



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ**

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΜΕ ΦΩΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

**Παπαγιαννοπούλου Έλλη
Αθήνα, 2017**

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Παπαγιαννοπούλου Έλλη

© (2018) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. 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 σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία, μελετάται η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου με χρήση τεσσάρων παραγώγων κουρκουμινών ως φωτοευαίσθητες ουσίες. Καθημερινά, οι άνθρωποι εκτίθενται σε μεγάλο αριθμό καρκινογόνων χημικών ουσιών και άλλων καρκινογόνων διεγέρσεων (υπεριώδες φως, ραδόνιο, ακτίνες Χ, κλπ.) ή ακόμα μικρές ποσότητες καρκινογόνων ουσιών μπορεί να λαμβάνονται μέσω της διατροφής. Έτσι, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού εμφανίζει καρκίνο. Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία μη επεμβατική εναλλακτική μέθοδος θεραπείας για την επιλεκτική καταστροφή διάφορων τύπων καρκίνου και άλλων ασθενειών. Συγκεκριμένα, γίνεται μελέτη της φωτοδυναμικής επίδρασης των παραγώγων κουρκουμίνης μίας ουσίας που εκχυλίζεται από τα ριζώματα του φυτού *Curcuma Longa*, για χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές στη PDT, *in vitro* σε δερματικά υγιή κύτταρα (HFFF2).

Για την αποτελεσματικότητα των ουσιών, αρχικά γίνεται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους και στη συνέχεια μελετάται η επίδρασή τους στα δερματικά υγιή κύτταρα (HFFF2) μετά την ενεργοποίηση των ουσιών με φωτεινή ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος..

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, γίνεται μία γενική αναφορά στη φωτοδυναμική θεραπεία καθώς και στα συστατικά της με έμφαση στους φωτοευαίσθητοποιητές. Ακόμη, γίνεται αναφορά στην ουσία κουρκουμίνη και στις εκ φύσεως ιδιότητές της και εφαρμογές της. Επιπροσθέτως, παρουσιάζονται έρευνες και κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας αποτελεί το πειραματικό μέρος της εργασίας όπου γίνεται αναφορά στις διατάξεις και στις μεθοδολογίες - πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν. Συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στις μεθοδολογίες φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης και φθορισμού καθώς και στην διαδικασία που ακολουθήθηκε για την λήψη των φασμάτων. Επιπλέον, παρουσιάζεται η διάταξη ακτινοβολήσης που χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη παραγωγή ελεύθερων ριζών όσο και για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ακόμη, γίνεται αναφορά στο πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων και μέτρησης των κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρητή. Στην πορεία παρουσιάζεται το πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας των κυττάρων-MTT. Ακόμη, γίνεται αναφορά στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας παρατίθενται τα αποτελέσματα και συμπεράσματα των πειραματικών διεργασιών καθώς και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που συνεργάστηκα μαζί τους και με βοήθησαν στη πραγματοποίηση της Μεταπτυχιακής

Διπλωματικής Εργασίας μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας μου κ. Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχολήθω με το συγκεκριμένο θέμα. Ευχαριστώ την κ. Ελένη Αλεξανδράτου για την αμέριστη βοήθειά της και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών & Μηχανικών Υπολογιστών. Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στην μητέρα μου και την αδερφή μου για την αγάπη τους, καθώς επίσης και για την υποστήριξή τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	7
ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ	10
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	16
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	18
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	20
ABSTRACT.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	24
1.1. Ιστορική αναδρομή	26
1.2. Φωτοδυναμική θεραπεία -PDT	27
1.3. Διαδικασία παραγωγής ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου-Μηχανισμοί PDT ...	29
1.3.1. Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί.....	30
1.4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας	32
1.5. Μηχανισμοί καταστροφής κυττάρων	33
1.5.1. Απόπτωση.....	33
1.5.2. Νέκρωση.....	34
1.5.3. Αυτοφαγία.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	36
2.1. Ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή.....	38
2.2. Κατηγορίες	40
2.2.1. Φωτοευαισθητοποιητές 1ης γενιάς.....	40
2.2.2. Φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς.....	41
2.2.3. Φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΙΑ PDT	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ.....	50
4.1 Η ουσία κουρκουμίνη.....	52

4.1.1 Ιστορική αναδρομή	52
4.1.2 Δομή	53
4.1.3 Χρήσεις	54
4.2 Ιδιότητες	55
4.2.1 Φωτοφυσικές ιδιότητες	55
4.2.2 Φωτοχημικές ιδιότητες	56
4.2.3 Εφαρμογές στο κλάδο φαρμακολογίας	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (PDT)	60
5.1 Κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής	62
5.2 Εφαρμογές της PDT με την κουρκουμίνη	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	66
6.1 Σκοπός	68
6.2 Πειραματικές διατάξεις.....	68
6.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	68
6.2.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού	72
6.2.3 Διάταξη ακτινοβολήσης	74
6.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν	76
6.3.1 Curcumin I	76
6.3.2 Curcumin II	76
6.3.3 Curcumin III	77
6.3.4 Curcumin mix.....	77
6.3.5 DMSO (dimethyl sulfoxide)	77
6.3.6 PBS (Phosphate Buffered Saline)	77
6.3.7 FBS (fetal bovine serum)	78
6.3.8 Αντιβιοτικό	78
6.3.9 DMEM.....	79
6.3.9 Τρυψίνη	79
6.3.10 MTT.....	79
6.3.11 Triton X	80
6.3.12 Ισοπροπανόλη(isopropanol)	80

6.3.13 NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide)	81
6.3.10 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid).....	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	84
7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες	85
7.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων	85
7.1.2 Σπάσιμο φλάσκας.....	86
7.1.3 Κυτταρομετρητής	87
7.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινών	89
7.2.1 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης κουρκουμινών.....	89
7.2.2 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού	90
7.2.3 Παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών με ακτινοβολία (ROS) με χρήση της ουσίας NADH	90
7.3 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις (MTT)	91
7.4 Μεθοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα HFFF2, με χρήση των τεσσάρων κουρκουμινών ως φωτοευαισθητοποιητές.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	96
8.1 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων	98
8.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης.....	98
8.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού.....	102
8.2 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών	106
8.3 Εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης (PDT)	110
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	126
Συμπεράσματα	128
Μελλοντικές προτάσεις.....	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133

ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

PDT	Φωτοδυναμική θεραπεία
PS	Φωτοευαισθητοποιητής
ROS	Δραστικά είδη οξυγόνου
PCI	Φωτοχημική εσωτερικοποίηση
$^1\text{O}_2$	Μονήρες οξυγόνο
NPS	Φωτοευαισθητοποιητής στη νανοκλίμακα
$^3\text{O}_2$	Μοριακό οξυγόνο
UV	Υπεριώδης περιοχή ηλεκτρομαγνητικού φάσματος
Vis	Ορατή περιοχή ηλεκτρομαγνητικού φάσματος
HFFF2	Υγιή ανθρώπινη δερματική κυτταρική σειρά
Et(OH)	Αιθανόλη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
(D)PBS	Αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικό Dulbecco
ΠΘΜ	Πλήρες θρεπτικό μέσο
MTT	Βιωσιμότητα κυττάρων

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Σχηματική αναπαράσταση καταστροφής καρκινικού όγκου με εφαρμογή των τριών συστατικών της φωτοδυναμικής θεραπείας	27
Σχήμα 2 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας (αντιδράσεις τύπου Ι-τύπου ΙΙ).....	29
Σχήμα 3 Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας: Βήμα 1 Εισαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή στον ανθρώπινο οργανισμό. Βήμα 2 Επιλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στο καρκινικό όγκο. Βήμα 3 Φωτοενεργοποίηση. Βήμα 4 Επιλεκτική κατατροφή καρκινικού όγκου.....	31
Σχήμα 4 Τελικό στάδιο απόπτωσης κυττάρου	33
Σχήμα 5 Νέκρωση σε σύγκριση με τον μηχανισμό της απόπτωσης	34
Σχήμα 6 Μηχανισμός αυτοφαγίας	35
Σχήμα 7 Δομή tetrapyrrole και πορφυρίνων.....	39
Σχήμα 8 Υδροφιλικά φάρμακα στον υδατικό πυρήνα και υδροφοβικοί παράγοντες εντός των λιπιδικών διπλοστοιβάδων	44
Σχήμα 9 Σχηματική αναπαράσταση NPSs (Α) λιπόσωμα, (Β) νανοσωματίδια πολυμερούς/διοξειδίου του πυριτίου (C) αυτοσυναρμολογημένη νανογέλη, (D) νανοράβδοι χρυσού	45
Σχήμα 10 Αριστερή εικόνα: Το φυτό <i>Curcuma longa</i> L από το οποίο εκχυλίζεται η ουσία κουρκουμίνη. Δεξιά εικόνα: η ουσία κουρκουμίνη	52
Σχήμα 11 Χημική δομή των κουρκουμινολιδών	53
Σχήμα 12 Απεικόνιση της χημικής δομής της κουρκουμίνης	53
Σχήμα 13 Κιτρινωπή σκόνη κουρκουμίνης.....	54
Σχήμα 14 Σχηματική αναπαράσταση φωτοφυσικής και φωτοχημικής διεργασίας στη κουρκουμίνη	57
Σχήμα 15 Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	68
Σχήμα 16 Σχηματική αναπαράσταση ακτινοβολίας και νόμος Lambert-Beer	69

Σχήμα 17 Πειραματική διάταξη UV-Vis.....	71
Σχήμα 18 Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	72
Σχήμα 19 Σχηματική αναπαράσταση φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού	73
Σχήμα 20 Όργανο μέτρησης φασματοσκοπίας φθορισμού, Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer	73
Σχήμα 21 Bridgelux Power LED 10W	74
Σχήμα 22 Διάταξη ακτινοβολήσης.....	75
Σχήμα 23 Χημική δομή της κουρκουμίνης I.....	76
Σχήμα 24 Χημική δομή της curcumin II	76
Σχήμα 25 Χημική δομή curcumin III	77
Σχήμα 26 Χημική δομή της DMSO.....	77
Σχήμα 27 Phosphate buffered saline.....	78
Σχήμα 28 Fetal bovine serum	78
Σχήμα 29 DMEM.....	79
Σχήμα 30 Χημική δομή του MTT	80
Σχήμα 31 Χημική δομή του Triton X.....	80
Σχήμα 32 Χημική δομή της ισοπροπανόλης	81
Σχήμα 33 Χημική δομή της NADH.....	81
Σχήμα 34 Χημική δομή της NAD ⁺	82
Σχήμα 35 Σχηματισμός NADH από NAD ⁺ και αντίστροφα	82
Σχήμα 36 Απορρόφηση των NADH και NAD ⁺ συναρτήσει του μήκους κύματος.....	83
Σχήμα 37 EDTA	83
Σχήμα 38 Απεικόνιση φλάσκας που χρησιμοποιήθηκε με το πλήρες θρεπτικό μέσο στο εσωτερικό του για προετοιμασία εισαγωγής κυττάρων	85
Σχήμα 39 Τοποθέτηση κυττάρων και πλήρους θρεπτικού μέσου.....	86

Σχήμα 40 Πλακίδιο Neubauer	88
Σχήμα 41 Κυτταρομετρητής	88
Σχήμα 42 Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων formazan του MTT και φάσματα απορρόφησης.	92
Σχήμα 43 Κύτταρα με πλήρες θρεπτικό μέσο σε plates	94
Σχήμα 44 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Fluostar Galaxy BMG	95

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος	75
Διάγραμμα 2 Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	98
Διάγραμμα 3 Φάσμα απορρόφησης κουρκουμίνης II σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	99
Διάγραμμα 4 Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης III σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	100
Διάγραμμα 5 Φάσμα απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινοειδών σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	100
Διάγραμμα 6 Συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	101
Διάγραμμα 7 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης I σε συγκέντρωση 10^{-7}M	102
Διάγραμμα 8 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης II σε συγκέντρωση 10^{-7}M	103
Διάγραμμα 9 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης III σε συγκέντρωση 10^{-7}M	103
Διάγραμμα 10 Φάσμα εκπομπής του μείγματος της κουρκουμίνης σε συγκέντρωση 10^{-7}M	104
Διάγραμμα 11 Φάσματα εκπομπής κουρκουμινών σε συγκέντρωση 10^{-7}M	105
Διάγραμμα 12 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη I.....	106
Διάγραμμα 13 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη II	107
Διάγραμμα 14 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min για την κουρκουμίνη III	107

Διάγραμμα 15 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min για το μείγμα της κουρκουμίνης.....	108
Διάγραμμα 16 Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης για τις ουσίες (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III, μείγμα κουρκουμινοειδών).....	109
Διάγραμμα 18 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη I ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	111
Διάγραμμα 19 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη II ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	112
Διάγραμμα 20 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη III ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	113
Διάγραμμα 21 Βιωσιμότητα των κυττάρων με το μείγμα κουρκουμινοειδών ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	114
Διάγραμμα 22 Βιωσιμότητα κυττάρων για 1 ώρα επώασης για κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (min)	115
Διάγραμμα 23 Βιωσιμότητα κυττάρων για 3 ώρες επώασης με κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (min)	116
Διάγραμμα 24 Βιωσιμότητα κυττάρων για 6 ώρες επώασης με κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (min)	117

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W	74
Πίνακας 2 Παρασκευή διαλυμάτων για μέτρηση απορρόφησης σε συγκέντρωση $c=2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	89
Πίνακας 3 Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φθορισμού	90
Πίνακας 4 Συγκριτική μελέτη λ_{max} και μέγιστης απορρόφησης για τις ουσίες που μελετήθηκαν σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$	101
Πίνακας 5 Συνοπτικός πίνακας για τα φάσματα εκπομπής των ουσιών σε συγκέντρωση 10^{-7}M	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προέλευση της φωτοδυναμικής θεραπείας βρίσκεται στην αρχαία Αίγυπτο, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία της ψωρίασης. Τη δεκαετία του 1970 πραγματοποιήθηκε η πρώτη χρήση της PDT για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων του ανθρώπινου δέρματος. Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την χρήση φωτοευαίσθητων ουσιών και εξωτερικού φωτός για τη θεραπεία ασθενειών και κυρίως του καρκίνου. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας οφείλεται στην επαγωγή κυτταροτοξικότητας σε κακοήγη κύτταρα. Συγκεκριμένα η τοξική δράση της θεραπείας εξαρτάται από τον συνδυασμό τριών σημαντικών παραγόντων. Αυτοί είναι ένας φωτοευαίσθητοποιητής, δηλαδή μία ουσία που έχει τη δυνατότητα να απορροφά φως και να προκαλεί φωτοχημικές αντιδράσεις, μία πηγή φωτός και τέλος το οξυγόνο. Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει την χορήγηση του φωτοευαίσθητου παράγοντα και την μετέπειτα ακτινοβολία σε μήκος κύματος αντίστοιχο της ζώνης απορρόφησής του. Ακολούθως, ενεργοποιείται μια φωτοχημική αντίδραση που οδηγεί στην δημιουργία ελεύθερων ριζών. Σε σύγκριση με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, η PDT μειώνει σημαντικά τις παρενέργειες και βελτιώνει την εξειδίκευση του στόχου καθώς θεραπεύει μόνο τη βλάβη που εκτίθεται στην ακτινοβολία του φωτός.

Η βελτιστοποίηση της θεραπείας έγκειται στην περαιτέρω έρευνα των φωτοευαίσθητων ουσιών. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες τους, η επιλεκτικότητα συγκέντρωσης στους προς θεραπεία στόχους, το χρονικό διάστημα αποβολής από τον οργανισμό και η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών καθορίζουν το αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη τεσσάρων συνθετικών παραγώγων κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία για τη θεραπεία του καρκίνου. Η κουρκουμίνη αποτελεί μία πορτοκαλί-κίτρινη χρωστική σκόνη, η οποία εκχυλίζεται από το φυτό turmeric (*curcuma Longa*). Η ουσία διαθέτει ποικίλες φαρμακολογικές και βιολογικές ιδιότητες που την καθιστούν εξαιρετικά χρήσιμη για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων ήδη από την αρχαιότητα.

Αρχικά, γίνεται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των τεσσάρων συνθετικών παραγώγων κουρκουμίνης. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης και φθορισμού των παραγώγων κουρκουμίνης. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ικανότητας των παραγώγων της κουρκουμίνης ως προς την φωτοεπαγόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Στο τελευταίο στάδιο της εργασίας, μελετάται η φωτοδυναμική θεραπεία *in vitro* σε υγιή δερματικά κύτταρα (HFFF2), με χρήση ακτινοβολίας και ως φωτοευαίσθητοποιητές τα τέσσερα συνθετικά παράγωγα κουρκουμίνης. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι αρκετά ενθαρρυντικά καθώς τα συνθετικά παράγωγα των κουρκουμινών που εξετάστηκαν παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών, πολύ υψηλή κυτταροτοξική δράση και λόγω της ικανότητας τους για φθορισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για φωτοδυναμική διάγνωση.

ABSTRACT

The origin of photodynamic therapy is found in ancient Egypt, which was used to treat psoriasis. In the 1970s, PDT was first used to treat various human skin cancers. Photodynamic therapy is a minimally invasive treatment process, which involves the use of photosensitive substances and light for the treatment of diseases, especially cancer. The efficacy of the therapy is due to the induction of cytotoxicity in malignant cells. In particular, the toxic effect of the treatment depends on the combination of three important agents. These are a photosensitizer, a substance that has the ability to absorb light and cause photochemical reactions, a light source and finally oxygen. Photodynamic therapy involves administration of the photosensitive agent and subsequent irradiation at a wavelength corresponding to its maximum absorption band. Subsequently, a photochemical reaction that leads to the formation of free radicals is activated. Compared with traditional chemotherapy and radiotherapy, PDT significantly reduces side effects and improves target specificity as it treats only the area exposed to light radiation.

The optimization of treatment lies in the further investigation of photosensitive substances. Their physicochemical properties, the selectivity of concentration in the targets to be treated, the time of elimination from the body and the ability to produce free radicals determine the effect of photodynamic therapy.

In this diploma thesis, a study of four synthetic curcumin derivatives was conducted as photosensitive substances during photodynamic therapy for the treatment of cancer. Curcumin is an orange-yellow pigment powder extracted from the turmeric plant (*Curcuma Longa*). The substance has a variety of pharmacological and biological properties that make it extremely useful for the treatment of various diseases since ancient times.

Initially, the photophysical properties of the four synthetic curcumin derivatives were studied. In particular, spectroscopic absorption and fluorescence studies of the curcumin derivatives were performed. Also, a study of the capability of curcumin derivatives for light-induced free radical production was carried out. In the final step of the study, the four synthetic curcumin derivatives were studied for their photodynamic efficiency in vitro on healthy foreskin fibroblasts (HFFF2)

Results obtained are quite encouraging as the synthetic derivatives of the curcumins tested have significant free radical production capacity, very high cytotoxic activity, and because of their fluorescence capacity can be used for photodynamic diagnosis.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.1. Ιστορική αναδρομή

Η προέλευση της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) μπορεί να ανιχνευθεί πίσω στην αρχαία Αίγυπτο, όπου αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως θεραπεία για την ψωρίαση (Daniell and Hill, 1991). Η επιτυχία της θεραπείας οφειλόταν στη χρήση χρωστικής ουσίας πάνω στο δέρμα και στη μετέπειτα έκθεση στο ηλιακό φως (φωτοευαισθητοποίηση)¹.

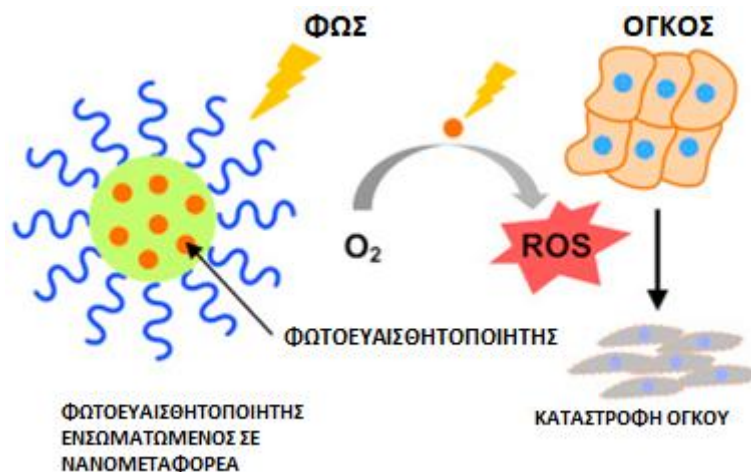
Τη δεκαετία του 1890 ο Raab, διαπίστωσε με χρήση της χρωστικής ακριδίνης, που κατείχε τον ρόλο του φωτοευαισθητοποιητή, τα θανατηφόρα αποτελέσματα που παρουσίαζε η έκθεσή της σε ορατό φως προκαλώντας κυτταροτοξικότητα στην περιοχή απορρόφησής της. Στη συνέχεια, το 1900 έγινε η πρώτη κλινική παρατήρηση της φωτοδυναμικής θεραπείας από τον νευρολόγο Jean Prime με χρήση της χρωστικής ιωσίνης για τη θεραπεία της επιληψίας. Η πρώτη δημοσιευμένη εργασία με χρήση της ιωσίνης, ήταν για τη θεραπεία δερματικών όγκων με τοπική έκθεση φωτός. Ο Von Tarpeiner παρατήρησε ότι το O₂ αποτελούσε σημαντικό συστατικό για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τη δεκαετία του 1950 και του 1960, πραγματοποιήθηκε μία σειρά μελετών για την αντικαρκινική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) σε διάφορους τύπους καρκίνου, με χρήση πορφυρίνων ως φωτοευαισθητοποιητές. Κύριο πλεονέκτημα που εμφανίζει η PDT για την θεραπεία του καρκίνου έναντι των άλλων μεθόδων αντιμετώπισης του, είναι η ικανότητα περιορισμού των τοξικών επιδράσεων στους βιολογικούς ιστούς που εκτίθενται τόσο στο φωτοευαισθητοποιητή (PS) όσο και στο φως, προστατεύοντας έτσι τους φυσιολογικούς ιστούς.

Η χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων του ανθρώπινου δέρματος ήταν η πρώτη που ερευνήθηκε στη δεκαετία του 1970 από τον Dougherty και τους συνεργάτες του το 1978. Ο Thomas Dougherty με χρήση ενός παραγώγου της αιματοπορφυρίνης βασίστηκε στην πρωτοποριακή εργασία της ερευνητικής ομάδας του Policard (1924), οι οποίοι έδειξαν ότι οι πορφυρίνες εισχωρούσαν κατά προτίμηση σε κακοήθεις και όχι σε φυσιολογικούς ιστούς. Η τεχνική ήταν αργή για να κερδίσει την κλινική αποδοχή, καθώς οι παράγοντες φωτοευαισθητοποίησης 'πρώτης γενιάς' της φωτοδυναμικής θεραπείας, αργούσαν να αποδεσμευθούν από τα υγιή κύτταρα, με αποτέλεσμα ο ασθενής να υποβάλλεται σε θεραπεία και να αποφεύγει το έντονο φως (π.χ. ηλιακό φως) για αρκετές εβδομάδες ώστε να αποφευχθούν τυχόν σοβαρές δερματικές αντιδράσεις. Η διαθεσιμότητα των παραγώγων της αιματοπορφυρίνης με ταχύτερους χρόνους αποδέσμευσης από τους υγιείς ιστούς τόνωσε περισσότερο το ενδιαφέρον για την φωτοδυναμική θεραπεία και έχουν πλέον δημοσιευθεί πολυάριθμες κλινικές μελέτες στον άνθρωπο, παρουσιάζοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα με χρωστικές φωτοευαισθητοποίησης χορηγούμενες τοπικά ή συστηματικά.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της τεχνικής στην αντιμετώπιση τοπικά προχωρημένων καρκινωμάτων της κεφαλής και του λαιμού (Wile κ.ά., 1984), ουροδόχου κύστης (Misaki κ.ά., 1983), οισοφάγος και βρόγχος (Cortese και Kinsey, 1984) αντιστάθμισαν τις τυχόν προφυλάξεις και επέδρασαν καταλυτικά για περαιτέρω έρευνα.

1.2. Φωτοδυναμική θεραπεία -PDT

Η φωτοδυναμική θεραπεία, αποτελεί μία νέα θεραπευτική μη επεμβατική μέθοδο, για την επιλεκτική καταστροφή διάφορων τύπων καρκίνου και άλλων ασθενειών. Είναι μία διαδικασία η οποία συνδυάζει τρία συστατικά. Συγκεκριμένα, ένα φωτοευαίσθητο μόριο (φωτοευαισθητοποιητής, PS), μία πηγή φωτός ρυθμιζόμενη στο κατάλληλο μήκος κύματος για το συγκεκριμένο φωτοευαισθητοποιητή και οξυγόνο. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου στηρίζεται στην ύπαρξη των τριών συστατικών, τα οποία αν και, μόνα τους είναι ανενεργά, ο συνδυασμός τους είναι πολύ δραστικός. Η παρουσία φωτός και η ενεργοποίηση του φωτο-ευαισθητοποιητή οδηγούν στην υπερπαραγωγή των δραστικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Συγκεκριμένα, το φως διεγείρει το φωτο-ευαισθητοποιητή στο νεοπλαστικό ιστό με αποτέλεσμα να παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλώντας φωτο-οξείδωση, η οποία δημιουργεί κυτταροτοξικότητα και επερχόμενη θανάτωση του κυττάρου. Η καταστροφή του όγκου, όπως εμφανίζεται στο σχήμα 1, πραγματοποιείται: είτε με απευθείας θάνατο των κυττάρων του όγκου που είναι η νέκρωση ή με απόπτωση, αυτοφαγία ή ακόμη και καταστροφή του αγγειακού συστήματος. Στην περίπτωση απουσίας εξωτερικής πηγής φωτός (φωτοενεργοποιητή), τα φάρμακα-φωτοευαισθητοποιητές PS δεν είναι καθόλου τοξικά.



Σχήμα 1 Σχηματική αναπαράσταση καταστροφής καρκινικού όγκου με εφαρμογή των τριών συστατικών της φωτοδυναμικής θεραπείας

Παρόλο που αυτή η θεραπευτική μέθοδος έχει βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής των καρκινοπαθών, απαιτείται περαιτέρω πρόοδος προκειμένου να εξαληφθούν προβλήματα που προκύπτουν λόγω κάποιων εκ φύσεως ιδιοτήτων των φαρμάκων PS. Ένα από τα κυριότερα προβλήματα που εμφανίζουν οι φωτοευαισθητοποιητές είναι η κακή υδατοδιαλυτότητα τους. Ο κλάδος της Βιονανοτεχνολογίας βοήθησε στη λύση των εμποδίων αυτών, με ενσωμάτωση των φαρμάκων PS σε νανοϋλικά (οργανικά ή ανόργανα). Επιπλέον, η χρήση φωτοευαισθητοποιητών στη νανοκλίμακα (NPSs) με ή χωρίς περαιτέρω βιολογικές/φωτοφυσικές λειτουργίες είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της PDT. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο, αποφεύγονται οι περιορισμοί που εμφανίζουν τα φάρμακα PS με παράλληλη αύξηση της αποτελεσματικότητας και επιλεκτικότητας στον καρκινικό όγκο.

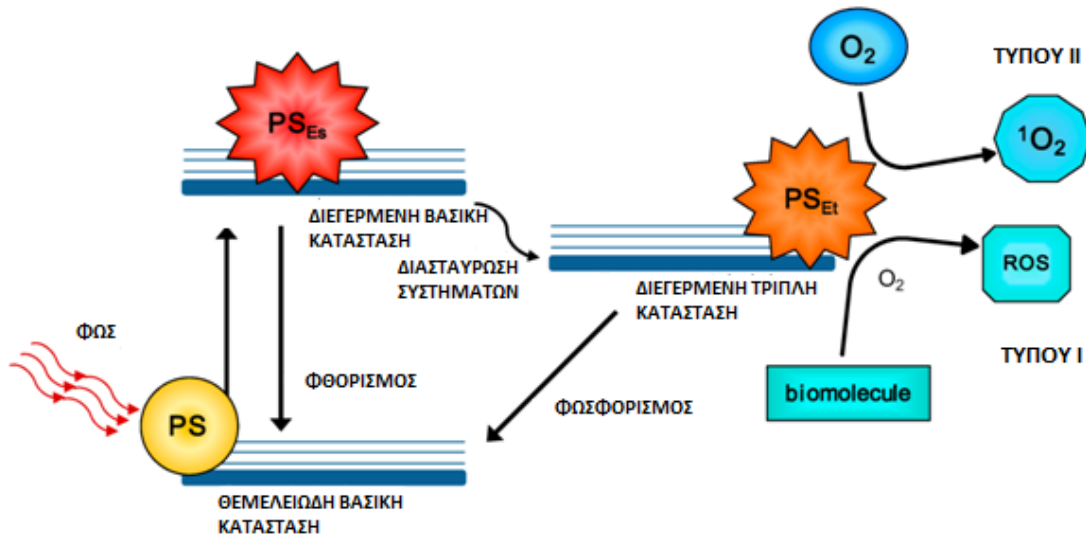
Τυπικά, η επιτυχία της PDT οφείλεται σε διάφορες παραμέτρους. Οι δύο πιο σημαντικές ωστόσο είναι η επιλεκτική συγκέντρωση των μορίων PS στα κακοήθη κύτταρα και η επιλεκτική ακτινοβολή της πάσχουσας περιοχής με φως. Οι δύο αυτές παράμετροι, αποτελούν προαπαιτούμενα για την αποφυγή παράπλευρης βλάβης στους υγιείς ιστούς. Λόγω της επιλεκτικής συσσώρευσής τους, οι PS μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και ως φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, απεικονίζοντας έτσι τους διάφορους όγκους/ιστούς. Δυνάμει της εν λόγω διπλής επιλεκτικότητας, τα φωτοευαισθητοποιημένα κύτταρα εξαλείφονται μέσω απόπτωσης και/ή νέκρωσης σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με την παραδοσιακή αντιμετώπιση του καρκίνου καθώς μειώνονται σημαντικά οι παρενέργειες και η συστηματική τοξικότητα σε υγιείς ιστούς. Επιπλέον αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για ασθενείς στους οποίους η θέση ή το μέγεθος της βλάβης περιορίζουν την αποδοχή της παραδοσιακής θεραπείας.

