισμού του διαλύτη DMSO. Η διέγερση (excitation) ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης (497nm). Στη συνέχεια, το δείγμα ακτινοβολείται με ισχύ  $12,5 \text{mW} / \text{cm}^2$ , κάνοντας χρήση της διάταξης που έχει περιγραφεί στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβολή να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα. Το φάσμα φθορισμού καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 0min – 10min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα 10min – 30min.

Για τη διεξαγωγή των μελετών της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα Δ.2.2). Η διέγερση (excitation) ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης της ουσίας. Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι 480 nm/min. Το άνοιγμα του μονοχρωμάτορα διέγερσης αλλά και εκπομπής επιλέγεται να είναι 10nm.

### ΣΤ.6.1 Αποτελέσματα

Παρατίθεται στο παρακάτω διάγραμμα η μεταβολή της μέγιστης τιμής του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης του διαλύματος της κουρκουμίνης AX-232 (διάγραμμα ΣΤ.18).



Διάγραμμα ΣΤ. 18: Μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης για την κουρκουμίνη ΑΧ-232

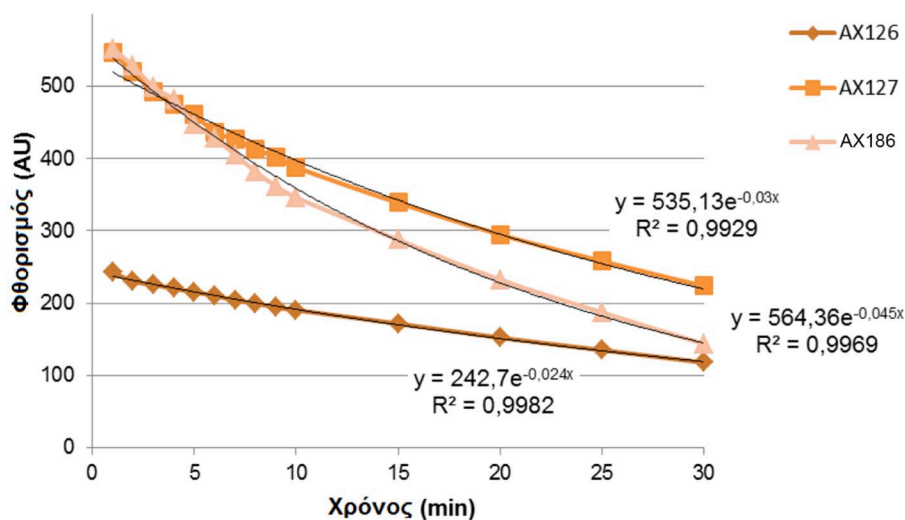
### ΣΤ.6.2 Συμπεράσματα

Η παραπάνω καμπύλη περιγράφεται από την εξίσωση  $y = -7,8349x + 801,75$  με  $R^2 = 0,9722$ , όπου  $y$  είναι το σήμα φθορισμού που προκύπτει από τα μετρούμενα, έπειτα από ακτινοβόληση, δείγματα και  $x$  ο χρόνος της εκάστοτε αυτής ακτινοβόλησης. Παρατηρείται λοιπόν ότι ο μέγιστος φθορισμός του διαλύματος της ΑΧ-232 με συγκέντρωση  $5 \times 10^{-7}M$  (0,5μM) παρουσιάζει μια γραμμική πτώση ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης.

Πιο συγκεκριμένα, ο μέγιστος φθορισμός πριν την έναρξη της ακτινοβόλησης έχει την τιμή 823,53 ενώ έπειτα από ακτινοβόληση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 588,05. Έχουμε δηλαδή μια πτώση της τάξης του 28,59% στο μέγιστο φθορισμό στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά.

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν και για τις άλλες τρεις κουρκουμίνες (διάγραμμα ΣΤ.19<sup>[1]</sup>):

### Συγκριτική φωτολεύκανση φθορισμού για συγκέντρωση τάξης 0,1μM



Διάγραμμα ΣΤ. 19: Μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186<sup>[1]</sup>

Μπορούμε να πούμε ότι:

- Στην περίπτωση των κουρκουμίνων AX-126, AX-127 και AX-186 η μέγιστη ένταση του σήματος φθορισμού πέφτει εκθετικά σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβόλησης.
- Μέγιστη φωτολεύκανση φθορισμού εμφανίζει η ουσία AX-186 ενώ την ελάχιστη η AX-232, γεγονός που υποδεικνύει τη φωτοσταθερότητά της.

## ΣΤ.7 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών των διαλυμάτων της κουρκουμίνης AX-232

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.4.2. Διεξάγονται τρία πειράματα τα οποία διαφέρουν ως προς τον εκάστοτε διαλύτη της ουσίας αλλά και ως προς την ένταση της ακτινοβολήσης. Στο πρώτο πείραμα, το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε DMSO. Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται στα  $4,77 \text{ mW/cm}^2$ . Στο δεύτερο πείραμα το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε PBS. Η ακτινοβολήση πραγματοποιείται πάλι στα  $4,77 \text{ mW/cm}^2$ . Στο τρίτο πείραμα, το επιθυμητό διάλυμα της κουρκουμίνης AX-232 με  $C = 10^{-5}M$  προκύπτει από δύο αραιώσεις σε DMSO. Ο τρόπος παρασκευής του είναι ακριβώς ο ίδιος που περιγράφηκε στο πρώτο πείραμα. Το μόνο που διαφέρει εδώ είναι ότι η ακτινοβολήση γίνεται στα  $10,72 \text{ mW/cm}^2$ . Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί επίσης ότι το τελικό προς ακτινοβολήση κάθε φορά διάλυμα περιλαμβάνει εκτός από κουρκουμίνη σε συγκέντρωση  $10^{-5}M$ , NADH σε συγκέντρωση  $100\mu M$  καθώς και EDTA σε συγκέντρωση  $0,1mM$ . Έχει όγκο  $3ml$ .

Το δεύτερο πείραμα διεξάγεται καθώς οι ενδείξεις παραγωγής ελευθέρων ριζών που προέκυψαν από το πρώτο δεν ήταν ικανοποιητικές. Αντίστοιχα, το τρίτο πείραμα διεξάγεται καθώς οι ενδείξεις παραγωγής ελευθέρων ριζών που προέκυψαν από το δεύτερο δεν ήταν ούτε αυτές με τη σειρά τους ικανοποιητικές.

Αρχικά, φτιάχνονται λοιπόν τα διαλύματα με τον τρόπο που έχει περιγραφεί στην ενότητα Ε.2.4.2. Στη συνέχεια, αυτά εισάγονται στις κατάλληλες κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων, πραγματοποιείται μέσω της επιλογής Autozero ο μηδενισμός του σήματος για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του εκάστοτε διαλύτη (DMSO ή PBS).

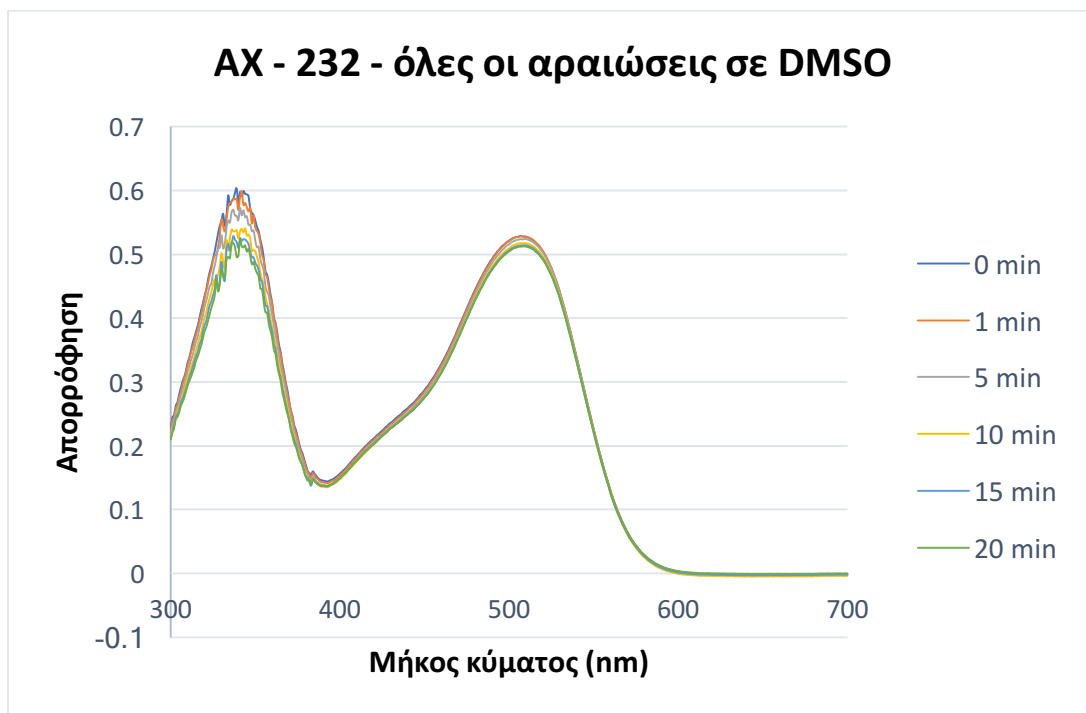
Έπειτα, το δείγμα του εκάστοτε πειράματος ακτινοβολείται με ισχύ  $4,77mW / cm^2$  ( $1^{\circ}$  και  $2^{\circ}$  πείραμα) ή  $10,72 \text{ mW} / cm^2$  ( $3^{\circ}$  πείραμα), κάνοντας χρήση της διάταξης που έχει περιγραφεί στην ενότητα Δ.2.3. Κάθε φορά γίνεται χρήση ειδικού μαγνήτη ανάδευσης (magnetic stirrer) έτσι ώστε η ακτινοβολήση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα στο διάλυμα.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών της κουρκουμίνης AX-232 γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1).

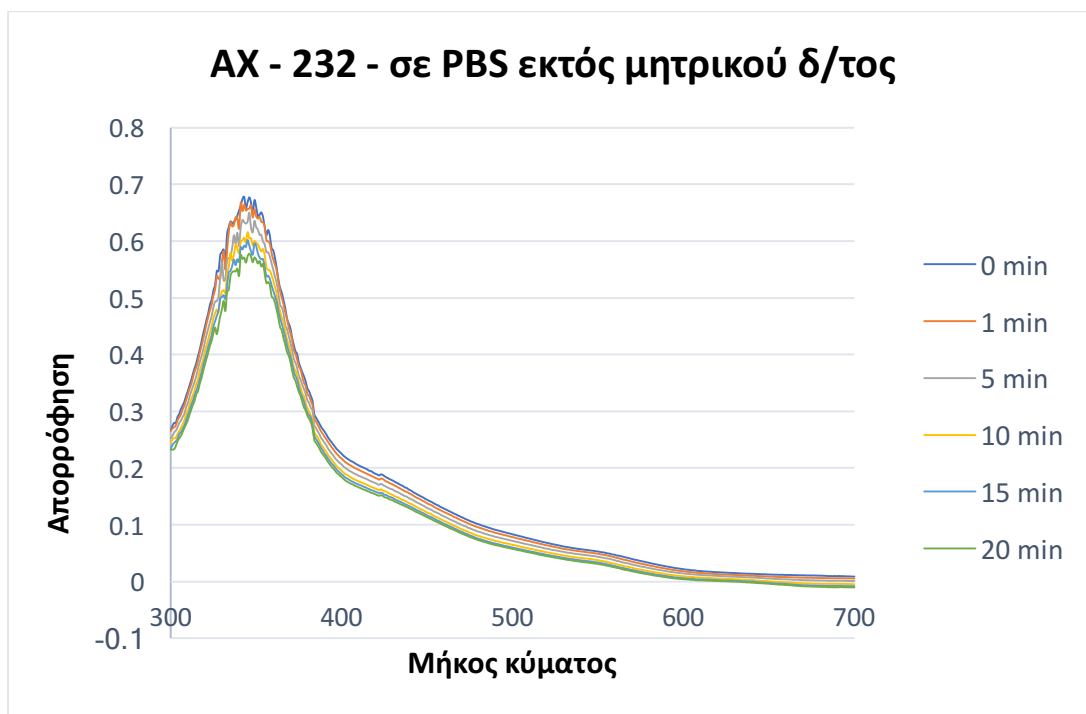
Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται ανά λεπτό ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα  $0min - 10min$  και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης στο χρονικό διάστημα  $10min - 20min$ . Τα φάσματα απορρόφησης κάθε διαλύματος λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή και έτσι η απορρόφηση μετριέται από τα  $300$  έως τα  $700nm$ . Η ταχύτητα σάρωσης επιλέγεται να είναι  $480 \text{ nm/min}$ .

### ΣΤ.7.1 Αποτελέσματα

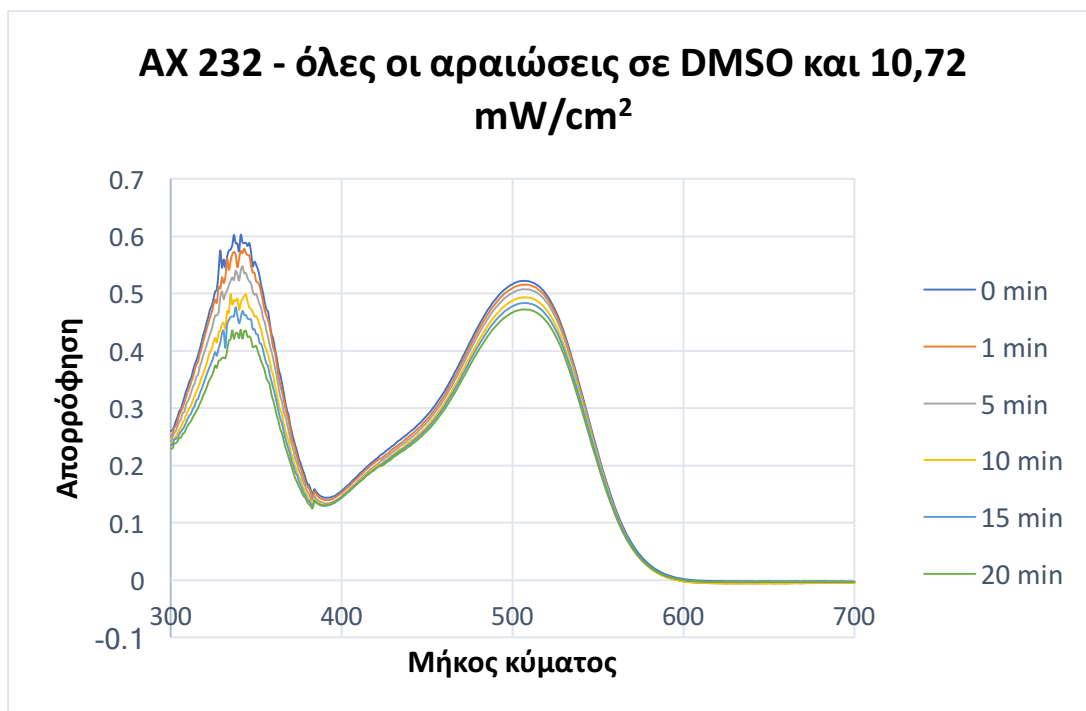
Παρατίθενται στο σημείο αυτό τα φάσματα απορρόφησης που προέκυψαν από την προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία (ΣΤ.20, ΣΤ.21, ΣΤ.22).



