

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



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

ΜΕΛΕΤΗ, ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ
ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ
ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΩΝ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗ
ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Παρασκευή Α. Παναγοπούλου

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π. Α΄

Αθήνα, 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



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

ΜΕΛΕΤΗ, ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΩΝ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Παρασκευή Α. Παναγοπούλου

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ
Συνεπιβλέπουσα: Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π. Α'

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την.....

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

.....
Γ.Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π

.....
Π. Τσανάκας
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα, 2019

.....
Παρασκευή Α. Παναγοπούλου
Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών ΕΜΠ

Copyright © – Παρασκευή Παναγοπούλου, 2019
Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

.....
Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

*Στους γονείς μου,
Αποστόλη και Αντιγόνη*

*...Όσο ψηλά κι αν ανεβείς σε τούτη τη ζωή σου,
να μην ξεχνάς πως τα φτερά στα δώσαν οι γονείς σου...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, Καθηγητή Ε.Μ.Π, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αμέριστη διάθεση συνεργασίας, τις υποδείξεις και τις συμβουλές του.

Ευχαριστώ την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος του εργαστηριακού και διδακτικού προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π) του Ε.Μ.Π, για την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη στήριξη και το ενδιαφέρον της κατάφερα να πάρω πολύτιμες γνώσεις γύρω από τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία. Χωρίς τη βοήθεια και την προθυμία της για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που προέκυψαν τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

Ευχαριστώ πολύ την Δρ. Μαρίνα Σαγνού και την Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή, ερευνήτριες στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών και μέλη του Εργαστηρίου Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». Εκτός από το γεγονός ότι μας παρείχαν τις προς μελέτη ουσίες, με βοήθησαν να φέρω εις πέρας πειράματα που δεν θα ήταν υλοποιήσιμα τη δεδομένη χρονική στιγμή χωρίς την καθοριστική συμβολή τους.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συμφοιτητές μου για τα όμορφα και αξέχαστα φοιτητικά χρόνια που περάσαμε μαζί. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Γιάννη, τη Δανάη, τον Σίμο, την Κατερίνα, τον Γιάννη και τον Πάνο για τις ξεχωριστές στιγμές που ζήσαμε, που παλέψαμε και που μάθαμε να αντιμετωπίζουμε την κάθε δυσκολία. Δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι οι φίλοι είναι η οικογένεια που εμείς επιλέγουμε.

Κλείνοντας, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην οικογένεια μου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη της κατά τη διάρκεια όλων των σπουδών μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Αποστόλη και Αντιγόνη, για την αγάπη τους, την υπομονή τους και την συμπαράσταση τους σε κάθε στάδιο της ζωής μου αλλά και τα αδέρφια μου, Ευδοκία, Αλέξη, Χρυσούλα, Κωνσταντίνα, και Ελένη καθώς ο καθένας με στήριξε και με βοήθησε να εκπληρώσω τους στόχους μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα ανίψια μου Στέργιο, Αντιγόνη και Ελένη που αν και πολύ μικρά ακόμη, η καθημερινή επαφή μαζί τους με γέμιζε χαρά και ζωντάνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση της φωτεινής ακτινοβολίας για την θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων όπως η ψωρίαση συναντάται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα. Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), συνδυάζοντας μία πηγή φωτός, μία φωτοευαίσθητη ουσία και οξυγόνο επάγει τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Αν και οι τρεις αυτοί παράγοντες δεν είναι τοξικοί από μόνοι τους, ο συνδυασμός τους οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Κατά την PDT χορηγείται στον ασθενή, συνήθως ενδοφλέβια, η φωτοευαίσθητη ουσία η οποία συσσωρεύεται επιλεκτικά στους καρκινικούς όγκους. Με την ακτινοβολία του όγκου, σε κατάλληλο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη ζώνη απορρόφησης του, παρουσία οξυγόνου ενεργοποιείται μια σειρά από αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών ή στη δημιουργία μονήρους οξυγόνου. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα θανατώνονται μέσω της τοξικότητας που επάγεται.

Η PDT είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος, το μέλλον της οποίας είναι συνδεδεμένο με την διαρκή έρευνα. Παράγοντες όπως η επιλεκτικότητα συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας, ο χρόνος αποβολής της από τον οργανισμό, οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές της ιδιότητες, η ικανότητα της για παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της PDT.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται μελέτη του μείγματος της κουρκουμίνης, η οποία εξάγεται από το φυτό turmeric (*curcuma Longa*), και των τριών συστατικών της (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) για χρήση τους κατά την PDT ως φωτοευαισθητοποιητές. Κεντρικό στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η συγκριτική μελέτη του μείγματος των κουρκουμινών με τα συστατικά του με σκοπό τη διερεύνηση και βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας τους στη PDT. Ο στόχος αυτός περαιτέρω αναλύεται και εξειδικεύεται στους εξής επιμέρους στόχους: α. μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων και β. μελέτη αλληλεπίδρασης με κύτταρα.

Αρχικά, πραγματοποιείται μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τόσο του μείγματος της κουρκουμίνης όσο και των συστατικών του. Πιο συγκεκριμένα, διεξάγονται φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης και φθορισμού για διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαλύτες. Αναπτύσσεται διάταξη ακτινοβολίας, βασισμένη σε μπλε led, για τη φωτεινή ενεργοποίηση των κουρκουμινών και μελετάται η φωτοσταθερότητα και η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ακόμη, μελετάται ο χωρικός εντοπισμός των ουσιών σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231) καθώς και η τοξικότητα τους απουσία φωτός. Τέλος, αναπτύσσεται μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης της συμπεριφοράς του μείγματος των κουρκουμινών βασισμένο στη συμπεριφορά των συστατικών του. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι ενθαρρυντικά για τη μελλοντική χρήση των συστατικών της κουρκουμίνης ως φωτοευαισθητοποιητές, καθώς παρουσιάζουν υψηλή και γρήγορη απορρόφηση, υψηλό φθορισμό και μεγάλη ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοδυναμική θεραπεία, φωτοευαισθητοποιητής, κουρκουμίνη, φάσματα, φωτοφυσικές ιδιότητες, απορρόφηση, φθορισμός, ελεύθερες ρίζες, καρκινικά κύτταρα, MDA-MB-231, καρκίνος του μαστού, χωρικός εντοπισμός

ABSTRACT

Light irradiation has already been used to treat various skin conditions, such as psoriasis, since antiquity. Photodynamic therapy (PDT), combining a light source, a photosensitive substance and oxygen induces toxicity to the cancer cells. Although all three of these factors are not individually toxic, their combined action leads to cell death. During PDT, photosensitizer is administered to the patient, usually intravenously, and is selectively accumulated in the cancerous tumors. Tumor irradiation, at an appropriate wavelength corresponding to its absorption band, in the presence of oxygen, triggers a series of reactions that lead to the production of free radicals or to the formation of singlet oxygen. Thus, the cancer cells are killed by the induced toxicity.

PDT is a promising method, the future of which is linked to ongoing research. Efficacy of PDT is determined by factors such as the selective accumulation of the photosensitive substance, its elimination time from cells and organisms, its photophysical and photochemical properties and its ability to produce free radicals.

The present thesis focuses on the study of the mixture of curcumin extracted from turmeric plant (*Longa curcuma*) and its three components (curcumin I, curcumin II, curcumin III) for their use in PDT as photosensitizers. The main objective of this thesis is the comparative study of the mixture of curcumin with its constituents in order to investigate and optimize their effectiveness in PDT. This objective is further analyzed and specified in the following sub-objectives: a. study of photophysical properties of the photosensitizer and b. cell – photosensitizer interactions.

Initially, the photophysical properties of both the curcumin mixture and its constituents are studied. In particular, absorption and fluorescence spectroscopic studies are performed for different concentrations and solvents. A blue-led based irradiation device is developed for curcumins light activation and their photostability and free radical production capacity are studied. Furthermore, the spatial localization of the substances in breast cancer cells (MDA-MB-231) and their toxicity in the absence of light are also being examined. Finally, a mathematical model for predicting the behavior of the curcumin mixture based on the behavior of its constituents is developed. The results are encouraging for the future use of curcumin components as photosensitizers, as they exhibit high and rapid absorption, high fluorescence and high free radical production capacity.

Keywords: *Photodynamic therapy, photosensitizers, curcumin, spectra, photophysical properties, absorption, fluorescence, free radicals, cancer cells, MDA-MB-231, breast cancer, spatial localization*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT.....	11
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	13
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	16
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	18
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	21
1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	21
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	21
1.2 Φωτοδυναμική θεραπεία –PDT.....	22
1.3 Απορρόφηση του φωτός.....	24
1.3.1 Εσωτερική μετατροπή.....	24
1.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$	25
1.3.3 Φθορισμός.....	25
1.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός.....	25
1.3.5 Φωσφορισμός.....	26
1.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων	26
1.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού.....	26
1.3.8 Δονητική αποδιέγερση	26
1.4 Διαδικασία παραγωγής ελευθέρων δραστικών ριζών οξυγόνου-Μηχανισμοί PDT.	26
1.4.1 Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί	28
1.5 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου	29
1.5.1.1 Απόπτωση.....	30
1.5.1.2 Νέκρωση.....	31
1.5.1.3 Αυτοφαγία	32
1.6 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας	33
1.7 Μελλοντικές προοπτικές της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	37
2. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ	37
2.1 Ορισμός και Ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή	37
2.2 Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών	38
2.2.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς	38
2.2.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2 ^{ης} γενιάς	39
2.2.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} γενιάς	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	43
3. ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ	43
3.1 Η κουρκουμίνη και τα παράγωγα της	43

3.2	Δομή	44
3.3	Χρήσεις και Εφαρμογές της κουρκουμίνης	44
3.4	Ιδιότητες κουρκουμίνης	46
3.4.1	Φωτοχημικές Ιδιότητες	46
3.4.2	Φωτοφυσικές Ιδιότητες	47
3.5	Η κουρκουμίνη στη φωτοδυναμική θεραπεία	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4		51
4.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ	51
4.1	Σκοπός	51
4.2	Πειραματικές Διατάξεις	51
4.2.1	Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης	51
4.2.2	Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού	54
4.2.3	Διάταξη Ακτινοβολήσης	57
4.2.4	Συνεστιακό Μικροσκόπιο φθορισμού	59
4.3	Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν	61
4.3.1	Curcumin I	61
4.3.2	Curcumin II	62
4.3.3	Curcumin III	62
4.3.4	Curcumin mix	62
4.3.5	DMSO (dimethyl sulfoxide)	63
4.3.6	PBS (Phosphate Buffered Saline)	63
4.3.7	Αιθανόλη (Ethanol – EtOH)	63
4.3.8	NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτιναμίδο-αδενιν- δινουκλεοτίδιο)	63
4.3.9	EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	65
4.3.10	FBS (fetal bovine serum)	66
4.3.11	Αντιβιοτικό	66
4.3.12	DMEM	66
4.3.13	Τρυψίνη	66
4.3.14	Ισοπροπανόλη	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5		67
5.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ	67
5.1	Κυτταρικές καλλιέργειες	67
5.1.1	Απόψυξη κυτταρικής σειράς MDA-MB-231	67
5.1.2	Ανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς MDA-MB-231	68
5.2	Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινών	69
5.2.1	Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης κουρκουμινών	69
5.2.2	Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού	71
5.2.3	Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών με χρήση NADH	71
5.3	Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμινών στα κύτταρα MDA-MB-231	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6		75

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	75
6.1 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων	75
6.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης.....	75
6.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού.....	86
6.2 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών	94
6.3 Φωτολεύκανση του μείγματος κουρκουμοειδών και των συστατικών του	101
6.4 Χωρικός εντοπισμός της κουρκουμίνης και των συστατικών της σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231)	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	107
7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
7.1 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης και των συστατικών της....	107
7.1.1 Απορρόφηση σε διάφορες συγκεντρώσεις και διαλύτες	107
7.1.2 Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	108
7.1.3 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών	108
7.1.4 Φωτολεύκανση του μείγματος κουρκουμοειδών και των συστατικών του ...	109
7.1.5 Χωρικός εντοπισμός της κουρκουμίνης και των παραγώγων της στα κύτταρα MDA-MB-231	109
7.2 Προτάσεις για το μέλλον	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας	22
Εικόνα 2: Διάγραμμα Jablonski ^[12]	24
Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης κατά την φωτοδυναμική θεραπεία ^[17]	27
Εικόνα 4: Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου απόπτωσης,	30
Εικόνα 5: Διαδικασία Απόπτωσης.....	31
Εικόνα 6: Διάφορα της νέκρωσης με την απόπτωση.....	32
Εικόνα 7: Η διαδικασία της αυτοφαγίας.....	33
Εικόνα 8: Συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητή-φωτός	38
Εικόνα 9: Δομή της πορφυρίνης.....	39
Εικόνα 10: Χημική σύνθεση φθαλοκυανίνης	40
Εικόνα 11: Υδροφιλικά φάρμακα και υδροφοβικοί παράγοντες.....	41
Εικόνα 12: ο φωτό κουρκουμάς και η ουσία κουρκουμίνη	43
Εικόνα 13: Χημική δομή των κουρκουμινολιδίων	44
Εικόνα 14: Χημική δομή της κουρκουμίνης.....	44
Εικόνα 15: Ιδιότητες κουρκουμίνης σε ιατρικό επίπεδο	45
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση φωτοφυσικής και φωτοχημικής διεργασίας στην κουρκουμίνη.....	47
Εικόνα 17: Διάφορες ταυτομερές μορφές κουρκουμίνης	48
Εικόνα 18: Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer.....	52
Εικόνα 19: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης	52
Εικόνα 20: Υποδοχείς του οργάνου για τις κυβέτες.....	54
Εικόνα 21: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.....	55
Εικόνα 22: Υποδοχή κυβέτας του φασματοφωτόμετρου φθορισμού.....	55
Εικόνα 23: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου φθορισμού	56
Εικόνα 24: Bridgelux Power LED 10W	57
Εικόνα 25: Διάταξη ακτινοβολήσης	58
Εικόνα 26: Συνεστιακό διφωτονικό μικροσκόπιο Leica TCS-SP5II	59
Εικόνα 27: Λογισμικό LASAF	59
Εικόνα 28: Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser	60
Εικόνα 29: Διάγραμμα ροής πληροφορίας σε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser	61
Εικόνα 30: Χημική δομή της κουρκουμίνης I	62
Εικόνα 31: Χημική δομή κουρκουμίνης II	62
Εικόνα 32: Χημική δομή της κουρκουμίνης III.....	62
Εικόνα 33: Χημική δομή της DMSO.....	63
Εικόνα 34: Χημική δομή της αιθανόλης.....	63
Εικόνα 35: Χημική δομή NAD ⁺ και NADH.....	64

Εικόνα 36: Σχηματισμός NADH από NAD ⁺ και αντίστροφα	64
Εικόνα 37: Απορρόφηση NAD ⁺ και NADH σε σχέση με το μήκος κύματος	65
Εικόνα 38: Χημική δομή EDTA	65
Εικόνα 39: Χημική δομή ισοπροπανόλης.....	66
Εικόνα 40: Κυτταρική σειρά MDA-MB-231	67
Εικόνα 41: Τοποθέτηση κυττάρων στη φλάσκα.....	68
Εικόνα 42:Κουρκουμίνη I-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.....	103
Εικόνα 43: Κουρκουμίνη II-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.....	104
Εικόνα 44: Κουρκουμίνη III-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.....	104
Εικόνα 45: Κουρκουμίνη Mix-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.....	105

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Κατανομή ακτινοβολίας της πηγής Bridgelux Power LED 10W στα διάφορα μήκη κύματος	58
Διάγραμμα 2: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	76
Διάγραμμα 3: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης I ως προς τη συγκέντρωση	76
Διάγραμμα 4: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης II σε διάφορες συγκεντρώσεις	77
Διάγραμμα 5: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης II ως προς τη συγκέντρωση	77
Διάγραμμα 6: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης III σε διάφορες συγκεντρώσεις	78
Διάγραμμα 7: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης III ως προς τη συγκέντρωση	79
Διάγραμμα 8: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix σε διάφορες συγκεντρώσεις	80
Διάγραμμα 9: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix ως προς τη συγκέντρωση	80
Διάγραμμα 10: Συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινών σε συγκέντρωση 2*10-5M	81
Διάγραμμα 11: Συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινοειδών και του θεωρητικού μοντέλου	83
Διάγραμμα 12: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε διάφορους διαλύτες.....	84
Διάγραμμα 13: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης II σε διάφορους διαλύτες.....	85
Διάγραμμα 14: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης III σε διάφορους διαλύτες	85
Διάγραμμα 15: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix σε διάφορους διαλύτες.....	86
Διάγραμμα 16: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης I σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	87
Διάγραμμα 17: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης I σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας.....	87
Διάγραμμα 18: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης II σε διάφορες συγκεντρώσεις	88
Διάγραμμα 19: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης II σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας.....	88
Διάγραμμα 20: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης III σε διάφορες συγκεντρώσεις	89
Διάγραμμα 21: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης III σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας.....	89
Διάγραμμα 22: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης Mix σε διάφορες συγκεντρώσεις	90
Διάγραμμα 23: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της Mix σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας	91
Διάγραμμα 24: Φάσματα εκπομπής κουρκουμινών σε συγκέντρωση 10 ⁻⁷ M.....	92
Διάγραμμα 25: Συγκριτικά τα φάσματα φθορισμού του μείγματος κουρκουμινοειδών και του θεωρητικού μοντέλου	94
Διάγραμμα 26: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης I και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min.....	95

Διάγραμμα 27: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης I για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης.....	95
Διάγραμμα 28: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης II και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min.....	96
Διάγραμμα 29: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης II για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης	96
Διάγραμμα 30: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης III και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min.....	97
Διάγραμμα 31: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης III για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης.....	97
Διάγραμμα 32: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος μείγματος κουρκουμινοειδών και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min.....	98
Διάγραμμα 33: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση του μείγματος για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης	98
Διάγραμμα 34: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης για τις ουσίες (Curcumin I, Curcumin II, Curcumin III, Curcumin Mix)	99
Διάγραμμα 35: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης για τις ουσίες (Curcumin I, Curcumin II, Curcumin III, Curcumin Mix)-Κανονικοποιημένες Καμπύλες.....	100
Διάγραμμα 36: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των τεσσάρων ουσιών σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης	102

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W	57
Πίνακας 2: Συνοπτική παρουσίαση των παραμέτρων για τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος.....	70
Πίνακας 3: Μοριακό βάρος ουσιών.....	70
Πίνακας 4: Πληροφορίες διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις φθορισμού ..	71
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις των ουσιών που περιέχονται στο διάλυμα προς ακτινοβολήση...	72
Πίνακας 6: Ρυθμίσεις του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser κατά τη λήψη εικόνων των κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με τις τέσσερις φωτοευαίσθητες ουσίες.....	74
Πίνακας 7: Ρυθμίσεις έντασης laser και κέρδους φωτοπολλαπλασιαστή του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης κατά τη λήψη εικόνων των κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με τις τέσσερις φωτοευαίσθητες ουσίες.	74
Πίνακας 8: Συγκριτική μελέτη λ_{max} και μέγιστης απορρόφησης για τις ουσίες που μελετήθηκαν σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} M$	81
Πίνακας 9: Συνοπτικός πίνακας για τα φάσματα εκπομπής των ουσιών σε συγκέντρωση $10^{-7} M$	92

1. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η χρήση του φωτός για την αντιμετώπιση και την θεραπεία ασθενειών όπως η ψωρίαση, η λεύκη και ο καρκίνος παρατηρείται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα. Οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν το φως του ήλιου ως θεραπευτικό μέσο για την καταπολέμηση διαφόρων δερματικών παθήσεων στην προσπάθειά τους να ανακουφιστούν ή και να απαλλαγούν από αυτές^[1]. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα η φωτοθεραπεία επανέρχεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος χάρη στην έρευνα που πραγματοποίησαν και στο έργο που έκαναν οι Niels Finsen, Oscar Raab και Herman von Tappeiner.^[2]

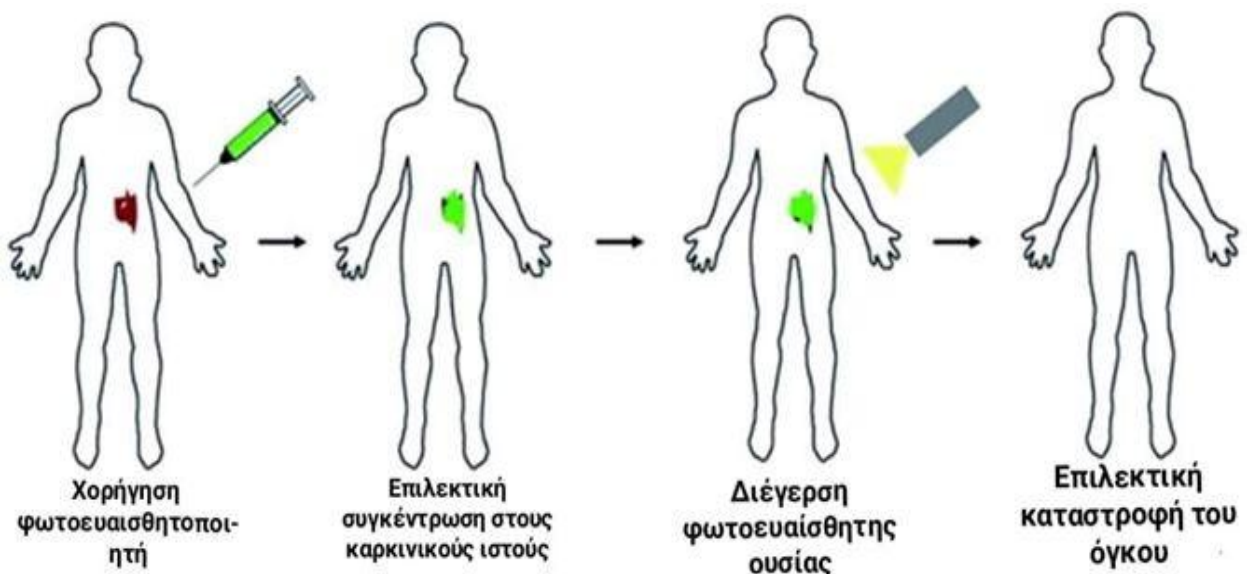
Ο Oscar Raab ήταν εκείνος που τη δεκαετία του 1890 διαπίστωσε ότι η χρήση φωτοευαίσθητης ουσίας σε συνδυασμό με φως μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, καθώς δούλευε στο εργαστήριο του Herman von Tappeiner, ανακάλυψε ότι η χρήση της ακριδίνης σε συνδυασμό με την έκθεση της σε ορατό φως είχε θανατηφόρα αποτελέσματα για την καλλιέργεια από παραμύχια που είχε χρησιμοποιήσει. Αργότερα, και σε συνεργασία με τους καθηγητές του Jesionek, Jodlbauer και Herman von Tappeiner, ανακάλυψαν ότι η ακριδίνη ήταν φωτοευαίσθητη ουσία. Το 1903, ο Herman von Tappeiner χρησιμοποίησε ιωσίνη παρουσία φωτός για θεραπεία του καρκίνου του δέρματος^[3]. Στη συνέχεια, ένα πολύ σημαντικό βήμα για την εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπείας έγινε από τον Γερμανό Meyer-Betz. Ο τελευταίος, το 1913 χορηγώντας αιματοπορφυρίνη στον εαυτό του και εκθέτοντας το δέρμα του στην ακτινοβολία του ήλιου, κατέγραψε τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν και τη φωτοευαισθησία που παρατηρήθηκε, καταλήγοντας σε σημαντικά συμπεράσματα.^[4] Η φωτοδυναμική θεραπεία με παράγωγα πορφυρίνης ως φάρμακα φωτοευαισθητοποίησης αναπτύχθηκε από το 1960 περίπου.^[5] Μεταξύ των δεκαετιών 1950 και 1960 πραγματοποιήθηκαν μελέτες κατά τις οποίες έγιναν εμφανή τα σπουδαία αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) σε καρκινικούς όγκους χρησιμοποιώντας πορφυρίνες ως φωτοευαισθητοποιητές. Πατέρας της, θεωρείται ο Dr. Tom Dougherty. Ο τελευταίος μελέτησε τη χρήση της αιματοπορφυρίνης και των παραγώγων της στην φωτοδυναμική θεραπεία, οδηγώντας στην ευρεία κυκλοφορία ενός φωτοευαισθητοποιητή. Το 1981, παράγωγο της αιματοπορφυρίνης κυκλοφόρησε στην αγορά, με το όνομα Photofrin.^{[1],[3]}

Έχουν περάσει πάνω από 30 χρόνια από την πρώτη χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας και από τότε μέχρι και σήμερα έχει εφαρμοστεί σε χιλιάδες ανθρώπους. Ο ετήσιος αριθμός των επιστημονικών άρθρων που την αφορούν, αυξάνεται σταθερά και νέες πτυχές και εφαρμογές συνεχίζουν να ανακαλύπτονται.^[5] Η αναζήτηση για μια νέα γενιά φωτοευαισθητοποιητών είναι σε εξέλιξη, ειδικά για φωτοευαισθητοποιητές που θα μπορούν να ενεργοποιηθούν με φως μεγαλύτερου μήκους κύματος για να επιτευχθεί έτσι μεγαλύτερη διείσδυση, που θα έχουν πιο καλή επιλεκτικότητα στον όγκο και θα προκαλούν μικρότερη φωτοευαισθησία.^[6] Αν δημιουργηθούν ή ανακαλυφθούν τέτοιες φωτοευαίσθητες ουσίες, η φωτοδυναμική

θεραπεία θα μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεγαλύτερο εύρος και με λιγότερες συνέπειες για την υγεία του ασθενούς. Κάτι τέτοιο μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην εξέλιξη της και γενικότερα σε σπουδαία επιτεύγματα στην αντιμετώπιση διάφορων τύπων καρκίνου.

1.2 Φωτοδυναμική θεραπεία –PDT

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) είναι μία θεραπεία για διάφορες παθήσεις όπως ο καρκίνος αλλά και άλλων μη νεοπλασματικών ασθενειών. Αποτελεί μία διαδικασία η οποία συνδυάζει τρεις παράγοντες προκειμένου να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα, τα οποία δεν είναι άλλα από την καταστροφή των πασχόντων ιστών (εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μία φωτοευαίσθητη ουσία (φωτοευαισθητοποιητής), μία πηγή που εκπέμπει κατάλληλο μήκος κύματος αντίστοιχο της περιοχής απορρόφησης της ουσίας αυτής και οξυγόνο. Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι αδρανείς στο σκοτάδι. Μετά τη χορήγηση τους, η οποία γίνεται συνήθως ενδοφλεβίως και αφού ο ασθενής εκτεθεί στο φως πραγματοποιείται ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή. Το τελευταίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών τοπικά στα καρκινικά κύτταρα και τελικά την καταστροφή του καρκινικού όγκου. Η καταστροφή του όγκου γίνεται είτε με νέκρωση των κυττάρων δηλαδή με απευθείας θάνατο του όγκου, είτε με απόπτωση, αυτοφαγία ή και καταστροφή του μικροαγγειακού δικτύου σταματώντας έτσι τη ροή του αίματος και άρα τη ροή του οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα^[14]. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιτυχία της διαδικασίας πρέπει το φως να στοχεύσει με ακρίβεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης σύγχρονων οπτικών ινών και διαφόρων τύπων ενδοσκοπησης^{[13],[15]}. Το γεγονός ότι στους υγιείς ιστούς εμφανίζεται ελάχιστη τοξικότητα αλλά και το ότι τα όργανα διατηρούν τη φυσιολογική τους λειτουργία χωρίς επιπτώσεις καθιστούν την φωτοδυναμική θεραπεία μια πολύ καλή επιλογή σε συνδυαστικές θεραπείες όπως για παράδειγμα τον συνδυασμό της με χημειοθεραπεία. Δεδομένης της προόδου που έχει κάνει μέχρι σήμερα αλλά και την εξέλιξη της τεχνολογίας είναι σίγουρο ότι η φωτοδυναμική θεραπεία θα διαδραματίσει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου.^[7]



Εικόνα 1: Διαδικασία φωτοδυναμικής θεραπείας

Όπως αναφέρθηκε, η φωτοδυναμική θεραπεία εξαρτάται από τρεις παράγοντες: τον φωτοευαισθητοποιητή ο οποίος απορροφώντας την ακτινοβολία προκαλεί φωτοχημικές και φωτοφυσικές αντιδράσεις, την φωτεινή ακτινοβολία και το οξυγόνο. Κανένας από αυτούς τους παράγοντες δεν είναι τοξικός από μόνος του. Με τον συνδυασμό όμως όλων αυτών ενεργοποιείται μια σειρά φωτοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών ή στη σύνθεση ενός δραστικού προϊόντος το οποίο είναι ένα μόριο οξυγόνου στη μονήρη κατάσταση^[8]. Αναφέρεται, ότι η τριπλή κατάσταση είναι αυτή στην οποία συναντάται το οξυγόνο τις περισσότερες φορές. Η κατάσταση αυτή διακρίνεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το οξυγόνο στη μονήρη κατάσταση εντοπίζεται σε πάρα πολλές χημικές αντιδράσεις και χρησιμοποιείται σε πολλές ιατρικές εφαρμογές^[7]. Σημαντική τοξικότητα προκαλείται από το συγκεκριμένο προϊόν, γεγονός που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος προέρχεται είτε μέσω απόπτωσης είτε μέσω νέκρωσης. Πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ότι τα αποτελέσματα της είναι φωτοχημικά και όχι θερμικά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οποιαδήποτε βλάβη συμβεί στα συστατικά συνδετικών ιστών όπως για παράδειγμα της ελαστίνης και του κολλαγόνου, είναι πολύ μικρή^[9].

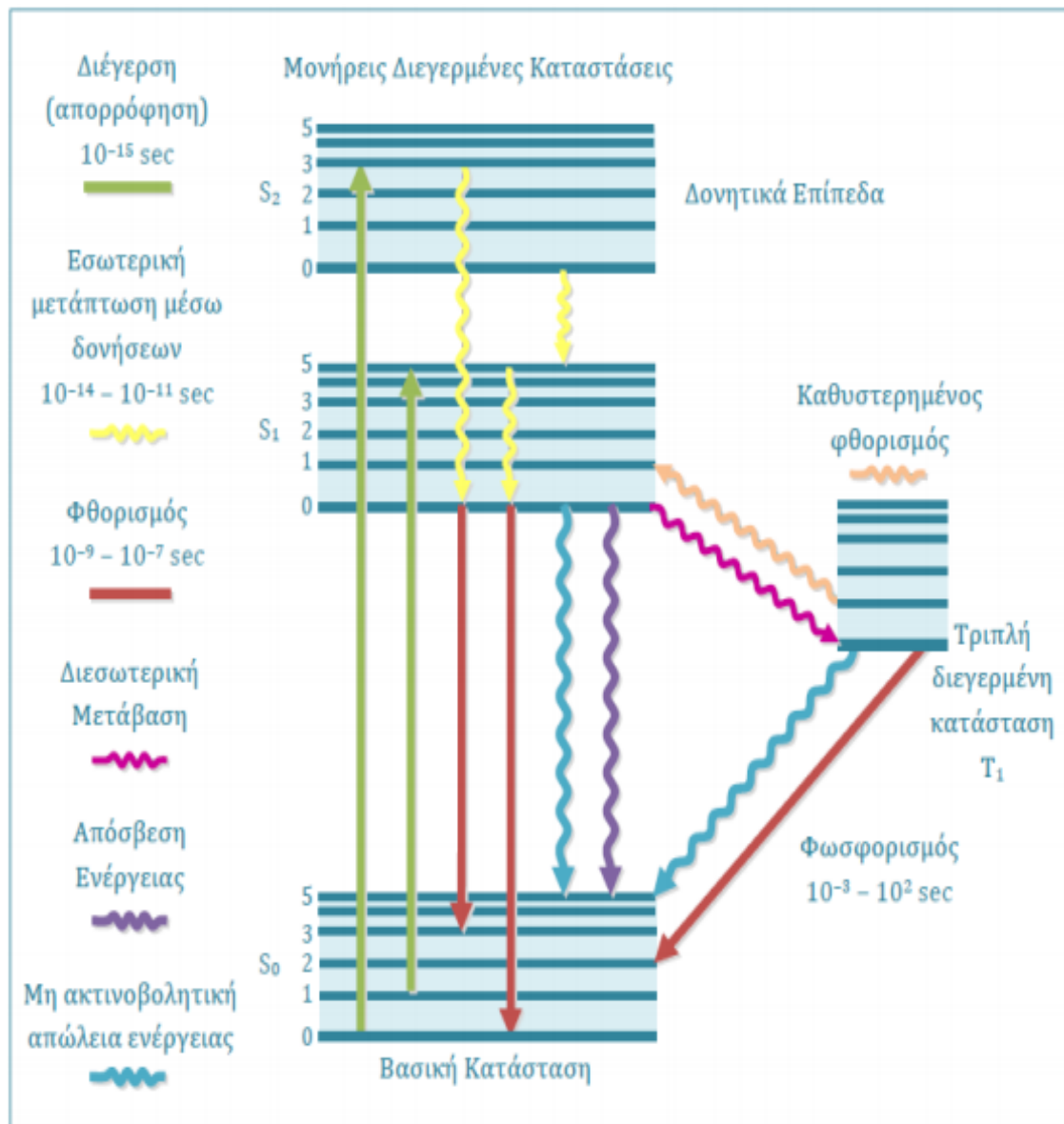
Η επιλεκτικότητα και η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας οφείλεται τόσο στην επιλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στα κακοήθη κύτταρα όσο και στην επιλεκτική ακτινοβόληση των πασχόντων ιστών, επιτυγχάνοντας έτσι την αποφυγή βλαβών σε υγιείς ιστούς. Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, εξαιτίας της επιλεκτικής τους συσσώρευσης, και της ικανότητας τους να φθορίζουν, δίνοντας έτσι μια καθαρή εικόνα του όγκου ή των πασχόντων ιστών^[6].

Περιορισμό για τη φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί το γεγονός ότι δε μπορεί να θεραπεύσει ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο με πιθανές μεταστάσεις του καρκίνου. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν είναι εφικτή η ακτινοβόληση ολόκληρου του σώματος. Παρ'όλα αυτά όμως, ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να φανεί χρήσιμη συμβάλλοντας τόσο στην επιμήκυνση της ζωής του ασθενή όσο και στην βελτίωση της ποιότητας της.

Συνοπτικά, αναφέρεται ότι η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία διαδικασία τεσσάρων σταδίων. Πρώτο στάδιο αποτελεί η χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Στο δεύτερο στάδιο οι καρκινικοί όγκοι κατακρατούν επιλεκτικά την ουσία αυτή και πραγματοποιείται επιλεκτική ακτινοβόληση του όγκου και των ιστών που τον περιβάλλουν, ύστερα από προκαθορισμένο χρόνο. Στο τρίτο στάδιο οι ιστοί αποβάλλουν σταδιακά την φωτοευαίσθητη ουσία ενώ ο όγκος αρχίζει να συρρικνώνεται λόγω της καταστροφής των κυττάρων του. Πιθανή βλάβη σε υγιείς ιστούς αποκαθίσταται εντός 6-8 εβδομάδων. Το τέταρτο και τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την πλήρη καταστροφή του όγκου και την αποβολή της φωτοευαίσθητης ουσίας από τον οργανισμό του ασθενή^[16].

1.3 Απορρόφηση του φωτός

Η απορρόφηση ενέργειας από ένα μόριο πραγματοποιείται μεταξύ των κοντινών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικά μοριακά τροχιακά. Οι πιθανές πορείες διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου φαίνονται στην Εικόνα 3. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά ο κάθε μηχανισμός που επιτρέπει στο μόριο να επιστρέψει στη βασική του στάθμη.



Εικόνα 2: Διάγραμμα Jablonski ^[12]

1.3.1 Εσωτερική μετατροπή

Πρόκειται για την μετάβαση του μορίου από τη διεγερμένη σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, δηλαδή σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης.

Δεν πραγματοποιείται εκπομπή ακτινοβολίας και η ενέργεια χάνεται λόγω δονητικής αποδιέγερσης^{[10],[11]}.

1.3.2 Εσωτερική μετάπτωση $S^* \rightarrow T^*$

Το ηλεκτρόνιο που έχει διεγερθεί έχει τη δυνατότητα να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη (S^*) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική μονήρη στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση δεν είναι πιθανή σε αντίθεση με την μετάπτωση από τη μονήρη διεγερμένη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη. Η τελευταία είναι περισσότερο πιθανή, λόγω της μικρότερης ενέργειας του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* από αυτή της S^* . Έπειτα, το μόριο μπορεί άμεσα να γυρίσει στη βασική μονήρη κατάσταση (S_0), αφού η επιστροφή στη βασική μέσω της S^* προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον. Η άμεση επιστροφή στη βασική κατάσταση πραγματοποιείται με ή χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Εφόσον υπάρχει μικρή πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη, η διάρκεια ζωής της διεγερμένης τριπλής στάθμης είναι συνήθως μεγάλη (της τάξης των msec). Ακόμα, η μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας^[11].

1.3.3 Φθορισμός

Η εκπομπή φθορισμού αφορά πάντα μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης (S_0) από τη βασική στάθμη της μονήρους διεγερμένης στάθμης (S^*), εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης είναι αυτή που καθορίζει το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Ο φθορισμός διαρκεί μερικά nsec. Στη συνέχεια, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Λόγω της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Οι διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης εκφράζονται μέσω του φάσματος φθορισμού. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται από τη δομή του αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον^{[11],[11]}.

1.3.4 Καθυστερημένος φθορισμός

Το μόριο έχει τη δυνατότητα να επιστρέψει έμμεσα από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) στην οποία βρίσκεται στη βασική μονήρη κατάσταση S_0 διαμέσου της S^* . Για να πραγματοποιηθεί η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη είναι απαραίτητο να προσληφθεί ενέργεια από το περιβάλλον. Το μόριο θα μεταβεί από την S^* στην S_0 εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια που ισοδυναμεί με την ενεργειακή διαφορά των δύο

αυτών σταθμών. Η παραπάνω διαδικασία καλείται καθυστερημένος φθορισμός λόγω του ότι παρατηρείται σε μεγαλύτερους χρόνους από αυτούς του φθορισμού.^{[1], [11]}

1.3.5 Φωσφορισμός

Πρόκειται για την άμεση επιστροφή του μορίου στην βασική κατάσταση από την τριπλή διεγερμένη εκπέμποντας φωτεινή ακτινοβολία.^{[1], [11]}

1.3.6 Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων

Όταν ένα διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με ένα άλλο το οποίο βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο τότε μεταφέρεται ενέργεια από το πρώτο στο δεύτερο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός ως απόσβεση φθορισμού.^[11]

1.3.7 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού

Μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου μεταξύ των μορίων μπορεί να μεταφερθεί ενέργεια σε ένα άλλο μόριο χωρίς να υπάρξει επαφή. Παρόλης της μείωσης της σύζευξης (η μείωση είναι ανάλογη της έκτης δύναμης της απόστασης ανάμεσα στα μόρια) στα βιολογικά συστήματα είναι εφικτή η ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5nm. Το μόριο που θα δεχτεί την ενέργεια πρέπει να έχει και κατάλληλη ενεργειακή δομή.^[11]

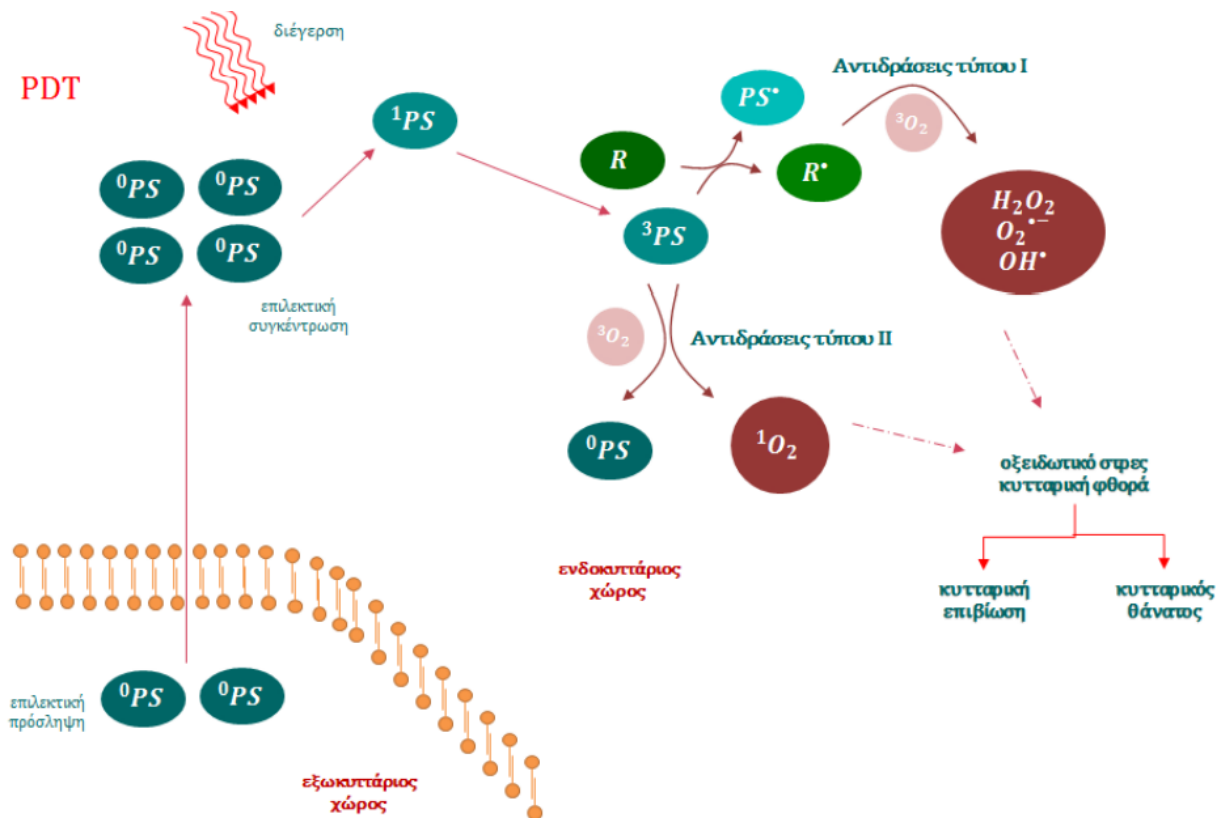
1.3.8 Δονητική αποδιέγερση

Το μόριο μπορεί να μεταβεί στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της ενεργειακής κατάστασης που βρίσκεται χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας.^[11]

1.4 Διαδικασία παραγωγής ελευθέρων δραστικών ριζών οξυγόνου-Μηχανισμοί PDT.