Επομένως, η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) περιλαμβάνει τη χορήγηση ενός φωτοευαισθητοποιητικού φαρμάκου ή ενός προφαρμάκου, η οποία συσσωρεύεται επιλεκτικά σε κύτταρα-στόχους, ακολουθούμενη από τοπικό φωτισμό της βλάβης με ορατό φως (Luksiene 2003², Wachowska κ.ά, 2011³). Είναι μια ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική αγωγή, η οποία χρησιμοποιείται στη διαχείριση διαφόρων καρκινικών και προ-κακοήθων ασθενειών. Ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί επίσης να εντοπιστεί σε κύτταρα όγκου χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη ομάδα φίλτρων απεικόνισης (Hefti κ.ά, 2010, Mowatt κ.ά, 2011, Nguyen και Tsien 2013⁴, Allison 2016⁵). Εκτός από τη θεραπεία του καρκίνου, η PDT έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία μικροβιακών λοιμώξεων σε ανθρώπους (Kharkwal κ.ά, 2011, Sharma κ.ά., 2012, Wardlaw κ.ά, 2012), σκύλους (Fabris κ.ά, 2014⁶) και πρόβατα (Sellera κ.ά, 2016)⁷. Η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας οφείλεται στην πρόσληψη του φωτός, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τους φαρμακευτικούς παράγοντες οι οποίοι θα παγιδευόνταν και θα

καταστρεφόνταν εντός των κυττάρων (φωτοχημική εσωτερικοποίηση, PCI, Selbo κ.ά, 2015, Madsen, 2016)⁸.

1.3. Διαδικασία παραγωγής ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου-Μηχανισμοί PDT⁹

Ο μηχανισμός της PDT με χρήση του PS έχει διασαφηνιστεί σε πολλές μελέτες. Εν συντομία, το PS στην βασική του κατάσταση απορροφά ένα φωτόνιο και ενεργοποιείται σε μια διεγερμένη κατάσταση μετά την ακτινοβολήση με κατάλληλο μήκος κύματος φωτός. Η διεγερμένη κατάσταση μπορεί να μετατραπεί σε τριπλή κατάσταση μέσω της διεσωτερικής μετάβασης. Το PS στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση αλληλεπιδρά με τα περιβάλλοντα μόρια και παράγει έτσι ROS μέσω των αντιδράσεων τύπου I και τύπου II (σχήμα 2).



Σχήμα 2 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας (αντιδράσεις τύπου I-τύπου II)

Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός αντίδρασης τύπου I ή αντίδρασης ελεύθερων ριζών, περιλαμβάνει τη μεταφορά είτε του ατόμου υδρογόνου είτε ενός ηλεκτρονίου μεταξύ του διεγερμένου PS και των υποστρωμάτων, οδηγώντας το στη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Αυτές οι ρίζες αντιδρούν στη συνέχεια με οξυγόνο, με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS όπως του υπεροξειδίου και του υδροξυλίου.

Ο μηχανισμός αντίδρασης τύπου II ή αντίδρασης του μονήρους οξυγόνου, περιλαμβάνει την μεταφορά ενέργειας μεταξύ του διεγερμένου PS και του μοριακού οξυγόνου στην βασική κατάσταση ($^3\text{O}_2$), με αποτέλεσμα το σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου ($^1\text{O}_2$). Οι παραγόμενες ROS μπορεί να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη βλάβη στους ιστούς / κύτταρα στόχους.

Εκτενέστερα, και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται ότι η δημιουργία ROS εισάγει περαιτέρω οξείδωση ενδιάμεσα στη κυτταρική μεμβράνη, στα πεπτίδια, λιπίδια, ανάλογα με την επιλεκτικότητα του PS. Η τοξικότητα που προκαλούν οι φωτοευαισθητοποιητές, στις περισσότερες *in vivo* περιπτώσεις οφείλεται στις αντιδράσεις μονήρους οξυγόνου. Παρόλα αυτά και οι δύο τύποι αντιδράσεων συνυπάρχουν και πολλές φορές μάλιστα είναι ανταγωνιστικές.

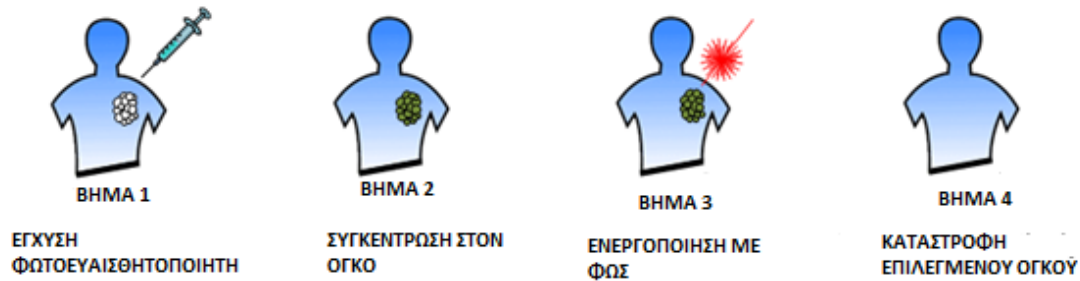
Για να εξετάσουμε τη χημική δομή του $^1\text{O}_2$, πολλά αναλυτικά εργαλεία είναι ικανά να μας προσφέρουν πληροφορίες για την συγκέντρωση, τη χωρική κατανομή και τη χρονική συμπεριφορά του σχηματισμού του $^1\text{O}_2$, συμπεριλαμβανομένου της φασματοφωτομετρίας, φθορισμομετρίας και χημιοφωταύγειας.

1.3.1. Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί

Υπάρχουν τρία βασικά συστατικά, όπως αναφέρθηκε, για την επιτυχημένη εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) :

- 1) Μία ένωση η οποία εμφανίζει φωτοευαίσθητες ιδιότητες (φωτοευαισθητοποιητής-PS)
- 2) Μία πηγή ορατού φωτός
- 3) Οξυγόνο

Τα συστατικά αυτά συνδυάζονται για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και ακολουθούνται τα βήματα που περιγράφονται συνοπτικά στο σχήμα 3.



Σχήμα 3 Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας: Βήμα 1 Εισαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή στον ανθρώπινο οργανισμό. **Βήμα 2** Επιλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στο καρκινικό όγκο. **Βήμα 3** Φωτοενεργοποίηση. **Βήμα 4** Επιλεκτική κατατροφή καρκινικού όγκου.

Όσον αφορά το πρώτο συστατικό της PDT, ο φωτοευαισθητοποιητής είναι μια χημική ουσία / χρωστική ουσία που συσσωρεύεται επιλεκτικά σε κακοήθεις ιστούς και μπορεί να ενεργοποιηθεί ορατά με χρήση εξωτερικού φωτός. Η ενέργεια από το διεγερμένο με φωτισμό PS μεταφέρεται σε μόρια οξυγόνου (O_2) για να δημιουργήσει δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία βλάπτουν τα βιολογικά μόρια. Στη συνέχεια, επέρχεται ως αποτέλεσμα βλάβη και θάνατος των νεοπλασματικών κυττάρων (Dougherty κ.ά. 1998, Juzeniene κ.ά. 2007). Η αυξημένη οξυγόνωση του ιστού μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο σχηματισμό ROS κατά τη διάρκεια της PDT και βελτιωμένων αποτελεσμάτων (Maier κ.ά. 2000). Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι διάφοροι φωτοευαισθητοποιητές εντοπίζονται επιλεκτικά σε κακοήθεις ιστούς είναι πολύπλοκοι. Φυσικοί παράγοντες, όπως η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και η κακή λεμφική παροχή στους όγκους, σε συνδυασμό με τη συγγένεια για τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου, είναι πιθανόν να συμβάλλουν στη συσσώρευση τους σε όγκους (Dougherty κ.ά. 1998).

Οι τρεις κύριες διεργασίες με τις οποίες οι ROS συμβάλλουν στην καταστροφή των όγκων με PDT είναι:

- άμεση κυτταρική βλάβη,
- έμμεση αγγειακή διακοπή,
- ενεργοποίηση ανοσοαποκρίσεων.

Άμεση ζημιά των κυττάρων του όγκου μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο τόσο από προγραμματισμένες οδούς (απόπτωση) όσο και μη προγραμματισμένες. Γενικά, όταν η ένταση φωτός είναι χαμηλή, μπορεί να ξεκινήσει ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος.

1.4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας

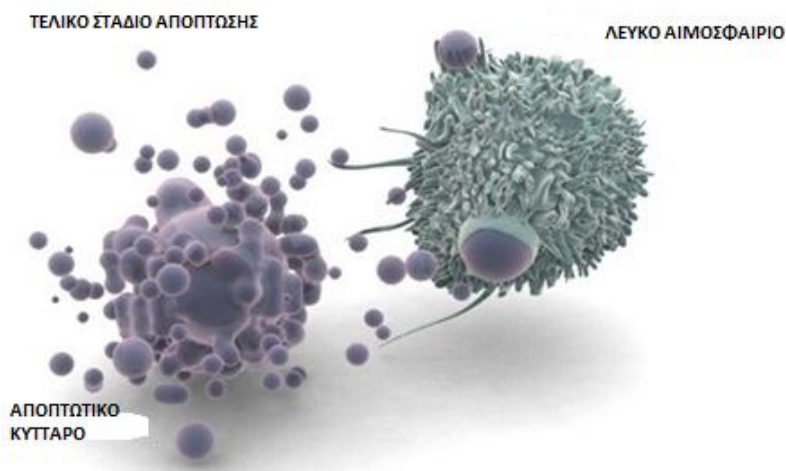
Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία ελπιδοφόρα μέθοδος για την εξόντωση ποικίλων βλαβερών μικροοργανισμών όπως βακτηρίων κ.ά, καθώς και καρκινικών ιστών. Η εκτενέστερη μελέτη για την μέθοδο αυτή, οφείλεται στα επιτεύγματα της πρόσφατης έρευνας που έχει πραγματοποιηθεί και λόγω της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας που αποτελεί σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Ως μέθοδο θεραπείας, κυρίως όσον αφορά το καρκίνο, παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα καθώς και μειονεκτήματα¹⁰. Η φωτοδυναμική θεραπεία πλεονεκτεί καθώς παρουσιάζει μικρότερη βλάβη στον φυσιολογικό ιστό συγκριτικά με τον νεοπλαστικό ιστό. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα με χρήση καλωδίου οπτικών ινών να εισχωρήσει σε καρκινικές περιοχές που δεν είναι προσιτές με χειρουργική επέμβαση. Επιπλέον, αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδος, καθώς για την αντιμετώπιση φλεγμονόδων αλλοιώσεων του οισφάγου (οισοφάγος Barrett) και των βρογχικών νεοπλασμάτων στους ανθρώπους γίνεται με διέλευση οπτικού καλωδίου μέσω ενδοσκοπίου. Επίσης, η φωτοδυναμική θεραπεία έχει την ικανότητα της επαναληψιμότητας, παρόλο που είναι επαρκής μία μόνο θεραπεία. Σε αντίθεση με την ακτινοθεραπεία, δεν παρουσιάζει συσσώρευση ακτινοβολίας στον φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία, δεν εμφανίζεται αντίσταση στον όγκο και η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει λιγότερες ουλές απ' ό,τι η χειρουργική επέμβαση.

Από την άλλη μεριά η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει διάφορα μειονεκτήματα. Αμέσως μετά τη θεραπεία, εμφανίζεται πρήξιμο με διάρκεια περίπου 4 ημερών. Για την αντιμετώπιση του στοματοφάρυγγα, κατά την τραχειοστομία ο σωλήνας πρέπει να τοποθετηθεί μέχρι να υποχωρήσει η διόγκωση. Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, ο όγκος πεθαίνει σε σύντομη χρονική περίοδο, αλλά η επούλωση διαρκεί περίπου 4 εβδομάδες, και κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μπορεί να υπάρξει σημαντική οσμή (θα μπορούσε να γίνει χρήση νερού ή ήπιου αντισηπτικού διαλύματος). Επιπλέον, είναι πιθανή η εμφάνιση λοίμωξης καθώς η περιοχή που θεραπεύεται είναι στην πραγματικότητα μία ανοικτή πληγή με νεκρωτικό ιστό, η μόλυνση είναι υπαρκτή κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής φάσης. Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με αντιβιοτικά. Η φωτοευαισθητοποίηση αποτελεί ένα επιπλέον μειονέκτημα καθώς, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να διατηρηθεί στο δέρμα, προκαλώντας μια σοβαρή αντίδραση εάν υπάρχει έκθεση στο ηλιακό φως. Αυτό ήταν ένα σημαντικό πρόβλημα με τους φωτοευαισθητοποιητές I¹⁵ γενιάς, αλλά αυτό βελτιώθηκε σημαντικά με τους φωτοευαισθητοποιητές νέας γενιάς. Τέλος, σε ορισμένα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για πλακώδη καρκίνωμα, αναπτύχθηκε πνευμονικό οίδημα.

1.5. Μηχανισμοί καταστροφής κυττάρων

1.5.1. Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία. Είναι αναγκαία για την ανάπτυξη των οργάνων, την ομοιόσταση των ιστών και την απομάκρυνση των ελαττωματικών ή πιθανώς βλαβερών κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς.



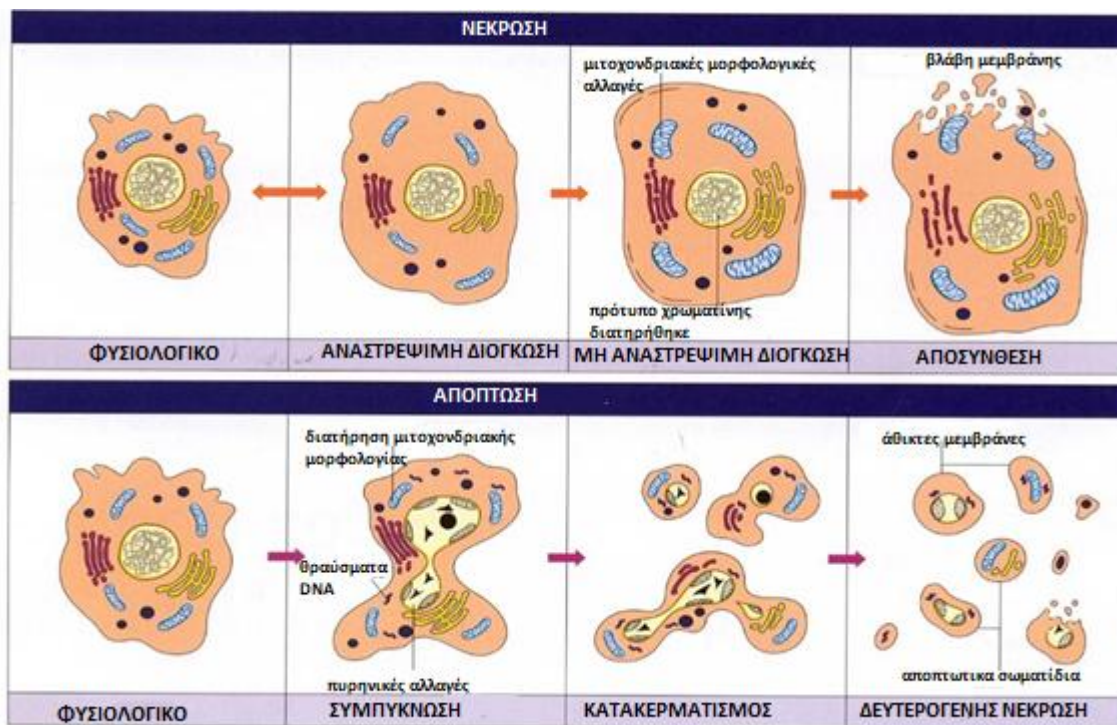
Σχήμα 4 Τελικό στάδιο απόπτωσης κυττάρου

Συγκεκριμένα, προκαλείται από πολλούς εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς παράγοντες. Αποπτωτικοί παράγοντες είναι οι ιοί, η ακτινοβολία και η κόπωση ή και η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA. Επίσης, όταν τα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού απομακρυνθούν από τον βασικό υμένα πεθαίνουν με απόπτωση. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυττώνονται, χωρίς φλεγμονή. Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται σχηματικά το τελικό στάδιο της απόπτωσης του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική, αυτοεπισχυόμενη και μη αντιστρεπτή. Υπάρχουν δύο λόγοι για τους οποίους ένα κύτταρο οδηγείται σε αυτοκαταστροφή:

- 1) Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος για τη σωστή ανάπτυξη του κυττάρου.
- 2) Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα τα οποία είναι επικίνδυνα για το εσωτερικό του οργανισμού.

1.5.2. Νέκρωση

Η νέκρωση αποτελεί μία μορφή βλάβης, η οποία οδηγεί στον ξαφνικό θάνατο των κυττάρων. Οι βλάβες είναι πιθανόν να προκαλούνται από υπερβολική δόση κυτταροτοξικών παραγόντων, μη φυσιολογικά επίπεδα θερμοκρασίας του ίδιου του κυττάρου ή ακόμη από διάφορους φυσικούς ή χημικούς τραυματισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας φλεγμονώδους αντίδρασης στον περιβάλλοντα ιστό. Η φλεγμονή αυτή, εμποδίζει τα μακροφάγα να εντοπίσουν και να φαγοκυττώσουν τα νεκρά κύτταρα. Γι' αυτό το λόγο, συχνά είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί ο νεκρωτικός ιστός χειρουργικά. Η νέκρωση η οποία μένει χωρίς θεραπεία έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση νεκρού ιστού σε αποσύνθεση στο ή κοντά στο σημείο του κυτταρικού θανάτου. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η γάγγραινα. Ακολουθώς, στο σχήμα 5 μπορούμε να διακρίνουμε τους διαφορετικούς μηχανισμούς καταστροφής του κυττάρου (νέκρωση-απόπτωση).

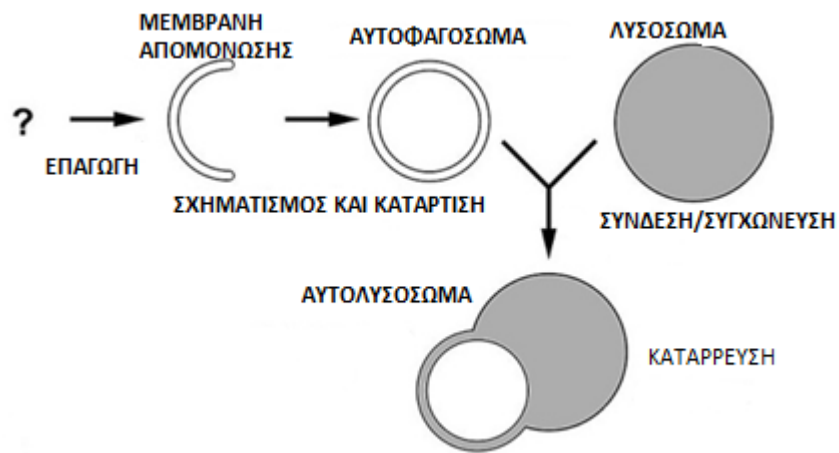


Σχήμα 5 Νέκρωση σε σύγκριση με τον μηχανισμό της απόπτωσης

1.5.3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ο φυσικός, ρυθμιστικός, καταστρεπτικός μηχανισμός του κυττάρου που αποσυναρμολογεί περιττά ή δυσλειτουργικά συστατικά. Η αυτοφαγία επιτρέπει την ομαλή διάσπαση και ανακύκλωση κυτταρικών συστατικών. Στη μακροαυτοφαγία, στοχευμένα κυτταροπλασματικά συστατικά απομονώνονται από το υπόλοιπο κύτταρο

μέσα σε ένα διπλά μεμβρανικό κυστίδιο γνωστό ως αυτοφαγοσωματικό. Το αυτοφαγοσώμα συνδέεται τελικά με λυσοσώματα και το περιεχόμενο υποβαθμίζεται και ανακυκλώνεται. Τρεις μορφές του μηχανισμού της αυτοφαγίας περιγράφονται συνήθως: μακροαυτοφαγία, μικροαυτοφαγία, και αυτοφαγία που επάγεται από συνοδούς πρωτεΐνες. Σε ασθένεια, η αυτοφαγία θεωρείται ως προσαρμοστική απάντηση στο στρες, η οποία προάγει την επιβίωση, ενώ σε άλλες περιπτώσεις φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό θάνατο και τη νοσηρότητα. Στην ακραία περίπτωση της λιμοκτονίας, η διάσπαση των κυτταρικών συστατικών προάγει την κυτταρική επιβίωση διατηρώντας τα επίπεδα κυτταρικής ενέργειας. Ακολούθως, παρουσιάζεται στο σχήμα 6 η πορεία που ακολουθεί η αυτοφαγία του κυττάρου.



Σχήμα 6 Μηχανισμός αυτοφαγίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

2.1. Ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή¹¹

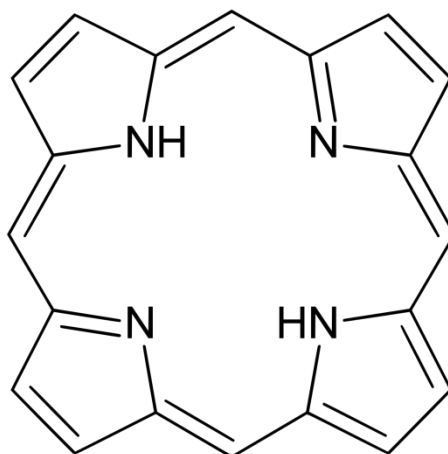
Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι φωτοευαίσθητα μόρια, όπου η ενεργοποίησή τους στηρίζεται στη χρήση εξωτερικής φωτεινής πηγής με συγκεκριμένο μήκος κύματος. Είναι φυσικές, χημικές ή συνθετικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ενέργεια στα μόρια του οξυγόνου ή σε άλλα υποστρώματα στις γύρω περιοχές, δημιουργώντας στο κύτταρο δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) που είναι ικανά να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Οι περισσότεροι PS είναι αρωματικές ενώσεις, με φτωχή ή περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Έτσι, είναι ικανοί να συσσωματώνονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, μειώνοντας σημαντικά τις αποδόσεις της παραγωγής ROS.

Για μία επιτυχημένη θεραπεία είναι απαραίτητη η χρήση ενός φωτοευαισθητοποιητή που να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Τοξικότητα: Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι μία μη τοξική χημική ουσία, έναντι των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Επιπλέον, ο μεταβολισμός του φωτοευαισθητοποιητή δεν θα πρέπει να δημιουργεί νέα τοξικά παραπροϊόντα.
- Μεταλλαξιογένεση / καρκινογένεση: ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει την ικανότητα να θεραπεύει μία ασθένεια χωρίς να δημιουργεί επιπλέον βλάβες σε φυσιολογικούς ιστούς.
- Επιλεκτικότητα/στόχος: ένας φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να διαθέτει την ικανότητα επιλεκτικής συσσώρευσης σε ιστούς-στόχους. Ακόμη, με την παρουσία φωτός να έχει την ιδιότητα καταστροφής του καρκινικού ιστού μέσω του μηχανισμού νέκρωσης ή απόπτωσης. Προϋπόθεση για την επιτυχημένη καταστροφή του καρκινικού ιστού είναι ότι το φως θα πρέπει να ενεργοποιείται στην περιοχή συσσώρευσης του φωτοευαισθητοποιητή. Επιπροσθέτως, κάποιος θα μπορούσε να συζεύξει τον φωτοευαισθητοποιητή, με φορείς όπως π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα, ραδιενεργό πηγή, κλπ ώστε να ενισχυθεί η εξειδίκευση και η καταστροφική ικανότητα.
- Για τη σωστή ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή, απαιτείται η εφαρμογή φωτός σε κατάλληλο μήκος κύματος απορρόφησης.
- Ο φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να είναι διαθέσιμος στο εμπόριο και με σχετικά ελάχιστο κόστος για ευρεία χρήση.
- Ο φωτοευαισθητοποιητής δεν πρέπει να προκαλεί ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως θρόμβοι, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή προσβολή κ.λπ.

- Οι υδατοδιαλυτοί φωτοευαισθητοποιητές εισχωρούν και διαπερνούν εύκολα το ανθρώπινο σώμα. Με χημικούς χειρισμούς οι μη διαλυτοί φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να συντεθούν με κατάλληλους φορείς για να επιτρέψουν κλινική χρήση.
- Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να μπορεί να χορηγηθεί εύκολα και με ασφάλεια, να στοχεύσει την κατάλληλη δομή, να αποφύγει τους φυσιολογικούς ιστούς, να ενεργοποιηθεί όταν χρειαστεί έως ότου καταστραφεί η εν λόγω δομή και στη συνέχεια να εξαλειφθεί χωρίς να προκληθεί μόνιμη βλάβη στο υπόλοιπο σώμα.

Ακόμη και στην περίπτωση των υδατοδιαλυτών PS, η επιλεκτικότητα συσσώρευσης σε κακοήθεις περιοχές δεν είναι αρκετά υψηλή για κλινική χρήση. Οι πλειοψηφία των PS που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου βασίζονται στη δομή του τετραπυρρολίου (tetrapyrrole) παρόμοια με εκείνη της δομής πρωτοπορφυρίνης IX (συνδέεται με σίδηρο για να σχηματίσει την αίμη) που περιέχεται στην αιμοσφαιρίνη. Η δομή εμφανίζεται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7 Δομή tetrapyrrole και πορφυρίνων

Για κλινική χρήση, ένας επιτυχημένος PS θα πρέπει να :

- μην είναι τοξικός έως ότου ενεργοποιηθεί το φως.
- είναι υδρόφιλος για εύκολη συστηματική εφαρμογή.
- ενεργοποιείται από κλινικά χρήσιμο μήκος κύματος φωτός.
- παράγει ικανοποιητική φωτοδυναμική αντίδραση (PDR).

Από την άποψη αυτή, η ενσωμάτωση των PS σε διασπειρόμενους στο νερό νανομεταφορείς (nanocarriers), τους λεγόμενους «nanophotosensitizers» (NPSs), μπορεί να ενισχύσει τη διαλυτότητα των PS καθώς και την επιλεκτικότητα της θεραπείας με καλύτερη στόχευση όγκου και ενδοκυτταρικής παράδοσης του ωφέλιμου φορτίου του PS, με ή χωρίς ενεργή στόχευση σε τμήματα όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια.

Σε αντίθεση με τα τυπικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων, τα NPSs δεν απαιτείται να απελευθερώνουν τα μόρια του PS. Αντ' αυτού, είναι σημαντικό τα είδη οξυγόνου (οι πραγματικοί θεραπευτικοί παράγοντες) να μπορούν να διαχέονται μέσα και έξω από τη μήτρα των νανοσωματιδίων ώστε να επιτευχθεί θεραπευτική αποτελεσματικότητα με φωτοευαισθητοποίηση. Αυτό το χαρακτηριστικό προσφέρει άλλο ένα πλεονέκτημα επιτρέποντας την κατασκευή ενός δομημένου PS ως πολυλειτουργικό νανοφάρμακο που μπορεί να ενσωματώσει πρόσθετες λειτουργίες (π.χ. απεικόνιση, ενεργή στόχευση του καρκίνου) στην εσωτερική μήτρα ή στην εξωτερική επιφάνεια ως σύνολο.

Από την άποψη αυτή, έχουν γίνει αρκετές δοκιμές για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της PDT χρησιμοποιώντας την έννοια της φωτοφυσικής βελτίωσης μέσω της προσθήκης ενισχυτικών παραγόντων και του PS στο χώρο της νανοκλίμακας. Αυτή η προσέγγιση υπερνικά τον περιορισμό των τυπικών NPS που εκδηλώνουν αναπόφευκτα μειωμένη απόδοση της παραγωγής ROS λόγω της υψηλής τοπικής συγκέντρωσης των μορίων του PS.

2.2. Κατηγορίες

Οι φωτοευαισθητοποιητές (PS) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς. Στους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς ανήκουν εκείνοι οι οποίοι βασίζονται στη δομή της πορφυρίνης, συμπεριλαμβανομένου της αιματοπορφυρίνης και παραγώγων της. Ακολούθως, στη 2^η γενιά, αναπτύχθηκαν διάφορες δομές, όπως φθαλοκυανίνες, χλωρίνες. Στη 3^η γενιά περιλαμβάνονται φωτοευαισθητοποιητές της 2^{ης} γενιάς συζευγμένοι με μόρια-μεταφορείς για καλύτερη επιλεκτικότητα και στοχευμένη θεραπεία.

2.2.1. Φωτοευαισθητοποιητές 1ης γενιάς

Η πρώτη οικογένεια των φωτοευαισθητοποιητών, βασίζεται στην αιματοπορφυρίνη (Hr) και τα παράγωγά της. Αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 1970 και νωρίς τη δεκαετία του 1980. Αυτά τα προϊόντα αποτελούνται από διαφορετικά κλάσματα πορφυρίνης, όπως μονομερή, διμερή και олиγομερή τα οποία είναι απαραίτητα για την επιτυχία της θεραπείας. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να μην είναι ταυτόσημα, αν και κλινικά, εμφανίζονται ισοδύναμα. Με την προσθήκη, την αφαίρεση ή υποκαθιστώντας δομές στις

πορφυρίνες μπορούν να δημιουργηθούν επιπλέον φωτοευαισθητοποιητές. Από την άλλη μεριά όμως, η τοξικότητα, που δεν σχετίζεται με την PDT, οφείλεται στη συστηματική χρήση αυτών των παραγόντων¹². Όσον αφορά την κλινική εφαρμογή της πορφυρίνης και συγκεκριμένα της Photofrin (sodium porfimer, νατριούχο πορφιμέρης), έγινε κλινικά αποδεκτή για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου και του τραχήλου της μήτρας (πρώιμο στάδιο). Ακόμη, ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα σε όγκους του εγκεφάλου¹³ καθώς και νεοπλάσματα κεφαλής και τραχήλου. Τα πλεονεκτήματα του Photofrin είναι ότι: καταστρέφει τον όγκο αποτελεσματικά, είναι μη τοξική με απουσία φωτός και μπορεί εύκολα να παρασκευαστεί σε ένα υδατοδιαλυτό παρασκεύασμα για ενδοφλέβια χορήγηση. Δεδομένου ότι είναι το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε, το Photofrin έχει αποδειχθεί να είναι ικανή για χρήση στη PDT ως εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση του καρκίνου: το Photofrin έχει χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες ασθενείς για περισσότερα από 20 χρόνια. Παρά την αποτελεσματικότητα του photofrin, μπορεί να προκαλέσει φωτοευαισθησία ή ακόμη και αλλεργική αντίδραση στο φως λόγω της φωτοτοξικότητας και ενδεχομένως να δημιουργηθούν ηλιακά εγκαύματα¹⁴. Τα μειονεκτήματα που εμφανίζει το Photofrin, θα μπορούσαν ενδεχομένως να ξεπεραστούν σε μελέτες για νέες ενώσεις¹⁵.

Τα μειονεκτήματα που οδήγησαν σε περαιτέρω έρευνα φωτοευαισθητοποιητών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά είναι ότι παρουσίαζαν:

- μικρή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς ιστούς
- υψηλή απορρόφηση φωτός σε μήκη κύματος μεταξύ 350 και 600 νανόμετρα (nm), με κορυφή μεταξύ 350 και 450 nm, η οποία επικαλύπτει την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας (400-600 nm). Ο βέλτιστος φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει χαμηλή απορρόφηση σε αυτή τη φασματική περιοχή, με υψηλή απορρόφηση μεταξύ 650 και 800 nm.
- παρατεταμένη φωτοευαισθησία του δέρματος, η οποία απαιτεί αποφυγή άμεσου ηλιακού φωτός για ένα μήνα ή και περισσότερο μετά τη θεραπεία (λόγω των δύο προαναφερθέντων χαρακτηριστικών)¹⁶.