Διάγραμμα ΣΤ. 20: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO



Διάγραμμα ΣΤ. 21: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε PBS



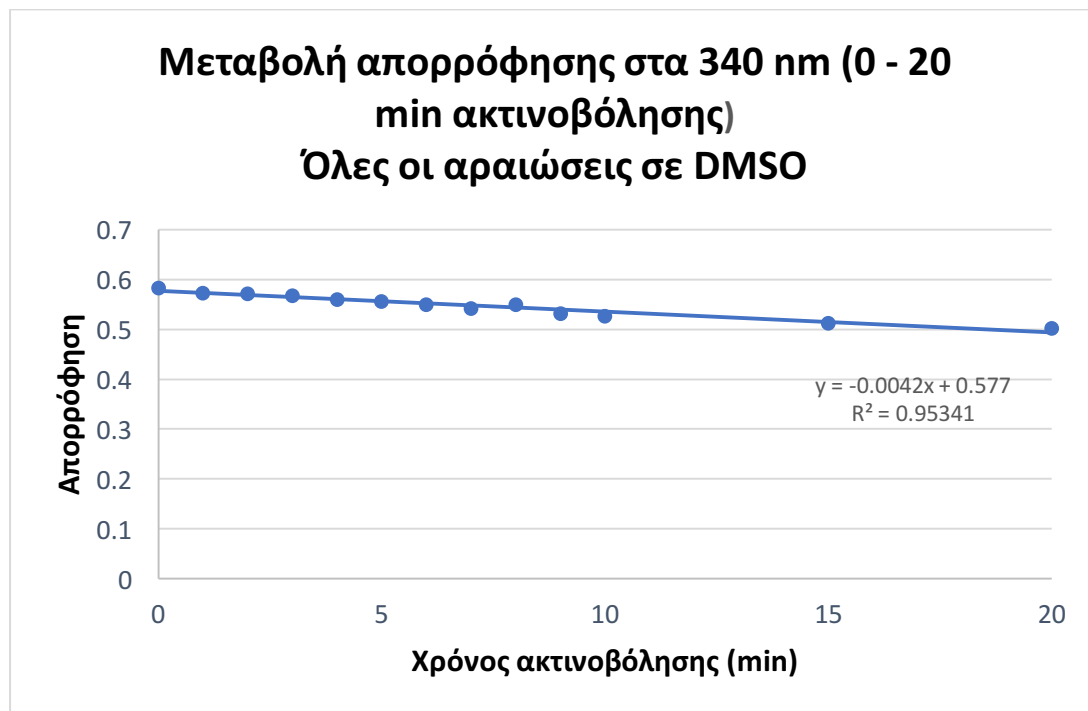
Διάγραμμα ΣΤ. 22: Φάσματα απορρόφησης στο διάστημα 0 – 20 min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO και ακτινοβολήση 10,72 mW/cm<sup>2</sup>

Στα παραπάνω φάσματα που προέκυψαν παρατηρείται ότι εμφανίζονται δύο κορυφές απορρόφησης. Στο 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> πείραμα, όπου οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO, η μια κορυφή έγκειται στα 500 περίπου nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική μέγιστη τιμή απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232. Η δεύτερη εμφανίζεται στα 340 περίπου nm και αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική κορυφή του NADH. Στο 2<sup>ο</sup> πείραμα, όπου οι δύο αραιώσεις από το μητρικό (σε DMSO) διάλυμα της ουσίας μας πραγματοποιούνται σε PBS, τα αποτελέσματα είναι λίγο διαφορετικά. Η μια κορυφή έγκειται τώρα γύρω στα 394nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική μέγιστη τιμή απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232 όταν πραγματοποιούνται και οι δύο αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα σε PBS. Η δεύτερη είναι επόμενο ότι οφείλεται στην παρουσία του NADH στο διάλυμα και παρουσιάζεται όπως και πριν στα 340 περίπου nm.

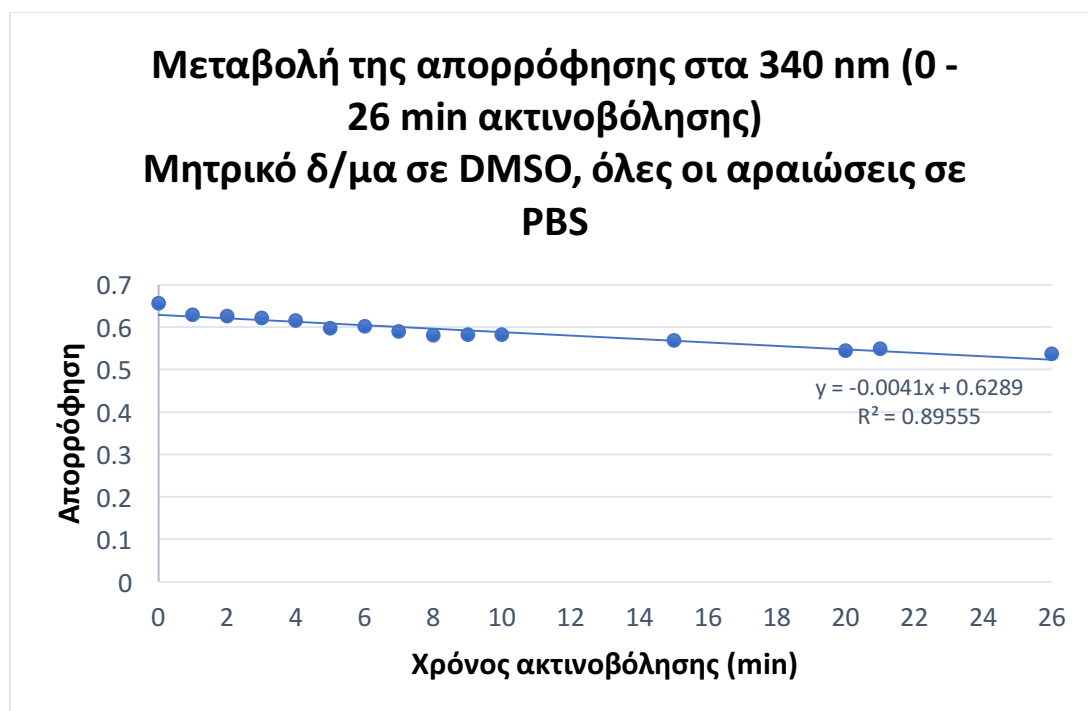
Μέσα από την παρατήρηση των παραπάνω διαγραμμάτων μπορεί να ειπωθεί ότι με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολήσης οι εκάστοτε δύο κορυφές παρουσιάζουν πτώση. Αυτό είναι επόμενο. Από τη μια πλευρά, η μείωση της κορυφής απορρόφησης της κουρκουμίνης AX-232, η οποία βρίσκεται στα 500 περίπου nm όταν και οι δύο αραιώσεις γίνονται σε DMSO και στα 394 περίπου nm όταν και οι δύο αραιώσεις γίνονται σε PBS, είναι αναμενόμενη κατά την αύξηση του χρόνου της ακτινοβολήσης. Αυτό, διότι επέρχεται όπως είδαμε και παραπάνω φωτολεύκανση της ουσίας. Από την άλλη πλευρά, η μείωση της κορυφής του NADH, η οποία εμφανίζεται στα 340 περίπου nm, είναι και αυτή με τη σειρά της λογική. Στην ουσία, αποδεικνύει την παραγωγή του NAD<sup>+</sup> και έτσι τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών στο διάλυμα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πτώσεις των προαναφερθέντων κορυφών και στα τρία πειράματα είναι πολύ μικρές, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών είναι αισθητά περιορισμένος.

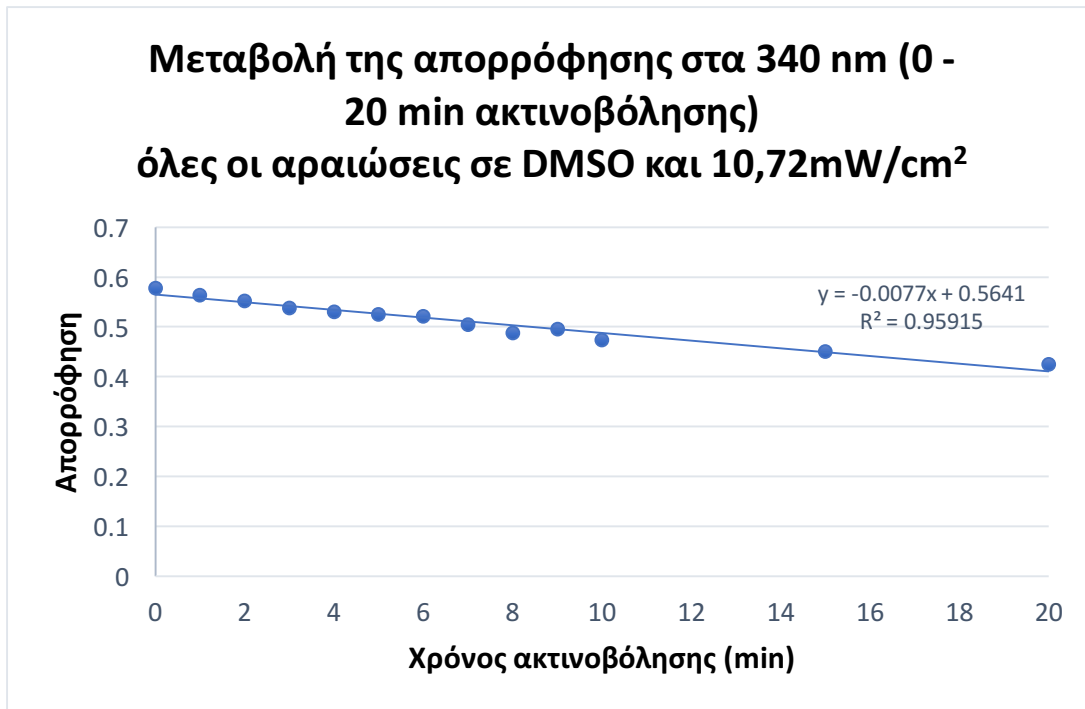
Παρατίθενται τα διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης (διαγράμματα ΣΤ.23, ΣΤ.24, ΣΤ.25, ΣΤ.26). Προφανώς, τα διαγράμματα αυτά αποτελούν ένδειξη της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Στο τελευταίο διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης (στα 340nm) για τις τέσσερις κουρκουμίνες που μελετώνται.



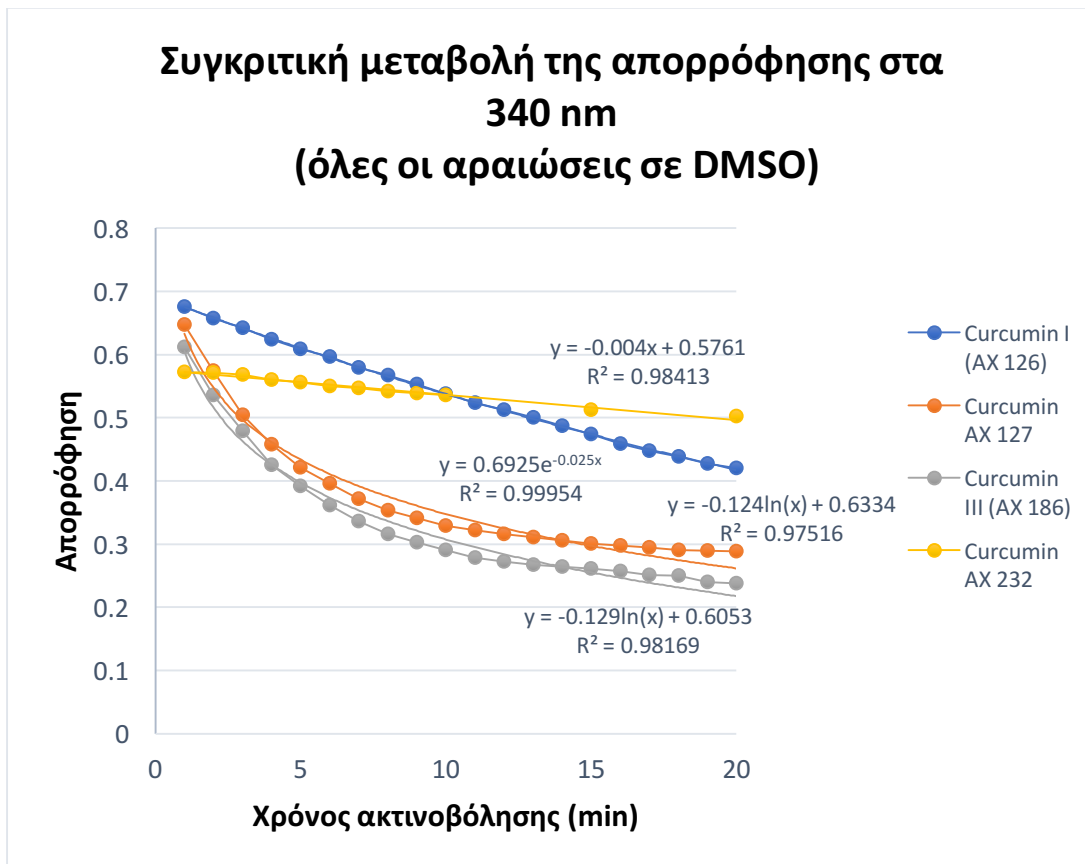
Διάγραμμα ΣΤ. 23: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO



Διάγραμμα ΣΤ. 24: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε PBS



Διάγραμμα ΣΤ. 25: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO και ακτινοβολήση 10,72 mW/cm<sup>2</sup>



Διάγραμμα ΣΤ. 26: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για τις κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186, AX-232 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO



## ΣΤ.7.2 Συμπεράσματα

Από τα τρία πρώτα διαγράμματα συμπεραίνεται ότι οι εξισώσεις που περιγράφουν τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης για τα τρία πειράματα που διεξάγονται είναι οι εξής:

Πείραμα 1 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO, ακτινοβολήση 4,77 mW/cm<sup>2</sup>:  
 **$y = -0,0042x + 0,577$**

Πείραμα 2 – όλες οι αραιώσεις σε PBS (μητρικό διάλυμα σε DMSO), ακτινοβολήση 4,77 mW/cm<sup>2</sup>:  
 **$y = -0,0041x + 0,6289$**

Πείραμα 3 – όλες οι αραιώσεις σε DMSO, ακτινοβολήση 10,72 mW/cm<sup>2</sup>:  
 **$y = -0,0077x + 0,5641,$**

όπου  $y$  είναι το σήμα απορρόφησης που προκύπτει από τα μετρούμενα, έπειτα από ακτινοβολήση, δείγματα και  $x$  ο χρόνος της εκάστοτε αυτής ακτινοβολήσης.

Έτσι λοιπόν προκύπτει το συμπέρασμα ότι και στις τρεις περιπτώσεις η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm πραγματοποιείται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης. Στο 1<sup>ο</sup> πείραμα παρατηρείται πτώση της τάξης του 13,87%, στο 2<sup>ο</sup> της τάξης του 18,13%, ενώ στο 3<sup>ο</sup> της τάξης του 26,46% (από 0 έως 20 λεπτά ακτινοβολήσης). Τα ποσοστά αυτά είναι αισθητά μικρότερα απ' ό τι τα αντίστοιχα που προέκυψαν για τις υπόλοιπες κουρκουμίνες.

Πιο συγκεκριμένα, ας γίνει τώρα η παρατήρηση του τέταρτου διαγράμματος στο οποίο απεικονίζεται η συγκριτική συμπεριφορά των τεσσάρων κουρκουμίνων ως προς την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Σημειώνεται ότι το τελευταίο αναφέρεται σε διαλύματα των κουρκουμίνων που έχουν συγκέντρωση  $C = 10^{-5}M$  (10μM), όπου όλες οι αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα έχουν γίνει σε DMSO. Το μητρικό διάλυμα είναι επίσης φτιαγμένο σε DMSO. Προκύπτουν οι εξής εξισώσεις:

Κουρκουμίνη I (AX 126):  **$y = 0,6925e^{-0,025x}$ , με  $R^2 = 0,99954$**

Κουρκουμίνη AX 127:  **$y = -0,124\ln(x) + 0,6334$**

Κουρκουμίνη III (AX 186):  **$y = -0,129\ln(x) + 0,6053$**

Κουρκουμίνη AX 232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin):  **$y = -0,004x + 0,5761$**

Η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm πραγματοποιείται λογαριθμικά σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης για τις κουρκουμίνες AX-127 και AX-186. Η πρώτη (AX-127) παρουσιάζει πτώση της τάξης του 61,14% ενώ η δεύτερη (curcumin III, AX 186) της τάξης του 65,54% (από 0 έως 20 λεπτά ακτινοβολήσης).

Για την κουρκουμίνη AX-126 (curcumin I) η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm πραγματοποιείται εκθετικά σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης και είναι της τάξης του 39,39% από 0 έως 20 λεπτά ακτινοβολήσης.

Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm είναι ενδεικτική του σχηματισμού του  $\text{NAD}^+$  στο εκάστοτε διάλυμα και επομένως της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η κουρκουμίνη AX-232 παρουσιάζει τη μικρότερη πτώση της προαναφερθείσας κορυφής. Το μεγαλύτερο ποσοστό ελάττωσης (26,46%) προκύπτει όταν εφαρμόζεται ακτινοβολία ισχύος  $10,72 \text{ mW/cm}^2$ . Στις μετρήσεις που έχουν παρθεί για τις υπόλοιπες κουρκουμίνες η ισχύς της ακτινοβολίας είναι  $4,65 \text{ mW/cm}^2$ . Προφανώς, όσο μεγαλύτερη είναι η ισχύς της ακτινοβολήσης, τόσο περισσότερο αυξάνεται και ο κίνδυνος εμφάνισής επαγόμενης τοξικότητας στα κύτταρα, κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Για το λόγο αυτό, όπως προκύπτει από τις μετρήσεις, η κουρκουμίνη AX-232 είναι η λιγότερο κατάλληλη για να χρησιμοποιηθεί ως φωτοευαίσθητη ουσία. Ακόμα και με την αύξηση της δόσης ακτινοβολίας στα  $10,72 \text{ mW/cm}^2$ , η παραγωγή των ελευθέρων ριζών δεν είναι ικανοποιητική σε σχέση με τις υπόλοιπες.
- Οι κουρκουμίνες AX-127 και III (AX-186) συμπεριφέρονται με παραπλήσιο τρόπο και έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Είναι οι καταλληλότερες για χρήση κατά την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Η κουρκουμίνη I (AX-126) παράγει προφανώς περισσότερες ελεύθερες ρίζες από την AX-232. Παρόλα αυτά, η παραγωγή αυτή συμβαίνει με πολύ αργότερους ρυθμούς απ' ό τι στην περίπτωση των AX-127 και AX-186.

