



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ - ΑΜΑΛΙΑ ΓΕΩΡΓΙΑΔΗ

**«Λιπιδικοί νανομεταφορείς φαρμάκων με εφαρμογές στη
φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου»**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

[ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΤΟΥ, Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π, ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ Ε.Μ.Π]

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

[ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΤΟΥ, Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π, ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ Ε.Μ.Π]

[ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.]

[ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΟΛΙΤΟΠΟΥΛΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΣΧΟΛΗ
ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ Ε.Μ.Π]

[ΑΘΗΝΑ,02/2023]

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών και της Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την κυρία Ελένη Αλεξανδράτου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Της είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων, καθώς χωρίς την καθοδήγηση της, την βοήθεια και τις συμβουλές της δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας. Ιδιαίτερα η εμπιστοσύνη της, η υπομονή της, η υποστήριξη και η ενθαρρυντική της στάση έπαιξαν καθοριστικό ρόλο σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Αννίτα Κατοπόδη, υποψηφία διδάκτορα του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. Η συμβολή της ήταν καταλυτική, καθώς πάντοτε ήταν σε ετοιμότητα να με βοηθήσει και να με συμβουλέψει για οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυψε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Έχω να δηλώσω πως η στάση της είναι αξιοθαύμαστη. Είμαι πολύ ευγνώμων για αυτή την όμορφη συνεργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες, Ελένη Γεωργιοπούλου και Αλέξανδρο Καλοσπύρο, για την αρμονική συνεργασία και το όμορφο περιβάλλον που καλλιέργησαν στο εργαστήριο.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελένη Καβέτσου για τις πολύτιμες συμβουλές που μοιράστηκε μαζί μου και στην κυρία Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να υλοποιήσω ένα μέρος της εργασίας μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π.

.....
Αναστασία – Αμαλία Γεωργιάδη

© (2023) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	3
A. Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	5
A.1. Ιστορική Αναδρομή	5
A.2. Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	6
A.3. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης.....	8
A.4. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου	13
A.4.1. Απόπτωση	14
A.4.2. Νέκρωση	14
A.4.3. Αυτοφαγία.....	15
A.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φωτοδυναμικής θεραπείας	16
B. Φωτοευαισθητοποιητές.....	17
B.1. Χαρακτηριστικά	17
B.2. Κατηγορίες	18
B.3. Νανοδοματίδια ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών.....	20
Γ. Νιωσώματα.....	24
Γ.1. Γενικά	24
Γ.2. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Νιωσωμάτων.....	26
Γ.3. Σύνθεση νιωσωμάτων	26
Γ.4. Εφαρμογές.....	28
Δ. Κουρκουμίνη	29
Δ.1. Γενικά	29
Δ.2. Εφαρμογές.....	31
Δ.2.1. Γενικά.....	31

Δ.2.2. Φωτοδυναμική Θεραπεία	32
E. Πειραματικός Σκοπός	35
ΣΤ. Σύνθεση Νιωσωμάτων	36
ΣΤ.1. Αντιδραστήρια	36
ΣΤ.2. Συσκευές	36
ΣΤ.3. Γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση του διαλύτη (emulsification and solvent evaporation technique).....	36
ΣΤ.4. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	38
ΣΤ.5. Απόδοση Διεργασίας Εγκλεισμού	38
ΣΤ.6. Απόδοση Εγκλεισμού.....	38
ΣΤ.7. Απόδοση Διεργασίας.....	38
ΣΤ.8. Ποσοστό φορτίου κουρκουμίνης στα νιωσώματα (Drug Loading).....	39
ΣΤ.9. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	39
ΣΤ.10. Μελέτη απελευθέρωσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανωσωματίδια.....	39
ΣΤ.11. Φασματομετρία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	42
Z. Φωτοφυσικές Μελέτες	43
Z.1. Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης.....	43
Z.2. Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού	45
Z.3. Διάταξη ακτινοβολήσης	46
Z.4. Πειραματική Διαδικασία	49
Z.4.1.Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες	49
ΣΤ.4.2.Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες.....	50
ΣΤ.4.3. Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο μέτρησης φθορισμού	51
Z.4.4. Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ρίζων (ROS) με απορρόφηση με χρήση NADH	53

H. Κυτταρικές Καλλιέργειες.....	57
H.1. Αντιδραστήρια	57
H.1.1. Προετοιμασία πλήρους θρεπτικού μέσου	57
H.2. Όργανα και σκεύη.....	58
H.2.1.Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317	58
H.2.1. Μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50.....	59
H.3. Πειραματική Διαδικασία.....	61
H.3.1. Συνθήκες εργαστηρίου.....	61
H.3.2. Κυτταρική σειρά	61
H.3.3. Μεθοδολογία Απόψυξης Κυττάρων	62
H.3.4. Μεθοδολογία Ανακαλλιέργειας Κυττάρων	62
H.3.5. Μεθοδολογία Μέτρησης Κυττάρων	63
H.3.6. Μεθοδολογία Ψύξης Κυττάρων.....	64
H.3.7. Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT.....	64
H.3.8. Μελέτη της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	65
H.3.9. Μελέτης της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα.....	66
H.3.10. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαίσθητοποιητών στα κύτταρα.....	67
H.3.11. Μεθοδολογία εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα με τη χρήση ελεύθερης και εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης.....	68
Θ. Αποτελέσματα – Σχολιασμός.....	70
Θ.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	70
Θ.2.Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού και Ποσοστό Φόρτωσης Κουρκουμίνης...	71
Θ.3. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό	72
Θ.4. Μελέτη απελευθέρωσης κουρκουμίνης από τα νιοσώματα	74
Θ.5. Δομικός Χαρακτηρισμός μέσω φασματομετρίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)	77

Θ.6. Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες	79
Θ.7. Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες.....	82
Θ.8. Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο μέτρησης φθορισμού	89
Θ.9. Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) με απορρόφηση με χρήση NADH	92
Θ.10. Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων	96
Θ.11. Έλεγχος της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα απουσία φωτός.....	97
Θ.12. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα.....	99
Θ.13. Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431 με τη χρήση ελεύθερης και εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης.....	101
I. Γενικά Συμπεράσματα.....	108
I.1. Εισαγωγή	108
I.2. Παρασκευή νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη	108
I.3. Απορρόφηση σε διαφορετικούς διαλύτες.....	109
I.4. Εκπομπή φθορισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες.....	110
I.5. Φωτολεύκανση με τη μέθοδο της απορρόφησης	110
I.6. Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών	110
I.7. Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων της σειράς A431	111
I.8. Τοξικότητα φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα της σειράς A431 απουσία φωτός .	111
I.9. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα	111
I.10. Εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431	112
I.11. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	112
Βιβλιογραφία	114

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας ΣΤ.1: Αντιδραστήρια της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νιοσωμάτων	36
Πίνακας ΣΤ.2: Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νανοσωματιδίων	36
Πίνακας ΣΤ.3 : Αναλογίες παρασκευής νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη.....	37
Πίνακας ΣΤ. 4: Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas.....	42
Πίνακας Ζ.1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της Bridgelux Power LED 10W.....	49
Πίνακα Ζ.2: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης	50
Πίνακα Ζ.3: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού. 51	
Πίνακας Ζ.4: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη φωτολεύκανσης	52
Πίνακας Ζ.5: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη παραγωγής ελεύθερων ριζών ελεύθερης κουρκουμίνης	55
Πίνακας Ζ.6: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη παραγωγής ελεύθερων ριζών εγκλεισμένης κουρκουμίνης	56
Πίνακας Η.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αντιδραστηρίων	57
Πίνακας Η.2: Κύβοι φθορισμού μικροσκοπίου Olympus BX-50	60
Πίνακας Η.3: Συγκεντρωτικός πίνακας συγκεντρώσεων φωτοευαισθητοποιητών	67
Πίνακας Θ.1: Τιμές καμπύλης αναφοράς	70
Πίνακας Θ.2: Απόδοση εγκλεισμού και διεργασίας για κάθε αναλογία	71
Πίνακας Θ.3: Ποσοστό φόρτωσης κουρκουμίνης στα νιοσώματα για τις αναλογίες 100:100:10 και 400:400:10	72
Πίνακας Θ.5 : Εξίσωση και συντελεστής R^2 για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης.....	75
Πίνακας Θ.6: Χαρακτηριστικές κορυφές φάσματος FT-IR της κουρκουμίνης, των νιοσωμάτων χωρίς την ουσία και των νιοσωμάτων με την εγκλεισμένη ουσία.....	78
Πίνακας Θ.7: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκους κύματος ελεύθερης κουρκουμίνης για κάθε διαλύτη.....	80
Πίνακα Θ.8: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκους κύματος εγκλεισμένης κουρκουμίνης για κάθε διαλύτη	82

Πίνακας Θ.9: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.....	88
Πίνακας Θ.10: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και μέγιστης τιμής φθορισμού στα 437 nm της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.....	91
Πίνακας Θ.11: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και μέγιστης τιμής απορρόφησης στα 340 nm της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.....	94
Πίνακας Θ.12: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας	105

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα Ζ.2: Φάσματα απορρόφησης NADH και NAD ⁺	53
Διάγραμμα Θ.1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Κουρκουμίνης	70
Διάγραμμα Θ.2: Προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νιοσώματα	75
Διάγραμμα Θ.3: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου μηδενικής τάξης	76
Διάγραμμα Θ.4: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου μηδενικής τάξης	76
Διάγραμμα Θ.6: Φάσμα απορρόφησης της ελεύθερης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες DMSO, EtOH και PBS με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5}$	79
Διάγραμμα Θ.7.: Φάσμα απορρόφησης της εγκλεισμένης και της ελεύθερης κουρκουμίνης στους διαλύτες διαλύτες DMSO, EtOH με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5}$ M	81
Διάγραμμα Θ.8: Φάσμα απορρόφησης της εγκλεισμένης και της ελεύθερης κουρκουμίνης διαλυμένη σε PBS με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5}$ M	81
Διάγραμμα Θ.9: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-7} M	83
Διάγραμμα Θ.10: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-7} M	83
Διάγραμμα Θ.11: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO με συγκέντρωση 10^{-7} M	84
Διάγραμμα Θ.12: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO με συγκέντρωση 10^{-7} M	84
Διάγραμμα Θ.13: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS για συγκεντρώσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M	86
Διάγραμμα Θ.14: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS για συγκεντρώσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M	86
Διάγραμμα Θ.15: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS με συγκέντρωση 10^{-6} M	87
Διάγραμμα Θ.16: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS με συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M	87
Διάγραμμα Θ.17: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης για ακτινοβόληση από 0 έως 30 min	89

Διάγραμμα Θ.18: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης για ακτινοβόληση από 0 έως 30 min	90
Διάγραμμα Θ.19: Ποσοστιαία μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης	90
Διάγραμμα Θ.20: Φάσματα απορρόφησης ακτινοβόλησης ελεύθερης κουρκουμίνης για χρονικό διάστημα 0-30 min σε PBS.....	93
Διάγραμμα Θ.21: Φάσματα απορρόφησης ακτινοβόλησης εγκλεισμένης κουρκουμίνης για χρονικό διάστημα 0-30 min σε DMSO.....	93
Διάγραμμα Θ.14: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβόλησης για την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη.....	94
Διάγραμμα Θ.22: Βιωσιμότητα των κυττάρων (%) σε σχέση με τους χρόνους ακτινοβόλησης 1 min, 2 min και 3 min για 9 mW/cm ² , 12 mW/cm ² , 15 mW/cm ² και 18 mW/cm ²	96
Διάγραμμα Θ.23: Βιωσιμότητα των κυττάρων (%) σε σχέση με την συγκέντρωση της κάθε ουσίας απουσίας φωτός	98
Διάγραμμα Θ.24: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	102
Διάγραμμα Θ.25: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	102
Διάγραμμα Θ.26: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 12 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	103
Διάγραμμα Θ.27: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 12 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	103
Διάγραμμα Θ.28: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 15 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	104
Διάγραμμα Θ.29: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm ² , έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη	104

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Α.1 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της φωτοδυναμικής θεραπείας.....	8
Εικόνα Α.2. Διάγραμμα Jabloski του μηχανισμού της φωτοδυναμικής θεραπείας	12
Εικόνα Α.3 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στη φωτοδυναμική θεραπεία	13
Εικόνα Γ.1: Δομή νιοσωμάτων.....	25
Εικόνα Γ.2: Κατηγορίες νιοσωμάτων.....	25
Εικόνα Δ.1: Απεικόνιση της ρίζας <i>Curcuma longa</i> , της κουρκουμίνης σε μορφή σκόνης και της χημικής της δομής.....	29
Εικόνα Δ.2: Χημικές δομές κουρκουμινοειδών.....	30
Εικόνα Δ.3: Καμπύλες απορρόφησης κουρκουμίνης σε διαφορετικούς διαλύτες.....	31
Εικόνα Δ.4: Σχηματική απεικόνιση της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης	32
Εικόνα Ζ.1: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	44
Εικόνα Ζ.2: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του Perkin-Elmer LS 45	45
Εικόνα Ζ.3: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβολήσης.....	47
Εικόνα Ζ.4: Φωτογραφική απεικόνιση της Bridgelux Power LED 10W.....	48
Εικόνα Ζ.5: Διάταξη ακτινοβολήσης δείγματος για τα πειράματα της φωτολεύκανσης και της παραγωγής ελευθέρων ριζών	52
Εικόνα Η.1: Φωτογραφική απεικόνιση του ανάστροφου μικροσκοπίου φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317	59
Εικόνα Η.2.: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του μικροσκοπίου φθορισμού.....	60
Εικόνα Η.3: Φωτογραφική απεικόνιση μικροσκοπίου Olympus BX-50.....	61
Εικόνα Η.4: Απεικόνιση Α) σταυρού του πλακιδίου Neubauer και Β) μετρήσιμων κυττάρων στο σταυρό.....	63
Εικόνα Η.5.: Φωτογραφική απεικόνιση διάταξη ακτινοβολήσης plate.....	66
Εικόνα Θ.1: ζ – δυναμικό νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη	73
.....	73
Εικόνα Θ.2: Κατανομή μεγέθους νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη.....	73
Εικόνα Θ.3: ζ – δυναμικό νιοσωμάτων χωρίς την ουσία (blank).....	73
Εικόνα Θ.4: Κατανομή μεγέθους νιοσωμάτων χωρίς την ουσία (blank)	74
Εικόνα Θ.5: Απεικόνιση χωρικού εντοπισμού ελεύθερης κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα, αριστερά με οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά με μικροσκόπιο φθορισμού	100

Εικόνα Θ.6: Απεικόνιση χωρικού εντοπισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα, αριστερά με οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά με μικροσκόπιο φθορισμού..... 100

Περίληψη

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο που μπορεί να ασκήσει επιλεκτική κυτταροτοξική δράση σε κακοήθη κύτταρα. Βασίζεται στον συνδυασμό τριών μη τοξικών παραγόντων: μιας φωτοευαισθητοποιού ουσίας, μιας πηγής φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος και του οξυγόνου. Ο φωτοευαισθητοποιητής κατά τη διέγερση του με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος παράγει δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Εξαιτίας αυτού, ο φωτοευαισθητοποιητής είναι αποτελεσματικός σε πολύ μικρό εύρος στην περιοχή ακτινοβολήσης, καθιστώντας τη φωτοδυναμική θεραπεία μια πολύ επιλεκτική μέθοδο που δεν οδηγεί σε βλάβη υγιών ιστών.

Η κουρκουμίνη, μια πολυφαινολική ουσία φυτικής προέλευσης, κοινώς γνωστή ως κουρκουμάς, έχει αποτελέσει το επίκεντρο της μελέτης σε πολλαπλούς ιατρικούς τομείς. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ένας πολλά υποσχόμενος φωτοευαισθητοποιητής στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ωστόσο, οι θεραπευτικές εφαρμογές της κουρκουμίνης έχουν περιοριστεί λόγω των εξαιρετικά λιπόφιλων ιδιοτήτων και της χαμηλής διαλυτότητας στο νερό που οδηγούν σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, οι έρευνες έχουν στραφεί στον εγκλεισμό φωτοευαισθητοποιητών σε νανοσωματίδια.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε νανοσωματίδια για τη βελτίωση των ιδιοτήτων της στη θεραπεία του καρκίνου του δέρματος με φωτοδυναμική θεραπεία.

Αρχικά έγινε η σύνθεση των νιοσώματων με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εξάτμισης διαλύτη γαλακτωματοποίησης και πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός τους με την μέθοδο DLS. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή του μεγέθους τους ήταν $144,23 \pm 1,01$ nm, η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς βρέθηκε $0,164 \pm 0,021$ και η τιμή του ζ-δυναμικού ήταν $-30,1 \pm 1,7$ mV. Πραγματοποιήθηκε και δομικός χαρακτηρισμός με FT-IR που φάνηκε ο επιτυχής εγκλεισμός της κουρκουμίνης στα νιοσώματα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν η κουρκουμίνη και τα νιοσώματα με την κουρκουμίνη για τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν φάσματα απορρόφησης των ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαλύτες και φάσματα φθορισμού σε διαφορετικούς διαλύτες.

Επιπλέον έγινε μελέτη της φωτοσταθερότητάς τους και της ικανότητά τους να δημιουργούν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε καρκινικά κύτταρα της σειράς A431. Εξετάστηκαν οι κατάλληλες ισχύς ακτινοβολήσης απουσία των δύο ουσιών και η βιοτοξικότητα των ουσιών απουσία φωτός και προσδιορίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση των δύο ουσιών για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Πραγματοποιήθηκε ο χωρικός εντοπισμός των ουσιών στα κύτταρα και έγινε εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας με φωτοευαισθητοποιητές την ελεύθερη και την εγκλεισμένη στα νιοσώματα κουρκουμίνη για συγκέντρωση 1 μM και ρυθμούς ροής ισχύς 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 .

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή για την καταπολέμηση του καρκίνου του δέρματος μέσω της Φωτοδυναμικής Θεραπείας.

Λέξεις κλειδιά: Φωτοδυναμική Θεραπεία, Φωτοευαισθητοποιητής, Κουρκουμίνη, Νανοσωματίδια, Νιοσώματα

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive treatment strategy used for various medical conditions and cancerous diseases. It involves combination of three otherwise non-toxic components, a photosensitizing agent, a light source of specific wavelength and oxygen. Photosensitizer is a harmless molecule that upon excitation with light of a specific wavelength generates reactive oxygen species (ROS), exhibiting cytotoxicity towards the surrounding cancer cells. Due to this, the photosensitizer is effective within a very small range to the irradiation site, making photodynamic therapy a very selective method that does not lead to healthy tissue damage.

Curcumin a plant-derived polyphenolic substance isolated from *Curcuma longa*, commonly known as turmeric, has been the focus of study in multiple medicinal areas from antibiotic to antitumor treatment due to the many benefits that it poses. Studies have shown that it is a promising photosensitizer that could be used in photodynamic therapy. However, therapeutic applications of curcumin have been limited due to its highly lipophilic properties and low solubility in water which lead to low bioavailability. In order to overcome these obstacles encapsulation of photosensitizers to nanoformulations is being studied.

The objective of this study was the encapsulation of curcumin in niosomal nanoparticles for improving its properties in the treatment of skin cancer by photodynamic therapy. To begin with, the niosomes loaded with curcumin were synthesized using the emulsification solvent evaporation method and they were characterized with DLS. Specifically, the average value of their size was 144.23 ± 1.01 nm, the polydispersity index value was found to be 0.164 ± 0.021 and the ζ -potential value was -30.1 ± 1.7 mV. Structural characterization by FT-IR was also performed which showed the successful encapsulation of curcumin in the niosomes.

Furthermore, curcumin and niosomes with curcumin were studied for their photophysical properties. For this purpose, absorption spectra of the substances in different concentrations and solvents and fluorescence spectra in different solvents were collected. In addition, their photostability and their ability to generate reactive oxygen species (ROS) were studied.

Finally, studies were performed on cancer cells of the A431 cell line. The appropriate irradiation powers in the absence of the two substances and the biotoxicity of the substances in the absence of light were examined and thus the appropriate concentration of the two substances for the

application of photodynamic therapy was determined. The spatial localization of the substances in the cells was carried out as well as the application of photodynamic therapy with the photosensitizers being the free and the niosomes-encapsulated curcumin for a concentration of 1 μM and irradiation at 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 and 15 mW/cm^2 .

The results of this study show that curcumin loaded niosomal nanoparticles behave as a promising photosensitizing drug to combat skin cancer by Photodynamic Therapy.

Keywords: Photodynamic Therapy, Photosensitizer, Curcumin, Nanoparticles, Niosomes

Θεωρητικό Μέρος

A. Φωτοδυναμική Θεραπεία

A.1. Ιστορική Αναδρομή

Το φως έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία πολλών ασθενειών από την αρχαιότητα. Οι αρχαίοι πολιτισμοί, των Αιγυπτίων, των Ινδών και των Κινέζων, χρησιμοποιούσαν το φως του ήλιου για τη θεραπεία διαφόρων δερματικών παθήσεων, όπως η ψωρίαση, η λεύκη και ο καρκίνος του δέρματος. ^[1] Ο Ηρόδοτος, γνωστός και ως ο πατέρας της ηλιοθεραπείας, τόνισε τη σημασία της έκθεσης ολόκληρου του σώματος στον ήλιο για την αποκατάσταση της υγείας. Τον 18^ο και 19^ο αιώνα, στη Γαλλία, το φως του ήλιου χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία πολλών παθήσεων, όπως η φυματίωση, η ραχίτιδα, το σκορβούτο και οι ρευματισμοί. ^[2] Το 1903 απονεμήθηκε το Νομπέλ Φυσιολογίας και Ιατρικής στον Niels Finsen για τη συμβολή του στη φωτοθεραπεία, καθώς διαπίστωσε ότι φως του ήλιου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του κοινού ερυθρηματώδους λύκου. ^[3,4]

Η φωτοθεραπεία περιγράφει τη χρήση του φωτός στη θεραπεία μιας ασθένειας, ενώ η φωτοχημειοθεραπεία απαιτεί τη χορήγηση ενός φωτοευαίσθητου παράγοντα, του οποίου η θεραπευτική δράση ενεργοποιείται από το φως στους ιστούς όπου εντοπίζεται. Αυτή η μορφή θεραπείας χρονολογείται επίσης πριν από 3000 χρόνια, όταν οι Ινδοί και οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν ψωραλένια από φυσικά φυτά για τη θεραπεία μιας ποικιλίας δερματικών παθήσεων. ^[3,5] Το 1900 ο γερμανός φοιτητής ιατρικής Oscar Raab, ενώ εργαζόταν με τον καθηγητή H. von Tappeiner στο Μόναχο, ανακάλυψε τη θανατηφόρα επίδραση που είχε ο συνδυασμός του φωτός και του κόκκινου της ακριδίνης (acridine red) σε πρωτόζωα που προκαλούν ελονοσία. ^[2,3,5] Ο ίδιος κατέληξε ότι η τοξικότητα εμφανίστηκε ως αποτέλεσμα του φθορισμού που προκαλείται από τη μεταφορά ενέργειας από το φως στη χημική ουσία. ^[5,6] Την ίδια χρονιά, ο Γάλλος νευρολόγος J. Prime ανακάλυψε ότι οι ασθενείς με επιληψία που έλαβαν θεραπεία με ηωσίνη που χορηγήθηκε από το στόμα εμφάνισαν δερματίτιδα σε περιοχές εκτεθειμένες στο ηλιακό φως. Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε τους H. von Tappeiner και A. Jesionek στην τοπική εφαρμογή ηωσίνης και λευκού φωτός για την αντιμετώπιση όγκων του δέρματος. ^[3,5,6] Το 1904, οι H. von Tappeiner και A. Jodlbauer εντόπισαν ότι το οξυγόνο είναι αναπόσπαστο

συστατικό στις αντιδράσεις φωτοευαισθητοποίησης και το 1907 εισήγαγαν τον όρο «φωτοδυναμική δράση» για να περιγράψουν αυτό το φαινόμενο. ^[3,6]

Το επόμενο βήμα που συνέβαλε στην ανάπτυξη της φωτοδυναμικής θεραπείας ήταν οι μελέτες του Γερμανού ιατρού Meyer-Betz. Το 1913, ο επιστήμονας έκανε ένεση στο ίδιο του το δέρμα 200 mg αιματοπορφυρίνης και εκτέθηκε σε ηλιακή ακτινοβολία. Οίδημα και φωτοτοξικές αντιδράσεις ήταν επακόλουθα του πειράματος. Σημαντικά αποτελέσματα λήφθηκαν από τους Auler και Banzer που εστίασαν στον κόκκινο φθορισμό των πορφυρινών σε όγκους τρωκτικών. ^[7] Το 1972, μακροχρόνιες μελέτες οδήγησαν στην πρώτη σημαντική, από ιατρικής άποψης, δημοσίευση που αφορούσε την δράση των αιματοπορφυρινών στην επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. ^[5,8] Τρία χρόνια αργότερα, ο κόσμος άκουσε για τη θεραπεία του καρκίνου σε ποντίκια από παράγωγα αιματοπορφυρινών (HpD). Μετά από αυτό το επίτευγμα οι επιστήμονες έδωσαν προσοχή στη δυνατότητα χρήσης αυτής της θεραπείας για τους ανθρώπους. Το 1976, οι Kelly και Snell χρησιμοποίησαν την HpD για το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης ^[6,7] Η επιβεβαίωση της δραστηριότητας της HpD μελετήθηκε από τον Thomas Dougherty. Τα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν ήταν εκπληκτικά καλά. Μόνο δύο από τους 113 όγκους δεν είχαν ανταπόκριση στις χρησιμοποιούμενες ουσίες. Η συστηματική μελέτη του Dougherty προκάλεσε την γνωστοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας στο παγκόσμιο κοινό της εποχής και οδήγησε στην έγκριση εμπορικής διάθεσης της πορφυρίνης ως φωτοευαισθητοποιητής. Για το έργο του αυτό αναφέρεται και ως ο πατέρας της φωτοδυναμικής θεραπείας. ^[2,3,6,7] Στο πέρασμα των χρόνων η νέα αυτή θεραπεία έχει επεκταθεί και σε άλλους τύπους όγκων, όπως ο εγκέφαλος, το κεφάλι και ο λαιμός, οι πνεύμονες ή ο οισοφάγος και έχει εφαρμοστεί σε πλήθος ασθενών. ^[9]

A.2. Φωτοδυναμική Θεραπεία

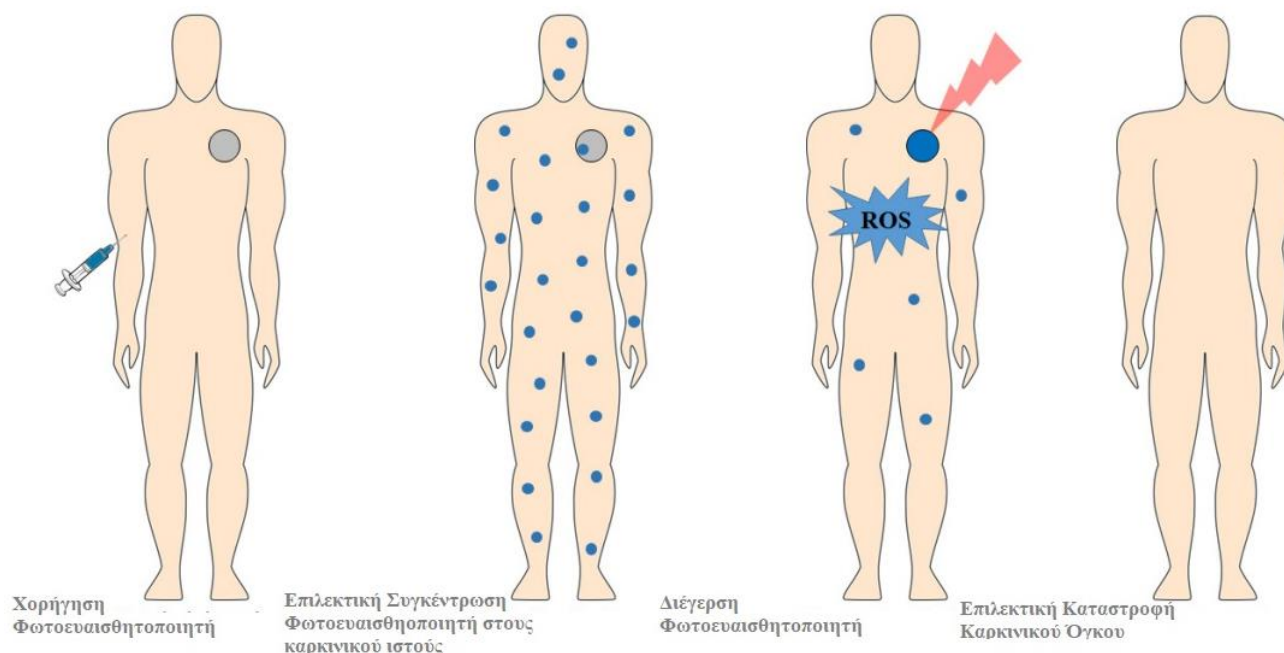
Τα τελευταία χρόνια, πάνω από 10 εκατομμύρια νέα κρούσματα καρκίνου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο και περίπου 9,6 εκατομμύρια ασθενείς απεβίωσαν από καρκίνο το 2018. Αυτός ο αριθμός εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κατά 70% τις επόμενες δύο δεκαετίες. ^[10,11] Στην πραγματικότητα ο καρκίνος αποτελεί μια από τις βασικότερες ασθένειες που προκαλεί θάνατο και συνεπώς η θεραπεία του αποτελεί παγκοσμίως επιτακτική ανάγκη.

Επί του παρόντος υπάρχουν διάφορα είδη θεραπείας που εφαρμόζονται με σημαντικότερες την χειρουργική αφαίρεση όγκου, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία και των συνδυασμό αυτών. Ωστόσο αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν διάφορα μειονεκτήματα,

όπως για παράδειγμα, με την χειρουργική επέμβαση καταστρέφονται και αφαιρούνται παράλληλα και υγιείς ιστοί, ενώ με τη χημειοθεραπεία μέσω των χημικών ουσιών προσβάλλονται μαζί με τα καρκινικά και τα υγιή κύτταρα. Η ακτινοθεραπεία με τη σειρά της αποτελεί μια δύσκολη μέθοδος καθώς χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια και χρόνο για να εντοπίσει τα καρκινικά κύτταρα και τέλος η ανοσοθεραπεία αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα του κάθε ασθενή γεγονός που την καθιστά απρόβλεπτη και μη αξιόπιστη μέθοδο. ^[12,13] Για αυτό και είναι σημαντικό να βρεθεί μια εναλλακτική θεραπεία η οποία θα είναι μη επεμβατική, επιλεκτική, θα παρουσιάζει ελάχιστες παρενέργειες και μικρό κόστος. Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μία μέθοδο με αυτά τα χαρακτηριστικά.

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο που μπορεί να ασκήσει επιλεκτική κυτταροτοξική δράση σε κακοήθη κύτταρα. Ως βάση της έχει τον συνδυασμό τριών μη τοξικών παραγόντων: μιας φωτοευαισθητοποιού ουσίας, μιας πηγής φωτός και του οξυγόνου. Ο κατάλληλος φωτοευαισθητοποιητής χορηγείται στην περιοχή του καρκινικού ιστού και ενεργοποιείται με μια πηγή φωτός με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και ισχύος. Η ενέργεια του φωτός, απορροφάται από τον φωτοευαισθητοποιητή και μεταφέρεται στα παρακείμενα μόρια οξυγόνου, που μετατρέπονται σε δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. ^[13] Χάρη στην ελάχιστη τοξικότητα στους υγιείς ιστούς, τη μειωμένη μακροχρόνια νοσηρότητα, την έλλειψη ανάπτυξης μηχανισμών εγγενούς ή επίκτητης ανθεκτικότητας, τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των οργάνων καθώς και τα εξαιρετικά αισθητικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης θεραπείας, καθίσταται μια πολύτιμη επιλογή. ^[14]

Η διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας ουσιαστικά αποτελείται από τέσσερα στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα Α.1. Πρώτα γίνεται η χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας στον οργανισμό του ασθενούς. Στη συνέχεια οι καρκινικοί όγκοι κάνουν επιλεκτική κατακράτηση της ουσίας, διαδικασία που συμβαίνει σε χρονικό διάστημα ωρών ή ακόμη και ημερών. Σε τρίτο στάδιο γίνεται η ακτινοβολήση του όγκου και των γύρων ιστών με σκοπό την ενεργοποίηση της φωτοευαίσθητης ουσίας. Τέλος, γίνεται αποβολή της ουσίας από τους ιστούς με παράλληλη συρρίκνωση του όγκου. Η καταστροφή του όγκου είναι ταχεία, ενώ η θεραπεία κάθε πιθανής βλάβης των υγείων ιστών γίνεται μέσα σε διάστημα 6-8 εβδομάδων. ^[3]



Εικόνα Α.1 Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της φωτοδυναμικής θεραπείας [3]

Α.3. Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης

Τα μόρια τα οποία παρουσιάζουν την ικανότητα να απορροφούν μήκη κύματος του ορατού φωτός καλούνται χρωμοφόρα. Ο ορισμός αυτός επεκτείνεται πολλές φορές για την UV και τη IR ακτινοβολία. Κάθε μόριο κατέχει μία σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μία χαμηλότερη σε μία υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση κβάντου φωτεινής ακτινοβολίας, ίσης ενέργειας με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί ένα πλήθος δονητικών καταστάσεων. Η πολλαπλότητα M μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό spin στις στάθμης S μέσω της σχέσης $M=2S+1$. Έτσι στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου του οποίου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα spin το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητά του ίση με 1. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μονήρης (singlet). Όταν το spin στις ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με παράλληλα spin και ολικό spin 1 άρα η πολλαπλότητα στις στάθμης είναι 3. Αυτή η ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet). [15,16]

Στη σταθερή τους κατάσταση, τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη μονήρη κατάσταση (singlet state) S_0 . Η βασική αυτή στάθμη χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια που μπορεί να έχει το μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται όταν όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα και έχουν

αντιπαράλληλα spins. Δεν υπάρχει δηλαδή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η τριπλή κατάσταση είναι για τα περισσότερα μόρια μία ασταθής κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν όταν διεγερθούν και η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση των παραπάνω, όντας μία από τις σπάνιες ενώσεις οι οποίες στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθούν μεταβαίνουν στην πολύ βασική για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση. ^[15,16]

Μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου από το μόριο του χρωμοφόρου, ακολουθεί μετάβασή του στην πρώτη ή δεύτερη ηλεκτρονιακή κατάσταση ανάλογα με το εάν το φωτόνιο ανήκε στην περιοχή της ορατής ή της υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η διαδικασία αυτή είναι πολύ εξειδικευμένη και ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας απορροφάται από συγκεκριμένες χημικές δομές. Κατά τη διάρκεια παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω συγκρούσεων σε άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Ο χρόνος ζωής της στάθμης είναι πολύ μικρός, της τάξεως του 1 μs. Το μόριο μπορεί να επιστρέψει στη βασική του στάθμη ακολουθώντας κάποιον από τους παρακάτω μηχανισμούς: ^[15,16]

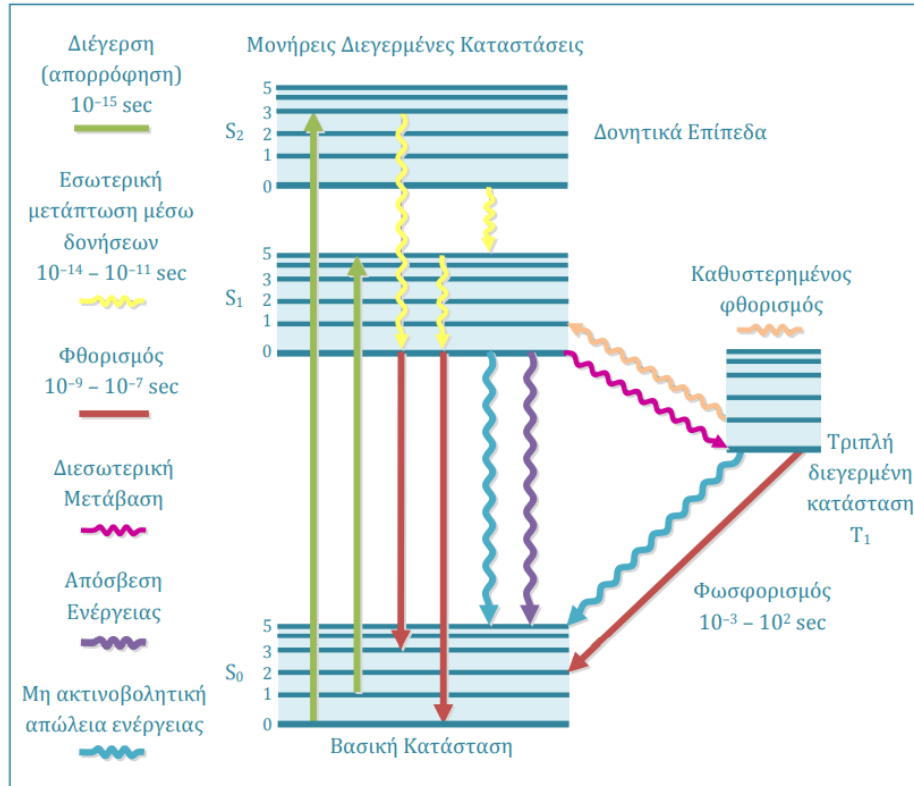
- Εσωτερική μετατροπή: το μόριο μπορεί από τη διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης. ^[15,16]
- Εσωτερική μετάπτωση: $S^* \rightarrow T^*$: το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί, εάν είναι ενεργειακά δυνατό, από τη μονήρη (S^*) στην πρώτη διεγερμένη τριπλή στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική στην τριπλή διεγερμένη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^* . Στη συνέχεια, το μόριο μπορεί να επανέλθει άμεσα στη βασική κατάσταση (S_0) αφού η επιστροφή στη βασική μέσω της S^* προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον (περίπτωση καθυστερημένου φθορισμού). Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε και έχουμε το φαινόμενο του

φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας (από msec έως λεπτά). Η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. ^[15,16]

- Φθορισμός: Η εκπομπή φθορισμού περιλαμβάνει πάντοτε μεταπτώσεις προς χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Το μόριο καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης (S_0) από τη βασική στάθμη της μονήρους διεγερμένης στάθμης (S^*), με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον. ^[15,16]
- Καθυστερημένος φθορισμός: Το μόριο έχει τη δυνατότητα να επανέλθει από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση T^* στη βασική μονήρη κατάσταση S_0 μέσω της S^* . Η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη προϋποθέτει την πρόσληψη ενέργειας από το περιβάλλον. Από την S^* το μόριο θα μεταβεί στην S_0 εκπέμποντας φωτεινή ενέργεια ίση με την ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών. Η διαδικασία που αναφέραμε παρουσιάζει χρόνους μεγαλύτερους από τον φθορισμό και συνεπώς καλείται καθυστερημένος φθορισμός. ^[15,16]
- Φωσφορισμός: αναφέρεται στην άμεση επιστροφή του μορίου από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση (T^*) στη βασική μονήρη κατάσταση (S_0) με την εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας. ^[15,16]

- Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων: αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού. ^[15,16]
- Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού: η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου - διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή μιας απόσβεσης φθορισμού. ^[15,16]
- Φωτοχημική αντίδραση: Η ενέργεια αυτή μπορεί να επάγει μια χημική αντίδραση, δηλαδή τη δημιουργία ενός νέου είδους μορίου. Η ενέργεια καταναλώνεται κατά τη διάρκεια αυτών των ενώσεων, που έχουν διαφορετικές ιδιότητες φθορισμού από τις αρχικές. ^[15,16]

Η απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί την αρχή των φωτοφυσικών και φωτοχημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη φωτοδυναμική θεραπεία, όπως φαίνεται στην Εικόνα Α.2. Για την διέγερση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή είναι απαραίτητα τα φωτόνια να έχουν αρκετή ενέργεια καθώς απορροφώνται. Μετά από απορρόφηση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή διεγείρεται σε δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης μονήρους στάθμης και καταλήγει τελικά στο χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης. Από εκεί, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή είτε θα αποδιεγερθεί πίσω στη βασική εκπέμποντας φθορισμό, μια ιδιότητα που μπορεί να αξιοποιηθεί κλινικά για απεικόνιση και φωτοανίχνευση, είτε θα μεταβεί στην τριπλή στάθμη. Μιας και η μετάβαση από τη μονήρη στην τριπλή στάθμη είναι κβαντομηχανικά απαγορευμένη, η τριπλή στάθμη έχει μεγάλη διάρκεια ζωής (μs) και έτσι μπορεί να αλληλεπιδράσει με το βιολογικό μέσο εντός του οποίου εντοπίζεται ο φωτοευαισθητοποιητής. ^[13,17]



Εικόνα Α.2. Διάγραμμα Jablonski του μηχανισμού της φωτοδυναμικής θεραπείας [15]

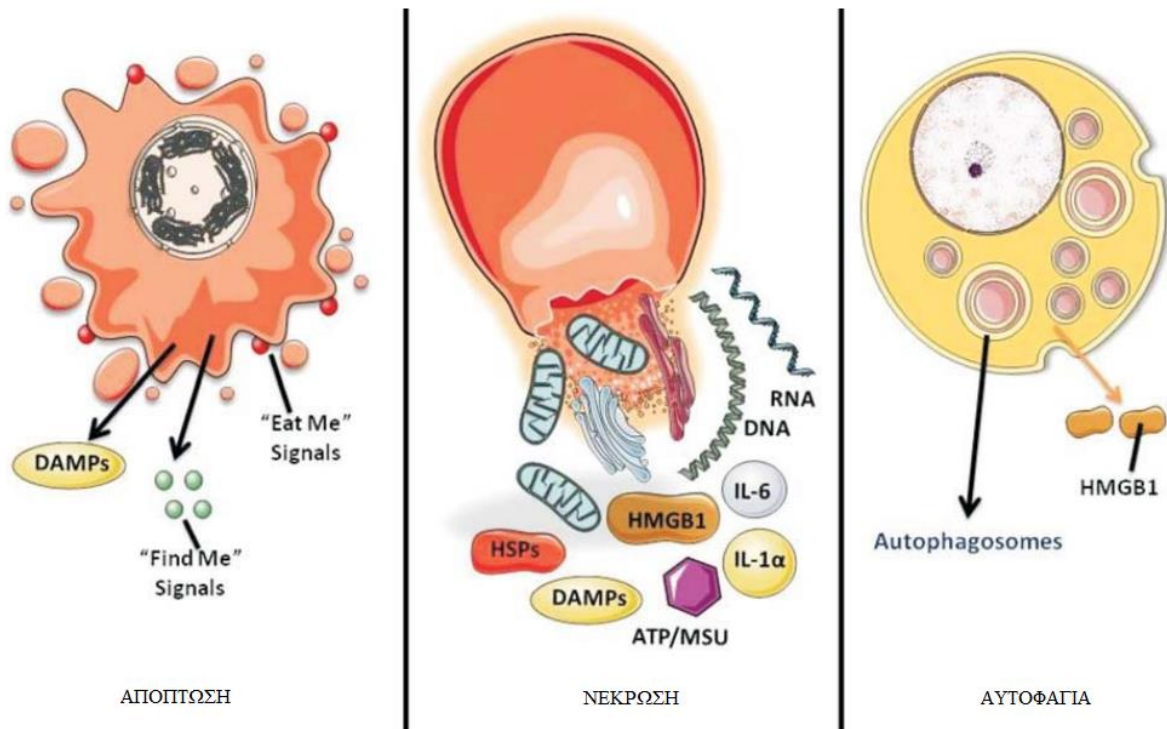
Η τριπλά διεγερμένη στάθμη του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να οδηγήσει σε δύο τύπους αντιδράσεων. Στην αντίδραση τύπου I, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί απευθείας να αντιδράσει με την κυτταρική μεμβράνη ή κάποιο μόριο και να μεταφέρει ένα πρωτόνιο ή ηλεκτρόνιο δημιουργώντας ένα ανιόν ή κατιόν αντίστοιχα. Έπειτα αυτές οι ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο παράγοντας δραστικά είδη οξυγόνου. Η αντίδραση τύπου I συχνά περιλαμβάνει την αρχική παραγωγή ενός ανιόντος υπεροξειδίου λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίου από τον φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο (μονοσθενής μείωση). [13,17] Το υπεροξείδιο, που από μόνο του δεν προκαλεί οξειδωτική καταστροφή, αντιδράει με τον εαυτό προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και οξυγόνου μέσω αυτοοξειδοαναγωγής. Έπειτα όταν φτάνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε μεγάλες συγκεντρώσεις αντιδρά με τα ανιόντα του υπεροξειδίου και σχηματίζονται πολύ δραστικές υδροξυλικές ρίζες ($HO\cdot$). Αυτές διαπερνούν εύκολα τη μεμβράνη, έχουν χαμηλές ενέργειες ενεργοποίησης και ως οξειδωτικοί παράγοντες οδηγούν στην καταστροφή μορίων μέσα στα κύτταρα. [18,19] Εναλλακτικά, στην αντίδραση τύπου II, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να μεταφέρει απευθείας την ενέργειά του στο μοριακό

οξυγόνο, διεγείροντάς το. Λόγω της υψηλής δραστηριότητάς του, το μονήρες οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών υποστρωμάτων, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη και κυτταρικό θάνατο.