Ο μηχανισμός της φωτοδυναμικής θεραπείας και ο ρόλος του φωτοευαισθητοποιητή έχει παρουσιαστεί σε πολλές μελέτες. Συνοπτικά αναφέρεται ότι ο φωτοευαισθητοποιητής απορροφά ένα φωτόνιο στην βασική του κατάσταση και μετά την ακτινοβόληση η οποία γίνεται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ενεργοποιείται σε μία διεγερμένη κατάσταση. Στη συνέχεια, μέσω της διεσωτερικής μετάβασης μεταβαίνει στην τριπλή διεγερμένη. Ο φωτοευαισθητοποιητής αλληλεπιδρά με τα περιβάλλοντα μόρια στην τριπλή διεγερμένη και παράγει έτσι δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μέσω των αντιδράσεων τύπου I και τύπου II (Εικόνα 3).

Οι αντιδράσεις **τύπου I** και **τύπου II** μπορούν να παρουσιαστούν ταυτόχρονα. Ο ρόλος που διαδραματίζουν στον θάνατο των κυττάρων εξαρτάται από παράγοντες όπως οι φωτοευαισθητοποιητές, η ενδοκυτταρική κατανομή, το υπόστρωμα και η παρουσία οξυγόνου^[17].



Εικόνα 3: Μηχανισμοί δράσης κατά την φωτοδυναμική θεραπεία^[17]

Αντιδράσεις Τύπου I

Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το διεγερμένο μόριο του φωτοευαισθητοποιητή προς την κυτταρική μεμβράνη ή το μόριο του υποστρώματος, σχηματίζοντας έτσι ελεύθερες ρίζες^[18]. Ιοντικές ρίζες καθώς και ρίζες άνευ ηλεκτρικού φορτίου μπορούν να παραχθούν από την αντίδραση μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή (στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση) και ενός γειτονικού μορίου (στην βασική κατάσταση).

Οι περισσότερες ρίζες που παράγονται μέσω αυτής της αντίδρασης αλληλεπιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν ένα μείγμα δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ROS αποτελούν το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-) το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υδροξύλιο (OH^\cdot). Το τελευταίο μπορεί να οξειδώσει με πολύ γρήγορους ρυθμούς μεγάλο αριθμό βιομορίων. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης υποστρώματος^[19].

Αντιδράσεις Τύπου II

Πρόκειται για τις αντιδράσεις που αφορούν την αλληλεπίδραση μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή (στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση) και μοριακού οξυγόνου (στην θεμελιώδη κατάσταση)^[19]. Η ενέργεια του διεγερμένου μορίου του φωτοευαισθητοποιητή

μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας έτσι κυτταροτοξικό μονήρες οξυγόνο. Ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάσταση ενώ το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση^[18].

Το μονήρες οξυγόνο έχει τη δυνατότητα να οξειδώνεται γρήγορα με βιομόρια. Είναι ηλεκτροφιλικό, αρκετά αντιδραστικό, ασταθές με διάρκεια ζωής της τάξης των μsec^[20]. Το τελευταίο, έχει ως συνέπεια τη διάχυση του στα κύτταρα σε απόσταση κάποιων nm με αποτέλεσμα η φωτοδυναμική βλάβη στα κύτταρα να εντοπίζεται σε πολύ κοντινή θέση με αυτή του φωτοευαισθητοποιητή^[21]. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η επιλεκτικότητα της θεραπείας και ελαχιστοποιείται η βλάβη στους υγιείς ιστούς.

Αν και οι μηχανισμοί της φωτοδυναμικής θεραπείας δεν έχουν διασαφηνιστεί απόλυτα, είναι γενικά αποδεκτή η ευθύνη του μονήρους οξυγόνου (το οποίο παράγεται από την αντίδραση τύπου II) για τον κυτταρικό θάνατο.

1.4.1 Βασικές Αρχές και Μηχανισμοί

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τρία είναι τα βασικά συστατικά για την επιτυχημένη εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας:

- Η φωτοευαίσθητη ουσία (φωτοευαισθητοποιητής)
- Μία πηγή ακτινοβολίας
- Οξυγόνο

Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι μια χημική, χρωστική ουσία που έχει την ικανότητα να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους κακοήθεις ιστούς και ενεργοποιείται έπειτα από ακτινοβολία με χρήση εξωτερικού φωτός. Ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής μεταφέρει ενέργεια σε μόρια οξυγόνου δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία προκαλούν βλάβες στα βιολογικά μόρια. Ακολούθως, επέρχεται βλάβη και θάνατος των νεοπλασματικών κυττάρων^[22]. Αυξημένος σχηματισμός ROS μπορεί να προκύψει λόγω αυξημένης οξυγόνωσης κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, οδηγώντας έτσι σε βελτιωμένα αποτελέσματα^[23]. Οι μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους οι φωτοευαισθητοποιητές εντοπίζονται επιλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς είναι πολύπλοκοι. Αρκετοί παράγοντες είναι πιθανόν να συμβάλλουν στη συσσώρευση τους στους όγκους όπως για παράδειγμα η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και η κακή λεμφική παροχή στους όγκους συνδυαστικά με την συγγένεια για τον πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου.

Οι τρόποι με τους οποίους οι ROS βοηθούν την καταστροφή των καρκινικών όγκων με φωτοδυναμική θεραπεία είναι οι εξής:

- Άμεση κυτταρική βλάβη
- Έμμεση αγγειακή διακοπή
- Ενεργοποίηση ανοσοαποκρίσεων

Η άμεση βλάβη του πάσχοντος ιστού μπορεί να οδηγήσει είτε σε προγραμματισμένο τρόπο θανάτου όπως την απόπτωση είτε σε μη προγραμματισμένο τρόπο όπως τη νέκρωση. Ακόμα

και με χρήση χαμηλής έντασης φωτός, μπορεί να γίνει η εκκίνηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

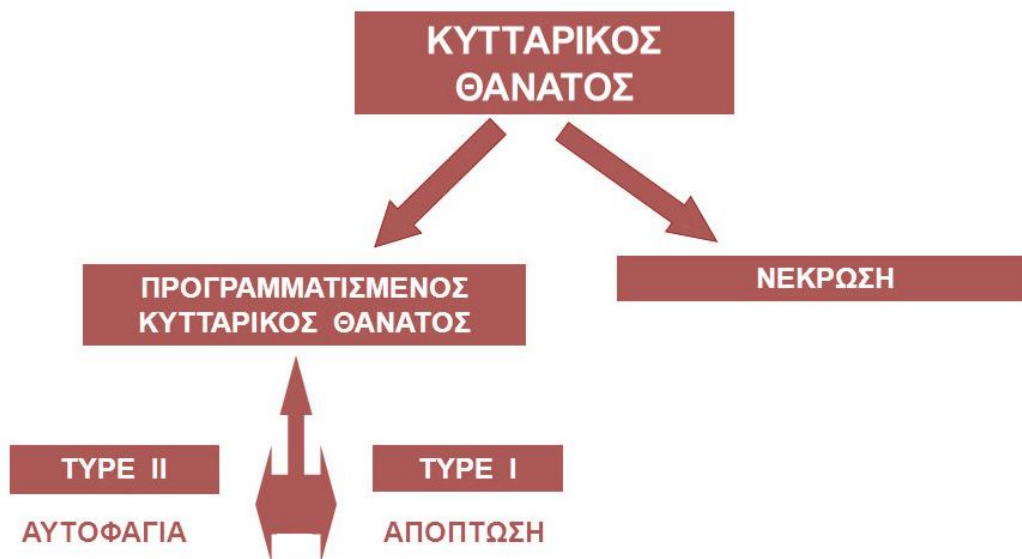
1.5 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

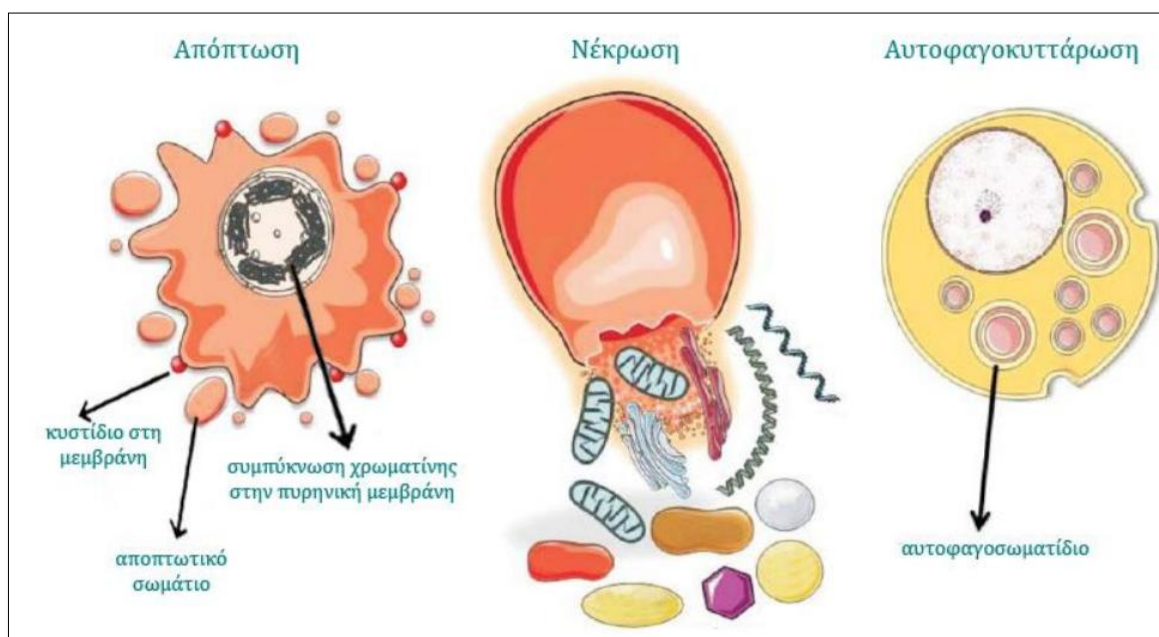
Η φωτοδυναμική θεραπεία έχει την δυνατότητα να προκαλέσει την εκκίνηση αρκετών από σωρεία τρόπων κυτταρικού θανάτου. Αναλυτικότερα, το ίδιο το κύτταρο καθώς και ποικίλα χαρακτηριστικά διαμορφώνουν τον τρόπο με το οποίο θα θανατωθεί καθώς και τον βαθμό κυτταρικού θανάτου του.

Μερικά από αυτά τα κύρια χαρακτηριστικά είναι^[24]:

- η συγκέντρωση της φωτοευαίσθητης ουσίας
- η συγκέντρωση του οξυγόνου
- το μήκος κύματος και η ένταση της ακτινοβολίας
- φυσικοχημικές ιδιότητες της φωτοευαίσθητης ουσίας
- οι θέσεις που συσσωρεύεται η φωτοευαίσθητη ουσία
- τα χαρακτηριστικά του κάθε είδους κυττάρων

Στα θηλαστικά η απόπτωση, η νέκρωση και η αυτοφαγία είναι οι τρεις από τους βασικότερους τρόπους με τους οποίους εξοντώνονται τα κύτταρα.





Εικόνα 4: Μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικού θανάτου απόπτωσης, νέκρωσης και αυτοφαγοκυττάρωσης

1.5.1.1 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία φυσικού κυτταρικού θανάτου η οποία βρίσκεται γενετικά σε κάθε κύτταρο του σώματος των θηλαστικών. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι ο έλεγχος ανάπτυξης των ιστών του σώματος, η απομάκρυνση ασθενών ή βλαβερών κυττάρων και η διατήρηση της σταθερότητας στο εσωτερικό περιβάλλον. Η εκκίνηση της διαδικασίας μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες που οφείλονται είτε στο εσωτερικό είτε στο εξωτερικό περιβάλλον του κύτταρου.

Κάποιοι αποπτωτικοί παράγοντες είναι :

- οι ιοί
- η κόπωση
- η ακτινοβολία
- η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA

Η διαδικασία αυτή είναι καταστροφική και μη αναστρέψιμη αφού το κύτταρο συμπυκνώνεται και αποδομείται δημιουργώντας αποπτωτικά σώματα τα όποια φαγοκυττώνονται χωρίς να προκληθεί κάποια φλεγμονή.

Σε περίπτωση που το σώμα σταματήσει να ελέγχει την απόπτωση τότε ασθενεί^[25]. Επομένως η αυτοκαταστροφή του κύτταρου είτε ενεργοποιείται για την σωστή ανάπτυξη του κύτταρου είτε για να απομακρυνθούν κύτταρα από τον οργανισμό τα οποία είναι βλαβερά.



Εικόνα 5: Διαδικασία Απόπτωσης

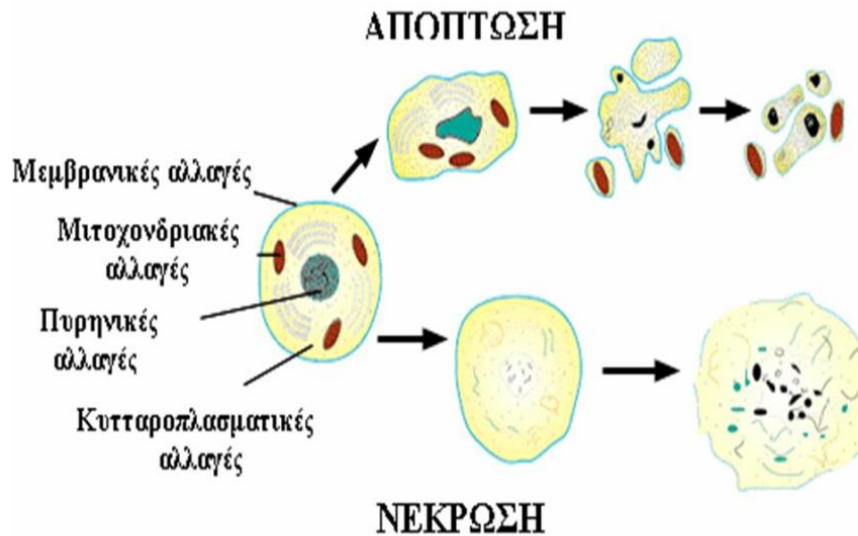
1.5.1.2 Νέκρωση

Η νέκρωση είναι ένας βίαιος και ξαφνικός τρόπος κυτταρικού θανάτου όπου επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων. Ο συγκεκριμένος τρόπος θανάτου πιθανόν μπορεί να προκληθεί από χημική ή φυσική καταστροφή ή και λόγω ασταθούς επιπέδου θερμοκρασίας προκαλώντας φλεγμονή στον περιβάλλοντα χώρο εξαιτίας της καταστροφής του κυττάρου και της απελευθέρωσης υλικού έξω από αυτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο νεκρός ιστός να αφαιρείται μόνο χειρουργικά αφού η φλεγμονή εμποδίζει τα μακροφάγα να τον εντοπίσουν και να τον φαγοκυττώσουν^[24,26]. Στην περίπτωση όπου δεν υπάρξει χειρουργική επέμβαση τότε υπάρχει πιθανότητα συσσώρευσης αποσυντεθειμένου νεκρού ιστού (γάγγραινα).

Η μελέτη των παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα την κυτταρική νέκρωση μετά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι δύσκολη σε αντίθεση με την περίπτωση της απόπτωσης. Οι κρίσιμοι παράγοντες που οδηγούν στον προσδιορισμό του τύπου του κυτταρικού θανάτου μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία είναι οι παρακάτω^[25]:

- το είδος των κύτταρων
- ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φωτοευαίσθητης ουσίας
- η μερική πίεση του οξυγόνου
- η δόση του φωτός

Ειδικότερα όσον αφορά την δόση του φωτός οι υψηλές δόσεις ακτινοβολίας έχουν σαν αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης σε αντίθεση με τις χαμηλές δόσεις που έχουν την τάση να εκκινούν την διαδικασία της απόπτωσης^[26].



Εικόνα 6: Διάφορα της νέκρωσης με την απόπτωση

1.5.1.3 Αυτοφαγία

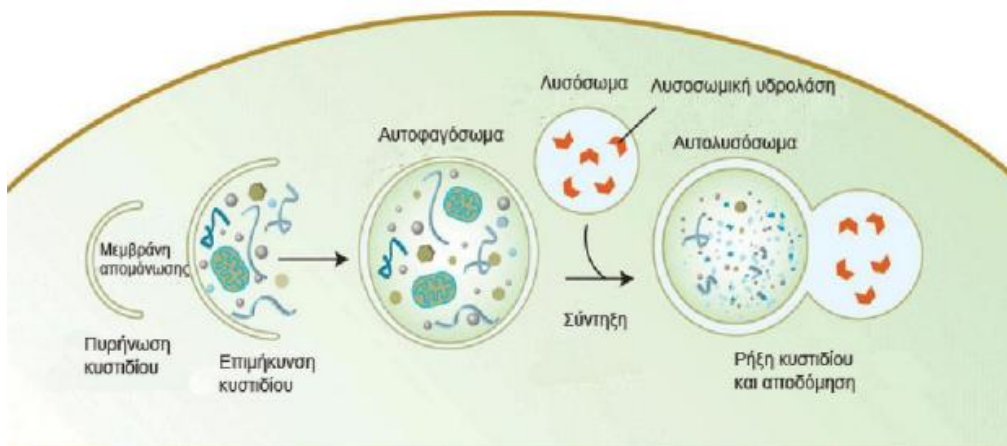
Η αυτοφαγία είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός εξόντωσης που σκοπός του είναι να διατηρήσει μια ισορροπία στο κύτταρο και να το αναδομήσει καταστρέφοντας περριτά η ελαττωματικά συστατικά και μέρη του κυττάρου και διατηρώντας στη ζωή το κύτταρο^[21,27].

Η αυτοφαγία χωρίζεται σε τρία είδη:

- αυτοφαγία
- μακροαυτοφαγία
- μικροαυτοφαγία

Ο τρόπος λειτουργίας της διαδικασίας της αυτοφαγίας είναι ο εξής: Αρχικά το αυτοφαγόσωμα το οποίο ουσιαστικά είναι μία δομή διπλής μεμβράνης δημιουργεί μια κύστη φυλακίζοντας την συγκεκριμένη περιοχή χωρίζοντας τα περιεχόμενα του και στην συνέχεια ενώνεται με το λυσόσωμα δημιουργώντας έτσι το αυτοφαγολυσόσωμα .Το αυτοφαγολυσόσωμα καταστρέφει το εσωτερικό του και το ανακυκλώνει.

Όσον αφορά την φωτοδυναμική θεραπεία είναι ένας από τους τρόπους που προκαλούν την εκκίνηση της αυτοφαγίας και σύμφωνα με μελέτες αυτό έχει ως αποτέλεσμα στο να βοηθή το κύτταρο να επιβιώσει μετά την ακτινοβολία και να διαλύσει τα συστατικά που δεν χρειάζεται έχοντας πια ένα υγιές κύτταρο^[21,21,26]. Παρόλο αυτά όμως δεν παύει η φωτοδυναμική θεραπεία να είναι και η αιτία για καταστροφή οργανιδίων όπως είναι τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα^[26].



Εικόνα 7: Η διαδικασία της αυτοφαγίας

1.6 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια ενδιαφέρουσα, νέα και μοναδική θεραπεία με την οποία δημιουργείται μια νέα ελπίδα για την επιτυχή εκμηδένιση διαφόρων βλαβερών και ελαττωματικών ιστών μέσω της καθημερινής και σε βάθος χρόνου μελέτης. Ειδικότερα συναντούμε αρκετά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα κατά την χρήση της^[4,7,9,13,28,29,30,231,32].

Τα πλεονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας έχουν ως εξής:

- Είναι μία θεραπεία ελάχιστα επεμβατική.
- Έχει πολύ καλά αισθητικά αποτελέσματα.
- Λειτουργεί ως διαμεσολαβητής σε ανοσολογικές αντιδράσεις που έχουν την δυνατότητα να καταστρέψουν καρκινικούς όγκους στο σώμα του ασθενή.
- Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους θεραπείας(π.χ.: χημικοθεραπεία) έχει μειωμένες παρενέργειες στο άτομο. Παρενέργειες όπως η πτώση των μαλλιών μπορούν να αποφευχθούν ή να μειωθούν σε μεγάλο βαθμό.
- Είναι επιτυχής σε συγκριμένες περιπτώσεις καρκίνου όπως ο καρκίνος του οισοφάγου τύπου Μπάρετ.
- Μπορεί να εφαρμοστεί σε συνεργασία με άλλες μεθόδους θεραπείας.
- Μπορεί να αντιμετωπίζει ταυτόχρονα πολλά καρκινώματα.
- Χρησιμοποιείται για την διάγνωση ασθενή.
- Εφαρμόζεται ακόμα και σε καταστάσεις που μια επέμβαση καθίσταται αδύνατη.
- Αναπτύσσεται διαρκώς με την βοήθεια της τεχνολογίας.
- Οι χρησιμοποιούμενοι φωτοευαισθητοποιητές δεν συγκεντρώνονται στον πυρήνα των κυττάρων και έτσι δεν καταστρέφουν το DNA και δεν προκαλούν μεταλλάξεις στους όγκους ή καρκινογένεση.
- Αυξάνει τη διάρκεια ζωής και βελτιώνει την ποιότητα της σε άτομα με καρκίνο σε προχωρημένο στάδιο.

- Αποφεύγει τη συστηματική θεραπεία αφού λειτουργεί μόνο όταν ο ασθενής εκθέτεται σε φως.
- Είναι αρκετά αποτελεσματική.
- Το χρηματικό κόστος είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με άλλες θεραπείες (χημικοθεραπεία).
- Κατά την εφαρμογή της ευκολύνει την εύρεση του νεοπλασματικού ιστού και τον έλεγχο της συγκέντρωσης του.
- Εντοπίζει τους όγκους και τους διαλύει αφήνοντας τα υγιή κύτταρα ανέπαφα
- Η διαδικασία είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί και εκτός νοσοκομείου.

Όμως παρόλο αυτά η φωτοδυναμική θεραπεία δεν μπορεί να αποδώσει τα μέγιστα στην λύση ογκολογικών προβλημάτων των ασθενών καθώς ακόμα και σήμερα μετά από πολύχρονες έρευνες και μελέτες έχει αρκετούς περιορισμούς. Οι περιορισμοί αυτοί οφείλονται σε κάποιες παραμέτρους που πρέπει να μελετηθούν ώστε να αναπτυχτεί περεταίρω η θεραπεία και να χρησιμοποιηθεί ευρύτερα.

Οι περιορισμοί αυτοί είναι:

- Η ακτινοβολία δεν μπορεί να διαπεράσει μεγάλους όγκους με αποτέλεσμα να μην μπορεί να τους καταστρέψει. Μεγάλη αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας θα μπορούσε να επιφέρει σημαντικές βλάβες στους υγιείς ιστούς.
- Οι όγκοι οι όποιοι βρίσκονται βαθιά στο εσωτερικό του σώματος του ασθενούς δεν θεραπεύονται αφού είναι δύσκολα προσβάσιμοι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται απαραίτητη κάποια επέμβαση.
- Δεν θεραπεύει πυκνές μάζες όγκου αλλά και όγκους οι όποιοι είναι περικυκλωμένοι από νεκρό ιστό καθώς η οξυγόνωση των όγκων και των ιστών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διέγερση της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Οι γιατροί δεν συνιστούν την φωτοδυναμική θεραπεία στους ασθενείς τους καθώς δεν έχουν πειστεί ακόμα για την επιτυχία της. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μελέτες έχουν γίνει σε μικρό αριθμό ασθενών και τα συμπεράσματα τους δεν είναι επαρκώς πειστικά για να τους πείσουν για τα οφέλη της.
- Μπορεί να δημιουργήσει αυξημένη φωτοευαισθητοποίηση για μεγάλο διάστημα ανάλογα και με την φωτοευαίσθητη ουσία που έχει χρησιμοποιηθεί στον ασθενή.
- Εμφανίζει δυσκολίες όσον αφορά την διάγνωση αλλά και την αξιολόγηση της πορείας της.
- Οποιαδήποτε αστοχία στην δόση που δίνεται στον ασθενή μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στους ιστούς που περιβάλλουν τον όγκο.
- Οι συνδυασμοί των πηγών φωτός και των φωτοευαίσθητοποιητών που έχουν χρησιμοποιηθεί στους ασθενείς παρόλο που κατέφεραν να πείσουν για την εφαρμογή της θεραπείας δεν μπόρεσαν να έχουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Συμπερασματικά η φωτοδυναμική θεραπεία παρόλο που έχει την ικανότητα δεν έχει την δυνατότητα να συναγωνιστεί άλλες εναλλακτικές λύσεις που έχουν δοκιμαστεί.

- Δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα η βέλτιστη δόση του φωτός καθώς και η ιδανική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή που απαιτείται ώστε να κατασταθεί ασφαλής και αποτελεσματική η κλινική εφαρμογή της θεραπείας.
- Είναι ακατόρθωτο μέχρι στιγμής να καταστρέψει καρκίνους που βρίσκονται σε μεταστατικό στάδιο αφού είναι αδύνατη η ακτινοβολήση ολοκλήρου του σώματος με συγκεκριμένες δόσεις ακτινοβολίας.
- Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι υδρόφοβοι και έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται σημαντικά οι κβαντικές αποδόσεις για την δημιουργία των ελεύθερων ριζών καθώς οι φωτοευαισθητοποιητές συσσωματώνονται εύκολα. Ακόμα και αν με κάποιον τρόπο μπορέσουμε να αυξήσουμε την διαλυτότητα στο νερό η στοχευόμενη συσσώρευση στους όγκους είναι ανεπαρκής για την εφαρμογή της θεραπείας.

Μετά την ανάλυση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της φωτοδυναμικής θεραπείας και παρά τους περιορισμούς που προέκυψαν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη θεραπεία είναι μια πολύ ελπιδοφόρα μέθοδος. Το μέλλον θα είναι καθοριστικό για τον ρολό που θα διαδραματίσει στον τομέα της ογκολογίας και την αντιμετώπιση του καρκίνου αφού θα χρειαστεί ακόμα αρκετή και διαρκή ερευνά για να αναπτυχτεί και να απαντηθούν αρκετά ερωτήματα που μέχρι στιγμής είναι αναπάντητα. Οι μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη έχουν ως σκοπό να παράξουν φάρμακα και φωτοευαισθητοποιητές καλύτερου επιπέδου χωρίς τον φόβο του κίνδυνου της διαρκής φωτοευαισθησίας ώστε η θεραπεία να πείσει για την αποτελεσματικότητά της και να χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κλινικό επίπεδο.

1.7 Μελλοντικές προοπτικές της φωτοδυναμικής θεραπείας

Οι συνεχείς μελέτες και τα πειράματα που βρίσκονται σε εξέλιξη, καθώς και η προσπάθεια εξέλιξης των φωτοευαισθητοποιητών προκειμένου να μειωθούν ή και να μηδενιστούν οι φόβοι εμφάνισης προβλημάτων στους πάσχοντες ασθενείς, συμβάλλουν σημαντικά στην εδραίωση της φωτοδυναμικής θεραπείας και στην αντιμετώπιση αλλοιώσεων και κυρίως του καρκίνου.

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια πολύπλοκη διαδικασία της οποίας η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από αρκετές παραμέτρους. Μια από αυτές είναι η στοχευόμενη μεταφορά και η ενεργοποίηση των φωτοευαίσθητων ουσιών μέσα στους όγκους. Επίσης το χρονικό διάστημα ανάμεσα στην χορήγηση της δόσης και την ακτινοβολήση της παίζει σημαντικό ρολό. Επιπρόσθετα η διαλυτότητα των φωτοευαισθητοποιητών καθώς επίσης και η αστοχία στο να επιλεγεί ο όγκος από τους υγιείς ιστούς θεωρούνται σημαντικά προβλήματα τα όποια πρέπει να επιλυθούν. Τέλος, όγκοι οι όποιοι βρίσκονται βαθιά στο σώμα του ασθενή δεν μπορούν να θεραπευτούν.

Κάποια από τα παραπάνω προβλήματα μπορούν να λυθούν με χρήση φωτοευαισθητοποιητών σε νανοκλίμακα αφού έχουν την δυνατότητα να διαλύονται σε νερό και να στοχεύουν τον καρκινικό ιστό. Ένας επιπλέον τρόπος επίλυσης είναι να μειωθεί η

ενέργεια που είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή το οποίο μπορεί να γίνει μέσω την δημιουργίας μιας ενιαίας μονάδας του φωτοευαίσθητης ουσίας-πηγής του φωτός. Λύση στο πρόβλημα της απεικόνισης του όγκου , την στοχοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή και τον έλεγχο στο σύστημα της μεταφοράς του θα ήταν η χρήση παραμαγνητικών φορέων ώστε να μπορούσε να εντοπιστεί και να ενεργοποιηθεί ο φωτοευαισθητοποιητής μέσω θερμότητας η φθορισμού. Ειδικότερα πολύ καλή θα ήταν η απενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή μετά από την διάλυση του όγκου, έχοντας έτσι μιας μορφής ενσωματωμένο έλεγχο δοσιμετρίας.

Συμφώνα με τελευταίες μελέτες παρατηρείται ότι η φωτοδυναμική θεραπεία εκτός από την καταστροφή όγκων έχει την ικανότητα να προλάβει η να αντιμετωπίσει απλούστερες ασθένειες του σώματος μας αφού μπορεί να ελέγξει το ανοσοποιητικό σύστημα. Τέλος η φωτοδυναμική θεραπεία να μπορούσε να στηρίζει ένα από τα δυνατά χαρτιά της, που δεν είναι άλλο από το πολύ καλό αισθητικό αποτέλεσμα και την αποκατάσταση των ιστών, μέσω ερευνών ώστε μετά από την επέμβαση εκτός από την γρήγορη επούλωση να επιτρέπεται και η αναγέννηση των ιστών.

2. ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

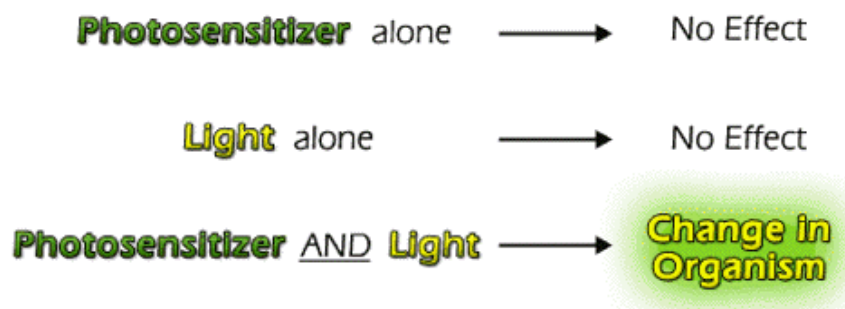
2.1 Ορισμός και Ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι μόρια, τα οποία διεγείρονται μέσω εξωτερικής πηγής φωτός σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Βασική λειτουργία τους είναι η αλλαγή της χημικής κατάστασης άλλων μορίων μέσω της φωτοχημικής διαδικασίας. Στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας η ενεργοποίησή τους προκαλεί την παραγωγή θανατηφόρων κυτταροτοξικών προϊόντων (μονήρες οξυγόνο ROS και ελεύθερες ρίζες), μέσω της μεταφοράς ενέργειας στα μόρια του οξυγόνου και προκαλούν κυτταρικό θάνατο.^{[27],[31]} Υπάρχουν πολλές φυσικές αλλά και συνθετικές χρωστικές ουσίες, από ουσίες εξαγόμενες από φυτά έως και περίπλοκες συνθετικές μακροκυκλικές ενώσεις, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία. Για την αποτελεσματικότητα όμως της θεραπείας είναι απαραίτητο οι φωτοευαισθητοποιητές να διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά ώστε να επάγεται το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα.

- **Επίπεδα τοξικότητας:** Τα επίπεδα τοξικότητας των φωτοευαισθητοποιητών θα πρέπει να είναι χαμηλά (έλλειψη τοξικότητας με την έλλειψη ακτινοβολίας) και ο μεταβολισμός τους να μην οδηγεί στη δημιουργία νέων τοξικών παραγώγων, προκειμένου να αποφεύγονται παρενέργειες υπότασης και αλλεργικής αντίδρασης στον ασθενή.^{[18],[33]}
- **Επιλεκτικότητα στους ιστούς και στη συγκέντρωση:** Ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στους πάσχοντες ιστούς. Ο λόγος της ποσότητας που συγκεντρώνεται στο πάσχοντα ιστό προς τη ποσότητα που παρακρατείται από τους υγιείς ιστούς θα πρέπει να είναι μεγάλος, ώστε να απορροφάται κατά το δυνατόν περισσότερο από τον ιστό-στόχο.^{[3],[33]}
- **Ικανότητα διείσδυσης στον ιστό:** Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να απορροφά το φως σε περιοχές του ερυθρού. Έτσι το φως εισχωρεί βαθύτερα στους ιστούς και αποφεύγεται η φωτοευαισθησία του δέρματος μέσω του ηλιακού φωτός.^[4] Επίσης, φωτοευαισθητοποιητές με μικρότερα μήκη κύματος δεν επιτρέπουν τη φωτοδυναμική θεραπεία σε όγκους μεγαλύτερου βάθους.^{[18],[33]}
- **Μετάλλαξη / καρκινογένεση:** ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει την ικανότητα να θεραπεύει μία ασθένεια χωρίς να δημιουργεί επιπλέον βλάβες σε φυσιολογικούς ιστούς.
- **Εύκολη διάλυση και ταχεία απορρόφηση:** Είναι επιθυμητό να είναι διαλυτός είτε στο νερό είτε σε τοξικό μίγμα υδατικού διαλύματος, ώστε να χορηγείται μέσω έγχυσης και να μεταφέρεται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος.^{[18],[33]}
- **Εμπορικά διαθέσιμος και οικονομικά προσιτός:** η σύνθεση του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να είναι εύκολη, τα πρωταρχικά υλικά να υπάρχουν

διαθέσιμα σε αφθονία ώστε το κόστος παραγωγής και η αγορά του να είναι δυνατή^{[33],[34]}

- **Δυνατότητα απεικόνισης:** Είναι απαραίτητη η ύπαρξη απεικονιστικής διάταξης για τη μέτρηση της απορροφόμενης δόσης του φωτοευαισθητοποιητή μέσω in vivo μετρήσεων φθορισμού
- **Ικανότητα φθορισμού:** Πολλοί φωτοευαισθητοποιητές διαθέτουν το πλεονέκτημα της απελευθέρωσης φωτός από την ενέργεια που έχουν λάβει μέσω της εξωτερικής πηγής. Η χρήση της είναι καθοριστική για τον εντοπισμό του ακριβή στόχου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκτομής του όγκου πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία. Παράλληλα, επιτρέπει στον επιβλέπων ιατρό να αντιληφθεί την έκταση του καρκινικού ιστού για τη δοσιμετρία της αγωγής^{[3],[36],[37]}



Εικόνα 8: Συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητή-φωτός

2.2 Κατηγορίες φωτοευαισθητοποιητών

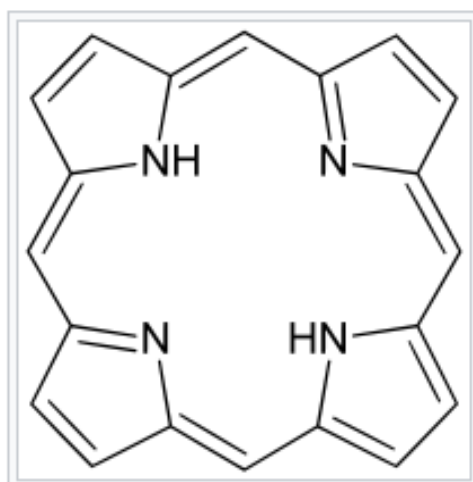
Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις γενιές. Οι φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς περιλαμβάνουν παράγωγα αιματοπορφυρίνης, η 2^{ης} γενιάς διαφορετικές ως προς τη δομή ενώσεις με απορρόφηση σε μεγάλα μήκη κύματος όπως χλωρίνες και φθαλοκυανίνες και η 3^{ης} γενιάς περιλαμβάνουν φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς με σύζευξη σε μόρια-μεταφορείς με στόχο την επιλεκτικότερη στόχευση των καρκινικών όγκων.^{[27],[38]}

2.2.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς

Στη 1^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών που εγκρίθηκαν για κλινική χρήση ανήκουν τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης με γνωστές εμπορικές ονομασίες ως Photofrin και Photoheme.^[39] Αναφορές για τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία εντοπίζονται στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Πρόκειται για ένα συνδυασμό μειγμάτων διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης με έντονη δραστηριότητα κατά την σύνδεσή τους με εστέρες και αιθέρες.^[40] Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να προσδιορίσουν την ακριβή χημική υπόσταση της ουσίας με πολυπληθής και χρονοβόρες μελέτες. Πολύ σημαντικό μείνεκτημα αποτέλεσε τόσο το γεγονός της μικρής επιλεκτικότητας στους πάσχοντες ιστούς όσο και το ότι αυτές οι

ουσίες εμφάνιζαν κορυφή απορρόφησης μεταξύ 350 και 450 nm. Ένας βέλτιστος φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να έχει χαμηλή απορρόφηση σε αυτήν λόγω του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας που είναι από 400-600nm.