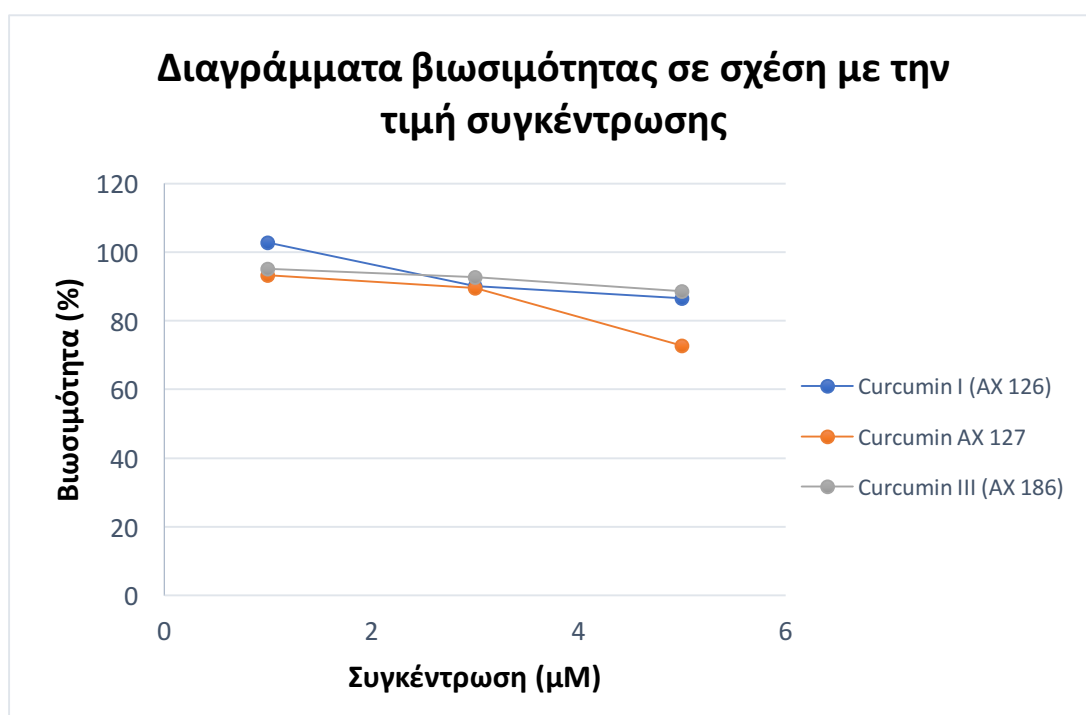
Σημειώνεται τέλος ότι παρότι η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια επιλογής μιας ουσίας για φωτοευαίσθητοποιητή στη φωτοδυναμική θεραπεία, υπάρχουν και αρκετοί ακόμα παράγοντες που παίζουν καίριο ρόλο. Για παράδειγμα, όπως θα εξηγηθεί και παρακάτω, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί έλεγχος ως προς τον χωρικό εντοπισμό των παραγώγων της κουρκουμίνης μέσα στην κυτταρική σειρά LNCaP. Αν για παράδειγμα διατίθεται ένας φωτοευαίσθητοποιητής με υψηλή ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών ο οποίος όμως συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων, τότε αυτός δεν είναι κατάλληλος για εφαρμογή στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ουσίες που συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων, εκεί δηλαδή που βρίσκεται το γενετικό υλικό, είναι ικανές να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο DNA, οι οποίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, νέα καρκινογένεση κτλ.

## ΣΤ.8 Έλεγχος της επαγόμενης στα κύτταρα LNCaP τοξικότητας από τις κουρκουμίνες

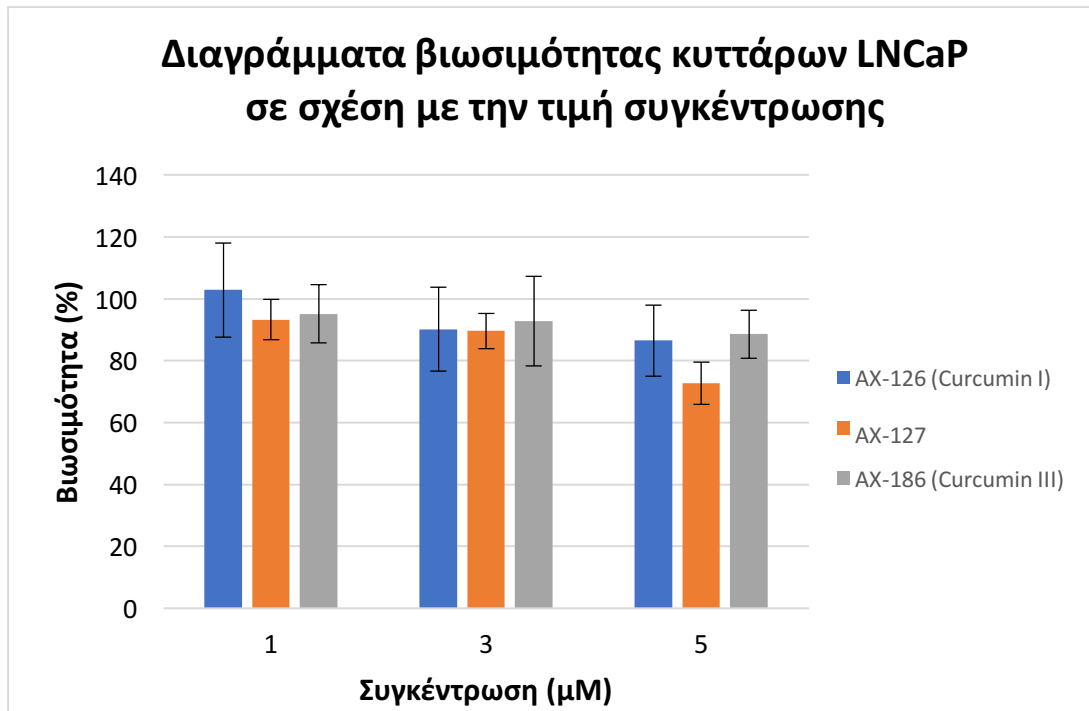
Στην ενότητα αυτή μελετάται η τοξικότητα που επάγεται από τα συνθετικά παράγωγα της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I), AX-127 και AX-186 (Curcumin III) στην κυτταρική σειρά LNCaP με απουσία φωτός. Η μεθοδολογία που ακολουθείται περιγράφεται στο κεφάλαιο Ε.3. Θα διεξαχθούν πειράματα για τρεις τιμές συγκεντρώσεων των ουσιών. Οι τιμές αυτές είναι: 1μΜ, 3μΜ και 5μΜ.

### ΣΤ.8.1 Αποτελέσματα

Όπως περιγράφεται στην ενότητα Ε.3 τα κύτταρα της σειράς LNCaP καλλιεργήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε τριβλία και στη συνέχεια επώαστηκαν με τις τιμές συγκεντρώσεων των κουρκουμίνων που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η βιωσιμότητά τους μελετήθηκε με τον βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων MTT (ενότητα Ε.3.1). Παρατίθενται τα διαγράμματα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με την τιμή συγκέντρωσης (μΜ) για την κάθε κουρκουμίνη (διαγράμματα ΣΤ.27, ΣΤ.28). Αυτά, προέκυψαν έπειτα από τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης που είναι μέρος του πρωτόκολλου ελέγχου βιωσιμότητας MTT με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1).



Διάγραμμα ΣΤ. 27: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με τη συγκέντρωση των κουρκουμίνων μας απουσία φωτός



Διάγραμμα ΣΤ. 28: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με τη συγκέντρωση των κουρκουμίνων μας απουσία φωτός

## ΣΤ.8.2 Συμπεράσματα

Από το παραπάνω διάγραμμα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Η συγκέντρωση 1μM στην περίπτωση και των τριών κουρκουμίνων είναι ελάχιστα έως και καθόλου τοξική για τα κύτταρα της σειράς LNCaP. Στην περίπτωση της κουρκουμίνης I (AX-126) το ποσοστό βιωσιμότητας για τιμή συγκέντρωσης 1μM είναι 101,66 %. Για την κουρκουμίνη AX-127 στις ίδιες συνθήκες το ποσοστό ανέρχεται στο 93,28% ενώ για την III (AX-186) στο 95,52 %.
- Η συγκέντρωση 3μM και για τις τρεις ουσίες προκαλεί μια πτώση στα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων. Η πτώση αυτή καταλήγει στα εξής νέα ποσοστά βιωσιμότητας: AX-126 → 88,73% | AX-127 → 89,7% | AX-186 → 92,9. Μπορεί να ειπωθεί ότι η συγκέντρωση 3μM θα είναι αποδεκτή για εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας, καθώς η πτώση στην βιωσιμότητα δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- Η συγκέντρωση 5μM οδηγεί σε μια ακόμη πτώση στα ποσοστά βιωσιμότητας που προαναφέρονται. Για τις μεν κουρκουμίνες AX-126 και AX-186 η πτώση αυτή παραμένει μικρή και οδηγεί στις εξής τιμές ποσοστών: AX-126 → 87,067% | AX-186 → 88,558%. Για την δε κουρκουμίνη AX-127 η πτώση είναι αισθητά μεγαλύτερη σε σχέση με τις τιμές ποσοστών βιωσιμότητας για συγκεντρώσεις 1μM και 3μM (AX-127 → 72,7226%).

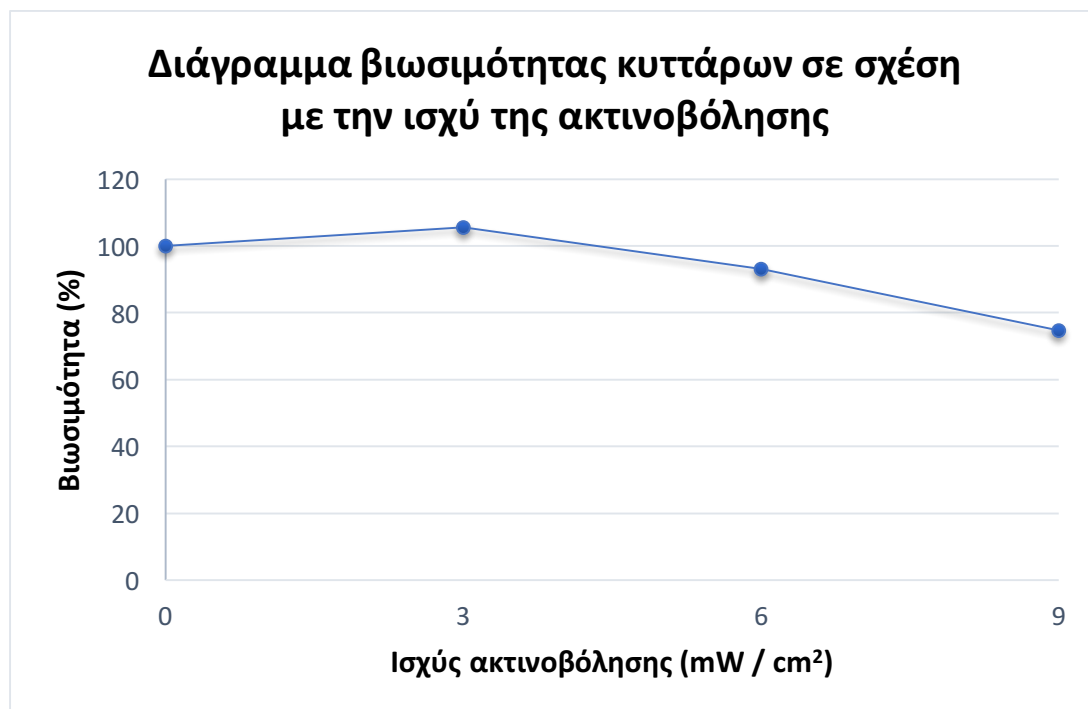
Τελικά, επιλέγεται να εφαρμοστεί φωτοδυναμική θεραπεία για τιμή συγκέντρωσης των κουρκουμίνων στα 3μM. Η τιμή αυτή δεν παρουσιάζει τοξικότητα στα κύτταρα LNCaP και για τις τρεις κουρκουμίνες.

## ΣΤ.9 Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP

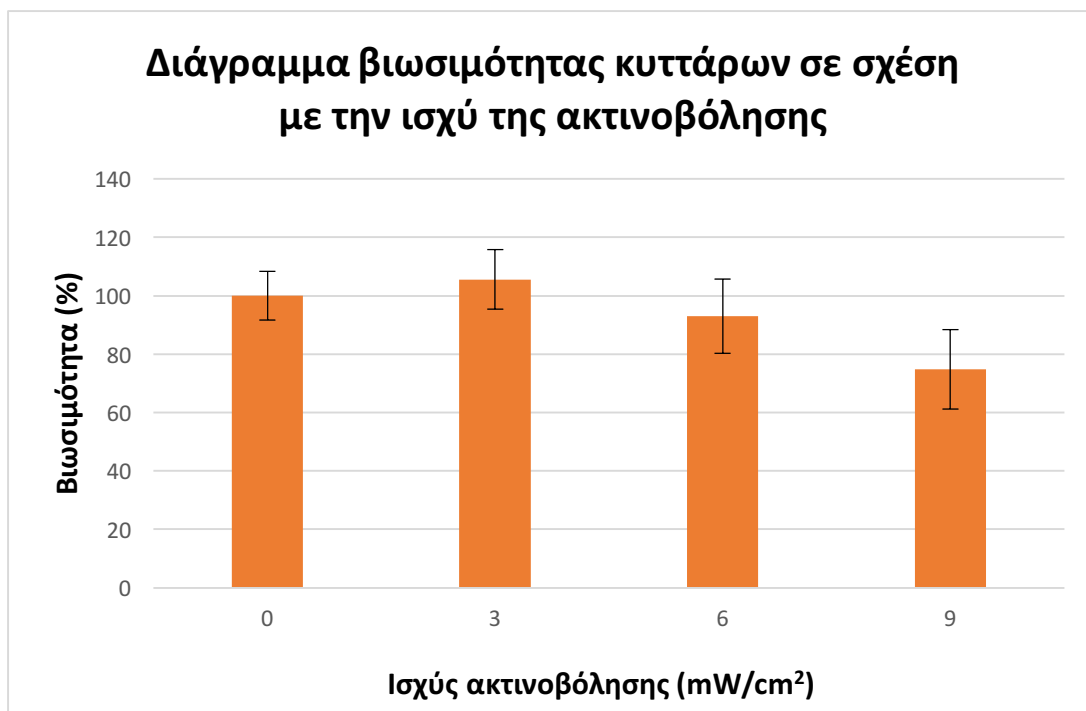
Στην ενότητα αυτή πραγματοποιείται η μελέτη της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη LNCaP. Η μεθοδολογία που ακολουθείται περιγράφεται στο κεφάλαιο Ε.4. Διεξάγονται πειράματα για τρεις τιμές ακτινοβολίας. Οι δόσεις ενέργειας φωτός είναι  $180 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $360 \text{ mJ/cm}^2$  και  $540 \text{ mJ/cm}^2$ . Αντιστοιχούν σε χρονική διάρκεια ακτινοβολήσης 60 δευτερολέπτων με ρυθμό ροής ισχύος ακτινοβολίας  $3 \text{ mW/cm}^2$ ,  $6 \text{ mW/cm}^2$  και  $9 \text{ mW/cm}^2$ .

### ΣΤ.9.1 Αποτελέσματα

Όπως περιγράφεται στην ενότητα Ε.4 τα κύτταρα της σειράς LNCaP καλλιεργήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε τριβλία και στη συνέχεια επώαστηκαν έπειτα από ακτινοβολή τους (παρουσία 300μl PBS) με τις συνολικές δόσεις ενέργειας που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η βιωσιμότητά τους μελετήθηκε με τον βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT (ενότητα Ε.3.1). Παρατίθενται τα διαγράμματα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με την συνολική δόση ενέργειας ακτινοβολίας (διαγράμματα ΣΤ.29, ΣΤ.30). Αυτά, προκύπτουν έπειτα από τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης που είναι μέρος του πρωτόκολλου ελέγχου βιωσιμότητας MTT με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1).