2.2.2. Φωτοευαισθητοποιητές 2ης γενιάς

Οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς σχεδιάστηκαν για να μειώσουν ή να εξαλείψουν τα ελαττώματα και τα προβλήματα που σχετίζονται με τους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς και κυρίως την Photofrin. Ως αντιπρόσωπος αυτής της κατηγορίας, το παράγωγο χλωρίου talaporfin sodium (εμπορική ονομασία Laserphyrin, επίσης γνωστό ως NPe6 ή LS11) εγκρίθηκε στην Ιαπωνία για φωτοδυναμική θεραπεία

του καρκίνου του πνεύμονα σε πρώιμο στάδιο το 2003. Το νατριούχο ταλαπορφίνη παρουσιάζει σημαντικές βελτιώσεις έναντι του Photofrin σε αρκετά χαρακτηριστικά:

Μειωμένη φωτοευαισθησία του δέρματος καθώς μειώνει την περίοδο αποφυγής του φωτός σε δύο εβδομάδες ή λιγότερο (σε σύγκριση με τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες με Photofrin). Αυτό οφείλεται εν μέρει στην ταχύτερη έκκριση του φωτοευαισθητοποιητή από το σώμα. Η κορυφή απορρόφησης που εμφανίζει στο μήκος κύματος 664 nm επιτρέπει βαθύτερη διείσδυση του φωτός στον ιστό και λιγότερη απορρόφηση του εισερχόμενου φωτός από την αιμοσφαιρίνη.

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της 2^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητών είναι:

1. 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA, Levulan®).

Η ALA είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη θεραπεία και τη διάγνωση των νεοπλασματικών ιστών του δέρματος.

2. Χλωρίνη e6

Το χλωρίδιο e6 αποτελεί έναν υδρόφιλο φωτόευαισθητοποιητή και είναι κυρίως μονομερές σε διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,4, εμφανίζει μια κύρια κορυφή απορρόφησης στα 402 nm και μια ισχυρή κορυφή στην κόκκινη ζώνη στα 654 nm. Ο φθορισμός του είναι μέγιστος στα 675 nm με διάρκεια ζωής 5,3 s. Το Ce6 (χλώρινα e6) εντοπίζεται σε λιποσώματα όπου προκαλεί βλάβη μετά από ακτινοβολία¹⁷.

3. Purpurins

Τα Purpurins έχουν ισχυρή απορρόφηση στο κόκκινο, μεταξύ 630 και 715 nm.

4. Το παράγωγο βενζοπορφυρίνης (BPD)

Αυτή η χλωρίνη (Verteporfin, Visudyne®) συντίθεται από την πρωτοπορφυρίνη. Η λιποφιλικότητα διευκολύνει τη σύνδεσή της στην κυτταρική μεμβράνη. Το κύριο πλεονέκτημα της BPD είναι η ισχυρή απορρόφησή της στα 690 nm, αυξάνοντας την διείσδυση του φωτός στον ιστό.

5. Meta (Tetra) υδροξυφαινυλοχλωρίδιο (m-THPC) και παράγωγά του.

Το m-THPC (temoporfin, Foscan) φαίνεται να είναι ένας από τους πιο ενεργούς φωτοευαισθητοποιητικούς παράγοντες, που απαιτούν πολύ χαμηλές δόσεις φαρμάκων. Αυτός ο ευαισθητοποιητής απορροφά ισχυρά με μέγιστο απορρόφηση στα 652 nm.

6. Φθαλοκυανίνες

Λόγω του πολύ υψηλού μοριακού συντελεστή απορρόφησης μεταξύ 675 nm και 700 nm, μερικές φθαλοκυανίνες είναι πολύ ισχυροί φωτοευαισθητοποιητές.

7. Texaphyrins (Lu-TeX, Antrin, Lutrin, Optrin)

Οι τεξαφυρίνες είναι συνθετικές πορφυρίνες, που ενεργοποιούνται από βαθύ κόκκινο φως, διεισδύοντας έτσι στον ιστό. Είναι υδατοδιαλυτές, και στοχεύουν επιλεκτικά τον όγκο και επίσης αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

8. Παρασκευάσματα βακτηριοχλωροφύλλης.

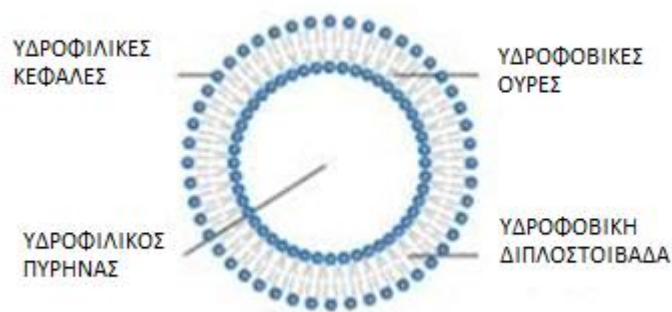
Η βακτηριοχλωροφύλλη-α είναι μια φυσική χρωστική με μια ζώνη απορρόφησης περίπου στα 780 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος, το βάθος διείσδυσης του φωτός είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή που επιτυγχάνεται στα 630 nm.

2.2.3. Φωτοευαισθητοποιητές 3ης γενιάς

Στους φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς ανήκουν οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς οι οποίοι χρησιμοποιούν νανομεταφορείς για να φτάσουν στοχευμένα στον ιστό-στόχο. Ιδιαίτερη προσοχή στη φωτοδυναμική θεραπεία έχει δοθεί στη χρήση λιποσωμάτων αλλά και άλλων νανοσωματιδίων τα οποία αναλύονται στη συνέχεια.

Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές είναι αδιαλυτοί σε υδατικά μέσα, ιδιαίτερα σε φυσιολογικό pH, περιορίζοντας τη χρήση τους. Οι εναλλακτικές στρατηγικές παράδοσης κυμαίνονται από τη χρήση γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (o/w), πρόσδεση ή εγκλεισμό των φωτοευαίσθητων ουσιών σε φορείς όπως λιποσώματα και νανοσωματίδια. Ο νανομεταφορέας μπορεί να περιορίσει την απορρόφηση του φωτός, μειώνοντας την απόδοση του οξυγόνου στη βασική του κατάσταση. Μια άλλη εναλλακτική λύση που δεν εμφανίζει το πρόβλημα σκέδασης είναι η απευθείας σύνδεση φωτοευαισθητοποιητών σε βιολογικά δραστικά μόρια όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα. Καθώς τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα διαφορετικά από τα υγιή κύτταρα. Έτσι, γίνεται επιλεκτική πρόσδεση και καταστροφή του καρκινικού ιστού.

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται σήμερα ως νανο-πλατφόρμες για καλύτερη στόχευση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η μοναδική τους ικανότητα είναι να εγκλείουν υδρόφιλα φάρμακα στον υδατικό πυρήνα τους και υδρόφοβους παράγοντες. Τα λιποσώματα είναι σφαιρικές δομές, όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 8, και σχηματίζονται από μία ή περισσότερες ομόκεντρες λιπιδικές διπλοστιβάδες, καθιστώντας τους εξαιρετικούς φορείς διανομής.



Σχήμα 8 Υδροφιλικά φάρμακα στον υδατικό πυρήνα και υδροφοβικοί παράγοντες εντός των λιπιδικών διπλοστοιβάδων

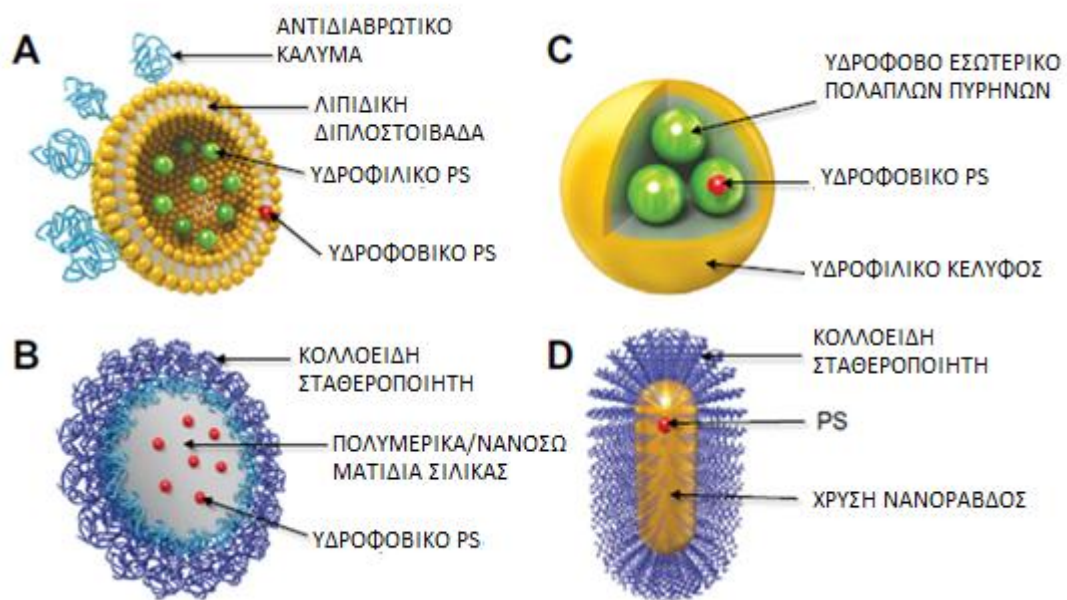
Η επιλογή των λιποσωμάτων μπορεί να βελτιστοποιηθεί σύμφωνα με τις φυσικές ιδιότητες των PS, όπως την υδροφοβικότητα. Ωστόσο, τα συμβατικά λιποσώματα χαρακτηρίζονται μερικές φορές από βραχεία ημιζωή στο πλάσμα, η οποία αποτελεί ανεπαρκή χρόνο όσον αφορά τα κύτταρα όγκου, λαμβάνοντας υπόψη την ταχεία απομάκρυνση από το ενδοθηλιακό σύστημα (RES) και την αποσύνθεση λόγω της ανταλλαγής λιπιδίων από μοριακές αλληλεπιδράσεις με συστατικά του λιποσώματος.

Μεταξύ των λιποσωμάτων παρόμοιας σύνθεσης, τα μικρότερα λιποσώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συσσώρευσης και συγκράτησης, αφού τα μεγαλύτερα απομακρύνονται εύκολα από τα μακροφάγα ή τις συμπληρωματικές πρωτεΐνες.

Στην 3^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών όμως, ανήκουν και συστήματα μεταφορέων όπως είναι τα νανοσωματίδια, στα οποία η φωτοευαίσθητη ουσία μπορεί να μεταφέρεται είτε διαλυμένη στη μήτρα ή απορροφημένη στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Οι νανο-μεταφορείς έχουν εξαιρετική ικανότητα στόχευσης καθώς και ενισχυμένη διαπερατότητα και συγκράτηση (EPR) σε σύγκριση με τους υπάρχοντες μικρο-μεταφορείς.

Τα συστήματα διανομής που είναι στη νανοκλίμακα έχουν ενεργήσει εκτενώς για απεικόνιση και θεραπεία σε διάφορα βιολογικά πεδία, όπως είναι η οπτική απεικόνιση, ο μαγνητικός συντονισμός απεικόνισης και η θεραπεία του καρκίνου. Ένα από τα πλεονεκτήματα των νανομεταφορέων, προέρχεται από το μοναδικό μικροπεριβάλλον που περιβάλλει τον ιστό του όγκου.

Οι νανοκατασκευές των PS αποτελούνται από διάφορα υλικά, όπως φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, πολυμερή, πυριτία και μέταλλα (σχήμα 9).



Σχήμα 9 Σχηματική αναπαράσταση NPSs (Α) λιπόσωμα, (Β) νανοσωματίδια πολυμερούς/διοξείδιο του πυριτίου (C) αυτοσυναρμολογημένη νανογέλη, (D) νανοράβδοι χρυσού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΙΑ PDT

Η PDT έχει εφαρμοστεί κλινικά σε διάφορους όγκους όπως του δέρματος, του οισοφάγου, του πνεύμονα, της κεφαλής και του αυχένα, του ήπατος, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη ο σχετιζόμενος με την ηλικία εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας, ηπατική μετάσταση, μεταστάσεις του μαστού, μεταστάσεις θωρακικού τοιχώματος και σάρκωμα Kaposi, δεδομένων των πλεονεκτημάτων της έναντι άλλων συμβατικών θεραπειών. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές τεχνικές δυσκολίες στην εφαρμογή της κλασσικής PDT στη θεραπεία ευρέος φάσματος όγκων, ειδικά σε αυτούς που αναπτύσσονται σε βαθιούς ιστούς. Οι περισσότεροι κλασικοί PS έχουν περιορισμούς, όπως η κακή διαλυτότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αβέβαιη επιλεκτικότητα μεταξύ του όγκου και των φυσιολογικών ιστών για κλινική χρήση και η περιορισμένη διείσδυση του φωτός στους ιστούς. Η χρήση PS στη νανοκλίμακα (NPS) δίνει λύση στα παραπάνω προβλήματα. Επίσης, η χρήση ενός NPS μπορεί να καταστήσει τον υδρόφοβο PS διαλυτό σε νερό και να του δώσει τη δυνατότητα να έχει το κατάλληλο μέγεθος για παθητική στόχευση στον καρκινικό ιστό. Η επιλεκτική συσσώρευση μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με σύζευξη αντισωμάτων ή ειδικών τμημάτων στόχευσης όγκου στην επιφάνεια των NPSs.

Επιπλέον, ως νανοπλατφόρμες πολλαπλών μεταφορών, οι NPSs παρέχουν πλεονεκτήματα όταν κατασκευάζονται με μαγνητικά νανοσωματίδια, φθοροφόρα και κβαντικές τελείες, ή όταν ο φθορισμός τους χρησιμοποιείται ως σήμα απεικόνισης. Παρόλο που τα NPSs βρίσκονται ακόμα στα αρχικά στάδια κλινικών δοκιμών, η εκμετάλλευση καινοτόμων NPSs μπορεί να προσελκύσει τη προσοχή των ιατρών. Παρόλα αυτά, η θεραπεία που ενεργοποιείται με το φως εξακολουθεί να εμφανίζει περιορισμούς που προκαλούνται από τα εν γένει μειονεκτήματα της διάδοσης του φωτός *in vivo* (π.χ. απορρόφηση από βιολογικά υλικά και σκέδαση σε ιστό).

Πιστεύεται ότι ένας συνδυασμός βελτιωμένων τεχνολογιών όσον αφορά τη μεταφορά του φωτός, σύγχρονων ενδοσκοπικών συσκευών και φωτοευαίσθητοποιητών PSs μπορούν να προωθήσουν τελικά την εφαρμογή της PDT στην πρώτη γραμμή της ογκολογικής διάγνωσης και θεραπείας στους διάφορους όγκους στο εγγύς μέλλον και τελικά να διαδοθεί ευρέως η χρήση της PDT στην κλινική εφαρμογή. Συνδυασμοί της PDT με χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία και/ή χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται με έναν πολύ πιο ακριβή τρόπο για να ελαχιστοποιηθεί η θνησιμότητα και να βελτιστοποιηθεί ο έλεγχος του όγκου. Περαιτέρω, η PDT μπορεί να εκτελείται υπό σχετικά απλές συνθήκες και με οικονομικά αποδοτικό τρόπο έτσι ώστε οι ασθενείς να έχουν την ευκαιρία να αποφύγουν μια επεμβατική χειρουργική μέθοδο. Βέβαια, προϋποθέτει καλά σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές ώστε να επιτραπεί η κλινική της χρήση.

Οι ερευνητές συνεχίζουν να μελετούν τρόπους βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της PDT και επέκτασης σε άλλους καρκίνους. Οι κλινικές δοκιμές (ερευνητικές μελέτες) βρίσκονται σε εξέλιξη για να αξιολογηθεί η χρήση PDT για καρκίνους του εγκεφάλου,

του δέρματος, του προστάτη, του τραχήλου και της περιτοναϊκής κοιλότητας. Άλλη έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη φωτοευαισθητοποιητών που είναι πιο ισχυροί, με καλύτερη επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα και να ενεργοποιούνται από το φως με το οποίο θα μπορεί να διεισδύσει σε ιστούς και να θεραπεύσει βαθύτερους ή μεγάλους όγκους. Οι ερευνητές διερευνούν επίσης τρόπους βελτίωσης του εξοπλισμού και της παράδοσης του φωτός ενεργοποίησης¹⁸.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ

4.1 Η ουσία κουρκουμίνη

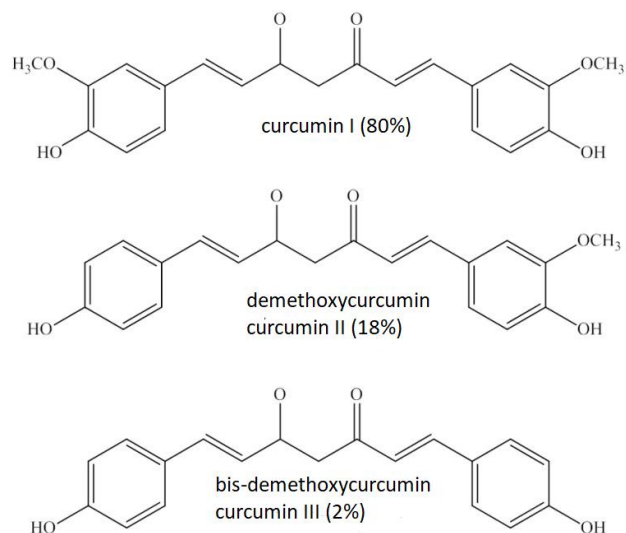
4.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η κουρκουμίνη (Curcumin) ή διφερουλοϋλ-μεθάνιο (diferuloylmethane) είναι μία φυσική κίτρινη χρωστική δραστική και αρωματική ουσία (πολυφαινολική ένωση). Η ουσία αυτή, εκχυλίζεται από το πολυετές βότανο *Curcuma longa* L. Στο σχήμα 10, εμφανίζεται το φυτό από το οποίο εκχυλίζεται η κουρκουμίνη και η κίτρινη χρωστική ουσία, κουρκουμίνη. Το γένος *Curcuma* είναι μέλος της οικογένειας ginger (*Zingiberaceae*), που αναπτύσσεται στην Ινδία, στη Νοτιοανατολική Ασία, και άλλες τροπικές περιοχές. Η κουρκουμίνη, έχει μακράν ιστορία στην παραδοσιακή ιατρική, καθώς διαθέτει ισχυρές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Ανακαλύφθηκε πριν από δύο περίπου αιώνες από τους Vogel και Pelletier (1842), στους οποίους οφείλεται και η ονομασία ‘κουρκουμίνη’. Η χημική δομή της ουσίας αναγνωρίστηκε από τον Milobedeska και την ερευνητική του ομάδα το 1910 και ακολούθως συντέθηκε από τον Lampe και τους συνεργάτες του το 1913¹⁹.



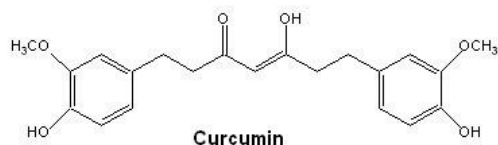
Σχήμα 10 Αριστερή εικόνα: Το φυτό *Curcuma longa* L. από το οποίο εκχυλίζεται η ουσία κουρκουμίνη. Δεξιά εικόνα: η ουσία κουρκουμίνη

Η ουσία έχει πληθώρα εφαρμογών καθώς χρησιμοποιείται ως φυτικό συμπλήρωμα, συστατικό καλλυντικών, αλλά και στη μαγειρική για να δώσει γεύση και χρώμα στα τρόφιμα. Τα άλλα δύο είδη κουρκουμινολογικών που έχουν απομονωθεί είναι τα : desmethoxycurcumin και δις-desmethoxycurcumin. Τα κουρκουμινολογικά (σχήμα 11) είναι φυσικές φαινόλες που είναι υπεύθυνες για το κίτρινο χρώμα του κουρκουμά που ονομάζεται επίσης και κίτρινη κουρκουμή. Τα εμπορικά παρασκευάσματα της κουρκουμίνης αποτελούνται από κουρκουμίνη I (80%), της demethoxycurcumin (18%) και της bisdemethoxycurcumin (2%) που είναι όλες οι υδρόφοβες ουσίες και συνήθως διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, οργανικούς διαλύτες ή έλαια.



Σχήμα 11 Χημική δομή των κουρκουμινολών

4.1.2 Δομή



Σχήμα 12 Απεικόνιση της χημικής δομής της κουρκουμίνης

Η χημική δομή της κουρκουμίνης (1,7-δισ [4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο] -1,6-επταδιενο-3,5-διόνη) απεικονίζεται στο σχήμα 11. Η ουσία ενσωματώνει διάφορες λειτουργικές ομάδες των οποίων η δομή αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1910. Οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι φαινόλης συνδέονται με δύο ομάδες α,β-ακόρεστου καρβονυλίου που είναι καλός δέκτης Michael και μπορεί να αντιδράσει με γλουταθειόνη και άλλα πυρηνόφιλα. Οι διαφορετικές μεθοξυ υποκαταστάσεις στη χημική δομή του διαφορετικού μορίου, της demethoxycurcumin και της bisdemethoxycurcumin είναι υπεύθυνες για μια σειρά βιολογικών και φαρμακολογικών δραστηριοτήτων αυτών των ενώσεων (Anand και άλλοι 2008). Υπάρχουν, ωστόσο, συστηματικές μελέτες που δείχνουν τη συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών και μοριακών χαρακτηριστικών αυτών των ενώσεων με τις βιολογικές και / ή τις φαρμακολογικές δραστηριότητες.

4.1.3 Χρήσεις

Η κουρκουμίνη πέρα από τις εφαρμογές της στον ιατρικό κλάδο, χρησιμοποιείται ευρέως σε τσάγια, χυμούς ακόμα και στη μαγειρική και σε διάφορα συμπληρώματα. Έως και σήμερα, εξακολουθεί να προκαλεί έκπληξη στους ερευνητές με τα πολλαπλά οφέλη που παρουσιάζει για την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στη σταθερότητα του σακχάρου στο αίμα, τη λειτουργία των νεφρών, καθώς και την καλή υγεία των οστών. Συνεπώς, προωθεί την υγεία του ανοσοποιητικού συστήματος και ακόμη αποτελεί έναν φυσικό ενισχυτή ευεξίας²⁰.

Η ρίζα του φυτού *Curcuma longa* L (το ρίζωμα), χρησιμοποιείται για να παράγει το κουρκούμη μπαχαρικό. Κατ' αρχάς, το ρίζωμα βράζεται και στη συνέχεια αφήνεται στον ήλιο για να στεγνώσει, τότε το τραχύ εξωτερικό στρώμα αφαιρείται και αλέθεται για να κάνει την πλούσια, κίτρινη, κουρκούμη σκόνη (σχήμα 13).



Σχήμα 13 Κιτρινωπή σκόνη κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη σε μορφή σκόνης, μπορεί να προστεθεί σε άλλα μπαχαρικά όπως σκόνη κορίανδρου, σκόνη τσίλι, κύμινο, κανέλα, και επιπλέον μπορεί να προστεθεί στο ρύζι για να τους δώσει ένα πλούσιο χρώμα και γεύση. Η κουρκούμη μπορεί να καταναλωθεί ως μπαχαρικό, αλλά μπορεί επίσης να γίνει τσάι, όπως αναφέρθηκε²¹.

ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ: ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΚΕΥΟΣ

Για χιλιάδες χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά προϊόντα ποικίλα φυσικά προϊόντα, καθώς έχουν αποδειχθεί να είναι πηγή συστατικών για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Παρά τις σημαντικές προσπάθειες, οι επικρατούσες πολύπλοκες πολυγονιδιακές ασθένειες του ανθρώπου όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι μεταβολικές παθήσεις, ο καρκίνος και οι νευρολογικές παθήσεις δεν έχουν μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινόλη που ήταν η πρώτη που εμφάνιζε αντιβακτηριδιακή δράση το 1949. Από τότε, αυτή η πολυφαινόλη

αλλά και τα παράγωγά της, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδη, αντιξειδοτοική και αντιμικροβιακή δράση. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες έχει αποδειχθεί η θεραπευτική ικανότητα της κουρκουμίνης καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών. Ήδη από το 1748, καταγράφηκε η θεραπευτική δράση της κουρκουμίνης, και το πρώτο δημοσιευμένο άρθρο πραγματοποιήθηκε το 1937 από τον Oppenheimer²².

Στην παραδοσιακή ιατρική, ο κουρκουμάς και η κουρκουμίνη έχουν χρησιμοποιηθεί στην Ασία και την Αφρική, για τη θεραπεία ποικίλων παθολογικών καταστάσεων. Συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και για την αντιμετώπιση ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος όπως είναι το άσθμα και οι αλλεργίες. Ακόμη έχει εφαρμογή τόσο στη θεραπεία κατά του διαβήτη, των ρευματικών παθήσεων, της ιγμορίτιδας, όσο και διαφόρων ηπατικών διαταραχών²³.

4.2 Ιδιότητες

Η κουρκουμίνη δεν είναι τοξική για τους ανθρώπους, όταν λαμβάνεται σε μεγάλες δόσεις από το στόμα. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο χημικό μόριο με πολλαπλούς βιολογικούς στόχους και διάφορα κυτταρικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με εκτεταμένες έρευνες η κουρκουμίνη διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, χημειοθεραπευτικές και άλλες ιδιότητες.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗΣ	
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ	368.39 g·mol ⁻¹
ΕΜΦΑΝΙΣΗ	Κιτρινωπή σκόνη
ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΞΕΩΣ	183 °C

4.2.1 Φωτοφυσικές ιδιότητες

Η κουρκουμίνη είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό σε pH=7, ενώ είναι εν μέρει διαλυτή σε αλκαλικό νερό. Είναι εύκολα διαλυτή σε διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, DMF, DMSO, χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο, κτλ. Επιπροσθέτως, είναι μέτρια διαλυτή σε εξάνιο, κυκλοεξάνιο, τετραχλωράνθρακα τετραϋδροφουράνιο, διοξάνιο και τριτ-βουτανόλη. Η σταθερή κουρκουμίνη έχει φωτεινό κίτρινο χρώμα, και σε διάλυμα,

παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στη UV-vis με μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή από 408 έως 434 nm.

4.2.2 Φωτοχημικές ιδιότητες

- Φωτοαποικοδόμηση

Η κουρκουμίνη υφίσταται χημική αποικοδόμηση όταν βρεθεί σε διαλύματα με βασικό pH, αντιθέτως εμφανίζει σταθερότητα σε διαλύματα που έχουν χαμηλό pH²⁴.

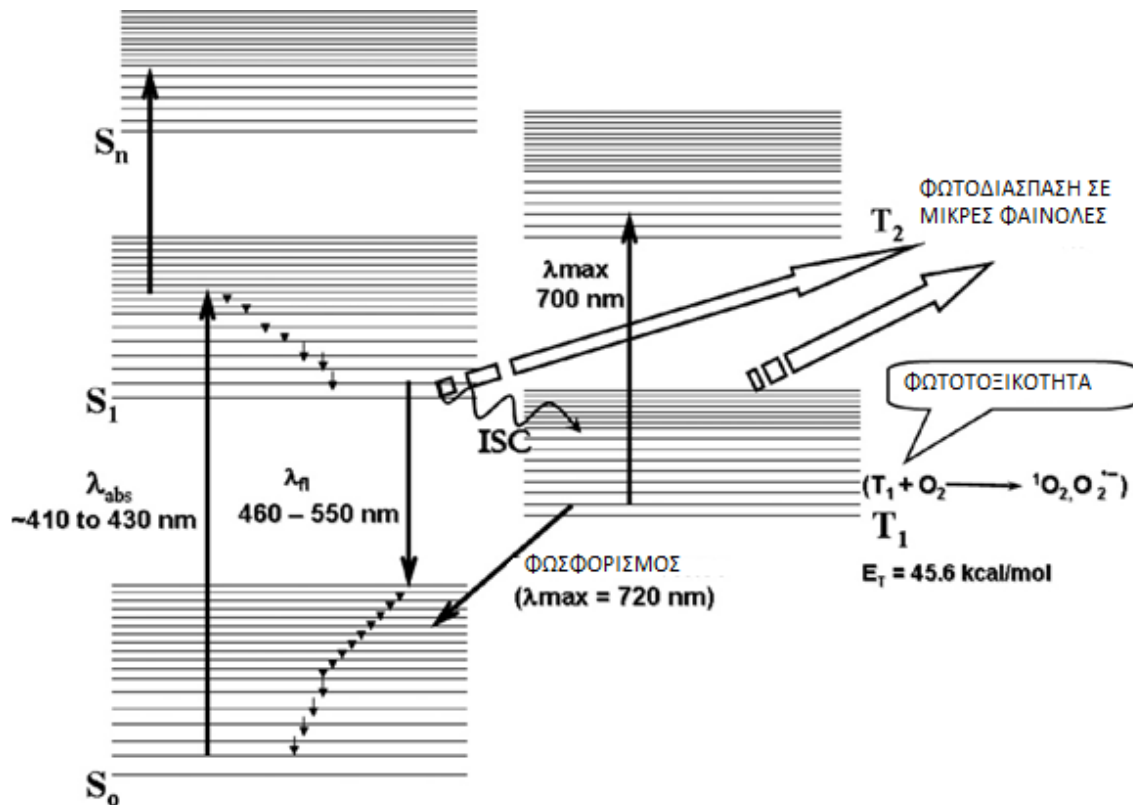
Η φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης έχει αναφερθεί και σε μορφή διαλύματος άλλα και σε στερεή μορφή. Σε οργανικούς διαλύτες, η κουρκουμίνη υποβάλλεται σε υπεριώδη φωτόλυση και η ανάλυση HPTLC έδειξε σχηματισμό τριών προϊόντων αποικοδόμησης. Επιπλέον και η έκθεση στο ηλιακό φως παρουσίασε περισσότερα προϊόντα αποικοδόμησης. Αν και η υδρολυτική αποικοδόμηση μειώθηκε, η φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης αυξάνεται παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων και κυκλοδεξτρίνης. Ωστόσο, ο μηχανισμός της φωτοαποικοδόμησης δεν είναι σαφής και τα συσσωρευμένα στοιχεία δείχνουν ότι η παρουσία ή η απουσία της ομάδας φαινολικού OH δεν παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Η υποβάθμιση προχωρά κυρίως μέσα από το σπάσιμο του α -συνδέσμου δικετόνης που σχηματίζει μικρότερες φαινολικές ενώσεις, βανιλίνη και φερουλικό οξύ λόγω των φαινολικών προϊόντων που προσδιορίζονται κατά τη φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης. Μερικές από αυτές τις μικρότερες φαινόλες πολυμερίζονται για να σχηματίσουν φαινολικά πολυμερή.

