

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**Τομέας (I) Χημικών Επιστημών**



**Σύνθεση, φωτοφυσικές μελέτες και επίδραση φωτοευαίσθητων  
παραγώγων κουρκουμίνης και συμπλόκων τους με βόριο σε  
καρκινικά κύτταρα προστάτη**

Διπλωματική εργασία

**Αρφαρά Μαρία**

Επιβλέπων

Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα 2020



## Ευχαριστίες

Η πειραματική μελέτη της παρούσας διπλωματικής εργασίας εκπονήθηκε σε δυο διαφορετικά εργαστήρια. Ένα μέρος της εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών και ένα μεγάλο μέρος της πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του ΕΜΠ, Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο, υπό την επίβλεψη του οποίου εκπονήθηκε η συγκεκριμένη διπλωματική, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Η βοήθειά του και οι συμβουλές του αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Βιοεφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της οποίας εκπονήθηκε η πειραματική μελέτη της σύνθεσης και βιολογικής αξιολόγησης των ενώσεων που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική. Την ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που αφιέρωσε, τη στήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών μελετών.

Ευχαριστώ πολύ τη Βαρβάρα Μαυροειδή, την Αγγελική Παναγιωτοπούλου και τον Μιχάλη Ζαχαριάδη, μέλη του Εργαστηρίου Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR), του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», χωρίς τη βοήθεια και τις γνώσεις των οποίων δεν θα μπορούσε να γίνει ο χαρακτηρισμός και η βιολογική αξιολόγηση των ενώσεων που συντέθηκαν.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, την Ελένη Αλεξανδράτου, Ε.ΔΙ.Π του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής στη Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών ΕΜΠ, για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή της μελέτης των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των ενώσεων που συντέθηκαν, για το χρόνο που αφιέρωσε και την επιμονή που έδειξε ώστε να ολοκληρωθεί η διπλωματική εργασία.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Αναστασία Δέτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στη Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ και Κωνσταντίνο Χαριτίδη, Καθηγητή στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, για το χρόνο που αφιέρωσαν για την κριτική μελέτη της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου, τα αδέρφια μου, τους φίλους μου και ιδιαίτερα τον Τάσο, που πίστευαν πάντα σε εμένα, για τη στήριξη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια, την παρότρυνση να συνεχίζω και να ολοκληρώνω κάθε μου προσπάθεια.

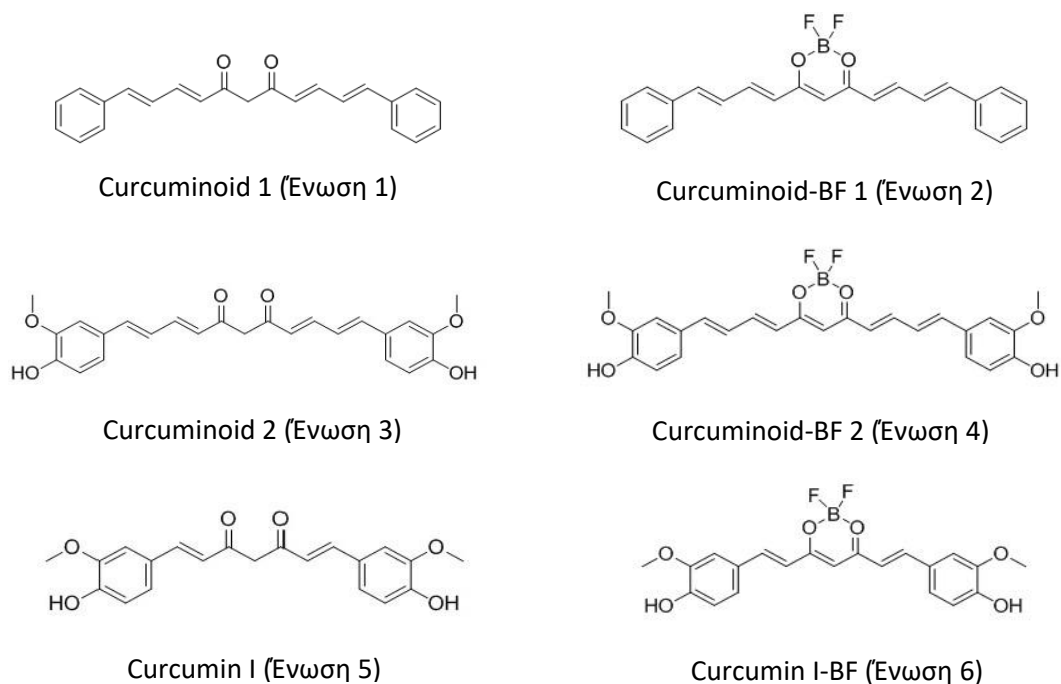
## Περίληψη

Οι ενώσεις που προέρχονται από φυσικά προϊόντα αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία που μελετάται από την ερευνητική κοινότητα, με σκοπό τη βελτίωση μεθόδων για διάγνωση και θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Οι κουρκουμίνες (curcumin I, II και III) και τα παράγωγά τους (curcuminoïds) αποτελούν μια τέτοια κατηγορία με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν, εκ των οποίων ξεχωρίζουν η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιβακτηριδιακή και αντικαρκινική τους δράση, αλλά και η δράση τους απέναντι σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Όσον αφορά την αντικαρκινική δράση, που μελετάται και στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής, πολλά παράγωγα των κουρκουμινών έχουν μελετηθεί για την επίδρασή τους σε καρκινικά κύτταρα τόσο απουσία φωτός, όσο και παρουσία φωτός ως φωτοευαίσθητοποιητές, στη φωτοδυναμική θεραπεία. Έχουν δηλαδή τη δυνατότητα μετά από ακτινοβολή τους σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, να επάγουν κυτταροτοξική δράση με τη σύνθεση δραστικών μορφών οξυγόνου.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζεται στη σύνθεση έξι κουρκουμινοειδών, τη συγκριτική μελέτη των φωτοφυσικών τους ιδιοτήτων και την *in vitro* βιολογική τους δράση σε καρκινικά κύτταρα προστάτη της σειράς PC3, απουσία φωτός.

Αρχικά, λαμβάνοντας υπόψιν τις μελέτες που υπάρχουν σχετικά με τη δράση των παραγώγων της κουρκουμίνης, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν έξι κουρκουμινοειδή (Εικόνα 1), εκ των οποίων οι τρεις ενώσεις ήταν η κουρκουμίνη I (ένωση 5) και δύο παρεμφερείς με αυτήν ενώσεις (ένωση 1 και ένωση 3).



Εικόνα 1: Χημική δομή παραγώγων κουρκουμίνης.

Οι δομικές αλλαγές στο μόριο της κουρκουμίνης I περιλαμβάνουν την ύπαρξη δυο επιπλέον διπλών δεσμών, με τη μία ένωση να μην διατηρεί την υποκατάσταση στα φαινύλια (ένωση 1), ενώ η υποκατάσταση αυτή υπάρχει στη δεύτερη ένωση (ένωση 3).

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τρία υβριδικά μόρια των ενώσεων αυτών, έπειτα από την αντίδραση καθεμιάς από αυτές τις ενώσεις με τριφθοριούχο βόριο (ενώσεις 2, 4 και 6). Η απόδοση και για τις έξι ενώσεις ήταν ικανοποιητική. Τέλος, οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Δρ. Μαρίνας Σαγνού, Ερευνήτριας στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Βιοεφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

Οι έξι ενώσεις που συντέθηκαν, μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες. Πραγματοποιήθηκαν, δηλαδή, για κάθε ένωση φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε τρεις διαλύτες (DCM, DMSO και PBS) και φασματοσκοπικές μελέτες εκπομπής φθορισμού για διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO. Από τις μελέτες αυτές, προσδιορίστηκε το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και μέγιστης εκπομπής για την κάθε ένωση καθώς και ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης. Από τη συγκριτική μελέτη των έξι ενώσεων προέκυψε ότι η προσθήκη ενός επιπλέον διπλού δεσμού, σε συνδυασμό με τη συμπλοκοποίηση, μπορεί να μετατοπίσει κατά πολύ το φάσμα απορρόφησης σε σχέση με τα μη συμπλοκοποιημένα παράγωγα, ενώ στη μελέτη φθορισμού οι περισσότερες ενώσεις, με εξαίρεση την ένωση 4, έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα, με τις ενώσεις 1 και 2 να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες εντάσεις.

Έπειτα, εξετάστηκε η επίδραση των κουρκουμινοειδών στην καρκινική σειρά PC3, αν δηλαδή καθίστανται τοξικές για τα καρκινικά κύτταρα, σε συνθήκες απουσίας φωτός. Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ακολουθήθηκε η μέθοδος MTT, από όπου προέκυψε ότι τα υπό μελέτη κουρκουμινοειδή αποτελούν αρκετά τοξικές ενώσεις για τη συγκεκριμένη καρκινική σειρά, και οι δομικές αλλαγές που έγιναν στο μόριο της κουρκουμίνης I, και κυρίως η προσθήκη του βορίου, ενίσχυσαν την κυτταροτοξικότητα.

Ακολούθησε η μέθοδος κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism, CD), για να προσδιοριστεί αν οι ενώσεις αλληλεπιδρούν με το DNA και επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, τα φάσματα CD δεν εμφάνισαν κάποια αλληλεπίδραση των ενώσεων με το DNA, οπότε χρειάζονται να γίνουν περαιτέρω μελέτες, ώστε να προσδιοριστεί ποια ακριβώς είναι η αιτία που επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος.

Το τελικό κομμάτι της πειραματικής μελέτης περιλαμβάνει τον χωρικό εντοπισμό των κουρκουμινοειδών μέσα στα καρκινικά κύτταρα, που έγινε με τη χρήση Συνεσττικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (confocal laser scanning microscopy). Από τη μελέτη αυτή φαίνεται ότι οι πέντε ενώσεις συγκεντρώνονται σε κυστίδια και κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ η μία ένωση, το σύμπλοκο της κουρκουμίνης I με βόριο φαίνεται να συγκεντρώνεται στον πυρήνα των κυττάρων.

**Λέξεις κλειδιά:** Κουρκουμίνη, Κουρκουμινοειδή, Σύμπλοκα με βόριο, υβριδικά μόρια, Φωτοφυσικές μελέτες, Κυτταροτοξικότητα, Αντικαρκινική δράση

## Abstract

Compounds derived from natural products are studied actively by the research community, with the aim to improve existing methods regarding diagnosis and treatment of various diseases. In particular, curcumins (curcumin I, II and III) and their derivatives (curcuminoids) present very promising results, due to their various biological actions, which make them excel in antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anti-cancer activity, along with their activity against neurodegenerative diseases.

Specifically, regarding anti-cancer effects, which is the scope of the present study, many curcumin derivatives have been examined for their effect on cancer cells both in the absence of light and in the presence of light as photosensitizers in photodynamic therapy. In particular, they have the ability to induce cytotoxic activity by synthesizing active forms of oxygen, after being irradiated at a certain wavelength.

This study focuses on synthesis of six curcuminoids, the comparative study of their photophysical properties and their in vitro biological activity on prostate cancer cell-line PC3, in the absence of light.

Initially, considering many research studies regarding curcumin derivatives' properties, six curcuminoids were designed and synthesized, three of which were curcumin I (compound 5) and two derivatives (compound 1 and compound 3). Structural changes in curcumin I molecule consist of the presence of two additional double bonds, with one compound not maintaining the substitution in the phenyl (compound 1), while this substitution exists in the second one (compound 3).

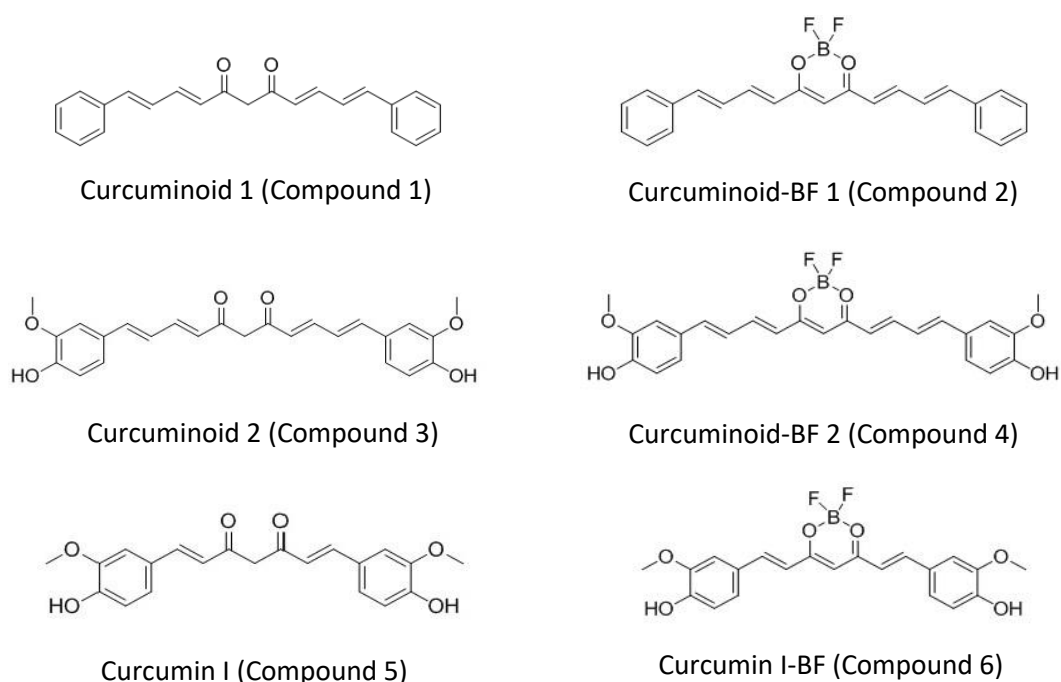


Figure 1: Chemical Structure of Curcumin derivatives.

Subsequently, three hybrid molecules of the above compounds were prepared after the reaction each them with trifluoride boron (compounds 2, 4, and 6). The yield for all six compounds was satisfactory. Finally, the compounds were identified using nuclear magnetic resonance (NMR). The design and composition of the compounds were carried out under the supervision and guidance of Dr. Marina Sagnou, Researcher at the Institute of Biosciences & Bio-Applications, of the National Research Center of Scientific Sciences "Democritus".

The six compounds were studied for their photophysical properties. Spectroscopic absorption studies were performed for each compound in different concentrations in three solvents (DCM, DMSO and PBS) as well as spectroscopic fluorescence emission studies for different concentrations in DMSO solvent. From these studies, the wavelength of maximum absorption and maximum emission for each compound and the molecular absorption coefficient were determined. The comparative study of the six compounds revealed that the addition of an additional double bond in combination with the complex can greatly displace the absorption spectrum compared to the non-complex derivatives. Also, the fluorescence study gave very good results for most compounds, with the exception of compound 4, with highest intensities in compounds 1 and 2.

The effect of curcuminoids on the PC3 cancer series was then examined to observe whether they become toxic to cancer cells in the absence of light. Regarding the cytotoxicity study, the MTT method was implemented, from which it emerged that the curcuminoids under study are quite toxic compounds for this particular cancer series, so the structural changes made to the curcumin I molecule, and especially the addition of BF, enhanced cytotoxicity.

The research continued using the Circular Dichroism (CD) method to determine whether or not the compounds interact with DNA and cause cell death. However, CD spectra did not show any interaction between the compounds and DNA, so further studies are needed to determine the exact cause of cell death.

The final part of the experimental study includes the spatial detection of curcuminoids in cancer cells, which was performed using the Confocal laser scanning microscopy. This final study shows that the five compounds are concentrated in vesicles and primarily in the cell cytoplasm, while in one compound, the curcumin I complex with BF, appears to be concentrated in the cell nucleus.

**Keywords:** Curcumin, Curcuminoids, Boron complexes, Hybrid molecules, Photophysical studies, Cytotoxicity, Anti-cancer activity



## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	3
Περίληψη .....	4
Abstract.....	7
<b>A. Θεωρητικό μέρος.....</b>	<b>12</b>
A.1. Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Ενώσεων .....	12
A.2. Ο Καρκίνος.....	13
A.3. Φωτοδυναμική θεραπεία.....	15
A.4. Φωτοευαισθητοποιητές.....	16
A.5. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας .....	17
A.6. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου .....	18
A.6.1. Νέκρωση .....	18
A.6.2. Απόπτωση.....	18
A.6.3. Αυτοφαγία .....	19
A.7. Κουρκουμίνη και κουρκουμινοειδή .....	21
A.7.1. Αντικαρκινική δράση κουρκουμίνης .....	22
A.7.2. Κουρκουμίνη και καρκίνος του προστάτη.....	24
A.7.3. Βιοδιαθεσιμότητα κουρκουμίνης στον ανθρώπινο οργανισμό.....	25
A.7.4. Δομικά χαρακτηριστικά κουρκουμίνης .....	26
A.7.5. Σχέση δομής – δράσης κουρκουμίνης.....	27
A.7.6. Ανάπτυξη παραγώγων κουρκουμίνης.....	28
A.7.7. Η κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής .....	29
<b>B. Πειραματικό μέρος .....</b>	<b>31</b>
B.1. Σκοπός πειραματικής μελέτης.....	31
B.2. Σύνθεση κουρκουμινοειδών.....	34
B.2.1. Πειραματικές Διατάξεις .....	34
Σύνθεση.....	34
Διαχωρισμός – Απομόνωση τελικού προϊόντος .....	35
Ταυτοποίηση.....	36
B.2.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα.....	40
Σύνθεση κουρκουμινοειδών χωρίς συμπλοκοποίηση .....	40
Σύνθεση κουρκουμινοειδών με συμπλοκοποίηση BF.....	43
Ταυτοποίηση ενώσεων με τη μέθοδο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	44
B.3. Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινοειδών .....	45
B.3.1. Πειραματικές Διατάξεις .....	45
Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης.....	45
Φασματόμετρο εκπομπής .....	47

B.3.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα.....	49
Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για τρεις διαλύτες .....	49
Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού των έξι ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO .....	51
B.4. Βιολογική Αξιολόγηση .....	54
B.4.1. Πειραματικές διατάξεις .....	54
Διαχείριση κυτταροκαλλιέργειών.....	54
Συνεστακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser .....	54
Πολωσίμετρο .....	56
B.4.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα.....	58
Κυτταρικές καλλιέργειες.....	58
Μελέτη κυτταροτοξικότητας .....	62
Ενδοκυττάριος Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμινοειδών στα κύτταρα της σειράς PC3 ...	65
Κυκλικός Διχρωισμός (Circular Dichroism, CD).....	68
<b>Γ. Αποτελέσματα – Συζήτηση .....</b>	<b>73</b>
Γ.1. Συνθετική πορεία κουρκουμινοειδών .....	73
Γ.1.1. Σύνθεση ένωσης 1.....	73
Μέθοδος Α για την παρασκευή της ένωσης 1.....	73
Μέθοδος Β για την παρασκευή της ένωσης 1.....	74
Γ.1.2. Σύνθεση ένωσης 2.....	75
Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 2 .....	75
Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 2.....	75
Γ.1.3. Σύνθεση ένωσης 3.....	76
Μέθοδος Α για την παρασκευή της ένωσης 3.....	76
Μέθοδος Β για την παρασκευή της ένωσης 3.....	76
Γ.1.4. Σύνθεση ένωσης 4.....	78
Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 4 .....	78
Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 4.....	78
Γ.1.5. Σύνθεση ένωσης 5.....	79
Μέθοδος Α για την παρασκευή κουρκουμίνης Ι.....	79
Μέθοδος Β για την παρασκευή κουρκουμίνης Ι.....	80
Γ.1.6. Σύνθεση ένωσης 6.....	81
Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 6 .....	81
Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 6.....	82
Γ.2. Ταυτοποίηση ενώσεων .....	83
Γ.2.1. Ταυτοποίηση ένωσης 1.....	83
Γ.2.2. Ταυτοποίηση ένωσης 2.....	84

Γ.2.3. Ταυτοποίηση ένωσης 3 .....	85
Γ.2.4. Ταυτοποίηση ένωσης 4 .....	86
Γ.2.5. Ταυτοποίηση ένωσης 5 .....	87
Γ.2.6. Ταυτοποίηση ένωσης 6 .....	88
Γ.3. Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινοειδών .....	89
Γ.3.1. Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης .....	89
Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε DMSO .....	89
Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων στην ίδια συγκέντρωση σε DCM .....	101
Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων στην ίδια συγκέντρωση σε PBS .....	103
Γ.3.2. Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού .....	104
Φασματοσκοπική μέτρηση φθορισμού όλων των ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO .....	104
Συγκριτική μελέτη των φασμάτων εκπομπής .....	111
Γ.4. Βιολογική αξιολόγηση .....	113
Γ.4.1. Δοκιμασία MTT .....	113
Γ.4.2. Χωρικός εντοπισμός .....	116
Επώαση των κυττάρων με την κάθε ένωση για 1 ώρα .....	117
Επώαση των κυττάρων με την κάθε ένωση για 6 ώρες .....	124
Γ.4.3. Κυκλικός διχρωισμός .....	131
<b>Δ. Συμπεράσματα .....</b>	<b>135</b>
<b>Ε. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα .....</b>	<b>139</b>
<b>Ευρετήριο εικόνων .....</b>	<b>140</b>
<b>Ευρετήριο διαγραμμάτων .....</b>	<b>142</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>144</b>

## A. Θεωρητικό μέρος

### A.1. Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Ενώσεων

Μέχρι τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, οι ουσίες που χρησιμοποιούνταν για φάρμακα ήταν κυρίως φυτικής προέλευσης. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα άρχισε η προσπάθεια για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των δραστικών συστατικών των φυτικών φαρμάκων, καθώς και τη σύνθεσή τους στο χημικό εργαστήριο. Η δομική ποικιλομορφία των φυσικών προϊόντων έδωσε τη δυνατότητα σύνθεσης χημικών ενώσεων εντός του εργαστηρίου.

Ακόμα και σήμερα τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται συχνά ως σημεία εκκίνησης για την ανακάλυψη φαρμάκων, ακολουθούν συνθετικές τροποποιήσεις που συμβάλλουν στη μείωση των παρενεργειών και στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας, ενώ πολλές θεραπευτικές ουσίες εξακολουθούν να απομονώνονται από φυτικά εκχυλίσματα, όπως η μορφίνη, η διγοξίνη, κ.α. Η σύγχρονη έρευνα προσανατολίζεται στη σύνθεση ουσιών που αποτελούν τροποποιήσεις μιας ήδη γνωστής φαρμακευτικής ένωσης, με σκοπό να βελτιωθούν οι υπάρχουσες φυσικοχημικές της ιδιότητες. Παράλληλα, αναπτύσσεται και σε νέες ενώσεις που δεν έχουν αξιοποιηθεί στο παρελθόν για θεραπευτικούς σκοπούς που όμως βάσει θεωρητικών προτύπων, ενδέχεται να αποτελέσουν την βάση για νέα φάρμακα [1][2].

Αυτή η διαδικασία βοήθησε στην κατανόηση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού και στη διασαφήνιση του μηχανισμού μιας ασθένειας. Ταυτόχρονα, η ίδια η ανάπτυξη διαφόρων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας ασθενειών δείχνει τον προσανατολισμό στην αναζήτηση ενώσεων με συγκεκριμένες ιδιότητες, ανάλογα με τις ανάγκες ανάπτυξης της κάθε μεθόδου. Η πορεία ανάπτυξης φαρμακευτικών ενώσεων περιλαμβάνει το σχεδιασμό, τη σύνθεση και την αξιολόγηση τους. Αρχικά προσδιορίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά της ένωσης και εντοπίζεται ο βιολογικός στόχος που εικάζεται ότι η ένωση ή μια παρεμφερής με αυτήν μπορεί να επέμβει δραστικά.

Ορισμένες σημαντικές ιδιότητες που επιδιώκεται να έχουν είναι να είναι βιοσυμβατές με τον οργανισμό, να έχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και να είναι σταθερές σε φυσιολογικές συνθήκες. Χρειάζεται να συσσωρεύονται επιλεκτικά σε βιολογικούς στόχους και να έχουν συγκεκριμένη δράση, και επίσης να είναι εύκολες στον εντοπισμό και χειρισμό τους.

Τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζονται αρκετά από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων, όπως για παράδειγμα, το μέγεθος του μορίου επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα διείσδυσης στα κύτταρα ή την ικανότητα διαπέρασης των μεμβρανών στον οργανισμό. Επιπλέον, η δομή του μορίου είναι σημαντικός παράγοντας προκειμένου να είναι ικανό να αναπτύξει δεσμούς με τα μακρομόρια ή τις μεμβράνες των κυττάρων. Για παράδειγμα αν η ένωση είναι λιποδιαλυτή μπορεί να μεταφερθεί και να απορροφηθεί με μεγαλύτερη ευκολία στον οργανισμό, ενώ αν είναι υδατοδιαλυτή ή μεγαλομοριακή συναντά δυσκολία. Ακόμα, η φαρμακολογική δράση της νέας ένωσης κρίνεται και στην ικανότητα διάλυσης, απορρόφησης της δραστικής ουσίας, δηλαδή στη βιοδιαθεσιμότητά της στον οργανισμό.

Στη συνέχεια γίνεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός της ένωσης. Ακολουθεί η δοκιμή της με *in vitro* μελέτες για να εξαχθούν συμπεράσματα για τις πιθανές εφαρμογές και την πιθανή τοξικότητα. Σε περίπτωση που η νέα ένωση ανταποκρίνεται στους προσδοκώμενους στόχους, μπορεί να περάσει και σε *in situ* δοκιμές, δηλαδή σε ζωντανούς οργανισμούς, προκλινικές και κλινικές μελέτες. [3]

## A.2. Ο Καρκίνος

Πολύ μεγάλο κομμάτι της έρευνας προσανατολίζεται γύρω από τη σύνθεση ενώσεων και την ανάπτυξη νέων μεθόδων που να καθίστανται πιο αποτελεσματικές απέναντι στον καρκίνο. Ο καρκίνος είναι η ασθένεια με το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας παγκοσμίως [4]. Οι κλασικές θεραπείες καρκίνου που χρησιμοποιούνται κλινικά περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και χειρουργική επέμβαση.

Ωστόσο, η χρήση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντικούς περιορισμούς. Τα κύρια μειονεκτήματα της χημειοθεραπείας είναι η έλλειψη επιλεκτικής δράσης, που έχει σαν αποτέλεσμα, εκτός από την επίδραση στα καρκινικά κύτταρα, να βλάπτει και τον περιβάλλοντα υγιή ιστό και να οδηγεί πολλές φορές σε ανάπτυξη ανοχής σε πολλαπλά φάρμακα κατά τη διάρκεια της θεραπείας και δυσκολία στη διαχείριση των παρενεργειών. Η χρήση της ακτινοθεραπείας αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματική για διάφορους τύπους καρκίνου σε συγκεκριμένα μέρη του σώματος. Ωστόσο, και η μέθοδος αυτή εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα.

Για το λόγο αυτό, πολλοί τομείς της επιστημονικής κοινότητας, όπως χημεία, βιολογία, γενετική, βιοχημεία, βιοτεχνολογία, ενζυμολογία, βιοπληροφορική, κ.α., προσανατολίζονται στην ανάπτυξη μεθόδων, τεχνολογιών και ουσιών που να ξεπερνούν τα μειονεκτήματα των κλασικών φαρμάκων με αποτέλεσμα:

- Αύξηση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης φαρμάκων και μείωση των παρενεργειών.
- Επιλεκτικότητα των δραστικών ουσιών σε κύτταρα/ιστούς. Είναι σημαντικό να αποτελούν κυτταροτοξικούς παράγοντες μόνο για τα καρκινικά κύτταρα και να λειτουργούν ευεργετικά για τα υγιή κύτταρα.
- Βελτίωση των ιδιοτήτων των δραστικών φαρμάκων, όπως η σταθερότητα, η διαλυτότητα, ο χρόνος ημιζωής.
- Ανάπτυξη φαρμάκων που προσκολλώνται σε βιομακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, mRNA, κλπ.
- Βελτίωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας με την παραγωγή πολυδραστικών ενώσεων για συγκεκριμένο βιολογικό στόχο, προκειμένου να περιοριστούν περιορισμοί, όπως η ανοχή στα φάρμακα.
- Υπερήδηση των βιολογικών εμποδίων, όπως η βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό, η συμβατότητα με τα φάρμακα που χορηγούνται ή με τα οποία θα δεσμευτούν.
- Βελτίωση της ευαισθησίας στη διάγνωση και απεικόνιση καρκινικών όγκων.

- Σύνδεση αντικαρκινικών δραστικών ενώσεων με μόρια ιχνηθέτες, ώστε να επιτευχθεί αξιολόγηση σε πραγματικό χρόνο της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων.
- Βελτίωση της διάγνωσης και απεικόνισης του καρκίνου με ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνολογιών.

### A.3. Φωτοδυναμική θεραπεία

Μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στη θεραπεία του καρκίνου είναι η φωτοδυναμική θεραπεία, η οποία αποτελεί μια κλινικά εγκεκριμένη, ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική διαδικασία. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική έναντι επεμβατικών μεθόδων ελαχιστοποιώντας και τις παρενέργειες. Με τη φωτοδυναμική θεραπεία δίνεται η δυνατότητα τοπικής δράσης, επιτυγχάνοντας επιλεκτική κυτταροτοξική δράση σε κακοήθη και νεοπλασματικά κύτταρα [5].

Ο όρος φωτοδυναμική περιγράφει τις εξαρτώμενες από το οξυγόνο χημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την ενεργοποίηση μιας φωτοευαίσθητης ένωσης, η οποία συσσωρεύεται επιλεκτικά στα κύτταρα στόχους, ακολουθούμενη από τοπική ακτινοβόληση του βιολογικού στόχου με ορατό φως. Με τη διαδικασία αυτή παράγονται δραστικά είδη οξυγόνου που προκαλούν σημαντική κυτταροτοξικότητα και οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Κανένας από τους κλινικά εγκεκριμένους φωτοευαίσθητοποιητές δεν συσσωρεύεται στον πυρήνα των κυττάρων, περιορίζοντας έτσι την καταστροφή του DNA, που μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση ή να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικών κλώνων. [6][7]

Η φωτοδυναμική θεραπεία ως θεραπεία του καρκίνου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, ιδιαίτερα σε πρώιμους όγκους, βελτιώνοντας πολύ την ποιότητα ζωής του ασθενούς, καθώς δεν επιβαρύνεται από τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας, ενώ έχει πολύ καλά αποτελέσματα σε περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η χειρουργική επέμβαση [8].

Τα αντικαρκινικά αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας προέρχονται από τρεις αλληλοσυνδεόμενους μηχανισμούς: άμεσες ή έμμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα, βλάβη στο αγγειακό σύστημα του όγκου και επαγωγή ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη συστηματικής ανοσίας.

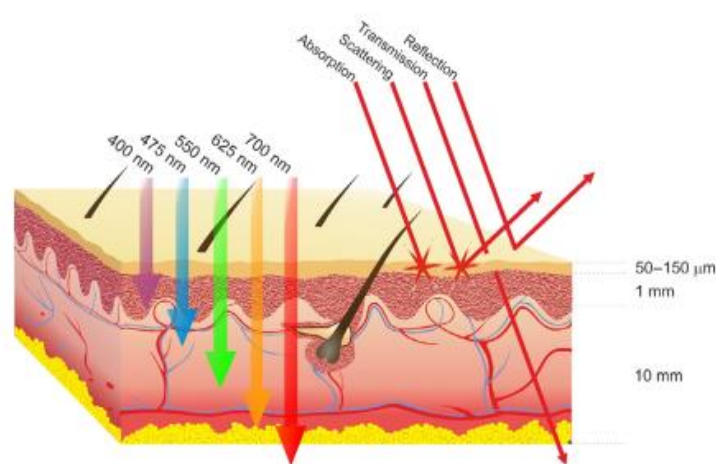
Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο και τη συγκέντρωση των φωτοευαίσθητων ουσιών, το χρόνο χορήγησης τους, την ισχύ και την ενέργεια ακτινοβόλησης και τη συγκέντρωση οξυγόνου στον όγκο. Η επιλεκτικότητα προκύπτει από την ικανότητα των φωτοευαίσθητοποιητών να εντοπίζονται σε νεοπλασματικές αλλοιώσεις και την ακριβή απελευθέρωση φωτός στις συγκεκριμένες περιοχές που έχει συσσωρευθεί ο φωτοευαίσθητοποιητής. Παραδόξως, η μεγάλη επιλεκτικότητα και η περιορισμένη εφαρμογή καθιστούν τη θεραπεία αναποτελεσματική έναντι των μεταστατικών βλαβών, οι οποίες αποτελούν την πιο συχνή αιτία θανάτου σε καρκινοπαθείς [9].

#### A.4. Φωτοευαισθητοποιητές

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι μόρια που μπορούν να ενεργοποιηθούν από φως προκειμένου να δημιουργηθούν δραστικές μορφές οξυγόνου, προκαλώντας βλάβη σε κυτταρικές δομές μικροοργανισμών ή παθολογικών κυττάρων θηλαστικών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο.

Ιδανικά οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να είναι σχετικά εύκολο να συντεθούν σαν καθарές ενώσεις και να έχουν σταθερότητα κατά την αποθήκευσή τους, να έχουν ειδική πρόσληψη από τον ιστό στόχο, χαμηλά επίπεδα τοξικότητας απουσία φωτός (να ενεργοποιείται δηλαδή μόνο μετά την ακτινοβολήση), να μην προκαλούν παρενέργειες στον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Χρειάζεται να έχουν ισχυρή απορρόφηση σε σχετικά μεγάλα μήκη κύματος (κόκκινη μετατόπιση) για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία στόχων βαθύτερων στο σώμα, καθώς η διείσδυση του κόκκινου φωτός στους ιστούς είναι υψηλότερη και υπάρχει λιγότερη φωτοευαισθησία στο δέρμα σε αυτήν την περιοχή του φάσματος (Εικόνα 2) [10].



Εικόνα 2: Αλληλεπίδραση φωτός με ανθρώπινο ιστό.

Επίσης, χρειάζεται να έχουν ισχυρές ζώνες απορρόφησης, ώστε να χρειάζεται χαμηλότερη ποσότητα φωτός, και η αποβολή του φαρμάκου από τον ασθενή θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν ταχύτερη για να αποφευχθεί η ανάγκη μακροχρόνιας προστασίας από το φως μετά τη θεραπεία, για την αποφυγή μεγάλης χρονικά παραμένουσας φωτοευαισθησίας και φωτοτοξικών παρενεργειών.

Τέλος, η φωτοδυναμική απόδοση του φωτοευαισθητοποιητή θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να εγγυάται ισχυρή φωτοτοξικότητα, αλλά δεν πρέπει να είναι υπερβολικά υψηλή ώστε μην προκληθεί κάποια βλάβη στον φυσιολογικό ιστό [11].

Ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να εντοπιστεί σε διάφορα οργανίδια όπως μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και μεμβράνες πλάσματος. Η πρόσδεση αυτή των φωτοευαισθητοποιητών δίνει ένα μεγάλο εύρος οδών σηματοδότησης στους οποίους μπορούν να επέμβουν μετά την ενεργοποίησή τους. Όσον αφορά τη

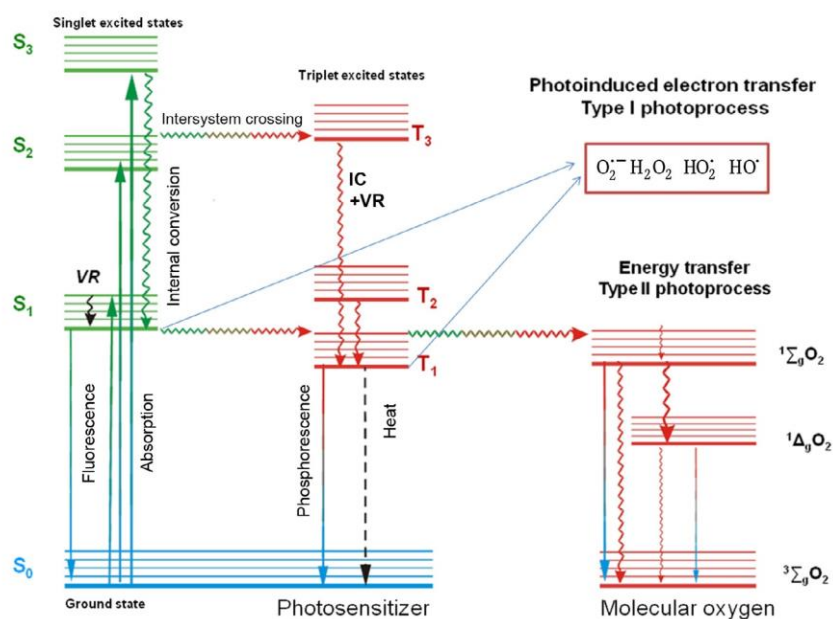


φωτοδυναμική θεραπεία είναι προτιμότερο να εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι πιο αποτελεσματικές στο να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο [12].

### A.5. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο η φωτοευαίσθητη ουσία χορηγείται στον ασθενή, από μια ή περισσότερες οδούς (τοπικά, ενδοφλέβια, από στόματος) και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα – στόχους. Μέχρι εκείνη τη στιγμή βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή παρουσία οξυγόνου, με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Το στάδιο έναρξης του μηχανισμού φωτοευαίσθητοποίησης είναι η απορρόφηση ενός φωτονίου από τον φωτοευαίσθητοποιητή, προκαλώντας τη διέγερση των ηλεκτρονίων που βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση σε τροχιακά υψηλότερης ενέργειας, με μικρό χρόνο ημιζωής (από  $10^{-6}$  έως  $10^{-9}$  δευτερόλεπτα) (Εικόνα 3). Ο διεγερμένος φωτοευαίσθητοποιητής είτε επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση με αποτέλεσμα το φαινόμενο του φθορισμού, είτε το διεγερμένο ηλεκτρόνιο αντιστρέφει το spin του, σχηματίζοντας τη σχετικά μεγαλύτερης διάρκειας τριπλή διεγερμένη κατάσταση [6] [13].



Εικόνα 3: Τροποποιημένο διάγραμμα Jablonski που παρουσιάζονται φωτοφυσικές και φωτοχημικές διεργασίες με την ακτινοβολία ενός φωτοευαίσθητοποιητή: από τη θεμελιώδη κατάσταση μεταπηδά στην απλή διεγερμένη και στην τριπλή διεγερμένη όπου παράγει δραστικά είδη οξύ.

Η ενεργοποιημένη φωτοευαίσθητη ένωση στην τριπλή διεγερμένη μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα περιβάλλοντα μόρια με δύο τρόπους: με τις **φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και τύπου II**.

Η *φωτοχημική αντίδραση τύπου I* περιλαμβάνει μεταφορά ηλεκτρονίων ή ατόμων, παράγοντας ριζικές μορφές του φωτοευαισθητοποιητή ή του υποστρώματος [13]. Αυτά τα ενδιάμεσα μπορούν να αντιδράσουν με οξυγόνο και να σχηματίσουν υπεροξειδία, ιόντα υπεροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.

Η *φωτοχημική αντίδραση τύπου II* περιλαμβάνει τη διαδικασία μεταφοράς ενέργειας με οξυγόνο και την επιστροφή του φωτοευαισθητοποιητή στη θεμελιώδη κατάσταση. Η παραγωγή του μονήρους οξυγόνου μέσω του μηχανισμού τύπου II φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στη φωτοδυναμική κυτταροτοξικότητα λόγω της εξαιρετικά αποτελεσματικής αλληλεπίδρασης των ειδών οξυγόνου με διαφορετικά βιομόρια.

#### A.6. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Παρόλο που η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να συμμετέχει σε πολλά γεγονότα κυτταρικής σηματοδότησης, κύριος σκοπός της είναι να σκοτώνει τα παθολόγνα κύτταρα. Η συγκέντρωση, οι φωτοφυσικές ιδιότητες, η κυτταρική θέση του φωτοευαισθητοποιητή, η συγκέντρωση οξυγόνου, το κατάλληλο μήκος κύματος και η ένταση του φωτός, καθώς και οι ιδιότητες κάθε τύπου κυττάρου μπορούν όλες να επηρεάσουν τον τρόπο και την έκταση του κυτταρικού θανάτου.

##### A.6.1. Νέκρωση

Ο πρώτος τύπος καρκινικού θανάτου είναι η νέκρωση, που προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες. Αποτελεί μια βίαιη και γρήγορη μορφή εκφυλισμού που επηρεάζει εκτεταμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυτταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, οδηγεί συχνά σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση. Αναφέρεται ως τυχαίος κυτταρικός θάνατος, που προκαλείται από φυσική ή χημική βλάβη και γενικά θεωρείται μη προγραμματισμένη διαδικασία. [8]

##### A.6.2. Απόπτωση

Η απόπτωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται όταν ο θάνατος είναι επιθυμητό ή προγραμματισμένο γεγονός, είναι ένα στερεοτυπικό πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας» με το οποίο οι πολυκύτταροι οργανισμοί εξαλείφουν γερασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαταραχή της ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού – προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο καθώς και σε εκφυλιστικά νοσήματα. Ο αποπτωτικός μηχανισμός είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [14].

Η απόπτωση διαφέρει μορφολογικά και βιοχημικά από τη νέκρωση. Η διαδικασία ξεκινάει όταν διαπιστωθούν παθολογικές καταστάσεις του κυττάρου από ενδοκυτταρικούς αισθητήρες, όπως βλάβη DNA, διαταραχές στη σηματοδότηση λόγω δράσης ογκογονιδίων, έλλειψη παραγόντων επιβίωσης ή υποξία. Χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, όπως γρήγορες δομικές αλλαγές της πλασματικής μεμβράνης χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, εκτεταμένη καταστροφή στη χρωματίνη, κατάτμηση του DNA, συμπύκνωση του πυρήνα, απώλεια μιτοχondριακής λειτουργίας απελευθερώνοντας το κυτόσωμα c – έναν ισχυρό καταλύτη της απόπτωσης, και συρρίκνωση του κυττάρου. Ουσιαστικά, ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικές πρωτεάσες, οι κασπάσες, που οδηγούν στην επιλεκτική κατάλυση κυτταρικών δομών και του γονιδιώματος. Πολλά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η απόπτωση θέτει φραγμό στην ανάπτυξη του όγκου.

Η διατήρηση της κυτταρικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία «αποπτωτικών σωματιδίων» διαφόρων μεγεθών και σύστασης, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με τη μεμβράνη, φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωματικά ένζυμα. [15][16]

Από *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε κατακερματισμός των αποπτωτικών κυττάρων σε σφαιρικά κυστίδια που περικλείονται σε πολλές μεμβράνες. Τα αποπτωτικά κύτταρα καθαρίζονται από τα φαγοκύτταρα, αποτρέπεται η φλεγμονή και τα κύτταρα πεθαίνουν στον «ανοσολογικό έλεγχο» της νέκρωσης που βρίσκεται μέσα ή έξω από τα κύτταρα. Η απόπτωση απαιτεί ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, και ενδονουκλεασών, επακόλουθη αποικοδόμηση του DNA και ενεργοποίηση κασπασών. [17]

### A.6.3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας καταβολικός κυτταρικός μηχανισμός που επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης, της υποβάθμισης και της ανακύκλωσης κυτταρικών προϊόντων.

Υπάρχει μια ποικιλία αυτοφαγικών διεργασιών που όλες περιλαμβάνουν λυσοσωμική αποικοδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων και πρωτεϊνών. Ο πιο γνωστός μηχανισμός έχει ως εξής: Μια δομή διπλής μεμβράνης που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα περιβάλλει το στόχο δημιουργώντας ένα κυστίδιο που το διαχωρίζει από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Αυτό το κυστίδιο περιέχει οργανίδια αποικοδόμησης και συστατικά του κυτταροπλάσματος.

Εκτός από τη διευκόλυνση της απόρριψης ανεπιθύμητων πρωτεϊνών, οργανιδίων και εισβαλλόντων μικροοργανισμών, η αυτοφαγία επιτρέπει επίσης σε ένα κύτταρο να ανακαταναείμει τα θρεπτικά συστατικά του από περιττές διαδικασίες σε ζωτικής σημασίας διαδικασίες σε περιόδους πείνας ή στρες. Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η αυτοφαγία είναι μια προσαρμοστική διαδικασία παραγωγής ενέργειας.

Μια από τις πρώτες ασθένειες που σχετίζονται με την αυτοφαγία είναι ο καρκίνος. Στα αρχικά στάδια φαίνεται ότι καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου, αλλά καθώς ο καρκίνος αναπτύσσεται και ο όγκος αλλάζει, η αυτοφαγία αρχίζει να προάγει την εξέλιξη του όγκου συνεισφέροντας στο μηχανισμό της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν την ενέργεια που χρειάζονται για να μείνουν ζωντανά, ενώ μπλοκάρουν τις αποπτωτικές οδούς, προστατεύοντας έτσι τα καρκινικά κύτταρα από τη θεραπεία.

Δεν είναι ακόμα σαφές με ποιο τρόπο επηρεάζει η αυτοφαγία την έκβαση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Γενικά, τα κύτταρα χρησιμοποιούν την αυτοφαγία ως άμυνα κατά της βλάβης που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες με εκκαθάριση του κυττάρου από τα οργανίδια που έχουν υποστεί βλάβη. Ανάλογα με τον τύπο του οξειδωτικού στρες και το βαθμό της οξειδωτικής βλάβης, η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να διεγείρει την αυτοφαγία είτε με κυτταροπροστατευτικό τρόπο είτε προκαλώντας αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο. Φαίνεται να προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων που είναι ικανά για απόπτωση, ενώ έχει αποδειχθεί ότι προάγει τον θάνατο σε καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν έχουν μηχανισμό απόπτωσης.

## A.7. Κουρκουμίνη και κουρκουμινοειδή

Η κουρκουμίνη είναι μια δραστική ένωση που απομονώνεται από το ρίζωμα του φυτού *Curcuma Longa*, γνωστό και ως turmeric. Το φυτό αυτό καλλιεργείται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή turmeric σε όλο τον κόσμο είναι η Ινδία, ωστόσο χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες και στην νοτιοανατολική Ασία, και την Κίνα ως μπαχαρικό στη μαγειρική, ως χρωστική ουσία, αλλά και στην παραδοσιακή ιατρική (Εικόνα 4) [18].



Εικόνα 4: Απεικόνιση της ρίζας του φυτού *Curcuma Longa* και η σκόνη που προέρχεται από αυτή.

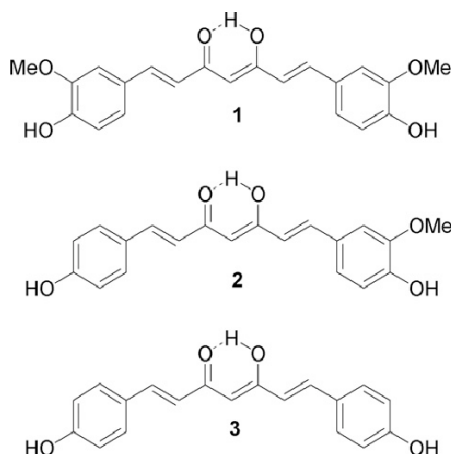
Η ολιστική, ινδική ιατρική (Ayurveda) χρησιμοποιεί το turmeric για θεραπεία λοιμώξεων, φλεγμονών, της ακμής, του βήχα, για επούλωση πληγών και τη θεραπεία εγκαυμάτων. Χρησιμοποιείται, επίσης, στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη θεραπεία ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος και έχει εφαρμογές σε θεραπείες για την αντιμετώπιση ρευματισμών, ηπατικών διαταραχών, της ιγμορίτιδας, της ανορεξίας κλπ.

Αν και ο κουρκουμάς χρησιμοποιούνταν ως μπαχαρικό και ως θεραπευτικό μέσο για χιλιάδες χρόνια στις ασιατικές χώρες, τα χαρακτηριστικά και οι βιολογικές δράσεις της κουρκουμίνης εντοπίστηκαν στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, αρχικά με την ανακάλυψη των αντιβακτηριδιακών ιδιοτήτων της και τις επόμενες δεκαετίες αποδείχτηκε ότι έχει τη δυνατότητα μείωσης της χοληστερίνης, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική δράση και αντικαρκινική δράση, ενώ πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχει δείξει η επίδρασή της σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως το πάρκινσον και το Αλτσχάιμερ.

Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν τόσο από *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων, όσο και από *in vivo* μελέτες σε ζωντανούς οργανισμούς (ζωικά μοντέλα), που έχουν ανοίξει το δρόμο για κλινικές μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό. Σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη είναι ασφαλής και αποτελεσματική ενάντια σε πολλές παθήσεις. Πλέον η κουρκουμίνη θεωρείται ως ένα «νέο φάρμακο» με μεγάλες δυνατότητες.

Ανάλογα με την προέλευσή του και τις συνθήκες του εδάφους που καλλιεργείται, το turmeric περιέχει 2% - 9% ένα μίγμα κουρκουμινοειδών, το οποίο αποτελείται από: κουρκουμίνη (ή κουρκουμίνη I, 77%), δεμεθοξικουρκουμίνη (DMC ή κουρκουμίνη II, 17%), δις-μεθόξυ-

κουρκουμίνη (BDMC ή κουρκουμίνη III, 3%). Από αυτό το μίγμα η κουρκουμίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό (Εικόνα 5) [18].



Εικόνα 5: Χημική δομή κουρκουμίνης I (1), κουρκουμίνης II (2), κουρκουμίνης III (3).

Η απομόνωση της κουρκουμίνης από αυτό το μίγμα χρονολογείται περίπου στο 1815 και έως το 1910 έγιναν πολλές προσπάθειες για προσδιορισμό του χημικού τύπου, ώσπου τελικά συντέθηκε στο εργαστήριο το 1913. Οι ιδιότητές της ωστόσο προσδιορίστηκαν πιο συγκεκριμένα μετά το 1970. Μέχρι σήμερα υπάρχουν πάνω από 3000 επιστημονικές δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τις χημικές, φωτοφυσικές και βιολογικές της επιδράσεις [19].

#### A.7.1. Αντικαρκινική δράση κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη είναι μια από τις φυσικές ενώσεις που έχουν μελετηθεί εκτενώς στη συμπληρωματική ογκολογία [20]. Η κουρκουμίνη έχει θεραπευτικές και χημειοπροληπτικές ιδιότητες έναντι πολλών τύπων καρκίνου, όπως η λευχαιμία, τα λεμφώματα, το μελάνωμα, το σάρκωμα, καρκίνος του ουροποιητικού συστήματος, του μαστού, των ωοθηκών, καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και αυχένα. Υπάρχουν πολλά ερευνητικά αποτελέσματα που σχετίζονται με την καταστολή στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, όπως αυτά του προστάτη, της χολής, της υπόφυσης, του στόματος και του λειομώματος της μήτρας [19][2].

Η δράση της κουρκουμίνης εξαρτάται από τη καρκινική σειρά, τη συγκέντρωση της ουσίας και τη διάρκεια της θεραπείας. Επειδή δεν είναι για όλους τους τύπους καρκίνου γνωστός ο μηχανισμός γέννησης και απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, η επίδραση της κουρκουμίνης ποικίλλει [21]. Ωστόσο, έχει προσδιοριστεί σε γενικές γραμμές πώς μπορεί να επέμβει στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ανάλογα, λοιπόν, με τον τύπο του καρκίνου, η κουρκουμίνη επιδρά σημαντικά στους μηχανισμούς ανάπτυξης και προόδου του, επεμβαίνοντας σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης, ακόμα και στα αρχικά στάδιά της.

Σε μοριακό επίπεδο επιδρά κυρίως σε πολυλειτουργικά ένζυμα (όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεασώματα, αποακετυλάση ιστόνης, κλπ.), ρυθμίζοντας έτσι πολλαπλές οδούς σηματοδότησης. Η αναστολή της δράσης αυτών των ενζύμων αναστέλλει αντίστοιχα την

ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, επάγοντας τελικά την απόπτωση, μέσω της απορρύθμισης του κανονισμένου κυτταρικού κύκλου. Ουσιαστικά η κουρκουμίνη απορρυθμίζει τους παράγοντες μεταγραφής που σχετίζονται με την έκφραση των γονιδίων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση, την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους, την μετάσταση και την αγγειογένεση [20].

Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει στη ρύθμιση των φλεγμονωδών μηχανισμών όταν εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία, κάτι που αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο πολλών χρόνιων παθήσεων, εκ των οποίων και ο καρκίνος [22][23].

Η κουρκουμίνη μπορεί να συμβάλλει, επίσης, στην εξάλειψη καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών στη χημειοθεραπεία, επεμβαίνοντας σε μηχανισμούς που τα καθιστούν τα ανθεκτικά στη θεραπεία. Γι' αυτό το λόγο, σε ορισμένες περιπτώσεις χορηγείται σαν συμπλήρωμα μαζί με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Επιπλέον, η κουρκουμίνη μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο ραδιοευαίσθητοποιητή σε μια ποικιλία καρκινικών κυττάρων κάνοντάς τα πιο ευαίσθητα στις ακτινοθεραπείες [24].