Οι δύο αυτοί τύποι αντιδράσεων, μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα και το ποσοστό της καθεμίας εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαίσθητοποιητή που χρησιμοποιήθηκε και τη συγκέντρωση του βιολογικού υποστρώματος και του οξυγόνου. ^[13,17] Η κυτταροτοξικότητα που επάγεται μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στις αντιδράσεις τύπου II. Το ποσοστό με το οποίο θα συμμετέχουν οι φωτοχημικές αντιδράσεις τύπου I και II στο τελικό αποτέλεσμα της θεραπείας εξαρτάται από παράγοντες, όπως το είδος της φωτοευαίσθητης ουσίας, το είδος του ιστού και των κυττάρων που στοχεύονται, το pH αλλά και η συγκέντρωση του οξυγόνου. ^[15]

A.4. Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται από τη φωτοδυναμική θεραπεία μέσω τριών δρόμων: απόπτωση, νέκρωση και αυτοφαγία, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα A.3.



Εικόνα A.3 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου στη φωτοδυναμική θεραπεία ^[14]

A.4.1. Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων και αφορά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ο οποίος είναι γενετικά κωδικοποιημένος σε κάθε κύτταρο του σώματος. Μπορεί να ξεκινήσει είτε μέσω της ενεργοποίησης των κυτταρικών υποδοχέων θανάτου είτε μέσω της μιτοχονδριακής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c. Και τα δύο γεγονότα οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση κασπάσεων, όπως η κασπάση-3, -6 και -7. Αυτές στη συνέχεια διασπούν τα κυτταρικά υποστρώματα, γεγονός που οδηγεί σε χαρακτηριστικές βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται σε κύτταρα που πεθαίνουν. ^[19] Η απόπτωση χαρακτηρίζεται μορφολογικά από συμπύκνωση χρωματίνης, διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA σε διανουκλεοσωμικά θραύσματα, συρρίκνωση των κυττάρων, δημιουργία προεξοχών της κυτταρικής μεμβράνης και σχηματισμό αποπτωτικών σωμάτων χωρίς διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης. Τυπικά, τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα «βρες με» και «φάε με» που απαιτούνται για την εκκαθάριση των εναπομεινάντων νεκρών κυττάρων από τα φαγοκυτταρικά κύτταρα. ^[14] Η αποπτωτική διαδικασία ελέγχεται αυστηρά από διάφορες πρωτεΐνες. Είναι ευρέως γνωστό ότι η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση μπορεί να είναι ένα ουσιαστικό χαρακτηριστικό της ανάπτυξης καρκίνου, επομένως, η τροποποίηση των βασικών στοιχείων της σηματοδότησης απόπτωσης μπορεί να επηρεάσει άμεσα τον επαγόμενο από τη θεραπεία θάνατο καρκινικών κυττάρων. ^[19]

A.4.2. Νέκρωση

Η νέκρωση έχει περιγραφεί ως μια βίαιη και γρήγορη μορφή εκφυλισμού που επηρεάζει μεγάλο αριθμό κυτταρικών πληθυσμών και χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική διόγκωση, καταστροφή οργανιδίων και διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου και επακόλουθη φλεγμονή. Αναφέρεται και ως τυχαίος κυτταρικός θάνατος, που προκαλείται από φυσική ή χημική βλάβη και γενικά θεωρείται μια μη προγραμματισμένη διαδικασία. Η αποσύνθεση μεσολαβείται κυρίως από πρωτεολυτική δραστηριότητα, αλλά οι ακριβείς ταυτότητες των πρωτεασών και των υποστρωμάτων τους είναι ελάχιστα καθορισμένες. ^[19] Η νέκρωση θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα παθολογικών προσβολών ή ότι προκαλείται από βιοενεργειακή καταστροφή, εξάντληση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε επίπεδο ασύμβατο με την κυτταρική επιβίωση. Η βιοχημεία της νέκρωσης χαρακτηρίζεται ως επί το πλείστον με αρνητικούς όρους από την απουσία ενεργοποίησης της κασπάσης, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τον ολιγονουκλεοσωμικό κατακερματισμό του DNA. ^[14]

Η μελέτη των παραγόντων και των παραμέτρων που προκαλούν κυτταρική νέκρωση μετά από την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας δεν είναι τόσο εύκολη όσο η μελέτη εκείνων των παραγόντων που οδηγούν σε απόπτωση. Οι κρίσιμοι παράγοντες για τον προσδιορισμό του τύπου του κυτταρικού θανάτου είναι: ο κυτταρικός τύπος, η παρουσία ενός ανέπαφου συνόλου μηχανημάτων απόπτωσης, ο υποκυτταρικός εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή, η δόση φωτός που εφαρμόζεται για την ενεργοποίησή του τοπικά, και τη μερική πίεση του οξυγόνου. ^[19] Έχει αποδειχτεί ωστόσο ότι είτε υψηλή συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή είτε υψηλή ροή φωτός ή και τα δύο τείνει να προκαλεί κυτταρικό θάνατο λόγω νέκρωσης, ενώ η χορήγησή τους σε χαμηλότερες δόσεις τείνει να προδιαθέτει τα κύτταρα προς τα αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. ^[20]

A.4.3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας καταβολικός κυτταρικός μηχανισμός που επιτρέπει στο κύτταρο να διατηρεί μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης, της αποδόμησης και της ανακύκλωσης των κυτταρικών προϊόντων. Υπάρχει μια ποικιλία αυτοφαγικών διεργασιών, που όλες περιλαμβάνουν τη λυσοσωμική αποικοδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων και πρωτεϊνών. ^[19] Η αυτοφαγική κυτταροπλασματική αποικοδόμηση απαιτεί το σχηματισμό μιας δομής διπλής μεμβράνης που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα, η οποία δεσμεύει τα κυτταροπλασματικά συστατικά καθώς και τα οργανίδια και τα διακινεί στα λυσοσώματα. Η σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσοσώματος έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών συστατικών από τις λυσοσωμικές υδρολάσες. Σε ενήλικους οργανισμούς, η αυτοφαγία λειτουργεί ως μονοπάτι αυτοπέψεως που προάγει την επιβίωση των κυττάρων σε ένα δυσμενές περιβάλλον και ως μηχανισμός ποιοτικού ελέγχου αφαιρώντας κατεστραμμένα οργανίδια, τοξικούς μεταβολίτες ή ενδοκυτταρικά παθογόνα. ^[14] Εκτός από τη διευκόλυνση της απόρριψης ανεπιθύμητων πρωτεϊνών, οργανιδίων και μικροοργανισμών εισβολής, η αυτοφαγία επιτρέπει επίσης σε ένα κύτταρο να ανακατανέμει τα θρεπτικά συστατικά του από περιττές διαδικασίες σε απαραίτητες για τη ζωή διαδικασίες σε περιόδους πείνας ή στρες. ^[19]

Μελέτες έχουν δείξει ότι η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προκαλεί άμεσα αυτοφαγία. Αυτό είναι ανεξάρτητο από τον στόχο του φωτοευαισθητοποιητή, καθώς παρατηρήθηκε αυτοφαγία με φωτοευαισθητοποιητές που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα. Επιπλέον έχει φανεί ότι η απόπτωση εμφανίζεται συχνά σε κύτταρα που ήδη υποβάλλονται σε αυτοφαγία και είναι επίσης αποτέλεσμα

της φωτοδυναμικής θεραπείας. Τα ποσοστά αυτοφαγίας και απόπτωσης εξαρτώνται από τον τύπο του καρκινικού κυττάρου, τον φωτοευαισθητοποιητή και τη δοσολογία φωτός. Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, η αυτοφαγία είτε θα προάγει είτε θα αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο από την φωτοδυναμική θεραπεία. Σε κύτταρα που είναι σε θέση να υποστούν απόπτωση, η αυτοφαγία μειώνει τις καταστροφικές επιδράσεις της φωτοδυναμικής ανακυκλώνοντας κατεστραμμένα οργανίδια. ^[19,20]

A.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φωτοδυναμικής θεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδος θεραπείας σε σχέση με τις τρέχουσες θεραπείες για αρκετούς τύπους καρκίνου και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές προσεγγίσεις θεραπείας του καρκίνου. Αρχικά είναι λιγότερο επεμβατική από τις χειρουργικές επεμβάσεις και οι παρενέργειες συνήθως διαρκούν για μικρότερο χρονικό διάστημα από τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία. Μπορεί να συνδυαστεί με τις συμβατικές θεραπείες χωρίς να επηρεαστούν από αυτή. ^[14,20,21] Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί και σε εξωτερικά ιατρεία, εκτός νοσοκομείου. ^[21] Παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό αποτελεσματικότητας, ιδιαίτερα σε πρώιμοι σταδίου όγκους, και μεγάλη επιλεκτικότητα στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, καθώς μπορεί να κατευθυνθεί σε έναν ιστό-στόχο ο οποίος εκτίθεται ταυτόχρονα στον φωτοευαισθητοποιητή, το φως και το οξυγόνο. ^[9,14] Καταστρέφει επίσης τα αγγεία που σχετίζονται με τον όγκο, εκτός από τον ίδιο τον όγκο, γεγονός που συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην θανάτωσή του. Μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές σε ένα σημείο εάν είναι απαραίτητο, σε αντίθεση με την ακτινοβολία. Παρουσιάζει εξαιρετικό αισθητικό αποτέλεσμα καθώς υπάρχουν ελάχιστες ή καθόλου ουλές μετά την επούλωση. Τέλος, κοστίζει λιγότερο από άλλες θεραπείες για τον καρκίνο. ^[9,14, 18, 20, 21]

Ωστόσο, όπως κάθε θεραπεία, η φωτοδυναμική θεραπεία έχει ορισμένους περιορισμούς. Το φωτοδυναμικό φαινόμενο λαμβάνει χώρα επιλεκτικά στο σημείο που ακτινοβολείται, γεγονός που καθιστά αδύνατη τη χρήση της σε διάσπαρτες μεταστάσεις και αυτό δεν επιτρέπει την ακτινοβολήση ολόκληρου του σώματος με την κατάλληλη ένταση φωτός. ^[9] Η οξυγόνωση των ιστών και των όγκων είναι ζωτικής σημασίας για να πραγματοποιηθεί το φωτοδυναμικό αποτέλεσμα. Επομένως, όγκοι που περιβάλλονται από νεκρωτικό ιστό ή πυκνές μάζες όγκου οδηγούν σε εξασθενημένη PDT. ^[21] Η παραμένουσα φωτοευαισθησία μετά τη θεραπεία επίσης αποτελεί πρόκληση της θεραπείας αυτής, όπως και το γεγονός ότι όγκοι μεγάλου βάθους (που δεν

είναι εύκολα προσβάσιμοι χωρίς χειρουργική επέμβαση) είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν μη επεμβατικά λόγω της χαμηλής διείσδυσης του ορατού φωτός στους ιστούς. ^[20]

B. Φωτοευαισθητοποιητές

B.1. Χαρακτηριστικά

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι ενώσεις που είναι ικανές να απορροφούν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και να το μετατρέπουν σε χρήσιμη ενέργεια. Στην περίπτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας, αυτό συνεπάγεται την παραγωγή θανατηφόρων κυτταροτοξικών παραγόντων, όπως μονήρες οξυγόνο, ελεύθερες ρίζες κ.α. Η φωτεινή ενέργεια μεταβάλλει τον αδρανές φωτοευαισθητοποιητή μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων από το φωτόνιο του φωτός. Αυτός ο ενεργοποιημένος φωτοευαισθητοποιητής μπορεί στη συνέχεια να χάσει ενέργεια από διάφορες οδούς. Απώλεια ενέργειας μπορεί να συμβεί με την απελευθέρωση φωτός. Αυτό το φθορίζον φαινόμενο, μπορεί να παρατηρηθεί, και επιτρέπει την ανίχνευση και την οριοθέτηση του όγκου. Η ανίχνευση φθορισμού μπορεί να βοηθήσει στη στόχευση του όγκου και στον καθορισμό των ορίων του φυσιολογικού ιστού (τα οποία δεν φθορίζουν), καθώς λιγότερη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή βρίσκεται στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό. Ο ενεργοποιημένος φωτοευαισθητοποιητής μπορεί επίσης να χάσει ενέργεια δημιουργώντας τη φωτοχημική αντίδραση τύπου I κατά την οποία δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες που είναι καταστροφικές. Ωστόσο, η πιο σημαντική οδός για την κλινική φωτοδυναμική θεραπεία είναι η δημιουργία της φωτοχημικής αντίδρασης τύπου II. Εδώ ο φωτοευαισθητοποιητής αλληλεπιδρά με το οξυγόνο για να δημιουργήσει το μονήρες οξυγόνο. Ο χρόνος ημιζωής των ελεύθερων ριζών και του μονήρους οξυγόνου είναι πολύ μικρός με αποτέλεσμα να δρουν τοπικά στο σημείο που παράγονται. Υπάρχουν εκατοντάδες φυσικές και συνθετικές χρωστικές ουσίες που μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαισθητοποιητές για την φωτοδυναμική θεραπεία, που κυμαίνονται από φυτικές ενώσεις έως πολύπλοκα συνθετικά μακρομόρια. ^[20, 22]

Για να μπορεί να αξιοποιηθεί ένας φωτοευαισθητοποιητής κλινικά θα πρέπει να πληροί να τα παρακάτω χαρακτηριστικά: ^[8,15,23]

- Χαμηλό κόστος και εμπορική διαθεσιμότητα
- Χημική καθαρότητα και σταθερότητα

- Χαμηλή τοξικότητα απουσία φωτός (dark toxicity) και μη ικανότητα παραγωγής νέων τοξικών υποπροϊόντων με τον μεταβολισμό τους
- Επιλεκτικότητα, δηλαδή ικανότητα συσσώρευσης στους καρκινικούς όγκους και όχι στους υγιείς
- Υψηλή απορρόφηση στην περιοχή του ερυθρού (600 – 800 nm), όπου παρατηρείται μεγαλύτερος βάθος διείσδυσης. Σε μικρότερα μήκη κύματος (<600 nm) η διεισδυτικότητα μικραίνει και προχωρώντας προς την UV περιοχή (<400 nm) αυξάνεται και η φωτοευαισθησία αν ο ασθενής εκτεθεί στην ηλιακή ακτινοβολία. Ενώ σε μεγαλύτερα των 800 nm τα μόρια του οξυγόνου δεν διεγείρονται καθώς τα φωτόνια δεν έχουν αρκετή ενέργεια για τη μετάβαση του οξυγόνου από τη θεμελιώδη κατάσταση στη μονήρης.
- Αμφιφιλικότητα, ώστε να μην δημιουργούνται συσσωματώματα στο υδατικό περιβάλλον του αίματος και παράλληλα να είναι δυνατή η διείσδυση της ουσίας στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της λιπιδικής κυτταρικής μεμβράνης
- Ταχεία φαρμακοκινητική αποβολή από τον οργανισμό για αποφυγή της παρατεταμένης φωτοευαισθησίας
- Υψηλή κβαντική απόδοση ώστε να υπάρχει ικανοποιητική παραγωγή μονήρους οξυγόνου και ελεύθερων ριζών
- Φθορισμό για το εντοπισμό και τη ποσοτικοποίηση της ουσίας μέσα στον οργανισμό
- Φωτοσταθερότητα, δηλαδή δυνατότητα ακτινοβόλησης για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα καθώς παρουσιάζεται ανθεκτικότητα σε φαινόμενα φωτοκαταστροφής ή φωτολεύκανσης όπου χάνεται μόνιμα η ικανότητα φθορισμού της ουσίας μετά από εκτεταμένη ακτινοβόληση

B.2. Κατηγορίες

Ανά τα χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλά είδη φωτοευαισθητοποιητών για τη θεραπεία του καρκίνου και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες γενιές. Η 1^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών αποτελείται από την αιμοτοποφυρίνη με τα παράγωγά της και αναπτύχθηκαν την δεκαετία του 1970. Το παράγωγο αιματοπορφυρίνης (HpD) (που περιέχει ένα αποκλειστικό μείγμα μονομερών, διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης) και το πορφιμερικό νάτριο (το δραστικό υλικό στο HpD) είναι παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών πρώτης γενιάς. Το πορφιμερικό νάτριο παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως το ότι καταστρέφει

αποτελεσματικά τους όγκους, παρουσιάζει αμελητέα σκοτεινή τοξικότητα και μπορεί εύκολα να διαμορφωθεί σε ένα υδατοδιαλυτό παρασκεύασμα για ενδοφλέβια χορήγηση. Οι ουσίες αυτές αν και αποδείχτηκαν αποτελεσματικές παρουσιάζουν διάφορα μειονεκτήματα, όπως μικρή κβαντική απόδοση και μικρό βάθος διείσδυσης σε καρκινικούς όγκους, καθώς διεγείρονται από χαμηλά μήκη κύματος στη περιοχή του ορατού με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν χαμηλή επιλεκτικότητα. Επιπλέον η σύνθεση τους περιλαμβάνει περίπλοκες διεργασίες και απομακρύνονται από τον οργανισμό σε εξαιρετικά αργούς χρόνους που έχει ως συνέπεια μεγάλη περίοδο φωτοευαισθησίας. [12,17,23]

Με τη συνέχεια των ερευνών για την υπέρβαση των προβλημάτων που παρουσίαζαν οι φωτοευαισθητοποιητές της 1^{ης} γενιάς, στα τέλη της δεκαετίας του 1980 αναπτύχθηκαν οι φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς. Οι καινούργιες ουσίες είναι καθαρές ουσίες γεγονός που διευκολύνει την παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη κβαντική απόδοση και κορυφή απορρόφησης στο κόκκινο (600-700 nm) ή στο εγγύς υπέρυθρο (700-850 nm) γεγονός που αυξάνει το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον όγκο. Ωστόσο παρά τη βελτίωση των χαρακτηριστικών τους εμφανίζουν μικρή επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και παρατεταμένη φωτοευαισθησία αν και αποβάλλονται ταχύτερα από τον οργανισμό. Οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν τις προφυρίνες, τα παράγωγα χλωρινών, τα παράγωγα βενζοχλωρινών, τις πουρπουρίνες, τις φθαλοκυανίνες, τις ναφθαλοκυανίνες και τις βακτηριοχλωρίνες. [13,17]

Καθώς οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές αποτελούν υδρόφοβα μόρια έχουν την δυνατότητα να συσσωματώνονται με ευκολία στα υδατικά μέσα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή αλληλεπίδραση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή και σημαντική επίδραση στις φωτοφυσικές (μείωση κβαντικής απόδοσης μονήρους οξυγόνου), χημικές (μείωση της διαλυτότητάς τους) και βιολογικές τους ιδιότητες. [17] Έτσι οι έρευνες οδήγησαν στην 3^η γενιά φωτοευαισθητοποιητών η οποία περιλαμβάνει φωτοευαισθητοποιητές προηγούμενων γενεών οι οποίοι προσδένονται ή είναι εγκλεισμένοι με νανοσωματίδια, προς βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων τους και ιδιαίτερα μείωση της υδροφοβικότητας τους και μεγαλύτερη συγκέντρωση των φωτοευαισθητοποιητών στις καρκινικές περιοχές σε σχέση με τις υγιείς.

B.3. Νανοσωματίδια ως φορείς μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών

Ως νανοσωματίδια καλούνται τα σωματίδια διαστάσεων 1-100 nm. Χρησιμοποιούνται ως φορείς μεταφοράς φαρμάκων λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους, όπως η μεγάλη επιφάνεια σε σχέση με τη μάζα τους και το μικρό τους μέγεθος. Μπορούν να αποτρέψουν τη διάσπαση του φαρμάκου αμέσως μετά τη χορήγησή του, μειώνουν τις παρενέργειες και αυξάνουν την διαλυτότητα των υδρόφοβων ουσιών σε υδατικά μέσα. Είναι δυνατό να σχεδιαστούν έτσι ώστε να είναι επιλεκτικά στο βιολογικό στόχο και έτσι η συγκέντρωση του φαρμάκου σε υγιείς περιοχές να είναι μηδαμινή. Ιδανικά ένα νανοσωματίδιο θα πρέπει να είναι βιοδιασπώμενο, να έχει μικρό μέγεθος και μεγάλη χωρητικότητα, να προκαλεί ελάχιστη ανοσογονικότητα και να μην παρουσιάζει καμία τοξικότητα ή παρενέργεια. Ακόμη να παρουσιάζει μεγάλους χρόνους ημιζωής στην κυκλοφορία του αίματος μετά τη χορήγησή του και ελάχιστη τάση προς σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ειδικά τα νανοσωματίδια μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών θα πρέπει να ενθυλακώνουν τον φωτοευαισθητοποιητή χωρίς να μειώνουν ή να αλλοιώνουν τις φωτοφυσικές του ιδιότητες και να εξασφαλίζουν μεταφορά των μορίων του χωρίς τη συσσωμάτωσή τους.^[23,24]

Τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει αρκετές μελέτες που υπογράμμισαν τις διάφορες προσεγγίσεις στη χρήση νανοσωματιδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία, οι οποίες γενικά κατηγοριοποιούσαν τα νανοσωματίδια σε παθητικούς και ενεργούς φορείς, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία οποιωνδήποτε τμημάτων στόχευσης στην επιφάνειά τους, είτε με βάση τη συμμετοχή τους στη διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή. Σε αντίθεση με τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, που πρέπει να απελευθερωθούν από τον φορέα για να ασκήσουν την επίδρασή του στα κύτταρα-στόχους, ο φωτοευαισθητοποιητής δεν χρειάζεται να απελευθερωθεί από τον φορέα, εφόσον το μοριακό οξυγόνο και το μονήρες οξυγόνο μπορούν να διαχέονται μέσα και έξω από τον φορέα. Λόγω αυτού του γεγονότος, συχνά υιοθετούνται δύο διαφορετικές στρατηγικές για την ανάπτυξη φορέων νανοσωματιδίων για την φωτοδυναμική θεραπεία: α) βιοαποικοδομήσιμα νανοσωματίδια (φυσικά ή συνθετικά νανοσωματίδια με βάση τα πολυμερή) που φέρουν το ωφέλιμο φορτίο φωτοευαισθητοποιητή, τα οποία θα μπορούσαν να υποστούν ενζυματική ή υδρολυτική αποικοδόμηση και έτσι να απεκκρίνονται, ελαχιστοποιώντας μακροπρόθεσμη συσσώρευση φορέων στο βιολογικό σύστημα. ή β) μη βιοαποδομήσιμα νανοσωματίδια (νανοσωματίδια με βάση τα κεραμικά ή τα μέταλλα), τα οποία δεν αποικοδομούνται εύκολα στο βιολογικό σύστημα, αλλά αρκετά συχνά προσφέρουν

ενσωματωμένες πολλαπλές λειτουργίες που τα καθιστούν πολύτιμα ως διαγνωστικούς παράγοντες. [23,24]

Παρακάτω παρατίθενται τα πιο σημαντικά είδη νανοσωματιδίων που έχουν μελετηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία.

- Ενεργά Νανοσωματίδια

Οι κβαντικές τελείες (Quantum Dots, QDs) είναι σφαιρικοί νανοκρύσταλλοι με τη διάμετρό τους να κυμαίνεται μεταξύ 2 και 10 nm. Αποτελούνται από έναν πυρήνα ημιαγωγού ο οποίος και επικαλύπτεται από ένα κέλυφος (shell) για τη βελτίωση των οπτικών τους ιδιοτήτων, αλλά και τη διαλυτότητά τους. [25] Τα QDs παρουσιάζουν απορρόφηση σε μεγάλο εύρος μηκών κύματος και εκπέμπουν φως σε στενότερες περιοχές και έχουν εξαιρετική αντοχή στη φωτολεύκανση. Μπορούν να εκπέμπουν στην εγγύς υπέρυθη περιοχή καθιστώντας ευκολότερη την οπτική απεικόνιση σε βάθος. Η μεγάλη επιφάνεια, η υψηλή φωτεινότητα και η ευέλικτη επιφάνεια των QDs επιτρέπουν τη χρήση τους στην ανάπτυξη εξαιρετικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Ως αποτέλεσμα, τα QDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε πολλές βιολογικές εφαρμογές, όπως σε βιοαισθητήρες, στην επισήμανση κυττάρων, στην κυτταρική εμφάνιση και στην διάγνωση του καρκίνου. [13]

Η ανάπτυξη νανοσωματιδίων άνω και κάτω μετατροπής (Up- and down-conversion nanoparticles) προκύπτει ως αποτέλεσμα των συνεχιζόμενων προσπαθειών για την επίλυση της αδυναμίας ορισμένων πρωτογενών φωτοευαισθητοποιητών στη θεραπεία όγκων μεγάλου βάθους λόγω της αδυναμίας τους να απορροφήσουν κοντά σε υπέρυθη ακτινοβολία. Η φωτοδυναμική θεραπεία άνω μετατροπής (Up-Conversion) περιλαμβάνει τη διέγερση νανοϋλικών, όπως νανοσωματίδια της σειράς των λανθανιδών, από φως υπέρυθρου κατάλληλου μήκους κύματος που οδηγεί σε εκπομπή φωτός που μπορεί να προκαλέσει την διέγερση φωτοευαισθητοποιητών που απορροφούν στη περιοχή του ορατού. Με αυτόν τον τρόπο, ο φωτοευαισθητοποιητής που απορροφά μόνο στο ορατό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία όγκων μεγαλύτερου βάθους. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης αφορά το γεγονός ότι δίνει τη δυνατότητα της μη περαιτέρω επεξεργασίας της δομής του φωτοευαισθητοποιητή ώστε να απορροφήσει στην περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, γεγονός που θα χρειαζόταν ακριβείς και τοξικές, προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον, ύλες. [26, 27]

Από την άλλη πλευρά, η φωτοδυναμική θεραπεία της κάτω μετατροπής (Down-Conversion) περιλαμβάνει τη διέγερση νανοϋλικών, όπως τα νανοσωματίδια της σειράς των λανθανίδων με ακτίνες X με κατάλληλο μήκος κύματος ικανό να διεγείρει ένα φωτοευαίσθητοποιητή του ορατού να απορροφά σε φως από την εκπομπή UV. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι η δομή του φωτοευαίσθητοποιητή δεν καταστρέφεται. Ωστόσο, παρά το πλεονέκτημα αυτό η ανησυχία, που υπάρχει σχετικά με την ασφάλεια των νανοσωματιδίων της σειράς λανθανίδων και την τοξικότητα που προκύπτει από την παρατεταμένη έκθεση σε ακτίνες X, μπορεί να περιορίσει τη μελλοντική αποδοχή αυτής της ενδιαφέρουσας προσέγγισης της φωτοδυναμικής θεραπείας. ^[26,27]

- Παθητικά νανοσωματίδια

Μη βιοαποδομήσιμα νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν ερευνηθεί εδώ και πολλά χρόνια σε σχέση με την εφαρμογή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία λόγω ορισμένων πολλά υποσχόμενων ιδιοτήτων τους, όπως οι μεγάλες επιφάνειες, η καλή βιοσυμβατότητα και η εύκολη επιφανειακή τους τροποποίηση. Μελετώνται εκτενώς σε διαγνωστικές εφαρμογές, λόγω της ελεγχόμενης οπτικής σκέδασης και απορρόφησής τους. ^[13] Επιπλέον είναι γνωστό ότι τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν ισχυρή ζώνη συντονισμού πλασμονίου (SPR), επιτρέποντάς τα να απορροφούν αποτελεσματικά στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) φως και να μετατρέπουν αποτελεσματικά τα φωτόνια σε θερμική ενέργεια, προκαλώντας έτσι μη αναστρέψιμη υπερθερμική αφαίρεση των καρκινικών κυττάρων. ^[28]

Βιοαποικοδομήσιμα νανοσωματίδια

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια είναι στερεά, κολλοειδή σωματίδια με διαστάσεις 10 έως 1000 nm. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής τους σε νανοκάψουλες, δηλαδή συστήματα κυστιδίων, και νανοσφαιρίδια που είναι συστήματα μητρών. Στις νανοκάψουλες, το βιοδραστικό μόριο βρίσκεται στο εσωτερικό τους και περιβάλλεται από μία πολυμερική μεμβράνη, ενώ στα νανοσφαιρίδια το βιοδραστικό βρίσκεται διεσπαρμένο μέσα στη μήτρα. ^[25] Τα κύρια πλεονεκτήματά τους αφορούν την ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας υλικών και διαδικασιών παραγωγής, τη δυνατότητα παροχής ενός αρκετά καλού φορτίου πολλαπλών παραγόντων (θεραπευτικών και διαγνωστικών παραγόντων) στον όγκο, προστατεύοντάς τον από πρόωρη διαρροή στο αίμα, διατηρώντας έτσι τη φωτοσταθερότητα των φωτοδραστικών παραγόντων και

των φθοροφόρων. Επιπλέον, οι επιφανειακές ιδιότητες, οι μορφολογίες και η σύνθεση των πολυμερικών μητρών μπορούν εύκολα να βελτιστοποιηθούν για την ελεγχόμενη αποδόμηση του πολυμερούς και κατά συνέπεια για την ελεγχόμενη απελευθέρωση των φωτοευαισθητοποιητών. [23, 24, 25]

Τα δενδριμερή είναι τρισδιάστατα διακλαδισμένα μακρομόρια, σε μορφή δέντρου, με μικρό μέγεθος (<10 nm) και ικανότητα να φέρουν στην επιφάνειά τους πολλές λειτουργικές ομάδες. Σε αντίθεση με τα συμβατικά πολυμερή, τα δενδριμερή παρασκευάζονται με μια σταδιακή και ελεγχόμενη συνθετική πορεία, που οδηγεί σε ένα εξαιρετικά διατεταγμένο σχέδιο διακλάδωσης με συνεπή και καλά καθορισμένη αρχιτεκτονική. Συνεπώς το μέγεθος και η λιποφιλικότητα του δενδριμερούς – συζευγμένου βιοδραστικού μορίου μπορούν να ελεγχθούν και να τροποποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της κυτταρικής πρόσληψης και της βιοκατανομής των ιστών. Επιπλέον, ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί είτε να συνδεθεί στις λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του δενδριμερούς είτε να ενθυλακωθεί στον πυρήνα του δενδριμερούς. Έτσι, τα χαρακτηριστικά του συζευγμένου φωτοευαισθητοποιητή μπορούν να διαμορφωθούν για τη βελτιστοποίηση της παροχής φαρμάκου και ως εκ τούτου να βελτιώσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. [23,25]

Τα λιποσώματα είναι από τα πρώτα συστήματα χορήγησης με βάση νανοσωματίδια που εφαρμόστηκαν στην ιατρική και υπάρχουν πάνω από 11 λιποσωμικά σκευάσματα εγκεκριμένα για κλινική χρήση σήμερα, με πολλά άλλα σε κλινική και προκλινική ανάπτυξη. [23] Αποτελούν κλειστές, σφαιρικές δομές με μία ή περισσότερες διπλοστιβάδες, και στο εσωτερικό τους δεσμεύουν το υδατικό μέσο στο οποίο βρίσκονται, και χαρακτηρίζονται ως θερμοδυναμικά ασταθείς κολλοειδής διασπορές. Οι λιπιδικές διπλοστιβάδες αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. [25] Λόγω του αμφιφίλου χαρακτήρα των φωσφολιπιδίων, που διαθέτουν μια υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβες αλυσίδες, είναι δυνατό να εγκλειστούν στα λιποσώματα τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα φάρμακα. Επομένως, τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση λιπόφιλων και υδρόφιλων PSs που χρησιμοποιούνται στην PDT του καρκίνου. [21]

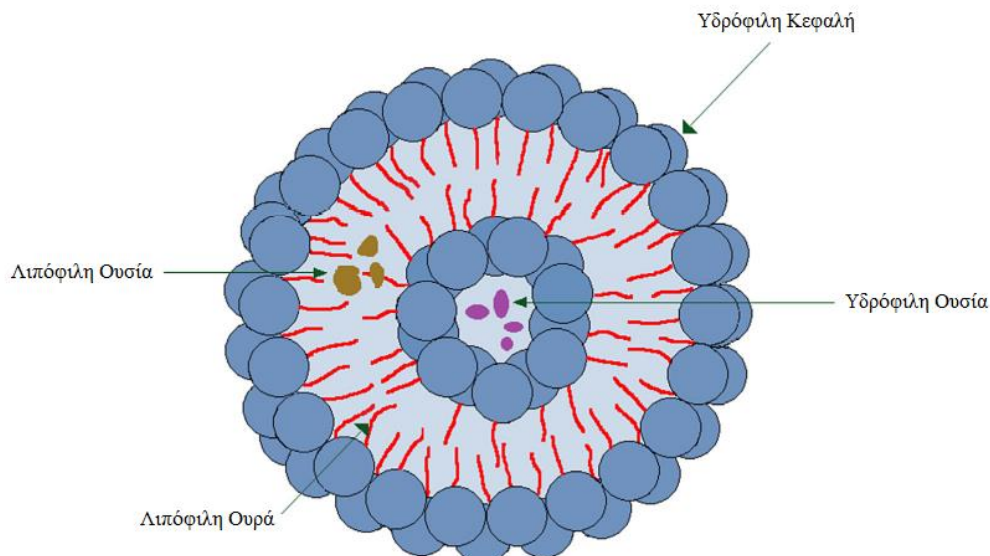
Από συγκριτικές μελέτες εγκλεισμένων και μη εγκλεισμένων φωτοευαισθητοποιητών σε λιποσώματα φάνηκε ότι βελτιστοποιούν την PDT. Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Bovis et al. που χρησιμοποίησαν ως φωτοευαισθητοποιητή την m-THPC. Τα αποτελέσματά τους

έδειξαν ότι τα φορτωμένα με m-THPC λιποσώματα βελτίωσαν την επιλεκτικότητα του όγκου με αποτέλεσμα τη μείωση της βλάβης των υγιών κυττάρων. Επίσης φάνηκε ότι το κόστος της θεραπείας θα μπορούσε να μειωθεί με τη χρήση λιποσωμάτων καθώς απαιτήθηκε χαμηλότερη δόση του φαρμάκου όταν φορτώνεται σε λιποσώματα.^[29] Παρόμοια ενδιαφέροντα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί με διαφορετικά μοντέλα όγκων ή διαφορετικούς φωτοευαίσθητοποιητές. Ωστόσο μειονεκτήματα όπως η χημική και φυσική τους αστάθεια μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση λιποσωμάτων και αποικοδόμηση της βιοδραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επιπλέον ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα, είναι πολύ σύντομος για να πραγματοποιηθεί αποτελεσματική πρόσληψη όγκου με αποτέλεσμα να μην έχουν προτιμηθεί ως τα τελικά εργαλεία για την επιλεκτική στόχευση φωτοευαίσθητοποιών σε όγκους.^[30]

Γ. Νιοσώματα

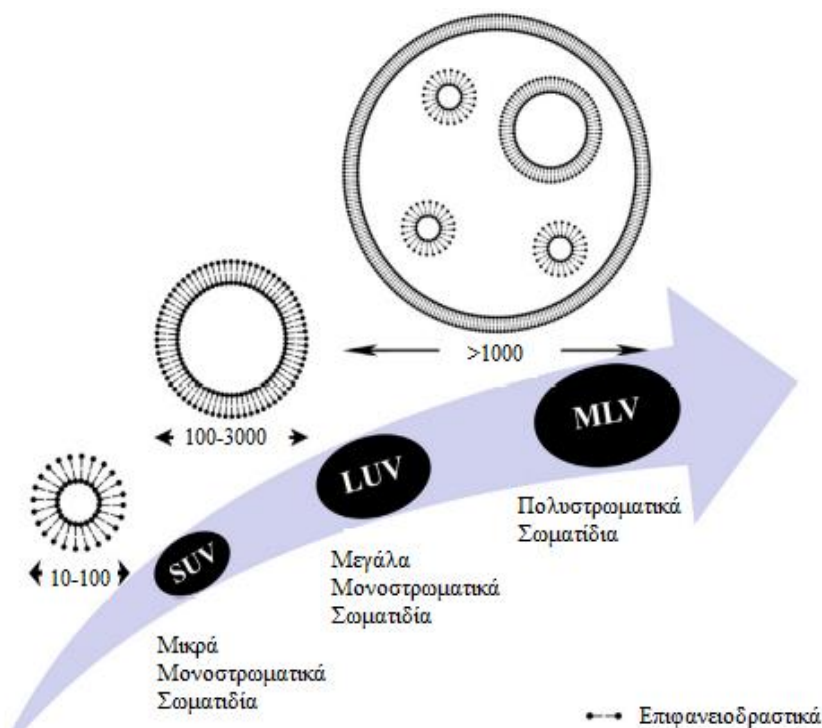
Γ.1. Γενικά

Ένα νέο σύστημα ελεγχόμενης και στοχευμένης χορήγησης βιοδραστικών ουσιών αποτελούν τα νιοσώματα. Παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες στη δομή τους με τα λιποσώματα, ωστόσο λόγω των μειονεκτημάτων τους, όπως τοξικότητα και προβλήματα σταθερότητας σε διαφορετικά pH, το ερευνητικό ενδιαφέρον μετατοπίστηκε στα νιοσώματα.^[31] Τα νιοσώματα, όπως τα λιποσώματα, είναι κλειστές, σφαιρικές δομές με λιπιδική διπλοστιβάδα με τη διαφορά ότι στο εσωτερικό τους πληρώνονται με υδατικό μέσο. Αποτελούνται κυρίως από μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες συνδυασμένες με τη χοληστερόλη ή τα παράγωγά της, που παρέχει την απαραίτητη ακαμψία και σταθερότητα στην δομή. Οι μοναδικές αυτές δομές των νιοσωμάτων τα καθιστούν ικανά να ενθυλακώνουν τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες ουσίες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη παγίδευση της υδρόφιλης ουσίας στον φυσαλιδώδη υδατικό πυρήνα ή την προσρόφησης της στην επιφάνεια της διπλοστιβάδας, ενώ οι λιπόφιλες ουσίες ενθυλακώνονται με τον διαχωρισμό τους στη λιπόφιλη περιοχή ανάμεσα στη διπλοστιβάδα, όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.1.^[31,32,33] Τα νιοσώματα μπορούν να χορηγούν διαφορετικά φάρμακα με ταυτόχρονο τρόπο, για παράδειγμα, δοξορουβικίνη και κουρκουμίνη (αντικαρκινικά φάρμακα).^[31]



Εικόνα Γ.1: Δομή νιοσωμάτων [33]

Ανάλογα με την αυτοσυναρμολόγηση των μη ιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών χωρίζονται, με βάση το μέγεθος τους, σε μικρά μονοστρωματικά (small unilamellar vesicles, SUV), μεγάλα μονοστρωματικά (large unilamellar vesicles, LUV), και πολυστρωματικά (multilamellar vesicles, MLV), όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.2. [32]



Εικόνα Γ.2: Κατηγορίες νιοσωμάτων [32]

Γ.2. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Νιοσωμάτων

Σε σύγκριση με τα λιποσώματα, τα νιοσώματα προσφέρουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα, οσμωτική δραστηριότητα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στα λιποσώματα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή στα νιοσώματα. Ως αποτέλεσμα, ο βαθμός εγκλεισμού του φαρμάκου των λιποσωμάτων είναι μικρότερος από των νιοσωμάτων. Επιπλέον, τα λιποσώματα είναι ακριβά και τα συστατικά τους, όπως τα φωσφολιπίδια, είναι χημικά ασταθή λόγω της προδιάθεσής τους σε οξειδωτική αποδόμηση. Λόγω της παρουσίας μιας λειτουργικής ομάδας στην υδρόφιλη κεφαλή, η επιφάνεια τους μπορεί εύκολα να σχηματιστεί και να τροποποιηθεί. Έχουν υψηλή συμβατότητα με βιολογικά συστήματα και χαμηλή τοξικότητα λόγω της μη ιοντικής φύσης τους και επίσης είναι βιοαποικοδομήσιμα και μη ανοσογόνα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλεισμό τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων φαρμάκων. Επιπλέον, μπορούν να βελτιώσουν τη θεραπευτική απόδοση των μορίων του φαρμάκου καθώς το προστατεύουν από το βιολογικό περιβάλλον. Τα νιοσώματα μπορούν να χορηγηθούν με όλες σχεδόν τις οδούς χορήγησης, για παράδειγμα, στοματική, παρεντερική, διαδερμική, οφθαλμική και πνευμονική. Χαρακτηριστικά; όπως το σχήμα, το μέγεθος, η απόδοση εγκλεισμού της βιοδραστικής ουσίας και η σταθερότητά τους είναι ελεγχόμενα και μπορούν να αλλάξουν τροποποιώντας διάφορες παραμέτρους όπως η μέθοδος παρασκευής, η επιφανειοδραστική ουσία, η περιεκτικότητα της χοληστερόλη. Ο χειρισμός, η αποθήκευση των επιφανειοδραστικών ουσιών και η προετοιμασία του νιοσώματος δεν απαιτούν ειδικές συνθήκες, ενώ απαιτούνται απλές μέθοδοι για την κατασκευή και την παραγωγή νιοσωμάτων μεγάλης κλίμακας. ^[31,32,33,34]

Αν και υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στη χρήση των νιοσωμάτων, η σταθερότητα του υδατικού εναιωρήματος των νιοσωμάτων θα μπορούσε να είναι πρόβλημα, καθώς το υδατικό μέσο μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση της λιπιδικής μεμβράνης. Κατά συνέπεια υπάρχει κίνδυνος της διαρροής της βιοδραστικής ουσίας από τα νιοσώματα και δημιουργίας συσσωματωμάτων. ^[31,32]

Γ.3. Σύνθεση νιοσωμάτων

Τα νιοσώματα μπορούν να παρασκευαστούν με διαφορετικές μεθόδους ανάλογα με το επιθυμητό μέγεθος του σωματιδίου, την κατανομή μεγέθους, τον αριθμό των διπλοστιβάδων και την απόδοση εγκλεισμού της υδατικής φάσης. Γενικά, τα νιοσώματα παράγονται με την ενυδάτωση ενός μείγματος της επιφανειοδραστικής ουσίας και του λιπιδίου σε υψηλή θερμοκρασία, συνήθως >60 °C. ^[35] Παρακάτω γίνεται αναφορά στις πιο βασικές μεθόδους

σύνθεσης νιοσωμάτων. Στην παρούσα εργασία η σύνθεση των νιοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη.

- Μέθοδος λεπτού φιλμ ενυδάτωσης

Η μέθοδος λεπτού φιλμ ενυδάτωσης (TFH) είναι μια απλή μέθοδος παρασκευής και χρησιμοποιείται ευρέως. Σε αυτή τη μέθοδο, τα επιφανειοδραστικά και η χοληστερόλη διαλύονται σε οργανικό διαλύτη σε φιάλη με στρογγυλό πάτο. Στη συνέχεια, σχηματίζεται λεπτό φιλμ στο εσωτερικό τοίχωμα της φιάλης αφαιρώντας τον οργανικό διαλύτη χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, καθώς ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται με την ελαττωμένη πίεση. Τέλος, προστίθεται ένα υδατικό διάλυμα του φαρμάκου σε νερό ή PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) και το ξηρό φιλμ ενυδατώνεται πάνω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης (T_c) του επιφανειοδραστικού. [32,35]

- Μέθοδος γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη

Η βάση της μεθόδου αυτής είναι η παρασκευή γαλακτωμάτων oil-in-water (o/w). Το λιπίδιο τήκεται υπό θέρμανση και διαλύεται σε μικρή ποσότητα ενός οργανικού, μη αναμειξιμού με το νερό, διαλύτη. Στην οργανική αυτή φάση προστίθεται ποσότητα διαλυμένης, σε όμοιο διαλύτη, φαρμακευτικής ουσίας. Στη συνέχεια η οργανική φάση διασπείρεται σε υδατικό διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα που έχει προηγουμένως θερμανθεί στην ίδια θερμοκρασία, υπό την εφαρμογή έντονης ανάδευσης. Ο οργανικός διαλύτης στη συνέχεια εξατμίζεται, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νιοσωμάτων διεσπαρμένων στην υδατική φάση. [35]

- Μέθοδος με υπερήχους

Σε αυτή τη μέθοδο, το διάλυμα του φαρμάκου προστίθεται στο μίγμα επιφανειοδραστικού/χοληστερόλης. Το μείγμα υποβάλλεται σε υπερήχους στους 60 °C μέσω συσκευής υπερήχων με ανιχνευτή τιτανίου για 3 λεπτά για να δώσει νιοσώματα. [34]

- Μέθοδος εξάτμισης αντίστροφης φάσης.

Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την ανάμειξη επιφανειοδραστικού και χοληστερόλης σε έναν οργανικό διαλύτη (οργανική φάση). Ξεχωριστά παρασκευάζεται ένα σύστημα φαρμάκου με βάση το νερό (υδατική φάση). Η υδατική φάση του φαρμάκου προστίθεται στην οργανική φάση και το μείγμα υποβάλλεται σε υπερήχους προκειμένου να σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα. Ακολουθεί

αργή απομάκρυνση της οργανικής φάσης χρησιμοποιώντας έναν περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους περίπου 40-60 °C. [31,32]

- Μέθοδος έγχυσης αιθέρα

Η μέθοδος αυτή βασίζεται ουσιαστικά στην αργή έγχυση μείγματος επιφανειοδραστικής ουσίας, χοληστερόλης και φαρμάκου διαλυμένα σε διαιθυλαιθέρα μέσω μιας βελόνας 14-gauge με ρυθμό περίπου 0,25 ml/min σε μια προθερμασμένη υδατική φάση που διατηρείται στους 60°C. [35]

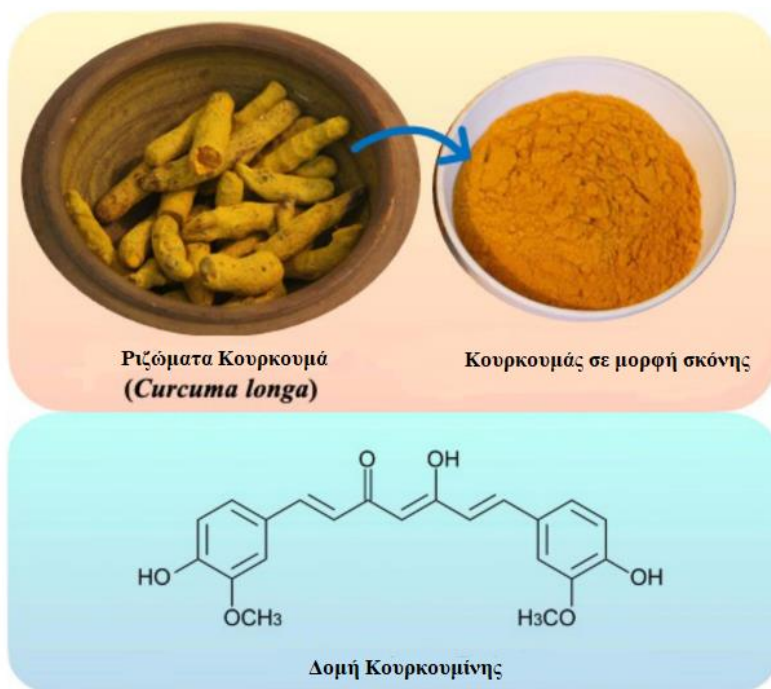
Γ.4. Εφαρμογές

Η στοχευμένη χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας νιοσώματα. Αυτή η στόχευση θα μπορούσε να είναι παθητική (απόθεση νιοσωμάτων εντός του όγκου λόγω των ειδικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων που δεν υπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα), φυσική (παροχή με βάση συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος όπως το pH ή τα μαγνητικά πεδία) ή ενεργού τύπου (ενεργητική πρόσληψη νιοσωμάτων από το καρκινικό κύτταρο). [31] Οι Lin et al. παρασκεύασαν νιοσώματα πολυαιθυλενογλυκόλης με γαμβογενικό οξύ και χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως φορέας αντικαρκινικής δράσης ενισχύοντας παράλληλα τη σταθερότητα του γαμβογενικού οξέος. [36] Οι Sharma et al. προετοίμασαν νιοσώματα για τη χορήγηση πολλαπλών φαρμάκων. Σε αυτή την εργασία, ενθυλακώθηκαν ταυτόχρονα κουρκουμίνη (υδρόφοβη) και η υδροχλωρική δοξορουβικίνη (υδρόφιλη) σε νιοσώματα για αντικαρκινική δράση με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί ενισχυμένη (συνεργική) κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών HeLa. [37] Παρομοίως οι Alemi et al. παρασκεύασαν κατιονικά νιοσώματα πολυαιθυλενογλυκόλης για τη συγχορήγηση κουρκουμίνης και πακλιταξέλης. Αυτά τα νιοσώματα ανέφεραν την ενισχυμένη συνεργική αντικαρκινική αποτελεσματικότητα. [38] Οι Bragagni et al. έδειξαν ότι τα νιοσωμικά σκευάσματα ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικά στη βελτίωση της χορήγησης αμινολεβουλινικού οξέος ALA στο δέρμα από το απλό υδατικό διάλυμα φαρμάκου που χρησιμοποιείται συνήθως στην κλινική πράξη. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο να θεωρηθούν αυτά τα αναπτυγμένα σκευάσματα δυνητικά χρήσιμα για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας αμινολεβουλινικού οξέος και της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας στη θεραπεία κακοηθειών του δέρματος με τοπική φωτοδυναμική θεραπεία. [39]

Δ. Κουρκουμίνη

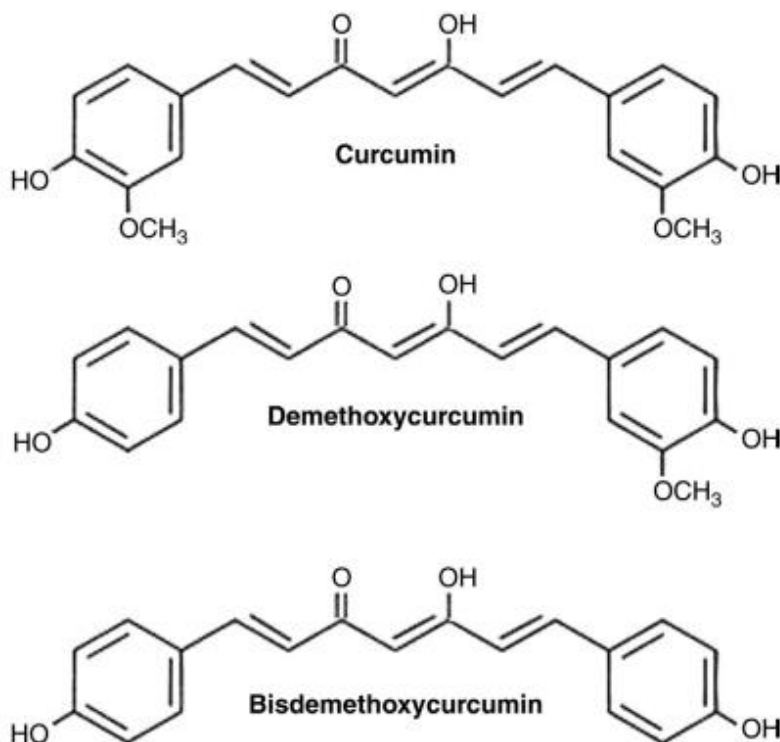
Δ.1. Γενικά

Η κουρκουμίνη αποτελεί μια φυσική λιποδιαλυτή πολυφαινολική ένωση, που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Curcuma longa* (κουρκουμάς) από τους Vogel και Pelletier το 1815. Προέρχεται από την Ινδία και καλλιεργείται επί του παρόντος στη Νοτιοανατολική Ασία, την Κίνα και τη Λατινική Αμερική.^[40] Το συγκεκριμένο φυτό ανήκει στην οικογένεια ginger (*Zingiberaceae*) και παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντισηπτικές ιδιότητες. Έτσι εκτός από ένα κοινό μπαχαρικό, η κουρκουμίνη έχει αξιοποιηθεί ανά τα χρόνια και για διάφορους ιατρικούς σκοπούς.^[42,43] Η κουρκουμίνη είναι μια πορτοκαλί – κίτρινη κρυσταλλική σκόνη σχετικά αδιάλυτη στο νερό, αλλά είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη, ακετόνη, αιθανόλη, ακετυλακετόνη, χλωροφόρμιο, οξικό οξύ, βενζόλιο, τολουόλιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) λόγω της υδρόφοβης φύσης της.^[44] Η IUPAC ονομασία της είναι 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6- heptadiene-3,5-dione με χημική δομή $C_{21}H_{20}O_6$, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 6, και μοριακό βάρος 368,38 Daltons. Το σημείο τήξης της είναι 183 °C.^[42,44]



Εικόνα Δ.1: Απεικόνιση της ρίζας *Curcuma longa*, της κουρκουμίνης σε μορφή σκόνης και της χημικής της δομής^[44]

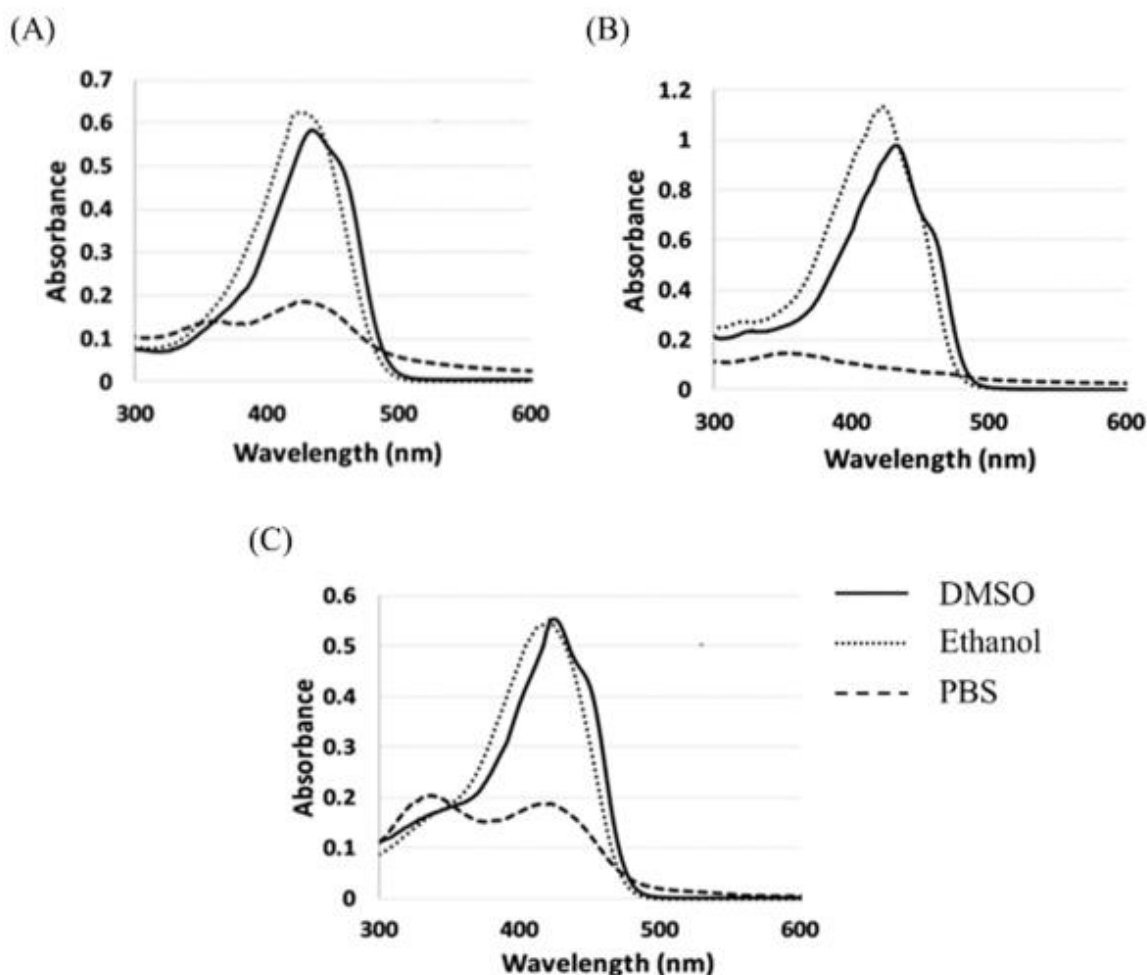
Ο φυσικός κουρκουμάς αποτελείται από τρία υδρόφοβα κουρκουμινοειδή: Curcumin (ή Curcumin I), demethoxycurcumin (ή Curcumin II), bisdemethoxycurcumin (ή Curcumin III) και cyclocurcumin (Εικόνα Δ.2). Η κουρκουμίνη που κυκλοφορεί στο εμπόριο περιέχει Curcumin I σε ποσοστό 77%, Curcumin II σε ποσοστό 17% και Curcumin III σε ποσοστό 3% περίπου. ^[46]



Εικόνα Δ.2: Χημικές δομές κουρκουμινοειδών ^[44]

Επιπλέον, ως φυσική φωτοχημική ουσία, η κουρκουμίνη έχει ευρεία κορυφή απορρόφησης (300–500 nm) και το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης ποικίλλει σε διαφορετικά συστήματα διαλυτών, κυμαίνεται από 408 nm (τετραχλωριούχος άνθρακας) έως 430 nm (διμεθυλοσουλφοξείδιο), όπως φαίνεται στην Εικόνα Δ.3. Το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης φθορισμού είναι 425 nm και το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής είναι 530 nm. Είναι ισχυρά φωτοτοξική και μπορεί να προκαλέσει ισχυρή φωτοτοξικότητα σε μικρογραμμομοριακές συγκεντρώσεις, γεγονός που αποτελεί τη βάση για την κουρκουμίνη να χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία. ^[42] Η κουρκουμίνη είναι πιο αποτελεσματική για τη θεραπεία «επιφανειακών» λοιμώξεων επειδή απορροφά στην περιοχή του μπλε, όπου το φως έχει μικρότερη

διείσδυση στους ιστούς συγκρινόμενο με την περιοχή του κόκκινου(θεραπευτικό παράθυρο), και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για βαθύτερες βλάβες. ^[21]



Εικόνα Δ.3: Καμπύλες απορρόφησης κουρκουμίνης σε διαφορετικούς διαλύτες ^[41]

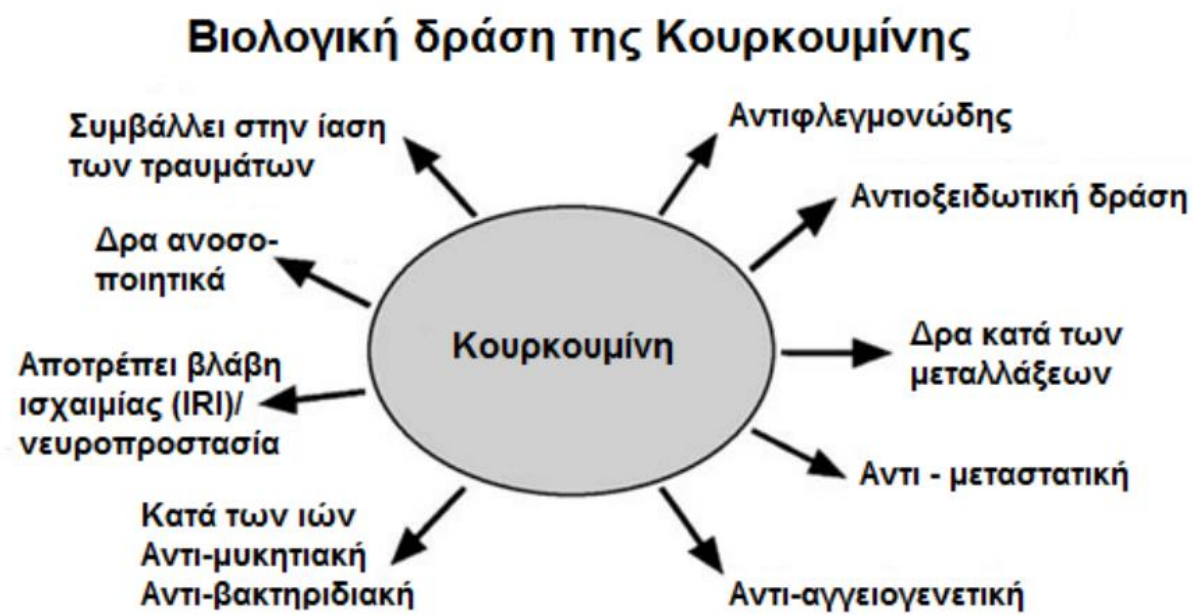
Δ.2. Εφαρμογές

Δ.2.1. Γενικά

Η αρχαία ινδική ιατρική γνωστή ως Αγιουρβέδα (Ayurveda) χρησιμοποιεί τον κουρκουμά για τη θεραπεία κοινών λοιμώξεων των ματιών, εγκαυμάτων, ακμής, επίδεσμων πληγών, διαστρέμματα και πρηξίματος. Ενώ στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική συχνά χρησιμοποιείται ο κουρκουμάς για τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με τον κοιλιακό πόνο. ^[42,46] Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του διαβήτη, του βήχα, της ιγμορίτιδας, της γρίπης, των

ρευματισμών και των ηπατικών διαταραχών. Είναι ευρέως αποδεκτό από την αρχαιότητα ότι αυτή η πολυφαινολική ένωση έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. ^[43,46,47]

Το 1985, οι Kuttan et al. έδειξαν πρώτοι την πιθανότητα η κουρκουμίνη να έχει αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Συνεχίζοντας τις μελέτες τους στράφηκαν προς τις αντιπολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές ικανότητες της κουρκουμίνης. ^[48] Οι εξελίξεις στη σύγχρονη ιατρική αποκάλυψαν πολλές άγνωστες φαρμακευτικές ιδιότητες του κουρκουμά που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντι-μεταλλαξιογόνες, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντικαρδιαγγειακές δραστηριότητες, στην Εικόνα Δ.4 γίνεται σχηματική απεικόνιση της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης. Επίσης έχουν μελετηθεί επιδράσεις της κουρκουμίνης όσον αφορά την αντιμετώπιση του ιού HIV, αλλά και διάφορων νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι το Πάρκινσον και η νόσος Αλτσχάιμερ. ^[46,47,49]



Εικόνα Δ.4: Σχηματική απεικόνιση της βιολογικής δράσης της κουρκουμίνης ^[50]

Δ.2.2. Φωτοδυναμική Θεραπεία

Σήμερα, μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι η κουρκουμίνη σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. ^[42] Το 2009 έγινε η πρώτη μελέτη από τους Dujic et al. που έδειξαν ότι η UVA ή η ακτινοβολία ορατού φωτός μπορεί να ενεργοποιήσει την αντικαρκινική δράση της

κουρκουμίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Απέδειξαν ότι η κουρκουμίνη σε συνδυασμό με φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να αναστείλει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων A431, που αφορούν το καρκίνο του δέρματος. ^[51] Το 2013, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ότι όταν η κουρκουμίνη επωάστηκε για 1 ώρα και εκτέθηκε στο ορατό φως παρουσίασε σημαντική ανασταλτική επίδραση στη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων G-361 και A375. Επιπλέον, σε σύγκριση με την υπεριώδη ακτινοβολία (UVA), το ορατό φως (VIS) έδειξε πιο αποτελεσματική ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, χωρίς να επηρεάζει την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, και το ποσοστό κυτταρικής απόπτωσης μπορεί να φτάσει περισσότερο από 90% με τον καλύτερο συνδυασμό. ^[52] Συγκριτικές μελέτες σχετικά με την αντικαρκινική φωτοδυναμική αποτελεσματικότητα της κουρκουμίνης και της υπερίκινης έδειξαν ότι, ως φωτοευαισθητοποιητής, η κουρκουμίνη είναι πιο κατάλληλη για τη θεραπεία του καρκίνου του δέρματος. ^[53] Μελετώντας τις επιδράσεις διαφορετικών μηκών κύματος ακτινοβολίας φωτός στην πρόσληψη φωτεινής ενέργειας και στοχευμένη διέγερση της κουρκουμίνης διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός κόκκινου φωτός (630 nm) και μπλε φωτός (405 nm) μπορεί να ενισχύσει αποτελεσματικά την αυτοφαγία των κυττάρων A375, αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. ^[54]

Ο κύριος περιορισμός της χρήσης κουρκουμίνης στην PDT είναι η κακή της υδατοδιαλυτότητα, η κακή της απορρόφηση και ο γρήγορος μεταβολισμός της που οδηγεί σε κακή βιοδιαθεσιμότητα. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση συστημάτων χορήγησης φαρμάκων που βασίζονται στη νανοτεχνολογία για τη βελτίωση της διαλυτότητας της κουρκουμίνης. ^[21,42] Για παράδειγμα, το 2012 οι Yallapu et al. σχεδίασαν νανοσωματίδια κυτταρίνης φορτωμένα με κουρκουμίνη για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, *in vitro*. Ο ίδιος έδειξαν ότι τα φορτωμένα με κουρκουμίνη νανοσωματίδια κυτταρίνης έδειξαν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την ελεύθερη κουρκουμίνη. ^[55] Ακόμη οι μελέτες των Fadeel et al. έδειξαν ότι η χρήση νανοφορέων λιπιδίων πολυαιθυλενογλυκόλης για την ενθυλάκωση της κουρκουμίνης οδήγησε σε βελτίωση της δράσης της ως φωτοευαισθητοποιητή. Συγκεκριμένα είδαν ότι η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων A431 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με την ελεύθερη κουρκουμίνη ήταν 41%, και μετά από θεραπεία με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη, η βιωσιμότητα των κυττάρων A431 μπορούσε να μειωθεί στο 7%, συνοδευόμενη από σημαντική αύξηση στα επίπεδα ROS, τα οποία κατέστρεψαν άμεσα τη μεμβράνη των

μιτοχονδριακών κυττάρων. Επιπλέον παρατήρησαν ότι η κουρκουμίνη σε νανοφορείς λιπιδίων πολυαιθυλενογλυκόλης μπορούσε να διεισδύσει σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος από ότι η ελεύθερη. ^[56] Οι Xu et al. παρατήρησαν ότι τα νιοσώματα κουρκουμίνης εμφάνισαν ενισχυμένη κυτταροτοξική δράση και αποπτωτικό ρυθμό έναντι των κυττάρων A2780 του καρκίνου των ωοθηκών σε σύγκριση με την ελεύθερη κουρκουμίνη. ^[57]

Ακόμη πιο πρόσφατα, το 2020, οι Akbari et al. εγκλείοντας την κουρκουμίνη σε νιοσώματα παρατήρησαν ότι η εγκλεισμένη κουρκουμίνη μπορούσε να διεισδύσει σε μεγαλύτερα βάθη στο δέρμα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νιοσώματα θα μπορούσαν να ενισχύσουν την θεραπευτική ιδιότητα της κουρκουμίνης μέσω βελτίωσης της παροχής του φαρμάκου στη θέση στόχο. ^[58] Την ίδια χρονιά οι Sahab-Negah et al. μελέτησαν επίσης την επίδραση του εγκλεισμού της κουρκουμίνης σε νιοσώματα και παρατήρησαν ότι η αντικαρκινική της δράση σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος ήταν ενισχυμένη σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη. ^[59]

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη σχετικά με την επίδραση της εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου δέρματος.

Πειραματικό Μέρος

Ε. Πειραματικός Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η βελτιστοποίηση της φωτοδυναμικής δράσης της κουρκουμίνης με τον εγκλεισμό της σε νανοσωματίδια νιοσωμάτων. Πιο συγκεκριμένα ώστε να ξεπεραστούν τα εμπόδια που προκύπτουν λόγω των εξαιρετικά λιπόφιλων ιδιοτήτων της κουρκουμίνης και της χαμηλής της διαλυτότητας στο νερό που οδηγούν σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα.

Αρχικά γίνεται η παρασκευή των νιοσωμάτων με την μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη και πραγματοποιείται ο χαρακτηρισμός τους. Έτσι γίνεται ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού και της απόδοσης διεργασίας. Το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό προσδιορίζονται με την μέθοδο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Ο δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιείται με υπέρυθη φασματοσκοπία (FT-IR). Στη συνέχεια γίνεται μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης και γίνεται η κινητική του μοντελοποίησης.

Ακολουθεί ο προσδιορισμός των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τόσο της ελεύθερης όσο και της εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης. Για το σκοπό αυτό γίνεται για τις δύο ουσίες φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε δύο συγκεντρώσεις για τρεις διαλύτες, φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε δύο συγκεντρώσεις για δύο διαλύτες, φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης με φθορισμό και μέτρηση της ικανότητας τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες μέσω φασματοσκοπικής μελέτης απορρόφησης.

Το τελευταίο στάδιο της έρευνας αφορά στην μελέτη της επίδρασης των δύο ουσιών στη καρκινική κυτταρική σειρά A431. Έτσι πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης των ουσιών στη βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία φωτός (drug only), μελέτη της επίδρασης φωτεινής ακτινοβολίας με διάφορες τιμές ισχύος στη βιωσιμότητα των κυττάρων (light only), μελέτη του χωρικού εντοπισμού των ουσιών στα καρκινικά κύτταρα και τελικά μελέτης της φωτοδυναμικής δράσης των ουσιών ως φωτοευαισθητοποιητές στα κύτταρα.

ΣΤ. Σύνθεση Νιοσωμάτων

ΣΤ.1. Αντιδραστήρια

Στην παρούσα παράγραφο, παρουσιάζονται στον Πίνακα ΣΤ.1 τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό, αλλά και τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων.

Αντιδραστήρια	Μοριακό βάρος (g/mol)
Κουρκουμίνη	368,385
Χοληστερόλη	386,65
Μονοστεατική σορβιτάνη, Span 60	430,62
Αιθανόλη 99.5%, EtOH	46,07
Απεσταγμένο νερό	18,02
Διβασικό φωσφορικό κάλιο K_2HPO_4	174,2
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4	136,086
Μονοστεατική σορβιτάνη πολυαιθυλενογλυκόλης, Tween 20	1227,54

Πίνακας ΣΤ.1: Αντιδραστήρια της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νιοσωμάτων

ΣΤ.2. Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό, αλλά και τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων, παρουσιάζονται στον Πίνακα ΣΤ.2.

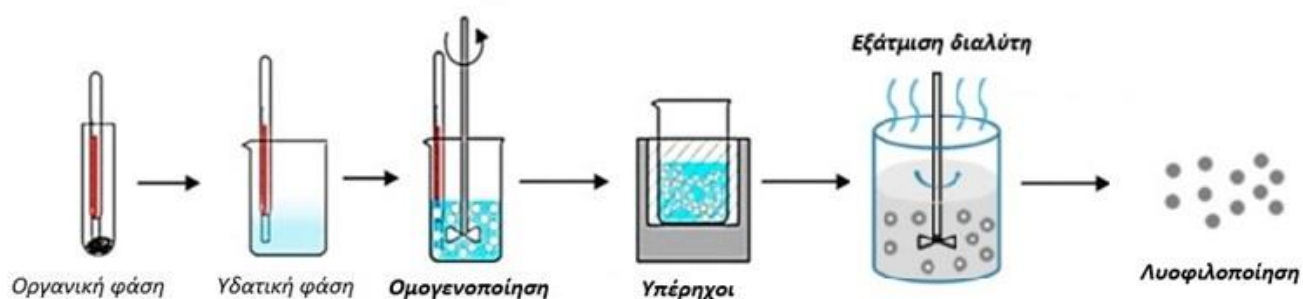
Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Συσκευή υπερήχων	Vibra Cell probe sonicator (400 W)	Sonics & Materials Inc. company
Συσκευή Shaker	Temperature Controlled Shaker	Gallenkamp
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	V-770 UV-VIS	Jasco
Φασματόμετρο NMR	600 MHz	Varian
Συσκευή DLS	Zetasizer Nano ZS	Malvern
Συσκευή λυοφιλοποίησης	Frozen In Time	Lablyo Mini
Φυγόκεντρος	Thermo Scientific	SORVALL LYNX 6000

Πίνακας ΣΤ.2: Όργανα και συσκευές της πειραματικής διαδικασίας παρασκευής νανοσωματιδίων

ΣΤ.3. Γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση του διαλύτη (emulsification and solvent evaporation technique)

Αρχικά ζυγίζονται σε γυάλινο φιαλίδιο 100 mg χοληστερόλης, 100 mg Span 60 (μονοστεατικής σορβιτάνης) και 10 mg κουρκουμίνης και διαλύονται σε 5 mL αιθανόλης στους 60 °C με τη βοήθεια υδατόλουτρου.

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 45 mL απεσταγμένου νερού και αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση σε θέρμανση μέχρι να φτάσουν τους 60 °C. Με τη σταθεροποίηση της υδατικής φάσης στους 60 °C γίνεται προσθήκη του διαλύματος στάγδην 1mL/min και αφήνεται για 1 hr υπό μαγνητική ανάδευση. Μετά το πέρας της ανάδευσης τοποθετείται σε επωαστήρα στους 37 °C στα 70 rpm για 24 hr. Την επόμενη μέρα πραγματοποιούνται υπερήχοι σε ένταση 72 W για διάστημα 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 5.000 rpm για 15 min στους 15 °C, όπου παραλαμβάνονται τα νανοσωματίδια ως το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης, το οποίο οδηγείται για λυοφιλοποίηση.



Εικόνα ΣΤ.1: Παρασκευή νιοσωμάτων με την μέθοδο γαλακτοματοποίησης και εξάτμιση διαλύτη

Η αναλογία 100 mg χοληστερόλης, 100 mg επιφανειοδραστικού παράγοντα και 10 mg κουρκουμίνης επιλέγεται ύστερα από εξέταση διαφόρων αναλογιών, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα ΣΤ.3.

Χοληστερόλη (mg)	Span 60 (mg)	Κουρκουμίνη (mg)
100	100	10
200	200	10
400	400	10
400	400	20

Πίνακας ΣΤ.3 : Αναλογίες παρασκευής νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη με την μέθοδο γαλακτοματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη.

Για την παρασκευή των νιοσωμάτων χωρίς κουρκουμίνη (blank) ακολουθείται η ίδια διαδικασία παραλείποντας όμως την προσθήκη της βιοδραστικής ένωσης.

ΣΤ.4. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάστηκαν διαλύματα κουρκουμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων 0,0063, 0,00504, 0,00378, 0,00252 και 0,00126 mg/ml και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή τους σε μήκος κύματος $\lambda_{max} = \text{nm}$.

ΣΤ.5. Απόδοση Διεργασίας Εγκλεισμού

Η απόδοση διεργασίας εγκλεισμού υπολογίζεται από την ολική ποσότητα των νανοσωματιδίων που συλλέγονται ύστερα από την λυοφιλοποίηση ως προς τις ποσότητες του φορέα, της ένωσης και των επιφανειοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται αρχικά, σύμφωνα με την εξίσωση (1):

$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{μάζα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκαν (mg)}}{\text{αρχική μάζα χοληστερόλης, μονοστεατικής σορβιτάνης, κουρκουμίνης (mg)}} \cdot 100\% \quad (1)$$

ΣΤ.6. Απόδοση Εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ένωσης που εγκλείστηκε στα νιοσώματα, χρησιμοποιείται η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Πραγματοποιείται φυγοκέντριση της υδατικής διασποράς των νιοσωμάτων στα 5.000 rpm για 15 min στους 15 °C. Το ίζημα της φυγοκέντρισης, το οποίο αποτελεί την ένωση που δεν εγκλείστηκε, διαλύεται σε αιθανόλη, φιλτράρεται με φίλτρο των 0.22 μm και στη συνέχεια λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200 – 500 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία με φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ώστε να προκύπτει απορρόφηση κάτω του 1.

Από την τιμή της απορρόφησης που προκύπτει, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα της ένωσης που δεν εγκλείστηκε, και μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης, προσδιορίζεται τελικά η ποσότητα της ένωσης που εγκλείστηκε στα νανοσωματίδια με βάση την εξίσωση (2):

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού} = 1 - \frac{\text{μάζα ουσίας που δεν εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ένωσης (mg)}} \cdot 100\% \quad (2)$$

ΣΤ.7. Απόδοση Διεργασίας

Ο υπολογισμός της απόδοσης της διεργασίας εγκλεισμού γίνεται από την ολική ποσότητα των νανοσωματιδίων που συλλέγονται ύστερα από την λυοφιλοποίηση ως προς τις ποσότητες του

φορέα, της ένωσης και των επιφανειοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, σύμφωνα με την εξίσωση (3):

$$\text{Απόδοση Διεργασίας} = \frac{\text{μάζα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκαν (mg)}}{\text{αρχική μάζα TM+DHC / DAPH +PC+Tween 80 (mg)}} \cdot 100\% \quad (3)$$

ΣΤ.8. Ποσοστό φορτίου κουρκουμίνης στα νιοσώματα (Drug Loading)

Αρχικά πραγματοποιείται ο θεωρητικός υπολογισμός της φόρτωσης της κουρκουμίνης στα νιοσώματα για την εκάστοτε αναλογία σύμφωνα με την εξίσωση (4):

$$\text{Φορτίο Φαρμάκου} = \frac{\text{αρχική μάζα κουρκουμίνης προς εγκλεισμό (mg)}}{\text{αρχική μάζα χοληστερόλης, μονοστεατικής σορβιτάνης, κουρκουμίνης (mg)}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ο πειραματικός υπολογισμός της φόρτωσης της κουρκουμίνης στα νιοσώματα για την εκάστοτε αναλογία με βάση την απόδοση εγκλεισμού σύμφωνα με την εξίσωση (5):

$$\text{Φορτίο Φαρμάκου} = \frac{\text{μάζα κουρκουμίνης που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{τελική μάζα νιοσωμάτων που λήφθηκε μετά από την λυοφιλοποίηση (mg)}} \cdot 100\% \quad (5)$$

ΣΤ.9. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς το μέγεθος, τον δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) με χρήση του οργάνου Zetasizer Nano ZS.

Προκειμένου να γίνει η μέτρηση κάθε δείγματος, λαμβάνονται 20 μL από την προκύπτουσα από την φυγοκέντρηση διασπορά των νανοσωματιδίων και αραιώνονται σε 20 mL απεσταγμένο νερό. Η αραιωμένη διασπορά οδηγείται προς ανάδευση για 2 λεπτά σε αναδευτήρα τύπου Vortex, προκειμένου να επιτευχθεί καλή διασπορά των νανοσωματιδίων. Οι υδατικές διασπορές εισάγονται σε τριχοειδείς κυψελίδες τύπου U (DTS 1070, Malvern, UK) και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$. Οι τιμές για το κάθε μέγεθος προκύπτουν ως ο μέσος όρος τριών τιμών..

ΣΤ.10. Μελέτη απελευθέρωσης των βιοδραστικών ενώσεων από τα νανοσωματίδια

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων K_2HPO_4 και KH_2PO_4 στο οποίο πραγματοποιείται και η μελέτη απελευθέρωσης. Για το σκοπό αυτό ζυγίζονται

4,14 g KH_2PO_4 τα οποία διαλύονται σε 300 mL απεσταγμένου νερού και 6,96 g K_2HPO_4 τα οποία διαλύονται σε 400 mL απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH σε τιμή 7,4 προσθέτοντας το διάλυμα KH_2PO_4 στάγδην στο διάλυμα K_2HPO_4 με τη βοήθεια πεχάμετρου. Επιπλέον είναι επιθυμητό το ρυθμιστικό διάλυμα να περιέχει 1% w/v Tween 80, οπότε για 150 mL ρυθμιστικού διαλύματος ζυγίζεται 1,5 g Tween 80.

Σε ποτήρι ζέσως των 200 mL προστίθενται 120 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 7.4 (1% w/v tween 80) και αφήνονται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 37 °C μέχρι να σταθεροποιηθεί το διάλυμα. Η υδατική διασπορά των νιοσωμάτων τοποθετείται σε μεμβράνη διάλυσης και εμβαπτίζεται στο σταθεροποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα των 2 mL από το ρυθμιστικό ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα οποία φιλτράρονται με φίλτρο των 0,22 μm και λαμβάνεται φάσμα απορρόφησης σε εύρος 200 – 500 nm με χρήση κυψελίδας χαλαζία σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Τα δείγματα λαμβάνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές: 30 min, 1 hr, 2hr, 3 hr, 4hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr και 96 hr. Σημειώνεται ότι κάθε φορά που λαμβάνεται δείγμα των 2 mL γίνεται συμπλήρωση στο ποτήρι με 2 mL του ρυθμιστικού διαλύματος.

Τελικά η μελέτη της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας γίνεται με την αξιοποίηση μαθηματικών μοντέλων. Τα μοντέλα χρησιμοποιούνται κυρίως για την ποσοτικοποίηση και την πρόβλεψη της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας συναρτήσει του χρόνου, ενώ καθιστούν δυνατή τη μέτρηση κάποιων σημαντικών φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως του συντελεστή διάχυσης της δραστικής ουσίας, μέσω των οποίων γίνεται εφικτή η πρόβλεψη του προφίλ απελευθέρωσης. Τα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης με ευρεία εφαρμογή που περιγράφουν καλύτερα τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την απελευθέρωση της δραστικής ένωσης είναι: ^[60]

Μοντέλο μηδενικής τάξης (Zero order)

Η κινητική πρώτης τάξης περιγράφει συστήματα όπου η διεργασία πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ουσίας. Η εξίσωση (6) για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης είναι:

$$C_t = C_0 + k_0 t \quad (6)$$

Όπου C_0 : η αρχική ποσότητα του δραστικής ουσίας στο διάλυμα, C_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t , k_0 : η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης, t : χρόνος σε h

Μοντέλο πρώτης τάξης (First order)

Η κινητική πρώτης τάξης χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απορρόφηση και την απέκκριση διαφόρων θεραπευτικών παραγόντων, και αφορά συστήματα όπου ο ρυθμός απελευθέρωσης εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας. Η εξίσωση (7) για το κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης είναι:

$$\text{Log}Q_t = \text{Log}Q_0 + kt/2.303 \quad (7)$$

Όπου Q_0 : η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα, Q_t : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t , k : η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης, t : χρόνος σε h

Μοντέλο Higuchi

Η εξίσωση Higuchi περιγράφει την απελευθέρωση του φαρμάκου με διάχυση βασιζόμενη στον 1^ο νόμο του Fick, μέσω γραμμικής συσχέτισης της συγκέντρωσης της ουσίας με την τετραγωνική ρίζα του χρόνου. Η εξίσωση (8) για το κινητικό μοντέλο Higuchi είναι:

$$Q = k_H t^{1/2} \quad \text{ή} \quad M_t/M_0 = kt^{1/2} \quad (8)$$

Όπου Q : η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαλύεται στο χρόνο t , k_H : σταθερά Higuchi, t : χρόνος σε h

Μοντέλο Korsmeyer – Peppas

Το μοντέλο Korsmeyer – Peppas είναι ένα ημι-εμπειρικό μοντέλο που περιγράφει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα με βάση την εκθετική σχέση της απελευθέρωσης και του χρόνου. Η εξίσωση Korsmeyer-Peppas (9) είναι:

$$F = (M_t/M) = k_m t^n \quad (9)$$

Όπου F : Κλάσμα της ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t , M_t : Ποσότητα της ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t , M : Συνολική ποσότητα της ουσίας σε δοσολογική μορφή ή στην ισορροπία, k_m : Κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος, t : χρόνος σε h, n : Εκθέτης διάχυσης ή απελευθέρωσης

Αυτή η εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης.

Η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του εκθέτη διάχυσης που αντιστοιχούν για κάθε μηχανισμό απελευθέρωσης.

Εκθέτης διάχυσης (n)	Μηχανισμός απελευθέρωσης
$n \leq 0.5$	Fickian διάχυση
$0.5 < n < 1$	Μη Fickian διάχυση/ Ανώμαλη μεταφορά
$n > 1$	Μη Fickian διάχυση – Case II

Πίνακας ΣΤ. 4: Τιμές εκθέτη κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas

Για $n \leq 0.5$ (Fickian model) κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης και η κινητική τέτοιων συστημάτων χαρακτηρίζεται από τον ρυθμό διάχυσης.

Για $0.5 < n < 1$ (μη Fickian ή ανώμαλη μεταφορά) τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.

Για $n > 1$ (μη Fickian - Case II) ο ρυθμός απελευθέρωσης αντιστοιχεί σε κινητική μηδενικής τάξης και τα φαινόμενα που κυριαρχούν είναι η διόγκωση ή η χαλάρωση.

ΣΤ.11. Φασματομετρία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

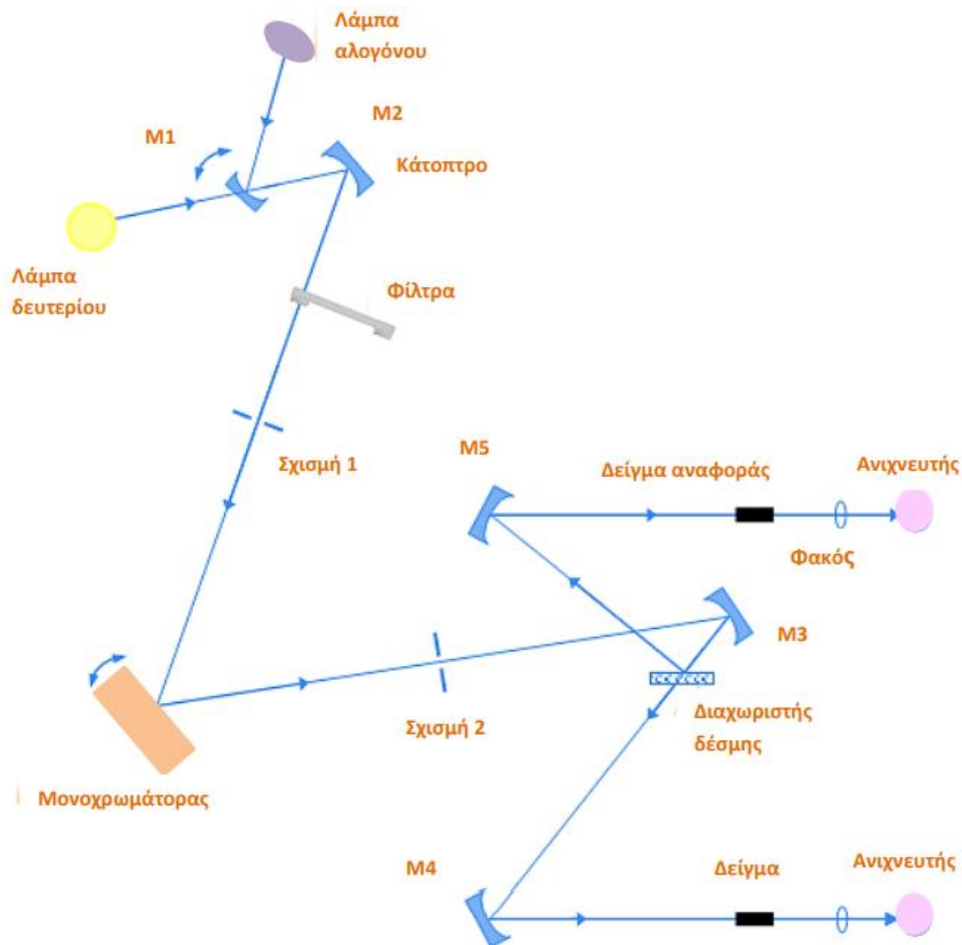
Η διάταξη που χρησιμοποιείται είναι η FT-IR 4200 Jasco του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας. Η υπό μελέτη ένωση αναμειγνύεται με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία περίπου 1:100 για την παρασκευή δείγματος με την μορφή δισκίου (παλέτας). Στη συνέχεια λαμβάνεται φάσμα κυματιθμών (cm^{-1}) μεταξύ 4000 cm^{-1} και 400 cm^{-1} συναρτήσει της αλληλεπίδρασης της ένωσης με την υπέρυθη ακτινοβολία, το οποίο χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό των ενώσεων, τον έλεγχο της καθαρότητάς τους και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ένωσης εγκλεισμού και του χρησιμοποιούμενου νανοφορέα.

Z. Φωτοφυσικές Μελέτες

Z.1. Φασματοφωτομετρική διάταξη απορρόφησης

Για την μελέτη της απορρόφησης τόσο της ελεύθερης όσο και της εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35 UV/VIS Spectrometer της Perkin Elmer. Το Lambda 35 λειτουργεί στην υπεριώδη (UV) και ορατή (VIS) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και διαθέτει σύστημα ολικής ανάκλασης διπλής δέσμης. Παρακάτω, στην Εικόνα ΣΤ.1, παρουσιάζεται διαγραμματικά η λειτουργία της διάταξης του συγκεκριμένου οργάνου.

Το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο αποτελείται από δύο φωτεινές πηγές: μία λυχνία δευτερίου η οποία εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή (200 – 400 nm) και μία λυχνία αλογόνου, η οποία εκπέμπει στην ορατή και κοντινή υπέρυθη περιοχή (350 – 900 nm). Για τη λειτουργία στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, εκπέμπεται ακτινοβολία από την λυχνία δευτερίου και το κάτοπτρο M1 ανασηκώνεται για την διέλευση της ακτινοβολίας προς το κάτοπτρο M2. Ενώ, για τη λειτουργία στην ορατή περιοχή, το κάτοπτρο M1 ανακλά την ακτινοβολία από τη λυχνία αλογόνου προς το κάτοπτρο M2. Η ακτινοβολία της πηγής που ανακλάται από το κάτοπτρο M2 οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρων, ο οποίος βρίσκεται σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτορα με τη βοήθεια ενός βηματικού κινητήρα. Ανάλογα με την περιοχή του μήκους κύματος, ο τροχός αυτός περιστρέφεται, ώστε να παρεμβληθεί στην πορεία της δέσμης το κατάλληλο φίλτρο που θα φιλτράρει τη δέσμη πριν αυτή εισέλθει στο μονοχρωμάτορα. Στη συνέχεια, η δέσμη περνάει στο μονοχρωμάτορα μέσω της σχισμής εισόδου του. Η δέσμη φωτός θα περάσει από τη σχισμή εξόδου και θα προσπέσει σε ένα νέο κάτοπτρο M3 που θα την οδηγήσει σε ένα διαχωριστή δέσμης. Το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται από το διαχωριστή δέσμης και οδηγείται προς το κάτοπτρο M4, ενώ το υπόλοιπο 50% περνά προς το κάτοπτρο M5. Η δέσμη αυτή οδηγείται προς το δείγμα αναφοράς και εν συνεχεία στη φωτοδίοδο μέσω φακού εστίασης. Ομοίως, η δέσμη του κατόπτρου M4 οδηγείται στο δείγμα προς εξέταση και εν συνεχεία στη φωτοδίοδο μέσω φακών. Τα δύο δείγματα βρίσκονται σε όμοιες κυβέττες και τοποθετούνται στις υποδοχές του οργάνου.



