



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: Μελέτη της αντι-φλεγμονώδους δράσης της κουρκουμίνης σε  
λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς**

**Δημήτριος Σκυβαλίδας**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος, 2020



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**

**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**Title: Study of anti-inflammatory action of curcumin in  
lymphocyte cell subsets**

**By  
Dimitrios Skyvalidas**

Three Member Committee:

- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine & Autoimmune Diseases
- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology
- Dardiotis Efthimios, Associate Professor of Neurology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular applications of

Larisa, October, 2020

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	4
Abstract .....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1. Γενικά στοιχεία κουρκουμίνης .....	6
1.2. Χημική σύνθεση .....	9
1.3. Μεταβολισμός και φαρμακοκινητικές ιδιότητες .....	10
1.3.1. Μεταβολισμός .....	10
1.3.2. Φαρμακοκινητική .....	11
1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις .....	14
1.4.1. Αντι-μικροβιακές ιδιότητες .....	15
1.4.2. Αντι-καρκινικές ιδιότητες .....	17
1.4.3. Αντι-οξειδωτικές ιδιότητες.....	20
1.4.4. Αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες.....	21
1.4.5. Ενίσχυση θεραπείας τραυμάτων.....	23
1.4.6. Νευροπροστατευτικές ιδιότητες.....	24
1.4.7. Αντι-φλεγμονώδης-Ανοσορυθμιστική δράση .....	26
1.5. Ανοσο-επαγόμενα νοσήματα .....	29
1.5.1. Ψωριασική νόσος .....	29
1.5.2. Πολλαπλή σκλήρυνση (MS).....	31
1.5.3. Ρευματοειδής αρθρίτιδα .....	32
1.6. Μοριακοί στόχοι.....	35
2. Σκοπός.....	37
3. Υλικά και μέθοδοι: .....	38
3.1. Απομόνωση και κρυσταντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs).....	38
3.2. Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue .....	40
3.3. Καλλιέργεια PBMCs .....	41
3.4. Διέγερση κυττάρων.....	43
3.5. Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια χρώση αντισωμάτων .....	46
3.6. Κυτταρομετρία ροής.....	48
3.7. Απομόνωση κυτταρικού πληθυσμού με χρήση μαγνητών.....	52
3.8. Φωσφο-ειδική κυτταρομετρία ροής.....	53
3.9. Στατιστική ανάλυση .....	55
4. Αποτελέσματα .....	56
5. Συζήτηση .....	72
6. Βιβλιογραφία .....	76

## Περίληψη:

Η κουρκουμίνη πρόκειται για μια ουσία που απομονώνεται από τις ρίζες του φυτού *Curcuma longa* (Turmeric). Η κουρκουμίνη διαθέτει πλειοτροπική δράση με πλέον γνωστές δράσεις της να είναι η αντι-οξειδωτική, η αντι-μικροβιακή και η νευροπροστατευτική. Ωστόσο, ο ρόλος της ως αντι-φλεγμονώδης ουσία καθώς και αναστολέας προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της *in vitro* δράσης της κουρκουμίνης στα επίπεδα των ρυθμιστικών T κυττάρων καθώς και στην παραγωγή της IFN- $\gamma$  και IL-17 σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος(PBMCs) από υγιείς δότες και ψωριασικούς ασθενείς. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε απομόνωση λευκοκυττάρων, κυτταροκαλλιέργεια και πρωτόκολλα χρώσης επιφανειακών και ενδοκυττάρων αντισωμάτων, ενώ ακολούθησε κυτταρομετρία ροής. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα CD4, CD56, CD25, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, FoxP3 και STAT3. Πέραν της κουρκουμίνης για ερευνητική χρήση μελετήθηκαν και δύο εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα κουρκουμίνης. Παρατηρούμε ότι η κουρκουμίνη σε μη διεγερμένα κύτταρα προκαλεί αύξηση των CD4+CD25hiFoxP3+ T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) τόσο μετά από 3 όσο και 7 μέρες επώασης με την ουσία αυτήν σε υγιείς δότες αλλά και ψωριασικούς ασθενείς. Το ποσοστό της αύξησης φτάνει μέχρι και το 13% και 25%, αντίστοιχα. Επίσης, χρήση διεγέρτη παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα με την αύξηση των Tregs να είναι μέχρι και της τάξης του 52% για τους υγιείς και του 83% για τους ασθενείς. Ακόμη η κουρκουμίνη φάνηκε να αναστέλλει και της παραγωγή της IL-17 σε ποσοστό μέχρι και 66%. Τέλος, στον μηχανισμό δράσης της ουσίας αυτής εμπλέκεται ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 καθώς παρουσία κουρκουμίνης αυξάνεται μέχρι και 96%. Αντι-φλεγμονώδη δράση ασκούν και τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα της κουρκουμίνης με παρόμοια δράση με αυτήν στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς, CD4 και NK. Επομένως, η κουρκουμίνη δρα σε δύο επίπεδα καθώς αναστέλλει προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες, ενώ επάγει αντι-φλεγμονώδης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η κουρκουμίνη έχει την δυνατότητα να αξιοποιηθεί ως ένας φυσικός αντι-φλεγμονώδης παράγοντας.

**Λέξεις-κλειδιά:** IFN- $\gamma$ , IL-17, κουρκουμίνη, PBMCs, Tregs

## Abstract:

Curcumin is a plant-derived component, isolated from the roots of *Curcuma Longa* (Turmeric). Curcumin has pleiotropic action acting as anti-oxidant, anti-microbial and neuroprotective agent. However, its role as anti-inflammatory agent and inhibitor of pro-inflammatory cytokines is poorly understood. The aim of this study was to investigate the *in vitro* effect of curcumin on levels of Tregs and on IFN- $\gamma$  and IL-17 production by PMBCs from healthy donors and patients with psoriatic arthritis. Leukocyte isolation, cell culture and surface and intracellular antibody staining protocols were performed, followed by flow cytometry. Antibodies used were CD4, CD25, CD56, IFN- $\gamma$ , IL-10, FoxP3 and STAT3. In addition to research grade curcumin, two commercially available curcumin products were studied. We observed that curcumin in unstimulated cells causes an increase in CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells (Tregs) after both 3 and 7 days of incubation in healthy donors and psoriatic patients. The percentage of increase reaches up to 13% and 25%, respectively. Moreover, similar results were noticed in stimulated cells with the increase of Tregs being up to 52% for healthy donors and 83% for patients. Curcumin also managed to inhibit up to 66% the production of IL-17. Finally, transcription factor STAT3 is involved in the mechanism of action of this substance as in the presence of curcumin the percentage of STAT3 was induced up to 96%. Apart from research grade curcumin, the commercially available products of curcumin were observed to have anti-inflammatory action in two lymphocyte cell subsets, CD4 and NK. Thus, curcumin acts on two levels as it inhibits pro-inflammatory cytokines while inducing anti-inflammatory cytokines. These results indicate that curcumin can be administered as a natural anti-inflammatory agent on healthy people and psoriasis patients.

**Key words:** IFN- $\gamma$ , IL-17, curcumin, PMBCs, Tregs

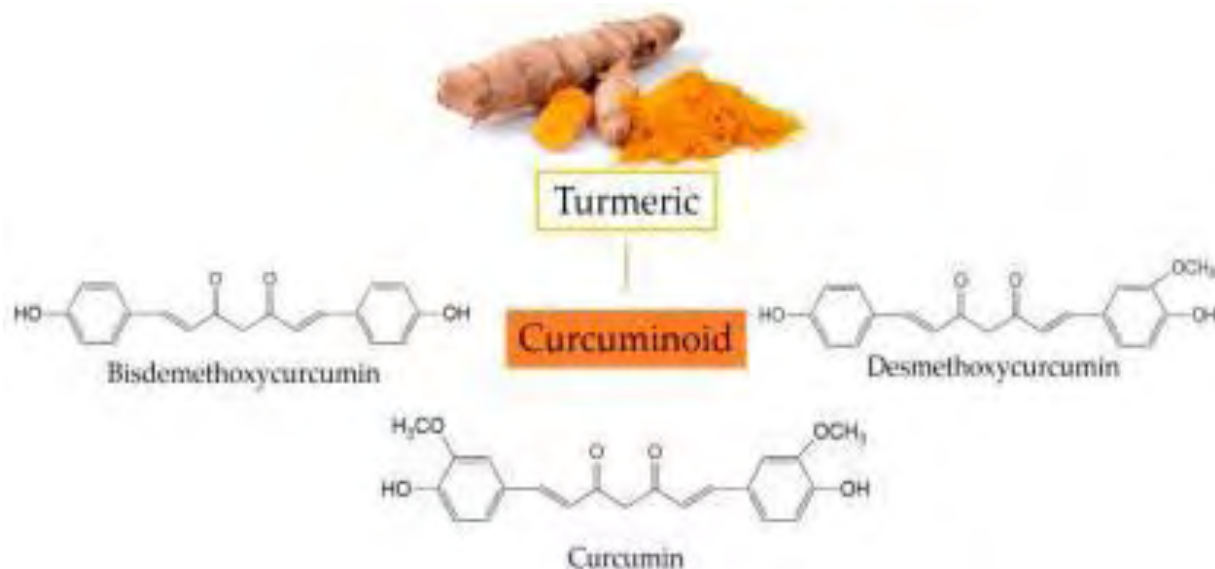
# 1.Εισαγωγή

## 1.1.Γενικά στοιχεία κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη είναι η δραστική ουσία που παράγεται από φυτά της οικογένειας *curcuma*. Έχουν ταυτοποιηθεί 133 είδη με χαρακτηριστικότερο το *Curcuma longa* από τις ρίζες των οποίων προέρχεται το turmeric. Η οικογένεια των φυτών αυτών ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των φυτών ginger και πρόκειται για ένα πολυετή ποώδη φυτά με ρίζες (1). Από τις ρίζες αυτών είναι που προέρχεται το μπαχαρικό turmeric το οποίο έχει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα λόγω του οποίου είχε ονομαστεί και ως “Ινδικό σαφρόν” στην Ευρώπη. Η Λατινική ονομασία *Curcuma* προέρχεται από την αντίστοιχη Αραβική *Koukroum* που ήταν η αρχική ονομασία του σαφρόν. Το turmeric είναι ένα φυτό με μακρά ιστορία με την χρήση του στην ιατρική να χρονολογείται μέχρι και 4000 χρόνια πριν. Στην Νοτιοανατολική Ασία πέρα από την χρήση του αυτή έχει ανακαλυφθεί και μία ακόμη πλευρά του δηλαδή η χρήση του σε θρησκευτικές τελετές. Ωστόσο, και στην μοντέρνα ιατρική η αξία της ουσίας αυτής έχει αναγνωριστεί καθώς περισσότερες από 3000 δημοσιεύσεις τα τελευταία 25 χρόνια έχουν αναδείξει πολλές διαφορετικές ιδιότητες της (2).

Όπως αναφέρθηκε το *Curcuma longa* είναι το σημαντικότερο φυτό από το οποίο προέρχεται το turmeric και επομένως και η κουρκουμίνη. Το βέλτιστο περιβάλλον για την καλλιέργεια αυτού του είδους είναι σε περιοχές με κλίμα θερμό, υγρασία και μεγάλες ποσότητες νερού άρα κυρίως σε υπο-τροπικές και τροπικές ζώνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων χωρών είναι η Ινδία, η Κίνα και η Νοτιοανατολική Ασία (Ινδονησία, Ταϊλάνδη, Βιετνάμ και Φιλιππίνες). Ωστόσο, ο μεγαλύτερο παραγωγός είναι η Ινδία όπου ο *Curcuma* είναι γνωστός ως “Haldi”. Η Ινδία είναι πρώτη πέρα από την παραγωγή και στην εξαγωγή καθώς και στην κατανάλωση του. Η παραγωγή *Curcuma* στην Ινδία έχει αυξηθεί κατά 40% την τελευταία δεκαετία με το 2008-2009 η παραγωγή να φτάνει και έως τους 900.000 τόνους (3). Ανάλογα με την προέλευση και τις συνθήκες του εδάφους που μεγαλώνει, το turmeric αποτελείται από 2-9% κουρκουμινοειδών. Η έννοια “κουρκουμινοειδή” αναφέρεται σε μία κατηγορία ουσιών όπως η κουρκουμίνη, η διμεθοξύκουρκουμίνη, η δις-διμεθοξύκουρκουμίνη και η κυκλική κουρκουμίνη. (Εικόνα 1) Από αυτές, η κουρκουμίνη είναι το κύριο συστατικό ενώ η κυκλική κουρκουμίνη είναι αυτή που συναντάται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (4). Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινόλη η οποία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω βρίσκει ευρεία χρήση. Η κουρκουμίνη θεωρείται ότι έχει μεγάλη φαρμακευτική αξία και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής σε διάφορες χώρες. Άλλα χαρακτηριστικό παραδείγματα αξιοποίησης

της αποτελούν η χρήση της στην Ινδία ως καρύκευμα, στην Κίνα ως παράγοντας που προσδίδει χρώμα, στην Ιαπωνία ως συνοδευτικό με ροφήματα, στην Ταϊλάνδη στην βιομηχανία καλλυντικών, στην Κορέα σε ποτά, στην Μαλαισία ως αντισηπτικό και στο Πακιστάν ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας για γαστρικές διαταραχές. Πέρα από την Ασία, όμως, τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η χρήση της και στον Δυτικό κόσμο με χαρακτηριστικό παράδειγμα να αποτελεί η αξιοποίηση της στην βιομηχανία τροφίμων στις ΗΠΑ ως συντηρητικό και ως παράγοντας που προσδίδει χρώμα σε μουστάρδες, τυριά, βούτυρα και άλλα προϊόντα (5).



**Εικόνα 1: Τα τρία βασικότερα κουρκουμινοειδή και η χημική δομή τους.** Ανατύπωση από: Xu XY et al., Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives, *Nutrients*. 2018 Oct; 10(10): 1553.

### Ιστορική αναδρομή

Η χρήση του turmeric χρονολογείται τουλάχιστον εδώ και 4000 χρόνια στην Ινδία, όπου χρησιμοποιούνταν ως μαγειρικό καρύκευμα, ενώ είχε και θρησκευτική σημασία. Από διάφορες αναφορές πιθανολογείται ότι το turmeric έφθασε στην Κίνα το 700 μ.Χ., στην Ανατολική Αφρική το 800 μ.Χ., στην Δυτική Αφρική το 1200 μ.Χ. και στην Τζαμάικα τον 18ο αιώνα. Το 1280, ο Μάρκο Πόλο στο ταξίδι του στην Κίνα αναφέρετε σε ένα μπαχαρικό περιγράφοντας ως “ένα μπαχαρικό που έχει όλες τις ιδιότητες του σαφρόν, όπως επίσης και την μυρωδιά και το χρώμα ωστόσο δεν είναι σαφρόν”. Σε μία συλλογή βιβλίων την Susruta’s Ayurvedic η χρήση του turmeric χρονολογείται ήδη στο 250 π.Χ. όπου προστίθονταν σε αλοιφές κατά της τροφικής δηλητηρίασης. Στην Ινδονησία το turmeric πέραν της ιατρικής εφαρμογής του, φαίνεται να χρησιμοποιούνταν και ως βαφή σώματος μέρος της τελετής του γάμου. Λόγω του χρώματος του το turmeric στην μεσαιωνική Ευρώπη ήταν γνωστό ως “Ινδικό σαφρόν” (6). Σύμφωνα με ορισμένα Σανσκριτικά χειρόγραφα το turmeric αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνταν ευρέως στην

νότια Ασία ως θεραπευτικός παράγοντας όπως ως αντισηπτικό έναντι καψιμάτων, μωλώπων και αντιβακτηριδιακό. Στο Πακιστάν χρησιμοποιούνταν ως αντιφλεγμονώδες για γαστρικές διαταραχές, ενώ στο Αφγανιστάν αξιοποιούνταν για καθαρισμό των πληγών και πιστευόταν ότι βοηθάει στην ανάρρωση. Ωστόσο, σημαντικό είναι ότι πέραν της κατανάλωσης του από το στόμα, στην ιατρική αντίληψη των παραπάνω λαών υπήρχαν και άλλοι τρόποι χορήγησης του turmeric. Έτσι, παρατηρείται ότι το turmeric χορηγούνταν και μέσω της εισπνοής για αντιμετώπιση ασθενειών όπως η ακμή, το έκζεμα και οι παρασιτικές λοιμώξεις, αλλά και με τοπική εφαρμογή του για την αντιμετώπιση όλων των ειδών δερματικών βλαβών από ευλογία και ανεμοβλογιά μέχρι και μελανιές, κοψίματα και καψίματα (2, 6).

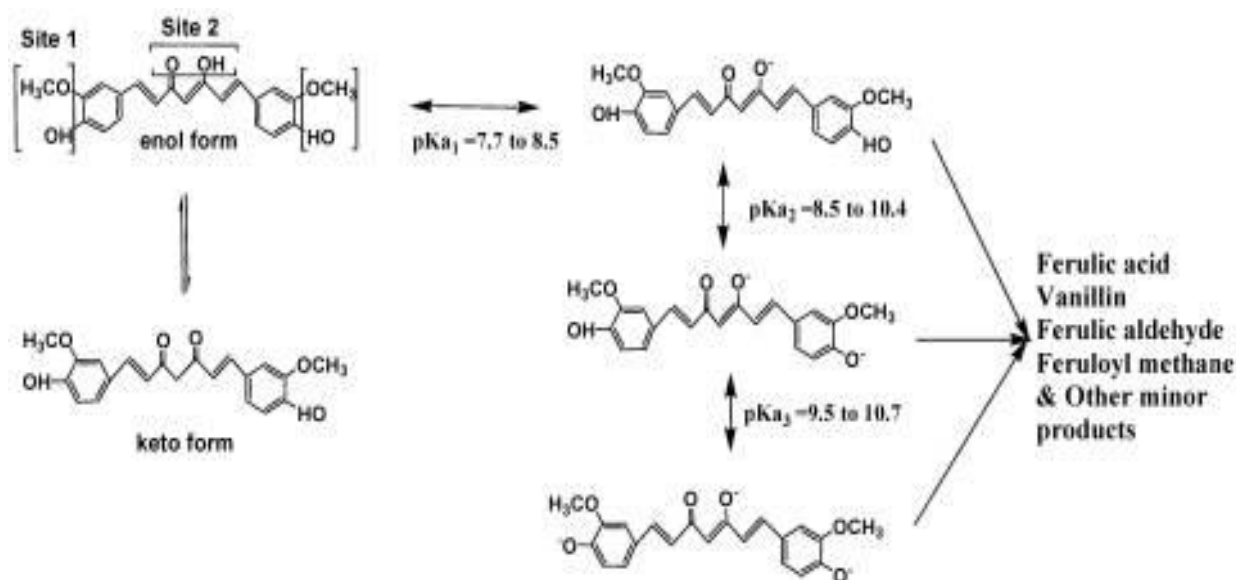
Στην σύγχρονη εποχή, η ανακάλυψη της κουρκουμίνης τοποθετείται περίπου πριν δύο αιώνες. Το 1815 δύο ερευνητές, ο Vogel και Pellatier, κατέγραψαν την απομόνωση “μίας κίτρινης ουσίας” από τις ρίζες του φυτού *Curcuma longa* την οποία και ονόμασαν κουρκουμίνη. Ωστόσο, όπως αποδείχθηκε αργότερα η ουσία αυτήν δεν ήταν καθαρή αλλά ένα μείγμα από διάφορες άλλες ουσίες. Εν τέλει, η απομόνωση καθαρής κουρκουμίνης επιτυγχάνεται από τον Vogel Jr. το 1842. Στην συνέχεια, ακολουθεί το 1910 η χημική της δομή όπως περιγράφεται από τους Milobedzka και Lampe και η σύνθεση της το 1913 από τους ίδιους ερευνητές (5, 6). Επίσης, μέσω χρήσης υγρής χρωματογραφίας επιτυγχάνεται η απομόνωση και ορισμένων κουρκουμινοειδών που εντοπίζονται στο turmeric (7). Αν και όπως αναφέρθηκε το turmeric καταναλωνόταν για χιλιάδες χρόνια λόγω των πιθανών θετικών του δράσεων, το 1949 ο Schraufstatter et al ήταν ο πρώτος που δημοσίευσε στο Nature μία μελέτη σχετικά με την αντιμικροβιακές δράσεις της κουρκουμίνης. Στην μελέτη αυτή αποδεικνύεται ότι η κουρκουμίνη ήταν ενεργή έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Trichophyton gypseum* και *Mycobacterium tuberculosis* (8). Τις επόμενες δύο δεκαετίες δεν υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον μέχρις ότου τις δεκαετίες του 1970 – 1980 όπου η ερευνητική δραστηριότητα πάνω στην κουρκουμίνη ανακάμπτει, με πολλαπλές αναφορές πάνω σε πολλές διαφορετικές δράσεις της όπως αντι-διαβητική, αντι-φλεγμονώδης, αντι-οξειδωτική, αντι-καρκινική και διάφορες άλλες. Το 1985, ο Kuttan είναι αυτός που πρώτος δείχνει την αντι-καρκινική δράση της κουρκουμίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (9). Τέλος, το 1995, οι Singh και Aggarwal ήταν οι πρώτοι που αποδεικνύουν την αντι-φλεγμονώδη δράση της κουρκουμίνης μέσω της αναστολής του προ-φλεγμονώδους μεταγραφικού παράγοντα NF-kB (10). Εκ τότε, λόγω των πιθανών θεραπευτικών ιδιοτήτων της, η κουρκουμίνη έχει μελετηθεί εκτενώς με σκοπό την εύρεση αυτών των ιδιοτήτων της καθώς και στην βέλτιστη αξιοποίησή τους μέσω ανάλυσης της χημείας της ουσίας αυτής.



## 1.2.Χημική σύνθεση

Το εκχύλισμα που προκύπτει από τις ρίζες των φυτών *Curcuma* περιέχει πτητικά και μη πτητικά έλαια, πρωτεΐνες, λιπαρά, μέταλλα, υδατάνθρακες και κουρκουμινοειδή. Τα κουρκουμινοειδή είναι ένα μείγμα τριών κυρίως βασικών συστατικών: κουρκουμίνης (77%), διμεθοξικουρκουμίνη (17%) και δις-διμεθοξικουρκουμίνη (3%) (11). Το φυτό *C.longa* περιέχει 3-5% κουρκουμινοειδή και μέχρι και 5% αιθέρια έλαια και ρητίνες. Τα κουρκουμινοειδή αυτά μπορούν να ποικίλουν μεταξύ 2-9% ανάλογα το φυτό και τις γεωγραφικές συνθήκες που ευδοκιμεί. Από διάφορα φυτά του είδους *Curcuma*, το *Curcuma zedoaria* έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κουρκουμινοειδή (> 100 μg/g) συγκριτικά με το *Curcuma longa* (1-2μg/g), ενώ το *Curcuma aromatica* την μικρότερη (<0.1μg/g) (12, 13).