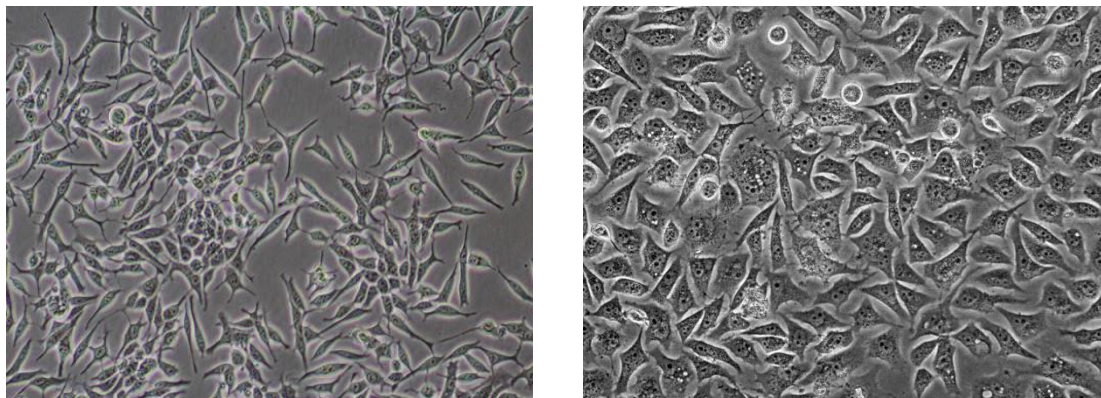
Λόγω όλων των παραπάνω, η κουρκουμίνη μπορεί να δρα και προληπτικά ενάντια στον καρκίνο καθώς μια ογκογένεση είναι μια διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει και δεκαετίες για να ολοκληρωθεί, οπότε η πρόσληψη ουσιών με χαμηλή τοξικότητα και επιλεκτική δράση μπορεί να εμποδίσει την εξάπλωση της νόσου.

Αυτό προκύπτει και από επιδημιολογικές μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και του προστάτη, είναι κατά πολύ μικρότερη σε χώρες της Ασίας και κυρίως στην Ινδία, σε σχέση με τα δυτικά έθνη και κυρίως την Αμερική, όπου φαίνεται ο καρκίνος του προστάτη να είναι η δεύτερη αιτία θανάτου, λόγω καρκίνου, στους άντρες. Για παράδειγμα, οι Ασιάτες άνδρες εμφανίζουν σε πολύ μικρότερο ποσοστό καρκίνου του προστάτη σε σχέση με Αμερικανούς άνδρες. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στις διατροφικές διαφορές και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [25][21]. Η κουρκουμίνη είναι ένας από τους διατροφικούς παράγοντες που μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ενάντια στην εμφάνιση προχωρημένου καρκίνου του προστάτη.



### A.7.2. Κουρκουμίνη και καρκίνος του προστάτη

Υπάρχουν δυο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη που μελετώνται εργαστηριακά: τα ανδρογόνο-ευαίσθητα LnCap και τα ανδρογόνο-ανθεκτικά PC3 (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Καλλιέργεια καρκινικής σειράς LnCap (αριστερά) και καρκινικής σειράς PC3 (δεξιά).

Τα PC3 παρουσιάζουν χαρακτηριστικά διαφοροποιημένου αδενοκαρκινώματος με μετάσταση στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης.

Η πρώτη επιλογή για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνει τη στέρηση ανδρογόνων από τον οργανισμό, με ανταπόκριση όμως σε αυτή τη θεραπεία μόνο κατά μέσο όρο 14 έως 20 μήνες λόγω της ενδεχόμενης εμφάνισης ανδρογόνο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων του προστάτη. Η χημειοθεραπεία, η οποία είναι η μόνη επιλογή θεραπείας για ανδρογόνο-ανθεκτικό καρκίνο είναι περισσότερο παρηγορητική παρά θεραπευτική. Για το λόγο αυτό, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της κουρκουμίνης στην καταπολέμηση του καρκίνου, έχει μελετηθεί από πλήθος ερευνητικών ομάδων η επίδραση *in vitro* σε καρκινικές σειρές του προστάτη. Ενδεικτικά αναφέρουμε, μελέτες στην καρκινική σειρά PC3 που αποδεικνύουν ότι η κουρκουμίνη μπορεί να προκαλέσει την απόπτωση των συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων. Η απόπτωση των κυττάρων δεν προκλήθηκε με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (οξειδωτικό στρες), διαδικασία που γίνεται έπειτα από την ακτινοβόληση της κουρκουμίνης, αλλά από την αύξηση του κυτταρικού κεραμιδίου και τις βλάβες στα μιτοχόνδρια [21][26].

Έρευνες σχετικά με την επίδραση της κουρκουμίνης σε αυτές τις καρκινικές σειρές δείχνουν ότι έχει κυτταροτοξική δράση εξαρτώμενη από το χρόνο και τη χορηγούμενη δόση. Επιπλέον, τα κύτταρα PC3 εμφάνισαν κατακερματισμένο DNA, που είχε να κάνει χρόνο αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA και τη δοσολογία, ενώ περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι η κουρκουμίνη προκαλεί απόπτωση και όχι νέκρωση των καρκινικών κυττάρων PC3 [21].

Επίσης, η χρήση της κουρκουμίνης I σε πειράματα κυτταροτοξικότητας απουσία και παρουσία φωτός στην κυτταρική σειρά LnCap έχουν δώσει εξαιρετικά αποτελέσματα σε μικρές συγκεντρώσεις [10].



### A.7.3. Βιοδιαθεσιμότητα κουρκουμίνης στον ανθρώπινο οργανισμό

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της κουρκουμίνης, που περιορίζει σημαντικά τις θεραπευτικές της δυνατότητες, είναι η κακή βιοδιαθεσιμότητά της στον οργανισμό. Το πρόβλημα αυτό φαίνεται να οφείλεται κυρίως στον υψηλό ρυθμό μεταβολισμού της, το μεγάλο μοριακό της βάρος και την κακή διαλυτότητά της στο νερό που έχουν σαν αποτέλεσμα την κακή απορρόφησή της, την περιορισμένη κατανομή της στους βιολογικούς ιστούς, τη δυσκολία να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες και τελικά την ταχεία συστηματική εξάλειψή της από τον οργανισμό. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από συγκριτικές μελέτες που έγιναν σε ζωικά μοντέλα, αλλά και στον άνθρωπο, βάσει του τρόπου χορήγησης, της ποσότητας, του χρόνου που μεσολάβησε από τη χορήγηση της κουρκουμίνης έως τη μέτρηση των αποτελεσμάτων στον ορό του αίματος και στους βιολογικούς ιστούς [27][28].

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για την ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης. Φαίνεται ότι η προστασία του ιονισμού των φαινολικών ομάδων και η εξάλειψη της απομάκρυνσης ηλεκτρονίων από το μόριο του κουρκουμινοειδούς, βελτιώνουν τη σταθερότητα του μορίου και έχουν σαν αποτέλεσμα αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με σύζευξη με άλλα μόρια, όπως αμινοξέα, οξικό οξύ, γλυκόζη, νουκλεϊκά οξέα στις φαινολικές ομάδες. [29]

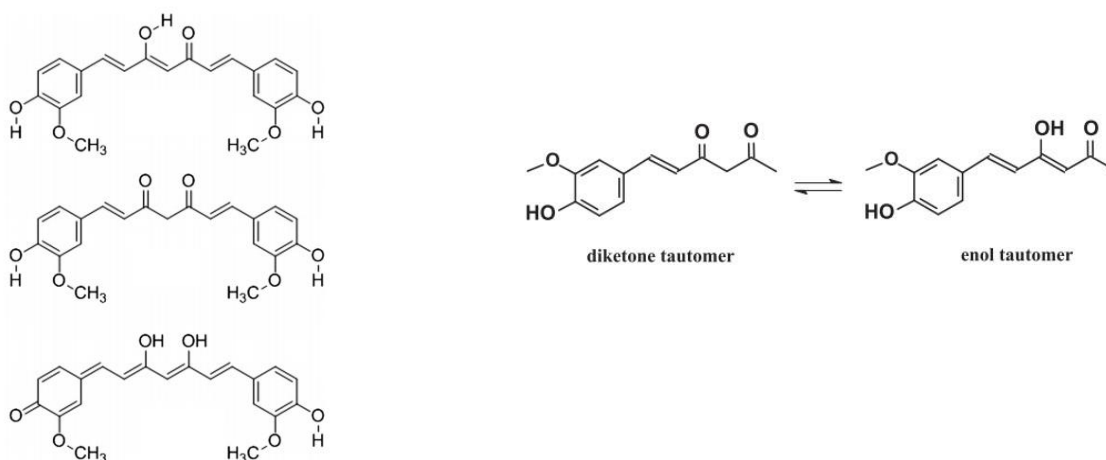
Επίσης, *in vitro* έρευνες δείχνουν ότι η κουρκουμίνη είναι μια ένωση που μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη θεραπεία της νόσου Alzheimer, λόγω της δέσμευσης των β-αμυλοειδών πλακών που σχηματίζονται στον εγκέφαλο με την εξέλιξη της νόσου, εμποδίζοντας την ανάπτυξή τους. Από τη δοκιμή όμως σε ζωντανό οργανισμό προκύπτει ότι είναι σχεδόν αδύνατο να διαπεράσει τις μεμβράνες που περικλείουν τον εγκέφαλο, λόγω όσων αναφέρθηκαν παραπάνω [30].

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά μελέτες προσανατολίζονται κυρίως στη σύνθεση ενώσεων (π.χ. πιπερίνη) με την ικανότητα να μπλοκάρουν τις μεταβολικές οδούς της κουρκουμίνης, αλλά και στη δημιουργία νανοσωματιδίων, λιποσωμάτων, μικκυλίων και φωσφολιπιδικών συμπλόκων τα οποία φαίνεται να παρέχουν μεγαλύτερη κυκλοφορία, καλύτερη διαπερατότητα και αντοχή στις μεταβολικές διεργασίες.

#### A.7.4. Δομικά χαρακτηριστικά κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη είναι μια δραστική, πολυφαινολική, συμμετρική οργανική ένωση. Η χημική ονομασία της είναι (1E,6E)-1,7-δισ(4-υδροξύ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-επταδιένιο-3,5-διόνη κατά IUPAC. Ο χημικός τύπος της είναι C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> και το μοριακό της βάρος 368,38 g/mol.

Η κουρκουμίνη ανήκει στην ομάδα των β-δικετόνων και παρουσιάζει ταυτομέρεια κετο-ενόλης, δηλαδή βρίσκεται σε δυο μορφές, από τις οποίες η μία περιέχει την ομάδα του καρβονυλίου και η άλλη είναι μια ενόλη (Εικόνα 7). Η μορφή της ενόλης εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα στη στερεά φάση και, ανάλογα με το διαλύτη, μέχρι και το 95% της κουρκουμίνης μπορεί να είναι στην ενολική μορφή [31].



Εικόνα 7: Μορφές ταυτομερών της κουρκουμίνης I.

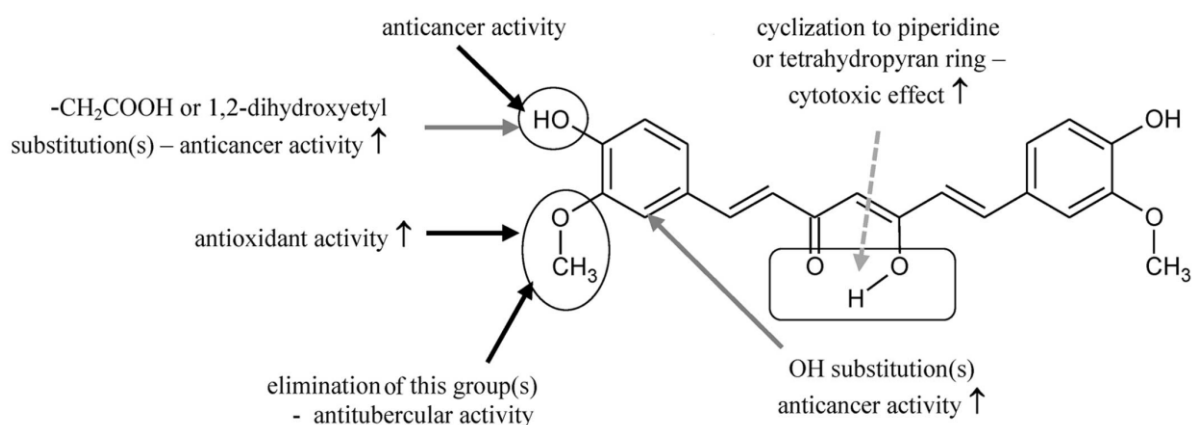
Παρά τη σχετικά απλή μοριακή δομή της, η κουρκουμίνη περιλαμβάνει ένα συνδυασμό χαρακτηριστικών που δρουν ευνοϊκά για το μόριο. Η δραστικότητά της οφείλεται στην ύπαρξη στο μόριο τριών δραστικών λειτουργικών ομάδων. Συγκεκριμένα αποτελείται από δυο αρωματικούς δακτυλίους, με ορθο-μεθόξυ φαινολικές ομάδες, οι οποίοι συνδέονται με μια αλυσίδα με επτά άτομα άνθρακα, στην οποία συνδέεται η β-δικετόνη [18].

Η κουρκουμίνη είναι υδρόφοβο μόριο και πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, ενώ είναι ευδιάλυτη σε πολικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο και σε διάφορους άλλους οργανικούς διαλύτες. Σε στερεή μορφή είναι μια πορτοκαλο-κίτρινη κρυσταλλική σκόνη [19].

Στους πολικούς διαλύτες το φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης είναι ευρύ (από 300 - 500 nm) με μέγιστη απορρόφηση στα 415 – 434 nm, ενώ το μέγιστο εκπομπής κυμαίνεται μεταξύ 494 - 538 nm [31].

#### A.7.5. Σχέση δομής – δράσης κουρκουμίνης

Οι σημαντικές χημικές αντιδράσεις της κουρκουμίνης που συνδέονται με τη βιολογική της δραστηριότητα είναι οι ακόλουθες: οι αντιδράσεις δωρεάς υδρογόνου που οδηγεί σε οξείδωση της κουρκουμίνης, ο μηχανισμός πυρηνόφιλης προσθήκης (αντίδραση Michael), υδρόλυση, αποικοδόμηση και ενζυμικές αντιδράσεις. Φαίνεται επίσης ότι λόγω των δραστηριών της ομάδων, αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικά μόρια, ενώ η ομάδα της ο-μεθόξυ φαινόλης και το υδρογόνο του μεθυλενίου είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική της δράση [32]. Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 8) παρουσιάζεται ποια είναι η επίδραση των χαρακτηριστικών ομάδων στο μόριο της κουρκουμίνης.



Εικόνα 8: Σχέση δομής - δραστηριότητας στο μόριο της κουρκουμίνης [21].

#### A.7.6. Ανάπτυξη παραγώγων κουρκουμίνης

Παρά το γεγονός ότι το τμήμα της 1,3-δικετόνης είναι πολύ σημαντικό για τις αλληλεπιδράσεις με πρωτεϊνικούς στόχους, θεωρείται ότι στην ομάδα αυτή οφείλεται και η κακή βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης και η χαμηλή σταθερότητα του μορίου. Για το λόγο αυτό, πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν στραφεί σε δομικές τροποποιήσεις με στόχο να γίνει το μόριο της κουρκουμίνης πιο σταθερό, με βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί μεγάλες βιβλιοθήκες με παρεμφερή με την κουρκουμίνη μόρια, τα κουρκουμινοειδή. Πολλά από αυτά τα μόρια, βέβαια, φτάνουν να αποκλίνουν αρκετά από το αρχικό μόριο της κουρκουμίνης.

Κάποιες από τις αλλαγές που έχουν γίνει από τους ερευνητές στο μόριο της κουρκουμίνης μπορεί να περιλαμβάνουν την αντικατάσταση του κεντρικού τμήματος με δακτυλίου πυραζόλης και ισοξαζόλης, μετασχηματισμό του φαινολικού OH σε συζυγή αμινοξέων, διαφόρων τύπων εστέρες και ακεταμίδια, προσθήκη περισσότερων διπλών δεσμών στο μόριο, αλλαγές στους υποκαταστάτες κάνοντας το μόριο περισσότερο ή λιγότερο υδρόφοβο. Η εισαγωγή εστέρων ή  $\alpha, \beta$  – ακόρεστων εστέρων στην ενεργή περιοχή του μεθυλενίου έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στην ανάπτυξη μορίων ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων με πολλές δοκιμές σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη και πνεύμονα [33].

Η κουρκουμίνη σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με τα περισσότερα γνωστά μεταλλικά ιόντα. Η  $\alpha, \beta$ -ακόρεστη  $\beta$ -δικετόνη είναι ένας εξαιρετικός χηλικός παράγοντας. Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει μεγάλη έρευνα σε σχέση με τα σύμπλοκα μετάλλων – κουρκουμίνης, τα οποία φαίνεται να έχουν ενισχυμένη σταθερότητα. Τα σύμπλοκα κουρκουμίνης – μετάλλου όχι μόνο τροποποιούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κουρκουμίνης αλλά επηρεάζουν επίσης τη βιολογική δραστικότητα των μετάλλων. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η συμπλοκοποίηση με κουρκουμίνη μειώνει την τοξικότητα των μετάλλων, ενώ τελικά τα σύμπλοκα κουρκουμίνης – μετάλλων φαίνεται να είναι καλύτεροι αντικαρκινικοί παράγοντες από την ίδια την κουρκουμίνη. Η δραστικότητα του συμπλόκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η φύση του μεταλλικού ιόντος, η δομή και η σταθερότητα του μορίου [18].

Σημαντικό στοιχείο που δίνει μεγάλη ώθηση στη βελτίωση της μεταβολικής σταθερότητας και των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των κουρκουμινοειδών είναι η σύνθεση φθοριωμένων κουρκουμινοειδών (curcuminoid-BF<sub>2</sub>) με την εισαγωγή του συμπλόκου βορίου – φθορίου στο χρωμοφόρο της κουρκουμίνης.

Πολλά από αυτά τα σύμπλοκα έχουν αυξήσει την ακαμψία της 1,3-δικετόνης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της σταθερότητάς της, την κόκκινη μετατόπιση των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής, με υψηλούς συντελεστές απορρόφησης στην περιοχή 400 έως 700 nm, ιδιότητα σημαντική για φθορίζουσες χρωστικές ουσίες και φωτοευαίσθητοποιητές. Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με το γεγονός ότι τα περισσότερα φθοριωμένα κουρκουμινοειδή αποτελούν δότες ηλεκτρονίων, λόγω των υποκαταστατών στους αρωματικούς δακτυλίους.

Οι σταθερές οργανικές φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, ειδικά εκείνες με υψηλούς συντελεστές απορρόφησης και αποδόσεις φθορισμού και μεγάλες μετατοπίσεις έχουν βρει σημαντικές εφαρμογές σε πολλά ερευνητικά πεδία για οργανικά ηλεκτρονικά, απεικόνιση, ανίχνευση, ιατρική διάγνωση και φωτοδυναμική θεραπεία [34].

#### A.7.7. Η κουρκουμίνη ως φωτοευαισθητοποιητής

Η κουρκουμίνη αποτελεί μια ένωση με πολλές θεραπευτικές ιδιότητες για τον οργανισμό, όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιβακτηριδιακή και αντικαρκινική δράση, αναστέλλοντας πολλές οδούς μεταγωγής σήματος [5]. Είναι μη τοξική ένωση, με ένα ευρύ φάσμα απορρόφησης (300 έως 500 nm) και εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση γύρω στα 430 nm. Το γεγονός αυτό, συμπεριλαμβανομένου και της ικανότητά της, μετά την απορρόφηση ακτινοβολίας, να επάγει διάφορες βιολογικές δράσεις σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις, την κατατάσσει ως ένα φυσικό φωτοευαισθητοποιητή [10]. Οι φωτοευαισθητοποιητές χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να συγκεντρώνονται επιλεκτικά σε βιολογικούς στόχους, ειδικότερα σε παθολογικές μορφολογίες και μετά την ενεργοποίησή τους να παράγουν κυτταροτοξικά προϊόντα.

Η διαδικασία της ενεργοποίησης της κουρκουμίνης με ακτινοβολία περιλαμβάνει τη μετάβαση του μορίου στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροτοξικών προϊόντων (δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών), αφήνοντας ανεπηρέαστους τους υγιείς ιστούς. Αυτή η ιδιότητά της έγκειται και στο γεγονός ότι απουσία φωτός έχει χαμηλά επίπεδα τοξικότητας για τον οργανισμό και ο μεταβολισμός της δεν οδηγεί στη δημιουργία νέων τοξικών παραγόντων, ούτε προκαλεί επιπλοκές στον οργανισμό μετά τη χορήγησή της. Οι φωτοφυσικές μελέτες στο μόριο της κουρκουμίνης αναφέρουν ότι η διάρκεια παραμονής του μορίου στην τριπλή διεγερμένη είναι μικροδευτερόλεπτα [10] [18].

Αποτελέσματα *in vitro* μελετών και κλινικών δοκιμών σχετικά με τη διερεύνηση της βακτηριοκτόνου δράσης και της στοματικής απολύμανσης, χρησιμοποιώντας την κουρκουμίνη στη φωτοδυναμική θεραπεία, δείχνουν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων συγκριτικά με άλλους φωτοευαισθητοποιητές που έχουν χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, θετικά αποτελέσματα φάνηκαν και στη μείωση της οδοντικής πλάκας, στη θεραπεία της ουλίτιδας, της περιοδοντίτιδας, της περιπλασματίτιδας και των ενδοδοντικών ασθενειών, αλλά και στη θεραπεία καρκίνου του στόματος [35][36][37][38].

Επιπλέον, η επίδραση της κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζεται με τη χρήση της ως φωτοευαισθητοποιητή σε σχέση με τα αποτελέσματα που δίνει απουσία φωτός, όπως έδειξε έρευνα που έγινε σε κύτταρα καρκίνου του ήπατος με εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας [20]. Επίσης, έρευνα που έγινε σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως σε καρκίνο του μαστού, καρκίνο του δέρματος, του στόματος, έδειξαν σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας απόπτωση σε όλες τις καρκινικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Η απόπτωση μπορεί να ξεκινήσει είτε μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων θανάτου είτε μέσω της μιτοχονδριακής απελευθέρωσης του

κυτοχρώματος c, που τελικά οδηγούν σε ενεργοποίηση κασπασών [39]. Τέλος, η χρήση της κουρκουμίνης σε δερματολογικές θεραπείες, με συνδυασμό μπλε και κόκκινου φωτός, είναι πολύ αποδοτική για τη θεραπεία χρόνιων φλεγμονών, με ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική επίδραση σε φλεγμονές που προκαλούνται από ψωρίαση [40].

Συνεπώς, λόγω της εκτεταμένης αντιμικροβιακής και αντικαρκινικής δραστηριότητας της κουρκουμίνης και της ασφαλούς χρήσης της έναντι υγιών κυττάρων, χρησιμοποιείται ως αφετηρία για το σχεδιασμό νέων παραγώγων με τροποποιημένη και αυξημένη αντιβακτηριδιακή, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση [5]. Τέλος, λόγω των περιορισμών στη χρήση της κουρκουμίνης που αναφέρθηκαν και παραπάνω (χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, χαμηλή διαλυτότητα, γρήγορη αποικοδόμηση και φωτοχημική αστάθεια), είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μορίων και μεθόδων, ικανών να διαλυτοποιήσουν και να σταθεροποιήσουν την κουρκουμίνη κατά τη διάρκεια της θεραπείας για τη φωτοδραστηριότητα [39].

## B. Πειραματικό μέρος

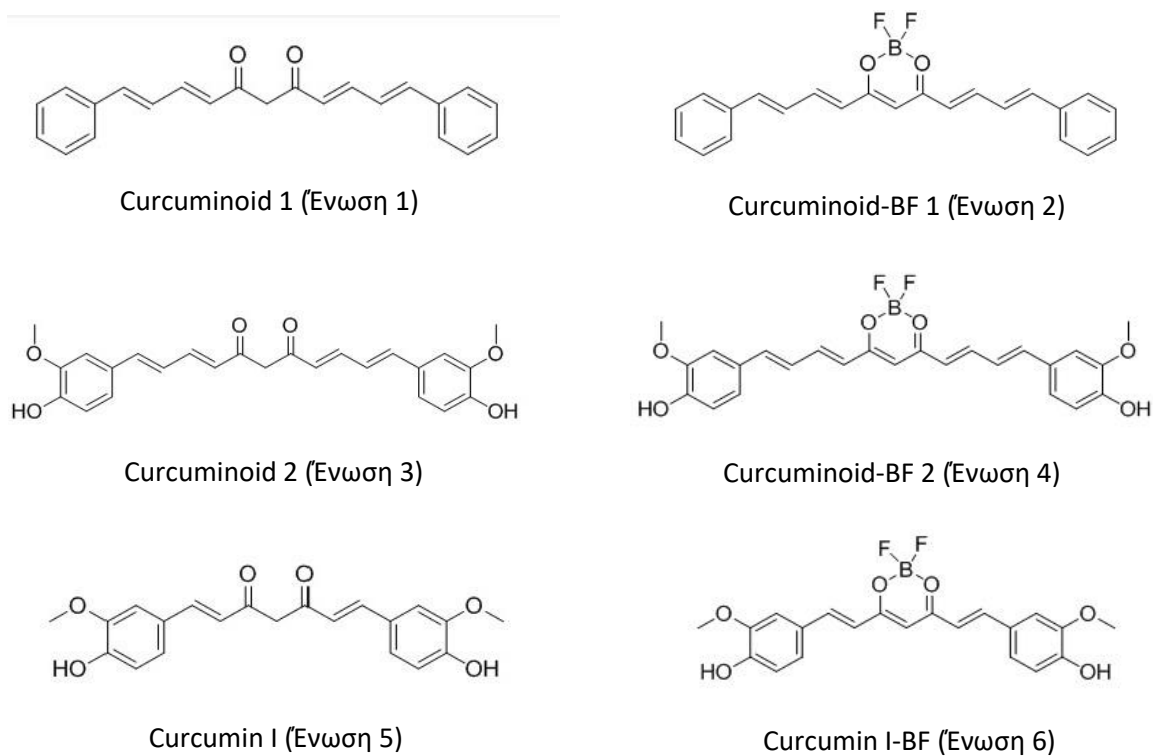
### B.1. Σκοπός πειραματικής μελέτης

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων κουρκουμινοειδών και των συμπλόκων τους με βόριο, με σκοπό την αξιολόγηση των φωτοχημικών τους ιδιοτήτων, της αντικαρκινικής τους δράσης σε *in vitro* δοκιμές σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου προστάτη, της πιθανής αλληλεπίδρασής τους με DNA και την μελέτη του χωρικού εντοπισμού τους μέσα στα καρκινικά κύτταρα.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας εξειδικεύεται και αναλύεται ως εξής:

#### ➤ Σχεδιασμός και σύνθεση

Στοχεύοντας στην δημιουργία φωτοευαίσθητοποιητών που παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση σε υψηλά μήκη κύματος (>550 nm) ώστε να επιτυγχάνεται αυξημένο βάθος διείσδυσης του φωτός ενεργοποίησης και συνεπώς θεραπευτική αντιμετώπιση όχι μόνο επιφανειακών αλλά και εν τω βάθει όγκων, οδηγηθήκαμε στις δομές 1 και 3, οι οποίες απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 9). Η προσθήκη του επιπλέον διπλού δεσμού αναμένεται να οδηγήσει σε επέκταση της ηλεκτρονικής συζυγίας. Επιπλέον, ο σχεδιασμός και η μελέτη της ένωσης 3 θα αναδείξει την πιθανή επίδραση της υποκατάστασης του αρωματικού δακτυλίου. Οι ιδιότητες και βιολογική αξιολόγηση των Ενώσεων 1 και 3 πραγματοποιήθηκαν συγκριτικά με το μόριο της κουρκουμίνης I (ένωση 5).



Εικόνα 9: Οι υπό μελέτη ενώσεις. Αριστερά: Κουρκουμινοειδή χωρίς συμπλοκοποίηση. Δεξιά: Κουρκουμινοειδή με συμπλοκοποίηση.

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη ερευνητικά αποτελέσματα σχετικά με τα μεταλλικά σύμπλοκα οργανικών ενώσεων, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί αντίδραση των τριών παραγώγων με το BF<sub>3</sub> οδηγώντας στη δημιουργία συμπλόκων BF που πιθανότατα να έχουν βελτιωμένες φυσικοχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες, όπως επίσης και βελτιωμένη κυτταροτοξική δράση. Συνεπώς προέκυψαν έξι ενώσεις που παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.

#### ➤ **Μελέτη φωτοφυσικών ιδιοτήτων των ενώσεων**

Σκοπός της μελέτης των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των ενώσεων είναι να προσδιοριστούν τα φασματικά χαρακτηριστικά κάθε ένωσης ως προς την απορρόφηση και το φθορισμό. Προσδιορίστηκαν τα φάσματα απορρόφησης των ενώσεων, τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης αυτών, ώστε να είναι δυνατή η διέγερσή τους και η ικανότητα τους να επάγουν φθορισμό, ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν.

Μελετήθηκαν τα φάσματα φθορισμού ώστε να προσδιοριστεί η πιθανή χρήση των ενώσεων σε διάγνωση φθορισμού αλλά και η δυνατότητα χωρικού ενδοκυττάριου εντοπισμού τους.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε:

- Φασματοσκοπική μελέτη της απορρόφησης των παραγώγων της κουρκουμίνης τα οποία συντέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις
- Φασματοσκοπική μελέτη της απορρόφησης των παραγώγων της κουρκουμίνης τα οποία συντέθηκαν σε διαφορετικούς διαλύτες
- Φασματοσκοπική μελέτη του φθορισμού των κουρκουμινοειδών τα οποία συντέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις

#### ➤ **Βιολογική αξιολόγηση και μελέτη χωρικού εντοπισμού**

Σκοπός της βιολογικής αξιολόγησης είναι η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των έξι ενώσεων που συντέθηκαν και ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με τα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν οι εξής μελέτες:

##### • **Μελέτη κυτταροτοξικότητας**

Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των νέων αυτών παραγώγων της κουρκουμίνης τα οποία συντέθηκαν στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής. Ως κυτταρικό μοντέλο για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη PC3 και η τοξικότητα απουσία φωτός μελετήθηκε με τη βοήθεια της διαδικασίας MTT.

##### • **Ενδοκυττάριος χωρικός εντοπισμός και κινητική των ενώσεων**

Στη συνέχεια, λόγω του φθορισμού των ενώσεων αυτών υπάρχει η δυνατότητα του ενδοκυττάριου χωρικού εντοπισμού τους δηλαδή της οπτικοποίησης της παρουσίας τους και επομένως του προσδιορισμού της εισαγωγής τους ή μη στα κύτταρα, της πιθανής συσσώρευσης τους σε οργανίδια ή της διάχυτης παρουσίας τους στο κυτταρόπλασμα, όπως



επίσης το αν διαπερνούν την πυρηνική μεμβράνη. Επίσης πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της εισαγωγής των κουρκουμινοειδών στα κύτταρα.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση Συνεστιακής Μικροσκοπίας σάρωσης με laser.

- ***Διερεύνηση μηχανισμών αλληλεπίδρασης με το DNA***

Τέλος, λόγω της κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων, χρειάζεται να προσδιοριστεί αν οι ενώσεις αυτές σχηματίζουν δεσμούς με το DNA και αν η κυτταροτοξική τους δράση οφείλεται σε αναδιοργάνωση του DNA. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism, CD).

## B.2. Σύνθεση κουρκουμοειδών

### B.2.1. Πειραματικές Διατάξεις – Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της σύνθεσης αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Όλες οι πειραματικές διατάξεις και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των έξι οργανικών ενώσεων βρίσκονται στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

#### Σύνθεση

Για τη σύνθεση των οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη, στην οποία στο ένα στόμιο τοποθετήθηκε ένας ψυκτήρας, καθώς χρησιμοποιούνται πτητικά αντιδραστήρια για τη σύνθεση των ενώσεων, ενώ στο δεύτερο στόμιο τοποθετείται πλαστικό πώμα, ώστε να γίνεται προσθήκη των αντιδραστηρίων μέσω σύριγγας. Στην κορυφή του ψυκτήρα τοποθετείται μπαλόνι με άζωτο και παροχετεύεται μέσα στη διάταξη άζωτο από φιάλη, ώστε να απομακρυνθεί ο αέρας και το περιβάλλον να καταστεί αδρανές για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.



Εικόνα 10: Πειραματική διάταξη για τη σύνθεση των έξι οργανικών ενώσεων.

Για την θέρμανση και την ταυτόχρονη ανάμιξη των μιγμάτων χρησιμοποιείται θερμαντική πλάκα, πάνω στην οποία υπάρχει λουτρό με λάδι και εκεί διατάσσονται τα σκεύη, με τη σφαιρική φιάλη να βρίσκεται κατά το ήμισυ μέσα στο λάδι. Ακόμα, για τον έλεγχο της θερμοκρασίας στο λουτρό, χρησιμοποιείται θερμομέτρο εμβαπτισμένο στο λάδι. Η διάταξη του χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 10.

## Διαχωρισμός – Απομόνωση τελικού προϊόντος

### Εκχύλιση

Κατά τη συνθετική πορεία των οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρικό οξύ (HCl(a)), οπότε απαραίτητη είναι σε πρώτο στάδιο η απομάκρυνση της υγρασίας. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι οι υπό μελέτη ενώσεις είναι δυσδιάλυτες στο νερό, γίνεται προσθήκη οργανικού διαλύτη που διαλύει ή δεσμεύει το προϊόν της αντίδρασης και δημιουργεί ένα σύστημα υδατικού – οργανικού διαλύτη, το οποίο είναι εύκολα διαχωρίσιμο με εκχύλιση. Στη διαδικασία αυτή προστίθεται ένα ανόργανο άλας, ώστε να δεσμευτεί οποιοδήποτε ίχνος υγρασίας από την οργανική φάση. Το άλας αυτό απορρίπτεται με το νερό που διαχωρίστηκε από το διάλυμα (εξαλάτωση). Στην περίπτωση αυτή γίνονται πολλαπλές εκχυλίσεις, μέχρι να είναι ξεκάθαρη η απουσία υδατικής φάσης. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε διαχωριστική χοάνη.

### Χρωματογραφία στήλης

Για τον πιο αποτελεσματικό διαχωρισμό κάθε ουσίας από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης χρησιμοποιείται η χρωματογραφία στήλης (Εικόνα 11), όπου ο διαχωρισμός βασίζεται στην κατανομή των επιμέρους ενώσεων του διαλύματος στη στατική φάση μιας κυλινδρικής στήλης, διαμέσου της οποίας περνά η υγρή κινητή φάση συμπαρασέροντας τις συγγενείς με αυτή ενώσεις του δείγματος.



Εικόνα 11: Στήλη χρωματογραφίας

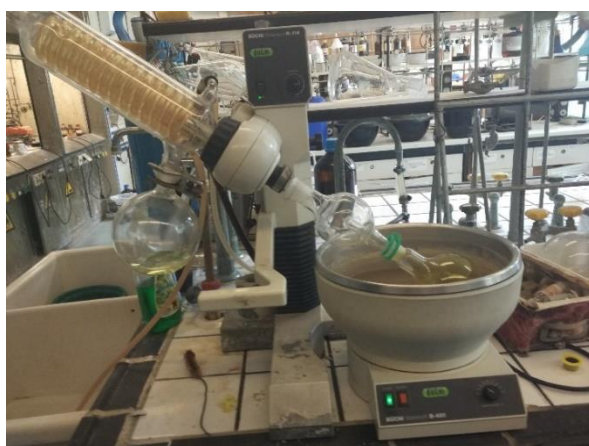
Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα μίγμα χλωροφορμίου - μεθανόλης που είναι χημικά συγγενές με την ένωση που αναμένεται να απομονωθεί, ώστε να παρασυρθεί πιο γρήγορα προς την έξοδο και στη συνέχεια να εκλουστούν και οι υπόλοιπες ενώσεις του δείγματος, οι οποίες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο στη στατική φάση. Η ροή της κινητής φάσης

οφείλεται στην εφαρμογή πίεσης με αντλία αέρα στο πάνω μέρος της στήλης (flash chromatography).

Ως στατική φάση χρησιμοποιείται λεπτόκοκκο στερεό υλικό, υπό τη μορφή πηκτής, silica gel, μέσα στο οποίο γίνεται η κατανομή των επιμέρους ενώσεων.

### *Συμπύκνωση*

Το αποτέλεσμα της σύνθεσης ή του διαχωρισμού των ενώσεων είναι ένα διάλυμα, το οποίο πρέπει να υποβληθεί σε συμπύκνωση προκειμένου να απομονωθούν σε μορφή σκόνης οι υπό μελέτη ενώσεις.



*Εικόνα 12: Περιστροφικός εξατμιστήρας.*

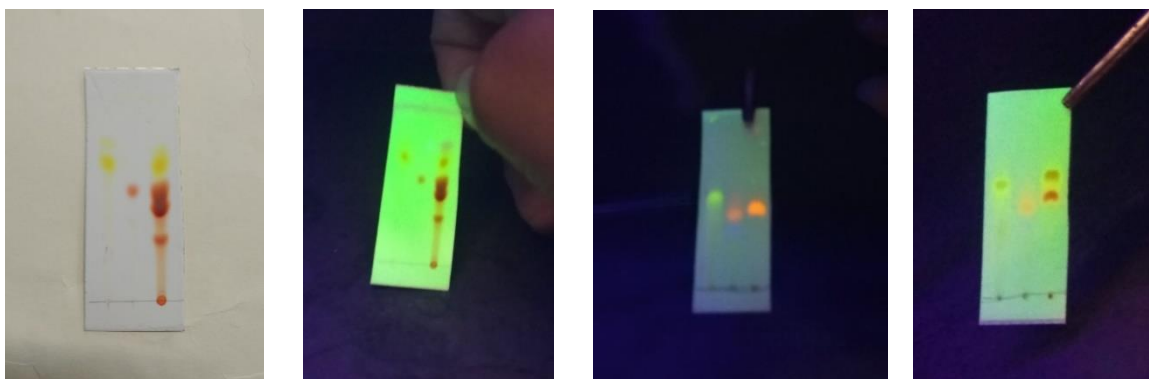
Η συμπύκνωση γίνεται με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (rotary evaporator) (Εικόνα 12), όπου το υπό συμπύκνωση διάλυμα εισάγεται σε σφαιρική φιάλη και τοποθετείται μέσα σε θερμαινόμενο λουτρό με νερό. Το σύστημα λειτουργεί υπό κενό και αφήνεται μέχρι ξηρού.

### *Ταυτοποίηση*

#### *Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Liquid Chromatography - TLC)*

Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας σύνθεσης και απομόνωσης του προϊόντος εφαρμόζεται η υγρή χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, μέσω της οποίας διαπιστώνεται κατά πόσο έχει προχωρήσει η αντίδραση προς το τελικό προϊόν, αν έχουν αντιδράσει πλήρως οι αρχικές ενώσεις και αν τελικά έχει προκύψει καθαρή η ένωση στο διάλυμα ή υπάρχουν παραπροϊόντα.

Χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με πήγμα οξειδίου του πυριτίου, πάνω στις οποίες αφήνονται κηλίδες των υπό ανάλυση ουσιών και εμβαπτίζονται σε διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα – εξανίου ή τολουόλιο – εξανίου ή χλωροφορμίου μεθανόλης, σε διαφορετικές κάθε φορά αναλογίες, ανάλογα με την εκλουστική τους ισχύ, αλλά και την πολικότητα και τη φύση των ουσιών (Εικόνα 13).



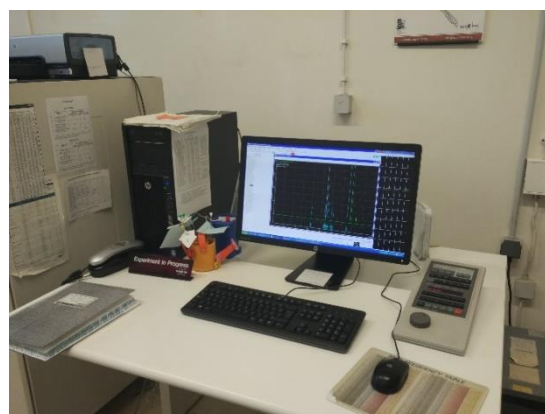
Εικόνα 13: Πλάκες TLC δύο προτύπων ουσιών και ενός δείγματος που ταυτοποιούν την ύπαρξη παραπροϊόντων στο δείγμα.

Ως αντιδραστήρια σύγκρισης χρησιμοποιούνται οι ενώσεις που αποτέλεσαν συστατικά στοιχεία για το μηχανισμό της αντίδρασης ή πρότυπες ενώσεις ίδιας χημικής σύστασης με το παραγόμενο προϊόν.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο ανάπτυξης, όπου έχει προστεθεί τόση ποσότητα διαλύτη ώστε να μην ξεπερνάει το ύψος που βρίσκονται οι κηλίδες των ουσιών και σκεπάζεται ώστε το περιβάλλον να είναι κορεσμένο στο διαλύτη που χρησιμοποιείται. Αφού η κινητή φάση διατρέξει όλη τη στατική φάση, η πλάκα αφαιρείται από τον θάλαμο ανάπτυξης, αφήνεται λίγο ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και παρατηρείται κάτω από λάμπα φθορισμού, ώστε να ελεγχθεί αν οι ουσίες έχουν δώσει αποτύπωμα στο ίδιο ύψος, από όπου προκύπτει και συμπέρασμα για την ύπαρξη παραπροϊόντων.

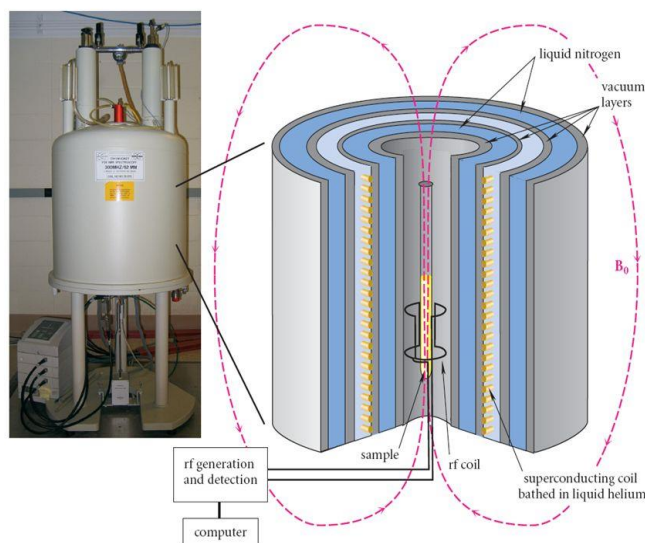
### Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance - NMR)

Με την απομόνωση και τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος απαραίτητη είναι η ταυτοποίηση της δομής της κάθε οργανικής ένωσης που συντέθηκε, όπως επίσης και ο έλεγχος ότι δεν υπάρχουν παραπροϊόντα στο τελικό προϊόν, που διαπιστώνονται με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H}$  NMR). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Bruker Avance 500 MHz spectrometer operating at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Όργανο NMR: Bruker Avance 500 MHz spectrometer operating at 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Πολλά είδη πυρήνων συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα. Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ( $H_0$ ). Το πρωτόνιο ( $^1H$ ) και ο πυρήνας του άνθρακα ( $^{13}C$ ) διαθέτουν σπιν. Τα πυρηνικά σπιν των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, βρεθούν ανάμεσα σε δυο πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη (Εικόνα 15), οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς.



Εικόνα 15: Μαγνητικό πεδίο που δημιουργεί ο μαγνήτης του NMR.

Ένας περιστρεφόμενος πυρήνας  $^1H$  ή  $^{13}C$  μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό, ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δυο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός έχει χαμηλότερη ενέργεια έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή σπιν). Όταν γίνει αυτή η αναστροφή λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός).

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία, που δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο. Οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε πυρήνας βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, προστατεύεται και σε διαφορετικό βαθμό, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα. Αν το όργανο του NMR



είναι αρκετά ευαίσθητο, οι μικροδιαφορές του πραγματικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου που γίνονται ανά πυρήνα μπορούν να ανιχνευθούν, οπότε και λαμβάνεται διαφορετικό σήμα NMR για κάθε χημικά διακριτό πυρήνα υδρογόνου ή άνθρακα κάποιου μορίου. Έτσι το φάσμα NMR μιας οργανικής ένωσης μπορεί να δώσει αποτελεσματικά το δίκτυο σύνδεσης ανθράκων – υδρογόνων, οπότε και μπορεί να γίνει ταυτοποίηση μιας ένωσης ή και να δώσει πληροφορίες σχετικά με άγνωστες ενώσεις.

Με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταγράφεται το ηλεκτρονικό σήμα του πυρήνα, το οποίο αθροίζεται με πολλές επαναλήψεις ώστε να μειωθεί ο ηλεκτρονικός θόρυβος και να εμφανιστεί το ασθενικό σήμα συναρτήσει του ποσού ενέργειας που χρειάζεται κάθε πυρήνας για το συντονισμό.

Η δημιουργία του πεδίου επιτυγχάνεται με τη χρήση ανθεκτικών υπεραγωγίων μαγνητών. Για να είναι όμως ομογενές το πεδίο χρησιμοποιούνται περιστρεφόμενα πηνία, καθένα από τα οποία παράγει ένα μικρό μαγνητικό πεδίο. Για τη διατήρηση της υπεραγωγίμης κατάστασης του πηνίου, βυθίζεται σε λουτρό ηλίου, σε θερμοκρασία 77 K και σε επαφή με λουτρό υγρού αζώτου και όλο το σύστημα λειτουργεί υπό κενό ώστε να μειώνεται η περαιτέρω ροή θερμότητας.

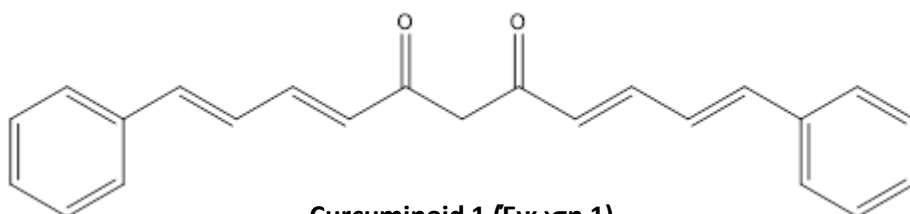
Το όργανο NMR περιλαμβάνει επίσης ένα κυλινδρικό μεταλλικό σωλήνα, ο οποίος εισάγεται μέσα στην οπή του μαγνήτη. Το κύριο μέρος του καθετήρα είναι ένα μικρό πηνίο, που χρησιμοποιείται τόσο για τη διέγερση όσο και για την ανίχνευση του σήματος, και συγκρατείται στην κορυφή αυτής της διάταξης με τέτοιο τρόπο ώστε το δείγμα να μπορεί να εισαχθεί από την κορυφή του μαγνήτη και μέσα στο πηνίο. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία, η σπείρα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στο δείγμα.

Το πηνίο είναι μέρος ενός συντονισμένου κυκλώματος που περιλαμβάνει επίσης και έναν πυκνωτή. Η επαγωγή του πηνίου και η χωρητικότητα του πυκνωτή ρυθμίζονται έτσι ώστε το κύκλωμα αυτό να συντονίζεται με τη συχνότητα Larmor. Ο συντονισμός του καθετήρα επηρεάζεται ανάλογα με τη μεταβολή του διαλύτη ή την αλλαγή της συγκέντρωσης των ιόντων στον διαλύτη.

## B.2.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα

### Σύνθεση κουρκουμινοειδών χωρίς συμπλοκοποίηση

Αρχικά γίνεται σύνθεση των τριών κουρκουμινοειδών χωρίς το σύμπλοκο BF<sub>3</sub> που φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 16):

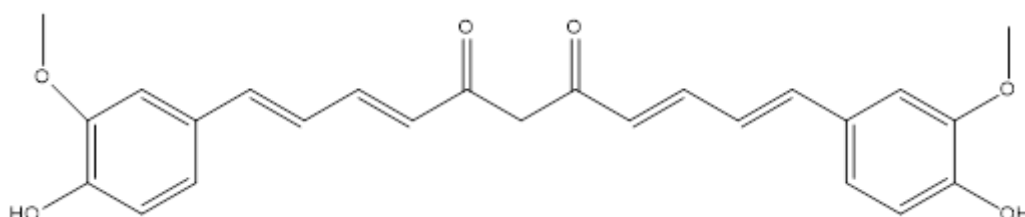


**Curcuminoid 1 (Ενωση 1)**

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

Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 328.41

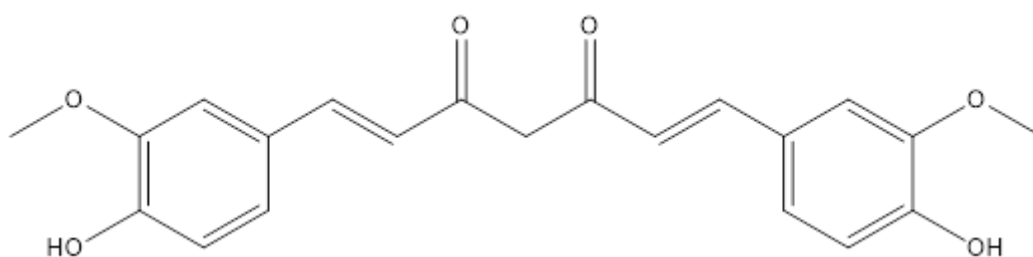


**Curcuminoid 2 (Ενωση 3)**

(1*E*,3*E*,8*E*,10*E*)-1,11-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)undeca-1,3,8,10-tetraene-5,7-dione

Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight: 420.46



**Curcumin I (Ενωση 5)**

(1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione

Chemical Formula: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight: 368.39

Εικόνα 16: Χημικές δομές κουρκουμινοειδών χωρίς συμπλοκοποίηση.



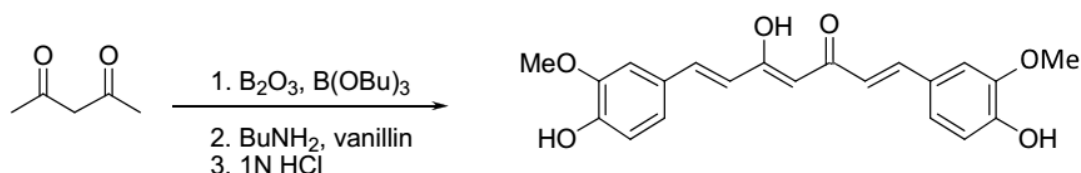
### Πρώτη μέθοδος παρασκευής κουρκουμινιδών χωρίς συμπλοκοποίηση (Μέθοδος Α)

Για τη σύνθεση των ενώσεων αυτών ακολουθήθηκε μεθοδολογία βασισμένη σε αυτή των Wisut Wichitnithad σύμφωνα με την οποία [29]:

Σε μια σφαιρική φιάλη διαλύεται οξείδιο του βορίου ( $B_2O_3$ ) σε οξικό αιθυλεστέρα ( $C_4H_8O_2$ ) και στη συνέχεια προστίθεται ακετυλοακετόνη ( $C_5H_8O_2$ ), σε αδρανές περιβάλλον. Το διάλυμα θερμαίνεται στους  $70^\circ - 80^\circ C$  με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά. Στο στάδιο αυτό γίνεται συμπλοκοποίηση της ακετυλοακετόνης με το βόριο οπότε το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός άσπρου ιζήματος.

Στη συνέχεια, προστίθεται σταδιακά η αλδεΐδη και το βορικό τριβουτύλιο και αφήνεται να αντιδράσει για ακόμα 30 λεπτά, με έντονη ανάδευση, στην ίδια θερμοκρασία. Η αλδεΐδη αυτή αντιδρά με το σύμπλοκο που έχει φτιαχτεί, ενώ το βορικό τριβουτύλιο λειτουργεί σαν αφυδατικό μέσο ώστε να μπορούν να σχηματιστούν οι διπλοί δεσμοί στο μόριο.

Έπειτα προστίθεται διάλυμα βουτυλαμίνης – οξικού αιθυλεστέρα και το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία  $60^\circ C$ . Το διάλυμα αυτό προστίθεται στάγδην ώστε να μεσολαβεί ο απαραίτητος χρόνος για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και ο σχηματισμός του τελικού προϊόντος. Η πορεία της αντίδρασης φανερώνεται και από την αλλαγή του χρώματος. Με το πέρας των 24 ωρών προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (1 M) και αφήνεται ακόμα 2 – 3 ώρες στην ίδια θερμοκρασία, ώστε να σπάσει ο δεσμός με το βόριο και να απελευθερωθεί η κετόνη. Παρακάτω (Εικόνα 17) φαίνεται συνοπτικά η συνθετική πορεία για την παρασκευή της κουρκουμίνης I:



Εικόνα 17: Συνθετική πορεία κουρκουμίνης I.