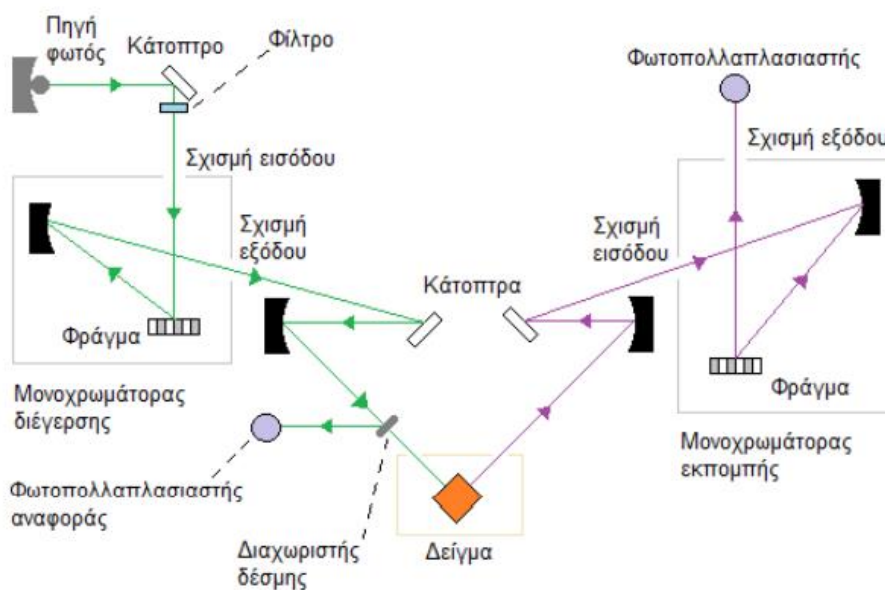
Εικόνα Z.1: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του Lambda 35 UV/VIS Spectrometer

Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου απορρόφησης που περιγράφηκε, γίνεται μέσω υπολογιστή και με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου UV WinLab. Μέσω αυτού μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης και οι παρακάτω διαδικασίες:

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

Z.2. Φασματοσκοπική διάταξη φθορισμού

Κατά την πειραματική διαδικασία έγινε επίσης η λήψη φασμάτων φθορισμού των δειγμάτων με τη χρήση του οργάνου Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer. Η μέτρηση του φθορισμού μπορεί να συμβεί είτε με συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος ή ένα υποσύνολο των μηκών κύματος του οργάνου είτε για συγκεκριμένο μήκος κύματος. Παρακάτω, στην Εικόνα Z.2, παρουσιάζεται διαγραμματικά η λειτουργία της διάταξης του συγκεκριμένου οργάνου.



Εικόνα Z.2: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του Perkin-Elmer LS 45

Ως πηγή φωτός το συγκεκριμένο όργανο έχει μια λυχνία ξένου με παλμούς μικρής χρονικής διάρκειας και μεγάλης έντασης. Η ακτινοβολία της πηγής αυτής εστιάζεται από το ελλειψοειδές κάτοπτρο και ανακλάται από το τοροειδές κάτοπτρο οδηγούμενη έτσι στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης. Ο μονοχρωμάτορας περιλαμβάνει μια σχισμή εισόδου, το φράγμα περίθλασης των 1440 γραμμών/mm, ένα σφαιρικό κάτοπτρο και τη σχισμή εξόδου. Έτσι από την σχισμή εξόδου εξέρχεται το μονοχρωματικό φως με κεντρικό μήκος κύματος που καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης με τη γωνία του να ελέγχεται από βηματικό κινητήρα. Στην συνέχεια η μονοχρωματική δέσμη διέγερσης, με χρήση κατόπτρου, προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμη με τη βοήθεια του οποίου ένα μέρος μεταφέρεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς και το υπόλοιπο στο δείγμα. Προκειμένου να διορθώνεται η απόκλιση στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, είναι αποθηκευμένη στο όργανο καμπύλη

αναφοράς ροδαμίνης, η οποία διατηρεί σχεδόν σταθερή την κβαντική της απόδοση για απορρόφηση σε μήκος κύματος 230nm – 630nm και εκπομπή στα 650 nm. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα, σε γωνία 90° ως προς τη δέσμη διέγερσης, εστιάζεται από το κάτοπτρο στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής. Ο μονοχρωμάτορας εκπομπής αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα σφαιρικό κάτοπτρο, ένα φράγμα περίθλασης 1200 γραμμών/mm και τη σχισμή εξόδου. Η στενή φασματική περιοχή που εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, το κεντρικό μήκος κύματος της οποίας καθορίζεται από τη θέση σάρωσης του φράγματος περίθλασης, συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή για περαιτέρω ανάλυση.

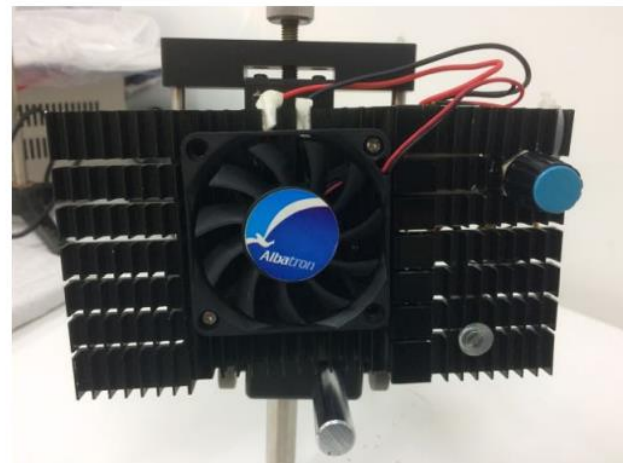
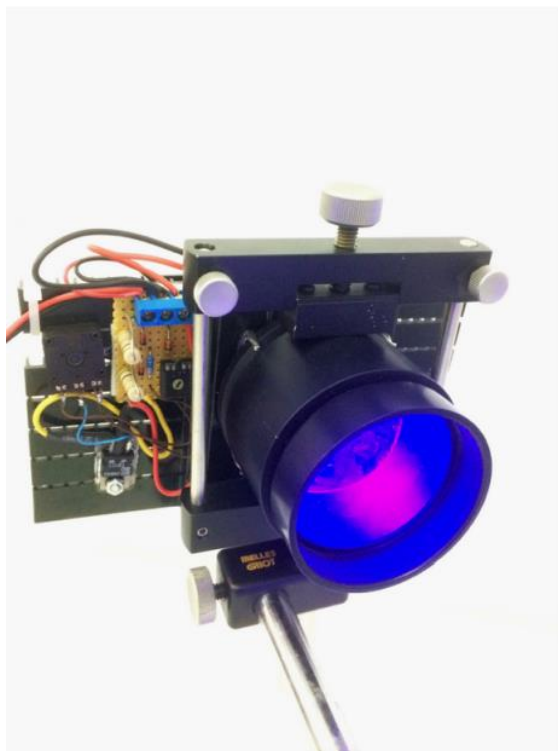
Ο έλεγχος του φασματοφωτόμετρου φθορισμού που περιγράφηκε, γίνεται μέσω υπολογιστή και με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου FL WinLab. Μέσω αυτού μπορούν να ρυθμίζονται οι παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης και οι παρακάτω διαδικασίες:

- Η επιλογή των μηκών κύματος, της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής για κάθε μονοχρωμάτορα.
- Η επιλογή του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος
- Ο μηδενισμός του σήματος που οφείλεται στο διαλύτη και το θόρυβο του φασματοφωτόμετρου, μέσω της κατάλληλης αφαίρεσης φάσματος φθορισμού της εν λόγω ουσίας
- Η επεξεργασία των φασμάτων που προκύπτουν από τις μετρήσεις

2.3. Διάταξη ακτινοβόλησης

Η διάταξη ακτινοβόλησης που περιγράφεται χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή πειραμάτων που αφορούν στην φωτολεύκανση αλλά και στην ικανότητα παραγωγή ελεύθερων ριζών τόσο της ελεύθερης κουρκουμίνης όσο και της εγκλεισμένης. Έπειτα αξιοποιήθηκε και στα πειράματα με τις κυτταροκαλλιέργειες για την βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με την ισχύ της ακτινοβολίας στα κύτταρα της σειράς A431 χωρίς την παρουσία ουσίας και με την εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας πάλι για ελεύθερη και εγκλεισμένη κουρκουμίνη.

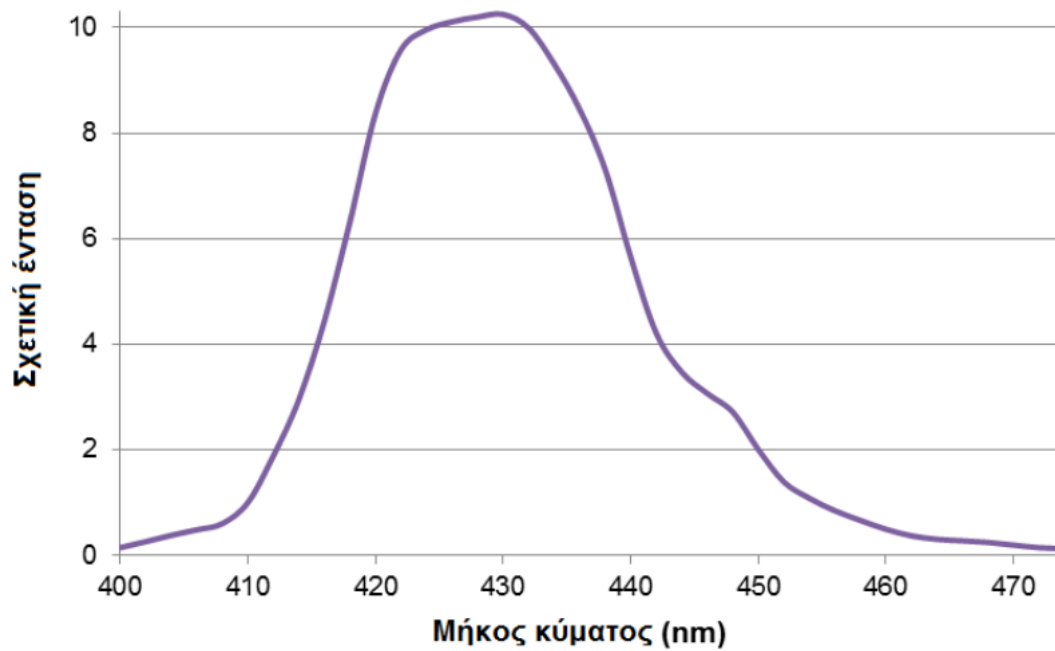
Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τα πείραμα δημιουργήθηκε στο εργαστήριο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών. Η διάταξη αυτή περιλαμβάνει μια πηγή φωτός, σωλήνα για τη συγκέντρωση της ακτινοβολίας στο εκάστοτε δείγμα, ποτενσιόμετρο που είναι αναγκαίο για τη ρύθμιση της έντασης ακτινοβολίας μέσω της αυξομείωσης της ισχύος αλλά και βάση ψύξης με ενσωματωμένο ανεμιστήρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα Z.3. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε το Bridgelux Power LED 10W η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα Z.4 και τα τεχνικά της χαρακτηριστικά στον Πίνακα Z.1.



Εικόνα Z.3: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης ακτινοβολίας

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν απαραίτητο πρώτα να μετρηθεί η ένταση της ακτινοβολίας της διάταξης ως προς το μήκος κύματος. Για τη μέτρηση έγινε χρήση της πηγής, ενός μονοχρωμάτορα, μιας αντίστασης και ενός πολυμέτρου. Μέσω του μονοχρωμάτορα, η προσπίπτουσα από την πηγή στην είσοδο του ακτινοβολία αναλύεται και στην έξοδό του επιλέγεται μια καθορισμένη στενή φασματική περιοχή. Στη συνέχεια αναπτύσσεται τάση στην αντίσταση από την εξερχόμενη μονοχρωματική ακτινοβολία και με τη βοήθεια του πολυμέτρου μετριέται η τάση αυτή η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ακτινοβολίας. Τα φάσμα της

σχετικής έντασης της ακτινοβολίας της πηγής σε σχέση με το μήκος κύματος φαίνεται στο Διάγραμμα Z.1.



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



Εικόνα Z.4: Φωτογραφική απεικόνιση της Bridgelux Power LED 10W

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

Πίνακας Ζ.1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της Bridgelux Power LED 10W

Ζ.4. Πειραματική Διαδικασία

Ζ.4.1. Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες

Η κουρκουμίνη και τα νιοσώματα με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη βρίσκονται σε μορφή σκόνης και διαλύονται σε DMSO, PBS και EtOH για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης. Αρχικά προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα και αραιώθηκε μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση.

Για το σκοπό αυτό ζυγίστηκαν 2,6 mg κουρκουμίνης. Με βάση τους υπολογισμούς που φαίνονται παρακάτω, γνωρίζοντας ότι το μοριακό της βάρος είναι 368,385 g/mol για τελικό όγκο 1,5 ml, προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα κουρκουμίνης σε DMSO με συγκέντρωση 4,67 mM.

$$n = \frac{m}{MW} = \frac{2,6 \text{ mg}}{368,385 \text{ g/mol}}$$

$$= 7 \cdot 10^{-6} \text{ moles κουρκουμίνης περιέχονται στο } 1,5 \text{ ml DMSO}$$

Με την μέθοδο των τριών για 1000 ml η συγκέντρωση θα είναι $C = 7 \cdot 10^{-6} \cdot 1000/1,5$

$$= 4,67 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Τα φάσματα απορρόφησης τελικά λήφθηκαν για συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ η οποία προέκυψε μετά από την αραιώση του μητρικού διαλύματος σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 4,67 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot V_1 = 2 \cdot 10^{-5} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1$$

$$= 12,8 \mu\text{l} \text{ από το μητρικό διάλυμα προστέθηκαν σε } 2987,2 \mu\text{l} \text{ του κάθε διαλύτη}$$

Για την μελέτη της απορρόφησης της εγκλεισμένης κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε ξηρό δείγμα νιοσωμάτων με απόδοση εγκλεισμού 48,44 %. Συνεπώς από τα 10 mg κουρκουμίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση εγκλείστηκαν τα 4,844 mg. Από το αρχικό ξηρό δείγμα των 161,2 mg ζυγίστηκαν τα 84,4 mg με αποτέλεσμα να περιέχονται 2,57 mg κουρκουμίνης με σκοπό

να προετοιμαστεί ίδιο μητρικό με αυτό της ελεύθερης κουρκουμίνης. Ωστόσο η διάλυση των νιοσωμάτων στο DMSO αποτέλεσε μια δύσκολη διαδικασία και ύστερα από μια σειρά αραιώσεων το τελικό μητρικό διάλυμα είχε συγκέντρωση $4,45 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Στη συνέχεια για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης πραγματοποιήθηκε επιπλέον αρραίωση μέχρι τα $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ομοίως με την ελεύθερη κουρκουμίνη σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 4,45 \cdot 10^{-4} \text{ M} \cdot V_1 = 2 \cdot 10^{-5} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 = 135 \mu\text{l}$$

από το μητρικό διάλυμα προστέθηκαν σε 2865 μl του κάθε διαλύτη

Δείγμα Κουρκουμίνης	Διαλύτης	Συγκέντρωση (M)
Ελεύθερη	DMSO	$2 \cdot 10^{-5}$
	EtOH	
	PBS	
Εγκλεισμένη σε νιοσώματα	DMSO	$2 \cdot 10^{-5}$
	EtOH	
	PBS	

Πίνακα Ζ.2: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης

Αρχικά φτιάχνονται τα 3 διαλύματα, χρησιμοποιώντας DMSO, αιθανόλη (EtOH) και PBS ως διαλύτες, με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Τα διαλύματα των 3ml εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου απορρόφησης με χωρητικότητα 4,5ml. Πριν την μέτρηση των δειγμάτων πρέπει να γίνει ο μηδενισμός του σήματος, ούτως ώστε να αποφευχθούν σφάλματα λόγω θορύβου του οργάνου και λόγω της απορρόφησης του κάθε διαλύτη. Έτσι, εισάγεται στο όργανο ένα ζεύγος κυβεττών οι οποίες περιέχουν 3ml του κάθε διαλύτη και επιλέγεται η επιλογή Autozero. Στην συνέχεια, στη θέση για το δείγμα τοποθετούνται κάθε φορά τα διαλύματα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Η σάρωση των φασμάτων γίνεται στο εύρος 300 – 700 nm, δηλαδή στην υπεριώδη και στην ορατή περιοχή.

ΣΤ.4.2.Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες

Στο σημείο αυτό έγινε μελέτη του φάσματος φθορισμού της κουρκουμίνης ελεύθερης και εγκλεισμένης για τους διαλύτες DMSO και PBS σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις για τον καθένα. Έτσι από τα μητρικά διαλύματα που φτιάχτηκαν και περιεγράφηκαν προηγουμένως κατασκευάστηκαν διαλύματα με DMSO των $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ και 10^{-7} M και με PBS των 10^{-6} M και $5 \cdot$

10^{-7} M. Τα διαλύματα των 3ml εισάγονται σε κυβέττες φασματοφωτόμετρου φθορισμού με χωρητικότητα 4,5ml.

Πραγματοποιείται και σε αυτήν την περίπτωση μηδενισμός του οργάνου πριν την λήψη των φασμάτων φθορισμού για την αποφυγή σφαλμάτων θορύβου του οργάνου και της αφαίρεσης του φθορισμού του κάθε διαλύτη. Έτσι, εισάγεται στο φασματοφωτόμετρο φθορισμού μια κυβέττα η οποία περιέχει 3ml DMSO, ομοίως για το διαλύτη PBS. Τα αρχεία αυτά αποθηκεύονται και αφαιρούνται κάθε φορά από το εκάστοτε φάσμα φθορισμού που λαμβάνεται. Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα δείγματα προς μελέτη στο όργανο με τη διέγερση να ορίζεται στο μέγιστο της απορρόφησης που μετρήθηκε προηγουμένως για το κάθε δείγμα και τη σάρωση να πραγματοποιείται στο εύρος 450 – 700 nm.

Δείγμα Κουρκουμίνης	Διαλύτης	Συγκέντρωση (M)	λ_{exc} (nm)
Ελεύθερη	DMSO	$5 \cdot 10^{-7}$	437
		10^{-7}	
	PBS	10^{-6}	429
		$5 \cdot 10^{-7}$	
Εγκλεισμένη σε νιοσώματα	DMSO	$5 \cdot 10^{-7}$	437
		10^{-7}	
	PBS	10^{-6}	429
		$5 \cdot 10^{-7}$	

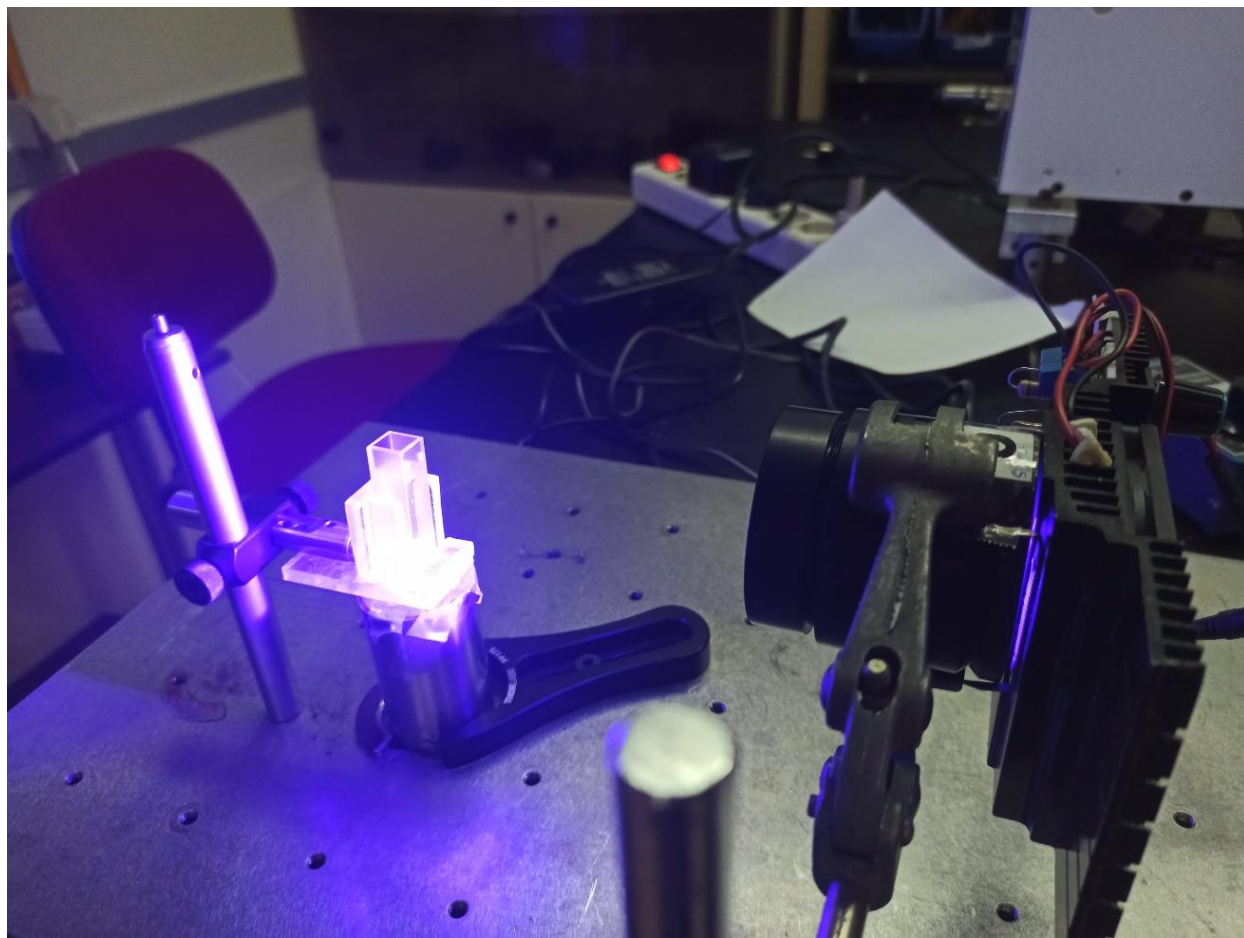
Πίνακα Ζ.3: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού

ΣΤ.4.3. Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο μέτρησης φθορισμού ^[41,43]

Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη της φωτολεύκανσης αρχικά είναι απαραίτητη ακτινοβόληση των δειγμάτων με την πηγή που αναλύθηκε παραπάνω. Η διάταξη της ακτινοβόλησης του δείγματος φαίνεται στην Εικόνα Ζ.5.

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης από τα αρχικά μητρικά με αραιώση σε συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M με διαλύτη DMSO σε τελικό όγκο 3 mL στη κυβέττα. Στην συνέχεια αυτή τοποθετείται στην ειδική υποδοχή, όπως φαίνεται στην Εικόνα Ζ.5, μαζί με ένα μαγνήτη, ο οποίος ενεργοποιείται από τον μαγνητικό αναδευτήρα που προσδένεται στη ειδική βάση της κυβέττας, ώστε να γίνεται συνεχή ανάδευση του δείγματος κατά την ακτινοβόληση. Η απόσταση της κυβέττας από την πηγή πρέπει να είναι τέτοια ώστε να γίνεται

ομοιόμορφη ακτινοβολήση σε όλο το δείγμα. Στην συνέχεια λαμβάνονται τα φάσματα φθορισμού ανά 1 min ακτινοβολήσης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min στο εύρος 450 - 700 nm. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν 12,55 mW/cm² για την ελεύθερη κουρκουμίνη και 13 mW/cm² για την εγκλεισμένη. Η διέγερση έγινε στον μέγιστο της απορρόφησης τους για τον διαλύτη DMSO, δηλαδή στα 437 nm.



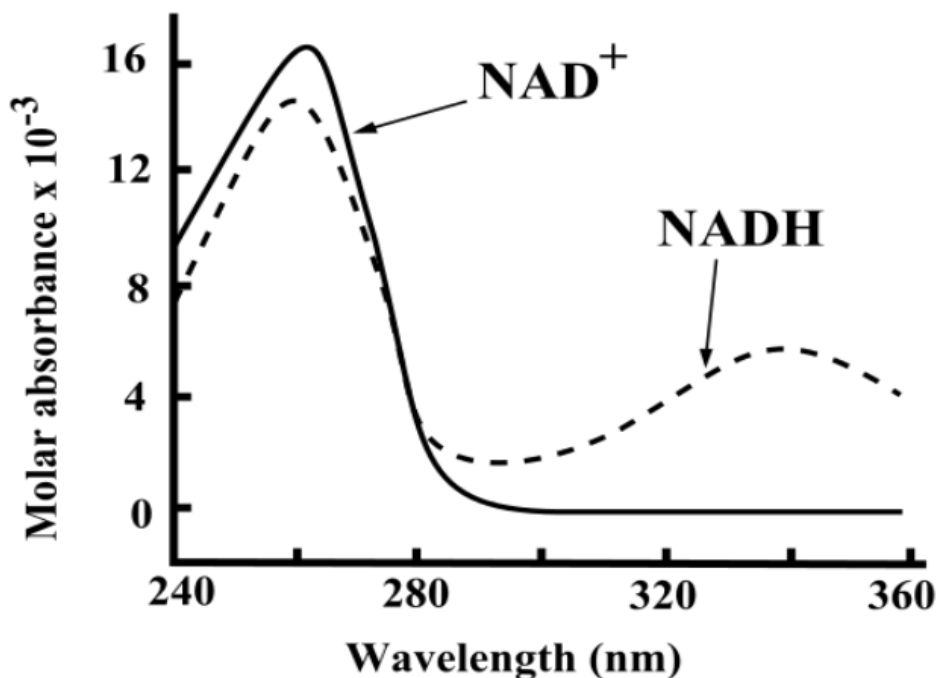
Εικόνα Z.5: Διάταξη ακτινοβολήσης δείγματος για τα πειράματα της φωτολεύκανσης και της παραγωγής ελευθέρων ριζών

Διάλυμα Κουρκουμίνης σε DMSO	Ελεύθερη	Εγκλεισμένη
Συγκέντρωση (M)	$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$
Ισχύς (mW/cm ²)	12,55	13
λ_{exc} (nm)	437	437

Πίνακας Z.4: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη φωτολεύκανσης

Z.4.4. Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) με απορρόφηση με χρήση NADH [41,43]

Για την μελέτη των ελεύθερων ριζών χρησιμοποιήθηκε το NADH, ένα συνένζυμο που βρίσκεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα και λειτουργεί ως ο βασικός τους μεταβολίτης και οξειδωτικός συμπράγοντας (cofactor). [61] Το NADH είναι η ανηγμένη μορφή του NAD^+ και το NAD^+ είναι η οξειδωμένη μορφή του NADH. Το ζεύγος οξειδοαναγωγής NAD^+/NADH είναι γνωστό ως ρυθμιστής του μεταβολισμού της κυτταρικής ενέργειας, δηλαδή της γλυκόλυσης και της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. [62] Το NADH σχηματίζεται από το NAD^+ μέσω της μεταφοράς ενός ιόντος υδριδίου με τη βοήθεια ενζύμων όπως οι αφυδρογονάσες. Το NADH παρουσιάζει κορυφή απορρόφησης στα 340 nm σε αντίθεση με το NAD^+ . Η αύξηση της απορρόφησης (με το σχηματισμό του NADH) ή η μείωση της απορρόφησης (με το σχηματισμό NAD^+) στα 340 nm αποτελεί τη βάση για την μελέτη της παραγωγής των ελεύθερων ριζών, σύμφωνα με το Διάγραμμα Z.2. [63] Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε EDTA ή αλλιώς αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ το οποίο είναι γνωστό για την συμπλεκτική του ικανότητα με μεταλλοίοντα με αποτέλεσμα να μπορεί να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα όπως Ca^{2+} και Fe^{3+} . Αυτά μπορούν να δεσμευτούν στο EDTA και να παρουσιάσουν μειωμένη δραστηριότητα. [63]



Διάγραμμα Z.2: Φάσματα απορρόφησης NADH και NAD^+

Αρχικά έγινε ετοιμασία των μητρικών διαλυμάτων του NADH και του EDTA. Ζυγίστηκαν 2 mg NADH τα οποία διαλύθηκαν σε 1 ml PBS. Με βάση τους υπολογισμούς που φαίνονται παρακάτω, γνωρίζοντας ότι το μοριακό του βάρος είναι 709,4 g/mol προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα με συγκέντρωση 2,8 mM.

$$n = \frac{m}{MW} = \frac{2 \text{ mg}}{709,4 \text{ g/mol}} = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ moles NADH περιέχονται στο 1 ml PBS}$$

$$\begin{aligned} \text{Με την μέθοδο των τριών για 1000 ml η συγκέντρωση θα είναι } C &= 2,8 \cdot 10^{-6} \cdot 1000/1 \\ &= 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

Τα φάσματα απορρόφησης τελικά λήφθηκαν για συγκέντρωση NADH 100 μM η οποία προέκυψε μετά από την αραίωση του μητρικού διαλύματος σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 100 \cdot 10^{-6} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 \\ &= 107 \mu\text{l} \text{ από το μητρικό διάλυμα του NADH προστέθηκαν στη κυβέττα} \end{aligned}$$

Ομοίως για το EDTA. Ζυγίστηκαν 11,9 mg NADH τα οποία διαλύθηκαν σε 2 ml PBS. Γνωρίζοντας ότι το μοριακό του βάρος είναι 292,24 g/mol προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα με συγκέντρωση 20,4 mM.

$$n = \frac{m}{MW} = \frac{11,9 \text{ mg}}{292,24 \text{ g/mol}} = 4,072 \cdot 10^{-6} \text{ moles κουρκουμίνης περιέχονται στα 2 ml PBS}$$

$$\begin{aligned} \text{Με την μέθοδο των τριών για 1000 ml η συγκέντρωση θα είναι } C & \\ &= 4,072 \cdot 10^{-6} \cdot 1000/2 = 20,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

Τα φάσματα απορρόφησης τελικά λήφθηκαν για συγκέντρωση EDTA 0,1 mM η οποία προέκυψε μετά από την αραίωση του μητρικού διαλύματος σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 20,4 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 0,1 \cdot 10^{-3} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 \\ &= 15 \mu\text{l} \text{ από το μητρικό διάλυμα του EDTA προστέθηκαν στην κυβέττα} \end{aligned}$$

Η επιθυμητή συγκέντρωση της κουρκουμίνης ήταν 10^{-5} M, επομένως από το μητρικό που έχει ήδη προετοιμαστεί έγινε η εξής αραίωση:

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 4,67 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot V_1 = 10^{-5} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 \\ &= 6,5 \mu\text{l} \text{ από το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης προστέθηκαν στην κυβέττα} \end{aligned}$$

Το τελικό διάλυμα της κυβέττας περιείχε 2871,5 μl PBS και τα υπόλοιπα ήταν οι ποσότητες που υπολογιστήκαν παραπάνω.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ακτινοβόληση με παρόμοια λογική όπως τη φωτολεύκανση που αναλύθηκε. Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν ανά 1 min ακτινοβόλησης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min στο εύρος 300 - 700 nm. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν 12,68 mW/cm².

Ουσία	Ελεύθερη Κουρκουμίνη	NADH	EDTA
Συγκέντρωση (M)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷
Ισχύς (mW/cm ²)	12,68		

Πίνακας Z.5: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών ελεύθερης κουρκουμίνης

Για την κουρκουμίνη εγκλεισμένη σε νιοσώματα ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία. Αρχικά έγινε ετοιμασία του μητρικού νιοσώματων από ξηρό δείγμα νιοσωμάτων με απόδοση εγκλεισμού 36,65 %. Από το αρχικό ξηρό δείγμα των 151,9 mg ζυγίστηκαν τα 83,3 mg με αποτέλεσμα να περιέχονται 1,955 mg. Ύστερα από διάλυση των νιοσωμάτων σε 20 ml DMSO το τελικό μητρικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 0,265 · 10⁻³ M.

$$n = \frac{m}{MW} = \frac{1,955 \text{ mg}}{368,385 \text{ g/mol}}$$

$$= 5,3 \cdot 10^{-6} \text{ moles κουρκουμίνης περιέχονται στα 20 ml DMSO}$$

$$\text{Με την μέθοδο των τριών για 1000 ml η συγκέντρωση θα είναι } C = 5,3 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{1000}{20}$$

$$= 0,265 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Η επιθυμητή συγκέντρωση για το πείραμα είναι 10⁻⁵ M, οπότε έγινε η εξής αραιώση:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 0,265 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 10^{-5} \cdot 3000 \text{ μl} \Rightarrow V_1$$

$$= 113,21 \text{ μl από το μητρικό διάλυμα νιοσωμάτων προστέθηκαν στην κυβέττα}$$

Επιπλέον έγινε ετοιμασία των νέων μητρικών διαλυμάτων του NADH και του EDTA. Ζυγίστηκαν 3,5 mg NADH τα οποία διαλύθηκαν σε 1 ml PBS. Γνωρίζοντας ότι το μοριακό του βάρος είναι 709,4 g/mol προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα με συγκέντρωση 4,5 mM.

Τα φάσματα απορρόφησης τελικά λήφθηκαν για συγκέντρωση NADH 370 μM η οποία προέκυψε μετά από την αραιώση του μητρικού διαλύματος σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 370 \cdot 10^{-6} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 = 247 \mu\text{l}$$

από το μητρικό διάλυμα του NADH προστέθηκαν στη κυβέττα

Ομοίως για το EDTA. Ζυγίστηκαν 4,9 mg NADH τα οποία διαλύθηκαν σε 1,08 ml PBS. Γνωρίζοντας ότι το μοριακό του βάρος είναι 292,24 g/mol προετοιμάστηκε μητρικό διάλυμα με συγκέντρωση 15,5 mM.

Τα φάσματα απορρόφησης τελικά λήφθηκαν για συγκέντρωση EDTA 0,1 mM η οποία προέκυψε μετά από την αραιώση του μητρικού διαλύματος σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow 15,5 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 0,1 \cdot 10^{-3} \cdot 3000 \mu\text{l} \Rightarrow V_1 = 19,35 \mu\text{l}$$

από το μητρικό διάλυμα του EDTA προστέθηκαν στην κυβέττα

Σε αυτήν την περίπτωση για το τελικό διάλυμα στην κυβέττα χρησιμοποιήθηκαν 2620,44 μl DMSO.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ακτινοβολήση με τα φάσματα απορρόφησης να λαμβάνονται ανά 1 min ακτινοβολήσης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min στο εύρος 300 - 700 nm. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν 13 mW/cm².

Ουσία	Εγκλεισμένη Κουρκουμίνη	NADH	EDTA
Συγκέντρωση (M)	10^{-5}	$3,7 \cdot 10^{-4}$	10^{-7}
Ισχύς (mW/cm ²)	13		

Πίνακας Z.6: Συγκεντρωτικός πίνακας δειγμάτων για την μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών εγκλεισμένης κουρκουμίνης

Η. Κυτταρικές Καλλιέργειες

Η.1. Αντιδραστήρια

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων με τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται στον Πίνακα Η.1.

Όνομασία	Λειτουργία
DMEM	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων
FBS	Εμβρυϊκός ορός βοοειδών Συμπλήρωμα κυτταρικής ανάπτυξης
PBS	Διάλυμα φωσφορικών ιόντων Υγρό έκπλυσης κυττάρων
Antibiotic Antimycotic solution	Αντιμικροβιακό - Αντιμυκητιασικό διάλυμα. Προστίθεται στο υγρό έκπλυσης και στο θρεπτικό υλικό για αποφυγή βακτηριακής μόλυνσης
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Άχρωμος διαλύτης για την κατεργασία των δειγμάτων
Isopropanol	Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση των εργαλείων του εργαστηρίου
Glacial Acetic Acid, analytical grade	Χρησιμοποιείται στην χρωμομετρική διαδικασία
Trypsin –EDTA 0,05%	Διάλυμα ενζυματικής αποκόλλησης κυττάρων
Distilled water or Purified Water	Διαλύτης
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)	Διαλύτης που χρωματίζει υγιή κύτταρα

Πίνακας Η.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αντιδραστηρίων

Η.1.1. Προετοιμασία πλήρους θρεπτικού μέσου

Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται DMEM + 4.5g/L D-Glucose, L-Glutamine (D-MEM (HG) W/NA PYR (CE) 500ML) στο οποίο προστίθενται 10%v/v εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS, Qualified HI /Pen-Str 0.5%*, Gibco, REF: 10500-641), 1% v/v αντιβιοτικό-αντιμυκητιασικό (Anti-Anti, Gibco, REF: 15240-062), 0,5 %v/v πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Penicillin/ Streptomycin, Gibco, REF: LM-A4118/100), και 0,07%v/v διάλυμα γενταμυκίνης 1% (Lab Supplies, REF: 15710-049). Στο FBS, Qualified HI έχει προστεθεί προηγουμένως 0,5% v/v διαλύματος Penicillin/ Streptomycin

H.2. Όργανα και σκεύη

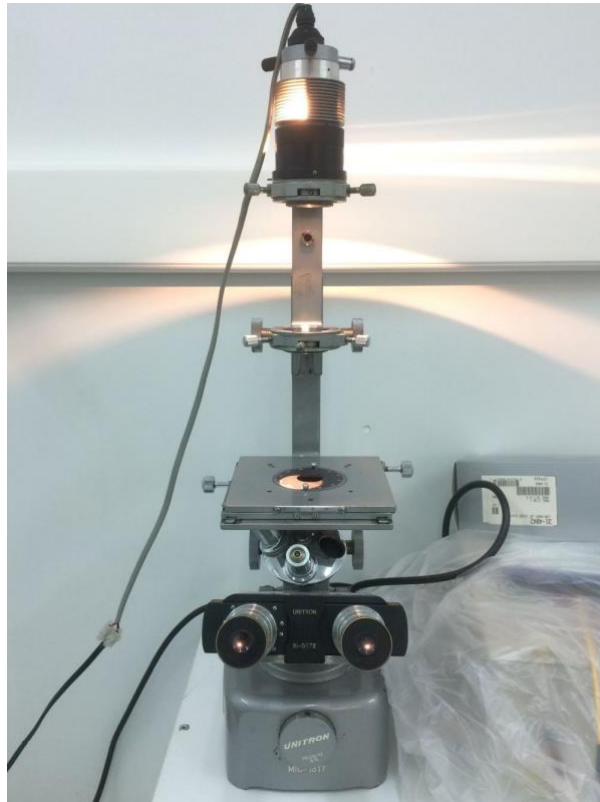
Τα όργανα και τα σκεύη που χρησιμοποιούνται στις πειραματικές διαδικασίες των κυτταροκαλλιιεργειών είναι τα εξής:

1. Κλίβανος επώασης διοξειδίου Incubator InCO₂ Memmert, Germany
2. Θάλαμος νηματικής ροής Abductor Telstar PV100, Spain
3. Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317
4. Φυγόκεντρος Hettich Roto Sienta III, Germany
5. Αυτόματη πιπέτα των 1-5 mL και tips πιπέτας
6. Αυτόματη πιπέτα των 100-1000 μ L και tips πιπέτας
7. Αυτόματη πιπέτα των 10-100 μ L και tips πιπέτας
8. Αυτόματη πιπέτα των 1-10 μ L και tips πιπέτας
9. Πολυκάναλη αυτόματη πιπέτα των 20-200 μ L και tips πιπέτας
10. Ποτήρι ζέσεως 50mL
11. Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με επιφάνεια ανάπτυξης 75 cm², Corning cell culture flasks, Sigma-Aldrich
12. Φιαλίδια 15 mL και 50 mL, Falcon Conical Centrifuge Tubes
13. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer μέτρησης κυττάρων
14. Liquid Nitrogen Freezing Cells Container 34XT Taylor Wharton
15. Φιαλίδια Eppendorf 1,5 mL
16. Ψυγείο
17. Vortex, IKA MS1 Minishaker small orbital shaker
18. Κατάψυξη
19. Μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50

H.2.1. Ανάστροφο μικροσκόπιο φωτισμού διέλευσης Unitron MiC-1317

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων με τις κυτταρικές καλλιέργειες είναι αναγκαία η οπτική παρατήρηση των κυττάρων, η οποία γίνεται με ανάστροφο μικροσκόπιο. Χρησιμοποιείται ανάστροφο και όχι κοινό μικροσκόπιο λόγω της αδυναμίας του δεύτερου να εστιάσει καθώς η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων γίνεται στο πυθμένα της φλάσκας, plate ή τριβλίου. Στο ανάστροφο μικροσκόπιο ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται κάτω από το δείγμα, ενώ το φως έρχεται από πάνω, με αποτέλεσμα να γίνεται έτσι παρατήρηση της κάτω πλευράς του αντικειμένου

υπό μελέτη, όπως φαίνεται στην Εικόνα Η.1. Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο αποτελείται από λάμπα αλογόνου ως πηγή και μεγεθυντικούς φακούς 10x, 20x και 40x.

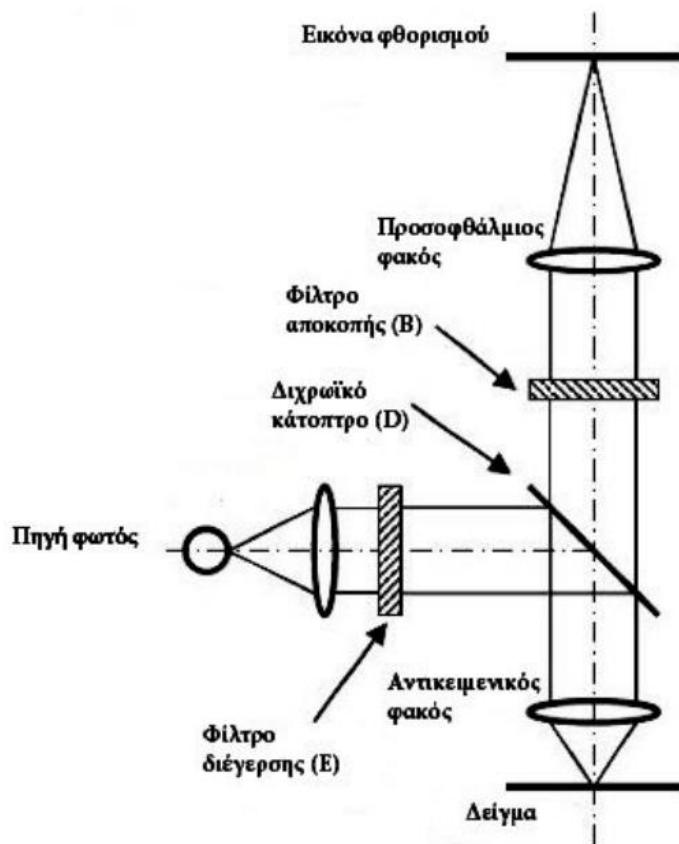


Εικόνα Η.1: Φωτογραφική απεικόνιση του ανάστροφου μικροσκοπίου φωτισμού διέλευσης
Unitron MiC-1317

Η.2.1. Μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50

Το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιείται για την λήψη εικόνας φθορισμού της επιθυμητής ουσίας, συνεπώς η λήψη του εκπεμπόμενου φθορισμού γίνεται με τη διέγερση της ουσίας στο κατάλληλο μήκος κύματος, δηλαδή κοντά στο μέγιστο της απορρόφησης της. Παράλληλα το όργανο είναι ικανό να ελαχιστοποιεί το φως του υποβάθρου είτε λόγω φωτισμού είτε λόγω αυτοφθορισμού της ουσίας. Το φως και ο εκπεμπόμενος φθορισμός εστιάζονται στο δείγμα μέσω αντικειμενικού φακού. Η διέγερση του δείγματος γίνεται μέσω κατάλληλου φίλτρου διέγερσης ώστε να μπορεί να επιλεγεί ένα ή περισσότερα μήκη κύματος. Στη συνέχεια γίνεται ανάκλαση του φωτός της πηγής από το διχρωϊκό κάτοπτρο, το οποίο επιτρέπει τη διέλευση μεγαλύτερων μηκών κύματος και ανακλά τα μικρότερα ως προς τη χαρακτηριστική του τιμή μήκους κύματος. Επιπλέον υπάρχει και ένα φίλτρο αποκοπής ώστε να μην επιτρέπει τη διέλευση μηκών κύματος ορισμένης

τιμής και πάνω, καθώς πολλές φορές από τα διχρωϊκα κάτοπτρα μπορεί να γίνει σφάλμα και μέρος του φωτός διέγερσης να ανακλαστεί προς το προσοφθάλμιο φακό. Στην Εικόνα Η.2. παρουσιάζεται σχηματική διάταξη του μικροσκοπίου.