Τόσο η κουρκουμίνη όσο και τα άλλα δύο κουρκουμινοειδή διαθέτουν την ίδια δομή με δύο βενζομεθόξυ δακτυλίους που ενώνονται με μία αλυσίδα. Από τα κουρκουμινοειδή αυτά το κυριότερο είναι η κουρκουμίνη η οποία έχει μελετηθεί παραπάνω και θεωρείται πιο ενεργή (14). Η χημική ονομασία κατά IUPAC της κουρκουμίνης είναι 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta1,6-diene-3,5-dione και η χημική της φόρμουλα είναι C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>. Η κουρκουμίνη διαθέτει τόσο κετο- όσο και ενολ- μορφή (Εικόνα 2). Αυτά τα ταυτομερή υπάρχουν επίσης σε cis και trans μορφές. Η αναλογία μεταξύ των μορφών αυτών ποικίλει ανάλογα με διάφορες παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, το pH και η υποκατάσταση των αρωματικών δακτυλίων. Η κετονική μορφή της κουρκουμίνης επικρατεί σε όξινα περιβάλλοντα με pH 3-7 όπου η κουρκουμίνη δρα ως ένας ιδιαίτερα ικανός δότης H. Αντίθετα, σε βασικά pH άνω του 8 κυριαρχεί η ενολική μορφή της με αποτέλεσμα η ικανότητα της να δίνει H να περιορίζεται (15). Η κουρκουμίνη λόγω της υδροφοβικής φύσης της είναι αδιάλυτη στο νερό, ενώ διαλύεται σε μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη και διμεθυλσουλφοξείδιο. Μέτριοι διαλύτες της κουρκουμίνης θεωρούνται και το εξάνιο, διοεξάνιο και κυκλοεξάνιο. Επίσης, η αποικοδόμηση της ουσίας αυτής φαίνεται να αυξάνεται σε φυσιολογικό ή βασικό pH. Μελέτη του Wang et al έδειξε ότι τοποθέτηση της κουρκουμίνης σε φωσφορικά ρυθμιστικά συστήματα με pH 7.2 επηρέαζε την αποικοδόμηση της με αποτέλεσμα έως και το 90% της ουσίας αυτής να διασπάται έπειτα από 30 λεπτά. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης είναι pH εξαρτώμενη πράγμα που αποτελεί ένα μειονέκτημα για ενδεχόμενη θεραπευτική αξιοποίηση της (14, 16).



Εικόνα 2: Κετο- και ενολ- ταυτομερή και τα προϊόντα αποικοδόμησης της κουρκουμίνης. Ανατύπωση από: Priyadarsini KI et al., The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent, *Molecules*, 2014 Dec 1; 19(12):20091-112.

### 1.3. Μεταβολισμός και φαρμακοκινητικές ιδιότητες

#### 1.3.1. Μεταβολισμός

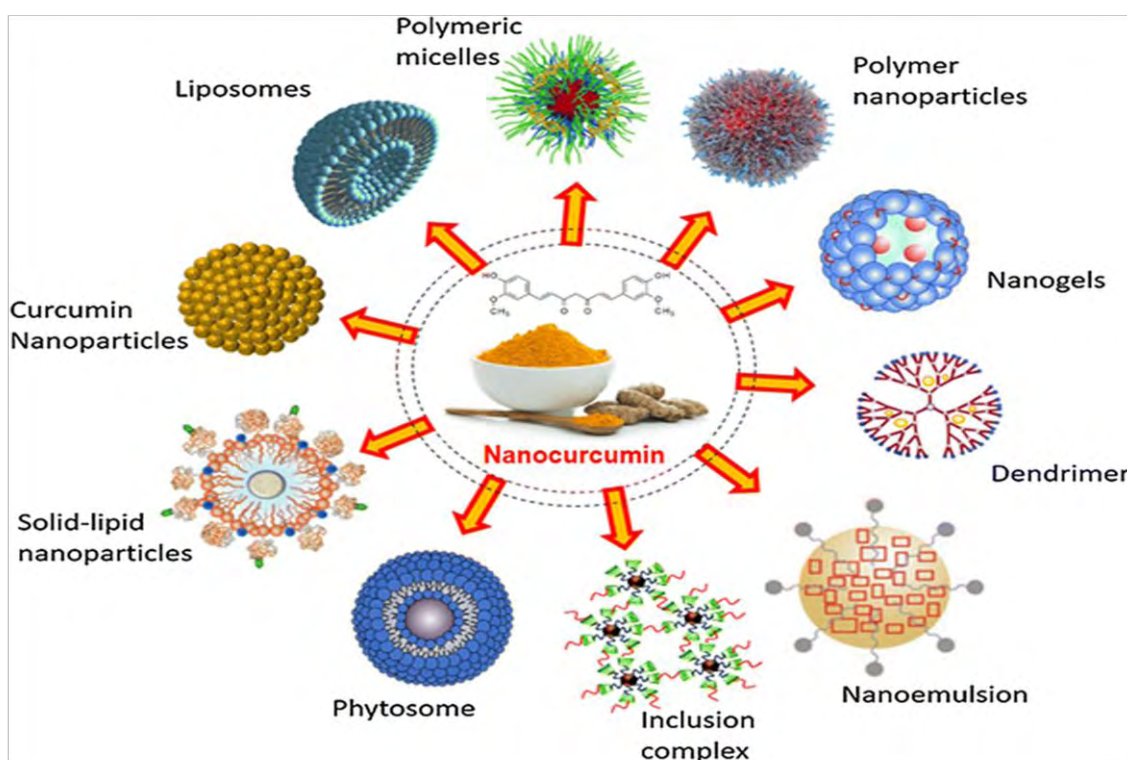
Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα κάθε παράγοντα στο σώμα συσχετίζεται με την χαμηλή απορρόφηση, τον υψηλό ρυθμό μεταβολισμού και/ή την γρήγορη καταστροφή και απομάκρυνση από το σώμα. Μέχρι σήμερα φαρμακοκινητικές μελέτες της κουρκουμίνης έχουν αποκαλύψει χαμηλή απορρόφηση από τον οργανισμό και υψηλό μεταβολισμό της. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η κουρκουμίνη δεν διαλύεται ή διαλύεται ελάχιστα στο νερό (περίπου 11ng/ml) καθώς και ότι αποικοδομείται εύκολα, ειδικά όταν βρίσκεται σε βασικά περιβάλλοντα (17). Σε συνθήκες με  $\text{pH} > 7$ , η κουρκουμίνη διασπάται σε Trans-6-(40-hydroxy-30-methoxyphenyl)-2, 4- dioxo-5-hexanal, φερουλικό οξύ, φερουλμεθάνιο και βανιλίνη μέσα σε 30 λεπτά. Αντίθετα, σε όξινες συνθήκες η αποικοδόμηση της κουρκουμίνης είναι πολύ χαμηλότερη, με την κουρκουμίνη να διασπάται σε ποσοστό μέχρι και 20% μέσα σε μία ώρα (18). Η εκ του στόματος χορήγηση της κουρκουμίνης συνήθως απορρίπτεται από το σώμα και ένα μικρό μόνο μέρος της ποσότητας απορροφάται από το έντερο. Ωστόσο, η προσροφημένη αυτή ποσότητα μειώνεται μέσω του ταχύ ρυθμού μεταβολισμού της στο συκώτι και στο πλάσμα (19). Επίσης, πέρα από την στερεή μορφή της η κουρκουμίνη μετατρέπεται και σε διαλυτούς στο νερό μεταβολίτες της όπως το γλυκουρονίδια και το θειικό και αποβάλλεται μέσω της ουρίας. Ο μεταβολισμός της κουρκουμίνης γίνεται σε δύο φάσεις. Χαρακτηριστικό της πρώτης φάσης είναι μια εξαρτώμενη από NADPH μείωση.

Στην φάση αυτήν έχουμε μία μείωση των διπλών δεσμών στη δομή της επταδιεν-3, 5-διόνης μέσω της NADPH εξαρτώμενης ρεδοκτάσης. Η φάση II βασίζεται στην πρόσδεση. Κατά την διάρκεια της, η κουρκουμίνη και οι μεταβολίτες της που παράχθηκαν στην προηγούμενη φάση συνδέονται με γλυκουρονίδια μέσω της β-γλυκουρονιδάσης, με θειικά μέσω σουλφτασών ή ένα μείγμα αυτών. Τα τελικά προϊόντα αυτής της διαδικασίας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γρήγορη αποικοδόμηση και απομάκρυνση της από τον οργανισμό (19, 20). Ο γρήγορος μεταβολισμός της έχει δείχθει σε αρκετές μελέτες τόσο υγιών όσο και ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, σε μία πρώιμη μελέτη υποστηρίζεται η χαμηλή συγκέντρωση της κουρκουμίνης στον ορό ασθενών. Σε αυτήν δόθηκε κουρκουμίνη σε δόση των 10 και 12 g σε ένα δείγμα 12 υγιών. Η ελεύθερη κουρκουμίνη ήταν πολύ κοντά στα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Ωστόσο, μέτρηση της συζευγμένης με γλυκουρονίδια ή με θειικά βρέθηκε ότι στην T<sub>max</sub> η συγκέντρωση της για τα 10g ήταν  $2.04 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$  και  $1.06 \pm 0.40 \mu\text{g/ml}$ , ενώ για τα 12g ήταν  $1.40 \pm 0.74 \mu\text{g/ml}$  και  $0.87 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (21). Καλύτερα αποτελέσματα βρέθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο. Παράδειγμα αποτελεί μία κλινική δοκιμή φάσης I όπου μελετήθηκε η δράση της εκ του στόματος κουρκουμίνης για τρεις μήνες σε 25 ασθενείς που πρόκειται να εμφανίσουν καρκίνο ή είχαν υψηλό ρίσκο εμφάνισης. Σε αυτήν αναφέρεται ό τι η κουρκουμίνη εμφανίζει το μέγιστο της ανίχνευσης της στις πρώτες 1-2 ώρες και έπειτα σταδιακά μειώνεται. Κατά μέσο όρο η συγκέντρωση της κουρκουμίνης στο μέγιστο της στον ορό ήταν  $0.51 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ,  $0.63 \pm 0.06 \mu\text{M}$ , και  $1.77 \pm 1.87 \mu\text{M}$ , έπειτα από χορήγηση 4, 6, και 8 gr κουρκουμίνης (22). Από τις παραπάνω μελέτες όπως και από βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι η κουρκουμίνη έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα αλλά είναι ασφαλείς η χορήγηση σε δόσεις μέχρι και 10 g. Για τον λόγο αυτό νέα σκευάσματα της κουρκουμίνης συζευγμένης με διάφορους φυσικούς ή τεχνητούς παράγοντες δημιουργούνται για περιορισμό των μειονεκτημάτων της χορήγησης της σε φυσική μορφή.

### 1.3.2.Φαρμακοκινητική

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω φαίνεται ότι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης οφείλεται στην χαμηλή της διαλυτότητα και τον υψηλό ρυθμό μεταβολισμού. Επομένως, ένα μέρος των μελετών έχει εστιάσει στους δύο αυτούς παράγοντες για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της. Ειδικά για την χορήγηση εκ του στόματος που αποτελεί την πιο εύχρηστη οδό χορήγησης έχουν ερευνηθεί διάφορες προσεγγίσεις. Ορισμένες από τις εναλλακτικές αυτές είναι η χορήγηση της με πιπερίνη, με φωσφολιπιδικά, καθώς και σε νανοσωματίδια.

Πιπερίνη: Αποτελεί ένα φυσικό προϊόν ικανό να επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω των αλκαλοειδών του μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*) που αποτελούν αναστολή της μετατροπής της κουρκουμίνης και κυρίως της γλυκουρονιδίωσης. Συνδυασμός 4g κουρκουμίνης με 5mg πιπερίνης αύξησε την συγκέντρωση της μέχρι και 3 φορές (23). Ένα παράδειγμα της συνδυαστικής δράσης τους δύο ουσιών αυτών είναι η μελέτη Shobal et al. Η ερευνητική ομάδα αυτή μελέτησε σε 8 υγιή ποντίκια την επίδραση της κουρκουμίνης με και χωρίς πιπερίνη. Έτσι, όταν χορηγήθηκε εκ του στόματος 2 g/kg κουρκουμίνης βρέθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα της στον ορό με C<sub>max</sub> μετά από μία ώρα να είναι στο 0.006 ± 0.005 µg/mL. Αλλά όταν η αντίστοιχη ποσότητα κουρκουμίνης συνδυάστηκε με 20µg/kg πιπερίνης η αντίστοιχη C<sub>max</sub> αυξήθηκε σε 0.18 ± 0.16 µg/mL. Αύξηση της διαθεσιμότητας της κουρκουμίνης βρέθηκε και στους ανθρώπους στην μελέτη αυτή (24). Μεταγενέστερες μελέτες αναφέρουν ότι η αύξηση της διαθεσιμότητας της κουρκουμίνης στους ανθρώπους είναι αρκετά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους ποντικούς. Μελέτη του Ryu et al καταγράφει μετά από 45 λεπτά από την χορήγηση ενός συμπλόκου κουρκουμίνης/πιπερίνης αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μέχρι και 2000%, ενώ αντίστοιχα σε αρουραίους η αύξηση αυτήν ήταν στο 154%. Επομένως, η πιπερίνη πιθανολογείται ότι μέσω της δράσης της στο έντερο και ήπαρ αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης (25).



Εικόνα 3. Διαφορετικές συστήματα μεταφοράς της κουρκουμίνης Ανατύπωση από: Bose, S., et al. Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. *Cell Div* 10, 6 (2015)

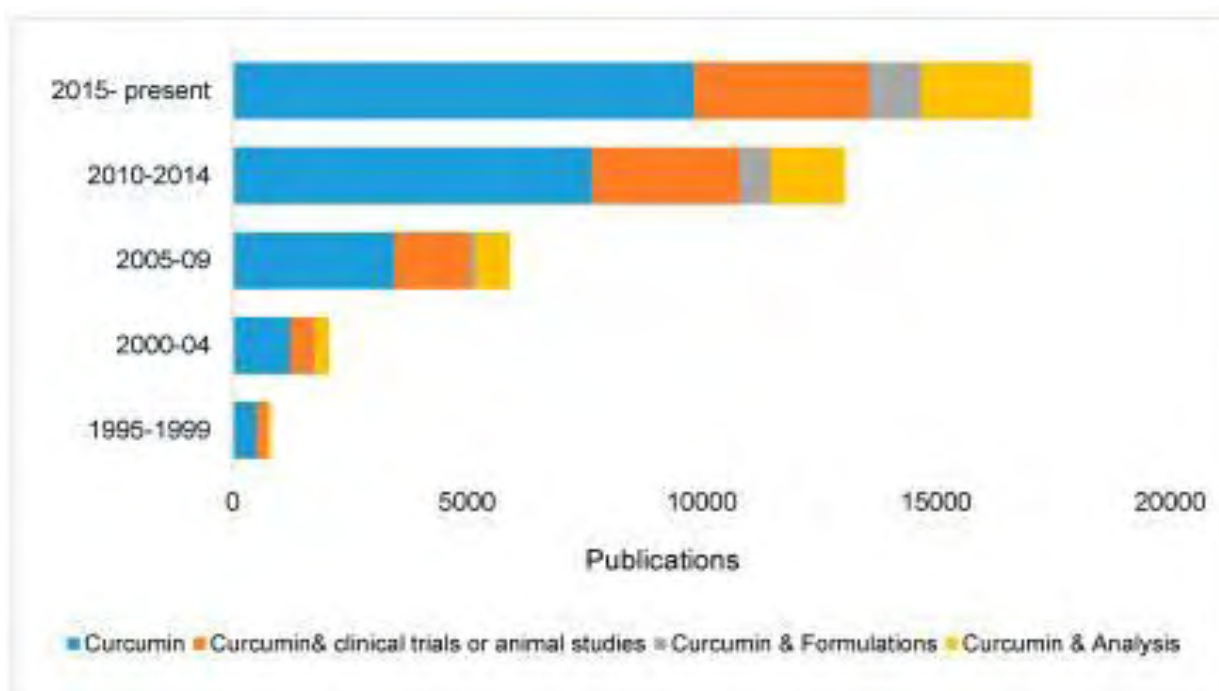
Νανοδοσματοειδή: Τα νανοδοσματοειδή είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος για αύξηση της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας διαφόρων φαρμάκων, κυρίως των αδιάλυτων στο νερό, λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους (<1000nm). Ανάλογα του τρόπου παρασκευής τους διαχωρίζονται κατά κύριο λόγο σε δύο είδη τα πολυμερή και τα λιπιδικά νανοδοσματοειδή, καθένα από τα δύο με τα δικά του πλεονεκτήματα. Τα πολυμερή είναι πολύ σταθερά και είναι εύκολα δυνατή η τροποποίηση των μεμβρανών τους. Από την άλλη, τα λιπιδικά μπορούν να αυξάνουν την διαλυτότητα, την εκ του στόματος βιοδιαθεσιμότητα καθώς και την σταθερότητα των λιπόφιλων φαρμάκων με τα οποία είναι δεσμευμένα. Διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί στα πλαίσια της μελέτης της συζευγμένης με νανοδοσματοειδή κουρκουμίνης (26). Μία ανάλογη μελέτη ήταν του Prakash et al όπου αναπτύχθηκαν με και χωρίς N-τριμεθυλ χιτοσιν (TMC) στερεά λιπιδικά νανοδοσματοειδή (SLCNs). Τα SLN διαθέτουν τροποποιημένες με TMC μεμβράνες για την σταθεροποίηση τους και την μείωση της κυκλοφορίας της κουρκουμίνης. Η κουρκουμίνη έδειξε  $C_{max}$   $0.24 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$  στις 0.5 h ( $T_{max}$ ) μετά την χορήγηση της, με  $AUC_{0-8h}$  value  $0.27 \pm 0.03$  h· $\mu\text{g/mL}$ . Τα χαρακτηριστικά αυτά επιβεβαιώνουν τα μειονεκτήματα της που αφορούν την βιοδιαθεσιμότητα και την αποικοδόμηση. Όταν, χρησιμοποιήθηκαν SLCN καταγράφηκαν υψηλότερα  $C_{max}$  ( $0.58 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ ) και  $AUC_{0-8h}$  ( $1.85 \pm 0.36$  h· $\mu\text{g/mL}$ ). Ωστόσο, από όλες παραμέτρους που διερευνήθηκαν οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν για τα TMC-SLCN με  $C_{max}$   $1.21 \pm 0.12$   $\mu\text{g/mL}$  και  $AUC_{0-8h}$   $6.23 \pm 0.75$  h· $\mu\text{g/mL}$ . Επομένως, παρατηρείται ότι τα SLN επικαλυμμένα με TMC ήταν τα καταλληλότερα για καθώς ήταν πιο σταθερά και δεν επέτρεπαν την διάσπαση της κουρκουμίνης (27). Επίσης, μια άλλη σημαντική έρευνα διεξήχθη και από τον Shaikh et al. Σε αυτήν χρησιμοποιήθηκαν βιοαποικοδομούμενα PLGA νανοδοσματοειδή συνδεδεμένα με κουρκουμίνη και συγκρίθηκαν με απλή κουρκουμίνη και κουρκουμίνη+πιπερίνη. Από αυτήν προέκυψε ότι η δεσμευμένη στα νανοδοσματοειδή κουρκουμίνη προκαλεί *in vivo* μία αύξηση 9 φορές μεγαλύτερη στην βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης όταν συγκρίθηκε με την αντίστοιχη του συμπλόκου κουρκουμίνη/πιπερίνη. Επίσης, προέκυψε ότι ο τρόπος χορήγησης επηρεάζει και την φάση απορρόφησης της με την απλή κουρκουμίνη να φτάνει σε  $C_{max}$  μετά από 0.5 ώρες, ενώ αυτήν που ήταν συνδεδεμένη με πιπερίνη μετά από 0.75 ώρες και με τα νανοδοσματοειδή μετά από 2 ώρες. Συμπεραίνεται επομένως ότι συνδεδεμένη με νανοδοσματοειδή η κουρκουμίνη διατηρεί την απελευθέρωση για μεγαλύτερο διάστημα επιτυγχάνοντας αργότερα την  $C_{max}$  πράγμα που βοηθά στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της (28).

Φωσφολιπιδικά σύμπλοκα: Μία άλλη μέθοδος για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης είναι τα φωσφολιπίδια. Πρόκειται για μικρά λιπιδικά μόρια με χαρακτηριστικότερο την φωσφατιδυλοχολίνη. Αυτήν είναι μία λιπόφιλη ουσία που προτιμά

τόσο υδατικό όσο και λιπιδικό περιβάλλον. Η φωσφατιδυλοχολίνη μπορεί να απορροφηθεί εύκολα όταν χορηγείται εκ του στόματος και χρησιμοποιείται σε σύμπλοκο με διάφορα φάρμακα. Έτσι, χρησιμοποιείται και μαζί με την κουρκουμίνη αυξάνοντας την βιοδιαθεσιμότητα και την απορρόφηση της τόσο σε υδατικά όσο και σε λιπιδικά περιβάλλοντα λόγω της αμφίφυλης φύσης του συμπλόκου. Παράδειγμα αποτελεί μία έρευνα σε αρσενικούς αρουραίους που δέχονταν εκ του στόματος 100mg/kg συμπλόκου κουρκουμίνης με φωσφολιπιδικά.. Σε αυτήν, η κουρκουμίνη μόνη της έχει  $C_{max}$  267ng/ml, ενώ το σύμπλοκο 600ng/ml δηλαδή περίπου 1.5 φορά αύξηση στην συγκέντρωση της κουρκουμίνης στον ορό (29). Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και από την δημοσίευση των Gupta et al. Οι ερευνητές αυτοί ασχολήθηκαν με την *ex vivo* δράση της συνδεδεμένα με φωσφατιδυλοχολίνη κουρκουμίνης σε αρουραίους. Έτσι, 1mg/kg του συμπλόκου συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ποσότητα της ελεύθερης κουρκουμίνης και βρέθηκε ότι *ex vivo* η απορρόφηση της κουρκουμίνης ήταν αυξημένη με το σύμπλοκο. Επίσης, η  $C_{max}$  του συμπλόκου της κουρκουμίνης ήταν πολύ μεγαλύτερη ( $C_{max}$ = 803.86 ng/ml) συγκριτικά με την απλή κουρκουμίνη ( $C_{max}$ =258.64) (30). Επομένως, τα φωσφολιπιδικά έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης. Κάτι που επιτυγχάνεται μέσω αύξησης των επιπέδων της στο πλάσμα, μείωση του χρόνου ημιζωής και της αποικοδόμησης της επηρεάζοντας συνολικά όλη την φαρμακοκινητική της.

#### 1.4.Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Η κουρκουμίνη όπως αναλύθηκε και αναφέρθηκε προηγουμένως είναι μια ουσία που επί 4000 χιλιάδες χρόνια έχει αναγνωριστεί και βρίσκει ευρεία χρήση στην θεραπευτική. Τα τελευταία χρόνια ειδικά υπάρχουν διάφορες μελέτες που αναλύουν τις ιδιότητες της με περισσότερα από 6000 άρθρα στην ηλεκτρονική βιβλιοθήκη PUBMED να υπάρχουν αυτήν την στιγμή όσο αναφορά αυτές. Οι ιδιότητες της αυτές είναι ποικίλες και αφορούν πολλά διαφορετικά νοσήματα. Οι σημαντικότερες εξ αυτών θα αναλυθούν παρακάτω. Επιγραμματικά αυτές είναι οι 1. αντι-μικροβιακές, 2. αντι-καρκινικές, 3. αντι-οξειδωτικές, 4. αντι-αγγειογενετικές, 5. νευροπροστατευτικές, 6. στην θεραπεία τραυμάτων, 7. αντι-φλεγμονώδης και 8. ανοσορυθμιστικές.