Διάγραμμα ΣΤ. 29: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με την ισχύ της ακτινοβολήσης



Διάγραμμα ΣΤ. 30: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με την ισχύ της ακτινοβολήσης

## ΣΤ.9.2 Συμπεράσματα

Από το παραπάνω διάγραμμα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Η ισχύς ακτινοβολήσης 3 mW/cm<sup>2</sup> (για 60sec) όχι μόνο δεν είναι τοξική για τα κύτταρα αλλά οδηγεί και σε ποσοστό βιωσιμότητας μεγαλύτερο από αυτό που προκύπτει για καθόλου ακτινοβολήση, χωρίς ωστόσο η αύξηση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι μικρές δόσεις φωτός έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
- Η ισχύς ακτινοβολήσης 6 mW/cm<sup>2</sup> προκαλεί μια πτώση στο ποσοστό βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς LNCaP και αυτό ανέρχεται τώρα στο 93,06%. Η επαγόμενη τοξικότητα σε αυτή την περίπτωση δεν είναι στατιστικά σημαντική και επιτρέπει την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας με αυτή την τιμή ισχύος ακτινοβολήσης.
- Η ισχύς ακτινοβολήσης 9 mW/cm<sup>2</sup> οδηγεί σε ποσοστό βιωσιμότητας 74,775 % το οποίο είναι αρκετά μικρότερο από τις προηγούμενες δύο περιπτώσεις. Η ισχύς ακτινοβολήσης σε αυτή την τιμή δεν παρέχει τις καλύτερες δυνατές συνθήκες για εφαρμογή της θεραπείας και για το λόγο αυτό η χρήση της είναι προτιμότερο να αποφευχθεί.

Τελικά επιλέγεται να εφαρμοστεί φωτοδυναμική θεραπεία με ισχύ ακτινοβολήσης 6 mW/cm<sup>2</sup>.

## ΣΤ.10 Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP

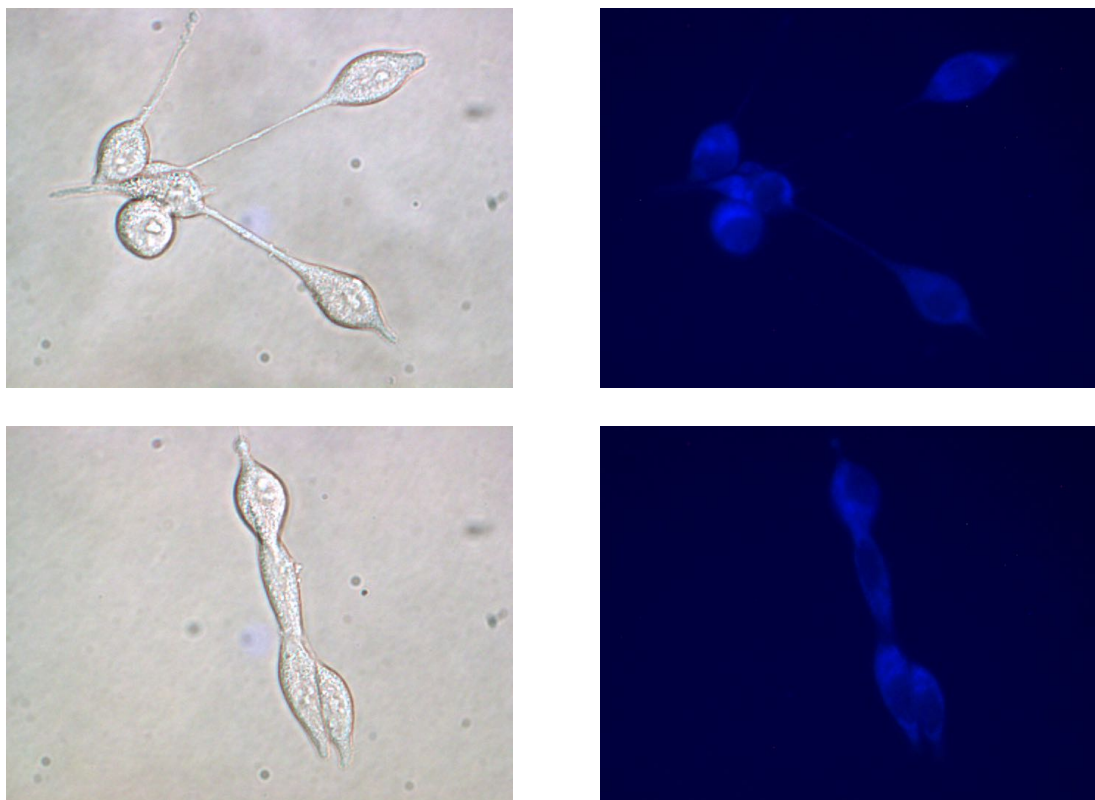
Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο μελετάται ο χωρικός εντοπισμός των συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) στα κύτταρα της σειράς LNCaP. Όπως έχει προαναφερθεί, η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι στενά συνδεδεμένη με την υποκυτταρική θέση συγκέντρωσης της εκάστοτε φωτοευαίσθητης ουσίας.

Ακολουθείται η μεθοδολογία που περιγράφεται στην ενότητα Ε.6. Έτσι λοιπόν, σε πρώτο στάδιο προετοιμάζονται τριβλία με καλυπτρίδες τα οποία περιέχουν 150.000 κύτταρα LNCaP το καθένα και αφήνονται στον κλίβανο για 24 ώρες επώαση. Στη συνέχεια, εισάγονται σε αυτά διαλύματα 3μΜ των τεσσάρων κουρκουμίνων σε πλήρες θρεπτικό μέσο και αφήνεται να γίνει επώαση μιας ώρας. Τέλος, τα τριβλία πλένονται με 1ml PBS δύο φορές, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε κατάλληλα πλακίδια μικροσκοπίου παρουσία 100μl PBS και ξεκινάει η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX50 (ενότητα Δ.2.4.2).

### ΣΤ.10.1 Αποτελέσματα

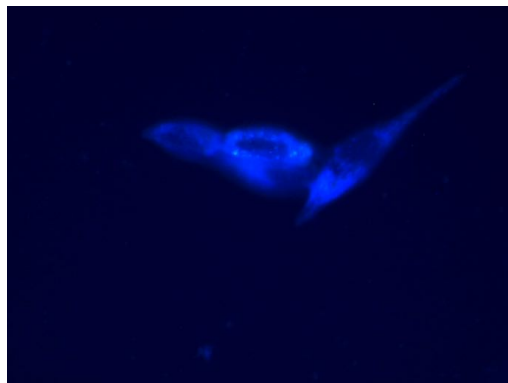
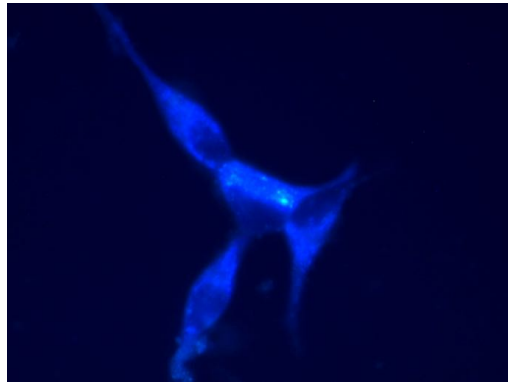
Στο σημείο αυτό παρατίθενται οι εικόνες που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο Olympus BX50 (ενότητα Δ.2.4.2). Στα αριστερά φαίνονται οι εικόνες που παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο ενώ στα δεξιά οι αντίστοιχες από το μικροσκόπιο φθορισμού:

#### AX-126 | Curcumin I



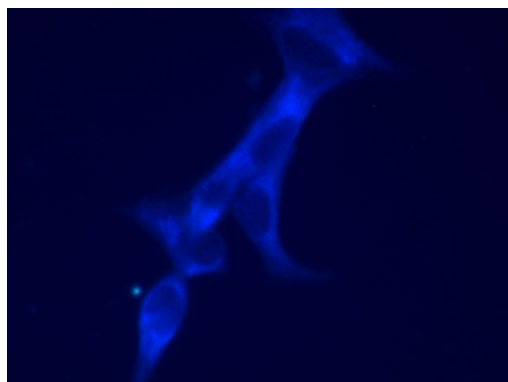
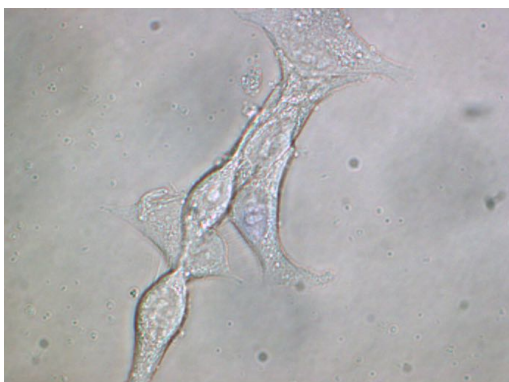
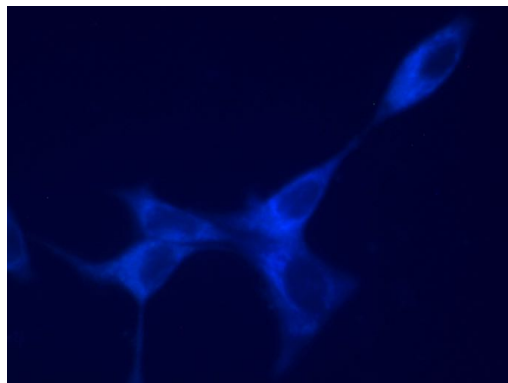
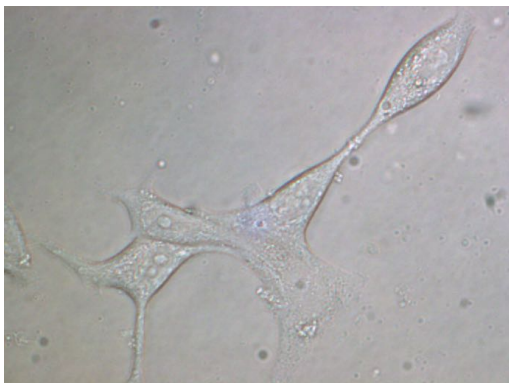
Εικόνα ΣΤ. 5: AX-126, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το μικροσκόπιο φθορισμού

### Curcumin AX-127



Εικόνα ΣΤ. 6: AX-127, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού

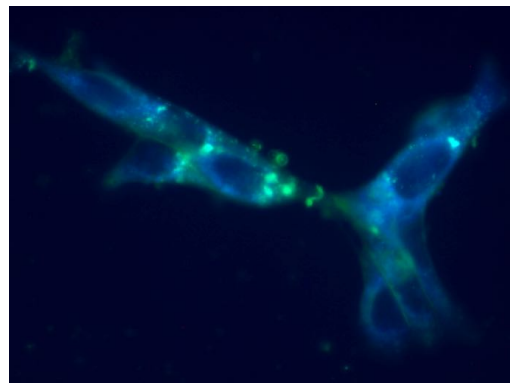
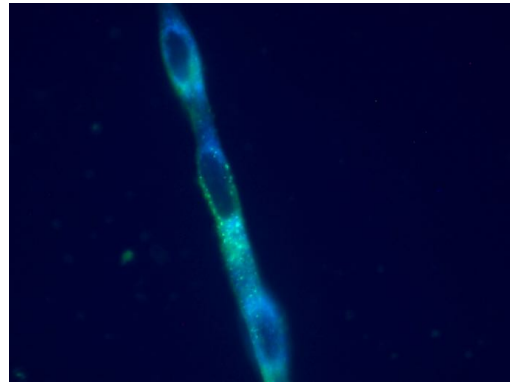
### AX-186 | Curcumin III



Εικόνα ΣΤ. 7: AX-186, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού



### Curcumin AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin)



Εικόνα ΣΤ. 8: AX-232, αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από μικροσκόπιο φθορισμού

### ΣΤ.10.2 Συμπεράσματα

Παρατηρώντας τις εικόνες που λήφθηκαν, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

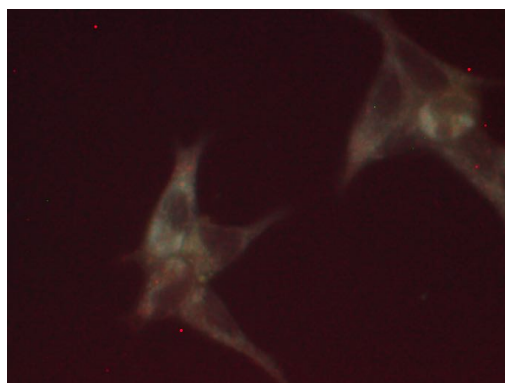
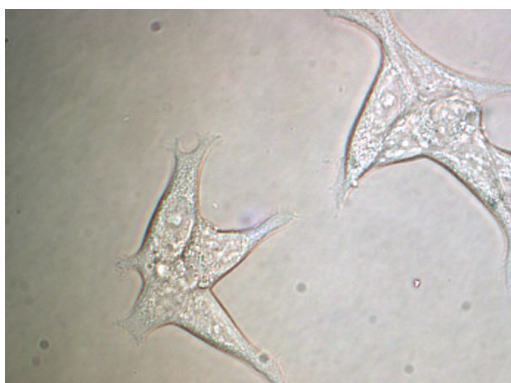
Αρχικά, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι και οι τέσσερις κουρκουμίνες που εξετάστηκαν, δεν παρουσιάζουν συσσώρευση στον πυρήνα. Αντίθετα, συγκεντρώνονται γύρω από εκείνον ο οποίος είναι ορατός σαν μια σκοτεινή περιοχή στο κεντρικό τμήμα των κυττάρων. Οι εικόνες δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα οι ουσίες μας να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, κάτι το οποίο, όπως έχει ειπωθεί στην ενότητα Ε.6, είναι πολύ βοηθητικό για τη μετέπειτα εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Παρόλα αυτά για να είναι το συμπέρασμα αυτό απόλυτα σίγουρο, θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες. Παρατηρείται επίσης ότι στο χρονικό διάστημα της μιας ώρας παρουσιάζεται ικανοποιητική απορρόφηση ουσίας από τα κύτταρα LNCaP.

Οι τέσσερις ουσίες από ότι φαίνεται από τη μορφολογία των κυττάρων δεν έχουν προκαλέσει επιρροή στην δομή των κυττάρων. Οι κουρκουμίνες AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) φθορίζουν με μπλε χρώμα ενώ η κουρκουμίνη AX-232 (di-NCH<sub>3</sub>) παρουσιάζει χρωματικές αποχρώσεις του μπλε αλλά και του πράσινου κατά το φθορισμό της μέσα στα κύτταρα.

Σύμφωνα με τα φάσματα εκπομπής των ουσιών, οι κουρκουμίνες AX-126, AX-127 και AX-186 θα έπρεπε να φθορίζουν στις εικόνες με χρώμα πράσινο, ενώ η AX-232 σε αποχρώσεις του πορτοκαλί.

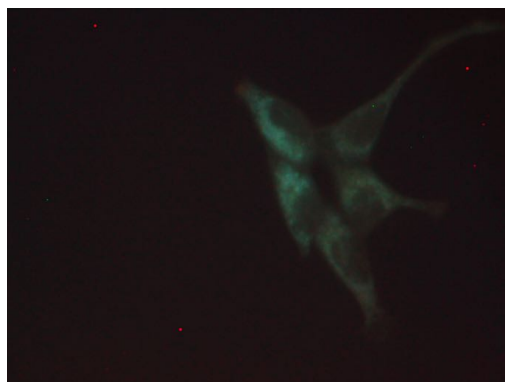
Τα χρώματα αυτά διαφέρουν στις εικόνες που λήφθηκαν καθώς δεν έγινε χρήση της επιλογής white balance η οποία συντελεί στο να αποδοθούν διορθωμένα τα χρώματα. Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα Ε.6 η επιλογή white balance προσθέτει 2s στο χρόνο απόκτησης της εκάστοτε εικόνας, και άρα δημιουργείται περισσότερη φωτοκαταστροφή, η οποία με τη σειρά της καταλήγει σε δυσδιάκριτες εικόνες. Στην περίπτωση που το white balance είχε επιλεγεί, οι αποχρώσεις των φθοριζουσών ουσιών στα κύτταρα LNCaP θα ήταν αυτές που αντιστοιχούν στα φάσματα εκπομπής τους. Για να γίνει αυτό περισσότερο σαφές, ακολουθούν δύο παραδείγματα εικόνων που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού με την επιλογή white balance ενεργή. Αυτές αντιστοιχούν στις κουρκουμίνες AX-127 και AX-186 (Curcumin III) (εικόνες ΣΤ.9, ΣΤ.10).