Ακολουθεί εκχύλιση, ώστε να διαχωριστούν η οργανική φάση που οφείλεται στον οξικό αιθυλεστέρα, από την υδατική φάση, που οφείλεται στην προσθήκη υδροχλωρικού οξέος. Για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας, η οργανική φάση υπόκειται σε περαιτέρω επεξεργασία με την προσθήκη πυκνού αλατόνευρου, άνυδρου θειικού νατρίου ή χλωριούχου νατρίου, δημιουργώντας μια διεπιφάνεια με τα σταγονίδια και παρασύροντάς τα.

Τέλος, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με μεθανόλη, διήθηση του μίγματος και συμπύκνωση του διηθήματος για να απομονωθεί στερεό το προϊόν.

### *Δεύτερη μέθοδος παρασκευής κουρκουμινοειδών χωρίς συμπλοκοποίηση (Μέθοδος Β)*

Για τη σύνθεση των παραπάνω ενώσεων ακολουθήθηκε δεύτερη μεθοδολογία βασισμένη σε αυτή των Jian-Ying Feng, Zai-Qun Liu σύμφωνα με την οποία [41]:

Σε μια σφαιρική φιάλη διαλύεται οξείδιο του βορίου σε ακετυλοακετόνη και βορικό τριβουτύλιο και προστίθεται σταδιακά η αλδεΐδη. Το μίγμα θερμαίνεται στους 90°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά, σε αδρανές περιβάλλον αζώτου.

Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην η βουτυλαμίνη, ενώ συνεχίζεται η ανάδευση στους 100°C για 1,5 ώρα. Τέλος, γίνεται προσθήκη υδροχλωρικού οξέος, σε μη αδρανές πλέον περιβάλλον, και αφήνεται να αναδεύεται ολονυχτίς στους 50°C.

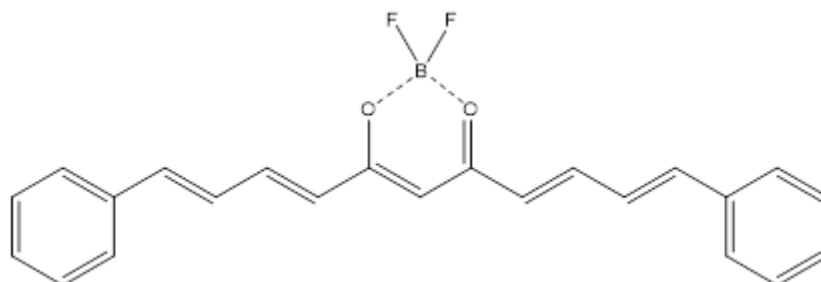
Το μίγμα διηθείται και ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος με νερό για την απομάκρυνση του χλωρίου. Στη συνέχεια ξηραίνεται και ακολουθεί υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (στήλης) για τον καθαρισμό του στερεού προϊόντος.

Και στις δυο μεθόδους παρασκευής των κουρκουμινοειδών η αλδεΐδη που προστίθεται διαφοροποιείται ανάλογα με τελικό προϊόν:

- Στην περίπτωση παρασκευής της ένωσης 1, η αλδεΐδη είναι η σινναμαλδεΐδη, ώστε να σχηματιστεί ο επιπλέον διπλός δεσμός και να μην υπάρχει υποκατάσταση στους αρωματικούς δακτυλίους.
- Στην περίπτωση παρασκευής της ένωσης 3, η αλδεΐδη είναι η 3-μεθόξυ-4-υδρόξυ-σινναμαλδεΐδη ώστε να σχηματιστεί στο μόριο ο επιπλέον διπλός δεσμός αλλά να υπάρχει υποκατάσταση στους αρωματικούς δακτυλίους.
- Στην περίπτωση σύνθεσης της ένωση 5 (κουρκουμίνη Ι) χρησιμοποιείται βανιλίνη, ώστε το τελικό μόριο να μην έχει επιπλέον διπλό δεσμό και να έχει υποκατάσταση στους αρωματικούς δακτυλίους.

### Σύνθεση κουρκουμινοειδών με συμπλοκοποίηση BF

Στη συνέχεια οι τρεις ενώσεις που συντέθηκαν χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των συμπλοκοποιημένων ενώσεων 2, 4 και 6, που φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 18):

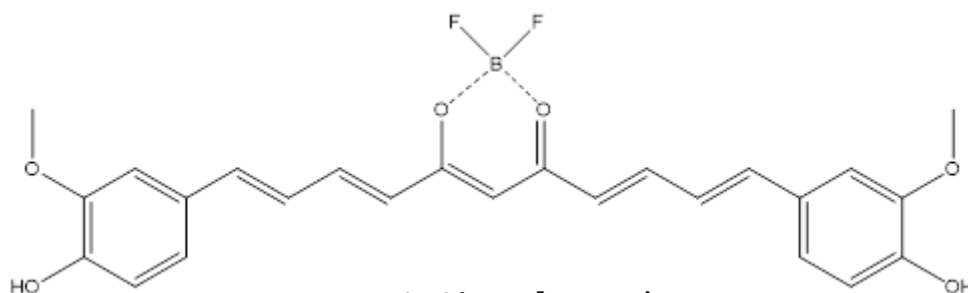


**Curcuminoid-BF 1 (Ένωση 2)**

(1*E*,3*E*,6*Z*,8*E*,10*E*)-7-((difluoroboraneyl)oxy)-1,11-diphenylundeca-1,3,6,8,10-pentaen-5-one

Chemical Formula:  $C_{23}H_{19}BF_2O_2$

Molecular Weight: 376.21

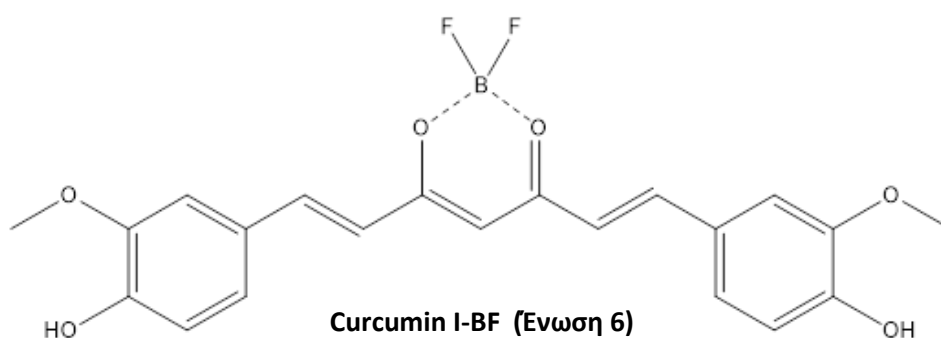


**Curcuminoid-BF 2 (Ένωση 4)**

(1*E*,3*E*,6*Z*,8*E*,10*E*)-7-((difluoroboraneyl)oxy)-1,11-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)undeca-1,3,6,8,10-pentaen-5-one

Chemical Formula:  $C_{25}H_{23}BF_2O_6$

Molecular Weight: 468.26



**Curcumin I-BF (Ένωση 6)**

(1*E*,4*Z*,6*E*)-5-((difluoroboraneyl)oxy)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one

Chemical Formula:  $C_{21}H_{19}BF_2O_6$

Molecular Weight: 416.18

Εικόνα 18: Κουρκουμινοειδή με συμπλοκοποίηση: Curcuminoid-BF 1 (ένωση 2), curcuminoid-BF 2 (ένωση 4) και curcumin I-BF (ένωση 6).

### *Πρώτη μέθοδος παρασκευής συμπλόκων κουρκουμινολιδίων (Μέθοδος Γ)*

Για τη σύνθεση των συμπλόκων της κουρκουμίνης, και των παραγώγων της, με βόριο και φθόριο ακολουθήθηκε μεθοδολογία βασισμένη στο πρωτόκολλο των Zhihua Sui, Rtiel Salto, Jia Li, Charles Craik and Paul R. Ch-tiz de Montellano, σύμφωνα με την οποία [42]:

Η οργανική ένωση, η οποία πρόκειται να συμπλοκοποιηθεί, προστίθεται σε ξηρό τετραϋδροφουράνιο. Στη συνέχεια, στο διάλυμα αυτό γίνεται προσθήκη του αιθερικού διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου σε αδρανές περιβάλλον και με απουσία φωτός. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 25°C με συνεχή ανάδευση του μίγματος για 16 ώρες. Κάθε 2 ώρες γίνεται έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και αν παρατηρηθεί παρουσία της οργανικής ένωσης που προστέθηκε αρχικά προστίθεται μικρή ποσότητα τετραϋδροφουρανίου, μέχρι να μην υπάρχουν παραπροϊόντα. Τέλος, το διάλυμα συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν της αντίδρασης.

### *Δεύτερη μέθοδος παρασκευής συμπλόκων κουρκουμινολιδίων (Μέθοδος Δ)*

Για τη σύνθεση των συμπλόκων ακολουθήθηκε και μια δεύτερη μέθοδος βασισμένη σε αυτή των (Kai Liu, 2013), σύμφωνα με την οποία [43]:

Η ένωση που πρόκειται να συμπλοκοποιηθεί αναμιγνύεται με αιθερικό διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου και τολουόλιο, σε αδρανές περιβάλλον και απουσία φωτός. Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει με συνεχή ανάδευση για 5 h, στους 65°C. Το ίζημα που σχηματίζεται ξεπλένεται με τολουόλιο και εξάνιο και λαμβάνεται το τελικό προϊόν.

### *Ταυτοποίηση ενώσεων με τη μέθοδο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού*

Για τη λήψη φάσματος προστίθεται σε πολύ λεπτούς δοκιμαστικούς σωλήνες ελάχιστη ποσότητα της κάθε ένωσης και μικρή ποσότητα διαλύτη δευτεριωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO-d6). Το δείγμα τοποθετείται μέσα σε πηνίο σε ειδικό κρουστάτη για την επίτευξη χαμηλών θερμοκρασιών, από θερμοκρασία δωματίου έως -271°C. Τα φάσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών καταγράφονται σε διάφορες θερμοκρασίες και οι ιδιότητες των υπό μελέτη υλικών εξετάζονται σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας.

### B.3. Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινοειδών

#### B.3.1. Πειραματικές Διατάξεις – Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Για τη μελέτη της απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν το φασματόμετρο απορρόφησης και το φασματόμετρο εκπομπής που βρίσκονται στο εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής, στο τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Η/Υ.

#### Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης των έξι ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρική συσκευή διπλής δέσμης Perkin – Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Φασματόμετρο απορρόφησης: Perkin – Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer.

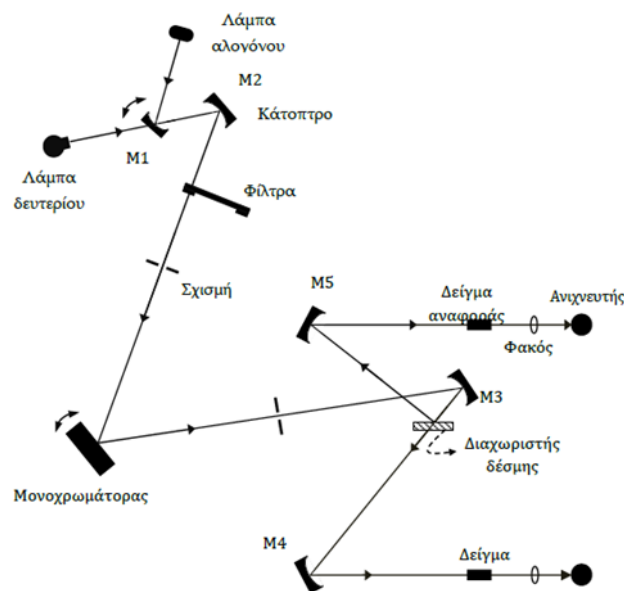
Το όργανο χρησιμοποιεί δυο πηγές ακτινοβολίας:

- Μία λάμπα δευτερίου, η οποία εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους (200 – 400 nm)
- Μία λάμπα αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και στην κοντινή υπέρυθρη περιοχή του φάσματος (350 – 900 nm). Τα δείγματα εισάγονται σε κυψελίδες χαλαζία.

Η λειτουργία του φασματόμετρου παρουσιάζεται στο παρακάτω οπτικό διάγραμμα (Εικόνα 20), με την πορεία της φωτεινής δέσμης. Το κάτοπτρο M1 μετακινείται αυτόματα κατά την περιστροφή του μονοχρωμάτορα στα 326 nm. Όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία δευτερίου, το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται, ώστε να επιτρέψει τη διέλευσή της. Όταν η ακτινοβολία προέρχεται από τη λυχνία αλογόνου, δηλαδή κατά τη λειτουργία στην

υπέρυθρη περιοχή, το κάτοπτρο M1 επανέρχεται στη θέση του και ανακλά την ακτινοβολία προς το κάτοπτρο M2.

Η ακτινοβολία από το κάτοπτρο M2 οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρων, ο οποίος περιστρέφεται και παρεμβάλλει το κατάλληλο φίλτρο ώστε να φιλτράρεται η δέσμη πριν προσπέσει στο μονοχρωμάτορα. Ο τροχός φίλτρων κινείται με τη βοήθεια ενός βηματικού κινητήρα και βρίσκεται σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτορα, ανάλογα με την περιοχή μήκους κύματος στην οποία λειτουργεί το όργανο. Από τον τροχό φίλτρων, η δέσμη κατευθύνεται μέσω μια σχισμής στο μονοχρωμάτορα και στη συνέχεια, η μονοχρωματική ακτινοβολία, προσπίπτει στο κάτοπτρο M3 που την προσανατολίζει στον διαχωριστή δέσμης. Το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται προς το κάτοπτρο M4 και το υπόλοιπο 50% ανακλάται στο κάτοπτρο M5.



Εικόνα 20: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματόμετρου απορρόφησης.

Το κάτοπτρο M4 προσανατολίζει τη δέσμη ακτινοβολίας στο υπό εξέταση δείγμα και η εξερχόμενη ακτινοβολία περνάει μέσω του φακού εστίασης στον ανιχνευτή. Αντίστοιχα, το κάτοπτρο M5 εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα αναφοράς και στη συνέχεια, μέσω άλλο φακού εστίασης. Στον ανιχνευτή.

Το προς εξέταση δείγμα και το δείγμα αναφοράς εισάγονται σε δυο κυβέττες που τοποθετούνται σε δυο συγκεκριμένες υποδοχές του οργάνου.

Ο έλεγχος και η ρύθμιση των παραμέτρων για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης ελέγχεται μέσω του προγράμματος UV WinLab στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

## Φασματόμετρο εκπομπής

Για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού των έξι ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το όργανο Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (Εικόνα 21).

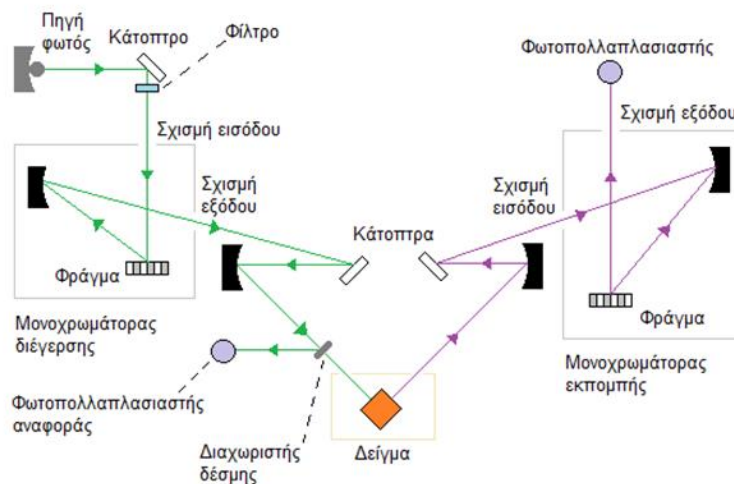


Εικόνα 21: Φασματόμετρο εκπομπής; Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer.

Οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν είτε για συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος των μηκών κύματος του οργάνου, είτε για συγκεκριμένα μήκη κύματος. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η σάρωση γίνεται στην περιοχή μεταξύ 520 και 700 nm, με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min και η διέγερση γίνεται στο μήκος κύματος που επιτυγχάνεται η μέγιστη απορρόφηση της κάθε ένωσης.

Παρακάτω παρουσιάζεται το οπτικό διάγραμμα διέγερσης και ανίχνευσης φθορισμού (Εικόνα 22). Η πηγή φωτός είναι μια λυχνία ξένου μεγάλης έντασης και μικρής χρονικής διάρκειας παλμού. Η ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα κάτοπτρο και προσανατολίζεται στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα φράγμα περίθλασης 1440 lines/nm και ένα σφαιρικό κάτοπτρο που οδηγεί την ακτινοβολία στη σχισμή εξόδου. Το εύρος σάρωσης του μονοχρωμάτορα διέγερσης είναι 200 nm – 800 nm.





Εικόνα 22: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματομέτρου εκπομπής.

Η μονοχρωματική ακτινοβολία εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου, σε συγκεκριμένη στενή φασματική περιοχή με το κεντρικό μήκος κύματος, που καθορίζεται από τη γωνιακή θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, που ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Η ακτινοβολία αυτή κατευθύνεται στο διαχωριστή δέσμης, από όπου ένα μέρος οδηγείται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς και το μεγαλύτερο ποσοστό της ακτινοβολίας οδηγείται στο δείγμα υπό γωνία  $45^\circ$ . Το δείγμα βρίσκεται μέσα σε κυβέττες σε συγκεκριμένο υποδοχέα του οργάνου. Η απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς διορθώνεται βάσει καμπύλης αναφοράς της ροδαμίνης που είναι αποθηκευμένη στο όργανο, η οποία διατηρεί σχεδόν σταθερή την κβαντική απόδοση για απορρόφηση μήκους κύματος 230 – 630 nm και εκπομπή στα 650 nm.

Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, υπό γωνία  $90^\circ$  ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται με τη χρήση κατόπτρων στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος αποτελείται επιπλέον από ένα σφαιρικό κάτοπτρο, ένα φράγμα περίθλασης 1200 lines/nm και τη σχισμή εξόδου. Το εύρος σάρωσης του μονοχρωμάτορα εκπομπής είναι 200 nm – 900 nm. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τον μονοχρωμάτορα εκπομπής συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή για περαιτέρω ανάλυση.

Ο έλεγχος και η ρύθμιση των παραμέτρων για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής ελέγχεται μέσω του προγράμματος FL WinLab στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.



### B.3.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα

Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για τρεις διαλύτες

#### Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία υπεριώδους – ορατού βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα μόρια της διαλυμένης ένωσης όπου προκαλούνται ηλεκτρονιακές διεγέρσεις. Στη συνέχεια, τα μόρια επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση, αφού αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η απεικόνιση της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης.

Στην ποσοτική ανάλυση με απορρόφηση μια δέσμη ακτινοβολίας  $I_0$  κατευθύνεται σε ένα δείγμα και μετριέται η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας. Για να έχουμε απορρόφηση πρέπει τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα να έχουν ενέργεια ίση με αυτήν που χρειάζεται για να προκληθεί μια ηλεκτρονιακή μεταβολή. Τότε μόνο παρατηρείται απορρόφηση, η οποία ελαττώνει την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας.

Η ποσοτική σχέση της απορρόφησης δίνεται από το νόμο Lambert – Beer, ο οποίος ορίζει τη σχέση μεταξύ της ελάττωσης της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του αναλύτη, μέσα από τον οποίο διέρχεται η ακτινοβολία.

Για την μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας ισχύει:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}$$
$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} \Rightarrow$$
$$A = \varepsilon \cdot C \cdot b$$

Όπου  $A$  η απορρόφηση

$I_0$  η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

$I$  η μειωμένη ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας

$T = I/I_0$  η διαπερατότητα (%), που δηλώνει το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα

$C$  η συγκέντρωση του δείγματος (mol/l)

$b$  το πάχος της κυψελίδας

$\varepsilon$  ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης (l/mol cm)

Το μέγεθος  $\varepsilon$  είναι ένα χαρακτηριστικό μέγεθος της κάθε ουσίας σε ορισμένο διαλύτη και μήκος κύματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η μοριακή απορροφητικότητα, τόσο μεγαλύτερη είναι

η ευαισθησία της μεθόδου απορρόφησης και ενδείκνυται για ποσοτικούς προσδιορισμούς ιχνών.

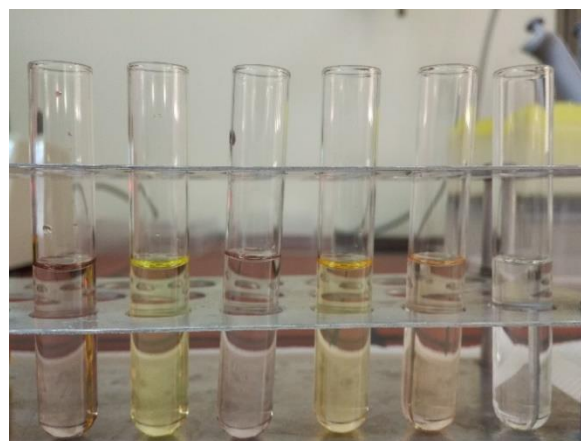
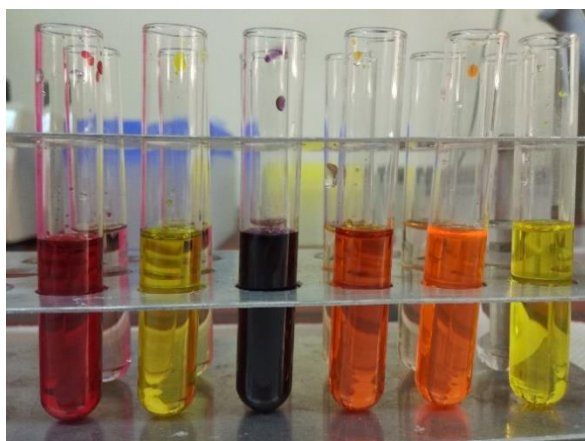
Τέλος, για να εφαρμόζεται ο νόμος Lambert – Beer όλα τα διαλύματα που μετρούνται πρέπει να είναι αραιά, σε περιοχή συγκεντρώσεων  $10^{-7} < c < 10^{-2} \text{ mol/l}$ [44].

### Πειραματική διαδικασία

- Αρχικά, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα των έξι ενώσεων συγκέντρωσης  $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  για όλες τις ενώσεις, με βάση τον τύπο  $c = \frac{m}{V \cdot Mr}$ , σε διαλύτη **DMSO**. Με διαδοχικές αραιώσεις προέκυψαν τελικά για την κάθε ένωση πέντε διαλύματα συγκεντρώσεων (Εικόνα 23):

$$2 \cdot 10^{-5} \text{ M } (20 \mu\text{M}), 10^{-5} \text{ M } (10 \mu\text{M}), 5 \cdot 10^{-6} \text{ M } (5 \mu\text{M}), 10^{-6} \text{ M } (1 \mu\text{M}) \text{ και } 5 \cdot 10^{-7} \text{ M } (0,5 \mu\text{M})$$

Ακολουθεί μηδενισμός του σήματος του διαλύτη και του θορύβου του οργάνου, ώστε να αφαιρείται σε κάθε μέτρηση το αντίστοιχο φάσμα και να απεικονίζεται μόνο το φάσμα απορρόφησης της ένωσης. Συνεπώς, πριν από οποιαδήποτε άλλη μέτρηση, εισάγεται ο διαλύτης DMSO σε δυο κυβέττες και γίνεται η πρώτη μέτρηση.



Εικόνα 23: Διαλύματα των έξι ενώσεων σε DMSO. Αριστερά η 1η διάλυση ( $50 \mu\text{M}$ ) και δεξιά η 4η διάλυση ( $10 \mu\text{M}$ ).

Στη συνέχεια, γίνεται μία προς μία μέτρηση των διαλυμάτων που εισάγονται σε κυβέττες χωρητικότητας 4,5 ml. Η σάρωση των δειγμάτων γίνεται με ακτινοβολία στην υπέρυθρη και ορατή περιοχή, από τα 350 nm έως τα 800 nm, με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

- Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τη μελέτη των έξι ενώσεων σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (**DCM**). Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με τη διάλυση των έξι ενώσεων σε DCM και ακολούθησε αραιώσή τους με τον ίδιο διαλύτη, με συγκεντρώσεις αυτές που προαναφέρθηκαν.

Το τυφλό δείγμα ήταν ο διαλύτης DCM και ακολούθησε μηδενισμός του σήματος του διαλύτη. Στη συνέχεια, έγινε μία προς μία η μέτρηση όλων των υπόλοιπων δειγμάτων.

- Για τη μελέτη των έξι ενώσεων σε διαλύτη **PBS**, παρασκευάστηκαν αρχικά έξι μητρικά διαλύματα με διαλύτη DMSO, συγκέντρωσης  $5 \cdot 10^{-3} M$ , λόγω της δυσκολίας διάλυσης των κουρκουμινονιδίων σε υδατικούς διαλύτες. Έπειτα, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις με διαλύτη PBS, ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκέντρωση  $10^{-5} M$  ( $10 \mu M$ ).

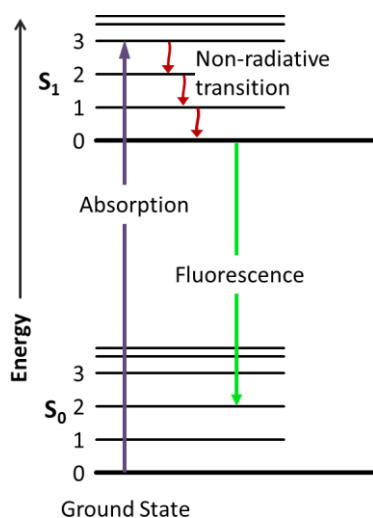
Το τυφλό δείγμα παρασκευάστηκε αντίστοιχα και έγινε η πρώτη μέτρηση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τα αραιωμένα διαλύματα.

## Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού των έξι ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO

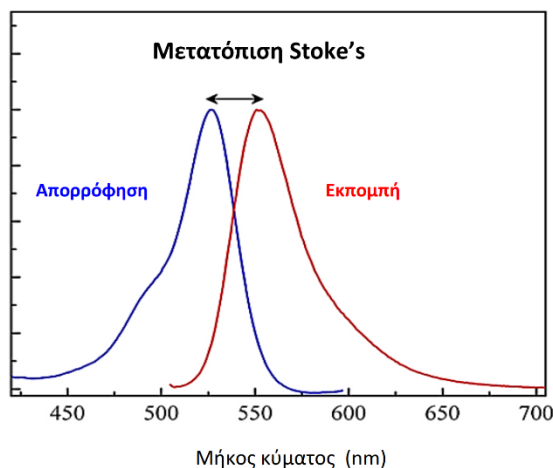
### Αρχή μεθόδου

Το χρωμοφόρο φθορισμού έχει χαρακτηριστικό φάσμα διέγερσης και φθορισμού. Αρχικά βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή του κατάσταση. Όπως αποτυπώνεται και στο διάγραμμα Jablonski (Εικόνα 24), όταν προσπέσει σε αυτό φως το απορροφάει και μεταβαίνει στη διεγερμένη κατάσταση σαν αποτέλεσμα μετάβασης σε υψηλότερη ενεργειακή τροχιά.

Αποδιεγερμένο το μόριο επανέρχεται στη βασική του κατάσταση εκπέμποντας ένα τμήμα της ενέργειας που πλέον διαθέτει με τη μορφή φωτός, το οποίο ονομάζεται φθορισμός. Ένα μέρος της αρχικής ενέργειας χάνεται πριν την εκπομπή του φθορισμού και για αυτό το εκπεμπόμενο φως είναι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από το μήκος κύματος διέγερσης.



Εικόνα 24: Διάγραμμα Jablonski.



Εικόνα 25: Μετατόπιση Stokes.

Το φάσμα εκπομπής του χρωμοφόρου είναι πάντα μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης. Η μετατόπιση αυτή κάνει δυνατό το διαχωρισμό του διεγείροντος από το εκπεμπόμενο φως με τη χρήση οπτικών φίλτρων. Το εκπεμπόμενο φως μπορεί στη συνέχεια να μετρηθεί. Η διαφορά ανάμεσα στα μέγιστα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής του χρωμοφόρου καλείται μετατόπιση Stokes (Εικόνα 25).

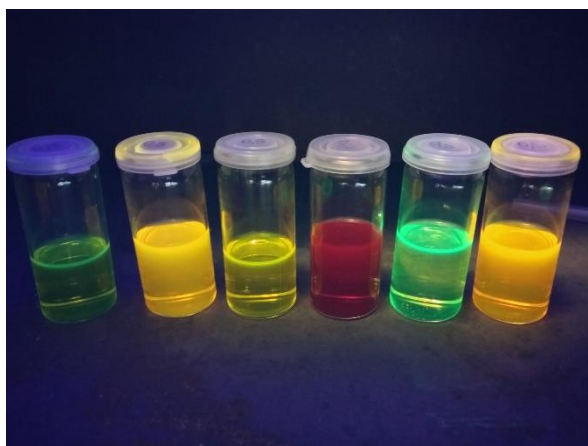
Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του χρωμοφόρου όταν το φως της διέγερσης έχει σταθερό μήκος κύματος και ένταση. Το σήμα φθορισμού γίνεται μη γραμμικό σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις χρωμοφόρου. [45]

### Πειραματική διαδικασία

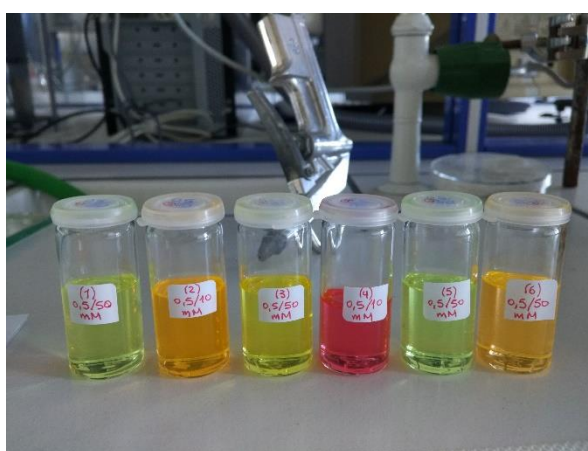
Αρχικά, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα συγκέντρωσης  $5 \cdot 10^{-3}$  M για όλες τις ενώσεις, με βάση τον τύπο  $c = \frac{m}{V \cdot Mr}$ , σε διαλύτη DMSO. Στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις προέκυψαν οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται σε κάθε περίπτωση.

Ακολουθεί μηδενισμός του σήματος του διαλύτη, σε περίπτωση ενδεχόμενου φθορισμού του διαλύτη, και του θορύβου του οργάνου, ώστε να αφαιρείται σε κάθε μέτρηση το αντίστοιχο φάσμα και να απεικονίζεται μόνο το φάσμα φθορισμού της ένωσης. Οπότε, πριν από οποιαδήποτε άλλη μέτρηση, εισάγεται ο διαλύτης DMSO σε δυο κυβέττες και γίνεται η πρώτη μέτρηση.

Στη συνέχεια, γίνεται μία προς μία μέτρηση των διαλυμάτων που εισάγονται σε κυβέττες χωρητικότητας 3 ml.



Εικόνα 26: Παρατήρηση των έξι διαλυμάτων (σε DMSO) κάτω από λάμπα φθορισμού.



Εικόνα 27: Διαλύματα των έξι ενώσεων σε DMSO.

Η μελέτη της έντασης φθορισμού έγινε μόνο για τα διαλύματα των ενώσεων σε DMSO (Dimethyl sulfoxide) της εταιρίας Sigma-Aldrich, καθώς προέκυψαν καλύτερα αποτελέσματα από τη μελέτη απορρόφησης σε σχέση με τα διαλύματα των ενώσεων σε DCM και PBS. Στις εικόνες Εικόνα 26 και Εικόνα 27 διακρίνονται τα διαλύματα των έξι ενώσεων σε φυσικό φως και υπό λάμπα φθορισμού αντίστοιχα.

## B.4. Βιολογική Αξιολόγηση

### B.4.1. Πειραματικές διατάξεις - Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της βιολογικής δράσης των ενώσεων αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Όλες οι πειραματικές διατάξεις και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για τη βιολογική αξιολόγηση των έξι οργανικών ενώσεων βρίσκονται στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

#### Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

Για τον έλεγχο ανάπτυξης της καλλιέργειας της καρκινικής σειράς PC3 και την προετοιμασία των πειραματικών διαδικασιών στο πλαίσιο της βιολογικής αξιολόγησης των ενώσεων χρησιμοποιούνται τα εξής όργανα:

- Θάλαμος νηματικής ροής (Vertical laminar flow), όπου εξασφαλίζεται ο χειρισμός των κυτταροκαλλιιεργειών σε στείρες συνθήκες.
- Επωαστήρας (Incubator), που εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιιεργειών.
- Οπτικό μικροσκόπιο, όπου παρατηρούνται οι κυτταροκαλλιιεργειες, η πορεία ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού και αν υπάρχει μόλυνση της καλλιέργειας.

#### Συνεστακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Η συνεστακή μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί μια πολύ σημαντική τεχνική στην βιοαπεικόνιση, δηλαδή την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων σε τρεις διαστάσεις. Δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της θέσης των ενώσεων μέσα στο κύτταρο όπου συντελούνται οι αλλαγές της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου. Με τη μικροσκοπία φθορισμού, γεγονότα που συμβαίνουν με ρυθμό μικρότερο από  $10^{-8}$  s μπορούν να ανιχνευθούν και να μετρηθούν με κατάλληλη διάταξη.

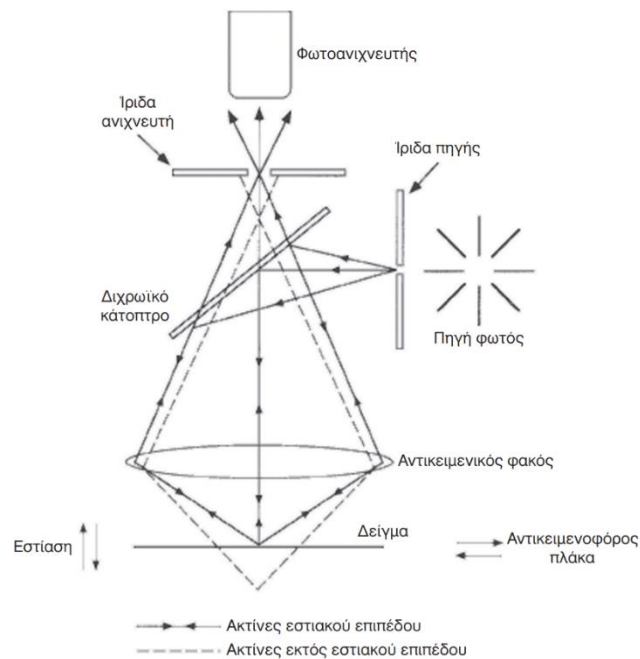
Παρακάτω παρουσιάζεται το οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του συνεστακού μικροσκοπίου φθορισμού (Εικόνα 28). Με τη συνεστακή μικροσκοπία φθορισμού είναι δυνατή η διέγερση φθορισμού κάθε φορά από έναν πολύ μικρό όγκο του δείγματος, με τη χρήση laser, καθώς η ακτινοβολία προσανατολίζεται σε διχρωμικό κάτοπτρο μέσω μιας ίριδας και περιορίζεται με αυτόν τον τρόπο το εστιακό επίπεδο σε έναν πολύ μικρό όγκο του δείγματος, της τάξης του 1  $\mu\text{m}$ .

Η πηγή φωτός είναι το laser και με τη χρήση φίλτρων απορρόφησης επιλέγεται η χαμηλότερη δυνατή ισχύς με την οποία θα επιτευχθεί όσο το δυνατόν πιο ικανοποιητικό σήμα και θα αποφευχθεί η φωτοκαταστροφή και η φωτοτοξικότητα.

Με την ακτινοβολία ενός σημείου κάθε φορά, η ένταση της ακτινοβολίας μειώνεται απότομα στο επίπεδο εστίασης, καθώς η δέσμη του φωτός συγκλίνει ή αποκλίνει. Έτσι

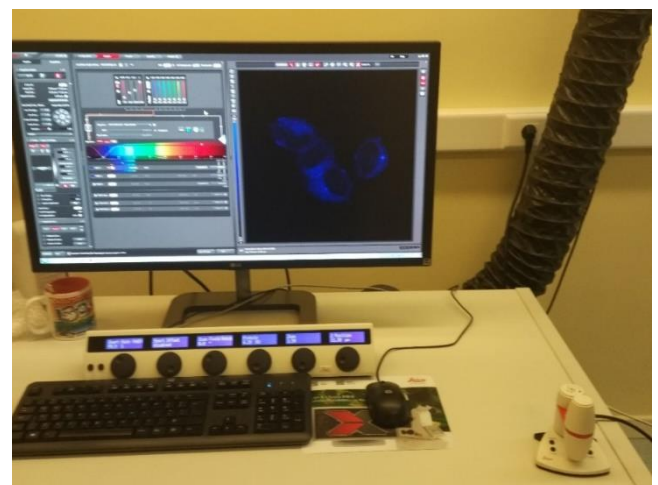
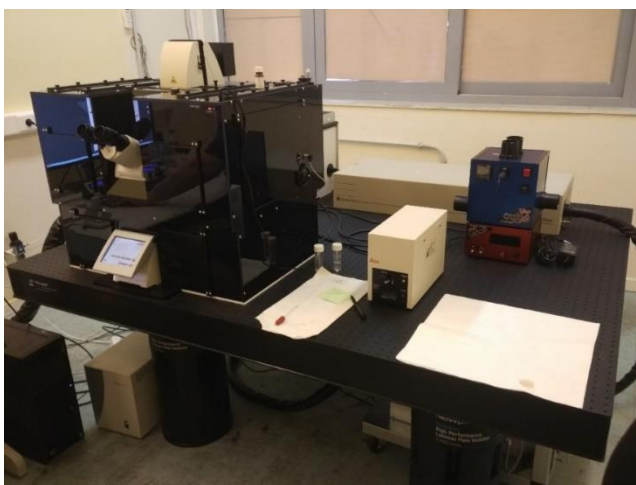


μειώνεται η διέγερση του φθορισμού των «αντικειμένων» που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου, έως το όριο που ορίζεται από την περίθλαση και επομένως η διακριτική ικανότητα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι πολύ μεγάλη. [46]



Εικόνα 28: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού.

Η απεικόνιση μιας περιοχής του δείγματος γίνεται με σάρωση του δείγματος και συλλογή εικόνων από όλα τα επίπεδά του και από όλα τα σημεία του οπτικού πεδίου. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μετακινώντας το δείγμα και διατηρώντας σταθερή την ακτίνα του laser, είτε μετακινώντας τη δέσμη του laser κατά μήκος του δείγματος, με τη βοήθεια γαλβανομετρικών κατόπτρων. Ο έλεγχος όλων των παραπάνω γίνεται με τη ρύθμιση των αντίστοιχων παραμέτρων από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι, συλλέγονται πολλές δισδιάστατες εικόνες σε διαφορετικό βάθος στο δείγμα, οι οποίες δίνουν μια τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικειμένου. Οι τρισδιάστατες αυτές εικόνες ονομάζονται «οπτικές τομές».

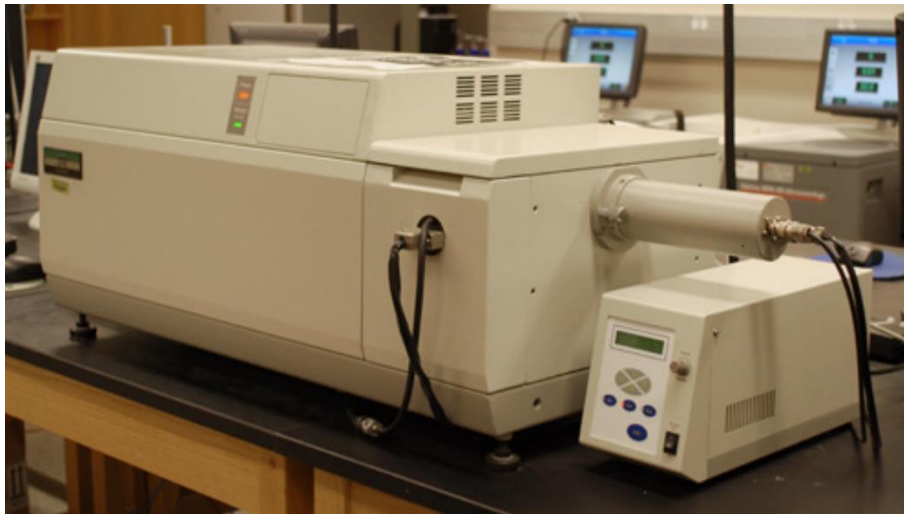


Εικόνα 29: Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP8 MP.

Προκειμένου να παρατηρηθούν οι καλλιέργειες της καρκινικής σειράς PC3 έπειτα από επώασή τους με τις έξι ενώσεις χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Germany) confocal microscope equipped with an IR MaiTai DeepSee Ti: Sapphire laser (Spectra-Physics, Santa Clara, CA) for multiphoton applications. Οι εικόνες αποκτήθηκαν με LAS X software (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) (Εικόνα 29).

### Πολωσίμετρο

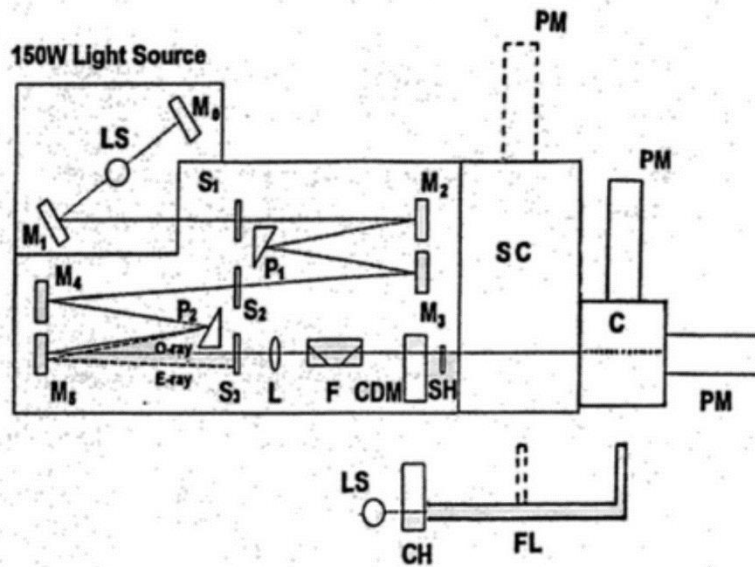
Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το Φασματόμετρο CD J 715: Spectropolarimeter, Jasco Corp (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Πολωσίμετρο J 715 from Jasco.



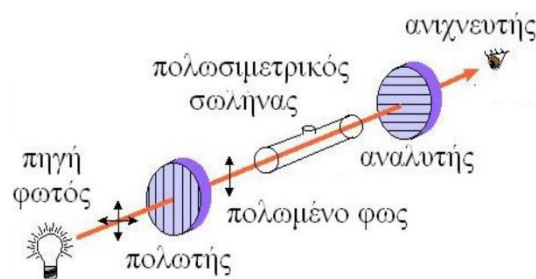
Στη συνέχεια παρουσιάζεται το οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του πολωσίμετρου (Εικόνα 31) και μια σχηματική απεικόνιση του οργάνου (Εικόνα 32):



Εικόνα 31: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας πολωσίμετρου.

Το πολωσίμετρο αποτελείται από ένα πολωτή, ένα πολωσιμετρικό σωλήνα που περιέχει το οπτικώς ενεργό υγρό, έναν αναλυτή που φέρει γωνιομετρικό κύκλο και από μία διόπτρα για την παρατήρηση. Ο πολωτής είναι ένα φίλτρο rolagoid, που το διαπερνά μόνο το φως που ταλαντώνεται σε μια συγκεκριμένη διεύθυνση. Το επίπεδο που ορίζεται από τη σχισμή του πολωτή ονομάζεται χαρακτηριστικό επίπεδο του πολωτή.

Ο αναλυτής είναι φίλτρο rolagoid με άξονα πόλωσης αρχικώς παράλληλο με του πολωτή. Αν το πολωμένο στο επίπεδο φως αλλάξει επίπεδο ταλάντωσης για να εμφανισθεί πάλι το φως πρέπει ο αναλυτής να στραφεί κατά γωνία  $\alpha$ . Αν η στροφή γίνει κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού, το υλικό ονομάζεται δεξιόστροφο, ενώ στην αντίθετη περίπτωση αριστερόστροφο.



Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση πολωσίμετρου.

## B.4.2. Μεθοδολογίες - Πρωτόκολλα

### Κυτταρικές καλλιέργειες

#### Κατάψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα παγωμένα σε δοχείο υγρού αζώτου. Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται μετά από καλλιέργειά τους και αφού έχουν καλύψει το 80 - 90% της επιφάνειας της φλάσκας. Ακολουθεί θρυψινοποίηση, για αποκόλληση των κυττάρων, και στη συνέχεια επαναιώρηση σε διάλυμα 90% ορού FBS – 10% DMSO και κατανομή σε κρυοφιαλίδια, τα οποία τοποθετούνται σε δοχείο υγρού αζώτου.

Η διαδικασία της ψύξης γίνεται σταδιακά με διαδοχική τοποθέτηση των φιαλιδίων με τα κύτταρα για 30 λεπτά στους 4°C, 1 ώρα στους -20°C, 16 – 20 ώρες στους -80°C και τελικά μεταφορά σε ειδικές φιάλες αζώτου (-196°C), ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων. Επίσης, παρουσία του DMSO αποφεύγεται η διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης που επέρχεται από την αύξηση του κυτταρικού όγκου κατά το σχηματισμό των παγοκρυστάλλων κατά την κυτταρική ψύξη.

#### Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα αποψύχονται ταχύτατα με τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, φυγοκεντρώνονται στα 1200 rpm για 10 λεπτά και στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται προσεκτικά σε πλήρες θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται σε νέες φλάσκες για καλλιέργεια.

#### Καλλιέργεια κυττάρων

Η κυτταρική σειρά καλλιεργείται σε ειδικά δοχεία (φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών), τα οποία είναι κατάλληλα διαμορφωμένα ώστε τα κύτταρα της καλλιέργειας να είναι σε επαφή με το ρυθμιζόμενο περιβάλλον του επωαστικού κλίβανου. Τα κύτταρα προσκολλώνται στον πυθμένα της φλάσκας και αναπτύσσονται καλύπτοντας την επιφάνεια που έχουν διαθέσιμη. Η προσκόλληση οφείλεται στην έκκριση από τα κύτταρα διαφόρων ινωδών πρωτεϊνών και συστατικών προσκόλλησης, όπως η λαμινίνη, η φμπρονεκτίνη και το κολλαγόνο. Μετά το πέρας της διαδικασίας προσκόλλησης, τα κύτταρα λαμβάνουν χαρακτηριστική μορφολογία (ινοβλαστών, επιθηλιακών κυττάρων κλπ.).

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας *in vitro* πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM). Η φλάσκα τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο, η ατμόσφαιρα του οποίου περιέχει σταθερό ποσοστό οξυγόνου (συνήθως 95%) και διοξειδίου του άνθρακα (συνήθως 5%). Η θερμοκρασία του επωαστικού κλίβανου παραμένει στους 37°C, η οποία είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη των κυττάρων. Μέσα στον κλίβανο υπάρχει ένα δοχείο με απεσταγμένο – αποστειρωμένο νερό για να διατηρείται η υγρασία στο χώρο και να αποφεύγεται η εξάτμιση της καλλιέργειας, ενώ ένας ανεμιστήρας διατηρεί ομοιόμορφες τις συνθήκες στην ατμόσφαιρα.

### Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν η πυκνότητα της φλάσκας προσεγγίζει το 90 – 100 % απομακρύνονται τουλάχιστον τα μισά κύτταρα για να μην υπάρξει αναστολή της ανάπτυξής τους και θάνατος, λόγω της αλλαγής των μεταβολικών τους διαδικασιών, κάτι που παρατηρείται. Για την αποκόλληση των κυττάρων εφαρμόζεται η τεχνική της θρυψινοποίησης, που επιτυγχάνεται με τη έκθεση των κυττάρων στο πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, η οποία πέπτει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης που συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου - κυττάρου και κυττάρου - επιφάνειας φιάλης. Το ένζυμο αυτό έχει μεγαλύτερη δραστικότητα μετά την απομάκρυνση των ιόντων  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ , τα οποία χρειάζονται οι ιντεγκρίνες για να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες για την κυτταρική προσκόλληση. Η απομάκρυνση αυτών των κατιόντων γίνεται με τη βοήθεια της χηλικής ένωσης EDTA.

- Αρχικά, παρατηρείται μακροσκοπικά η κυτταρική καλλιέργεια. Από το χρώμα του θρεπτικού υλικού προκύπτει μια πρώτη εκτίμηση του πληθυσμού της καλλιέργειας. Αν έχει αλλάξει χρώμα είναι πολύ πιθανό να υπάρχει υπερπληθυσμός στην καλλιέργεια. Στη συνέχεια, παρατηρείται το τριβλίο στο μικροσκόπιο για εκτίμηση της κατάστασης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Τα κύτταρα που είναι κολλημένα στον πάτο της φλάσκας είναι τα υγιή κύτταρα της καλλιέργειας, ενώ όσα επιπλέουν στο θρεπτικό υλικό είναι νεκρά.
- Αν το μεγαλύτερο μέρος της φλάσκας έχει καλυφθεί από κύτταρα, η φλάσκα μεταφέρεται σε θάλαμο νηματικής ροής, ο οποίος έχει αποστειρωθεί νωρίτερα, για διαχείριση της καλλιέργειας σε στείρες συνθήκες.
- Αναρρόφηση υπό κενό του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας με χρήση σιφωνίου.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 2 ml PBS δύο φορές, ώστε να απομακρυνθούν κατάλοιπα που πιθανόν να υπάρχουν πάνω στα κύτταρα, όπως ίχνη ορού, τα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης.
- Προσθήκη 1,5 ml διαλύματος θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων και επώαση στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, το πολύ για 10 λεπτά. Παράλληλα, παρατηρείται στο μικροσκόπιο η εξέλιξη της αποκόλλησης των κυττάρων.
- Αναστολή της δράσης της θρυψίνης με προσθήκη ίδιας ποσότητας θρεπτικού υλικού στη φλάσκα.
- Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωλήνα (falcon 15 ml), όπου γίνεται pipetting για να σπάσουν τα συσσωματώματα.
- Ανάλογα με την πειραματική διαδικασία στην οποία θα υποβληθούν στη συνέχεια τα κύτταρα, διαλέγεται και το είδος του πλακιδίου που θα χρησιμοποιηθεί. (6 wells plate ή 96 wells plate)
- Μεταφορά ίδιας ποσότητας του εναιωρήματος με τα κύτταρα στα πηγαδάκια, με τη βοήθεια πιπέτας και προσθήκη μικρής ποσότητας θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι.

- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο των επιμέρους καλλιιεργειών, ώστε να είναι σίγουρο ότι υπάρχουν κύτταρα σε κάθε πηγαδάκι και η καλλιέργεια τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο.
- Όσα κύτταρα δεν κατάφεραν να αποκολληθούν από την επιφάνεια της φλάσκας επανατοποθετούνται στον επωαστήρα με θρεπτικό υλικό για μια εβδομάδα με αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανά τρεις ημέρες, ώστε να αναπτυχθούν και να δώσουν μια νέα αποικία.

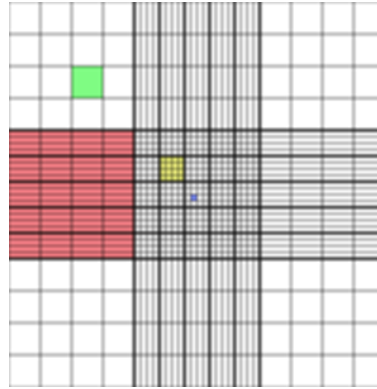
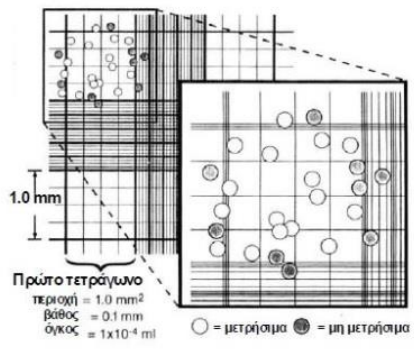
### *Μέτρηση αριθμού κυττάρων*

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με σκοπό να υπάρχει ακρίβεια στη διεξαγωγή των πειραμάτων, ώστε οποιαδήποτε διαδικασία ακολουθηθεί στη συνέχεια να δώσει πιο αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα, κάτι που επιτυγχάνεται με την κατανομή του εναιωρήματος των κυττάρων σε περισσότερα φρεάτια με κατά μέσο όρο ίδιο πληθυσμό στο καθένα.

Για να μετρηθούν τα κύτταρα χρησιμοποιείται το αιματοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer), το οποίο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δυο κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες. Η κάθε επιφάνεια αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος (Εικόνα 33). Κάθε ένα από τα τέσσερα τετράγωνα έχει επιφάνεια  $1 \text{ mm}^2$  και έχει διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Από τα 9 κύρια τετράγωνα μόνο τα 4 χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση.

Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται  $0,1 \text{ mm}$  χαμηλότερα από τις δυο ράχες στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη επιφάνεια μεταφέρεται μικρή ποσότητα από το εναιώρημα με τα κύτταρα, το οποίο λόγω της τριχοειδούς αναρρίχησης απλώνεται σε όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια.

- Τοποθέτηση καλυπτρίδας στο αιματοκυτταρόμετρο και με τη χρήση πιπέτας προστίθενται  $10 \mu\text{L}$  από το κυτταρικό εναιώρημα στην άκρη της καλυπτρίδας, έτσι ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια, λόγω της τριχοειδούς αναρρίχησης.
- Μέτρηση κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε τεταρτημόριο στο οπτικό μικροσκόπιο Ο αριθμός των κυττάρων ανά  $\text{mL}$  αρχικού εναιωρήματος ισούται με τον μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων στα τέσσερα διαμερίσματα του αιματοκυτταρομέτρου επί  $10^4$ . Αφού προκύψει ένας μέσος όρος για τον πληθυσμό τους, υπολογίζεται πόση από την ποσότητα θρεπτικού υλικού μαζί με κύτταρα πρέπει να καλλιιεργηθούν στα φρεάτια που θα χρησιμοποιηθούν.



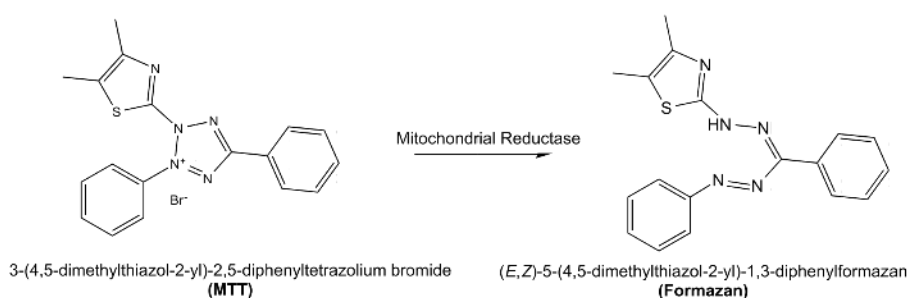
Εικόνα 33: Πλάκα Neubauer για τη μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού.

## Μελέτη κυτταροτοξικότητας

### Αρχή μεθόδου

Τα κύτταρα στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους εκτίθενται στις υπό μελέτη ενώσεις. Η διάρκεια επώασης των κυττάρων ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να επιδράσουν σε ικανοποιητικό βαθμό στην κυτταρική καλλιέργεια.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η δοκιμασία MTT, η οποία αποτελεί χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των ζώντων κυττάρων να διασπούν το τετραζολικό δακτύλιο του ασθενώς κίτρινου άλατος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), με αποτέλεσμα το σχηματισμό αδιάλυτων στο νερό, κυανών κρυστάλλων ενός παραγώγου φορμαζάνης (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Χημική δομή MTT και κρυστάλλων φορμαζάνης.

Ο χρόνος επώασης με το MTT προσδιορίζεται ανάλογα με τον τύπο κυττάρων και τις πειραματικές συνθήκες και είναι συνήθως 1 έως 3 ώρες. Η ποσότητα της παραγόμενης φορμαζάνης μπορεί να προσδιοριστεί φασματομετρικά όταν διαλυτοποιηθεί σε κατάλληλο διαλύτη, που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι DMSO. Με τον τρόπο αυτό μετρείται έμμεσα ο αριθμός των κυττάρων που επιβίωσαν.

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι μια γρήγορη και εύκολη πειραματική μέθοδος και μπορούν να διεξαχθούν πολλές δοκιμές σε μια μόνο παρτίδα, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η σύγκριση μεταξύ των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε διαφορετικές ενώσεις και με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αποτελεί, ωστόσο, μια καταστρεπτική μέθοδο και συνεπώς τα κύτταρα δεν μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.

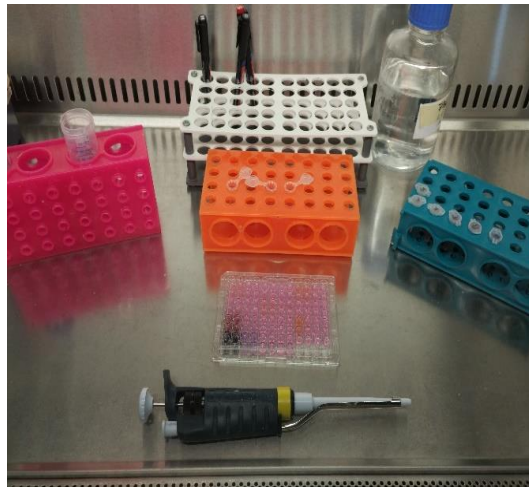
## Πειραματική διαδικασία

- Αρχικά, η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί και ακολουθεί αποκόλληση της προσκολλημένης κυτταρικής καλλιέργειας από τη φλάσκα με την διαδικασία που αναγράφεται παραπάνω.
- Μέτρηση των κυττάρων στο αιματοκυτταρόμετρο και υπολογισμός, προσεγγιστικά, του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων. Προέκυψαν  $4 \cdot 10^5$  κύτταρα, από τα οποία  $3 \cdot 10^5$  κύτταρα διανεμήθηκαν σε 92 πηγαδάκια πλάκας μικροτιτλοδότησης (Εικόνα 35).
- Τα κύτταρα αφήνονται στον επωαστικό κλίβανο να πολλαπλασιαστούν για 24 ώρες.
- Με το πέρας των 24 ωρών, ελέγχεται η πρόοδος ανάπτυξής τους στο μικροσκόπιο και αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό, σε στείρες συνθήκες.
- Ακολουθεί αραιώση των 6 ενώσεων με το θρεπτικό υλικό, καθεμία από τις οποίες αραιώνεται σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 mM, 1mM, 100μM, 10 μM, 100 nM), ως εξής:
  - a. Χρησιμοποιήθηκαν 18 ντορφάκια, σε καθένα από τα οποία προστίθενται 0,45 mL θρεπτικό υλικό DMEM.
  - b. Όλες οι ενώσεις είναι διαλυμένες σε DMSO και έχουν αρχική συγκέντρωση 10 mM. Στο πρώτο ντορφάκι με DMEM προστίθενται 10 μL της πρώτης ένωσης, συγκέντρωσης 10 mM, και 990 μL PBS, οπότε προκύπτει συγκέντρωση 1 mM.
  - c. Στο δεύτερο ντορφάκι προστίθενται 50 μL από το πρώτο ντορφάκι και συμπληρώνονται 450 μL DMEM, οπότε προκύπτει συγκέντρωση 100 μM και τελικό όγκο 500 μL.
  - d. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για ακόμα τρία ντορφάκια όπου θα περιέχουν την ένωση σε συγκεντρώσεις 10 μM, 1 μM και 100 nM.
  - e. Για κάθε ένωση χρησιμοποιούνται πέντε ντορφάκια που χρησιμοποιούνται οι παραπάνω αναλογίες, ώστε να περιέχουν τις επιθυμητές συγκεντρώσεις.
  - f. Σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιούνται 100 μL από κάθε ντορφάκι.
- Κάθε ένωση προστίθεται σε 4 πηγαδάκια και αφήνονται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες, ώστε να μπορέσουν οι ενώσεις να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα.
- Αφού γίνει η επώαση με τις ενώσεις, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται η ένωση MTT διαλυμένη σε θρεπτικό υλικό σε αναλογία 1mg MTT/ 10 mL DMEM, και προστίθενται 100 μL σε κάθε πηγαδάκι.
- Με την προσθήκη του MTT, τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 4 ώρες, ώστε να δημιουργηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης μέσα στα κύτταρα.





Εικόνα 35: Πλακίδιο με 96 θέσεις.



Εικόνα 36: Υλικά για την προετοιμασία της δοκιμής MTT.

- Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο προσεκτικά να μην παρασυρθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης, προστίθενται 100  $\mu$ L DMSO σε κάθε πηγαδάκι και τέλος μετριέται η απορρόφηση των κρυστάλλων στα 540 nm.



### Ενδοκυττάριος Χωρικός εντοπισμός των κουρκουμινοειδών στα κύτταρα της σειράς PC3

Στην παρούσα διπλωματική μελετάται ο χωρικός εντοπισμός των έξι ενώσεων, οι οποίες έχουν συντεθεί, στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτη, PC3.

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού μιας ένωσης μέσα στα κύτταρα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη χρήση της ως μελλοντικό φωτοευαισθητοποιητή στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Η αποδοτικότητα των φωτοεθαισθητοποιητών εξαρτάται από την εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν για συγκεκριμένα είδη κυττάρων και από τον υποκυττάριο εντοπισμό τους. Κατά τη χορήγηση, διαφορετικοί φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να εντοπιστούν σε διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και μεμβράνες, ανάλογα με τις φυσικοχημικές και δεσμευτικές ιδιότητες της κάθε ένωσης, αν είναι λιπόφιλη ή υδρόφιλη, το φορτίο και τη χημική δομή [47].

Η κατανομή της κάθε ένωσης μέσα στο κύτταρο σχετίζεται άμεσα με το συγκεκριμένο τύπο κυτταρικού θανάτου. Μεταξύ διάφορων υποκυττάρων στόχων, τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς παρέχουν ενέργεια για τα κύτταρα και συμβάλλουν στην απόπτωση των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, μεγάλη προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη φωτοευαισθητοποιητών που να στοχεύουν μιτοχόνδρια. Οι ενώσεις αυτές στηρίζονται κυρίως σε κατιονικά μόρια, καθώς επιτρέπουν την ιοντική αλληλεπίδραση με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ωστόσο, χρειάζεται να περιορίζονται μόνο στα κύτταρα στόχους, καθώς μπορούν να βλάψουν και υγιή κύτταρα, οδηγώντας σε ανεπιθύμητες ενέργειες [48] [49].

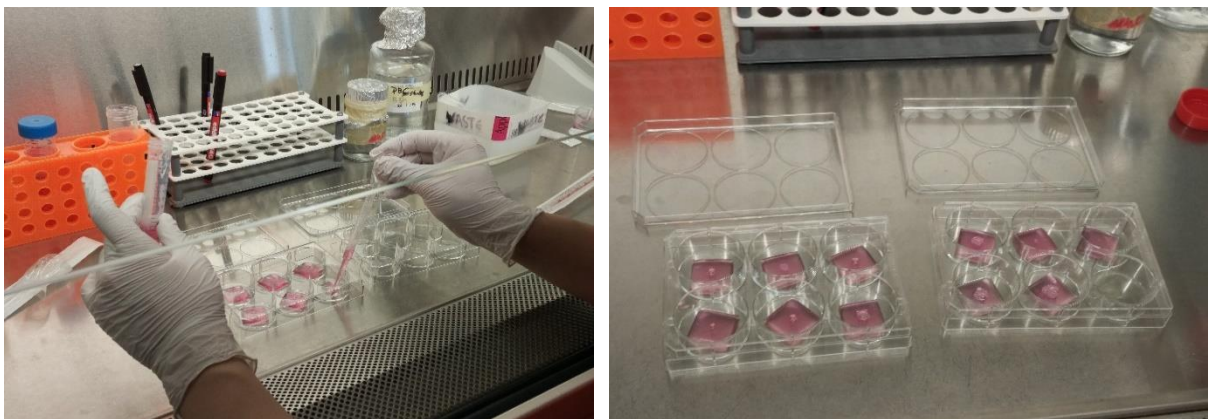
Σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα μπορούν να οδηγήσουν ακόμα ενώσεις που συγκεντρώνονται στον πυρήνα των κυττάρων. Οι ενώσεις αυτές ενδέχεται να αλληλεπιδράσουν με το DNA, να το αλλοιώσουν και να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και νέες ογκογενέσεις [49].

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού των ενώσεων στα κύτταρα γίνεται με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης φθορισμού με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy).

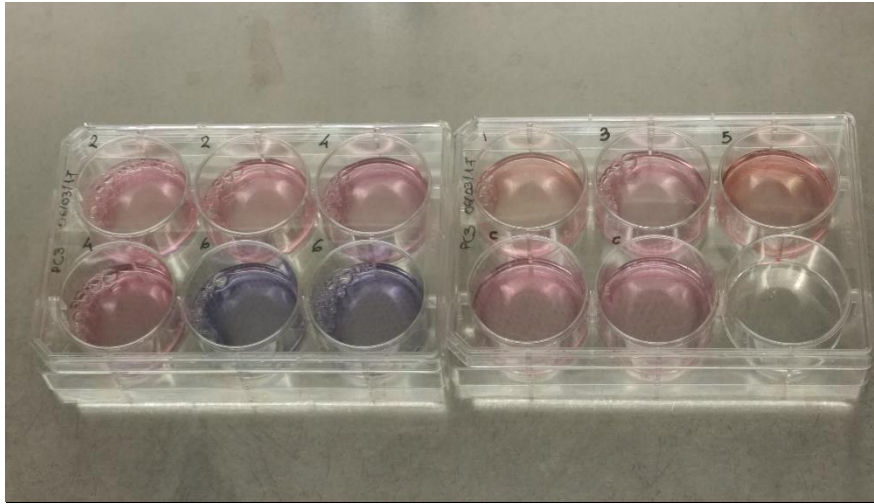
Γίνονται δύο σερ πειραμάτων. Στο πρώτο σερ ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τις υπό μελέτη ουσίες είναι μια ώρα και στο δεύτερο ο χρόνος επώασης είναι έξι ώρες. Κάθε ένωση χορηγείται σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$ , ενώ το χρονικό διάστημα που αφήνονται να επωαστούν τα κύτταρα με τις ενώσεις επιλέγεται ώστε να έχουν αλληλεπιδράσει, αλλά να μην έχει επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό ο πληθυσμός των κυττάρων.

Προετοιμασία κυτταρικής καλλιέργειας:

- Αρχικά, γίνεται ανακαλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων από τη φλάσκα σε πλακίδιο με έξι θέσεις (6-well plate) και χρησιμοποιούνται συνολικά εννέα πηγαδάκια για κάθε σερ πειραμάτων, όπου έχουν τοποθετηθεί καλυπτρίδες πάνω στις οποίες θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια (Εικόνα 37). Οι συμπλοκοποιημένες με το  $\text{BF}_2$  ενώσεις, δηλαδή οι ενώσεις 2, 4 και 6 καθώς και το control θα προστεθούν σε δύο πηγαδάκια η καθεμία. Το control δεν θα περιέχει κάποια από τις εξεταζόμενες ενώσεις, οπότε θα αποτελεί ένα μέτρο σύγκρισης των «υγείων» κυττάρων με αυτά που θα τους χορηγηθούν οι έξι ενώσεις.
- Ακολουθεί η αραιώση των έξι ενώσεων με θρεπτικό υλικό, ώστε η τελική συγκέντρωση όλων να είναι 1  $\mu\text{M}$ . Το ποσοστό του DMSO χρειάζεται να είναι μικρότερο από 1%, καθώς σε μεγαλύτερα ποσοστά είναι τοξικό για τα κύτταρα, κάτι που θα αλλοίωνε το αποτέλεσμα της μελέτης. Οι αραιωμένες ενώσεις προστίθενται στις καλλιέργειες, οι οποίες αφήνονται στον επωαστικό κλίβανο για 1 και για 6 ώρες, ώστε να αλληλεπιδράσουν οι ενώσεις με τα κύτταρα (Εικόνα 38).

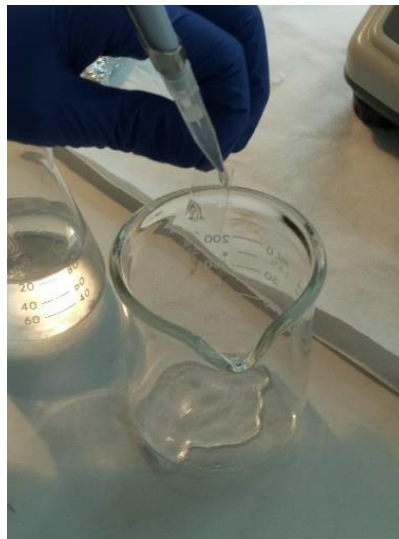


Εικόνα 37: Καλυπτρίδες με καλλιέργειες καρκινικής σειράς PC3 σε πλακίδια 6 θέσεων.



Εικόνα 38: Επώαση των κυτταρικών καλλιέργειών με τις έξι ενώσεις και θρεπτικό υλικό.

- Έπειτα, παρατηρείται η ύπαρξη ή μη κυττάρων στις καλλιέργειες και εφόσον υπάρχουν προσκολλημένα κύτταρα, σε μη στείρες πλέον συνθήκες, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και αφαιρούνται προσεκτικά με λαβίδα οι καλυπτρίδες από το 6-well plate .
- Η κάθε καλυπτρίδα ξεπλένεται με PBS και στραγγίζεται καλά σε απορροφητικό χαρτί (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Χρήση PBS για απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού από την καλλιέργεια.

- Πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο που θα ακουμπήσει η καλυπτρίδα, προστίθεται μια σταγόνα mountain fluid (antifade), ώστε να αποφευχθεί η φωτολεύκανση (Εικόνα 40).
- Στη συνέχεια, η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, με τέτοιο τρόπο που τα κύτταρα να ακουμπάνε πάνω στην πλάκα.



Εικόνα 40: Προσθήκη mountain fluid στη θέση που θα τοποθετηθεί η καλυπτρίδα.

- Διασφαλίζεται ότι η καλυπτρίδα θα παραμείνει σταθερή πάνω στην πλάκα κατά τη διάρκεια του πειράματος, με τη χρήση μικρής ποσότητας βερνικιού στις άκρες. Επίσης, διασφαλίζεται ότι οι καλλιέργειες δεν θα είναι εκτεθειμένες στο φως μέχρι να παρατηρηθούν στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

### Κυκλικός Διχρωσμός (Circular Dichroism, CD)

Σκοπός της μελέτης των ενώσεων με κυκλικό διχρωισμό αποτελεί η αλληλεπίδραση τους με το DNA των κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε ώστε να γίνει μια εκτίμηση των δομικών αλλαγών του DNA μετά από επώαση με τις έξι ενώσεις που μελετώνται. Να προσδιοριστεί, δηλαδή, αν οι ενώσεις σχηματίζουν δεσμούς με το μόριο του DNA, ώστε να εκτιμηθεί αν η κυτταροτοξικότητα των ενώσεων οφείλεται στην αλληλεπίδραση με το DNA ή οφείλεται σε άλλους παράγοντες.

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού χρησιμοποιείται για τη μελέτη της διαμόρφωσης βιολογικών μακρομορίων και της σταθερότητάς τους σε διαφορετικές συνθήκες, για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μακρομορίων, αλλά και των μακρομορίων με προσδέτες όπως φάρμακα, αναστολείς, ενεργοποιητές, κλπ. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να ανιχνευθούν πιθανές αλλαγές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA (A-, B-, Z-), λόγω της παρουσίας κάποιας ουσίας που παρεμβαίνει στη δομή και τη συμμετρία του μορίου, μπορεί να καθοριστεί η δευτερογενής και η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών και πιθανές αλλαγές λόγω επέμβασης στις συνθήκες και στο περιβάλλον του μακρομορίου.

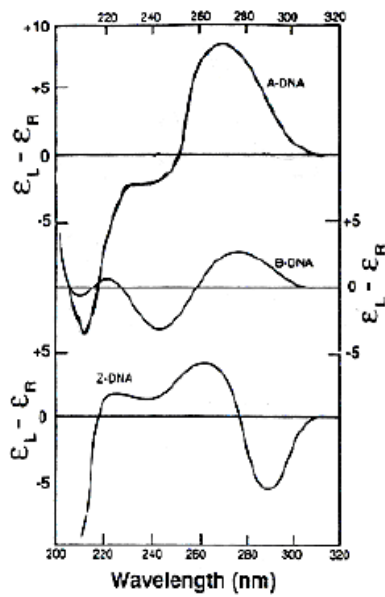
### Αρχή μεθόδου

Ένα μόριο μπορεί να χαρακτηριστεί **οπτικώς ενεργό μόριο** εφόσον είναι χειρόμορφο μόριο, δηλαδή το κατοπτρικό είδωλό του δεν συμπίπτει με αυτό. Η οπτική ενεργότητα προέρχεται από την έλλειψη συμμετρίας του μορίου, από την παρουσία του ασύμμετρου άνθρακα και την επίδρασή του στα γειτονικά χρωμοφόρα, που απορροφούν την προσπίπτουσα

ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και έντασης. Στα μακρομόρια η οπτική ενεργότητα είναι αποτέλεσμα της διαμόρφωσης και συμμετρίας του συνολικού μακρομορίου και πώς αυτό επηρεάζει και αλληλεπιδρά με τα γειτονικά χρωμοφόρα και όχι μεμονωμένων μονάδων που τις αποτελούν.

Τα χειρόμορφα μόρια, λόγω του ότι είναι οπτικώς ενεργά, μπορούν να διαχωρίσουν το δεξιόστροφο από το αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Όταν η γραμμικώς πολωμένη ακτινοβολία φωτός προσπέσει σε ένα οπτικά ενεργό μέσο τότε οι κυκλικά πολωμένες συνιστώσες αυτής (δεξιόστροφη και αριστερόστροφη) κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες εξαιτίας του διαφορετικού δείκτη διάθλασης αυτών) και συνεπώς έχουν και διαφορετικά μήκη κύματος. Κατά συνέπεια διαφοροποιούνται και οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας για τις δυο αυτές συνιστώσες λόγω απορρόφησης της ακτινοβολίας από το οπτικά ενεργό μέσο. Η διαφορά απορρόφησης του αριστερόστροφου και του δεξιόστροφου πολωμένου φωτός, λόγω του διαφορετικού συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας, καλείται **κυκλικός διχρωσμός**.

Οι πουρινικές (αδενίνη, γουανίνη) και οι πυριμιδινικές βάσεις (θυμίνη, κυτοσίνη) στα νουκλεϊκά οξέα είναι υπεύθυνες για τα φάσματα απορρόφησης ορατού – υπεριώδους καθώς επίσης και για το διχρωικό σήμα. Η οπτική τους ενεργότητα οφείλεται στο σάκχαρο που βρίσκεται στο C1' της δεοξυριβόζης. Οι ταινίες του φάσματος CD είναι είτε θετικές είτε αρνητικές. Το σπρίνγκ των αρωματικών βάσεων επηρεάζει άμεσα τη μορφή των φασμάτων CD. Λόγω των υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο μόριο του DNA καθώς και λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων μέσω των π-ηλεκτρονίων το μόριο του DNA υιοθετεί ελικοειδή δομή. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των βάσεων (χρωμοφόρων) μπορούν και αλληλεπιδρούν δίνοντας έτσι ισχυρά διχρωικά σήματα. Ανάλογα με τη διαμόρφωση του DNA (A-, B-, ή Z-) λαμβάνεται και διαφορετικό φάσμα CD, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 41).



Διαμόρφωση DNA	Μήκος κύματος ταινιών (nm)
A-	180, 186, 210, 270, 300 (μηδέν)
B-	180, 186, 245, 258 (μηδέν), 275
Z-	184 (μηδέν), 190-195, 260, 290

Εικόνα 41: Φάσμα CD.

Συνεπώς, από το φάσμα CD μπορεί να γίνει διαχωρισμός των διαφορετικών διαμορφώσεων του DNA. Η σχεδόν ανάστροφη μορφή του φάσματος Z-DNA σε σχέση με το φάσμα B-DNA αποτέλεσαν την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη αριστερόστροφης έλικας. Βέβαια, η μόνη περίπτωση που μπορεί να εμφανίσει διχρωικό σήμα ένα μη χειρόμορφο μόριο είναι όταν συνδεθεί με ένα χειρόμορφο μόριο (οπτικά ενεργό), λόγω του φαινομένου εξ' επαγωγής κυκλικού διχρωισμού (Induced Circular Dichroism, ICD). Σε αυτό το φαινόμενο στηριχτήκαμε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη και του συμπλόκου (μη χειρόμορφα μόρια) με το DNA (χειρόμορφο μόριο).

## Πειραματική διαδικασία

Η παρασκευή του διαλύματος DNA, που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, απαιτεί αρχικά την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων για το DNA και έπειτα την παρασκευή του ίδιου του διαλύματος του DNA.

Αρχικά, παρασκευάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα:

- Για την παρασκευή του πρώτου ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ :

Διάλυμα A: Ζυγίζονται 1,7867 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και αραιώνονται με απιονισμένο νερό milli-Q μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Διάλυμα B: Ζυγίζονται 0,9073 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  και αραιώνονται με νερό milli-Q μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Στη συνέχεια, αναμιγνύονται 58,7 ml του διαλύματος A και 41,3 ml του διαλύματος B με τελικό όγκο 100 ml, το οποίο αποτελεί το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ , με έχει  $\text{pH} \approx 7$ . Το pH μετριέται κάθε φορά πριν τη χρήση του.

- Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10:

Γίνεται αραιώση του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  1:10 ως εξής: Λαμβάνονται 10 ml του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  και αραιώνονται με απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με  $\text{Na}^+$ , 0,1 M σε NaCl:

Ζυγίζονται 0,5844 g NaCl και διαλύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα DNA 1:10 με τελικό όγκο 100 ml. Εναλλακτικά, αναμιγνύονται 10 ml του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  με απιονισμένο νερό milli-Q μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα DNA και υπολογίζεται η συγκέντρωσή του:

Ζυγίζονται 5 mg ινών φυσικού DNA θύμου αδένος βοοειδούς και προστίθενται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με  $\text{Na}^+$ . Το διάλυμα τοποθετείται σε φιαλίδιο και αφήνεται για μία νύχτα σε ήπια ανάδευση στο σκοτάδι.

Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό του DNA αραιώνεται σε αναλογία 1:20 παίρνοντας την κατάλληλη ποσότητα πυκνού διαλύματος και ρυθμιστικού, ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να παρασκευάσουμε, π.χ. αναμιγνύουμε 0,1 ml του διαλύματος DNA και 1,9 ml του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10.

- Για την αρχική μέτρηση (baselines) παρασκευάζεται το εξής διάλυμα:

Αναμιγνύονται 0,1 ml του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10 με  $\text{Na}^+$ , 0,1 M σε NaCl και 1,9 ml του ρυθμιστικού διαλύματος DNA 1:10. Ο συντελεστής απορρόφησης του DNA στα 258 nm είναι  $\epsilon = 6.600$  και μετρώντας την απορρόφηση υπολογίζεται κάθε φορά η συγκέντρωση του διαλύματος DNA.

➤ Για την παρασκευή διαλυμάτων κουρκουμινοειδών – DNA

Παρασκευάζονται σειρές διαλυμάτων κάθε κουρκουμινοειδούς με DNA σταθερής συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$ . Οι τελικές συγκεντρώσεις των ενώσεων της κουρκουμίνης ποικίλλουν (0,2  $\mu\text{M}$  έως 28  $\mu\text{M}$ ) ανάλογα με τον επιθυμητό λόγο R ( $R = \frac{[X]}{[DNA]}$ , όπου [X] η συγκέντρωση των ενώσεων κουρκουμίνης).

Σε όλα τα διαλύματα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης, ώστε τελικά η ποσότητα των ενώσεων να είναι σταθερή και ίση με 2% v/v. Τα διαλύματα αυτά επωάζονται για 24 ώρες. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού λαμβάνεται στην περιοχή 600 – 200 nm, σε θερμοκρασία 25°C.



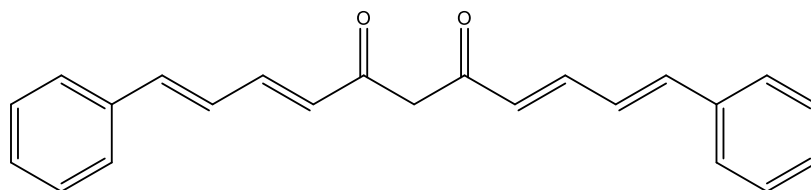
## Γ. Αποτελέσματα – Συζήτηση

### Γ.1. Συνθετική πορεία κουρκουμινοειδών

Για τη σύνθεση και των έξι ενώσεων χρειάζεται, αρχικά, να εξασφαλιστεί ότι όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται με αποφυγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, τα οποία δύσκολα διαχωρίζονται από το επιθυμητό προϊόν ή ενδεχομένως να οδηγήσουν σε άλλο προϊόν. Για το λόγο αυτό, πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, τα σκεύη της διάταξης που θα έρθουν σε άμεση επαφή με τις ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν (δηλαδή η σφαιρική φιάλη και ο ψυκτήρας), καθώς επίσης και οι σύριγγες, μέσω των οποίων έγινε προσθήκη των υγρών μιγμάτων, τοποθετούνται σε κλίβανο ξήρανσης (πυριαντήριο), ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει ίχνος υγρασίας. Επίσης, καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης εξασφαλίζεται αδρανές περιβάλλον, με τη συνεχή παροχή αζώτου.

Εξασφαλίζεται, επίσης, ότι δεν υπάρχει ίχνος υγρασίας στα αντιδραστήρια. Για το λόγο αυτό τα κουρκουμινοειδή τοποθετείται σε αντλία για 30 λεπτά, ενώ τα υγρά αντιδραστήρια είναι κατάλληλα κλεισμένα ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

#### Γ.1.1. Σύνθεση ένωσης 1



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

Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 328.41

#### Μέθοδος Α για την παρασκευή της ένωσης 1

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται οξείδιο του βορίου (0,69 g, 10 mmol) και, αφού διασφαλιστεί το αδρανές περιβάλλον, προστίθενται μέσω σύριγγας ακετυλοακετόνη (2 ml, 20 mmol) και απεσταγμένος οξικός αιθυλεστέρας (25 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, προστίθεται με σύριγγα σινναμαλδεΰδη (5 ml, 40 mmol) και στη συνέχεια βορικό τριβουτύλιο (20 ml, 75 mmol) και συνεχίζεται η αντίδραση με έντονη ανάδευση για ακόμα 15 έως 20 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία. Το ίζημα διαλύεται σιγά σιγά και το μίγμα γίνεται διαυγές κίτρινο.

Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα (5 ml) - βουτυλαμίνης (0,8 ml, 10 mmol) και γίνεται προσθήκη στο μίγμα στάγδην. Σιγά σιγά παρατηρείται αλλαγή του

χρώματος του μίγματος μέσα στη σφαιρική φιάλη, το οποίο από κίτρινο γίνεται τελικά σκούρο κόκκινο. Το μίγμα αφήνεται για 24 ώρες, στους 60°C με ανάδευση. Αφού περάσει το διάστημα των 24 ωρών προστίθεται *υδροχλωρικό οξύ (1N, 60 ml)* και αφήνεται για ακόμα μία ώρα στους 60°C. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Ακολουθεί η εκχύλιση και η πλήρης απομάκρυνση οποιουδήποτε ίχνους υγρασίας από το διάλυμα και στη συνέχεια γίνεται ανακρυστάλλωση και διήθηση. Ακολουθεί καθαρισμός του ιζήματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας στήλης, από όπου και προκύπτει καθαρό το επιθυμητό προϊόν.

**Απόδοση:** 7%

#### Μέθοδος B για την παρασκευή της ένωσης 1

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται οξειδίου του βορίου (2 g, 28 mmol) και *σινναμαλδεΐδη (10 ml, 80 mmol)*, και έπειτα προστίθεται *ακετυλακετόνη (4 ml, 40 mmol)* και βορικό τριβουτύλιο (10 ml, 37 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 90°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά, σε αδρανές περιβάλλον αζώτου.

Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην *βουτυλαμίνη (1,5 ml, 19 mmol)*, ενώ συνεχίζεται η θέρμανση στους 100°C και η ανάδυσή του για ακόμα 1,5 ώρα. Έπειτα, σε μη αδρανές περιβάλλον πλέον, προστίθεται *υδροχλωρικό οξύ (1 N, 20 ml)*, με θέρμανση στους 50°C και ανάδευση ολονυχτίς, ώστε να σπάσει ο δεσμός με το βόριο. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

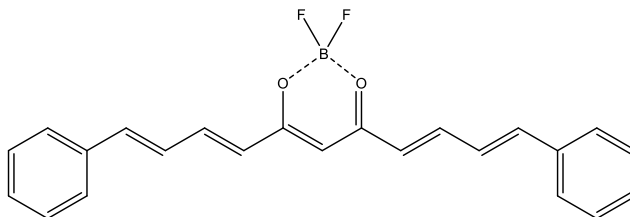
Το διάλυμα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το μίγμα οδηγείται προς διήθηση, προστίθεται μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα ώστε να ξεπλυθούν παραπροϊόντα που μπορεί να δεσμεύσει και να απομακρύνει. Το ίζημα που προέκυψε κωνιοποιείται και ακολουθεί η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στήλης από όπου προκύπτουν 5 κλάσματα με χρώμα κόκκινο, στα οποία επιβεβαιώνεται η ύπαρξη της επιθυμητής ένωσης (ένωση 1) με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Τα κλάσματα αυτά φέρονται σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώνονται.

**Απόδοση:** 54%

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.59 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 7.50–7.30 (m, 8H), 7.23–7.07 (m, 4H), 6.38 (d, J = 15.1 Hz, 2H), 6.09 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 182.93, 141.06, 140.39, 136.13, 129.11, 128.92, 127.77, 127.38, 127.29, 101.39.

### Γ.1.2. Σύνθεση ένωσης 2



(1E,3E,6Z,8E,10E)-7-((difluoroboranyl)oxy)-1,11-diphenylundeca-1,3,6,8,10-pentaen-5-one

Chemical Formula: C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molecular Weight: 376.21

#### Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 2

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται ποσότητα της ένωσης 1 (0,394 g, 1,2 mmoles), αιθερικό διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου (0,2 ml, 0,9 mmoles) και τετραϋδροφουράνιο (7 ml). Το περιβάλλον καθίσταται αδρανές με την παροχή αζώτου και η αντίδραση πραγματοποιείται με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 2 ώρες.

Στις 2 h γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος και ταυτοποιείται αν υπάρχουν ακόμα παραπροϊόντα στη φιάλη με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε διάλυμα 50% CHCl<sub>3</sub> : 50 % MeOH. Εφόσον διαπιστώνεται η παρουσία επιπλέον προϊόντων προστίθεται μικρή ποσότητα του αιθερικό διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου. Επαναλαμβάνοντας τον δειγματοληπτικό έλεγχο κάθε 2 ώρες προστίθενται συνολικά 5,5 ml αιθερικό διαιθυλεστέρα του τριφθοριούχου βορίου, ώσπου τελικά διαπιστώνεται η ύπαρξη καθαρού προϊόντος. Ακολουθεί διήθηση και απομόνωση του ιζήματος, το οποίο ξηραίνεται απουσία φωτός.

**Απόδοση:** 69.3 %

#### Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 2

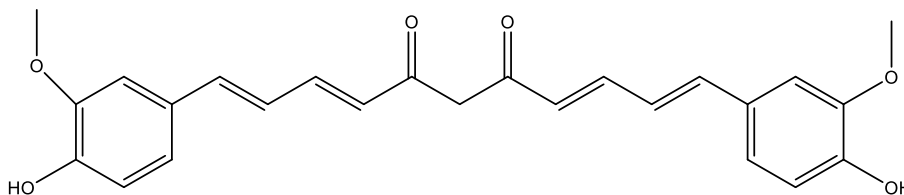
Σε σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται η ένωση 1 (0,2 g, 0,6 mmoles) με αιθερικό διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου (0,11 ml, 0,9 mmoles) και τολουόλιο (5 ml). Το περιβάλλον καθίσταται αδρανές με την παροχή αζώτου και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 65°C για 5 ώρες. Παρατηρείται ο σχηματισμός κόκκινου ιζήματος. Το ίζημα αφαιρείται και ξεπλένεται με τολουόλιο και εξάνιο και ξηραίνεται απουσία φωτός.

**Απόδοση:** 81.9%

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83-7.77 (m, 2 H), 7.51-7.49 (m, 2 H), 7.38-7.36 (m, 6 H), 7.07 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 6.99-6.97 (m, 2 H), 6.25 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 5.93 (s, 1 H)

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.9, 146.8, 134.5, 132.8, 132.3, 131.8, 129.0, 128.8, 128.3, 127.8, 127.1, 124.2, 121.8, 102.4

### Γ.1.3. Σύνθεση ένωσης 3



(1*E*,3*E*,8*E*,10*E*)-1,11-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)undeca-1,3,8,10-tetraene-5,7-dione  
Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>  
Molecular Weight: 420.46

#### Μέθοδος A για την παρασκευή της ένωσης 3

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται οξείδιο του βορίου (0,136 g, 0,00196 moles) και, αφού διασφαλιστεί το αδρανές περιβάλλον, προστίθενται μέσω σύριγγας ακετυλοακετόνη (0,29 ml, 0,0028 moles) και απεσταγμένος οξικός αιθυλεστέρας (10 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά, σε αδρανές περιβάλλον αζώτου.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, προστίθενται με σύριγγα η 3-μεθοξυ-4-υδρόξυ σιναμαλδεύδη (0,0056 moles) και στη συνέχεια βορικό τριβουτύλιο (3,028 ml) και συνεχίζεται η αντίδραση με έντονη ανάδευση για ακόμα 15 έως 20 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία. Το ίζημα διαλύεται σιγά σιγά και το μίγμα γίνεται διαυγές κίτρινο.

Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα (5 ml) - βουτυλαμίνης (0,8 ml) και γίνεται προσθήκη στο μίγμα στάγδην. Σιγά σιγά παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του μίγματος μέσα στη σφαιρική φιάλη. Το μίγμα αφήνεται για 24 ώρες, στους 60°C με ανάδευση. Αφού περάσει το διάστημα των 24 ωρών προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (1*N*, 10 ml) και αφήνεται για ακόμα μία ώρα στους 60°C. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Ακολουθεί η εκχύλιση και η πλήρης απομάκρυνση οποιουδήποτε ίχνους υγρασίας από το διάλυμα και στη συνέχεια γίνεται ανακρυστάλλωση και διήθηση. Στη συνέχεια το ίζημα καθαρίζεται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας στήλης, από όπου και προκύπτει καθαρό το επιθυμητό προϊόν.

**Απόδοση:** 15,6%

#### Μέθοδος B για την παρασκευή της ένωσης 3

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται οξείδιο του βορίου (2 g), αλδεΐδη (10 ml), ακετυλακετόνη (4 ml, 40 mmoles) και βορικό τριβουτύλιο (10 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 90°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά, σε αδρανές περιβάλλον αζώτου.

Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην βουτυλαμίνη (1,5 ml), ενώ συνεχίζεται η θέρμανση στους 100°C και η ανάδυσή του για ακόμα 1,5 ώρα. Έπειτα, σε μη αδρανές περιβάλλον πλέον,

προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (1N, 20 ml), με θέρμανση στους 50°C και ανάδευση ολονυχτίς, ώστε να σπάσει ο δεσμός με το βόριο. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

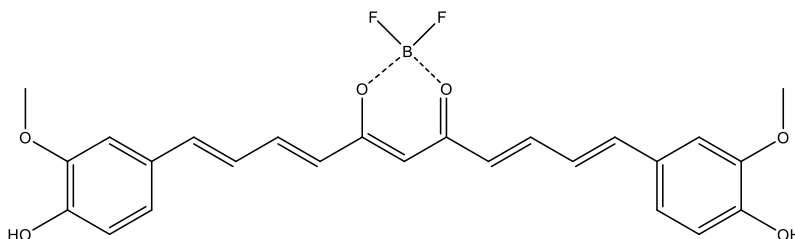
Προστίθεται μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα ώστε να διαλυθούν παραπροϊόντα και ακολουθεί διήθηση. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης όπου το ίζημα που προέκυψε από τη σύνθεση καθαρίζεται. Επιβεβαιώνεται ότι το διάλυμα που προκύπτει δεν περιέχει παραπροϊόντα και συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

**Απόδοση:** 48 %

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.48 (bs, 2H, -OH), 7.43–7.38 (m, 4H), 7.19 (s, 2H), 7.02–7.00 (m, 8H), 6.8 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.29 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 3.83 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 183.1, 149.4, 147.9, 140.7, 130.3, 126.3, 123.1, 121.0, 115.7, 111.3, 100.8, 55.7.

#### Γ.1.4. Σύνθεση ένωσης 4



(1E,3E,6Z,8E,10E)-7-((difluoroboranyl)oxy)-1,11-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)undeca-1,3,6,8,10-pentaen-5-one

Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>BF<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight: 468.26

#### Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 4

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται ορισμένη ποσότητα της ένωσης 3 (0,095 g, 0,23 mmoles), αιθερικός διαιθυλεστέρας του τριφθοριούχου βορίου (0,2 ml, 0,9 mmoles) και τετραϋδροφουράνιο (7 ml). Το περιβάλλον καθίσταται αδρανές με την παροχή αζώτου και η αντίδραση πραγματοποιείται με συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 2 ώρες.

Στις 2 ώρες γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος και ταυτοποιείται αν υπάρχουν ακόμα παραπροϊόντα στη φιάλη με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον διαπιστώνεται η παρουσία επιπλέον προϊόντων προστίθεται μικρή ποσότητα του αιθερικού διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου, ώσπου τελικά διαπιστώνεται η ύπαρξη καθαρού προϊόντος. Ακολουθεί διήθηση και απομόνωση του ιζήματος, το οποίο ξηραίνεται απουσία φωτός.

**Απόδοση:** 22,3 %

#### Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 4

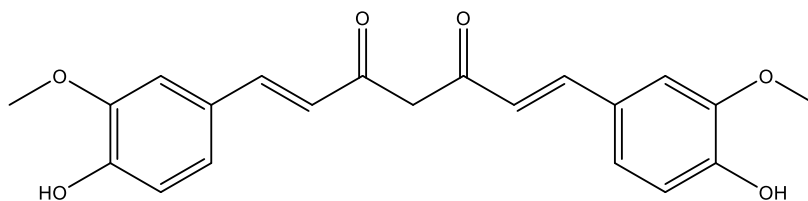
Σε σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται η ένωση 3 (0,7 g, 1,6 mmoles) με αιθερικό διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου (0,2 ml, 0,9 mmoles) και τετραϋδροφουράνιο (7 ml). Το περιβάλλον καθίσταται αδρανές με την παροχή αζώτου και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 65°C για 5 ώρες. Παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος.

Το μίγμα αφαιρείται και ξεπλένεται με τολουόλιο και εξάνιο. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Τελικά η ποσότητα που απομονώνεται είναι 0,25 g καθαρού προϊόντος.

**Απόδοση:** 33,5 %

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.76 (s, 2 H), 7.82 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 7.78 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 7.27 (d, J = 1.76 Hz, 2 H), 7.20 (dd, J = 8.0 Hz 2 H), 7.10 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 6.98 (s, 1 H), 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 6.50 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 6.46 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 3.85 (s, 6 H)

### Γ.1.5. Σύνθεση ένωσης 5



(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione

Chemical Formula: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

Molecular Weight: 368.39

#### Μέθοδος A για την παρασκευή κουρκουμίνης I

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 0,7 g οξειδίου του βορίου με 40 ml οξικού αιθυλεστέρα και ακετυλακετόνη (2 ml, 20 mmoles) και εξασφαλίζεται το αδρανές περιβάλλον για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Το μίγμα θερμαίνεται στους 70°C, με ταυτόχρονη ανάδευση για 30 λεπτά.

Στη συνέχεια, προστίθενται 20 ml βορικό τριβουτύλιο και 6 g βανιλίνης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για ακόμα 30 λεπτά, σταθερά στους 70°C. Παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του μίγματος προς πράσινο, με το διάλυμα να είναι διαυγές.

Έπειτα παρασκευάζεται διάλυμα 5 ml οξικού αιθυλεστέρα με 0,8 ml βουτυλαμίνης και προστίθεται στάγδην στη σφαιρική φιάλη. Με την προσθήκη αυτή παρατηρείται σιγά σιγά αλλαγή του χρώματος του μίγματος προς σκούρο κόκκινο. Η αντίδραση συνεχίζεται για 24 ώρες στους 60°C. Με το πέρας των 24 ωρών προστίθενται 60 ml υδροχλωρικού οξέος 1M και συνεχίζεται η ανάδευση για 2 – 3 ώρες στους 60°C. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύματος που παρασκευάστηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα και γίνεται προσπάθεια απομόνωσης της κουρκουμίνης I με απομάκρυνση των παραπροϊόντων που φαίνεται να δίνουν κόκκινο χρώμα στο παραγόμενο στερεό.

Για τον καθαρισμό του προϊόντος ακολουθείται η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στήλης (χρωματογραφία υψηλής πίεσης), όπου στατική φάση είναι silica gel ενώ κινητή φάση επιλέγεται διάλυμα 95% χλωροφόρμιο – 5% μεθανόλη, καθώς παρατηρήθηκε μερική διάλυση του στερεού προϊόντος στη μεθανόλη, που ενδεχομένως να διαλύει σε μεγαλύτερο βαθμό την κουρκουμίνη. Με τη μέθοδο αυτή συλλέγονται τέσσερα κλάσματα, όπου εντοπίζεται καθαρό το προϊόν. Τα κλάσματα ενώνονται σε μια σφαιρική φιάλη και οδηγούνται προς συμπύκνωση από όπου λαμβάνεται το τελικό προϊόν σε μορφή σκόνης.

**Απόδοση:** 10,73 %

## Μέθοδος Β για την παρασκευή κουρκουμίνης Ι

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 2 g οξειδίου του βορίου με 4 ml ακετυλακετόνης και 10 ml *βορικό τριβουτύλιο*. Εξασφαλίζεται το αδρανές περιβάλλον με την παροχή αζώτου και στη συνέχεια, προστίθενται σε τρεις δόσεις 12 g βανιλίνης. Το μίγμα αφήνεται για 30 λεπτά στους 90°C με ανάδευση και στη συνέχεια προστίθενται στάγδην 1,5 ml βουτυλαμίνης, όπου παρατηρείται αλλαγή του χρώματος προς σκούρο κόκκινο, ενώ με την προσθήκη κάθε σταγόνας υπάρχει έντονη δημιουργία ατμών μέσα στη φιάλη. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα της βουτυλαμίνης αυξάνεται η θερμοκρασία του ελαιόλουτρου στους 100°C και το μίγμα αναδεύεται για ακόμα 1,5 ώρα. Τέλος, προστίθενται 20 ml υδροχλωρικού οξέος 1 Μ, η θερμοκρασία μειώνεται στους 50°C, ενώ στη φιάλη το περιβάλλον δεν είναι πλέον αδρανές αλλά είναι εκτεθειμένη στον ατμοσφαιρικό αέρα. Στη μία ώρα παρατηρείται σχηματισμός κρυσταλλικού ιζήματος και το χρώμα του μίγματος είναι πλέον πορτοκαλί. Η αντίδραση αφήνεται ολονυχτίς και στη συνέχεια το μίγμα διηθείται. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Το ίζημα ξηραίνεται και κονιοποιείται. Πριν την κονιοποίηση, είναι εμφανής η ύπαρξη δυο φάσεων στο στερεό: μιας πράσινης και μιας μωβ φάσης, ενώ μετά την κονιοποίηση προκύπτει μια καφέ σκόνη. Για το διαχωρισμό του επιθυμητού προϊόντος χρησιμοποιείται η χρωματογραφία στήλης, όπου ως στατική φάση χρησιμοποιείται silica gel και ως κινητή φάση αρχικά μόνο χλωροφόρμιο, που είναι άπολος διαλύτης, ώστε να ξεπλύνει το στερεό και στη συνέχεια 95% χλωροφόρμιο – 5% μεθανόλη, από όπου συλλέγονται τελικά επτά κλάσματα, με χρώμα κίτρινο, που περιέχουν πλέον καθαρή κουρκουμίνη, ενώ τα παραπροϊόντα έχουν κατακρατηθεί στη στήλη χρωματογραφίας. Τα κλάσματα αυτά συμπυκνώνονται σε μια σφαιρική φιάλη και τελικά συλλέγεται το τελικό προϊόν σ εμορφή μιας πορτοκαλί σκόνης.

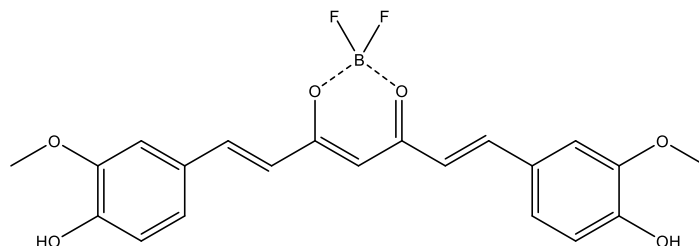
**Απόδοση:** 52 %

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.54 (d, J = 15.3 Hz, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.14 (d, J = 7.84 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.06 (s, 2H), 3.83 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 183.1, 149.4, 147.9, 140.7, 130.3, 126.3, 123.1, 121.0, 115.7, 111.3, 100.8, 55.7.



### Γ.1.6. Σύνθεση ένωσης 6



(1E,4Z,6E)-5-((difluoroborane)oxy)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one

Chemical Formula:  $C_{21}H_{19}BF_2O_6$

Molecular Weight: 416.18

#### Μέθοδος Γ για την παρασκευή της ένωσης 6

Αρχικά, κουρκουμίνη I (0,293 g, 0,8 mmol) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και εξασφαλίζεται το αδρανές περιβάλλον με παροχή αζώτου. Έπειτα προστίθενται 7 ml του οργανικού διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (dry TetraHydroFuran – THF) και 100  $\mu$ l τριφθοριούχου βορίου. Το μίγμα με την προσθήκη του τετραϋδροφουρανίου παίρνει χρώμα πορτοκαλί και η κουρκουμίνη I διαλύεται πλήρως, ενώ με την προσθήκη του τριφθοριούχου βορίου το χρώμα αλλάζει προς σκούρο κόκκινο και το μίγμα δεν είναι πλέον διαυγές. Η αντίδραση αφήνεται για 16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $T=25^\circ\text{C}$ ) με ταυτόχρονη ανάδευση. Στις 16 ώρες γίνεται δειγματοληπτικός έλεγχος και ταυτοποιείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) αν υπάρχουν ακόμα παραπροϊόντα στη φιάλη. Διαπιστώνεται η παρουσία επιπλέον προϊόντων, οπότε προστίθεται μικρή ποσότητα του αιθερικού διαιθυλεστέρα τριφθοριούχου βορίου και αφήνεται η αντίδραση ολονυχτίς με ταυτόχρονη ανάδευση. Όταν διαπιστωθεί ότι έχει αντιδράσει όλη η ποσότητα της κουρκουμίνης και η αντίδραση σταματάει.

Το τελικό διάλυμα αποτελείται από δυο φάσεις και είναι σε μορφή λαδιού. Για να προκύψει καθαρό το τελικό προϊόν σε μορφή σκόνης γίνεται επαναδιάλυση του μίγματος σε διάφορους διαλύτες, ανάλογα με το πώς αντιδράει κάθε φορά το μίγμα (προστίθενται διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και εξάνιο), όπου καταβυθίζεται ίζημα, ακολουθεί διήθηση και γίνεται ταυτοποίηση κάθε φορά στο ίζημα και στο διήθημα για να διαπιστωθούν η ύπαρξη του καθαρού προϊόντος και των παραπροϊόντων. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου δεν υπάρχουν παραπροϊόντα.

Τελικά από τη διαδικασία αυτή προκύπτει μια μικρή ποσότητα καθαρού προϊόντος, ενώ το διήθημα συμπυκνώνεται στον εξαμιστήρα, η σκόνη που προκύπτει διαχωρίζεται σε στήλη χρωματογραφίας ( $\text{CHCl}_3$  98% - MeOH 2%), επιβεβαιώνεται ότι είναι καθαρό το τελικό προϊόν και ακολουθεί ξανά συμπύκνωση. Ωστόσο, επειδή το τελικό αποτέλεσμα είναι ελαιώδες, προστίθεται αιθέρας που προκαλεί κρυσταλλοποίηση της ένωσης και καταβύθισή της. Για

την απομόνωση της στερεής φάσης, η φιάλη τοποθετείται σε αντλία για 15 λεπτά. Ωστόσο, η τελική ποσότητα καθαρού προϊόντος είναι ελάχιστη.

**Απόδοση:** 20%

#### Μέθοδος Δ για την παρασκευή της ένωσης 6

Σε σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται ποσότητα της ένωσης 5 (κουρκουμίνη I) (317 mg, 0,86mmoles), αιθερικός διαιθυλεστέρας τριφθοριούχου βορίου (0,11 ml, 0,9 mmoles) και τολουόλιο (5 ml) και στήνεται η διάταξη. Το περιβάλλον καθίσταται αδρανές με την παροχή αζώτου και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 65°C για 5 ώρες. Παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος.