Εικόνα 4: Αριθμός των δημοσιεύσεων από το 1995 έως το 2019 (α) της κουρκουμίνης, (β) της κουρκουμίνης και κλινικών δοκιμών ή ζωικών μελετών, (γ) της κουρκουμίνης και σκευασμάτων της, (δ) της κουρκουμίνης και αναλύσεων της. Ανατύπωση από: Raghavendhar KR et al., Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects, *Molecules*. 2019 Aug; 24(16): 2930.

#### 1.4.1. Αντι-μικροβιακές ιδιότητες

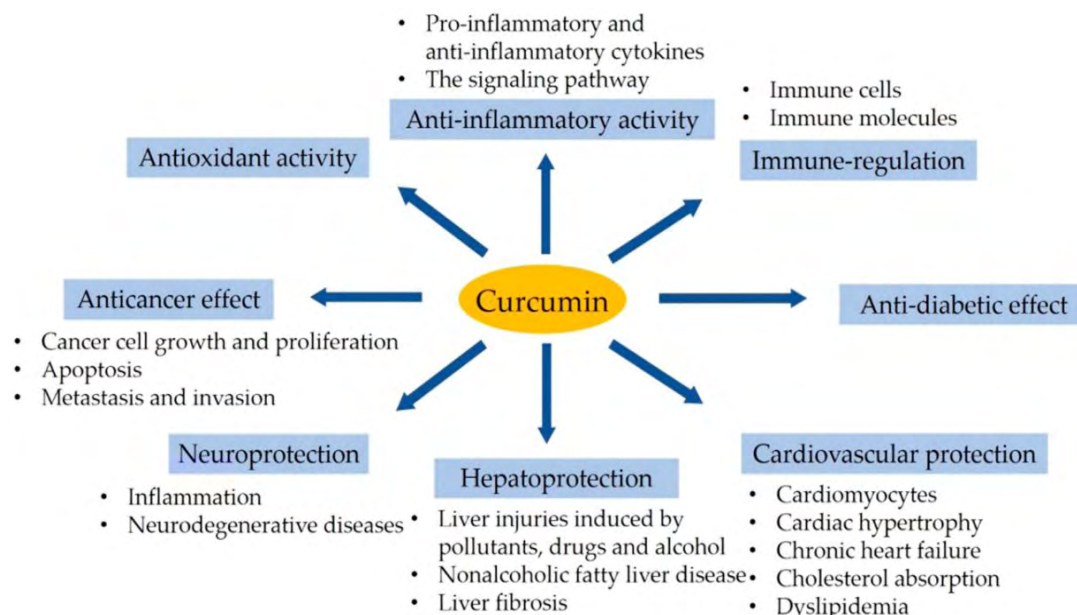
Οι αντι-μικροβιακές ιδιότητες της κουρκουμίνης αποτελούν μίας από τις σημαντικότερες ιδιότητες τους. Άλλωστε, η πρώτη δημοσίευση σχετικά με την ουσία αυτήν, όπως αναφέρθηκε, ήταν το 1949 και η οποία αναφερόταν στην αντι-μικροβιακή δράση της ενεργή έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Trichophyton gypsum* και *Mycobacterium tuberculosis*. Η μελέτη αυτήν ήταν που πυροδότησε το επερχόμενο ενδιαφέρον σχετικά με την κουρκουμίνη και την περαιτέρω μελέτη της δράσης της ως αντι-μικροβιακή ουσία. Αναλύοντας την δράση της κουρκουμίνης αποδείχθηκε κατά την διάρκεια των χρόνων ότι η ουσία αυτή μπορεί να ασκεί ισχυρή δράση τόσο έναντι βακτηριδίων όσο και μυκήτων ή ιών. Όσον αφορά την αντι-βακτηριδιακή δράση της έχει τεκμηριωθεί η δράση της σε σχέση με διάφορα βακτήρια όπως για παράδειγμα το *E. coli*, *St. aureus* και *H. pylori*. Μελέτη της προηγούμενης δεκαετίας ανέφερε ότι η MIC (minimum inhibitory concentration) ενός εκχυλίσματος από τις ρίζες του φυτού *C. Longa* ήταν 4-16g/l, ενώ η MBC (minimum bactericidal concentration) ήταν 16-32g/l *S. epidermis*, *Staph. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* και *E. coli*. Επομένως, μιας και οι τιμές είναι ιδιαίτερα κοντά στην μελέτη δείχθηκε ότι το εκχύλισμα ανέστειλε την ανάπτυξη των στελεχών αυτών των βακτηρίων (31). Επίσης, και μία άλλη μελέτη πάνω σε παθογόνα βακτήρια απομονωμένα από κοτόπουλα και γαρίδες έδειξε ότι το εκχύλισμα μεθανόλης από τις ρίζες του

*C. longa* έχει μεγαλύτερη αντιβακτηριδιακή ικανότητα σε σχέση με το αντίστοιχο με εξάνιο. Τόσο το ένα όσο και το άλλο κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη 13 ειδών βακτηρίων του είδους *Staphylococcus*, *Vibrio* και *Bacillus*, ενώ δεν κατάφερε τον αντίστοιχο αποτέλεσμα σε 8 άλλα (32). Μεγάλος όγκος δεδομένων υπάρχει και για το βακτήριο *H. pylori*. Μία μελέτη εξ'αυτών αναφέρει ότι η τιμή MIC για 65 απομονωμένα *H. pylori* ήταν μεταξύ 5 και 50 µg/ml υποδεικνύοντας την δράση της κουρκουμίνης έναντι του βακτηρίου αυτού (33). Η δράση αυτή της κουρκουμίνης έχει μελετηθεί εκτενώς και σε μοριακό επίπεδο με μελέτες να αναφέρονται στην επίδραση μεταλλοπρωτεϊνάσεων του πυρήνα (MMP) και κυρίως οι MMP-3 και -9 (34) καθώς και μέσω του NF-κB (35).

Πέρα από την δράση της έναντι βακτηρίων η κουρκουμίνη έχει ισχυρή δράση και έναντι ιών όπως ο HBV/HCV, HPV και HIV. Εκχύλισμα από το *Curcuma longa* κατάφερε να μειώσει τον ρυθμό παραγωγής σωματιδίων HBV από μολυσμένα κύτταρα καθώς και να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του ιού μέσω δράσης στον μεταγραφικό παράγοντα p53. Ακόμη, μέσω της κουρκουμίνης επιτεύχθηκε μείωση των επιπέδων του mRNA του HBV από τα μολυσμένα κύτταρα (36). Ενώ, σύμφωνα με μελέτη των Kim et al δείχθηκε ότι η κουρκουμίνη μπορεί να αναστέλλει και τον HCV μέσω επίδρασης της στο μονοπάτι Akt-SREBP-1 (37). Όσον αφορά τον HPV, η κουρκουμίνη αυξάνει την απόπτωση των μολυσμένων με HPV κυττάρων όπως αυτά που έχουν μολυνθεί με HPV16 και HPV18, ενώ μπορεί και να μειώσει τα ιικά ογκογονίδια E6 και E7. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης του IκB και άρα μείωση της ενεργοποίησης του NF-κB. Επίσης, και η αναστολή του AP-1 συνεισφέρει στην μείωση της μεταγραφής και άρα στην συνολική αντι-ική δράση της κουρκουμίνης (38, 39). Σημαντικό είναι να αναφερθεί και ο ιός του AIDS ή αλλιώς HIV στον οποίο φαίνεται να επιδρά η κουρκουμίνη. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι η κουρκουμίνη έχει την δυνατότητα να αναστέλλει την μεταγραφή των μακρών τερματικών επαναλήψεων αλληλουχιών που είναι απαραίτητες για την επιβίωση και αναπαραγωγή του ιού. Ειδικά ένα παράγωγο της κουρκουμίνης, η τοκοφερολ-κουρκουμίνη δείχθηκε ότι σε συγκέντρωση 1nM προκάλεσε 70% αναστολή της μεταγραφής ποσοστό υψηλότερο από το 30% της αναστολής που επέφερε η χρήση της απλής κουρκουμίνης (40). Επίσης, η κουρκουμίνη δείχθηκε να αναστέλλει την ακετυλίωση της Tat πρωτεΐνης. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω απευθείας αναστολής της ακετυλοτρανσφεράσης της p300/CREB συνδετικής πρωτεΐνης (CBP). Η επίδραση αυτή γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής και όχι στο DNA προκαλώντας έτσι και μια ακόλουθη αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιού (41). Ωστόσο, τα πειράματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο κλινικών μελετών. Μελέτη του James et al με 40 ασθενείς με HIV στους οποίους χορηγούνταν κουρκουμίνη για 8 εβδομάδες δεν έδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα. Μετά το πέρας των 8 εβδομάδων δεν ήταν ενθαρρυντικά καθώς οι



ασθενείς δεν παρουσίασαν μειωμένο ιικό φορτίο ούτε αύξηση του πληθυσμού των CD4+ κυττάρων (42). Επομένως, σε επίπεδο *in vitro* η κουρκουμίνη παρουσιάζει διάφορα θετικά στον ιό του HIV που όμως θα πρέπει να διερευνηθούν παραπάνω σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Ωστόσο, όλα αυτά τα αποτελέσματα είναι μόνο ορισμένα από την καλά χαρακτηρισμένη αντι-μικροβιακή δράση της κουρκουμίνης η οποία είναι από τις σημαντικότερες της ιδιότητες. Η ιδιότητα της όμως αυτήν δεν θα αναλυθεί περαιτέρω μιας και δεν αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής.



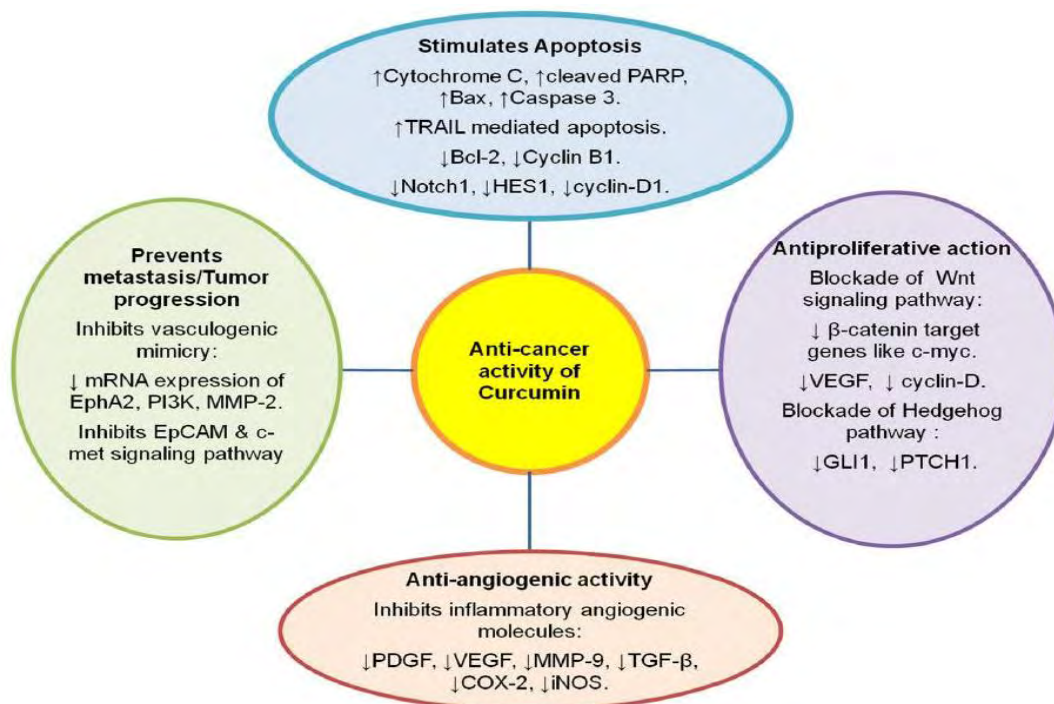
**Εικόνα 5. Οι βασικότερες δράσεις της κουρκουμίνης.** Ανατύπωση από: Xu. X-Y et al., Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives, *Nutrients* 2018, 10(10), 1553

#### 1.4.2 Αντι-καρκινικές ιδιότητες

Μία σημαντική ιδιότητα της κουρκουμίνης που έχει διερευνηθεί αρκετά είναι η αντι-καρκινική της ιδιότητα. Η ουσία αυτήν έχει παρουσιάσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα αναστολή του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Αυτό δεν αφορά ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνο αλλά επεκτείνεται σε μία πληθώρα όπως ο καρκίνος του προστάτη, του εγκεφάλου, του παχέος εντέρου, του μαστού, του κεφαλιού, του παγκρέατος και του λαιμού. Τα αποτελέσματα αυτά είναι τόσο *in vitro* σε διάφορες καρκινικές σειρές όσο και *in vivo* από ζώα ή κλινικές μελέτες σε ασθενείς. Χάρην παραδείγματος θα αναφερθούν μόνο δύο είδη καρκίνου τόσο για την *in vitro* όσο και για την *in vivo* επίδραση της κουρκουμίνης. Ξεκινώντας με τον καρκίνο του προστάτη, από έρευνες η κουρκουμίνη έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την απόπτωση των καρκινικών ενώ παράλληλα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους. Ο μηχανισμός πίσω από την δράση αυτήν συμπεριλαμβάνει μια πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών με χαρακτηριστικά του MAPK (mitogen-activated protein kinase), EGFR (epidermal growth factor

receptor) και NF-κB (nuclear factor κB) (43, 44). Επίσης, συνδεδεμένη με μέταλλα κουρκουμίνη αναφέρεται ότι προκαλεί αυξημένη απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (45). Πέρα από τον καρκίνο του προστάτη και ο καρκίνος του στήθους είναι ένας σημαντικός τύπος καρκίνου που επιδρά η κουρκουμίνη. Ο Liu et al μελέτησε την επίδραση της κουρκουμίνης σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του στήθους. Ως αποτέλεσμα προέκυψε ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει τόσο δόσο- όσο και χρόνο-εξαρτώμενα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των υπό κουρκουμίνη κυττάρων σε σχέση με τα υπόλοιπα. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει λόγω της ικανότητας της ουσίας αυτής να μειώνει την έκφραση του NF-κB, της κυκλίνης D και της MMP-1 (46). Η δράση, όμως, της κουρκουμίνης δεν περιορίζεται εκεί. Συνδυασμός της με ένα βιοπολυμερές την αραβινογαλακτάνη προκάλεσε αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση G1 του πολλαπλασιασμού τους, ενώ παράλληλα αύξησε την αναλογία Bax/Bcl2. Αυτά καθώς και η αύξηση των επιπέδων την κασπάσης 3 στα κύτταρα υποδηλώνει ότι η κουρκουμίνη επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η απόπτωση φαίνεται να επάγεται και μέσω ενός άλλου μηχανισμού, της αύξησης των ROS και της μείωσης της γλουταθειόνης. Στο σημείο αυτό η ερευνητές προχώρησαν λίγο παραπέρα με την μεταφορά των καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια. Στο *in vivo* μοντέλο αυτό παρατηρήθηκε ότι η κουρκουμίνη μέσω της αναστολής του ki67 και την αύξηση του p53 προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του όγκου (47). Όσα αναλύθηκαν προηγουμένως ήταν κυρίως *in vitro* μοντέλα που παρότι είναι ιδιαίτερα σημαντικά δεν μπορούν να υποκαταστήσουν τα *in vivo*. Στο πλαίσιο αυτής της πειραματικής προσέγγισης θα αναλυθούν δύο τύποι καρκίνου, ο καρκίνος του παγκρέατος καθώς και του παχέος εντέρου. Όσον αφορά τον πρώτο αίμα από 25 ασθενείς πάρθηκε στο οποίο εντοπίστηκε μείωση των επιπέδων του NF-κB, της κυκλοοξυγενάσης 2 και του STAT3 σε PBMCs ασθενών που έπαιρναν κουρκουμίνη. Στην μελέτη αυτήν αναφέρεται επίσης η πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης αλλά και η χωρίς παρενέργειες χρήση της (48). Αργότερα μια άλλη μελέτη από τον Erelbaum μελέτησε την κουρκουμίνη σε συνδυασμό με την γεμισιταβίνη. Στην μελέτη αυτή συμπεριλήφθησαν 17 ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε εκ του στόματος 8g κουρκουμίνης. Η δόση αυτήν θεωρήθηκε αρκετά υψηλή ωστόσο φάνηκε ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα να βοηθά την δράση της γεμισιταβίνης λειτουργώντας χημειοθεραπευτικά (49). Περνώντας στο καρκίνο του παχέος εντέρου η κουρκουμίνη στις πρώτες μελέτες δεν φάνηκε να έχει ισχυρή δράση. Ο Carroll et al στηριζόμενη στο ότι η κουρκουμίνη μειώνει τα επίπεδα των PGE2 και HETE-5 στα ποντίκια προσπάθησε να αποδείξει το ίδιο σε ένα *in vivo* μοντέλο. Γι αυτό πραγματοποιήθηκε μια κλινική μελέτη 44 ασθενών που κάπνιζαν οι οποίοι θα έπρεπε να έχουν ACF>8 και στους οποίους δόθηκε είτε 2 g ή 4 g κουρκουμίνης ημερησίως για 30 μέρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης όμως δεν ήταν θετικά μη βρίσκοντας κάποια αλλαγή στα επίπεδα των δύο παραγόντων. Από την άλλη, υπήρξε

μια μείωση της τάξης του 40% στο ACF που συσχετίστηκε με βελτίωση της νόσου (50). Ένα παράδειγμα όπου η κουρκουμίνη δεν είχε αρνητικό αποτέλεσμα ήταν η δημοσίευση του He et al. Σ' αυτήν την κλινική έρευνα συμπεριλήφθησαν 126 ασθενείς όπου ένα ποσοστό αυτών έπαιρναν εκ του στόματος 360mg κουρκουμίνη 3 φορές την μέρα. Μια σημαντική μείωση των επιπέδων του TNF-a βρέθηκε στον ορό των ασθενών που κατανάλωναν κουρκουμίνη. Επίσης, η κουρκουμίνη προκάλεσε αύξηση του p53 και του Bax, ενώ μείωσε το Bcl-2. Κατά συνέπεια, μετά την χορήγηση της ουσίας βρέθηκε και μεγαλύτερος αριθμός αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων (51). Κλείνοντας είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η κουρκουμίνη έχει δοκιμαστεί και σε άλλους είδους καρκίνου τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε ασθενείς. Όμως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιηθούν περαιτέρω κλινικές μελέτες που θα απαντήσουν στα ερωτήματα σχετικά με τις δράσεις της κουρκουμίνης στην θεραπεία του καρκίνου.



**Εικόνα 6. Οι αντι-καρκινικές ιδιότητες της κουρκουμίνης.** Ανατύπωση από: Sharma S. et al., Curcumin: an adjuvant therapeutic remedy for liver cancer, *Hepatoma Res* 2016;2:62-70.

### 1.4.3. Αντι-οξειδωτικές ιδιότητες

Διάφορες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ικανότητα της κουρκουμίνης ως αντι-οξειδωτικό. Η ικανότητα της αυτήν σε συνδυασμό με την αντι-φλεγμονώδη που θα αναλυθεί παρακάτω αποτελούν κύριους μηχανισμούς με τους οποίους είναι πιθανό να βοηθήσει η κουρκουμίνη σε διάφορες ασθένειες. Η ικανότητα αυτήν στηρίζεται στο ότι η κουρκουμίνη είναι ικανή να επάγει διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), την καταλάση, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH), ενώ προστατεύει και από ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Μία μετα-ανάλυση του Sahekbabar στην οποία μελετήθηκαν 6 άρθρα με διάφορα κουρκουμινοειδή παρουσία ή όχι πιπερίνης τόνισε την αντιοξειδωτική ικανότητα των κουρκουμινοειδών. Σύμφωνα με αυτήν έγινε φανερό ότι η κουρκουμίνη ρίχνει τα επίπεδα τόσο τη GSH όσο και της λιπιδικής υπεροξειδάσης στον ορό των ασθενών, ενώ αύξησε και την ενεργότητα του SOD και της καταλάσης. Οι μελέτες αυτές διενεργήθηκαν με διάφορα σκευάσματα κουρκουμίνης και κουρκουμινοειδών καθώς έτσι ενισχύθηκε η βιοδιαθεσιμότητα της (52). Επίσης, μια άλλη μελέτη αργότερα από τους Panahi et al. επαλήθευσε τα αποτελέσματα των προηγούμενων ερευνών. Σε αυτήν συμπεριλήφθησαν 40 άτομα που έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα στα οποία δόθηκε είτε κάψουλα κουρκουμινοειδών ή πλασίμπο για μια περίοδο 6 εβδομάδων. Έτσι, προέκυψε ότι η ενεργότητα της SOD αυξήθηκε με mean change:  $2.94 \pm 3.73$  σε  $-0.38 \pm 1.33$  με  $p < 0.001$ , ενώ αυξήθηκαν τα επίπεδα του GSH με mean change:  $1.39 \pm 2.78$  σε  $-0.02 \pm 1.62$  με  $p = 0.064$  και μειώθηκε η MDA με mean change:  $-5.26 \pm 4.46$  vs.  $-2.49 \pm 3.81$  με  $p = 0.044$  (53). Πέρα όμως της απευθείας δράσης της κουρκουμίνης στα αντι-οξειδωτικά ένζυμα σημαντική είναι και ο μηχανισμός δράσης της στις ενεργές ρίζες. Μπορεί να επιδρά σε διάφορες ελεύθερες ρίζες όπως στις ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της ενεργότητας των ενζύμων GSH, SOD και καταλάσης που μπορούν να εξουδετερώνουν τις ρίζες αυτές. Επίσης, πέρα από την εξουδετέρωση επιδρά και στην αρχική παραγωγή τους. Ειδικά για τις ROS έχει δειχθεί ότι αναστέλλει σημαντικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ριζών αυτών όπως για παράδειγμα της λιποοξυγενάσης, της κυκλοοξυγενάσης, καθώς και της οξειδάσης και της υδροξυγενάσης της ξανθίνης (54, 55). Μελέτη στην ηπατοκυτταρική σειρά L02, η οποία είχε εκτεθεί σε μία ακετόνη που επάγει την κυτταροτοξικότητα και άρα και οξειδωτικό στρες, έδειξε ότι *in vitro* η χορήγηση της κουρκουμίνης πριν την χορήγηση της ακετόνης εμπόδισε σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή ROS. Αυτό επιτεύχθηκε καθώς η κουρκουμίνη κατάφερε να αναστείλει την μείωση των επιπέδων των αντι-οξειδωτικών ενζύμων όπως το SOD αλλά και απαραίτητων για αυτά συστατικών όπως η γλουταθειόνη (56). Τέλος, σημαντικό είναι ότι η κουρκουμίνη έχει την δυνατότητα να δρά ως μια λιπόφιλη ουσία με αποτέλεσμα να μπορεί να αφαιρεί ρίζες υπεροξειδίου. Η αντι-οξειδωτική δράση της αυτή οφείλεται στην ικανότητα της να δρα παρόμοια με την βιταμίνη E διασπώντας

αλυσίδες των μορίων. Η κουρκουμίνη αποτελείται από μία φαινολική ομάδα που μπορεί να δωρίζει άτομα υδρογόνου πράγμα που ενισχύει την αντι-οξειδωτική ικανότητα της (57). Έτσι, διερευνήθηκε η επίδραση της κουρκουμίνης στην κυτταρική σειρά A259 που είχαν μολυνθεί με influenza A virus (IAV) που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Η ουσία αυτήν κατάφερε να μειώσει την παραγωγή των ROS, ενώ παράλληλα και αύξησε την ενεργοποίηση των TLR με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση του ιού. Κλείνοντας, η αντι-οξειδωτική δράση της κουρκουμίνης είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες ιδίως σε χρόνιες και θα μπορούσε να αποτελεί έναν ενδεχόμενο θεραπευτικό παράγοντα γι' αυτές.