### Curcumin AX-127



Εικόνα ΣΤ. 9: AX-127, αριστερά εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού – white balance ενεργό

### AX-186 (Curcumin III)



Εικόνα ΣΤ. 10: AX-186, αριστερά εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού – white balance ενεργό

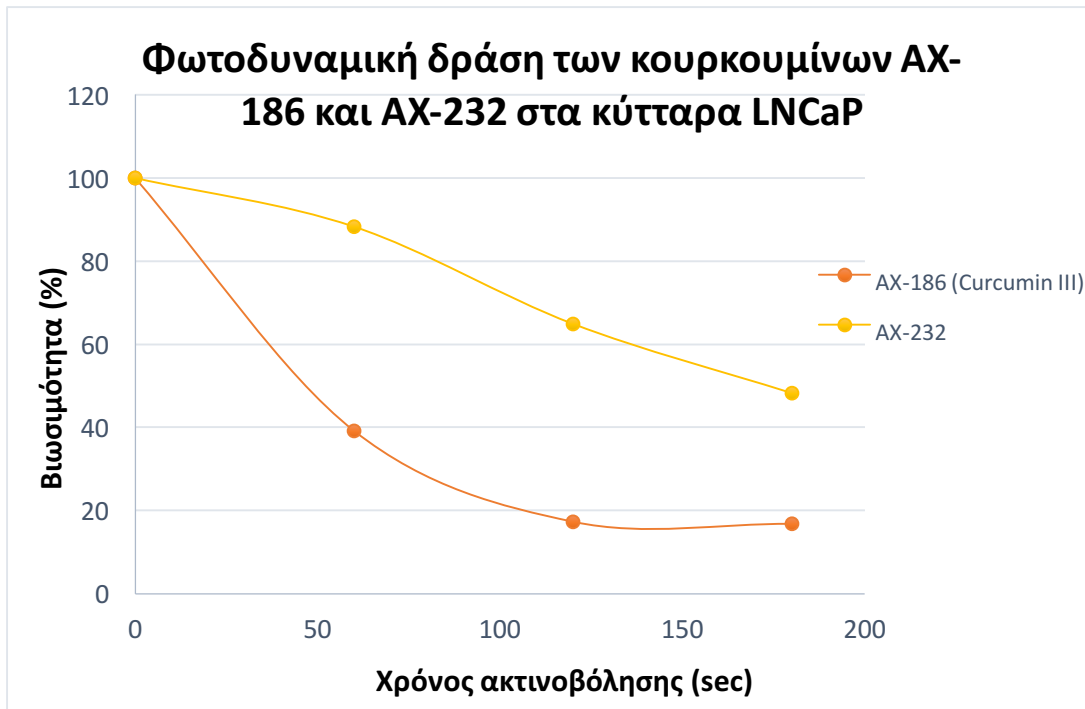
Όσον αφορά τώρα την ένταση του φθορισμού, μπορεί να ειπωθεί ότι η κουρκουμίνη AX-126 (Curcumin I) παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή. Η φωτεινότητα στις εικόνες της που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο φθορισμού είναι η μικρότερη σε σχέση με τις άλλες. Η κουρκουμίνη AX-127 παρουσιάζει αισθητά εντονότερο φθορισμό από την AX-126 αλλά φαίνεται επίσης να φθορίζει περισσότερο και από την AX-186 (Curcumin III). Η τελευταία φθορίζει αδιαμφισβήτητα περισσότερο από την AX-126 (Curcumin I). Τέλος, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) εμφανίζει τη μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη που ανήκουν στη σειρά LNCaP. Έτσι, η κουρκουμίνη AX-232 απορροφάται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τις υπόλοιπες, κατά το χρονικό διάστημα επώασης της μιας ώρας. Οι κουρκουμίνες AX-127 και AX-186 (Curcumin III) δεσμεύονται από τα κύτταρα με παρόμοιο τρόπο, με την AX-127 να υπερέχει. Τέλος, η AX-126 (Curcumin I) απορροφάται λιγότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις.

## ΣΤ.11 Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP, με τη χρήση των τεσσάρων κουρκουμίνων ως φωτοευαίσθητες ουσίες

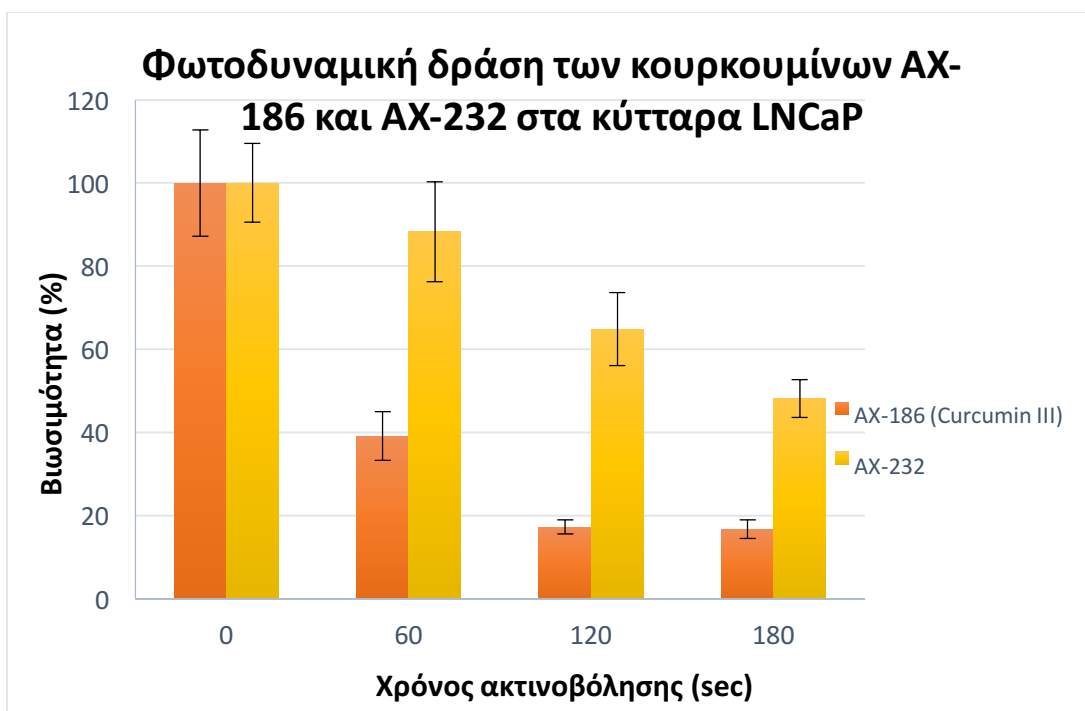
Στην ενότητα αυτή αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα LNCaP με τη μεθοδολογία που έχει νωρίτερα περιγραφεί στο κεφάλαιο Ε.5. Ως φωτοευαίσθητες ουσίες χρησιμοποιούνται οι κουρκουμίνες AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232. Η τιμή της συγκέντρωσης των ουσιών που επιλέγεται είναι τα 3μΜ. Επίσης, εφαρμόζεται ακτινοβολία με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW/cm<sup>2</sup> και για χρονική διάρκεια 60 δευτερολέπτων, 120 δευτερολέπτων και 180 δευτερολέπτων. Επομένως, η ακτινοβολία θα χαρακτηρίζεται από συνολική δόση ενέργειας 360 mJ/cm<sup>2</sup>, 720 mJ/cm<sup>2</sup> και 1080 mJ/cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Η διάταξη ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται είναι αυτή που περιγράφεται στην ενότητα Δ.2.3.

### ΣΤ.11.1 Αποτελέσματα

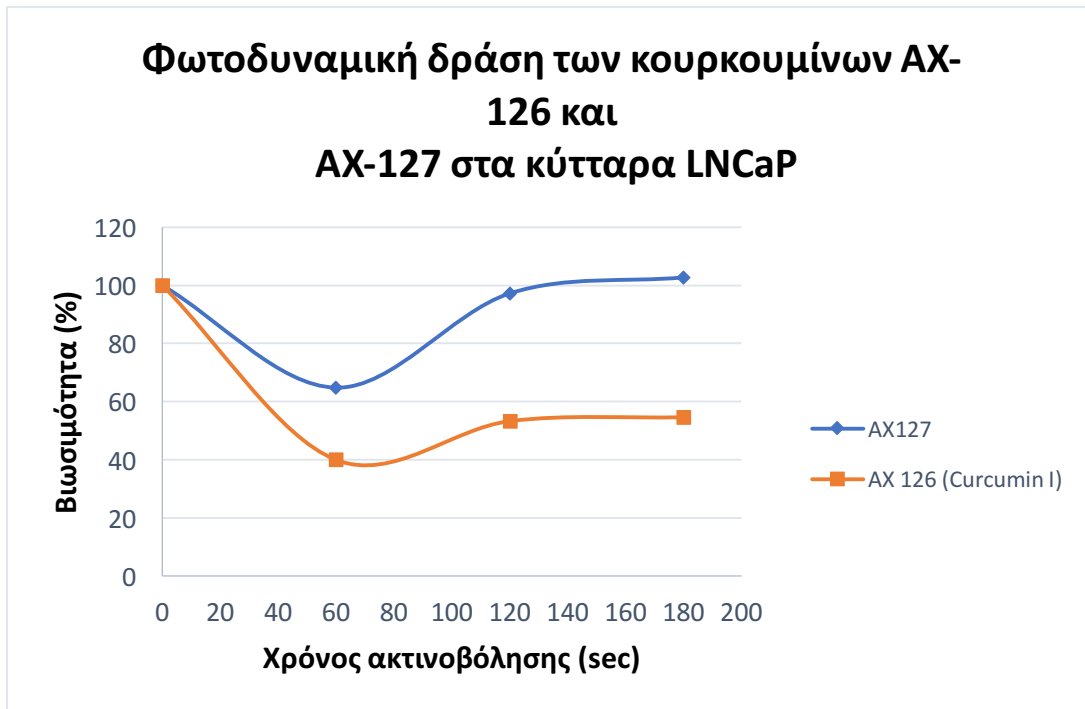
Όπως περιγράφεται στην ενότητα Ε.5 τα κύτταρα της σειράς LNCaP καλλιεργήθηκαν, τοποθετήθηκαν σε τριβλία και επώαστηκαν για μια ώρα έπειτα από εισαγωγή σε αυτά των διαλυμάτων 3μΜ των κουρκουμίνων AX-126, AX-127, AX-186 και AX-232 σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ακτινοβολία τους (παρουσία 300μl PBS) με τις συνολικές δόσεις ενέργειας που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αφέθηκαν να επωαστούν για άλλες 24 ώρες παρουσία των 300μl PBS και 2,2ml νέου πλήρους θρεπτικού μέσου. Η βιωσιμότητά τους μελετήθηκε με τον βιοχημικό έλεγχο μέτρησης βιωσιμότητας MTT (ενότητα Ε.3.1). Παρατίθενται τα διαγράμματα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολίας για τις περιπτώσεις των τεσσάρων κουρκουμίνων (διαγράμματα ΣΤ.31, ΣΤ.32, ΣΤ.33 και ΣΤ.34) . Αυτά, προέκυψαν έπειτα από τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης που είναι μέρος του πρωτόκολλου ελέγχου βιωσιμότητας MTT με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS (ενότητα Δ.2.1). Οι χρόνοι ακτινοβολίας 60s, 120s και 180s αντιστοιχούν σε συνολικές δόσεις ενέργειας 360 mJ/cm<sup>2</sup>, 720 mJ/cm<sup>2</sup> και 1080 mJ/cm<sup>2</sup>.



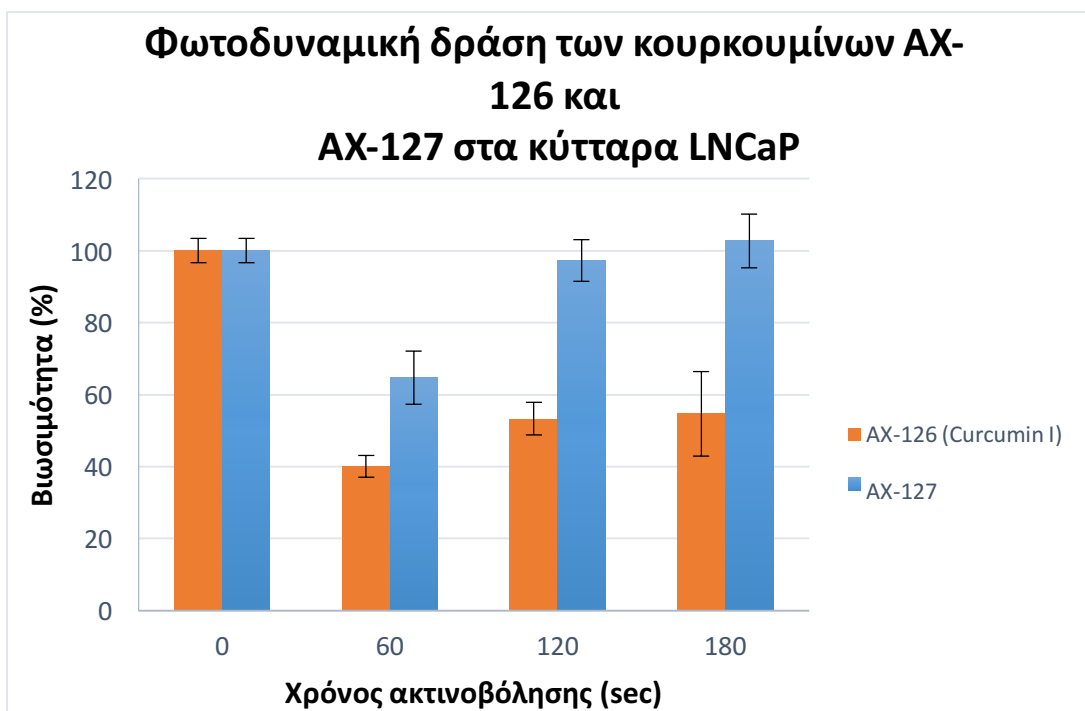
Διάγραμμα ΣΤ. 31: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα  $6 \text{ mW/cm}^2$ , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-186 και AX-232



Διάγραμμα ΣΤ. 32: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα  $6 \text{ mW/cm}^2$ , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-186 και AX-232



Διάγραμμα ΣΤ. 33: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα  $6 \text{ mW/cm}^2$ , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-126 και AX-127



Διάγραμμα ΣΤ. 34: Βιωσιμότητα κυττάρων LNCaP σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης στα  $6 \text{ mW/cm}^2$ , έπειτα από επώαση με τις κουρκουμίνες AX-126 και AX-127

### ΣΤ.11.2 Συμπεράσματα

Αρχικά, ως γίνεται μια παρατήρηση των δύο πρώτων διαγραμμάτων που αναφέρονται στη φωτοδυναμική δράση των κουρκουμίνων AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin).

Όσον αφορά την AX-186 μπορεί να ειπωθεί ότι παρουσιάζει ιδιαίτερα επιθυμητή δράση. Η επώαση με συγκέντρωση 3μΜ της ουσίας προκαλεί σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων LNCaP από καρκίνο του προστάτη. Η ακτινοβολία ενός λεπτού με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW / cm<sup>2</sup> και άρα με ενέργεια 360 mJ/cm<sup>2</sup> προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων της τάξης του 60%. Αυτό αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό ποσοστό μείωσης για μόλις ένα λεπτό χρονικής διάρκειας ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία δύο λεπτών (ενέργεια 720 mJ/cm<sup>2</sup>) έριξε το ποσοστό βιωσιμότητας στο 17,29%, ενώ εκείνη των τριών λεπτών ενέργεια (1080 mJ/cm<sup>2</sup>) οδηγεί σε παρόμοιο ποσοστό με την προηγούμενη. Με λίγα λόγια, στα τρία λεπτά ακτινοβολίας, έπειτα από επώαση των κυττάρων LNCaP με την κουρκουμίνη AX-186 και σε συγκέντρωση 3μΜ, έχει προκληθεί καταστροφή ενός πολύ μεγάλου μέρους του κυτταρικού πληθυσμού που αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 80%. Είναι λοιπόν αδιαμφισβήτητο ότι η συγκεκριμένη ουσία χαρακτηρίζεται από πολύ σημαντική φωτοδυναμική δράση.

Η AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) παρουσιάζει και αυτή αξιοσημείωτη φωτοδυναμική δράση. Έπειτα από επώαση των κυττάρων LNCaP με 3μΜ της ουσίας και ακτινοβολία ενός λεπτού με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW/cm<sup>2</sup> (ενέργεια 360 mJ/cm<sup>2</sup>) προκαλείται μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 12%. Το ποσοστό αυτό δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Παρόλα αυτά παρατηρείται ότι για δύο λεπτά ακτινοβολίας στα 6 mW/cm<sup>2</sup> (ενέργεια 720 mJ/cm<sup>2</sup>) το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ανέρχεται τώρα στο 64,87%. Αυτό σημαίνει ότι για την ακτινοβολία των συνθηκών που προαναφέρθηκαν, προκαλείται μια μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας της τάξης του 35% περίπου. Τέλος, μετά από ακτινοβολία τριών λεπτών (ενέργεια 1080 mJ/cm<sup>2</sup>), προκύπτει ένα ποσοστό βιωσιμότητας 48,2% περίπου. Παρατηρείται λοιπόν ότι ενώ η ακτινοβολία του ενός λεπτού δεν προκαλεί σημαντικό κυτταρικό θάνατο, η ακτινοβολία δύο και τριών λεπτών οδηγεί σε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση ακτινοβολίας με ενέργεια 1080 mJ/cm<sup>2</sup>, έχει προκληθεί θνησιμότητα στο μισό του κυτταρικού πληθυσμού.