Η φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης επηρεάζεται από την παρουσία αλάτων σιδήρου και αργιλίου και από νανοσωματίδια όπως ο φερρίτης αργύρου και ψευδαργύρου. Αν και η ίδια η κουρκουμίνη υφίσταται φωτοαποικοδόμηση, η προσθήκη της ωστόσο καθυστέρησε τη φωτοαποικοδόμηση φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τοπικές εφαρμογές όπως η τρετινοΐνη και το αντιμεταστατικό σύμπλοκο ρουθηνίου NAMI-A. Η αυξημένη φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης παρουσία των νανοσωματιδίων και των μεταλλικών αλάτων χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μεθόδων για την αφαίρεση κηλίδων από βαμβακερά υφάσματα²⁵.

- Φωτοτοξικότητα

Από την αρχαιότητα, η κουρκουμίνη ήταν χρήσιμη για την προστασία του δέρματος από τις βλαβερές επιδράσεις του φωτός. Συγκεκριμένα, στην Ινδία χρησίμευε για τη θεραπεία δερματικών ασθενειών όπως η ψωρίαση, η λέπρα κλπ. Λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης, οι συνθέσεις λοσιόν δέρματος που βασίζονται σε αυτή, γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς ως παράγοντες για την προστασία του δέρματος από τα ηλιακά εγκαύματα. Στο πρόσφατο παρελθόν, η κουρκουμίνη έχει εξεταστεί για φωτοτοξικότητα σε διαφορετικά συστήματα. Μία ομάδα ερευνητών, Tonnesen και οι συνεργάτες του,

ερεύνησαν τη φωτοβιολογική δραστικότητα της κουρκουμίνης σε βακτηριακά συστήματα ύστερα από ακτινοβολήση με φωτεινή πηγή μήκους κύματος 420 nm. Παρατηρήθηκε ότι η κουρκουμίνη σε συνδυασμό με το φως παρουσίαζε γονιδιοτοξικότητα για την *E. coli*. Ακολούθως, η ερευνητική ομάδα Dahl και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν τη φωτοτοξικότητα της κουρκουμίνης σε μικρογραμμομοριακές ποσότητες, σε βακτηριακά συστήματα και επίσης σε κύτταρα θηλαστικών. Αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι η κουρκουμίνη εμφάνισε φωτοτοξικότητα εξαρτώμενη από το οξυγόνο σε όλα αυτά τα συστήματα. Παρομοίως, εξετάστηκε η εφαρμογή της σε κυτταρικό μοντέλο βασεόφιλης λευχαιμίας αρουραίου, όπου η κουρκουμίνη με την παρουσία φωτός επέδρασε θετικά στην θανάτωση των κυττάρων που οφείλονταν για την ασθένεια αυτή.



Σχήμα 14 Σχηματική αναπαράσταση φωτοφυσικής και φωτοχημικής διεργασίας στη κουρκουμίνη

4.2.3 Εφαρμογές στο κλάδο φαρμακολογίας

Αρκετές αναφορές έχουν τεκμηριώσει την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα της κουρκουμίνης με την οποία μετριάζεται η υπεροξείδωση των λιπιδίων και εμφανίζει οξειδωτικό στρες σε αρκετούς ιστούς. Οι αντιμικροβιακές δράσεις οφείλονται στην

ικανότητα της κουρκουμίνης για τροποποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως είναι το υπεροξειδίο δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης (Nabavi). Σε αυτό το πλαίσιο, η κουρκουμίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο δραστική από τη βιταμίνη E (Shishodia κ. ά. 2006). Ακόμη, η κουρκουμίνη έχει την ικανότητα να αντιδρά με τηθειόλη της γλουταθειόνης και τηςθειορεδοξίνης 1 (Adams κ. ά 2005). Είναι γνωστό ότι οι φαινολικές ομάδες υδροξυλίου παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης (Feng and Liu 2009).

Η δράση της κουρκουμίνης έχει επίσης αναφερθεί σε μελέτες σχετικά με τη διμεθυλοτετραϋδροκουρκουμίνη. Επί πλέον, έχει αναφερθεί ότι η ορθο-αλκοξυ ομάδα παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση της κουρκουμίνης (Amorati κ.ά 2009). Υπό συνθήκες *in vivo*, η θέση του υδροξυλίου, κατέχει έναν κρίσιμο ρόλο στη βελτίωση του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των κουρκουμινολογικών (Somparn κ. ά 2007).

Η αντιφλεγμονώδης δράση της κουρκουμίνης εν μέρει προκαλείται μέσω αναστολής της δραστηριότητας της κινάσης IkB που οδηγεί σε καταστολή της ενεργοποίησης του NF-kB. Έχει αποδειχθεί ότι ο κορεσμός του αλκενίου και η μείωση των λειτουργιών του καρβονυλίου οδηγεί στη μείωση του αντιφλεγμονώδους αποτελέσματος. Σύμφωνα με την Nurfina κ ά (1997), η παρουσία του τμήματος 4-υδροξυφαινυλίου είναι απαραίτητη για την αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα της κουρκουμίνης. Βρήκαν επίσης ότι το αντιφλεγμονώδες αποτέλεσμα, θα μπορούσε να ενισχυθεί εάν προκύψουν επιπρόσθετες ομάδες αλκυλίου ή αλκοξυλίου στις θέσεις 3 και 5 στον δακτύλιο φαινυλίου (Χονγκ κ. ά 2004). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η ακυλίωση και η αλκυλίωση της φαινολικής υδροξυλομάδας της κουρκουμίνης μειώνει σοβαρά την αντιφλεγμονώδη δράση (Anand κ. ά 2008). Η ερευνητική ομάδα του Χονγκ το 2004, απέδειξαν περαιτέρω ότι η παρουσία φαινολικών υδροξυ ομάδων είναι απαραίτητη για την ανασταλτική δράση του COX-1 κουρκουμίνης. Μέχρι σήμερα έχουν τεκμηριωθεί αρκετές επιστημονικές εκθέσεις για τα αντικαρκινικά αποτελέσματα της κουρκουμίνης σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (Dunoi κ.ά 2005, Johnson and Mukhtar 2007, Wilken κ ά 2011 Yan κ ά 2012). Αυτά τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση του μετασχηματισμού των κυττάρων (Bakhshi κ ά 2008), προαγωγή όγκων (Dance-Barnes κ ά 2009), έναρξη καρκινώματος (Huang κ ά 1992), αγγειογένεση (Kunnumakkara κ ά 2007), εισβολή (Kim Im κ ά 2008) και μετάσταση (Kunnumakkara κ ά 2008). Η δυνατότητα της κουρκουμίνης στην καταστολή της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, το συκώτι και το δέρμα (Sethi κ ά 2009) έχει επίσης καθιερωθεί. Επιπλέον, η κουρκουμίνη εμφάνισε αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα κατά διάφορων τύπων κυττάρων όγκου, όπως στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Nautiyal κ ά 2010), Β-κύτταρα και Τ-κύτταρα λευχαιμία (Angelo και Kurzrock 2009), επιδερμοειδές καρκίνωμα (Chan κ ά 2003) και διάφορους τύπους καρκινώματος του μαστού (Liu κ ά 2009) έχουν αναφερθεί από διάφορους συντάκτες.

Η παρουσία των ομάδων υδροξυφαινυλίου συμβάλλει περαιτέρω στην χημειοπροστατευτική δράση της κουρκουμίνης (Pullakhandam κ ά 2009).

Η κουρκουμίνη έχει ισχυρή δράση ενάντια σε διάφορους τύπους ιών, όπως ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας-1 (Chai κ ά 2005), έρπης απλός ιός-1 (Kutluay κ ά 2008), ιός ηπατίτιδας C (Kim κ ά 2010), τον ιό της γρίπης (Chen κ ά 2010), τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (Prusty and Das 2004) και ούτω καθεξής. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η κατανάλωση κουρκουμίνης έχει προστατευτικό ρόλο κατά της αθηροσκλήρωσης (Shin κ.ά 2011) και του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Wang κ ά 2012). Περαιτέρω βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η κουρκουμίνη βελτιώνει τη διαβητική εγκεφαλοπάθεια σε πειραματικούς αρουραίους (Kuhad και Chopra 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ (PDT)

5.1 Κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής

Τελικά, η κουρκουμίνη λόγω της τοξικότητας που παρατηρήθηκε σε υπομικρομοριακές συγκεντρώσεις και με χαμηλή δόση φωτός, αποδείχθηκε ως πιθανός φωτοευαισθητοποιητής για την θεραπεία του καρκινού.

Η φωτοτοξικότητα της κουρκουμίνης προκάλεσε συρρίκνωση των κυττάρων, και σε τελικό στάδιο απόπτωση των καρκινικών κυττάρων-στόχων. Έτσι αποδείχθηκε κατάλληλη ως φωτοευαισθητοποιητής και χημειοθεραπευτικός παράγοντας. Τα αποτελέσματα της φωτοτοξικότητας της κουρκουμίνης έχουν αποδοθεί σε δύο μηχανισμούς, μη εξαρτώμενο από το οξυγόνο και εξαρτώμενο από οξυγόνο. Τα φωτοπροϊόντα της κουρκουμίνης και οι δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όπως μόρια οξυγόνου στη βασική κατάσταση (singlet oxygen) και ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της φωτο-διεγερμένης κουρκουμίνης με οξυγόνο, ευθύνονται για την φωτοτοξικότητα.

Λόγω του σημαντικού ρόλου του $^1\text{O}_2$ στη φωτοδυναμική θεραπεία και με στόχο την ανάπτυξη της κουρκουμίνης ως φωτοδυναμικό παράγοντα, έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τη δημιουργία και τις αντιδράσεις του $^1\text{O}_2$ με την κουρκουμίνη. Στην φωτοδυναμική δράση, ένα μόριο φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή κατάσταση αντιδρά με μοριακό οξυγόνο για την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενώ η αντιοξειδωτική δράση απαιτεί το μόριο του οξυγόνου να βρίσκεται στη βασική του κατάσταση $^1\text{O}_2$. Δεδομένου ότι η κουρκουμίνη παρουσιάζει και αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση, υπήρξαν ξεχωριστές μελέτες που αναφέρουν την δημιουργία $^1\text{O}_2$ ή τις αντιδράσεις του, από τη φωτο-διεγέρση²⁶.

5.2 Εφαρμογές της PDT με την κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι προλαμβάνει και εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου και πληρεί τις τέσσερις βασικές απαιτήσεις για την καταπολέμησή του που αναζητούν οι ερευνητές. Συγκεκριμένα:

- Αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έχει την ικανότητα να σταματήσει τα καρκινικά κύτταρα από τη διάσπαση και τη διάδοση.
- Είναι σε θέση να διαφοροποιήσει τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού.
- Προάγει τη διαδικασία της απόπτωσης.
- Αποκόπτει τη παροχή του αίματος σε καρκινικά κύτταρα²⁷.

Η κουρκουμίνη όπως αναφέρθηκε , είναι μία χρωστική ουσία που εκχυλίζεται από τα ριζώματα του φυτού *Curcuma longa* και διαθέτει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές φαρμακευτικές ιδιότητες. Αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έδειξαν ότι η κουρκουμίνη είναι ικανή για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία ως φωτοευαισθητοποιητής καθώς εμφανίζει μη τοξικά αποτελέσματα και μπορεί να ανιχνευθεί μέσω μιας ευρείας κορυφής απορρόφησης, στην περιοχή των 300-500 nm (μέγιστο 430 nm). Επιπλέον, με την ικανότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων με λογικό κόστος, ως PS θα μπορούσε να προσφέρει οικονομικά ελκυστική λύση.

Η εφαρμογή της κουρκουμίνης με επίκεντρο την αντιμικροβιακή δράση, αποτελεί πρόσφατη προσέγγιση από την ερευνητική ομάδα του Hegge. Παρατηρήθηκε ότι η κουρκουμίνη συσχετιζόμενη με β -cyclodextrin 0.01%, ακτινοβολήθηκε με κατάλληλο μπλε φως (έντασης 29 J cm^{-2}), και εμφάνισε υψηλή φωτοτοξικότητα έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*. Ακόμη, υψηλή φωτοτοξικότητα παρατηρήθηκε στη χρήση κουρκουμίνης σε μορφή biofilm και planktonik²⁸.

Συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες in vitro για την αποτελεσματικότητα της κουρκουμίνης σε συνδυασμό με το φως. Η κουρκουμίνη με μορφή βιολογικό φιλμ (biofilm), σε συνδυασμό με ακτινοβολία μπλε LED φωτός, παρουσίασε αποτελεσματική μείωση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών *L.acidophilus* και του *S.mutans*, αντιμετωπίζοντας το σημαντικότερο βακτηρίδιο που εμπλέκεται στο πρόβλημα της οδοντικής τερηδόνας²⁹.

Επίσης, η χρήση της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την αντιμετώπιση του τραχηλικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η κουρκουμίνη ως σκεύασμα νανογαλακτώματος και η πηγή ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια συσκευή υψηλής ισχύος LED (209 W/cm^2). Το σύστημα παροχής νανογαλακτώματος για την κουρκουμίνη που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη ενσωματώθηκε αποτελεσματικότερα από την ελεύθερη κουρκουμίνη και για τις δύο κυτταρικές σειρές που ευθύνονται για το καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας (CasKi και SiHa). Το νανογαλάκτωμα-κουρκουμίνη ήταν ικανό να οδηγήσει σε θάνατο με τη διαδικασία της απόπτωσης, μόνο στα καρκινικά κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν³⁰.

Ακόμη, η κουρκουμίνη σε συνδυασμό με ακτινοβολία LED (600 mW/cm^2) οδήγησε σε μείωση αποικιών των βακτηρίων του στόματος στις οποίες οφείλονται οι μολύνσεις του στόματος³¹.

Όσον αφορά τον καρκίνο του δέρματος, καταλυτική ήταν η χρήση της κουρκουμίνης σε μορφή κρέμας για τοπική χρήση στον καρκινικό στόχο. Συγκεκριμένα μελετήθηκε για την αντιμετώπιση του επιθητικού πλακώδους καρκινώματος του δέρματος που εντοπίζεται κυρίως στις USA. Η μελέτη έγινε in vivo, όπου η κρέμα κουρκουμίνης

διαμορφώθηκε με σκοπό να δεισδύσει στην επιδερμίδα του ανθρώπινου δέρματος. Με επιτυχία έγιναν οι μελέτες σε ποντικούς λόγω του μικρού πάχους του δέρματός τους και την άμεση διείσδυση στον όγκο. Σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε σημαντική αναστολή αρκετών βιοδεικτών του μονοπατιού AKT / mTOR καθώς και κύτταρα SRB12-P9 STAT3 και ERK1/2 μετά από αγωγή κουρκουμίνης με συγκέντρωση 20μM³². Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη επάγει τη διαδικασία της απόπτωσης σε κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος (30-60 μM για 24 ώρες) [Bush κ.ά, 2001], σε ανθρώπινα κύτταρα προμυελοτικής λευχαιμίας HL-60 (10-40 μM για 16-24 h) [Κυο κ.ά, 1996 Anto κ.ά., 2002], και MCF-7 κύτταρα καρκίνου του μαστού (25 μM για 24 ώρες) [Choudhuri κ. ά. , 2002]. Ακόμη, καταλυτική ήταν η χρήση της κουρκουμίνης έναντι καρκινικών κυττάρων του μαστού (10 μM για 12 ώρες) [Jaruga κ.ά, 1998 Somasundaram κ.ά., 2002]. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η κουρκουμίνη σε συνδυασμό με UV- ακτινοβολία επάγει τον σχηματισμό ROS και την απόπτωση σε κύτταρα A431 επιδερμοειδούς καρκινώματος (25-50 μM για 2-3 h) [Chan κ.ά., 2003]³³. Επιπροσθέτως, έγιναν μελέτες σε δερματικά τραύματα φυσιολογικών και διαβητικών ζώων. Παρατηρήθηκαν κάποιες βελτιώσεις στις τενομετρικές ιδιότητες μέσω βιοδιέγερσης με λείζερ, στην οποία προτάθηκε βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς³⁴.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1 Σκοπός

Στη παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε συγκριτική μελέτη των συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης αλλά και του μείγματος των κουρκουμινοείδων για τη χρήση τους ως PS στη φωτοδυναμική θεραπεία. Δεδομένου ότι οι PS πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά για να εφαρμοστεί επιτυχώς η PDT.

Αρχικά, για την διεκπεραίωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε:

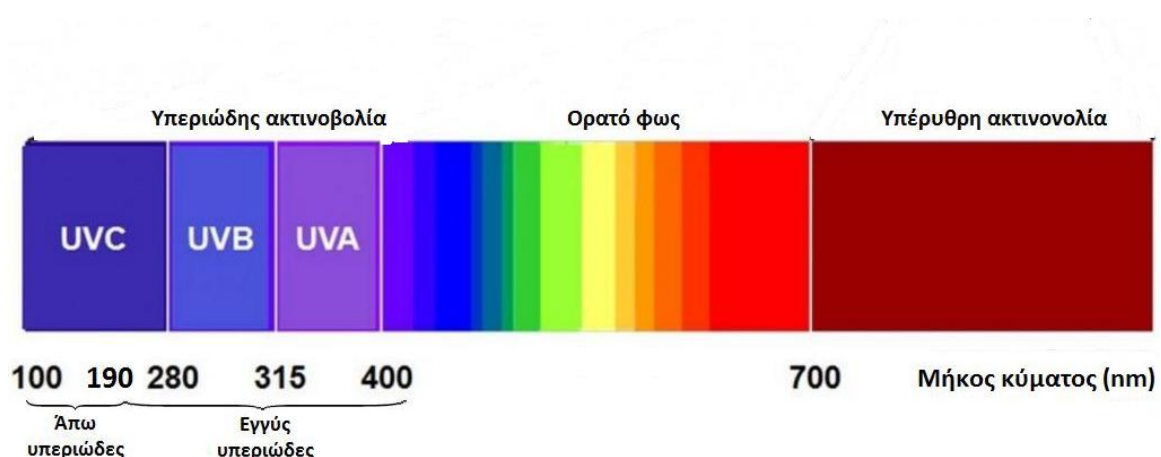
- Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των PS.
- Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών.
- Μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης των PS σε υγιή δερματικά κύτταρα HFFF2.

Στόχος είναι η μελέτη της δραστικότητας των συγκεκριμένων παραγώγων κουρκουμίνης στη PDT.

6.2 Πειραματικές διατάξεις

6.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης³⁵

Η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) όπως όλες οι φασματομετρικές μέθοδοι, βασίζονται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Υπάρχουν πολλά και διαφορετικά είδη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με ευρύ φάσμα συχνοτήτων και μηκών κύματος. Στη φασματοφωτομετρία UV-Vis, που ανήκει στις φασματομετρικές μεθόδους μοριακής απορρόφησης, εργαζόμαστε κυρίως με υπεριώδη ακτινοβολία (μήκη κύματος από 100 έως 400 nm) και ορατό φως (400-700 nm). Στο σχήμα 15 που ακολουθεί φαίνεται ένα μικρό μέρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.



Σχήμα 15 Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Το φαινόμενο που μελετάται, είναι η απορρόφηση ακτινοβολίας με μήκη κύματος από 100 έως 800 nm από τα μόρια του υπό εξέταση δείγματος. Συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια των δεσμικών και μη δεσμικών μοριακών τροχιακών χαμηλής ενέργειας, μεταπηδούν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες με απορρόφηση φωτονίων στα προαναφερθέντα μήκη κύματος.

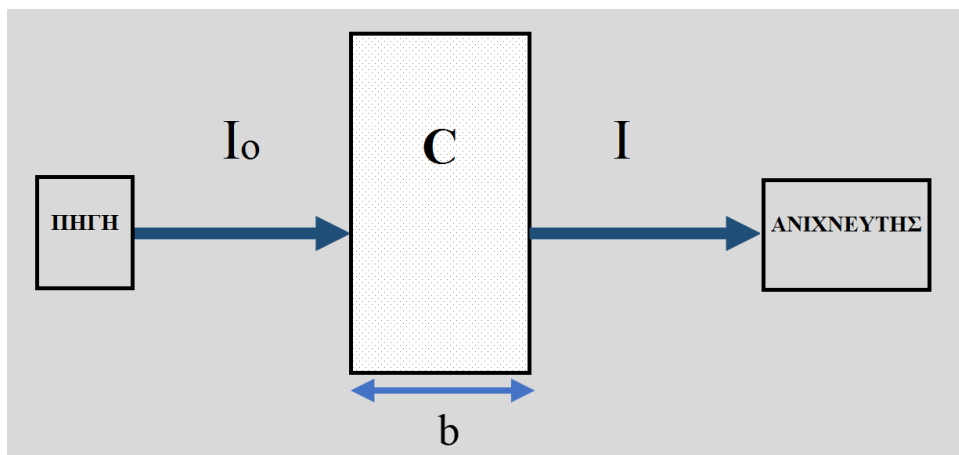
Το μετρούμενο μέγεθος της μεθόδου είναι η διαπερατότητα T (transmittance) η οποία ορίζεται ως: $T = I/I_0$, όπου I_0 η αρχική ένταση της ακτινοβολίας και I η ένταση της ακτινοβολίας μετά την απορρόφηση από το δείγμα (σχήμα 16). Είναι προφανές ότι θα πρέπει: $T \leq 1$, με την ισότητα να ισχύει μόνο αν το δείγμα δεν απορροφά καθόλου ακτινοβολία στο μήκος κύματος που εργαζόμαστε. Οι αναλύσεις διαλυμάτων υπακούουν στο νόμο Lambert-Beer : $A = -\log T = -\log(I/I_0) = \epsilon b C$ (1)

όπου A : Απορροφητικότητα

ϵ : Γραμμομοριακή απορροφητικότητα (σταθερά)

b : Μήκος διαδρομής ακτίνας μέσα στην κυψελίδα σε cm (Συνήθως ταυτίζεται με το μήκος της κυψελίδας και είναι περίπου 1cm).

C : Συγκέντρωση αναλύτη.



Σχήμα 16 Σχηματική αναπαράσταση ακτινοβολίας και νόμος Lambert-Beer

Για να πραγματοποιηθεί απορρόφηση ακτινοβολίας, τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα πρέπει να έχουν ενέργεια ίση με αυτή που χρειάζεται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή. Η ενέργεια των ηλεκτρονικών μεταπτώσεων (της τάξεως μερικών eV), δίνεται από τον τύπο : $E = E_1 - E_2 = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$ (2)

όπου E η ενέργεια, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας και λ το μήκος κύματος.

Συνεπώς, με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να γίνει ανάλυση ενώσεων όπως: αλκοόλες ($-\text{OH}$), αιθέρες ($-\text{OR}$), αμίνες ($-\text{NH}_2$), θειόλες ($-\text{SH}$) καθώς και οργανικών ενώσεων με αλογόνα. Επίσης μπορούν να εξεταστούν ανόργανες ενώσεις που παρουσιάζουν ζώνες απορρόφησης στο UV καθώς και σύμπλοκα αφού τα ηλεκτρόνια των ημιπολικών δεσμών διεγείρονται με παρόμοιο τρόπο.

Σημαντικό στοιχείο στη φασματομετρία UV-Vis αποτελεί η καμπύλη αναφοράς ή βαθμονόμησης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα. Είναι αναγκαία ώστε να συσχετίζεται το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή με τη συγκέντρωση του δείγματος. Γενικά, στις φασματομετρικές μεθόδους, η μεταβολή της συγκέντρωσης μιας ουσίας δεν σημαίνει ότι είναι απαραίτητα ανάλογη με τη μεταβολή του σήματος του ανιχνευτή. Για το λόγο αυτό κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς έτσι ώστε να είναι γραμμική στην περιοχή της συγκέντρωσης του προς ανάλυση δείγματος, και να μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Η φασματομετρία UV-Vis βρίσκει πολλές και σημαντικές εφαρμογές. Χρησιμοποιείται κυρίως για ποσοτικούς και όχι ποιοτικούς προσδιορισμούς καθώς δίνει πληροφορίες για ορισμένες ομάδες ενός μορίου και όχι για ολόκληρο το μόριο.

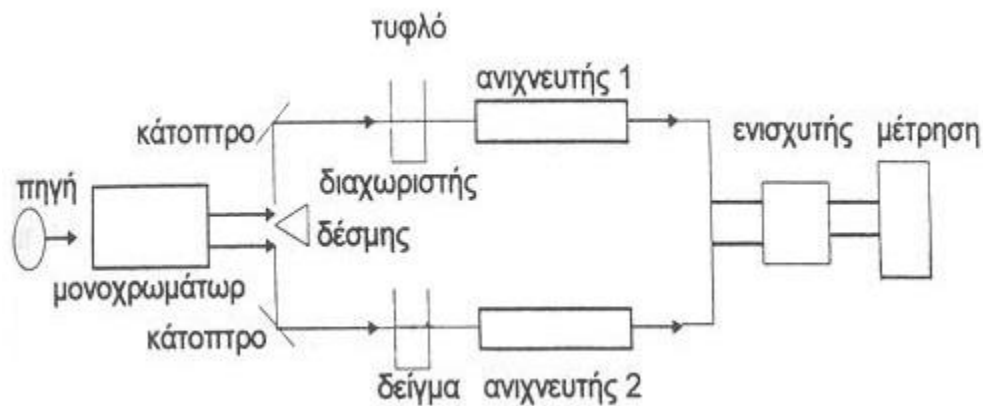
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Η ακτινοβολία διέγερσης, είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του φασματοφωτομέτρου, η οποία εκπέμπεται από **λυχνίες** (lamps). Για τη φασματομετρία UV-Vis χρησιμοποιούμε δύο λυχνίες, μία λάμπα υδρογόνου για την περιοχή UV και μία βολφραμίου (κοινός λαμπτήρας πυρακτώσεως) για την περιοχή του ορατού. Το φάσμα εκπομπής που παράγεται είναι συνεχές. Για την απομόνωση του μήκους κύματος που χρειαζόμαστε, χρησιμοποιείται ο **μονοχρωμάτορας** (monochromator), ο οποίος έχει τη δυνατότητα της συνεχούς μεταβολής του μήκους κύματος κατά την μέτρηση (σάρωση φάσματος). Το προς ανάλυση **δείγμα** (sample) τοποθετείται σε **κυψελίδα** (cuvette) η οποία τοποθετείται κάθετα στον υποδοχέα ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες λόγω ανάκλασης ενώ ο μηνίσκος του διαλύματος βρίσκεται πάνω από τη διερχόμενη δέσμη ακτινοβολίας. Οι κυψελίδες πρέπει να κατασκευάζονται από υλικό το οποίο επιτρέπει τη διέλευση της ακτινοβολίας στην περιοχή μελέτης. Ενδεικτικές κυψελίδες, κατασκευάζονται από γυαλί, χαλαζία ή πλαστικό (πολυστυρένιο). Οι κυψελίδες από γυαλί απορροφούν σε περιοχές UV κάτω από 350 nm ενώ αυτές από πλαστικό σε περιοχές κάτω από 300 nm και είναι κατά πολύ φθηνότερες, οι οποίες και χρησιμοποιούνται μόνο για υδατικά διαλύματα. Οι κυψελίδες χαλαζία είναι οι πιο ακριβές, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν σε όλο το φάσμα του εγγύς υπεριώδους. Αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση μας είναι κατασκευασμένες από γυαλί και πριν τη χρήση τους, είναι απαραίτητο να καθαρίζονται

προσεκτικά και να διατηρούνται σε στεγνό μέρος (ξηραντήρας ή συσκευασία). Οι κυψελίδες κατασκευάζονται έτσι, ώστε η διαδρομή του φωτός μέσα σε αυτές να είναι περίπου 1 cm, όπως αναφέρθηκε. Το φως που διέρχεται από αυτές καταλήγει στον **ανιχνευτή** (detector), ο οποίος παράγει ηλεκτρικό σήμα ανάλογα με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Διάταξη φασματοφωτόμετρου UV-VIS

Ο μονοχρωμάτορας (πρίσμα, ή περιθλαστικό φράγμα), αναλύει τα λευκό φως στις διάφορες μονοχρωματικές περιοχές του και επιλέγει το επιθυμητό μήκος κύματος, με μεγάλη ακρίβεια. Ο διαχωριστής δέσμης, χωρίζει την εξερχόμενη δέσμη σε δύο ίσα μέρη. Οι κυψελίδες που περιέχουν το τυφλό και το δείγμα μέτρησης, κατασκευάζονται από χαλαζία για την περιοχή UV, ή και από ύαλο για την περιοχή VIS. Οι ανιχνευτές 1 και 2 συνδυαζόμενοι βρίσκουν το σήμα που οφείλεται στην ουσία που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Ο ενισχυτής, ενισχύει το εξερχόμενο σήμα. Η μέτρηση, ή και καταγραφή του σήματος γίνεται από ευαίσθητη φωτοδίοδο και εκφράζεται σαν απορρόφηση, ή διαπερατότητα. Στο σχήμα 17 παρουσιάζεται και σχηματικά η πειραματική διάταξη που περιγράφηκε.



Σχήμα 17 Πειραματική διάταξη UV-Vis

ΟΡΙΣΜΟΙ

- α) Το μήκος κύματος όπου παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, καλείται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ . Σε αυτή τη τιμή του μήκους κύματος πραγματοποιούνται όλες οι μετρήσεις.
- β) Λευκό διάλυμα, ή τυφλό δείγμα (blank), είναι το διάλυμα που έχει υποστεί όλες ακριβώς τις επεξεργασίες όπως και το άγνωστο, αλλά δεν περιέχει την ουσία που

εξετάζουμε. Η κυψελίδα που περιέχει το λευκό διάλυμα ονομάζεται και κυψελίδα αναφοράς. Είναι κατασκευασμένη από χαλαζία, ή γυαλί ανάλογα με την περιοχή μέτρησης.

γ) Καμπύλη αναφοράς, ή βαθμονόμησης (calibration curve), ονομάζεται η καμπύλη που προκύπτει από τη γραφική απεικόνιση των αριθμητικών τιμών μιας φυσικοχημικής ιδιότητας του δείγματος (A ή $T\%$), σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ουσίας. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζετε η τιμή της συγκέντρωσης. Σωστές μετρήσεις λαμβάνονται όταν η μικρότερη τιμή της $\%T$ είναι 10% και η μέγιστη οριακή τιμή της απορρόφησης μονάδα, ($A=1$).

Για την μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των κουρκουμινών, έγινε χρήση μίας φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης, με χρήση του μηχανήματος του εργαστηρίου εταιρείας Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer³⁶ (σχήμα 18).