Εικόνα Η.2.: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του μικροσκοπίου φθορισμού

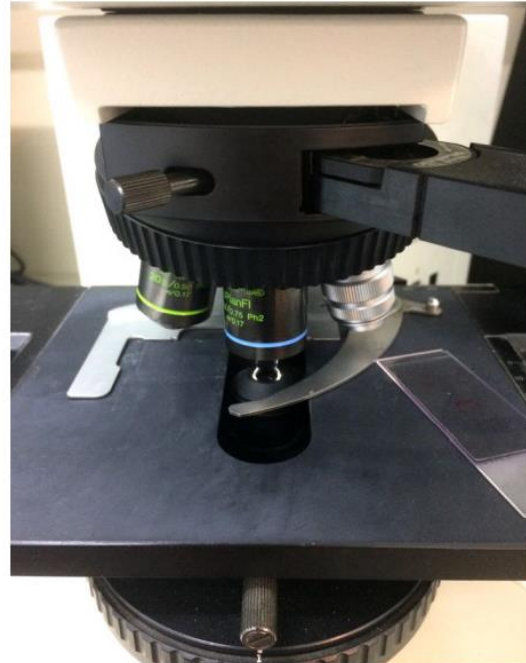
Η διέγερση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50 πραγματοποιείται με λυχνία υδραργύρου 100 W και κατάλληλα σείτ οπτικών φίλτρων-κύβων. Οι κύβοι φθορισμού με τους οποίους είναι εξοπλισμένο το μικροσκόπιο Olympus BX-50 είναι οι εξής:

Κωδικός Κύβου	Φίλτρο Διέγερσης (nm)	Διχρωϊκό Κάτοπτρο (nm)	Φίλτρο Εκπομπής (nm)
U-MWU	330-385	400	420
U-MWB	470-490	500	515
U-MWG	510-550	570	590

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

Για την λήψη των εικόνων χρησιμοποιείται έγχρωμη κάμερα CCD (XC-30, Olympus), η οποία είναι προσαρμοσμένη (c-mount adapter) στην άκρη του σωλήνα φωτογραφικής καταγραφής

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



Εικόνα Η.3: Φωτογραφική απεικόνιση μικροσκοπίου Olympus BX-50

Η.3. Πειραματική Διαδικασία

Η.3.1. Συνθήκες εργαστηρίου

Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιείται υπό άσηπτες συνθήκες, στο θάλαμο νηματικής ροής Laminar flow hood (Abductor Telstar PV100, Spain). Πριν από κάθε διεργασία πραγματοποιείται αποστείρωση των σκευών μέσω της έκθεσης τους για 30 min σε υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται από τη πηγή που βρίσκεται μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Η.3.2. Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται είναι A431 ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος. Η κυτταρική σειρά βρίσκεται αποθηκευμένη σε αμπούλες (ειδικά φιαλίδια κρυοδιατήρησης) και διατηρείται κατεψυγμένη σε υγρό άζωτο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

H.3.3. Μεθοδολογία Απόψυξης Κυττάρων

Αρχικά τοποθετείται ένα ποτήρι ζέσεως των 50 ml με απεσταγμένο νερό στο κλίβανο μέχρι να φτάσει τους 37 °C. Στο ποτήρι ζέσεως εισάγεται μια αμπούλα με τα κύτταρα, αφού πρώτα έχει αφαιρεθεί από το υγρό άζωτο, και τοποθετείται πάλι το ποτήρι ζέσεως με την αμπούλα μέσα στον κλίβανο για 5 min. Σε Falcon προστίθενται 7 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και αφού έχει ξεπαγώσει, προστίθεται και το περιεχόμενο της αμπούλας. Γίνεται επιπλέον ξέπλυμα της αμπούλας δύο φορές με 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου για την αποφυγή απωλειών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του Falcon στα 1200 rpm για 7 min με αντίβαρο νερό ίδιου όγκου. Το υπερκείμενο αφαιρείται πολύ προσεκτικά ώστε να μην αφαιρεθούν κύτταρα από τον πάτο του Falcon. Στο Falcon με τα συσσωματωμένα κύτταρα προστίθενται 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και ακολουθεί καλό pipetting για το σπάσιμο των συσσωματωμάτων. Στη συνέχεια, αφού έχουν τοποθετηθεί 2 ml πλήρους θρεπτικού μέσου σε μεγάλη φλάσκα (75 cm²), προστίθενται 2 ml από τα κύτταρα του Falcon και τελικά αλλά 2 ml θρεπτικό μέσο, ώστε ο τελικός όγκος να είναι τα 15 ml. Τελικά πραγματοποιείται οπτική παρατήρηση της φλάσκας στο οπτικό μικροσκόπιο και τοποθετείται στον κλίβανο.

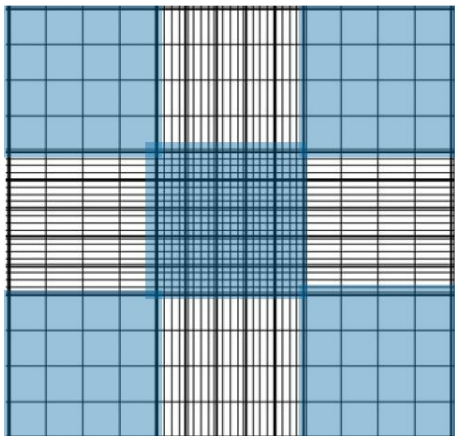
H.3.4. Μεθοδολογία Ανακαλλιέργειας Κυττάρων

Γίνεται οπτική παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο, καθώς η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν η πληρότητα της φλάσκα σε κύτταρα στην επιφάνεια υπερβεί το 70 %. Το περιεχόμενο της φλάσκας αποχύνεται σε Falcon με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν κύτταρα. Η φλάσκα ξεπλένεται δύο φορές με 4 ml πλήρες PBS και αποχύνεται το περιεχόμενο σε Falcon. Στη συνέχεια προστίθεται 7 ml θριψίνης (Trypsin –EDTA 0,05%), η οποία προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, και η φλάσκα επωάζεται στον κλίβανο για 10 min. Ακολουθεί ανακίνηση με ελαφρά χτυπήματα στα τοιχώματα της φλάσκας και οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση της αποκόλλησης των κυττάρων. Για την αναστολή της δράσης της θριψίνης προστίθενται άλλα 8 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στη φλάσκα. Το περιεχόμενό της μεταφέρεται σε Falcon ώστε να φυγοκεντρηθεί στα 1200 rpm για 7 min με αντίβαρο 15 ml νερού. Το υπερκείμενο αφαιρείται και γίνεται προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στο Falcon με το συσσωμάτωμα των κυττάρων και ακολουθεί καλό pipetting για το σπάσιμο του συσσωματώματος με σκοπό την ομοιογένεια. Τέλος, εισάγονται σε δύο διαφορετικές μεγάλες φλάσκες με 15 ml πλήρες θρεπτικό μέσο 150 μl και 300 μl κυττάρων αντίστοιχα.

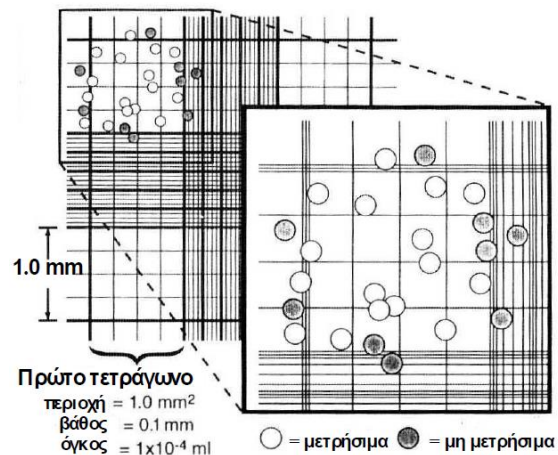
H.3.5. Μεθοδολογία Μέτρησης Κυττάρων

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την εισαγωγή συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων ανά well σε plate των 96 θέσεων και ανά τριβλίο ανάλογα με το σκοπό του πειράματος. Για την μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται η πλάκα Neubauer Improved Poly-Optic GmbH Hemacytometer, η οποία καθαρίζεται σχολαστικά με διάλυμα ισοπροπανόλης:νερού σε αναλογία 70:30. Τα κύτταρα που μετρούνται είναι αυτά που προκύπτουν από την μεθοδολογία της ανακαλλιέργειας μετά από την διαδικασία της φυγοκέντρησης και του σπασίματος με το πλήρες θρεπτικό μέσο. Πρώτα πραγματοποιείται αραιώση 1:10, δηλαδή 10 μ l από τα κύτταρα με 90 μ l πλήρες θρεπτικό μέσο και από αυτό διάλυμα λαμβάνεται δείγμα 9 μ l. Στην πλάκα μέτρησης Neubauer έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα και των δείγμα των 9 μ l εισάγεται κάτω από αυτήν τριχοειδικά. Στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου φαίνεται ένας σταυρός με τέσσερα τετράγωνα, τα δύο πάνω είναι τα A και B, και τα δύο κάτω τα C και D, όπως φαίνονται στην Εικόνα Ζ.4. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε κάθε τετράγωνο και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους. Στη συνέχεια γίνεται πολλαπλασιασμός του μέσου όρου αρχικά με 10 λόγω αραιώσης και με 10^4 ώστε το αποτέλεσμα να είναι ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Κατά τη μέτρηση δεν προσμετρούνται τα κύτταρα που εφάπτονται στις γραμμές, πάνω δεξιά και κάτω αριστερά, καθώς και τα συσσωματώματα.

A)



B)



Εικόνα Η.4: Απεικόνιση Α) σταυρού του πλακιδίου Neubauer και Β) μετρήσιμων κυττάρων στο σταυρό

H.3.6. Μεθοδολογία Ψύξης Κυττάρων

Η μεθοδολογία αυτή αφορά στην δημιουργία αποθέματος κυττάρων. Όταν η πληρότητα της φλάσκας σε κύτταρα στην επιφάνεια υπερβεί το 70 % αφαιρείται το περιεχόμενο και γίνεται δύο φορές ξέπλυμα και απόχυση με 4 ml πλήρες PBS. Στη συνέχεια, ομοίως με την ανακαλλιέργεια, προστίθεται 7 ml θρυψίνης (Trypsin –EDTA 0,05%), η οποία προκαλεί την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, και η φλάσκα επώαζεται στον κλίβανο για 10 min. Ακολουθεί ανακίνηση με ελαφρά χτυπήματα στα τοιχώματα της φλάσκας και οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση της αποκόλλησης των κυττάρων. Η θρυψίνη εξουδετερώνεται με την προσθήκη 8 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στη φλάσκα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1200 rpm για 7 min με αντίβαρο 15 ml νερού. Το υπερκείμενο αφαιρείται με μεγάλη προσοχή και στα κύτταρα που είναι συσσωματωμένα στον πάτο του Falcon προστίθενται 5,32 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και 680 μl FBS με καλό pipetting. Οι αμπούλες στις οποίες θα γίνει η αποθήκευση των κυττάρων έχουν προετοιμαστεί με 150 μl DMSO, ώστε να αποτραπεί ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την ψύξη. Στις αμπούλες με το DMSO γίνεται προσθήκη από 1,5 ml από τα κύτταρα. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, πρώτα γίνεται αποθήκευση των φιαλιδίων σε υπερκαταψύκτη (-80 °C) και μετά το πέρας 24 hr τοποθετούνται στο υγρό άζωτο (-196 °C).

H.3.7. Πρωτόκολλο ελέγχου βιωσιμότητας – βιοχημικός έλεγχος MTT

Για τη μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων γίνεται χρήση του αντιδραστηρίου MTT, το οποίο χρωματίζει τα υγιή κύτταρα, καθώς οι μιτοχονδριακές τους δεϋδρογενάσες αντιδρούν με το αντιδραστήριο αυτό και σχηματίζονται μωβ κρύσταλλοι φαρμαζάνης (formazan). Αυτοί διαλύονται με DMSO και έτσι είναι δυνατό να μετρηθεί η απορρόφησή τους φασματοφωτομετρικά.

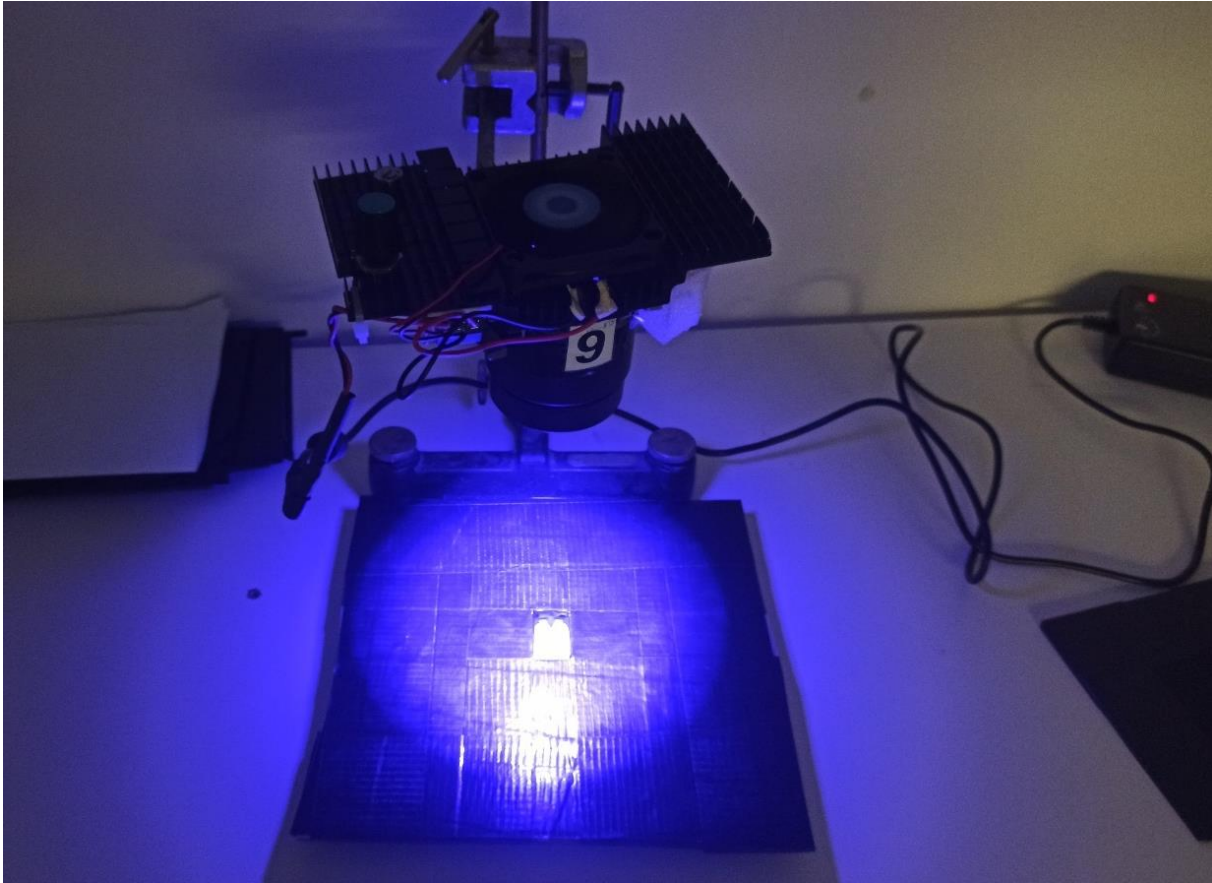
Αρχικά γίνεται προετοιμασία του διαλύματος MTT συγκέντρωσης 5 mg της σκόνης MTT ανά 1 ml PBS. Σε κάθε well του plate είναι απαραίτητη η προσθήκη 15 μl διαλύματος MTT σε PBS με 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου, έτσι ανάλογα με τον αναγκαίο αριθμό των wells του εκάστοτε πειράματος φτιάχνεται και ανάλογη ποσότητα διαλύματος MTT σύστασης 5mg/ml PBS. Έτσι αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο από τα wells προστίθενται τα 115 μl του διαλυμένου MTT σε PBS και του θρεπτικού μέσου. Το plate αφήνεται στο κλίβανο για επώαση 3 hr. Μετά το πέρας της επώασης έχουν σχηματιστεί οι μωβ κρύσταλλοι της φαρμαζάνης. Το υπερκείμενο αφαιρείται,

με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αφαιρεθούν και οι κρύσταλλοι μαζί, προστίθενται πρώτα 100 μl DMSO και το plate ανακινείται μαζί με ελαφρύ χτύπημα στα τοιχώματα ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι. Στη συνέχεια προστίθενται άλλα 100 μl DMSO με σκοπό την αραιώση του διαλύματος. Τελικά λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης του plate στο εύρος 350 nm με 700 nm και καταγράφεται η απορρόφηση στα 570 nm όπως επίσης και στα 690nm, ώστε να υπολογιστεί η διαφορά τους. Τα 570 nm αναφέρονται στο μέγιστο της απορρόφησης των κρυστάλλων formazan, ενώ τα 690 nm στο υπόβαθρο.

H.3.8. Μελέτη της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι απαραίτητο να μελετηθεί πρώτα η επίδραση της ακτινοβολίας διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτό πραγματοποιείται χωρίς τη παρουσία της ουσίας κουρκουμίνης που μελετάται, ώστε κατά τη διεξαγωγή της φωτοδυναμικής θεραπείας να χρησιμοποιηθεί ενεργειακή δόση φωτός που δεν είναι από μόνη της τοξική για τα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό έχουν επιλεγεί να μελετηθούν τέσσερις ισχύς ακτινοβολίας με χρήση της πηγής Bridgelux Power LED 10W που αναλύθηκε στο κεφάλαιο ΣΤ.3 Αυτές είναι 9 mW/cm², 12 mW/cm², 15 mW/cm² και 18 mW/cm². Η κάθε ακτινοβολία πραγματοποιείται για διαφορετικούς χρόνους. Οι ρυθμοί ροής ισχύος των 9 mW/cm², 12 mW/cm² και 15 mW/cm² πραγματοποιήθηκαν για χρόνους διάρκειας 1 min, 2 min, 3 min, ενώ η δόση των 18 mW/cm² για 1 min και 2 min. Η συνολική δόση ενέργειας προκύπτει από το γινόμενο του ρυθμού ροής ισχύος ακτινοβολίας επί τη χρονική διάρκεια της ακτινοβολίας. Έτσι συνολικά οι δόσεις ενέργειας είναι οι εξής: 540 mJ/cm², 1080 mJ/cm², 1620 mJ/cm², 720 mJ/cm², 1440 mJ/cm², 2160 mJ/cm², 900 mJ/cm², 1800 mJ/cm², 2700 mJ/cm², 2160 mJ/cm² και 3240 mJ/cm².

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του plate των 96 wells σύμφωνα με τη μεθοδολογία της ανακαλλιέργειας που αναλύθηκε. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης σε κάθε well περιέχονται 7500 κύτταρα και για κάθε συνθήκη ετοιμάζονται 3 wells, δηλαδή 3 επαναλήψεις. Σε άλλα 3 wells χρησιμοποιείται μόνο πλήρες θρεπτικό μέσο ως αναφορά (control), τα οποία δεν ακτινοβολούνται. Το plate αφήνεται στον κλίβανο για 24 hr. Μετά το πέρας των 24 hr αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται προσθήκη 40 μl PBS για την ακτινοβολία. Μετά το τέλος της ακτινοβολίας αφαιρούνται τα 40 μl PBS και προστίθενται 100 μl πλήρες θρεπτικό μέσο. Το plate αφήνεται για 24 hr στο κλίβανο και ακολουθεί η διαδικασία του ελέγχου της βιωσιμότητας των κυττάρων με το αντιδραστήριο MTT.



Εικόνα Η.5.: Φωτογραφική απεικόνιση διάταξη ακτινοβόλησης plate

Η.3.9. Μελέτης της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα

Για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι απαραίτητο να γίνει έλεγχος της τοξικότητας των ουσιών απουσία φωτός (dark toxicity). Αυτό συμβαίνει για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ουσίας που δεν είναι τοξική από μόνη της για τα κύτταρα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Αρχικά γίνεται προετοιμασία των συγκεντρώσεων των ουσιών που θα αξιοποιηθούν για το εν λόγω πείραμα. Καθώς η διάλυση τους γίνεται σε DMSO είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη ο περιορισμός του 0,5% DMSO του τελικού διαλύματος, ποσοστό μεγαλύτερο αυτού στο διάλυμα είναι τοξικό για τα κύτταρα. Έτσι πραγματοποιείται η προετοιμασία μητρικών διαλυμάτων συγκέντρωσης C_1 για τις επιθυμητές συγκεντρώσεις C_2 σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow C_1 \cdot \frac{0,5}{100} \cdot x = C_2 \cdot x \Rightarrow C_1 \cdot \frac{0,5}{100} = C_2 \quad (1)$$

Συγκεντρώσεις Μητρικών Διαλυμάτων	Τελικές Συγκεντρώσεις
20 mM	100 μM
2 mM	10 μM
1 mM	5 μM
0,6 mM	3 μM
0,2 mM	1 μM
0,02 mM	100 nM

Πίνακας Η.3: Συγκεντρωτικός πίνακας συγκεντρώσεων φωτοευαισθητοποιητών

Γίνεται προετοιμασία του plate των 96 wells σύμφωνα με τη μεθοδολογία της ανακαλλιέργειας που αναλύθηκε. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης σε κάθε well περιέχονται 7500 κύτταρα και για κάθε συνθήκη ετοιμάζονται 3 wells, δηλαδή 3 επαναλήψεις. Σε άλλα 3 wells χρησιμοποιείται μόνο πλήρες θρεπτικό μέσο ως αναφορά (control), τα οποία δεν ακτινοβολούνται. Το plate αφήνεται στον κλίβανο για 24 hr. Μετά το πέρας των 24 hr αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται προσθήκη των συγκεντρώσεων 100 μM, 10 μM, 5 μM, 3 μM, 1 μM και 100 nM όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη και 1 μM και 100 nM της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Οι συγκεντρώσεις των 100 μM, 10 μM, 5 μM και 3 μM δεν μελετώνται στην περίπτωση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Η προετοιμασία των συγκεντρώσεων αυτών δεν ήταν εφικτή καθώς τα νιοσώματα παρουσίασαν συσσωμάτωση και η διάλυση τους πραγματοποιήθηκε μόνο στις πιο αραιές συγκεντρώσεις. Στις 24 hr γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου των κυττάρων, ενώ στις 48 hr ακολουθεί η διαδικασία του ελέγχου της βιωσιμότητας των κυττάρων με το αντιδραστήριο MTT.

Η.3.10. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα

Για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι απαραίτητο να γίνει μελέτη του χωρικού εντοπισμού του φωτοευαισθητοποιητή στο κύτταρο καθώς αυτή συνδέεται με το τύπο του κυτταρικού θανάτου. Η συσώρευση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε κυτταρικό οργανίδιο, όπως στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσώματα, στη μεμβράνη πλάσματος ή στον πυρήνα του κυττάρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συσώρευση φωτοευαισθητοποιητών στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα πιο αποτελεσματική φωτοδυναμική θεραπεία, δηλαδή μεγαλύτερα ποσοστά κυτταρικής νέκρωσης. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί αν λάβουμε υπόψη το βασικό ρόλο των μιτοχονδρίων στην παροχή ενέργειας στα κύτταρα και τη ρύθμιση της απόπτωσης. Από την άλλη είναι ανάγκη να αποφευχθεί η συσώρευση στον πυρήνα του κυττάρου

όπου βρίσκεται και το γενετικό υλικό γιατί αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις του DNA με αποτελέσματα όπως μεταλλάξεις και περαιτέρω καρκινογένεση. [64]

Αρχικά γίνεται ετοιμασία τριβλίων που θα χρειαστούν με βάση το πρωτόκολλο της ανακαλλιέργειας και της μέτρησης κυττάρων ώστε να περιέχονται στα τριβλία $15 \cdot 10^5$ κύτταρα. Τοποθετείται ειδική καλυπτρίδα σε κάθε τριβλίο, ώστε να προσκολληθούν σε αυτήν τα κύτταρα και να μπορούν να παρατηρηθούν μετέπειτα με μικροσκοπία, και γίνεται η εισαγωγή των $15 \cdot 10^5$ κυττάρων. Τα τριβλία αφήνονται για επώαση 24 hr στον κλίβανο. Ακολουθεί η προσθήκη των συγκεντρώσεων 1 μM της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαφορετικά τριβλία με τελικό όγκο 2,5 ml ουσίας και πλήρους θρεπτικού μέσου και αφήνονται 3 hr για επώαση στο κλίβανο. Μετά το πέρας των 3 hr, κάθε τριβλίο ξεπλένεται δύο φορές με 1 ml PBS. Η καλυπτρίδα με τα προσκολλημένα κύτταρα τοποθετείται σε ειδικό πλακιδίο με 100 μl PBS και εισάγεται, ώστε να παρατηρηθεί, στο μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50. Με χρήση του προγράμματος AnalySIS getIT γίνεται white balance. Οι εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (brightfield) λαμβάνονται με χρόνο έκθεσης στα 50s, ενώ οι εικόνες φθορισμού με χρόνο έκθεσης στο 1s και γίνεται λήψη των εικόνων. [65]

H.3.11. Μεθοδολογία εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα με τη χρήση ελεύθερης και εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης

Στο σημείο αυτό γίνεται εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας με φωτοευαίσθητες ουσίες την ελεύθερη κουρκουμίνη και την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη με συγκέντρωση 1 μM που επιλέχθηκε από τα πειράματα κυτταροτοξικότητας (drug only). Η ακτινοβολία πραγματοποιείται για τους τρεις ρυθμούς ροής ισχύος 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 για χρόνους διάρκειας 2 min και 3 min για τα 9 mW/cm^2 και 1 min, 2 min και 3 min για 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 . Άρα οι συνολικές δόσεις ενέργειας είναι 540 mJ/cm^2 , 1080 mJ/cm^2 , 1620 mJ/cm^2 , 720 mJ/cm^2 , 1440 mJ/cm^2 , 2160 mJ/cm^2 , 900 mJ/cm^2 , 1800 mJ/cm^2 και 2700 mJ/cm^2 . Η διάταξη της ακτινοβολίας είναι η πηγή Bridgelux Power LED 10W που αναλύθηκε στο κεφάλαιο ΣΤ.3. Οι τιμές τόσο της συγκέντρωσης όσο της ισχύος επιλέχθηκαν από τα απροηγούμενα πειράματα με βάση το γεγονός ότι δεν επηρεάζουν τα κύτταρα από μόνες τους.

Αρχικά γίνεται προετοιμασία του plate των 96 wells σύμφωνα με τη μεθοδολογία της ανακαλλιέργειας που αναλύθηκε. Με βάση το πρωτόκολλο της μέτρησης σε κάθε well περιέχονται 6000 κύτταρα και για κάθε συνθήκη ετοιμάζονται 3 wells, δηλαδή 6 επαναλήψεις. Σε άλλα 3 wells

χρησιμοποιείται μόνο πλήρες θρεπτικό μέσο ως αναφορά (control), τα οποία δεν ακτινοβολούνται. Το plate αφήνεται στον κλίβανο για 24 hr. Μετά το πέρας των 24 hr αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται προσθήκη της συγκέντρωσης 1 μM των δύο ουσιών, της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Το plate με τις ουσίες πλέον αφήνεται για επώαση 3 hr στον κλίβανο. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί η ακτινοβόληση του plate, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται προσθήκη 40 μl PBS για την ακτινοβόληση. Μετά το τέλος της ακτινοβόλησης αφαιρούνται τα 40 μl PBS και προστίθενται 100 μl πλήρες θρεπτικό μέσο. Το plate αφήνεται για 24 hr στο κλίβανο και ακολουθεί η διαδικασία του ελέγχου της βιωσιμότητας των κυττάρων με το αντιδραστήριο MTT.

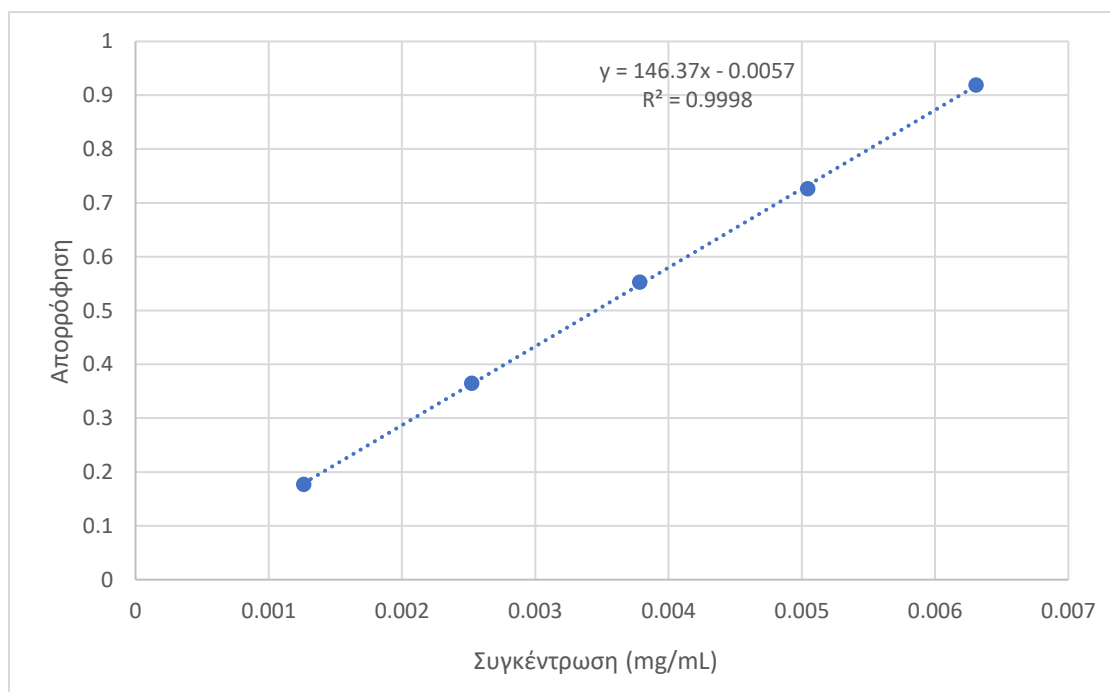
Θ. Αποτελέσματα – Σχολιασμός

Θ.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης είναι αναγκαία για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού καθώς όλες οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού βασίζονται στην μέτρηση της απορρόφησης του εκάστοτε δείγματος και στη μετατροπή της σε συγκέντρωση μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο Ζ.6. και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στον πίνακα Θ.1. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του προγράμματος excel φτιάχνεται το διάγραμμα και βρίσκεται η εξίσωση της καμπύλης: $y = 146,37x - 0,0057$.

Συγκέντρωση (mg/ml)	Απορρόφηση
0,0063	0,919155
0,00504	0,726406
0,00378	0,552978
0,00252	0,364824
0,00126	0,176952

Πίνακας Θ.1: Τιμές καμπύλης αναφοράς



Διάγραμμα Θ.1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Κουρκουμίνης

Θ.2.Απόδοση Διεργασίας, Απόδοση Εγκλεισμού και Ποσοστό Φόρτωσης Κουρκουμίνης

Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των νιοσωμάτων ως προς τις αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας και ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό με τη μέθοδο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Η σύνθεση των νιοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη. Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη αναλογία για την παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών για τέσσερις διαφορετικές αναλογίες Χοληστερόλης/Span 60/κουρκουμίνης (w/w/w). Στον Πίνακα Θ.2. φαίνονται οι αποδόσεις εγκλεισμού και διεργασίας ύστερα από επαναληπτικά πειράματα για τις τέσσερις μελετώμενες αναλογίες.

Αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/κουρκουμίνη (w/w/w)	Απόδοση Εγκλεισμού %	Απόδοση Διεργασίας %
100:100:10	48,4	83
200:200:10	9,4	79,2
400:400:10	53,2	78,6
400:400:20	12	71,2

Πίνακας Θ.2: Απόδοση εγκλεισμού και διεργασίας για κάθε αναλογία

Όπως φαίνεται στον Πίνακα Θ.3, οι αναλογίες των 200:200:10 και 400:400:20 έδωσαν πολύ χαμηλή απόδοση εγκλεισμού 9,4% και 12% αντίστοιχα. Ενώ οι αναλογίες 100:100:10 και 400:400:10 έδωσαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλεισμού με τιμές 48,44% και 53,% αντίστοιχα. Ωστόσο, η απόδοση διεργασίας φαίνεται να παραμένει σε υψηλά επίπεδα (71-83%) σε όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες.

Στη συνέχεια με σκοπό να επιλεγεί η βέλτιστη αναλογία μελετήθηκε το ποσοστό φόρτωσης της κουρκουμίνης στο τελικό δείγμα των νιοσωμάτων για τις δύο αναλογίες με τις μεγαλύτερες αποδόσεις εγκλεισμού σύμφωνα με τις εξισώσεις (3) και (4) με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα Θ.3.

Από το ποσοστό φόρτωσης συμπεραίνεται ότι η βέλτιστη αναλογία είναι η 100:100:10, καθώς παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερο φορτίο κουρκουμίνης στα νιοσώματα από την αναλογία 400:400:10 παρά το γεγονός ότι η τελευταία παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού

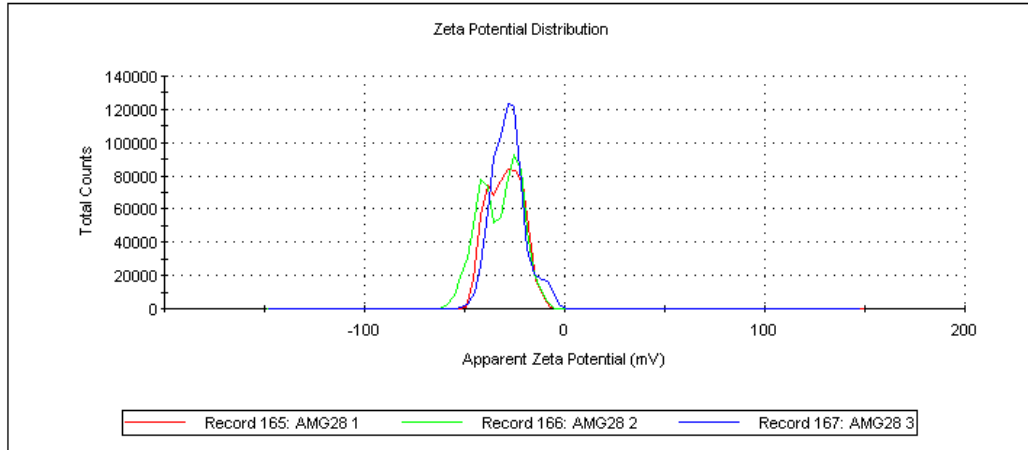
Αναλογία Χοληστερόλη/Span 60/κουρκουμίνη (w/w/w)	Ποσοστό θεωρητικού φορτίου κουρκουμίνης στα νιοσώματα (%)	Ποσοστό πραγματικού φορτίου κουρκουμίνης στα νιοσώματα (%)
100:100:10	4,8	2,98
400:400:10	1,23	0,75

Πίνακας Θ.3: Ποσοστό φόρτωσης κουρκουμίνης στα νιοσώματα για τις αναλογίες 100:100:10 και 400:400:10

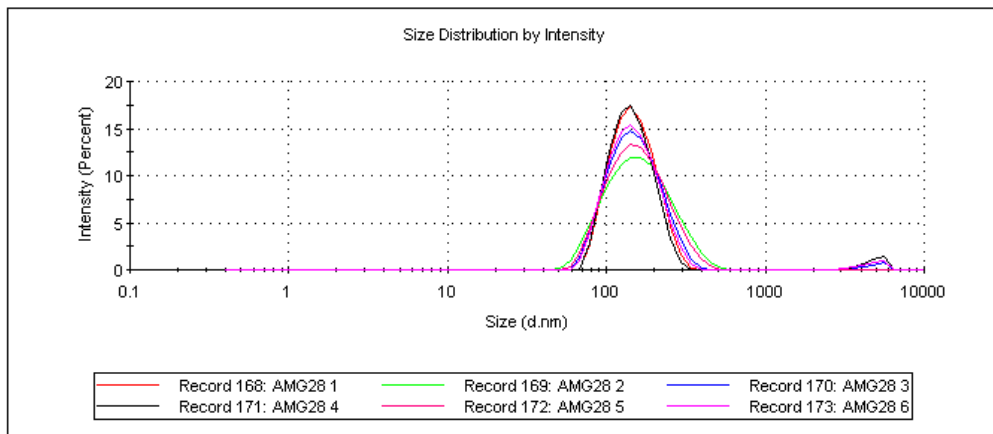
Θ.3. Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικό

Ο χαρακτηρισμός των νιοσωμάτων της αναλογίας βέλτιστης αναλογίας (Χοληστερόλη/Span 60/κουρκουμίνη = 100:100:10 w/w/w) πραγματοποιείται λαμβάνοντας 20 μL από την προκύπτουσα από την φυγοκέντριση διασπορά των νανοσωματιδίων τα οποία αραιώνονται σε 20 mL απεσταγμένο νερό. Η αραιωμένη διασπορά οδηγείται προς ανάδευση για 2 λεπτά σε αναδευτήρα τύπου Vortex, προκειμένου να επιτευχθεί καλή διασπορά των νανοσωματιδίων. Οι τιμές για το κάθε μέγεθος που προκύπτουν αποτελούν τον μέσο όρο τριών τιμών, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα Θ.4 και στις Εικόνες Θ.1 και Θ.2.

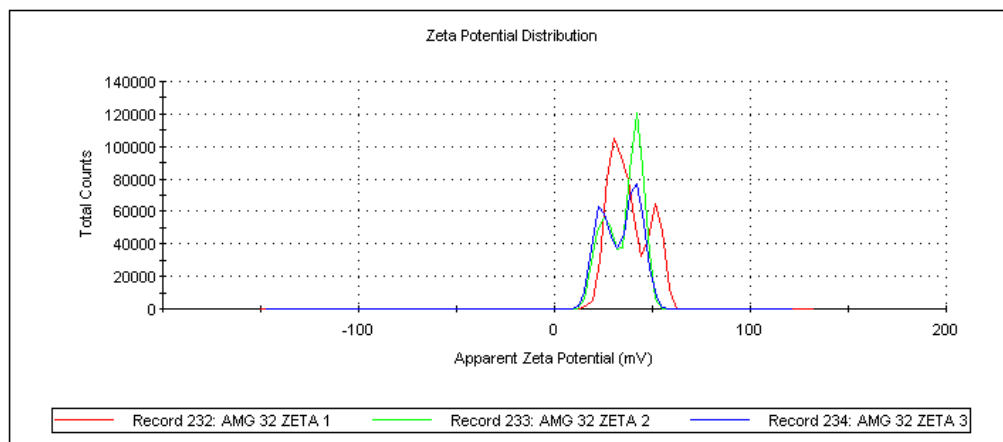
Τα νιοσώματα που συντέθηκαν χρησιμοποιώντας τη βέλτιστη αναλογία εμφανίζουν κατά μέσο όρο μέγεθος $144,23 \pm 1,01$ nm που είναι πολύ ικανοποιητική τιμή καθώς έχει βρεθεί ότι μικρές τιμές μεγέθους νανοσωματιδίων σχετίζονται με αυξημένη ικανότητά τους να διαπερνούν το δέρμα.^[66] Επιπλέον η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς είναι $0,164 \pm 0,021$ που αποτελεί ένδειξη εξαιρετικής ομοιομορφίας μεγέθους. Συγκεκριμένα, ο δείκτης πολυδιασποράς λαμβάνει τιμές μεταξύ 0,1-1 και όσο η τιμή του πλησιάζει προς το 0,1 τόσο καλύτερη η ομοιογένεια του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε υδατική διασπορά. Η τιμή του ζ-δυναμικού ήταν $-30,1 \pm 1,7$ mV η οποία δείχνει πολύ καλή σταθερότητα. Η Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η τιμή, κοντά στα $|30|$ mV, τόσο πιο σταθερή είναι η διασπορά των σωματιδίων χωρίς να εμφανίζουν τάση προς συσσωμάτωση. Στην περίπτωση των νιοσωμάτων χωρίς την κουρκουμίνη το μέγεθος είναι μεγαλύτερο σχεδόν διπλάσιο συγκριτικά με νιοσώματα με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη με τιμή $307 \pm 2,03$. Ο δείκτης πολύ διασποράς έχει τιμή $0,402 \pm 0,026$ που δείχνει μέτρια ομοιομορφία και το ζ- δυναμικό είναι στα $38 \pm 2,8$ mV που υποδυνκνεί καλή σταθερότητα με μειωμένη τάση για συσσωματώματα.



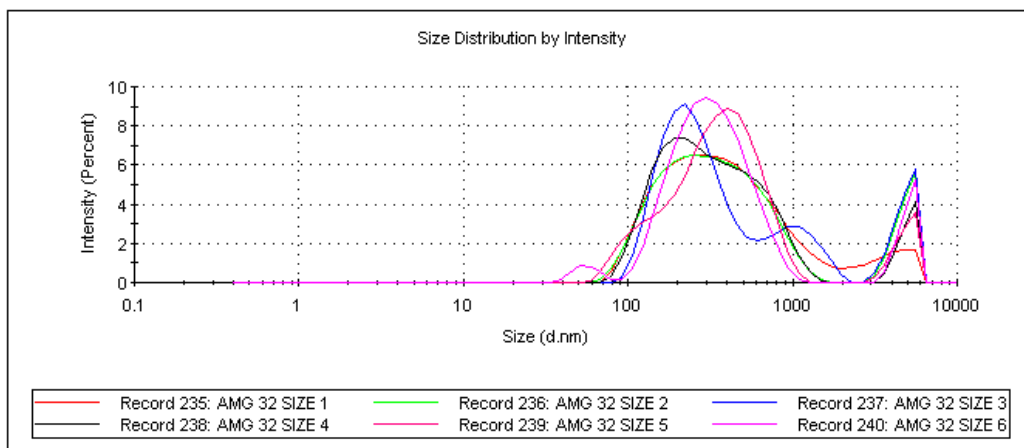
Εικόνα Θ.1: ζ – δυναμικό νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη



Εικόνα Θ.2: Κατανομή μεγέθους νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη



Εικόνα Θ.3: ζ – δυναμικό νιοσωμάτων χωρίς την ουσία (blank)



Εικόνα Θ.4: Κατανομή μεγέθους νιοσωμάτων χωρίς την ουσία (blank)

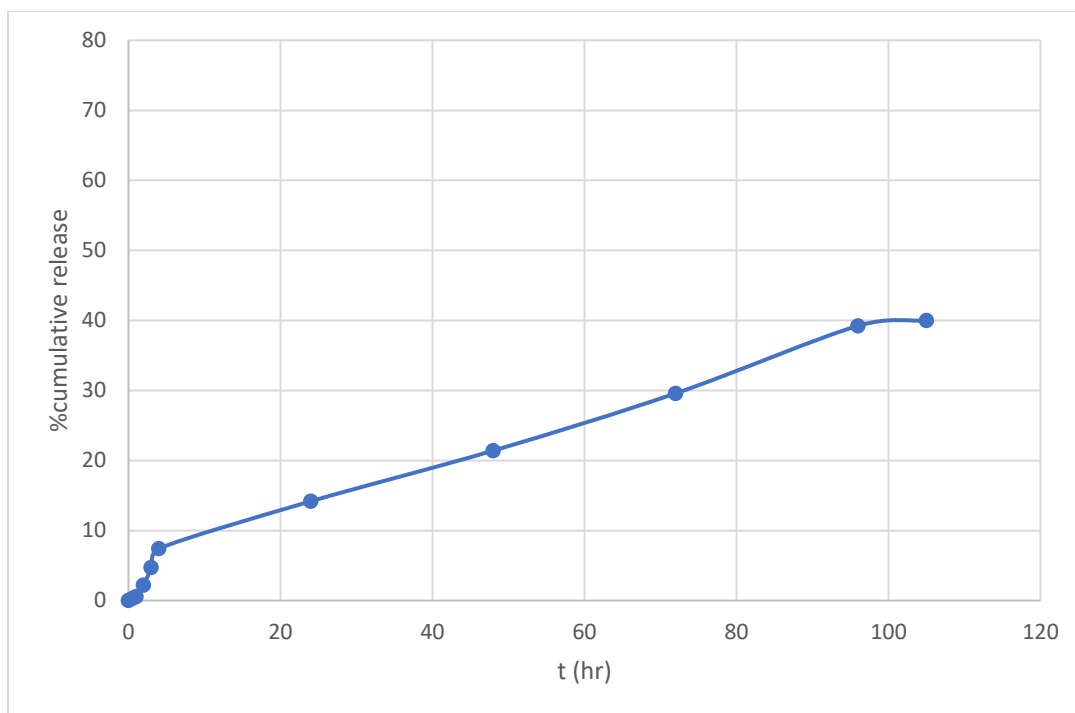
Αναλογία 60/κουρκουμίνη (w/w/w)	Χοληστερόλη/Span	Μέγεθος (nm)	PDI	Z- Δυναμικό (mV)
100:100:10		144,23±1,01	0,164±0,021	-30,1±1,7
100:100:0		307± 2,03	0,402±0,026	38±2,8

Πίνακας Θ.4: Αποτελέσματα μεθόδου DLS

Θ.4. Μελέτη απελευθέρωσης κουρκουμίνης από τα νιοσώματα

Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται στο διάγραμμα Θ. το προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νιοσώματα. Η απελευθέρωση της κουρκουμίνης από τα νιοσώματα γίνεται με αργό ρυθμό και στις 24 hr έχει να έχει απελευθερωθεί μόνο το 14 %. Η απελευθέρωση συνεχίζει να είναι αργή αλλά και σταθερή στο διάστημα των 96 hr στο οποίο και απελευθερώνεται το 39% της ένωσης. Τελικά μέχρι τις 105 hr η απελευθέρωση σταθεροποιείται με τελικό ποσοστό απελευθέρωσης το 40% της ένωσης.

Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή του προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης με προσδιορισμό του κατάλληλου κινητικού μοντέλου μέσω προσαρμογής των δεδομένων σε γραμμικά συστήματα με τη βοήθεια του προγράμματος Excel. Επιλέγεται το σύστημα με το υψηλότερο R^2 . Την καλύτερη γραμμικότητα με τον υψηλότερο συντελεστή R^2 παρουσίασαν το κινητικά μοντέλα Zero Order και Higuchi όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

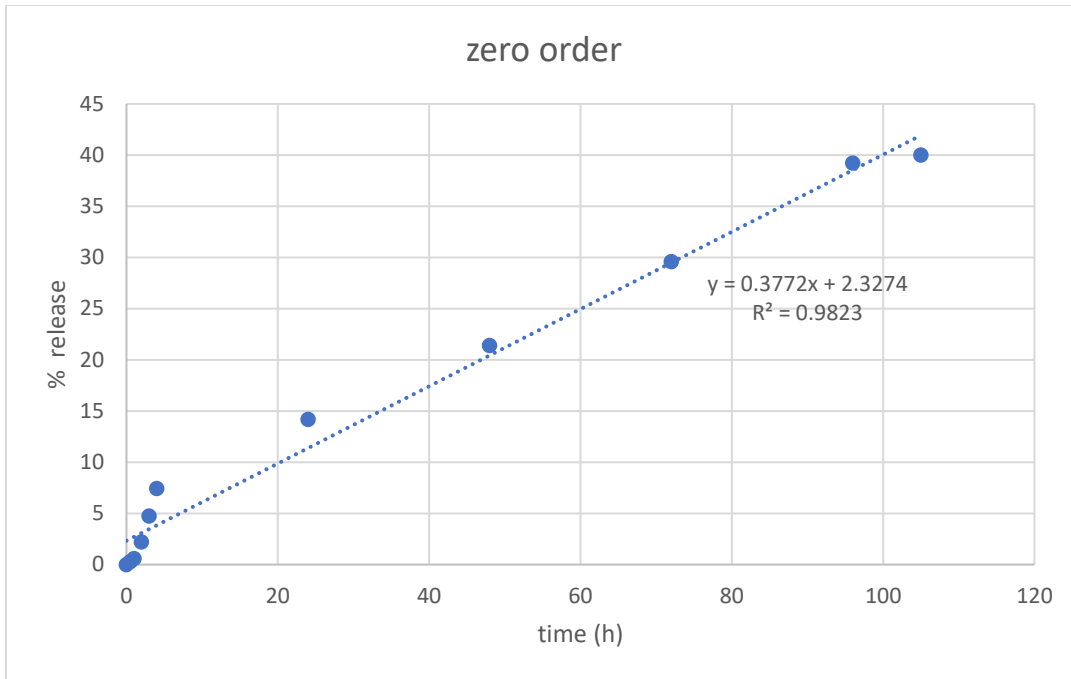


Διάγραμμα Θ.2: Προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νισώματα

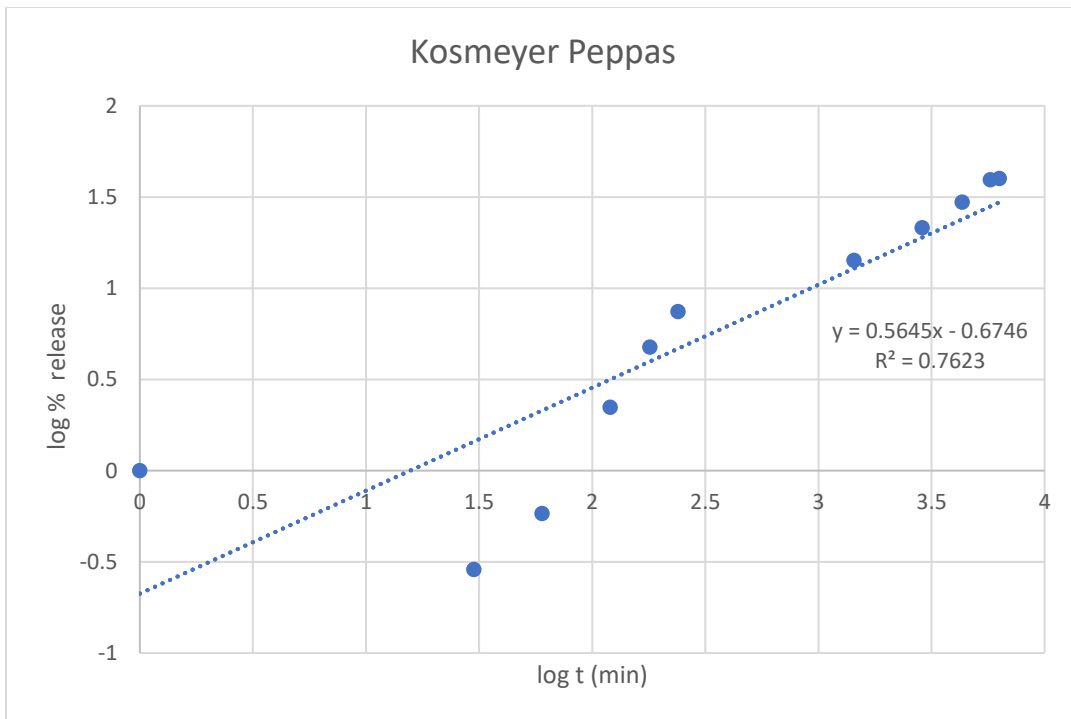
Μοντέλο	Zero Order	First Order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Εξίσωση	$y = 0.3772x + 2.3274$	$y = 0.0153x + 0.2578$	$y = 3.9565x - 2.4646$	$y = 0.5645x - 0.6746$
R^2	0.982	0.672	0.981	0.762

Πίνακας Θ.5 : Εξίσωση και συντελεστής R^2 για το κάθε κινητικό μοντέλο απελευθέρωσης

Το μοντέλο που επιλέγεται είναι το zero order ή μοντέλο μηδενικής τάξης με εξίσωση: $y = 0.3772x + 2.3274$, το οποίο περιγράφει συστήματα όπου η διεργασία πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ουσίας. Ωστόσο η τιμή του εκθέτη διάχυσης ή απελευθέρωσης (n) του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης. Η εξίσωση του κινητικού μοντέλου Korsmeyer-Peppas είναι: $y = 0.5645x - 0.6746$. Επομένως, η τιμή του εκθέτη διάχυσης, 0.5645 ($0.5 < 0.5645 < 1$) που υποδηλώνει μη Fickian ή ανώμαλη μεταφορά δηλαδή ότι τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.



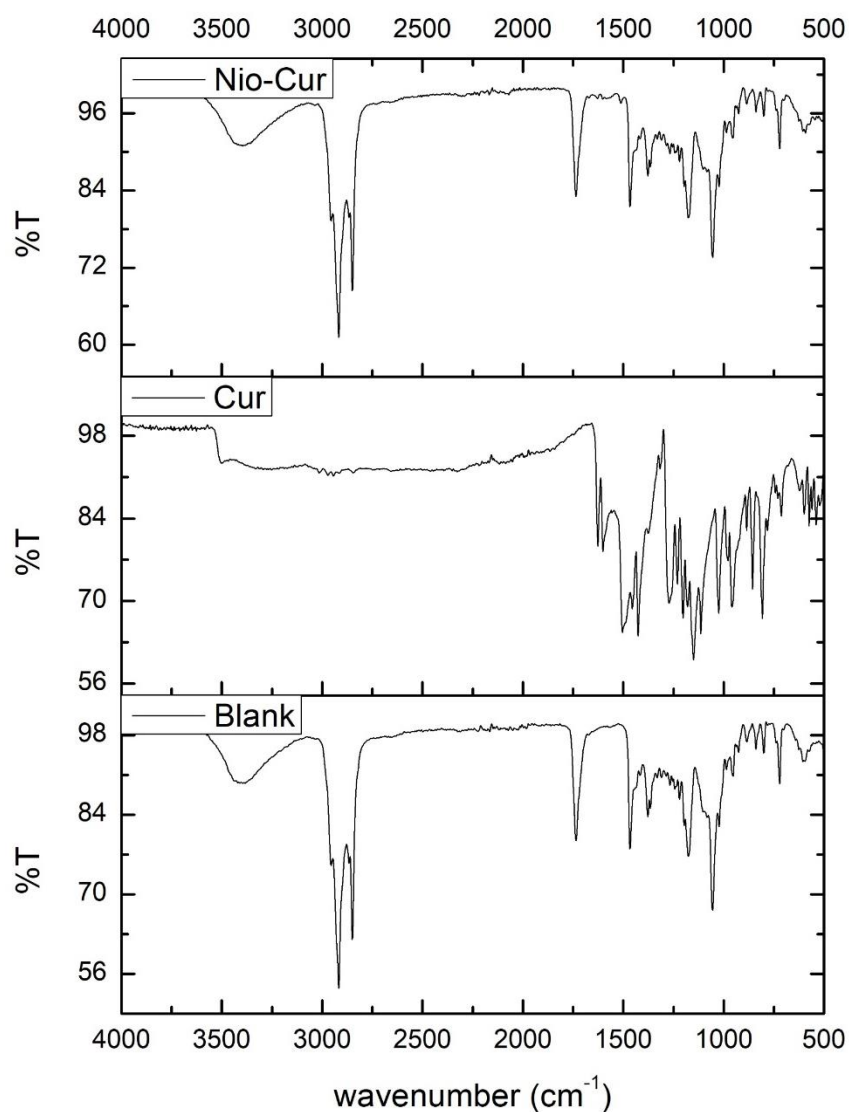
Διάγραμμα Θ.3: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου μηδενικής τάξης



Διάγραμμα Θ.4: Γραφική παράσταση του κινητικού μοντέλου μηδενικής τάξης

Θ.5. Δομικός Χαρακτηρισμός μέσω φασματομετρίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων, καθώς μέσω αυτής είναι εφικτή η επιβεβαίωση ότι έγινε ο σχηματισμός του σύμπλοκου εγκλεισμού. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι από δείγματα της ελεύθερης κουρκουμίνης, των νιοσωμάτων χωρίς κουρκουμίνη και των νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη.



Διάγραμμα Θ.5: Φάσματα FT-IR νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη, ελεύθερης κουρκουμίνης και νιοσώματα χωρίς κουρκουμίνη

Χαρακτηριστικές κορυφές φάσματος FT-IR (cm ⁻¹)								
	O-H δόνηση τάσης	μικτή δόνηση C=C και C=O	ασύμμετρη δόνηση τάσης του -CH ₂	ασύμμετρη δόνηση τάσης του -CH	συμμετρική δόνηση τάσης του -CH ₂	C=O δόνηση τάσης	C-H δόνηση κάμψης	C-O δόνηση τάσης
Κουρκουμίνη	3504	1625	1426	-	-	-	-	1271,1201,1150, 1113,1024
Νιοσώματα χωρίς την ουσία	3391	-	-	2918	2850	1736	1465,1376	1175,1053
Νιοσώματα με την ουσία	3399	-	-	2918	2850	1734	1467,1378	1179,1055

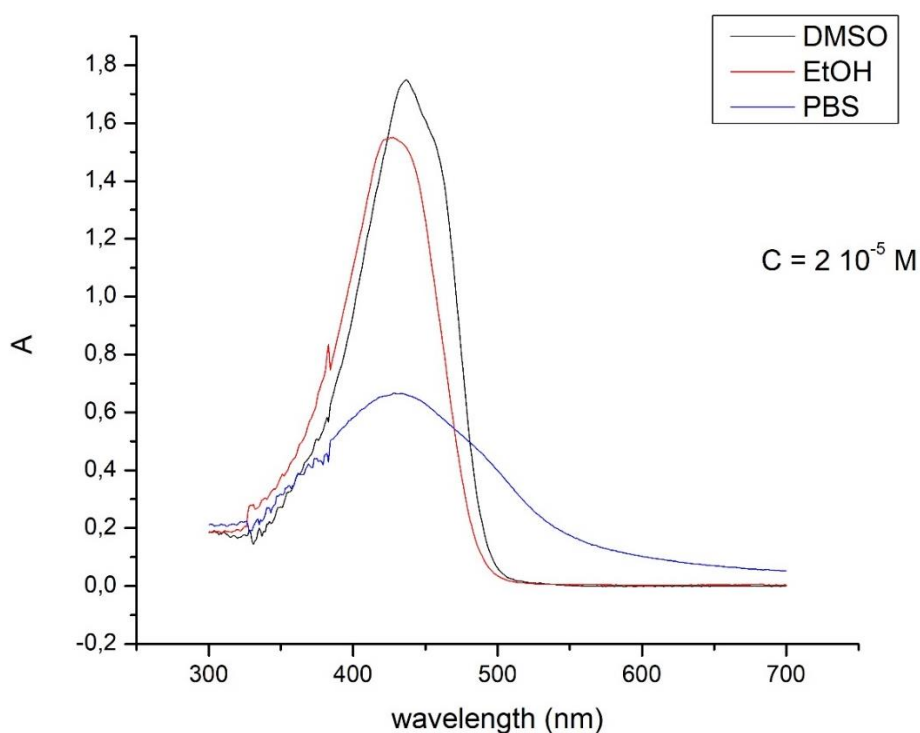
Πίνακας Θ.6: Χαρακτηριστικές κορυφές φάσματος FT-IR της κουρκουμίνης, των νιοσωμάτων χωρίς την ουσία και των νιοσωμάτων με την εγκλεισμένη ουσία

Στο φάσμα FT-IR της κουρκουμίνης η πιο χαρακτηριστική της κορυφή εμφανίζεται στα 3504 cm⁻¹ λόγω δονήσεων τάσης O-H. Στα 1625 cm⁻¹ οι κορυφές αποδίδονται στην μικτή δόνηση C=C και C=O, ενώ στα 1504 cm⁻¹ λόγω συνδυασμού δονήσεων τάσης C=O και δονήσεων κάμψης των αλειφατικών τμημάτων της κουρκουμίνης. Ακόμη οι κορυφές στα 1426 cm⁻¹ αποδίδονται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του -CH₂ και μεταξύ 1271 cm⁻¹ και 1024 cm⁻¹ λόγω δονήσεων τάσης των δεσμών C-O στους δύο δακτυλίους.^[58,67] Όσο αφορά στο φάσμα των νιοσωμάτων χωρίς την εγκλεισμένη κουρκουμίνη η κορυφή που εμφανίζεται στα 3391 cm⁻¹ αποδίδεται στην O-H δόνηση τάσης του Span 60. Οι κορυφές στα 2918 cm⁻¹ και 2850 cm⁻¹ αποδίδονται στην C-H δόνηση τάσης των αλειφατικών αλυσίδων της Χοληστερόλης και του Span 60, συγκεκριμένα στα 2918 cm⁻¹ σε ασύμμετρη δόνηση τάσης και στα 2850 cm⁻¹ σε συμμετρική. Στα 1736 cm⁻¹ αποδίδεται στην C=O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60, οι κορυφές στα 1465 cm⁻¹ και 1376 cm⁻¹ αποδίδονται στην C-H δόνηση κάμψης και οι κορυφές στα 1175 cm⁻¹ και 1053 cm⁻¹ αποδίδονται στην C-O δόνηση τάσης της Χοληστερόλης και του Span 60.^[58,68] Στο φάσμα των νιοσωμάτων με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη παρατηρείται ότι οι κορυφές είναι ίδιες με αυτές του φάσματος των νιοσωμάτων χωρίς την εγκλεισμένη ουσία οδηγώντας στο συμπέρασμα του επιτυχούς εγκλεισμού της ένωσης και της μη αλληλεπίδρασης της ουσίας με τα νιοσώματα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία.^[58]

Θ.6. Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Z.4.1. Έτσι από το μητρικό διάλυμα της κουρκουμίνης έχουν ετοιμαστεί τρία διαφορετικά διαλύματα στους τρεις διαλύτες DMSO, EtOH και PBS με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ και γίνεται η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησής τους με το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Perkin - Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer στο εύρος 300 – 700 nm. Ομοίως και για την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη.

Παρατίθεται στο διάγραμμα Θ.6 τα φάσματα που λήφθηκαν για την ελεύθερη κουρκουμίνη και παρουσιάζεται στον πίνακα Θ.6. η μέγιστη τιμή απορρόφησης και του μήκους κύματος για κάθε διαλύτη.



Διάγραμμα Θ.6: Φάσμα απορρόφησης της ελεύθερης κουρκουμίνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες DMSO, EtOH και PBS με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5}$

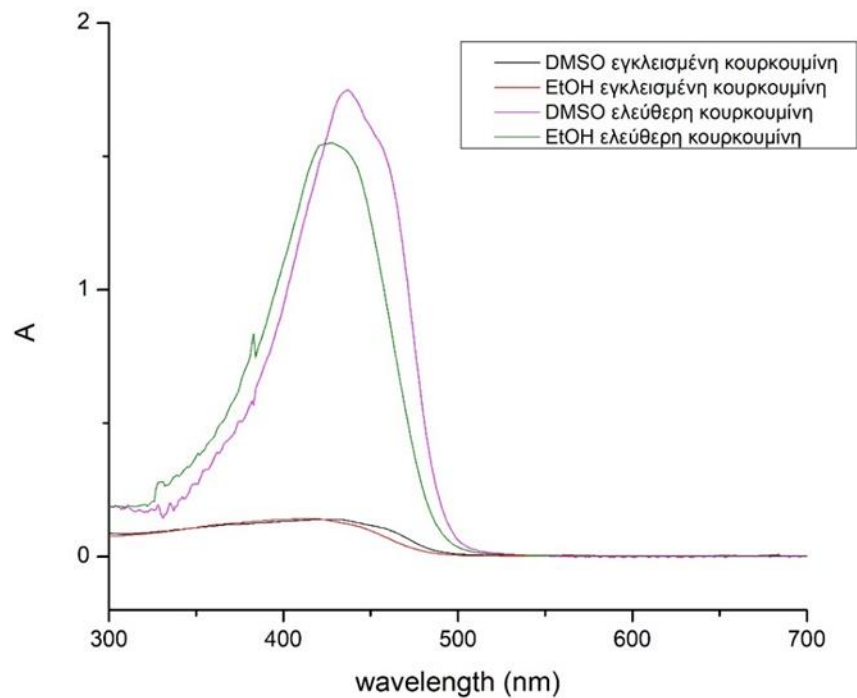
Διαλύτης	λ_{\max}	A_{\max}
DMSO	437	1,75
EtOH	428	1,55
PBS	429	0,66

Πίνακας Θ.7: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκους κύματος ελεύθερης κουρκουμίνης για κάθε διαλύτη

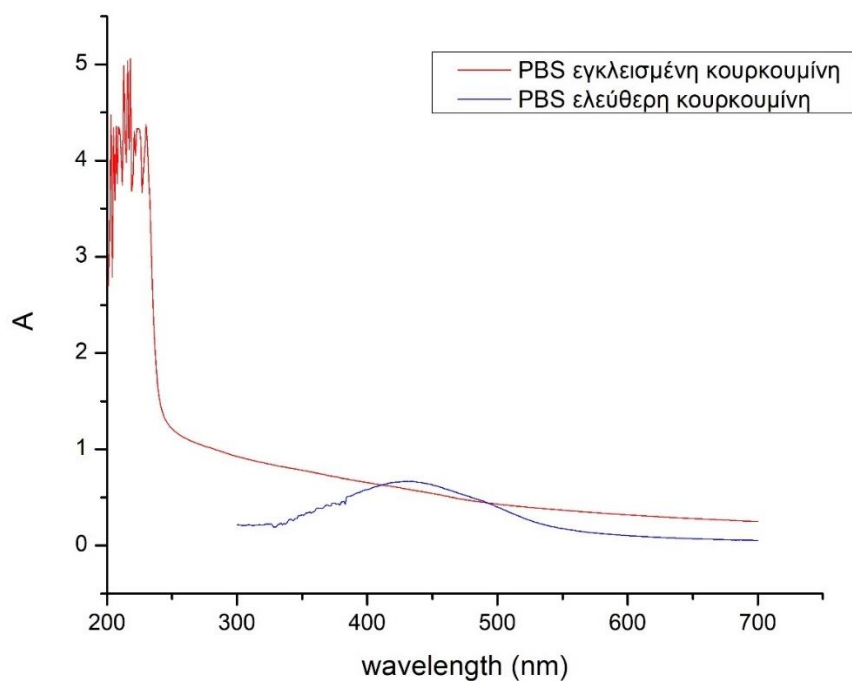
Από το διάγραμμα Θ.6 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Οι οργανικοί διαλύτες DMSO και EtOH διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης της κουρκουμίνης σε σύγκριση με τον υδατικό διαλύτη PBS.
- Το φάσμα απορρόφησης της κουρκουμίνης στην αιθανόλη, αν και συγκρίσιμο με του DMSO ως προς τη μορφή του, παρουσιάζει μια μετατόπιση προς τα αριστερά, δηλαδή προς χαμηλότερα μήκη κύματος σε σχέση με το DMSO. Επίσης η απορρόφηση της κουρκουμίνης στο DMSO εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με την απορρόφηση στην αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή απορρόφησης για το διάλυμα με διαλύτη DMSO βρίσκεται σε μήκος κύματος 437 nm με τιμή απορρόφησης τα 1,75, ενώ για το διάλυμα σε αιθανόλη είναι σε μήκος κύματος 428 nm και με τιμή 1,55.
- Αντίθετα το φάσμα του PBS παρουσιάζει μεγάλη μείωση στην απορρόφηση για την ίδια συγκέντρωση κουρκουμίνης σε σχέση με τους άλλους δύο διαλύτες και η κορυφή φαίνεται να έχει μεγαλύτερο πλάτος και μέγιστη τιμή απορρόφησης το 0,66 στα 429 nm. Αυτό οφείλεται στην υδροφοβικότητα της κουρκουμίνης, η οποία λόγω του υδατικού διαλύτη PBS συσσωματώνεται μειώνοντας την ικανότητα της να απορροφά. Ως προς την κορυφή μέγιστης απορρόφησης στο PBS η κουρκουμίνη παρουσιάζει ίδια συμπεριφορά με τη διάλυση της σε αιθανόλη.

Στην συνέχεια στο διάγραμμα Θ.7 παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν για την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη και παρουσιάζεται στον πίνακα Θ.7. η μέγιστη τιμή της απορρόφησης και του μήκους κύματος για κάθε διαλύτη.



Διάγραμμα Θ.7.: Φάσμα απορρόφησης της εγκλεισμένης και της ελεύθερης κουρκουμίνης στους διαλύτες διαλύτες DMSO, EtOH με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$



Διάγραμμα Θ.8.: Φάσμα απορρόφησης της εγκλεισμένης και της ελεύθερης κουρκουμίνης διαλυμένη σε PBS με συγκέντρωση $C = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Διαλύτης	λ_{\max}	A_{\max}
DMSO	427	0,13994
EtOH	416	0,14236
PBS	Δεν εμφανίζει κορυφή-	-

Πίνακα Θ.8: Μέγιστη τιμή απορρόφησης και μήκους κύματος εγκλεισμένης κουρκουμίνης για κάθε διαλύτη

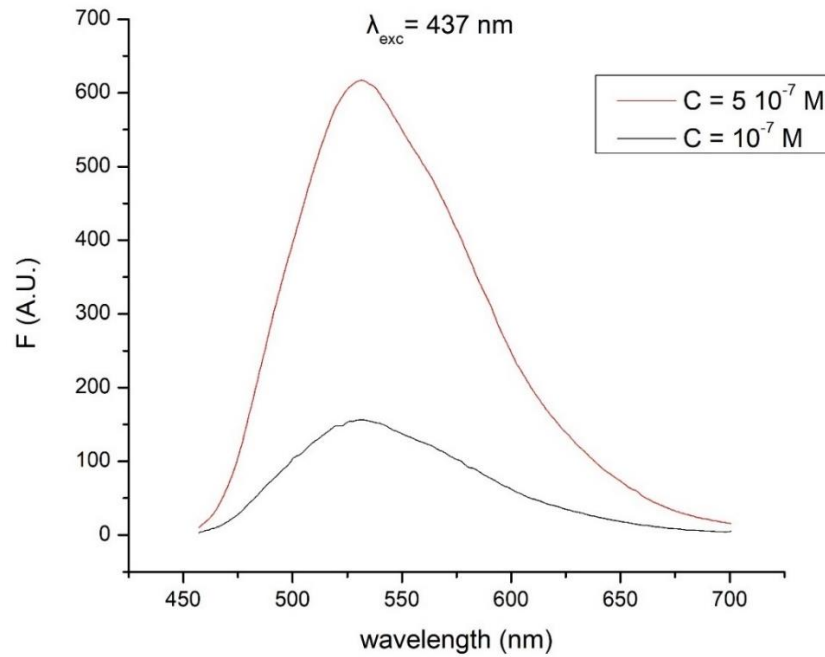
Από τα διαγράμματα Θ.7 και Θ.8 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα φάσματα των οργανικών διαλυτών DMSO και EtOH δεν διατηρούν την χαρακτηριστική καμπύλη της ουσίας και εμφανίζουν μεγάλη μείωση σε σχέση με την ελεύθερη κουρκουμίνη. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή απορρόφησης για το διάλυμα με διαλύτη DMSO βρίσκεται σε μήκος κύματος 427 nm με τιμή απορρόφησης τα 0,13994, ενώ για το διάλυμα σε αιθανόλη είναι σε μήκος κύματος 416 nm και με τιμή 0,14236. Οι κορυφές τους είναι πιο διευρυμένες σε σύγκριση με την ελεύθερη κουρκουμίνη και το μέγιστο τους μετατοπίστηκε σε μικρότερα μήκη κύματος.
- Όσο αφορά τον υδατικό διαλύτη PBS δε παρουσίασε κορυφή γεγονός που οφείλεται σε σκεδάσεις που προκαλούνται από τα νανοσωματίδια των νιοσωμάτων.

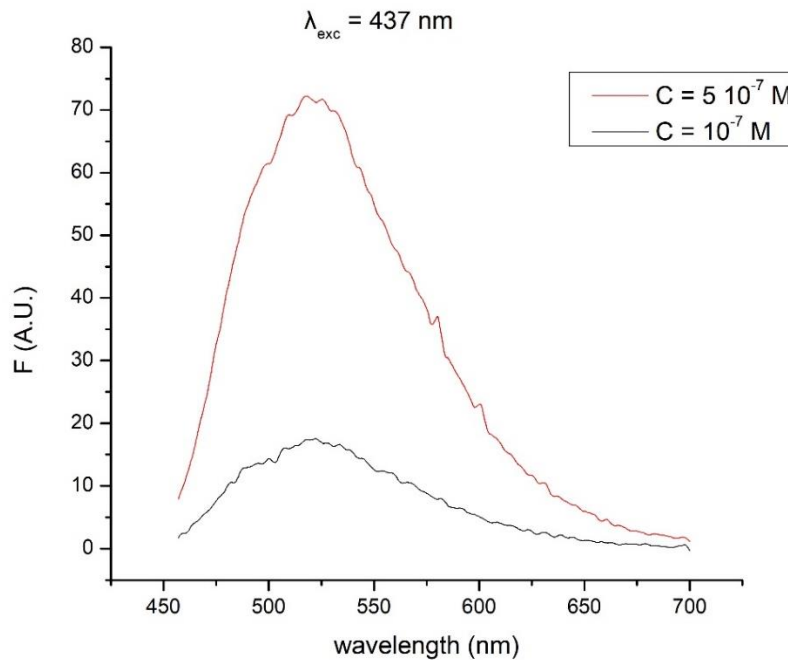
Θ.7. Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Z.4.2. Έτσι από τα μητρικά διαλύματα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης έχουν ετοιμαστεί διαφορετικά διαλύματα με DMSO των $5 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-7} M και με PBS των 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M. και γίνεται η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού με το φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer στο εύρος 450 – 700 nm. Ομοίως και για την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη.

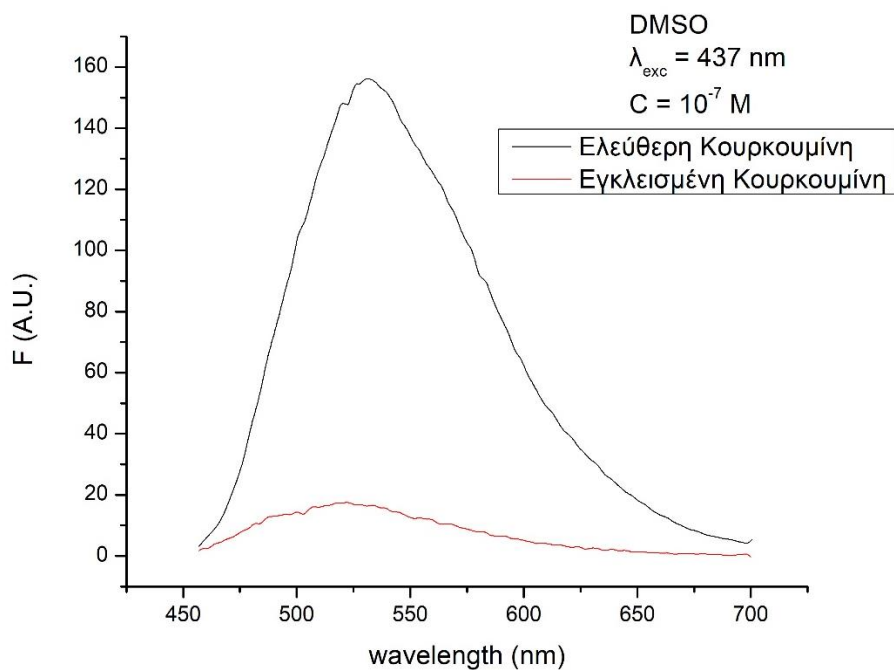
Παρατίθεται παρακάτω τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν για τον διαλύτη DMSO.



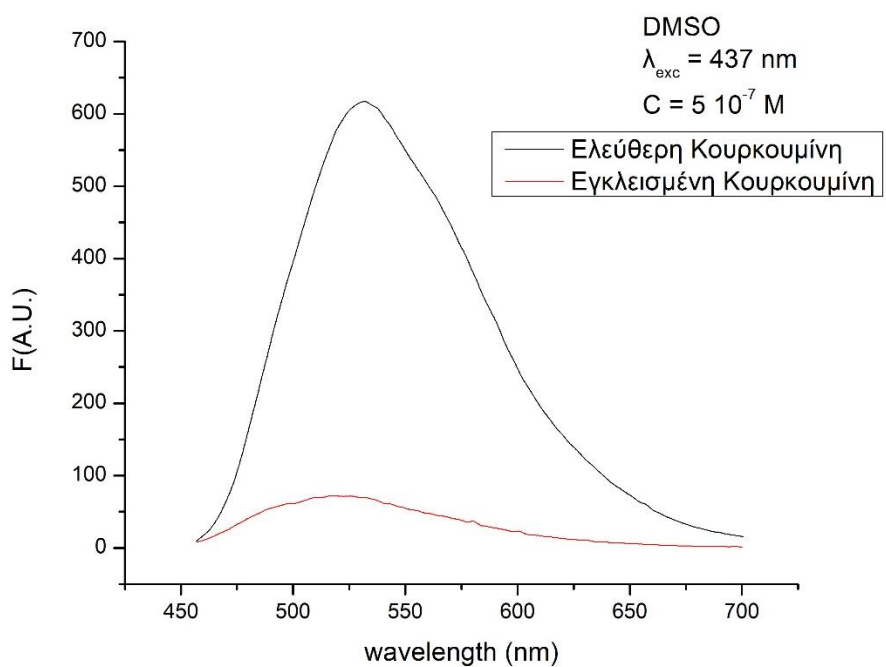
Διάγραμμα Θ.9: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ και 10^{-7} M



Διάγραμμα Θ.10: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ και 10^{-7} M



Διάγραμμα Θ.11: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO με συγκέντρωση 10^{-7} M



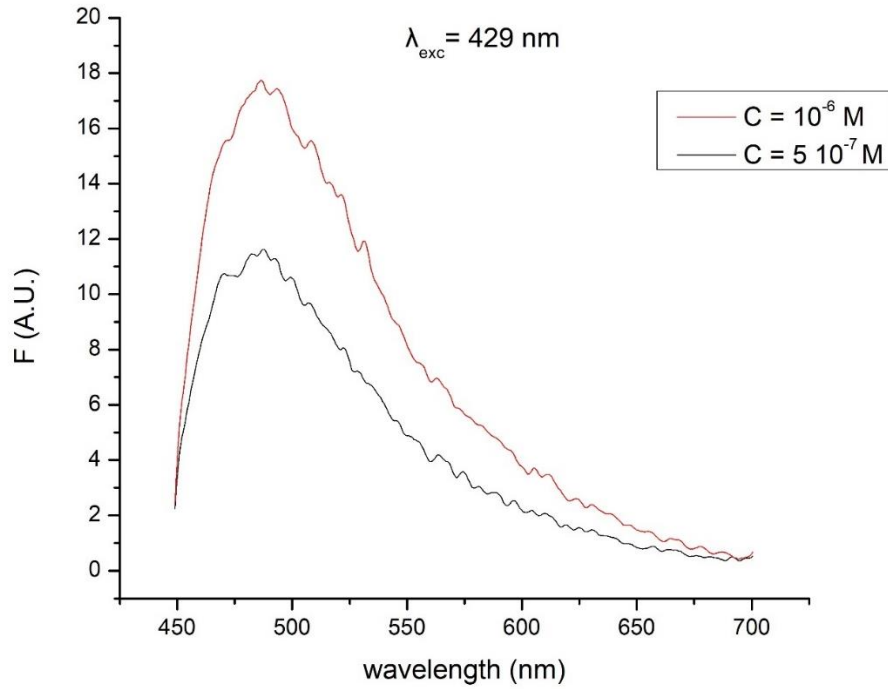
Διάγραμμα Θ.12: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO με συγκέντρωση 10^{-7} M

Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται τα φάσματα φθορισμού της ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-7} M, ενώ στο δεύτερο διάγραμμα τα φάσματα φθορισμού της εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^{-7}$ M και 10^{-7} M. Η επιλογή της διέγερσης έγινε στο μήκος κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης δηλαδή τα 437 nm. Ενώ, στα διαγράμματα Θ. και Θ. φαίνονται συγκριτικά τα φάσματα φθορισμού της ελεύθερης και της εγκλεισμένης ουσίας για τις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

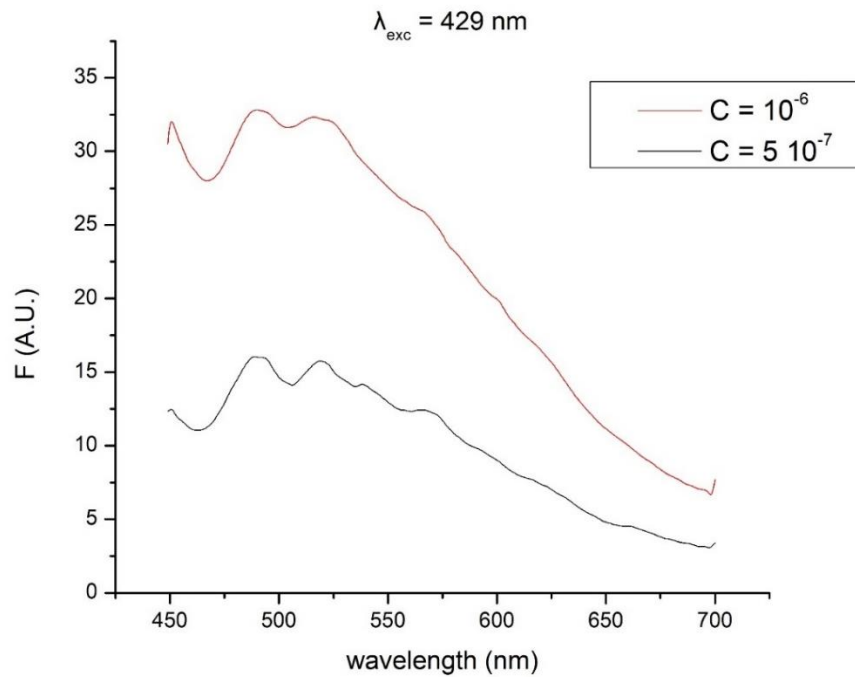
Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, τόσο για την ελεύθερη όσο και για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη μεταβάλλονται με την συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, μικρότερες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης έδωσαν μικρότερη ένταση φθορισμού και στις δύο περιπτώσεις.
- Οι δύο ουσίες, ελεύθερη και εγκλεισμένη κουρκουμίνη, παρουσιάζουν μέγιστο εκπεμπόμενο φθορισμό στα 531 nm για την ελεύθερη και 520 nm για την εγκλεισμένη. Γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει μια μετατόπιση 11 nm στο φάσμα.
- Η ελεύθερη κουρκουμίνη παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές εκπεμπόμενου φθορισμού σε σύγκριση με την εγκλεισμένη, όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση. Συγκεκριμένα η ελεύθερη κουρκουμίνη για συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M παρουσίασε μέγιστο φθορισμό με τιμή 617 (A.U.) και για συγκέντρωση 10^{-7} M, 156 (A.U.) στα 531 nm, ενώ η εγκλεισμένη για συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M παρουσίασε μέγιστο φθορισμό με τιμή 72,17 (A.U.) και για συγκέντρωση 10^{-7} M, 17,81 (A.U.) στα 531 nm.

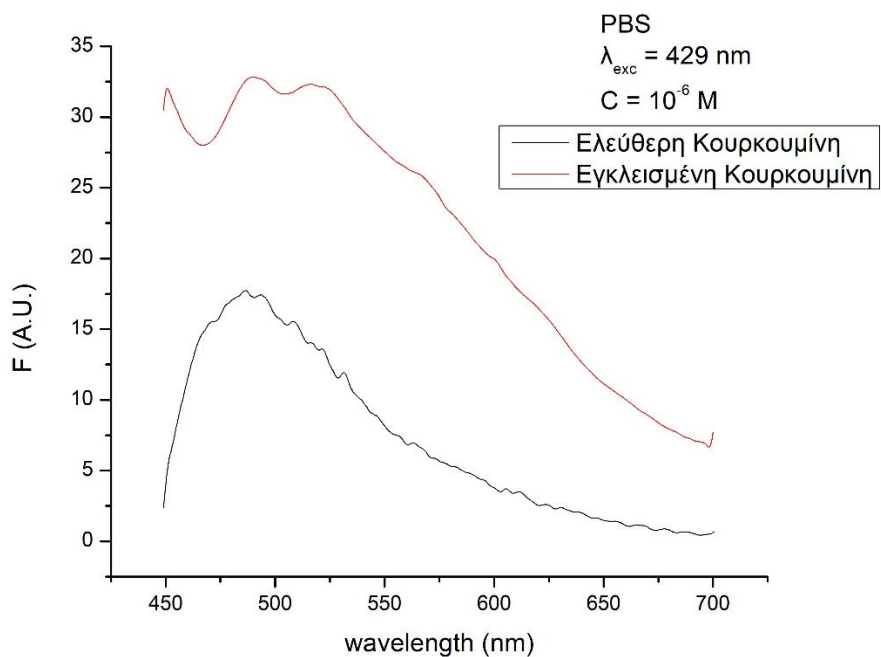
Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν για τον διαλύτη PBS. Στο πρώτο διάγραμμα απεικονίζονται τα φάσματα φθορισμού της ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS για συγκεντρώσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7}$ M, ενώ στο δεύτερο διάγραμμα τα φάσματα φθορισμού της εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη DMSO για τις ίδιες συγκεντρώσεις. Η επιλογή της διέγερσης έγινε στο μήκος κύματος εμφάνισης της μέγιστης απορρόφησης δηλαδή τα 429 nm. Ενώ, στα διαγράμματα Θ. και Θ. φαίνονται συγκριτικά τα φάσματα φθορισμού της ελεύθερης και της εγκλεισμένης ουσίας για τις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.



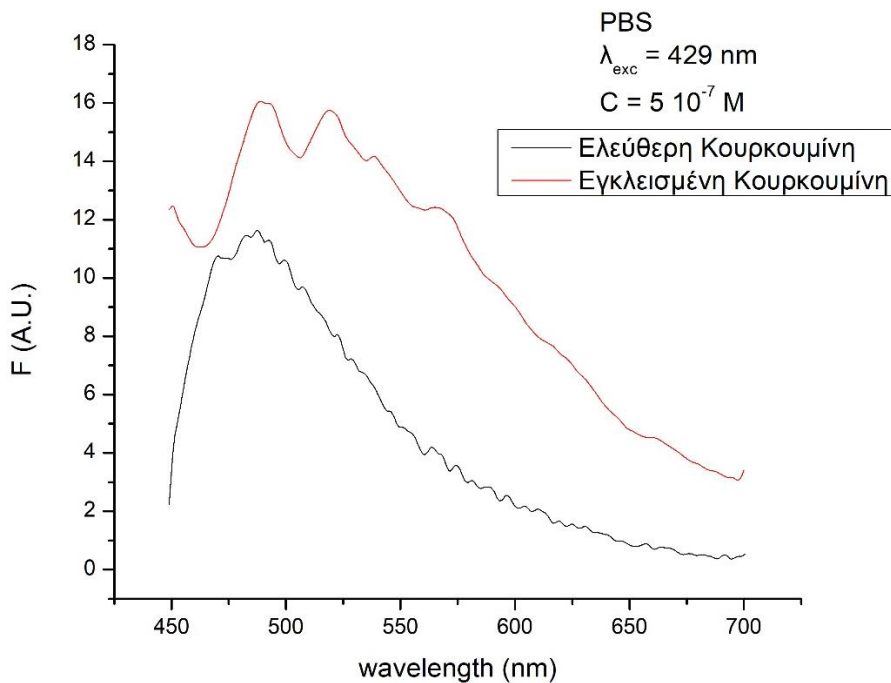
Διάγραμμα Θ.13: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS για συγκεντρώσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$



Διάγραμμα Θ.14: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS για συγκεντρώσεις 10^{-6} M και $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$



Διάγραμμα Θ.15: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS με συγκέντρωση 10^{-6} M



Διάγραμμα Θ.16: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης και εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαλύτη PBS με συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Οι δύο μορφές της κουρκουμίνης, ελεύθερη και εγκλεισμένη, παρουσιάζουν μέγιστο εκπεμπόμενο φθορισμό σε σχετικά ίδια μήκη κύματος, με τιμή 487 nm για την ελεύθερη και 490 nm για την εγκλεισμένη.
- Σε αυτήν την περίπτωση, η εγκλεισμένη κουρκουμίνη παρουσίασε μεγαλύτερη εκπομπή φθορισμού από ότι η ελεύθερη. Συγκεκριμένα η ελεύθερη κουρκουμίνη για συγκέντρωση 10^{-6} M παρουσίασε μέγιστο φθορισμό με τιμή 17,71 (A.U.) και για συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M, 11,60 (A.U.) στα 487 nm, ενώ η εγκλεισμένη για συγκέντρωση 10^{-6} M παρουσίασε μέγιστο φθορισμό με τιμή 34,41 (A.U.) και για συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M, 16,88 (A.U.) στα 490 nm. Αυτό συνεπάγεται την βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας της κουρκουμίνης με τον εγκλεισμό της στα νιοσώματα, καθιστώντας τα πολλά υποσχόμενους παράγοντες φωτοδιάγνωσης. Σύμφωνα με την έρευνα των Mandal et al., που κατέληξαν στο ίδιο αποτέλεσμα, η λιγότερη αλληλεπίδραση της με το νερό οδηγεί σε μεγαλύτερες εκπομπές φθορισμού. ^[69]
- Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, τόσο για την ελεύθερη όσο και για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη μεταβάλλονται με την συγκέντρωση. Μικρότερες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης έδωσαν μικρότερη ένταση φθορισμού και στις δύο περιπτώσεις.

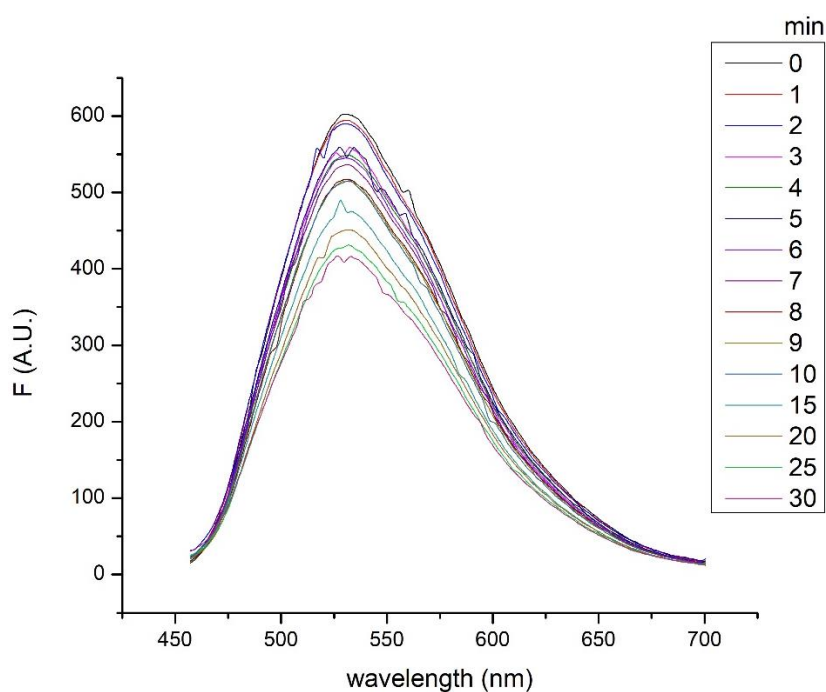
Δείγμα Κουρκουμίνης	Διαλύτης	Συγκέντρωση (M)	λ_{exc} (nm)	F (A.U.)
Ελεύθερη	DMSO	$5 \cdot 10^{-7}$	437	617
		10^{-7}		156
	PBS	10^{-6}	429	17,71
		$5 \cdot 10^{-7}$		11,60
Εγκλεισμένη σε νιοσώματα	DMSO	$5 \cdot 10^{-7}$	437	72,17
		10^{-7}		17,81
	PBS	10^{-6}	429	34,41
		$5 \cdot 10^{-7}$		16,88

Πίνακας Θ.9: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης

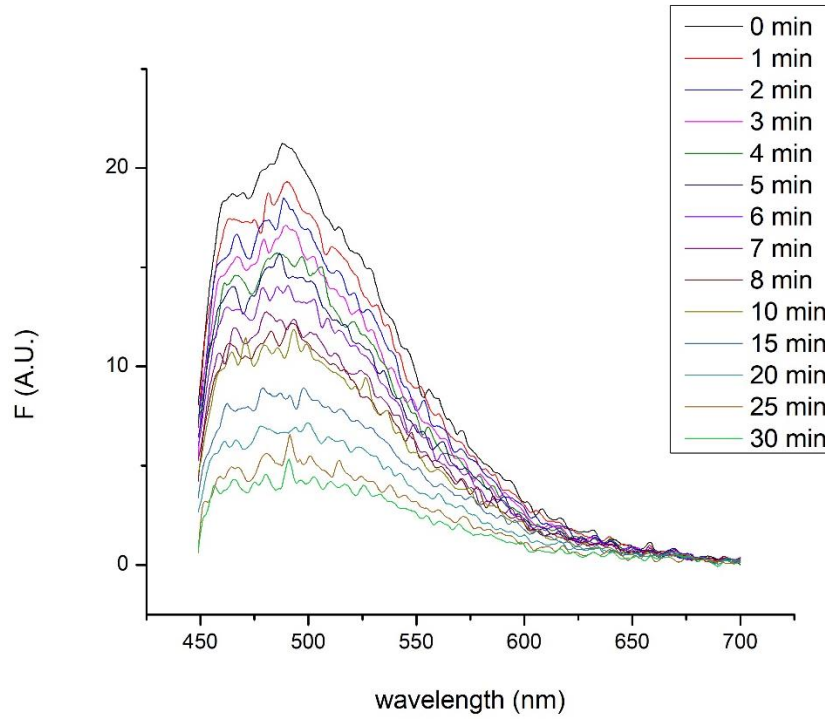
Θ.8. Μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο μέτρησης φθορισμού

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα Z.4.3. Έτσι από τα μητρικά διαλύματα της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης έχουν ετοιμαστεί διαλύματα με διαλύτη το DMSO και συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-7}$ M και γίνεται η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού με το φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer στο εύρος 450 – 700 nm. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται ανά 1 min ακτινοβολήσης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν $12,55 \text{ mW/cm}^2$ για την ελεύθερη κουρκουμίνη και 13 mW/cm^2 για την εγκλεισμένη. Η διέγερση έγινε στο μέγιστο της απορρόφησης τους για τον διαλύτη DMSO, δηλαδή στα 437 nm.