#### 1.4.4. Αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες

Αγγειογένεση είναι η διαδικασία ανάπτυξης νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Η αγγειογένεση αποτελεί κύριο παράγοντα για την ανάπτυξη όγκου και την επέκτασή του. Ένας φυσικός αναστολέας αυτής είναι η κουρκουμίνη. Η ουσία αυτήν μπορεί να δράσει με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος τρόπος είναι απευθείας στην αγγειογένεση δηλαδή να έχει επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα και λιγότερα ή και καθόλου στα καρκινικά κύτταρα. Ο δεύτερος τρόπος δεν αφορά την δράση της στα επιθηλιακά αλλά σε διάφορους παράγοντες που μπορούν να διεγείρουν την διαδικασία αυτή. Παράγοντες τέτοιοι είναι προ-αγγειογενετικές πρωτεΐνες όπως διάφορες κυτταροκίνες (58).

Αναφορικά με τον πρώτο μηχανισμό, κατά την διάρκεια την αγγειογένεσης κύριο ρόλο διαδραματίζει η εξωκυττάρια πρωτεόλυση η οποία συμμετέχει σε πολλά στάδια της όπως στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, στην αναδιάταξη του πυρήνα, στην μετανάστευση και διήθηση των κυττάρων. Δύο από τις κύριες κατηγορίες ενζύμων που επηρεάζει η κουρκουμίνη είναι οι πρωτεΐνασες σερίνης καθώς και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Η κουρκουμίνη από πηγές αναφέρεται ότι αναστέλλει και τις δύο κατηγορίες αυτές (59, 60). Στην οικογένεια των σερινών ισχυρή δράση έχει έναντι της uPA (urokinase plasminogen activator system) η οποία συνδέεται σε έναν υποδοχέα της (uPAR) μέσω της περιοχής της που προσομοιάζει με τον επιδερμικό αναπτυξιακό παράγοντα (EGF). Αναστέλλοντας τον παράγοντα αυτόν η κουρκουμίνη επιδρά απευθείας στην αγγειογένεση καθώς ο uPA είναι υπεύθυνος για την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ ελέγχει και μια πληθώρα αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο bFGF, ο TGF-β, ο TNF, ο αναπτυξιακός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF) και ο VEGF (61). Μελέτη στα κερατινοκύτταρα ποντικών έδειξε ότι η κουρκουμίνη μειώνει την επαγόμενη από τον TGF-β έκφραση του uPA. Έτσι, μπορεί να αναστέλλει σύνθεση της φιβρονεκτίνης καθώς και να εμποδίζει την επαγωγή της μετανάστευσης και εξάπλωση των κυττάρων (62). Σε μία άλλη μελέτη υποστηρίζονται παρόμοια αποτελέσματα καθώς η κουρκουμίνη φάνηκε να αναστέλλει την επαγόμενη από N-μεθυλ-N-νιτρο-N-νιτροσογουανιδίνη (MNNG). Στο πείραμα

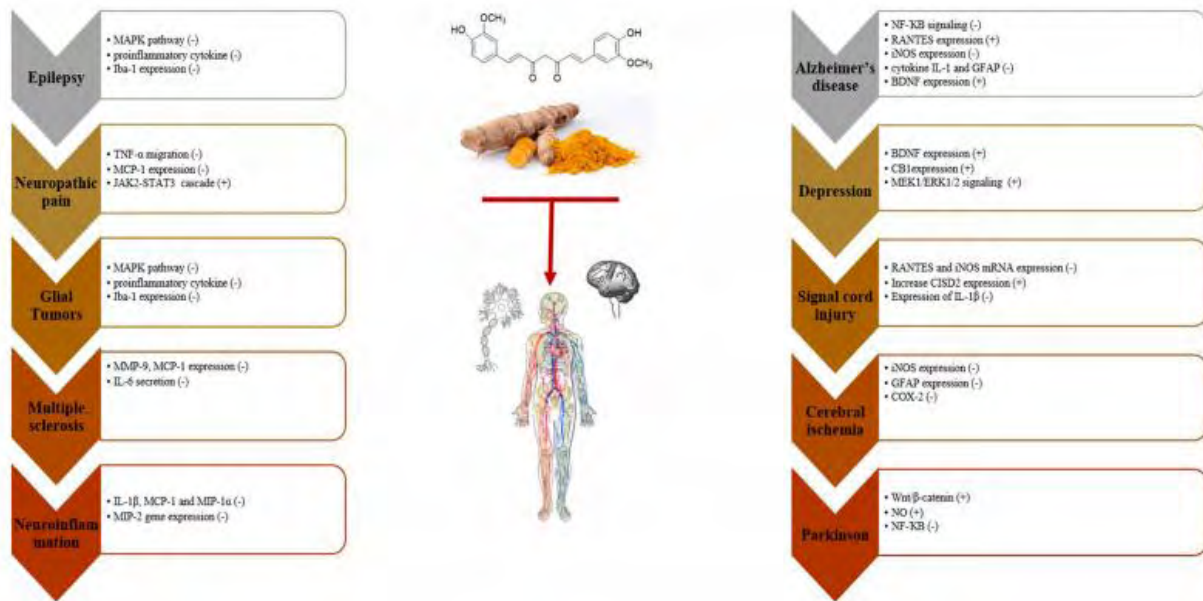
αυτό η κουρκουμίνη έδρασε σε τρία επίπεδα αναστέλλοντας τον AP-1, παράγοντας που ενισχύει το uPA, την μεταγραφή του uPA καθώς και μειώνοντας τα επίπεδα mRNA του uPA (63). Εκτός από την δράση στις πρωτεΐνάσες σερίνης η κουρκουμίνη δρα και στις μεταλλοπρωτεΐνάσες που όπως αναφέρθηκε συμμετέχουν σε απαραίτητες διαδικασίες της αγγειογένεσης. Από μελέτες η κουρκουμίνη φαίνεται ότι αναστέλλει την έκφραση και μεταγραφή, καθώς και την ενεργότητα της 72-kDa MMP δηλαδή της MMP-2. Φαίνεται έτσι να δρα τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Μια άλλη μεταλλοπρωτεΐνάση που επιδρά η κουρκουμίνη είναι και η MMP-9. Τα κουρκουμινοειδή υποστηρίζεται ότι έχουν την δυνατότητα να αναστέλλουν τον FGF-2 με αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο AP-1, μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιεί την MMP-9 (64). Επομένως, και μέσω των MMP η κουρκουμίνη φαίνεται να ασκεί ρυθμιστική δράση στην αγγειογένεση.

Πέραν όμως της απευθείας ρύθμισης όπως αναφέρθηκε η κουρκουμίνη μπορεί να ρυθμίζει την αγγειογένεση και μέσω των προ-αγγειογενετικών παραγόντων μειώνοντας την παραγωγή τους. Σημαντικοί παράγοντες της είναι ο VEGF και ο bFGF. Μελέτη του Cui et al. παρουσιάζει την επίδραση του TNF και της κουρκουμίνης στην παραγωγή και έκκριση του VEGF. Τόσο στα U937 όσο και στα Raji κύτταρα ο TNF αυξάνει τα επίπεδα του mRNA του VEGF165 και VEGF121 ενώ η κουρκουμίνη δρα αντίθετα. Επομένως, οι ερευνητές καταλήγουν ότι ο VEGF και ο TNF επάγουν την αγγειογένεση, ενώ η κουρκουμίνη την αναστέλλει στα ECV304 κύτταρα και έτσι αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό ελέγχου της αγγειογένεσης στον καρκίνο (65). Πέρα από τον VEGF και η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2) έχει τεκμηριωθεί ότι δρα άμεσα ή έμμεσα στην αγγειογένεση του καρκίνου. Μελέτη του Yoysungnoen et al. σε ποντίκια έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα του VEGF και COX-2 συνδέονταν με αυξημένη συγκέντρωση τριχοειδών καρκίνου (NCD). Χορήγηση κουρκουμίνης επέφερε μείωση τόσο των NCD όσο και του VEGF και COX-2 που αποτελούν δείκτες της αγγειογένεσης (66). Τέλος, η κουρκουμίνη μείωσε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή όχι bFGF και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό μιας ενδοθηλιακής καρκινικής κυτταρικής σειράς. Επομένως, η κουρκουμίνη κατάφερε να αναστείλει την επαγόμενη από τον bFGF αγγειογένεση (67). Εν κατακλείδι, η κουρκουμίνη λειτουργώντας με τους δύο μηχανισμούς που αναλύθηκαν δηλαδή είτε απευθείας στην αγγειογένεση ή μέσω της αναστολής προ-αγγειογενετικών παραγόντων φαίνεται να έχει κύριο ρόλο στην διαδικασία αυτή. Ωστόσο, απαραίτητο είναι η περαιτέρω διερεύνηση της και σε *in vivo* μοντέλα για την τεκμηρίωση της δράσης αυτής σε ανθρώπους και όχι μόνο σε επίπεδο *in vitro* πειραμάτων.

#### 1.4.5. Ενίσχυση θεραπείας τραυμάτων

Μία ακόμη δράση της κουρκουμίνης είναι και στην ενίσχυση της θεραπείας τραυμάτων. Σημαντικές ιδιότητες που βοηθούν στην διαδικασία αυτή είναι οι αντι-οξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της. Μελέτη σε ζωικό μοντέλο ποντικών ανέφερε ότι η ουσία αυτήν μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της IL-6, MMP-2, TIMP-1/2 και iNOS επιταχύνοντας την διαδικασία της θεραπείας τραυμάτων έπειτα από χειρουργικό τραύμα (68). Η κουρκουμίνη *in vitro* δεν κατάφερε να προκαλέσει αύξηση της μετανάστευσης των ινοβλαστών στην περιοχή της βλάβης (69). Ωστόσο, σε ένα μοντέλο αρουραίων ένας πολυμερές κουρκουμίνης κατάφερε να προκαλέσει αύξηση της εναπόθεσης μυοινοβλαστών (70). Άλλη ιδιότητα της κουρκουμίνης είναι στον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού. Ο Mohenty et al. αναφέρει ότι το COP, ένας πολυμερές κουρκουμίνης, κατάφερε να μέσα σε 10 μέρες από την χορήγηση του να δημιουργήσει ένα καλύτερο οργανωμένο κοκκιωματώδες ιστό. Η καθυστέρηση αυτήν εξηγείται με το ότι η έναρξη της δημιουργίας του ιστού ξεκινά 4 μέρες μετά το τραύμα. Ωστόσο, το εύρημα αυτό είναι σημαντικό καθώς αυτό το στάδιο είναι έχει μεγάλη σημασία στην δημιουργία του νέου επιθηλίου βοηθώντας τα επιθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν κλείνοντας την πληγή (71). Πέρα από την έμμεση δράση της όμως μπορεί να δρα και απευθείας στην δημιουργία του νέου επιθηλίου. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω της αύξησης του ρυθμού επιθηλιοποίησης του ιστού. Έρευνα του Panchatcharam et al. έδειξε ότι η τοπική χορήγηση κουρκουμίνης σε αρουραίους μείωσε σημαντικά την περίοδο επιθηλιοποίησης από 23 μέρες σε 11 μέρες σε σχέση με την ομάδα αναφοράς (72). Τέλος, σημαντικό στάδιο στην θεραπεία τραυμάτων είναι η δημιουργία της εξωκυττάριας μήτρας. Για την κατασκευή αυτή απαιτείται κολλαγόνο μιας και αποτελεί το 70-80% του δέρματος. Έτσι, από διάφορα μελέτες βρέθηκε ότι η κουρκουμίνη έχει σαν αποτέλεσμα καλύτερη τοποθέτηση και μεγαλύτερη εναπόθεση κολλαγόνου (73), καθώς και πιο πρόωμη μετακίνηση κολλαγόνου και δημιουργία ινών του (72). Συνολικά, λοιπόν, η κουρκουμίνη μέσα από τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την δημιουργία κοκκιώδους ιστού, της γρήγορης επανεπιθηλίωσης και της εναπόθεσης κολλαγόνου φαίνεται να διαδραματίζει κύριο ρόλο στην διαδικασία της θεραπείας τραυμάτων, ενισχύοντας της σημαντικά.





**Εικόνα 7. Νευροπροστατευτικές δράσεις της κουρκουμίνης και οι μοριακή της στόχοι.**  
Ανατύπωση από: Eghbaliferiz S. et al., Effects of curcumin on neurological diseases: focus on astrocytes, *Pharmacological Reports* volume 72, pages769–782(2020)

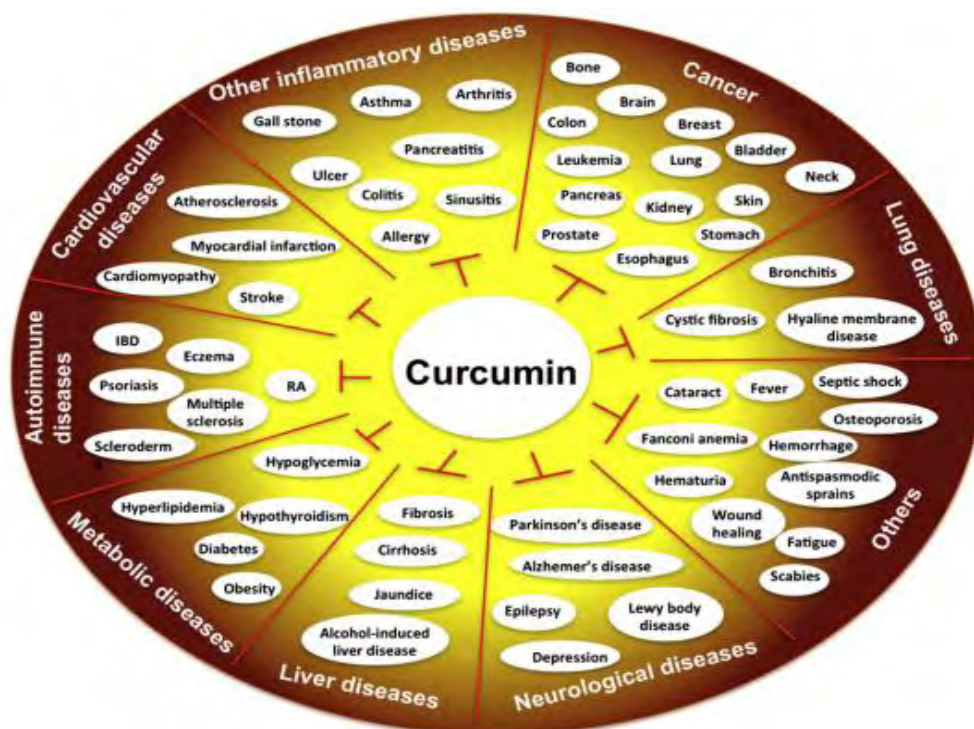
#### 1.4.6.Νευροπροστατευτικές ιδιότητες

Όπως αναφέρθηκε μέχρι στιγμής η κουρκουμίνη είναι μια ουσία που έχει ευρεία δράση συμμετέχοντας σε διάφορες καταστάσεις. Αυτή η τόσο ευρεία δράση περιπλέκει μεταγραφικούς παράγοντες, κινάσες, σηματοδοτικά μονοπάτια και διάφορα άλλα που της χαρίζουν την ιδιότητα να είναι τόσο σημαντική. Έτσι δεν θα μπορούσε να μην επηρεάζει και ένα ιδιαίτερα σημαντικό σύστημα του ανθρώπου, το νευρικό. Λόγω, λοιπόν, της αντι-οξειδωτικής, της αντι-φλεγμονώδης και της λειτουργίας της ως αναστολέας διαφόρων πρωτεϊνών μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας νευροπροστατευτικός παράγοντας που εμπλέκεται με κύτταρα του ιπποκάμπου, του φλοιού, του μεσεγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (74). Δύο κύριες ασθένειες στις οποίες υποστηρίζεται ότι βοηθά η κουρκουμίνη είναι η νόσος του Αλτσχάιμερ (AD) και του Πάρκινσον (PD). Κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του AD διαδραματίζει η συσσώρευση των β-αμυλοειδών πρωτεϊνών. Η κουρκουμίνη μπορεί να προσδένεται στην PPAR- $\gamma$  αυξάνοντας την μεταγραφή της και άρα τα επίπεδα της με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα των β-αμυλοειδών και άρα βοηθώντας την φλεγμονή του νευρικού συστήματος που υπάρχει (75). Επίσης, σε ένα αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο αρουραίων δείχθηκε ότι η κουρκουμίνη μέσω αναστολής των β-αμυλοειδών προκάλεσε βελτίωση της μνήμης και μεγαλύτερη ικανότητα εκμάθησης πράγμα που συσχετίστηκε με την αναστολή της φωσφορυλίωσης του JNK-3 (76). Ακόμη, από *in vitro* πειράματα προέκυψε ότι η μείωση των β-αμυλοειδών από την κουρκουμίνη γίνεται μέσω αύξησης της ικανότητας φαγοκυττάρωσης της μικρογλοίας που προκαλούν την κάθαρση τους. Έτσι, η ουσία αυτή αναστέλλει την συσσώρευση β-αμυλοειδούς μην επιτρέποντας να



δημιουργηθούν Αβ ίνες (77, 78). Όσον αφορά το PD, μελέτες έχουν συσχετίσει την εμφάνιση του με αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης α-συνουκλείνης. Μία έρευνα του Abbaoui et al. έδειξε ότι η κουρκουμίνη μείωσε την συσσώρευση της α-συνουκλείνης μέσω αναστολής του mTOR/ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 κινάσης (p70S6K) και αποκαθιστώντας την αυτοφαγία. Έτσι, η κουρκουμίνη μέσω της δράσης της τόσο σε επίπεδο γονιδίων όσο και σε επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών μπορεί να εμποδίσει την α-συνουκλείνη να συνδεθεί στον ντοπαμινεργικό νευρώνα (79). Για την επίδραση της στον ντοπαμινεργικό νευρώνα διενεργήθηκε μελέτη σε μοντέλο τρωκτικών στο οποίο είχαν δοθεί 6-OHDA, ουσία που προκαλεί ντοπαμινεργικές βλάβες. Κατά αυτόν τον τρόπο δείχθηκε ότι η χορήγηση κουρκουμίνης τόσο ενδοφλεβίως όσο και εκ του στόματος μείωσε την απόπτωση, προκάλεσε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και βελτίωσε τον εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματός (80). Επίσης, η κουρκουμίνη βοηθά στον ντοπαμινεργικό νευρώνα και με έναν ακόμα τρόπο, μειώνοντας την εναπόθεση σιδήρου σε αυτόν και αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων. Πέρα από αυτά, στο PD σύνηθες είναι να επηρεάζεται και η γνωστική λειτουργία. Χορήγηση κουρκουμίνης σε μοντέλο ποντικών με PD προκάλεσε μείωση των αυξημένων επιπέδων της εστεράσης της ακετυλοχολίνης και αύξησε τις κινητικές λειτουργίες βοηθώντας και στην γνωστική λειτουργία (81). Τέλος, μελέτη του Meesarapee et al. υποστηρίζει έναν μηχανισμό που προκαλεί μείωση του οξειδωτικού στρες πράγμα που θα μπορούσε να είναι ωφέλιμο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες που συσχετίζονται με το στρες. Προσθήκη κουρκουμίνης στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y μείωσε την έκφραση των επιπέδων της p-p28, της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και του σχηματισμού της τοξικής κουινοπρωτεΐνης παρέχοντας έτσι προστασία στους νευρώνες (82). Οι μελέτες όσο αναφορά τις ασθένειες αυτές όπως αναφέρθηκε είναι κυρίως σε επίπεδο ζωικών μοντέλων και δεν έχουν προχωρήσει στους ανθρώπους. Επομένως, για την πλήρη τεκμηρίωση της δράσης της κουρκουμίνης απαιτείται η περαιτέρω διερεύνηση της σε επίπεδο κλινικών δοκιμών.

### 1.4.7. Αντι-φλεγμονώδης-Ανοσορυθμιστική δράση



**Εικόνα 8:** Ασθένειες στις οποίες συνεισφέρει η κουρκουμίνη . Ανατύπωση από: Prasad S. et al., Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnology Advances* 32 (2014) 1053–1064

Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με διάφορες χρόνιες φλεγμονώδης παθήσεις και φαίνεται να συνδέεται στενά με την φλεγμονή. Ένα παράδειγμα της σχέσης αυτής είναι ότι τα προ-φλεγμονώδη κύτταρα έχουν την δυνατότητα να παράγουν και να απελευθερώνουν ενεργές ρίζες στο σημείο της φλεγμονής προκαλώντας οξειδωτικό στρες (83). Όμως, η σχέση αυτή λειτουργεί και αντίστροφα. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου ή αζώτου έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν έναν ενδοκυττάριο σηματοδοτικό καταρράκτη που έχει ως τελικό αποδέκτη προ-φλεγμονώδη γονίδια ενεργοποιώντας την έκφραση τους (84). Παράδειγμα όσων αφορά αυτήν την αμφίδρομη σχέση μεταξύ φλεγμονή και οξειδωτικού στρες αποτελεί ο TNF- $\alpha$ , ένας προ-φλεγμονώδης παράγοντας που ελέγχεται από την ενεργοποίηση ή μη του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B. Αν και η έκφραση του TNF- $\alpha$  ελέγχεται από τον NF- $\kappa$ B και ο ίδιος αποτελεί έναν πολύ ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B. Η κουρκουμίνη ως ένας αναστολέας του NF- $\kappa$ B αναστέλλει και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως του TNF- $\alpha$  (85). Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός με βάση τον οποίο η κουρκουμίνη αναστέλλει τον NF- $\kappa$ B είναι μέσω επηρεασμού του προτύπου μεθυλίωσης του επαγωγέα του TNF- $\alpha$  (86, 87). Όλα αυτά συγκλίνουν στο ότι η κουρκουμίνη δρα με διαφορετικούς τρόπους αναστέλλοντας τόσο το οξειδωτικό στρες όσο και την φλεγμονή τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους.