Κατά την χρήση τους παρατηρήθηκε πλήθος αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία και τη ποιότητα ζωής των ασθενών, με συνέπεια την αισθητή μείωση της χορήγησής τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δερματική ευαισθησία των ασθενών κατά την έκθεσή τους στην ηλιακή ακτινοβολία για μεγάλο χρονικό διάστημα από τη λήψη τους. Έχουν καταγραφεί φαινόμενα αλλεργικών αντιδράσεων και ηλιακών εγκαυμάτων λόγω της φωτοτοξικότητας.^{[21],[18]}



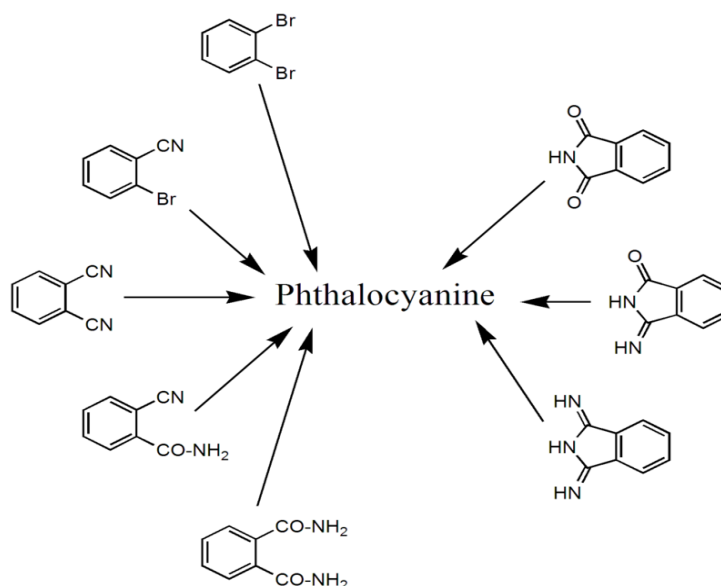
Εικόνα 9: Δομή της πορφυρίνης

Το φάσμα απορρόφησης αποτελείται από έξι κορυφές με τη μεγαλύτερη στα 400nm και τη μικρότερη στα 630nm. Παρόλο που η απορρόφηση στα 630nm είναι μικρή, αυτή η τιμή του μήκους κύματος είναι ευρέως αποδεκτή και χρήσιμη τόσο σε κλινικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Αυτό συμβαίνει, διότι η διείσδυση της ακτινοβολίας στον ιστό είναι υψηλότερη σε αυτό το μήκος κύματος. Η Photofrin είναι κλινικά αποδεκτή σε πολλές χώρες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα, του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του στομάχου, και του τραχήλου της μήτρας (πρώιμο στάδιο). Έχει χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες ασθενείς σε βάθος χρόνου μεγαλύτερο της 20ετίας.^{[31],[33]}

2.2.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς

Τα δύο βασικά μειονεκτήματα των παραγώγων της αιματοπορφυρίνης που οδηγούσαν στη δημιουργία φωτοευαισθησίας του ασθενή καθώς και τα χαμηλά επίπεδα απορρόφησης της στα 630nm οδήγησαν τους ερευνητές στη μελέτη και τη δημιουργία νέας γενιάς φωτοευαισθητοποιητών. Οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς είναι καθαρές χημικές ενώσεις με σταθερή σύνθεση. Κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές χημικές ομάδες, τις κυανίνες και τις χλωρίνες.^{[31],[41]}

Οι φθαλοκυανίνες διαφέρουν από τις πορφυρίνες, γιατί διαθέτουν άτομα αζώτου που είναι συνδεδεμένα στις επιμέρους πυρρολικές ομάδες. Η ικανότητα διείσδυσης της ακτινοβολίας στους ιστούς οφείλεται λόγω της ισχυρής τους απορρόφησης στο ερυθρό με συνέπεια να τους καθιστά ιδανικούς για την φωτοδυναμική θεραπεία. Ενδεικτικά οι πιο δημοφιλής φθαλοκυανίνες που εντοπίζουμε στην αγορά είναι οι PC4, MePCs κτλ ^[9]



Εικόνα 10: Χημική σύνθεση φθαλοκυανίνης

Οι χλωρίνες διαφέρουν από τις πορφυρίνες, καθώς στη περίπτωση των πορφυρινών ο πυρρολικός δακτύλιος επιδέχεται μερική υδρογόνωση. Η απορρόφηση εντοπίζεται στη φασματική περιοχή του υπέρυθρου με επιλεκτική στόχευση στον καρκινικό ιστό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα χλωρινών αποτελούν οι Foscan, Verteporfin, HPPH, Purlytin, Talporfin κτλ.

Άλλοι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς με διαφορετικές τροποποιήσεις στη δομή των πορφυρινών είναι οι τεξαφυρίνες, όπως η Motexafin lutetium (LuTex).

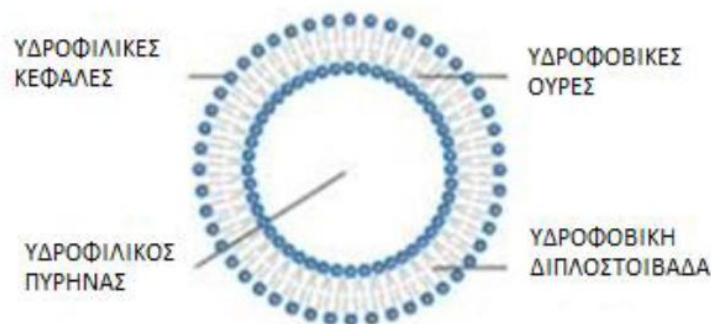
Βασικό χαρακτηριστικό που είναι και η ειδοποιός διαφορά από τους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς, είναι οι υψηλοί συντελεστές απορρόφησης^[27]. Οι κορυφές απορρόφησης εντοπίζονται μεταξύ 660nm-700nm της φασματικής περιοχής ή και στη περιοχή του υπέρυθρου περί των 800nm, με ικανότητα διείσδυσης στους ιστούς έως τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς.^[42] Στα πλεονεκτήματά τους εντοπίζουμε την ικανότητά τους να απομακρύνονται ταχύτατα από τον οργανισμό, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος και να μη προκαλούν παρενέργειες στον ασθενή για μεγάλο χρονικό διάστημα από τη χορήγησή τους. Επίσης, η τοξικότητα για τα όργανα και το δέρμα σε συνθήκες έλλειψης φωτός είναι ελάχιστη.

2.2.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς

Για την αποτελεσματική θεραπεία του καρκινικού όγκου μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας απαιτείται η χρήση κατάλληλων φωτοευαισθητοποιητών, με στόχευση στη κατά το δυνατόν πλησιέστερη περιοχή των καρκινικών κυττάρων. Στους φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς ανήκουν οι φωτοευαισθητοποιητές των δύο προηγούμενων γενιών, οι οποίοι σε συνδυασμό με διάφορα χημικά μόρια που αποτελούν δομικά ή λειτουργικά συστατικά του οργανισμού, επιτρέπουν την επιλεκτικότερη στόχευση στο καρκινικό ιστό.^{[27],[33]}

Η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών σε βιομόρια (π.χ μονοκλωνικά αντισώματα) και η επιλεκτική πρόσδεση πάνω στα καρκινικά κύτταρα, λόγω της ύπαρξης αντιγόνων σε αυτά, προκαλούν την καταστροφή τους, δίχως τον επηρεασμό των υγιών κυττάρων.^[38]

Ένας ακόμη συνδυασμός για την επιλεκτική στόχευση είναι η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών με λιποσώματα. Τα λιποσώματα είναι μικρές κοίλες κυψελίδες, των οποίων οι μεμβράνες με τα διπλά επίπεδα αποτελούνται από μια διπλή στρώση φωσφολιπιδίων. Η ικανότητά τους να εγκλείουν υδρόφιλες ουσίες στον υδατικό τους πυρήνα και υδρόφοβες στις μεμβράνες τους, τα καθιστούν ιδανικά κατά τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία.^[27]



Εικόνα 11: Υδροφιλικά φάρμακα και υδροφοβικοί παράγοντες

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητών με βιοδιασπώμενα πολυμερή και αιωρήματα ελαίου, που μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της επιλεκτικότητας κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Στη περίπτωση των αιωρημάτων ελαίου μας δίνεται η δυνατότητα ταχύτερης διάλυσής τους στους υδροφοβικούς φωτοευαισθητοποιητές, ενώ τα βιοδιασπώμενα πολυμερή χρησιμοποιούνται αντί των λιποσωμάτων, με προτερήματα που εντοπίζονται στη μεγάλη ποσότητα φαρμάκου κατά τη μεταφορά και στη στοχευμένη έκκρισή του.^{[43],[44]}

Τέλος, ένα ακόμη σύστημα μεταφοράς της φωτοευαίσθητης ουσίας που έχει μελετηθεί είναι τα νανοσωματίδια. Οι νανο-μεταφορείς έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν την ουσία είτε διαλυμένη στη μήτρα είτε απορροφημένη στην επιφάνεια με ικανότητα υψηλής διαπερατότητας και συγκράτησης.^[45] Τα νανοσωματίδια συμμετέχουν στη διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας ή ενεργητικά, μέσω της διέγερσης της φωτοευαίσθητης ουσίας, ή παθητικά ως απλοί μεταφορείς. Η χρήση τους επιφέρει ολοκληρωτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με το μικρότερο δυνατό ή και καθόλου επηρεασμό των υγιών κυττάρων, με πεδίο δράσης σε επίπεδο ιστών και κυττάρων.

3. ΚΟΥΡΚΟΥΜΙΝΗ

3.1 Η κουρκουμίνη και τα παράγωγα της

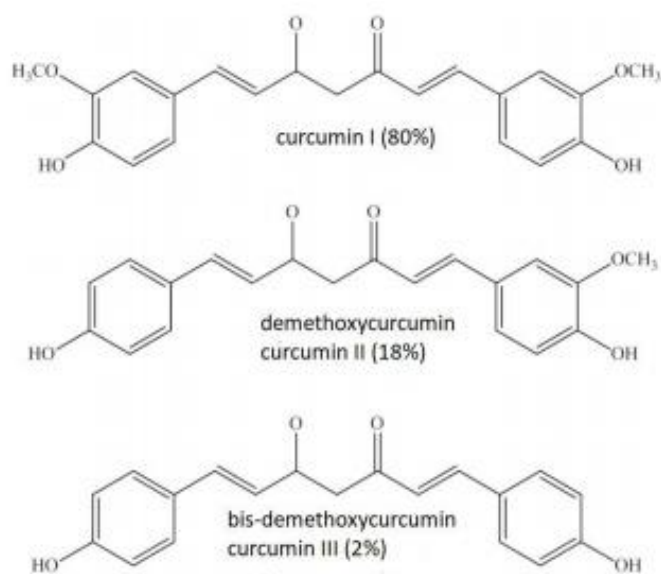
Η κουρκουμίνη είναι μια κίτρινη χρωστική και δραστική ουσία η οποία προέρχεται από το φυτό κουρκουμά. Ο κουρκουμάς ο οποίος κατέχει πλήθος ονομάτων όπως Indian saffron, yellow ginger, kurkum είναι ένα ριζωματοειδές και πολυετές φυτό το οποίο εντοπίζεται κυρίως στην νότια Ασία και στην Ινδία αφού για να επιβιώσει χρειάζεται θερμοκρασίες μεταξύ των 20 και 30 °C. Η χρήση του κουρκουμά και ειδικότερα η ρίζα του φυτού ξεκίνησε πριν 2000 χρόνια. Άρχισε να χρησιμοποιείται λόγω της γεύσης και του χρώματος του στην μαγειρική και των θεραπευτικών ιδιοτήτων του όπως επίσης και σαν συστατικό φαρμάκων καθώς και για βαφή υφασμάτων^[25,46]. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και σαν δείκτης οξύτητας και αλκαλικότητας για χημικές αναλύσεις. Η εξάπλωση του συγκεκριμένου φυτού στην Ευρώπη έγινε περίπου στα τέλη της μεσαιωνικής περιόδου (14ο αιώνα) και η κουρκουμίνη σαν συστατικό ανακαλύφθηκε αρκετά πρόσφατα μόλις το 1842, από τους Vogel και Pelletier οι οποίοι έδωσαν και την ονομασία στην συγκεκριμένη ουσία.



Εικόνα 12: Το φυτό κουρκουμάς και η ουσία κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη αναλυτικότερα αποτελείται από αρκετές χημικές ενώσεις αλλά η πιο σημαντική είναι η επονομαζόμενη curcuminoids η οποία περιλαμβάνει την κουρκουμίνη I (diferuloylmethane), την κουρκουμίνη II (demethoxycurcumin) και την κουρκουμίνη III (bisdemethoxycurcumin) οι οποίες είναι όλες υδρόφοβες. Συνήθως τα παρασκευάσματα κουρκουμίνης που κυκλοφορούν στο εμπόριο περιέχουν κουρκουμίνη I κατά 80%, κουρκουμίνη II κατά 18% και κουρκουμίνη III κατά 2%. Η έρευνες που έχουν γίνει για την

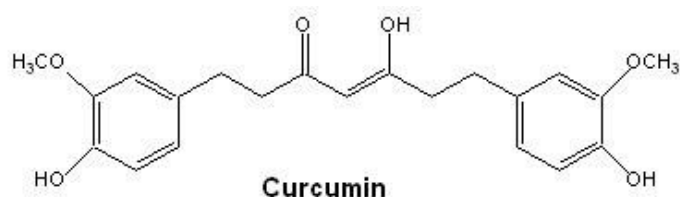
κουρκουμίνη αποδεικνύουν ότι κατέχει αντιμυκητιακές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες για αυτό και λαμβάνεται από ασθενείς [25,47,48,49].



Εικόνα 13: Χημική δομή των κουρκουμνοειδών

3.2 Δομή

Η χημική δομή της κουρκουμίνης (1,7-δισ [4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο] -1,6-επταδιενο-3,5-διόνη) ανακαλύφθηκε το 1910 από τον Milobedeska και την ερευνητική του ομάδα. Οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι φαινόλης ενώνονται με δυο ομάδες ακόρεστου καρβονύλιου που μπορεί να αντιδράσει με γλουταθειόνη και άλλα πυρηνόφιλα. Επίσης περιέχει μόριο μεθανίου το οποίο με την σειρά του περιέχεται στις demethoxycurcumin και bisdemethoxycurcumin και κατέχει διάφορες μεθοξυ υποκαταστάσεις που είναι ο λόγος των ευεργετικών ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων.^[50]



Εικόνα 14: Χημική δομή της κουρκουμίνης

3.3 Χρήσεις και Εφαρμογές της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη όπως προείπαμε εξάγεται από το φυτό κουρκουμά το οποίο παράγεται στην Ασία, στην Κίνα αλλά και στην Ινδία. Χρησιμοποιείται κυρίως για ιατρικούς λόγους σε φάρμακα αλλά και στη μαγειρική. Συγκεκριμένα η Ινδική ιατρική χρησιμοποιεί την κουρκουμίνη για την επούλωση πληγών στο δέρμα όπως είναι η ακμή ή το έγκωμα. Επίσης χρησιμοποιείται για την απαλλαγή των αλλεργιών καθώς και για την ενδυνάμωση του

ανοσοποιητικού μας συστήματος^[51](καταπολέμηση του άσθματος και του βήχα). Επιπροσθέτως χρησιμοποιείται από άτομα που πάσχουν από διαβήτη, ρευματικές παθήσεις, ασθένειες του ήπατος, ιγμορίτιδα αλλά και ασθένειες των ματιών. Τα τελευταία χρόνια η συγκεκριμένη ουσία έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον επιστημόνων διαφόρων κλάδων όσον αφορά την έρευνα των ευεργετικών της ιδιοτήτων. Μέσα από τελευταίες μελέτες συμπεραίνουμε ότι η κουρκουμίνη έχει αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές καθώς και αντιαγγειογενετικές δράσεις αλλά χρησιμοποιείται και από ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τον ιό του HIV και αυτοάνοσες ασθένειες όπως το Αλτσχάιμερ και το Πάρκινσον. Εκτός από τον ιατρικό κλάδο η κουρκουμίνη βρίσκεται και στο εμπόριο ως μπαχαρικό αλλά και σε τσάγια και χυμούς συνεισφέροντας έτσι στην καλή υγεία των οστών. Τέλος η σκόνη κουρκουμίνης μπορεί να συνδυαστεί με άλλα μπαχαρικά όπως είναι το τσίλι, η κανέλα και το κύμινο δίνοντας στο φαγητό ωραίο άρωμα και γεύση.



Εικόνα 15: Ιδιότητες κουρκουμίνης σε ιατρικό επίπεδο

3.4 Ιδιότητες κουρκουμίνης

3.4.1 Φωτοχημικές Ιδιότητες

Η βασική αρχή της φωτοχημικής διαδικασίας βασίζεται στην ύπαρξη τριών αναγκαίων συνθηκών, φωτοευαισθητοποιητή, φωτός και οξυγόνου. Μέσω της απορρόφησης φωτός ο φωτοευαισθητοποιητής μεταπίπτει σε μία ηλεκτρονικά μονήρη διεγερμένη κατάσταση και μετά από ένα εσωτερικό μετασχηματισμό, μεταβαίνει στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Με τη βοήθεια γειτονικών μορίων δημιουργείται η φωτοχημική αντίδραση. Ο διαχωρισμός των φωτοχημικών αντιδράσεων κατηγοριοποιούνται όπως θα δούμε παρακάτω με βάση τις συνθήκες του περιβάλλοντος και τις ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή της κουρκουμίνης.

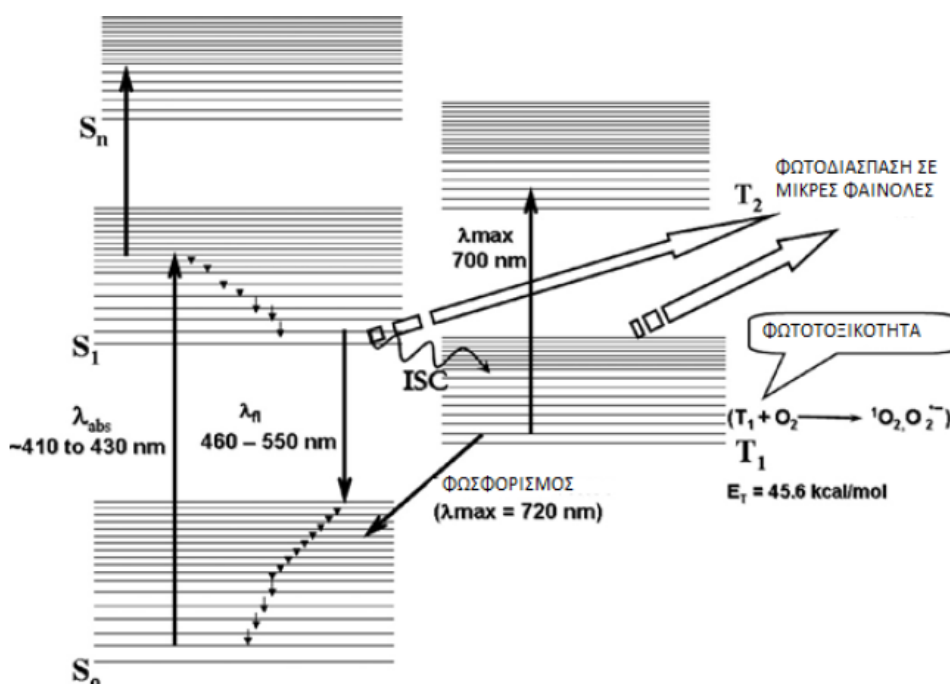
Φωτοαποικοδόμηση

Η άναμειξη της κουρκουμίνης σε διαλύματα βασικού Ph έχει ως αποτέλεσμα την χημική αποικοδόμησή της, ενώ σε χαμηλά Ph διαλυμάτων παρουσιάζει σταθερότητα.^[52] Η φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης έχει παρατηρηθεί από διάφορες ομάδες τα τελευταία χρόνια είτε σε μορφή διαλύματος είτε σε στερεή μορφή^[53,54]. Ο Canamares et al έχει μελετήσει τη φωτοαποικοδόμηση της κουρκουμίνης σε υδατικό διάλυμα παρουσία νανοσωματιδίων αργύρου κατά τη διέγερση του φωτός^[53]. Παράλληλα, η χημική αντίδραση προκαλείται και από την ύπαρξη αλάτων σιδήρου και αργιλίου. Τα προϊόντα της φωτοαποικοδόμησης έχουν ταυτοποιηθεί και αποτελείται από φαινολικές ενώσεις που προκύπτουν από τη διάσπαση της αλυσίδας που συνδέει τους δύο αρωματικούς δακτυλίους.

Μετά από έρευνα διαπιστώθηκε ότι κατά την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία παρουσιάζεται αύξηση στα προϊόντα της φωτοαποικοδόμησης. Επίσης, σημαντική στη διαδικασία φωτοαποικοδόμησης της κουρκουμίνης είναι η παρουσία κυκλοδεξτρίνης και τασιενεργών ουσιών.^[53] Τέλος, παρόλο που η κουρκουμίνη φωτοαποικοδομείται εύκολα, η χρήση της στα αντικαρκινικά φάρμακα (τρετινοΐνη, NAMI-A, KP1019) δεν έχει άμεσα αποτελέσματα.

Φωτοτοξικότητα

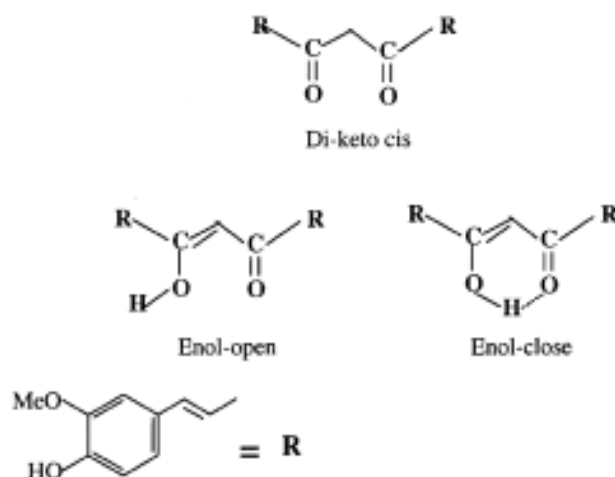
Οι ευεργετικές ιδιότητες της κουρκουμίνης αναφέρονται από την αρχαιότητα, λόγω της χρησιμότητάς της κατά της ηλιακής ακτινοβολίας και την ίαση δερματικών ασθενειών. Η έκθεση της κουρκουμίνης στο ορατό φως σε συνδυασμό με το οξυγόνο παρουσιάζει φωτοτοξικότητα. Μελέτες στη φωτοβιολογική επίδραση της κουρκουμίνης σε βακτήρια και σε κύτταρα αποδεικνύουν την καταπολέμηση καρκινικών όγκων.^{[55],[56]} Διαφορετικές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης (0,325Μμ, 6,65Μμ) αναλύθηκαν για κυτταροτοξικές επιδράσεις σε λεμφοκύτταρα αρουραίου. Η επίδραση της κουρκουμίνης εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ισχυρή τοξική αντίδραση στα καρκινικά κύτταρα του φάρυγγα (NPC), με αποτέλεσμα την συρρίκνωση των επιβλαβών κυττάρων και την αιμορραγία των μεμβρανών.^[57]



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση φωτοφυσικής και φωτοχημικής διεργασίας στην κουρκουμίνη

3.4.2 Φωτοφυσικές Ιδιότητες

Οι φωτοφυσικές ιδιότητες της κουρκουμίνης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πολικότητα του διαλύτη^[58,59], κυρίως λόγω της ύπαρξης κετονελικού ταυτομερισμού που περιλαμβάνει ενδομοριακή μεταφορά πρωτονίων. Διαλύεται εύκολα σε διαλύτες μεθανόλης, αιθανόλης, χλωροφορμίου και DMF. Ανάλογα με την πολικότητα και τη πρωτονική φύση των διαλυτών, η ισορροπία των κετονελικών ταυτομερών επηρεάζεται, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες διέγερσης της κουρκουμίνης. Η ενολική μορφή μπορεί να παραχθεί από τις διάφορες ενώσεις των ισομερών καταστάσεων (εικόνα 17), ανάλογα με τη θερμοκρασία, τη πολικότητα και τις συνδέσεις υδρογόνου των μονομερών^[60,61]. Η ένδο- ή διαμοριακή μεταφορά πρωτονίων είναι κυρίως υπεύθυνη για τις φωτοφυσικές ιδιότητες του διαλύτη με αποτέλεσμα να παρατηρείται σημαντική αλλαγή στους δευτεριωμένους διαλύτες. Έχει αναφερθεί ότι το φάσμα φθορισμού της κουρκουμίνης είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην πολικότητα του διαλύτη, προκαλώντας στιγμιαία μεγάλη μεταβολή στη διεγερμένη κατάσταση. Παράλληλα, η απόδοση φθορισμού ήταν πολύ χαμηλή στους περισσότερους διαλύτες με μικρές διαφορές στους μη πολικούς διαλύτες όντας ελάχιστα υψηλότερη.^[60,61] Έτσι, η επιρροή των δευτεριωμένων διαλυτών στις φωτοφυσικές ιδιότητες της κουρκουμίνης αποτελούν καθοριστικά παράγοντα στη φωτοδυναμική θεραπεία.



Εικόνα 17: Διάφορες ταυτομερές μορφές κουρκουμίνης

3.5 Η κουρκουμίνη στη φωτοδυναμική θεραπεία

Η χρήση της κουρκουμίνης στην φωτοδυναμική θεραπεία για την καταπολέμηση των καρκινικών όγκων είναι καθοριστική. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Διαθέτει το πλεονέκτημα της διαχωριστικότητας των καρκινικών από τα υγιή κύτταρα με μεγαλύτερη στόχευση στα καρκινικά. Παράλληλα, αποκόπτεται η παροχή του αίματος στα καρκινικά κύτταρα και προάγεται η διαδικασία της απόπτωσης. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την κουρκουμίνη βασικό ιατρικό εργαλείο για την πρόληψη και καταπολέμηση του καρκίνου.

Επιπλέον, όπως έχει ήδη προαναφερθεί εκτός των αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της, η χρήση της στην φωτοδυναμική θεραπεία είναι αποτελεσματική λόγω μη τοξικότητας, έχοντας την δυνατότητα ανίχνευσης μέσω μιας ευρείας περιοχής φάσματος των 300-500 nm, και του χαμηλού κόστους της που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες ποσότητες.

Εφαρμογές της κουρκουμίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία είχαν επιτυχή αποτελέσματα στην αντιμετώπιση καρκίνου του τράχηλου, καταπολέμηση επιβλαβών βακτηρίων για την στοματική υγιεινή, επιθετικά πλακώδη καρκινώματα του δέρματος κτλ. Συγκεκριμένα, η επίδραση του ναμογαλακτώματος κουρκουμίνης σε συνδυασμό με πηγή ακτινοβολήσης φωτός υψηλής έντασης οδήγησε σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου με τη διαδικασία της απόπτωσης.^[62] Στη περίπτωση καταπολέμησης της οδοντικής τερηδόνας και άλλων στοματικών μολύνσεων, η χρήση κουρκουμίνης με τη βοήθεια μπλε φωτός τύπου Led μείωσε δραστικά τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών τύπου *L.acidophilus* και *S.mutans*, που είναι υπεύθυνα των παραπάνω συμπτωμάτων.^[63] Επιπλέον, η μελέτη και διαμόρφωση κρέμας κουρκουμίνης με σκοπό την επιφανειακή κάλυψη της καρκινικής περιοχής του πάσχοντος δέρματος, οδήγησε στην επιτυχή αντιμετώπιση και εξόντωση καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ποντικούς, εξαιτίας του μικρού επιδερμικού πάχους τους.^[64]

Τα παράγωγα κουρκουμίνης θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τις μακροκυκλικές οργανικές χρωστικές, όπως οι πορφυρίνες και οι φθυαλοκυανίνες, που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου και με κατάλληλες τροποποιήσεις (π.χ σύμπλοκα μετάλλων) για αμεσότερη διάλυση και σταθερότητα, θα ξεπερνούσαν τα προβλήματα χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας και αστάθειας στο σώμα.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΟΥΣΙΕΣ

4.1 Σκοπός

Σημαντικό κομμάτι της φωτοδυναμικής θεραπείας αποτελεί η μελέτη των φωτοευαισθητοποιητών και των ιδιοτήτων τους. Κάθε φωτοευαισθητοποιητής εμφανίζει διαφορές ως προς τη συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά του, γεγονός που επηρεάζει άμεσα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Κεντρικός στόχος αυτής της εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη του μείγματος κουρκουμινολιδίων με τα συστατικά του με σκοπό τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στη διπλωματική αυτή περιλαμβάνονται οι εξής μελέτες:

- Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις.
- Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) σε διάφορους διαλύτες.
- Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις.
- Φασματοσκοπικές μελέτες φωτολεύκανσης (photobleaching) με τη μέθοδο της απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III).
- Μελέτη της ικανότητας του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) για παραγωγή ελευθέρων ριζών.
- Μελέτη του χωρικού εντοπισμού του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του (κουρκουμίνη I, κουρκουμίνη II, κουρκουμίνη III) στα κύτταρα MDA-MB-231.

4.2 Πειραματικές Διατάξεις

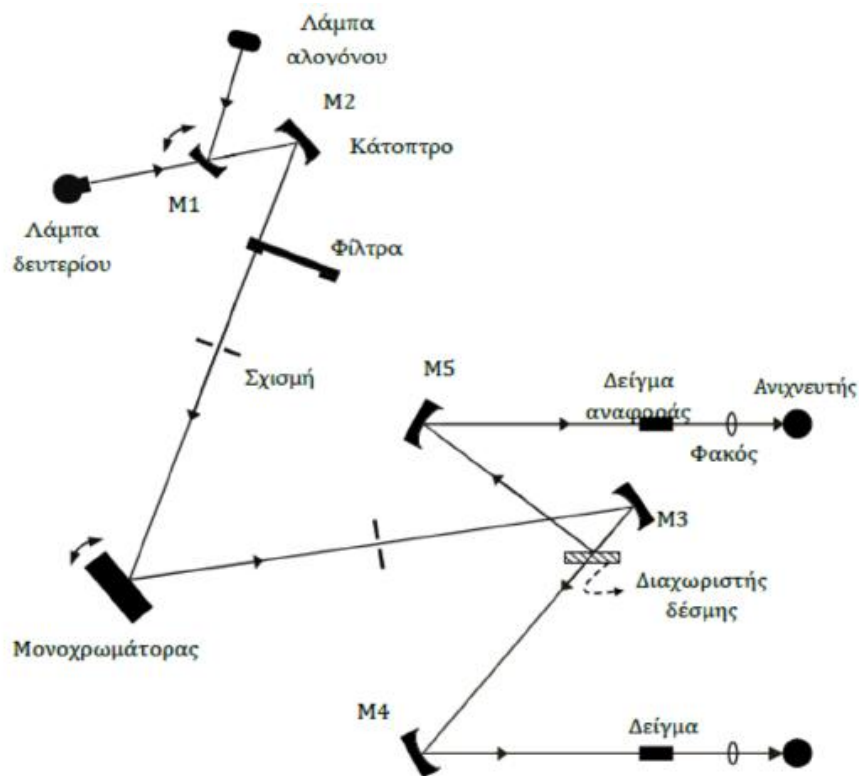
4.2.1 Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για τη διεξαγωγή της εργασίας και των απαραίτητων πειραμάτων ήταν αναγκαία η χρήση μιας φασματοφωτομετρικής διάταξης απορρόφησης. Η διάταξη αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινολιδίων και των συστατικών του αλλά και για τη μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών των ουσιών αυτών. Για τη λήψη και την καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS που λειτουργεί στην περιοχή του υπεριώδους αλλά και του ορατού φωτός.



Εικόνα 18: Φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία που ακολουθεί η δέσμη:



Εικόνα 19: Το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία της φωτεινής δέσμης

Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο φωτεινές πηγές. Η πρώτη είναι λάμπα δευτερίου έτσι ώστε να καλυφθεί η υπεριώδης περιοχή του φάσματος (200-400nm), ενώ η δεύτερη είναι λάμπα αλογόνου η οποία καλύπτει την ορατή και την κοντινή υπέρυθη περιοχή (350-900nm). Έτσι καλύπτεται το εύρος μηκών κύματος του φασματόμετρου.

Για τη λειτουργία του συστήματος στην περιοχή του ορατού φωτός, το κάτοπτρο M1 προκαλεί την ανάκλαση του φωτός που προέρχεται από τη λάμπα αλογόνου και την οδήγησή αυτού στο κάτοπτρο M2. Την ίδια στιγμή, το κάτοπτρο M1 μπλοκάρει την ακτινοβολία από τη λάμπα δευτερίου. Κατά τη λειτουργία στην υπέρυθη περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται έτσι ώστε να επιτρέψει τη διέλευση του φωτός από τη λάμπα δευτερίου και την πρόσπτωσή του στο κάτοπτρο M2. Η αλλαγή της πηγής πραγματοποιείται αυτόματα κατά την περιστροφή του μονοχρωμάτορα.

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

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

Από το κάτοπτρο M3 η φωτεινή δέσμη θα οδηγηθεί σε έναν διαχωριστή δέσμης. Το 50% της ακτινοβολίας περνάει προς το κάτοπτρο M4 ενώ το υπόλοιπο 50% ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M5. Το κάτοπτρο M4 εστιάζει την ακτινοβολία προς το δείγμα για εξέταση και εκείνη στη συνέχεια περνάει μέσω ενός κυρτού φακού στη φωτοδίοδο (ανιχνευτής). Το κάτοπτρο M5 εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα αναφοράς και με παρόμοιο τρόπο εκείνη περνάει στη συνέχεια μέσω ενός κυρτού φακού στη φωτοδίοδο. Τα δείγματα εξέτασης και αναφοράς τοποθετούνται σε δύο όμοιες κυβέττες οι οποίες εισάγονται στις κατάλληλες υποδοχές του οργάνου (εικόνα 20).



Εικόνα 20: Υποδοχείς του οργάνου για τις κυβέτες

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης που περιγράφηκε, γίνεται μέσω υπολογιστή και με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Μέσω αυτού επιτρέπεται η ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων αλλά και του τρόπου με τον οποίο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Οι διεργασίες λοιπόν που μπορούν να εκτελεστούν είναι οι εξής:

- Επιλογή του εύρους και της περιοχής των μηκών κυμάτων για την οποία θα γίνει μέτρηση της απορρόφησης της εκάστοτε ουσίας.
- Επιλογή του μεγέθους της σχισμής του μονοχρωμάτορα αλλά και της ταχύτητας σάρωσης.
- Μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στον διαλύτη και τον θόρυβο του οργάνου χρησιμοποιώντας την επιλογή Autozero η οποία είναι διαθέσιμη.
- Εξομάλυνση και επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν μέσω της πειραματικής διαδικασίας.

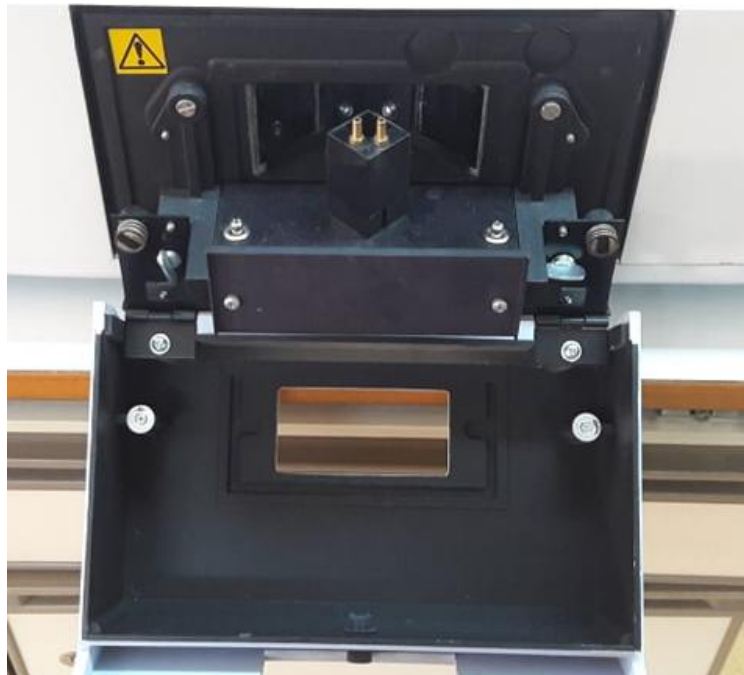
4.2.2 Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού

Για την ολοκλήρωση της εργασίας και για την περάτωση των πειραμάτων χρειάστηκε επίσης η λήψη φασμάτων φθορισμού. Οι λήψεις έγιναν χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer η οποία φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Μέσω της διάταξης αυτής είναι εφικτή η ανίχνευση φθορισμού, φωσφορισμού, χημειοφωταύγειας η βιοφωταύγειας. Για τη λήψη φασμάτων φθορισμού

μπορεί να γίνει σάρωση είτε σε όλο το εύρος μηκών κύματος του οργάνου είτε σε συγκεκριμένα μήκη κύματος.

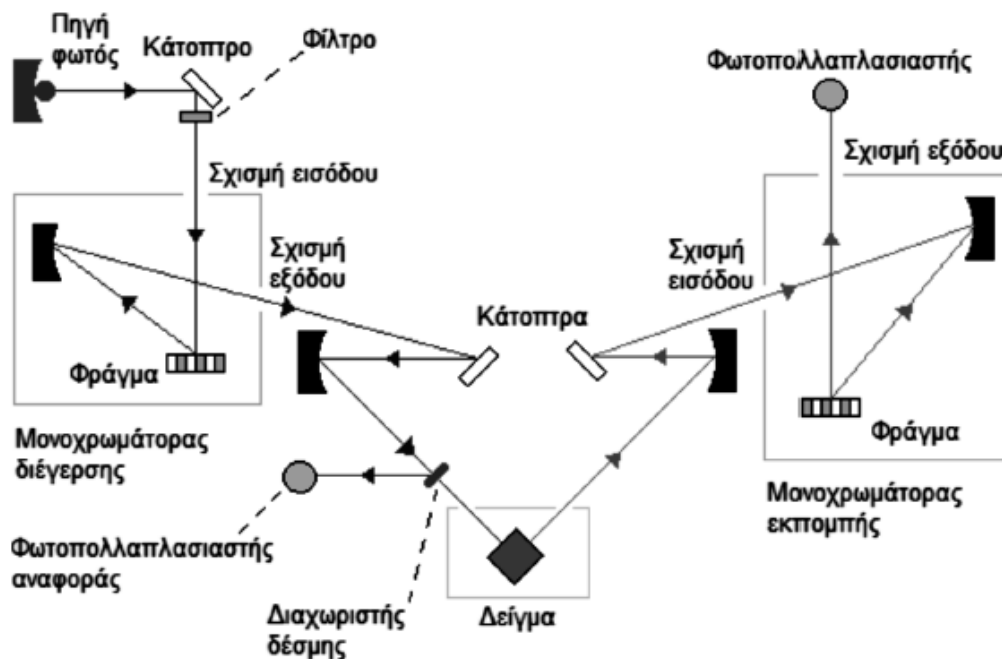


Εικόνα 21: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer



Εικόνα 22: Υποδοχή κυβέτας του φασματοφωτόμετρον φθορισμού

Παρακάτω φαίνεται η διάταξη του φασματοφωτόμετρον φθορισμού:



Εικόνα 23: Οπτικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου φθορισμού

Αρχικά, σαν πηγή φωτός χρησιμοποιείται μία λυχνία ξένου που παράγει ένα παλμό μικρής διάρκειας. Η ακτινοβολία που προκύπτει από την πηγή οδηγείται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης με τη βοήθεια αρχικά ενός ελλειψοειδούς κατόπτρου στο οποίο εστιάζεται η ακτινοβολία και εν συνεχεία ενός τοροειδούς κατόπτρου. Τα μέρη από τα οποία αποτελείται ο μονοχρωμάτορας είναι τα εξής: σχισμή εισόδου, φράγμα, σφαιρικό κατόπτρο και σχισμή εισόδου. Το μονοχρωματικό φως εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου σε μια συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή με το κεντρικό μήκος κύματός της να καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Η δέσμη διέγερσης φτάνει, στο μεγαλύτερο ποσοστό της, στο δείγμα με τη βοήθεια ενός τοροειδούς κατόπτρου εστίασης. Ένα μικρό ποσοστό της δέσμης φτάνει στον φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς αφού πρώτα ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης. Στη συνέχεια, το δείγμα εκπέμπει φθορισμό ο οποίος σχηματίζει γωνία 90 μοιρών σε σχέση με τη δέσμη διέγερσης. Ο φθορισμός εστιάζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής με τη βοήθεια τοροειδούς κατόπτρου. Η εξερχόμενη από τη σχισμή εξόδου, στενή φασματική περιοχή συγκεντρώνεται στον φωτοπολλαπλασιαστή για να γίνει περαιτέρω ανάλυση.

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer γίνεται μέσω υπολογιστή. Πιο συγκεκριμένα γίνεται χρήση του λογισμικού πακέτου FL WinLab, μέσω του οποίου γίνεται ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων και εκτελούνται εργασίες όπως:

- Επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης της ουσίας.
- Μηδενισμός του σήματος που μπορεί να οφείλετε είτε στο διαλύτη είτε στο θόρυβο του οργάνου.

- Επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν έπειτα από τη διεξαγωγή των μετρήσεων.

4.2.3 Διάταξη Ακτινοβολήσης

Για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας έγινε χρήση διάταξης ακτινοβολήσης με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών τόσο του μείγματος κουρκουμίνης όσο και των παραγώγων της.

Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 10W το οποίο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



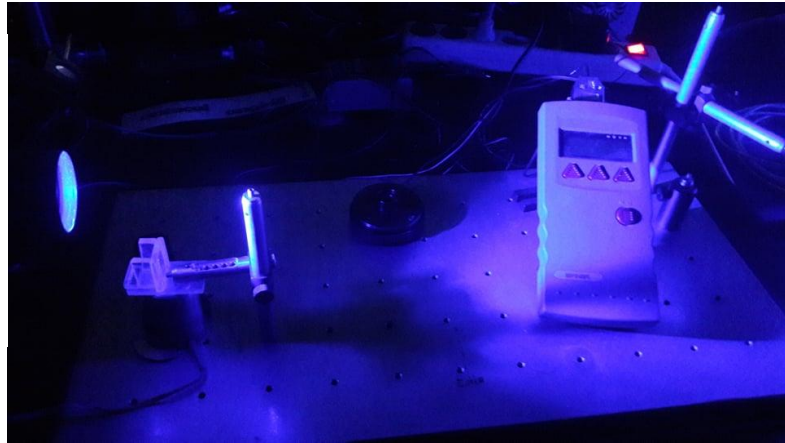
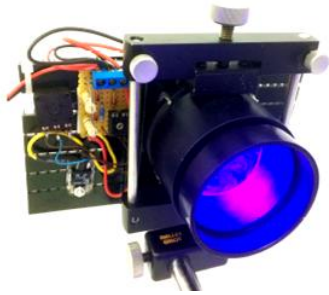
Εικόνα 24: Bridgelux Power LED 10W

Τα χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

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

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W

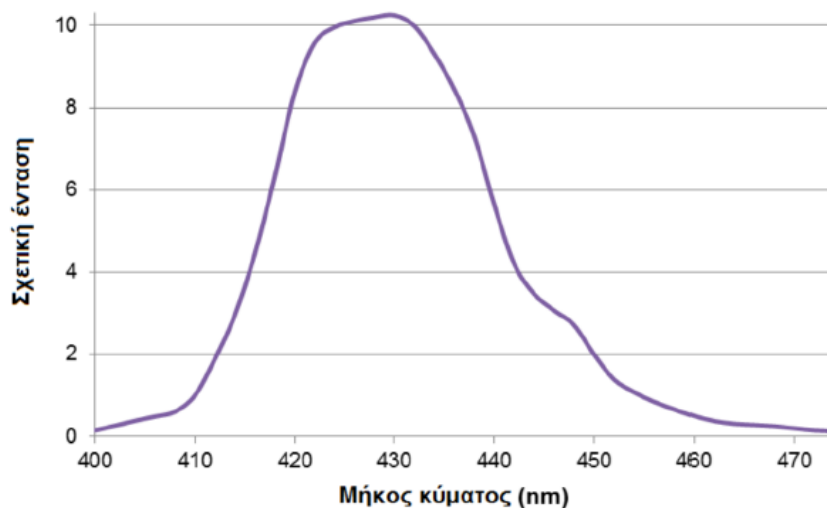
Η διάταξη ακτινοβολήσης που κατασκευάστηκε εκτός από την πηγή ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W περιλαμβάνει σωλήνα για συγκέντρωση της ακτινοβολίας στο δείγμα, ποτενσιόμετρο για ρύθμιση της έντασης ακτινοβολήσης, και βάση ψύξης που περιέχει ενσωματωμένο ανεμιστήρα.



Εικόνα 25: Διάταξη ακτινοβολήσης

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακτινοβολήσης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της έντασης ακτινοβολίας ως προς το μήκος κύματος και τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 1. Η μέτρηση έγινε χρησιμοποιώντας την πηγή, τον μονοχρωμάτορα, αντίσταση και πολύμετρο. Η ακτινοβολία που προέρχεται από την πηγή, προσπίπτει στην είσοδο του μονοχρωμάτορα, και αναλύεται. Στην έξοδο του, γίνεται διαδοχική επιλογή μιας καθορισμένης στενής φασματικής περιοχής. Η μονοχρωματική ακτινοβολία που εξέρχεται προκαλεί στην αντίσταση που έχει συνδεθεί ανάπτυξη τάσης ανάλογη με την ένταση ακτινοβολήσης. Η μέτρηση της τάσης αυτής γίνεται με τη βοήθεια του πολυμέτρου.

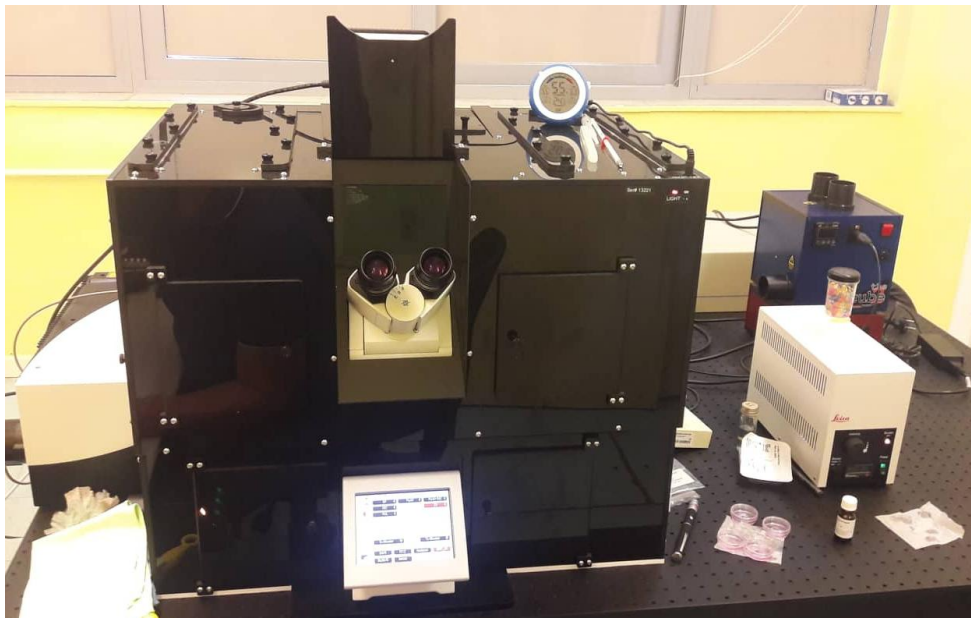
Πηγή ακτινοβολήσης πειραμάτων παραγωγής ελ. ριζών



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

4.2.4 Συνεστιακό Μικροσκόπιο φθορισμού

Το μικροσκόπιο φθορισμού καθίσταται απαραίτητο για την μελέτη του χωρικού εντοπισμού των τεσσάρων κουρκουμινών στα κύτταρα της σειράς MDA-MB-231. Για τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής έγινε χρήση του συνεστιακού διφωτονικού μικροσκοπίου **Leica TCS-SP5II** (εικόνα 26). Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό LASAF, το οποίο επιτρέπει πλήρη έλεγχο του μικροσκοπίου, των πηγών laser και της κεφαλής σάρωσης, την λήψη και αποθήκευση εικόνων, 3D ανασύσταση εικόνας από οπτικές τομές, δημιουργία βίντεο και επεξεργασία/ανάλυση εικόνας (εικόνα 27).

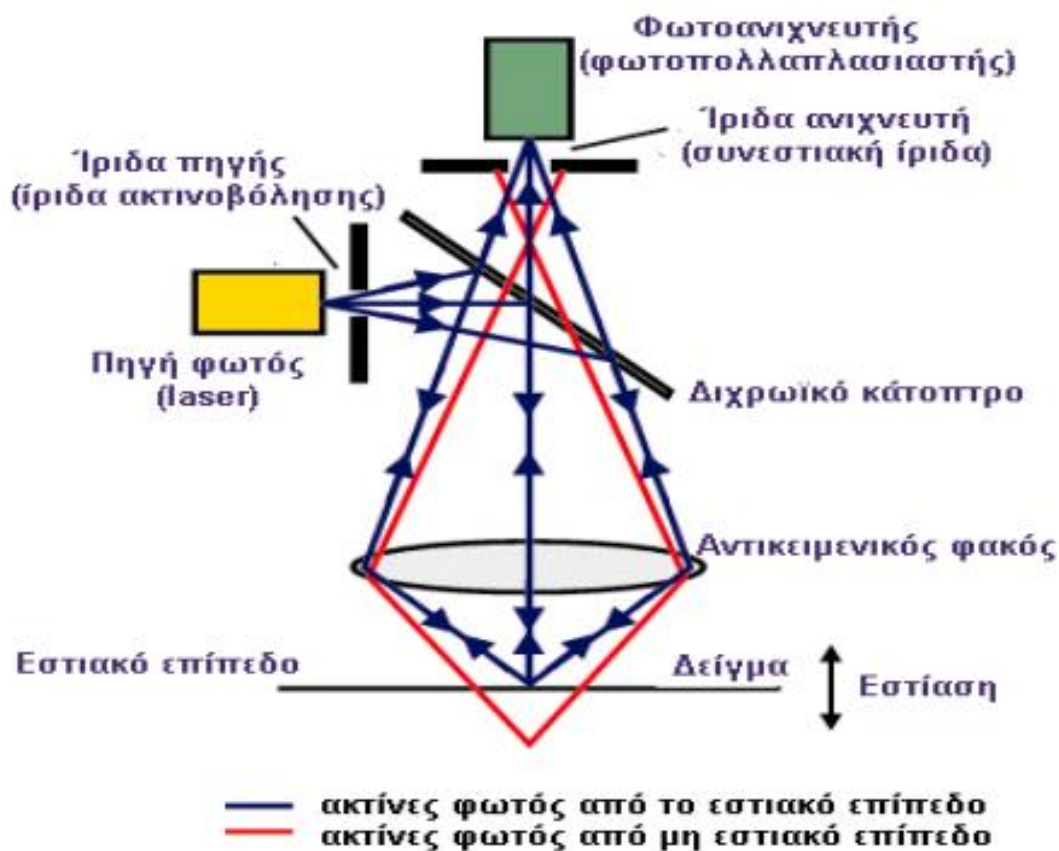


Εικόνα 26: Συνεστιακό διφωτονικό μικροσκόπιο Leica TCS-SP5II



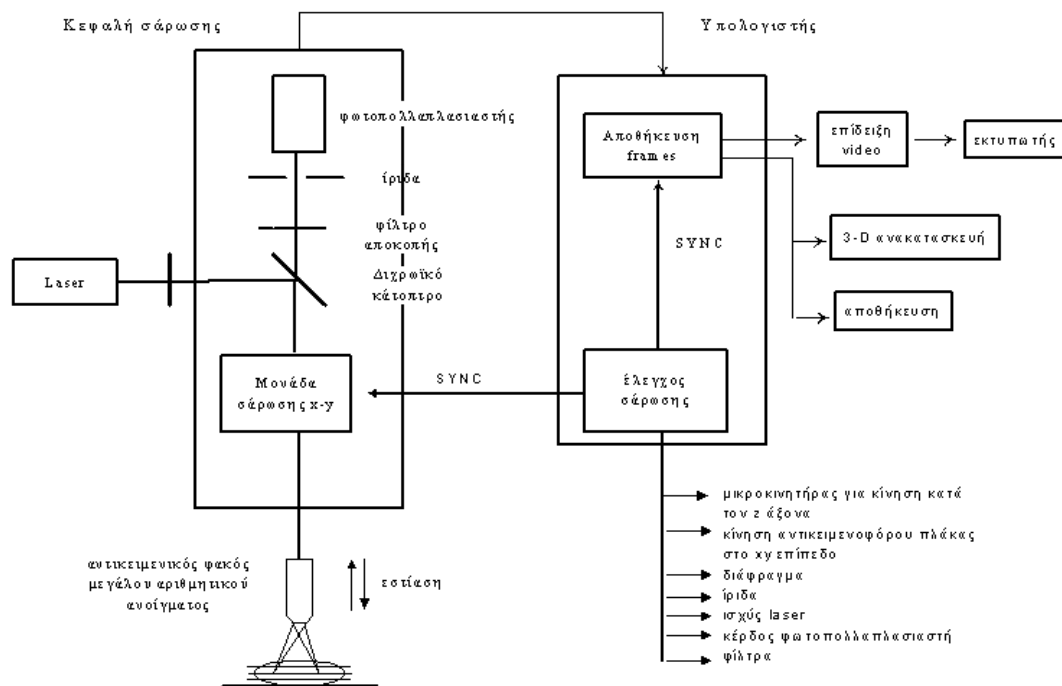
Εικόνα 27: Λογισμικό LASAF

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η βασική αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser:



Εικόνα 28: Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser

Το laser παράγει ακτίνες και διεγείρει κάθε φορά ένα σημείο του δείγματος προκαλώντας έτσι το φθορισμό του (εικόνα 28). Με την ακτινοβόληση ενός σημείου κάθε φορά, η ένταση της ακτινοβόλησης μειώνεται απότομα πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης, καθώς η δέσμη του φωτός συγκλίνει ή αποκλίνει. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η μείωση της διέγερσης του φθορισμού των σημείων του δείγματος που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου. Στη συνέχεια ο εκπεμπόμενος φθορισμός περνά πίσω, μέσω του διχρωϊκού κατόπτρου και έπειτα μέσω της ίριδας που βρίσκεται σε συζευγμένο εστιακό επίπεδο με το δείγμα. Φως το οποίο δεν προέρχεται από σημείου του εστιακού επιπέδου εμποδίζεται από την ίριδα (όσο η ίριδα μεγαλώνει τόσο αυξάνεται το βάθος του πεδίου) προσφέροντας έτσι την εξασθένιση του θορύβου που προκαλείται από την συνεισφορά του μη εστιασμένου φωτός. Τελικά, το φως που θα περάσει από την ίριδα ανιχνεύεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή.



Εικόνα 29: Διάγραμμα ροής πληροφορίας σε ένα συνθετικό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

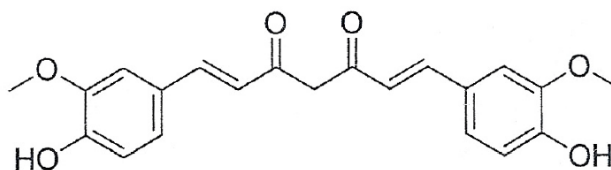
Η επιλογή του εστιακού επιπέδου γίνεται μέσω ενός κινητήρα υψηλής ακρίβειας, ο οποίος ελέγχεται από υπολογιστή, μετακινώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτή η λήψη μιας ακολουθίας δισδιάστατων εικόνων σε διαφορετικό βάθος στο δείγμα, μέσω των οποίων δημιουργείται μια τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικειμένου. Πολύ σημαντικό στοιχείο αποτελεί ο μικροκινητήρας, μέσω του οποίου επιτρέπεται η ακριβής γνώση του βάθους μέσα στο δείγμα που βρίσκεται το επίπεδο που απεικονίζεται. Τα διαστήματα μεταξύ των διαδοχικών επιπέδων ελέγχονται από τον μικροκινητήρα και ο υπολογιστής είναι υπεύθυνος για την καταγραφή τους (εικόνα 29).

4.3 Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

Παρακάτω περιγράφονται τα τέσσερα συνθετικά παράγωγα κουρκουμίνης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αλλά και οι υπόλοιπες ουσίες των οποίων η χρήση ήταν απαραίτητη για τη διεξαγωγή της εργασίας.

4.3.1 Curcumin I

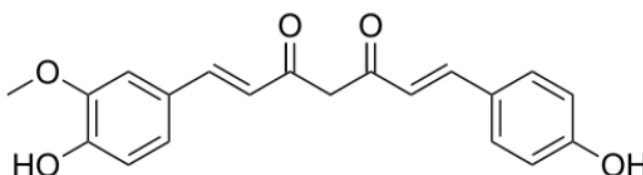
Η κουρκουμίνη I έχει πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione και ο χημικός της τύπος είναι $C_{21}H_{20}O_6$. Η χημική δομή της φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το χρώμα της ουσίας είναι σκούρο κίτρινο και βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Το μοριακό της βάρος είναι 368,38.



Εικόνα 30: Χημική δομή της κουρκουμίνης I

4.3.2 Curcumin II

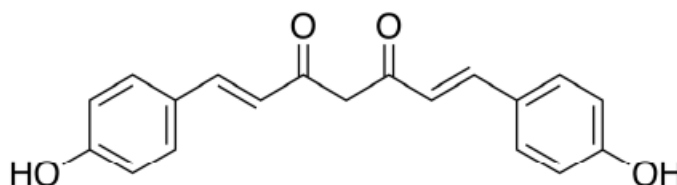
Η κουρκουμίνη II έχει πλήρη ονομασία (1E,6E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione και χημικό τύπο $C_{20}H_{18}O$. Η χημική της δομή εμφανίζεται στην παρακάτω εικόνα. Το χρώμα της είναι ελαφρώς πορτοκαλί και είναι σε μορφή σκόνης. Το μοριακό βάρος της είναι 338,3.



Εικόνα 31: Χημική δομή κουρκουμίνης II

4.3.3 Curcumin III

Η κουρκουμίνη III έχει πλήρη ονομασία 1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione και χημικό τύπο $C_{19}H_{16}O_4$. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η χημική δομή της. Το χρώμα της είναι κίτρινο προς πορτοκαλί και βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Το μοριακό της βάρος είναι 308,38.



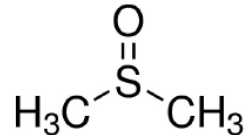
Εικόνα 32: Χημική δομή της κουρκουμίνης III

4.3.4 Curcumin mix

Είναι μείγμα κουρκουμινοειδών. Αποτελείται από curcumin I σε ποσοστό 80%, από curcumin II σε ποσοστό 18% και από curcumin III σε ποσοστό 2%. Το μοριακό της βάρος είναι 368,38.

4.3.5 DMSO (dimethyl sulfoxide)

Το DMSO είναι άχρωμος διαλύτης και διατηρείται στους 20⁰C. Δημιουργείται από την οξείδωση του σουλφιδίου διμεθυλίου με διοξείδιο του οξυγόνου ή αζώτου. Ο μοριακός του τύπος είναι C₂H₆OS και η χημική δομή του φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης της κουρκουμίνης και των παραγώγων της σε όλα τα πειράματα.



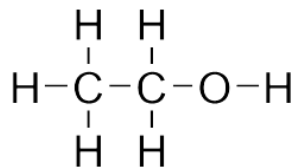
Εικόνα 33: Χημική δομή της DMSO

4.3.6 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Πρόκειται για ένα διάλυμα φωσφορικών ιόντων που χρησιμοποιήθηκε τόσο στις κυτταρικές καλλιέργειες όσο και ως διαλύτης κουρκουμινών σε κάποια πειράματα. Στις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο των κυττάρων. Διατηρείται σε θερμοκρασία 4- 8°C.

4.3.7 Αιθανόλη (Ethanol – EtOH)

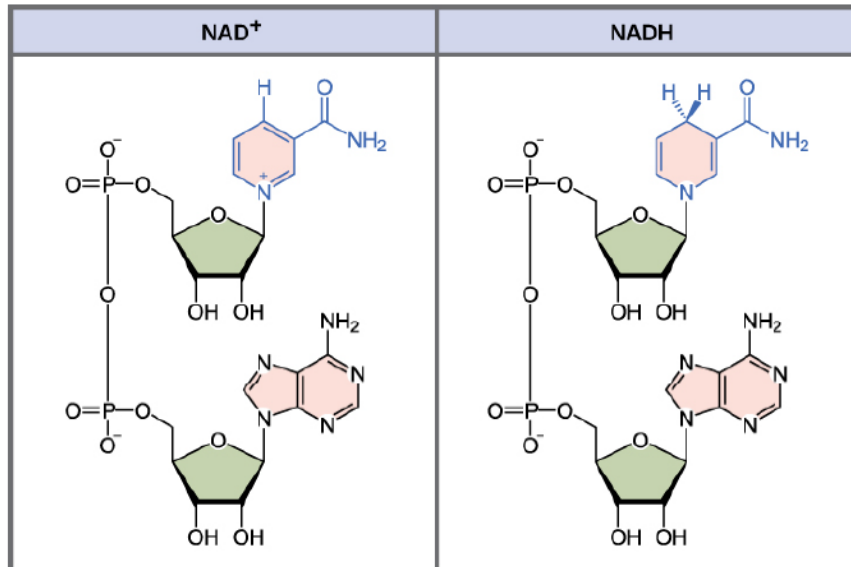
Πρόκειται για μία καθαρή, άχρωμη ένωση η οποία παράγεται από την ζύμωση των σακχάρων και χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό, διαλύτης και καύσιμο. Η χημική της δομή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Ο μοριακός της τύπος είναι CH₃CH₂OH αλλά συχνά γράφεται και C₂H₆O ή C₂H₅OH ή EtOH. Είναι ένας πολύ καλός διαλύτης γενικής χρήσης. Χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ως διαλύτης κουρκουμινών σε κάποια πειράματα.



Εικόνα 34: Χημική δομή της αιθανόλης

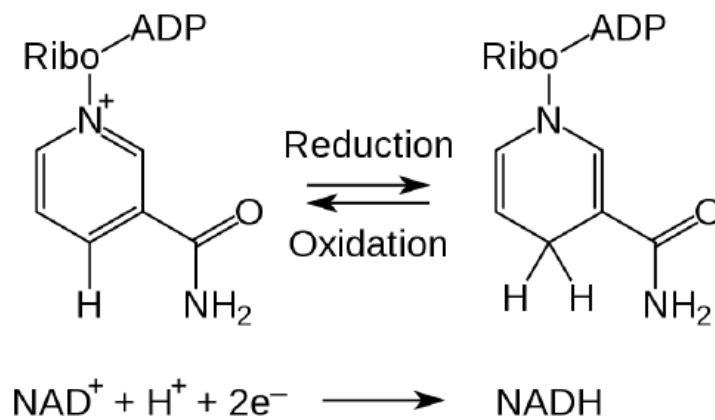
4.3.8 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο)

Το NADH είναι νουκλεοτίδιο πυριδίνης και λειτουργεί ως οξειδωτικός παράγοντας στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εμπλέκεται σε διάφορες ενζυματικές αντιδράσεις στις οποίες χρησιμεύει ως φορέας ηλεκτρονίων. Βρίσκεται είτε σε οξειδωμένη κατάσταση (oxidized, NAD⁺) είτε σε μειωμένη (reduced, NADH). Παρακάτω παρουσιάζεται η χημική δομή του NAD⁺ και του NADH.



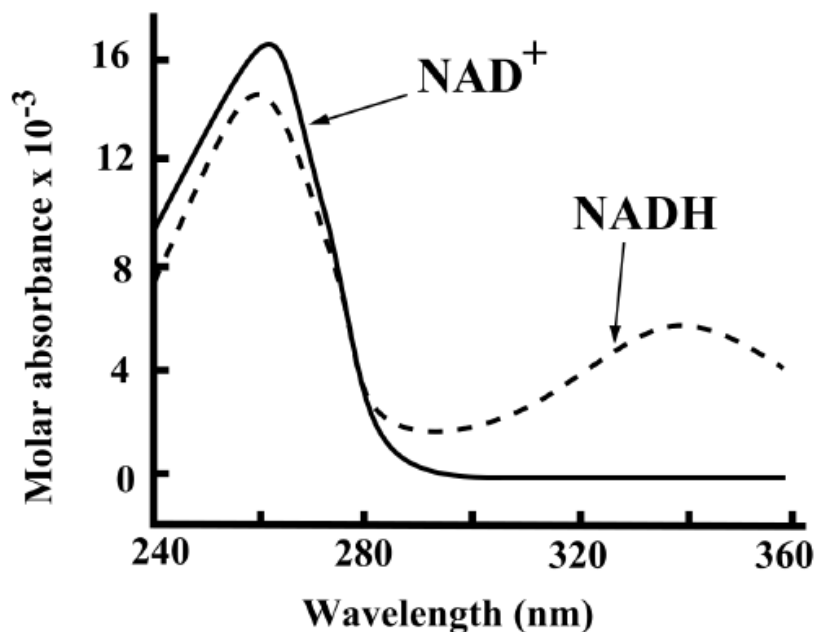
Εικόνα 35: Χημική δομή NAD⁺ και NADH.

Το NADH μπορεί να σχηματιστεί από το NAD⁺ το οποίο είναι φορέας ιόντων υδριδίων. Ένα μόριο υποστρώματος απομακρύνει ενζυματικά το ιόν υδριδίου εξαιτίας της δράσης αφυδρογονασών. Η αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάση προς το NAD⁺ καταλύεται από αυτά τα ένζυμα, σχηματίζοντας τελικά το NADH.



Εικόνα 36: Σχηματισμός NADH από NAD⁺ και αντίστροφα

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το NADH εμφανίζει απορρόφηση στα 340nm σε αντίθεση με το NAD⁺ που δεν παρουσιάζει απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η αύξηση ή η μείωση της απορρόφησης που συμβαίνει κατά τον σχηματισμό του NADH ή του NAD⁺ αντίστοιχα, είναι η βάση για τη μέτρηση της δραστηριότητας πολλών ουσιών στα 340nm.

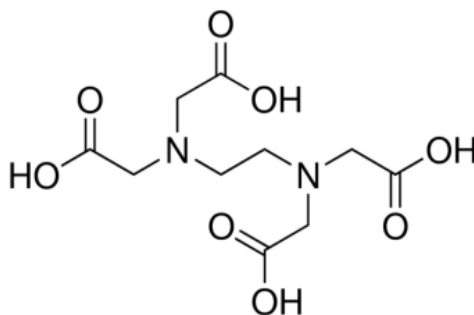


Εικόνα 37: Απορρόφηση NAD⁺ και NADH σε σχέση με το μήκος κύματος

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του NADH στα πειράματα για τον έλεγχο της παραγωγής ελευθέρων ριζών της κουρκουμίνης και των παραγώγων της.

4.3.9 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Το EDTA ή αλλιώς αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ είναι ένα αμινοπολυκαρβοξυλικό οξύ. Είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό με ελαφρά διαλυτότητα στο νερό. Ο χημικός του τύπος είναι C₁₀H₁₆N₂O₈ και η χημική του δομή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Χρησιμοποιείται κυρίως για να διαλύσει άλατα. Είναι μια πολύ χρήσιμη ουσία εξαιτίας του ρόλου του ως εξαοδοντωτή συνδέτη και χηλικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, έχει την ικανότητά να αποσπά μεταλλικά ιόντα όπως είναι τα Ca²⁺ και Fe³⁺. Εφόσον αυτά δεσμευτούν από το EDTA, παραμένουν στο διάλυμα αλλά παρουσιάζουν μειωμένη αντιδραστικότητα.



Εικόνα 38: Χημική δομή EDTA

Το EDTA χρησιμοποιήθηκε μαζί με το NADH για την διεξαγωγή ελέγχου της ικανότητας για παραγωγή ελευθέρων ριζών από την κουρκουμίνη και τα παράγωγα της.

4.3.10 FBS (fetal bovine serum)

Το FBS είναι εμβρυϊκός ορός βοοειδών ο οποίος χρησιμοποιείται ως αυξητικός παράγοντας στην καλλιέργεια κυττάρων. Διατηρείται στην κατάψυξη και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε εμβρυικούς αυξητικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, είναι το πιο διαδεδομένο συμπλήρωμα ανάπτυξης για προσθήκη στο μέσο κυτταρικής καλλιέργειας. Η μορφή του φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

4.3.11 Αντιβιοτικό

Χρησιμοποιήθηκε αντιβιοτικό στις κυτταρικές καλλιέργειες προκειμένου να αποφευχθεί βακτηριακή ή μυκητιακή μόλυνση. Πρόκειται για ένα άχρωμο διάλυμα που περιέχει πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και Gibco αμοτερικίνη. Διατηρείται στην κατάψυξη.

4.3.12 DMEM

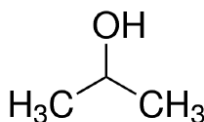
Το RPMI χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνεται στο πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ). Το πλήρες θρεπτικό μέσο αποτελείται από RPMI, FBS και αντιβιοτικό. Το RPMI διατηρείται στο σκοτάδι στους 2-8°C.

4.3.13 Τρυψίνη

Η τρυψίνη έχει έντονο ροζ χρώμα και χρησιμοποιείται για την αφαίρεση προσκολλημένων κυττάρων από την φλάσκα. Διατηρείται στην κατάψυξη.

4.3.14 Ισοπροπανόλη

Η ισοπροπανόλη χρησιμοποιείται για την αποστείρωση των εργαλείων του εργαστηρίου. Είναι μία καθαρή, άχρωμη, πολική ένωση η οποία μπορεί να διαλύσει πολλές χημικές ουσίες και εξατμίζεται γρήγορα. Η χημική της δομή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 39: Χημική δομή ισοπροπανόλης

5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

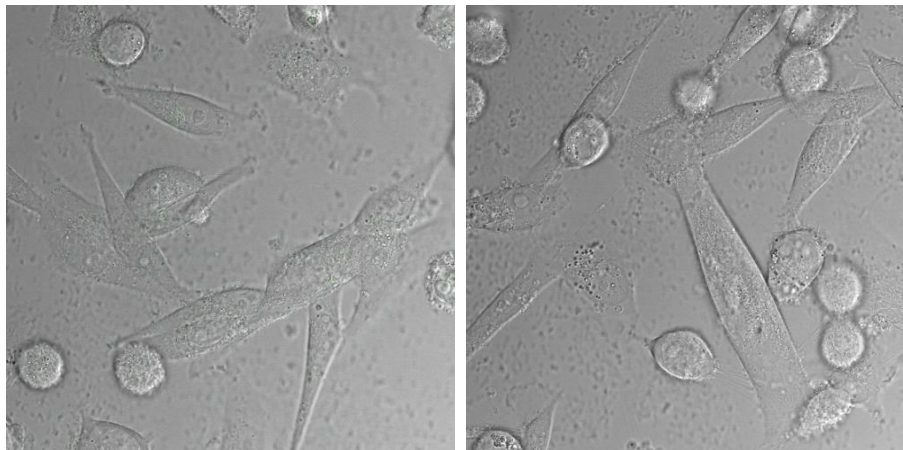
5.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

5.1.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς MDA-MB-231

Τα κύτταρα αποθηκεύονται και διατηρούνται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Τα φιαλίδια που περιέχουν τα κύτταρα τοποθετούνται σε θήκες που υπάρχουν μέσα σε αυτό. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση καρκινικών κυττάρων μαστού τύπου MDA-MB-231.

Αρχικά, το φιαλίδιο με τα κύτταρα που βρίσκονταν στο υγρό άζωτο τοποθετείται σε ένα ποτήρι ζέσεως, αφού πρώτα το νερό αποκτήσει θερμοκρασία ίδια με αυτή του κλιβάνου προκειμένου να ξεπαγώσουν τα κύτταρα. Ακολούθως, για να επιτευχθεί αναστολή της δράσης του DMSO, το οποίο είναι βασικό συστατικό της κατάψυξης των κυττάρων, αδειάζουμε το περιεχόμενο του φιαλιδίου σε ένα ειδικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό, όγκου 10 ml αποτελείται από: 9ml PBS, 1ml FBS και 80μl αντιβιοτικό. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση (pipeting) έτσι ώστε να γίνει το διάλυμα ομοιογενές.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση στη φυγόκεντρο του εργαστηρίου διάρκειας 7 λεπτών. Η φυγοκέντρηση ρυθμίζεται στις 1200 στροφές. Στη φυγόκεντρο, το μπουκαλάκι που περιέχει τα κύτταρα, τοποθετείται αντιδιαμετρικά με ένα άλλο το οποίο χρησιμοποιείται απλά ως αντίβαρο. Μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή, παρασκευάζεται το διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου. Το διάλυμα αυτό, όγκου 15ml αποτελείται από: 13.5ml DMEM, 1.5ml FBS και 120μl αντιβιοτικό. Ακολουθεί η προετοιμασία της φλάσκας τοποθετώντας σε αυτήν 10ml πλήρους θρεπτικού μέσου (μεγάλη φλάσκα).



Εικόνα 40: Κυτταρική σειρά MDA-MB-231

Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο έτσι ώστε να μείνουν στο μπουκαλάκι μόνο τα κύτταρα. Η αφαίρεση αυτή γίνεται με μόνο μία κίνηση προκειμένου να μην υπάρξει παλινδρόμηση και ξεκολλήσει το pellet με τα κύτταρα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και πετιέται. Έπειτα, εισάγονται στο μπουκαλάκι 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου και γίνεται πολύ καλή ανάδευση για να σπάσουν τα συσσωματώματα. Με

την πιπέτα και κάνοντας μαλακές κινήσεις εισάγονται τα κύτταρα στη φλάσκα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να πάνε παντού.



Εικόνα 41: Τοποθέτηση κυττάρων στη φλάσκα

Γίνεται αποστείρωση του στομίου τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά, και στη συνέχεια η φλάσκα κλείνει. Τέλος, παρατηρείται η φλάσκα στο μικροσκόπιο και τοποθετείται στον κλίβανο.

5.1.2 Ανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς MDA-MB-231

Μετά από λίγες μέρες παρατηρείται η φλάσκα στο μικροσκόπιο προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα κύτταρα αναπτύχθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν. Αν έχει συμβεί αυτό, τότε ξεκινάει η διαδικασία ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Αρχικά αναφέρεται ότι θα γίνει χρήση των εξής τριών διαλυμάτων:

A. Διάλυμα για αναστολή δράσης τρυψίνης

Το διάλυμα όγκου 10ml αποτελείται από:

- 9ml PBS
- 1ml FBS
- 80μl Αντιβιοτικό

B. Πλήρες Θρεπτικό Μέσο (ΠΘΜ)

Το διάλυμα όγκου 15ml όπως αναφέρθηκε και πριν αποτελείται από:

- 13.5ml DMEM
- 1.5ml FBS
- 120μl Αντιβιοτικό

C. Διάλυμα για ξέπλυμα

Το διάλυμα όγκου 10ml αποτελείται από:

- 10ml PBS

- 80ml Αντιβιοτικό

Πρώτα από όλα απορρίπτεται το παλιό μέσο. Η ενέργεια αυτή γίνεται με πολύ προσοχή και πάντα από το πλάι έτσι ώστε να μην χαθούν κύτταρα. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας 2 ml από το διάλυμα 3 η φλάσκα ξεπλένεται. Το ξέπλυμα επαναλαμβάνεται ακόμα μία φορά. Έπειτα, με σκοπό να ξεκολλήσουν τα κύτταρα προστίθενται 2ml τρυψίνης και γίνεται καλή ανακίνηση της φλάσκας σε συνδυασμό με μικρά χτυπήματα. Η τρυψίνη είναι τοξική για τα κύτταρα επομένως, η παραμονή της στη φλάσκα δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 3 λεπτά. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται 6ml από το διάλυμα 1 έτσι ώστε να γίνει αναστολή της δράσης της. Πραγματοποιείται καλή ανακίνηση και εν συνεχεία το περιεχόμενο της φλάσκας εισάγεται σε ένα μπουκαλάκι. Στη φλάσκα προστίθενται ακόμα 4ml διαλύματος αναστολής δράσης και μετά την ανακίνηση εισάγονται και αυτά στο ίδιο μπουκαλάκι. Το μπουκαλάκι τοποθετείται στην φυγόκεντρο για 7 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 1200rpm. Όταν αυτή η διαδικασία τελειώσει το υπερκείμενο αφαιρείται με μία μόνο κίνηση προσεκτικά και πετιέται. Στο μπουκαλάκι εισάγονται πλέον 5ml πλήρους θρεπτικού μέσου, και γίνεται πολύ καλή ανάδευση για να σπάσουν τα συσσωματώματα. Χρησιμοποιώντας την πιπέτα και κάνοντας πολύ μαλακές κινήσεις τα κύτταρα τοποθετούνται μέσα στην καινούρια φλάσκα η οποία προηγουμένως έχει προετοιμασθεί με την εισαγωγή 10ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Πριν το κλείσιμο της φλάσκας το στόμιο αποστειρώνεται τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά. Τέλος, γίνεται παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο και ακολούθως τοποθετείται στον κλίβανο για να γίνει η επώαση των κυττάρων.

5.2 Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινών

5.2.1 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης κουρκουμινών

I. Μεθοδολογία μελέτης απορρόφησης για διάφορες συγκεντρώσεις και αραιώσεις σε DMSO

Αρχικά, κατασκευάζονται τα μητρικά διαλύματα των ουσιών. Οι ουσίες βρίσκονται σε μορφή σκόνης και διαλύονται στη συνέχεια σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Για να υπολογιστούν οι τελικές συγκεντρώσεις των μητρικών διαλυμάτων χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$C = \frac{m \cdot 1000}{V \cdot Mr}, \text{όπου:}$$

- m: μάζα ουσίας (σε gr)
- V: όγκος διαλύματος (σε ml)
- Mr: Μοριακό βάρος ουσίας

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει πόσα γραμμάρια ουσίας και πόσα ml DMSO χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθούν κατάλληλες συγκεντρώσεις για το μητρικό διάλυμα.

Ουσίες	Μάζα	Όγκος DMSO	Συγκέντρωση μητρικού διαλύματος
Curcumin I	$4.5 \cdot 10^{-3}$ gr	2ml	$6.1 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin II	$2.3 \cdot 10^{-3}$ gr	1.5ml	$4.5 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin III	$3.1 \cdot 10^{-3}$ gr	1.5ml	$6.7 \cdot 10^{-3}$ M
Curcumin Mix	$3.2 \cdot 10^{-3}$ gr	1.5ml	$5.8 \cdot 10^{-3}$ M

Πίνακας 2: Συνοπτική παρουσίαση των παραμέτρων για τη δημιουργία του μητρικού διαλύματος

Αναφέρεται επίσης το μοριακό βάρος κάθε ουσίας:

Ουσίες	Μοριακό Βάρος
Curcumin I	368.4
Curcumin II	338.3
Curcumin III	308.3
Curcumin Mix	368.38

Πίνακας 3: Μοριακό βάρος ουσιών

Στη συνέχεια, αφού έχει δημιουργηθεί το μητρικό διάλυμα κάθε ουσίας παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα με τελικό όγκο 3ml και συγκεντρώσεις $C=2 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-5} M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M. Τα διαλύματα αυτά εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Πριν ξεκινήσει η μέτρηση είναι απαραίτητο να γίνει μηδενισμός του οργάνου για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται σε θόρυβο ή πιθανής απορρόφησης του εκάστοτε διαλύτη.

Το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή των φασμάτων απορρόφησης ονομάζεται Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis. Τα φάσματα λαμβάνονται σε περιοχή από 300-700nm με ταχύτητα σάρωσης 480nm/min.

II. Μελέτη απορρόφησης σε διάφορους διαλύτες

Οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν εδώ, εκτός από DMSO θα είναι: αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικό Dulbecco (PBS) και Αιθανόλη (EtOH). Από το μητρικό διάλυμα το οποίο κατασκευάζεται ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω δημιουργούνται 3 νέα διαλύματα συγκέντρωσης $C=2 \cdot 10^{-5}$ M. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε ουσία. Ο όγκος κάθε ενός από τα 3 αυτά διαλύματα είναι 3ml και εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης.

Όπως και πριν, το όργανο που χρησιμοποιείται για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης είναι το Perkin-Elmer Lambda 35 UV-Vis. Τα φάσματα λαμβάνονται σε περιοχή από 300-700nm με ταχύτητα σάρωσης 480nm/min.

5.2.2 Μεθοδολογία φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού

Από τα μητρικά διαλύματα των ουσιών δημιουργούνται νέα διαλύματα συγκέντρωσης $C=10^{-7}M$. Χρησιμοποιείται DMSO για όλες τις αραιώσεις. Στη συνέχεια, τα διαλύματα, τα οποία έχουν όγκο 3ml, εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου φθορισμού. Πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις γίνεται μηδενισμός του σήματος για αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται σε θόρυβο, αλλά και πιθανού φθορισμού του διαλύτη. Κυβέτα, η οποία περιέχει 3ml DMSO τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού. Έπειτα, το σήμα που καταγράφεται αφαιρείται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται κάποιες πληροφορίες που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των διαλυμάτων στα οποία πρόκειται να γίνει λήψη φασμάτων φθορισμού.

Ουσίες	Συγκέντρωση Μητρικού Διαλύματος	Μήκος Κύματος Διέγερσης
Curcumin I	$6.1 \cdot 10^{-3}M$	443nm
Curcumin II	$4.5 \cdot 10^{-3}M$	437nm
Curcumin III	$6.7 \cdot 10^{-3}M$	433nm
Curcumin Mix	$5.8 \cdot 10^{-3}M$	441nm

Πίνακας 4: Πληροφορίες διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις φθορισμού

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων χρησιμοποιείται το όργανο Perkin Elmer LS-55 Fluorescence Spectrometer.

Η διέγερση (excitation) επιλέγεται να γίνει σε εκείνο το μήκος κύματος όπου η ουσία απορροφά μέγιστα. Τα φάσματα φθορισμού των εκάστοτε διαλυμάτων λαμβάνονται με σάρωση στην περιοχή μεταξύ 450 και 700nm. Επιλέγεται ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

5.2.3 Μεθοδολογία μελέτης της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών με χρήση NADH

Είναι πολύ σημαντικό, ο φωτοευαίσθητοποιητής που χρησιμοποιείται κατά τη διεξαγωγή της φωτοδυναμικής θεραπείας να παρουσιάζει υψηλή παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έτσι, σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει παρουσίαση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για τη μελέτη της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών των ουσιών.