Στο σημείο αυτό γεννάται το ερώτημα γιατί η κουρκουμίνη AX-232, παρά τη χαμηλή ικανότητά της στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε σχέση με τις υπόλοιπες, έχει τόσο ικανοποιητική φωτοδυναμική δράση. Όπως έχει εξηγηθεί και νωρίτερα, οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή της τοξικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας, και όσο περισσότερες είναι, τόσο πιο σημαντική είναι και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας έναντι των καρκινικών κυττάρων. Έτσι λοιπόν, θα ήταν επόμενο, η ουσία AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) να μην παρουσίαζε ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τη φωτοδυναμική της δράση. Αυτό που τελικά την κάνει να αποδίδει σε τόσο μεγάλο βαθμό, δεν είναι άλλο από τη δυνατότητά της να απορροφάται από τα καρκινικά κύτταρα σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Ανατρέχοντας στις εικόνες της ενότητας ΣΤ.11 (χωρικός εντοπισμός των κουρκουμίνων στα κύτταρα της σειράς LNCaP), παρατηρείται ότι η AX-232 χαρακτηρίζεται από τον εντονότερο φθορισμό μέσα στα κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις. Βρίσκεται λοιπόν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις υπόλοιπες μέσα στα κύτταρα LNCaP και αυτό

είναι κάτι που της προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς την αποτελεσματικότητά της κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Όσον αφορά τις κουρκουμίνες AX-126 (Curcumin I) και AX-127 μπορεί να ειπωθεί ότι παρατηρείται μια τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Έπειτα από επώαση των κυττάρων LNCaP με 3μM της ουσίας AX-126 (Curcumin I) και ακτινοβολήση ενός λεπτού με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW/cm<sup>2</sup> (ενέργεια 360 mJ/cm<sup>2</sup>) προκαλείται μείωση της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού της τάξης του 60%. Αυτό αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό ποσοστό μείωσης για μόλις ένα λεπτό χρονικής διάρκειας ακτινοβολήσης. Κάτι το οποίο γεννά πολλά ερωτήματα είναι ότι η ακτινοβολήση δύο λεπτών (ενέργεια 720 mJ/cm<sup>2</sup>) ανεβάζει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο 53,33% σε σχέση με το ποσοστό 40,04% που παρατηρήθηκε για ένα λεπτό ακτινοβολήσης. Η ακτινοβολήση των τριών λεπτών (ενέργεια 1080 mJ/cm<sup>2</sup>) οδηγεί στην εμφάνιση ποσοστού βιωσιμότητας 46,46% περίπου. Παρατηρείται δηλαδή ότι η ουσία AX-126 εμφανίζει μιας μορφής διφασική απόκριση ως προς τη φωτοδυναμική της δράση στα κύτταρα της σειράς LNCaP.

Έπειτα από επώαση των κυττάρων LNCaP με 3μM της κουρκουμίνης AX-127 και ακτινοβολήση ενός λεπτού με ρυθμό ροής ισχύος 6 mW/cm<sup>2</sup> (ενέργεια 360 mJ/cm<sup>2</sup>) προκαλείται μείωση της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού της τάξης του 35%. Ενώ και σε αυτή την περίπτωση θα ήταν αναμενόμενο η αύξηση του χρόνου της ακτινοβολήσης να οδηγούσε σε περαιτέρω μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων, τα αποτελέσματα δεν αποδεικνύουν κάτι τέτοιο. Αντίθετα για δύο και τρία λεπτά ακτινοβολήσης τα ποσοστά αυτά ανέρχονται στις τιμές 97,22% και 102,75% περίπου. Ως αποτέλεσμα, ενώ η δόση ακτινοβολίας 360 mJ/cm<sup>2</sup> οδήγησε σε μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, οι δόσεις 720 mJ/cm<sup>2</sup> και 1080 mJ/cm<sup>2</sup> όχι μόνο δεν προκαλούν θνησιμότητα στα καρκινικά κύτταρα, αλλά εντείνουν και τον πολλαπλασιασμό τους. Αξίζει να σημειωθεί, ότι έπειτα από τρία λεπτά ακτινοβολήσης ο πληθυσμός των κυττάρων ανέρχεται στο 100% του, δηλαδή δεν παρατηρείται φωτοδυναμική κυτταροτοξική δράση. Και στην περίπτωση της AX-127 μπορεί να ειπωθεί ότι η ουσία παρουσιάζει διφασική απόκριση ως προς τη φωτοδυναμική της δράση.

Η διφασική απόκριση που έκανε την εμφάνισή της στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις αναφέρεται στο γεγονός ότι ενώ η ακτινοβολήση του ενός λεπτού με 6 mW/cm<sup>2</sup> οδηγεί σε αξιοσημείωτη κυτταρική θνησιμότητα, η ακτινοβολήση στα 2 και 3 λεπτά κατά κάποιον τρόπο ενεργοποιεί την αντίσταση των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Το γεγονός αυτό απαιτεί περαιτέρω έρευνα έτσι ώστε να γίνουν κατανοητοί και ευδιάκριτοι οι λόγοι για τους οποίους παρατηρείται αυτού του είδους η διφασική απόκριση όταν εξετάζουμε τη φωτοδυναμική δράση των κουρκουμίνων AX-126 (Curcumin I) και AX-127 στα καρκινικά κύτταρα της σειράς LNCaP. Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και σε άλλες ερευνητικές μελέτες, κυρίως κατά την εφαρμογή αντιβακτηριακής φωτοδυναμικής θεραπείας<sup>[120], [121]</sup>.



## Κεφάλαιο Ζ: Γενικά Συμπεράσματα

## Z.1 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των τεσσάρων παραγώγων κουρκουμίνης

### Z.1.1 Απορρόφηση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς διαλύτες

Τα πειράματα που διεξήχθησαν ως προς την απορρόφηση των τεσσάρων κουρκουμίνων (AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin)) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έδειξαν ότι η συμπεριφορά των ουσιών ήταν ικανοποιητική. Πιο συγκεκριμένα, και τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης διατηρούν μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος για όλες τις τιμές των συγκεντρώσεων. Επίσης, η μέγιστη τιμή της απορρόφησης μεταβάλλεται σε όλες τις περιπτώσεις γραμμικά σε σχέση με την τιμή της συγκέντρωσης. Οι τρεις πρώτες κουρκουμίνες (AX-126, AX-127, AX-186) παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση στην περιοχή 350nm – 480nm, ενώ η AX-232 στην περιοχή μεταξύ 400nm – 550nm. Σημειώνεται επίσης ότι οι υψηλότερες τιμές απορρόφησης εμφανίζονται στην κουρκουμίνη AX-127 και AX-232, ενώ οι χαμηλότερες στην AX-126.

Η συμπεριφορά μιας ουσίας ως προς την απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας είναι αλληλένδετη με τη χρησιμότητά της κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Μπορεί να ειπωθεί ότι και τα τέσσερα παράγωγα παρουσιάζουν αξιόλογη και ικανοποιητική απόκριση, κάτι που τα καθιστά άξια περαιτέρω έρευνας και δοκιμών όσον αφορά την μελλοντική χρήση τους στη θεραπευτική διαδικασία αυτή. Από την άλλη πλευρά, οι ουσίες παρουσιάζουν έναν σημαντικό περιορισμό. Καμία από τις τέσσερις δεν απορροφά φως στην περιοχή του ερυθρού (600nm – 800nm). Όπως έχει προαναφερθεί, μια φωτοευαίσθητη ουσία θα πρέπει να απορροφά σε αυτή την περιοχή καθώς με αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η καλύτερη αλληλεπίδραση φωτός, δέρματος και ιστών εφόσον το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον οργανισμό παίρνει τη μέγιστη τιμή του. Έτσι λοιπόν, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα παράγωγα της κουρκουμίνης δεν θα παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία των όγκων σε βάθος άλλα θα είναι χρήσιμα περισσότερο για την αντιμετώπιση επιφανειακών παθήσεων και καρκίνων.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων απορρόφησης σε διαφορετικούς διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δύο οργανικοί διαλύτες, το DMSO και η αιθανόλη (EtOH), καθώς και ένας πολικός που είναι το PBS. Τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης διατήρησαν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης τους στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών (DMSO και EtOH) και παρατηρήθηκε μια σχεδόν αμελητέα μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης. Αντίθετα, στην περίπτωση του υδατικού μέσου PBS, τα φάσματα παρουσίασαν μια τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Παρουσιάστηκε μια σημαντική πτώση στις τιμές απορρόφησης. Επίσης, οι κορυφές των διαγραμμάτων μετατοπίστηκαν σε διαφορετικές τιμές μήκους κύματος, με την πιο εμφανή μετατόπιση στην περίπτωση της AX-232. Σε ορισμένες περιπτώσεις (πχ AX-127) υφίσταται και μια δυσκολία διάκρισης της χαρακτηριστικής αυτής κορυφής.

Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται άμεσα με τη χημική δομή των ουσιών όπως επίσης και με την παρατήρηση ότι τα μόρια των παραγώγων της κουρκουμίνης σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικό περιβάλλον, καθώς είναι υδρόφοβα. Αυτό προσθέτει έναν ακόμα πολύ σημαντικό περιορισμό. Η συσσωμάτωση που προκαλείται εμποδίζει σε μεγάλο

βαθμό την κυκλοφορία και την απορρόφηση των ουσιών από τα κύτταρα. Καθίσταται επομένως πολύ σημαντικός ο εγκλεισμός των συγκεκριμένων φωτοευαίσθητοποιητών σε φορείς μεταφοράς, όπως είναι για παράδειγμα τα νανοσωματίδια, σε περίπτωση συστηματικής χορήγησης των ουσιών.

### 2.1.2 Εκπομπή φθορισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Τα πειράματα που διεξήχθησαν ως προς την εκπομπή φθορισμού των τεσσάρων κουρκουμίνων (AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin)) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έδειξαν ότι η συμπεριφορά των ουσιών μας ήταν ικανοποιητική. Πιο συγκεκριμένα, και τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης διατηρούν μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος φθορισμού για όλες τις τιμές των συγκεντρώσεων, όταν η διέγερση ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης της κάθε ουσίας. Επίσης, η μέγιστη τιμή του φθορισμού μεταβάλλεται σε όλες τις περιπτώσεις γραμμικά σε σχέση με την τιμή της συγκέντρωσης. Οι τρεις πρώτες κουρκουμίνες (AX-126, AX-127, AX-186) παρουσιάζουν σημαντική εκπομπή στην περιοχή 460nm – 600nm περίπου, ενώ η AX-232 στην περιοχή μεταξύ 550nm – 690nm περίπου. Μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τις χαμηλότερες τιμές φθορισμού εμφανίζει η ουσία AX-126 ενώ οι υπόλοιπες τρεις παρουσιάζουν κοντινές τιμές με την AX-127 να υπερέχει. Προκύπτει ότι και οι τέσσερις κουρκουμίνες εμφανίζουν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού για κατάλληλη διέγερση και έτσι επιτρέπεται η χρήση τους όχι μόνο κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, αλλά και κατά τη φωτοδυναμική διάγνωση καρκινικών όγκων, όπου ο υψηλός φθορισμός καθίσταται απαραίτητη προϋπόθεση.

### 2.1.3 Φωτολεύκανση με τη μέθοδο της απορρόφησης και του φθορισμού

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων γύρω από τη φωτολεύκανση με τη μέθοδο της απορρόφησης για τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης παρατηρήθηκε ότι οι AX-126, AX-127 και AX-186 παρουσίασαν μια εκθετική, ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης, πτώση. Μέγιστη φωτολεύκανση απορρόφησης παρουσιάστηκε στην περίπτωση της AX-127. Η μικρότερη φωτολεύκανση απορρόφησης εμφανίστηκε στην περίπτωση της AX-232, η οποία διατήρησε υψηλές τιμές απορρόφησης ακόμη και έπειτα από 30 λεπτά ακτινοβολήσης. Η πτώση της προσεγγίστηκε γραμμικά σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων γύρω από τη φωτολεύκανση με τη μέθοδο του φθορισμού για τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης παρατηρήθηκε ότι οι AX-126, AX-127 και AX-186 παρουσίασαν μια εκθετική, ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης, πτώση. Μέγιστη φωτολεύκανση φθορισμού παρουσιάστηκε στην περίπτωση της AX-186. Η μικρότερη φωτολεύκανση φθορισμού εμφανίστηκε στην περίπτωση της AX-232, η οποία διατήρησε υψηλές τιμές εκπομπής φθορισμού ακόμη και έπειτα από 30 λεπτά ακτινοβολήσης. Η πτώση της προσεγγίστηκε γραμμικά σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολήσης.

Η συμπεριφορά της εκάστοτε φωτοευαίσθητης ουσίας ως προς τη φωτολεύκανση είναι στενά συνδεδεμένη με τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Γενικά, μπορεί να ειπωθεί ότι είναι σε μεγάλο βαθμό επιθυμητό μια ουσία να διατηρεί σταθερότητα ως προς την ικανότητα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού κατά την ακτινοβολήσή της με φως. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται και η αποτελεσματικότερη εφαρμογή της

φωτοδυναμικής θεραπείας. Παρόλα αυτά είναι επίσης σημαντικό η φωτοφυσική δράση της φωτοευαίσθητης ουσίας να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό διότι δεν είναι σε κανένα βαθμό επιθυμητή η μετέπειτα διέγερση και παρατεταμένη φωτοευαισθησία του οργανισμού του εκάστοτε ασθενή. Επομένως, μια ιδανική φωτοευαίσθητη ουσία θα πρέπει να μπορεί να διατηρεί τη δράση της στα πρώτα λεπτά της ακτινοβολήσης (εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας), ενώ στη συνέχεια να αρχίζει να την μειώνει. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, μπορεί να παρατηρηθεί ότι και οι τέσσερις κουρκουμίνες εμφανίζουν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι AX-126, AX-127 και AX-186 παρότι παρουσιάζουν εκθετική πτώση της απορρόφησης και του φθορισμού τους σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης, στα πρώτα λεπτά της τελευταίας, εμφανίζουν αρκετά υψηλές τιμές. Η φωτοδυναμική τους δράση μειώνεται στη συνέχεια και έτσι μπορούν να αποφευχθούν τυχόν επόμενες διεγέρσεις. Η AX-232 παρουσιάζει μια έντονη αντίσταση στη φωτολεύκανση, η οποία είναι περισσότερο εμφανής στα πειράματα απορρόφησης. Διατηρεί υψηλές τιμές ακόμη και έπειτα από 30 λεπτά ακτινοβολήσης. Μπορεί να ειπωθεί ότι φαίνεται να έχει πολύ ισχυρή φωτοδυναμική δράση αλλά η μικρή μείωσή της με την πάροδο του χρόνου της ακτινοβολήσης καθιστά την ουσία επίφοβη ως προς ζητήματα παρατεταμένης φωτοευαισθησίας ή μη επιθυμητής μετέπειτα από εφαρμογή της θεραπείας διέγερση.

#### 2.1.4 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών

Έπειτα από τη μελέτη γύρω από την ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών για τα τέσσερα παράγωγα κουρκουμίνης μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Η υψηλότερη παραγωγή εμφανίζεται στην περίπτωση των AX-127 και AX-186. Η πτώση της απορρόφησης στα 340nm που είναι ενδεικτική της παραγωγής του  $\text{NAD}^+$  και άρα της παραγωγής ελευθέρων ριζών προσεγγίζεται λογαριθμικά στις δύο αυτές περιπτώσεις. Είναι ραγδαία στο διάστημα 1-10 λεπτών ακτινοβολήσης ενώ στη συνέχεια συνεχίζεται με περισσότερο αργό ρυθμό. Η AX-126 παράγει λιγότερες ελεύθερες ρίζες και η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm προσεγγίζεται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης. Αντίθετα, η AX-232 φαίνεται να χαρακτηρίζεται από τη χαμηλότερη ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η πτώση της κορυφής στα 340nm είναι σχεδόν αμελητέα με την πάροδο του χρόνου της ακτινοβολήσης ακόμα και όταν αυξάνεται η δόση στα 10,72 mW/cm<sup>2</sup>.