Η κουρκουμίνη όντας μία ουσία με τόσες βιολογικές δράσεις μπορεί να ρυθμίσει τόσο την λειτουργία όσο και τον πολλαπλασιασμό διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Καταρχάς, η ουσία αυτή μπορεί να δράσει τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα μακροφάγα με δεδομένα να παρουσιάζονται ήδη από την δεκαετία του 90'. Σε μελέτη του 1999 από τον Abe et al. αναφέρεται συσχέτιση της κουρκουμίνης με την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μακροφάγα σε υγιείς άτομα. Η κουρκουμίνη φαίνεται ότι παρουσία δύο διαφορετικών διεγερτών μπορεί να προκαλέσει πτώση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$  και MCP-1 σε PBMCs υγιών (88). Παρόμοια αποτελέσματα δείχθηκαν και σε μια κυτταρική σειρά μακροφάγων, την RAW264.7. Η κουρκουμίνη μέσω αλληλεπίδρασης με τα μονοπάτια των SOCS-1, SOCS-3 και p38 MAPK φάνηκε να αναστέλλει την έκφραση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και TNF- $\alpha$ . Στην μελέτη αυτήν υποστηρίζεται ότι η κουρκουμίνη στην συγκέντρωση των 10 $\mu$ M δεν προκάλεσε καμία πτώση της βιωσιμότητας των μακροφάγων (89). Όσον αφορά την ίδια κυτταρική σειρά από μελέτη των Yadav et al. δείχθηκε ότι η κουρκουμίνη σε διεγερμένα με LPS κύτταρα κατάφερε να προκαλέσει μείωση των επιπέδων της προ-φλεγμονωδούς κυτταροκίνης IL-18 (90). Επίσης, μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B η κουρκουμίνη κατάφερε να επιτύχει πτώση των επιπέδων του TNF- $\alpha$  και της IL-12 από περιτοναϊκά μακροφάγα (91). Η πτώση της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-12 από την κουρκουμίνη υποστηρίζεται ότι υπάρχει και σε μακροφάγα που εδράζονται στον σπλήνα ποντικών. Χορήγηση κουρκουμίνης στα κύτταρα αυτά παρουσία τόσο του διεγέρτη LPS (lipopolysaccharide) όσο και του HKL (heat-killed *Listeria monocytogene*) επέφερε μείωση της παραγωγής IL-12 από αυτά. Παράλληλα, συν-καλλιέργεια των επωασμένων με κουρκουμίνη μακροφάγων με CD4+ T κύτταρα οδήγησε σε αναστολή της παραγωγής IFN- $\gamma$  από τα CD4+ T κύτταρα ενώ υπήρξε άνοδος της IL-4. Αντίστοιχα αποτελέσματα πάρθηκαν και όταν η κουρκουμίνη χορηγήθηκε σε ποντίκια των οποίων τα μακροφάγα απομονώθηκαν και συν-καλλιεργήθηκαν με CD4+ T κύτταρα. Η κουρκουμίνη προκάλεσε αναστολή της παραγωγής IFN- $\gamma$ , ενώ αύξησε τα επίπεδα της IL-4. Επομένως, παρατηρείται ότι η κουρκουμίνη στα μακροφάγα αναστέλλει τις Th1 αποκρίσεις, ενώ ενισχύει τις Th2 αποκρίσεις (92).

Πέρα των μακροφάγων, βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κουρκουμίνη ασκεί την αντι-φλεγμονώδη δράση της και σε δενδριτικά κύτταρα (DCs). Σε πρόσφατη μελέτη των Campbell et al. δείχθηκε ότι η κουρκουμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις των 10 $\mu$ M όπως και στα μακροφάγα δεν προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των DCs από PBMCs υγιών δοτών. Από την άλλη η κουρκουμίνη ανέστειλε την ωρίμανση των DCs, ενώ επέτυχε μέσω της επαγωγής του HO-1 να διατηρήσει την φαγοκυτταρική τους ικανότητα. Τέλος, ελέγχθησαν και οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται από τα DCs. Η κουρκουμίνη προκάλεσε μείωση

των κυτταροκινών IL-12, IL-23 και TNF- $\alpha$  μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των MEK, ERK και p38 MAPK (93). Άλλη μελέτη επαλήθευσε τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς υποστήριξε ότι η κουρκουμίνη μειώνει τα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6 και IL-23. Παράλληλα, η κουρκουμίνη μπορεί να παρεμποδίζει την ικανότητα των δενδριτικών να επάγουν την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε Th17. Αυτό το επιτυγχάνει καθώς προκαλεί πτώση των επιπέδων της IL-17 και του ROR- $\gamma$ t των T κυττάρων όταν αυτά συν-καλλιεργηθούν με δενδριτικά επωασμένα με κουρκουμίνη (94). Επιπρόσθετα, παύση στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων παρουσιάζεται και σε μία ακόμη μελέτη των Rogers et al. Στο πείραμα αυτό ακόμη και έπειτα από διέγερση με LPS/CD40L/IFN- $\gamma$ , η κουρκουμίνη κατάφερε να παρεμποδίσει την παραγωγή της IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα υγιών ατόμων. Επίσης, τα επωασμένα με κουρκουμίνη DCs συν-καλλιεργήθηκαν με CD3+ T κύτταρα ποντικών. Η κουρκουμίνη φάνηκε, λοιπόν, να προκαλεί αναστολή της IL-12 από τα DCs, μία κυτταροκίνη απαραίτητη για την επαγωγή Th1 αποκρίσεων. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την παρατηρούμενη αναστολή της παραγωγής της IFN- $\gamma$  καθώς και της IL-17 από τα T κύτταρα έπειτα από την χορήγηση κουρκουμίνης. Η ουσία αυτή προκαλεί αναστολή των Th1 και Th17 αποκρίσεων κάτι που μπορεί να συσχετιστεί με την δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) (95).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί ορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν την ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ Th1 και Th17 με τα Tregs. Στην κατεύθυνση αυτή συνεχίστηκε η προαναφερθείσα μελέτη των Rogers et al. Όπως αναφέρθηκε στην εργασία αυτή συν-καλλιέργεια CD3+ T κύτταρα με DCs που είχαν επωαστεί με κουρκουμίνη υποστηρίζεται ότι μετατοπίζει την ισορροπία των κυττάρων προς τα Tregs αφού παράλληλα με την μείωση του πληθυσμού που παράγει IFN- $\gamma$  παρατηρείται και μια αύξηση του πληθυσμού που έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο Tregs. Πέρα όμως τα *in vitro* αυτά αποτελέσματα παρόμοια δεδομένα παρουσιάζονται και *in vivo*. Έγχυση DCs που είχαν επωαστεί με κουρκουμίνη σε ποντίκια έδειξε άνοδο στα επίπεδα των CD4+CD25hiFoxP3+ T ρυθμιστικών κυττάρων (95). Εκτός των δεδομένων σε δενδριτικά κύτταρα μελέτες της δράσης της κουρκουμίνης υπάρχουν και απευθείας στα T κύτταρα. Βιβλιογραφικά στοιχεία υποστηρίζουν ότι η κουρκουμίνη μετατοπίζει την ισορροπία Th1/Th2 προς τις Th2 αποκρίσεις σε PBMCs υγιών δοτών (96). Όταν CD4+ T κύτταρα από PBMCs διεγέρθηκαν με anti-CD2/CD3/CD28 και επώαστηκαν με κουρκουμίνη φάνηκε ότι η ουσία αυτή αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών. Μέσα στην κυτταροκίνες που ελέχθησαν ήταν ορισμένες προ-φλεγμονώδεις όπως η IFN- $\gamma$ , ο TNF- $\alpha$ , η IL-2, καθώς και μία αντι-φλεγμονώδης κυτταροκίνη η IL-10. Ωστόσο, η ουσία αυτή αυξάνει την έκφραση των

CCR7, L-selectin και TGF- $\beta$  στην όψιμη φάση της ενεργοποίησης των T κυττάρων. Η κουρκουμίνη μπορεί να αναστέλλει την IL-10 την πιο κύρια κυτταροκίνη των Tregs αλλά παράλληλα αυξάνει τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα που είναι χαρακτηριστικός για τα Tregs δηλαδή του FoxP3. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί καθώς η κουρκουμίνη επάγει τον TGF- $\beta$  ασκώντας πιθανώς έτσι την αντι-φλεγμονώδη δράση της. Έτσι, φαίνεται ότι μέσω επίδρασης στα CCR7, L-selectin, CD69 και TGF- $\beta$  η κουρκουμίνη ασκεί την αντι-φλεγμονώδη δράση της όχι μόνο αναστέλλοντας τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα αλλά και ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών (97). Οι μελέτες που αναφέρθηκαν αποδεικνύουν την αντι-φλεγμονώδη δράση της κουρκουμίνης σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά και τα T κύτταρα. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές αναφέρονται σε υγιείς δότες. Ενδιαφέρον αποτελεί και για τον λόγο αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς η επίδραση της κουρκουμίνης και σε διάφορα νοσήματα.

## **1.5.Ανοσο-επαγόμενα νοσήματα**

### 1.5.1.Ψωριασική νόσος

Όσον αφορά το ρόλο της κουρκουμίνης στη ψωριασική νόσο, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, φαίνεται να ασκεί σαφή αντιφλεγμονώδη δράση τόσο *in vitro* όσο και σε ζωικά μοντέλα. Μια *in vitro* μελέτη όσον αφορά την δράση της πραγματοποιήθηκε από τους Varma et al. στην κυτταρική σειρά HaCaT, δηλαδή κύτταρα που προσομοιάζουν αυτά της ψωρίασης. Η κουρκουμίνη βρέθηκε ότι ήταν ικανή να αναστείλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών μέσω της μείωσης της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και της IL-6. Ταυτόχρονα κατάφερε να ενισχύσει την λειτουργία του δέρματος ως φραγμός επάγοντας την έκφραση των πρωτεϊνών involucrin (iNV) και filaggrin (FLG), δύο σημαντικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών του δέρματος. Σημαντικό από την μελέτη αυτή είναι να τονιστεί ότι οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 25 $\mu$ M και 50 $\mu$ M, με την βιωσιμότητα των κυττάρων να παραμένει ανεπηρέαστη και στις δύο συγκεντρώσεις (98). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται και από μία άλλη μελέτη πάνω στην κυτταρική σειρά HaCaT. Σε αυτήν φαίνεται ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ψωριασικών κυττάρων ακόμη και όταν τα κύτταρα καλλιεργηθούν παρουσία της IL-22, μίας κυτταροκίνης η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης (99). Επίσης, η κουρκουμίνη αναστέλλει την παραγωγή σημαντικών για την παθογένεια της ψωρίασης φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL12 και IL-23 από δενδριτικά κύτταρα, ενώ και σε PBMCs φαίνεται να έχει παρόμοια δράση αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την

παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (93). Τέλος, πιο πρόσφατη μελέτη είναι των Skyvalidas et al. σε PBMCs ασθενών με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα. Στην έρευνα αυτήν δείχνεται ότι η κουρκουμίνη μειώνει τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  που προέρχεται από διάφορους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς ενώ μειώνει και τα επίπεδα της IL-17 γεγονός που συσχετίζεται με την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (100).

Αντίστοιχα αποτελέσματα υπάρχουν και στην βιβλιογραφία από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα. Μελέτη των Kang et al υποστήριξε ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων από τα T κύτταρα στην ψωρίαση. Η μελέτη έγινε πάνω σε ποντίκια με μια νόσο που προσομοιάζει τη ψωρίαση και παρατηρήθηκε ότι μετά από 20 μέρες χορήγησης κουρκουμίνης από του στόματος τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-8 και TNF- $\alpha$  μειώθηκαν σημαντικά (101). Επιπλέον, σημαντικό είναι να αναφερθεί και μια άλλη μελέτη που έγινε από τους Sun et al στην οποία μελετήθηκε η δράση της κουρκουμίνης σε ποντίκια με νόσο που προσομοιάζει τη ψωρίαση, όταν επάγεται από το imiquimod. Από πειράματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* προέκυψε ότι η κουρκουμίνη βοηθάει στην ελάττωση των συμπτωμάτων της ψωριασης μειώνοντας την φλεγμονή και αναστέλλοντας την πάχυνση του δέρματος. Επιπλέον, από την ίδια μελέτη προέκυψε ότι η κουρκουμίνη μειώνει τα επίπεδα του mRNA διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-1 $\beta$ , IL-6 και TNF- $\alpha$ , με την IL-1 $\beta$  και τον TNF- $\alpha$  να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη πτώση (102).

Τέλος, οι κλινικές δοκιμές που αναφέρονται στην δράση της κουρκουμίνης δεν θα μπορούσαν να παραλειφθούν. Μία εξ αυτών πραγματοποιήθηκε από τους Antiga et al στην οποία χορηγήθηκαν τοπικά στεροειδή παρουσία και μη ενός σκευάσματος κουρκουμίνης σε 63 ασθενείς που έπασχαν από ψωρίαση. Όταν η κουρκουμίνη χορηγείται μαζί με τα στεροειδή παρατηρείται μία πτώση των επιπέδων μίας σημαντικής προφλεγμονώδους κυτταροκίνης της IL-22 και σημαντική μείωση του PASI (103). Επιπλέον, από άλλη κλινική μελέτη αναφέρεται ότι χορήγηση κουρκουμίνης μετά από φωτοθεραπεία έδειξε να έχει ευεργετικές δράσεις προκαλώντας σημαντική μείωση του PASI (104). Τέλος, σε μία μελέτη των Gelfand et al στην οποία συμμετείχαν 12 άτομα η κουρκουμίνη φάνηκε να δρα μόνο στο 17% των περιπτώσεων, με σημαντική όμως βελτίωση στους ασθενείς αυτούς (105). Ωστόσο, η μελέτη αυτήν δεν είναι αρκετή λόγω του μικρού δείγματος της για την δημιουργία σαφή συμπερασμάτων. Έτσι, κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες κλινικές μελέτες ώστε να μπορέσει να διερευνηθεί η δράση της κουρκουμίνης καθώς η βέλτιστη χρήση της για την θεραπεία της ψωριασης.

### 1.5.2.Πολλαπλή σκλήρυνση (MS)

Πέρα από την δράση της στην ψωριασική νόσο σημαντική δουλειά έχει γίνει στην δράση της κουρκουμίνης στην πολλαπλή σκλήρυνση. Από την βιβλιογραφία εντοπίζονται διάφορες μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* που υποστηρίζουν την σημασία της κουρκουμίνης. Όσον αφορά την *in vitro* δράση της, μία από τις πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκε από τους Natarajan et al. και αναφερόταν σε T κύτταρα. Η κουρκουμίνη κατάφερε να ελαττώσει τα επίπεδα της IFN- $\gamma$ . Επίσης, η κουρκουμίνη κατάφερε και όταν διεγέρθηκαν τα κύτταρα αυτά να μειώσει δόσο-εξαρτώμενα τα επίπεδα μίας άλλης προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης, της IL-12. Η αναστολή αυτή των κυτταροκινών καθώς και του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων οφείλεται στο ότι η κουρκουμίνη ανέστειλε το μοριακό μονοπάτι JAK-STAT (106). Επίδραση της κουρκουμίνης βρέθηκε και στα αστροκύτταρα τα πιο πολυάριθμα γαγγλιακά κύτταρα. Επώαση με την ουσία αυτή σε ενεργοποιημένα αστροκύτταρα προκάλεσε μείωση της MMP-9 και της IL-6, ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα του mRNA των IGF-1 και NT-3 (107).

Εκτός των *in vitro* πειραμάτων ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα *in vivo*. Ειδικότερα για την MS πολύ δουλειά έχει πραγματοποιηθεί σε ένα πειραματικό της μοντέλο, την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Στο μοντέλο αυτό όταν χορηγήθηκε στα ποντίκια η κουρκουμίνη κατάφερε να αναστείλει τα επίπεδα της IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23 και IL-12. Η πτώση των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών αυτών συσχετίστηκε με άνοδο των CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> T κυττάρων καθώς και της IL-10 και PPAR- $\gamma$  στον λεμφικό ιστό και τα όργανο του κεντρικού νευρικού συστήματος (108). Σε ένα μοντέλο τρωκτικών που ανέπτυξαν EAE η κουρκουμίνη μείωσε το οξειδωτικό στρες ενώ επίσης προκάλεσε άνοδο των επιπέδων διαφόρων παραγόντων της μυελογένεσης (109). Επομένως, στην EAE σε μοντέλα τρωκτικών η κουρκουμίνη μπορεί *in vivo* να αναστέλλει την διαφοροποίηση σε Th1 και Th17, ενώ προωθεί την διαφοροποίηση των κυττάρων σε Th2. Η κουρκουμίνη στα DCs μέσω του HO-1 και κατ' επέκταση του STAT3 μπορεί να επηρεάζει την παραγωγή των κυτταροκινών IL-12b και IL-23a ρυθμίζοντας αρνητικά την μεταγραφή τους. Η αναστολή αυτή από τα DCs θα επηρεάσει το μονοπάτι του IL-23/Th17 (110).

Πέραν, όμως, των μοντέλων ποντικών απαραίτητες είναι και οι μελέτες σε ανθρώπους. Έτσι, σε μία κλινική δοκιμή με 50 ασθενείς με MS αναφέρεται η αναστολή που προκαλεί η κουρκουμίνη στους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες. Νανοσωματίδια κουρκουμίνης δόθηκαν για 6 μήνες στους ασθενείς. Μεταξύ των ασθενών που έπαιρναν κουρκουμίνη και εκείνων που έπαιρναν placebo βρέθηκε σημαντική διαφορά. Η χορήγηση της κουρκουμίνης επέτυχε να αναστέλλει τόσο τα

επίπεδα έκφρασης των γονιδίων όσο και την συγκέντρωση στο ορό των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 και IL-1 $\beta$  (111). Μία παρόμοια μελέτη διενεργήθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα εστιάζοντας στα Th17 κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η IL-17 είναι μια κυτταροκίνη που εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς με MS σε σχέση με τους υγιείς δότες. Ωστόσο, όταν χορηγήθηκε ναοσωματίδιο κουρκουμίνης βρέθηκε ότι οι παράγοντες που σχετίζονται με Th17 αποκρίσεις μειώθηκαν. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζεται μείωση στην έκφραση του ROR- $\gamma$ t και στην παραγωγή της IL-17, ενώ τα επίπεδα της έκφραση της IL-23 παρέμειναν ανεπηρέαστα (112). Η δράση, όμως, της κουρκουμίνης επεκτείνεται πέρα από τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που αναλύθηκαν παραπάνω και στις αντι-φλεγμονώδεις. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Dolati et al. ναοσωματίδιο κουρκουμίνης χορηγήθηκαν σε 25 ασθενείς με MS. Σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους χορηγήθηκε placebo βρέθηκε μια επίδραση της κουρκουμίνης στα αντι-φλεγμονώδεις κύτταρα. Αυτό εκφράζεται στην αύξηση του αριθμού των Tregs, της έκφρασης του FoxP3 καθώς και στην άνοδο των επιπέδων των επιπέδων των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, IL-10 και TGF- $\beta$  (113). Επομένως, η πολλαπλή σκλήρυνση αποτελεί μια ασθένεια που η κουρκουμίνη ασκεί σημαντική δράση. Ωστόσο, απαραίτητο είναι η πραγματοποίηση περισσότερων κλινικών δοκιμών για να μπορέσει να υποστηριχθεί βέλτιστα η δράση της ουσίας αυτής στην θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης.

### 1.5.3. Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) είναι μια χρόνια συστηματική φλεγμονώδης νόσος. Η κουρκουμίνη αποτελώντας έναν ισχυρό αντι-φλεγμονώδη παράγοντα, μπορεί να βοηθήσει στην φλεγμονή των αρθρώσεων όπως έχει δειχθεί *in vitro* σε υμενοκύτταρα τύπου ινοβλάστη (FLS) και *in vivo* τόσο σε μοντέλα τρωκτικών όσο και σε δοκιμές σε ανθρώπους. Σε μία *in vitro* μελέτη η κουρκουμίνη μελετήθηκε τόσο στα FLS όσο και στην κυτταρική σειρά MH7A. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν τόσο με IL-1 $\beta$  όσο και με PMA. Ωστόσο, η κουρκουμίνη καταφέρνει να προκαλέσει πτώση των επιπέδων της IL-6. Επίσης, στα FLS μετρήθηκε και η VEGF-A μετά από επαγωγή με PMA. Η κουρκουμίνη φάνηκε δοσο-εξαρτώμενα να αναστέλλει την έκφραση του VEGF-A. Ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργεί η κουρκουμίνη αναφέρεται στην παρούσα μελέτη να είναι μέσω μέσω αναστολής ενεργοποίησης του NF- $\kappa$ B και επάγοντας την αποφωσφορυλίωση του ERK1/2. Σημαντικό εύρημα ακόμη είναι ότι και στην RA η κουρκουμίνη μέχρι την συγκέντρωση των 25 $\mu$ M δεν επάγει την κυτταρικό θάνατο (114). Μείωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από την κουρκουμίνη στην RA παρατηρείται και στην μελέτη των Ahn et al. Σε αυτήν FLS κύτταρα επώαστηκαν με κουρκουμίνη και διεγέρθηκαν με TNF- $\alpha$  ώστε να μελετηθεί η επίδραση της κουρκουμίνης στην παραγωγή IL-6, IL-8, MMP-1 και

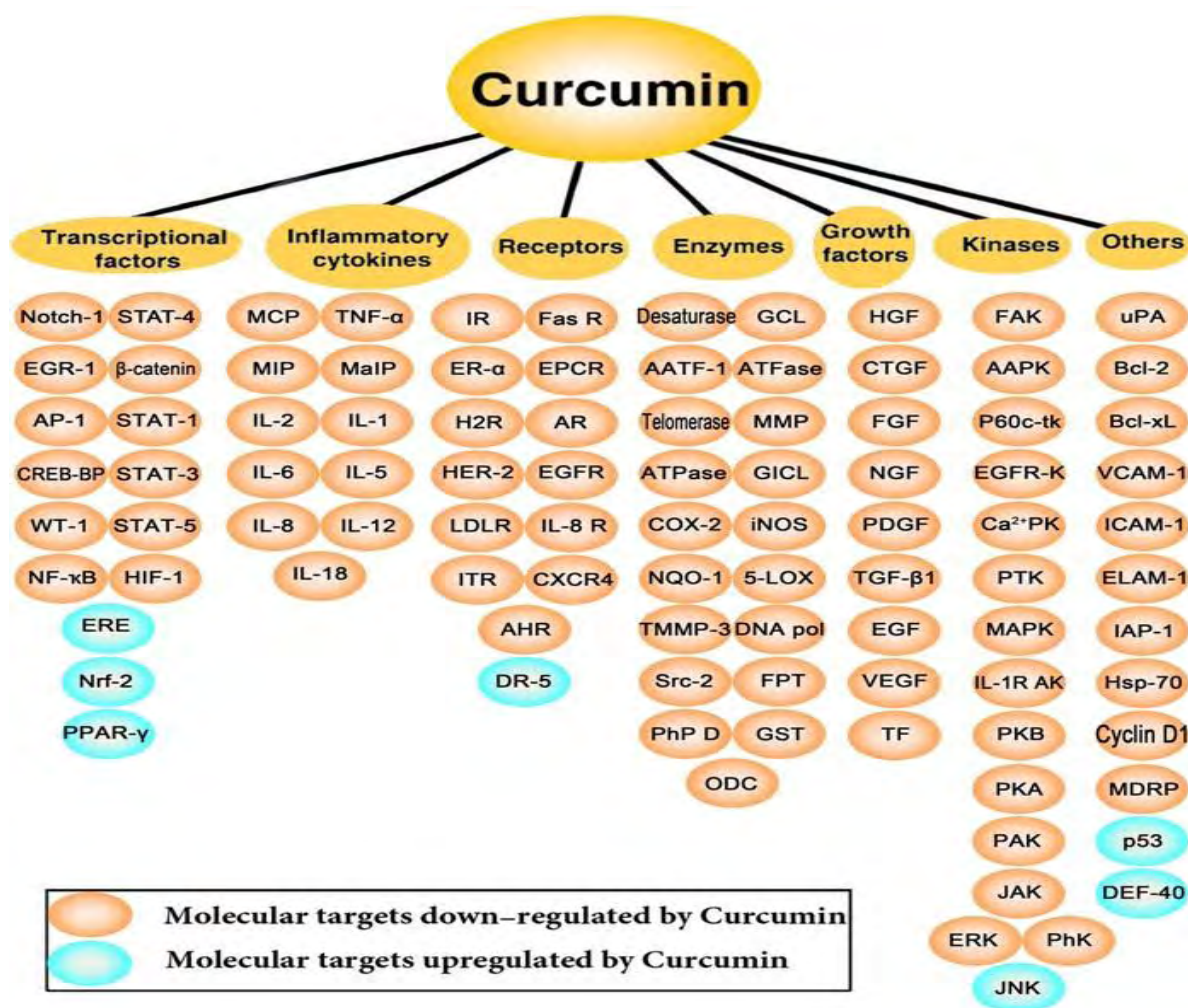


MMP-3. Η αναστολή της ουσίας αυτής είναι σημαντική καθώς είναι της τάξης του 94% για την IL-6 και IL-8 και της τάξης του 96% για τα MMP-1 και MMP-3 (115).