Για τη λήψη των απαραίτητων μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin-Elmer Lambda 35 UV/VIS. Τα φάσματα λαμβάνονται με σάρωση από τα 300-700nm και ελέγχεται η απορρόφηση στα 340nm, καθώς εκεί εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του NADH. Η ταχύτητα σάρωσης είναι 480 nm/min. Η ισχύς με την οποία θα γίνει ακτινοβολία των διαλυμάτων είναι $5,06mW/cm^2$. Το διάλυμα προς ακτινοβολία αποτελείται από:

- 69μl διαλύματος NADH (παίρνονται από το διάλυμα συγκέντρωσης C=4.32mM)
- 17μl διαλύματος EDTA (παίρνονται από το διάλυμα συγκέντρωσης συγκέντρωσης C=18.02mM)
- 1500μl διαλύματος της προς εξέταση κουρκουμίνης (κουρκουμίνη I/κουρκουμίνη II/κουρκουμίνη III/μείγμα κουρκουμινοειδών) (παίρνονται από το διάλυμα συγκέντρωσης συγκέντρωσης C=2*10⁻⁵)
- 1414 DMSO

Πρέπει να αναφερθεί ότι πριν την δημιουργία του διαλύματος αυτού, δημιουργούμε μητρικά διαλύματα για τις ουσίες NADH και EDTA. Τα μητρικά αυτά διαλύματα έχουν συγκέντρωση 4.32*10⁻³M και 18.02*10⁻³M αντίστοιχα.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ουσίες που περιέχονται στο διάλυμα προς ακτινοβολήση καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους σε αυτό. Ο όγκος του διαλύματος είναι 3ml.

Ουσίες	Συγκέντρωση Ουσιών στο διάλυμα
NADH	100μM
EDTA	0.1mM
Curcumin I/II/III/Mix	10 ⁻⁵ M

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις των ουσιών που περιέχονται στο διάλυμα προς ακτινοβολήση

Πριν την οποιαδήποτε μέτρηση γίνεται μηδενισμός για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται σε θόρυβο του οργάνου η και πιθανής απορρόφησης του διαλύτη. Ο μηδενισμός στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται με χρήση DMSO. Στη συνέχεια γίνεται καταγραφή του φάσματος απορρόφησης του διαλύματος πριν και μετά την προσθήκη NADH και EDTA χωρίς να έχει ακτινοβοληθεί. Έπειτα, το διάλυμα που πλέον αποτελείται από NADH, EDTA, κουρκουμίνη και DMSO ακτινοβολείται και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης ανά λεπτό ακτινοβολήσης σε διάστημα από 0min-15min και ανά 5 λεπτά ακτινοβολήσης σε διάστημα 15min-20min.

5.3 Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμινών στα κύτταρα MDA-MB-231

Πριν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί έλεγχος γύρω από τον χωρικό εντοπισμό των τεσσάρων ουσιών στα κύτταρα της σειράς MDA-MB-231. Αυτός ο έλεγχος καθίσταται απαραίτητος αφού η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι συνδεδεμένη με την θέση συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή.

Η φωτοευαίσθητη ουσία, μετά τη χορήγηση της, μπορεί να συσσωρευτεί σε οργανίδια των κυττάρων όπως είναι τα λυσοσώματα, τα μιτοχόνδρια, οι μεμβράνες πλάσματος, ο πυρήνας. Το σημείο στο οποίο θα συσσωρευτεί η ουσία εξαρτάται από τις φυσικοχημικές της ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η λιποφιλικότητα, η υδροφιλικότητα, η χημική δομή, το φορτίο. Αυτό το σημείο συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας στο κύτταρο συνδέεται

άμεσα με συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου. Τόσο τα μιτοχόνδρια όσο και το ενδοπλασματικό δίκτυο αποτελούν επιθυμητούς στόχους συσσώρευσης. Πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια είναι κατάλληλοι στόχοι λόγω του ρόλου τους ως «εργοστάσια» παραγωγής ενέργειας των κυττάρων αλλά και της συμμετοχή τους στη ρύθμιση της απόπτωσης. Έχει παρατηρηθεί, ότι όταν ένας φωτοευαισθητοποιητής αποθηκεύεται σε αυτό το οργανίδιο, μετά την ενεργοποίησή του τα μιτοχόνδρια απελευθερώνουν κυτόχρωμα C, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε ταχεία επαγωγή απόπτωσης. Αντίθετα με τα μιτοχόνδρια, οι ουσίες δε θα πρέπει να συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων επειδή μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο DNA οδηγώντας έτσι σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως μετάλλαξη και νέα καρκινογένεση εάν το κύτταρο δεν οδηγηθεί τελικά σε θάνατο.

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού του μείγματος της κουρκουμίνης και των συστατικών της στα κύτταρα MDA-MB-231 πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συνεστιακού διφωτονικού μικροσκοπίου Leica TCS-SP5II και του λογισμικού LASAF. Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά ετοιμάζονται τα τριβλία που θα χρειαστούν. Από την υπάρχουσα φλάσκα τα κύτταρα χωρίζονται σε πέντε τριβλία (ένα για την κάθε ουσία και ένα που θα χρησιμοποιηθεί ως αναφορά). Αφού γίνει ο χωρισμός των κυττάρων, τα τριβλία τοποθετούνται στον κλίβανο και αφήνονται να επωαστούν για 24 ώρες.
- Μόλις περάσουν οι 24 ώρες, σε κάθε τριβλίο πρέπει να εισαχθεί το διάλυμα κάθε μίας από τις κουρκουμίνες. Η τιμή συγκέντρωσης που επιλέγεται είναι 3μM. Για αυτή τη συγκέντρωση έχει παρατηρηθεί ότι δεν προκαλείται σημαντική τοξικότητα απουσία φωτός για τακουρκουμινοειδή. Έτσι, χρησιμοποιώντας τα μητρικά διαλύματα των ουσιών (όπου ο διαλύτης είναι DMSO) δημιουργούνται τα επιθυμητά διαλύματα σε πλήρες θρεπτικό μέσο (ΠΘΜ). Τέλος, τα τριβλία τοποθετούνται πάλι στον κλίβανο και αφήνονται να επωαστούν για μία ώρα.
- Αφού περάσει η μία ώρα, τα τριβλία βγαίνουν από τον κλίβανο και το κάθε ένα πλένεται δυο φορές με 1ml PBS ώστε να απομακρυνθεί η ουσία που δεν έχει μπει μέσα στα κύτταρα. Στη συνέχεια, εισάγεται στο κάθε ένα 1ml πλήρες θρεπτικό μέσο έτσι ώστε να είναι προστατευμένα μέχρι να μελετηθούν στο μικροσκόπιο.
- Τα τριβλία τοποθετούνται στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Ο έλεγχος της λήψης, της μεταφοράς των εικόνων και η επιλογή των διαφόρων παραμέτρων γίνεται μέσω του λογισμικού LASAF.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι παράμετροι που επιλέχθηκαν για την λήψη των εικόνων των τεσσάρων ουσιών.

Για τη μελέτη και των τεσσάρων ουσιών οι ρυθμίσεις που φαίνονται στον πίνακα 6 ήταν κοινές.

Confocal Settings	
Scan Speed	700 Hz
Magnification	63
Objective Name	HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL
Pinhole	95.6 μm
Frame Average	1

Πίνακας 6: Ρυθμίσεις του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser κατά τη λήψη εικόνων των κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με τις τέσσερις φωτοευαίσθητες ουσίες.

Για την καλύτερη απεικόνιση του φθορισμού των κυττάρων τόσο του μείγματος κουρκουμινοειδών όσο και των συστατικών του οι ρυθμίσεις που αφορούν την ισχύ του laser και το κέρδος του ανιχνευτή διαφοροποιούνται. Οι τιμές των παραμέτρων φαίνονται στον πίνακα 7:

Laser Line				
	Curcumin I	Curcumin II	Curcumin III	Curcumin Mix
Visible (458nm) Intensity	8%	1.20%	1%	7%
Detectors				
	Curcumin I	Curcumin II	Curcumin III	Curcumin Mix
PMT GAIN	310	426.7	456.5	396.9

Πίνακας 7: Ρυθμίσεις έντασης laser και κέρδους φωτοπολλαπλασιαστή του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης κατά τη λήψη εικόνων των κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί με τις τέσσερις φωτοευαίσθητες ουσίες.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων

6.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης

Μελέτη απορρόφησης για διάφορες συγκεντρώσεις και αραιώσεις σε DMSO

Ακολουθείται τη διαδικασία που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Από το μητρικό μας διάλυμα φτιάχνονται 5 διαλύματα με τις εξής συγκεντρώσεις : $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M και $5 \times 10^{-7} \text{ M}$. Οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Τα διαλύματα αυτά εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης των 3ml. Πριν από την έναρξη των μετρήσεων γίνεται Autozero, δηλαδή μηδενισμός του σήματος για ελαχιστοποίηση του θορύβου αλλά και πιθανής απορρόφησης του διαλύτη DMSO.

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο). Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης για κάθε διάλυμα λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή με αποτέλεσμα η απορρόφηση να μετρείται από τα 300 μέχρι τα 700nm.

Αναφέρεται ότι η σχέση που συνδέει την απορρόφηση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας περιγράφεται από το νόμο των Lambert – Beer ^[3]:

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

Όπου:

A: η απορρόφηση

I_0 : η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I: η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας

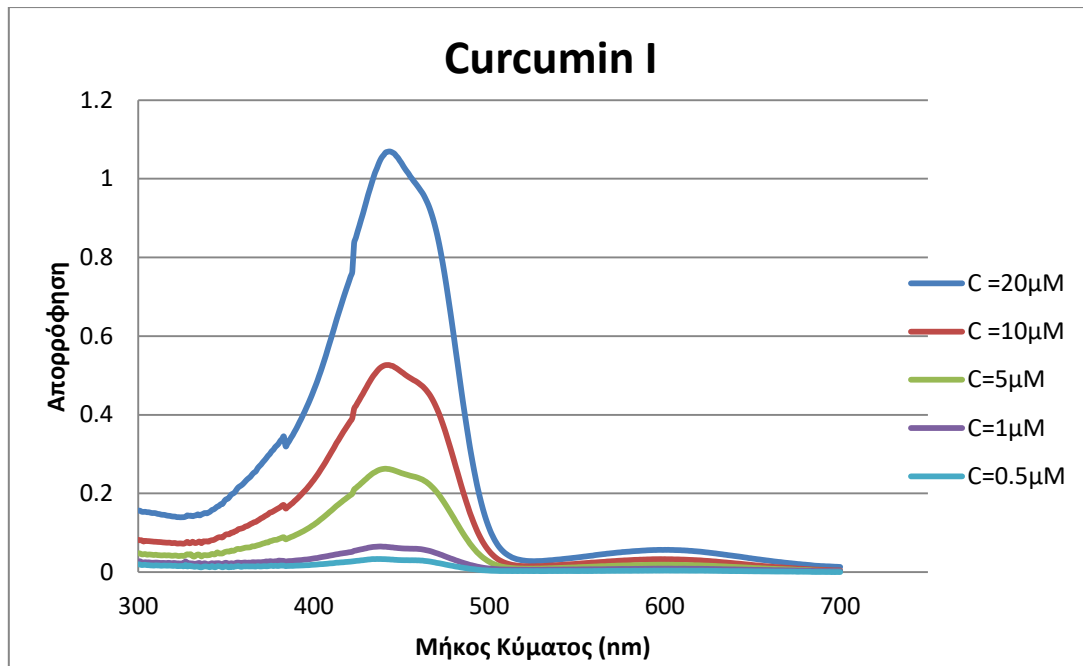
ε : η μοριακή απορροφητικότητα ($\text{l/mol} \times \text{cm}$)

b: το πάχος της κυβέτας (cm)

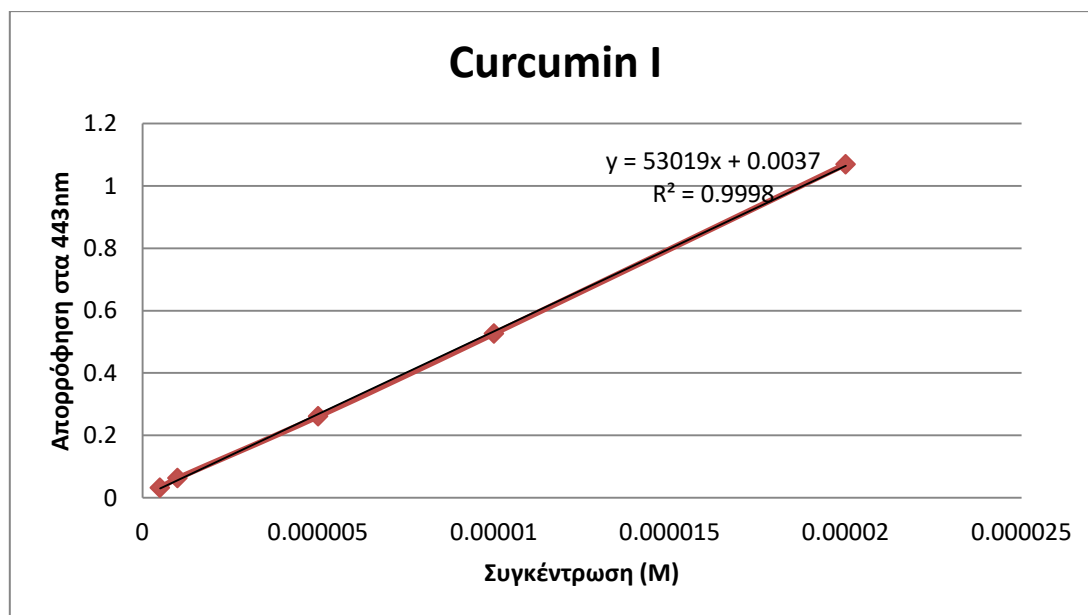
c: η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας (mol/l)

Curcumin I

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2) φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης I στις τιμές συγκεντρώσεων που αναφέραμε παραπάνω. Ακόμα, προστίθεται και το διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. (Διάγραμμα 3)



Διάγραμμα 2: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε διάφορες συγκεντρώσεις



Διάγραμμα 3: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης I ως προς τη συγκέντρωση

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης I μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση σύμφωνα με τη σχέση:

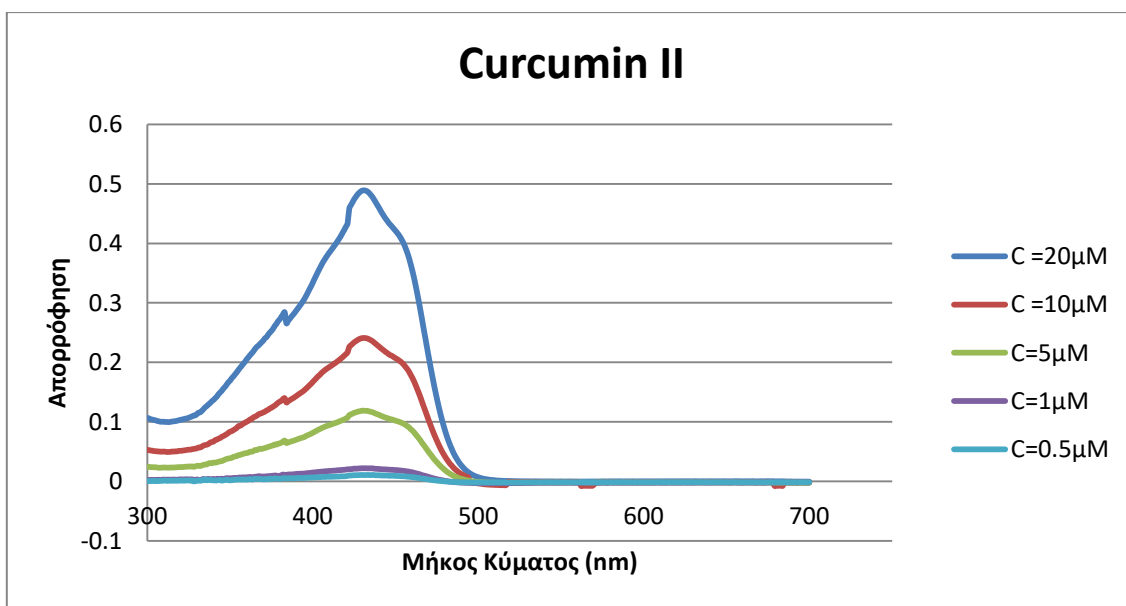
$$y = 53019x + 0,0037 \text{ με } R^2=0,9998$$

Παρατηρείται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης I μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση και ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 2 τα διαλύματα της ουσίας παρουσιάζουν μέγιστη

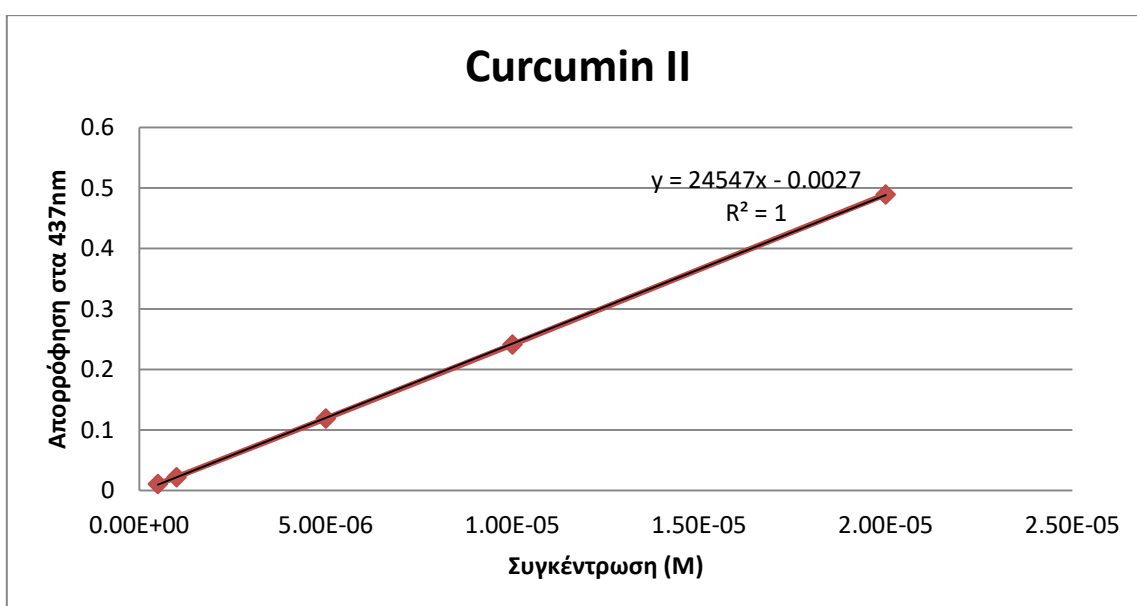
απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος περίπου στα 443 nm και η απορρόφηση αυξάνεται καθώς αυξάνεται γραμμικά και η συγκέντρωση.

Curcumin II

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4) φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης II στις τιμές συγκεντρώσεων που αναφέραμε παραπάνω. Ακόμα, προστίθεται και το διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. (Διάγραμμα 5)



Διάγραμμα 4: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης II σε διάφορες συγκεντρώσεις



Διάγραμμα 5: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης II ως προς τη συγκέντρωση

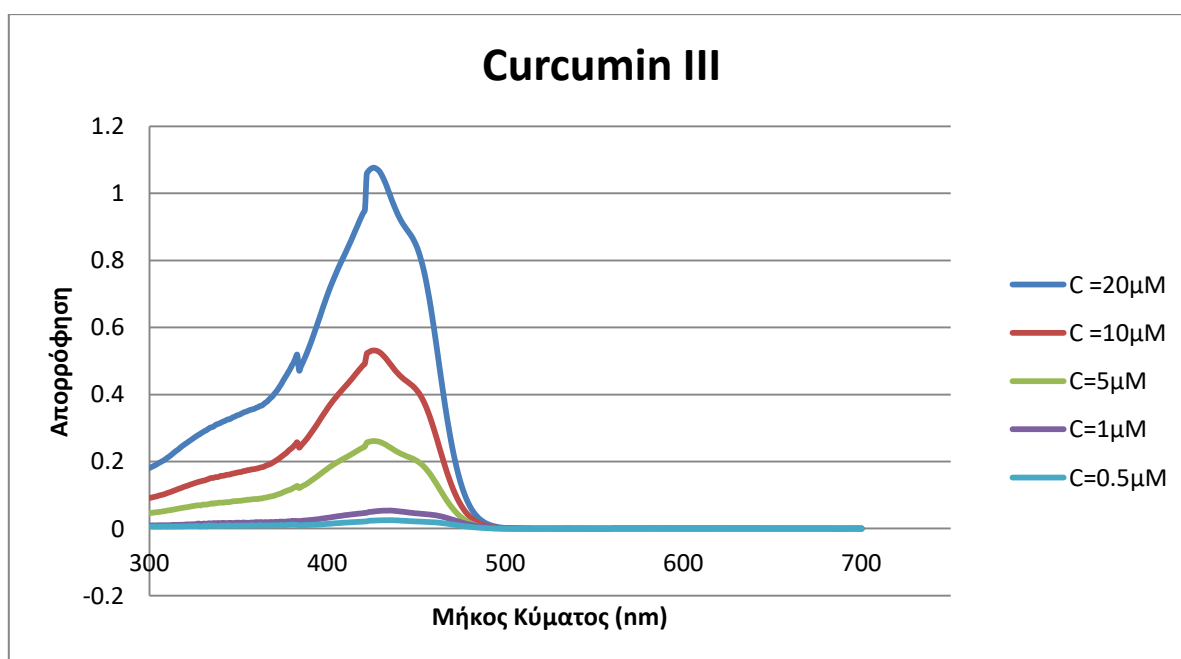
Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης II μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση σύμφωνα με τη σχέση:

$$y = 24547x - 0,0027 \text{ με } R^2=1$$

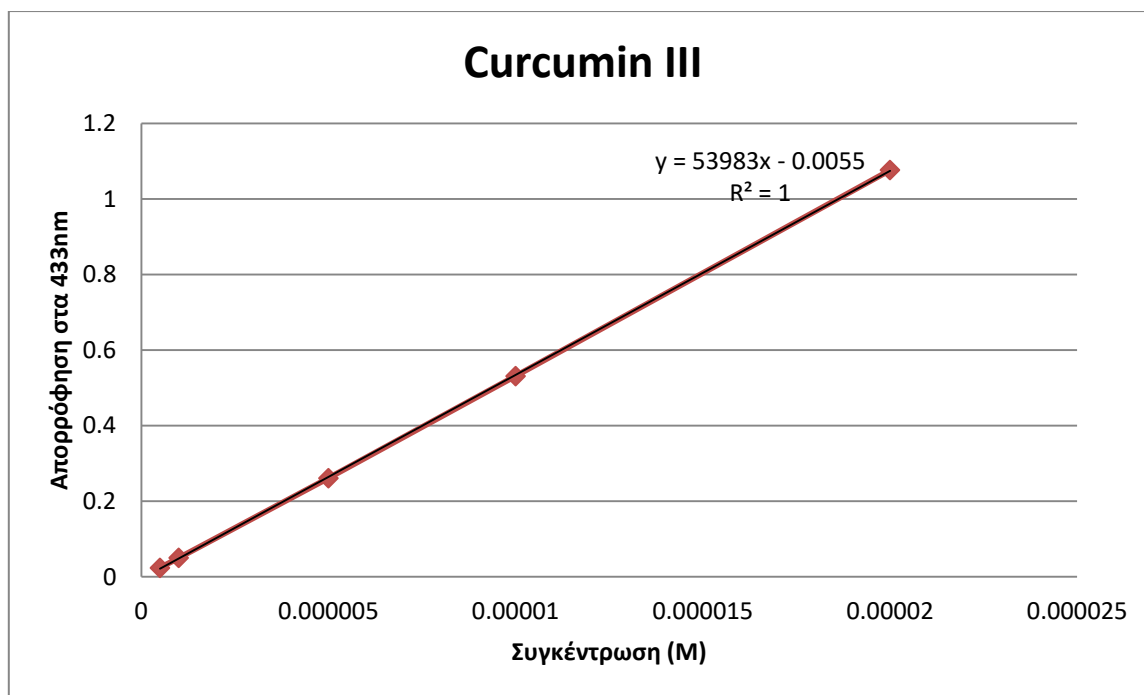
Όπως και στην προηγούμενη ουσία (κουρκουμίνη I) παρατηρείται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης II μεταβάλλεται και εκείνη γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση και ικανοποιούνται επίσης οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Από το διάγραμμα 4 φαίνεται ότι τα διαλύματα της ουσίας παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος περίπου στα 437 nm και η απορρόφηση αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση.

Curcumin III

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 6) φαίνεται το φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης III στις προαναφερθείσες τιμές συγκέντρωσης. Επίσης, προστίθεται και το διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. (Διάγραμμα 7)



Διάγραμμα 6: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης III σε διάφορες συγκεντρώσεις



Διάγραμμα 7: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης III ως προς τη συγκέντρωση

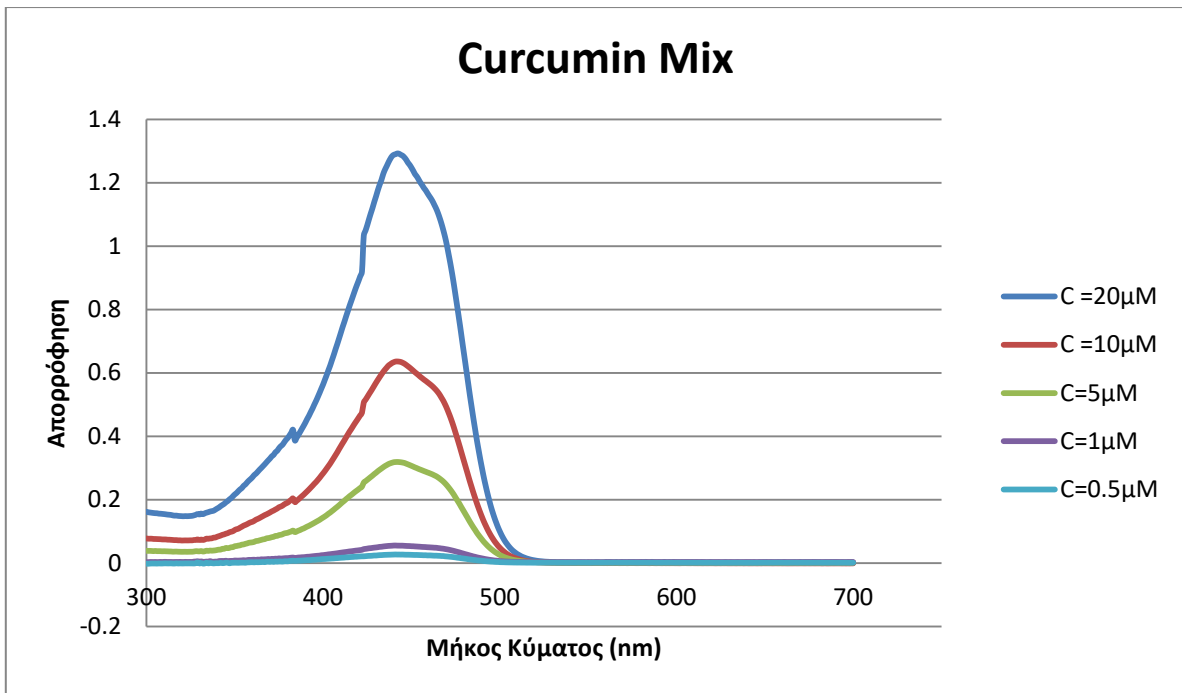
Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης I μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση σύμφωνα με τη σχέση:

$$y = 53983x - 0,0055 \text{ με } R^2=1$$

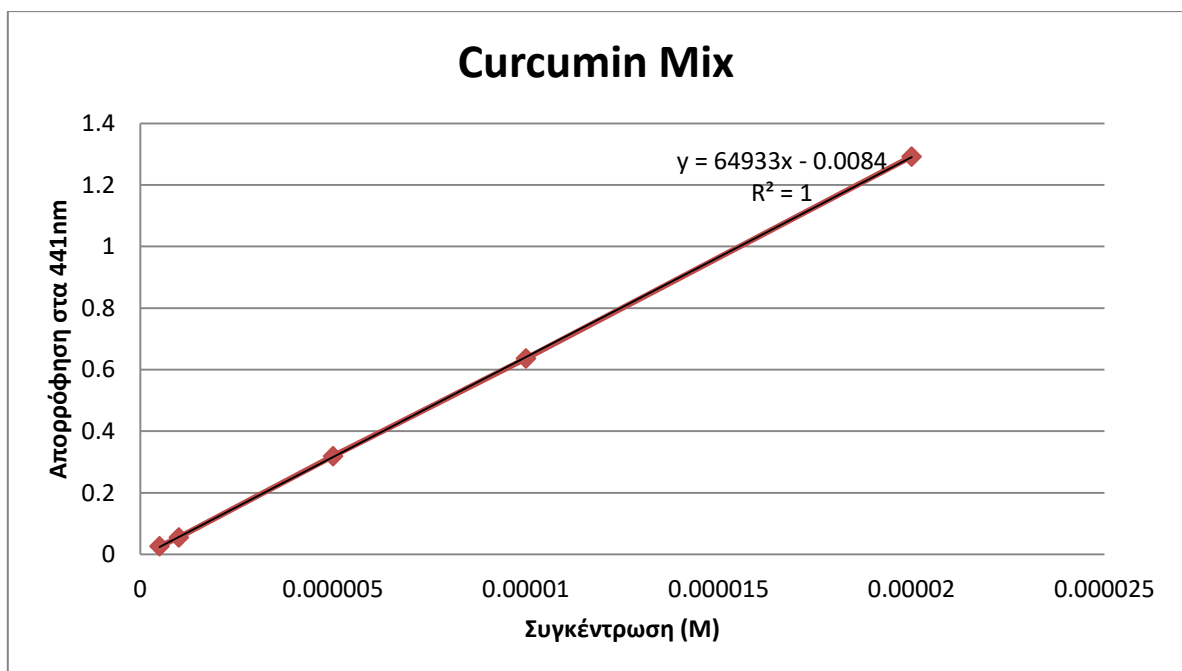
Όπως και στις προηγούμενες ουσίες παρατηρείται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης III μεταβάλλεται και εκείνη γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση. Ικανοποιούνται επίσης οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Από το διάγραμμα 6 φαίνεται ότι τα διαλύματα της ουσίας παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος περίπου στα 443 nm και η απορρόφηση αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης.

Curcumin Mix

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 8) φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινοειδών στις προαναφερθείσες τιμές συγκέντρωσης. Επίσης, προστίθεται και το διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση. (Διάγραμμα 9)



Διάγραμμα 8: Φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix σε διάφορες συγκεντρώσεις



Διάγραμμα 9: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix ως προς τη συγκέντρωση

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης I μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση σύμφωνα με τη σχέση:

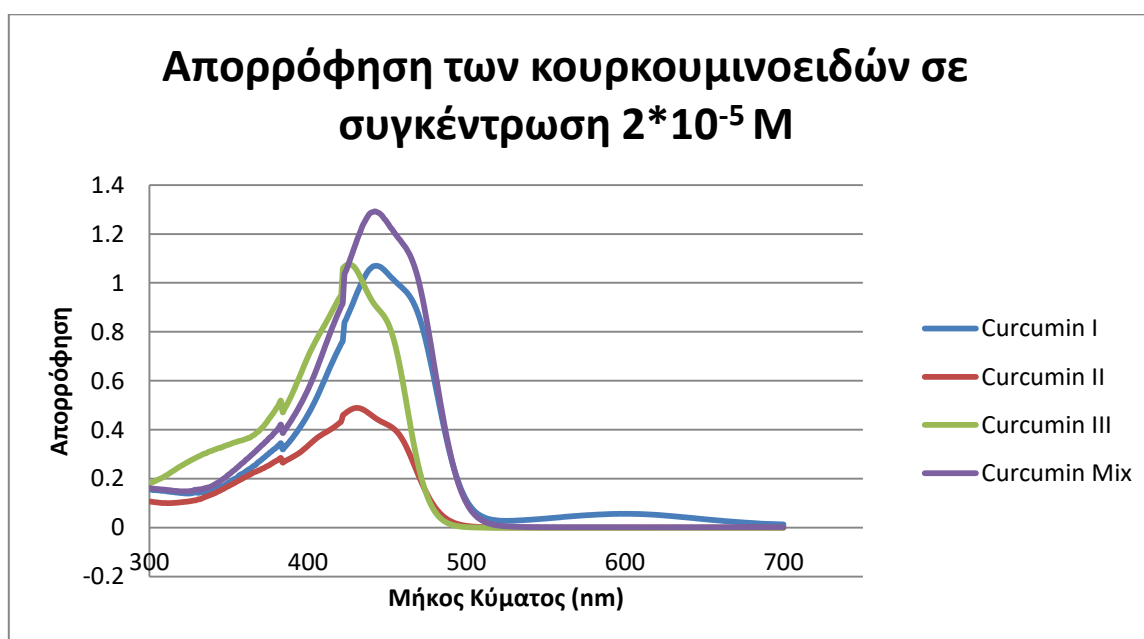
$$y = 64933x - 0,0084 \text{ με } R^2=1$$

Όπως και στις προηγούμενες ουσίες παρατηρείται ότι η μέγιστη απορρόφηση της κουρκουμίνης Mix μεταβάλλεται και εκείνη γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση.

Ικανοποιούνται επίσης οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Από το διάγραμμα 8 φαίνεται ότι τα διαλύματα της ουσίας παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση για τιμή μήκους κύματος περίπου στα 441 nm και η απορρόφηση αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης.

Συγκριτική Μελέτη Φασμάτων Απορρόφησης UV-Vis Κουρκουμινών

Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζεται η σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης των κουρκουμινών για συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} M$ και με όλες τις αραιώσεις των μειγμάτων να έχουν γίνει σε DMSO.



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

Στον πίνακα 8, παρατίθενται η μέγιστη τιμή του μήκους κύματος απορρόφησης αλλά και η μέγιστη απορρόφηση που προέκυψε από τα παραπάνω διαγράμματα.

Ουσίες	Μέγιστη τιμή μήκους κύματος απορρόφησης (nm)	Μέγιστη απορρόφηση
Curcumin I	443	1.07
Curcumin II	437	0.49
Curcumin III	433	1.08
Curcumin Mix	441	1.3

Πίνακας 8: Συγκριτική μελέτη λ_{max} και μέγιστης απορρόφησης για τις ουσίες που μελετήθηκαν σε συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} M$

Παρατηρώντας το διάγραμμα 10, οδηγούμαστε στα εξής συμπεράσματα:

- Η ουσία που εμφανίζει την πιο έντονη απορρόφηση είναι το μείγμα κουρκουμινοειδών (Curcumin Mix). Αμέσως μετά ακολουθούν οι κουρκουμίνες I και

III με σχεδόν ίδια απορρόφηση. Τη μικρότερη απορρόφηση εμφανίζει η κουρκουμίνη II.

- Τα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν μέγιστα οι ουσίες παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην τιμή τους με την κουρκουμίνη I να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μετατόπιση σε μήκη κύματος (443nm).
- Το μείγμα κουρκουμινωειδών περιέχει: 94% κουρκουμίνη I, 3% κουρκουμίνη II και 3% κουρκουμίνη III. Διακρίνουμε ότι η κουρκουμίνη Mix προσεγγίζει αρκετά την κουρκουμίνη I, γεγονός που οφείλεται στο ότι η κουρκουμίνη I βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στο μείγμα από ότι οι υπόλοιπες δύο.
- Η κουρκουμίνη Mix καθώς και η κουρκουμίνη I εμφανίζουν μεγάλη απορρόφηση (1.3 και 1.07 αντίστοιχα). Αυτό είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για έναν φωτοευαίσθητοποιητή καθώς στην φωτοδυναμική θεραπεία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η ουσία να απορροφά μέγιστα.

Δημιουργία Μαθηματικού Μοντέλου για την προσέγγιση του φάσματος απορρόφησης του μείγματος κουρκουμίνης με βάση τη σύσταση του

Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα το μείγμα κουρκουμινωειδών ή αλλιώς κουρκουμίνη αποτελείται από κουρκουμίνη I σε ποσοστό 94%, από κουρκουμίνη II σε ποσοστό 3% και κουρκουμίνη III σε ποσοστό 3%. Το μείγμα κουρκουμινωειδών που διατίθεται στο εμπόριο περιέχει 95% κουρκουμίνη. Έγινε προσπάθεια, χρησιμοποιώντας τη σύσταση του μείγματος, να προσεγγιστεί θεωρητικά το φάσμα απορρόφησης δημιουργώντας ένα μαθηματικό μοντέλο.

Υπολογισμός θεωρητικού φάσματος

Όπως είναι γνωστό, τα αποτελέσματα των μετρήσεων απορρόφησης εκφράζονται σε λογαριθμική κλίμακα. Για να είναι εφικτή όμως η επεξεργασία τους θα πρέπει να γίνει μετατροπή των μετρήσεων απορρόφησης τόσο του μείγματος όσο και των συστατικών του σε ποσοστιαίες αναλογίες απορρόφησης.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί ο τύπος υπολογισμού της απορρόφησης είναι $A = \log \frac{I_0}{I}$, όπου I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας.

Ισχύει ότι: $A = \log \frac{I_0}{I} \Rightarrow \frac{I}{I_0} = 10^{-A}$

Η ποσοστιαία απορρόφηση (Π_A) είναι: $\Pi_A = \frac{I_0 - I}{I_0} = 1 - \frac{I}{I_0} = 1 - 10^{-A} \Rightarrow \boxed{\Pi_A = 1 - 10^{-A}}$

Για τον σχεδιασμό του θεωρητικού φάσματος απορρόφησης του μείγματος της κουρκουμίνης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Μετατροπή των μετρήσεων απορρόφησης του μείγματος και των συστατικών του σε ποσοστιαίες αναλογίες απορρόφησης κάνοντας χρήση του τύπου : $\Pi_A = 1 - 10^{-A}$
- Πολλαπλασιασμός των ποσοστιαίων απορροφήσεων των κουρκουμινών I, II με το αντίστοιχο ποσοστό που βρίσκονται στο μείγμα. Πιο συγκεκριμένα όλες οι

ποσοστιαίες απορροφήσεις για μήκη κύματος από 300-700nm της κουρκουμίνης I πολλαπλασιάστηκαν με 0.94 και της κουρκουμίνης II και III με 0.3.