Όπως έχει αναφερθεί, η επαγωγή κυτταροτοξικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι αλληλένδετη με την ικανότητα του εκάστοτε φωτοευαισθητοποιητή να παράγει μονήρες οξυγόνο και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου έπειτα από τη διέγερσή του με φωτεινή ακτινοβολία. Έτσι λοιπόν, όσο περισσότερες ελεύθερες ρίζες παράγει μια ουσία, τόσο πιο δραστική είναι η φωτοδυναμική δράση. Ως αποτέλεσμα, οι κουρκουμίνες AX-127 και AX-186 αναμένεται να παρουσιάσουν εντονότερη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων LNCaP κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

#### 2.1.5 Τοξικότητα των παραγώγων της κουρκουμίνης στα κύτταρα της σειράς LNCaP απουσία φωτός

Οι τρεις παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η φωτοδυναμική θεραπεία είναι η φωτοευαίσθητη ουσία, η φωτεινή ακτινοβολία αλλά και το οξυγόνο. Κανένας από τους παράγοντες αυτούς δεν είναι από μόνος του τοξικός και η τοξικότητα της θεραπευτικής

διαδικασίας οφείλεται στο συνδυασμό των τριών. Για το λόγο αυτό, πριν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας καθίσταται αναγκαίος ο έλεγχος αν οι φωτοευαίσθητες ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν προκαλούν κάποιας μορφής τοξικότητα στα κύτταρα απουσία του φωτός. Αν η προϋπόθεση αυτή δεν ικανοποιείται, υπάρχει κίνδυνος οι ουσίες να βλάψουν τους υγιείς ιστούς και όργανα, κάτι το οποίο δεν είναι σε καμία περίπτωση επιθυμητό.

Έπειτα από τα πειράματα που διεξήχθησαν αποδείχθηκε ότι κανένα από τα διαθέσιμα παράγωγα της κουρκουμίνης δεν προκαλεί αξιοσημείωτη επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP, όταν βρίσκεται μέσα σε αυτά σε συγκέντρωσή έως τα 3μM. Από την τιμή αυτή και έπειτα παρατηρείται μια λίγο μεγαλύτερη πτώση στη βιωσιμότητα των κυττάρων η οποία είναι περισσότερο ευδιάκριτη στην περίπτωση της AX-127. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι μπορεί με άνεση να ακολουθήσει η εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας με τιμή συγκέντρωσης ουσίας 3μM.

### 2.1.6 Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP

Ο δεύτερος παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται η φωτοδυναμική θεραπεία είναι η φωτεινή ακτινοβολία. Εκείνη, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, δεν πρέπει να είναι από μόνη της τοξική. Για το λόγο αυτό, καθίσταται πολύ σημαντική η μελέτη γύρω από το πότε η ισχύς ακτινοβολίας αρχίζει να επιδρά στη βιωσιμότητα των κυττάρων LNCaP.

Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές τιμές ισχύος φωτός διέγερσης. Αυτές είναι οι εξής: 3 mW/cm<sup>2</sup>, 6 mW/cm<sup>2</sup> και 9 mW/cm<sup>2</sup>. Προέκυψε ότι τα 3 mW/cm<sup>2</sup> όχι μόνο δεν προκάλεσαν μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, αλλά αύξησή του. Κάτι τέτοιο δεν είναι παράλογο, καθώς μικρές δόσεις φωτός έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για ακτινοβολία 6 mW/cm<sup>2</sup> η βιωσιμότητα των κυττάρων βρίσκεται στο 93% περίπου επομένως η επίδραση είναι ελάχιστη. Στα 9 mW/cm<sup>2</sup> η βιωσιμότητα πέφτει στο 75% περίπου και άρα η επαγόμενη από το φως επίδραση στον κυτταρικό πληθυσμό είναι αισθητά μεγαλύτερη. Επιλέγεται λοιπόν να εφαρμοστεί η φωτοδυναμική θεραπεία με φωτεινή ακτινοβολία 6 mW/cm<sup>2</sup>.

### 2.1.7 Χρήση των τεσσάρων παραγώγων της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας

Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες γύρω από τη φωτοδυναμική θεραπεία με τη χρήση των κουρκουμίνων AX-126 (Curcumin I), AX-127, AX-186 (Curcumin III) και AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin) ως φωτοευαίσθητοποιητές. Η συγκέντρωση επώασης των ουσιών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 3μM. Η ισχύς ακτινοβολίας επιλέχθηκε στα 6 mW/cm<sup>2</sup> και οι χρόνοι ακτινοβολίας ήταν 60, 120 και 180 sec. Επομένως, εφαρμόστηκαν συνολικές δόσεις ενέργειας 360 mJ/cm<sup>2</sup>, 720 mJ/cm<sup>2</sup> και 1080 mJ/cm<sup>2</sup>. Ως προς τα αποτελέσματα τώρα, την καλύτερη απόκριση παρουσίασε η κουρκουμίνη AX-186 (Curcumin III). Αξίζει να σημειωθεί ότι για χρόνο ακτινοβολίας μόλις ενός λεπτού, η κυτταρική βιωσιμότητα έχει πέσει λίγο πιο πάνω από το 40%. Με λίγα λόγια, έχει θανατωθεί ένα πολύ μεγάλο μέρος του πληθυσμού (της τάξης του 60%). Για δύο λεπτά ακτινοβολίας το ποσοστό βιωσιμότητας ανέρχεται τώρα στο 17,3 % περίπου. Πολύ ικανοποιητική φωτοδυναμική δράση εμφανίζει επίσης και η κουρκουμίνη AX-232 (di-NCH<sub>3</sub> curcumin). Καταφέρνει, έπειτα από

ακτινοβολήση με συνολική δόση ενέργειας  $1080 \text{ mJ/cm}^2$ , να ρίξει το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων LNCaP στο μισό (γύρω στο 48%). Παρότι λοιπόν η AX-232 δεν έχει ιδιαίτερα σημαντική παραγωγή ελευθέρων ριζών, εμφανίζει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα κατά τη χρήση της στη φωτοδυναμική θεραπεία και αυτό οφείλεται στην ικανότητα της να βρίσκεται απορροφημένη μέσα στα καρκινικά κύτταρα σε πολύ μεγάλο ποσοστό έπειτα από μόλις μια ώρα επώασης.

Όσον αφορά τώρα τις κουρκουμίνες AX-126 (Curcumin I) και AX-127 τα αποτελέσματα είναι τελείως διαφορετικά. Τα διαγράμματα βιωσιμότητας κυττάρων – χρόνου ακτινοβολήσης παρουσιάζουν και για τις δύο ουσίες μιας μορφής διφασική απόκριση. Για την AX-127 ο χρόνος ακτινοβολήσης ενός λεπτού ( $360 \text{ mJ/cm}^2$ ) ρίχνει τη βιωσιμότητα στο 65%, ενώ στα τρία λεπτά ( $1080 \text{ mJ/cm}^2$ ) αυτή αγγίζει και πάλι το 100%. Για την AX-126 ο χρόνος ακτινοβολήσης ενός λεπτού ρίχνει τη βιωσιμότητα στο 40%, στα δύο λεπτά ( $720 \text{ mJ/cm}^2$ ) το ποσοστό βρίσκεται στο 53% περίπου, ενώ στα τρία λεπτά στο 46,5% περίπου. Η διφασική αυτή απόκριση γεννά πολλά ερωτήματα ως προς τις αιτίες εμφάνισής της και προκαλεί αμφιβολίες ως προς τη χρησιμότητα των δύο ουσιών κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Περαιτέρω μελέτες καθίστανται απαραίτητες και αυτό διότι είναι αδήριτης σημασίας να διερευνηθεί ο κατάλληλος, ακριβής συνδυασμός συγκέντρωσης των παραγώγων της κουρκουμίνης και δόσης ακτινοβολίας, έτσι ώστε η φωτοδυναμική θεραπεία με τη χρήση των δύο ουσιών να μεγιστοποιεί τη μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να είναι βλαβερή για τους υπόλοιπους υγιείς ιστούς.

### 2.1.8 Χωρικός εντοπισμός των παραγώγων της κουρκουμίνης στα κύτταρα LNCaP

Έπειτα από τη διεξαγωγή των πειραμάτων γύρω από το χωρικό εντοπισμό των τεσσάρων παραγώγων της κουρκουμίνης στα κύτταρα της σειράς LNCaP και τη λήψη των εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού μπορούμε να αποφανθούμε τα εξής: Απ' ότι φαίνεται καμία από τις ουσίες δεν έχει προκαλέσει επιρροή στη δομή των κυττάρων. Επίσης, δεν παρατηρείται συσσώρευση στον πυρήνα αλλά στην περιοχή γύρω από αυτόν. Οι εικόνες δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα οι ουσίες μας να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, κάτι το οποίο, όπως έχει ειπωθεί στην ενότητα Ε.6, είναι πολύ βοηθητικό για τη μετέπειτα εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Παρόλα αυτά για να είμαστε απόλυτα σίγουροι για το συμπέρασμα αυτό, θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες. Τέλος, όσον αφορά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ουσιών, μπορούμε να πούμε ότι η AX-126 παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή, ενώ η AX-232 την υψηλότερη. Οι AX-127 και AX-186 παρουσιάζουν πολύ ικανοποιητική ένταση φθορισμού, με την AX-127 να υπερέχει.

## Z.2 Συζήτηση και προοπτικές

Η παρούσα εργασία βοηθά στη εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων όσον αφορά την ενδεχόμενη χρήση των τεσσάρων παραγώγων της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας ενάντια του καρκίνου του προστάτη. Συνοψίζοντας, μπορούν να ειπωθούν τα εξής:

- Παρατηρείται επιλεκτική ενεργοποίηση των ουσιών με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος.
- Τα φάσματα απορρόφησής τους διατηρούν τη χαρακτηριστική τους μορφή και όλες οι κουρκουμίνες απορροφούν σημαντικά σε μήκη κύματος του ορατού φάσματος.
- Η εκπομπή φθορισμού είναι αξιοσημείωτη και για τα τέσσερα παράγωγα, κάτι το οποίο είναι πολύ βοηθητικό όχι μόνο για τη φωτοδυναμική θεραπεία, αλλά και για τη φωτοδυναμική διάγνωση.
- Οι τρεις κουρκουμίνες (AX-126, AX-127, AX-186) παρουσιάζουν εκθετική πτώση της φωτολεύκανσης ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης, διατηρώντας αρκετά υψηλές τιμές στα πρώτα λεπτά της τελευταίας. Η AX-232 παρουσιάζει μια έντονη αντοχή στη φωτολεύκανση και έτσι διατηρεί υψηλές τιμές απορρόφησης και φθορισμού ακόμα και μετά από ακτινοβολήση πολλών λεπτών.
- Με εξαίρεση την AX-232, όλες οι άλλες κουρκουμίνες παράγουν επαρκή ποσότητα ελευθέρων ριζών, η ύπαρξη των οποίων είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή κυτταροτοξικότητας της θεραπείας. Η AX-232 παρότι δεν φαίνεται να παράγει μεγάλο αριθμό δραστικών μορφών οξυγόνου, παρουσιάζει μια πολλά υποσχόμενη φωτοδυναμική δράση στα κύτταρα LNCaP, λόγω της ικανότητας της να απορροφάται σε μεγάλο ποσοστό από τα κύτταρα αυτά.
- Και τα τέσσερα παράγωγα της κουρκουμίνης παρουσιάζουν ελάχιστη επαγωγή τοξικότητας με απουσία του φωτός για τιμή συγκέντρωσης 3μM στα κύτταρα.
- Καμία από τις κουρκουμίνες που είναι διαθέσιμες δεν συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων LNCaP. Επομένως, πιθανές αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό και ενδεχόμενες μεταλλάξεις ή νέα καρκινογένεση δεν πρόκειται να συμβούν.
- Η φωτοδυναμική δράση των AX-186 και AX-232 μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά αποτελέσματα. Αναφέρεται ότι η πρώτη κατάφερε να ρίξει το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων στο 17% περίπου.

Συνοψίζοντας, τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι κουρκουμίνες όσον αφορά τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι ποικίλα. Παρ' όλους τους περιορισμούς που προκύπτουν είναι εμφανές ότι αξίζει να διεξαχθούν περαιτέρω ερευνητικές μελέτες και πειράματα, καθώς είναι πολύ πιθανόν οι ουσίες αυτές να διαδραματίσουν αξιοσημείωτο ρόλο στον αγώνα για την αντιμετώπιση της μάστιγας του καρκίνου.

Πιο συγκεκριμένα, υψίστης σημασίας μελλοντικές προοπτικές είναι:

- Η μελέτη γύρω από την επιλεκτικότητα συσσώρευσης των συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης στα καρκινικά κακοήθη κύτταρα σε σχέση με τους γειτονικούς υγιείς ιστούς.
- Η έρευνα γύρω από τη φαρμακοκινητική αποβολή των ουσιών από τον οργανισμό, καθώς η παρατεταμένη φωτοευαισθησία είναι ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Η διερεύνηση των δυνατοτήτων χρήσης των παραγώγων κουρκουμίνης κατά τη φωτοδυναμική διάγνωση, καθώς τα αποτελέσματα από τις φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού τους, ήταν πολύ ικανοποιητικά.
- Η μελέτη πάνω σε πειραματόζωα με στόχο τη βελτιστοποίηση των επιμέρους παραμέτρων της φωτοδυναμικής θεραπείας, με τη χρήση των παραγώγων κουρκουμίνης στη θέση των φωτοευαίσθητων ουσιών, σε ζωντανούς οργανισμούς.
- Ο πιθανός εγκλεισμός των παραγώγων σε φορείς μεταφοράς και η διερεύνηση των προοπτικών που θα προκύψουν μέσω αυτού.



## Βιβλιογραφία

---

- [1] Κουτσονικολή Αικατερίνη. Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων παραγώγων της κουρκουμίνης για ενδεχόμενη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.
- [2] Daniell, M. D. and Hill, J. S. (1991), A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 61: 340–348. doi:10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x
- [3] Ron R. Allison, Claudio H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 7, Issue 2, June 2010, Pages 61-75, ISSN 1572-1000, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157210001000027X>)
- [4] D Kessel, Photodynamic therapy: from the beginning, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 3-7, ISSN 1572-1000, [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1).  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100004000031>)
- [5] Anna Oniszczyk, Karolina A. Wojtunik-Kulesza, Tomasz Oniszczyk, Kamila Kasprzak, The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 83, October 2016, Pages 912-929, ISSN 0753-3322, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216305595>)
- [6] Brown SB, Brown EA, Walker I. Review the present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment photodynamic therapy. *Lancet Oncol*. 2004;5:497–508. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- [7] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... Golab, J. (2011). PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>
- [8] [http://photonitec.org/Tech\\_PDT.html](http://photonitec.org/Tech_PDT.html)
- [9] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2004;1(4):279-293. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- [10] Colin Hopper, Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer, *The Lancet Oncology*, Volume 1, Issue 4, December 2000, Pages 212-219, ISSN 1470-2045, [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00166-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00166-2).  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204500001662>)

---

[11] Μετρήσεις και έλεγχοι στην Βιοϊατρική τεχνολογία, Εργαστηριακός Οδηγός 7<sup>ου</sup> εξαμήνου, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

[12] Wesley M. Sharman, Cynthia M. Allen, Johan E. van Lier, Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, Volume 4, Issue 11, 1 November 1999, Pages 507-517, ISSN 1359-6446, [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9).

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644699014129>)

[13] Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J. et al. *Lasers Med Sci* (2009) 24: 259. doi:10.1007/s10103-008-0539-1

[14] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 39, Issue 1, 1997, Pages 1-18, ISSN 1011-1344, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07428-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07428-3).

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134496074283>)

[15] Foote, C. S. (1991), DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION. *Photochemistry and Photobiology*, 54: 659. doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x

[16] Carlo M. Bergamini, Stefania Gambetti, Alessia Dondi and Carlo Cervellati, Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage, *Current Pharmaceutical Design*, volume 10, issue 14, pages 1611-1626, year 2004, issn 1381-6128/1873-4286, doi 10.2174/1381612043384664, (<http://www.eurekaselect.com/node/62681/article>) ,oxygen reactive oxygen species oxygen derived radicals radical scavengers physiology oxidative damage alterations in cell structures

[17] Maria C DeRosa, Robert J Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, Volumes 233–234, 1 November 2002, Pages 351-371, ISSN 0010-8545, [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854502000346>)

[18] S.M. Banerjee, A.J. MacRobert, C.A. Mosse, B. Periera, S.G. Bown, M.R.S. Keshtgar, Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer, *The Breast*, Volume 31, February 2017, Pages 105-113, ISSN 0960-9776, <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.016>.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977616301771>)

[19] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2005;2(1):1-23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.

[20] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*. 2011;3(2):2516-2539. doi:10.3390/cancers3022516.

---

[21] Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:781–828. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.781.

[22] <http://docplayer.gr/29632218-Z-e-1-vasikes-leitoyrgies-tis-apoptosis.html>

[23] Oleinick N. L., Morris R. L. & Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 1–12 (2002).

[24] <http://omlc.org/pdt/articles/PDTadvantages.html>

[25] Calixto, G.M.F.; Bernegossi, J.; de Freitas, L.M.; Fontana, C.R.; Chorilli, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* 2016, 21, 342.