Το μίγμα αφαιρείται και ξεπλένεται με τολουόλιο και εξάνιο, ξηραίνεται και συλλέγεται σε μορφή σκόνης. Καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

**Απόδοση:** 33,5 %

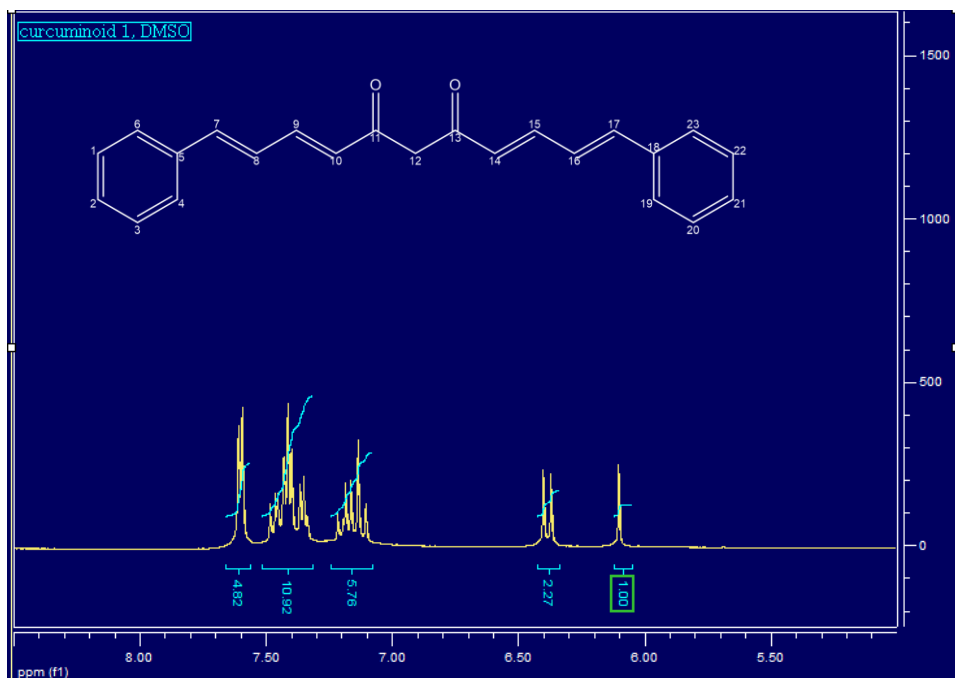
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.08 (s, 2 H), 7.92 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 7.47 (d, J = 1.76 Hz, 2 H), 7.34 (dd, J = 8.0 Hz 2 H), 7.01 (d, J = 16.0 Hz, 2 H), 6.88 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 6.46 (s, 1 H), 3.85 (s, 6 H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d6) δ 178.7, 151.3, 148.1, 146.9, 126.0, 125.2, 117.8, 115.9, 112.4, 101.0, 55.8

## Γ.2. Ταυτοποίηση ενώσεων

Όλα τα μόρια που συντέθηκαν είναι συμμετρικά με κέντρο συμμετρίας τον άνθρακα μεταξύ των δυο καρβονυλίων.

### Γ.2.1. Ταυτοποίηση ένωσης 1



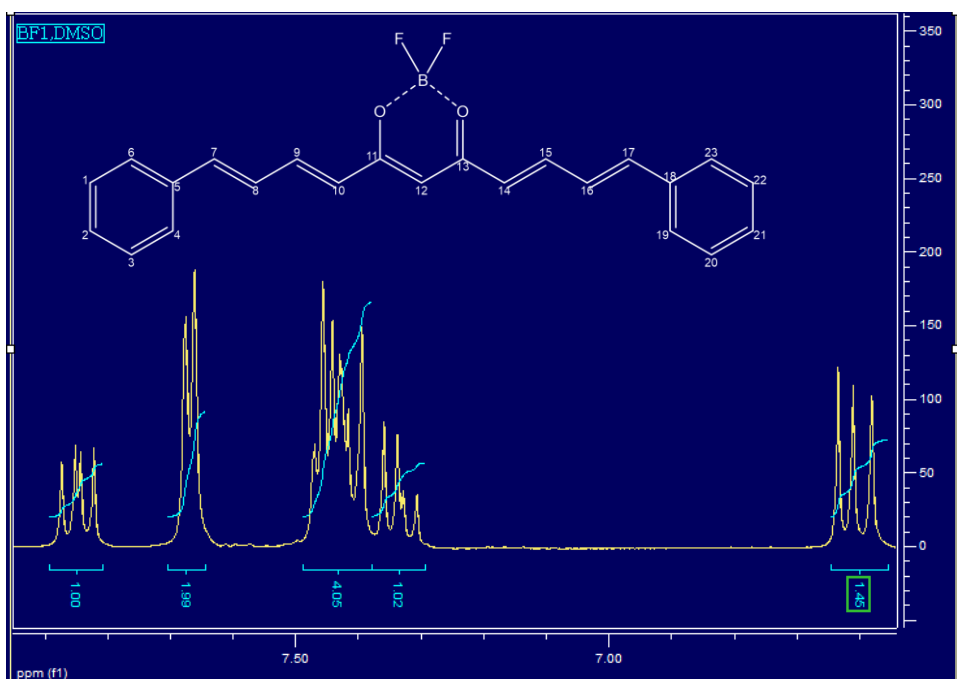
Διάγραμμα 1: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 1.

Στο φάσμα NMR που παρατίθεται παραπάνω (Διάγραμμα 1) εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 6.1 ppm, που οφείλεται στο πρωτόνιο του κεντρικού ατόμου άνθρακα (θέση 12). Στη συνέχεια η διπλή κορυφή στα 6.37 ppm με χαρακτηριστικό  $J=15,2$  Hz υποδηλώνει πρωτόνιο διπλού δεσμού.

Έπειτα, φαίνεται μια σειρά πολλαπλών κορυφών από τα 7,1 έως τα 7,21 ppm, που ακολουθείται από άλλη μια σειρά πολλαπλών από τα 7,33 έως τα 7,48 ppm. Οι περιοχές αυτές αντιστοιχούν στο πλήθος των αρωματικών πρωτονίων και των πρωτονίων των επιπλέον διπλών δεσμών και δεν είναι εύκολο να διαφοροποιηθούν επαρκώς.

Τέλος, η διπλέτα στα 7,59 ppm, με  $J=7,9$  Hz, αντιστοιχεί σε κάποιο από τα αρωματικά πρωτόνια, που διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα.

## Γ.2.2. Ταυτοποίηση ένωσης 2

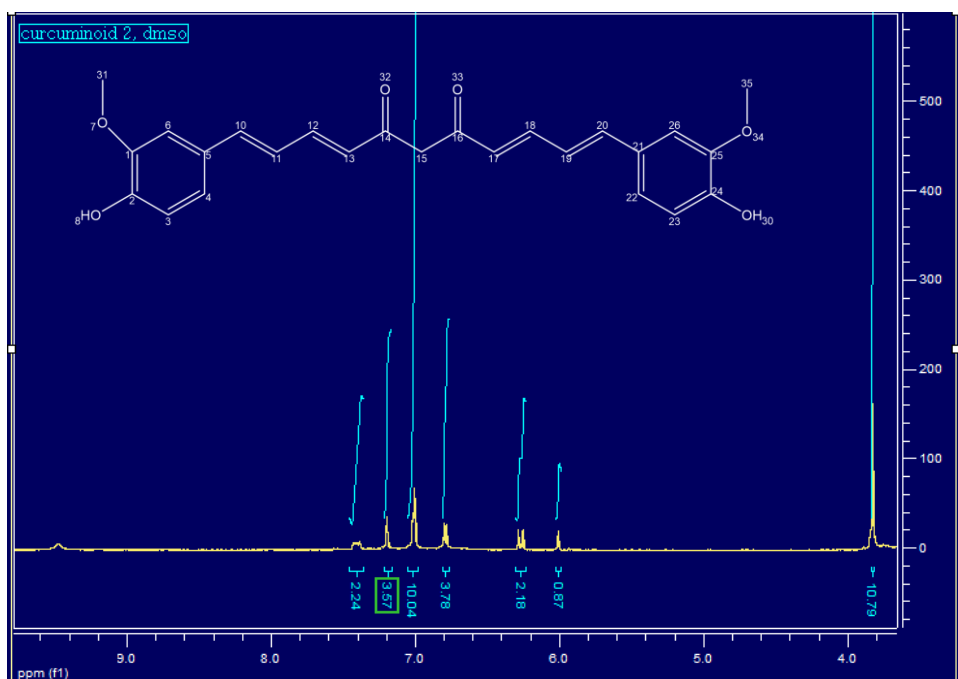


Διάγραμμα 2: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 2.

Αυτό που παρατηρείται από το φάσμα NMR της ένωσης 2 (Διάγραμμα 2), μετά τη συμπλοκοποίηση με το βόριο, είναι ότι η διπλέτα του διπλού δεσμού μεταφέρθηκε στα 6,58 ( $J=15,3$  Hz), ενώ παράλληλα η μονή κορυφή του κεντρικού πρωτονίου μετατοπίστηκε εξίσου σημαντικά από τα 6,1 ppm στα 6,63 ppm.

Επιπλέον, στην περιοχή από 7,82 ppm έως 7,87 ppm εμφανίζονται δύο αλληλοεπικαλυπτόμενες διπλέτες με  $J=15,2$  Hz η καθεμία. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η συμπλοκοποίηση με το βόριο επηρέασε κάποιο επιπλέον ακόρεστο πρωτόνιο.

### Γ.2.3. Ταυτοποίηση ένωσης 3



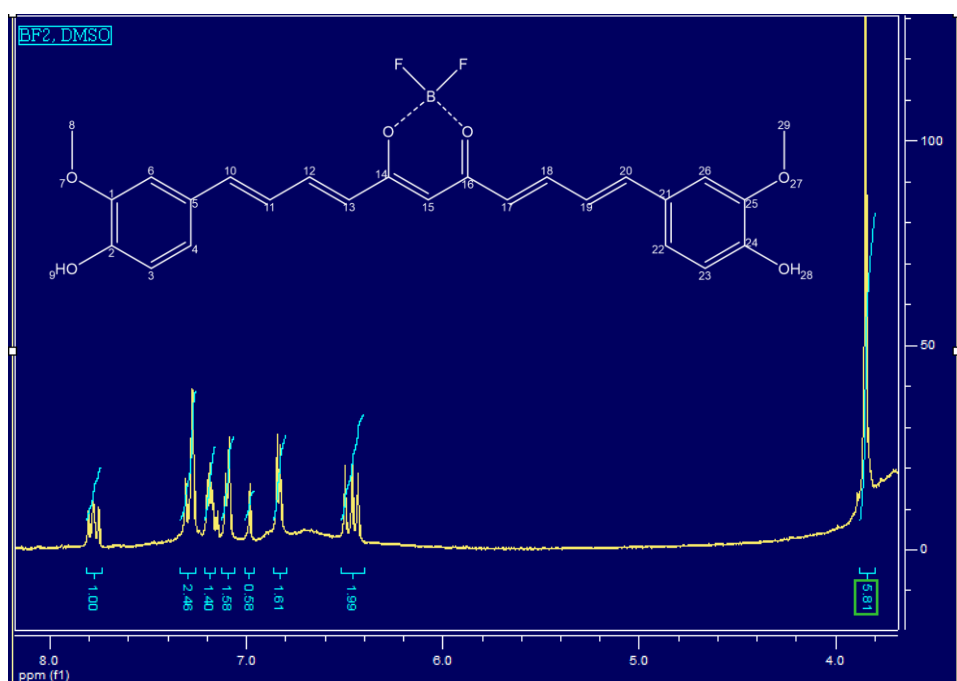
Διάγραμμα 3: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 3.

Στο φάσμα της ένωσης 3 (Διάγραμμα 3) παρατηρείται μια μονή κορυφή στα 3,83 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο του 3-μεθόξυ του αρωματικού δακτυλίου. Στη συνέχεια, εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 6,01 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του κεντρικού ατόμου άνθρακα.

Στα 6,25 ppm με χαρακτηριστικό  $J=15$  Hz εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί σε πρωτόνιο διπλού δεσμού, ενώ στα 6,78 ppm με  $J=8,1$  Hz, παρατηρείται διπλέτα αρωματικού δακτυλίου. Παρακάτω, στα 7,19 ppm συναντάμε μια μονή κορυφή που είναι το πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου, το οποίο γειτονεύει με άνθρακες που δεν έχουν άλλα πρωτόνια (θέση 6).

Τέλος, σημαντικό είναι να αναφερθεί το σήμα στα 9,47 ppm, που είναι μια φαρδιά κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του φαινυλίου OH.

#### Γ.2.4. Ταυτοποίηση ένωσης 4

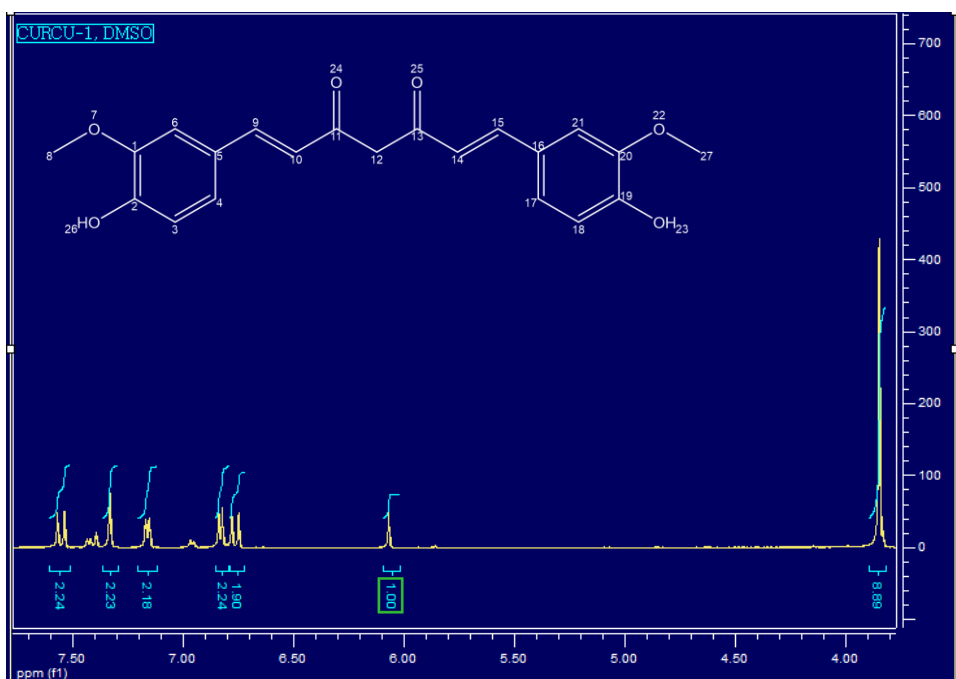


Διάγραμμα 4: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 4.

Η συμπλοκοποίηση της ένωσης 3 με το BF επέφερε ανάλογες μετατοπίσεις των πρωτονίων με εκείνες που παρατηρήθηκαν από την ένωση 1 στην ένωση 2 (Διάγραμμα 4).

Παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές που αλληλοεπικαλύπτονται στην περιοχή από 7,75 έως 7,80 ppm, με  $J=15,1$  Hz η καθεμιά. Επίσης, η διπλή κορυφή στα 6,43 ppm υποδηλώνει την ύπαρξη πρωτονίου διπλού δεσμού, που στην ένωση 3 παρατηρήθηκε στα 6,25 ppm, ενώ υπάρχει και μετατόπιση του σήματος του πρωτονίου του κεντρικού ατόμου άνθρακα από τα 6,01 ppm που ήταν στην ένωση 3, στα 6,49 ppm στη συμπλοκοποιημένη της μορφή.

### Γ.2.5. Ταυτοποίηση ένωσης 5



Διάγραμμα 5: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 5.

Στο φάσμα της ένωσης 5 (Διάγραμμα 5) παρατηρείται μια κορυφή στα 3,84 ppm, η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του μεθυλίου του 3-μεθόξυ του αρωματικού δακτυλίου. Στη συνέχεια, εμφανίζεται μια κορυφή στα 6,06 ppm που οφείλεται στο πρωτόνιο το κεντρικού ατόμου άνθρακα.

Έπειτα, στα 6,74 ppm με χαρακτηριστικό  $J=16$  Hz εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί σε πρωτόνιο διπλού δεσμού, όπως επίσης και στα 7,53 ppm με  $J=15,7$  Hz.

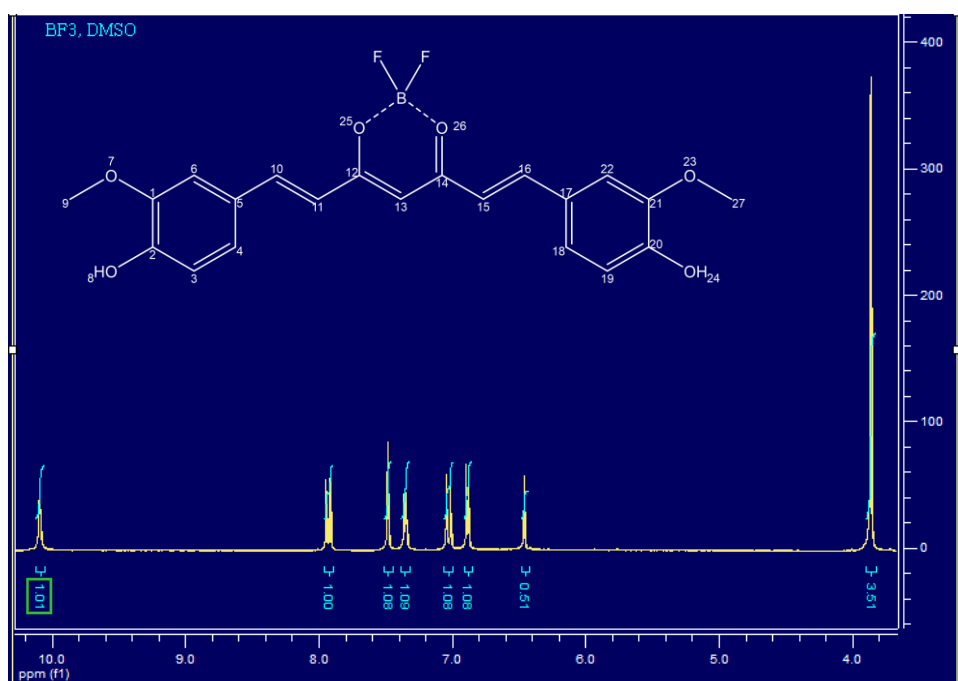
Στα 6,82 ppm με  $J=8,1$  Hz παρατηρείται μια διπλή κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου (θέσεις 3 και 4).

Η επόμενη διπλή κορυφή που συναντάται είναι στα 7,15 ppm, με  $J=8,2$  Hz, και αποδίδεται σε πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου, που βρίσκεται δίπλα σε άνθρακες που δεν έχουν άλλα πρωτόνια (θέση 6).

Στη συνέχεια, στα 7,33 ppm εμφανίζεται μια μονή κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 6 και μια διπλή κορυφή στα 7,53 ppm, με  $J=15,7$  Hz.

Τέλος, στα 9,66 ppm εμφανίζεται μια φαρδιά κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του φαινυλίου OH.

## Γ.2.6. Ταυτοποίηση ένωσης 6



Διάγραμμα 6: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 6.

Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις των συμπλοκοποιημένων κουρκουμινωιδών (ενώσεις 2 και 4) έτσι και στη συμπλοκοποιημένη κουρκουμίνη (ένωση 6), η ύπαρξη του BF<sub>3</sub> επιφέρει μετατοπίσεις των πρωτονίων, με αποτέλεσμα και πιο ξεκάθαρες κορυφές στο φάσμα (Διάγραμμα 6).

Παρατηρείται ότι η κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα της κουρκουμίνης I (ένωση 5) στα 6,06 ppm και αποδίδεται στο κεντρικό άτομο άνθρακα έχει μετατοπιστεί στα 6,46 ppm στο φάσμα της συμπλοκοποιημένης κουρκουμίνης (ένωσης 6).

Οι διπλές κορυφές που εμφανίζονται στα 6,88 ppm με  $J=8$  Hz και 7,34 ppm με  $J=8,2$  Hz αποδίδονται σε πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου.

Επίσης, στα 7,01 ppm με  $J=15,5$  Hz εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που οφείλεται σε πρωτόνιο διπλού δεσμού, όπως επίσης και στα 7,91 ppm με  $J=15,5$  Hz.

Η μονή κορυφή που εμφανίζεται στα 7,48 ppm οφείλεται στο πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου στον άνθρακα στη θέση 6.

Τέλος, στα 10,01 ppm εμφανίζεται μια φαρδιά κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του φαινυλίου OH.



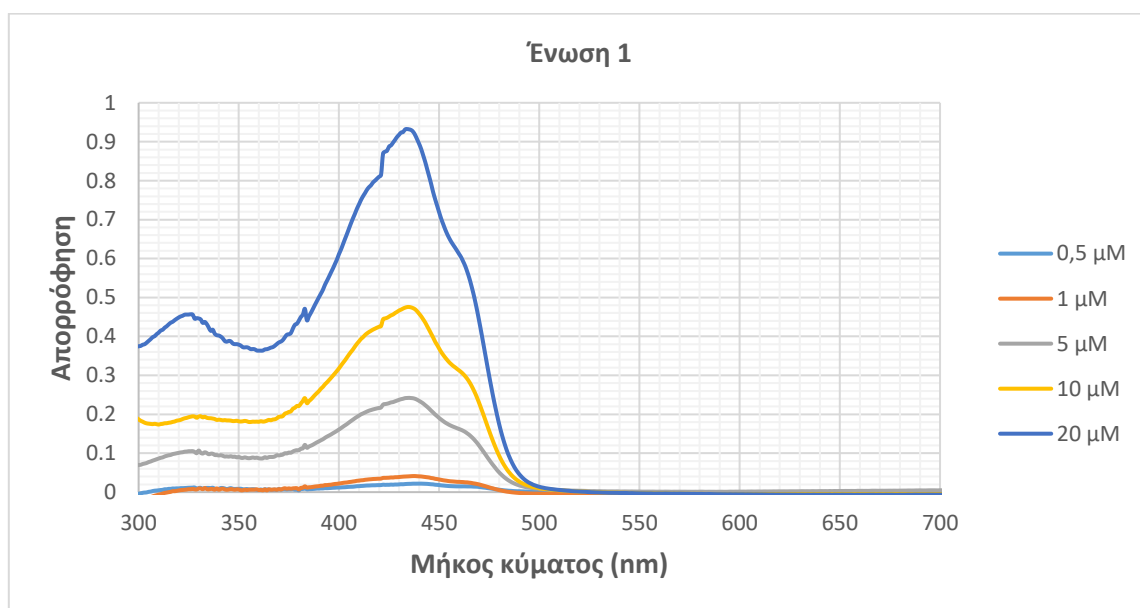
### Γ.3. Φωτοφυσικές μελέτες κουρκουμινοειδών

#### Γ.3.1. Φασματοσκοπικές μελέτες απορρόφησης

Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε DMSO

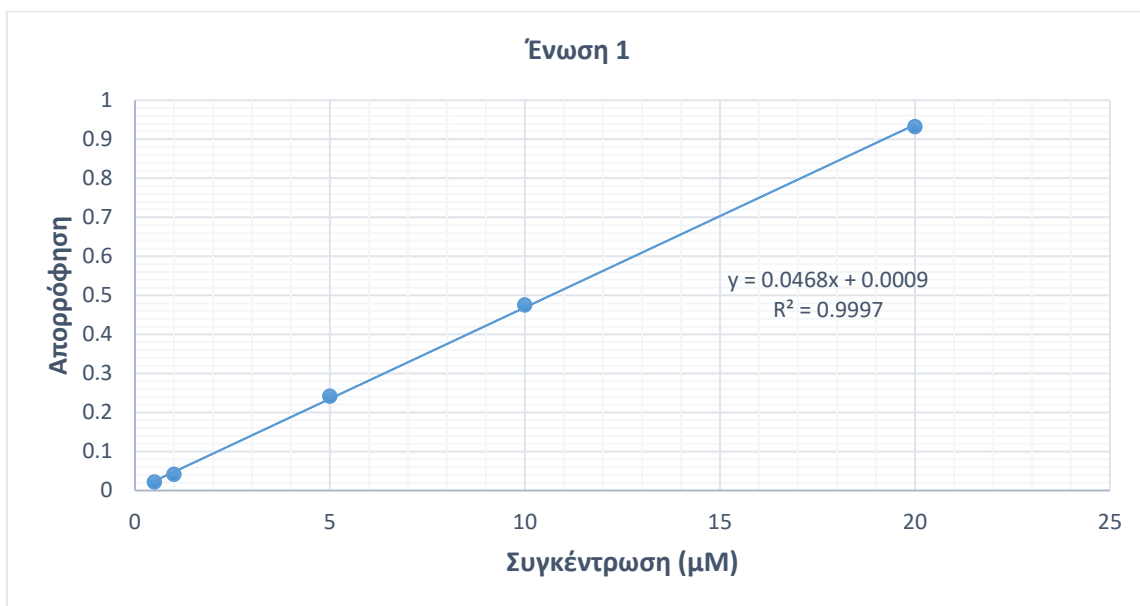
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των έξι ενώσεων, με τιμές συγκεντρώσεων αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αρχικά, παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 1 (Διάγραμμα 7):



Διάγραμμα 7: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 1 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Από το φάσμα απορρόφησης παρατηρούμε ότι η ένωση 1 παρουσιάζει μια ισχυρή Soret band με μέγιστη απορρόφηση για μήκος κύματος ακτινοβολίας **434 nm**, ενώ εμφανίζει και μία δευτερογενή κορυφή απορρόφησης στα 326 nm.



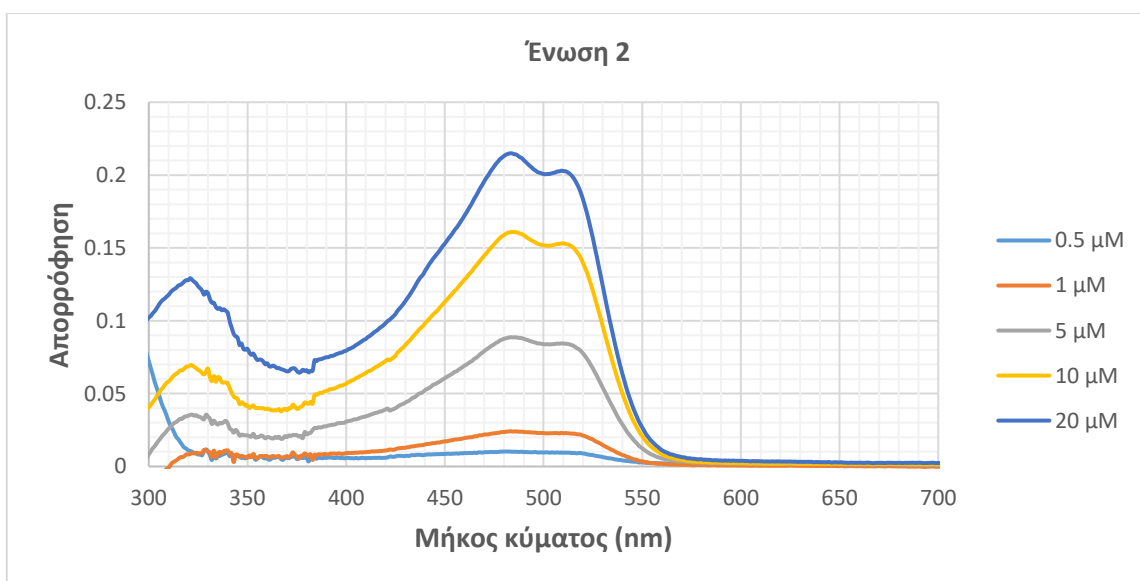
Διάγραμμα 8: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 434 nm) της ένωσης 1 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 8) προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 1 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν και με βάση τη σχέση:

$$y = 0.0468x + 0.0009, \quad \text{με } R^2 = 0.9997$$

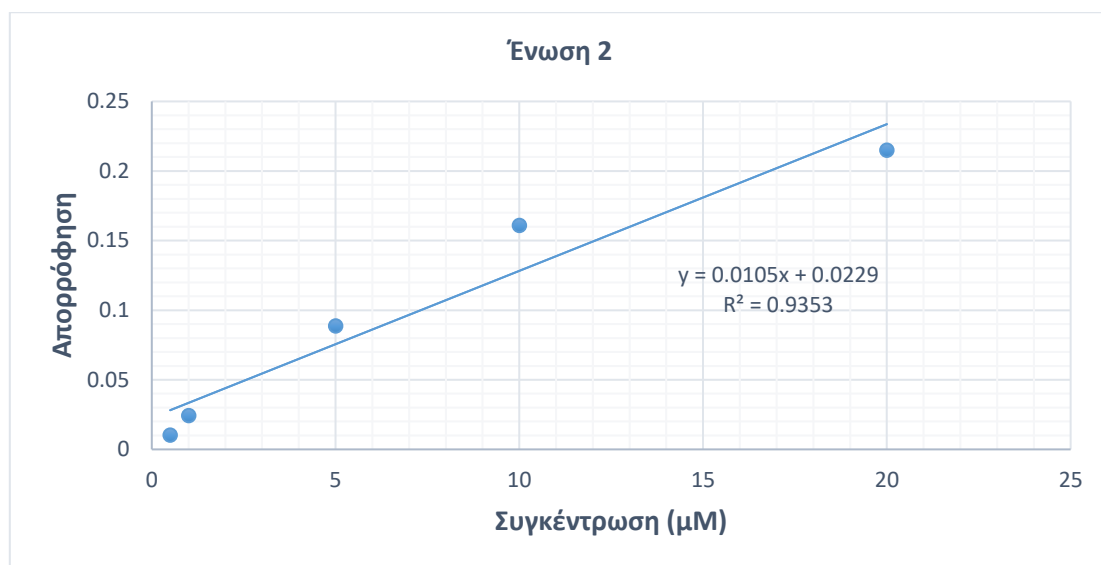
Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας της ένωσης 1 είναι  $\epsilon = 6,45 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 2 σε διαλύτη DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 9):



Διάγραμμα 9: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 2 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Από το φάσμα απορρόφησης για την ένωση 2 παρατηρούμε ότι εμφανίζει τρεις κορυφές απορρόφησης: μία κύρια στα **484 nm** (Q band) η οποία συνοδεύεται από μία ελαφρά ασθενέστερης απορρόφησης στα 509 nm και μία δευτερεύουσα Soret band στα 322 nm.



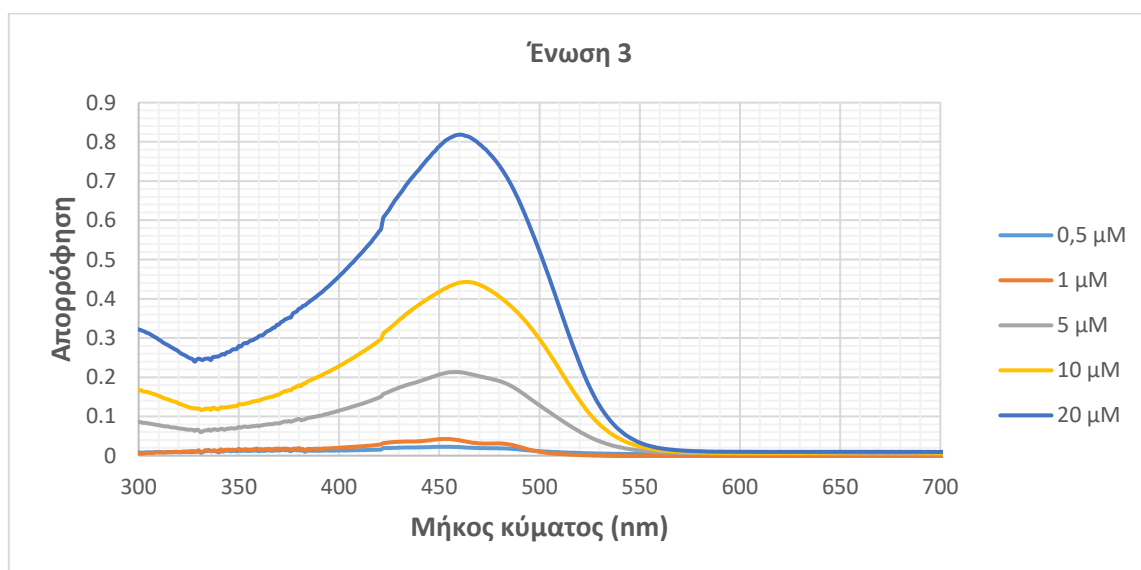
Διάγραμμα 10: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 484 nm) της ένωσης 2 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 10) προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 2 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0105x + 0.0229, \quad \text{με } R^2 = 0.9353$$

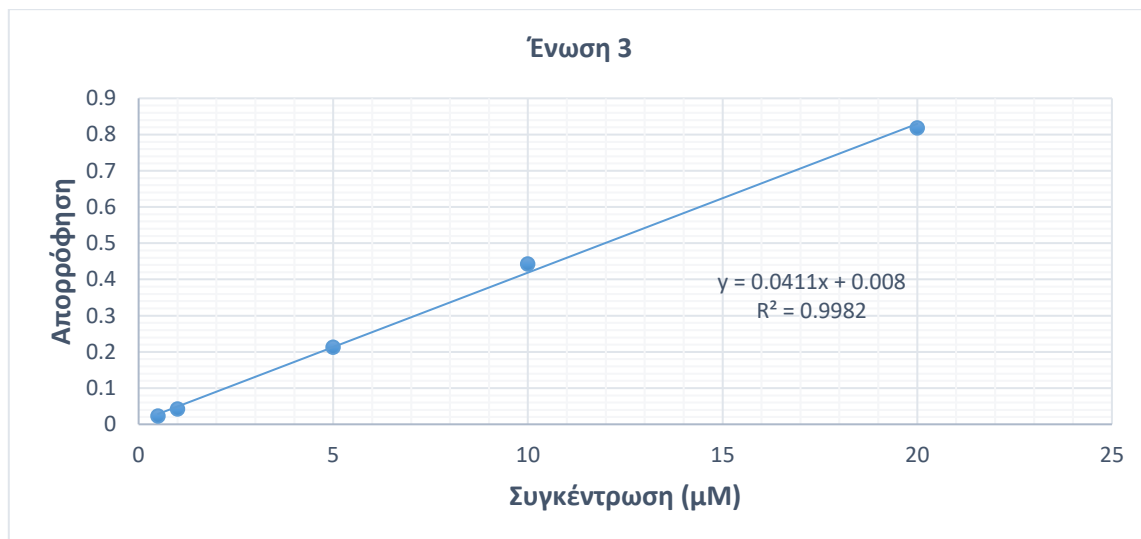
Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι  $\varepsilon = 1,958 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 σε DMSO και για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 11):



Διάγραμμα 11: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Από το φάσμα απορρόφησης για την ένωση 3 προκύπτει μια κύρια κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί σε Soret band με μέγιστη απορρόφηση για μήκος κύματος ακτινοβολίας **464 nm**.



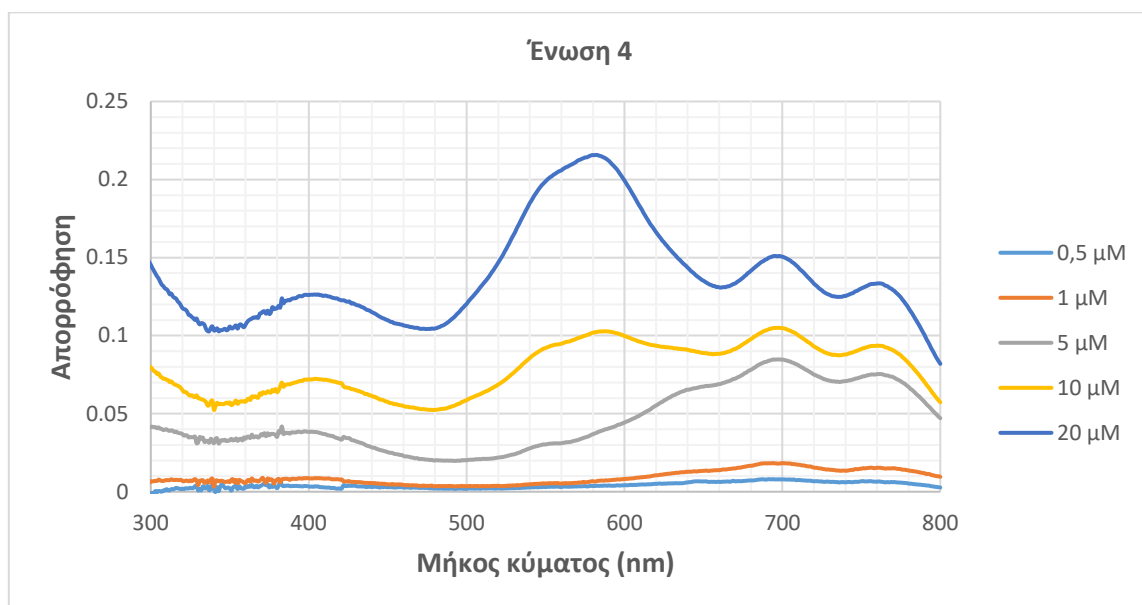
Διάγραμμα 12: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 464 nm) της ένωσης 3 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 12) εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 3 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0411x + 0.008, \quad \text{με } R^2 = 0.9982$$

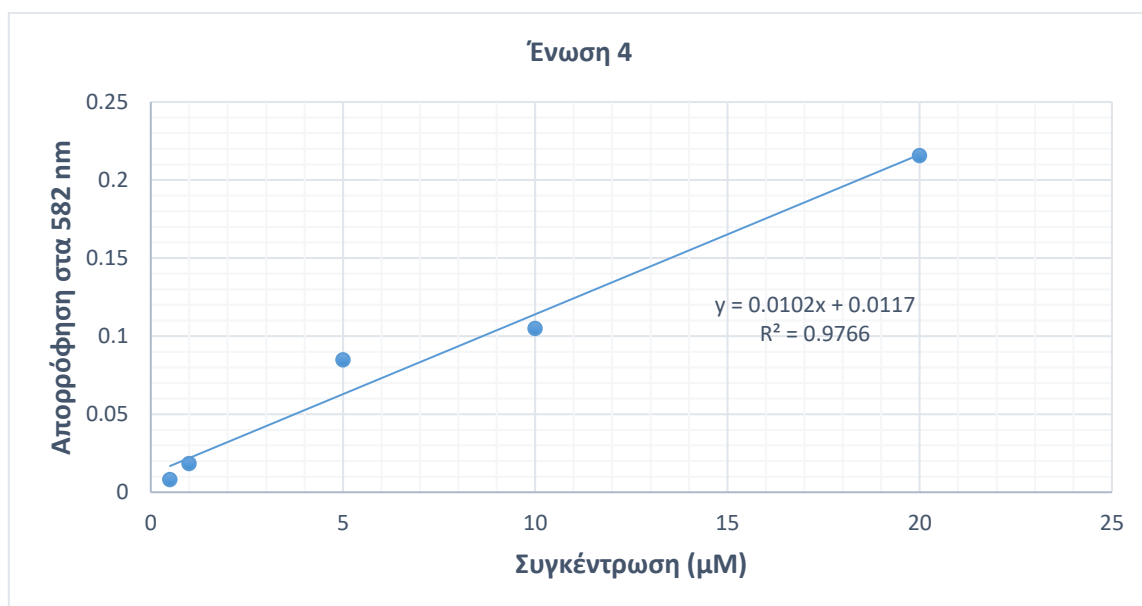
Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι  $\varepsilon = 4,43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Παρακάτω, παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 σε DMSO και για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 13):



Διάγραμμα 13: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Στο φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 παρατηρούνται πολλαπλές κορυφές. Καταρχάς, εμφανίζει μια ισχυρή Q band με μέγιστη απορρόφηση για μήκος κύματος **582 nm**. Εμφανίζονται επίσης δυο δευτερεύουσες Q bands για μήκος κύματος 698 nm και για 762 nm, ενώ για μήκος κύματος 312 nm εμφανίζεται μια χαμηλότερης έντασης Soret band.



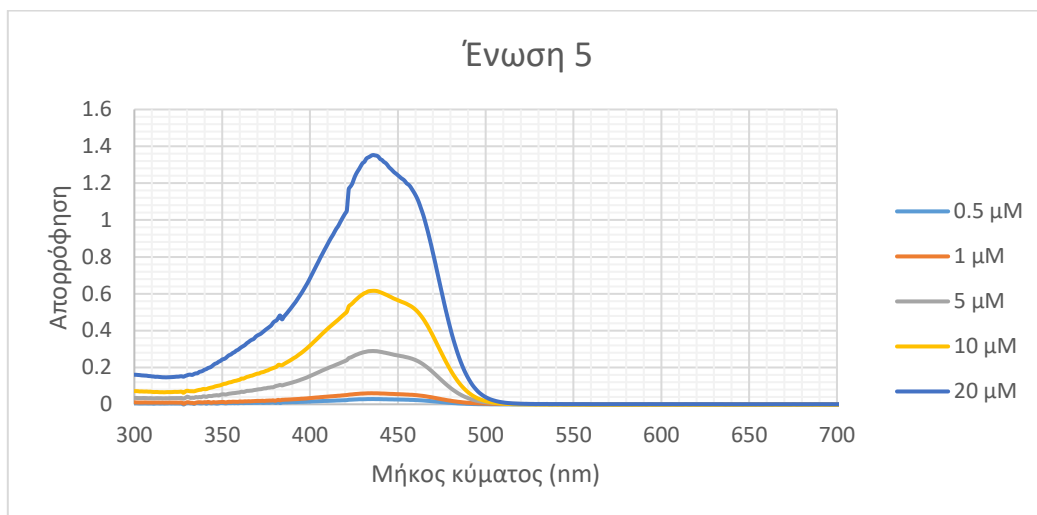
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 582 nm) της ένωσης 4 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 14) προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 4 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0102 + 0.0117x, \quad \mu\epsilon R^2 = 0.9766$$

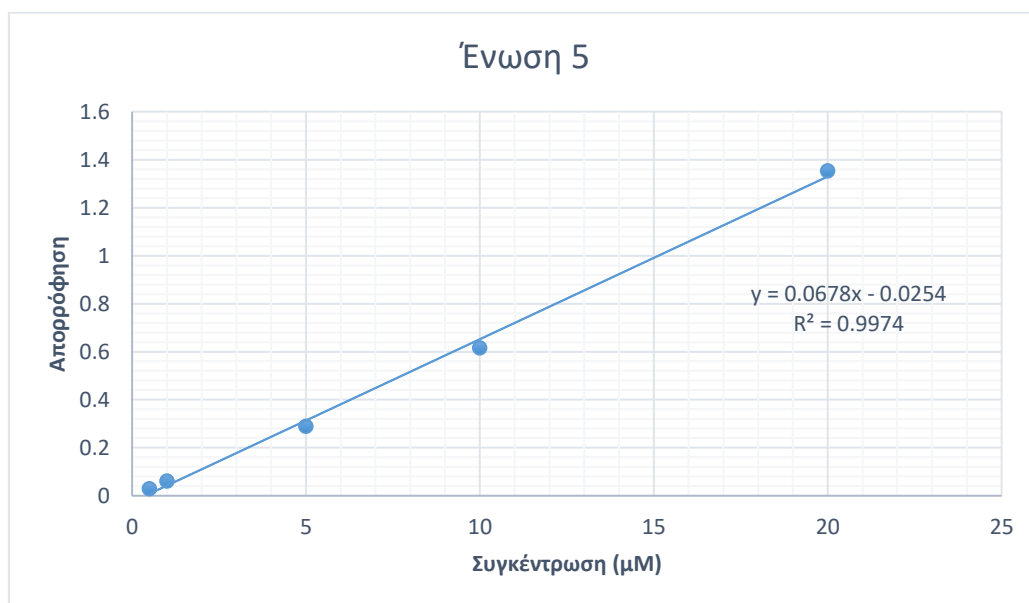
Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι  $\epsilon = 0,911 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 5 σε διαλύτη DMSO και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 15):



Διάγραμμα 15: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 5 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Από το φάσμα απορρόφησης για την ένωση 5 προκύπτει ότι η εμφανίζει μια σημαντική Soret band με μέγιστη απορρόφηση να επιτυγχάνεται για μήκος κύματος ακτινοβολίας **435 nm**.



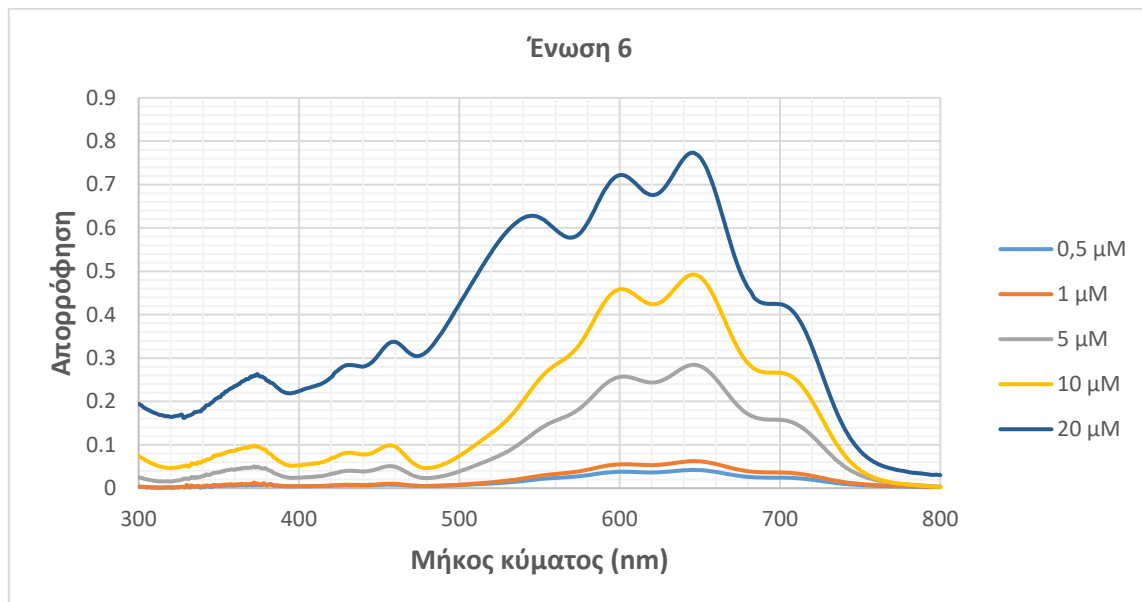
Διάγραμμα 16: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 435 nm) της ένωσης 5 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 16) προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 5 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 0.0678x - 0.0254, \quad \mu\epsilon R^2 = 0.9974.$$

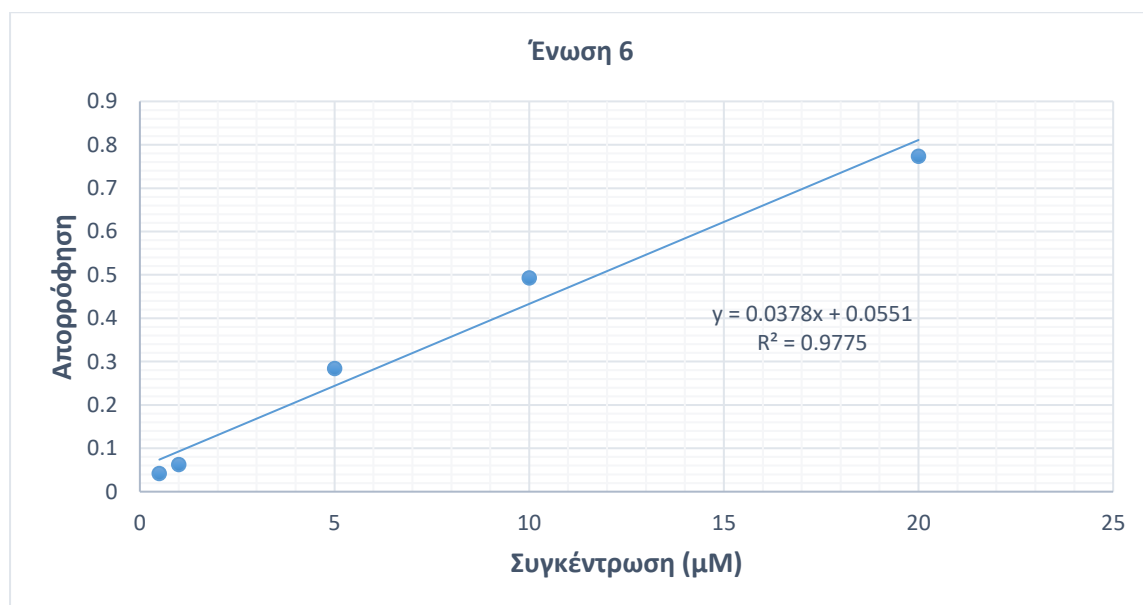
Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι  $\varepsilon = 5,59 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Τέλος, παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης της ένωσης 6 σε DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 17):



Διάγραμμα 17: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 6 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.

Στο φάσμα απορρόφησης της ένωσης 6 εμφανίζονται αρκετές Q bands με μέγιστη απορρόφηση για μήκος κύματος ακτινοβολίας **646 nm**. Η αμέσως μικρότερη ένταση απορρόφησης εμφανίζεται για μήκος κύματος 601 nm, έπειτα για μήκος κύματος 546 nm και τέλος για μήκος κύματος 700 nm.



Διάγραμμα 18: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 646 nm) της ένωσης 6 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από αυτή τη γραφική παράσταση (Διάγραμμα 18) προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση της ένωσης 6 μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση με βάση τη σχέση:

$$y = 0,0378 + 0,0551x, \quad \text{με } R^2 = 0,9775$$

Οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer ικανοποιούνται και ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας είναι  $\epsilon = 4,64 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) συνοψίζονται τα μήκη κύματος στα οποία οι έξι ενώσεις απορροφούν το μέγιστο αριθμό φωτονίων και ο αντίστοιχος συντελεστής μοριακής απορρόφησης.

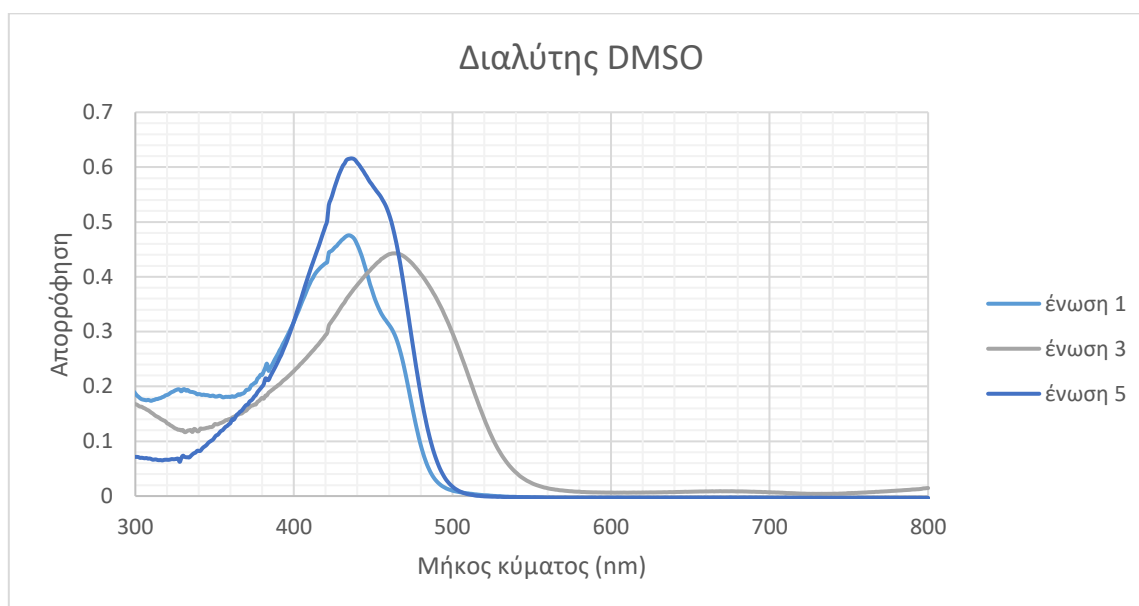
Ένωση	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης	Μοριακή απορροφητικότητα, $\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
1	434 nm	$6.45 \cdot 10^4$
2	484 nm	$1.958 \cdot 10^4$
3	464 nm	$4.43 \cdot 10^4$
4	582 nm	$0.911 \cdot 10^4$
5	435 nm	$5.59 \cdot 10^4$
6	656 nm	$4.64 \cdot 10^4$

Πίνακας 1: Μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και μοριακή απορροφητικότητα των ενώσεων σε DMSO.



### Συγκριτική μελέτη των αναλόγων κουρκουμινονιδών χωρίς συμπλοκοποίηση

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 19) παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των τριών κουρκουμινονιδών που συντέθηκαν χωρίς το σύμπλοκο BF (ενώσεις 1, 3 και 5), για συγκέντρωση 0,5  $\mu\text{M}$ , ενώ στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης για κάθε ένωση:



Διάγραμμα 19: Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων απορρόφησης ενώσεων 1, 3 και 5.