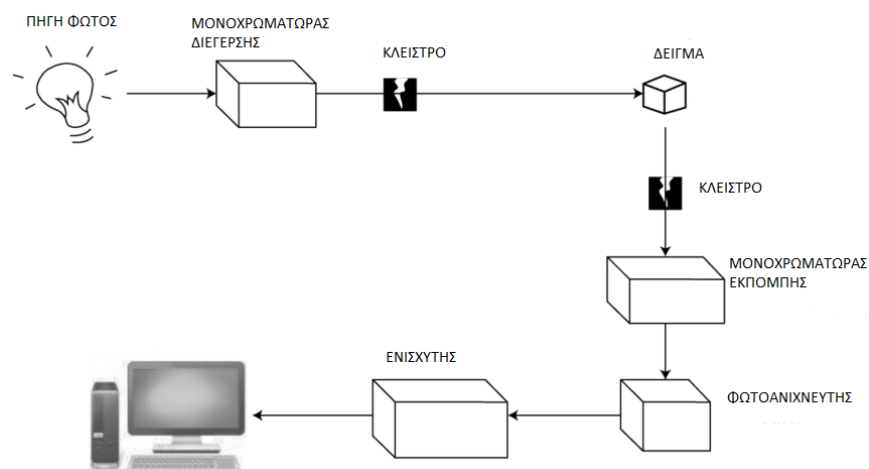


Σχήμα 18 Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

6.2.2 Φασματοφωτομετρική διάταξη φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού (επίσης γνωστή ως φθορισμομετρία ή φασματοφθορομετρία) είναι ένας τύπος ηλεκτρομαγνητικής φασματοσκοπίας που αναλύει φθορισμό από ένα δείγμα. Περιλαμβάνει τη χρήση δέσμης φωτός, συνήθως υπεριώδους φωτός, που διεγείρει τα ηλεκτρόνια σε μόρια ορισμένων ενώσεων και τα αναγκάζει να εκπέμπουν φως. Συσκευές μέτρησης φθορισμού ονομάζονται φθορίμετρα. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται μία λάμπα ξένου (Xenon flash tube) και καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ακτινοβολίας. Η προερχόμενη από την πηγή ακτινοβολία, εστιάζεται και ανακλάται από ελλειψοειδές κάτοπτρο σ'ένα επιπλέον κάτοπτρο έως ότου φθάσει στη σχισμή εισόδου όπου βρίσκεται ο μονοχρωμάτορας διέγερσης. Ακολούθως, το μονοχρωματικό φως εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου σε μια 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 με τη βοήθεια κατόπτρου προσπίπτει στο δείγμα, ενώ το υπόλοιπο μέρος της ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Η πειραματική διάταξη εμφανίζεται σχηματικά στο σχήμα 19.



Σχήμα 19 Σχηματική αναπαράσταση φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση της φασματοσκοπικής διάταξης φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (σχήμα 20) ελέγχεται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. 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 κύματος³⁷.



Σχήμα 20 Όργανο μέτρησης φασματοσκοπίας φθορισμού, Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer

6.2.3 Διάταξη ακτινοβολήσης

Κατά την πορεία των πειραμάτων, έγινε χρήση διάταξης ακτινοβολήσης, όπου μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών των κουρκουμινών αλλά και κατά την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα τύπου HFF2.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων, ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 10W, η οποία απεικονίζεται στο σχήμα 21. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας αναφέρονται στο παρακάτω πίνακα 1:



Σχήμα 21 Bridgelux Power LED 10W

Θερμοκρασία χρώματος	Actinic violet
Μήκος κύματος	415-420nm
Voltage	11V@1A
Radiant Flux	1800-2000mW@1A
Μέγιστο φορτίο	1A(προτεινόμενο)
Γωνία φακού	120degrees
Θερμοκρασία Λειτουργίας	-20°C~70°C

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

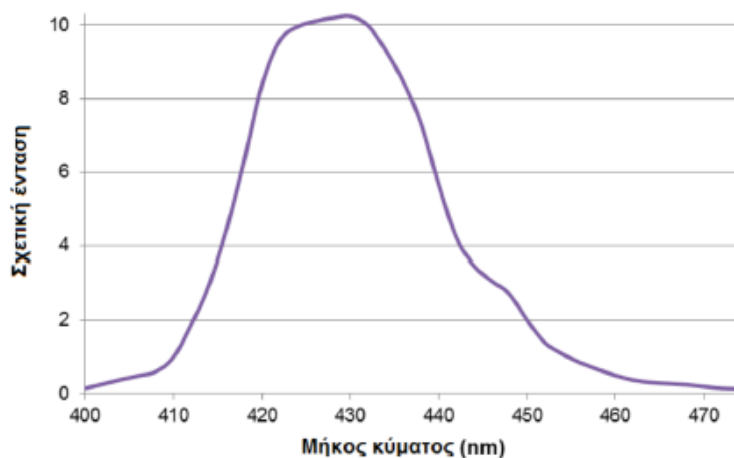
Έτσι, κατασκευάστηκε διάταξη ακτινοβολήσης (σχήμα 22), κατά την οποία ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 10W σωλήνα για τη συγκέντρωση της ακτινοβολίας στο εκάστοτε δείγμα, ποτενσιόμετρο που είναι αναγκαίο για τη ρύθμιση της έντασης ακτινοβολήσης μέσω της αυξομείωσης της ισχύος αλλά και βάση ψύξης με ενσωματωμένο ανεμιστήρα.



Σχήμα 22 Διάταξη ακτινοβολήσης

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακτινοβολήσης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας της διάταξης ως προς το μήκος κύματος. Το φάσμα απεικονίζεται στο διάγραμμα 1 και η μέτρηση έγινε με χρήση της πηγής, του μονοχρωμάτορα, αντίστασης και πολύμετρου. Με τη χρήση του μονοχρωμάτορα, η προσπίπτουσα στην είσοδό του ακτινοβολία από την πηγή, αναλύεται και στην έξοδό του επιλέγεται μία καθορισμένη φασματική περιοχή. Ακολούθως, με τη χρήση του πολύμετρου πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τάσης η οποία προκαλεί η εξερχόμενη ακτινοβολία στη συνδεδεμένη αντίσταση.

Πηγή ακτινοβολήσης πειραμάτων παραγωγής ελ. ριζών



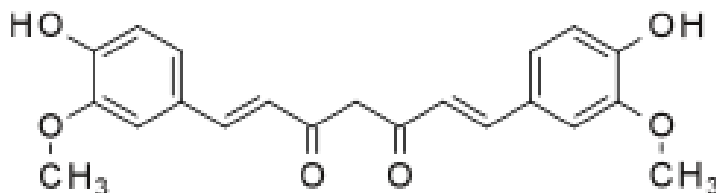
Διάγραμμα 1 Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος

6.3 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».

6.3.1 Curcumin I

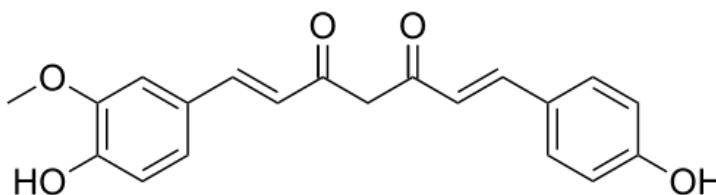
Το παράγωγο της κουρκουμίνης έχει χημικό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$ και πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Είναι σε μορφή κίτρινης σκόνης και το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 368,4. Η χημική της δομή απεικονίζεται στην σχήμα 23.



Σχήμα 23 Χημική δομή της κουρκουμίνης I

6.3.2 Curcumin II

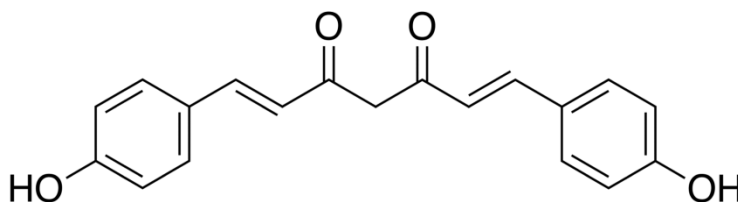
Το παράγωγο της κουρκουμίνης έχει χημικό τύπο $C_{20}H_{18}O_5$ και πλήρη ονομασία (1E,6E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione. Είναι σε μορφή σκόνης με χρώμα κίτρινο και ελαφρώς πορτοκαλί. Το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 338,3. Η χημική της δομή απεικονίζεται στο σχήμα 24.



Σχήμα 24 Χημική δομή της curcumin II

6.3.3 Curcumin III

Το παράγωγο της κουρκουμίνης έχει χημικό τύπο $C_{19}H_{16}O_4$ και πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Είναι σε μορφή σκόνης με χρώμα κίτρινο-πορτοκαλί. Το μοριακό βάρος της ουσίας είναι 308,38. Η χημική της δομή απεικονίζεται στο σχήμα 25.



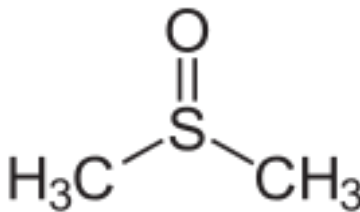
Σχήμα 25 Χημική δομή curcumin III

6.3.4 Curcumin mix

Αποτελεί μίγμα κουρκουμινολιδίων και συγκεκριμένη τα ποσοστά αναλογίας τους είναι curcumin I=80% , curcumin II=2% και curcumin III=18% και έχει μοριακό βάρος 368,38.

6.3.5 DMSO (dimethyl sulfoxide)

Το DMSO είναι άχρωμη ουσία και διατηρείται στους 20⁰C. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης των παραγώγων της κουρκουμίνης σε όλα τα πειράματα. Η χημική της δομή απεικονίζεται στο σχήμα 26.



Σχήμα 26 Χημική δομή της DMSO

6.3.6 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Το PBS είναι ένα άχρωμο υγρό που διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8⁰C. Αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε κυρίως στην καλλιέργεια κυττάρων και για έκπλυση. Η εμφάνιση του υγρού παρουσιάζεται στο εικόνα 27.



Σχήμα 27 Phosphate buffered saline

6.3.7 FBS (fetal bovine serum)

Το FBS χρησιμοποιήθηκε ως αυξητικός παράγοντας στη καλλιέργεια κυττάρων. Συγκεκριμένα είναι εμβρυϊκός ορός βοοειδών και διατηρείται στη κατάψυξη. Διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε παράγοντες προαγωγής εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η εμφάνισή του απεικονίζεται στο σχήμα 28.



Σχήμα 28 Fetal bovine serum

6.3.8 Αντιβιοτικό

Κατά τη πειραματική διαδικασία και συγκεκριμένα στις κυτταρικές καλλιέργειες απαραίτητη ήταν και η ύπαρξη αντιβιοτικού. Άχρωμο διάλυμα το οποίο βοηθάει στην αποφυγή βακτηριακής ή μυκητιακής μόλυνσης. Διατηρείται σε κατάψυξη.

6.3.9 DMEM

Το DMEM είναι μια τροποποίηση του Basal Medium Eagle (BME) που περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων και βιταμινών, καθώς και πρόσθετα συμπληρωματικά συστατικά. Ο αρχικός τύπος DMEM περιέχει 1000 mg / L γλυκόζης και αναφέρθηκε αρχικά για καλλιέργεια εμβρυϊκών κυττάρων ποντικού. Μια περαιτέρω τροποποίηση με 4500 mg / L γλυκόζη αποδείχθηκε ότι είναι βέλτιστη για την καλλιέργεια ορισμένων τύπων κυττάρων. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των κυττάρων. Η εμφάνισή του απεικονίζεται στο σχήμα 29.



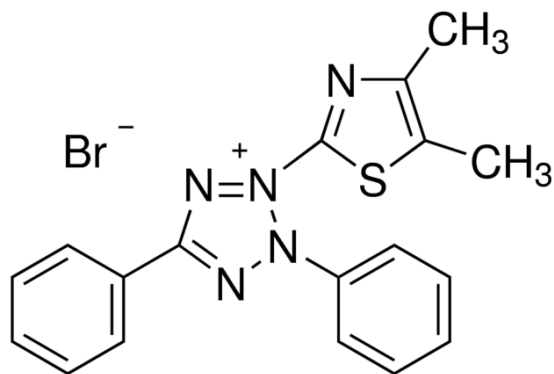
Σχήμα 29 DMEM

6.3.9 Τρυψίνη

Η τρυψίνη χρησιμοποιήθηκε για την αφαίρεση των προσκολλημένων κυττάρων από τη φλάσκα. Έχει έντονο ροζ χρώμα και διατηρείται σε κατάψυξη.

6.3.10 MTT

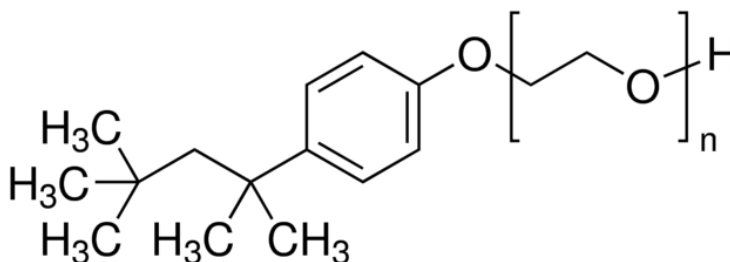
Το MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2,5-diphenyl-2 Htetrazolium Bromide) χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή αναλύσεων βιωσιμότητας κυττάρων. Αποτελεί ένα δείκτη, καθώς από κιτρινωπό διάλυμα μετατρέπεται σε σκούρο μώβ σύμπλοκο φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων. Η χημική δομή του MTT, απεικονίζεται στο σχήμα 30.



Σχήμα 30 Χημική δομή του MTT

6.3.11 Triton X

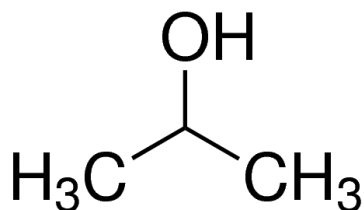
Το Triton X, χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ως συστατικό του διαλύτη του MTT. Αποτελεί μια μη ιονική επιφανειοδραστική ουσία αλλά και ένα γαλακτοματοποιητή που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία για τη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών. Η χημική δομή του Triton X, απεικονίζεται στο σχήμα 31.



Σχήμα 31 Χημική δομή του Triton X

6.3.12 Ισοπροπανόλη(isopropanol)

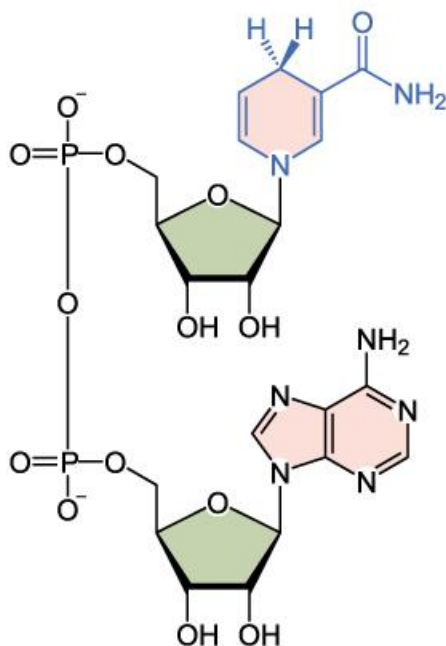
Η ισοπροπανόλη χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό για την αποστείρωση του εργαστηρίου αλλά και ως συστατικό του διαλύτη MTT. Αποτελεί μια άχρωμη, πολική οργανική ένωση και εξατμίζεται γρήγορα. Η χημική δομή της ισοπροπανόλης, απεικονίζεται στο σχήμα 32.



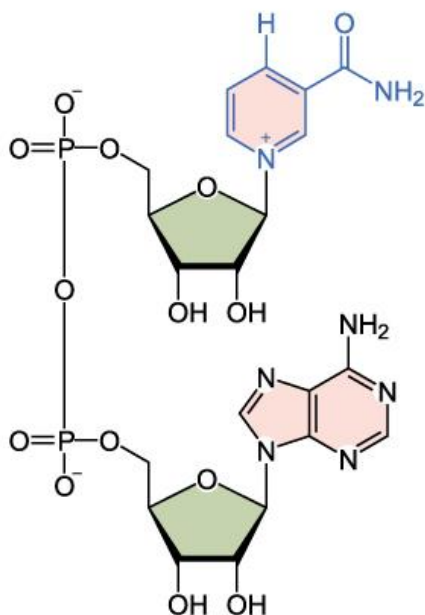
Σχήμα 32 Χημική δομή της ισοπροπανόλης

6.3.13 NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide)

Το NADH είναι νουκλεοτίδιο πυριδίνης το οποίο λειτουργεί ως οξειδωτικός συμπαράγοντας στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Λειτουργεί ως συνένζυμο για την καταλυτική δράση των ενζύμων εμπλέκεται όπου χρησιμεύει ως φορέας ηλεκτρονίων, όντας είτε σε οξειδωμένη κατάσταση (NAD⁺) είτε σε υποβαθμισμένη (NADH). Η ένωση αποτελείται από δύο νουκλεοτίδια ενωμένα μέσω των φωσφορικών τους ομάδων. Ένα νουκλεοτίδιο περιέχει μια βάση αδενίνης και το άλλο νικοτιναμίδιο. Η χημική δομή της NADH απεικονίζεται στο σχήμα 33 και η δομή του NAD⁺ στο σχήμα 34.



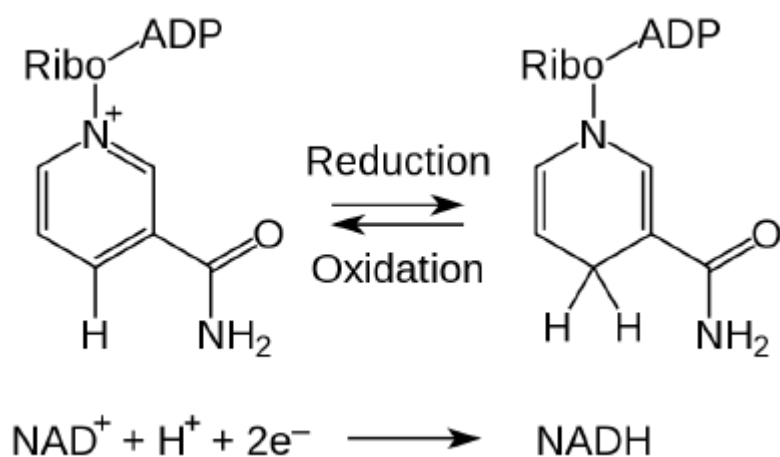
Σχήμα 33 Χημική δομή της NADH



Σχήμα 34 Χημική δομή της NAD⁺

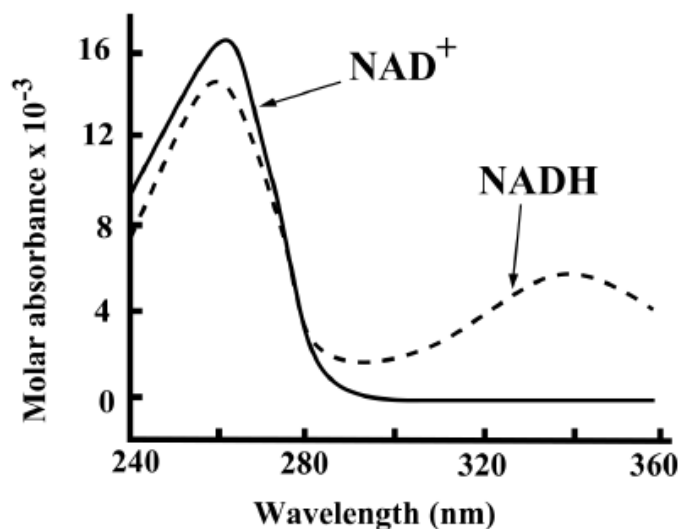
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ NADH

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 35, το NAD⁺ δρα ως φορέας ιόντων υδριδίων και έχει την δυνατότητα σχηματισμού του NADH. Ακολουθώντας, το ιόν υδριδίου απομακρύνεται ενζυματικά από ένα μόριο του υποστρώματος λόγω της δράσης αφυδρογονασών. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάση προς το NAD⁺, και τελικά οδηγούν στο σχηματισμού του NADH.



Σχήμα 35 Σχηματισμός NADH από NAD⁺ και αντίστροφα

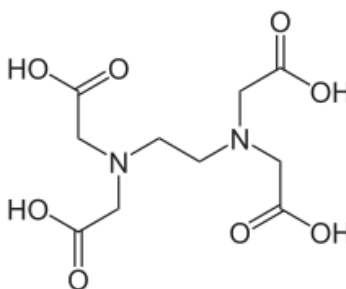
Το NADH έχει την ικανότητα να απορροφά σε μήκος κύματος 340nm σε αντίθεση με το NAD^+ . Τα φαινόμενα αύξησης ή μείωσης της απορρόφησης κατά το σχηματισμό του NADH ή του NAD^+ αντίστοιχα, λειτουργεί ως βάση για τη μέτρηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων στα 340nm (σχήμα 36). Το NADH χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα για τον έλεγχο παραγωγής ελευθέρων ριζών.



Σχήμα 36 Απορρόφηση των NADH και NAD^+ συναρτήσει του μήκους κύματος

6.3.10 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Το EDTA είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό υδατοδιαλυτό στερεό με χημικό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$. Η χρησιμότητά του προκύπτει λόγω του ρόλου του ως εξανθενικού προσδέματος και χηλικού παράγοντα, δηλαδή της ικανότητάς του να απομονώσει μεταλλικά ιόντα όπως τα Ca^{2+} και Fe^{3+} . Αφού συνδεθούν με EDTA σε μεταλλικό σύμπλοκο, τα μεταλλικά ιόντα παραμένουν σε διάλυμα αλλά εμφανίζουν μειωμένη αντιδραστικότητα. Η χημική δομή του απεικονίζεται στο σχήμα 37.



Σχήμα 37 EDTA

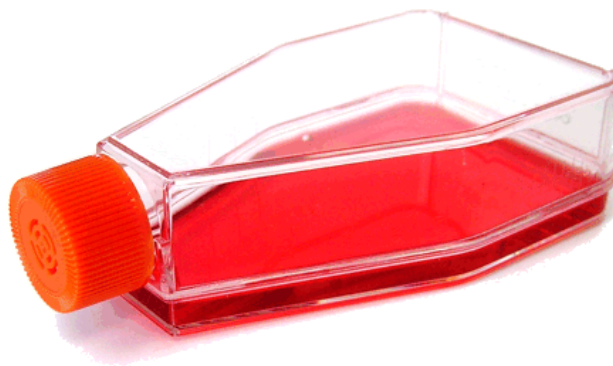
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

7.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Αρχικά, γίνεται ξεπάγωμα των κυττάρων τα οποία φυλάττονται σε υγρό άζωτο. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υγιή κύτταρα από ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες τύπου HFFF₂. Τοποθετείτε ένα ποτήρι ζέσεως με νερό στο κλίβανο και όταν αποκτήσει την θερμοκρασία του κλιβάνου, προσθέτουμε σε αυτό το φιαλίδιο με τα κύτταρα από το υγρό άζωτο, ώστε να ξεπαγώσουν. Αφού ξεπαγώσουν, τα αδειάζουμε σε διάλυμα που περιέχει 9ml PBS , 1ml FBS και 80μl αντιβιοτικό. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την αναστολή της δράσης του DMSO, βασικό συστατικό της κατάψυξης των κυττάρων. Ακολούθως, γίνεται καλή ανάδευση (pipeting) του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα για να είναι το διάλυμα ομοιογενές.

Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 7 λεπτά σε φυγόκεντρο του εργαστηρίου. Κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρησης χρησιμοποιούνται μπουκαλάκια των 50ml τα οποία τοποθετούνται αντιδιαμετρικά του άξονα της φυγοκέντρου. Συγκεκριμένα, το ένα μπουκαλάκι περιέχει τα κύτταρα και το άλλο χρησιμοποιείται ως αντίβαρο. Εώς ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία της φυγοκέντρησης, παρασκευάζεται το διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου, όπου περιείχε DMEM=13.5ml ,FBS=1.5ml και αντιβιοτικό=120μl. Εάν χρησιμοποιηθεί μεγάλη φλάσκα, χρειάζονται 15ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Για να προετοιμαστεί η μεγάλη φλάσκα, χρησιμοποιούνται 6ml πλήρους θρεπτικού μέσου, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 36.



Σχήμα 38 Απεικόνιση φλάσκας που χρησιμοποιήθηκε με το πλήρες θρεπτικό μέσο στο εσωτερικό του για προετοιμασία εισαγωγής κυττάρων

Αφού τελειώσει η διαδικασία της φυγοκέντρησης, προσεκτικά αφαιρείται το υπερκείμενο και παραμένουν στο μπουκαλάκι τα κύτταρα. Ακολούθως, στο μπουκαλάκι με τα κύτταρα προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου. Γίνεται καλή ανάδευση για να σπάσουν τα συσσωματώματα που δημιουργούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετούνται στη φλάσκα με μαλακές κινήσεις (βεντάλια), διαχέοντάς τα να καλύψουν όλη την έκταση της φλάσκας, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 37. Για να κλείσει η φλάσκα, αποστειρώνεται το στόμιο τόσο από τη εσωτερική όσο και από την εξωτερική μεριά.



Σχήμα 39 Τοποθέτηση κυττάρων και πλήρους θρεπτικού μέσου

Τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο και ακολούθως τοποθετούνται στο κλίβανο για 1-2 μέρες.

7.1.2 Σπάσιμο φλάσκας

Η φλάσκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και εφόσον αναπτύχθηκαν τα κύτταρα ακολουθείται η διαδικασία ‘σπασίματος’ της φλάσκας σε δύο μεγάλες. Αρχικά, απορρίπτεται το παλιό μέσο. Η φλάσκα ξεπλένεται με 1ml ή 2ml από το διάλυμα ξεπλύματος (διάλυμα ξεπλύματος που φτιάχτηκε: PBS=10ml, αντιβιοτικό=80μl). Επαναλαμβάνεται το ξέπλυμα με 1-2ml ακόμη. Για την αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιείται τριψίνη και ακόμη παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

- Διάλυμα για αναστολή δράσης τριψίνης: Vτελ=10ml
PBS=9ml
FBS=1ml
Αντιβιοτικό=80μ

- Πλήρες θρεπτικό μέσο: Vτελ=15ml

DMEM=13.5ml

FBS=1.5ml

Αντιβιοτικό=120μl

- Διάλυμα για ξέπλυμα: Vτελ=10ml

PBS=10ml

Αντιβιοτικό=80μl

Στη συνέχεια, προστίθεται 2ml τριψίνη, για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τη μεγάλη φλάσκα. Το στάδιο αυτό γίνεται απότομα για καλύτερη αποκόλληση κυττάρων. Ανακινείται καλά η φλάσκα και με επιπλέον μικρά χτυπήματα στο πίσω μέρος της. Ακολούθως, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί ότι έγινε αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο της φλάσκας.

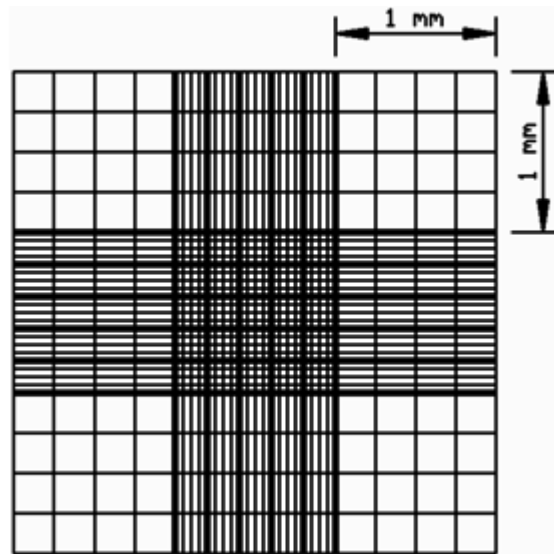
Η τριψίνη δεν πρέπει να μείνει πολύ ώρα στη φλάσκα καθώς είναι τοξική για τα κύτταρα, επομένως προστίθενται 3ml διαλύματος αναστολής τριψίνης. Ανακινείται καλά. Προστίθενται 6-10ml από το πλήρες θρεπτικό μέσο στις φλάσκες στις οποίες τοποθετούνται τα κύτταρα. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 7 λεπτά. Όταν τελειώσει η φυγοκέντρηση με προσοχή μεταφέρεται το μπουκαλάκι με τα κύτταρα. Για συλλογή των κυττάρων, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται σε αυτά το υπόλοιπο πλήρες θρεπτικό μέσο. Γίνεται καλή ανάδευση των κυττάρων και του πλήρους θρεπτικού μέσου και προστίθεται σε κάθε φλάσκα από 5ml.

7.1.3 Κυτταρομετρητής

Αρχικά, από το μπουκαλάκι με τα κύτταρα, χρησιμοποιούνται 50μl και 200μl PBS. Από αυτό το διάλυμα, τα 9μl χρησιμοποιούνται στον κυτταρομετρητή ή αλλιώς πλακίδιο Neubauer (σχήμα 38). Στον κυτταρομετρητή, υπάρχουν δύο περιοχές, μία από την πάνω μεριά και μία από την κάτω μεριά όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 39. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε καθένα από τα 4 τεταρτημόρια που περικλείονται από τις τριπλές γραμμές. Βγάζουμε το μέσο όρο των κυττάρων.



Σχήμα 40 Πλακίδιο Neubauer



Σχήμα 41 Κυτταρομετρητής

Number of cells/mm³ = N of cells counted per mm² * dilution * 10 (βάθος πλακιδίου)

Number of cells/ml = N of cells counted per mm² * dilution * 10.000 (1ml=1000mm³)

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μετρούνται κύτταρα ανά mm². Επομένως ανά μονάδα όγκου: No of cells * 10μm γιατί 10mm το βάθος του πλακιδίου. Άρα: No of cells * 10 /mm³ = No of cells * 10 /10⁻³cm³ == No of cells * 10000 /ml.

7.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινών

7.2.1 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης κουρκουμινών

Αρχικά, φτιάχνονται τα μητρικά διαλύματα των κουρκουμινών. Οι ουσίες βρίσκονται σε μορφή σκόνης. Για να προκύψουν οι τελικές μητρικές συγκεντρώσεις γίνεται χρήση του τύπου $C = \frac{m \cdot 1000}{V \cdot Mr}$, όπου m είναι σε gr και V σε ml. Τοποθετούνται για την κουρκουμίνη I: 1,6mg της ουσίας σε 1,5ml DMSO και προκύπτει μητρική συγκέντρωση $C=2,8 \cdot 10^{-3}$ M (σε DMSO), για την κουρκουμίνη II: 1,2mg της ουσίας σε 1,5ml DMSO και προκύπτει μητρική συγκέντρωση $C=2,3 \cdot 10^{-3}$ M (σε DMSO), για την κουρκουμίνη III: 1,8mg της ουσίας σε 1,5ml DMSO και προκύπτει μητρική συγκέντρωση $3,8 \cdot 10^{-3}$ M (σε DMSO) και για το μείγμα κουρκουμινολιδών: 1,6mg της ουσίας σε 1,5ml DMSO και προκύπτει μητρική συγκέντρωση $C=2,8 \cdot 10^{-3}$ M (σε DMSO). Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται συνοπτικά πληροφορίες για την παρασκευή των διαλυμάτων για τη μέτρηση απορρόφησης με τελικό όγκο 3ml σε τελική συγκέντρωση $c=2 \cdot 10^{-5}$ M.