[26] Lei-Lei Rui, Hong-Liang Cao, Yu-Dong Xue, Li-Chao Liu, Lei Xu, Yun Gao, Wei-An Zhang, Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy, *Chinese Chemical Letters*, Volume 27, Issue 8, August 2016, Pages 1412-1420, ISSN 1001-8417, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.07.011>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841716302327>)

[27] Hong EJ, Choi DG, Shim MS. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2016;6(4):297-307. doi:10.1016/j.apsb.2016.01.007.

[28] R.K. Pandey and C.K. Herman, "SHEDDING SOME LIGHT ON TUMORS", *Chemistry and Industry*, (18), 1998, pp. 739-743

[29] Ethan D Sternberg, David Dolphin, Christian Brückner, Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron*, Volume 54, Issue 17, 1998, Pages 4151-4202, ISSN 0040-4020, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00015-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5).  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402098000155>)

[30] Ron R Allison, Gordon H Downie, Rosa Cuenca, Xin-Hua Hu, Carter JH Childs, Claudio H Sibata, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 27-42, ISSN 1572-1000, [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9).  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100004000079>)

[31] Poste, G., & Kirsh, R. (1983). Site-specific (targeted) drug delivery in cancer therapy. *Bio/Technology*, 1(10), 869-878.

[32] Klyashchitsky BA, Nechaeva IS, Ponomaryov GV. Approaches to targeted photodynamic tumor therapy. *J Controlled Release.* 1994;29:1–16.

---

[33] Yvette Niamien Konan, Robert Gurny, Eric Allémann, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 66, Issue 2, March 2002, Pages 89-106, ISSN 1011-1344, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00267-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00267-6).

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401002676>)

[34] Valeur, B. (2002). *Molecular fluorescence: Principles and applications*. Weinheim: Wiley-VCH.

[35] Harubumi Kato, Masahiko Harada, Shu Ichinose, Jitsuo Usuda, Takaaki Tsuchida, Tetsuya Okunaka, Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 1, Issue 1, May 2004, Pages 49-55, ISSN 1572-1000, [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00008-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00008-0). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100004000080>)

[36] Richard L. Lipson, M.D., Edward J. Baldes, Ph.D., Arthur M. Olsen, M.D.; The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. *J Natl Cancer Inst* 1961; 26 (1): 1-11. doi: 10.1093/jnci/26.1.1

[37] Dougherty, T. J. (1987), STUDIES ON THE STRUCTURE OF PORPHYRINS CONTAINED IN PHOTOFRIN® II. *Photochemistry and Photobiology*, 46: 569–573. doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04815.x

[38] Kessel, D. and Thompson, P. (1987), PURIFICATION and ANALYSIS OF HEMATOPORPHYRIN and HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVE BY GEL EXCLUSION and REVERSE-PHASE CHROMATOGRAPHY\*. *Photochemistry and Photobiology*, 46: 1023–1025. doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04888.x

[39] Kessel, D. (1989), PROBING THE STRUCTURE OF HPD BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Photochemistry and Photobiology*, 50: 345–350. doi:10.1111/j.1751-1097.1989.tb04168.x

[40] Kessel D. On the purity and definition of oligomeric HPD formulations. *J Photochem Photobiol B*. 1989;3:637–8.

[41] Bernstein, ZP, Wilson, BD, Oseroff, AR et al. Photofrin photodynamic therapy for treatment of AIDS-related cutaneous Kaposi's sarcoma. *Aids*. 1999; **13**: 1697–1704

[42] Wöhrle, D., Hirth, A., Bogdahn-Rai, T. et al. *Russ Chem Bull* (1998) 47: 807. doi:10.1007/BF02498146

[43] Zheng, Xiang. "A Comparative Study Of Photosensitizers With And Without Carbohydrate Moieties". Ph.D. State University of New York at Buffalo, 2006. Print.

---

[44] Elena Reddi, Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 37, Issue 3, 1997, Pages 189-195, ISSN 1011-1344, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07404-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07404-0). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134496074040>)

[45] Oseroff, A. R., Ara, G., Ohuoha, D., Aprille, J., Bommer, J. C., Yarmush, M. L., Foley, J. and Cincotta, L. (1987), STRATEGIES FOR SELECTIVE CANCER PHOTOCHEMOTHERAPY: ANTIBODY-TARGETED and SELECTIVE CARCINOMA CELL PHOTOLYSIS\*. *Photochemistry and Photobiology*, 46: 83–96. doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04740.x

[46] Yvette Niamien Konan, Robert Gurny, Eric Allémann, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 66, Issue 2, March 2002, Pages 89-106, ISSN 1011-1344, [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00267-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00267-6). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401002676>)

[47] Ντούραϊ Στέλα. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων διαλυτοποίησης και άλλων εκδοχών στις κινητικές απελευθέρωσης των λιποσωμικών φαρμάκων όταν τα λιποσώματα διασπείρονται σε υδρογέλες. Επίδραση εκδοχών μορφοποιήσεως στη σταθερότητα των λιποσωμάτων. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2006.

[48] Jean-Christophe Leroux, Eric Allémann, Fanny De Jaeghere, Eric Doelker, Robert Gurny, Biodegradable nanoparticles — From sustained release formulations to improved site specific drug delivery, *Journal of Controlled Release*, Volume 39, Issue 2, 1996, Pages 339-350, ISSN 0168-3659, [http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00164-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(95)00164-6). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168365995001646>)

[49] Gupta, P. K. (1990), Drug targeting in cancer chemotherapy: A clinical perspective. *J. Pharm. Sci.*, 79: 949–962. doi:10.1002/jps.2600791102

[50] G. Jori, M. Beltramini, E. Reddi, B. Salvato, A. Pagnan, L. Ziron, L. Tomio, T. Tsanov, Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo, *Cancer Letters*, Volume 24, Issue 3, 1984, Pages 291-297, ISSN 0304-3835, [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(84\)90025-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(84)90025-9). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304383584900259>)

[51] D. Kessel, Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization, *Cancer Letters*, Volume 33, Issue 2, 1986, Pages 183-188, ISSN 0304-3835, [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(86\)90023-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(86)90023-6). (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304383586900236>)

[52] Allison BA, Pritchard PH, Levy JG. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *British Journal of Cancer*. 1994;69(5):833-839.

---

[53] Kosmas, C., Linardou, H., Epenetos, A. A. (1993), Review: advances in monoclonal antibody tumour targeting. *J. Drug Target.* , 1 , 81-91.

[54] Dev Kumar Chatterjee, Li Shan Fong, Yong Zhang, Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 60, Issue 15, 14 December 2008, Pages 1627-1637, ISSN 0169-409X,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X08002263>)

[55] Samia AC, Chen X, Burda C. Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy. *J Am Chem Soc.* 2003;125:15736–15737.

[56] Chen W, Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006;6:1159–1166. doi: 10.1166/jnn.2006.327.

[57] Zhang P, Steelant W, Kumar M, Scholfield M. Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation. *Journal of the American Chemical Society.* 2007;129(15):4526-4527. doi:10.1021/ja0700707.

[58] Ron R. Allison, PDT frontiers, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Volume 6, Issue 2, June 2009, Pages 135-136, ISSN 1572-1000,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.07.008>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100009000842>)

[59] Chatterjee DK, Yong Z. Upconverting nanoparticles as nanotransducers for photodynamic therapy in cancer cells. *Nanomedicine.* 2008;3(1):73–82.

[60] Lee W-H, Loo C-Y, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology.* 2013;11(4):338-378. doi:10.2174/1570159X11311040002 .

[61] Pramod K. Sahu, Design, structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives/analogues, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 121, 4 October 2016, Pages 510-516, ISSN 0223-5234,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.037>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416304354>)

[62] Bagchi, A. (2012). Extraction of Curcumin. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(3), 01–16. doi:10.9790/2402-0130116

[63] Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan Rao, L. & Sakariah, K.K., 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends Food. Sci. Technol.* 16, 533-548.

---

[64] Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2012;39(3):283-299. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x.

[65] Aggarwal, B.B.; Bhatt, I.D.; Ichikawa, H.; Ahn, K.S.; Sethi, G.; Sandur, S.K.; Natarajan, C.; Seeram, N.; Shishodia, S. Curcumin—Biological and medicinal properties. In *Turmeric the Genus Curcuma*; Ravindran, P.N., Babu, K.N., Sivaraman, K., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2007; pp. 297–368.

[66] Tuorkey MJ. Curcumin a potent cancer preventive agent: Mechanisms of cancer cell killing. *Interventional Medicine & Applied Science*. 2014;6(4):139-146. doi:10.1556/IMAS.6.2014.4.1.

[67] Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2011;10:12. doi:10.1186/1476-4598-10-12.

[68] Annelise Duvoix, Romain Blasius, Sylvie Delhalle, Michaël Schnekenburger, Franck Morceau, Estelle Henry, Mario Dicato, Marc Diederich, Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, *Cancer Letters*, Volume 223, Issue 2, 8 June 2005, Pages 181-190, ISSN 0304-3835, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.041>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383504007232>)

[69] Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutrition and cancer*. 2010 Sep 23;62(7):919–30. doi: 10.1080/01635581.2010.509835. pmid:20924967

[70] Teiten, M., Gaascht, F., Cronauer, M., Henry, E., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Anti-proliferative potential of curcumin in androgen-dependent prostate cancer cells occurs through modulation of the Wingless signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 38, 603-611. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2011.905>

[71] Prakobwong S, Gupta SC, Kim JH, et al. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis*. 2011;32(9):1372-1380. doi:10.1093/carcin/bgr032.

[72] Bar-Sela G, Epelbaum R, Schaffer M. Curcumin as an anticancer agent: Review of the gap between basic and clinical applications [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(3):190-197.

[73] Minnie Malik, Mirian Mendoza, Mark Payson, William H. Catherino, Curcumin, a nutritional supplement with antineoplastic activity, enhances leiomyoma cell apoptosis and decreases fibronectin expression, *Fertility and Sterility*, Volume 91, Issue 5, Supplement, May 2009, Pages 2177-2184, ISSN 0015-0282, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.045>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028208007127>)

- 
- [74] López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(Suppl 1):S103–S127.
- [75] Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C., Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies, *Anticancer Res*. 2003, 23, 363 – 398.
- [76] Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*. 2001;21(4B):2895–2900.
- [77] Douglas Hanahan, Robert A Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, Volume 100, Issue 1, 7 January 2000, Pages 57-70, ISSN 0092-8674, [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- [78] Gaorav P. Gupta, Joan Massagué, Cancer Metastasis: Building a Framework, *Cell*, Volume 127, Issue 4, 17 November 2006, Pages 679-695, ISSN 0092-8674, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406014140>)
- [79] Syng-ai C, Kumari AL, Khar A, Syng-ai C, Kumari AL. Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2. *Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2*. 2004;3: 1101–1108.
- [80] Choudhuri, T., Pal, S., Das, T., Sa, G., Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 Phase of cell cycle in a p53-dependent manner, *J. Biol. Chem*. 2005, 280, 20059 – 20068.
- [81] Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate*. 2001;47(4):293–303. doi: 10.1002/pros.1074.
- [82] Hong JH, Ahn KS, Bae E, Jeon SS, Choi HY. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9:147–152. doi: 10.1038/sj.pcan.4500856.
- [83] Li M, Zhang Z, Hill DL, Wang H, Zhang R. Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway. *Cancer Res*. 2007;67:1988–1996. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3066.



- 
- [84] Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2015;6(Suppl 1):S102-S109. doi:10.4103/0976-9668.166100.
- [85] Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25:487–504.
- [86] Araújo NC, Fontana CR, Gerbi ME, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg*. 2012;30:96–101.
- [87] Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen H. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. Pharmazie*. 2010;65(8):600–606.
- [88] Hanne Hjorth Tønnesen, Henk de Vries, Jan Karlsen, Gerard Beijersbergen Van Henegouwen, *Studies on Curcumin and Curcuminoids IX: Investigation of the Photobiological Activity of Curcumin Using Bacterial Indicator Systems*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 76, Issue 5, 1987, Pages 371-373, ISSN 0022-3549, <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600760506>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915474131>)
- [89] K. Indira Priyadarsini, Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, Volume 10, Issue 2, June 2009, Pages 81-95, ISSN 1389-5567, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556709000331>)
- [90] Bruzell E. M., Morisbak E., Tønnesen H. H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2005;4(7):523–530. doi: 10.1039/b503397g.
- [91] Koon H, Leung AW, Yue KK, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cell. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25(1–2):205–215.
- [92] Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*. 1989;151(2):183–5.
- [93] Chignell CF, Bilskj P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol*. 1994;59(3):295–302.
- [94] [http://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer\\_Lambda35\\_manual\\_EN.pdf](http://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.pdf)
- [95] [https://drexelchemistry-ail.wikispaces.com/file/view/UV\\_WinLab\\_Software\\_Guide.pdf](https://drexelchemistry-ail.wikispaces.com/file/view/UV_WinLab_Software_Guide.pdf)

---

[96] <http://www.perkinelmer.co.kr/files/LS%2045%20Users%20Guide%20-%2009934437.pdf>

[97] Γεωργιοπούλου Ελένη. Φωτοφυσικές ιδιότητες της Χλωροαλούμινο Φθαλοκυανίνης (AlClPc) και μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης in vitro σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.

[98] Κανλή Γεωργία. Συγκριτική μελέτη αποδέσμευσης φωτοευαισθητοποιητών Foscan και Fosreg από καρκινικά κύτταρα με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012.

[99] [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_DMSO.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_DMSO.htm)

[100] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10010023>

[101] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethanol#section=Top>

[102] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nadh#section=Top>

[103] <http://figures.boundless-cdn.com/18828/full/figure-07-01-01ab.jpeg>

[104] [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n8129pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8129pis.pdf)

[105] [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_EDTA.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_EDTA.htm)

[106] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>

[107] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m5655?lang=en&region=GR>

[108] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8787?lang=en&region=GR>

[109] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i9516?lang=en&region=GR>

[110] Κίτσου Παρασκευή. Η Συνδεκάνη-3 διαμεσολαβεί τις βιολογικές δράσεις της HARP. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας κυττάρου και Ανάπτυξης, 2011.

[111] <http://www.free-ed.net/sweethaven/MedTech/Hematology/lessonMain.asp?iNum=0502>

- 
- [112] Juan C. Stockert, Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, Richard W. Horobin, Ángeles Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*, Volume 114, Issue 8, December 2012, Pages 785-796, ISSN 0065-1281, <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000190>)
- [113] Zhang S, Yang L, Ling X, et al. Tumor Mitochondria-targeted Photodynamic Therapy with a Translocator Protein (TSPO)-specific Photosensitizer. *Acta biomaterialia*. 2015;28:160-170. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.033.
- [114] Ramiro D. Almeida, Bruno J. Manadas, Arsélio P. Carvalho, Carlos B. Duarte, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1704, Issue 2, 20 September 2004, Pages 59-86, ISSN 0304-419X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.05.003>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X04000332>)
- [115] Reza Hosseinzadeh, Khatereh Khorsandi, Methylene blue, curcumin and ion pairing nanoparticles effects on photodynamic therapy of MDA-MB-231 breast cancer cell, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Available online 12 March 2017, ISSN 1572-1000, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.03.005>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100016301685>)
- [116] Hui-Yi Lin, Jia-Ni Lin, Jui-Wen Ma, Ning-Sun Yang, Chi-Tang Ho, Sheng-Chu Kuo, Tzong-Der Way, Demethoxycurcumin induces autophagic and apoptotic responses on breast cancer cells in photodynamic therapy, *Journal of Functional Foods*, Volume 12, January 2015, Pages 439-449, ISSN 1756-4646, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.014>.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614003934>)
- [117] Leite DPV, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2014;32(11):627-632. doi:10.1089/pho.2014.3805.
- [118] V. Ellerkamp, N. Bortel, E. Schmid, B. Kirchner, S. Armeanu-Ebinger, J. Fuchs Photodynamic therapy potentiates the effects of curcumin on pediatric epithelial liver tumor cells. *Anticancer Res*, 36 (7) (2016), pp. 3363–3372
- [119] Niu T, Tian Y, Cai Q, Ren Q, Wei L. Red Light Combined with Blue Light Irradiation Regulates Proliferation and Apoptosis in Skin Keratinocytes in Combination with Low Concentrations of Curcumin. *Slominski AT*, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0138754. doi:10.1371/journal.pone.0138754.
- [120] Masamitsu Tanaka ; Pawel Mroz ; Tianhong Dai ; Manabu Kinoshita ; Yuji Morimoto ; Michael R. Hamblin; Photodynamic therapy can induce non-specific protective immunity against a bacterial infection. *Proc. SPIE 8224, Biophotonics and Immune Responses VII*, 822403 (February 9, 2012); doi:10.1117/12.906012.

---

[121] Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, et al. Photodynamic Therapy Using Intra-Articular Photofrin for Murine MRSA Arthritis: Biphasic Light Dose Response for Neutrophil-Mediated Antibacterial Effect. *Lasers in surgery and medicine*. 2011;43(3):221-229.  
doi:10.1002/lsm.21037.