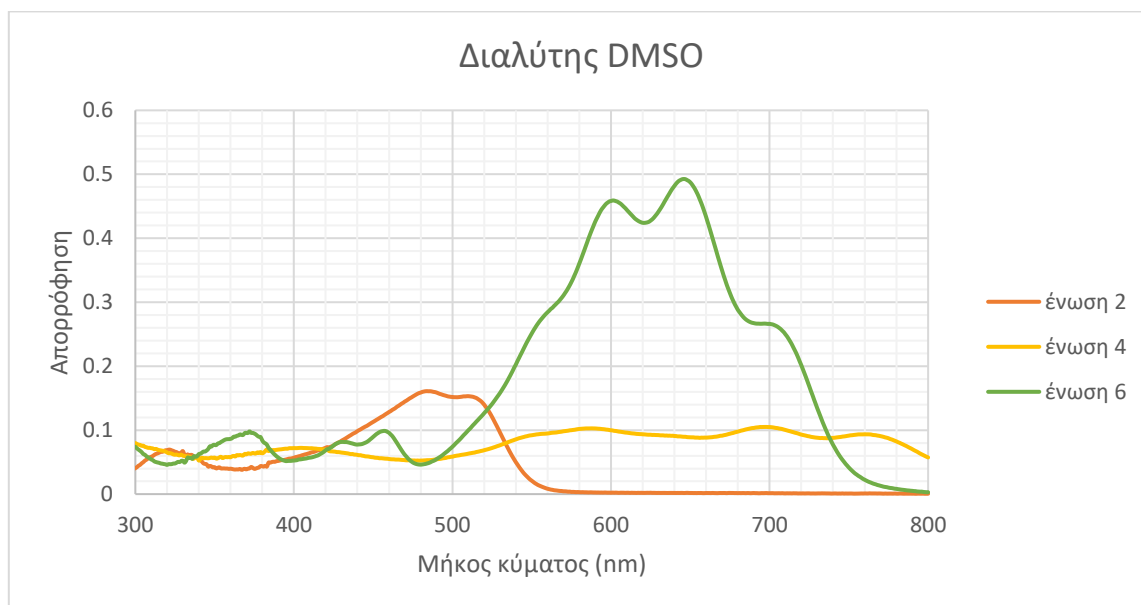
Ένωση	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης
<b>1</b>	434 nm
<b>3</b>	464 nm
<b>5</b>	435 nm

Πίνακας 2: Μήκη κύματος των τριών κουρκουμινονιδών χωρίς συμπλοκοποίηση.

Η ένωση 1 και η ένωση 5 (κουρκουμίνη I) απορροφούν σε παραπλήσια μήκη κύματος (434 nm και 435 nm αντίστοιχα), ενώ η ένωση 3 απορροφά σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (464 nm). Συνεπώς φαίνεται ότι η ύπαρξη δύο επιπλέον διπλών δεσμών στο μόριο της κουρκουμίνης I σε συνδυασμό με την υποκατάσταση στα φαινύλια προκαλεί μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης κατά 30 nm περίπου.

### Συγκριτική μελέτη των αναλόγων κουρκουμινοειδών με συμπλοκοποίηση

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 20) παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των τριών κουρκουμινοειδών που συμπλοκοποιήθηκαν με BF (ενώσεις 2, 4 και 6), σε συγκέντρωση 0,5  $\mu$ M.



Διάγραμμα 20: Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων απορρόφησης ενώσεων 2, 4 και 6.

Στον Πίνακα 3 καταγράφονται τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης:

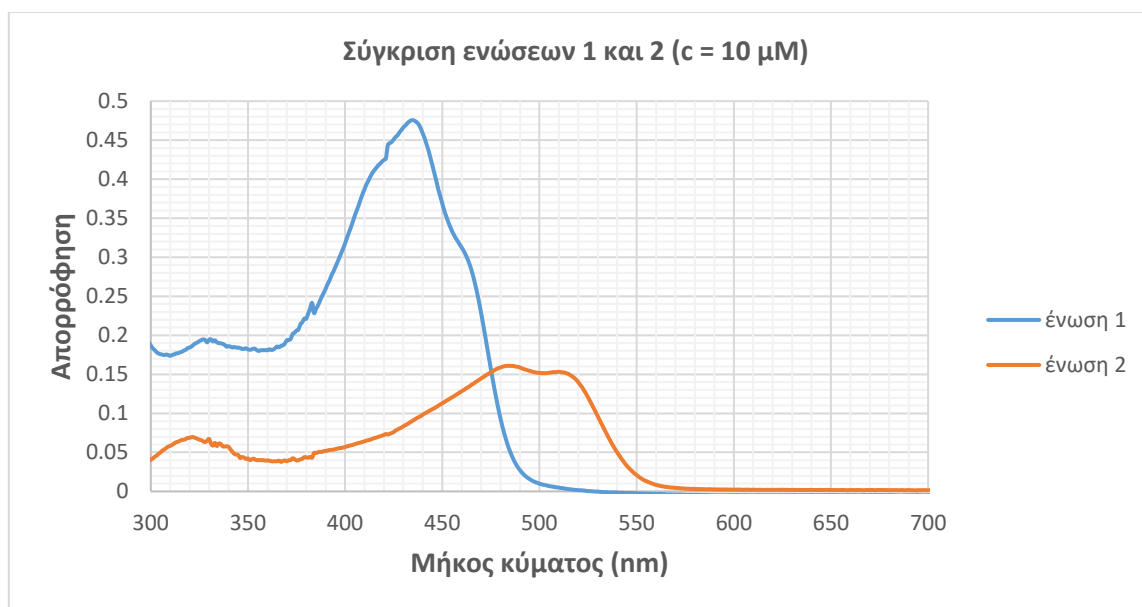
Ένωση	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης
<b>2</b>	484 nm
<b>4</b>	582 nm
<b>6</b>	656 nm

Πίνακας 3: Μήκη κύματος των τριών κουρκουμινοειδών με συμπλοκοποίηση.

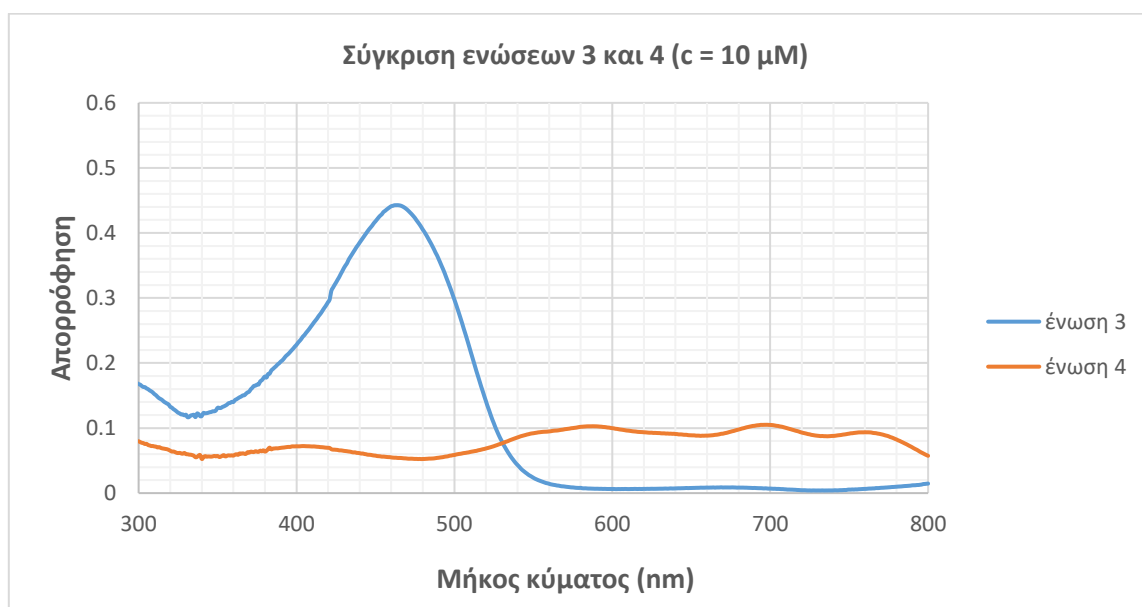
Από τα συμπλοκοποιημένα παράγωγα των κουρκουμινοειδών παρατηρείται ότι η ένωση 6 (σύμπλοκο κουρκουμίνης I με βόριο) εμφανίζει απορρόφηση στο μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με τις άλλες δυο συμπλοκοποιημένες ενώσεις (656 nm). Με την προσθήκη του επιπλέον διπλού δεσμού φαίνεται ότι υπάρχει μπλε μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης, όπως φαίνεται με την ένωση 4 (582 nm). Κατ' επέκταση, η κατάργηση της υποκατάστασης στους αρωματικούς δακτυλίους του μορίου, μαζί με την ύπαρξη του επιπλέον διπλού δεσμού, φαίνεται ότι μετατοπίζει ακόμα περισσότερο το φάσμα απορρόφησης προς τα αριστερά, με την ένωση 2 να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 484 nm.

Συγκριτική μελέτη των φασμάτων απορρόφησης κάθε κουρκουμοειδούς και του αντίστοιχου συμπλόκου σε DMSO

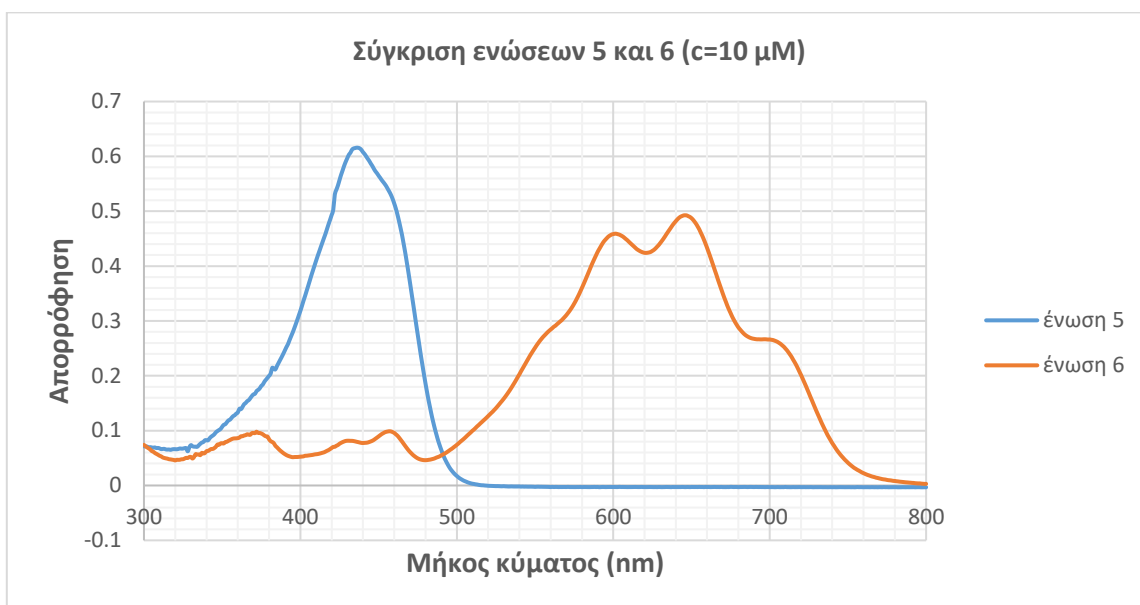
Στη συνέχεια, παρατίθενται τρία διαγράμματα καθένα από τα οποία απεικονίζει το φάσμα απορρόφησης ενός κουρκουμοειδούς και του αντίστοιχού συμπλόκου του (Διάγραμμα 21, Διάγραμμα 22, Διάγραμμα 23):



Διάγραμμα 21: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 1 και του συμπλόκου της με βόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 μM, σε διαλύτη DMSO.



Διάγραμμα 22: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 και του συμπλόκου της με βόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 μM, σε διαλύτη DMSO.



Διάγραμμα 23: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 5 και του συμπλόκου της με θόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 μM, σε διαλύτη DMSO.

Τα συμπλοκοποιημένα ανάλογα εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση σε μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με τις μη συμπλοκοποιημένες ενώσεις. Έχει επιτευχθεί, δηλαδή, μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τα μη συμπλοκοποιημένα ανάλογα, αν και η ένταση της απορρόφησης είναι μικρότερη.

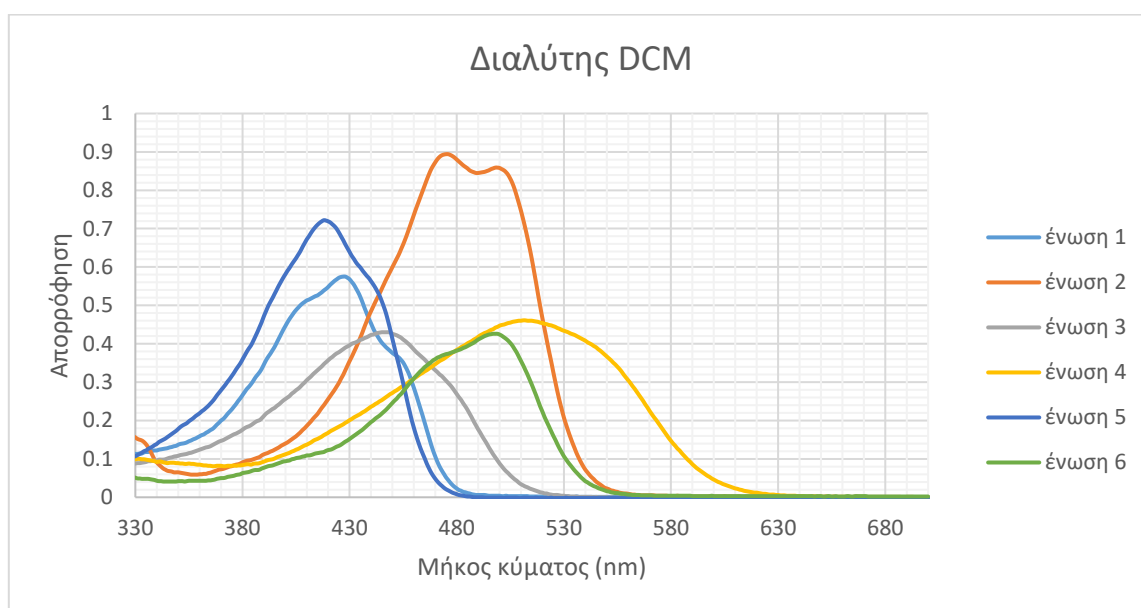
Φαίνεται ότι η ένωση με το μεγαλύτερο μήκος κύματος διέγερσης είναι η ένωση 6, δηλαδή το σύμπλοκο της κουρκουμίνης I, που έχει μετατοπίσει κατά πολύ το φάσμα απορρόφησης και σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα αλλά και σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις (από 74 έως 222 nm).

### Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων στην ίδια συγκέντρωση σε DCM

Αρχικά, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα συγκέντρωσης  $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  για όλες τις ενώσεις, με βάση τον τύπο  $c = \frac{m}{V \cdot Mr}$ , σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM). Με διαδοχικές αραιώσεις προέκυψαν τελικά για την κάθε ένωση πέντε διαλύματα συγκεντρώσεων:

$2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  ( $20 \mu\text{M}$ ),  $10^{-5} \text{ M}$  ( $10 \mu\text{M}$ ),  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  ( $5 \mu\text{M}$ ),  $10^{-6} \text{ M}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) και  $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  ( $0,5 \mu\text{M}$ )

Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση για κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα. Η μέγιστη συγκέντρωση για κάθε ένωση μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και ικανοποιούνται όλες οι προϋποθέσεις του νόμου Lambert – Beer. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 24) εμφανίζονται συγκεντρωτικά τα φάσματα απορρόφησης για τις έξι ενώσεις για συγκέντρωση  $10^{-5} \text{ M}$  ( $10 \mu\text{M}$ ):



Διάγραμμα 24: Φάσμα απορρόφησης όλων των ενώσεων σε διχλωρομεθάνιο (DCM), με συγκέντρωση  $10 \mu\text{M}$ .

Οι μέγιστες τιμές μήκους κύματος απορρόφησης για τις έξι ενώσεις είναι:

Ένωση	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης	Μοριακή απορροφητικότητα, $\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
1	428 nm	$6,15 \cdot 10^4$
2	477 nm	$2,12 \cdot 10^4$
3	448 nm	$4,56 \cdot 10^4$
4	513 nm	$0,95 \cdot 10^4$
5	418 nm	$3,96 \cdot 10^4$
6	499 nm	$5,02 \cdot 10^4$

Πίνακας 4: Μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και μοριακή απορροφητικότητα των ενώσεων σε DCM.

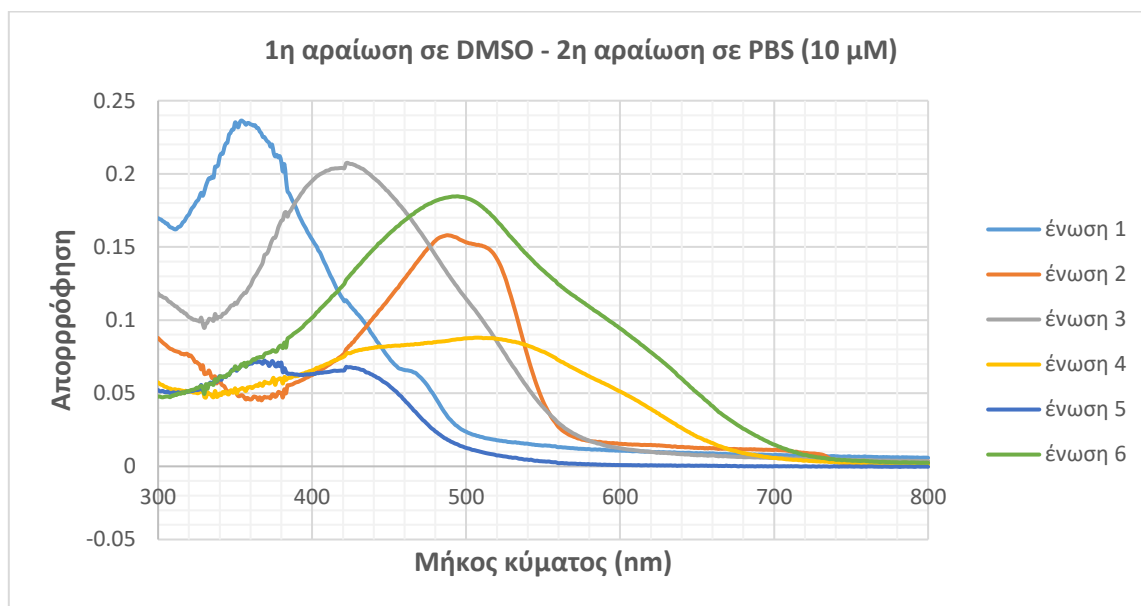
Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι:

- Τα διαλύματα τόσο των μη συμπλοκοποιημένων όσο και των συμπλοκοποιημένων ενώσεων παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα διαλύματα των αντίστοιχων ενώσεων σε DMSO. Δηλαδή, από τις μη συμπλοκοποιημένες ενώσεις η ένωση 3 απορροφά σε μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με τις 1 και 5, και οι συμπλοκοποιημένες ενώσεις 2, 4 και 6 εμφανίζουν μετατοπισμένο φάσμα απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τα αντίστοιχα μη συμπλοκοποιημένα ανάλογα.
- Τα διαλύματα των ενώσεων σε DCM απορροφούν σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με τα διαλύματα των ενώσεων σε DMSO. Για το λόγο αυτό η μελέτη φθορισμού επιλέγεται να γίνει στο διαλύτη DMSO, που αναμένεται να δοθούν καλύτερα αποτελέσματα.

### Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης όλων των ενώσεων στην ίδια συγκέντρωση σε PBS

Τέλος, ακολουθεί μελέτη της απορρόφησης των έξι παραγώγων σε PBS (Phosphate-Buffered Saline) που αποτελεί έναν υδατικό διαλύτη. Η μελέτη αυτή είναι σημαντική καθώς η συμπεριφορά των ενώσεων αυτών σε υδατικούς διαλύτες είναι ενδεικτική για την περίπτωση που βρεθούν μέσα σε ζωντανό οργανισμό, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των βιολογικών υγρών είναι υδατικά διαλύματα.

Παρακάτω παρατίθενται συγκεντρωτικά τα φάσματα των έξι ενώσεων με πρώτη διάλυση σε DMSO και έπειτα σε PBS (Διάγραμμα 25):



Διάγραμμα 25: Φάσμα απορρόφησης όλων των ενώσεων με πρώτη αραιώση σε DMSO και δεύτερη αραιώση σε PBS, με τελική συγκέντρωση 10 μΜ.

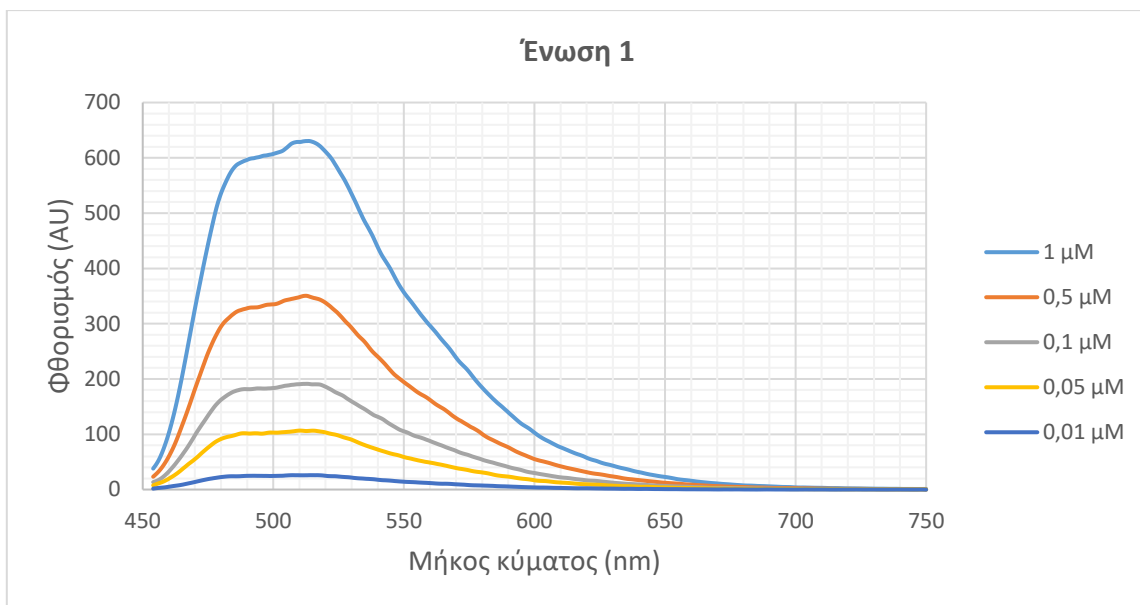
Το φάσμα που λαμβάνεται στο συγκεκριμένο διαλύτη φαίνεται εντελώς διαφορετικό σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης των ενώσεων σε DMSO και DCM (που είναι οργανικοί διαλύτες), καθώς τα παράγωγα της κουρκουμίνης είναι δυσδιάλυτα σε υδατικούς διαλύτες και δημιουργούν συσσωματώματα. Το αποτέλεσμα είναι τα φάσματα όλων των ενώσεων να είναι μετατοπισμένα προς τα αριστερά και να παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη ένταση απορρόφησης σε σχέση με τη διάλυση σε DMSO και DCM.

### Γ.3.2. Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού

#### Φασματοσκοπική μέτρηση φθορισμού όλων των ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO

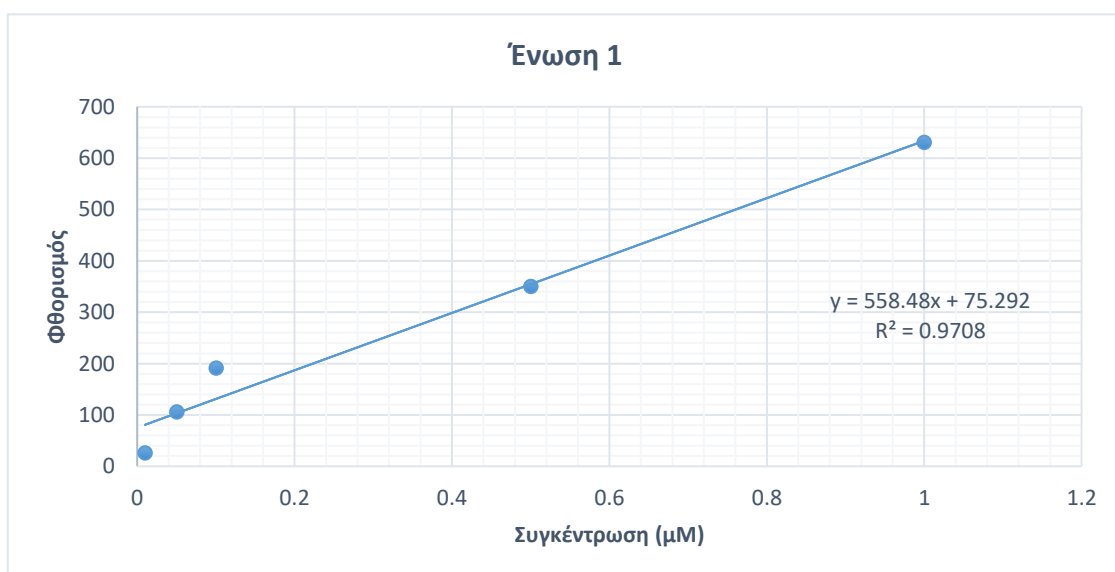
Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των έξι ενώσεων, με τιμές συγκεντρώσεων αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αρχικά, παρατίθεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 1 (Διάγραμμα 26):



Διάγραμμα 26: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διέγερση της ένωσης 1 γίνεται για μήκος κύματος 434 nm, για μήκος κύματος δηλαδή που η ουσία απορροφά το μέγιστο δυνατό αριθμό φωτονίων και επομένως επέρχεται και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός, που παρατηρείται στα 513 nm.



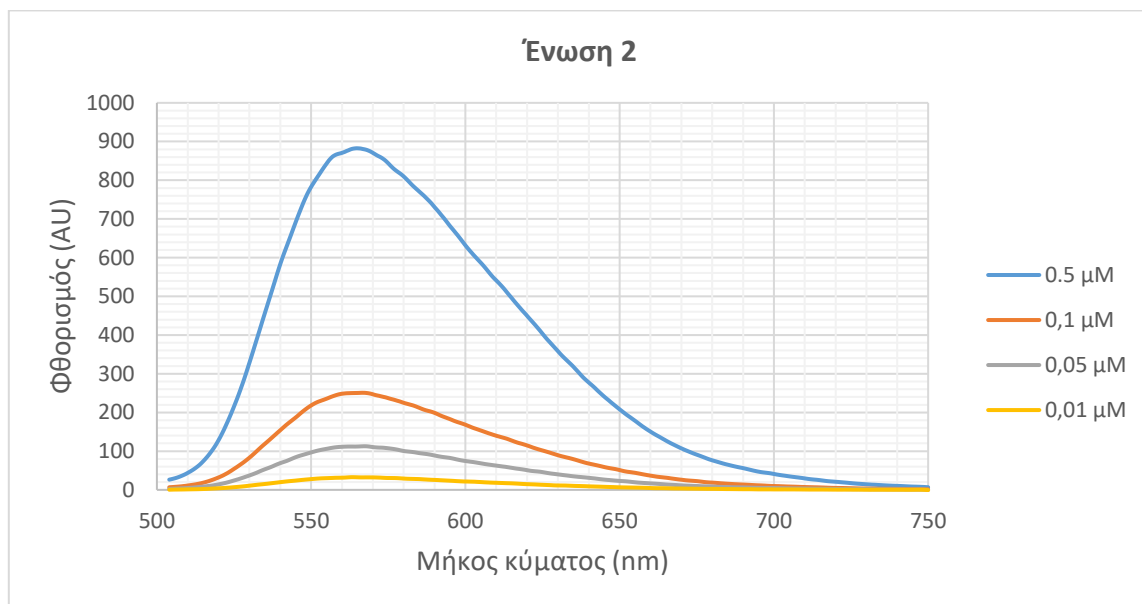
Διάγραμμα 27: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 513 nm) της ένωσης 1 συναρτήσει της συγκέντρωσης.



Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 27) προκύπτει ότι η ένταση του σήματος φθορισμού της ένωσης 1 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

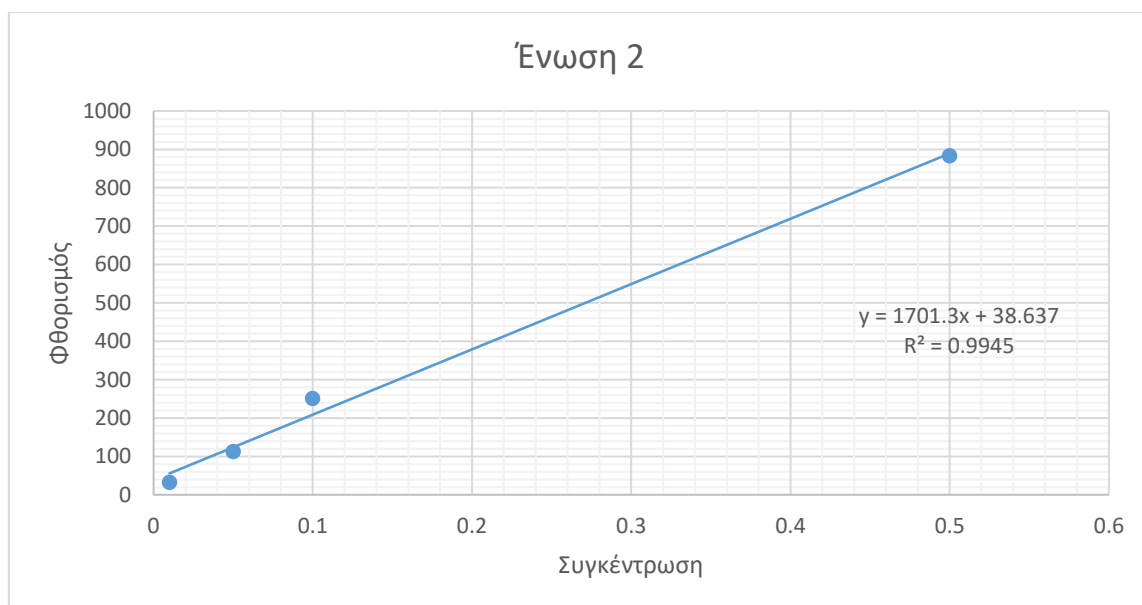
$$y = 558.48x + 75.292, \quad \text{με } R^2 = 0.9708$$

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 2 σε διαλύτη DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 28):



Διάγραμμα 28: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διέγερση της ένωσης 2 γίνεται για μήκος κύματος 484 nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός παρατηρείται στα 565 nm.

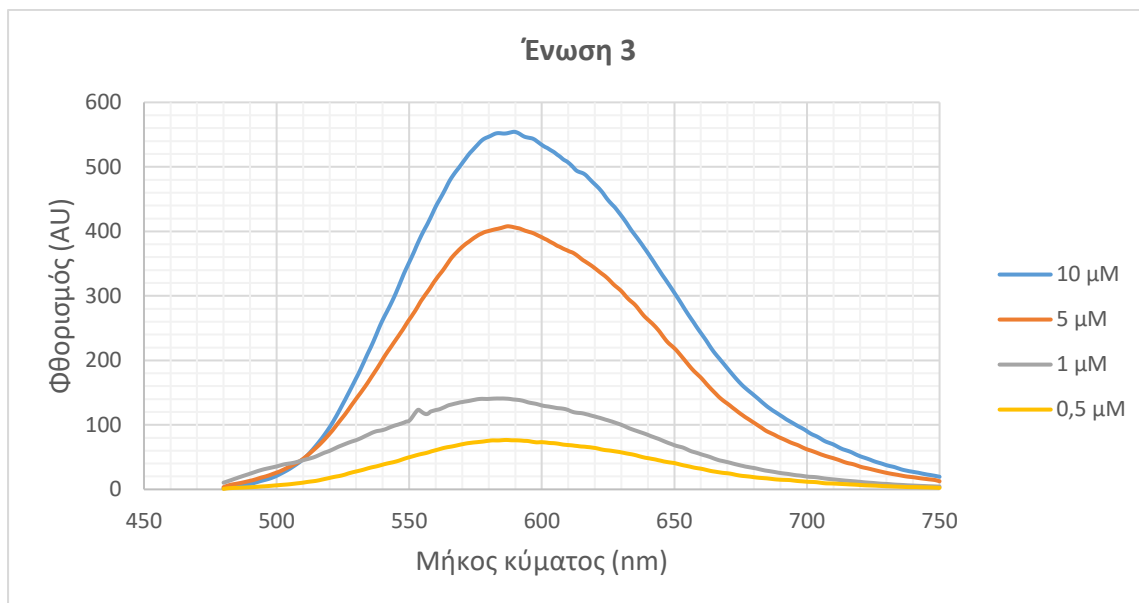


Διάγραμμα 29: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 513 nm) της ένωσης 2 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 29) προκύπτει ότι η ένταση του σήματος φθορισμού της ένωσης 2 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

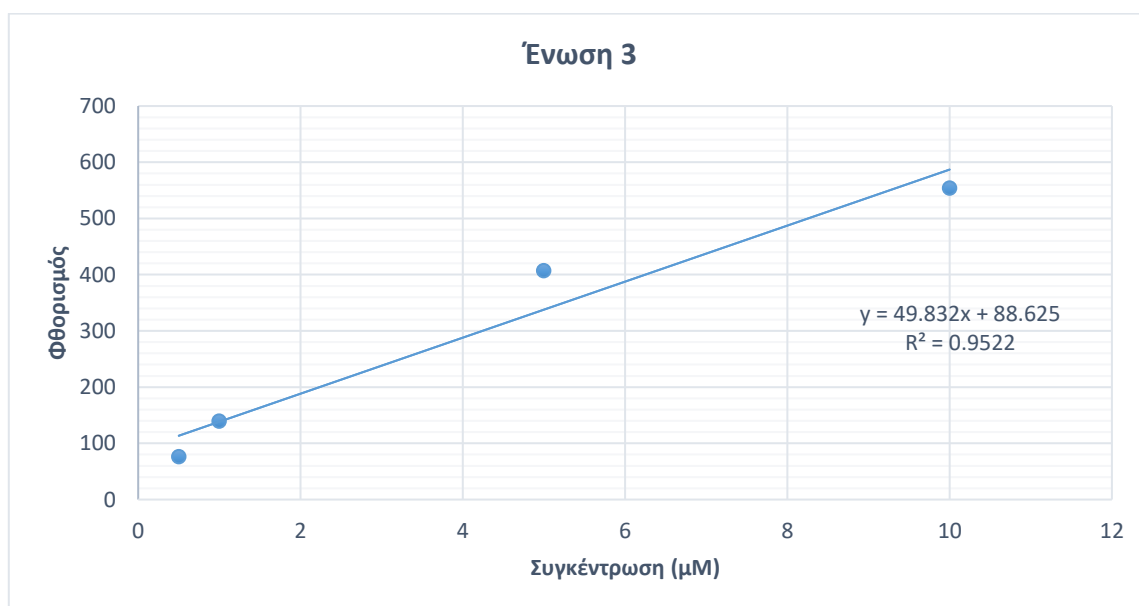
$$y = 1701.3x + 38.637, \quad \text{με } R^2 = 0.9945$$

Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 3 σε DMSO και για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 30/Διάγραμμα 11):



Διάγραμμα 30: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 3 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διέγερση της ένωσης 3 γίνεται για μήκος κύματος 464 nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός παρατηρείται στα 589 nm.

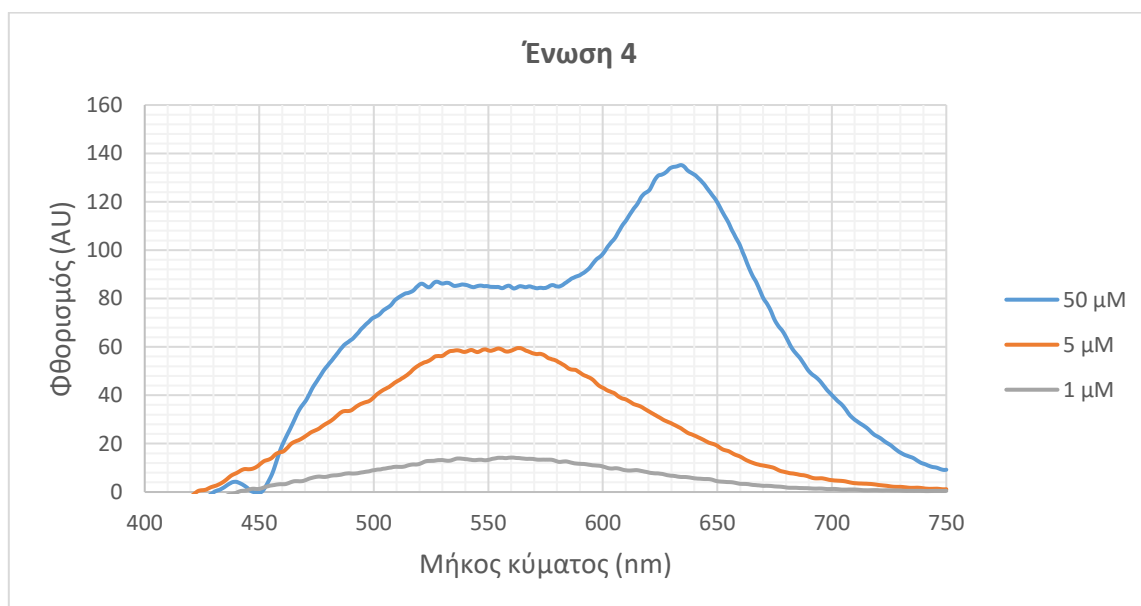


Διάγραμμα 31: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 589 nm) της ένωσης 3 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 31) προκύπτει ότι η ένταση του σήματος φθορισμού της ένωσης 3 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 49.832x + 88.625, \quad \text{με } R^2 = 0.9522$$

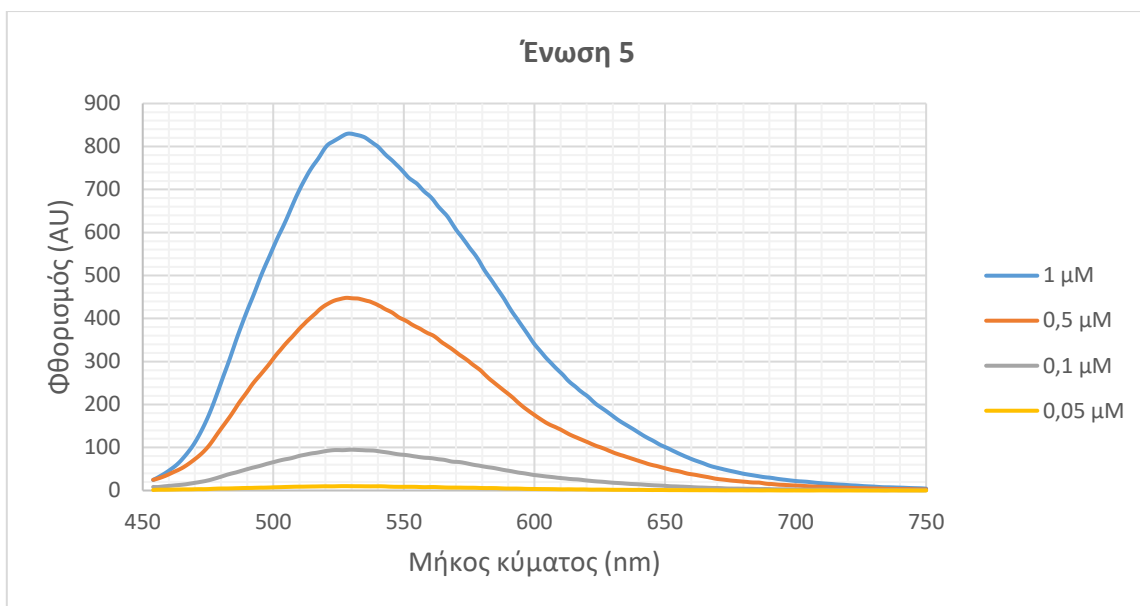
Παρακάτω, παρατίθεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 4 σε DMSO και για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 32):



Διάγραμμα 32: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 4 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

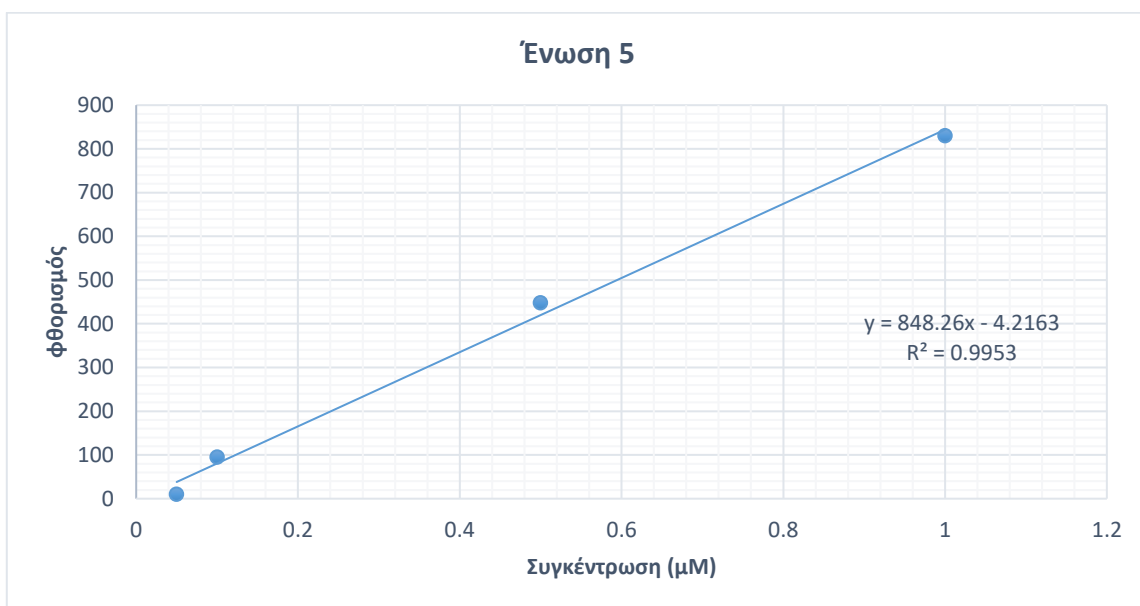
Για τη λήψη του φάσματος εκπομπής φθορισμού της ένωσης 4 η διέγερση έγινε στα 380 nm. Η ένταση φθορισμού είναι αρκετά χαμηλή και παρατηρείται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας εμφανίζεται μια επιπλέον κορυφή στα 640 nm, που μπορεί να οφείλεται σε συσσωματώματα (j-aggregates) που πιθανόν να δημιουργήθηκαν.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 5 σε διαλύτη DMSO και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 33):



Διάγραμμα 33: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 5 (κουρκουμίνη Ι) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διέγερση της ένωσης 5 γίνεται για μήκος κύματος 435 nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός παρατηρείται στα 529 nm.

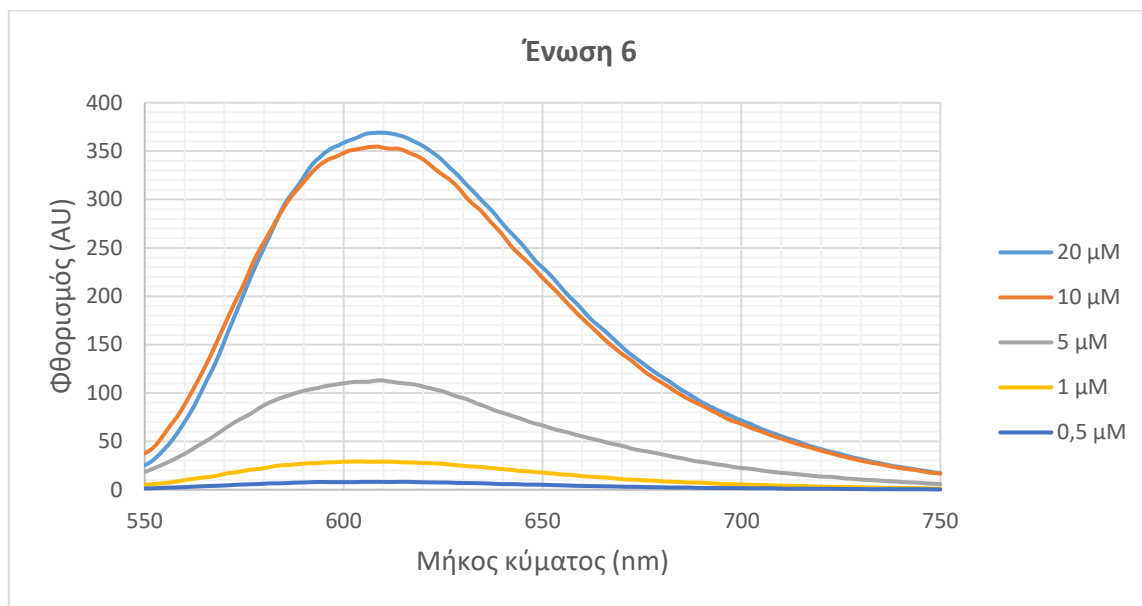


Διάγραμμα 34: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 529 nm) της ένωσης 5 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 34) προκύπτει ότι η ένταση του σήματος φθορισμού της ένωσης 5 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

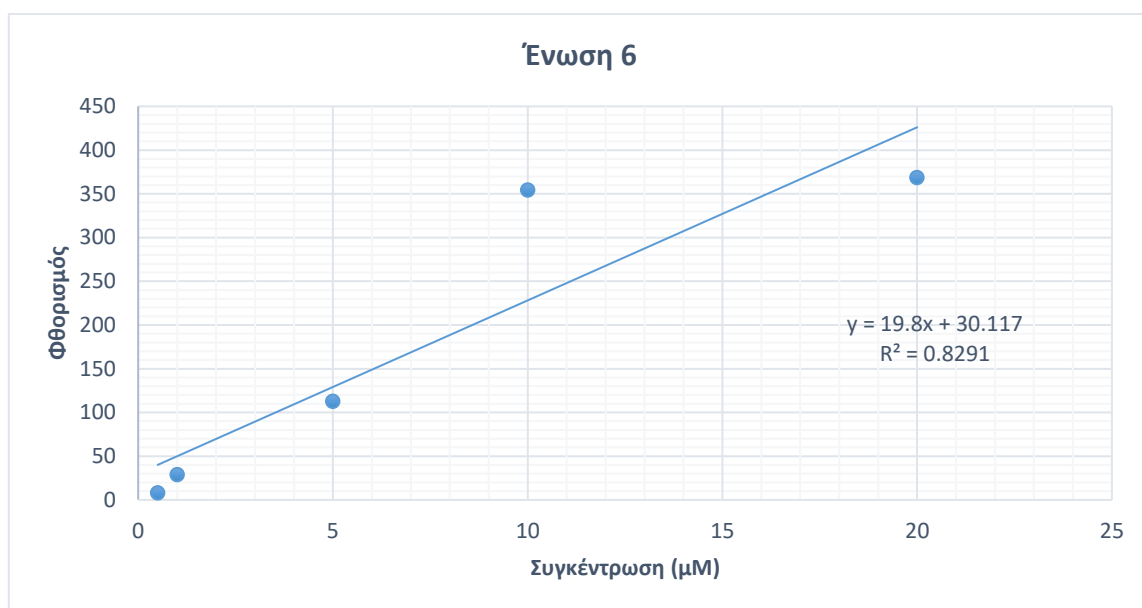
$$y = 848.26x - 4.2163, \quad \text{με } R^2 = 0.9953$$

Τέλος, παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής της ένωσης 6 σε DMSO για διαφορετικές συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 35):



Διάγραμμα 35: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 6 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Η διέγερση της ένωσης 6 γίνεται για μήκος κύματος 530 nm και ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός παρατηρείται στα 608 nm.



Διάγραμμα 36: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 608 nm) της ένωσης 6 συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Από την παραπάνω γραφική παράσταση (Διάγραμμα 36) προκύπτει ότι η ένταση του σήματος φθορισμού της ένωσης 6 μεταβάλλεται γραμμικά ως προς τη συγκέντρωση και με βάση τη σχέση:

$$y = 19.8x + 30.117, \quad \mu\epsilon R^2 = 0.8291$$

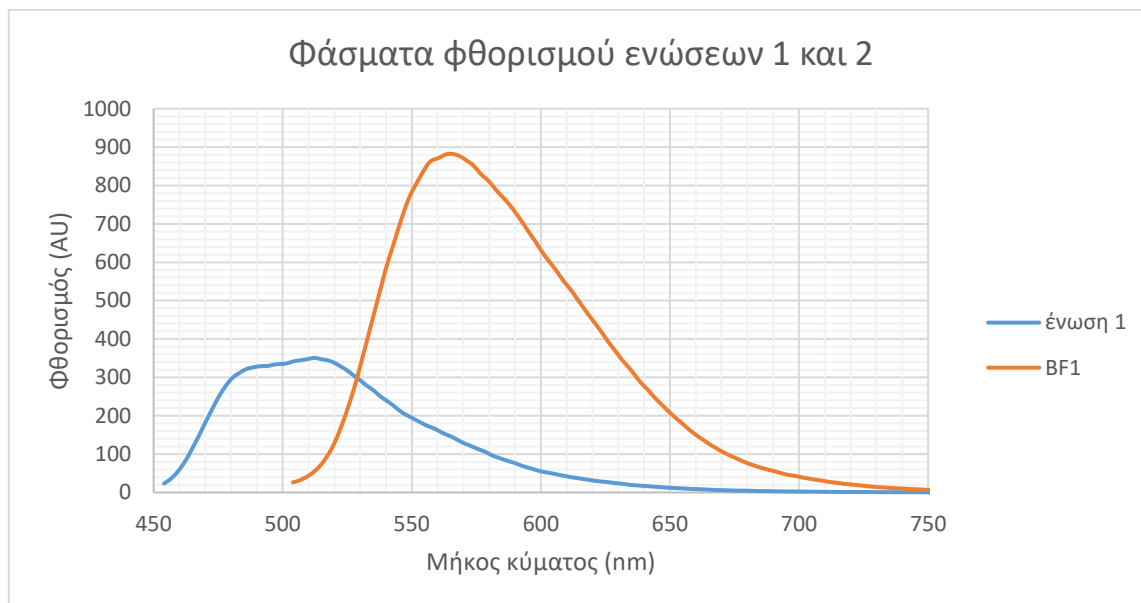
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα μήκη κύματος, στα οποία έγινε η διέγερση για την κάθε ένωση και τα μήκη κύματος που εμφάνισαν τη μέγιστη εκπομπή:

Ένωση	Μήκος κύματος διέγερσης	Μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής
1	434 nm	513 nm
2	484 nm	565 nm
3	464 nm	589 nm
4	380 nm	640 nm
5	435 nm	529 nm
6	530 nm	608 nm

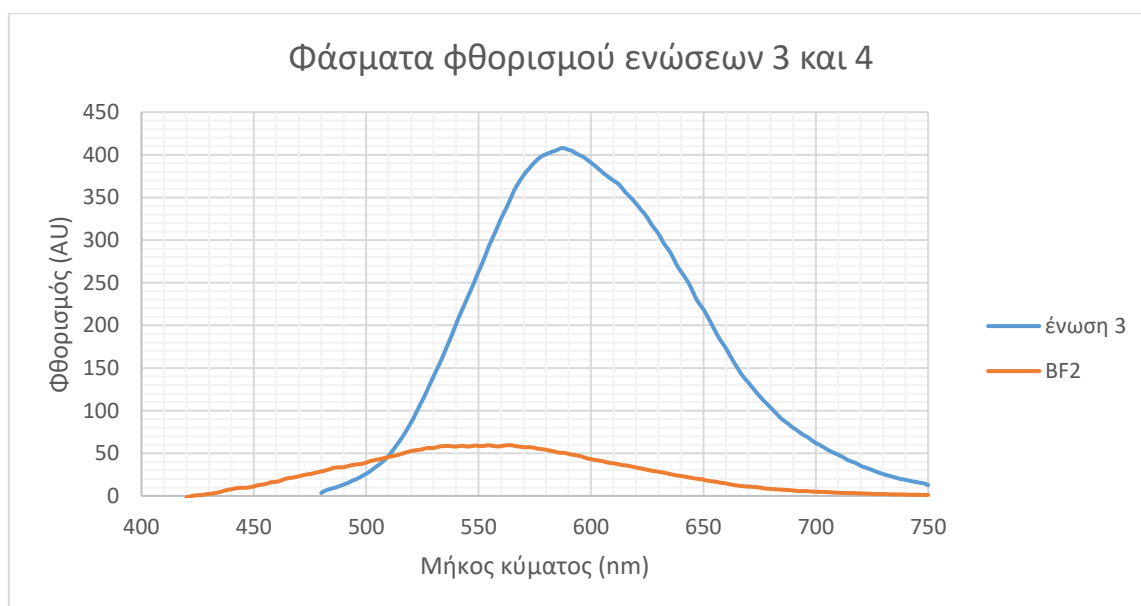
*Πίνακας 5: Μήκη κύματος διέγερσης και μέγιστης εκπομπής κάθε ένωσης.*

## Συγκριτική μελέτη των φασμάτων εκπομπής

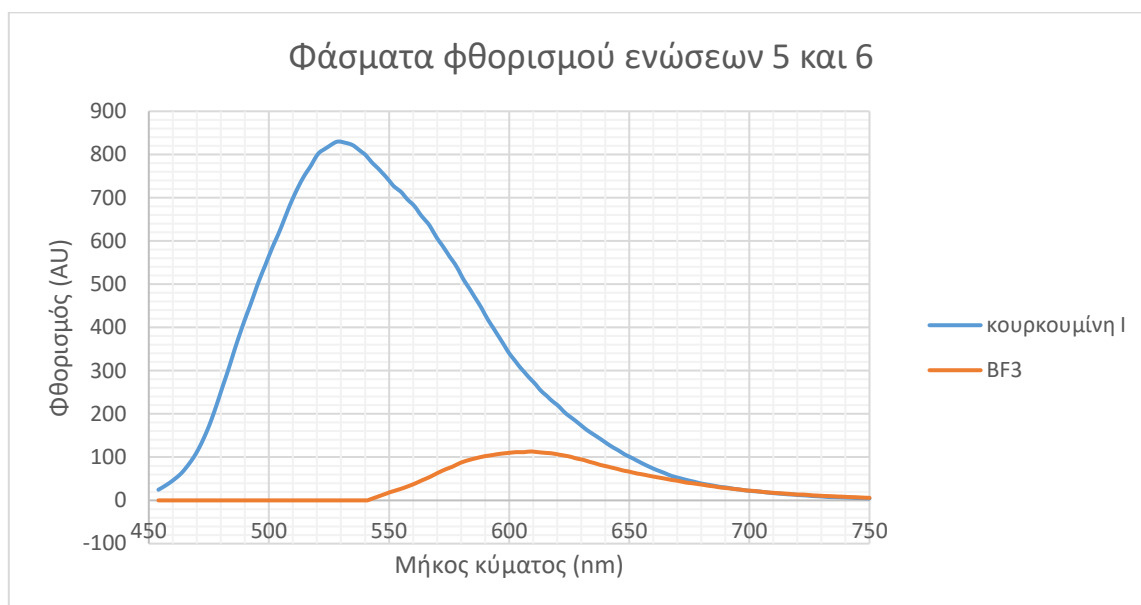
Παρακάτω παρατίθενται τρία διαγράμματα καθένα από τα οποία απεικονίζει το φάσμα εκπομπής ενός κουρκουμινοειδούς και του αντίστοιχού συμπλόκου του (Διάγραμμα 37, Διάγραμμα 21, Διάγραμμα 38, Διάγραμμα 23):



Διάγραμμα 37: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 1 και 2, συγκέντρωσης 0,5  $\mu$ M, σε διαλύτη DMSO.