Ουσίες	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος
Curcumin I	368.4	$2.8 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin II	308.33	$2.3 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin III	338.3	$3.8 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin mix	368.38	$2.8 \cdot 10^{-3}$ M

Πίνακας 2 Παρασκευή διαλυμάτων για μέτρηση απορρόφησης σε συγκέντρωση $c=2 \cdot 10^{-5}$ M

Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με DMSO. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με τελικό όγκο 3000μl (3ml). Για να ξεκινήσει η μέτρηση, απαραίτητος είναι ο μηδενισμός του οργάνου με το μέσο διάλυσης που χρησιμοποιείται, στη συγκεκριμένη περίπτωση το DMSO. Αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis, πραγματοποιούνται στο όργανο του εργαστηρίου Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis, σε περιοχή απορρόφησης υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας, 300-700nm με ταχύτητα σάρωσης να είναι 480 nm/min.

7.2.2 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού

Από μητρικά διαλύματα κουρκουμινών φτιάχνονται διαλύματα με συγκέντρωση $c=10^{-7}$ M. Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιούνται με DMSO. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με τελικό όγκο 3000μl (3ml). Σημειώνεται ότι η διέγερση στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού έχει οριστεί στο μέγιστο της απορρόφησης της κάθε ουσίας. Στον πίνακα 3, παρατίθενται συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία των διαλυμάτων μέτρησης φθορισμού για όλες τις ουσίες.

Ουσίες	Μοριακό Βάρος	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος	Μήκος κύματος διέγερσης
Curcumin I	368.4	$2.8 \cdot 10^{-3}$ M	444nm
Curcumin II	308.33	$2.3 \cdot 10^{-3}$ M	434nm
Curcumin III	338.3	$3.8 \cdot 10^{-3}$ M	437nm
Curcumin mix	368.38	$2.8 \cdot 10^{-3}$ M	441nm

Πίνακας 3 Προετοιμασία διαλυμάτων για μετρήσεις φθορισμού

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε όργανο του εργαστηρίου Perkin Elmer LS-55 Fluorescence Spectrometer 120V. Για να ξεκινήσει η μέτρηση έγινε μηδενισμός του οργάνου με το μέσο διάλυσης, στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη ήταν το DMSO. 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. Ακολούθως γίνεται αποθήκευση του αρχείου, έτσι ώστε το σήμα να αφαιρείται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται.

7.2.3 Παραγωγή δραστικών ελεύθερων ριζών με ακτινοβολία (ROS) με χρήση της ουσίας NADH

Συγκεκριμένα για την μελέτη της παραγωγής των ελεύθερων ριζών (ROS). Για την επιτυχημένη εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας και συνεπώς τοξικότητας έναντι των καρκινικών κυττάρων, είναι σημαντικό ο φωτοευαισθητοποιητής να παρουσιάζει υψηλή παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών των κουρκουμινών, χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS. Η απορρόφηση μελετάται σε εύρος τιμών από 300-700 nm και θα ελεγχθεί η απορρόφηση στα 340nm, καθώς στο συγκεκριμένο σημείο όταν επέρχεται

παραγωγή ROS δίνει κορυφή η ουσία NADH. Επίσης, η ισχύς ακτινοβολήσης που θα χρησιμοποιηθεί θα είναι $4,66\text{mW/cm}^2$. Οι ουσίες που φτιάχνονται για το συγκεκριμένο πείραμα:

- EDTA σε συγκέντρωση 15,5mM
- NADH σε συγκέντρωση 4,5mM.

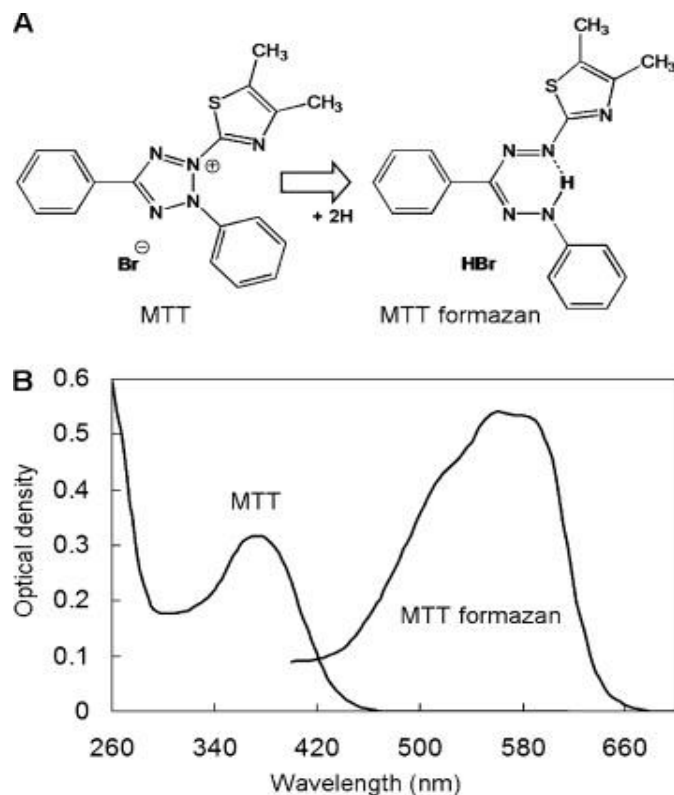
Ακολουθώς το διάλυμα προς ακτινοβολήση περιέχει:

- 67μl από την ουσία NADH (C=4,5mM)
- 19μl από την ουσία EDTA (C=15,5mM)
- 300μl από την ουσία που μελετάται κάθε φορά (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III και μίγμα κουρκουμινοειδών)
- 2614μl DMSO.

Για να γίνει η μέτρηση στο μηχάνημα UV-Vis απαιτείται μηδενισμός με DMSO, για την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου του οργάνου αλλά και ενδεχόμενης απορρόφησης του διαλύτη. Ακολουθώς, καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει μόνο DMSO+ουσία και έπειτα το διάλυμα DMSO+ουσία+EDTA+NADH χωρίς να υποστεί ακτινοβολήση ($t=0$). Έπειτα, καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης ανά λεπτό ακτινοβολήσης σε 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.

7.3 Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις (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). Έπειτα από διάλυση της ουσίας αυτής σε PBS, δίνει ένα κιτρινωπό υδατικό διάλυμα, το οποίο, αντιδρώντας με τις μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες των μεταβολικά ενεργών κυττάρων, έχει την ικανότητα να παράγει μωβ κρυστάλλους formazan (MTT formazan). Οι κρύσταλλοι αυτοί στη συνέχεια διαλύονται σε κατάλληλο διάλυμα που περιέχει ισοπροπανόλη, Triton X και υδροχλωρικό οξύ, και έτσι η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Είναι αποδεκτό ότι η ποσότητα των κρυστάλλων formazan είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν μιτοχονδριακή δραστηριότητα και επομένως δεν μπορούν να σηματοδοτήσουν το σχηματισμό των κρυστάλλων formazan (σχήμα 40).



Σχήμα 42 Χημική δομή του MTT και των κρυστάλλων formazan του MTT και φάσματα απορρόφησης.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Αρχικά, φτιάχνονται τα ακόλουθα διαλύματα.

Διάλυμα MTT (κιτρινωπό διάλυμα) : 5mg σκόνης MTT σε 1ml PBS.

Διαλύτης MTT: 89.2ml isopropanol, 100ml Triton X, 0.8ml HCl.

- Ακολούθως, γίνεται μέτρηση των κυττάρων της φλάσκας. Χρησιμοποιούνται 15 τριβλία και σε κάθε τριβλίο τοποθετούνται 200.000 κύτταρα. Βρέθηκε ότι απαιτείται να τοποθετηθούν 70μl σε κάθε τριβλίο από τα κύτταρα.
- Πρέπει να προετοιμαστούν τα τριβλία πριν την εισαγωγή των κυττάρων. Τοποθετούνται αρχικά, 2500μl πλήρες θρεπτικό μέσο και έπειτα 70μl από τα κύτταρα.
- Επώαση σε κλίβανο για 24 ώρες.
- Απορρίπτεται το πλήρες θρεπτικό μέσο και εισάγονται 130μl MTT και 1170μl PBS.
- Επώαση για 3 ώρες σε κλίβανο.
- Συλλογή υπερκείμενου από τα τριβλία.
- Φυγοκέντρηση για 7 λεπτά σε 1200 στροφές.

- Προστίθενται στα τριβλία 1ml διαλύτης MTT, ώστε εάν υπάρχουν κύτταρα κολλημένα στο τριβλίο να αποκολληθούν.
- Αφού τελειώσει η διαδικασία της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και εισάγεται στο φιαλίδιο 1ml διαλύτης MTT γίνεται καλή ανάδευση και προστίθεται σε αυτό το περιεχόμενο των τριβλίων.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησης του MTT. Τα φάσματα απορρόφησης μετρούνται από τα 380 έως τα 700nm. Κάθε φορά γίνεται καταγραφή της απορρόφησης στα 565nm όπως επίσης και στα 690nm. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, πρέπει να υπολογιστεί η διαφορά των τιμών απορρόφησης, A565 – A690. Το A565 αναφέρεται στο μέγιστο της απορρόφησης των κρυστάλλων formazan, ενώ το A690 στον θόρυβο που υφίσταται.

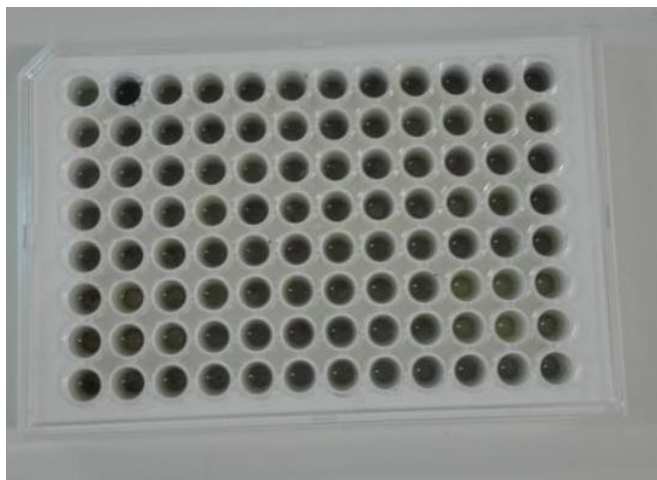
7.4 Μεθοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα HFFF2, με χρήση των τεσσάρων κουρκουμινών ως φωτοευαισθητοποιητές

Για τη διεξαγωγή της φωτοδυναμικής θεραπείας χρησιμοποιούνται και οι τέσσερις κουρκουμίνες ως φωτοευαισθητοποιητές σε συγκέντρωση C=3μM, η οποία παρουσίασε μη τοξικά αποτελέσματα στα κύτταρα. Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκαν plates της Corning Incorporated costar με κωδικό 3610 που αποτελούνται από 96 πηγαδάκια το καθένα.

Αρχικά, στα πηγαδάκια τοποθετούνται από 20.000 κύτταρα HFFF2 και από 100μl ΠΘΜ στο καθένα. Έπειτα, γίνεται 24ωρη επώαση σε επωαστικό κλίβανο. Ακολούθως, αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο από τα πηγαδάκια και τοποθετείται 100μl πλήρες θρεπτικού μέσου +ουσία.

ΣΤΑΔΙΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗΣ

Στα plates που χρησιμοποιούνται, υπήρχαν πηγαδάκια μόνο με κύτταρα (Blank) που δεν ακτινοβολούνται και πηγαδάκια στα οποία εισάγονται οι τέσσερις κουρκουμίνες που ακτινοβολούνται (σχήμα 41).



Σχήμα 43 Κύτταρα με πλήρες θρεπτικό μέσο σε plates

Η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας πραγματοποιείται μετά από 1, 3 και 6 ώρες επώασης των κυττάρων με τις ουσίες και η ακτινοβολήση έγινε για 1, 2 και 3min για κάθε χρόνο επώασης. Αρχικά αφαιρείται το ΠΘΜ+ουσίες από τα πηγαδάκια, τα plates ακτινοβολούνται με μπλε laser ισχύος $6\text{mW}/\text{cm}^2$. Έπειτα από την ακτινοβολήση τοποθετούνται 100μl νέο πλήρες θρεπτικό μέσο στα πηγαδάκια και αφήνονται για επώαση στον κλίβανο για 24h.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ-MTT

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα και ο διαλύτης MTT. Για το διάλυμα MTT διαλύονται 5mg σκόνης Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% σε 1ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline. Για το διαλύτη MTT χρειάζονται 89.20ml ισοπροπανόλη και 10ml Triton X και 0.80ml HCl.

Μετά τη επώαση των κυττάρων με το νέο πλήρες θρεπτικό μέσο, αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο με χρήση πιπέτας και εισάγονται σε κάθε πηγαδάκι 11μl δ/τος MTT + 100μl PBS. Ακολούθως, τα plates αφήνονται για επώαση στον κλίβανο για ακόμη 3 ώρες. Στη συνέχεια, αφού αφαιρείται το δ/μα MTT + PBS από τα πηγαδάκια, εισάγονται 100μl δ/τη MTT και γίνεται ανάδευση(pipetting) ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα που βρίσκονται στον πάτο. Τέλος, τα plates τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο απορρόφησης (fluostar galaxy BMG-Σχήμα 42) για την μέτρηση της απορρόφησης του MTT.



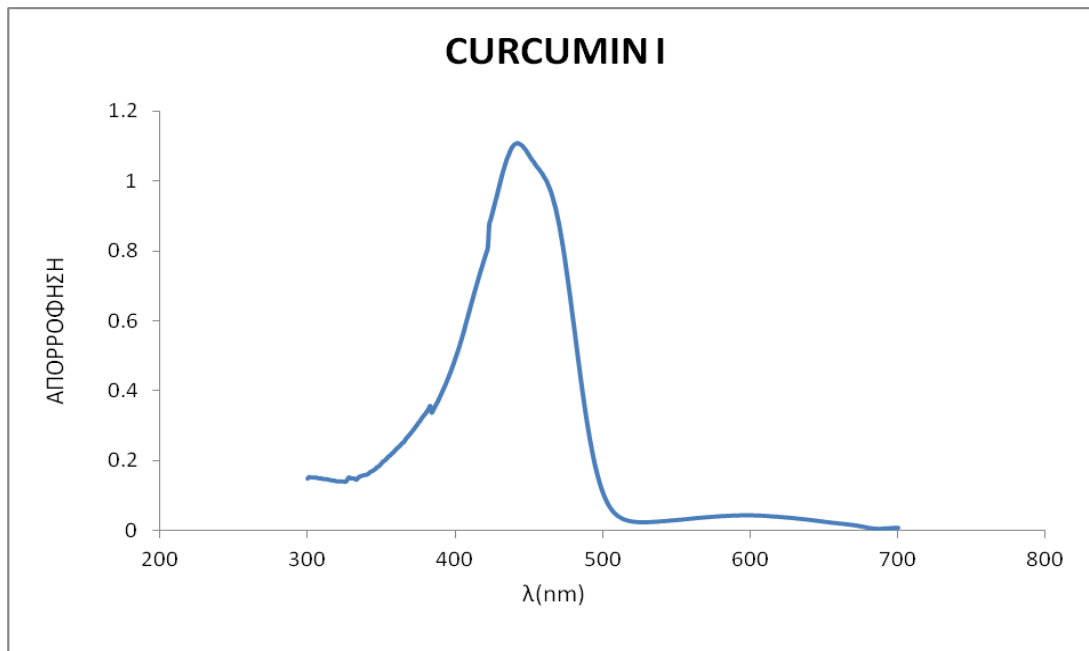
Σχήμα 44 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Fluostar Galaxy BMG

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων

8.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης

Α) CURCUMIN I

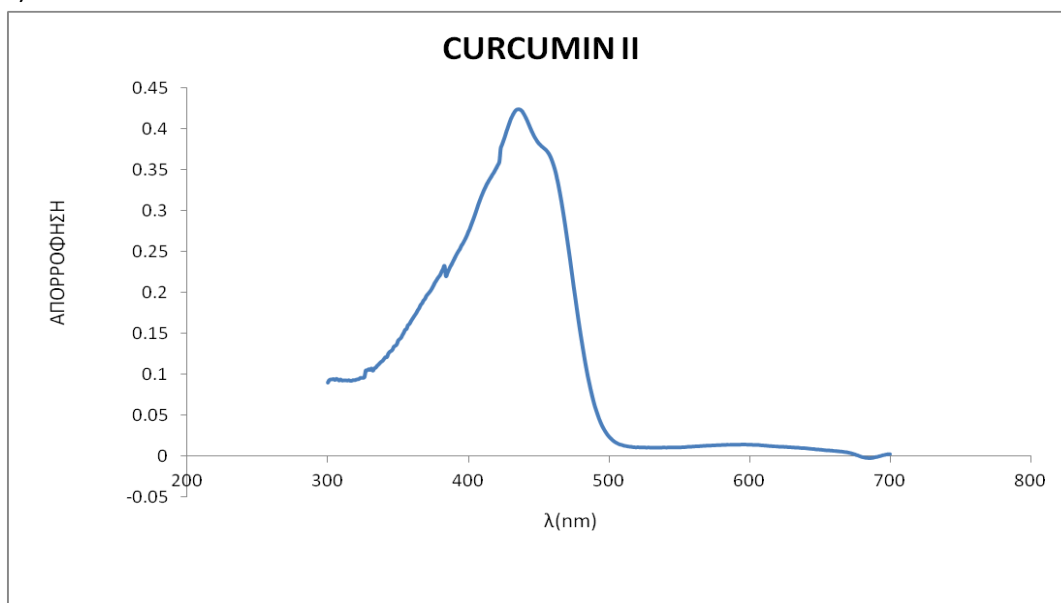


Διάγραμμα 2 Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \times 10^{-5} \text{ M}$

Στο παραπάνω διάγραμμα 2, παρατίθεται το φάσμα της απορρόφησης της κουρκουμίνης I με συγκέντρωση $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ όπου παρασκευάστηκε από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης $2,8 \times 10^{-3} \text{ M}$. Παρατηρείται ότι εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 444nm με απορρόφηση 1,10.

Β) CURCUMIN

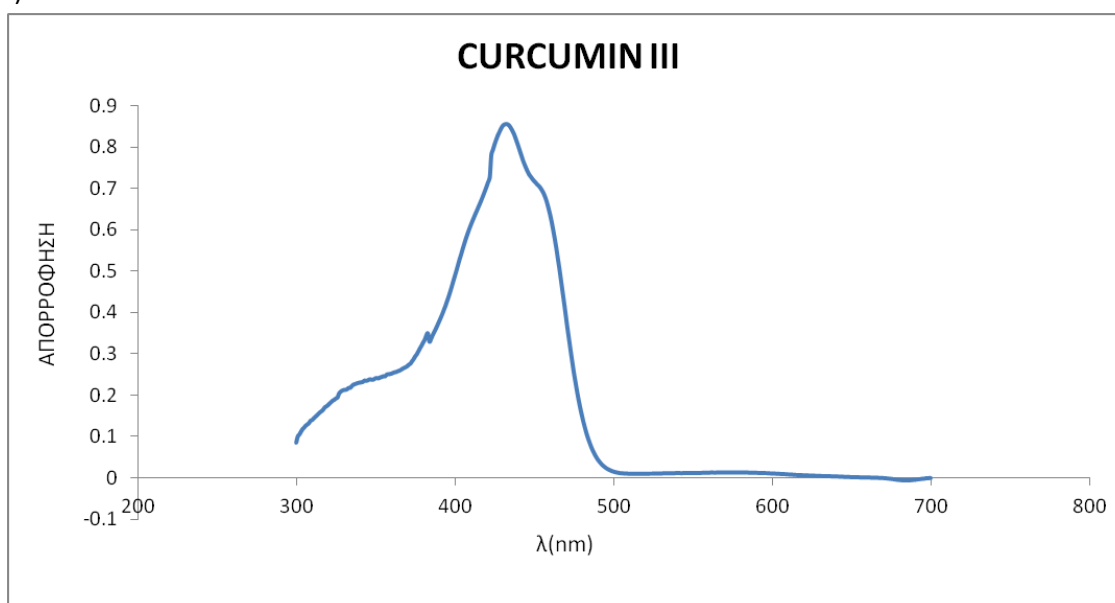
II



Διάγραμμα 3 Φάσμα απορρόφησης κουρκουμίνης II σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Στο διάγραμμα 3, παρουσιάζεται το φάσμα της απορρόφησης της κουρκουμίνης II. Η ουσία μελετήθηκε σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$, όπου παρασκευάστηκε από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης $2,3 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Η κουρκουμίνη II, εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 434nm με τιμή απορρόφησης 0,42.

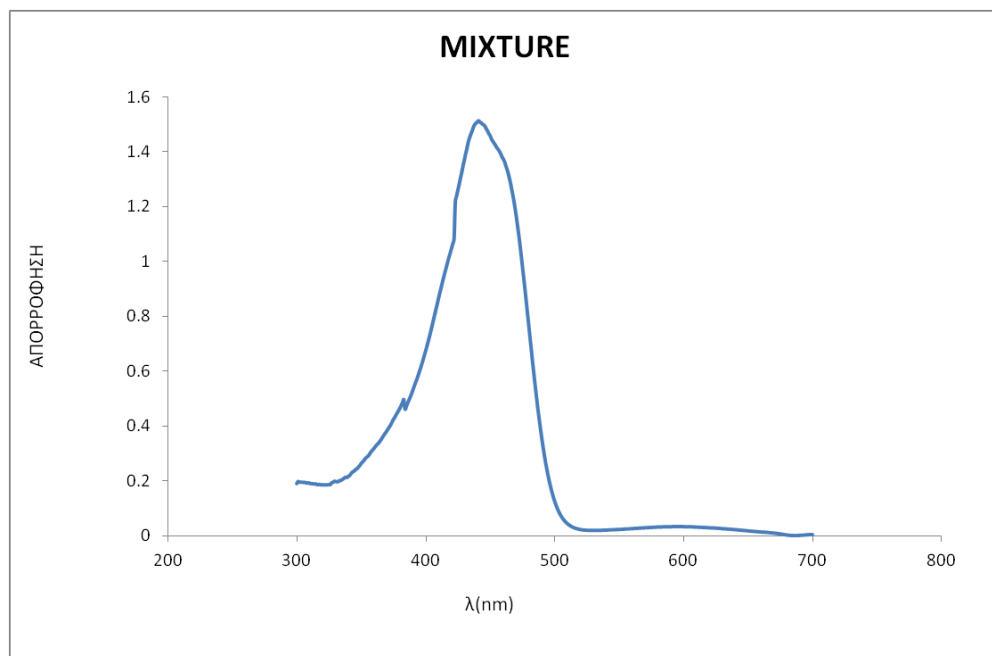
Γ) CURCUMIN III



Διάγραμμα 4 Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης ΙΙΙ σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Στο παραπάνω διάγραμμα 4, απεικονίζεται το φάσμα της απορρόφησης της κουρκουμίνης ΙΙΙ με συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Το μητρικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την αραιώση ήταν συγκέντρωσης $3,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Από το φάσμα απορρόφησης παρατηρείται ότι η ουσία έχει μέγιστη απορρόφηση στα 437nm με απορρόφηση 0,83.

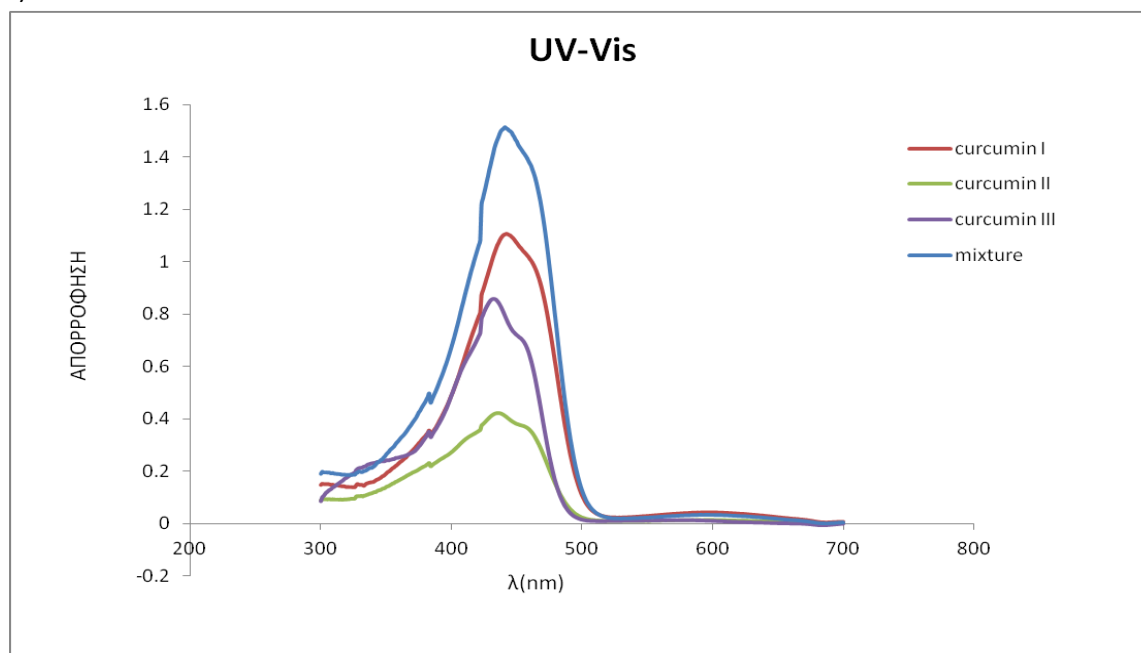
Δ) ΜΕΙΓΜΑ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΟΕΙΔΩΝ



Διάγραμμα 5 Φάσμα απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινολοιδών σε DMSO σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Στο παραπάνω διάγραμμα 5, εμφανίζεται το φάσμα της απορρόφησης του μίγματος κουρκουμινολοιδών. Το μείγμα αποτελείται από: curcumin I (80%), curcumin II (18%), curcumin III (2%). Το φάσμα απορρόφησης μελετήθηκε σε τελική συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης $2,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Παρατηρείται ότι εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 441nm με τιμή απορρόφησης 1,51.

Ε) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ UV-Vis ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΩΝ



Διάγραμμα 6 Συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Στο πίνακα 4, παρατίθενται συνοπτικά η μέγιστη τιμή του μήκους απορρόφησης και η μέγιστη απορρόφηση όπου παρατηρήθηκαν στα παραπάνω διαγράμματα (2-5).

Ουσίες	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ απορρόφησης	Μέγιστη απορρόφηση
Curcumin I	444	1.10
Curcumin II	434	0.42
Curcumin III	437	0.83
Curcumin mixture	441	1.51

Πίνακας 4 Συγκριτική μελέτη λ_{max} και μέγιστης απορρόφησης για τις ουσίες που μελετήθηκαν σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$

Με βάση τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα για τις ουσίες:

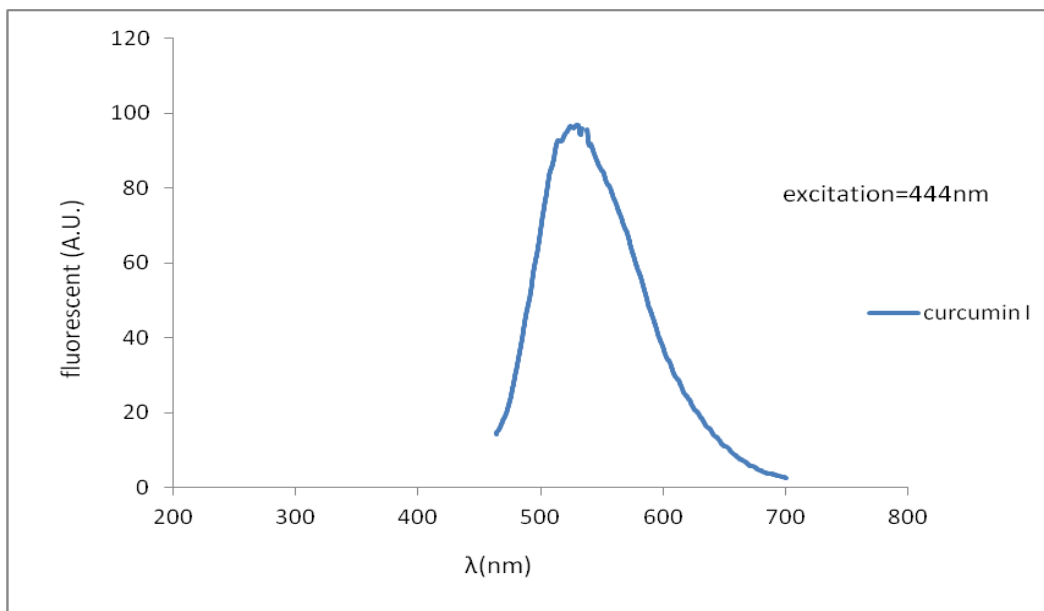
- Οι ουσίες που εμφανίζουν την πιο έντονη απορρόφηση είναι το μείγμα των κουρκουμινοειδών και η κουρκουμίνη I. Τη μικρότερη απορρόφηση εμφανίζει η κουρκουμίνη II.
- Τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην τιμή με λίγο μεγαλύτερο της κουρκουμίνης I (444nm).
- Το μείγμα κουρκουμινοειδών αποτελείται από: 80% κουρκουμίνη I, 2% κουρκουμίνη III και 18% κουρκουμίνη II. Συμπεραίνουμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό στο μείγμα το έχει η κουρκουμίνη I, παρατηρώντας το διάγραμμα 5,

φαίνεται ότι η μορφή του διαγράμματος προσεγγίζει την μεγαλύτερη σε ποσοστό κουρκουμίνη I και λιγότερο τις υπόλοιπες δύο.

- Τόσο η κουρκουμίνη I όσο και το μείγμα κουρκουμινοειδών εμφανίζουν πολύ μεγάλη απορρόφηση με τιμές 1.10 και 1.51 αντίστοιχα. Αυτό είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για έναν PS, καθώς για να είναι πιο αποτελεσματική η PDT θα πρέπει να απορροφήσει η ουσία.