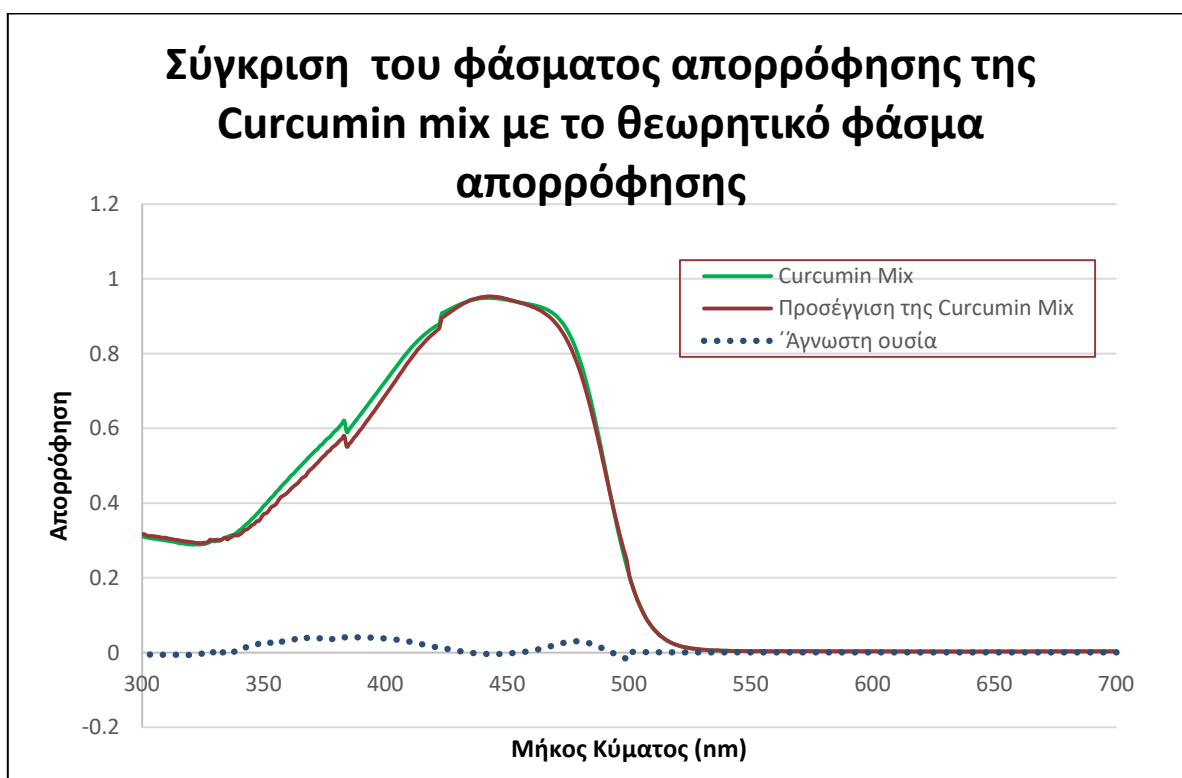
- Πρόσθεση των τιμών των εντάσεων των κουρκουμινών I,II,III, για κάθε μήκος κύματος από 300-700nm.

$$\Pi_{A(\Theta\Omega\text{PHTIKO})} = 0.94 * \Pi_{A(\text{ΚΟΥΡΚ.Ι})} + 0.03 * \Pi_{A(\text{ΚΟΥΡΚ.ΙΙ})} + 0.03 * \Pi_{A(\text{ΚΟΥΡΚ.ΙΙΙ})}$$

Με τα παραπάνω βήματα δημιουργήθηκε ο υπολογισμός της θεωρητικής συμπεριφοράς του μείγματος κουρκουμινοειδών όσον αφορά την απορρόφηση. Επειδή όμως, το εμπορικά διαθέσιμο μείγμα κουρκουμινοειδών περιέχει συνολικά κουρκουμίνη σε ποσοστό 95% και όχι 100% ο υπολογισμός του θεωρητικού φάσματος θα έπρεπε να επαυξηθεί με 5%. Έτσι, το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει:

- Διαίρεση του $\Pi_{A(\Theta\Omega\text{PHTIKO})}$ με 0.95 για κάθε μήκος κύματος από 300-700nm.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η σύγκριση του φάσματος του μείγματος της κουρκουμίνης με το θεωρητικό φάσμα:



Διάγραμμα 11: Συγκριτικά τα φάσματα απορρόφησης του μείγματος κουρκουμινοειδών και του θεωρητικού μοντέλου

Συμπεράσματα

Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι το μαθηματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε πλησιάζει αρκετά τις τιμές του φάσματος απορρόφησης του μείγματος. Η μέγιστη απόκλιση των προσεγγιστικών τιμών από τις πραγματικές είναι 5.8%. Η απόκλιση είναι πολύ μικρή

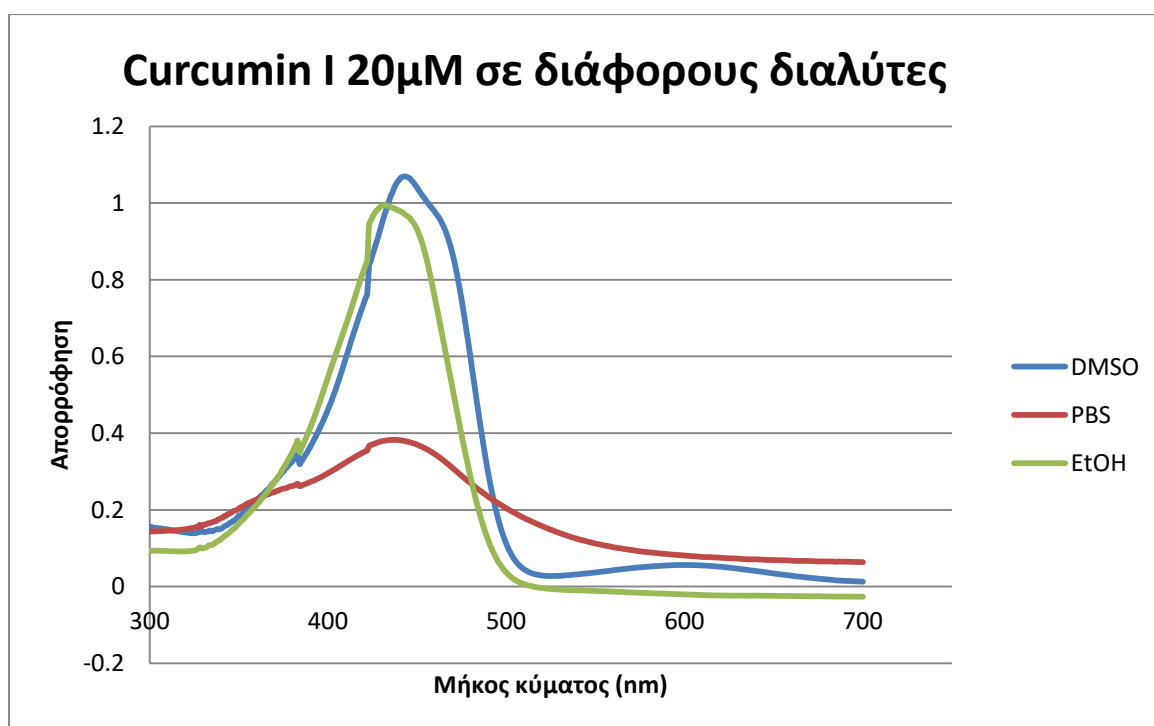
και μπορεί να οφείλεται στην άγνωστη ουσία που βρίσκεται σε ποσοστό 5% μέσα στο μείγμα. Μια προσέγγιση της συμπεριφοράς αυτής της ουσίας φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα. Ουσιαστικά προκύπτει από την αφαίρεση του προσεγγιστικού φάσματος από το πειραματικά μετρημένο φάσμα του μείγματος.

Μελέτη απορρόφησης σε διάφορους διαλύτες

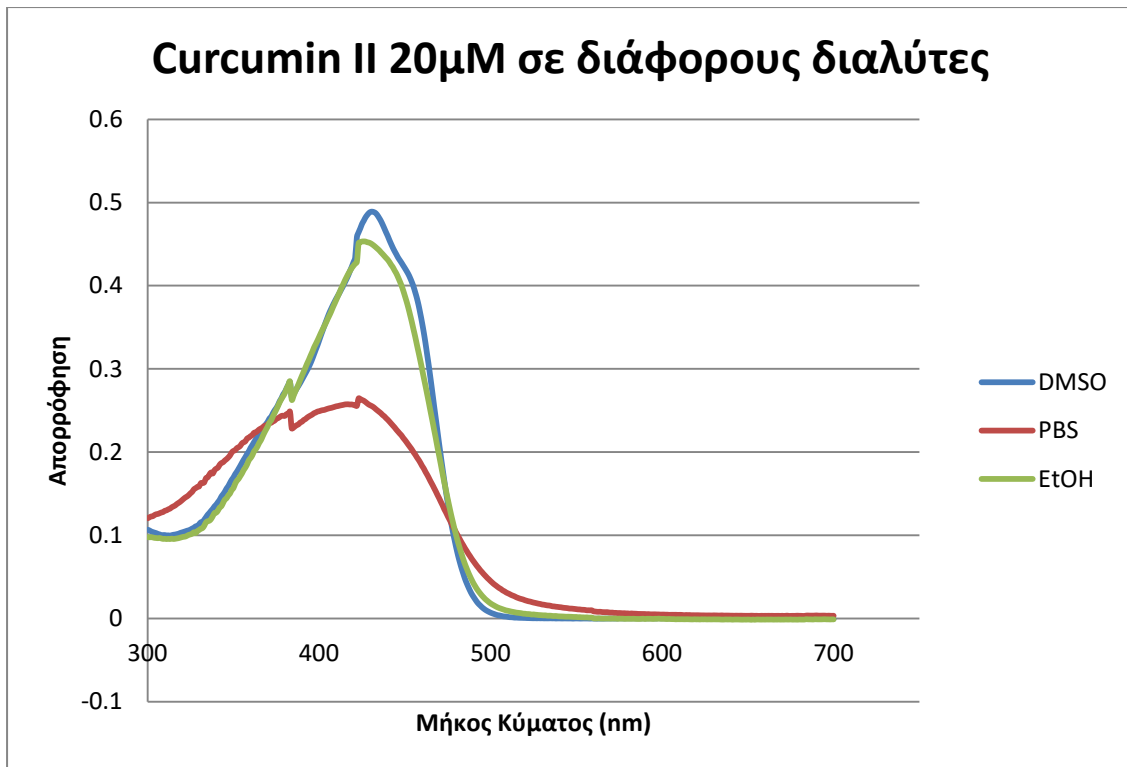
Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Από το μητρικό διάλυμα κάθε κουρκουμίνης φτιάχνονται 3 διαλύματα με συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5}$ M. Σε κάθε ένα από αυτά τα 3 διαλύματα περιέχεται και διαφορετικός διαλύτης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: DMSO, αιθανόλη (EtOH) και PBS. Τα διαλύματα έχουν όγκο 3ml και εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης. Όπως και στις μετρήσεις που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη υποενότητα, γίνεται Autozero, δηλαδή μηδενισμός του σήματος για αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου και πιθανής απορρόφησης των διαλυτών.

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο). Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης για κάθε διάλυμα λαμβάνονται με σάρωση στην υπεριώδη και ορατή περιοχή με αποτέλεσμα η απορρόφηση να μετρείται από τα 300 μέχρι τα 700nm.

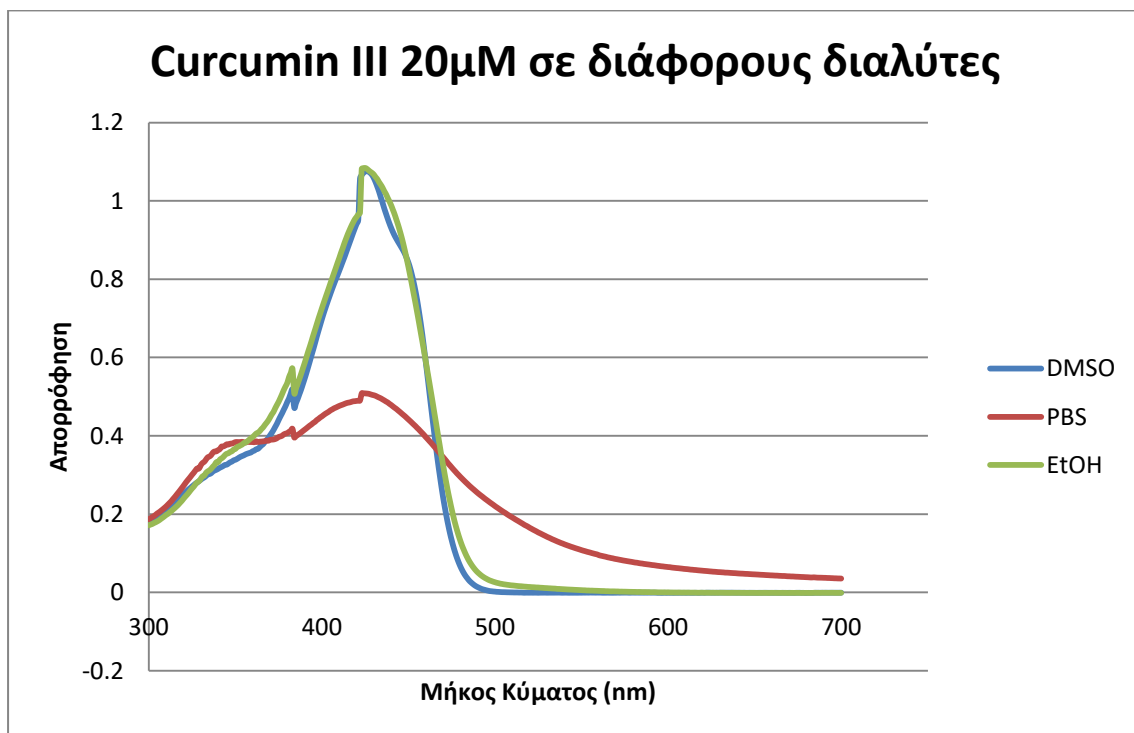
Στο σημείο αυτό παρουσιάζονται για κάθε κουρκουμίνη αλλά και για το μείγμα κουρκουμινοειδών τα φάσματα απορρόφησης στους 3 διαλύτες που αναφέρθηκαν.



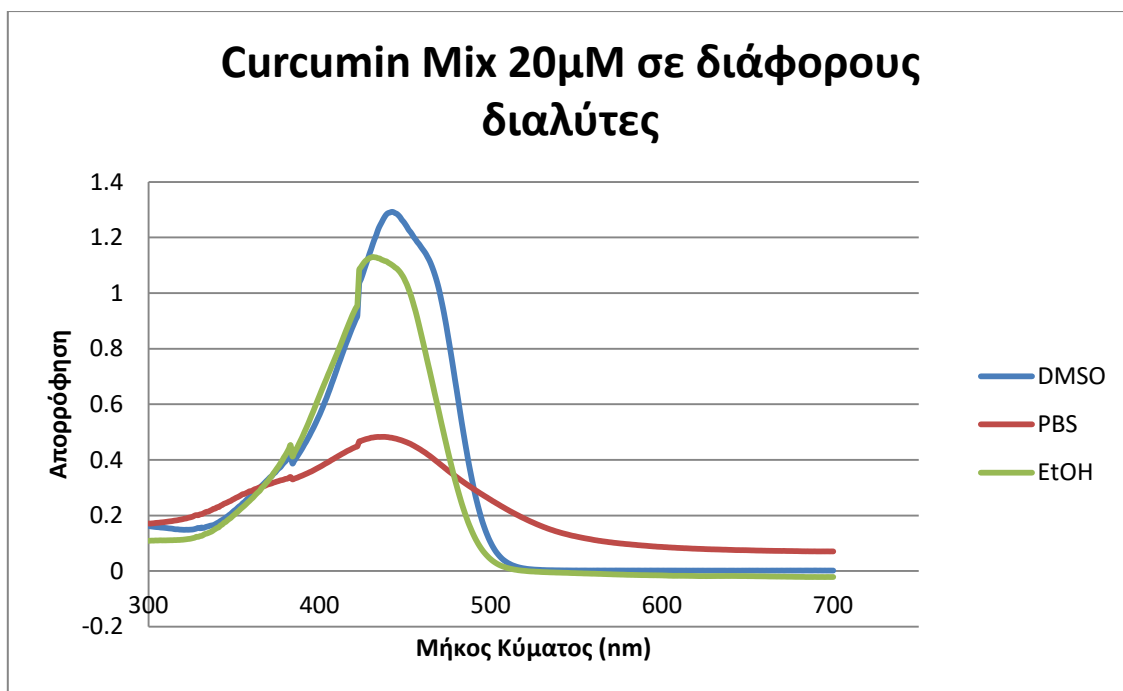
Διάγραμμα 12: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης I σε διάφορους διαλύτες



Διάγραμμα 13: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης II σε διάφορους διαλύτες



Διάγραμμα 14: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης III σε διάφορους διαλύτες



Διάγραμμα 15: Φάσματα απορρόφησης της κουρκουμίνης Mix σε διάφορους διαλύτες

Παρατηρώντας τα διαγράμματα 12-15 καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Τα φάσματα απορρόφησης που προκύπτουν μετά τη χρήση DMSO και EtOH είναι παραπλήσια. Υπάρχει μια πολύ μικρή μετατόπιση της κορυφής των φασμάτων αυτών. Οι δύο αυτοί διαλύτες είναι οργανικοί και όπως φαίνεται τα φάσματα απορρόφησης των κουρκουμινοειδών διατηρούν την χαρακτηριστική μορφή τους.
- Τα φάσματα απορρόφησης εμφανίζουν μια διαφορετική συμπεριφορά όταν οι ουσίες διαλύονται σε PBS. Το PBS αποτελεί ουσιαστικά ένα υδατικό μέσο. Φαίνεται εύκολα ότι οι κορυφές απορρόφησης πέφτουν κατά πολύ στην περίπτωση χρήσης του PBS ως διαλύτη. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την τάση των μορίων της κουρκουμίνης να σχηματίζουν συσσωματώματα μέσα στα υδατικά μέσα, τα οποία εμφανίζουν μειωμένη απορρόφηση.

6.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού

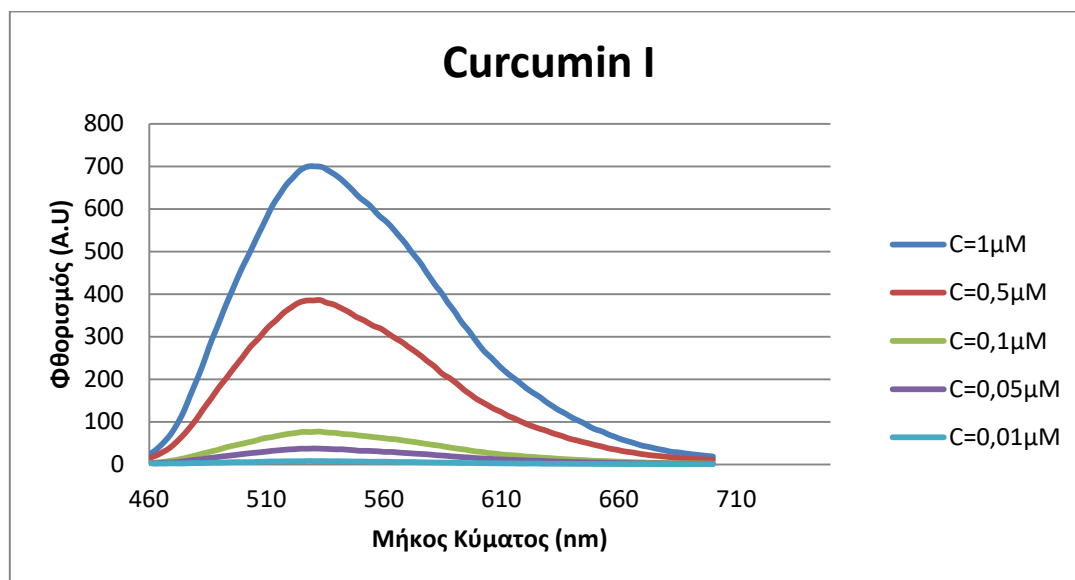
Ακολουθείται τη διαδικασία που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Από το μητρικό μας διάλυμα φτιάχνονται 5 διαλύματα με τις εξής συγκεντρώσεις : 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-7} M, $5 \cdot 10^{-8}$ M και 10^{-8} M. Οι αραιώσεις γίνονται σε DMSO. Τα διαλύματα αυτά εισάγονται σε κυβέτες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης των 3ml. Πριν από την έναρξη των μετρήσεων γίνεται μηδενισμός του σήματος για αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου αλλά και πιθανή φθορισμό του διαλύτη DMSO. Η διέγερση γίνεται στο μέγιστο της απορρόφησης κάθε ουσίας.

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων γίνεται χρήση του φασματοφωτόμετρου φθορισμού Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer. Η λήψη των φασμάτων φθορισμού για κάθε

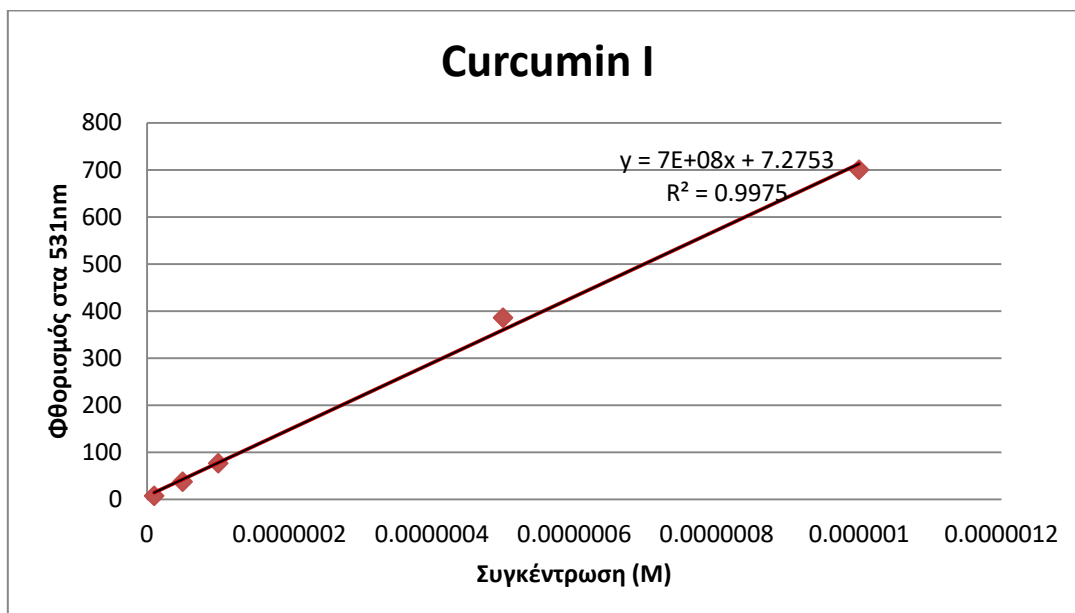
διάλυμα λαμβάνονται με σάρωση στην περιοχή μεταξύ 450 και 700nm. Η διέγερση στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού ορίζεται ως το μέγιστο της απορρόφησης κάθε ουσίας.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα που προέκυψαν από το φασματοφωτόμετρο φθορισμού καθώς και η μεταβολή της μέγιστης τιμής του φθορισμού κάθε κουρκουμίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας. Σημειώνονται επίσης τα συμπεράσματα που προκύπτουν για κάθε ουσία, παρατηρώντας τα αντίστοιχα διαγράμματα.

Curcumin I



Διάγραμμα 16: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης I σε διάφορες συγκεντρώσεις



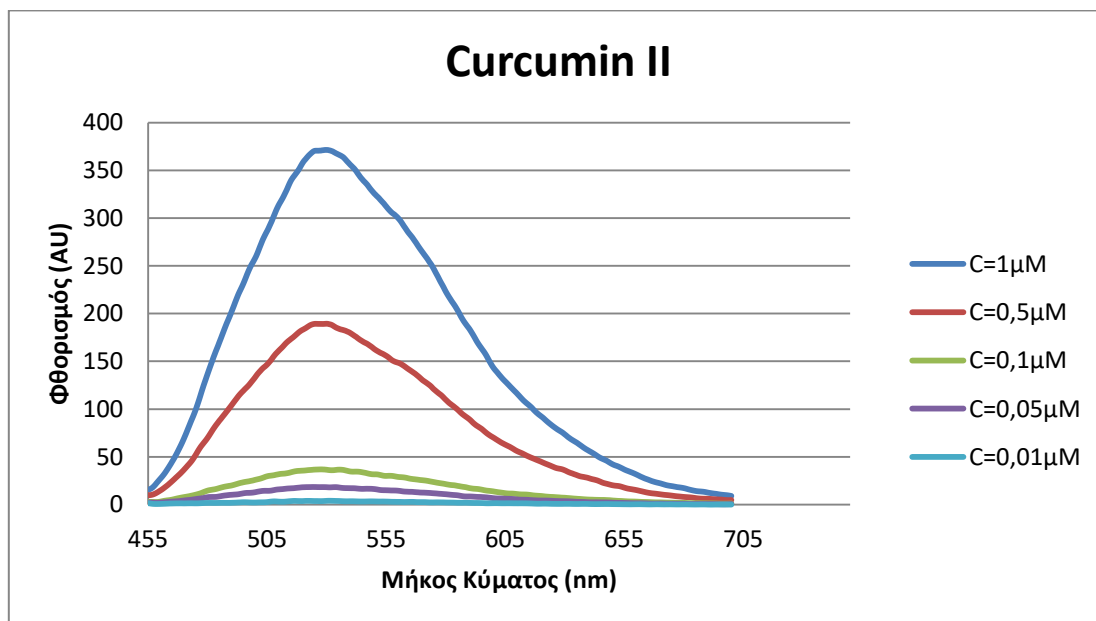
Διάγραμμα 17: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης I σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας

Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στο μήκος κύματος όπου εμφανίστηκε η μέγιστη απορρόφηση δηλαδή στα 443nm. Σε αυτό το μήκος κύματος η ουσία απορροφά το

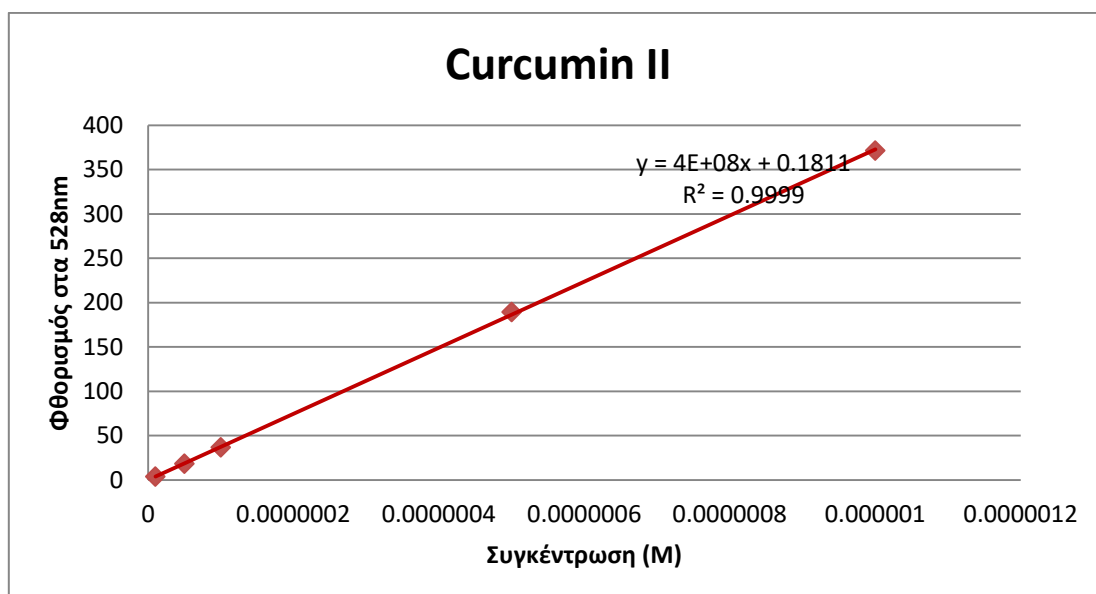
μεγαλύτερο αριθμό φωτονίων και άρα παρατηρείται μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός. Η συλλογή του φάσματος φθορισμού έγινε από τα 460nm μέχρι τα 700nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός που καταγράφηκε είναι στα 531nm.

Η μέγιστη τιμή φθορισμού της ουσίας σε σχέση με τη συγκέντρωση της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 7E + 8x + 7,2753$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης Ι.

Curcumin II



Διάγραμμα 18: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης II σε διάφορες συγκεντρώσεις

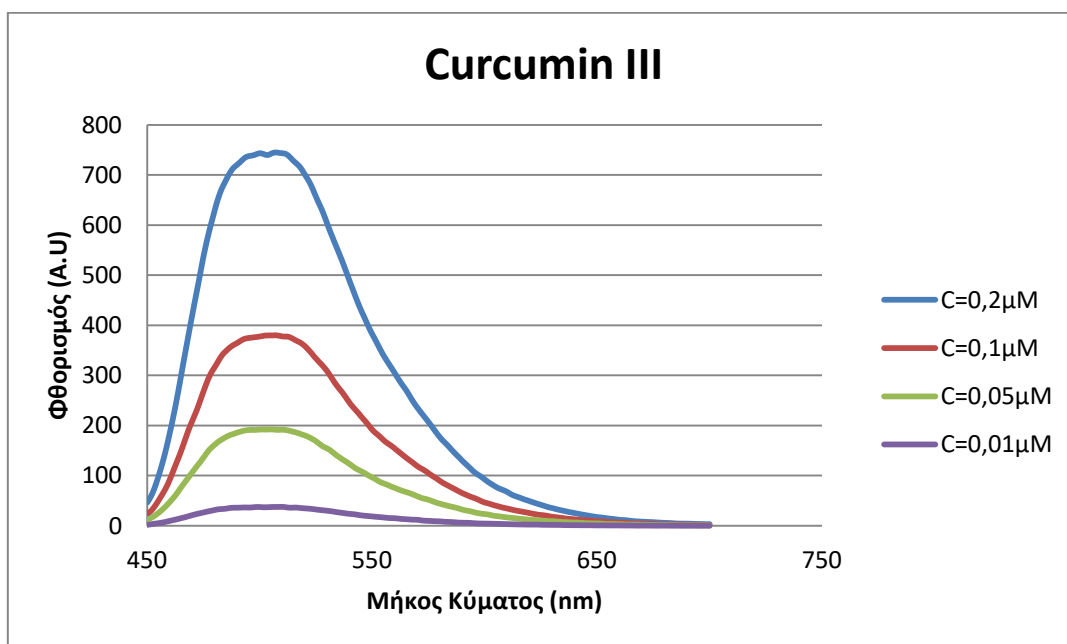


Διάγραμμα 19: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης II σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας

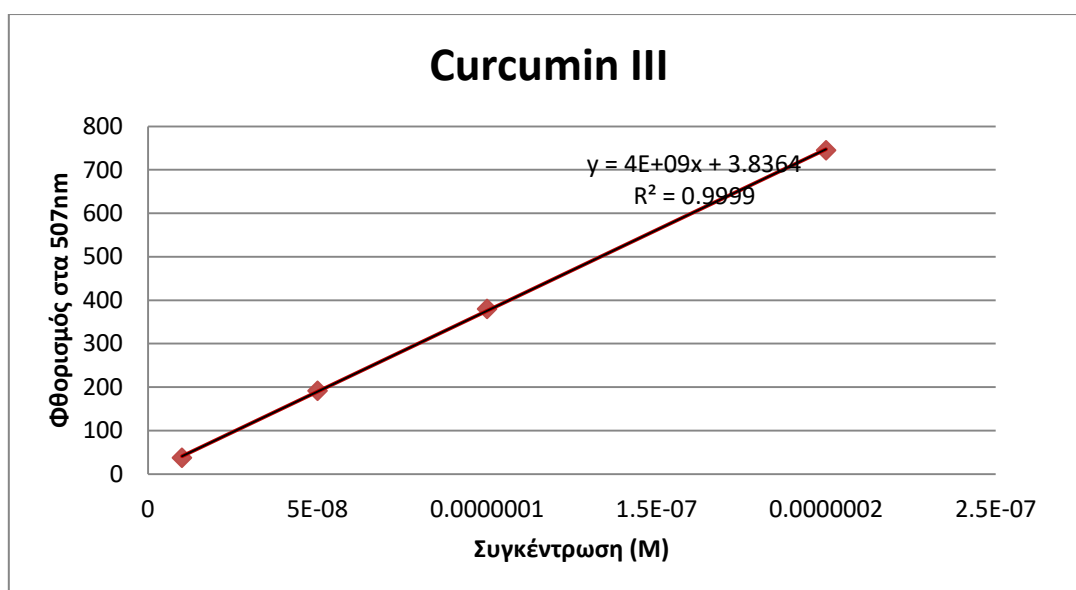
Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 437nm, εκεί όπου εμφανίστηκε η μέγιστη απορρόφηση αριθμού φωτονίων και άρα παρατηρείται μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός. Η συλλογή του φάσματος φθορισμού πραγματοποιήθηκε από τα 455nm μέχρι τα 700nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός που καταγράφηκε είναι στα 529nm.

Η μέγιστη τιμή φθορισμού της ουσίας σε σχέση με τη συγκέντρωση της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 4E + 8x + 0,1811$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης II.

Curcumin III



Διάγραμμα 20: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης III σε διάφορες συγκεντρώσεις



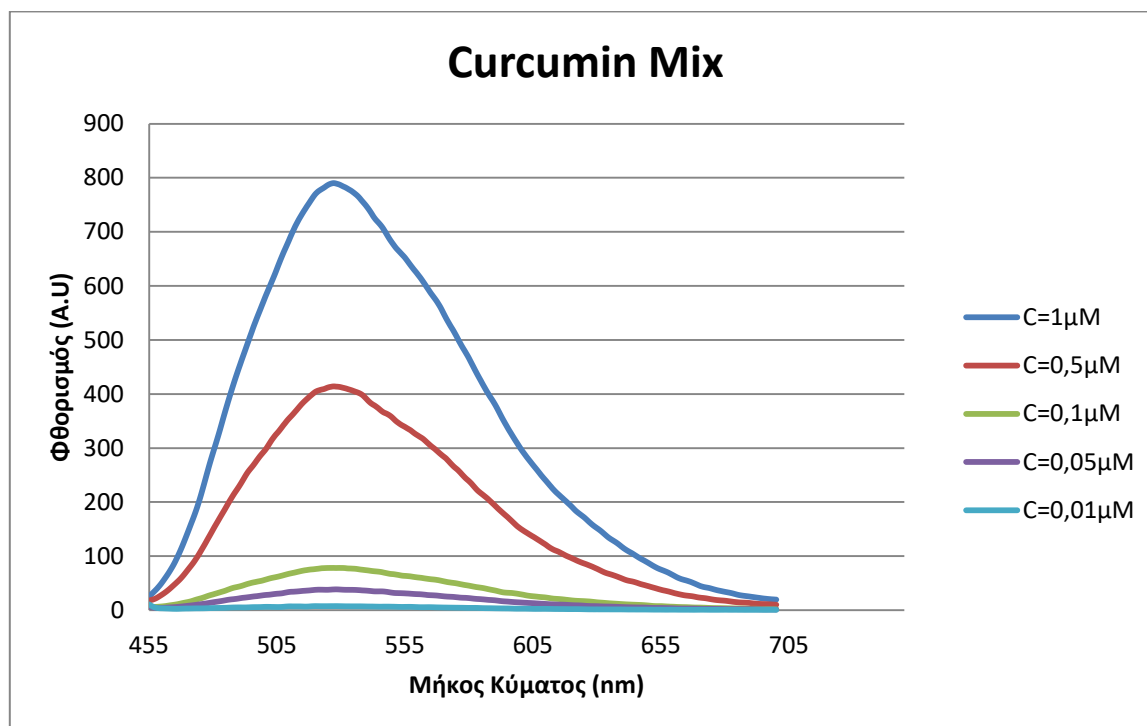
Διάγραμμα 21: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της κουρκουμίνης III σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας

Το φάσμα φθορισμού συλλέχθηκε από τα 450nm μέχρι τα 700nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός που καταγράφηκε είναι στα 507nm. Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 433nm δεδομένου ότι εκεί εμφανίστηκε η μέγιστη απορρόφηση και άρα παρατηρείται μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός.

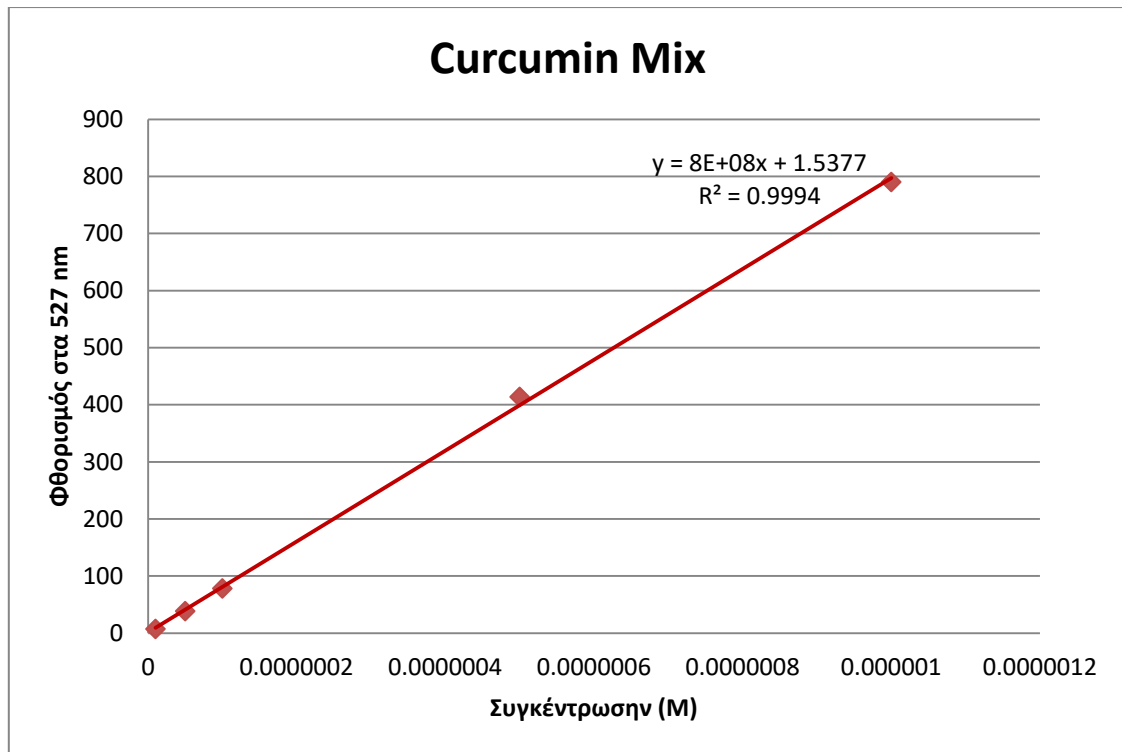
Η μέγιστη τιμή φθορισμού της ουσίας σε σχέση με τη συγκέντρωση της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 4E + 8x + 3,8364$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση της κουρκουμίνης III.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω μεγάλης έντασης φθορισμού δεν μπόρεσαν να καταγραφούν τα φάσματα φθορισμού της κουρκουμίνης III για συγκέντρωση $C=10^{-6}M$ και $5 \cdot 10^{-7}M$.

Curcumin Mix



Διάγραμμα 22: Φάσματα εκπομπής της κουρκουμίνης Mix σε διάφορες συγκεντρώσεις



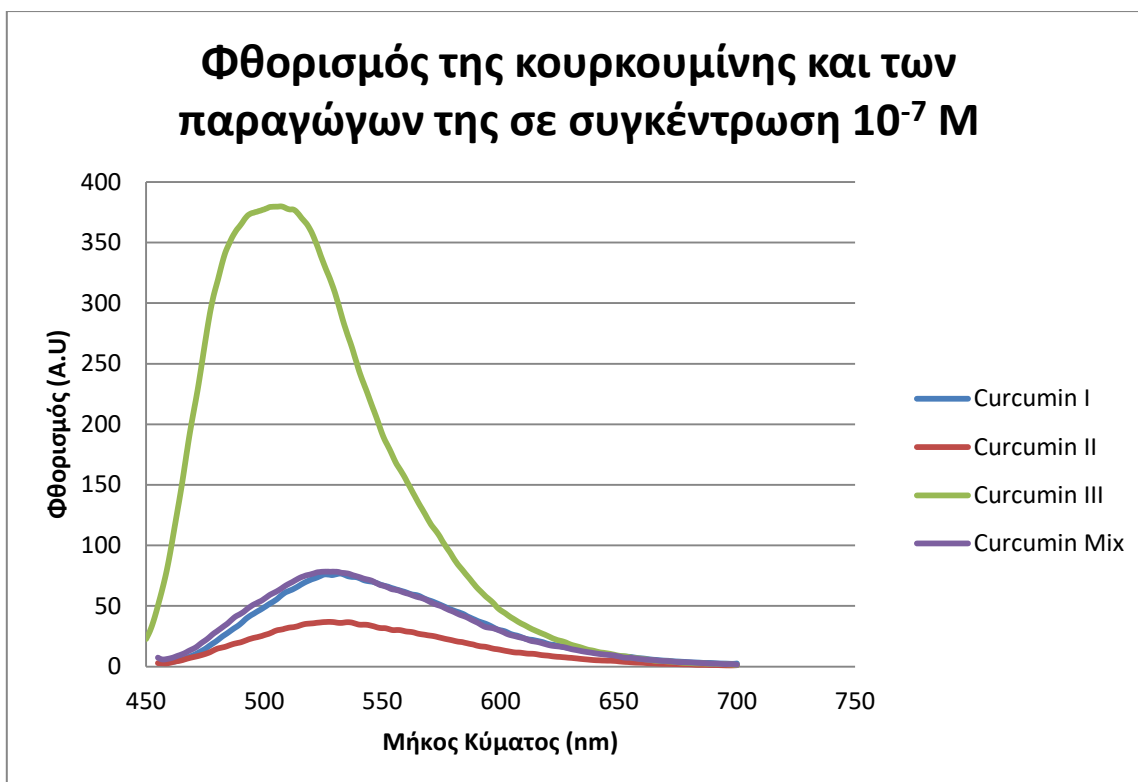
Διάγραμμα 23: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού της Mix σε σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας

Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 441nm, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απορρόφηση αριθμού φωτονίων και να εξασφαλιστεί ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός. Η συλλογή του φάσματος φθορισμού πραγματοποιήθηκε από τα 455nm μέχρι τα 700nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός που καταγράφηκε είναι στα 527nm.

Η μέγιστη τιμή φθορισμού της ουσίας σε σχέση με τη συγκέντρωση της περιγράφεται από την εξίσωση $y = 8E + 8x + 1,5377$ όπου y είναι το σήμα φθορισμού και x η συγκέντρωση. Όπως φαίνεται η ένταση του σήματος φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τη συγκέντρωση του μείγματος των κουρκουμοειδών.

Συγκριτική Μελέτη Φασμάτων Φθορισμού Κουρκουμινών

Στο διάγραμμα 24 παρουσιάζεται η σύγκριση των φασμάτων φθορισμού των κουρκουμινών για συγκέντρωση $10^{-7}M$ και με όλες τις αραιώσεις των μειγμάτων να έχουν γίνει σε DMSO.



Διάγραμμα 24: Φάσματα εκπομπής κουρκουμινών σε συγκέντρωση 10^{-7} M

Στον πίνακα 9, παρατίθενται η τιμή του μήκους κύματος διέγερσης, η μέγιστη τιμή του μήκους κύματος φθορισμού αλλά και η μέγιστη ένταση φθορισμού που προέκυψε από τα παραπάνω διαγράμματα.