Διάγραμμα 38: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 3 και 4, συγκέντρωσης 5  $\mu$ M, σε διαλύτη DMSO.



Διάγραμμα 39: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 5 και 6, συγκέντρωσης 5 μM, σε διαλύτη DMSO.

Από τα παραπάνω προκύπτουν τα εξής:

- Η ένωση 2 συγκριτικά με την ένωση 1 παρουσιάζει πιο έντονο φθορισμό σε μεγαλύτερο μήκος κύματος.
- Η ένωση 4 ωστόσο συγκριτικά με την ένωση 3 μπορεί να μετατοπίζει το φάσμα εκπομπής προς τα αριστερά και δίνει μικρότερη ένταση φθορισμού.
- Η ένωση 6 σε σχέση με την ένωση 5 μετατοπίζει το φάσμα πιο δεξιά, που είναι και το ζητούμενο, με μικρή όμως ένταση εκπομπής φθορισμού.
- Οι ενώσεις 1 και 2 δίνουν πολύ ισχυρό φθορισμό αν και σε μικρότερη συγκέντρωση (0,5μM) σε σχέση με τις υπόλοιπες (5μM).
- Η προσθήκη του BF<sub>3</sub> στην περίπτωση της ένωσης 1 σχεδόν τριπλασιάζει το φθορισμό ενώ στις άλλες 2 περιπτώσεις, ένωση 3 και 5, τον υποβιβάζει σημαντικά.



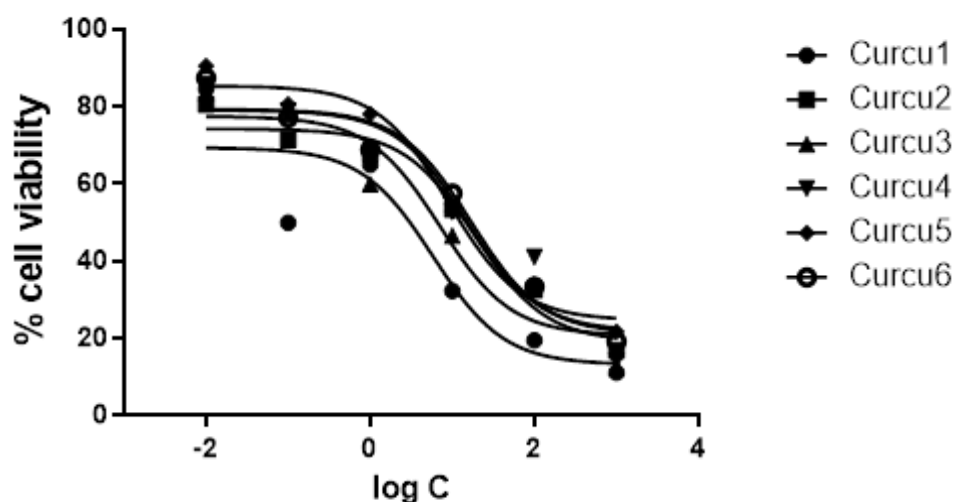
## Γ.4. Βιολογική αξιολόγηση

### Γ.4.1. Δοκιμασία MTT

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ελήφθησαν δεδομένα από το φωτόμετρο για τρεις επαναλήψεις του πειράματος. Από τα δεδομένα αυτά προέκυψε ένα διάγραμμα που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα και για τις έξι ενώσεις (διάγραμμα 40) και υπολογίζεται το  $IC_{50}$  για κάθε ένωση (Πίνακας 6). Το  $IC_{50}$  είναι ο δείκτης από όπου προκύπτει πόσο τοξική είναι η κάθε ένωση, πόση συγκέντρωση απαιτείται από την κάθε ένωση για να μειωθεί κατά 50% ο κυτταρικός πληθυσμός *in vitro*.

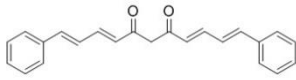
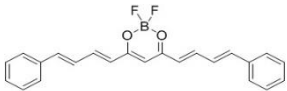
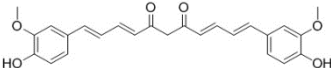
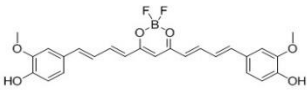
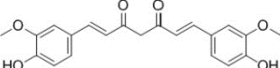
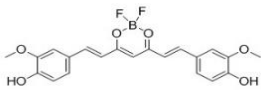
Οι τιμές της κυτταροτοξικότητας και των έξι ενώσεων είναι της τάξης των  $\mu M$  (περίπου 1 έως 10  $\mu M$ ), που τις καθιστά αρκετά κυτταροτοξικές δεδομένου ότι ο χρόνος επώασης με τις ενώσεις είναι 24 ώρες.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 40) απεικονίζεται η επί % κυτταρική επιβίωση συναρτήσει του λογάριθμου κάθε συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε από την κάθε ένωση.



Διάγραμμα 40: Σιγμοειδής καμπύλη MTT.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6):

	Ένωση	IC <sub>50</sub> (μM)
1		16,94 ± 3,65
2		9,076 ± 4,52
3		14,98 ± 6,98
4		7,039 ± 2,79
5		18,78 ± 6,22
6		0,8878 ± 0,12

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας (MTT) για τις έξι ενώσεις

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα η κατάταξη των έξι ενώσεων από την πιο κυτταροτοξική (μικρότερη απαιτούμενη συγκέντρωση) έως τη λιγότερη κυτταροτοξική (μεγαλύτερη απαιτούμενη συγκέντρωση) έχει ως εξής:

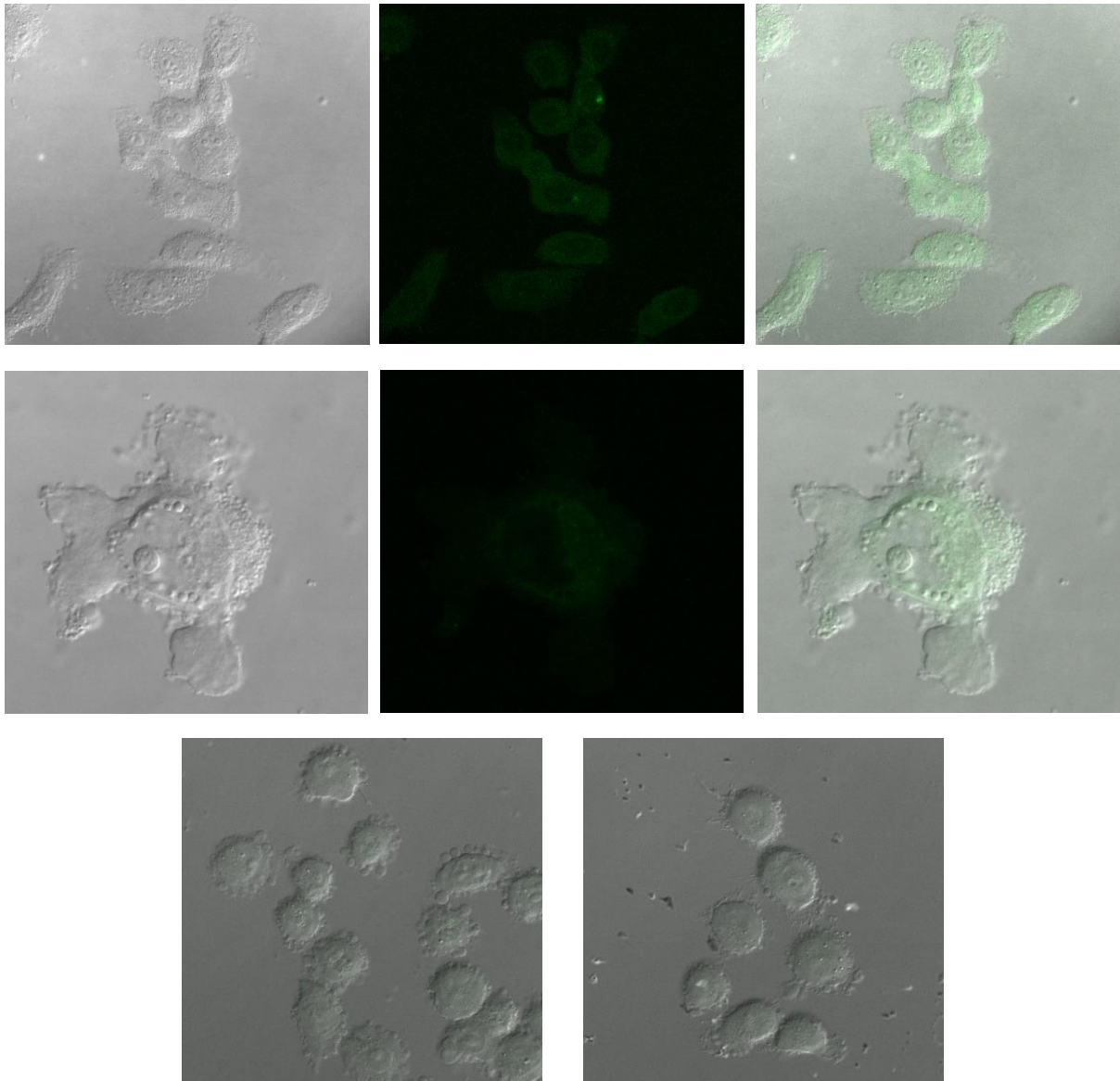
$$IC_{50}(\text{Ένωσης 6}) < IC_{50}(\text{Ένωσης 4}) < IC_{50}(\text{Ένωσης 2}) \\ < IC_{50}(\text{Ένωσης 3}) < IC_{50}(\text{Ένωσης 1}) < IC_{50}(\text{Ένωσης 5})$$

- Καταρχάς, παρατηρείται ότι οι ενώσεις που φέρουν το BF (ενώσεις 2, 4, 6) απαιτούν μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις ενώσεις που δεν το φέρουν (ενώσεις 1, 3, 5), δηλαδή το BF προκαλεί μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, κάτι που συμβαδίζει και με βιβλιογραφικά δεδομένα.
- Συγκριτικά από τις ενώσεις 1, 3 και 5 καλύτερα αποτελέσματα δίνει η ένωση 3, έπειτα η ένωση 1 και τέλος η ένωση 5 (κουρκουμίνη I). Από αυτό προκύπτει ότι η ύπαρξη του επιπλέον διπλού δεσμού στο μόριο προκαλεί μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση. Ακόμα, συγκριτικά από τις ενώσεις 1 και 3 προκύπτει ότι η ύπαρξη των συγκεκριμένων υποκαταστατών στα φαινύλια επίσης επάγει μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση.

- Συγκριτικά από τις ενώσεις 2, 4 και 6 καλύτερα αποτελέσματα δίνει η ένωση 6, έπειτα η ένωση 4 και τέλος η 2. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η ένωση 3 εμφανίζει μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από την 1, είναι αναμενόμενο και τα συμπλοκοποιημένα ανάλογά τους να εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά, με την ένωση 4 να είναι πιο κυτταροτοξική από την 2. Ωστόσο, όλα τα συμπλοκοποιημένα ανάλογα είναι πιο κυτταροτοξικά από τα απλά κουρκουμινοειδή.
- Τέλος, με βάση και τα αποτελέσματα των απλών αναλόγων της κουρκουμίνης, φαίνεται ότι ενώ η κουρκουμίνη (ένωση 5) εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, δεν συμβαίνει το ίδιο με το συμπλοκοποιημένο ανάλογό της (ένωση 6), για το οποίο απαιτείται πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις για να επιτευχθεί η τοξικότητα στα κύτταρα.

#### Γ.4.2. Χωρικός εντοπισμός

Αρχικά, παρατηρείται στο συνεστιακό μικροσκόπιο η καλλιέργεια που δεν περιέχει κάποια από τις ενώσεις (control). Όλες οι παράμετροι του μικροσκοπίου ρυθμίζονται έτσι ώστε να απεικονίζεται μηδενικό υπόβαθρο φθορισμού των κυττάρων (αυτοφθορισμός) των κυττάρων από την παρατήρηση των επόμενων καλλιεργειών, ώστε να μην υπάρχει σύγχυση με το φθορισμό των ενώσεων, και επίσης, αναγνωρίζεται η φυσιολογική μορφολογία των κυττάρων της συγκεκριμένης καρκινικής σειράς.



Εικόνα 42: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 (control) στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

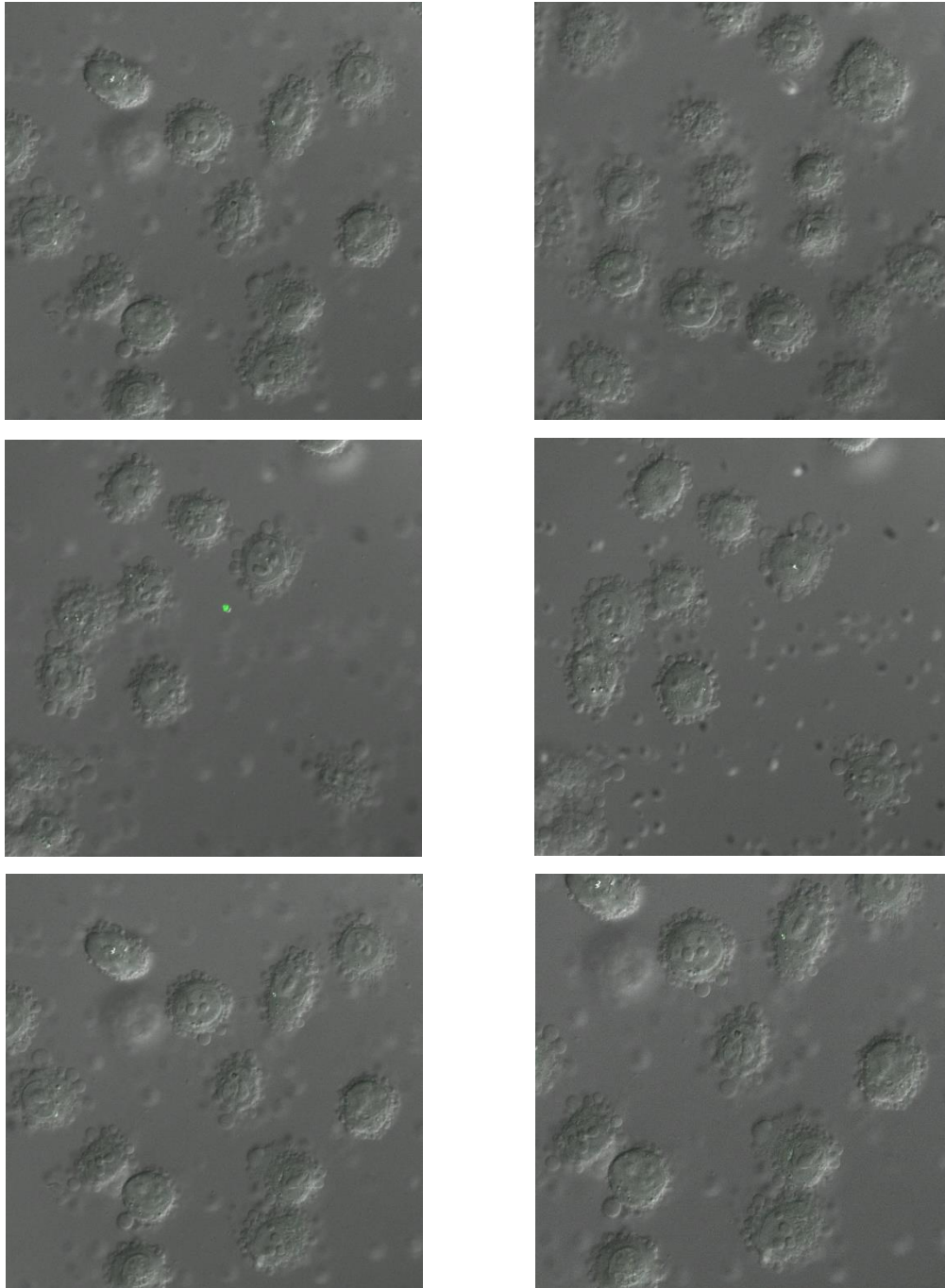
Όπως παρατηρείται από τις εικόνες παραπάνω (Εικόνα 42), τα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη (PC3) περιβάλλονται από μικρές «φούσκες», που αποκαλούνται *oncosomes*, μέσω των οποίων κάνουν μετάσταση σε άλλα όργανα [50][51].

### Επώαση των κυττάρων με την κάθε ένωση για 1 ώρα

Η μορφολογία των κυττάρων όλων των καλλιεργειών, βάσει της εικόνας που δίνει η καλλιέργεια αναφοράς (control), φαίνεται να είναι φυσιολογική και ο πληθυσμός των κυττάρων φαίνεται να μην έχει επηρεαστεί από την επώασή τους με τις ενώσεις που μελετάμε.

### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 1

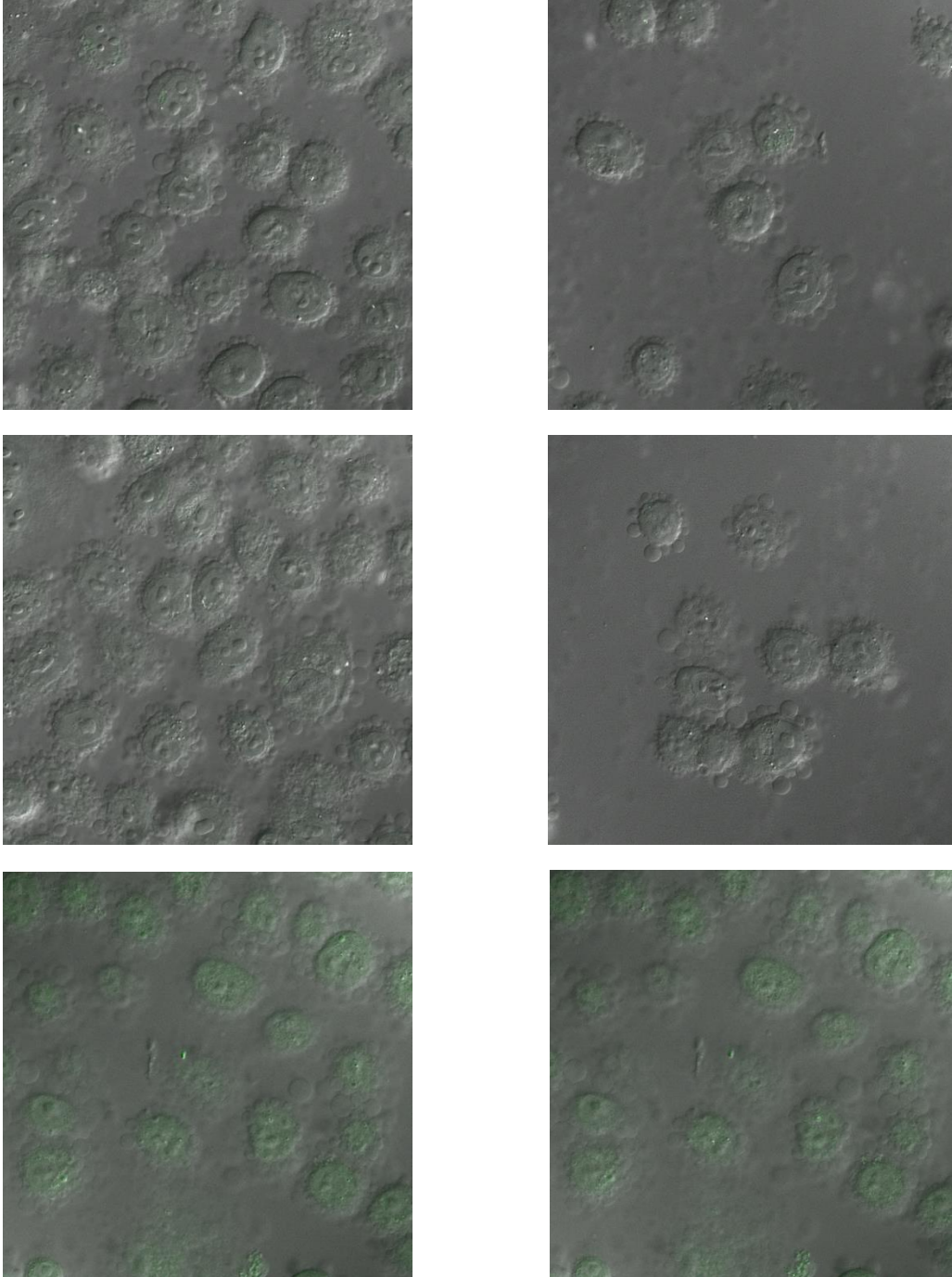
Στην καλλιέργεια που έχει χορηγηθεί η ένωση 1 παρατηρείται πολύ ασθενής φθορισμός (Εικόνα 43). Δεν υπάρχει εμφανής είσοδος της ένωσης στα κύτταρα.



Εικόνα 43: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 1 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 2

Στην καλλιέργεια που έχει χορηγηθεί η ένωση 2 παρατηρείται λίγο πιο έντονος φθορισμός (Εικόνα 44). Φαίνεται, επίσης, ότι η ένωση δεν έχει καταφέρει να μπει μέσα στα κύτταρα, αλλά βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων.

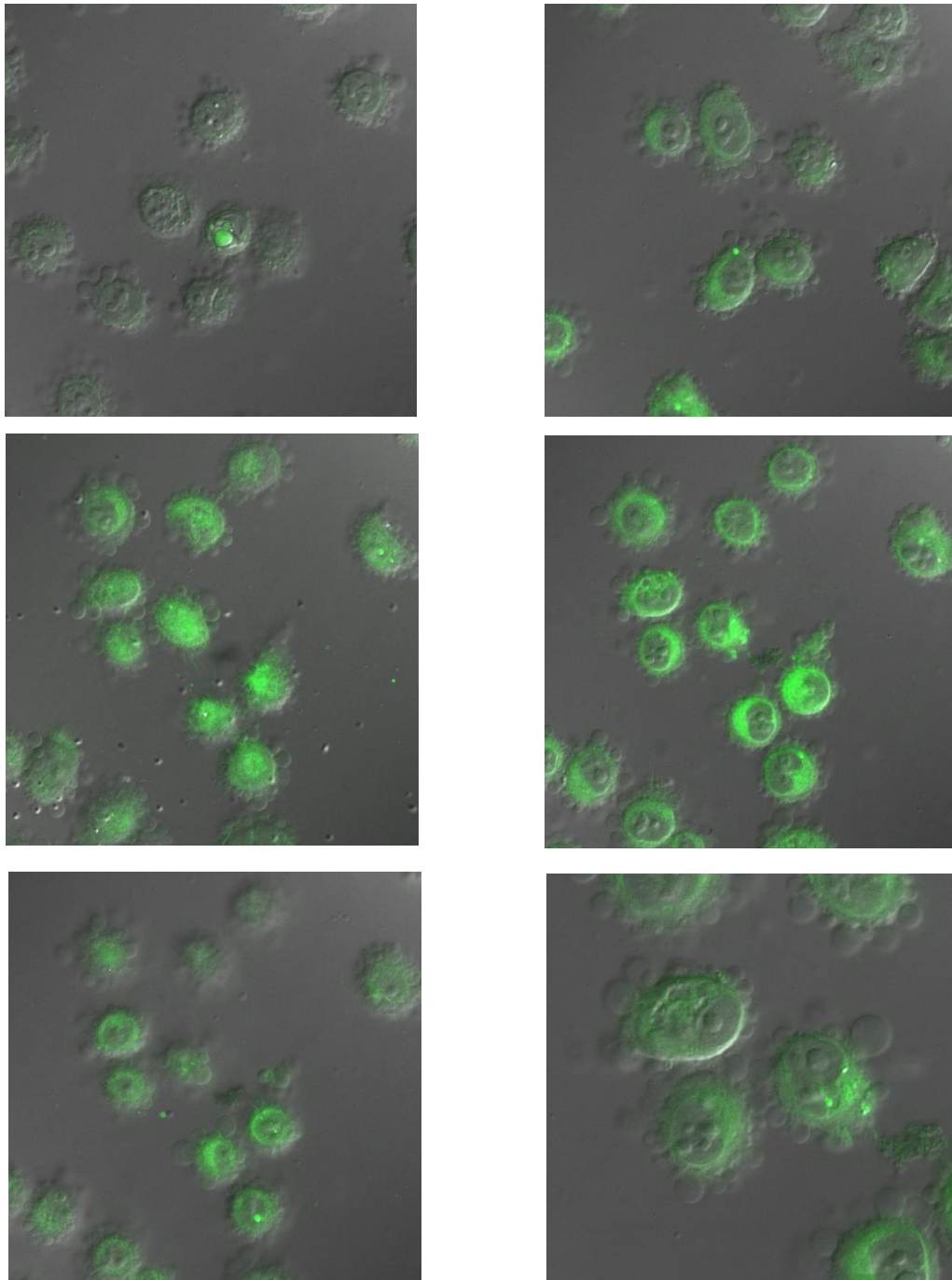


Εικόνα 44: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 2 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 3

Στην καλλιέργεια που έχει επωαστεί με την ένωση 3 υπάρχει πολύ έντονος φθορισμός (Εικόνα 45) που υποδεικνύει ότι η ένωση αυτή έχει μπει στο κυτταρόπλασμα και φαίνεται να συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρήνα και μέσα στα κυστίδια που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα.

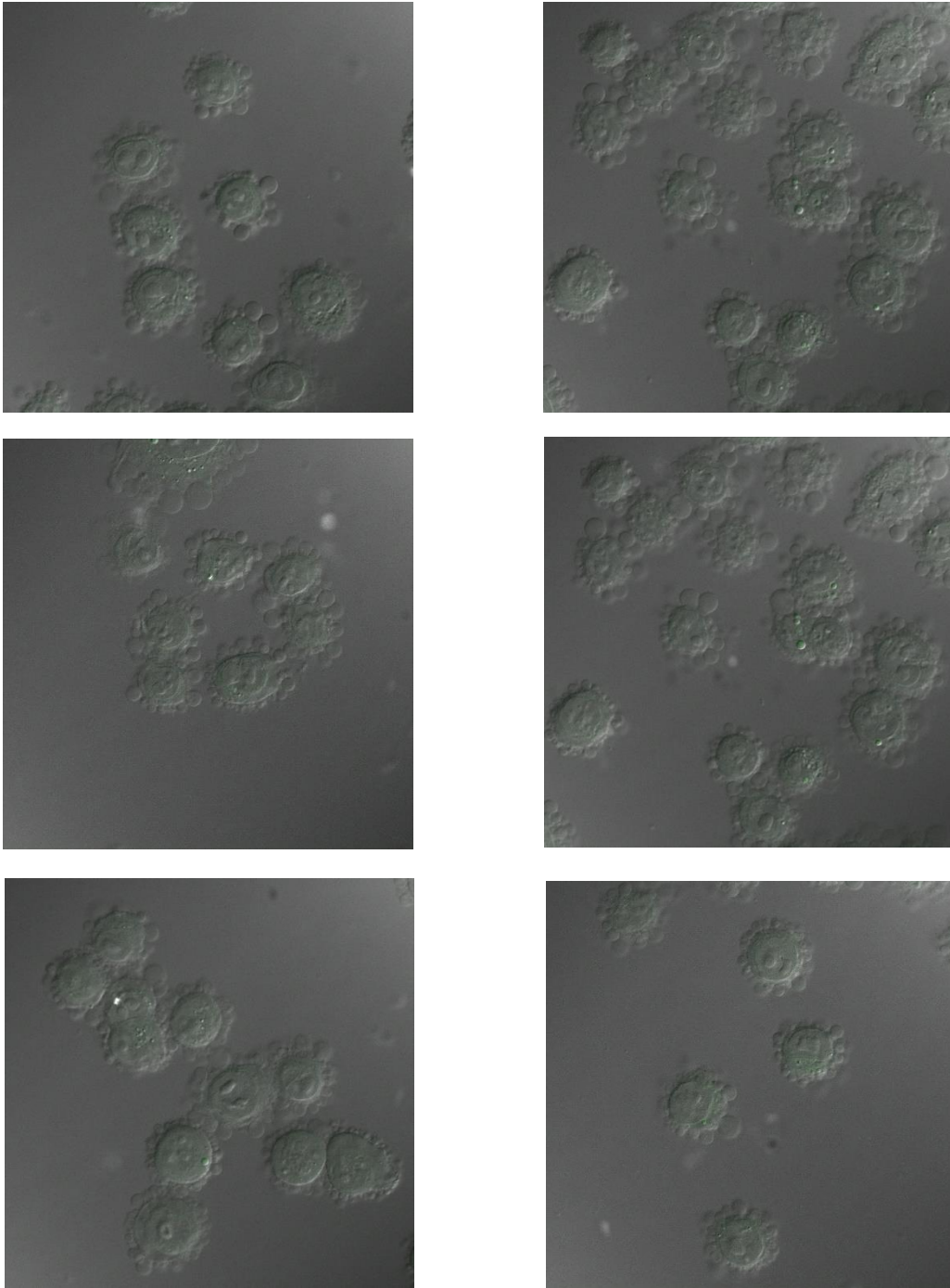


Εικόνα 45: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 3 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



#### *Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 4*

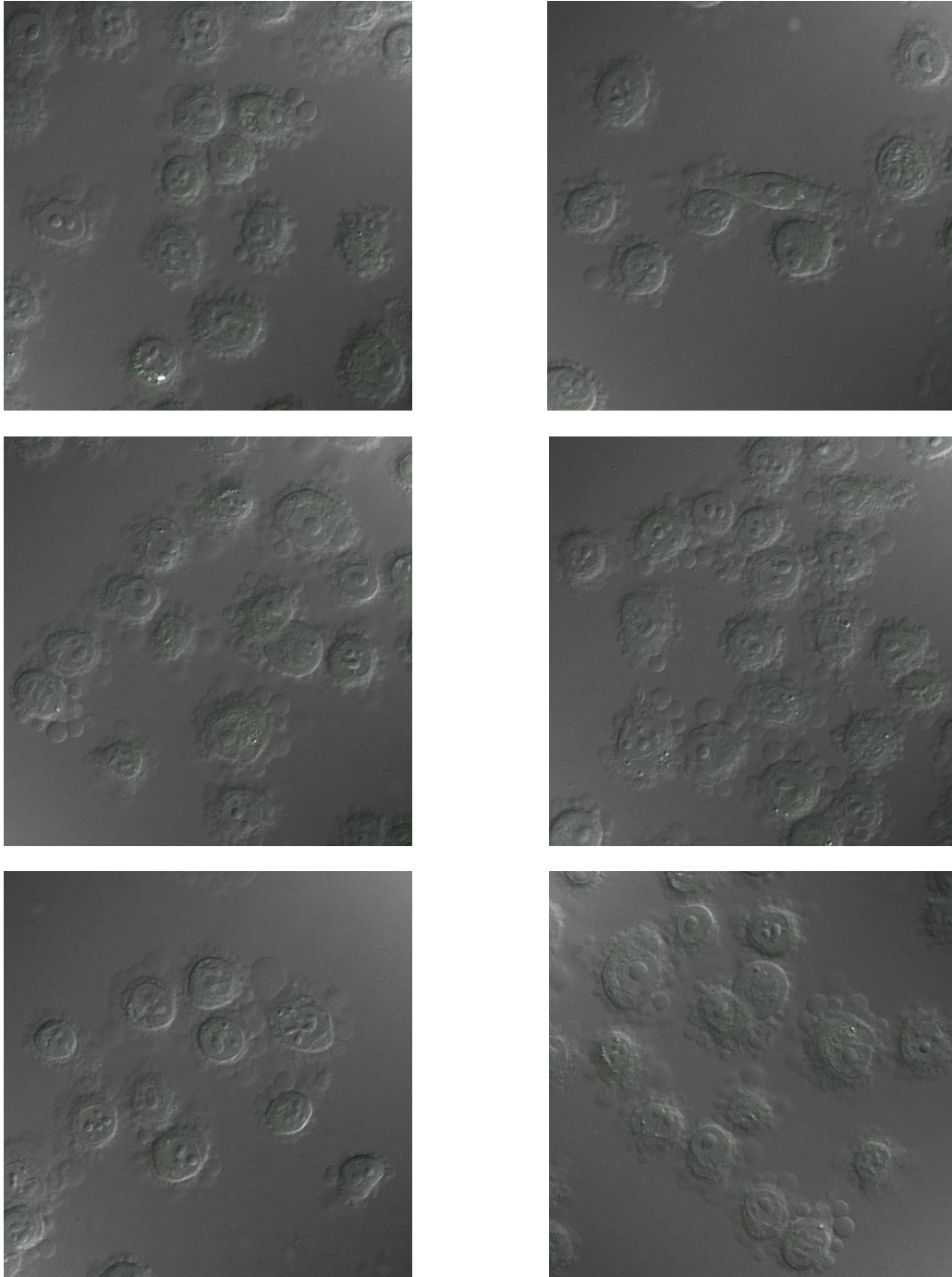
Κατά την παρατήρηση της καλλιέργειας που επωάστηκε με την ένωση 4 το σήμα φθορισμού από τα κύτταρα είναι πολύ ασθενές (Εικόνα 46) γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι ελάχιστη ποσότητα της ένωσης αυτής έχει εισέλθει στα κύτταρα, η οποία είναι συγκεντρωμένη στα κυστίδια που είναι στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, από τη μελέτη εκπομπής φθορισμού παρατηρήθηκε ότι η ένωση 4 δεν έχει έντονο φθορισμό, γεγονός στο οποίο μπορεί να οφείλεται και η δυσκολία στην οπτικοποίησή της.



*Εικόνα 46: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 4 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.*

### *Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 5*

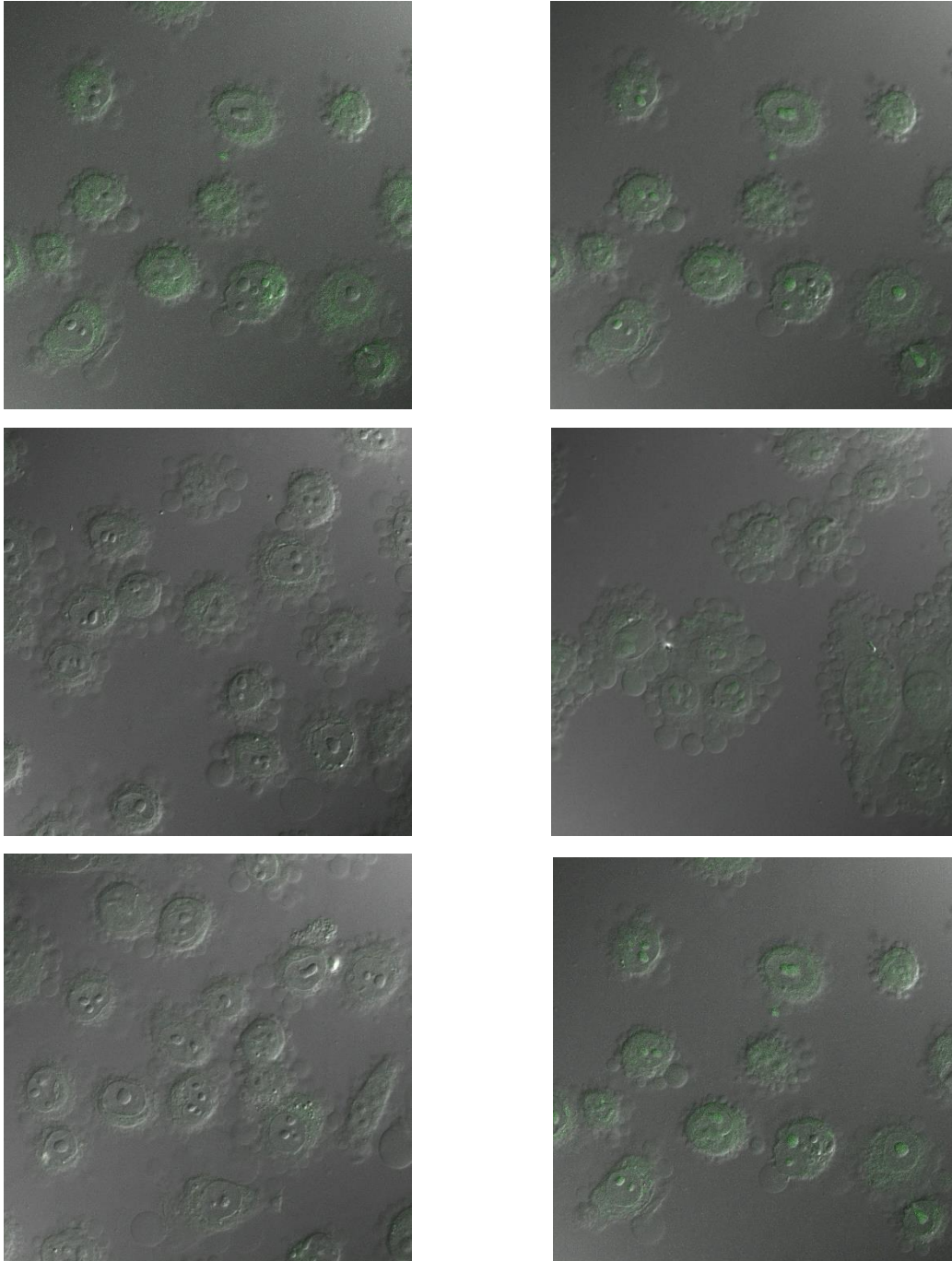
Στην καλλιέργεια που επωάστηκε με την ένωση 5 για 1 ώρα δεν λαμβάνεται κανένα σήμα (Εικόνα 47). Επομένως, η ένωση 5 δεν έχει εισέλθει στα κύτταρα στο χρονικό διάστημα της 1 ώρας που επωάστηκε με αυτά.



*Εικόνα 47: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 5 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.*

### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 6

Κατά την παρατήρηση της καλλιέργειας που επωάστηκε με την ένωση 6 λαμβάνεται ασθενές σήμα (Εικόνα 48), που υποδεικνύει ότι έχει μπει ελάχιστη ποσότητα της ένωσης αυτής στα κύτταρα και αρχίζει να συγκεντρώνεται στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους.



Εικόνα 48: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 6 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

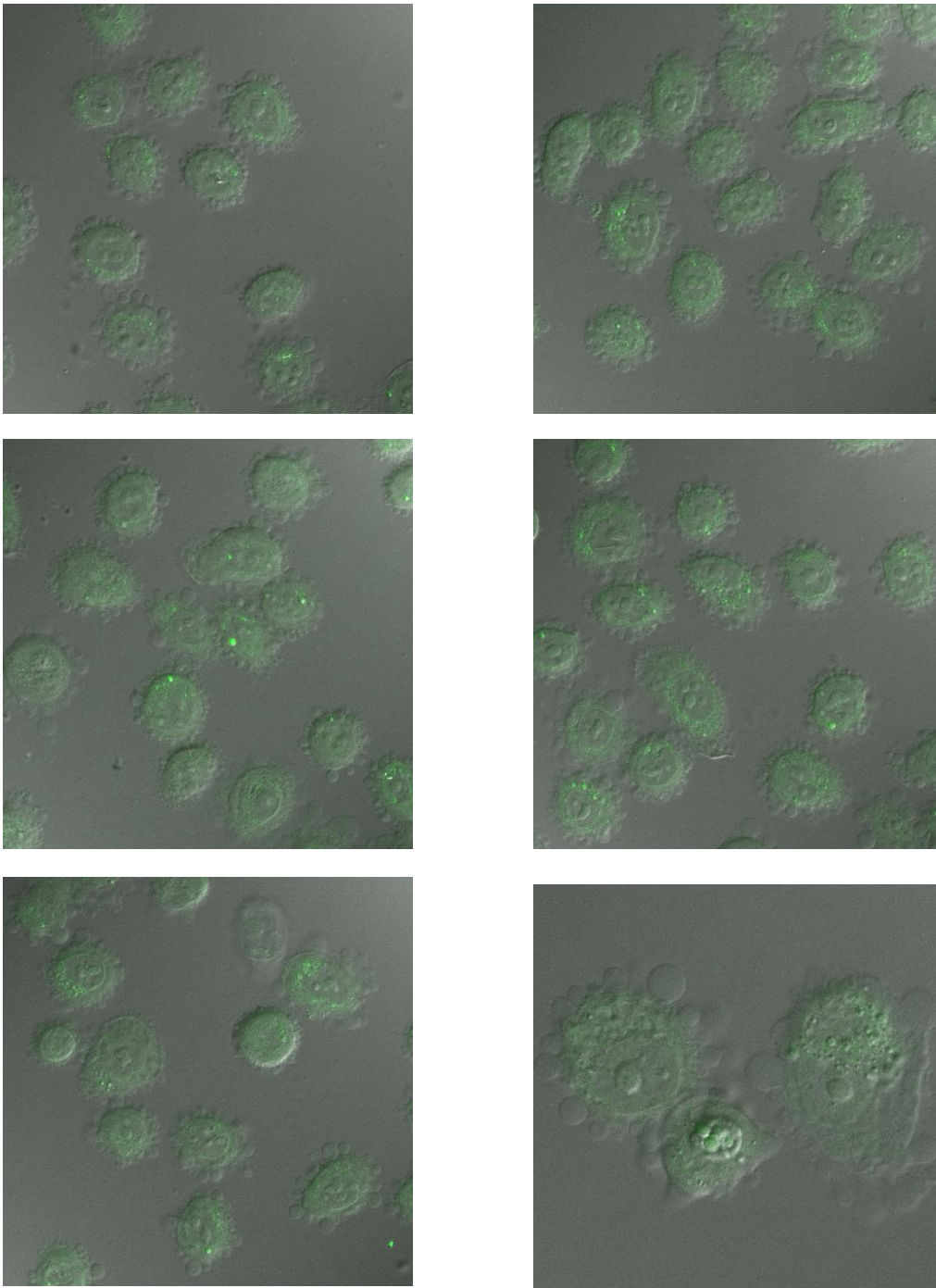
### Επώαση των κυττάρων με την κάθε ένωση για 6 ώρες

Η μορφολογία των κυττάρων των καλλιέργειών που επώαστηκαν με τις ενώσεις 1,2,3 και 4, βάσει της εικόνας που δίνει η καλλιέργεια αναφοράς (control), φαίνεται να είναι φυσιολογική και ο πληθυσμός των κυττάρων φαίνεται να μην έχει επηρεαστεί πολύ. Στις καλλιέργειες που επώαστηκαν με τις ενώσεις 5 και 6 παρατηρείται μικρότερος πληθυσμός σε σχέση με τις υπόλοιπες.



### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 1

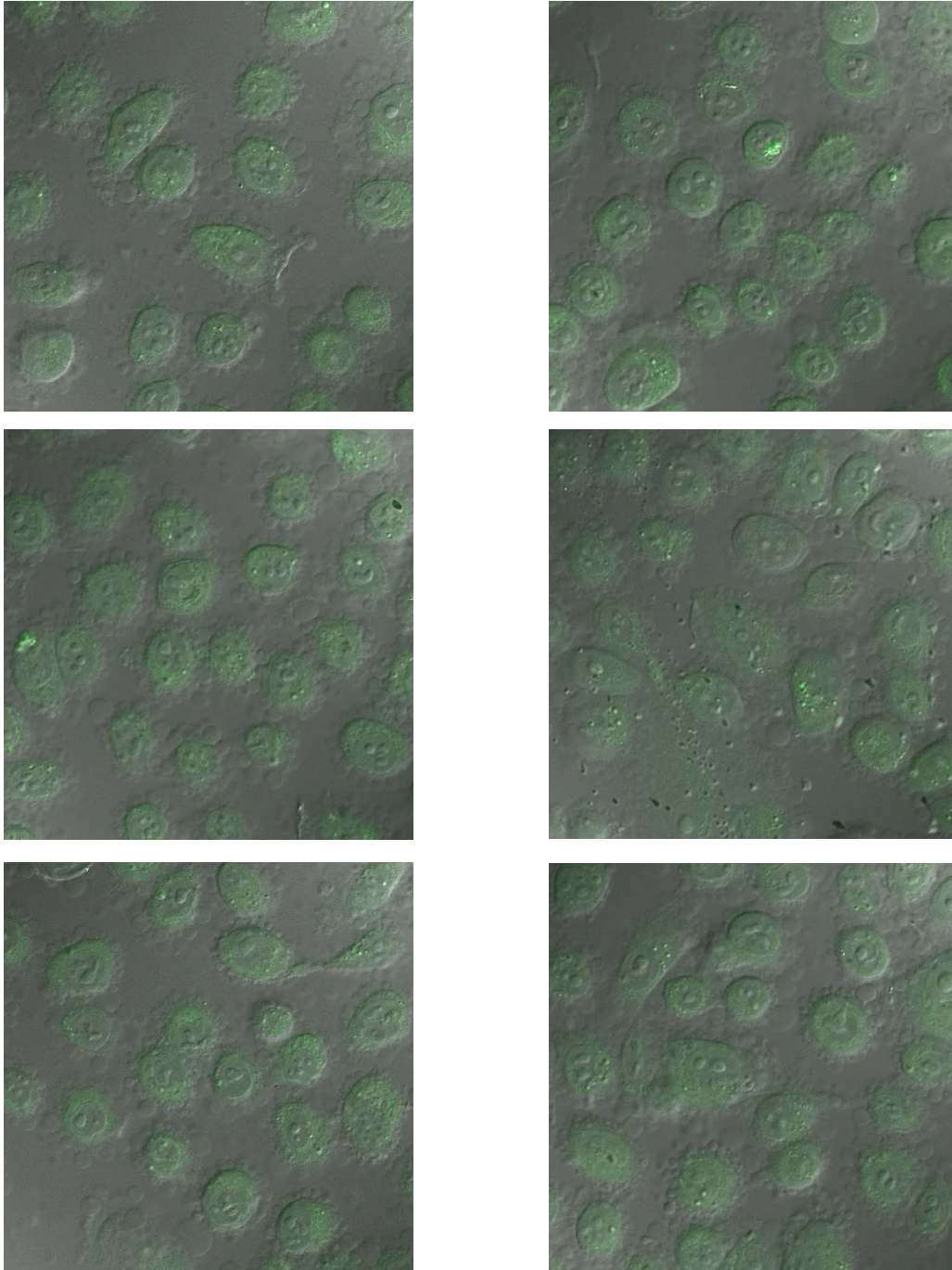
Η ένταση του φθορισμού της ένωσης 1 είναι ασθενής και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ μικρή ποσότητα φαίνεται να έχει εισέλθει σε κυστίδια στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 49). Τα κυστίδια αυτά μπορεί να είναι ριβοσώματα, λισσώματα ή άλλα οργανίδια που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 49: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 1 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

### *Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 2*

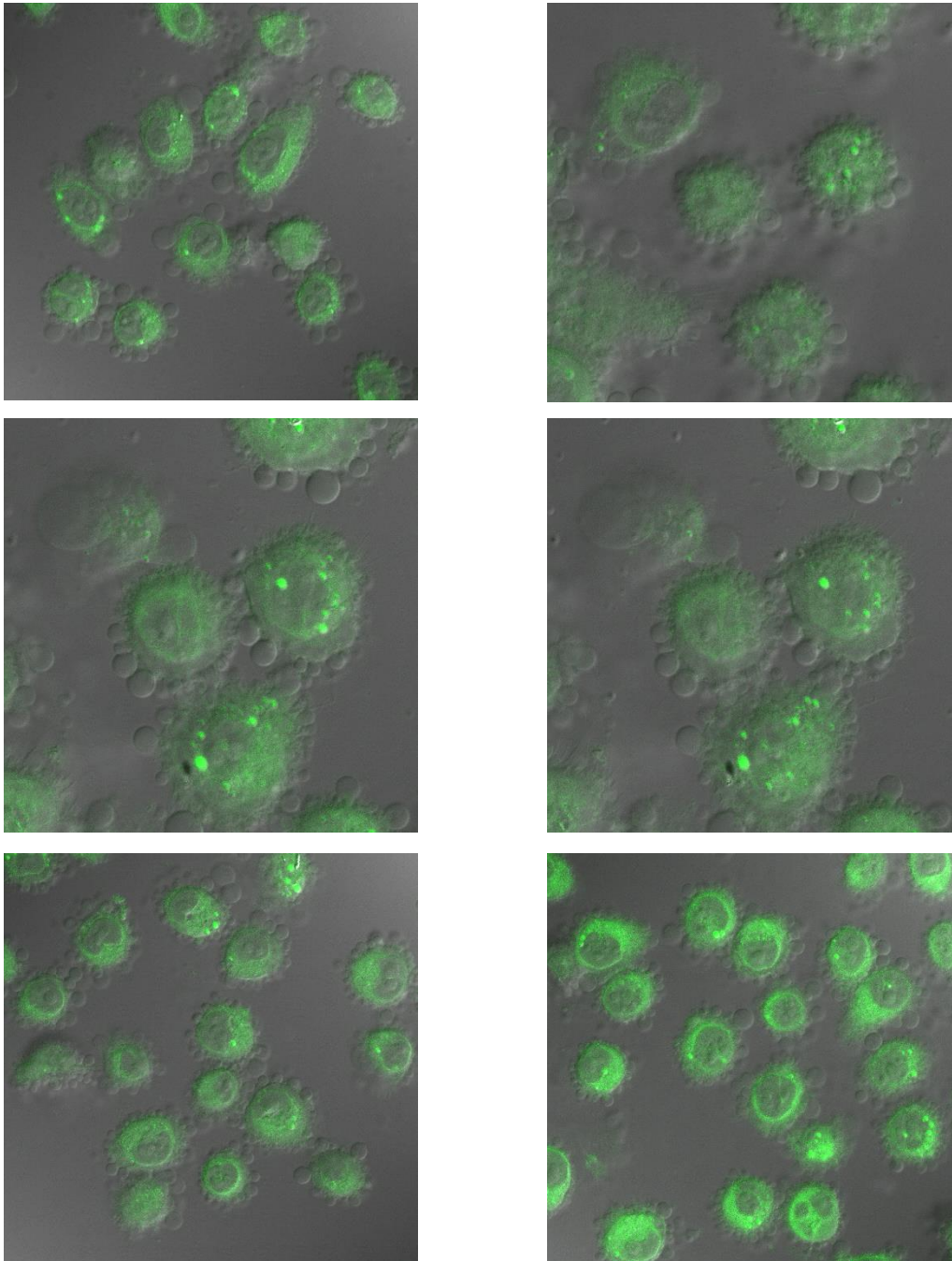
Το σήμα του φθορισμού από την ένωση 2 είναι ασθενές (Εικόνα 50), αλλά πιο έντονο σε σχέση με την ένωση 1. Η ένωση 2 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και υπάρχει ελαφριά χρώση στον πυρηνίσκο.



*Εικόνα 50: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 2 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.*

### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 3

Παρατηρείται έντονος φθορισμός από κυστίδια που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα, τα οποία όμως δεν είναι ξεκάθαρο τι οργανίδια είναι. Φαίνεται ότι η ένωση συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα και είναι ευκρινές ότι δεν συγκεντρώνεται στους πυρήνισκους (Εικόνα 51).