8.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού

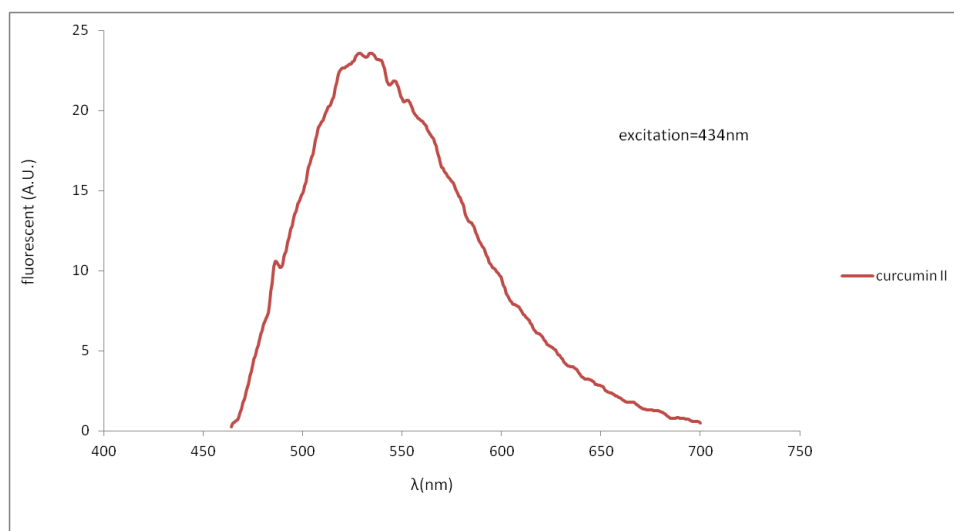
A) CURCUMIN I



Διάγραμμα 7 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης I σε συγκέντρωση $10^{-7}M$

Το παραπάνω διάγραμμα 7 παρουσιάζει το φάσμα απορρόφησης φθορισμού της κουρκουμίνης I. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ουσία ήταν $excitation=444nm$, ενώ το φάσμα φθορισμού συλλέχθηκε από τα 463nm έως τα 700nm. Η τελική συγκέντρωση προς μέτρηση ήταν $c=10^{-7}M$ από μητρικό διάλυμα $2,8 \cdot 10^{-3}M$. Παρατηρείται ότι εμφανίζει μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 535nm.

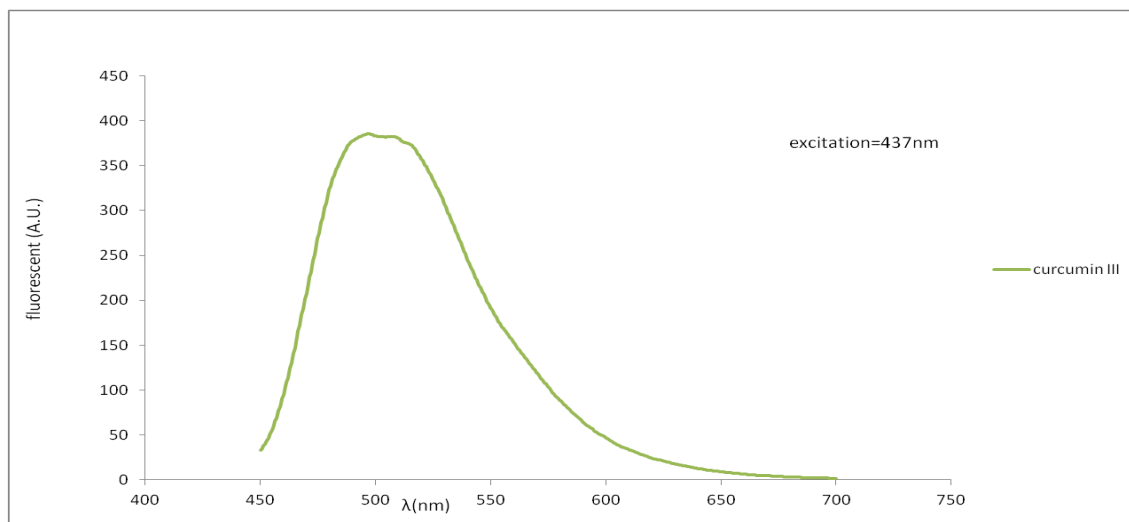
B) CURCUMIN II



Διάγραμμα 8 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης II σε συγκέντρωση 10^{-7}M

Το διάγραμμα 8 απεικονίζει το φάσμα φθορισμού της κουρκουμίνης II. Το φάσμα φθορισμού της ουσίας, συλλέχθηκε από τα 457nm έως τα 700nm με excitation=434nm. Η τελική συγκέντρωση ήταν $c=10^{-7}\text{M}$, η οποία παρασκευάστηκε από μητρικό διάλυμα $2,3 \cdot 10^{-3}\text{M}$. Παρατηρείται ότι εμφανίζει μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 533nm.

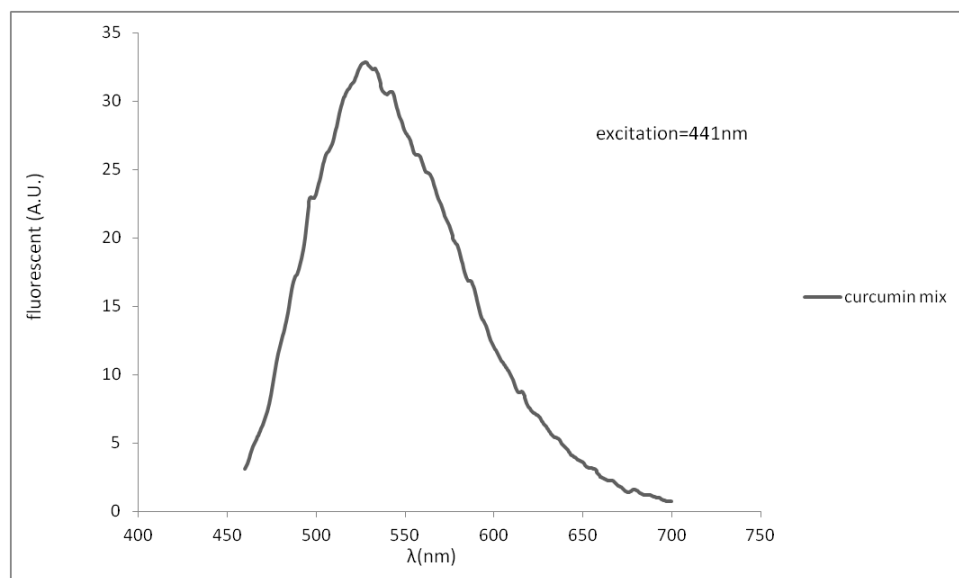
Γ) CURCUMIN III



Διάγραμμα 9 Φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης III σε συγκέντρωση 10^{-7}M

Το παραπάνω διάγραμμα 9 παραθέτει το φάσμα φθορισμού της κουρκουμίνης ΙΙΙ σε τελική συγκέντρωση 10^{-7}M . Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη ουσία ήταν excitation=437nm, ενώ το φάσμα φθορισμού συλλέχθηκε από τα 450nm έως τα 700nm. Η μέγιστη εκπομπή φθορισμού για την κουρκουμίνη ΙΙΙ είναι στα 497nm.

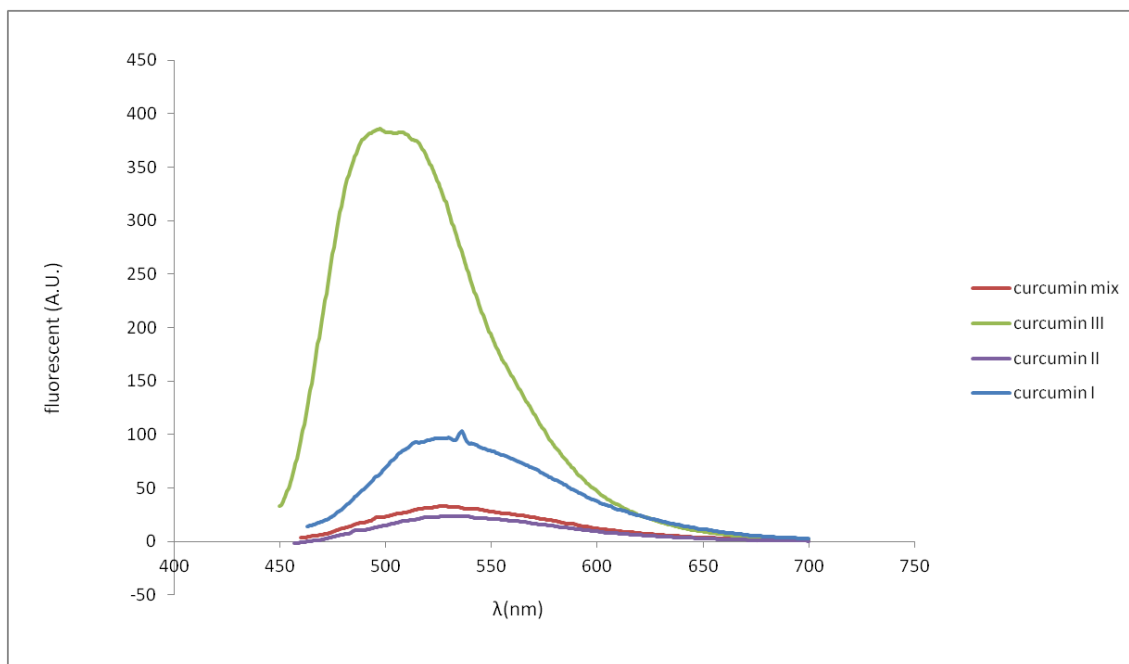
Δ) ΜΕΙΓΜΑ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΟΕΙΔΩΝ



Διάγραμμα 10 Φάσμα εκπομπής του μείγματος της κουρκουμίνης σε συγκέντρωση 10^{-7}M

Στο διάγραμμα 10, παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού του μείγματος κουρκουμινοειδών. Για την συγκεκριμένη ουσία, το φάσμα φθορισμού συλλέχθηκε από τα 460nm έως τα 700nm και με excitation=440nm. Η συγκέντρωση όπου πραγματοποιήθηκε η μέτρηση ήταν $c=10^{-7}\text{M}$, η οποία παρασκευάστηκε από μητρικό διάλυμα $2,8 \cdot 10^{-3}\text{M}$. Το μείγμα κουρκουμινοειδών, εμφανίζει μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 525nm.

Ε) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΩΝ



Διάγραμμα 11 Φάσματα εκπομπής κουρκουμινών σε συγκέντρωση 10^{-7}M

Βάση των φασμάτων εκπομπής των ουσιών (διαγράμματα 7-10), παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα στον πίνακα 5:

Ουσίες	$\lambda(\text{nm})$ διέγερσης	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ φθορισμού	Μέγιστη ένταση φθορισμού
Curcumin I	444	535	96.8
Curcumin II	434	533	23.58
Curcumin III	437	497	385.7
Curcumin mixture	441	525	32.4

Πίνακας 5 Συνοπτικός πίνακας για τα φάσματα εκπομπής των ουσιών σε συγκέντρωση 10^{-7}M

Συμπεραίνεται από το συνοπτικό διάγραμμα 11 των ουσιών:

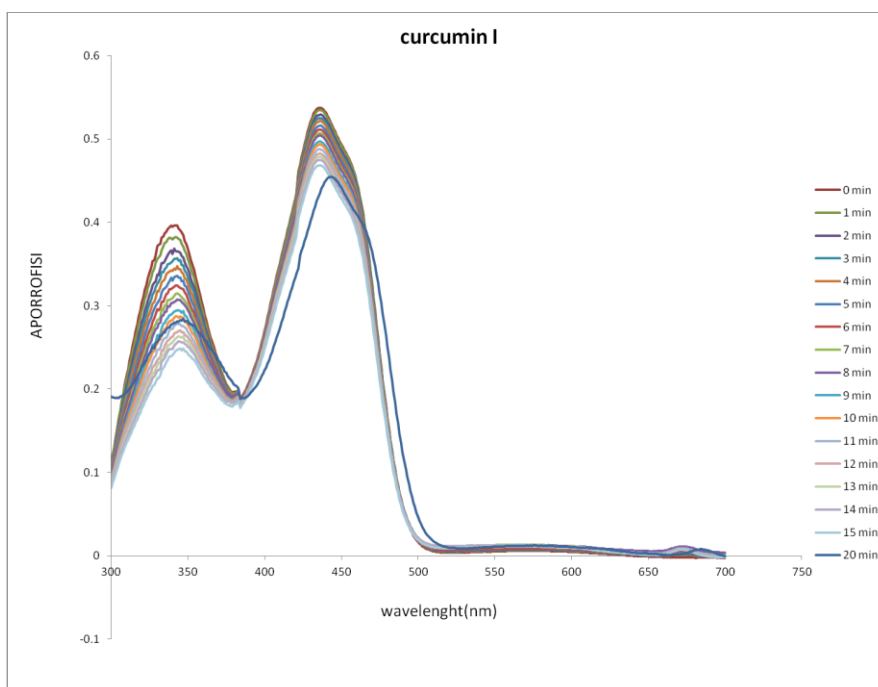
- Όλες οι ουσίες εμφανίζουν παρόμοια τιμή μήκους κύματος μέγιστου φθορισμού (~497-537nm).
- Μεγαλύτερη ένταση φθορισμού παρουσιάζει η κουρκουμίνη ΙΙΙ, ακολουθεί η κουρκουμίνη Ι, το μείγμα της κουρκουμίνης και με μικρότερη τιμή ακολουθεί η κουρκουμίνη ΙΙ.

- Το μείγμα των κουρκουμινοειδών ενώ αποτελείται σε μεγαλύτερο ποσοστό (80%) από την κουρκουμίνη Ι, εμφανίζεται να έχει παρόμοια μορφή διαγράμματος με την κουρκουμίνη ΙΙ.
- Τελικά, συμπεραίνεται ότι όλες οι ουσίες εμφάνισαν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού για κατάλληλη διέγερση. Επομένως, υπάρχουν προοπτικές για χρήση τους στη φωτοδυναμική διάγνωση όπου απαιτείται σημαντικός φθορισμός της ουσίας που συγκεντρώνεται στα καρκινικά κύτταρα.

8.2 Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελεύθερων ριζών

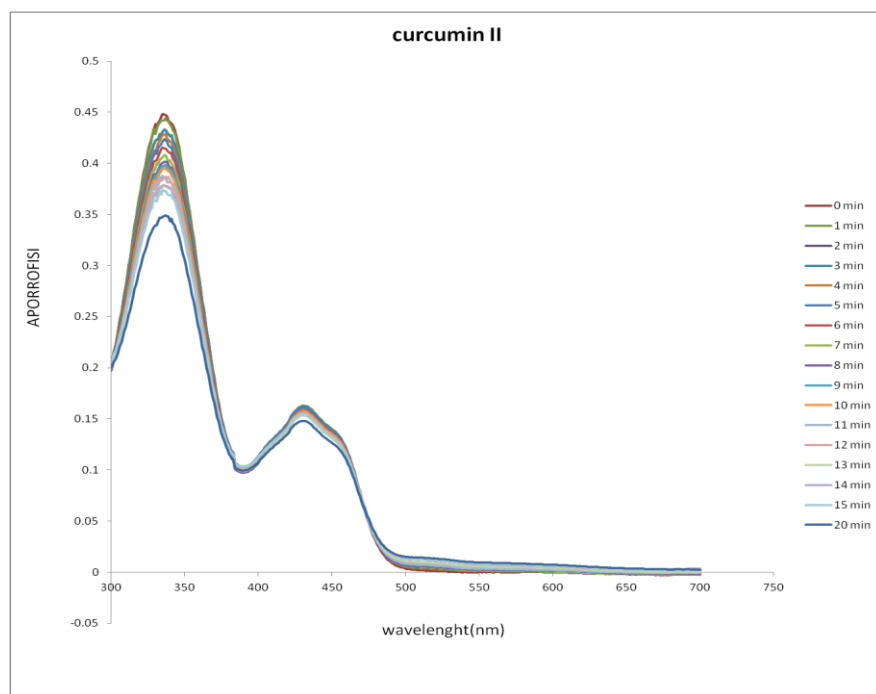
Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε μελέτη για την παραγωγή των ελεύθερων ριζών από τις κουρκουμίνες με ακτινοβολία ισχύος $4,66\text{mW/cm}^2$ και χρήση της ουσίας NADH. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες μελετήθηκαν οι ουσίες ήταν $c=10^{-5}\text{M}$. Τελικό διάλυμα ακτινοβόλησης: 67μl NADH, 19μl EDTA, 300μl curcumin, 2614μl DMSO.

A) CURCUMIN I



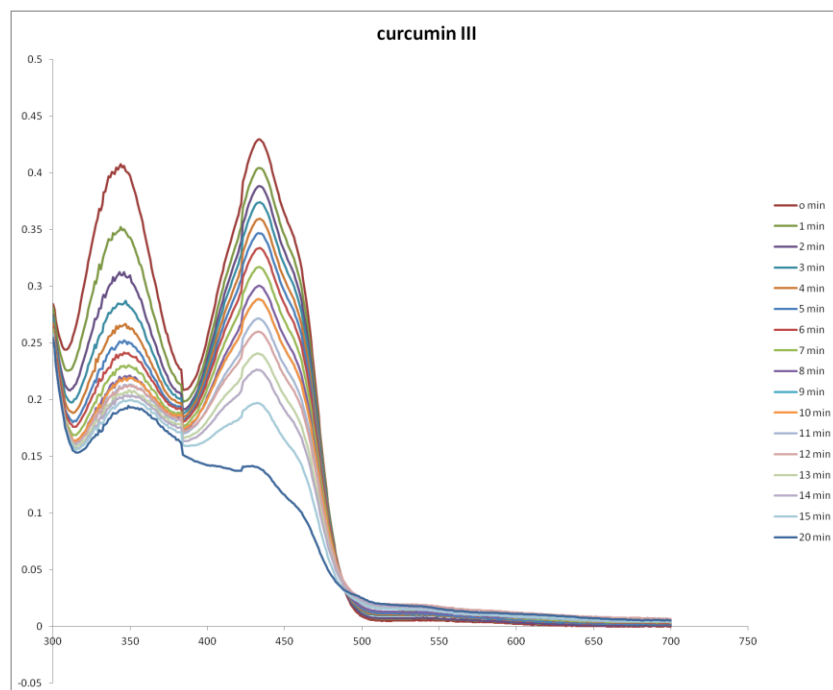
Διάγραμμα 12 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min ακτινοβόλησης για την κουρκουμίνη Ι

Β) CURCUMIN II



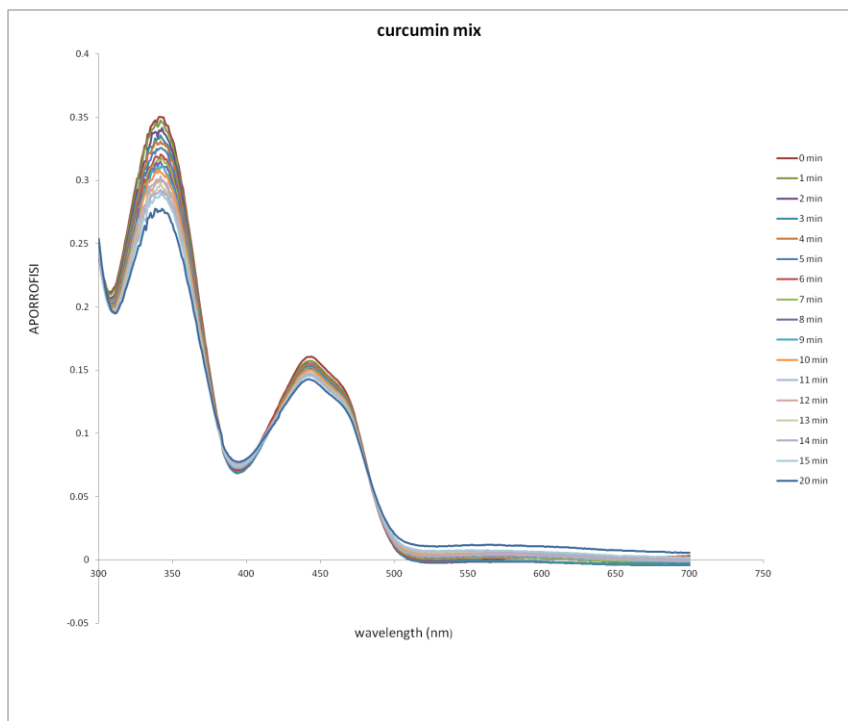
Διάγραμμα 13 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min ακτινοβολήσης για την κουρκουμίνη II

Γ) CURCUMIN III



Διάγραμμα 14 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min για την κουρκουμίνη III

Δ) ΜΕΙΓΜΑ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΟΕΙΔΩΝ



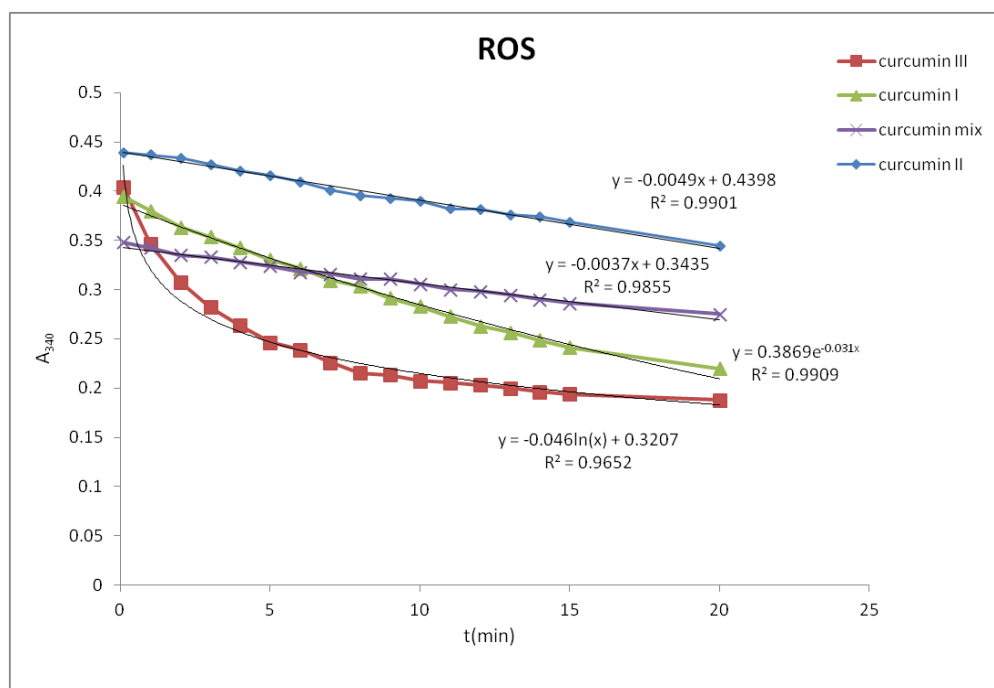
Διάγραμμα 15 Φάσμα απορρόφησης στο διάστημα 0-20min για το μείγμα της κουρκουμίνης

Από τα παραπάνω διαγράμματα (12-15), παρατηρείται ότι:

- Σε όλα τα διαγράμματα εμφανίζονται δύο κύριες κορυφές. Η πρώτη κορυφή βρίσκεται στα 340nm, όπου αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική κορυφή του NADH. Η δεύτερη κορυφή, εμφανίζεται κοντά στα 500nm όπου είναι χαρακτηριστική για την απορρόφηση της κάθε ουσίας. Επίσης σε όλες τις ουσίες εμφανίζεται πτώση των 2 κορυφών. Η πτώση της 1^{ης} κορυφής στα 340nm οφείλεται στην οξείδωση του NADH και η πτώση της 2^{ης} κορυφής απορρόφησης ουσιών οφείλεται στη φωτοαπειικοδόμηση της κουρκουμίνης λόγω της μεγάλης ενέργειας.
- Η κουρκουμίνη I, φωτοκαταστρέφεται και παρουσιάζει μία ελαφρά μετατόπιση 10 nm προς τα δεξιά στα 20min.
- Η κορυφή απορρόφησης της κουρκουμίνης II εμφανίζει μικρότερη πτώση άρα και μικρότερη φωτοαπειικοδόμηση.
- Η κουρκουμίνη III εμφανίζει έντονη πτώση στη κορυφή απορρόφησης της με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μεγαλύτερη φωτοκαταστροφή.
- Το μείγμα της κουρκουμίνης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ουσίες εμφανίζει τη μικρότερη φωτοαπειικοδόμηση.

- Η φωτολεύκανση που εμφανίζει η εκάστοτε ουσία είναι στενά συνδεδεμένη με τα αποτελέσματα της PDT. Κατά τα αρχικά στάδια της PDT, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι είναι επιθυμητό μία ουσία να είναι σταθερή ως προς την ικανότητα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού κατά την ακτινοβόλησή της με φως (φωτοσταθερότητα). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Με την πάροδο του χρόνου είναι επίσης σημαντικό να επέλθει φωτοαπεικοδόμιση της φωτοευαίσθητης ουσίας, καθώς δεν είναι επιθυμητή η μετέπειτα διέγερση και παρατεταμένη φωτοευαισθησία του οργανισμού του εκάστοτε ασθενή. Άρα μία φωτοευαίσθητη ουσία θα πρέπει να διατηρεί τη δράση της στα πρώτα λεπτά της ακτινοβόλησης και στη συνέχεια να αρχίζει να την μειώνει. Επομένως και οι τέσσερις ουσίες εμφανίζουν αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Ε) Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm



Διάγραμμα 16 Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβόλησης για τις ουσίες (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III, μείγμα κουρκουμινολιδών)

Στο διάγραμμα 16, απεικονίζεται η συγκριτική συμπεριφορά των τεσσάρων κουρκουμινών ως προς την ικανότητά τους για παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα διαλύματα των κουρκουμινών έχουν συγκέντρωση $C = 10^{-5}M$, όπου όλες οι αραιώσεις από τα μητρικά διαλύματα, έχουν γίνει σε DMSO. Τα μητρικά διαλύματα είναι επίσης παρασκευασμένα σε DMSO. Ακολούθως, από το παραπάνω διάγραμμα υπολογίζεται ότι

οι εξισώσεις που περιγράφουν τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης είναι οι εξής, για την κάθε ουσία:

- Curcumin I: $y=0.3869 \cdot e^{-0.031x}$, $R^2=0.9909$
- Curcumin II: $y=-0.0049x+0.4398$, $R^2=0.9901$
- Curcumin III: $y=-0.046\ln(x)+0.3207$, $R^2=0.9652$
- Curcumin mixture: $y=-0.0037x+0.3435$, $R^2=0.9855$

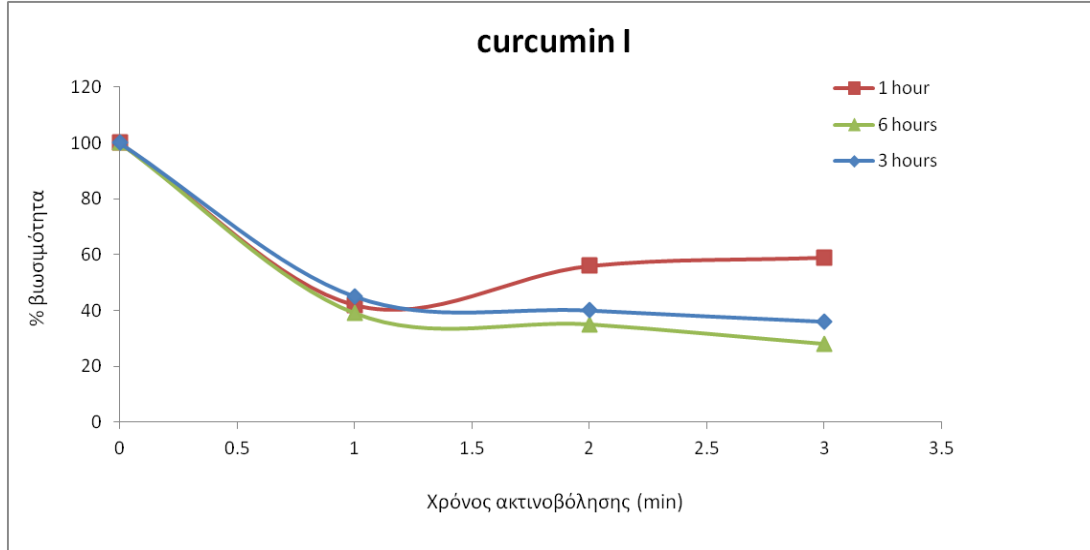
Συνοπτικά, παρατηρούνται τα εξής:

- Η κουρκουμίνη III, παρουσιάζει πολύ γρήγορη πτώση της τιμής από τα 2 μόλις πρώτα λεπτά της ακτινοβολήσης. Η κουρκουμίνη I ακολουθεί μία ομαλή πτώση. Η κουρκουμίνη II, εμφανίζει πολύ μικρή γραμμική μείωση. Τη μικρότερη πτώση εμφανίζει το μείγμα των κουρκουμινολιδών.
- Η παραγωγή ελεύθερων ριζών του μείγματος δεν φαίνεται να είναι ικανοποιητική. Το μείγμα φαίνεται να απενεργοποιείται καθώς σε σύγκριση με την κουρκουμίνη I φαίνεται να μην εμφανίζει μεταβολή στην τιμή αλλά να παραμένει σταθερό.

8.3 Εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης (PDT)

Στη συγκριμένη ενότητα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας στους υγιείς δερματικούς ινοβλάστες HFFF2 χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητές τις τέσσερις κουρκουμίνες. Αρχικά, μελετάται το ποσοστό βιωσιμότητας συναρτήση του χρόνου ακτινοβολήσης για κάθε ουσία ξεχωριστά και ακολούθως γίνεται συγκριτική μελέτη των ουσιών βάση του χρόνου επώασης.