Ουσίες	Μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μήκος κύματος μέγιστου φθορισμού (nm)	Μέγιστη ένταση φθορισμού (A.U)
Curcumin I	443	531	76.79
Curcumin II	437	529	36.68
Curcumin III	433	507	379.87
Curcumin mix	441	527	78.29

Πίνακας 9: Συνοπτικός πίνακας για τα φάσματα εκπομπής των ουσιών σε συγκέντρωση 10^{-7} M

Παρατηρώντας το διάγραμμα 24, οδηγούμαστε στα εξής συμπεράσματα:

- Ο μέγιστος φθορισμός σε όλες τις ουσίες εμφανίζεται σε παρόμοιες τιμές μήκους κύματος (507-531nm) και δεν παρατηρούνται σημαντικές διακυμάνσεις.
- Η κουρκουμίνη III εμφανίζεται να έχει τη μεγαλύτερη ένταση φθορισμού ξεπερνώντας κατά μεγάλο ποσοστό τις υπόλοιπες. Ακολουθούν το μείγμα κουρκουμινοειδών (Curcumin Mix), η κουρκουμίνη I και με αρκετά χαμηλότερη τιμή η κουρκουμίνη II.

- Το φάσμα εκπομπής του μείγματος κουρκουμινωειδών εμφανίζεται παραπλήσιο με το φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης I. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η κουρκουμίνη I βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (94%) στο μείγμα κουρκουμινωειδών από ότι οι υπόλοιπες.
- Όλες οι κουρκουμίνες που μελετήθηκαν εμφανίζουν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού κάτι το οποίο είναι πολύ σημαντικό καθώς οι ουσίες αυτές εκτός από θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη διάγνωση.

Δημιουργία Μαθηματικού Μοντέλου για την προσέγγιση του φάσματος φθορισμού του μείγματος κουρκουμίνης με βάση τη σύσταση του

Όπως και στην περίπτωση της απορρόφησης προσπαθήσαμε, χρησιμοποιώντας τη σύσταση του μείγματος, να προσεγγίσουμε το φάσμα φθορισμού δημιουργώντας ένα μαθηματικό μοντέλο. Τα ποσοστά που περιέχονται οι κουρκουμίνες I, II και III στο μείγμα είναι 94%, 3% και 3% αντίστοιχα.

Υπολογισμός θεωρητικού φάσματος

Για τον υπολογισμό του θεωρητικού φάσματος φθορισμού του μείγματος της κουρκουμίνης ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

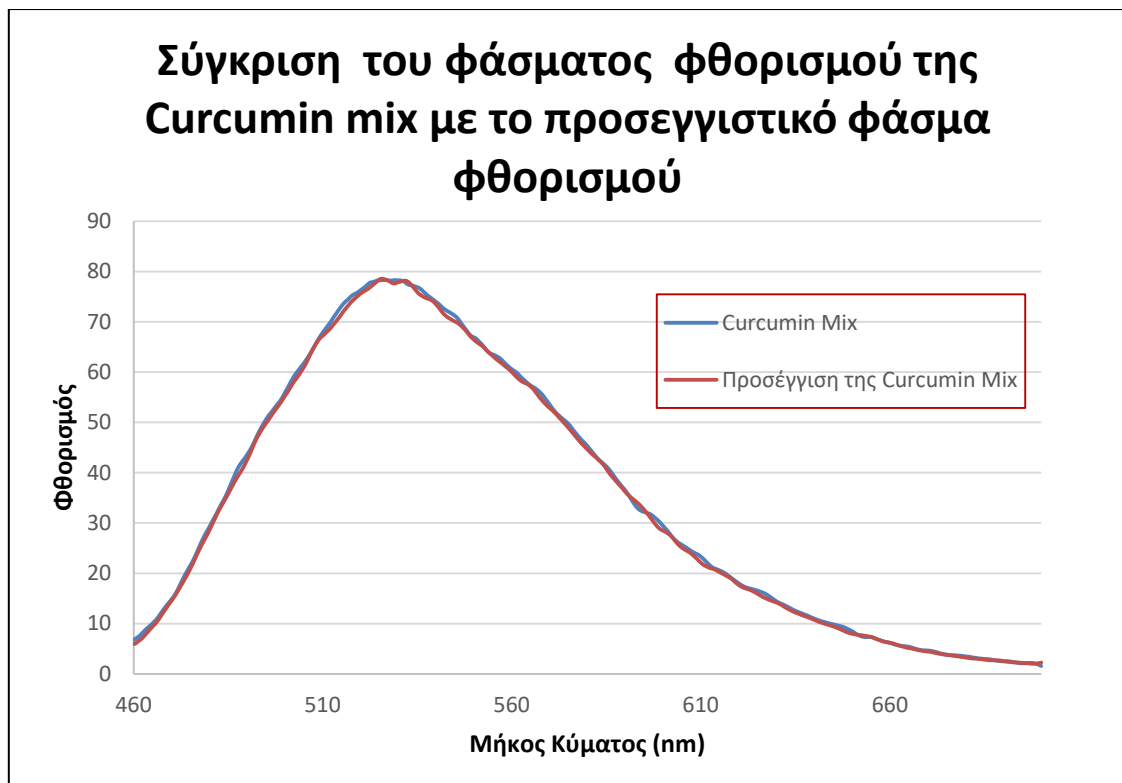
- Πολλαπλασιασμός των τιμών φθορισμού των κουρκουμινών I,II και III με το αντίστοιχο ποσοστό που βρίσκονται στο μείγμα. Πιο συγκεκριμένα όλες τιμές του φθορισμού για μήκη κύματος από 300-700nm της κουρκουμίνης I πολλαπλασιάστηκαν με 0.94 και της κουρκουμίνης II και III με 0.3.
- Πρόσθεση των τιμών του φθορισμού των κουρκουμινών I,II,III, **για κάθε μήκος κύματος από 300-700nm.**

$$\text{Φθορισμός}_{(\text{ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΣ})} = 0.94 * \text{Φθορ.}_{(\text{ΚΟΥΡΚ.Ι})} + 0.03 * \text{Φθορ.}_{(\text{ΚΟΥΡΚ.ΙΙ})} + 0.03 * \text{Φθορ.}_{(\text{ΚΟΥΡΚ.ΙΙΙ})}$$

Με τα παραπάνω βήματα δημιουργήθηκε ο υπολογισμός της θεωρητικής συμπεριφοράς του μείγματος κουρκουμινωειδών όσον αφορά τον φθορισμό. Επειδή όμως, το μείγμα κουρκουμινωειδών περιέχει συνολικά κουρκουμίνη σε ποσοστό 95% και όχι 100%, ο υπολογισμός του θεωρητικού φάσματος θα πρέπει να μειωθεί κατά 5%. Έτσι, το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει:

- Πολλαπλασιασμό του θεωρητικού φθορισμού για κάθε μήκος κύματος από 300-700nm με 0.95.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η σύγκριση του φάσματος του μείγματος της κουρκουμίνης με το θεωρητικό φάσμα:



Διάγραμμα 25: Συγκριτικά τα φάσματα φθορισμού του μείγματος κουρκουμινοειδών και του θεωρητικού μοντέλου

Συμπεράσματα

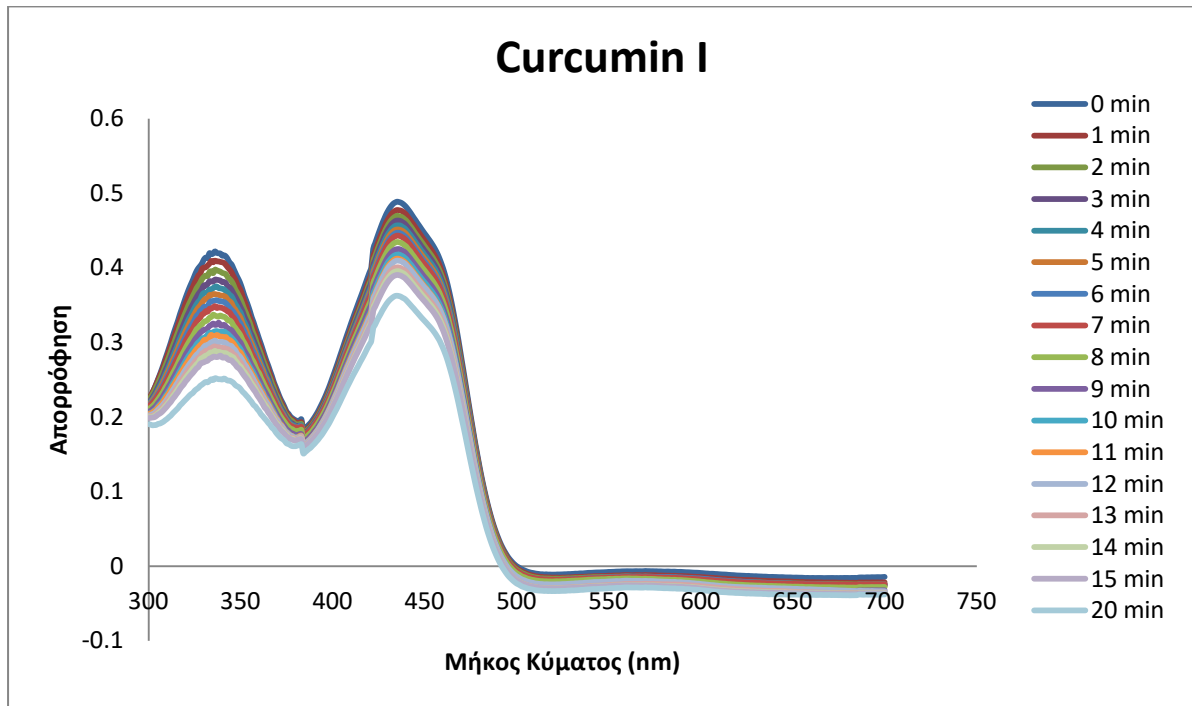
Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι το μαθηματικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε πλησιάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τις τιμές του φάσματος φθορισμού του μείγματος. Η μέγιστη απόκλιση των προσεγγιστικών τιμών από τις πραγματικές είναι 1.1%. Η απόκλιση είναι ελάχιστη και μπορεί να οφείλεται στην άγνωστη ουσία που βρίσκεται σε ποσοστό 5% μέσα στο μείγμα στην περίπτωση παράγει φθορισμό ή σε σφάλμα του οργάνου.

6.2 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών

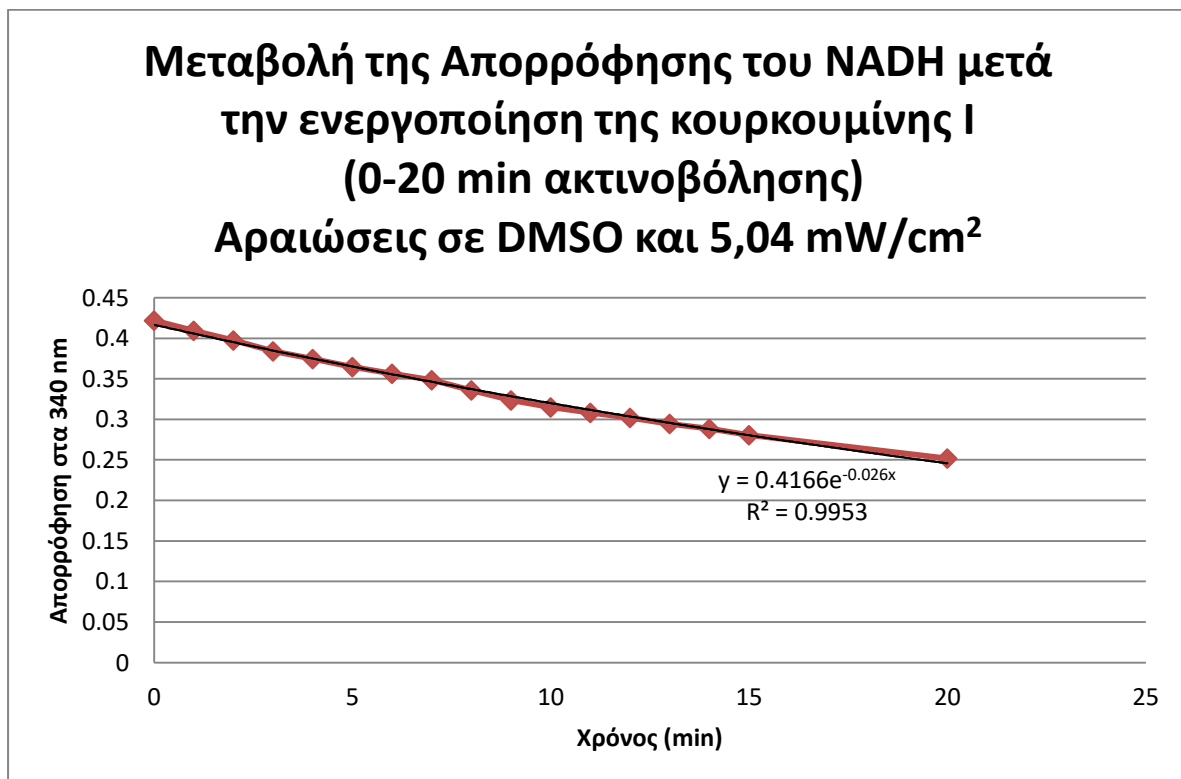
Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τα μείγματα ακτινοβολήθηκαν με ισχύ $5,06\text{mW/cm}^2$ έτσι ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα των ουσιών για παραγωγή ελευθέρων ριζών. Οι ουσίες μελετήθηκαν σε συγκέντρωση $c=10^{-5}$ μέσα στο διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα το τελικό διάλυμα ακτινοβολήσης αποτελούταν από: 69μl NADH συγκέντρωσης $c=100\mu\text{M}$, 17μl EDTA συγκέντρωσης $c=0.1\text{mM}$, 1500μl κουρκουμίνης ($c=10^{-5}\text{M}$ όπως αναφέρθηκε) και 1414 μl DMSO.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης για διάστημα ακτινοβολήσης από 0 έως 20 λεπτά για κάθε ουσία καθώς και η μεταβολή της απορρόφησης κάθε ουσίας για το διάστημα αυτό της ακτινοβολήσης.

Curcumin I

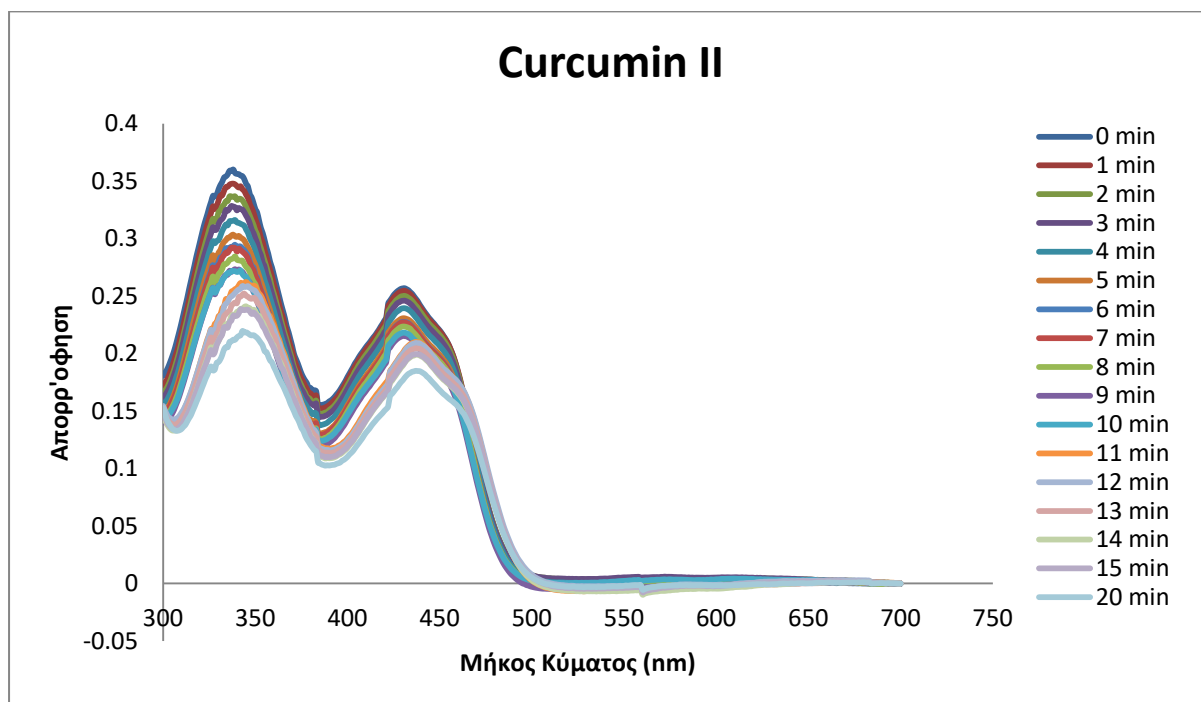


Διάγραμμα 26: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης I και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης από 0-20min

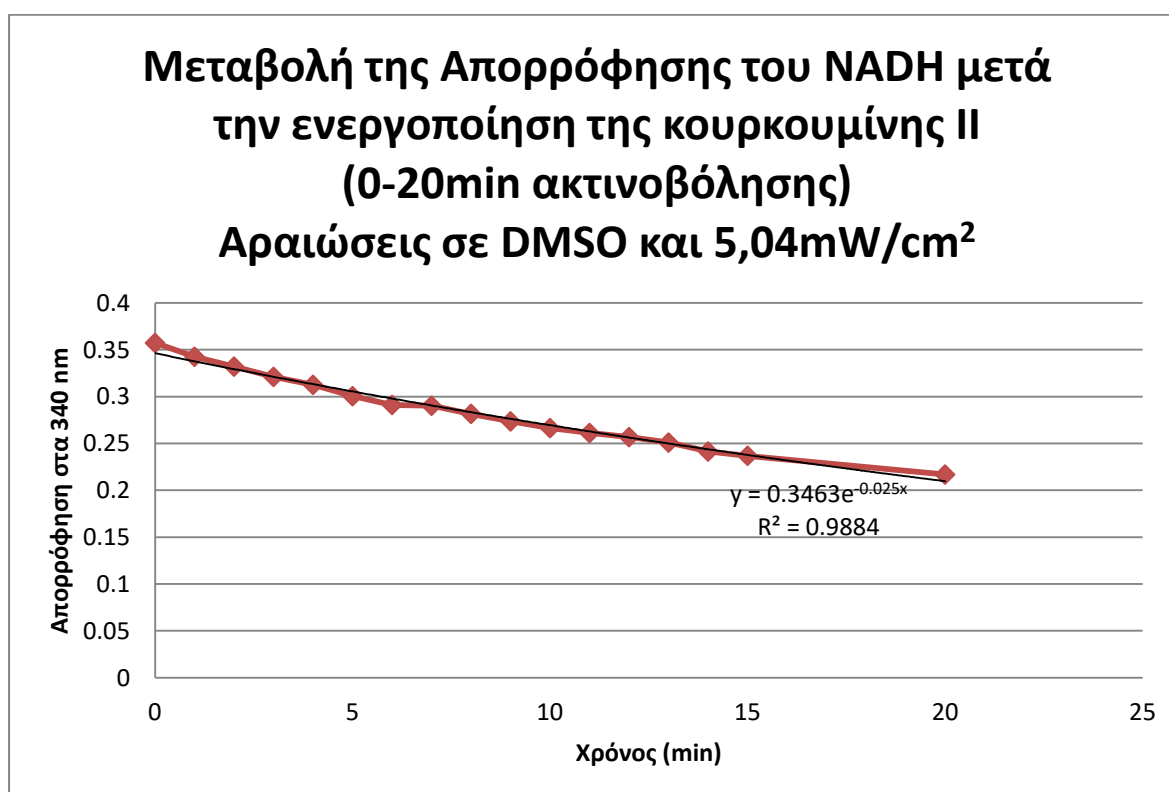


Διάγραμμα 27: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης I για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης

Curcumin II

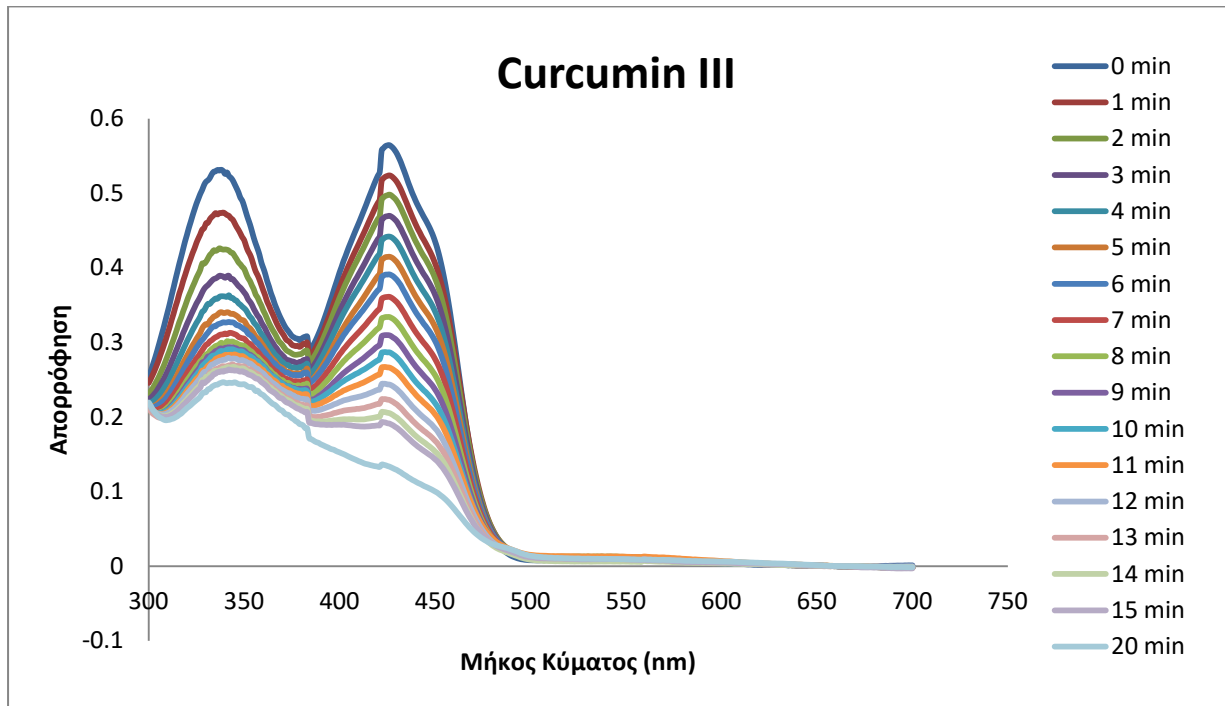


Διάγραμμα 28: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης II και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min

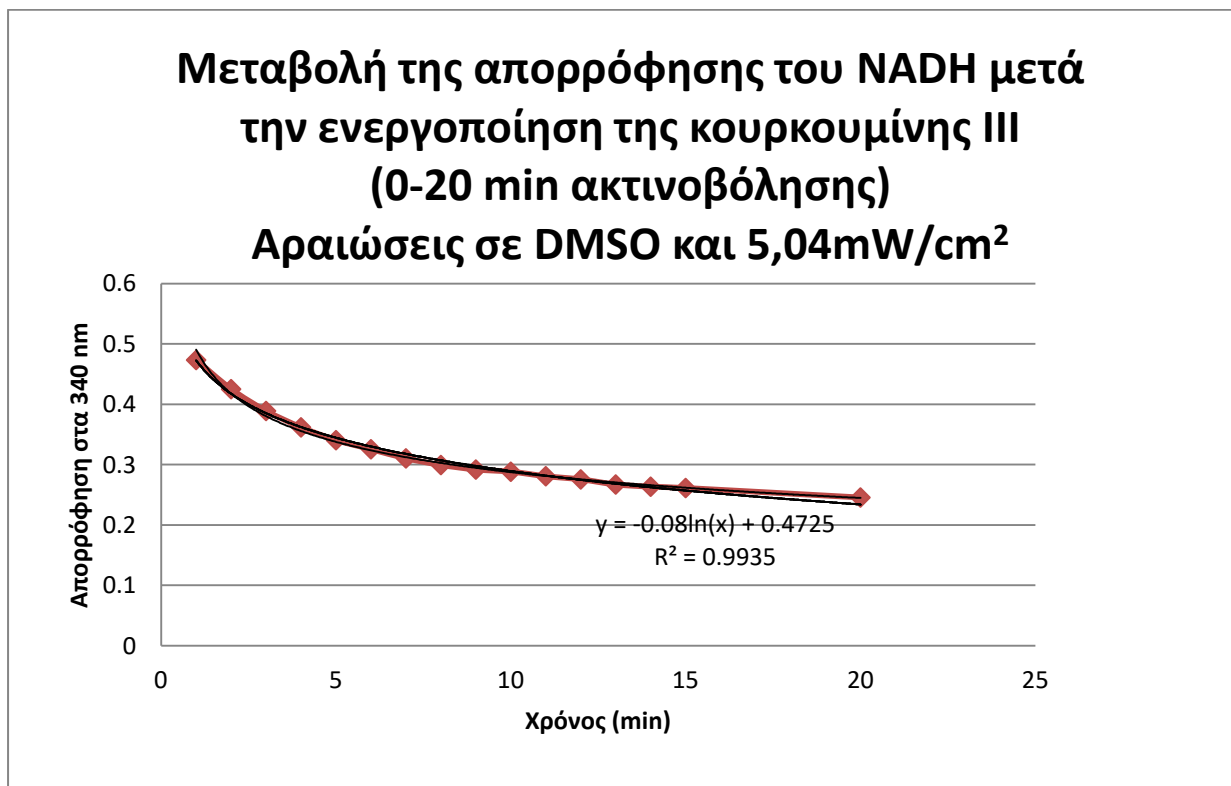


Διάγραμμα 29: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης II για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης

Curcumin III

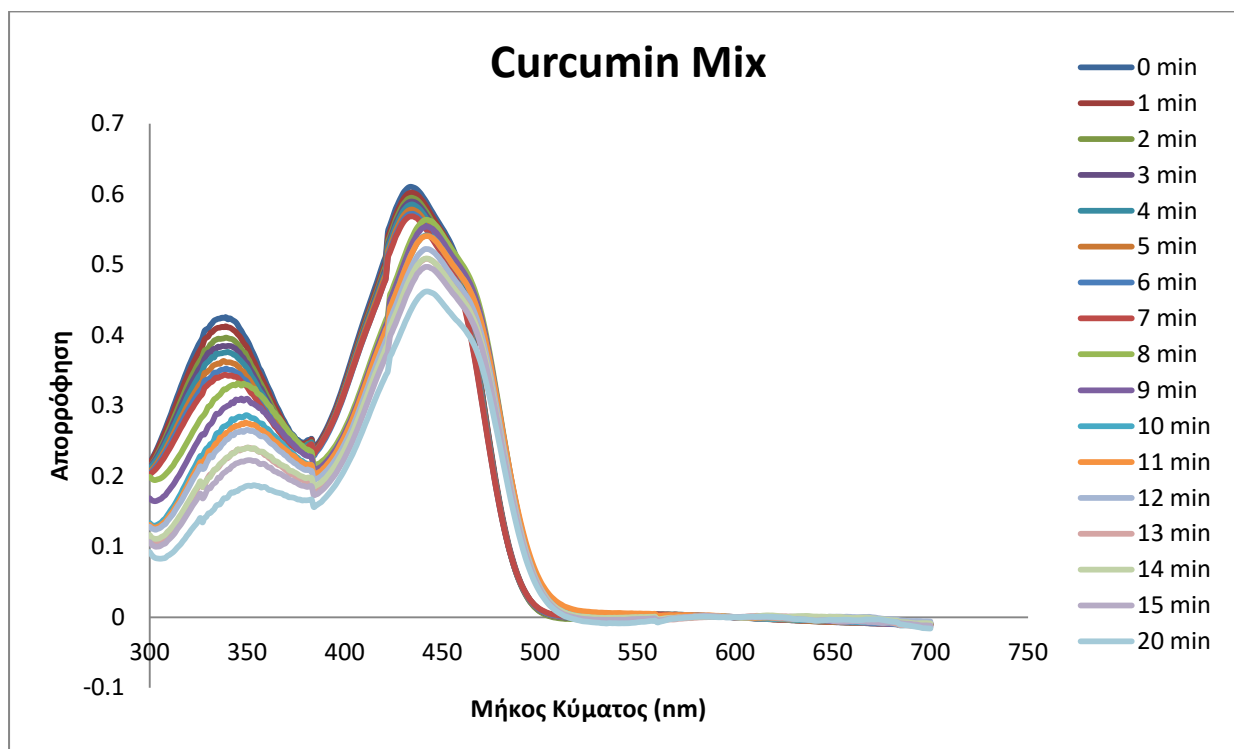


Διάγραμμα 30: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος κουρκουμίνης III και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min

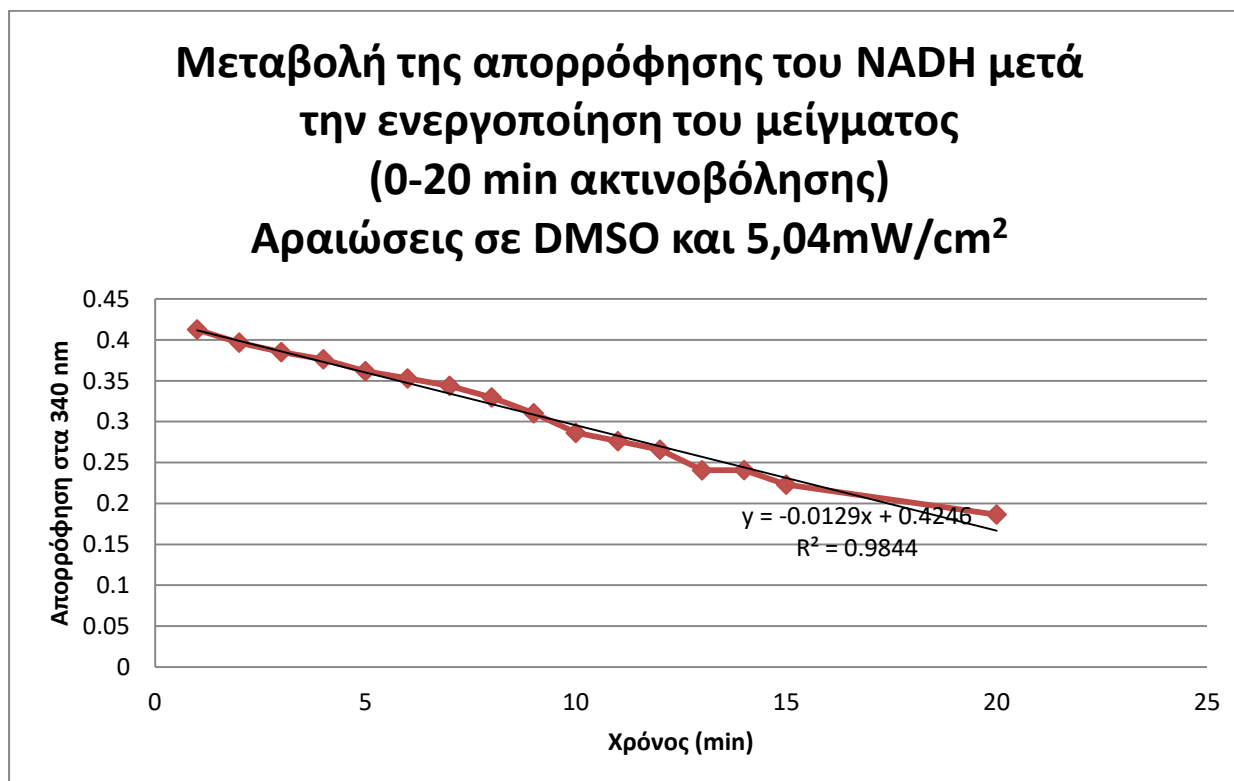


Διάγραμμα 31: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση της κουρκουμίνης III για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης

Curcumin Mix



Διάγραμμα 32: Φάσμα απορρόφησης διαλύματος μείγματος κουρκουμοειδών και NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min

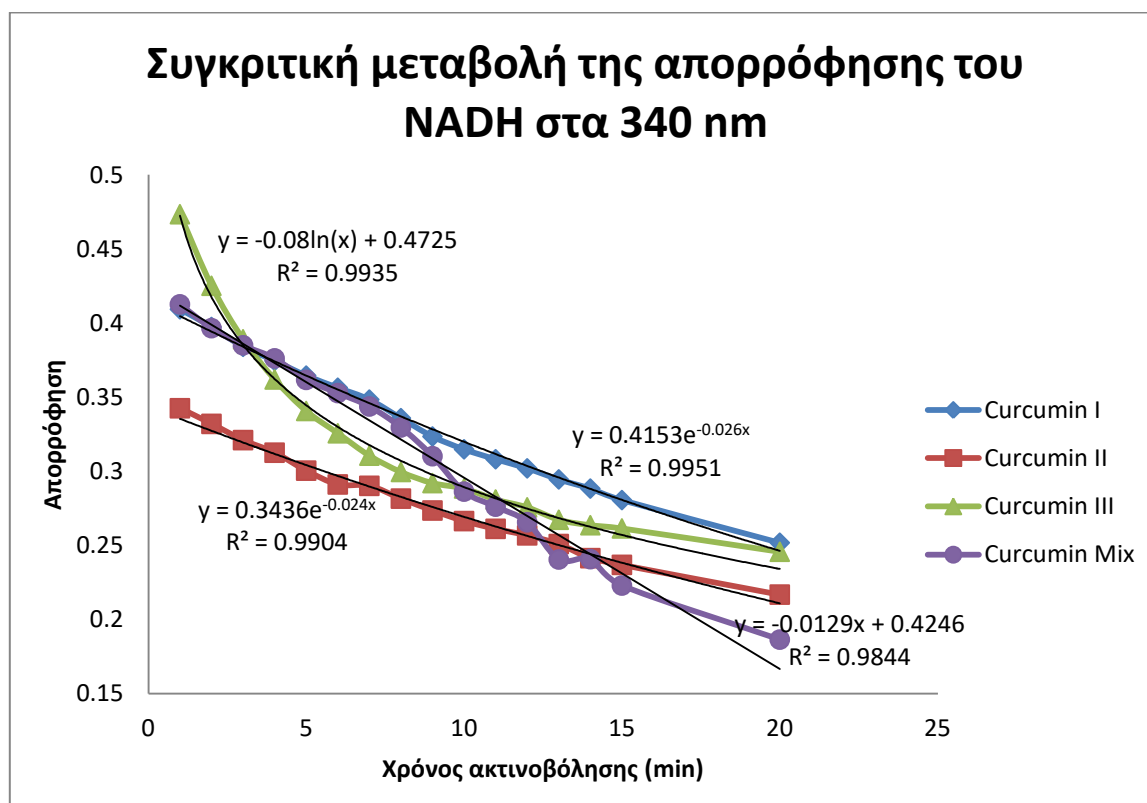


Διάγραμμα 33: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm μετά την ενεργοποίηση του μείγματος για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης

Από τα παραπάνω διαγράμματα (26,28,30,32), παρατηρείται ότι εμφανίζονται δύο κύριες κορυφές. Η πρώτη εμφανίζεται στα 340nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική του NADH, ενώ η δεύτερη εμφανίζεται περίπου στα 440nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική για την απορρόφηση της κάθε ουσίας. Με την πάροδο των λεπτών ακτινοβόλησης φαίνεται πτώση και των δύο κορυφών. Η πτώση της πρώτης κορυφής οφείλεται στην οξείδωση του NADH, ενώ η δεύτερη στην φωτοαπεικοδόμηση της κουρκουμίνης.

Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης του NADH

Στο διάγραμμα 34 παρουσιάζεται η ικανότητα των τεσσάρων κουρκουμινών να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην αρχή της ενότητας η συγκέντρωση των κουρκουμινών στα διαλύματα είναι $c=10^{-5}M$, και όλες οι αραιώσεις από τα μητρικά διαλύματα έγιναν σε DMSO.



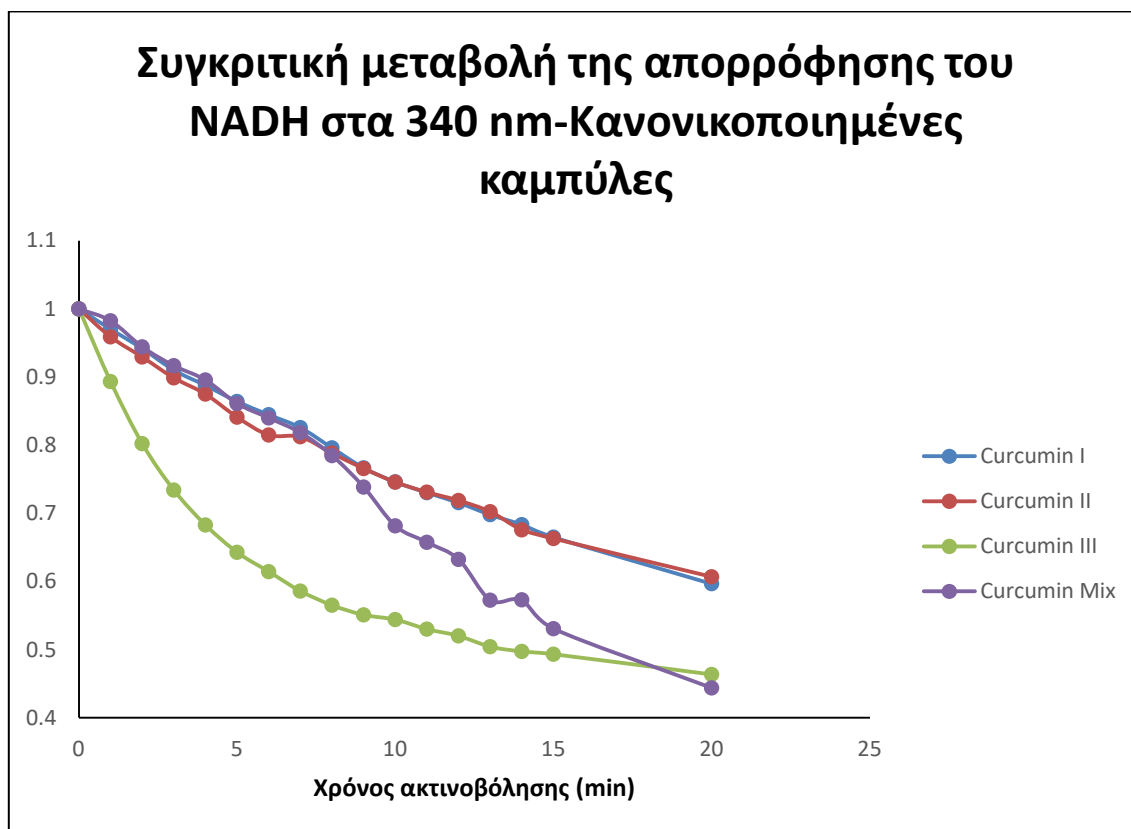
Διάγραμμα 34: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβόλησης για τις ουσίες (Curcumin I, Curcumin II, Curcumin III, Curcumin Mix)

Παρατίθενται οι εξισώσεις που περιγράφουν τη μεταβολή της απορρόφησης του NADH στα 340nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβόλησης, όπως προκύπτουν από το παραπάνω διάγραμμα.:

- Curcumin I: $y=0.4153*e^{-0.0261x}$, $R^2=0.9951$
- Curcumin II: $y=0.3436e^{-0.024x}$, $R^2=0.9904$
- Curcumin III: $y=-0.08\ln(x)+0.4725$, $R^2=0.9935$

→ Curcumin Mix: $y=-0.0129x+0.4246$, $R^2=0.9844$

Για την συγκριτική μελέτη της συμπεριφοράς των ουσιών έγινε κανονικοποίηση των παραπάνω καμπυλών. Στην προκειμένη περίπτωση ενδιαφέρον παρουσιάζει η κλίση της καμπύλης, δηλαδή το πόσο γρήγορα παράγονται οι ελεύθερες ρίζες. Έτσι για να υπάρχει καλύτερη οπτική εικόνα και ευκολία στην εξαγωγή συμπερασμάτων έγινε η απαραίτητη μετατροπή έτσι ώστε όλες οι καμπύλες να έχουν κοινή αρχή όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 35: Συγκριτική μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης για τις ουσίες (Curcumin I, Curcumin II, Curcumin III, Curcumin Mix)-Κανονικοποιημένες Καμπύλες

Παρατηρώντας το διάγραμμα καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Η κουρκουμίνη III εμφανίζει πολύ γρήγορη πτώση της τιμής από τα πρώτα κιόλας λεπτά της ακτινοβολήσης. Το μείγμα παρουσιάζει αρχικά ομαλή πτώση και στη συνέχεια εμφανίζει απότομη μείωση, ενώ οι κουρκουμίνες I και II έχουν μια ομαλή πτώση.
- Η κουρκουμίνη III είναι η καταλληλότερη για χρήση κατά την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας όσον αφορά την παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθώς σε πολύ μικρό χρονικά διάστημα παρουσιάζει μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως φαίνεται από την απότομη πτώση της απορρόφησης του NADH στα 340nm.
- Παρατηρούμε ότι μέχρι τα 8 λεπτά το μείγμα ακολουθεί την πορεία της κουρκουμίνης I και II. Από τα 9 λεπτά και μετά αρχίζει και πέφτει με πιο γρήγορο ρυθμό. Ο πληθυσμός των μορίων κάθε ουσίας αλλάζει συνεχώς αφού οι ουσίες με την πάροδο του χρόνου καταστρέφονται. Έτσι τα ποσοστά των ουσιών στο μείγμα παύουν να ισχύουν μετά την ακτινοβολήση τους. Για το λόγω αυτό από τα 9 λεπτά

και μετά η συμπεριφορά του μείγματος κουρκουμινοειδών αλλάζει και δεν ακολουθεί την συμπεριφορά της κουρκουμίνης I και II.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, παρότι η ικανότητα ενός φωτοευαισθητοποιητή να παράγει ελεύθερες ρίζες είναι πολύ σημαντική, υπάρχουν και άλλοι πολύ σοβαροί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιλογή της σωστής ουσίας. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η χωρική κατανομή του φωτοευαισθητοποιητή στα κύτταρα. Εάν για παράδειγμα υπάρχει ένας φωτοευαισθητοποιητής ο οποίος έχει πολύ καλή ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών αλλά δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα ή συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων τότε αυτός δε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην φωτοδυναμική θεραπεία διότι θεωρείται ακατάλληλος. Στον πυρήνα των κυττάρων βρίσκεται το γενετικό υλικό και έτσι η συσσώρευση της ουσίας εκεί μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις του DNA, μεταλλάξεις, νέα καρκινογένεση κτλ.