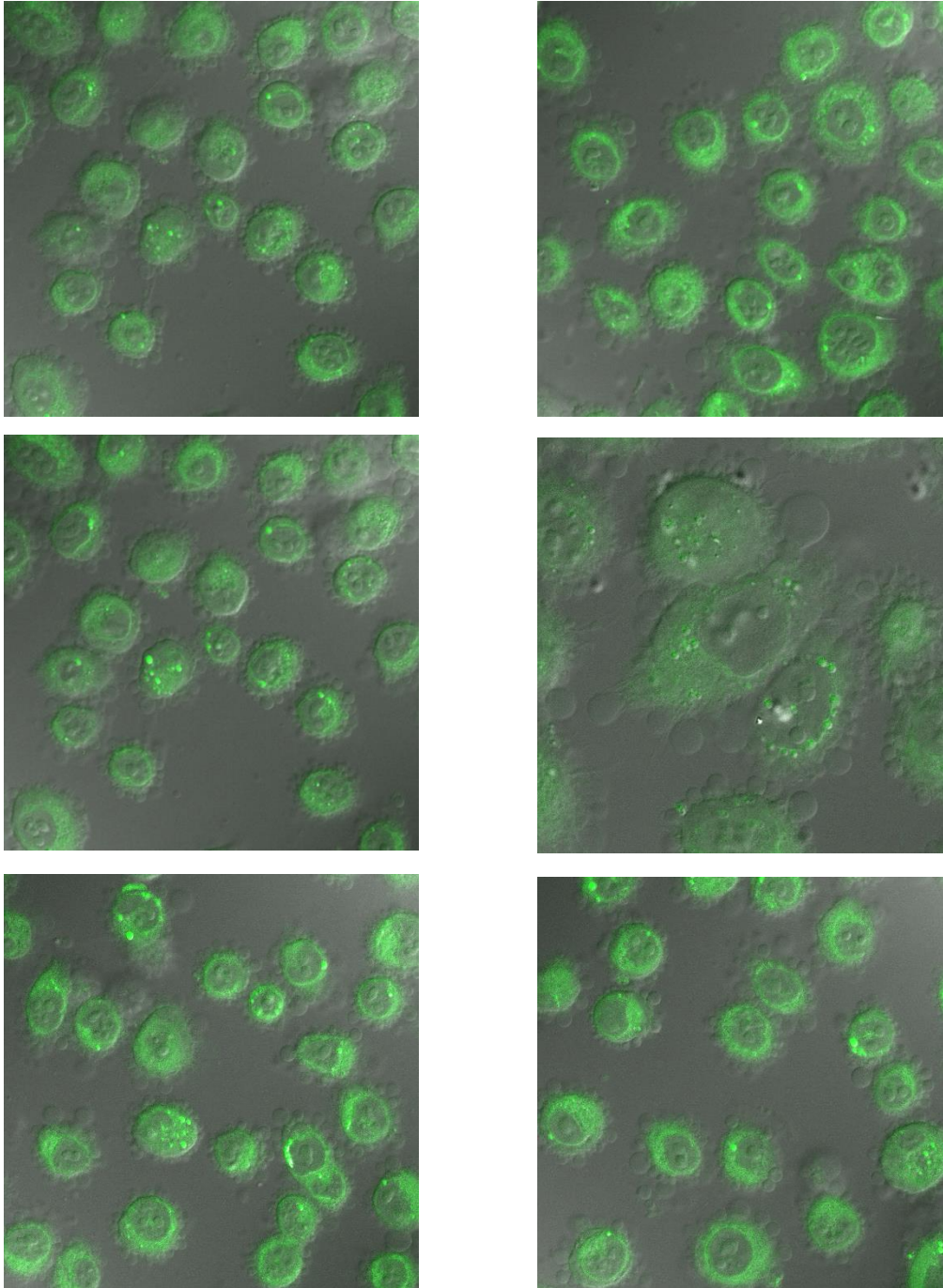


Εικόνα 51: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 3 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



#### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 4

Φαίνεται ότι η ένωση συγκεντρώνεται εκλεκτικά σε περιοχές στο κυτταρόπλασμα, χωρίς να είναι ευδιάκριτο τι είναι αυτές οι περιοχές. Μεγαλύτερη ποσότητα, ωστόσο, φαίνεται να συγκεντρώνεται στα κυστίδια στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 52).

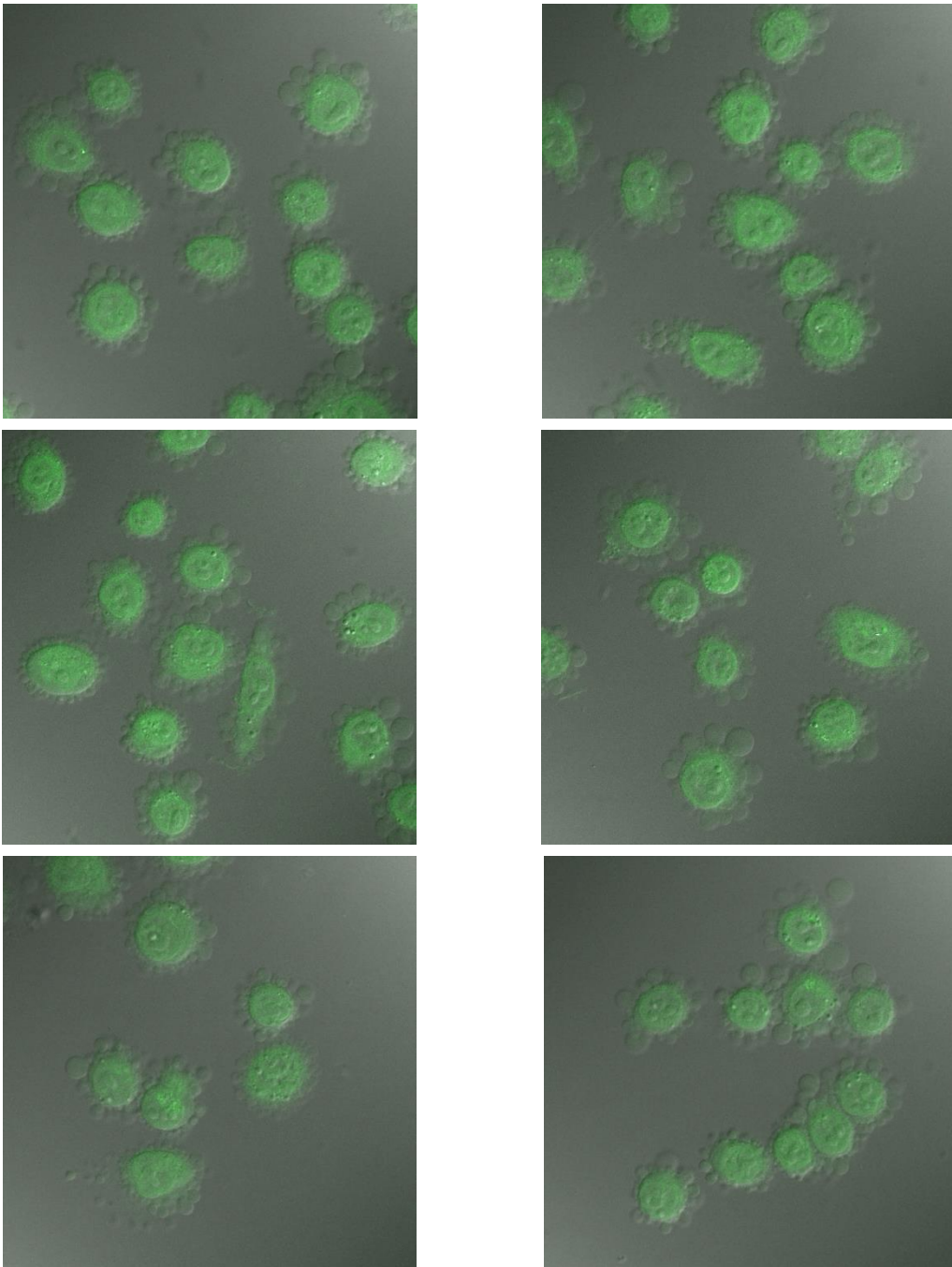


Εικόνα 52: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 4 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 5

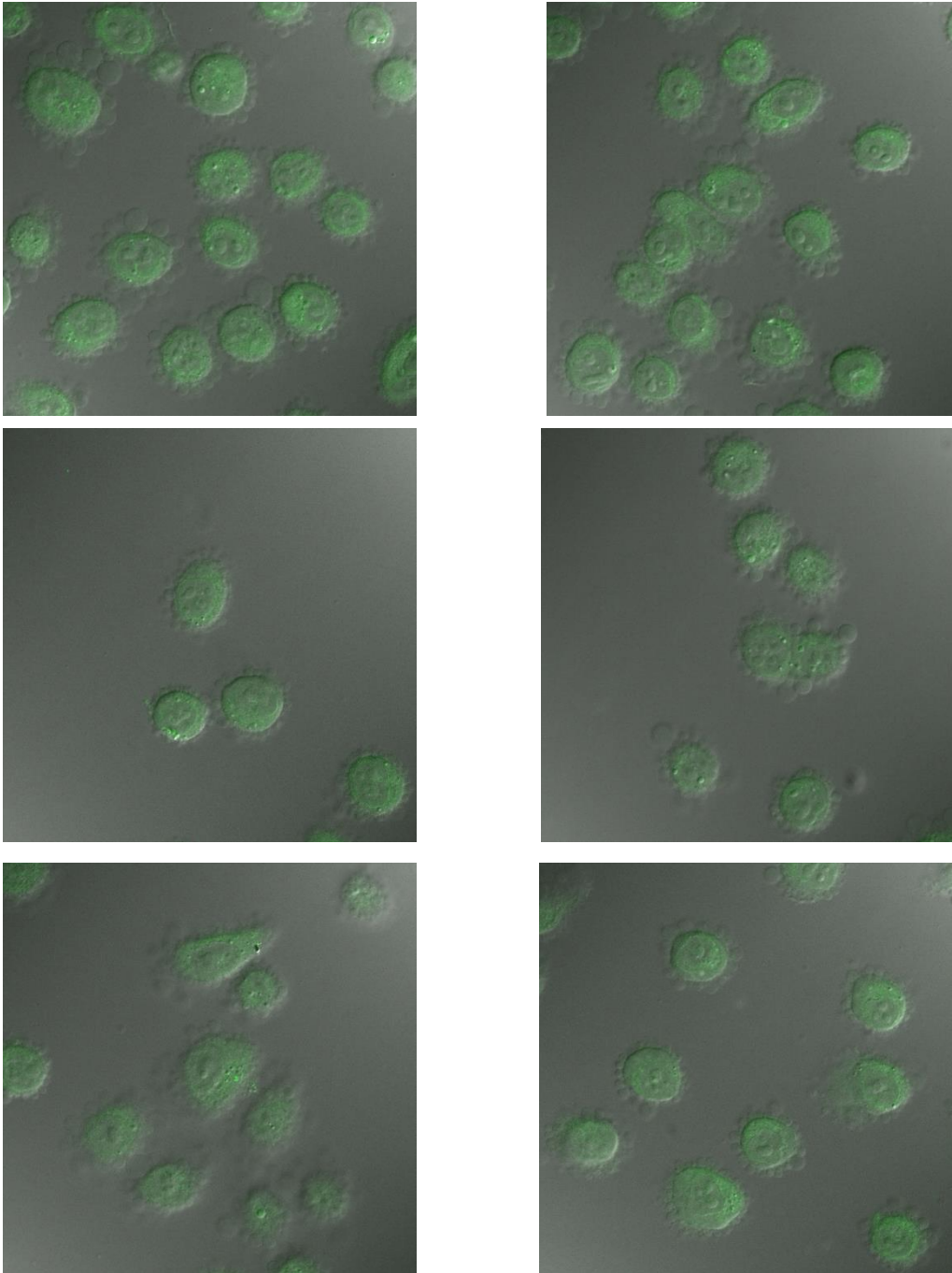
Παρατηρείται ότι η ένωση 5 είναι διάχυτη, αλλά με ομοιόμορφη κατανομή στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 53). Ελάχιστη ποσότητα μπαίνει στον πυρήνα και φαίνεται η ένωση να εισέρχεται και στα oncosomes, που σημαίνει ότι είναι πιο υδατοδιαλυτή σε σχέση με τις άλλες ενώσεις που είναι πιο λιπόφιλες.



Εικόνα 53: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 5 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

### Χωρικός εντοπισμός της Ένωσης 6

Παρατηρείται ότι η ένωση 6 συγκεντρώνεται στο κυτταρόπλασμα και ότι έχει εισέλθει στους πυρηνίσκους και στον πυρήνα. Δεν παρατηρείται να εισέρχεται στα κυστίδια (Εικόνα 54).

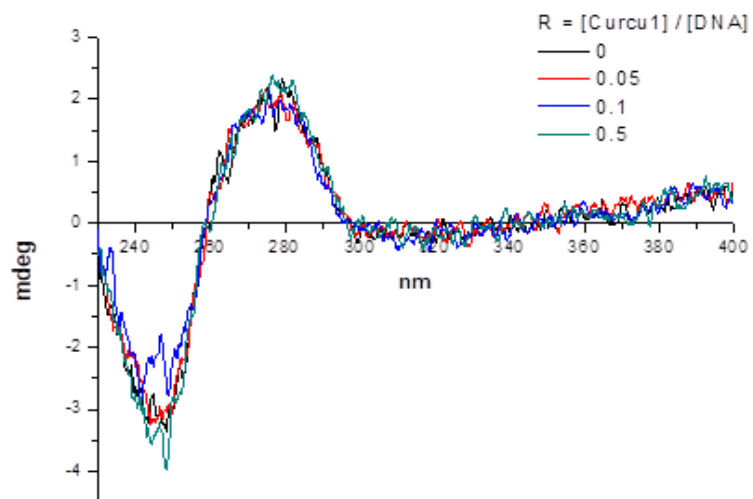


Εικόνα 54: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 6 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

### Γ.4.3. Κυκλικός διχρωσμός

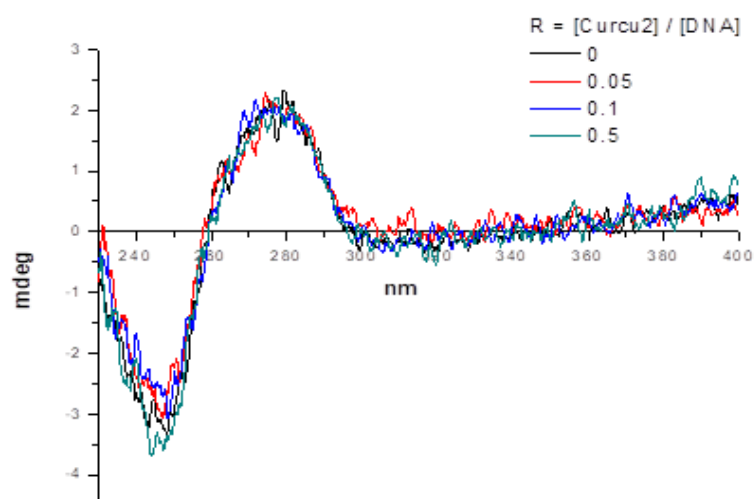
Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσμού φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα:

Το φάσμα κυκλικού διχρωσμού που προέκυψε έπειτα από επώαση 24 ωρών με την ένωση 1 είναι (Διάγραμμα 41):



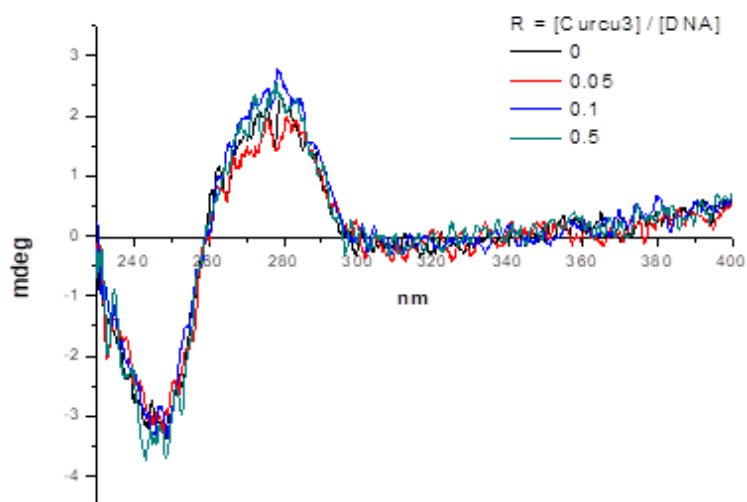
Διάγραμμα 41: Φάσμα CD για την ένωση 1.

Αντίστοιχα, για την ένωση 2 προέκυψε το παρακάτω φάσμα κυκλικού διχρωσμού (Διάγραμμα 42):



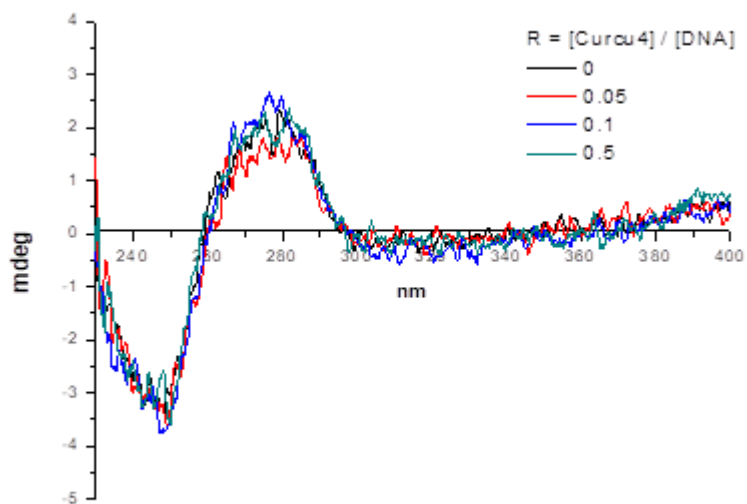
Διάγραμμα 42: Φάσμα CD για την ένωση 2.

Για την ένωση 3 προέκυψε το παρακάτω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Διάγραμμα 43):



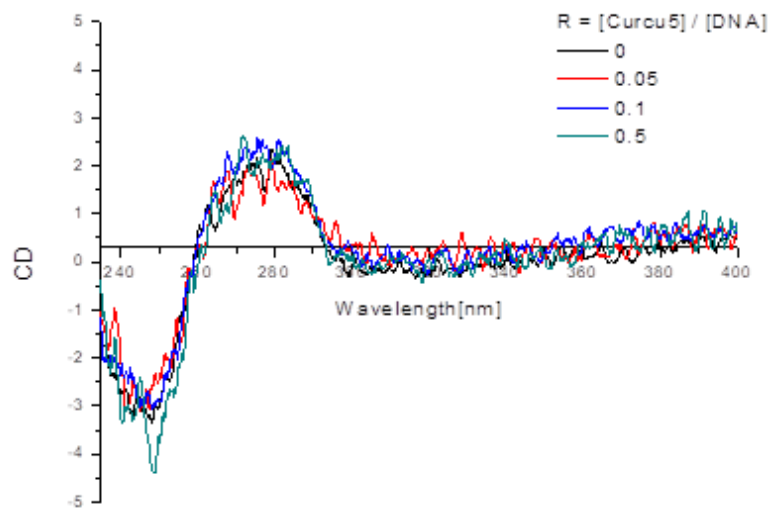
Διάγραμμα 43: Φάσμα CD για την ένωση 3.

Για την ένωση 4 προέκυψε το παρακάτω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Διάγραμμα 44):



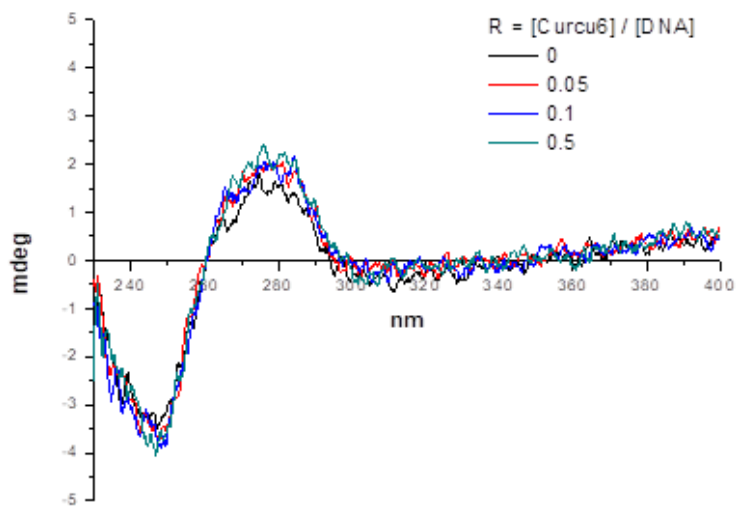
Διάγραμμα 44: Φάσμα CD για την ένωση 4.

Για την ένωση 5 προέκυψε το παρακάτω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Διάγραμμα 45Διάγραμμα 44):



Διάγραμμα 45: Φάσμα CD για την ένωση 5.

Τέλος, για την ένωση 6 προέκυψε το παρακάτω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Διάγραμμα 46Διάγραμμα 44):



Διάγραμμα 46: Φάσμα CD για την ένωση 6.

Μέσω της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης που υπάρχει μεταξύ των ενώσεων και του DNA. Ωστόσο, μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού φαίνεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, καθώς ποσότητα των ενώσεων μπαίνει μέσα στους πυρηνίσκους. Χρειάζεται να γίνει περαιτέρω μελέτη για να προσδιοριστεί το είδος της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA και σε ποιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου γίνεται.

## Δ. Συμπεράσματα

### ➤ Σχεδιασμός και σύνθεση έξι κουρκουμινολιδίων

Ακολουθήθηκαν για την κάθε ένωση δυο διαφορετικά πρωτόκολλα για την πορεία σύνθεσης της κουρκουμίνης I και των δυο παραγώγων της και δυο διαφορετικά για τη σύνθεση των ενώσεων αυτών με BF. Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR.

- Για τη σύνθεση των παραγώγων της κουρκουμίνης I χωρίς συμπλοκοποίηση:

Με τη δεύτερη μέθοδο παρασκευής κουρκουμινολιδίων (βασισμένη σε αυτή των Jian-Ying Feng, Zai-Qun Liu) προέκυψαν μεγαλύτερες αποδόσεις. Επίσης, για να προκύψει καθαρό το τελικό προϊόν φάνηκε ότι η μέθοδος αυτή καθίσταται πιο συμφέρουσα, λόγω του ότι οι ποσότητες που απαιτούνται για την παρασκευή των ενώσεων είναι μικρότερες, αλλά και λόγω του γεγονότος ότι είναι πιο απλή διαδικασία, ενώ ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος γίνεται πιο εύκολα.

- Για τη σύνθεση των συμπλοκοποιημένων με BF κουρκουμινολιδίων.

Από τη διαδικασία παρασκευής των συμπλόκων των ενώσεων, πιο συμφέρουσα μέθοδος προέκυψε ότι είναι η δεύτερη μέθοδος (βασισμένη σε αυτή των Kai Liu και Jiangmin Chen), καθώς από την πρώτη μέθοδο ήταν αρκετά δύσκολος ο καθαρισμός και η απομόνωση του τελικού προϊόντος.

### ➤ Απορρόφηση των έξι ενώσεων σε διαφορετικούς διαλύτες και για διαφορετικές συγκεντρώσεις

Από την πειραματική μελέτη που έγινε ως προς την απορρόφηση των έξι κουρκουμινολιδίων σε διαλύτες DMSO και DCM, προέκυψε ότι όλες οι ενώσεις έχουν χαρακτηριστικά για την κάθε μία φάσματα απορρόφησης. Για κάθε ένωση προσδιορίστηκε η περιοχή συγκεντρώσεων στην οποία η μέγιστη τιμή της απορρόφησης μεταβάλλεται γραμμικά συναρτήσει της συγκέντρωσης της ουσίας.

Τα διαλύματα των ενώσεων σε DCM εμφανίζουν μετατόπιση της απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με τα διαλύματα των ενώσεων σε DMSO. Για το λόγο αυτό η μελέτη φθορισμού επιλέγεται να γίνει στο διαλύτη DMSO, που αναμένεται να δοθούν καλύτερα αποτελέσματα.

Για τη μελέτη των έξι ενώσεων σε PBS τα φάσματα απορρόφησης δεν ήταν ευκρινή και δεν μπορούσαν να δώσουν ξεκάθαρα αποτελέσματα λόγω της κακής διαλυτότητας των κουρκουμινολιδίων σε υδατικούς διαλύτες και τη δημιουργία συσσωματωμάτων.

### ➤ Μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε διαλύτη DMSO.

Όσον αφορά την κουρκουμίνη I (ένωση 5) και τα μη συμπλοκοποιημένα παράγωγά της (ενώσεις 1 και 3), παρατηρείται ότι η ένωση 3 απορροφά σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Συνεπώς φαίνεται ότι η ύπαρξη δύο επιπλέον διπλών δεσμών στο μόριο της κουρκουμίνης I

σε συνδυασμό με την υποκατάσταση στα φαινύλια προκαλεί μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης κατά 30 nm περίπου.

Με την προσθήκη του BF στα κourκουμινοειδή προκαλείται μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τα μη συμπλοκοποιημένα ανάλογα, αν και η ένταση της απορρόφησης είναι μικρότερη.

Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι η ένωση με το μεγαλύτερο μήκος κύματος διέγερσης είναι η ένωση 6, δηλαδή το σύμπλοκο της κourκουμίνης I, που έχει μετατοπίσει κατά πολύ το φάσμα απορρόφησης και σε σχέση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, αλλά και σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις (μετατοπίσεις από 74 έως 222 nm).

➤ **Μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε διαλύτη DCM.**

Από τη μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε DCM προκύπτει ότι τα διαλύματα τόσο των μη συμπλοκοποιημένων όσο και των συμπλοκοποιημένων ενώσεων παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα διαλύματα των αντίστοιχων ενώσεων σε DMSO. Δηλαδή, από τις μη συμπλοκοποιημένες ενώσεις η ένωση 3 απορροφά σε μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με τις 1 και 5, και οι συμπλοκοποιημένες ενώσεις 2, 4 και 6 εμφανίζουν μετατοπισμένο φάσμα απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τα αντίστοιχα μη συμπλοκοποιημένα ανάλογα.

➤ **Μελέτη απορρόφησης των έξι ενώσεων σε διαλύτη PBS.**

Το φάσμα που λαμβάνεται στο συγκεκριμένο διαλύτη φαίνεται εντελώς διαφορετικό σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης των ενώσεων σε DMSO και DCM (που είναι οργανικοί διαλύτες), καθώς τα παράγωγα της κourκουμίνης είναι δυσδιάλυτα σε υδατικούς διαλύτες και δημιουργούν συσσωματώματα. Το αποτέλεσμα είναι τα φάσματα όλων των ενώσεων να είναι μετατοπισμένα προς τα αριστερά και να παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη ένταση απορρόφησης σε σχέση με τη διάλυση σε DMSO και DCM.

➤ **Μελέτη εκπομπής φθορισμού των έξι ενώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO.**

Από την πειραματική μελέτη που έγινε ως προς την εκπομπή φθορισμού των έξι κourκουμινοειδών σε διαλύτη DMSO, προέκυψε ότι όλες οι ενώσεις, εκτός από την ένωση 4, έχουν χαρακτηριστικά για την κάθε μία φάσματα εκπομπής. Προσδιορίστηκε πειραματικά η περιοχή συγκεντρώσεων στην οποία ο φθορισμός της κάθε ένωσης μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση. Για κάθε ένωση η μέγιστη τιμή της εκπομπής μεταβάλλεται γραμμικά συναρτήσει της συγκέντρωσης της ουσίας.

Τα συμπλοκοποιημένα παράγωγα της κourκουμίνης I και της ένωσης 1 μετατοπίζουν το φάσμα φθορισμού προς τα δεξιά που είναι και το ζητούμενο, κάτι όμως που δεν συμβαίνει με την ένωση 4 και το αντίστοιχο κourκουμινοειδές, όπου η ένωση 4 δεν παρουσιάζει φθορισμό. Η προσθήκη του BF<sub>3</sub> στην περίπτωση της ένωσης 1 σχεδόν τριπλασιάζει το φθορισμό, ενώ στις άλλες 2 περιπτώσεις, ένωση 3 και 5, τον υποβιβάζει σημαντικά, από



όπου μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η υποκατάσταση στους αρωματικούς δακτυλίους εξασθενεί σημαντικά τον φθορισμό.

Οι ενώσεις 1 και 2 δίνουν πολύ ισχυρό φθορισμό αν και σε μικρότερη συγκέντρωση (0,5μM) σε σχέση με τις υπόλοιπες (5μM), κάτι που τις καθιστά και κατάλληλες ενώσεις για περαιτέρω μελέτη και χρήση τους σε μελέτες διάγνωσης φθορισμού.

#### ➤ **Μελέτη κυτταροτοξικότητας των έξι ενώσεων**

Η μελέτη της επίδρασης των ενώσεων στην αναστολή βασικών λειτουργιών των κυττάρων και δράση τους ως τοξικές για τα κύτταρα ενώσεις είναι βασικό για την ανάπτυξή τους ως φαρμακευτικές ενώσεις.

Από τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των έξι ενώσεων προέκυψε ότι οι ενώσεις που φέρουν το BF (ενώσεις 2, 4, 6) απαιτούν μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τις ενώσεις που δεν το φέρουν (ενώσεις 1, 3, 5), δηλαδή το BF προκαλεί μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, κάτι που συμβαδίζει και με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Συγκριτικά από τις ενώσεις 1, 3 και 5 καλύτερα αποτελέσματα δίνει η ένωση 3, έπειτα η ένωση 1 και τέλος η ένωση 5 (κουρκουμίνη I). Από αυτό προκύπτει ότι η ύπαρξη του επιπλέον διπλού δεσμού στο μόριο προκαλεί μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση. Ακόμα, συγκριτικά από τις ενώσεις 1 και 3 προκύπτει ότι η ύπαρξη των συγκεκριμένων υποκαταστατών στα φαινύλια επίσης επάγει μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση.

Τέλος, με βάση και τα αποτελέσματα των απλών αναλόγων της κουρκουμίνης, φαίνεται ότι ενώ η κουρκουμίνη (ένωση 5) εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, δεν συμβαίνει το ίδιο με το συμπλοκοποιημένο ανάλογό της (ένωση 6), για το οποίο απαιτείται πολύ μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις για να επιτευχθεί η τοξικότητα στα κύτταρα.

Συμπερασματικά, τα πέντε παράγωγα της κουρκουμίνης I που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση για μικρότερες από την κουρκουμίνη συγκεντρώσεις.

#### ➤ **Μελέτη χωρικού εντοπισμού των έξι ενώσεων**

Η μελέτη του πιθανού χωρικού εντοπισμού έγινε σε κύτταρα της καρκινικής σειράς PC3, σε συγκέντρωση 1μM, με χρόνο επώασης των κυττάρων με τις ενώσεις 1 ώρα και 6 ώρες. Στις 6 ώρες ήταν πιο εμφανή τα αποτελέσματα.

Παρατηρήθηκε ότι όλες οι ενώσεις εισέρχονται στα κύτταρα, στο κυτταρόπλασμα. Όλες οι ενώσεις, εκτός από το συμπλοκοποιημένο ανάλογο της κουρκουμίνης (ένωση 6) φαίνεται να συγκεντρώνονται επιλεκτικά σε περιοχές στο κυτταρόπλασμα, σε κυστίδια ή άλλες περιοχές του.

Η ένωση 6 παρατηρείται ότι έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται μέσα στους πυρηνίσκους και στον πυρήνα των κυττάρων και πιθανώς για το λόγο αυτό να είναι και πιο τοξική για τα

κύτταρα. Το γεγονός αυτό την καθιστά και ακατάλληλη για χρήση της ως φωτοευαισθητοποιητή σε διαγνώσεις φθορισμού και στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Τέλος, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της μελέτης φθορισμού των ενώσεων, της κυτταροτοξικότητας και του χωρικού εντοπισμού μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι ενώσεις 1 και 2 μπορούν μελετηθούν περαιτέρω, ώστε να χρησιμοποιηθούν για διάγνωση φθορισμού.

➤ **Μελέτη αλληλεπίδρασης των έξι ενώσεων με το DNA**

Από τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA δεν προκύπτει ότι οι ενώσεις προκαλούν κάποια σημαντική αλλαγή στη δευτεροταγή δομή του DNA, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν αλληλεπιδρά με το βιομόριο με κάποιον άλλο τρόπο.

## Ε. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Από τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη των κουρκουμινοειδών προέκυψαν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, που μπορούν να αποτελέσουν οδηγό για περαιτέρω μελέτη αυτών των ενώσεων, αλλά και για τη σύνθεση νέων φαρμακευτικών μορίων και φωτοευαίσθητων μορίων για χρήση τους σε διαγνώσεις φθορισμού και στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Αρχικά, προκειμένου να προσδιοριστεί με ποιο τρόπο αλληλεπιδρούν οι ενώσεις με το DNA προτείνεται να γίνουν πειραματικές μελέτες, πέρα από τον κυκλικό διχρωισμό, όπως ιξωδομετρία, ανταγωνιστικές μελέτες φθορισμού, σημείου τήξεως, μέσω των οποίων μπορεί να βγει ολοκληρωμένο συμπέρασμα.

Εν συνεχεία, η χρώση οργανιδίων μέσα στα κύτταρα και η επανάληψη της μελέτης χωρικού εντοπισμού των ενώσεων στην καρκινική σειρά PC3, μπορεί να δείξει ποια ακριβώς είναι η θέση τους μέσα στα κύτταρα ώστε να βγουν πιο συγκεκριμένα συμπεράσματα για τον ενδοκυττάριο χωρικό εντοπισμό των ουσιών κατ' επέκταση ποιες βιολογικές οδούς επηρεάζουν και επάγουν κυτταροτοξική δράση.

Ακόμα, σημαντικό είναι να προσδιοριστεί αν τα νέα παράγωγα της κουρκουμίνης δείχνουν επιλεκτικότητα στη συσσώρευσή τους σε υγιή ή καρκινικά κύτταρα.

Τέλος, οι ενώσεις που μελετήθηκαν είναι φωτοευαίσθητες. Στην παρούσα διπλωματική οι μελέτες έγιναν απουσία φωτός. Συνεπώς προτείνεται η μελέτη των ενώσεων αυτών παρουσία φωτός και έλεγχος της επίδρασής του στη βιωσιμότητα της καρκινικής σειράς PC3 και η ικανότητά τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες.

## Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Χημική δομή παραγώγων κουρκουμίνης. ....	4
Εικόνα 2: Αλληλεπίδραση φωτός με ανθρώπινο ιστό. ....	16
Εικόνα 3: Τροποποιημένο διάγραμμα Jablonski που παρουσιάζονται φωτοφυσικές και φωτοχημικές διεργασίες με την ακτινοβολήση ενός φωτοευαίσθητοποιητή: από τη θεμελιώδη κατάσταση μεταπηδά στην απλή διεγερμένη και στην τριπλή διεγερμένη όπου παράγει δραστικά είδη οξύ. ...	17
Εικόνα 4: Απεικόνιση της ρίζας του φυτού <i>Curcuma Longa</i> και η σκόνη που προέρχεται από αυτή. ....	21
Εικόνα 5: Χημική δομή κουρκουμίνης I (1), κουρκουμίνης II (2), κουρκουμίνης III (3). ....	22
Εικόνα 6: Καλλιέργεια καρκινικής σειράς LnCap (αριστερά) και καρκινικής σειράς PC3 (δεξιά). ....	24
Εικόνα 7: Μορφές ταυτομερών της κουρκουμίνης I. ....	26
Εικόνα 8: Σχέση δομής - δρατικότητας στο μόριο της κουρκουμίνης [21]. ....	27
Εικόνα 9: Οι υπό μελέτη ενώσεις. Αριστερά: Κουρκουμινοειδή χωρίς συμπλοκοποίηση. Δεξιά: Κουρκουμινοειδή με συμπλοκοποίηση. ....	31
Εικόνα 10: Πειραματική διάταξη για τη σύνθεση των έξι οργανικών ενώσεων. ....	34
Εικόνα 11: Στήλη χρωματογραφίας. ....	35
Εικόνα 12: Περιστροφικός εξαμιστήρας. ....	36
Εικόνα 13: Πλάκες TLC δύο προτύπων ουσιών και ενός δείγματος που ταυτοποιούν την ύπαρξη παραπροϊόντων στο δείγμα. ....	37
Εικόνα 14: Όργανο NMR: Bruker Avance 500 MHz spectrometer operating at 500 MHz (1H) and 125 MHz (13C). ....	37
Εικόνα 15: Μαγνητικό πεδίο που δημιουργεί ο μαγνήτης του NMR. ....	38
Εικόνα 16: Χημικές δομές κουρκουμινοειδών χωρίς συμπλοκοποίηση. ....	40
Εικόνα 17: Συνθετική πορεία κουρκουμίνης I. ....	41
Εικόνα 18: Κουρκουμινοειδή με συμπλοκοποίηση: Curcuminoid-BF 1 (ένωση 2), curcuminoid-BF 2 (ένωση 4) και curcumin I-BF (ένωση 6). ....	43
Εικόνα 19: Φασματόμετρο απορρόφησης: Perkin – Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer. ....	45
Εικόνα 20: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματόμετρου απορρόφησης. ....	46
Εικόνα 21: Φασματόμετρο εκπομπής: Perkin – Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer. ....	47
Εικόνα 22: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας του φασματόμετρου εκπομπής. ....	48
Εικόνα 23: Διαλύματα των έξι ενώσεων σε DMSO. Αριστερά η 1η διάλυση (50 μM) και δεξιά η 4η διάλυση (10 μM). ....	50
Εικόνα 24: Διάγραμμα Jablonski. ....	51
Εικόνα 25: Μετατόπιση Stokes. ....	52
Εικόνα 26: Παρατήρηση των έξι διαλυμάτων (σε DMSO) κάτω από λάμπα φθορισμού. ....	53
Εικόνα 27: Διαλύματα των έξι ενώσεων σε DMSO. ....	53
Εικόνα 28: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. ....	55
Εικόνα 29: Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP8 MP. ....	55
Εικόνα 30: Πολωσίμετρο J 715 from Jasco. ....	56
Εικόνα 31: Οπτικό διάγραμμα λειτουργίας πολωσίμετρου. ....	57
Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση πολωσίμετρου. ....	57
Εικόνα 33: Πλάκα Neubauer για τη μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού. ....	61
Εικόνα 34: Χημική δομή MTT και κρυστάλλων φορμαζάνης. ....	62
Εικόνα 35: Πλακίδιο με 96 θέσεις. ....	64
Εικόνα 36: Υλικά για την προετοιμασία της δοκιμασίας MTT. ....	64

Εικόνα 37: Καλυπτρίδες με καλλιέργειες καρκινικής σειράς PC3 σε πλακίδια 6 θέσεων. ....	66
Εικόνα 38: Επώαση των κυτταρικών καλλιεργιών με τις έξι ενώσεις και θρεπτικό υλικό.....	67
Εικόνα 39: Χρήση PBS για απομάκρυνση υπερκείμενου υγρού από την καλλιέργεια.....	67
Εικόνα 40: Προσθήκη mountain fluid στη θέση που θα τοποθετηθεί η καλυπτρίδα.....	68
Εικόνα 41: Φάσμα CD. ....	70
Εικόνα 42: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 (control) στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. ....	116
Εικόνα 43: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 1 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	118
Εικόνα 44: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 2 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	119
Εικόνα 45: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 3 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	120
Εικόνα 46: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 4 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	121
Εικόνα 47: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 5 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	122
Εικόνα 48: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 6 για 1h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	123
Εικόνα 49: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 1 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	125
Εικόνα 50: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 2 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	126
Εικόνα 51: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 3 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	127
Εικόνα 52: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 4 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	128
Εικόνα 53: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 5 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	129
Εικόνα 54: Απεικόνιση καλλιέργειας κυτταρικής σειράς PC3 επωασμένη με την ένωση 6 για 6h, στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.....	130

## Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 1. ....	83
Διάγραμμα 2: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 2. ....	84
Διάγραμμα 3: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 3. ....	85
Διάγραμμα 4: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 4. ....	86
Διάγραμμα 5: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 5. ....	87
Διάγραμμα 6: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της ένωσης 6. ....	88
Διάγραμμα 7: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 1 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	89
Διάγραμμα 8: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 434 nm) της ένωσης 1 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	90
Διάγραμμα 9: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 2 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	90
Διάγραμμα 10: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 484 nm) της ένωσης 2 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	91
Διάγραμμα 11: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	91
Διάγραμμα 12: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 464 nm) της ένωσης 3 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	92
Διάγραμμα 13: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 4 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	93
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 582 nm) της ένωσης 4 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	93
Διάγραμμα 15: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 5 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	94
Διάγραμμα 16: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 435 nm) της ένωσης 5 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	94
Διάγραμμα 17: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 6 για διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. ....	95
Διάγραμμα 18: Μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης (στα 646 nm) της ένωσης 6 συναρτήσει της συγκέντρωσης. ....	95
Διάγραμμα 19: Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων απορρόφησης ενώσεων 1, 3 και 5. ....	97
Διάγραμμα 20: Συγκριτική απεικόνιση φασμάτων απορρόφησης ενώσεων 2, 4 και 6. ....	98
Διάγραμμα 21: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 1 και του συμπλόκου της με βόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 $\mu\text{M}$ , σε διαλύτη DMSO. ....	99
Διάγραμμα 22: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 3 και του συμπλόκου της με βόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 $\mu\text{M}$ , σε διαλύτη DMSO. ....	99
Διάγραμμα 23: Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 5 και του συμπλόκου της με βόριο και φθόριο, συγκέντρωσης 10 $\mu\text{M}$ , σε διαλύτη DMSO. ....	100
Διάγραμμα 24: Φάσμα απορρόφησης όλων των ενώσεων σε διχλωρομεθάνιο (DCM), με συγκέντρωση 10 $\mu\text{M}$ . ....	101
Διάγραμμα 25: Φάσμα απορρόφησης όλων των ενώσεων με πρώτη αραιώση σε DMSO και δεύτερη αραιώση σε PBS, με τελική συγκέντρωση 10 $\mu\text{M}$ . ....	103
Διάγραμμα 26: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. ....	104

Διάγραμμα 27: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 513 nm) της ένωσης 1 συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	104
Διάγραμμα 28: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. ....	105
Διάγραμμα 29: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 513 nm) της ένωσης 2 συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	105
Διάγραμμα 30: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 3 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. ....	106
Διάγραμμα 31: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 589 nm) της ένωσης 3 συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	106
Διάγραμμα 32: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 4 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. ....	107
Διάγραμμα 33: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 5 (κουρκουμίνη Ι) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.	108
Διάγραμμα 34: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 529 nm) της ένωσης 5 συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	108
Διάγραμμα 35: Φάσμα εκπομπής της ένωσης 6 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. ....	109
Διάγραμμα 36: Μεταβολή της μέγιστης εκπομπής (στα 608 nm) της ένωσης 6 συναρτήσει της συγκέντρωσης.....	109
Διάγραμμα 37: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 1 και 2, συγκέντρωσης 0,5 μM, σε διαλύτη DMSO. ....	111
Διάγραμμα 38: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 3 και 4, συγκέντρωσης 5 μM, σε διαλύτη DMSO. ....	111
Διάγραμμα 39: Φάσματα εκπομπής των ενώσεων 5 και 6, συγκέντρωσης 5 μM, σε διαλύτη DMSO. ....	112
Διάγραμμα 40: Σιγμοειδής καμπύλη MTT.....	113
Διάγραμμα 41: Φάσμα CD για την ένωση 1.....	131
Διάγραμμα 42: Φάσμα CD για την ένωση 2.....	131
Διάγραμμα 43: Φάσμα CD για την ένωση 3.....	132
Διάγραμμα 44: Φάσμα CD για την ένωση 4.....	132
Διάγραμμα 45: Φάσμα CD για την ένωση 5.....	133
Διάγραμμα 46: Φάσμα CD για την ένωση 6.....	133

## Βιβλιογραφία

- [1] D. W. Eom *et al.*, "Synergistic effect of curcumin on epigallocatechin gallate-induced anticancer action in PC3 prostate cancer cells," *BMB Rep.*, vol. 48, no. 8, pp. 461–466, 2015, doi: 10.5483/BMBRep.2015.48.8.216.
- [2] T. W. Corson and C. M. Crews, "Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials," *Cell*, vol. 130, no. 5, pp. 769–774, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.021.
- [3] P. . Abozenadah, H., Bishop, A., Bittner, S., Lopez, O., Wiley, C., and Flatt, *Consumer Chemistry: How Organic Chemistry Impacts Our Lives*. 2017.
- [4] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2020," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2020, doi: 10.3322/caac.21590.
- [5] H. H. Buzzá, L. C. F. de Freitas, L. T. Moriyama, R. G. T. Rosa, V. S. Bagnato, and C. Kurachi, "Vascular effects of photodynamic therapy with curcumin in a chorioallantoic membrane model," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3390/ijms20051084.
- [6] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 1 SPEC. ISS., pp. 1–23, 2005, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
- [7] E. Alexandratou, M. Kyriazi, T. Trebst, S. Gräfe, and D. Yova, "Photodynamic therapy of non melanoma skin cancer murine model by topical application of a novel mTHPC liposomal formulation," *Opt. InfoBase Conf. Pap.*, no. January, 2007, doi: 10.1117/12.728181.
- [8] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 2516–2539, 2011, doi: 10.3390/cancers3022516.
- [9] A. Cludia, A. P. Dias Ribeiro, L. Nordi, C. R. de Andrade, C. A. de Souza Costa, and C. Eduardo, "Photodynamic Therapy to Eradicate Tumor Cells," *Cell Metab. - Cell Homeost. Stress Response*, 2012, doi: 10.5772/27408.
- [10] K. T. Kazantzis *et al.*, "Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: Photophysical properties and: In vitro studies with prostate cancer cells," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 193–206, 2020, doi: 10.1039/c9pp00375d.
- [11] H. A. Hemeg, "Nanomaterials for alternative antibacterial therapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 8211–8225, 2017, doi: 10.2147/IJN.S132163.
- [12] J. M. Dąbrowski, "Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation," *Adv. Inorg. Chem.*, vol. 70, pp. 343–394, 2017, doi: 10.1016/bs.adioch.2017.03.002.
- [13] Z. Luksiene, "Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment.," *Medicina (Kaunas)*, vol. 39, no. 12, pp. 1137–1150, 2003.



- [14] S. Shirjang *et al.*, “MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 139, no. May, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.017.
- [15] K. E. Σέκερης, “Μηχανισμοί ογκογένεσης,” pp. 17–30, 2003.
- [16] M. Andrikoula and G. Vartholomatos, “Apoptosis: Cell death necessary for life,” *Arch. Hell. Med.*, vol. 18, no. 5, pp. 496–513, 2001.
- [17] G. Palareti *et al.*, “Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, no. 1, pp. 42–49, 2016, doi: 10.1111/ijlh.12426.
- [18] K. I. Priyadarsini, “The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent,” *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20091–20112, 2014, doi: 10.3390/molecules191220091.
- [19] K. I. Priyadarsini, “Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells,” *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 81–95, 2009, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001.
- [20] S. A.-E. and J. F. VERENA ELLERKAMP†, NICOLA BORTEL, EVI SCHMID, BETTINA KIRCHNER, “Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells,” 2016.
- [21] A. L. Hilchie *et al.*, “Curcumin-induced apoptosis in PC3 prostate carcinoma cells is caspase-independent and involves cellular ceramide accumulation and damage to mitochondria,” *Nutr. Cancer*, vol. 62, no. 3, pp. 379–89, 2010, doi: 10.1080/01635580903441238.
- [22] R. Wilken, M. S. Veena, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, “Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma,” *Mol. Cancer*, vol. 10, pp. 1–19, 2011, doi: 10.1186/1476-4598-10-12.
- [23] S. C. Gupta, S. Patchva, W. Koh, and B. B. Aggarwal, “Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 39, no. 3, pp. 283–299, 2012, doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x.
- [24] A. Duvoix *et al.*, “Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin,” *Cancer Lett.*, vol. 223, no. 2, pp. 181–190, 2005, doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.041.
- [25] B. B. Aggarwal, A. Kumar, and A. C. Bharti, “Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies,” *Anticancer Res.*, vol. 23, no. 1 A, pp. 363–398, 2003.
- [26] M. Li, Z. Zhang, D. L. Hill, H. Wang, and R. Zhang, “Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 5, pp. 1988–1996, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3066.
- [27] P. Anand *et al.*, “Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises reviews

- Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises,” vol. 4, no. November, pp. 807–818, 2007, doi: 10.1021/mp700113r.
- [28] Π. Χ. Μ. Μαρσέλος, Αικ.Αντωνίου, Μ.Κωνσταντή, Γ. Λεονταρίτης,Ευ. Μανωλόπουλος,Π.Παππάς, “Βιοχημικήφαρμακολογία Μηχανισμοί Δράσης Των Φαρμάκων,” p. 278, 2015, doi: <http://hdl.handle.net/11419/4252>.
- [29] W. Wichitnithad, U. Nimmannit, S. Wacharasindhu, and P. Rojsitthisak, “Synthesis, characterization and biological evaluation of succinate prodrugs of curcuminoids for colon cancer treatment,” *Molecules*, vol. 16, no. 2, pp. 1888–1900, 2011, doi: 10.3390/molecules16021888.
- [30] K. P. S Mishra, “The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer’s disease: An overview,” *Ann Indian Acad Neurol.*, 2008.
- [31] Y. Manolova, V. Deneva, L. Antonov, E. Drakalska, D. Momekova, and N. Lambov, “The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 132, pp. 815–820, 2014, doi: 10.1016/j.saa.2014.05.096.
- [32] K. Indira Priyadarsini, “Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 11, pp. 2093–2100, 2013, doi: 10.2174/138161213805289228.
- [33] K. K. Laali, B. M. Rathman, S. D. Bunge, X. Qi, and G. L. Borosky, “Structures , Bioassay , and Computational / Docking Study,” *J. Fluor. Chem.*, vol. 191, pp. 29–41, 2016, doi: 10.1016/j.jfluchem.2016.09.009.
- [34] G. Bai *et al.*, “Syntheses and photophysical properties of BF<sub>2</sub> complexes of curcumin analogues,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 10, pp. 1618–1626, 2014, doi: 10.1039/c3ob42201a.
- [35] N. C. Araújo, C. R. Fontana, V. S. Bagnato, and M. E. M. Gerbi, “Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 29, no. 2, pp. 629–635, 2014, doi: 10.1007/s10103-013-1369-3.
- [36] D. P. V. Leite, F. R. Paolillo, T. N. Parmesano, C. R. Fontana, and V. S. Bagnato, “Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: A randomized controlled trial,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 32, no. 11, pp. 627–632, 2014, doi: 10.1089/pho.2014.3805.
- [37] E. M. Bruzell, E. Morisbak, and H. H. Tønnesen, “Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 4, no. 7, pp. 523–530, 2005, doi: 10.1039/b503397g.
- [38] C. Santezi, B. D. Reina, and L. N. Dovigo, “Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 21, no. January, pp. 409–415, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.016.
- [39] M. Calmon *et al.*, “Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in HPV-16 E6 positive vulvar carcinoma cell lines,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 2018, pp. 55–55, 2018.

- [40] T. Niu, Y. Tian, Q. Cai, Q. Ren, and L. Wei, "Red light combined with blue light irradiation regulates proliferation and apoptosis in skin keratinocytes in combination with low concentrations of curcumin," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–18, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0138754.
- [41] J. Y. Feng and Z. Q. Liu, "Feruloylacetone as the model compound of half-curcumin: Synthesis and antioxidant properties," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 4, pp. 1198–1206, 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.01.039.
- [42] Z. Sui, R. Salto, J. Li, C. Craik, and P. R. Ortiz de Montellano, "Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 1, no. 6, pp. 415–422, 1993, doi: 10.1016/S0968-0896(00)82152-5.
- [43] K. Liu, J. Chen, J. Chojnacki, and S. Zhang, "BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>-promoted concise synthesis of difluoroboron-derivatized curcumins from aldehydes and 2,4-pentanedione," *Tetrahedron Lett.*, vol. 54, no. 16, pp. 2070–2073, 2013, doi: 10.1016/j.tetlet.2013.02.015.
- [44] Μ. Όξενκιουν - Πετροπούλου, Ed., *Φασματομετρικές μέθοδοι*, 3rd ed. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία, 2012.
- [45] Κ. Α. Ι. Μ. Φθορισμού, "Οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού."
- [46] J. A. Conchello and J. W. Lichtman, "Optical sectioning microscopy," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 920–931, 2005, doi: 10.1038/nmeth815.
- [47] A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, and A. S. Sobolev, "Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 78, no. 4, pp. 452–464, 2000, doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00925.x.
- [48] Q. Cui, S. Wen, and P. Huang, "Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach: Recent updates," *Future Med. Chem.*, vol. 9, no. 9, pp. 929–949, 2017, doi: 10.4155/fmc-2017-0011.
- [49] S. Zhang *et al.*, "Tumor mitochondria-targeted photodynamic therapy with a translocator protein (TSPO)-specific photosensitizer," *Acta Biomater.*, vol. 28, pp. 160–170, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.033.
- [50] D. Di Vizio *et al.*, "Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease," *Am. J. Pathol.*, vol. 181, no. 5, pp. 1573–1584, 2012, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.030.
- [51] T. Vagner *et al.*, "Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1505403.