Το μοντέλο της αρθρίτιδας που επάγεται από κολλαγόνο (CIA) είναι από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μοντέλα της RA. Για τον λόγο αυτό υπάρχουν διάφορες μελέτες που αναφέρονται στην επίδραση της κουρκουμίνης στο μοντέλο αυτό. Οι Okamoto et al. ανέφεραν ότι η κουρκουμίνη μπορεί *in vitro* αλλά και *in vivo* να μειώνει την παραγωγή της IL-17 και να βελτιώνει την CIA σε DBA/1 J ποντίκια (116). Επίσης, σε μελέτη των Huang et al σε παρόμοιο μοντέλο τροφικών με CIA υποστηρίζεται ότι η κουρκουμίνη ασκεί αντι-φλεγμονώδη δράση. Έγχυση της ενδοπεριτοναϊκά μειώνει τα επίπεδα του BAFF, της IFN- $\gamma$  και της IL-6 στον ορό των ποντικών καθώς και στα σπληνοκύτταρα τους (117). Έρευνα με DBA/1 ποντίκια ανοσοποιημένα με CII στα οποία χορηγήθηκε κουρκουμίνη κάθε δύο μέρες για δύο εβδομάδες έδειξε να προκαλείται μείωση των κλινικών σκορ των αρθρώσεων. Η βελτίωση της ασθένειας συσχετίζεται με μείωση στην έκφραση του TNF- $\alpha$  και της IL-1 $\beta$  στις αρθρώσεις των αστραγάλων καθώς και σε μείωση των επιπέδων του IgG2a στον ορό (118). Οι Funk et al ήταν οι πρώτοι που αναφέρθηκαν στην αντι-αρθριτική ιδιότητα ενός συμπλέγματος turmeric που περιείχε κουρκουμινοειδή σε ένα μοντέλο αρθρίτιδας σε αρουραίους (119). Επιπρόσθετα, η αντι-φλεγμονώδης δράση του συνδυασμού της κουρκουμίνης με την ρεσβερατρόλη και της τετραμεθυλοπυραζίνης (TRC) μελετήθηκε *in vivo* σε ένα μοντέλο αρουραίων με CIA. Ο συνδυασμός TRC μπόρεσε να αναστείλει την παραγωγή του TNF- $\alpha$ , της IL-6 και της IL-1 $\beta$  στον ορό αν και δεν υπήρχαν σχετικές πληροφορίες για τα επίπεδα της IL-17 (120). Τέλος, η χορήγηση κουρκουμίνης μέσω της ενδοφλέβιας οδού ή εκ του στόματος παρουσίασε αποτελέσματα παρόμοια με την μεθοτρεξάτη σε ένα μοντέλο αρουραίων με επαγόμενη αρθρίτιδα. Η δράση της αυτή συσχετίζεται με την μείωση των επιπέδων του TNF- $\alpha$  και της IL-1 $\beta$  που βρέθηκε σε ορό και αρθρικό υγρό (121).

Πέραν των πειραματικών μοντέλων τροφικών ορισμένα δεδομένα σχετικά με την επίδραση της κουρκουμίνης στην RA υπάρχουν και σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Μία μικρή τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 45 ασθενείς με RA οι οποίοι χωρίστηκαν σε τρεις μερίδες ανάλογα αν τους χορηγούνταν κουρκουμίνη (500mg), νάτριο δικλοφαινάκης (50mg) ή συνδυασμό των δύο. Για την μέτρηση των αποτελεσμάτων ελέγχθηκαν τα κλινικά κριτήρια μέτρησης ενεργότητας της νόσου καθώς και τα επίπεδα της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP). Η χορήγηση της κουρκουμίνης ήταν ασφαλής και δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες παρενέργειες. Οι ασθενείς και στις τρεις προαναφερθείσες κατηγορίες εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσων αφορά το σκορ DAS28 με την μεγαλύτερη μείωση να φτάνει το 45% για τους ασθενείς που τους χορηγούνταν μόνο κουρκουμίνη. Σημαντική ήταν η πτώση και στα

επίπεδα της CRP με την μείωση να είναι της τάξης του 52% στους ασθενείς με την κουρκουμίνη (122). Ακόμη μία τυχαίοποιημένη, διπλά τυφλή μελέτη πραγματοποιήθηκε σχετικά με την επίδραση της κουρκουμίνης σε ασθενείς με μέτρια PA και χαμηλά επίπεδα CRP. Η μελέτη χωρίστηκε σε τρεις ομάδες ασθενών, αυτούς που τους χορηγούνταν placebo και αυτούς που τους χορηγούνταν ένα σύμπλοκο κουρκουμίνης με αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα στις συγκεντρώσεις των 500mg ή 250mg. Η κουρκουμίνη και στις δύο συγκεντρώσεις φάνηκε στο τέλος της μελέτης να προκάλεσε σημαντική βελτίωση τόσο στο DAS28 όσο και στο ACR20 στην μεγαλύτερη μερίδα των ασθενών. Η αλλαγή αυτή στην εξέλιξη της νόσου συσχετίστηκε με μείωση των δεικτών της φλεγμονής όπως του CRP και ESR καθώς και των επιπέδων του ρευματικού παράγοντα (RF) (123). Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και σε εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα που συμπεριλαμβάνεται κουρκουμίνη. Για παράδειγμα, οι Hemmati et al έδειξαν ότι το Curcumex ένα προϊόν που αποτελείται από κουρκουμίνη και τζίντζερ έπειτα από 8 εβδομάδες χορήγησης βελτίωσε τα συμπτώματα της ασθένειας καθώς μείωσε το DAS28 σκορ (124). Επίσης, ακόμη μια φόρμουλα κουρκουμίνης η CuroWhite φάνηκε να βοηθά στην PA προκαλώντας μείωση των δεικτών ESR, CRP και RF καθώς και τον κλινικών σκορ DAS και VAS (125). Πρόσφατη μελέτη με μια μορφή νανοσωματιδίων κουρκουμίνης απέτυχε να δείξει στατιστικά σημαντική διαφορά με τα αποτελέσματα ωστόσο να είναι θετικά όσον αφορά τους δείκτες DAS28, IJC και SJC (126). Σημαντική δουλειά έχει πραγματοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα ζώων όμως οι μελέτες που αφορούν ανθρώπους δεν είναι αρκετές για αποτίμηση της δράσης της κουρκουμίνης. Για τον λόγο αυτό απαιτούνται περισσότερες και μεγαλύτερες σε έκταση μελέτες ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί η κουρκουμίνη ως ένας φυσικός θεραπευτικός παράγοντας στην θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.



**Εικόνα 9: Μοριακοί στόχοι της κουρκουμίνης.** Ανατύπωση από: Noorafshan A. et al., A review of therapeutic effects of curcumin, *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2032-46.

## 1.6.Μοριακοί στόχοι

Από όλα τα παραπάνω η κουρκουμίνη φαίνεται ότι είναι ένα μόριο με μεγάλη ουσία που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην θεραπευτική διαδικασία σε μία μεγάλη ποικιλία ασθενειών. Η ευρύτατη δράση της αυτή οφείλεται στην μεγάλη πλειοτροπία που εμφανίζει μιας και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με διάφορους μοριακούς στόχους. Σε μοριακό επίπεδο, η κουρκουμίνη έχει αναφερθεί ότι μπορεί να επηρεάζει διάφορα μόρια τόσο απευθείας μέσω δέσμευσης και αλλαγής της λειτουργίας τους όσο και εμμέσως ρυθμίζοντας την δράση τους. Όσον αφορά την απευθείας δράση πάνω από 30 ουσίες έχουν βρεθεί στις οποίες επιδρά η κουρκουμίνη. Μερικές εξ' αυτών είναι η DNA πολυμεράση, η κινάση FAK (focal adhesion kinase), η ρεδοκτάση της θυρεοδοξίνης, η PKC (protein kinase C), η λιποξυγενάση (LOX) και η τουμπουλίνη. Επίσης, απευθείας μπορεί να συνδέεται και με διάφορα μεταλλικά ιόντα αναστέλλοντας την δράση τους. Από την άλλη, η έμμεση δράση της επηρεάζει και αυτήν

διάφορες κατηγορίες μορίων, με σημαντικότερες μεταγραφικούς παράγοντες, παράγοντες ανάπτυξης, πρωτεϊνικές κινάσες, κυτταροκίνες, ένζυμα, μόρια πρόσδεσης, πρωτεΐνες σχετικές με την απόπτωση και άλλοι παράγοντες (127).

Αρχικά, η δράση της κουρκουμίνης στους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να είναι είτε θετική επάγοντας τους ή αρνητική αναστέλλοντας τους. Ορισμένοι τέτοιοι παράγοντες που ασκεί την ανασταλτική της δράση είναι ο NF-κB (nuclear factor-κB) (128), ο AP-1 (activated protein-1) (129), ο HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) (130), notch-1 (131, 132), ο Egr-1 (early growth response-1) (133) και η β-catenin (134). Ενώ, οι αντίστοιχοι παράγοντες που ασκεί την επαγωγική της δράση είναι οι εξής: AhR (aryl hydrocarbon receptor) (135), ATF 3 (activating transcription factor) (136), CHOP (C/EBP homologous protein) (137), EpRe (electrophile response element) (138), PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma)(139) και Nrf2 (NF-E2-related factor) (140). Πέραν των μεταγραφικών παραγόντων, η κουρκουμίνη μπορεί να επηρεάζει και αναπτυξιακούς παράγοντες. Η ουσία αυτήν μπορεί να αναστέλλει τον EGFR (epidermal growth factor receptor) (139, 141), VEGF, FGF, EGF (142) και CXCR4 (chemokine C-X-C motif receptor 4) (143). Επίσης, η κουρκουμίνη μπορεί να αναστέλλει και πρωτεϊνικές κινάσες με σημαντικότερες τις CDPK( Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase) (144), IRAK( IL-1 receptor-associated kinase) (145), JAK (Janus kinase) (146), MAPK (mitogen-activated protein kinases), PKC (147), mTOR (mammalian target of rapamycin) (148), Phk (phosphorylase kinase), cPK (cytosolic protamine kinase), PKA (149) και SYK (spleen tyrosine kinase) (150). Περνώντας στην κυτταροκίνες σημαντική είναι η δράση της κουρκουμίνης. Όπως έχει αναφερθεί από το εργαστήριο όμως όπως και από διάφορους άλλους η κουρκουμίνη μπορεί να ασκεί αντι-φλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας διάφορες κυτταροκίνες. Οι πιο σημαντικές εξ'αυτών είναι TNF-α, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL18 και IFN-γ (151-158). Η δράση της κουρκουμίνης στις κυτταροκίνες έχει αναλυθεί περαιτέρω στο κεφάλαιο 1.4.7. Άλλοι στόχοι της κουρκουμίνης είναι και τα ένζυμα. Σημαντικά παραδείγματα αλληλεπίδρασης με ένζυμα είναι με την COX-2 (159, 160) και IMPDH (Inosine monophosphate dehydrogenase) (161). Ωστόσο, αυτά απλούν μόνο ορισμένα παραδείγματα καθώς η κουρκουμίνη από όταν ανακαλύφθηκε έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τόσο θετικά όσο και αρνητικά μια μεγάλη πληθώρα ενζύμων. Επίσης, μεγάλης σημασίας είναι η δράση της ουσίας αυτής και στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση. Από διάφορες μελέτες έχει προκύψει ότι η δράση της κουρκουμίνης στον καρκίνο είναι να επάγει προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bax, Bim, Bak, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8, Caspase-9 και να αναστέλλει αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bcl-2 και Bcl-XL (162, 163). Η δράση αυτήν είναι σημαντική όμως μιας και υπάρχει επικοινωνία και κοινά μόρια μεταξύ των διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών της απόπτωσης

η κουρκουμίνη χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Τέλος, εκτός όλων των παραπάνω υπάρχουν και διάφοροι άλλοι στόχοι στους οποίους ασκεί την δράση της η κουρκουμίνη. Ορισμένα παραδείγματα αυτών είναι ο p53 (164), ο CBP (P300/CREB-binding protein) (165), uPA, uPA receptor (128), Hsp70 (166) και η κυκλίνη D1 (167). Κλείνοντας, το κεφάλαιο αυτό απλά αναφέρθηκε σε ορισμένους στόχους της κουρκουμίνης. Ωστόσο, δεν αναφέρθηκε ούτε σε όλο τον όγκο των στόχων αυτής ούτε ανέλυσε διεξοδικά την αλληλεπίδραση της με αυτούς. Αυτό οφείλεται στην πληθώρα των δράσεων της κουρκουμίνης που μπορεί να είναι τόσο επαγωγική όσο και ανασταλτική και επηρεάζεται τόσο από τον μοριακό της στόχο όσο και στο εκάστοτε σύστημα στα πλαίσια του οποίου εξετάζονται. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η κουρκουμίνη είναι μια ουσία που χαρακτηρίζεται από μεγάλη πλειοτροπία, επηρεάζοντας πολλούς διαφορετικούς στόχους και επομένως αποτελεί έναν πιθανό θεραπευτικό παράγοντα με διάφορες χρήσεις στην θεραπευτική.

## 2.Σκοπός

Η κουρκουμίνη αποτελεί μια ουσία με ποικίλες δράσεις. Ωστόσο, η δράση της ως αντιφλεγμονώδης ουσίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Για τον λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ανοσοτροποποιητικής δράσης της κουρκουμίνης σε υγιείς και σε ασθενείς με ψωριασική νόσο. Ειδικότεροι σκοποί της εργασίας ήταν 1. (i) η επίδραση της κουρκουμίνης σε ρυθμιστικούς πληθυσμούς T κυττάρων που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3, (ii) η δράση της πάνω σε προ-φλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς που παράγουν IL-17 και (iii) η συσχέτιση της σε μοριακό επίπεδο με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3. Επιπλέον, στους ειδικούς σκοπούς της εργασίας ανήκει και η μελέτη εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων της κουρκουμίνης και η σύγκριση της δράσης τους με την αντίστοιχη της κουρκουμίνης όπως αυτή διαφαίνεται μέσα στην βιβλιογραφία.

## 3. Υλικά και μέθοδοι:

### 3.1. Απομόνωση και κρυσυντήρηση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

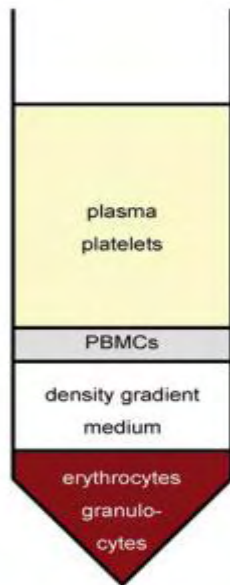
#### Υλικά και αντιδραστήρια

- Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος (20ml ή μεγαλύτερη)
- Διάλυμα διαβάθμισης συγκέντρωσης Lymphoprep
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon 50ml
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon 15ml
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Θρεπτικό μέσο RPMI-1640 με L-γλουταμίνη, κόκκινο της φαινόλης και HEPES
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf 2ml
- Ορό εμβρύου μόσχου (FBS)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Cryogenic vials
- Δοχείο ψύξης Mr Frosty
- Cryobox
- Υγρό άζωτο

#### Μέθοδος:

1. Συλλογή 20ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα.
2. Σημείωση των πληροφοριών του εκάστοτε δείγματος (ασθενούς ή υγιούς αντίστοιχα) και αρχειοθέτηση τους σε γραπτή και ηλεκτρονική μορφή.
3. Προσθήκη 10ml διαλύματος διαβάθμισης συγκέντρωσης Lymphoprep σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon 50ml.
4. Στρώση των 20ml αίματος στα 10ml Lymphoprep με το μικρότερο δυνατό ρυθμό για αποφυγή ρήξης της στιβάδας του διαλύματος διαβάθμισης συγκέντρωσης.
5. Φυγοκέντρωση του σωλήνα τύπου Falcon σε 1800 rpm στους 19-20 °C για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Τα φρένα θα πρέπει να αφαιρούνται από την φυγόκεντρο ή να περιορίζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα για αποφυγή διατάραξης της διαστρωμάτωσης.
6. Συλλογή της "θολερής" ζώνης όπου περιέχονται τα λεμφοκύτταρα σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon των 15ml. Η στιβάδα αυτήν εμπεριέχεται ανάμεσα στο διάλυμα διαβάθμισης συγκέντρωσης και την ανώτατη ζώνη που αποτελείται από πλάσμα και αιμοπετάλια (Εικόνα 10).

7. Συλλογή της ζώνης του πλάσματος σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου Eppendorf καθώς και των ερυθροκυττάρων και αποθήκευση τους σε κατάψυξη  $-20^{\circ}\text{C}$  για χρήση σε διαφορετικά πρωτόκολλα.



**Εικόνα 10: Διαστρωμάτωση περιφερικού αίματος έπειτα από φυγοκέντρηση.** Ανατύπωση από: Riedhammer C. et al, Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing and Culture, *Methods Mol Biol.* 2016;1304:53-61

8. Προσθήκη του θρεπτικού μέσου RPMI-1640 στον φυγοκεντρικό σωλήνα που περιλαμβάνει τα λεμφοκύτταρα και φυγοκέντρηση σε 2100 rpm για 5 λεπτά με φρένα.
9. Απόρριψη με ιδιαίτερη προσοχή του υπερκείμενου χωρίς διατάραξη του κυτταρικού ιζήματος και πλύση με νέο RPMI-1640 όπου καθίσταται αναγκαίο για βέλτιστη απομόνωση των συνόλου των λευκοκυττάρων.
10. Δημιουργία διαλύματος κρυσυντήρησης που αποτελείται από FBS 70%, RPMI-1640 20% και DMSO 10%.
11. Προσθήκη 3ml διαλύματος κρυσυντήρησης και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος.
12. Μέτρηση των κυττάρων με χρήση της τεχνικής χρώσης Trypan Blue (**Ενότητα 2.2**).
13. Διαίρεση των κυττάρων σε τρία Cryogenic vials που περιλαμβάνουν κατάλληλη σήμανση, αποθήκευση τους σε δοχείο ψύξης Mr Frosty και μεταφορά σε κατάψυξη  $-80^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 24 ώρες. Τα δοχεία αυτά περιέχουν ισοπροπανόλη, επιτρέποντας την θερμοκρασία των κυττάρων να μειώνεται κατά  $1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ .
14. Μεταφορά των vials στο υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση σε ειδικά Cryobox.



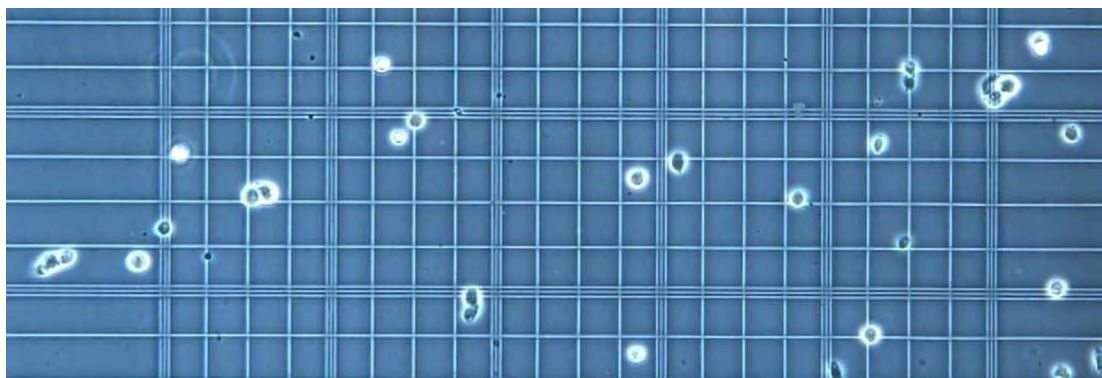
## 3.2.Μέτρηση κυττάρων με χρώση Trypan Blue

### Υλικά και αντιδραστήρια

- Οπτικό μικροσκόπιο
- 0.4% Trypan Blue
- Πλάκα Neubauer
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf 2ml

### Μέθοδος:

1. Λήψη 100μl κυττάρων σε Eppendorf tube αφού πρώτα έχει γίνει καλή ανάδευση και προσθήκη 400μL 0.4% Trypan Blue(τελική συγκέντρωση 0.32%). Ακολουθεί καλό ανακάτεμα σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf χωρίς δημιουργία φυσαλίδων και επώαση έως 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αν το χρονικό διάστημα ξεπεράσει τα 5 λεπτά η διαδικασία δεν θεωρείται ακριβής λόγω κυτταρικού θανάτου από την χρωστική.
2. Γίνεται λήψη 10μl κυτταρικού εναιωρήματος που έχει υποστεί κατεργασία με Trypan Blue και γέμισμα ενός εκ των δύο θαλάμων κάτω από την καλύπτρα, επιτρέποντας την μεταφορά των κυττάρων μέσω τριχοειδούς δράσης.
3. Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, γίνεται εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου καθώς και στα τεταρτημόρια της πλάκας Neubauer με μεγέθυνση 10X.



**Εικόνα 11. Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων εστιαζόμενοι στις γραμμές πλέγματος αιμοκυτταρομέτρου.**

4. Μέτρηση τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών κυττάρων σε τουλάχιστον 2 τεταρτημόρια. Μονο τα νεκρά κύτταρα δεν βάφονται με Trypan Blue λόγω της ικανότητας της χρωστικής να διαπερνά της κυτταρικές μεμβράνες νεκρών κυττάρων.



5. Πολλαπλασιασμός του μέσου όρου των ζωντανών κυττάρων με  $X10^4$  λόγω του ότι η πλευρά του κάθε "τετραγώνου" είναι 1mm και η απόσταση μεταξύ του slide και του καλύμματος της είναι 0.1mm άρα  $0.1\text{mm}^3$ .
6. Πολλαπλασιασμός με 5 λόγω της αρχικής αραιώσης 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue.
7. Η τελική τιμή που θα προκύψει είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/ml στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.
8. Για τον υπολογισμό του ποσοστού βιωσιμότητας αθροίζουμε τόσο τα ζωντανά όσο και τα νεκρά κύτταρα και έπειτα διαιρούμε τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων δια του συνόλου και το πολλαπλασιάζουμε επί του 100.