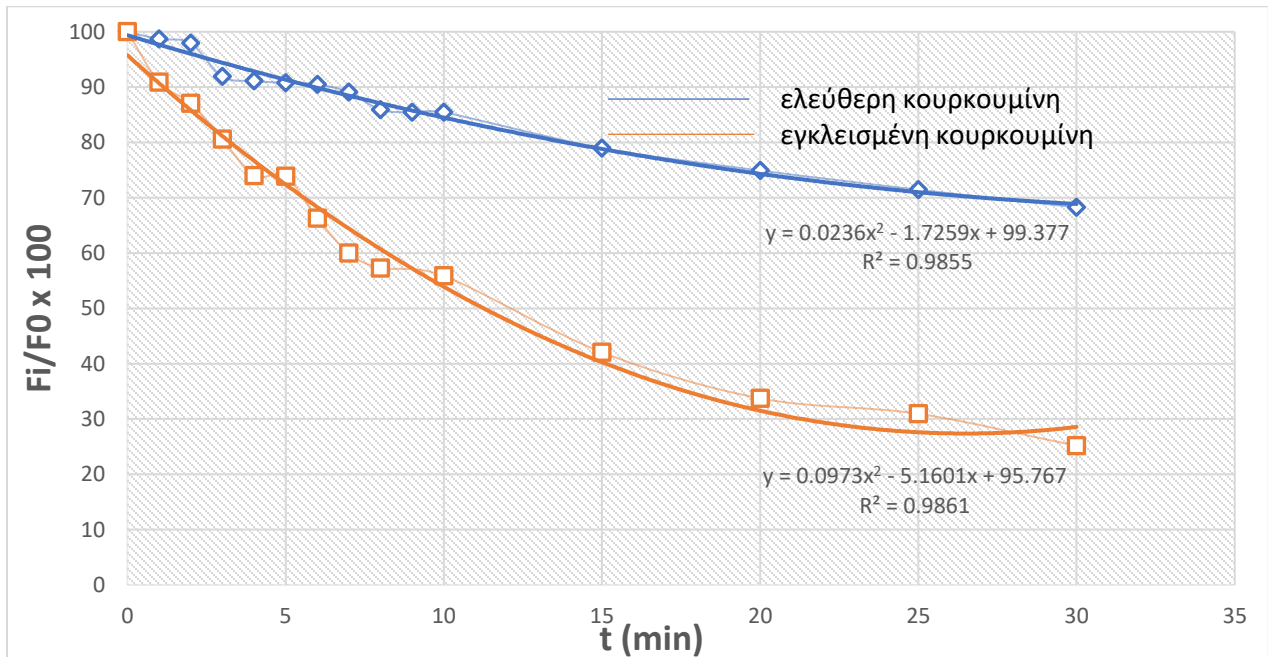
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν για την ακτινοβολήση από 0 έως 30 min και το συγκριτικό διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού σε σχέση με τους χρόνους ακτινοβολήσης για την ελεύθερη κουρκουμίνη και την εγκλεισμένη.



Διάγραμμα Θ.17: Φάσμα φθορισμού ελεύθερης κουρκουμίνης για ακτινοβολήση από 0 έως 30 min



Διάγραμμα Θ.18: Φάσμα φθορισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης για ακτινοβόληση από 0 έως 30 min



Διάγραμμα Θ.19: Ποσοστιαία μεταβολή της μέγιστης τιμής φθορισμού ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης

Χρόνος (min)	Ακτινοβολήσης	Μέγιστη Τιμή Φθορισμού (A.U.) στα 437 nm	
		Ελεύθερη Κουρκουμίνη	Εγκλεισμένη Κουρκουμίνη
0		602,22	21,26
1		594,43	19,31
2		589,68	18,49
3		553,44	17,12
4		548,66	15,72
5		546,58	15,71
6		544,98	14,09
7		536,41	12,75
8		517,30	12,17
9		514,54	11,99
10		514,47	11,87
15		475,54	8,94
20		451,17	7,17
25		430,24	6,57
30		411,15	5,34

Πίνακας Θ.10: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβολήσης και μέγιστης τιμής φθορισμού στα 437 nm της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης

Από τα παραπάνω προκύπτουν τα εξής:

- Η μέγιστη ένταση φθορισμού μειώνεται με το χρόνο ακτινοβολήσης ακολουθώντας πολυωνυμική συνάρτησης 2^{ου} βαθμού. Πιο συγκεκριμένα, Η καμπύλη μεταβολής της μέγιστης έντασης φθορισμού της ελεύθερης κουρκουμίνης περιγράφεται από την εξίσωση: $y = 0,0236x^2 - 1,7259x + 99,377$ με $R^2 = 0,9855$, όπου y είναι η τιμή του μέγιστου φθορισμού μετά την ακτινοβολήση και x ο χρόνος της ακτινοβολήσης. Η καμπύλη μεταβολής για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη περιγράφεται από την εξίσωση $y = 0,0973x^2 - 5,1601x + 95,767$ με $R^2 = 0,9861$, όπου ομοίως y είναι η τιμή του μέγιστου φθορισμού μετά την ακτινοβολήση και x ο χρόνος της ακτινοβολήσης.
- Ο μέγιστος φθορισμός πριν την έναρξη της ακτινοβολήσης για την ελεύθερη κουρκουμίνη έχει την τιμή 602,22 ενώ έπειτα από ακτινοβολήση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 411,15. Παρατηρείται δηλαδή μια πτώση της τάξης του 32% στο μέγιστο φθορισμό στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά, ενώ στα πρώτα 10 λεπτά παρατηρείται μείωση της τάξης του 14%. Ενώ για την εγκλεισμένη ο μέγιστος φθορισμός πριν την

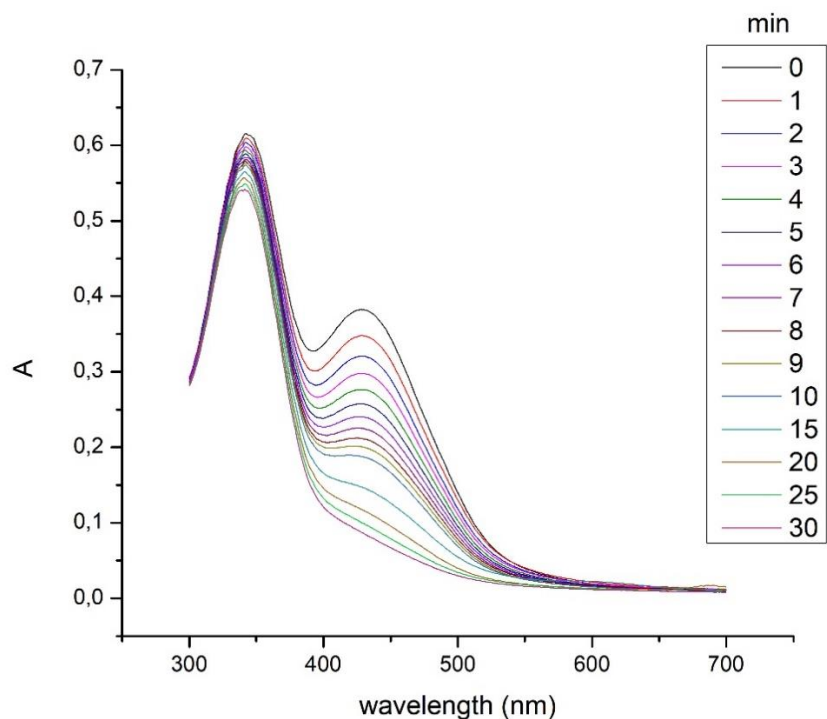
έναρξη της ακτινοβόλησης έχει την τιμή 21,26 ενώ έπειτα από ακτινοβόληση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 5,34. Προκύπτει δηλαδή μια πτώση της τάξης του 75% στο μέγιστο φθορισμό στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά, ενώ σε αυτήν την περίπτωση πρώτα 10 λεπτά παρατηρείται μείωση της τάξης του 44%.

- Η μέγιστη ένταση φθορισμού έδειξε πολυωνυμική μείωση με το χρόνο ακτινοβόλησης και για τις δύο ουσίες.
- Η ελεύθερη κουρκουμίνη έδειξε μεγαλύτερη αντίσταση στη φωτολεύκανση σε σχέση με την εγκλεισμένη και φάνηκε ωστόσο ότι παρουσιάζει μεγάλη φωτοσταθερατότητα, όπως έχει επιβεβαιωθεί και στη βιβλιογραφία από την μελέτη των Kazantzis et. al. ^[41]

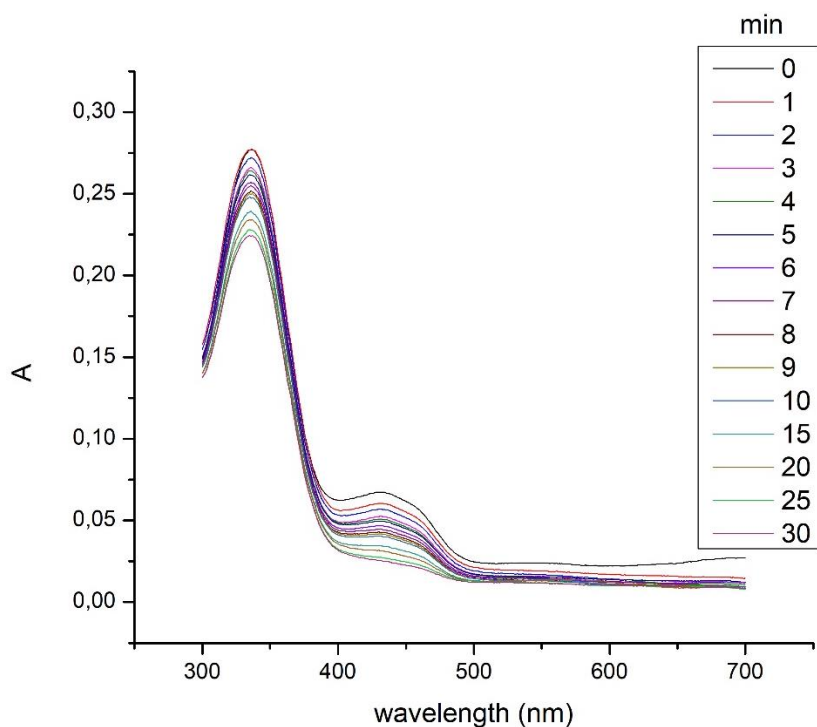
Θ.9. Μελέτη παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) με απορρόφηση με χρήση NADH

Ακολουθείται η διαδικασία που έχει περιγραφεί στην ενότητα ΣΤ.4.4. Έτσι από το μητρικό διάλυμα της ελεύθερης κουρκουμίνης προετοιμάστηκε το διάλυμα προς μέτρηση, το οποίο τελικά περιείχε ελεύθερη κουρκουμίνη συγκέντρωσης 10^{-5} M, NADH 10^{-4} M και EDTA 10^{-7} M. Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν ανά 1 min ακτινοβόλησης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min στο εύρος 300 - 700 nm. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν $12,68 \text{ mW/cm}^2$. Ομοίως για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη από το μητρικό διάλυμα προετοιμάστηκε το διάλυμα προς μέτρηση, το οποίο τελικά περιείχε εγκλεισμένη κουρκουμίνη συγκέντρωσης 10^{-5} M, NADH $3,7 \cdot 10^{-4}$ M και EDTA 10^{-7} M. Τα φάσματα απορρόφησης και σε αυτή την περίπτωση λήφθησαν ανά 1 min ακτινοβόλησης για διάστημα 0 έως 10 min και έπειτα ανά 5 min για το διάστημα 10 min έως 30 min στο εύρος 300 - 700 nm. Η ισχύς της ακτινοβολίας ήταν 13 mW/cm^2 .

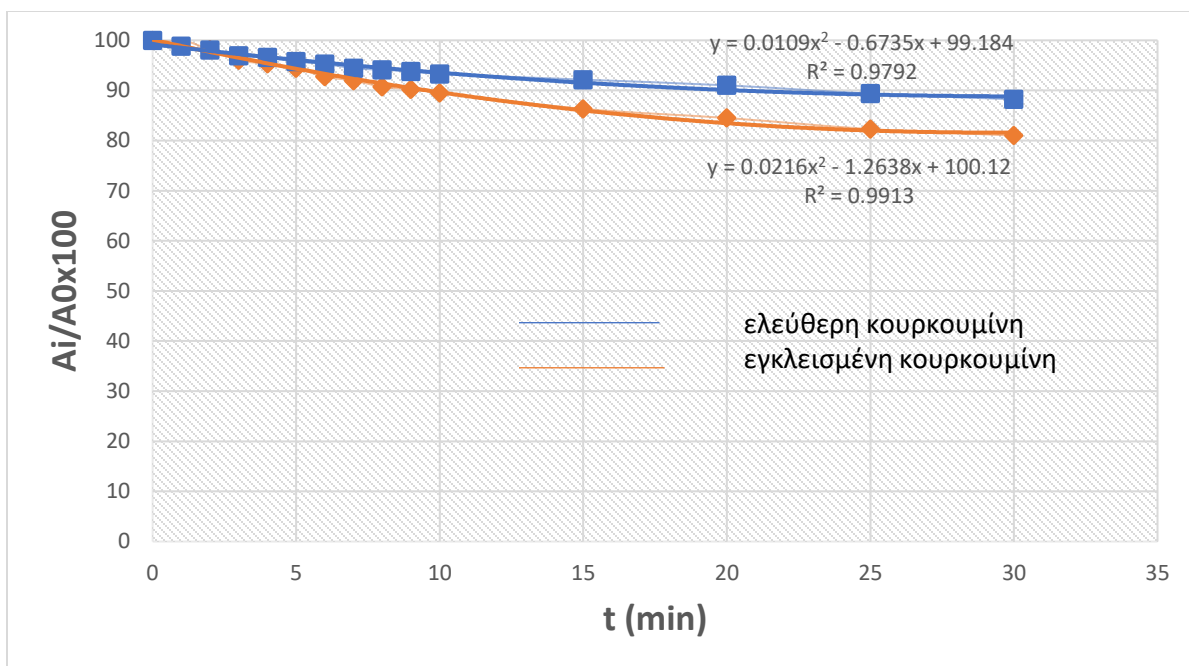
Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης (Διάγραμμα Θ.12) και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης (Διάγραμμα Θ.13) στους διάφορους χρόνους ακτινοβόλησης (σχήμα 49), καθώς και το συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης (Διάγραμμα Θ.14), καθώς και ο πίνακας Θ.10 με τις μέγιστες τιμές απορρόφησης για τις δύο ουσίες στους χρόνους ακτινοβόλησης.



Διάγραμμα Θ.20: Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολήσης ελεύθερης κουρκουμίνης για χρονικό διάστημα 0-30 min σε PBS



Διάγραμμα Θ.21: Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολήσης εγκλεισμένης κουρκουμίνης για χρονικό διάστημα 0-30 min σε DMSO



Διάγραμμα Θ.14: Μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβόλησης για την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη

Χρόνος (min)	Ακτινοβόλησης	Μέγιστη Τιμή Απορρόφησης στα 340 nm	
		Ελεύθερη Κουρκουμίνη	Εγκλεισμένη Κουρκουμίνη
0		0,612	0,2768
1		0,605	0,2776
2		0,600	0,2717
3		0,593	0,2659
4		0,591	0,2639
5		0,586	0,2615
6		0,583	0,2568
7		0,578	0,2546
8		0,576	0,2512
9		0,574	0,2498
10		0,571	0,2479
15		0,564	0,2390
20		0,557	0,2340
25		0,547	0,2279
30		0,540	0,2243

Πίνακας Θ.11: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και μέγιστης τιμής απορρόφησης στα 340 nm της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης

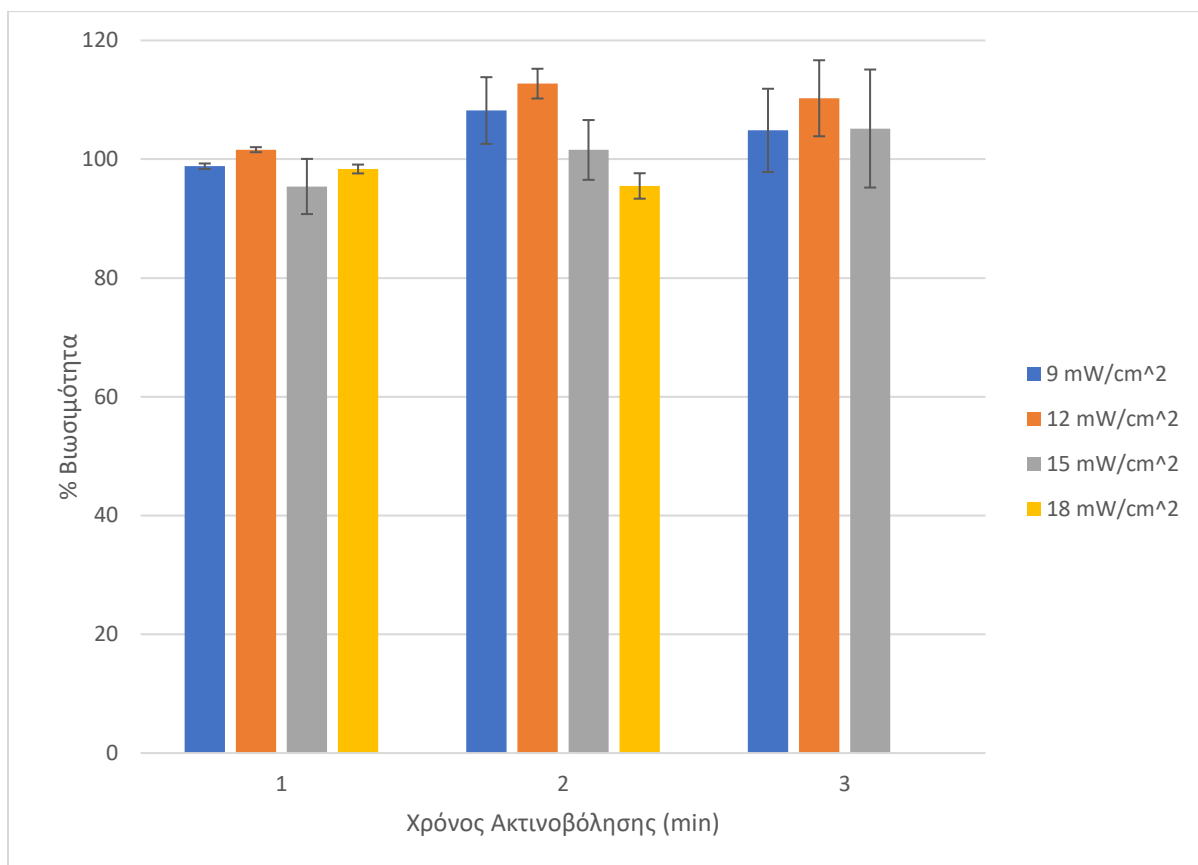
Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Στα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης αλλά και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης παρατηρούνται δύο κορυφές. Η μία κορυφή είναι γύρω στα 450 nm και αφορά την κουρκουμίνη, ενώ η δεύτερη κορυφή παρατηρείται στα 340 nm και αντιστοιχεί στο διάλυμα του NADH. Παρατηρείται μείωση των κορυφών και στις δύο περιπτώσεις συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης. Η μείωση της πρώτης αφορά στην φωτολεύκανση της ουσίας, ενώ της δεύτερης στην οξείδωση του NADH σε NAD⁺ με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών στο διάλυμα.
- Οι εξισώσεις που περιγράφουν τη μεταβολή της απορρόφησης στα 340nm σε σχέση με το χρόνο της ακτινοβολήσης $y = 0,0109x^2 - 0,6735x + 99,184$ με $R^2 = 0,9792$ για την ελεύθερη κουρκουμίνη και $y = 0,0216x^2 - 1,2638x + 100,12$ με $R^2 = 0,9913$ για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη, όπου y είναι η τιμή της απορρόφησης και x ο χρόνος της ακτινοβολήσης. Παρατηρείται δηλαδή πτώση της κορυφής απορρόφησης και στις δύο περιπτώσεις σε σχέση με τον χρόνο της ακτινοβολήσης.
- Η τιμή της απορρόφησης πριν την έναρξη της ακτινοβολήσης για την ελεύθερη κουρκουμίνη ήταν 0,612, ενώ έπειτα από ακτινοβολήση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 0,540. Παρατηρείται δηλαδή μια πτώση της τάξης του 12 % στην απορρόφηση στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά. Ενώ για την εγκλεισμένη η απορρόφηση πριν την έναρξη της ακτινοβολήσης έχει την τιμή 0,2768 ενώ έπειτα από ακτινοβολήση 30 λεπτών πέφτει στην τιμή 0,2243, δηλαδή προκύπτει μια πτώση της τάξης του 19 % στο διάστημα από 0 έως 30 λεπτά.
- Η πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340nm είναι ενδεικτική του σχηματισμού του NAD⁺ στο εκάστοτε διάλυμα και επομένως της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Συνεπώς η εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη, που παρουσιάζει ελαφρά πιο απότομη και μεγαλύτερη πτώση της κορυφής απορρόφησης από ότι η ελεύθερη, είναι θεωρητικά περισσότερο κατάλληλη για την χρήση της στη φωτοδυναμική θεραπεία. Το πείραμα με το NADH αποτελεί μία ένδειξη της δυνατότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών και υποδεικνύει δυνητικά αποτελεσματικούς φωτοευαισθητοποιητές.

Θ.10. Έλεγχος της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων

Στο σημείο αυτό γίνεται η μελέτη της επίδρασης του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων A431. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα Η.3.8. Τα πειράματα διεξάγονται για τέσσερις τιμές ισχύος της ακτινοβολίας. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται ακτινοβολήση με ρυθμούς ροής ισχύος των 9 mW/cm², 12 mW/cm² και 15 mW/cm² πραγματοποιήθηκαν για χρόνους διάρκειας 1 min, 2 min, 3 min, ενώ η δόση των 18 mW/cm² για 1 min και 2 min. Συνολικά οι δόσεις ενέργειας είναι οι εξής: 540 mJ/cm², 1080 mJ/cm², 1620 mJ/cm², 720 mJ/cm², 1440 mJ/cm², 2160 mJ/cm², 900 mJ/cm², 1800 mJ/cm², 2700 mJ/cm², 2160 mJ/cm² και 3240 mJ/cm².

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα βιωσιμότητας των κυττάρων (%) σε σχέση με τους χρόνους ακτινοβολήσης για τους τέσσερις ρυθμούς ροής ισχύος.



Διάγραμμα Θ.22: Βιωσιμότητα των κυττάρων (%) σε σχέση με τους χρόνους ακτινοβολήσης 1 min, 2 min και 3 min για 9 mW/cm², 12 mW/cm², 15 mW/cm² και 18 mW/cm²

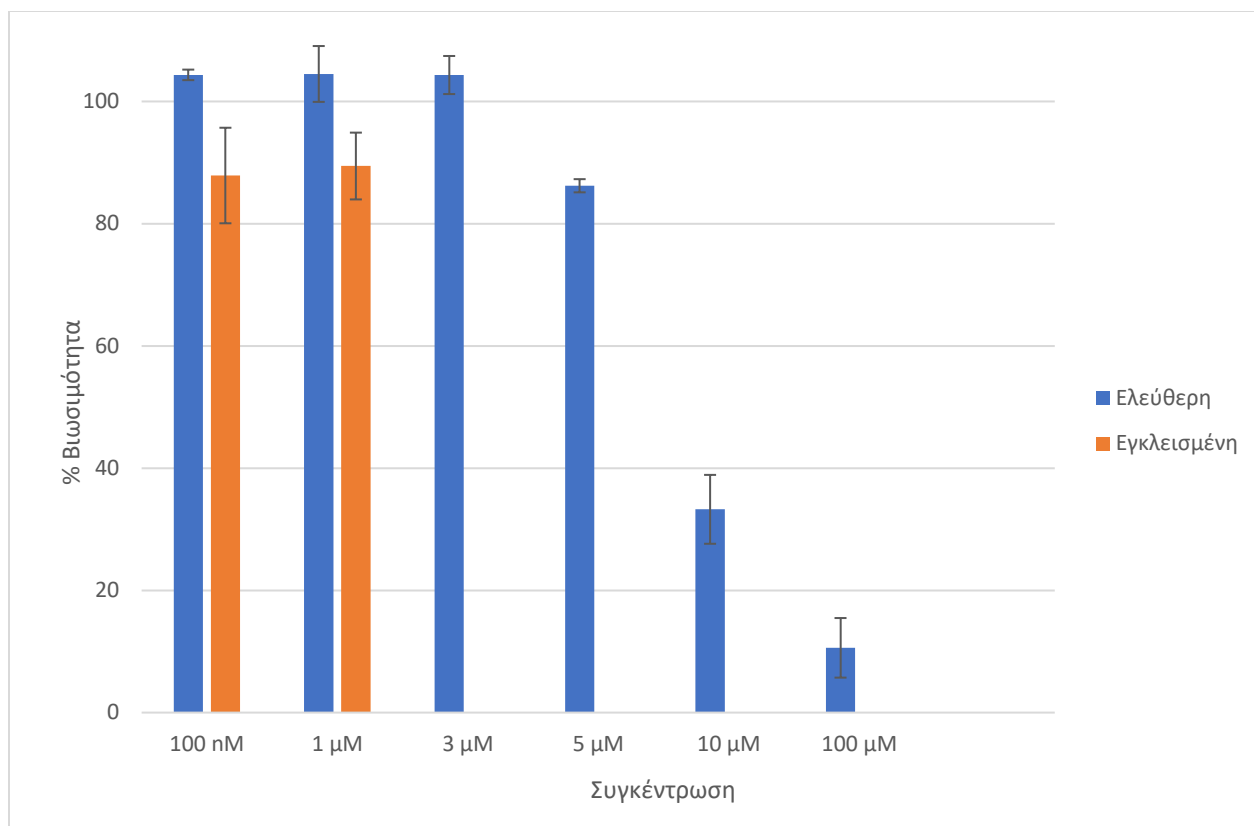
Από το διάγραμμα Θ.22 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 9 mW/cm^2 , αν και αρχικά παρουσιάζει μια μικρή πτώση, αυτή στατιστικά δεν είναι σημαντική και έτσι δεν είναι τοξική και μετά το πέρας των 2 min και 3 min οδηγεί σε ποσοστά βιωσιμότητας μεγαλύτερο του αρχικού, τα οποία επίσης δεν αποτέλεσαν στατιστικά σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, στο 1 min έδωσε βιωσιμότητα 98,81 %, στα 2 min 108,2 % και στα 3 min 104,86 %.
- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 12 mW/cm^2 επίσης δεν είναι τοξική και από το πρώτο λεπτό της ακτινοβολήσης οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στο 1 min παρουσίασε βιωσιμότητα 101,60 %, στα 2 min 112,72 % και στα 3 min 110,26 %, ποσοστά τα οποία δεν είναι στατιστικά σημαντικά.
- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 15 mW/cm^2 αρχικά παρουσίασε μείωση στην βιωσιμότητα και στο 1 min έδωσε 95,41 %, στη συνέχεια όμως έδωσε αύξηση, έτσι στα 2 min παρουσίασε 101,56 % και στα 3 min 105,16 %. Ωστόσο τα ποσοστά αυτά δεν αποτελούν στατιστικά σημαντικά.
- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 18 mW/cm^2 προκαλεί πτώση στο ποσοστό βιωσιμότητας και στους δύο χρόνους που μελετάται, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι στο 1 min παρουσίασε 98,35 % και στα 2 min 95,49 %.
- Τελικά επιλέγεται να απορριφθεί η ισχύς των 18 mW/cm^2 καθώς παρουσίασε τα μικρότερα ποσοστά βιωσιμότητας και η φωτοδυναμική θεραπεία να πραγματοποιηθεί για τις ισχύς των 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 .

Θ.11. Έλεγχος της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα απουσία φωτός

Στο σημείο αυτό γίνεται η μελέτη της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα απουσία φωτός. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα Η.3.9. Τα πειράματα διεξάγονται για συγκεντρώσεις 100 μM , 10 μM , 5 μM , 3 μM , 1 μM και 100 nM όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη και 1 μM και 100 nM της εγκλεισμένης κουρκουμίνης.

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα βιωσιμότητας κυττάρων (%) σε σχέση με την τιμή συγκέντρωσης για την κάθε ουσία.



Διάγραμμα Θ.23: Βιωσιμότητα των κυττάρων (%) σε σχέση με την συγκέντρωση της κάθε ουσίας απουσίας φωτός

Από το διάγραμμα Θ.23. προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

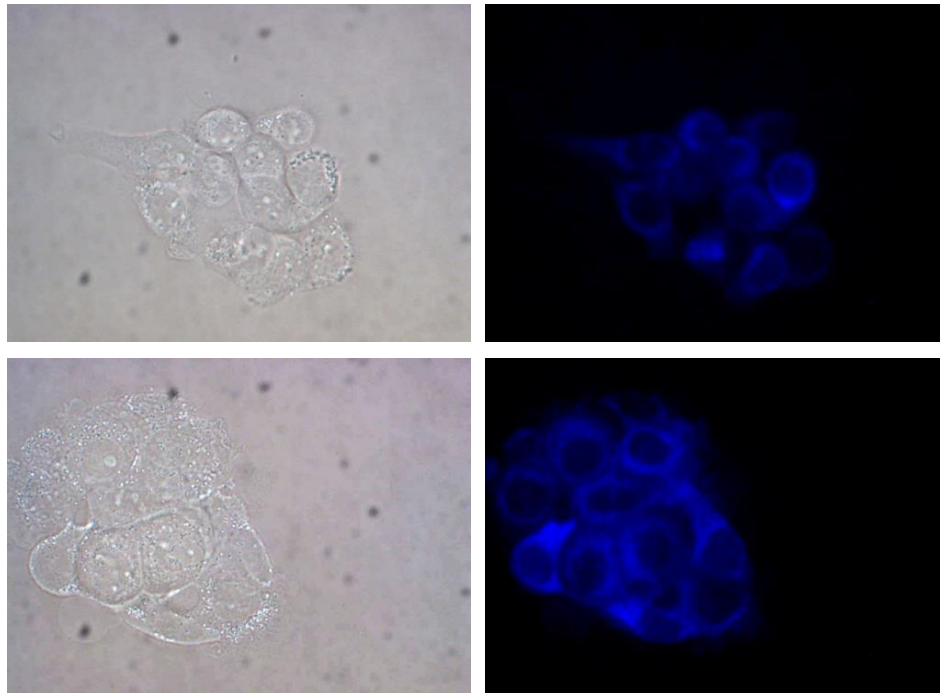
- Οι συγκεντρώσεις 5 μM , 10 μM και 100 μM της ελεύθερης κουρκουμίνης είναι τοξικές για τα κύτταρα, καθώς οδήγησαν σε σημαντική στατιστική μείωση της βιωσιμότητας με ποσοστά αντίστοιχα 86,21 %, 33,26 % και 10,59 %. Ενώ, η συγκέντρωση 3 μM οδηγεί σε μικρή αύξηση του ποσοστού βιωσιμότητας φτάνοντας το 104,32 %, χωρίς να είναι ωστόσο στατιστικά σημαντική αυτή η αύξηση. Οι συγκεντρώσεις αυτές μελετήθηκαν μόνο για την ελεύθερη κουρκουμίνη, καθώς τα νιοσώματα στα οποία εγκλείστηκε η κουρκουμίνη δεν ήταν εφικτό να διαλυθούν σε τόσο πυκνές συγκεντρώσεις. Έτσι μελετήθηκαν συγκριτικά οι συγκεντρώσεις 1 μM και 100 nM.
- Η συγκέντρωση 1 μM για την ελεύθερη κουρκουμίνη οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας σε ποσοστό 104,49 % χωρίς ωστόσο η αύξηση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι μικρές δόσεις φωτός έχει

παρατηρηθεί ότι ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στην περίπτωση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης παρατηρήθηκε μείωση της βιωσιμότητας με ποσοστό 89,43 %, το οποίο επίσης δεν είναι στατιστικά σημαντικό ώστε να θεωρηθεί τοξική για τα κύτταρα.

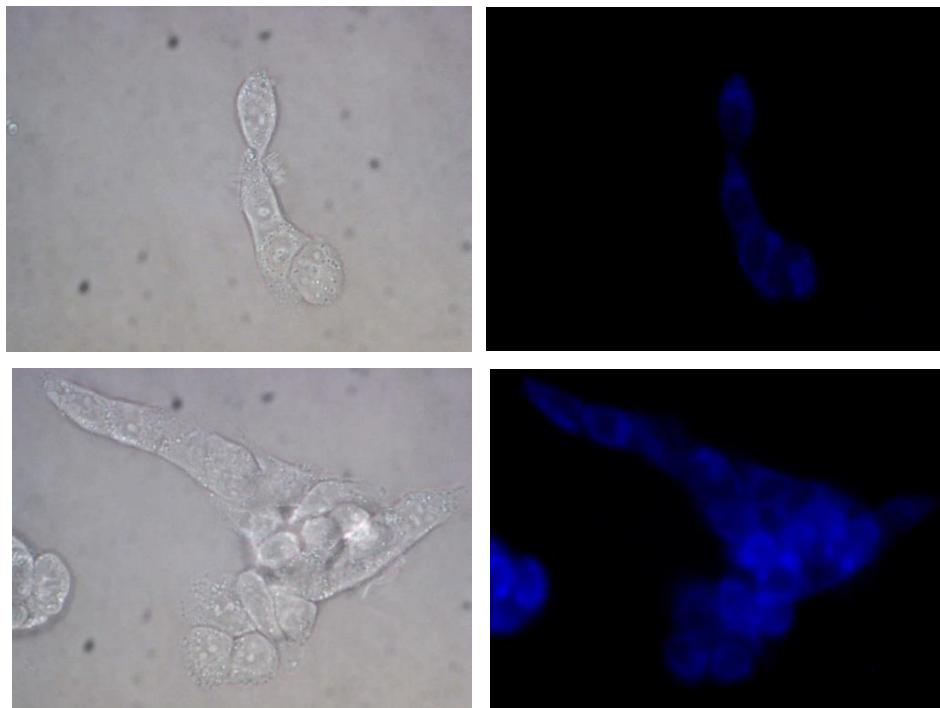
- Η συγκέντρωση 100 nM για την ελεύθερη κουρκουμίνη οδήγησε σε αύξηση της βιωσιμότητας σε ποσοστό 104,35 % παρόμοια με τη συγκέντρωση 1 μ M. Στην εγκλεισμένη κουρκουμίνη παρατηρήθηκε μείωση της βιωσιμότητας με ποσοστό 87,88 % παρουσιάζοντας μεγαλύτερη πτώση σε σχέση με την συγκέντρωση 1 μ M. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση το ποσοστό αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό.
- Τελικά από τις συγκεντρώσεις των 1 μ M και 100 nM που φαίνονται να μην είναι τοξικές στα κύτταρα και στις δύο περιπτώσεις, επιλέγεται η πιο πυκνή συγκέντρωση των 1 μ M για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Θ.12. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα

Σε αυτό το σημείο γίνεται μελέτη του χωρικού εντοπισμού των δύο ουσιών στα κύτταρα με τη μεθοδολογία που αναλύθηκε στο κεφάλαιο Η.3.10., καθώς η θέση της συσσώρευσης της ουσίας έχει άμεση σχέση με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Συνοπτικά, πραγματοποιείται προσθήκη των συγκεντρώσεων 1 μ M της ελεύθερης και της εγκλεισμένης κουρκουμίνης σε διαφορετικά τριβλία και αφήνονται 3 hr για επώαση στο κλίβανο. Μετά το πέρας των 3 hr, παρατηρείται κάθε ουσία στο μικροσκόπιο φθορισμού Olympus BX-50. Οι εικόνες οπτικού μικροσκοπίου (brightfield) λαμβάνονται με χρόνο έκθεσης στα 50s, ενώ οι εικόνες φθορισμού με χρόνο έκθεσης στο 1s και γίνεται λήψη των εικόνων.



Εικόνα Θ.5: Απεικόνιση χωρικού εντοπισμού ελεύθερης κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα, αριστερά με οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά με μικροσκόπιο φθορισμού



Εικόνα Θ.6: Απεικόνιση χωρικού εντοπισμού εγκλεισμένης κουρκουμίνης στα καρκινικά κύτταρα, αριστερά με οπτικό μικροσκόπιο, δεξιά με μικροσκόπιο φθορισμού

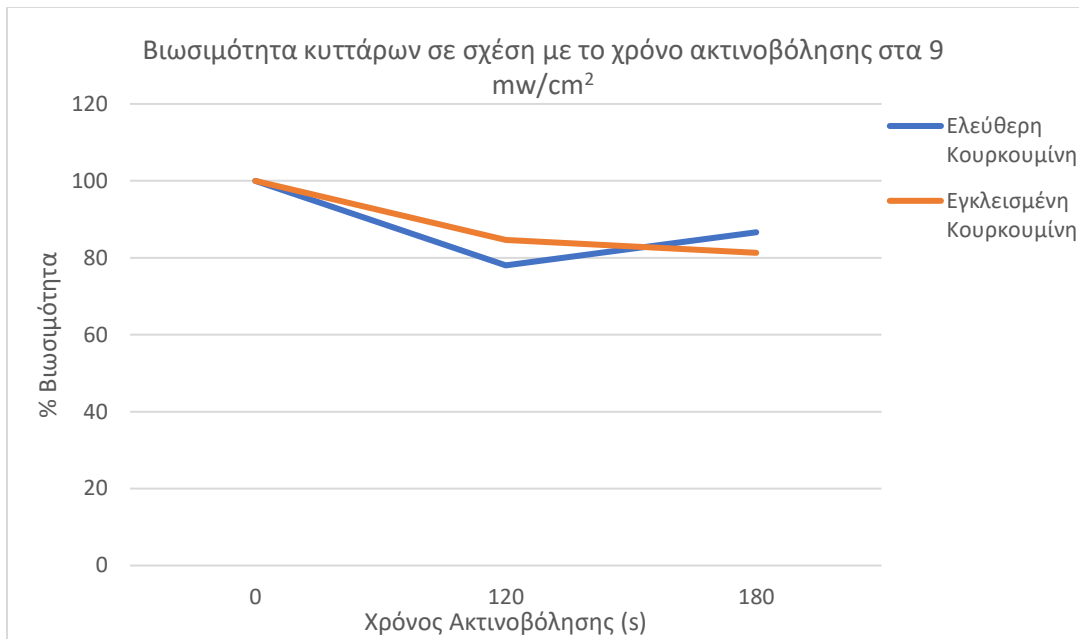
Από τις εικόνες Θ.5. και Θ.6. προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η συσσώρευση και των δύο ουσιών φαίνεται να μην πραγματοποιείται στον πυρήνα αλλά γύρω από αυτόν. Ο πυρήνας στις εικόνες απεικονίζεται από την σκοτεινή περιοχή στο κέντρο του κυττάρου. Αυτό είναι θεμιτό όπως έχει αναλυθεί στο κεφάλαιο Η.3.10 καθώς η συσσώρευση στον πυρήνα μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο DNA μεταλλάξεις και περαιτέρω καρκινογένεση
- Το διάστημα των 3 hr φαίνεται να είναι αρκετό ώστε να απορροφηθούν και οι δύο ουσίες από τα κύτταρα και παράλληλα να μην προκληθούν αλλοιώσεις στην μορφολογία των κυττάρων και κατ' επέκταση να μην είναι τοξικές για τα κύτταρα.
- Ο φθορισμός της ελεύθερης κουρκουμίνης δείχνει να είναι ελαφρώς πιο έντονος από της εγκλεισμένης. Μεγαλύτερη ένταση φθορισμού συνεπάγεται και μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας. Προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ελεύθερη κουρκουμίνη έχει εισχωρήσει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο διάστημα των 3 ωρών από ότι η εγκλεισμένη κουρκουμίνη στο συγκεκριμένο μοντέλο καρκινικών κυττάρων.

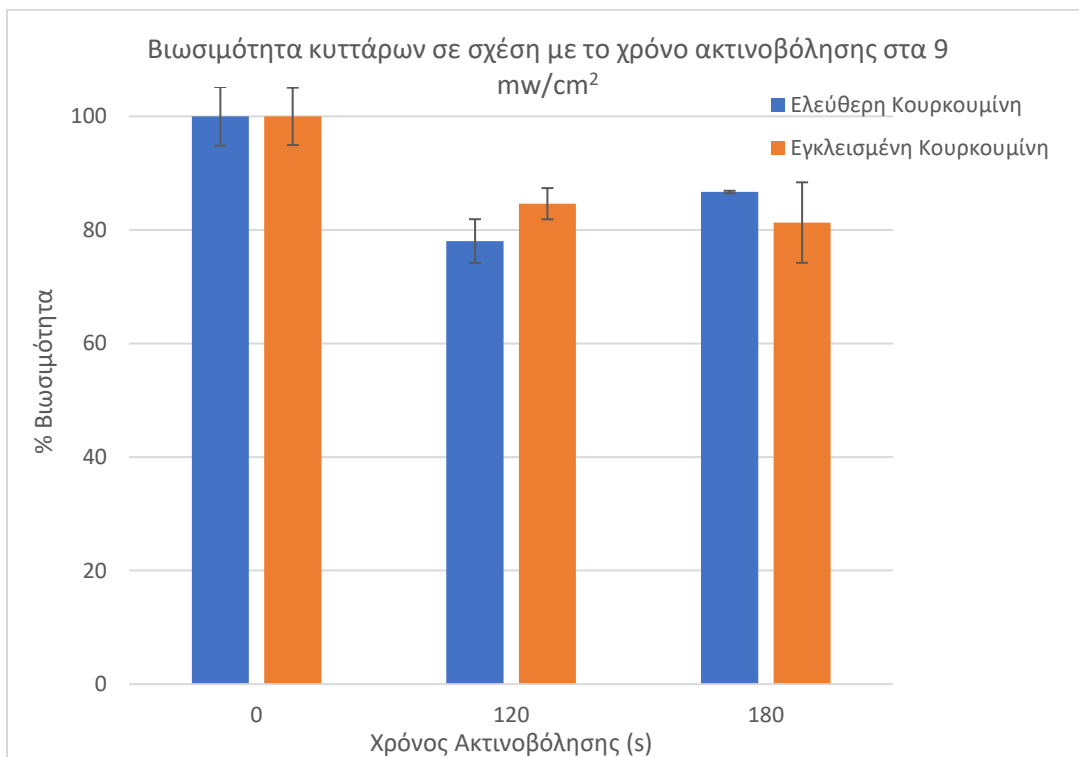
Θ.13. Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431 με τη χρήση ελεύθερης και εγκλεισμένης σε νιοσώματα κουρκουμίνης

Στο σημείο αυτό γίνεται εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας με φωτοευαίσθητες ουσίες την ελεύθερη κουρκουμίνη και την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη με συγκέντρωση 1 μM που επιλέχθηκε από τα πειράματα κυτταροτοξικότητας (drug only). Η ακτινοβολία πραγματοποιείται για τους τρεις ρυθμούς ροής ισχύος 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 για χρόνους διάρκειας 2 min και 3 min για τα 9 mW/cm^2 και 1 min, 2 min και 3 min για 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 . Άρα οι συνολικές δόσεις ενέργειας είναι 540 mJ/cm^2 , 1080 mJ/cm^2 , 1620 mJ/cm^2 , 720 mJ/cm^2 , 1440 mJ/cm^2 , 2160 mJ/cm^2 , 900 mJ/cm^2 , 1800 mJ/cm^2 και 2700 mJ/cm^2 . Η διάταξη της ακτινοβολίας είναι η πηγή Bridgelux Power LED 10W που αναλύθηκε στο κεφάλαιο Η.3. Οι τιμές τόσο της συγκέντρωσης όσο της ισχύος επιλέχθηκαν με βάση το γεγονός ότι δεν επηρεάζουν τα κύτταρα από μόνες τους.