A) Curcumin I



Διάγραμμα 17 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη I ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

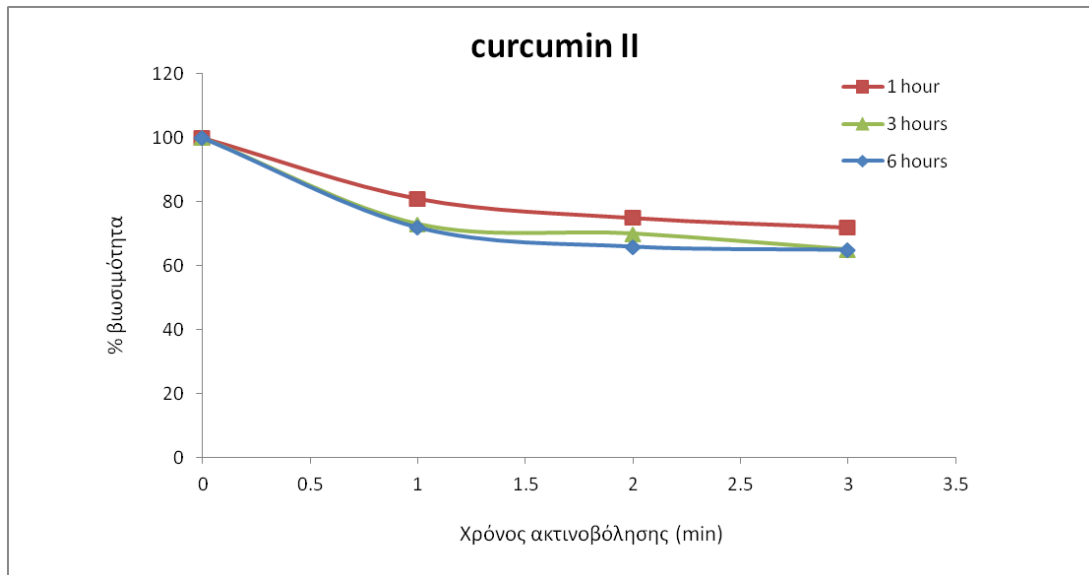
Το διάγραμμα 17, αναφέρεται στην κουρκουμίνη I, σε συγκέντρωση $c=3\mu\text{M}$ και σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. Παρατηρείται ότι από το 1^ο min ακτινοβολήσης, παρουσιάζεται μεγάλη πτώση στο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων, προσεγγίζοντας το 60%. Στο 2^ο min, εμφανίζεται στο διάγραμμα μία ομαλή αύξηση, αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε:

- καταστροφή της ουσίας
- αποδέυσμεσης της ουσίας από τα κύτταρα

Άρα η κουρκουμίνη I εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα μετά από 3 ή/και 6 ώρες επώασης. Σε μεγαλύτερο χρόνο επώασης τα αποτελέσματα είναι καλύτερα καθώς είναι πιθανό:

- να συγκεντρώθηκε περισσότερη ουσία στα κύτταρα
- να έχει συγκεντρωθεί και σε άλλα σημεία ουσία πέρα από την κυτταρική μεμβράνη. Με αποφυγή συσσώρευσης στο πυρήνα του κυττάρου διότι είναι πιθανό να προκύψουν μεταλλάξεις/καρκινογενέσεις.

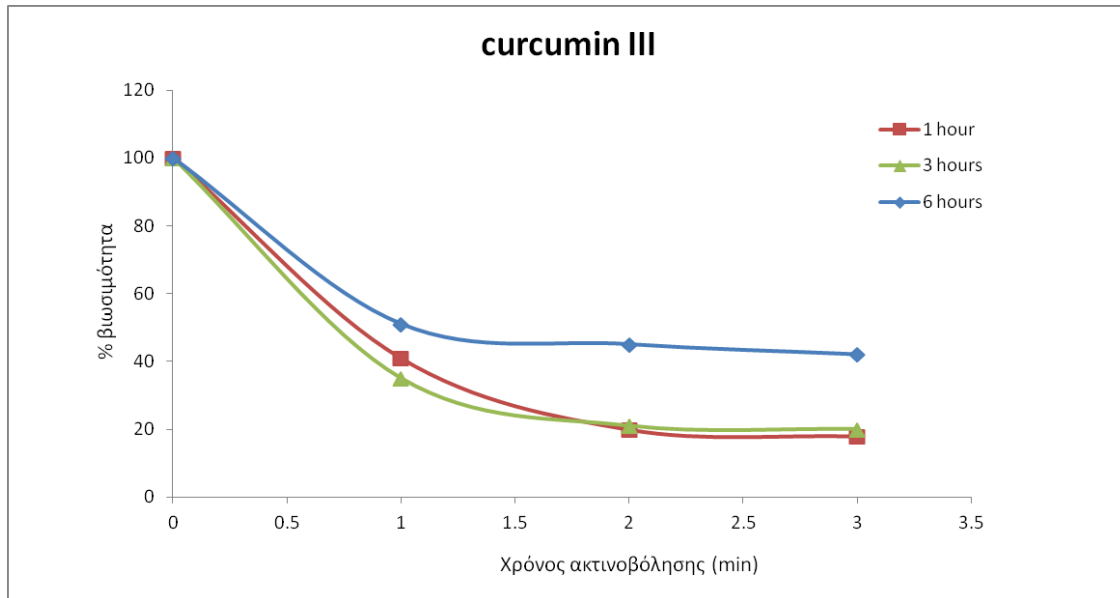
B)Curcumin II



Διάγραμμα 18 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη II ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Στο διάγραμμα 19, εμφανίζεται η κουρκουμίνη II σε συγκέντρωση $c=3\mu\text{M}$ σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. Η πορεία του διαγράμματος εμφανίζει μία ομαλή πτώση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η ουσία φαίνεται να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα μετά από 3 και 6 ώρες επώασης καθώς μειώνεται το ποσοστό βιωσιμότητας στο 72% και 81% αντίστοιχα, έναντι στη 1 ώρα επώασης. Τελικά, καταλήγει το ποσοστό βιωσιμότητας ύστερα από 3min ακτινοβολήσης, να μειώνεται στο 65% μετά από 3 και 6 ώρες επώασης.

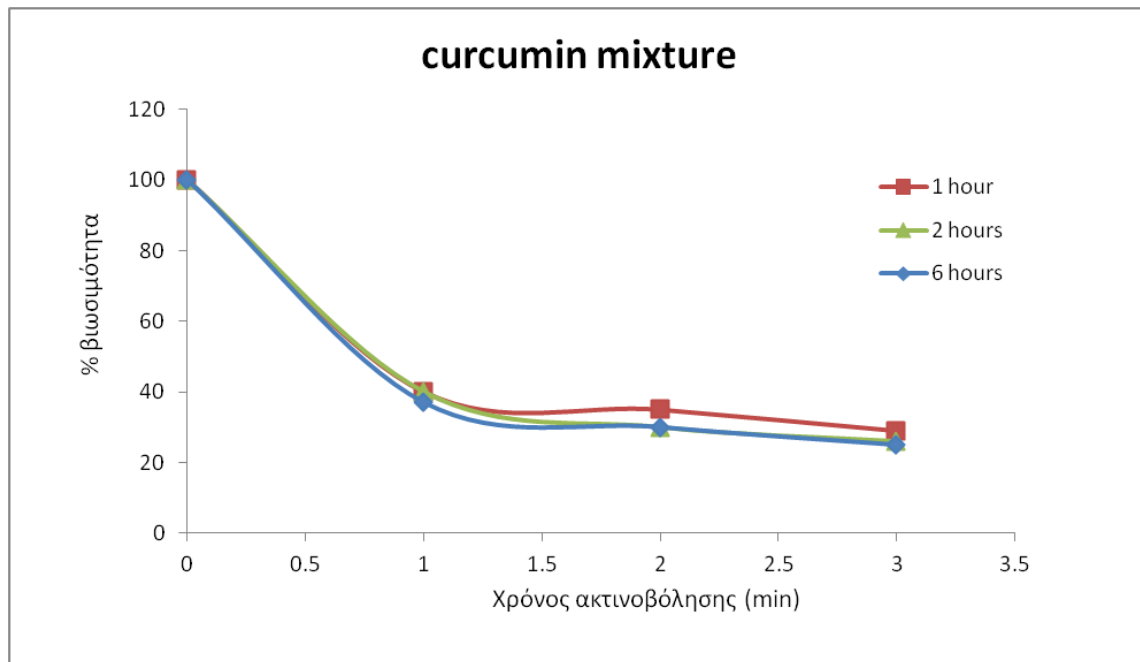
Γ) Curcumin III



Διάγραμμα 19 Βιωσιμότητα κυττάρων με την κουρκουμίνη ΙΙΙ ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Στο διάγραμμα 20, απεικονίζεται η κουρκουμίνη ΙΙΙ συγκέντρωσης $c=3\mu\text{M}$ ύστερα από 1,3,6 ώρες επώασης. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η ουσία έχει καλύτερα αποτελέσματα μετά από 3 και 1 ώρες επώασης έναντι στις 6 ώρες. Συγκεκριμένα, στις 6 ώρες επώασης το ποσοστό βιωσιμότητας από το 1^ο min παρουσιάζει απότομη μείωση στο 60%, αλλά στα 2 και 3 min ακτινοβολήσης διατηρείται σταθερό. Αυτό το φαινόμενο είναι πιθανό να οφείλεται σε αποδέσμευση της ουσίας από τα κύτταρα.

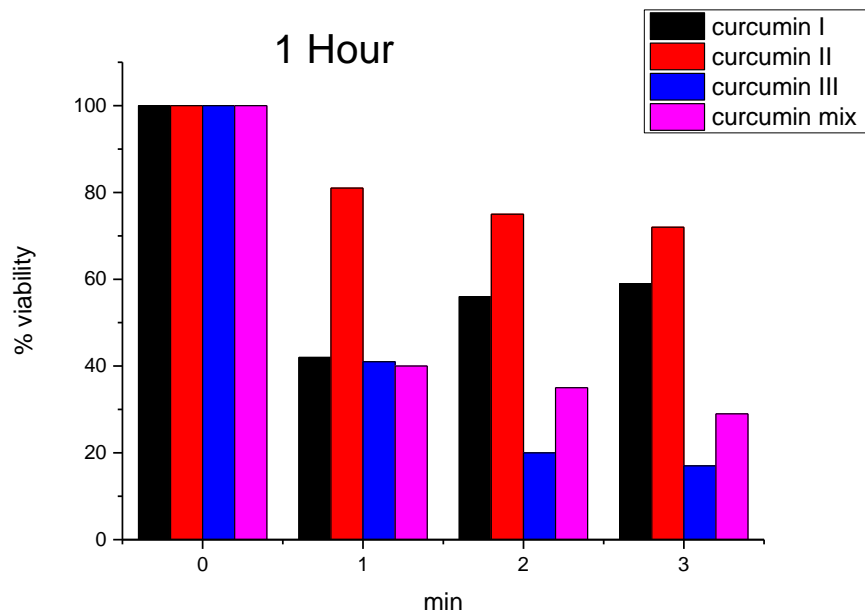
Δ)Curcumin mixture



Διάγραμμα 20 Βιωσιμότητα των κυττάρων με το μείγμα κουρκουμινοειδών ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Στο διάγραμμα 21, παρουσιάζεται το μείγμα κουρκουμινοειδών σε συγκέντρωση $c=3\mu\text{M}$ ύστερα από εφαρμογή της PDT σε διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης. Συμπεραίνουμε ότι η ουσία έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε όλους τους χρόνους επώασης (1,3,6 ώρες). Αυτό είναι πολύ ενθαρρυντικό αποτέλεσμα, καθώς ακόμα και στη 1 ώρα επώασης της ουσίας έχουμε ίδια αποτελέσματα και μετά από 6 ώρες επώασης. Έτσι, η PDT γίνεται πιο αποδοτική και ο ασθενής δεν ταλαιπωρείται.

Ε) Συγκριτική μελέτη των ουσιών με τον χρόνο ακτινοβολήσεως σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

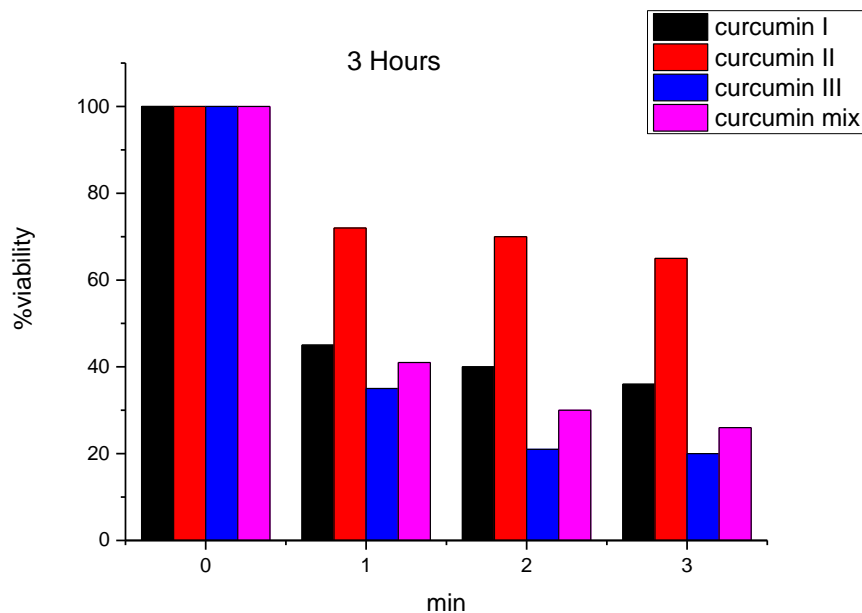


Διάγραμμα 21 Βιωσιμότητα κυττάρων για 1 ώρα επώασης για κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσεως (min)

Στο διάγραμμα 22, παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα των ουσιών ύστερα από μία ώρα επώασης με τα κύτταρα. Παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα για όλες τις ουσίες είναι ικανοποιητικά. Στο 1^ο min ακτινοβολήσεως, η κουρκουμίνη I και το μείγμα κουρκουμινοειδών εμφανίζουν σημαντική πτώση της βιωσιμότητας στο 40%, το οποίο είναι πολύ σημαντικό και ενθαρρυντικό για την εφαρμογή της PDT. Η κουρκουμίνη II, εμφανίζει μία πιο ομαλή πτώση προσεγγίζοντας το 80%.

Στο 2^ο min ακτινοβολήσεως, η κουρκουμίνη I εμφανίζει αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας, που μπορεί να οφείλεται είτε σε καταστροφή της ουσίας ή αποδέσμευσης από τα κύτταρα. Οι υπόλοιπες ουσίες παρουσιάζουν μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας, με την κουρκουμίνη III να προσεγγίζει μόλις το 20%.

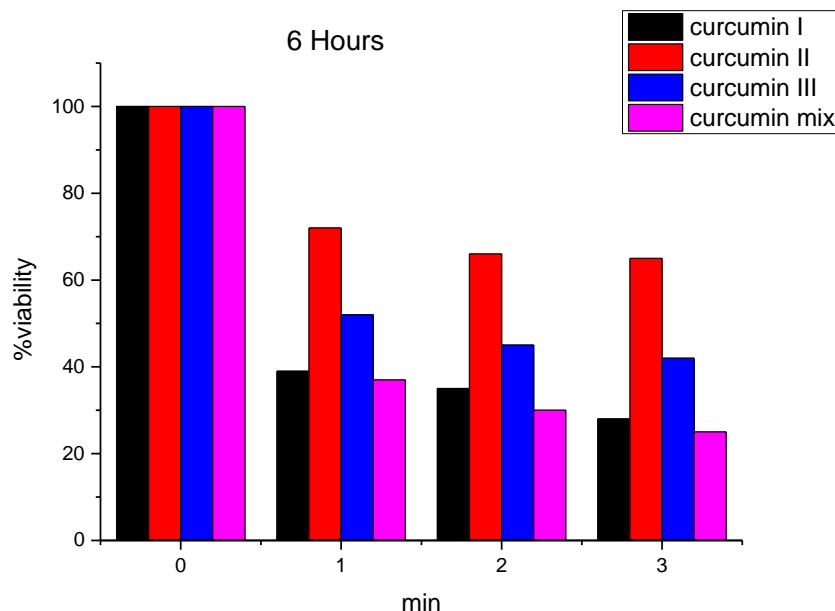
Στο 3^ο min ακτινοβολήσεως, η πορεία και για τις τρεις ουσίες είναι παρόμοια με εκείνη στο 2^ο min ακτινοβολήσεως.



Διάγραμμα 22 Βιωσιμότητα κυττάρων για 3 ώρες επώασης με κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (min)

Στο παραπάνω διάγραμμα 23, παρουσιάζονται οι ουσίες που μελετήθηκαν ύστερα από 3 ώρες ακτινοβολήσης. Τα αποτελέσματα είναι αρκετά ικανοποιητικά. Από το 1^ο min η θνησιμότητα των κυττάρων φτάνει το 40 % με χρήση της κουρκουμίνης I, του μείγματος κουρκουμινοειδών και της κουρκουμίνης III ενώ η κουρκουμίνη II προσεγγίζει το 75 %.

Στα 2 και 3 min ακτινοβολήσης, όλες οι ουσίες παρουσιάζουν πτώση του ποσοστού βιωσιμότητας καταλήγοντας στο 3^ο min να είναι <20 %, ενώ η κουρκουμίνη II παρουσιάζει σταθερή πορεία ύστερα από 2 και 3 min ακτινοβολήσης.



Διάγραμμα 23 Βιωσιμότητα κυττάρων για 6 ώρες επώασης με κάθε ουσία συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (min)

Το διάγραμμα 24, αναφέρεται σε μελέτη των ουσιών ύστερα από 6 ώρες επώασης. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά για την εφαρμογή της PDT. Το ποσοστό βιωσιμότητας μειώνεται στο 40% από τα πρώτα λεπτά ακτινοβολήσης με χρήση της κουρκουμίνης I και του μείγματος κουρκουμινοειδών, στο 50% με χρήση της κουρκουμίνης III και στο 70 % με χρήση της κουρκουμίνης II.

Στα 2 και 3 min ακτινοβολήσης, η κουρκουμίνη I και το μείγμα κουρκουμινοειδών καταλήγουν σε πολύ σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας μόλις 25%. Η κουρκουμίνη III φτάνει το 40 % τελική πτώση του ποσοστού βιωσιμότητας. Ενώ, η κουρκουμίνη II, φαίνεται να μην παρουσιάζει κάποια διαφορά στην πορεία της βιωσιμότητας των κυττάρων.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Συμπεράσματα

Η PDT έχει εφαρμοστεί κλινικά σε διάφορους όγκους όπως στο δέρμα, όγκους του οισοφάγου, του πνεύμονα, της κεφαλής και του αυχένα, του ήπατος, της ουροδόχου κύστης και του προστάτη (σχετιζόμενος με την ηλικία εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας, ηπατική μετάσταση, μεταστάσεις του μαστού, μεταστάσεις θωρακικού τοιχώματος και σάρκωμα Kaposi), δεδομένων των πλεονεκτημάτων της έναντι άλλων συμβατικών θεραπειών. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές τεχνικές δυσκολίες στην εφαρμογή της κλασσικής PS-based PDT στη θεραπεία ευρέος φάσματος όγκων, ειδικά σε αυτούς που αναπτύσσονται σε βαθιούς ιστούς. Οι περισσότεροι κλασικοί PS έχουν περιορισμούς, όπως η κακή διαλυτότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αβέβαιη επιλεκτικότητα μεταξύ του όγκου και των φυσιολογικών ιστών για κλινική χρήση και η περιορισμένη διείσδυση του φωτός στους ιστούς. Στην παρούσα εργασία διεξάγεται μελέτη για τη χρήση των τεσσάρων παραγώγων κουρκουμίνης ως φωτοευαισθητοποιητές κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας ενάντια του καρκίνου του δέρματος. Συνοπτικά τα αποτελέσματα της έρευνας είναι τα εξής:

- Η φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης έδειξε ότι τα τέσσερα παράγωγα κουρκουμινών, παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση στην περιοχή 320nm-480nm και διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματός τους. Η ικανότητα απορρόφησης των ουσιών είναι πολύ σημαντική για την χρήση τους ως φωτοευαισθητοποιητές στην PDT. Εφόσον οι ουσίες δρουν με την απορρόφηση επαρκούς φωτός, κρίνονται ικανοποιητικές για την χρήση τους ως PS.
 - Τα τέσσερα παράγωγα κουρκουμινών παρουσιάζουν εκπομπή φθορισμού στην περιοχή 440nm-640nm για διεγέρσεις στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης τους. Η εκπομπή φθορισμού είναι ικανοποιητική και για τα τέσσερα παράγωγα κουρκουμινών, φαινόμενο πολύ σημαντικό για τη φωτοδυναμική διάγνωση.
 - Μελετώντας την φωτολεύκανση των ουσιών, παρατηρείται ότι και στα τέσσερα παράγωγα κουρκουμινών η μέγιστη ένταση του σήματος απορρόφησης του διαλύματος που ακτινοβολήθηκε, εμφανίζει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης. Η κουρκουμίνη III εμφανίζει πιο έντονη πτώση άρα και μεγάλη φωτοκαταστροφή. Ακολούθως, η κουρκουμίνη I εμφανίζει πτώση και ελαφρά μετατόπιση μετά από 20 min ακτινοβολήσης. Ενώ, ελαφρά πτώση εμφανίζει η κουρκουμίνη II και πολύ μικρή πτώση το μείγμα κουρκουμινολιδών.
- Η συμπεριφορά του PS όσον αφορά τη φωτολεύκανση είναι εξαιρετικά σημαντική. Καθορίζει την επιτυχία της θεραπείας και συνδέεται με την παραμένουσα φωτοευαισθησία στον οργανισμό του ασθενή μετά από την εφαρμογή της PDT. Γι αυτό το λόγο, στα πρώτα λεπτά της εφαρμογής της PDT θα πρέπει να παραμένει σταθερή η δράση της PS και ακολούθως να μειώνεται η φωτοδυναμική δράση της ουσίας.

- Όλες οι ουσίες παρουσιάζουν ικανοποιητική παραγωγή ελεύθερων ριζών, εκτός από το μείγμα κουρκουμινοειδών που φαίνεται να απενεργοποιείται, καθώς δεν εμφανίζει μεταβολή στην απορρόφηση συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης. Μεγαλύτερη παραγωγή ROS έχει η κουρκουμίνη ΙΙΙ, ακολουθεί η κουρκουμίνη ΙΙ και με μικρή παραγωγή ROS η κουρκουμίνη Ι. Η ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών ενός φωτοευαισθητοποιητή, είναι μείζονος σημασίας που καθορίζει την επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης των ουσιών μετά από επώαση για 1,3 και 6 ώρες με υγιή δερματικά κύτταρα τύπου HFFF2 και επιπλέον ακτινοβολήσης για 1min 2min 3min, έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η κουρκουμίνη Ι, παρουσίασε μεγαλύτερη πτώση της βιωσιμότητας κυττάρων μετά από 6 ώρες επώασης (~40%). Η κουρκουμίνη ΙΙ, ύστερα από 3 και 6 ώρες επώασης παρουσίασε παρόμοια πτώση στο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων (~60%). Η κουρκουμίνη ΙΙΙ, είχε μεγάλη μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων κοντά στο 20% μετά από 3 και 6 ώρες επώασης. Το μείγμα των κουρκουμινοειδών είχε παρόμοιο ικανοποιητικό αποτέλεσμα για όλους τους χρόνους επώασης και το ποσοστό βιωσιμότητας μειώθηκε στο 20%.

Συνοπτικά, οι κουρκουμίνες εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά την χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Θα ήταν αρκετά ελπιδοφόρο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες και πειράματα για τις συγκεκριμένες ουσίες ώστε να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Μελλοντικές προτάσεις

Η εμφάνιση καρκινογενέσεων/μεταλλάξεων είναι πιθανό να οφείλονται και στην καθημερινή διατροφή των ανθρώπων, καθώς λαμβάνουν καθημερινά μικρές ποσότητες καρκινογόνων ουσιών και μεταλλαξιογόνων παραγόντων. Η κουρκουμίνη από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούταν σε διάφορα καρυκεύματα ή ακόμα και στη μαγειρική. Επειδή η κουρκουμίνη είναι μη τοξική, μη καρκινογόνα και αποτελεί ήδη μέρος της διατροφικής συνήθειας, η κατανάλωση κουρκουμίνης θα μπορούσε να βοηθήσει της έκθεσης στο ηλιακό φως και άλλων παραγόντων που μπορεί να προκαλούν καρκίνο στους ανθρώπους.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αποδείχθηκαν ενθαρρυντικά και επιβεβαίωσαν την επιτυχημένη χρήση της κουρκουμίνης στην αντιμετώπιση του καρκίνου και κυρίως των δερματικών αλλοιώσεων που μελετήθηκαν. Στη συνέχεια, για περαιτέρω κλινική χρήση της κουρκουμίνης θα ήταν πρόκληση να εξετασθεί η χρήση των εν λόγω ουσιών σε πειραματόζωα. Θα ήταν χρήσιμο να εξετασθεί η παραμένουσα φωτοευαισθησία στα πειραματόζωα, καθώς αποτελεί μία δυσμενή παρενέργεια για τους πάσχοντες ασθενείς κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Επίσης, μεγάλη σημασία έχει η μελέτη της επιλεκτικότητας των παραγώγων κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή. Συγχρόνως, θα πρέπει να μελετηθεί ο χρόνος αποδέσμευσης από τα κύτταρα, τόσο τα υγιή όσο και τα καρκινικά..

Επιπλέον, πέρα από τη χρήση των κουρκουμινών στη φωτοδυναμική θεραπεία, ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα και για χρήση των ουσιών στη φωτοδυναμική διάγνωση. Ένας από τους μελλοντικούς στόχους επομένως είναι και η διερεύνηση της χρήσης των κουρκουμινολοιδών στη φωτοδυναμική διάγνωση του καρκίνου.

Τέλος, υψηλής σημασίας για καλύτερα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας θα ήταν ο πιθανός εγκλεισμός των παραγώγων της κουρκουμίνης σε νανομεταφορείς και η περαιτέρω διερεύνηση των προοπτικών που θα προκύψουν μέσω αυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Juan Zhang, Chengshi Jiang, João Paulo Figueiró Longo, Ricardo Bentes Azevedo, Hua Zhang, Luis Alexandre Muehlmann, An updated overview on the development of new photosensitizers
- ² Luksiene, Z., 2003. Photodynamic therapy: Mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina* 39, 1137-1150.
- ³ Wachowska, M., Muchowicz, A., Firczuk, M., Gabrysiak, M., Winiarska, M., Bojarczuk, K., Golab, J., 2011. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer molecules 16, 4140-4164.
- ⁴ Nguyen, Q.T., Tsien, R.Y., 2013. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation – a new cutting edge. *Nature Reviews of Cancer*. 13, 653-662.
- ⁵ Allison, R.R., 2016. Fluorescence guided resection (FGR): A primer for oncology. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13, 73-80.
- ⁶ Fabris, C., Soncin, M., Camerin, M., Corsi, F., Cattin, I., Cardin, F., Guidolin, L., Jori, G., Coppelotti, O., 2014. Photodynamic therapy: A novel promising approach for the treatment of spontaneous microbial infections in pet animals. In: Abdel-Kader, M.H. (Ed.). *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. Springer, New York, NY, USA, pp 255-268.
- ⁷ Sellera, F.P., Gargano, R.G., Libera, A.M., Benesi, F.J., Azedo, M.R., de Sa, L.R., Ribeiro, M.S., da Silva Baptista, M., Pogliani, F.C., 2016. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: Report of ten cases. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13, 120-122.
- ⁸ Jane Dobson, Genilson Fernandes de Queiroz, Jon P. Golding, Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects, *The Veterinary Journal* , Volume 233, March 2018, Pages 8-18.
- ⁹ Eun Ji Hong, Dae Gun Choi, Min Suk Shim, Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 6, Issue 4, July 2016, Pages 297-307.
- ¹⁰ Dudley L. McCaw and Jeffrey N. Bryan, Chapter 17- Photodynamic Therapy, *Cancer Management in Small Animal Practice*, 2010, Pages 163–166.
- ¹¹ Ron R. Allison MD, Gordon H. Downie MD, PhD Rosa Cuenca MD Xin-Hua Hu PhD ,Carter J.H. Childs MD, Claudio H. Sibata PhD, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* Volume 1, Issue 1 May 2004, Pages 27-42.
- ¹² Ron R Allison ,MD, Gordon H Downie, MD, PhD, Rosa Cuenca, MD, Xin-Hua Hu, PhD, Carter J.H. Childs, MD, Claudio H. Sibata, PhD, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* ,(2004), 27-42.
- ¹³ Popovic EA, Kaye AH, Hill JS, Photodynamic therapy of brain tumors, *J Clin Laser Med Surg* (1996), 251-61.
- ¹⁴ <http://www.photofrin.com/>
- ¹⁵ Stanley B Brown, Elizabeth A Brown, and Ian Walker, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment.
- ¹⁶ Stephen Western, Photodynamic Therapy, Clinical trials and Noteworthy Treatments for brain tumors.
- ¹⁷ Dr. Humberto Cabrera Morales Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas The Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics, Photodynamic Therapy – Photosensitizers.

- ¹⁸ Photodynamic Therapy for Cancer, National cancer institute, U.S. Department of Health and Human Services.
- ¹⁹ Augustine Amalraj, Anitha Pius, Sreerag Gopi, Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7 (2017).
- ²⁰ Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. 2008. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75(4):787–809.
- ²¹ Tom, The history and benefits of turmeric curcumin exploring the origins and properties of turmeric curcumin, smarter reviews (<https://smarter-reviews.com/article/sr-history-of-turmeric>).
- ²² Subash C. Gupta, Sridevi Patchva and Bharat B. Aggarwal, Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *The AAPS Journal*, Vol. 15, No. 1, January 2013.
- ²³ 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, 338-378.
- ²⁴ Y.J. Wang, M.H. Pan, A.L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, C.Y. Hsieh, J.K. Lin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867–1876.
- ²⁵ K.I. Priyadarsini / *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 10 (2009) 81–95.
- ²⁶ 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* 10 (2009) 81–95.
- ²⁷ <http://www.curcuminforhealth.com/health-benefits/cancer/>
- ²⁸ N. C. Araújo & C. R. Fontana & V. S. Bagnato & M. E. M. Gerbi, Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine, *Lasers Med Sci* (2014) 29:629–635.
- ²⁹ Natalia Costa Araujo, Rebeca Ferraz de Menezes, Vanda Elizabeth Martinez Gerbi, Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer, *Photomedicine and Laser Surgery*, January 2017.
- ³⁰ Renata Prandini Adum de Matos, Marilia Freitas Calmon, Camila Fernanda Amantino, Luisa Lina Villa, Fernando Lucas Primo, Antonio Claudio Tedesco, and Paula Rahal , Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines , *BioMed Research International* Volume 2018 (2018), Article ID 4057959, 11 page.
- ³¹ Diego Portes Vieira Leite, Ricardo S. Navarro, Cristina F. Ortolani, Herica Ricci, Fernanda Rossi Paolillo, Vanderlei Salvador Bagnato PDT with blue light and curcumin for oral disinfection, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 12 (2015) 325–375.
- ³² Kunal Sonavane, Jeffrey Phillips, Oleksandr Ekshyyan, Tara Moore-Medlin, Jennifer Roberts Gill, Xiaohua Rong, Raghunatha Reddy Lakshmaiah, Fleurette Abreo, Douglas Boudreaux, John L. Clifford, and Cherie-Ann O. Nathan , Topical Curcumin-Based Cream Is Equivalent to Dietary Curcumin in a Skin Cancer Model, *Journal of Skin Cancer* Volume 2012 (2012).
- ³³ Wen-Hsiung Chan, Hsin-Jung Wu, Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A-431 cells, *Journal of cellular Biochemistry*, 5 April 2004.
- ³⁴ G.K. Reddy, L. Stehno-Bittel, C.S. Enwemeka Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats *Wound Repair Regen.*, (2001), 248-255.
- ³⁶ <http://www.perkinelmer.co.kr/files/LS%2045%20Users%20Guide%20-%2009934437.pdf>
- ³⁷ <https://partners.perkinelmer.com/Content/DealerSalesInfo/Product%20Lines/Materials%20Characterizations/Fluorescence/Brochures/LS55-Bro.pdf>