### **3.3.Καλλιέργεια PBMCs**

#### **Υλικά και αντιδραστήρια**

- Μέσο RPMI-1640 με L-γλουταμίνη, κόκκινο της φαινόλης και HEPES
- Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon 50ml
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon 15ml
- Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 φρεατίων
- Ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη IL-2

#### **Μέθοδος:**

1. Απόψυξη του εναιωρήματος των λεμφοκυττάρων από το υγρό άζωτο στους 37 °C με προσθήκη 1ml RPMI-1640 το οποίο έχει προ-θερμανθεί στους 37 °C.
2. Μεταφορά από το cryogenic vial σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon των 15ml το οποίο περιέχει 5ml RPMI-1640.
3. Φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 λεπτά παρουσία φρένων ώστε να αραιωθεί το DMSO, ένα δυνητικά τοξικό χημικό για τα κύτταρα ανάλογα με την συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης σε αυτό σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Δημιουργία Complete Medium όπου σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon των 50ml προστίθενται 10%FBS σε 90% RPMI παρουσία 100units/ml πενικιλίνης καθώς και 10μg/ml στρεπτομυκίνης.

5. Για κάθε μέρος του πειράματος(πηγαδάκι) προσθέεται Complete medium στα κύτταρα. Ο όγκος του θρεπτικού υλικού που προστίθεται καθορίζεται έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός κυττάρων που να περιέχονται σε κάθε πηγαδάκι να είναι περίπου  $10^6$  στο 1ml του φρεατίου.
6. Ακολουθεί ιδιαίτερη προσεκτική ανάδευση για να είναι όσο το δυνατόν ισόποσα κατανεμημένα τα κύτταρα μέσα στον φυγοκεντρικό σωλήνα.
7. Μεταφορά του όγκου των κυττάρων για κάθε ένα από τα φρεάτια της πλάκας κυτταρικής καλλιέργειας.
8. Συμπληρώνεται όγκος θρεπτικού υλικού Complete medium μέχρι το 1ml σε κάθε φρεάτιο της πλάκας καλλιέργειας.
9. Ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί προστίθενται τα αντίστοιχα αντιδραστήρια και εν συνεχεία πραγματοποιείται ελαφριά επαναιώρηση.
10. Τέλος, οι πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετούνται σε επωαστήρα με συνθήκες 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.

Σε περίπτωση που η καλλιέργεια είναι άνω των 72h τότε έχουμε κάποια επιπρόσθετα βήματα:

- I. Μετά το πέρας των 72h. και για κάθε η πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε κατάλληλη φυγόκεντρο στις 2000 rpm για 10 λεπτά παρουσία φρένων.
- II. Με μία γρήγορη κίνηση αφαιρείται το Complete medium αδειάζοντας το.
- III. Προστίθεται 1ml Complete medium καθώς και IL-2 και τα κύτταρα επαναιωρούνται.

Εν τέλει, οι πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετούνται και πάλι σε επωαστήρα με τις άνωθεν συγκεκριμένες συνθήκες για τις επόμενες ώρες της καλλιέργειας.

Πέραν των βημάτων αυτών, όταν η καλλιέργεια πρόκειται να αφηθεί για άνω των 72h. τότε από τις 0h πέρα από τα κυτταρικά διεγερτικά προστίθεται και IL-2. Ενώ, το medium της καλλιέργειας είναι το ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium από την STEMCELL Technologies Canada Inc. (Vancouver, BC, Canada).

### 3.4. Διέγερση κυττάρων

Τα διεγερτικά που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω προκειμένου να επιτευχθεί η διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων είναι τα εξής:

- **PMA (phorbol 12-myristate 13acetate) ή TPA(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate):**  
Πρόκειται για ένα διεστέρα της φορβόλης ο οποίος χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC), ένζυμο που συμμετέχει στη μετάδοση του μηνύματος ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων. Το PMA απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους σπόρους ενός φυτού της Νοτιο-Ανατολικής Ασίας που ονομάζεται croton plant και πιο συγκεκριμένα του *Croton tiglium*. Η επίδραση του PMA στην PKC οφείλεται στην ιδιότητα της να μοιάζει με τους φυσικούς ενεργοποιητές των ισομορφών της PKC, όπως είναι η διακυλογλυκερόλη. Η PKC είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό ένζυμο καθώς η ενεργοποίησή του επιδρά στην απελευθέρωση και μετακίνηση του  $Ca^{2+}$  το οποίο στην συνέχεια θα πυροδοτήσει μια σειρά κυτταρικών απαντήσεων που θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων να αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να παράγουν υψηλές ποσότητες κυτταροκινών όπως είναι η IFN- $\gamma$ . Μια αντίστοιχη κυτταροκίνη που παράγεται και εκκρίνεται κατά την διέγερση με PMA είναι και η IL-2. Η IL-2 είναι μια ιδιαίτερα σημαντική κυτταροκίνη η οποία παράγεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα Jurkat T cells, μια λευχαιμική κυτταρική σειρά Τ λεμφοκυττάρων. Το PMA μέσω της ικανότητάς του να επιδρά και να ενεργοποιεί την PKC μπορεί να διεγείρει την αύξηση της παραγωγής της IL-2. Το παράδειγμα αυτό αποτελεί μόνο ένα σχετικά με το πώς το PMA δρα στην παραγωγή κυτταροκινών. Γεγονός στο οποίο οφείλεται η ευρεία χρήση του σε πρωτόκολλα χρώσης των ενδοκυττάρων κυτταροκινών όπως για παράδειγμα της IFN- $\gamma$ , της IL-17 και άλλων. Πέρα από αυτά το PMA έχει και άλλες δράσεις επάγοντας την ενδογενή παραγωγή σουπεροξειδίου και εμπλεκόμενο σε διάφορες μορφές καρκίνου. Επίσης, το PMA μπορεί να ενεργοποιεί και τον πυρηνικό παράγοντα  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ο οποίος συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες και εμπλέκεται μια πληθώρα ασθενειών όπως σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και σε αυτοάνοσες παθήσεις (168-171).
- **Ionomycin:** Το PMA που προαναφέρθηκε δεν δρα όμως μόνο του αλλά συνήθως σε συνεργασία με την Ιονομυκίνη. Η ουσία αυτή πρόκειται για ένα ιονοφόρο που μπορεί να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και μπορεί να προσδένεται με το  $Ca^{2+}$  σε μια αναλογία 1:1. Παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces conglobatus* και μπορεί να λειτουργήσει και ως αντιβιοτικό. Πέρα από τα ιόντα ασβεστίου μπορεί να δεσμεύσει και άλλα κατιόντα όπως του μαγνησίου και του καδμίου, ωστόσο βέλτιστη πρόσδεση όπως έχει αποδειχθεί είναι με το ασβέστιο. Η ιονομυκίνη μεσολαβεί στην μεταφορά του  $Ca^{2+}$  μέσα και έξω από τα κύτταρα μέσω της απελευθέρωσης του από τις

αποθήκες ασβεστίου του κυττάρου. Η μεταφορά αυτήν του ασβεστίου μπορεί να αυξήσει τις ενδοκυττάριας ποσότητες ασβεστίου οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο και αυτοφαγία. Επομένως, μπορεί να συμμετέχει στην μετάδοση του μηνύματος της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. Η ουσίες αυτές δρουν συνεργατικά μεταξύ τους σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της πρόσδεσης με TCR (T cell receptor). Αυτήν η συνδυασμένη δράση και των δύο έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και NFAT οδηγώντας έτσι στην παραγωγή από τα T λεμφοκύτταρα διαφόρων κυτταροκινών, όπως της IL-2, IL-4, IL-17 και IFN-γ. Για τον λόγο αυτό αξιοποιείται ευρέως σε πρωτόκολλα χρώσης κυτταροκινών μαζί με το PMA (168-170, 172).

- **Interleukin-2(IL-2):** Η IL-2 ήταν η πρώτη κυτταροκίνη που κλωνοποιήθηκε μοριακά και με βάση τα τότε δεδομένα ονομάστηκε ‘‘παράγοντας ανάπτυξης των T λεμφοκυττάρων’’. Αρχικά, θεωρούνταν ένας παράγοντας που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, καθώς και την διαφοροποίηση τους σε T δραστικά λεμφοκύτταρα(T effector cells). Ωστόσο, μετά από σχεδόν 30 χρόνια πειράματα σε ποντίκια στα οποία είχε γίνει knock-out το γονίδιο της IL-2 καθώς και του υποδοχέα της αμφισβήτησαν την θεωρία αυτήν. Αντίθετα προέκυψε ότι πέραν του γεγονότος ότι δεν χρειάζεται στα T δραστικά λεμφοκύττατα αλλά διαδραματίζει κύριο ρόλο στην διατήρηση των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων(Treg cells) και απουσία αυτού χάνεται η ρύθμιση του ανοσοποιητικού μέσω των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Η IL-2 έχει πλειοτροπική δράση και παράγεται κυρίως από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα, αλλά και από τα ενεργοποιημένα CD8+ T λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα καθώς και από τα φυσικά φονικά(NK) κύτταρα και τα NKT κύτταρα. Η κύρια λειτουργία της έγκειται στην ανάπτυξη των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στο θύμο. Επίσης, αποτελούν ιδιαίτερο σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση των Treg στην περιφέρεια καθώς και για την λειτουργική ικανότητα και σταθερότητα των επιπέδων των Treg λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η IL-2 ρυθμίζει τα Treg αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός εμπλέκει επιγενετικές αλλαγές του FoxP3 καθώς τα κύτταρα που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα αυτόν δεν την παράγουν. Οι δράσεις αυτές επιτυγχάνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις της κυτταροκίνης αυτής. Επίσης, χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν δοκιμαστεί και σε ανθρώπινες δοκιμασίες ως φάρμακα ενάντια αυτοάνοσων παθήσεων. Τέλος, λόγω των ιδιοτήτων της η IL-2 έχει ερευνηθεί σε PBMCs όπου αποδείχθηκε να διατηρεί την δράση της στην επαγωγή των T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (173-176).

- **CD3/CD28:** Τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιούνται για την διέγερση των T λεμφοκυττάρων. Τα Naïve T λεμφοκύτταρα χρειάζονται δύο σήματα για την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση τους. Το ένα σήμα υφίσταται μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων(TCR) και του προσδέτη του MHC συμπλόκου. Ενώ, το δεύτερο προέρχεται από συνδιεγερτικά σήματα μεταξύ του υποδοχέα του CD28 με τον προσδέτη CD80/86. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα αντισώματα CD3/CD28. Το CD3 μπορεί να προσδέεται και να αλληλεπιδρά με τον TCR, όμως απουσία του συνδιεγερτικού σήματος θα επιτευχθεί πολλαπλασιασμός των κυττάρων που εν τέλει θα οδηγήσει σε πρώιμο κυτταρικό θάνατο ή ανεργία των T λεμφοκυττάρων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται και ένα πρόσθετο αντίσωμα, το CD28, το οποίο προσφέρει τα συνδιεγερτικά σήματα για την βέλτιστη ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση αυτήν θα προκαλέσει ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών διαδικασιών που θα οδηγήσει εν τέλει στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν. Υπάρχουν διάφορες μορφές με την οποία τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιούνται όπως προσδεμένα στο πιάτο, με μορφή beads, διαλυτά (177, 178).

**Brefeldin A:** Πρόκειται για μια αντι-ική λακτόνη που παράγεται από τον *Eupenicillium brefeldianum*. Η ουσία αυτή αποτελεί έναν αναστρέψιμο αναστολέα της πρωτεϊνικής μεταφοράς από το ενδοπλασματικό δίκτυο(ER) στο σύστημα Golgi οδηγώντας σε συσσώρευση τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Για την μεταφορά των πρωτεϊνών από το ER στο Golgi εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες. Ένας εκ των βασικότερων είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF), ο GBF1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της Arf1p GTPase. Ο GBF1 και πιο συγκεκριμένα η καταλυτική περιοχή του Sec7 ευθύνεται για την μετατροπή του GDP που είναι δεσμευμένο στην Arf1p στην ενεργή μορφή του GTP. Εν συνεχεία, δημιουργείται ένα σύμπλοκο με την περιοχή COP-I του β-COP μια πρωτεΐνης καλύμματος. Η πρωτεΐνη β-COP είναι αναγκαία για την ορθή διαμόρφωση των κυστιδίων μέσα στα οποία περιέχονται η πρωτεΐνες που θα μεταφερθούν στο Golgi απ' όπου και θα εκκριθούν. Κύριος στόχος της Brefeldin είναι ο Arf1p. Η ουσία αυτή μέσω της σύνδεσης της στο σύμπλοκο Arf1p-GDP αναστέλλει την λειτουργία της GBF1 μην επιτρέποντας την μετατροπή του συμπλόκου στην ενεργή μορφή. Έτσι, οι πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για δημιουργία των κυστιδίων μεταφοράς δεν παράγονται. Οι πρωτεΐνες που θα μεταφερόντουσαν στο Golgi για να εκκριθούν εν τέλει παραμένουν στο ER και συσσωρεύονται στο διαμέρισμα αυτό. Η Brefeldin, λοιπόν, χρησιμοποιείται στα *in vitro* πειράματα, καθώς προκαλεί μέγιστη ανίχνευση ορισμένων κυτταροκινών οι οποίες υπό άλλες περιπτώσεις θα διέφευγαν από το κύτταρο και δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν μέσω κυτταρομετρίας ροής (179).

### 3.5.Εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια χρώση αντισωμάτων

#### Υλικά και αντιδραστήρια:

- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf 2ml
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon 50ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline)
- Ορός εμβρύου μόσχου(FBS)
- Αντισώματα(αναλύονται παρακάτω)
- Παραφορμαλδεΐδη(PFA) 2%
- Perm/Wash Buffer

#### Μέθοδος:

Για να είναι εφικτό τα κύτταρα μέσω της κυτταρομετρίας ροής να μετρηθούν για την παραγωγή κυτταροκινών ή άλλων παραγόντων πρέπει πρώτα να έχουν περάσει από μια διαδικασία χρώσης. Η διαδικασία αυτήν, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, οδηγεί στην χρώση των εξωκυττάρων υποδοχέων όπως CD3 όσο και για ενδοκυττάρους παράγοντες όπως κυτταροκίνες. Η κυτταρομετρία ροής αναλύεται σε βάθος στην επόμενη ενότητα. Ωστόσο, η διαδικασία που προηγείται αυτής είναι η εξής:

1. Έπειτα από το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα αναδεύονται ελαφρά και μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Eppendorf των 2ml.
2. Φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 4000rpm και το υπερκείμενο αφαιρείται με την χρήση σύριγγας.
3. Προσθήκη 1ml PBS και επαναιώρηση του ιζήματος, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4000rpm. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για να αφαιρεθεί η ποσότητα της κουρκουμίνης που έχει παραμείνει προσδεσμένη στην επιφάνεια των κύτταρα και μπορεί να δώσει ψευδώς θετικό σήμα στην κυτταρομετρία ροής.
4. Δημιουργία διαλύματος PBS με 2% FBS σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου Falcon και προσθήκη 1ml αυτού στα κύτταρα αφότου έχει αφαιρεθεί το υπερκείμενο της προηγούμενης διαδικασίας. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την μη ειδική σύνδεση καθώς το FBS προσδένεται σε μη ειδικούς υποδοχείς που αλλιώς θα έδιναν σήμα που θα επηρέαζε την ορθή ανάλυση των δεδομένων.
5. Εν συνεχεία, τα κύτταρα επαναιωρούνται, φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 4000rpm και αφαιρείται το υπερκείμενο.
6. Προσθήκη 100μl PBS/2%FBS καθώς και των επιφανειακών αντισωμάτων που θα χρωματίσουν συγκεκριμένα μόρια της επιφάνειας του κυττάρου.

7. Ελαφριά ανάδευση ώστε τα κύτταρα να είναι επαναιωρημένα και επώαση των κυττάρων για 30-45 λεπτά σε ψυγείο στους 4 °C.
8. Προσθήκη 900μl PBS/2% FBS, επαναιώρηση και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4000rpm, έτσι, ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια του αντισώματος.
9. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 200μl PFA 2%. Η παραφορμαλδεΐδη έχει την ικανότητα να μονιμοποιεί την επιφάνεια των κυττάρων μην επιτρέποντας την διάχυση των αντισωμάτων στον γύρω χώρο.
10. Επαναιώρηση των κυττάρων και επώαση τους για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
11. Προσθήκη 800μl PBS , ανάδευση και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4000rpm ώστε να αφαιρεθεί το PFA από τα κύτταρα.
12. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 200μl PBS.
13. Επαναιώρηση των κυττάρων και αποθήκευση στους 4 °C. Στο σημείο αυτό είναι δυνατή μια παύση του πρωτόκολλου και τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν μέχρι και 18h.
14. Μετά το πέρας 12h, προστίθενται 800μl PBS και επαναιώρηση των κυττάρων.
15. Εν συνεχεία, υφίστανται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4000rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
16. Προσθήκη 400μl Perm/Wash Buffer, επαναιώρηση τους και χρήση vortex σε κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα για 15-30 δευτερόλεπτα.
17. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η επώαση σε συνδυασμό με το vortex θα βοηθήσουν στην ικανότητα του Perm/Wash Buffer να ανοίγει αντιστρεπτά πόρους στην κυτταρική μεμβράνη για την είσοδο των αντισωμάτων.
18. Προσθήκη 600μl Perm/Wash Buffer και φυγοκέντρηση των κυττάρων για 3 λεπτά στις 4000rpm.
19. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 100μl Perm/Wash Buffer.
20. Έπειτα προστίθενται τα ενδοκυττάρια αντισώματα που είναι κατάλληλα για χρώση κυτταροκινών, καθώς και ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων και πραγματοποιείται ανάδευση.
21. Επώαση των κυττάρων για 30-45 λεπτά σε ψυγείο στους 4 °C.
22. Προσθήκη 900μl Perm/Wash Buffer και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4000rpm ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια το αντισώματος.
23. Τέλος, γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου, προσθήκη 400μl PBS και τα κύτταρα είναι έτοιμα για την επόμενη διαδικασία, την κυτταρομετρία ροής.

Το παραπάνω πρωτόκολλο διαφοροποιείται όταν οι συνθήκες που μελετούνται είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Στην περίπτωση αυτή, ακολουθούνται τα ίδια βήματα με τις εξής διαφορές:

- I. Στο βήμα 9, πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκειμένου και ακολουθεί αντί για προσθήκη PFA, προσθήκη 200μl True-Nuclear Fix Concentrate. Ελαφριά ανάδευση ώστε τα κύτταρα να είναι επαναιωρημένα και επώαση για 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- II. Στο βήμα 16, η διαφορά είναι μόνο στο ρυθμιστικό διάλυμα. Όπου αντί για το Perm/Wash Buffer χρησιμοποιείται το True Nuclear Perm Buffer και έπειτα ακολουθούνται τα ίδια βήματα με χρήση αυτού του ρυθμιστικού διαλύματος.
- III. Στα βήματα 19-21, η διαδικασία παραμένει ίδια με δύο αλλαγές. Χρησιμοποιείται όπως επισημάνθηκε προηγουμένως το True Nuclear Perm Buffer και ο χρόνος επώασης αυξάνεται σε 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

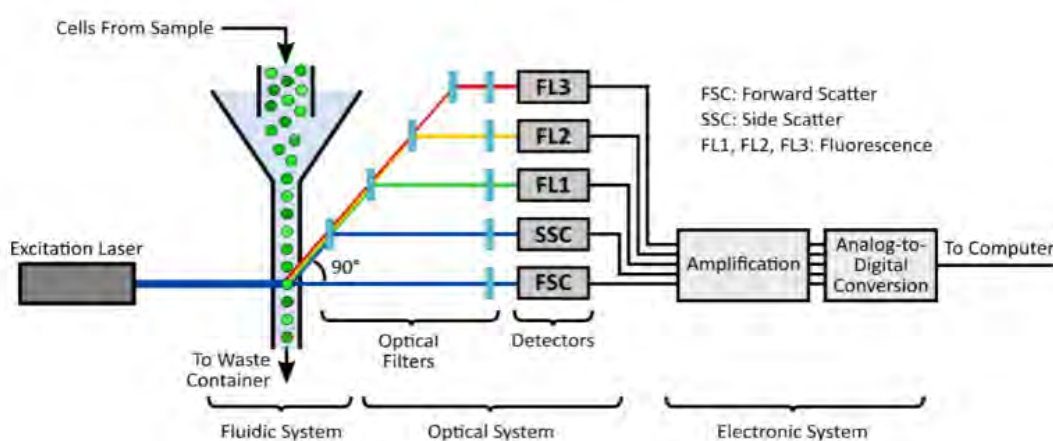
### **3.6.Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο της κυτταρικής βιολογίας καθώς πρόκειται για μια αυτοματοποιημένη μέθοδο για την ανίχνευση και μέτρηση πολλαπλών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών ορισμένων σωματιδίων, όπως για παράδειγμα κυττάρων, όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρηση σε συνεχόμενη ροή. Για να είναι δυνατόν αυτό προσμετράτε η σκέδαση του φωτός, η οποία προέρχεται από χρωστικές ή μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν είτε εξωκυττάρια μόρια της κυτταρικής μεμβράνης ή ενδοκυττάρια μόρια. Ιστορικά τα πρώτα κυτταρόμετρα δημιουργήθηκαν στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα και ήταν όργανα με την ικανότητα ανάλυσης μίας μόνου παραμέτρου, του μεγέθους των κυττάρων. Ωστόσο, από τις δεκαετίες του 1970-1980 τα κυτταρόμετρα γίνονται εμπορικά διαθέσιμα και εκ τότε αρχίζει η ευρεία χρήση του. Αν και εκ τότε οι βασικές αρχές στις οποίες στηρίζεται η κυτταρομετρία δεν έχουν αλλάξει, τα σύγχρονα όργανα έχουν βελτιωθεί καθώς έχουν αυτοματοποιηθεί και είναι εξειδικευμένα. Ένας κυτταρομετρητής ροής επιτρέπει ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση έως και χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Οι πλέον εξελιγμένοι αναλυτές λειτουργούν τόσο σε επίπεδο εξωτερικά του κυττάρου όσο και εσωτερικά επιτρέποντας την ταυτόχρονα ανάλυση μέχρι και 30 διαφορετικών παραμέτρων.