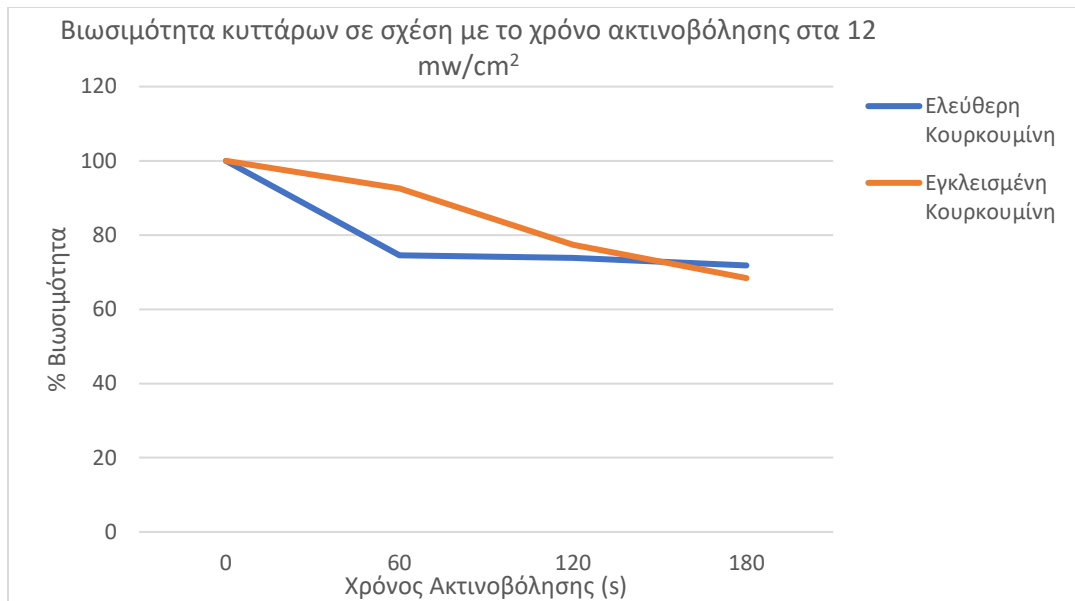
Παρατίθενται παρακάτω τα διαγράμματα βιωσιμότητας των κυττάρων (%) σε σχέση με το χρόνο ακτινοβολίας για κάθε ισχύ, έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη και ο συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων.



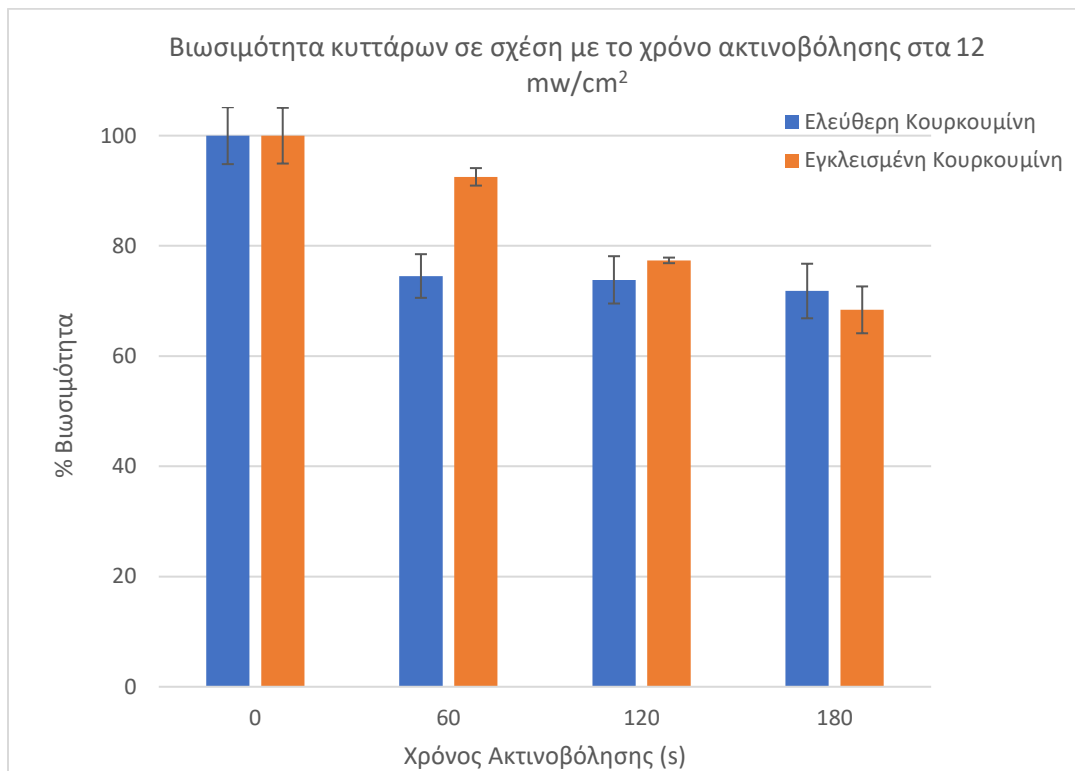
Διάγραμμα Θ.24: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη



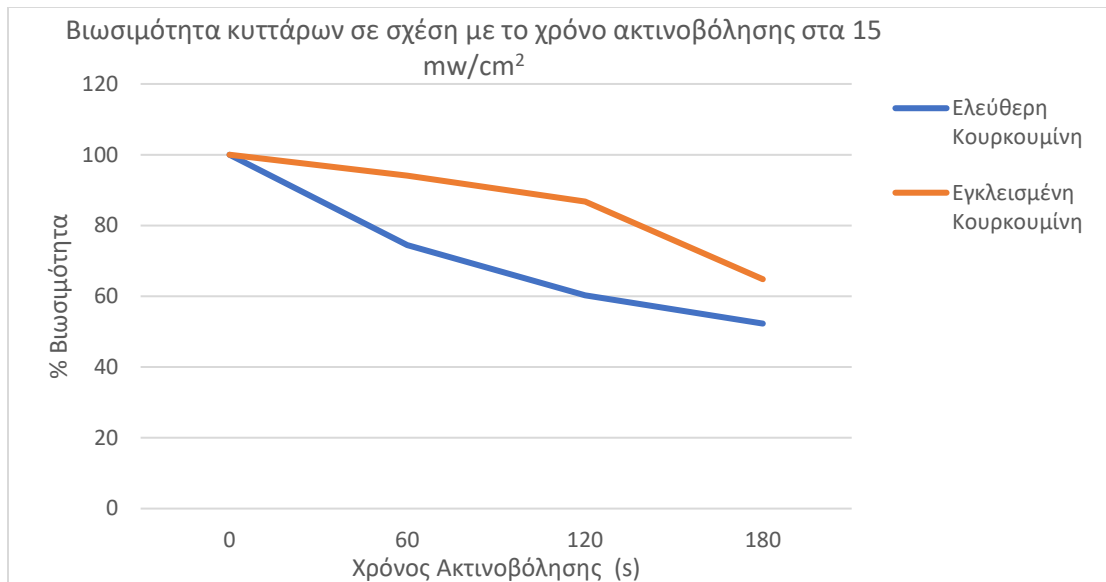
Διάγραμμα Θ.25: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη



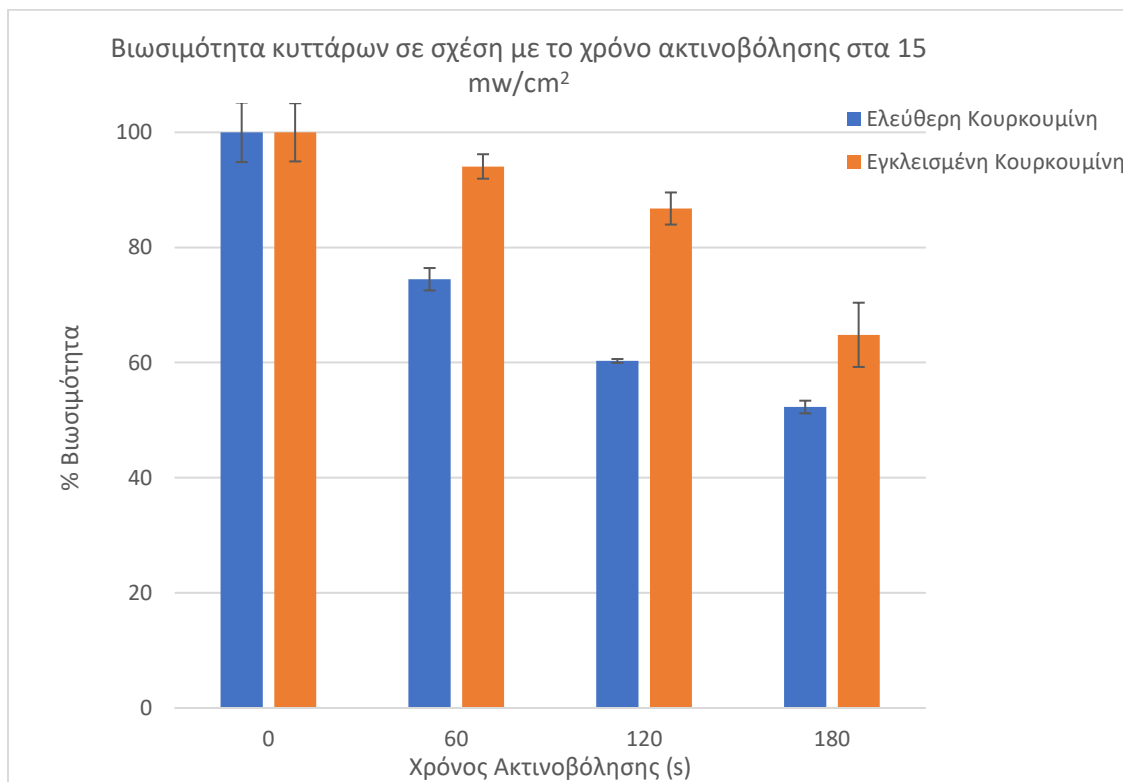
Διάγραμμα Θ.26: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 12 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη



Διάγραμμα Θ.27: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 12 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη



Διάγραμμα Θ.28: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 15 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη



Διάγραμμα Θ.29: Βιωσιμότητα κυττάρων σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης στα 9 mW/cm², έπειτα από επώαση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη κουρκουμίνη

Ισχύς Ακτινοβολήσης (mW/cm ²)	Χρόνος Ακτινοβολήσης (min)	Δόσεις Ενέργειας (mJ/cm ²)	Βιωσιμότητα (%) για την ελεύθερη κουρκουμίνη	Βιωσιμότητα (%) για την ελεύθερη κουρκουμίνη
9	2	1080	78,03	84,62
	3	1620	86,67	81,29
12	1	720	74,53	92,53
	2	1440	73,83	77,37
	3	2160	71,81	68,39
15	1	900	74,48	94,07
	2	1800	60,29	86,76
	3	2700	52,28	64,82

Πίνακας Θ.12: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας

Από τα παραπάνω προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 9 mW/cm² όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη στα 2 min (1080 mJ/cm²) προκαλεί μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 78,03%, το οποίο είναι και στατιστικά σημαντικό. Στα 3 min (1620 mJ/cm²) παρατηρείται μείωση στη βιωσιμότητα σε σχέση με συνθήκες απουσίας ακτινοβολήσης φτάνοντας στο στατιστικά σημαντικό ποσοστό των 86,67 %. Ωστόσο αυτό δείχνει ότι μια αύξηση σε σχέση με τη βιωσιμότητα των 2 min. Στην περίπτωση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης, ακτινοβολήση των 2 min στα 9 mW/cm², οδήγησε σε μείωση της βιωσιμότητας στα 84,62% ποσοστό στατιστικά σημαντικό και άρα και τοξικό προς τα κύτταρα. Ωστόσο στα 3 min αν και η μείωση συνεχίστηκε και έφτασε το 81,29 % αυτή φάνηκε να μην είναι στατιστικά σημαντική. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένες συνθήκες δεν είναι κατάλληλες για φωτοδυναμική δράση, καθώς παρατηρείται άλλη συμπεριφορά στα 2 min και άλλη στα 3 min. []
- Η ισχύς ακτινοβολήσης των 12 mW/cm² όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη για τους χρόνους 1 min, 2 min και 3 min παρουσιάζει μείωση στη βιωσιμότητα με τα αντίστοιχα και στατιστικά σημαντικά ποσοστά 74,53%, 73,83% και 71,81%. Στην περίπτωση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης, στο 1 min η βιωσιμότητα των κυττάρων

έφτασε το 92,52 %, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικό ποσοστό, ενώ στα 2 min μειώθηκε στα 77,3 % και στα 3 min στα 68,39% που είναι στατιστικά σημαντικά. Συγκρίνοντας, παρατηρείται ότι στα 1 min και 2 min η ελεύθερη κουρκουμίνη εμφανίζει καλύτερη φωτοδυναμική δράση από την εγκλεισμένη. Όμως στα 3 min αν και η εγκλεισμένη κουρκουμίνη παρουσιάζει μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας από ότι η ελεύθερη, το ποσοστό αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι για 3 min ακτινοβόλησης έχουν την ίδια φωτοδυναμική δράση.

- Η ισχύς ακτινοβόλησης των 15 mW/cm² έδειξε παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των 12 mW/cm². Πιο συγκεκριμένα, για την ελεύθερη κουρκουμίνη στους χρόνους των 1 min, 2 min και 3 min παρουσιάζει μείωση στη βιωσιμότητα με τα αντίστοιχα στατιστικά σημαντικά ποσοστά 74,81%, 60,29% και 52,28%. Στην περίπτωση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης, στο 1 min η βιωσιμότητα των κυττάρων έφτασε το 94,07 %, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικό ποσοστό, ενώ στα 2 min μειώθηκε στα 86,76 % και στα 3 min στα 64,82% που είναι στατιστικά σημαντικά. Συγκρίνοντας, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ότι στα 1 min και 2 min η ελεύθερη κουρκουμίνη εμφανίζει καλύτερη φωτοδυναμική δράση από την εγκλεισμένη. Όμως στα 3 min αν και η ελεύθερη κουρκουμίνη συνεχίζει παρουσιάζει μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας από ότι η εγκλεισμένη, το ποσοστό αυτό και δεν είναι στατιστικά σημαντικό οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι και σε αυτήν την περίπτωση στα 3 min ακτινοβόλησης οι δύο ουσίες έχουν την ίδια φωτοδυναμική δράση.
- Από τους τρεις ρυθμούς ροής ισχύς, τα 9 mW/cm² παρουσιάζουν τη λιγότερο αποτελεσματική δράση στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα 12 και 15 mW/cm² παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, καθώς στα πρώτα δύο λεπτά ακτινοβόλησης η ελεύθερη κουρκουμίνη παρουσιάζει καλύτερη φωτοδυναμική δράση, ενώ στο τρίτο λεπτό και οι δύο ουσίες παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά. Ωστόσο, τα 15 mW/cm² έδωσαν μικρότερα ποσοστά βιωσιμότητας από ότι τα 12 mW/cm² καθιστώντας τα καταλληλότερα για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.
- Από τις δύο μορφές της φωτοευαίσθητης ουσίας κουρκουμίνης που χρησιμοποιούνται, η ελεύθερη κουρκουμίνη φαίνεται να παρουσιάζει την βέλτιστη φωτοδυναμική δράση σε σχέση με την εγκλεισμένη καθώς έδωσε τα μικρότερα ποσοστά βιωσιμότητας σε

όλες τις συνθήκες ακτινοβολήσης. Ανατρέχοντας στις εικόνες της ενότητας Θ.12 του χωρικού εντοπισμού των ουσιών στα κύτταρα, παρατηρείται ότι η ελεύθερη κουρκουμίνη χαρακτηρίζεται από τον εντονότερο φθορισμό μέσα στα κύτταρα σε σχέση με την εγκλεισμένη. Βρίσκεται λοιπόν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τις μέσα στα κύτταρα καθιστώντας την έτσι πιο αποτελεσματική. Ωστόσο φαίνεται ότι αυτό παύει να ισχύει για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβολήσης των κυττάρων, καθώς τότε παρατηρείται ίδια φωτοδυναμική δράση και για τις δύο ουσίες. Υπάρχει περίπτωση, η ακτινοβολήση άνω των 3 min να οδηγεί στην αποδέσμευση της κουρκουμίνης από τα νιοσώματα και έτσι να είναι πιο αποτελεσματικά σε μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβολήσης. Γεγονός που απαιτεί περαιτέρω έρευνα καθώς δεν υπάρχει κάποια μελέτη στη βιβλιογραφία πάνω σε αυτό.

I. Γενικά Συμπεράσματα

I.1. Εισαγωγή

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο που μπορεί να ασκήσει επιλεκτική κυτταροτοξική δράση σε κακοήθη κύτταρα. Ως βάση της έχει τον συνδυασμό τριών μη τοξικών παραγόντων: μιας φωτοευαισθητοποιού ουσίας, μιας πηγής φωτός και του οξυγόνου. Ο κατάλληλος φωτοευαισθητοποιητής χορηγείται στην περιοχή του καρκινικού ιστού και ενεργοποιείται με μια πηγή φωτός με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και ισχύος. Η ενέργεια του φωτός, απορροφάται από τον φωτοευαισθητοποιητή και μεταφέρεται στα παρακείμενα μόρια οξυγόνου, που μετατρέπονται σε δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Η κουρκουμίνη αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή καθώς σε συνδυασμό με τη φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. Η κουρκουμίνη είναι πιο αποτελεσματική για τη θεραπεία «επιφανειακών» λοιμώξεων επειδή απορροφά στην περιοχή του μπλε, όπου το φως έχει μικρότερη διείσδυση στους ιστούς συγκρινόμενο με την περιοχή του κόκκινου(θεραπευτικό παράθυρο), και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για βαθύτερες βλάβες. Είναι ισχυρά φωτοτοξική και μπορεί να προκαλέσει ισχυρή φωτοτοξικότητα σε μικρογραμμομοριακές συγκεντρώσεις, γεγονός που αποτελεί τη βάση για την κουρκουμίνη να χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία.Ο κύριος περιορισμός της χρήσης κουρκουμίνης στην PDT είναι η κακή της υδατοδιαλυτότητα, η κακή της απορρόφηση και ο γρήγορος μεταβολισμός της που οδηγεί σε κακή βιοδιαθεσιμότητα. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση συστημάτων χορήγησης φαρμάκων που βασίζονται στη νανοτεχνολογία για τη βελτίωση της διαλυτότητας της κουρκουμίνης. Τα νιοσώματα είναι νανοσωματίδια τα οποία αποτελούνται κυρίως από μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες συνδυασμένες με τη χοληστερόλη ή τα παράγωγά της, που παρέχει την απαραίτητη ακαμψία και σταθερότητα στην δομή. Οι μοναδικές αυτές δομές των νιοσωμάτων τα καθιστούν ικανά να ενθυλακώνουν τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες ουσίες.

I.2. Παρασκευή νιοσωμάτων με εγκλεισμένη κουρκουμίνη

Αρχικά πραγματοποιήθηκε επιτυχής εγκλεισμός της κουρκουμίνης σε νιοσώματα με την μέθοδο γαλακτοματοποίησης και εξάτμισης διαλύτη. Η βέλτιστη αναλογία για την σύνθεση αυτή που βρέθηκε ήταν 100 mg χοληστερόλης, 100 mg επιφανειοδραστικού παράγοντα και 10 mg

κουρκουμίνης με απόδοση εγκλεισμού 48,44% και απόδοση διεργασίας 83%. Τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο χαρακτηρίστηκαν στη συνέχεια μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό τους. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή του μεγέθους τους ήταν $144,23 \pm 1,01$ nm που είναι πολύ ικανοποιητική, η τιμή του δείκτη πολυδιασποράς βρέθηκε $0,164 \pm 0,021$ που αποτελεί ένδειξη εξαιρετικής ομοιομορφίας μεγέθους και η τιμή του ζ-δυναμικού ήταν $-30,1 \pm 1,7$ mV η οποία δείχνει πολύ καλή σταθερότητα. Το προφίλ απελευθέρωσης έδειξε αργή και σταθερή συμπεριφορά. Στις πρώτες 24 hr απελευθερώθηκε μόνο το 14% και τελικά η απελευθέρωση σταθεροποιήθηκε στις 105 hr με τελικό ποσοστό απελευθέρωσης το 40% της ένωσης. Το κινητικό μοντέλο που φάνηκε να περιγράφει καλύτερα το προφίλ απελευθέρωσης ήταν το μοντέλο μηδενικής τάξης ή zero order και από το ημιεμπειρικό μοντέλο Korsmeyer-Peppas φάνηκε ότι ο μηχανισμός απελευθέρωσης έγινε μέσω μη Fickian ή ανώμαλης μεταφοράς, δηλαδή ότι τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα. Πραγματοποιήθηκε ο δομικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με φασματομετρία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT – IR) όπου τα φάσματα νιοσωμάτων χωρίς και με την εγκλεισμένη ουσία ήταν παρόμοια, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα του επιτυχούς εγκλεισμού της ένωσης και της μη αλληλεπίδρασης της ουσίας με τα νιοσώματα.

1.3. Απορρόφηση σε διαφορετικούς διαλύτες

Στα πειράματα της απορρόφησης που πραγματοποιήθηκαν για την ελεύθερη κουρκουμίνη παρατηρήθηκε ότι οι οργανικοί διαλύτες DMSO και EtOH διατηρούν τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης της ένωσης, σε αντίθεση με το PBS που είναι πολικός διαλύτης. Στο φάσμα του PBS η κορυφή ήταν διευρυμένη με μικρότερες τιμές απορρόφησης γεγονός που οφείλεται στην υδροφοβικότητα της κουρκουμίνης με αποτέλεσμα την δημιουργία συσσωματωμάτων εμποδίζοντας έτσι την καλή απορρόφηση της από τα κύτταρα. Στην εγκλεισμένη της μορφή φάνηκε ότι η διάλυσή της στους οργανικούς διαλύτες DMSO και EtOH οδήγησε σε πολύ μικρότερες τιμές απορρόφησης και τα μήκη κύματος από 437 nm για το DMSO μειώθηκε στα 427 nm, ενώ για το EtOH από τα 427 nm στα 416 nm σε σχέση με την ελεύθερη μορφή της. Ειδικά στην περίπτωση του PBS δε φάνηκε να υπάρχει κάποια βελτιστοποίηση με τον εγκλεισμό της στα νιοσώματα, τουναντίον το φάσμα απορρόφησης δεν έδωσε κορυφή, καθώς φάνηκε ότι τα συσσωματώματα των νιοσωμάτων οδήγησαν σε σκεδάσεις.

1.4. Εκπομπή φθορισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με διαφορετικούς διαλύτες

Τα πειράματα που διεξήχθησαν ως προς τον φθορισμό για τις δύο ουσίες στους δύο διαλύτες DMSO και PBS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έδειξαν ότι και στις δύο περιπτώσεις η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού, τόσο για την ελεύθερη όσο και για την εγκλεισμένη κουρκουμίνη μεταβάλλονται με την συγκέντρωση. Μικρότερες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης έδωσαν μικρότερη ένταση φθορισμού. Στην περίπτωση του διαλύτη DMSO, εμφανίζεται στο φάσμα της εγκλεισμένης ουσίας μια μετατόπιση των 11 nm σε σχέση με την ελεύθερη, έτσι ενώ η ελεύθερη κουρκουμίνη έδωσε μέγιστο φθορισμό στα 531 nm η εγκλεισμένη έδωσε στα 520 nm. Επιπλέον η ελεύθερη κουρκουμίνη έδωσε μεγαλύτερο μέγιστο φθορισμό από ότι η εγκλεισμένη. Στην περίπτωση του διαλύτη PBS, και οι δύο μορφές της κουρκουμίνης έδωσαν μέγιστο εκπεμπόμενο φθορισμό σε σχετικά ίδια μήκη κύματος. Ωστόσο, όσο αφορά την τιμή του μέγιστου εκπεμπόμενου φθορισμού φάνηκε ότι σε αυτήν την περίπτωση η εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη έδωσε οδήγησε σε μεγαλύτερη εκπομπή φθορισμού από ότι η ελεύθερη. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα νιοσώματα αποτελούν πολλά υποσχόμενους παράγοντες φωτοδιάγνωσης καθώς οδήγησαν σε βελτίωση της εκπομπής του φθορισμού της ένωσης.

1.5. Φωτολεύκανση με τη μέθοδο της απορρόφησης

Η μελέτη της φωτολεύκανση είναι σημαντική στην αποτελεσματικότητα του φωτοευαισθητοποιητή στην φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς είναι απαραίτητο αυτός να διατηρεί τη δράση του στην αρχή της θεραπείας και έπειτα να φωτοκαταστρέφεται ούτως ώστε να παρουσιάζεται παραμένουσα φωτοευαισθησία στον ασθενή μετά το πέρας της θεραπείας. Στα πείραματα της φωτολεύκανσης που πραγματοποιήθηκαν και στις δύο ουσίες η μέγιστη εκπομπή φθορισμού μειώθηκε πολυωνυμικά με το χρονό ακτινοβολήσης. Η ελεύθερη κουρκουμίνη στα πρώτα 10 min παρουσίασε 14% μείωση στον μέγιστο φθορισμό και στα 30 min έφτασε το 32%, ενώ στην εγκλεισμένη κουρκουμίνη στα πρώτα 10 min ο μέγιστος φθορισμός εμφάνισε μείωση της τάξης του 44% και στα 30 min το ποσοστό έφτασε το 75%. Γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ελεύθερη κουρκουμίνη παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη φωτοσταθερότητα.

1.6. Ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών

Όπως έχει αναφερθεί, η φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή βασίζεται στην ικανότητα του να απορροφά ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος και να τη μετατρέπει

σε θανατηφόρους κυτταροτοξικούς παραγόντες, όπως οι δραστικές ρίζες οξυγόνου. Στα πειράματα μελέτης της παραγωγής ελεύθερων ριζών στο φάσμα απορρόφησης η εστίαση είναι στη κορυφή των 340 nm, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί η οξειδωση του NADH σε NAD⁺ που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στο διάλυμα. Παρατηρήθηκε πτώση της κορυφής απορρόφησης στα 340 nm και στις δύο περιπτώσεις σε σχέση με τον χρόνο της ακτινοβολίας. Όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη η πτώση αυτή έπειτα από 30 λεπτά ακτινοβολίας ήταν της τάξης του 12%, ενώ στην εγκλεισμένη ήταν 19%. Επιπλέον, η εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη παρουσιάζει ελαφρά πιο απότομη και μεγαλύτερη πτώση της κορυφής απορρόφησης από ότι η ελεύθερη καθιστώντας την περισσότερο κατάλληλη για την χρήση της στη φωτοδυναμική θεραπεία.

1.7. Επίδραση του φωτός διέγερσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων της σειράς A431

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στον συνδυασμό τριών παραγόντων τη φωτοευαίσθητη ουσία, τη φωτεινή ακτινοβολία και το οξυγόνο. Είναι σημαντικό κανένας από αυτούς τους παράγοντες να μην είναι από μόνος του τοξικός. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσδιορισμού της ισχύος ακτινοβολίας που δεν επιδρά στην βιωσιμότητα των κυττάρων.. Έτσι από τις τέσσερις ισχύς 9 mW/cm², 12 mW/cm², 15 mW/cm², 18 mW/cm² που μελετήθηκαν για χρόνους 1 έως 3 min, απορρίφθηκε η ισχύς των 18 mW/cm² καθώς παρουσίασε τα μικρότερα ποσοστά βιωσιμότητας.

1.8. Τοξικότητα φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα της σειράς A431 απουσία φωτός

Τα πειράματα ελέγχου της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα απουσία φωτός πραγματοποιήθηκαν για συγκεντρώσεις 100 μM, 10 μM, 5 μM, 3 μM, 1 μM και 100 nM όσο αφορά την ελεύθερη κουρκουμίνη και 1 μM και 100 nM της εγκλεισμένης κουρκουμίνης. Οι συγκεντρώσεις που φάνηκε ότι δεν βλάπτουν τα κύτταρα αυτές των 1 μM και 100 nM και στις δύο περιπτώσεις και επιλέχθηκε τελικά η πιο πυκνή συγκέντρωση των 1 μM για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

1.9. Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα

Πριν την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι απαραίτητο να γίνει πρώτα ο χωρικός εντοπισμός του φωτοευαισθητοποιητή. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι και η ελεύθερη και η εγκλεισμένη κουρκουμίνη συσσωρεύονται γύρω από τον πυρήνα των κυττάρων, όπως ήταν επιθυμητό, ούτως ώστε να ην προκληθούν αλλοιώσεις DNA, μεταλλάξεις και περαιτέρω

καρκινογένεση. Συγκριτικά φάνηκε ότι η ελεύθερη κουρκουμίνη έχει εισχωρήσει σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η εγκλεισμένη παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ένταση φθορισμού στις εικόνες, αν και στα πειράματα φθορισμού τα νιοσώματα παρουσίασαν μεγαλύτερη ένταση φθορισμού σε υδατικό μέσο, που προσομοιάζει τα κύτταρα. Αυτό έχει λογική αν ληφθεί υπόψη το προφίλ της απελευθέρωσης της ένωσης από τα νιοσώματα που φάνηκε να είναι πολύ βραδύ. Συνεπώς, αν και τα νιοσώματα οδηγούν σε μεγαλύτερο φθορισμό από την ελεύθερη ουσία, η αργή απελευθέρωση της κουρκουμίνης από αυτά οδήγησε σε μικρότερο φθορισμό στα κύτταρα κατά τον χωρικό εντοπισμό. Αυτό το αποτέλεσμα ενδεχομένως να άλλαζε σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης όπου και θα έχει απελευθερωθεί μεγαλύτερο ποσοστό της κουρκουμίνης.

I.10. Εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στα κύτταρα A431

Η φωτοδυναμική θεραπεία εφαρμόστηκε στα κύτταρα της σειράς A431 χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητές τη κουρκουμίνη και την εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη με συγκεντρώση 1 μM . Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε για ρυθμούς ισχύς με τιμές 9 mW/cm^2 , 12 mW/cm^2 και 15 mW/cm^2 και χρονικά διαστήματα από 1 έως 3 λεπτά. Από τους τρεις ρυθμούς ροής ισχύς, τα 9 mW/cm^2 παρουσιάζουν τη λιγότερο αποτελεσματική δράση στη φωτοδυναμική θεραπεία. Στα 12 και 15 mW/cm^2 η ελεύθερη κουρκουμίνη παρουσίασε καλύτερη φωτοδυναμική δράση, ενώ στο τρίτο λεπτό και οι δύο ουσίες παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά. Ωστόσο, στα 15 mW/cm^2 ποσοστά βιωσιμότητας ήταν χαμηλότερα από ότι στα 12 mW/cm^2 καθιστώντας τα καταλληλότερα για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Δηλαδή, η ελεύθερη κουρκουμίνη για μεγαλύτερους ρυθμούς ισχύς έδειξε καλύτερη συμπεριφορά από ότι η εγκλεισμένη, γεγονός που αλλάζει όταν η ακτινοβολήση έγινε για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι το αργό προφίλ απελευθέρωσης της κουρκουμίνης από τα νιοσώματα θα οδηγήσει στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της και θα την προστατεύσει από τα βιοαποικοδομητικά ένζυμα του ζωντανού οργανισμού. Σε συνδυασμό με την ικανοποιητική φωτοδυναμική δράση της εγκλεισμένης κουρκουμίνης στα νιοσώματα δείχνει έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή ειδικά σε μελέτες ζωντανών οργανισμών

I.11. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι η εγκλεισμένη σε νιοσώματα κουρκουμίνη αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή που μπορεί να αξιοποιηθεί στην εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω

μελέτης προς την βελτιστοποίησή τους για την εφαρμογή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Αυτές είναι οι εξής:

- Βελτιστοποίηση της παρασκευής των νιοσώματων με την εγκλεισμένη κουρκουμίνη είτε μέσω άλλων μεθόδων, όπως η σύνθεση λεπτού φιλμ και ενυδάτωσης, είτε μέσω το δοκιμών διαφορετικών αναλογιών των συστατικών της σύνθεσης, είτε χρησιμοποιώντας άλλους επιφανειαδραστικούς παράγοντες.
- Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων με άλλες μεθόδους όπως η θερμοσταθμικής ανάλυση (TGA) και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) για τον προσδιορισμό των θερμικών τους ιδιοτήτων.
- Η μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM)
- Η επώαση των φωτοευαίσθητοποιητών στα κύτταρα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα ώστε να βελτιστοποιηθεί η απορρόφησης τους από αυτά πριν από την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας
- Η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα ακτινοβολήσης
- In vivo μελέτες σε μοντέλα μικρών ζώων

Βιβλιογραφία

- [1] Kessel, D. (2004). Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 3–7. [https://doi.org/10.1016/s1572-1000\(04\)00003-1](https://doi.org/10.1016/s1572-1000(04)00003-1)
- [2] Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2007). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656–669. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656thopap2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656thopap2.0.co2)
- [3] Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
- [4] Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>
- [5] Mitton, D., & Ackroyd, R. (2008). A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 5(2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>
- [6] Hamblin, M. R. (2020). Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506–516. <https://doi.org/10.1111/php.13190>
- [7] Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 912–929. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>
- [8] Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>
- [9] Brown, S. B., Brown, E. A., & Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 5(8), 497–508. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(04\)01529-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(04)01529-3)
- [10] Cancer. (2021, March 3). World Health Organization, Cancer. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- [11] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [12] Zhang, J., Jiang, C., Figueiró Longo, J. P., Azevedo, R. B., Zhang, H., & Muehlmann, L. A. (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>
- [13] Chen, J., Fan, T., Xie, Z., Zeng, Q., Xue, P., Zheng, T., Chen, Y., Luo, X., & Zhang, H. (2020). Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges. *Biomaterials*, 237, 119827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119827>
- [14] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- [15] Μετρήσεις και έλεγχοι στην Βιοϊατρική τεχνολογία, Εργαστηριακός Οδηγός 7ου εξαμήνου, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- [16] Κυριαζή, Μ. (2007). Μελέτη συνδυαστικής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε καρκίνο του δέρματος με χρήση φωτοφυσικών μεθόδων. Διδακτορική Διατριβή. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών Και Μηχανικών Υπολογιστών. <https://doi.org/10.12681/eadd/16906>
- [17] Chilakamarthi, U., & Giribabu, L. (2017). Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *The Chemical Record*, 17(8), 775–802. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>
- [18] Bergamini, C., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1611–1626. <https://doi.org/10.2174/1381612043384664>

- [19] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
- [20] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 24. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>
- [21] Calixto, G., Bernegossi, J., de Freitas, L., Fontana, C., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules*, 21(3), 342. <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>
- [22] Sharman, W. M., Allen, C. M., & van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4(11), 507–517. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(99\)01412-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(99)01412-9)
- [23] Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/s1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s1572-1000(04)00007-9)
- [23] Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, 115(4), 1990–2042. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>
- [24] Chatterjee, D. K., Fong, L. S., & Zhang, Y. (2008). Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1627–1637. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>
- [25] Demetzos, C. (2016). *Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications* (1st ed. 2016 ed.). Springer.
- [26] Fakayode, O. J., Tsolekile, N., Songca, S. P., & Oluwafemi, O. S. (2018). Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. *Biophysical Reviews*, 10(1), 49–67. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0383-2>
- [27] Chen, H., Wang, G. D., Chuang, Y. J., Zhen, Z., Chen, X., Biddinger, P., Hao, Z., Liu, F., Shen, B., Pan, Z., & Xie, J. (2015). Nanoscintillator-Mediated X-ray Inducible Photodynamic Therapy for In Vivo Cancer Treatment. *Nano Letters*, 15(4), 2249–2256. <https://doi.org/10.1021/nl504044p>

- [28] Shen, Y., Shuhendler, A. J., Ye, D., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2016). Two-photon excitation nanoparticles for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 45(24), 6725–6741. <https://doi.org/10.1039/c6cs00442c>
- [29] Bovis, M. J., Woodhams, J. H., Loizidou, M., Scheglmann, D., Bown, S. G., & MacRobert, A. J. (2012). Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.085>
- [30] Derycke, A. (2004). Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.07.014>
- [31] Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R., & Pandey, S. (2020). Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101581. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581>
- [32] Moghassemi, S., & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185, 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>
- [33] Khoei, S., & Yaghoobian, M. (2017). Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. *Nanostructures for Drug Delivery*, 207–237. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-46143-6.00006-3>
- [34] Gharbavi, M., Amani, J., Kheiri-Manjili, H., Danafar, H., & Sharafi, A. (2018). Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/6847971>
- [35] Kuotsu, K., Karim, K., Mandal, A., Biswas, N., Guha, A., Chatterjee, S., & Behera, M. (2010). Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4), 374. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76435>
- [36] Lin, T., Fang, Q., Peng, D., Huang, X., Zhu, T., Luo, Q., Zhou, K., & Chen, W. (2013). PEGylated non-ionic surfactant vesicles as drug delivery systems for Gambogic acid. *Drug Delivery*, 20(7), 277–284. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.836618>

- [37] Sharma, V., Anandhakumar, S., & Sasidharan, M. (2015). Self-degrading niosomes for encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs: An efficient carrier for cancer multi-drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.049>
- [38] Alemi, A., Zavar Reza, J., Haghirsadat, F., Zarei Jaliani, H., Haghi Karamallah, M., Hosseini, S. A., & Haghi Karamallah, S. (2018b). Paclitaxel and curcumin coadministration in novel cationic PEGylated niosomal formulations exhibit enhanced synergistic antitumor efficacy. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0351-4>
- [39] Bragagni, M., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C. T., & Mura, P. (2015d). Development and ex vivo evaluation of 5-aminolevulinic acid-loaded niosomal formulations for topical photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.036>
- [40] Tomeh, M., Hadianamrei, R., & Zhao, X. (2019). A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1033. <https://doi.org/10.3390/ijms20051033>
- [41] Kazantzis, K. T., Koutsonikoli, K., Mavroidi, B., Zachariadis, M., Alexiou, P., Pelecanou, M., Politopoulos, K., Alexandratou, E., & Sagnou, M. (2020). Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and in vitro studies with prostate cancer cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19(2), 193–206. <https://doi.org/10.1039/c9pp00375d>
- [42] Xie, L., Ji, X., Zhang, Q., & Wei, Y. (2022). Curcumin combined with photodynamic therapy, promising therapies for the treatment of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112567. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112567>
- [43] Halevas, E., Arvanitidou, M., Mavroidi, B., Hatzidimitriou, A. G., Politopoulos, K., Alexandratou, E., Pelecanou, M., & Sagnou, M. (2021). A novel curcumin gallium complex as photosensitizer in photodynamic therapy: Synthesis, structural and physicochemical characterization, photophysical properties and in vitro studies against breast cancer cells. *Journal of Molecular Structure*, 1240, 130485. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130485>

- [44] Subramani, P. A., Panati, K., Lebaka, V. R., Reddy, D. D., & Narala, V. R. (2017). Nanostructures for Curcumin Delivery: Possibilities and Challenges. *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*, 393–418. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52727-9.00021-2>
- [45] Butnariu, M., Quispe, C., Koirala, N., Khadka, S., Salgado-Castillo, C. M., Akram, M., Anum, R., Yeskaliyeva, B., Cruz-Martins, N., Martorell, M., Kumar, M., Vasile Bagiu, R., Abdull Razis, A. F., Sunusi, U., Muhammad Kamal, R., & Sharifi-Rad, J. (2022). Bioactive Effects of Curcumin in Human Immunodeficiency Virus Infection Along with the Most Effective Isolation Techniques and Type of Nanoformulations. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, 3619–3632. <https://doi.org/10.2147/ijn.s364501>
- [46] Lee, W. H., Loo, C. Y., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R., & Rohanizadeh, R. (2013). Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 338–378. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311040002>
- [47] Bharat B. Aggarwal, Anushree Kumar, & Alok C. Bharti. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 23(1A), 363–398.
- [48] Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., & George, M. (1985). Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Letters*, 29(2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(85\)90159-4](https://doi.org/10.1016/0304-3835(85)90159-4)
- [49] Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(3), 283–299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>
- [50] Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., & Srimal, R. C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*, 78(18), 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>
- [51] Dujic, J., Kippenberger, S., Ramirez-Bosca, A., Diaz-Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., & Hofmann, M. (2009). Curcumin in combination with visible light inhibits tumor

growth in a xenograft tumor model. *International Journal of Cancer*, 124(6), 1422–1428. <https://doi.org/10.1002/ijc.23997>

[52] Buss, S., Dobra, J., Goerg, K., Hoffmann, S., Kippenberger, S., Kaufmann, R., Hofmann, M., & Bernd, A. (2013). Visible Light Is a Better Co-Inducer of Apoptosis for Curcumin-Treated Human Melanoma Cells than UVA. *PLoS ONE*, 8(11), e79748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079748>

[53] Ling, M., Bernal, C., & Perussi, J. (2017). A comparative study on the anticancer photodynamic efficiency of curcumin and hypericin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 17, A49–A50. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.111>

[54] Niu, T., Tian, Y., Mei, Z., & Guo, G. (2016). Inhibition of Autophagy Enhances Curcumin United light irradiation-induced Oxidative Stress and Tumor Growth Suppression in Human Melanoma Cells. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep31383>

[55] Mohan Yallapu, M., Ray Dobberpuhl, M., Michele Maher, D., Jaggi, M., & Chand Chauhan, S. (2012). Design of Curcumin loaded Cellulose Nanoparticles for Prostate Cancer. *Current Drug Metabolism*, 13(1), 120–128. <https://doi.org/10.2174/138920012798356952>

[56] D.A. Abdel Fadeel, R. Kamel, M. Fadel, PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 10435

[57] Xu, Y. Q., Chen, W. R., Tsosie, J. K., Xie, X., Li, P., Wan, J. B., He, C. W., & Chen, M. W. (2016). Niosome Encapsulation of Curcumin: Characterization and Cytotoxic Effect on Ovarian Cancer Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/6365295>

[58] Akbari, J., Saeedi, M., Enayatifard, R., Morteza-Semnani, K., Hassan Hashemi, S. M., Babaei, A., Rahimnia, S. M., Rostamkalaei, S. S., & Nokhodchi, A. (2020). Curcumin Niosomes (curcusomes) as an alternative to conventional vehicles: A potential for efficient dermal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102035. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102035>

[59] Sahab-Negah, S., Ariakia, F., Jalili-Nik, M., Afshari, A. R., Salehi, S., Samini, F., Rajabzadeh, G., & Gorji, A. (2020). Curcumin Loaded in Niosomal Nanoparticles Improved the Anti-tumor

Effects of Free Curcumin on Glioblastoma Stem-like Cells: an In Vitro Study. *Molecular Neurobiology*, 57(8), 3391–3411. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01922-5>

[60] Panotopoulos, G. P., & Haidar, Z. S. (2019). Mathematical Modeling for Pharmacokinetic and -Dynamic Predictions from Controlled Drug Release NanoSystems: A Comparative Parametric Study. *Scientifica*, 2019, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2019/9153876>

[61] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 439153, 1,4-Dihydronicotinamide adenine dinucleotide. Retrieved December 13, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Dihydronicotinamide-adenine-dinucleotide.

[62] Xiao, W., Wang, R. S., Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2018). NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(3), 251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>

[63] Κυριαζή Μ. Μελέτη συνδυαστικής δράσης φωτοδυναμικής θεραπείας και αντιοξειδωτικών σε καρκίνο του δέρματος με χρήση φωτοφυσικών μεθόδων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2007

[64] Zhang, S., Yang, L., Ling, X., Shao, P., Wang, X., Edwards, W. B., & Bai, M. (2015). Tumor mitochondria-targeted photodynamic therapy with a translocator protein (TSPO)-specific photosensitizer. *Acta Biomaterialia*, 28, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.033>

[65] Alexandratou, E., Yova, D., & Loukas, S. (2005). A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(9), 1119–1127. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.006>

[66] Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

[67] Subhan, M. A., Alam, K., Rahaman, M. S., Rahman, M. A., & Awal, R. (2013). Synthesis and Characterization of Metal Complexes Containing Curcumin (C₂₁H₂₀O₆) and Study of their Anti-microbial Activities

and DNA-binding Properties. *Journal of Scientific Research*, 6(1), 97–109. <https://doi.org/10.3329/jsr.v6i1.15381>

[68] Ur Rehman, M., Rasul, A., Khan, M. I., Hanif, M., Aamir, M. N., Waqas, M. K., Hameed, M., & Akram, M. R. (2018). Development of niosomal formulations loaded with cyclosporine A and evaluation of its compatibility. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(8), 1457. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i8.1>

[69] Mandal, S., Banerjee, C., Ghosh, S., Kuchlyan, J., & Sarkar, N. (2013). Modulation of the Photophysical Properties of Curcumin in Nonionic Surfactant (Tween-20) Forming Micelles and Niosomes: A Comparative Study of Different Microenvironments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(23), 6957–6968. <https://doi.org/10.1021/jp403724g>