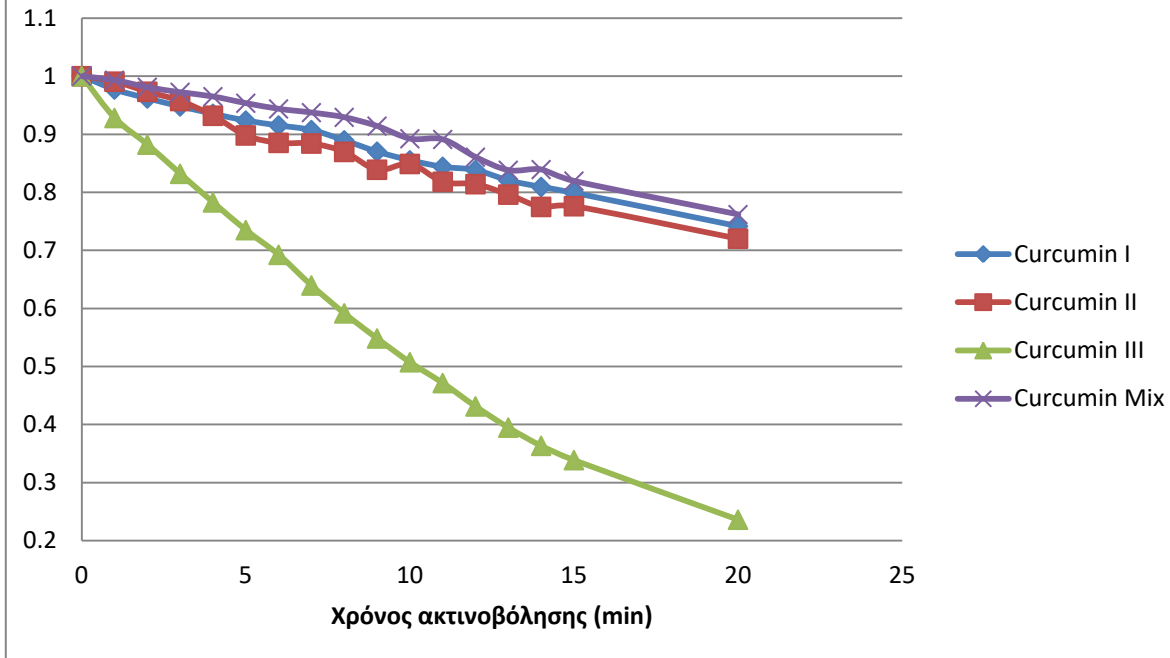
6.3 Φωτολεύκανση του μείγματος κουρκουμινοειδών και των συστατικών του

Για την μελέτη της φωτοκαταστροφής των ουσιών γίνεται χρήση των μετρήσεων που λήφθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούσαν την παραγωγή ελευθέρων ριζών των τεσσάρων ουσιών. Οι μετρήσεις που καταγράφονται αφορούν την απορρόφηση διαλύματος της εκάστοτε κουρκουμίνης παρουσία NADH για διαφορετικούς χρόνους ακτινοβολήσης από 0-20min.

Τα διαγράμματα παρουσιάζουν δύο κύριες κορυφές. Η πρώτη εμφανίζεται στα 340nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική του NADH, ενώ η δεύτερη εμφανίζεται περίπου στα 433-443nm και αντιστοιχεί στην χαρακτηριστική για την απορρόφηση της κάθε ουσίας. Με την πάροδο των λεπτών ακτινοβολήσης φαίνεται πτώση και των δύο κορυφών. Η πτώση της πρώτης κορυφής οφείλεται στην οξείδωση του NADH, ενώ η δεύτερη στην φωτοαπεικοδόμηση της εκάστοτε κουρκουμίνης.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκριτική μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των τεσσάρων ουσιών σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης. Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των ελευθέρων ριζών, η κλίση των καμπυλών είναι αυτή που ενδιαφέρει στην προκειμένη περίπτωση, δηλαδή το πόσο γρήγορα φωτοκαταστρέφεται η κάθε ουσία. Οπότε οι καμπύλες που παρουσιάζονται είναι κανονικοποιημένες έτσι ώστε να έχουν κοινή αρχή και να είναι πιο εύκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων.

Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των κουρκουμινών - Κανονικοποιημένες Καμπύλες (0-20min ακτινοβόλησης)



Διάγραμμα 36: Συγκριτική μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των τεσσάρων ουσιών σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβόλησης

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Οι κουρκουμίνες I, II καθώς και το μείγμα είναι φωτοσταθερές καθώς η πτώση της κορυφής απορρόφησης τους είναι περίπου 25% μετά από 20min ακτινοβόλησης.
- Εμφανίζεται έντονη πτώση της κορυφής απορρόφησης της κουρκουμίνης III γεγονός που σημαίνει ότι παρουσιάζει και μεγαλύτερη φωτοκαταστροφή.

Είναι πολύ σημαντικό στην φωτοδυναμική θεραπεία, στα αρχικά στάδια η ουσία να είναι σταθερή ως προς την ικανότητα της να απορροφά και να εκπέμπει φθορισμό κατά την ακτινοβόληση της. Είναι επίσης σημαντικό να επέλθει φωτοαπεικοδόμηση του φωτοευαισθητοποιητή με την πάροδο του χρόνου, έτσι ώστε να μην υπάρξει μετέπειτα διέγερση και φωτοευαισθησία του οργανισμού του ασθενή. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα η κουρκουμίνη III πληροί αυτές τις προδιαγραφές.

6.4 Χωρικός εντοπισμός της κουρκουμίνης και των συστατικών της σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231)

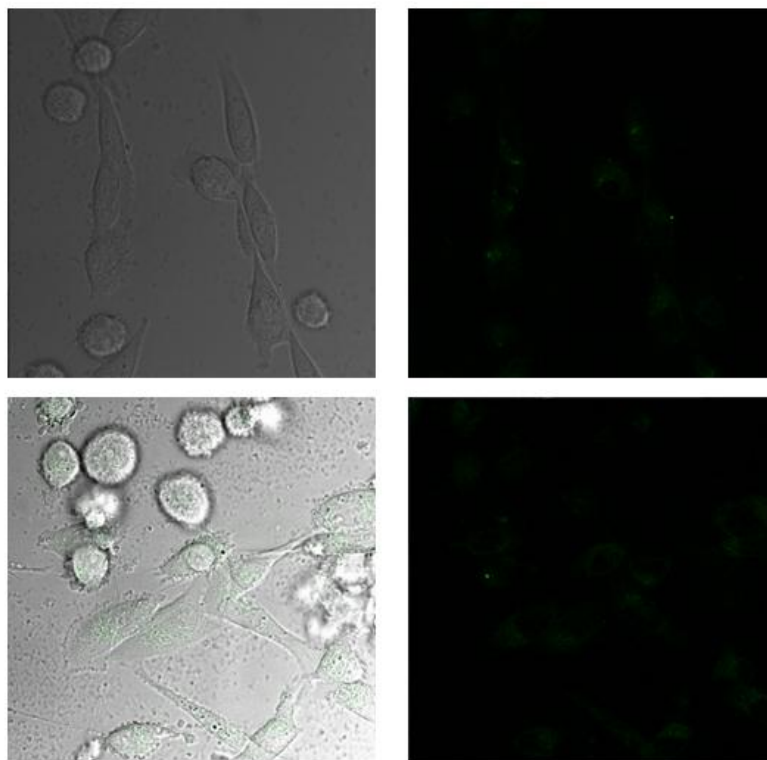
Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται ο χωρικός εντοπισμός του μείγματος της κουρκουμίνης και των τριών συστατικών της, στην καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MDA-MB-231. Όπως

αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η θέση συγκέντρωσης της φωτοευαίσθητης ουσίας στο εσωτερικό του κυττάρου είναι συνυφασμένη με την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συνοπτικά αναφέρεται ότι τα κύτταρα που βρίσκονταν στη φιάσκα χωρίστηκαν σε πέντε τριβλία και εισήχθησαν στον κλίβανο για να επωαστούν 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα διαλύματα κάθε μίας ουσίας εισήχθησαν σε συγκέντρωση 3μM στο πλήρες θρεπτικό μέσο και πραγματοποιήθηκε επώαση μίας ώρας. Τέλος αφού τα κύτταρα πλύθηκαν με 1 ml PBS δύο φορές και εισήχθηκε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου ξεκίνησε η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS-SP5II.

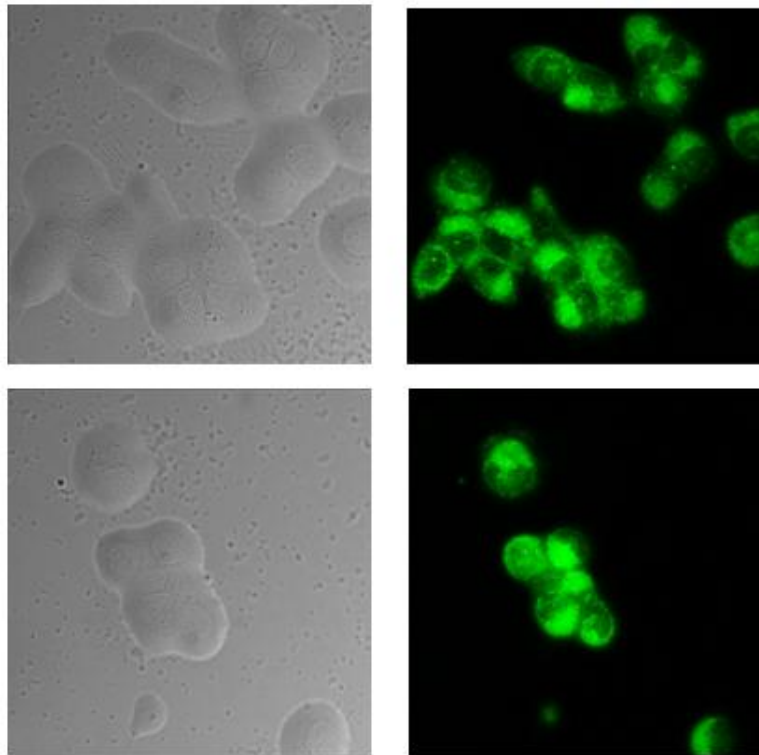
Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο :

Curcumin I



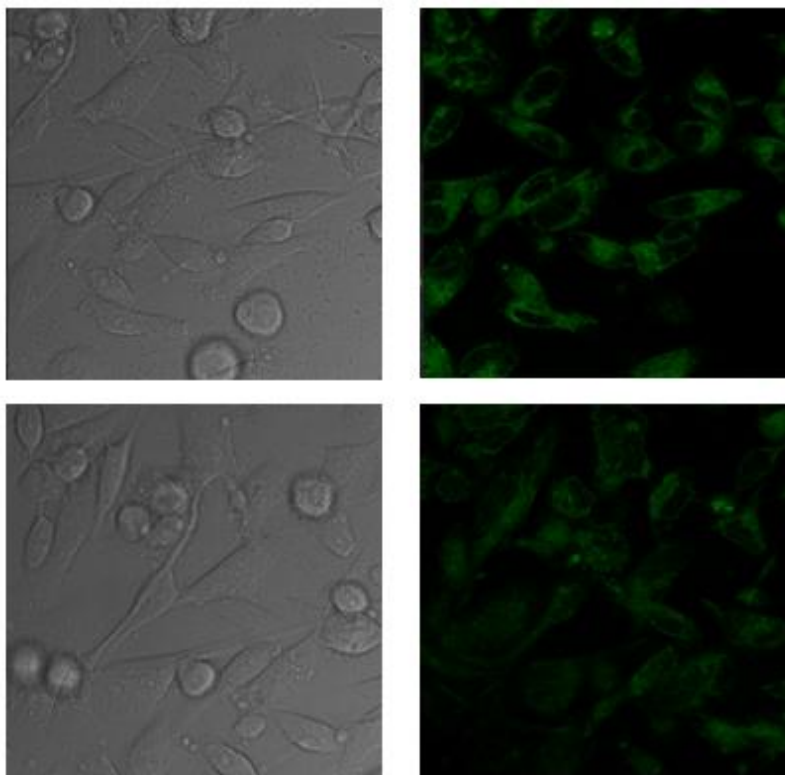
Εικόνα 42:Κουρκουμίνη I-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Curcumin II



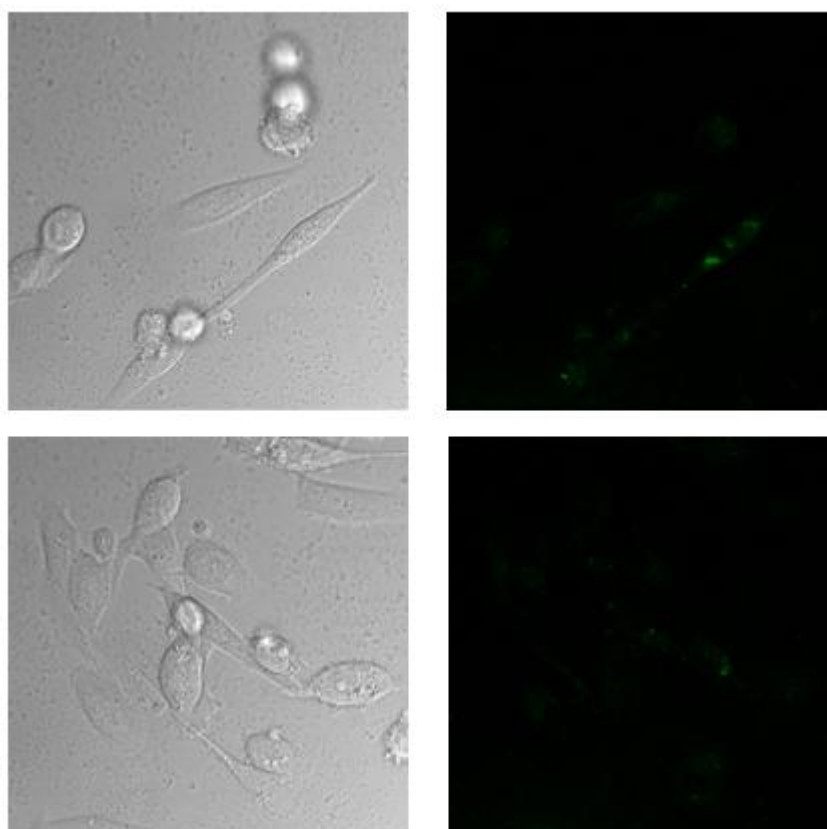
Εικόνα 43: Κουρκουμίνη II-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Curcumin III



Εικόνα 44: Κουρκουμίνη III-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Curcumin Mix



Εικόνα 45: Κουρκουμίνη Mix-Αριστερά οι εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά οι αντίστοιχες από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Παρατηρώντας τις εικόνες που λήφθηκαν, εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Στην περίπτωση της κουρκουμίνης I,III και του μείγματος, παρατηρείται ότι τα κύτταρα είναι σε πολύ καλή φυσιολογική κατάσταση και διατηρούν την ακεραιότητα τους γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι οι ουσίες σε συγκέντρωση 3μΜ δεν είναι τοξικές για τα συγκεκριμένα κύτταρα. Αντίθετα, στην περίπτωση της κουρκουμίνης II παρατηρείται ότι η μορφή των κυττάρων έχει αλλάξει και τα κύτταρα μάλλον είναι σε φάση απόπτωσης. Συμπεραίνεται ότι η ουσία καταστρέφει τα κύτταρα ακόμα και απουσία φωτός σε αυτήν την πολύ μικρή συγκέντρωση.
- Στο χρονικό διάστημα της μίας ώρας παρουσιάζεται ικανοποιητική απορρόφηση των ουσιών από τα κύτταρα. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι η κυτταρική MDA-MB-231 που μελετάται στην παρούσα εργασία αποτελεί μία πολύ επιθετική μορφή καρκίνου του μαστού. Άλλες ουσίες που έχουν μελετηθεί για χρήση τους στην φωτοδυναμική θεραπεία του, χρειάζονταν από μία έως και δύο μέρες μέχρι να εισχωρήσουν στα κύτταρα, γεγονός που μας δείχνει πόσο σημαντική είναι η χρήση της κουρκουμίνης για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

- Στην περίπτωση των κουρκουμινών I,III και του μείγματος της κουρκουμίνης δεν παρατηρείται συσσώρευση των ουσιών στον πυρήνα. Αντιθέτως, αυτές συγκεντρώνονται γύρω από αυτόν. Ο πυρήνας φαίνεται στις παραπάνω εικόνες ως μια σκοτεινή περιοχή στο κέντρο περίπου των κυττάρων. Στην περίπτωση της κουρκουμίνης II παρατηρείται ότι η ουσία έχει εισέλθει στον πυρήνα.
- Το μείγμα κουρκουμινοειδών καθώς και η κουρκουμίνη I παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερες τιμές φθορισμού από τις κουρκουμίνες II και III. Η διαφορά αυτή μάλιστα είναι ακόμα μεγαλύτερη εάν ληφθεί υπόψη ότι στην πρώτη περίπτωση (μείγμα κουρκουμινοειδών, κουρκουμίνη I) η ισχύς του laser που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση των ουσιών ήταν στο 8% ενώ στην δεύτερη περίπτωση μειώθηκε στο 1.2% (κουρκουμίνες II, III).
- Γνωρίζουμε ότι το φάσμα εκπομπής της κουρκουμίνης II είναι μικρότερο σε σχέση με το φάσμα εκπομπής του μείγματος κουρκουμινοειδών και της κουρκουμίνης I. Το γεγονός όμως ότι η κουρκουμίνη II φθορίζει πολύ περισσότερο από ότι οι άλλες δύο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έχει «προλάβει» να εισχωρήσει μεγαλύτερο ποσοστό από αυτήν στα κύτταρα σε σχέση με τις άλλες δύο. Εξάλλου ισχύει ότι η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας.
- Όπως αναφέρθηκε, η κουρκουμίνη III εμφανίζει και αυτή μεγάλο ποσοστό φθορισμού. Το φάσμα εκπομπής της είναι πολύ μεγαλύτερο από το φάσμα των άλλων τριών ουσιών. Επομένως, ο υψηλός φθορισμός που εμφανίζει στα κύτταρα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός αυτό, ή και στο ότι έχει απορροφηθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτά από ότι το μείγμα και η κουρκουμίνη I.

7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της κουρκουμίνης και των συστατικών της

7.1.1 Απορρόφηση σε διάφορες συγκεντρώσεις και διαλύτες

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά την απορρόφηση της κουρκουμίνης και των συστατικών της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, απέδειξαν ικανοποιητική συμπεριφορά των ουσιών αυτών. Και οι τέσσερις ουσίες διατηρούν μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος για κάθε τιμή της συγκέντρωσης. Παρατηρείται, πως για κάθε ουσία η τιμή της απορρόφησης μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με την συγκέντρωση. Τόσο η κουρκουμίνη όσο και τα παράγωγα της παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση για μήκος κύματος από 350nm-480nm. Η μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης εμφανίζεται στο μείγμα ενώ η μικρότερη εμφανίζεται στην κουρκουμίνη II.

Η χρησιμότητα μιας ουσίας για την φωτοδυναμική θεραπεία έχει συνδυαστεί με τη συμπεριφορά αυτής κατά την απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν συμπεραίνεται ότι και οι τέσσερις ουσίες εμφανίζουν αξιόλογη απόκριση, γεγονός που τις καθιστά άξιες περαιτέρω έρευνας. Από την άλλη όμως, εμφανίζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα όσον αφορά την απορρόφηση τους στην περιοχή του ερυθρού (600nm-800nm). Πιο συγκεκριμένα, καμία ουσία από αυτές που μελετήθηκαν δεν απορροφούν στην περιοχή που αναφέρθηκε, γεγονός που σημαίνει ότι δεν θα εμφανίσουν υψηλή αποτελεσματικότητα σε όγκους που βρίσκονται σε βάθος στο ανθρώπινο σώμα, αλλά θα είναι χρήσιμες στην αντιμετώπιση επιφανειακών παθήσεων και όγκων. Φως με μήκος κύματος στην περιοχή 600-800nm εμφανίζει μεγάλη διείσδυση στους ανθρώπινους ιστούς. Επομένως, φωτοευαίσθητοποιητές οι οποίοι διεγείρονται σε αυτή την περιοχή του φάσματος, μπορούν να διεγερθούν ακόμη και αν δεν βρίσκονται στην επιφάνεια και έτσι να αντιμετωπιστούν εν τω βάθει αλλοιώσεις.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε χρήση τόσο οργανικών διαλυτών (DMSO, αιθανόλη (EtOH)) όσο και πολικών (PBS). Παρατηρήθηκε ότι, η κουρκουμίνη και τα συστατικά της διατήρησαν την μορφή του φάσματος απορρόφησης τους στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών ενώ στην περίπτωση του υδατικού μέσου PBS τα φάσματα εμφάνισαν μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της χρήσης του PBS παρουσιάστηκε σημαντική πτώση των τιμών απορρόφησης, χωρίς όμως να παρατηρηθεί ιδιαίτερη μετατόπιση των κορυφών διαγραμμάτων σε διαφορετικές τιμές μήκους κύματος.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνδέονται με τη χημική δομή των ουσιών. Τα μόρια της κουρκουμίνης και των συστατικών της έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικό περιβάλλον, λόγω του ότι είναι υδρόφοβα. Το γεγονός αυτό αποτελεί έναν αρκετά σημαντικό περιορισμό. Τα συσσωματώματα που δημιουργούνται εμποδίζουν την

κυκλοφορία και την απορρόφηση ουσιών από τα κύτταρα. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα θα ήταν ο εγκλεισμός των ουσιών αυτών σε φορείς μεταφοράς, όπως είναι τα νανοσωματίδια στην περίπτωση συστηματικής χορήγησης των ουσιών.

7.1.2 Εκπομπή φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν όσον αφορά την εκπομπή φθορισμού της κουρκουμίνης και των παραγώγων της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, απέδειξαν ικανοποιητική συμπεριφορά των ουσιών αυτών. Και οι τέσσερις ουσίες διατηρούν μια χαρακτηριστική μορφή φάσματος φθορισμού για κάθε τιμή της συγκέντρωσης, όταν ως διέγερση ορίζεται το μέγιστο της απορρόφησης κάθε ουσίας. Παρατηρείται, πως για κάθε ουσία η τιμή του φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με την συγκέντρωση. Όλες οι ουσίες εμφανίζουν σημαντική εκπομπή για μήκος κύματος από 460nm-580nm. Η μεγαλύτερη τιμή φθορισμού εμφανίζεται στην κουρκουμίνη III ενώ η μικρότερη εμφανίζεται στην κουρκουμίνη II. Η τιμή φθορισμού της κουρκουμίνης III είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες και πιο συγκεκριμένα περίπου 5 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές του μείγματος και της κουρκουμίνης I και 9 φορές μεγαλύτερη από τις τιμές της κουρκουμίνης II. Συμπερασματικά, και οι τέσσερις ουσίες παρουσιάζουν ικανοποιητικές τιμές φθορισμού με κατάλληλη διέγερση και έτσι μπορούν να είναι χρήσιμες όχι μόνο κατά την φωτοδυναμική θεραπεία αλλά και κατά την διάγνωση καρκινικών όγκων, όπου ο υψηλός φθορισμός είναι απαραίτητη προϋπόθεση.

7.1.3 Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών

Έπειτα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι ουσίες ως προς την ικανότητα τους για παραγωγή ελευθέρων ριζών εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα. Η μεγαλύτερη παραγωγή παρουσιάζεται στην περίπτωση της κουρκουμίνης III. Η πτώση της τιμής της απορρόφησης που εμφανίζεται στα 340nm και είναι ενδεικτική του σχηματισμού NAD^+ (και επομένως της παραγωγής ελευθέρων ριζών) προσεγγίζεται λογαριθμικά στην περίπτωση της κουρκουμίνης III. Η πτώση αυτή είναι μεγάλη στα πρώτα δέκα λεπτά ακτινοβολήσης ενώ τα επόμενα λεπτά συνεχίζεται με πιο αργό ρυθμό. Ακολουθούν οι κουρκουμίνες I και II, οι οποίες παράγουν λιγότερες ρίζες από ότι η προηγούμενη, των οποίων η πτώση προσεγγίζεται εκθετικά σε σχέση με τον χρόνο ακτινοβολήσης. Όσον αφορά το μείγμα, παρατηρούμε ότι μέχρι τα 8 πρώτα λεπτά ακολουθεί την πορεία της κουρκουμίνης I και II ενώ από τα 9 λεπτά και μετά πέφτει με πιο γρήγορο ρυθμό. Ο πληθυσμός των μορίων κάθε ουσίας αλλάζει συνεχώς αφού οι ουσίες με την πάροδο του χρόνου καταστρέφονται. Έτσι τα ποσοστά των ουσιών στο μείγμα παύουν να ισχύουν μετά την ακτινοβολήση τους. Για το λόγο αυτό από τα 9 λεπτά και μετά η συμπεριφορά του μείγματος αλλάζει και δεν ακολουθεί την συμπεριφορά της κουρκουμίνης I και II (οι οποίες αθροιστικά βρίσκονται σε ποσοστό 97% στο μείγμα).

Η ικανότητα της φωτοευαίσθητης ουσίας να παράγει μονήρες οξυγόνο και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου έπειτα από την ακτινοβολήση της, είναι συνδεδεμένη με την επαγωγή κυτταροτοξικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας. Έτσι, η ικανότητα παραγωγής περισσότερων ελευθέρων ριζών σημαίνει ότι η φωτοδυναμική θεραπεία θα είναι πιο δραστική. Συμπερασματικά, η κουρκουμίνη III αναμένεται να εμφανίσει πιο έντονη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων κατά την φωτοδυναμική θεραπεία.

7.1.4 Φωτολεύκανση του μείγματος κουρκουμοειδών και των συστατικών του

Είναι πολύ σημαντικό στην φωτοδυναμική θεραπεία, στα αρχικά στάδια η ουσία να είναι σταθερή ως προς την ικανότητα της να απορροφά και να εκπέμπει φθορισμό κατά την ακτινοβολήση της. Είναι επίσης σημαντικό να επέλθει φωτοαπεικοδόμηση του φωτοευαίσθητοποιητή με την πάροδο του χρόνου, έτσι ώστε να μην υπάρξει μετέπειτα διέγερση και φωτοευαίσθησία του οργανισμού του ασθενή. Έπειτα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εξάγεται το συμπέρασμα πως η κουρκουμίνη III πληροί αυτές τις προδιαγραφές σε αντίθεση με τις κουρκουμίνες I, II και το μείγμα. Οι τελευταίες είναι φωτοσταθερές αφού η πτώση τους μετά από 20 λεπτά ακτινοβολήσης είναι μόνο 25%.

7.1.5 Χωρικός εντοπισμός της κουρκουμίνης και των παραγώγων της στα κύτταρα MDA-MB-231

Έπειτα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί ο χωρικός εντοπισμός των τεσσάρων ουσιών στα κύτταρα της σειράς MDA-MB-231, καθώς και την λήψη των εικόνων από το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser εξάγονται τα εξής συμπεράσματα: Από ότι φαίνεται η κουρκουμίνη II προκαλεί αλλαγές στη μορφή των κυττάρων, συγκεντρώνεται στον πυρήνα και εμφανίζει τοξικότητα απουσία φωτός. Οι υπόλοιπες ουσίες δεν συσσωρεύονται στον πυρήνα και δεν παρατηρείται καμία επιρροή στην δομή των κυττάρων. Όσον αφορά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ουσιών, μπορούμε να πούμε ότι η κουρκουμίνη II παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή, ενώ η κουρκουμίνη I την χαμηλότερη. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του μείγματος εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη τιμή από ότι εμφανίζει η κουρκουμίνη I. Γενικά, η κουρκουμίνη III παρουσιάζει πολύ ικανοποιητική ένταση φθορισμού, άρα μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση, χωρίς να επηρεάζει τη δομή και τη μορφή του κυττάρου. Παρόλα αυτά όμως θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί το συμπέρασμα αυτό.

7.2 Προτάσεις για το μέλλον

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδείχθηκαν ελπιδοφόρα και επιβεβαίωσαν την σπουδαιότητα της χρήσης της κουρκουμίνης στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Παρ'όλους τους περιορισμούς που προέκυψαν είναι εμφανές ότι αξίζει να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα και μελέτες έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν κάποια από τα υπάρχοντα προβλήματα

και να μπορέσει η φωτοδυναμική θεραπεία να εξελιχθεί και να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος αντιμετώπισης του καρκίνου.

Πιο συγκεκριμένα, πολύ σημαντικές προτάσεις και μελλοντικές προοπτικές είναι:

- Χρήση του μείγματος και των συστατικών του ως φωτοευαίσθητες ουσίες κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας σε κύτταρα.
- Η περαιτέρω διερεύνηση και μελέτη γύρω από την επιλεκτικότητα των συστατικών της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή.
- Η διερεύνηση των δυνατοτήτων των συστατικών της κουρκουμίνης για χρήση τους στη φωτοδυναμική διάγνωση του καρκίνου πέρα από τη φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς παρουσιάστηκαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σε αυτό το κομμάτι.
- Η έρευνα γύρω από την φαρμακοκινητική αποβολή των ουσιών από τον οργανισμό. Είναι γεγονός πως η φωτοευαισθησία είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που εμφανίζει η φωτοδυναμική θεραπεία και για αυτό εμφανίζεται η ανάγκη για άμεση αντιμετώπιση του προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι συνέπειες της στους πάσχοντες ασθενείς.
- Η μελέτη της χρήσης των συστατικών της κουρκουμίνης σε πειραματόζωα προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση των επιμέρους παραμέτρων της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Η μελέτη για πιθανό εγκλεισμό των παραγώγων της κουρκουμίνης σε νανομεταφορείς, και η περαιτέρω διερεύνηση των προοπτικών που θα προκύψουν μέσα από αυτό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhang, Juan, et al. "An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy." *Acta pharmaceutica sinica B* 8.2 (2018): 137-146.
- [2] Daniell, M. D., and J. S. Hill. "A history of photodynamic therapy." *Australian and New Zealand Journal of Surgery* 61.5 (1991): 340-348.
- [3] Allison, Ron R., and Claudio H. Sibata. "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 7.2 (2010): 61-75.
- [4] Oniszczyk, Anna, et al. "The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83 (2016): 912-929.
- [5] Moan, Johan, and Qian Peng. "An outline of the hundred-year history of PDT." *Anticancer research* 23.5A (2003): 3591-3600.
- [6] Δρακάκη, Ελένη. "Μια πολλά υποσχόμενη ιατρική εφαρμογή: «οπτική» βιοψία και φωτοδυναμική θεραπεία στην ογκολογία." *10442/13424* (2013): 00-25.
- [7] Agostinis, Patrizia, et al. "Photodynamic therapy of cancer: an update." *CA: a cancer journal for clinicians* 61.4 (2011): 250-281.
- [8] Castano, Ana P., Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. "Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1.4 (2004): 279-293.
- [9] Hopper, Colin. "Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer." *The lancet oncology* 1.4 (2000): 212-219.
- [10] Εκπαιδευτικό υλικό μαθήματος «Ενόργανη Χημική Ανάλυση ΙΙ», Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- [11] Εργαστηριακός οδηγός άσκησης «Διάγνωση καρκινικών μορφωμάτων σε ιστούς στην περιοχή του μακράν ερυθρού». Εκπαιδευτικό υλικό μαθήματος «Εισαγωγή στην Εμβιομηχανική και Εφαρμοσμένη Βιοφυσική», σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2012
- [12] Κυριαζή Μ. Μελέτη συνδυαστικής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε καρκίνο του δέρματος με χρήση φωτοφυσικών μεθόδων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2007
- [13] Brown, Stanley B., Elizabeth A. Brown, and Ian Walker. "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment." *The lancet oncology* 5.8 (2004): 497-508.
- [14] Arumainayagam, Nimalan, et al. "Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate." *World journal of urology* 28.5 (2010): 571-576.
- [15] Kübler, Alexander C. "Photodynamic therapy." *Medical Laser Application* 20.1 (2005): 37-45.

- [16] Kalka, Katrin, Hans Merk, and Hasan Mukhtar. "Photodynamic therapy in dermatology." *Journal of the American Academy of Dermatology* 42.3 (2000): 389-413.
- [17] Α. Πετρή. Διερεύνηση μηχανισμών συνδυαστικής δράσης φωτός, φωτοευαίσθητων ουσιών & φυσικών αντιοξειδωτικών σε μοντέλα νεοπλασιών με ανάπτυξη οπτικών μεθόδων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013
- [18] Castano, Ana P., Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. "Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1.4 (2004): 279-293.
- [19] Sobolev, Alexander S., David A. Jans, and Andrey A. Rosenkranz. "Targeted intracellular delivery of photosensitizers." *Progress in biophysics and molecular biology* 73.1 (2000): 51-90.
- [20] Katzir, Abraham. *Lasers and optical fibers in medicine*. Elsevier, 2012.
- [21] Agostinis, Patrizia, et al. "Photodynamic therapy of cancer: an update." *CA: a cancer journal for clinicians* 61.4 (2011): 250-281.
- [22] Juzeniene, Asta, Qian Peng, and Johan Moan. "Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis." *Photochemical & Photobiological Sciences* 6.12 (2007): 1234-1245.
- [23] Maier, Alfred, et al. "Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in the treatment of advanced carcinoma of the cardia and the esophagus." *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* 26.3 (2000): 308-315.
- [24] Amalraj, Augustine, et al. "Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives—A review." *Journal of traditional and complementary medicine* 7.2 (2017): 205-233.
- [25] Lee, Wing-Hin, et al. "Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century." *Current neuropharmacology* 11.4 (2013): 338-378.
- [26] Mroz, Pawel, et al. "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer." *Cancers* 3.2 (2011): 2516-2539.
- [27] Κουτσονικολή Αικατερίνη. Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων παραγώγων της κουρκουμίνης για ενδεχόμενη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.
- [28] Calixto, Giovana Maria Fioramonti, et al. "Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review." *Molecules* 21.3 (2016): 342.
- [29] Rui, Lei-Lei, et al. "Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy." *Chinese Chemical Letters* 27.8 (2016): 1412-1420.

- [30] Hong, Eun Ji, Dae Gun Choi, and Min Suk Shim. "Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6.4 (2016): 297-307.
- [31] Sharman, Wesley M., Cynthia M. Allen, and Johan E. Van Lier. "Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications." *Drug discovery today* 4.11 (1999): 507-517.
- [32] Banerjee, S. M., et al. "Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer." *The Breast* 31 (2017): 105-113.
- [33] Allison, Ron R., et al. "Photosensitizers in clinical PDT." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1.1 (2004): 27-42.
- [34] Pandey, R. K., and C. K. Herman. "Shedding some light on tumours." *Chemistry and industry* 18 (1998): 739-43.
- [35] Sternberg, Ethan D., David Dolphin, and Christian Brückner. "Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy." *Tetrahedron* 54.17 (1998): 4151-4202.
- [36] Valeur, Bernard. "Molecular fluorescence." *digital Encyclopedia of Applied Physics* (2003): 477-531.
- [37] Kato, Harubumi, et al. "Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University." *Photodiagnosis and Photodynamic therapy* 1.1 (2004): 49-55.
- [38] DeRosa, Maria C., and Robert J. Crutchley. "Photosensitized singlet oxygen and its applications." *Coordination Chemistry Reviews* 233 (2002): 351-371.
- [39] Lipson, Richard L., Edward J. Baldes, and Arthur M. Olsen. "The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection." *Journal of the National Cancer Institute* 26.1 (1961): 1-11.
- [40] Dougherty, Thomas J. "Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin® II." *Photochemistry and photobiology* 46.5 (1987): 569-573.
- [41] Sandland, Jordon, and Ross W. Boyle. "Photosensitizer Antibody–Drug Conjugates: Past, Present, and Future." *Bioconjugate chemistry* 30.4 (2019): 975-993.
- [42] Kessel, D. "Photodynamic therapy: from the beginning." *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1.1 (2004): 3-7.
- [43] Konan, Yvette Niamien, Robert Gurny, and Eric Allémann. "State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66.2 (2002): 89-106.
- [44] Gupta, Pramod K. "Drug targeting in cancer chemotherapy: a clinical perspective." *Journal of pharmaceutical sciences* 79.11 (1990): 949-962.
- [45] Chatterjee, Dev Kumar, Li Shan Fong, and Yong Zhang. "Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm." *Advanced drug delivery reviews* 60.15 (2008): 1627-1637.

- [46] Sahu, Pramod K., et al. "Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26.4 (2016): 1342-1347.
- [47] Bagchi, Anamika. "Extraction of curcumin." *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 1.3 (2012): 1-16.
- [48] Jayaprakasha, G. K., L. Jagan Mohan Rao, and K. K. Sakariah. "Chemistry and biological activities of *C. longa*." *Trends in Food Science & Technology* 16.12 (2005): 533-548.
- [49] Gupta, Subash C., et al. "Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39.3 (2012): 283-299.
- [50] Anand, Preetha, et al. "Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature." *Biochemical pharmacology* 76.11 (2008): 1590-1611.
- [51] Goel, Ajay, Ajaikumar B. Kunnumakkara, and Bharat B. Aggarwal. "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." *Biochemical pharmacology* 75.4 (2008): 787-809.
- [52] Wang, Ying-Jan, et al. "Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 15.12 (1997): 1867-1876.
- [53] Cañamares, Maria Vega, Jose V. Garcia-Ramos, and Santiago Sanchez-Cortes. "Degradation of curcumin dye in aqueous solution and on Ag nanoparticles studied by ultraviolet-visible absorption and surface-enhanced raman spectroscopy." *Applied spectroscopy* 60.12 (2006): 1386-1391.
- [54] PRICE, LISA C., and R. W. Buescher. "DECOMPOSITION OF TURMERIC CURCUMINOIDS AS AFFECTED BY LIGHT, SOLVENT AND OXYGEN 1." *Journal of food biochemistry* 20.5 (1996): 125-133.
- [55] Cao, Youfu, et al. "Ratiometric singlet oxygen nano-optodes and their use for monitoring photodynamic therapy nanoplatforms." *Photochemistry and photobiology* 81.6 (2005): 1489-1498.
- [56] Desai, Nisarg, et al. "Cytotoxic effects of curcumin at various concentrations and role of curcumin on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes of the rat peripheral blood lymphocytes." (2011): 4933-4933.
- [57] User's Guide: UV WINLAB Software.
- [58] Khopde, Sujata M., et al. "Effect of Solvent on the Excited-state Photophysical Properties of Curcumin." *Photochemistry and photobiology* 72.5 (2000): 625-631.
- [59] Bong, Pil Hun. "Spectral and photophysical behaviors of curcumin and curcuminoids." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 21.1 (2000): 81-86.
- [60] Hart, H., Z. Rappoport, and S. E. Biali. "The Chemistry of Enols." (1990): 1-74.

- [61] Nikolov, G. St, and P. Markov. "Photochemical hydrogen abstraction as a radiationless transition in the photoketonization of β -dicarbonyl compounds." *Journal of Photochemistry* 16.2 (1981): 93-104.
- [62] De Matos, Renata Prandini Adum, et al. "Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines." *BioMed research international* 2018 (2018).
- [63] Araújo, Natália Costa, et al. "Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer." *Photomedicine and laser surgery* 35.5 (2017): 259-263.
- [64] Sonavane, Kunal, et al. "Topical curcumin-based cream is equivalent to dietary curcumin in a skin cancer model." *Journal of skin cancer* 2012 (2012).