Για τους παραπάνω λόγους, η κυτταρομετρία ροής βρίσκει ποικίλες εφαρμογές στην έρευνα, στην κλινική πράξη και στις κλινικές δοκιμές. Στις χρήσεις αυτές περιλαμβάνονται τα εξής:

- Μέτρηση κυττάρων
- Επιλεκτικός διαχωρισμός κυττάρων
- Καθορισμός κυτταρικών χαρακτηριστικών και λειτουργιών
- Ανίχνευση μικροοργανισμών
- Εύρεση νέων βιοδεικτών
- Διάγνωση ασθενειών όπως καρκίνου, ανοσοανεπαρκειών κ.α.
- Χαρακτηρισμός και απομόνωση σπάνιων κυτταρικών πληθυσμών όπως των ενήλικων βλαστοκυττάρων, κυττάρων υποψήφιων για την έναρξη καρκίνου κ.α.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση συστημάτων κυτταρομέτρου ροής. Ανατύπωση από: S.Castillo-Hair, FlowCal software for analysis and calibration of flow cytometry data

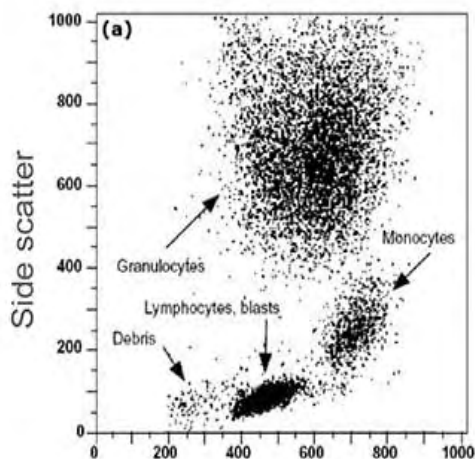
Κάθε κυτταρόμετρο περιλαμβάνει τρία βασικά συστήματα, 1.το σύστημα ροής υγρών (υδροδυναμικό σύστημα), 2.το οπτικό σύστημα και 3.το ηλεκτρονικό (υπολογιστικό) σύστημα όπως απεικονίζονται και στην Εικόνα 12. 1. Το σύστημα ροής υγρών μεταφέρει το δείγμα από το σωλήνα δειγμάτων στον θάλαμο ροής. 2. Στο οπτικό σύστημα περιλαμβάνονται πηγή φωτός, φίλτρα και διάφοροι ανιχνευτές που είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά του φωτός και την ανίχνευση του. 3. Τέλος, το ηλεκτρονικό σύστημα είναι αυτό που ενισχύει το σήμα που ανιχνεύεται μετατρέποντας το στην συνέχεια σε ψηφιακή μορφή η οποία καθίσταται διαχειρίσιμη για μελλοντική ανάλυση της.

Έτσι, στο σύστημα ροής υγρών υπάρχει ένας θάλαμος όπου μέσω σύριγγας προσροφώνται τα κύτταρα που βρίσκονται εν αιωρήσει συνήθως σε διάλυμα PBS. Για να γίνει αυτό απαιτείται μια σταθερή ροή υγρού καθώς και κατάλληλη πίεση. Η πίεση που αναπτύσσεται επιτρέπει την αρχική προσρόφηση του δείγματος. Έπειτα η σταθερή ροή σε συνδυασμό με την πίεση

συνδράμουν στην δημιουργία κατάλληλης φάσης όπου κάθε φορά αναλύεται ένα κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα κινούνται με σταθερή ταχύτητα σε ροή περνώντας μέσα από μια συσκευή οπτικών και ηλεκτρικών σημάτων. Η ροή αυτή ρυθμίζεται από την πίεση, επιτρέποντας στον κυτταρομετρητή να έχει την ικανότητα να προσαρμόσει τον ρυθμό ανάλογα με τον σκοπό της ανάλυσης. Η υψηλή ταχύτητας ροή χρησιμοποιείται κυρίως για την ποιοτική εξέταση του δείγματος, ενώ η χαμηλή ταχύτητα αυξάνει την ομοιομορφία και ακρίβεια της απεικόνισης. Στο οπτικό σύστημα, η ανάλυση των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω του φαινομένου του σκεδασμού του φωτός(σκεδασμός κατά Rayleigh–Debye–Gans) σε συνδυασμό με τον φθορισμό που υπάρχει λόγω σήμανσης με φθορίζουσες ουσίες. Κάθε κύτταρο στο σημείο αυτό περνά από τουλάχιστον μία ακτίνα φωτός. Η ακτίνα αυτήν διεγείρει τα ηλεκτρόνια να μεταπηδήσουν σε τροχιακά υψηλής ενέργειας. Όταν τα ηλεκτρόνια αυτά επιστρέφουν στα τροχιακά χαμηλότερης ενέργειας παράγονται και εκπέμπονται φωτόνια σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Το φως που διεγείρει τα κύτταρα είναι διαθέσιμο σε διάφορα μήκη κύματος από το υπεριώδες έως και το κόκκινο. Επίσης, το σύστημα αυτό περιέχει και ένα σύνολο φακών που συλλέγει το φως που εκλύθηκε από την αλληλεπίδραση ακτίνας φωτός-σωματιδίου. Στην συνέχεια, το φως διαχωρίζεται και κατευθύνεται μέσω διαφόρων καθρεπτών και φίλτρων στον κατάλληλο ανιχνευτή φωτός. Τέλος, ως φωτοανιχνευτές υπάρχουν ορισμένες φωτοдиодοι οι οποίες μετατρέπουν το φως σε ηλεκτρικούς παλμούς που θα καταλήξει τελικά να μετατραπεί σε ψηφιακή μορφή.



**Εικόνα 13. Κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ Merck-Millipore.**



**Εικόνα 14. Διάγραμμα πρόσθιας(Forward, FSC) και πλάγιας (Side,SSC) σκέδασης. Ανατύπωση από: Riley et al, Principles and applications of Flow Cytometry, journal of quantitative cell science 1994; issue 4 volume**

Όπως αναφέρθηκε οι παράγοντες που μετρώνται από το μηχάνημα αυτό είναι σήματα που εκπέμπονται από φθοροφόρα. Ωστόσο, ένα σημείο-κλειδί στην κυτταρομετρία ροής είναι η πρόσθια σκέδαση του φωτός (forward-scattered light/FSC) καθώς και η πλάγια σκέδαση (side-scattered light/SSC). Στην FSC το φως διαθλάται από τα κύτταρα σε μια πρόσθια κατεύθυνση συνεχίζοντας να ακολουθεί την αρχική του κατεύθυνση. Η FSC επιτρέπει τον καθορισμό του μεγέθους του κυττάρου. Επομένως, όσο μεγαλύτερη η πρόσθια σκέδαση τόσο μεγαλώνει το μέγεθος του μορίου καθώς και το σήμα που δίνεται. Από την άλλη, στην SSC το φως διαθλάται από ένα μόριο και η κατεύθυνση που ακολουθεί αλλάζει. Η πλάγια σκέδαση, λοιπόν, παρέχει πληροφορίες για την κοκκιωμάτωση καθώς και την πολυπλοκότητα του κυττάρου. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι κύτταρα με υψηλότερη εσωτερική πολυπλοκότητα όπως τα ουδετερόφιλα να έχουν μεγαλύτερη πλάγια σκέδαση και άρα και μεγαλύτερο σήμα SSC. Τόσο η πρόσθια σκέδαση όσο και η πλάγια σκέδαση του φωτός αποδεικνύεται ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικές αφού μέσω αυτών μπορεί να γίνει διάκριση ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών βασιζόμενοι μόνο στο μέγεθος και την κοκκιωμάτωση των κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών είναι η Εικόνα 14 όπου φαίνεται η κυτταρομετρία μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος. Στην εικόνα αυτήν καθίσταται εφικτό μέσω της FSC και SSC να διακριθούν τα λεμφοκύτταρα, από τα κοκκιόκυτταρα και τα μονοκύτταρα.

Ωστόσο, η χρήση της κυτταρομετρίας ροής δεν περιορίζεται στο κομμάτι αυτό. Η αξιοποίηση ανιχνευτών φθορισμού οι οποίοι ονομάζονται φθοριοχρώματα ή φθοροφόρα παρείχε την δυνατότητα να σημανθούν και να απεικονιστούν συστατικά που αλλιώς δεν θα ήταν εφικτό. Το φθοριόχρωμα μπορεί δηλαδή να προσδεθεί και να χρωματίσει ειδικά την πρωτεΐνη ή μόριο που ερευνάται. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φθοριοχρώματος όπως για παράδειγμα FITC, PE, PerCP, APC και πολλά ακόμα όπου το καθένα έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όσον αφορά το φάσμα διέγερσης και εκπομπής του φωτός πράγμα που αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό σημείο για την σχεδίαση του πάνελ των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στην κυτταρομετρία ροής. Στον Πίνακα 1 απεικονίζεται το σύνολο των αντισωμάτων που αξιοποιήθηκαν για τα εκάστοτε πειράματα μας (180, 181).

Αντίσωμα	Φθοριόχρωμα	Κλώνος	Εταιρία
CD3	FITC	UCHT-1	Merck-Milipore
CD4	PE-Cy7	RPAT-4	Merck-Milipore
	APC	RPAT-4	Biolegend
	APC-Cy7	RPAT-4	Merck-Milipore
CD25	APC	BC96	Biolegend
CD56	PE	C59	Merck-Milipore
IFN-γ	APC		Origene
IL-17	FITC	BL168	Merck-Milipore
IL-10	PE	RPA-T4	Biolegend
FoxP3	FITC	206D	Biolegend
STAT3	PE	PS727	BD Biosciences

**Πίνακας 1:** Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρομετρία ροής

Στην παρούσα μελέτη, για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε ο κυτταρομετρητής ροής Guava easyCyte™ της Millipore-Merck και για την επιμέρους ανάλυση των δεδομένων τα λογισμικά Guava InCyte και FlowJo. Σε κάθε ανάλυση, η εγκυρότητα της λειτουργικότητας ελεγχόταν με το guava easyCheck™ Kit. Τέλος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης απεικονίζονται κυρίως με στικτογράμματα ή κυτταροδιαγράμματα(dot plots) καθώς και με περιμετρικά διαγράμματα ή νεφελοδιαγράμματα (contour plot).

### 3.7.Απομόνωση κυτταρικού πληθυσμού με χρήση μαγνητών

Η απομόνωση μέσω μαγνητών ή MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομόνωση διάφορων κυτταρικών τύπων αξιοποιώντας της συστάδες διαφοροποίησης που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην δέσμευση αντισωμάτων, ενζύμων ή λεκτίνης σε μαγνητικά σφαιρίδια(beads) που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε συγκεκριμένα κύτταρα που εκφράζουν έναν συγκεκριμένο επίτοπο. Έτσι, όταν ένας μεικτός πληθυσμός κυττάρων εναποτίθεται σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, τα μαγνητικά σφαιρίδια ενεργοποιούνται και διαχωρίζονται τα κύτταρα-στόχοι από τα υπόλοιπα. Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους γίνεται η επιλογή του πληθυσμού των “σημασμένων” κυττάρων, είτε με θετική ή με αρνητική επιλογή. Στην πρώτη μέθοδο, το υπερκείμενο των κυττάρων διέρχεται της στήλης και μόνο τα κύτταρα που έχουν δεσμευτεί με τα σφαιρίδια μένουν ακινητοποιημένα στην στήλη λόγω του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται. Τα υπόλοιπα διέρχονται από αυτήν και απορρίπτονται, ενώ ακολούθως με πάυση του πεδίου και πλύση της στήλης απομονώνεται ο επιθυμητός πληθυσμός. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται υψηλός βαθμός απομόνωσης ενός συγκεκριμένου πληθυσμού που αντιστοιχεί σε έναν καλά καθορισμένο επιφανειακό δείκτη. Αντίστοιχα, στην δεύτερα μέθοδο,

τα κύτταρα που “σημαίνονται” δεν είναι τα επιθυμητά, αλλά όλα τα υπόλοιπα. Επομένως, αυτά που εκλούνται από την στήλη μετά την εφαρμογή του πεδίου είναι τα κύτταρα που δεν έχουν σημανθεί και είναι τα ζητούμενα. Για την επιτυχία του τρόπου αυτού χρησιμοποιούνται κοκτέιλ αντισωμάτων που σημαίνουν όλα τα κύτταρα εκτός των ζητούμενων, τα οποία παραμένουν άθικτα και ανεπηρέαστα από τα σφαιρίδια. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από την επακόλουθη χρήση των κυττάρων. Ιδιαίτερα διαδεδομένο είναι επίσης, και οι συνδυασμοί των δύο αυτών μεθοδολογιών για επίτευξη βέλτιστης απομόνωσης του κυτταρικού πληθυσμού (182, 183).

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των CD4+ T λεμφοκυττάρων από μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ήταν θετική επιλογή χρησιμοποιώντας CD4-επικαλυμμένα μικροσφαιρίδια T λεμφοκυττάρων. Τα μαγνητικά σφαιρίδια προέρχονται από την Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.

### **3.8.Φωσφο-ειδική κυτταρομετρία ροής**

Η φωσφο-ειδική κυτταρομετρία ροής (phosphoflow cytometry) είναι μια μορφή κυτταρομετρίας ροής που αφορά φωσφορυλιωμένα μόρια. Από το 1999 διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει φωσφορυλιωμένα μόρια μέσω κυτταρομετρίας ροής. Κάποια εξ αυτών είναι τα STAT1, STAT4, AKT/PKB, ERK, MEK, p38 και c-Jun. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες: 1. την άμεση μονιμοποίηση για την διατήρηση των αρχικών φωσφορυλιωμένων σταδίων, 2. τα κατάλληλα αντισώματα που θα διέλθουν έπειτα από αποτελεσματική διάτρηση των κυττάρων στο εσωτερικό του και θα δεσμευθούν στον στόχο τους και 3. Τα κατάλληλα αντισώματα που θα δεσμευθούν στην επιφάνεια των κυττάρων επιτρέποντας την διάκριση τους. Επομένως, διάφοροι ερευνητές μελέτησαν τους παράγοντες αυτούς για να βελτιστοποιήσουν την ανίχνευση των φωσφορυλιωμένων μορίων. Από τους πρώτους στην διαδικασία ανάπτυξης πρωτοκόλλου φωσφο-ειδικής κυτταρομετρίας ροής ήταν ο Nolan και οι συνεργάτες του. Η ομάδα αυτήν μελέτησε και σύγκρινε διάφορες πειραματικές διαδικασίες εστιάζοντας στην εύρεση του κατάλληλου διεγέρτη των κυττάρων, στην μέθοδο μονιμοποίησης και στην μέθοδο διάτρησης του κυττάρου. Οι παραπάνω μελέτες ήταν ένα μικρό δείγμα όσων ακολούθησαν. Ακαδημαϊκές ομάδες καθώς και μη ακαδημαϊκοί ερευνητές ανέπτυξαν και εξέλιξαν τις μεθόδους αυτές καθώς επίσης ανακάλυψαν και ταυτοποίησαν διάφορα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αντισώματα. Η φωσφο-ειδική κυτταρομετρία αναδείχθηκε με τον τρόπο αυτό σε ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο (184, 185).

Ο μεταγραφικός παράγοντας που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική ήταν ο STAT3 και πιο συγκεκριμένα η φωσφορυλιωμένη μορφή του στην σερίνη 727 καθώς είναι μια πιο ενεργή μορφή με μέγιστη μεταγραφική ενεργότητα.

#### **Υλικά και αντιδραστήρια:**

- Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf 2ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline)
- Ορός εμβρύου μόσχου(FBS)
- Κυτταρικά διεγερτικά
- PhosFlow Perm Buffer III ( BD Biosciences)
- Αντισώματα(αναλύονται παραπάνω)
- Παραφορμαλδεΰδη(PFA) 2%

#### **Διαδικασία:**

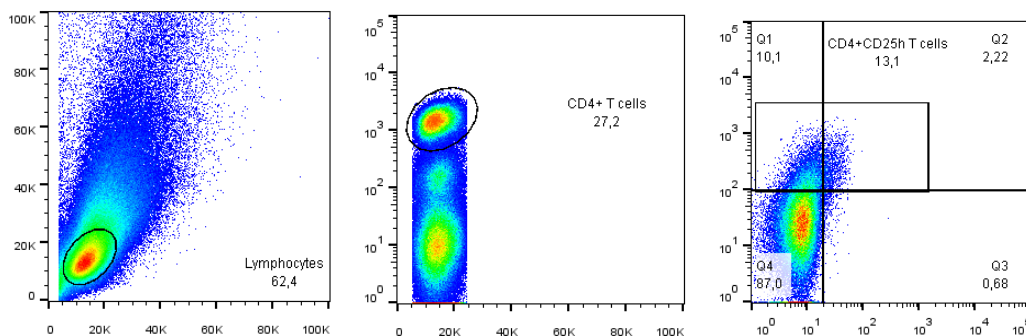
1. Τα κύτταρα αφήνονται σε κατάσταση ηρεμίας σε χαμηλή συγκέντρωση ορού (1% FCS) για 12 ώρες.
2. Έπειτα 2 ώρες πριν την ενεργοποίηση προστίθεται η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 5μg/ml και 10μg/ml.
3. Μετά το πέρας αυτών προστίθεται μη ειδικός διεγέρτης PMA (50ng/ml) συν Ionomycin (1μg/ml) για 30 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3. Παράλληλα, υπήρχε και μία καλλιέργεια με μη διεγερμένα κύτταρα με σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων του STAT3 σε μη διεγερμένη κατάσταση.
4. Για την μονιμοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιείται προ-θερμασμένη στους 37 °C παραφορμαλδεΰδη σε συγκέντρωση 2% και επώαση των κυττάρων για 15 λεπτά στους 37 °C.
5. Τα κύτταρα μετά πλένονται και ακολουθεί διάτρηση μέσω προσθήκης PhosFlow Perm Buffer III ( BD Biosciences) ενώ παράλληλα έγινε χρήση vortex.
6. Προστίθεται 1ml PBS για 30-60 λεπτά για ενυδάτωση των διατρημένων κυττάρων.
7. Για τον μπλοκάρισμα των Fc υποδοχέων τα κύτταρα πλένονται και επαναιωρούνται σε κατάλληλο αντιδραστήριο (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
8. Έπειτα τα κύτταρα πλένονται, επαναιωρούνται σε 100ml 2% FBS/PBS και προστίθενται τα κατάλληλα αντισώματα με επώαση αυτών για 1 ώρα.
9. Τέλος, τα κύτταρα πλένονται και επαναιωρούνται σε PBS για το στάδιο της κυτταρομετρίας ροής

### **3.9.Στατιστική ανάλυση**

Για την ανάλυση των δεδομένων, για κάθε άτομο το ποσοστό των κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένους δείκτες καθώς και το MFI τους θεωρείται ως ο μέσος όρος ή η μέση τιμή του κάθε ατόμου σε κάθε ομάδα. Η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean, SEM). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ασθενών και των υγιών ατόμων υπολογίστηκαν με την μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης ANOVA. Στατιστικά σημαντικές τιμές θεωρήθηκαν οι τιμές που παρουσίασαν  $p \leq 0.05$ . Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με GraphPad Prism και SPSS.

## 4.Αποτελέσματα

### Φαινοτυπικός προσδιορισμός λεμφοκυτταρικών πληθυσμών από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος μέσω κυτταρομετρίας ροής

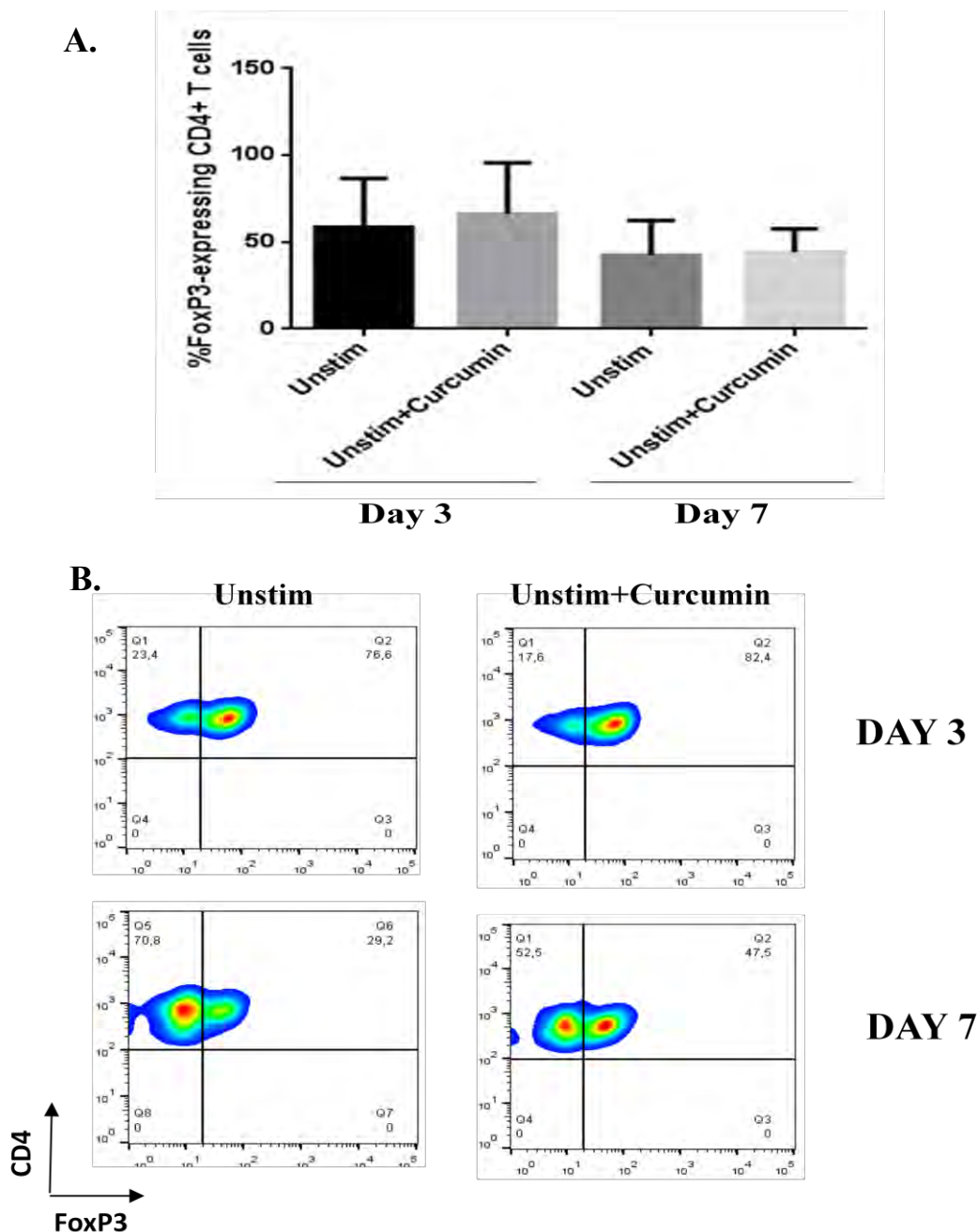


**Εικόνα 15: Φαινοτυπική ανάλυση και επιλογή “gating” λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Α. Επιλογή βιώσιμου λεμφοκυτταρικού πληθυσμού, Β. Διαλογή των CD4+ T λεμφοκυττάρων, Γ. Φαινοτυπικός προσδιορισμός των CD4+CD25<sup>high</sup> T λεμφοκυττάρων**

PBMCs τόσο υγιών όσο και ασθενών καλλιιεργήθηκαν και υποβλήθηκαν σε εξωκυτάρια και ενδοκυτάρια χρώση με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα (όπως απεικονίζονται στον Πίνακα 1). Μετά την χρώση τους, τα κύτταρα αναλύθηκαν μέσω χρήσης της κυτταρομετρίας ροής. Οι τεχνικές αυτές αναλύονται παραπάνω στο κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και υλικά υποενότητες 2.3-2.6. Από την ανάλυση των φαινοτυπικών επιτόπων μπορεί να γίνει χαρακτηρισμός των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών και διαχωρισμός σε CD4+ T λεμφοκύτταρα, NK λεμφοκύτταρα καθώς και CD4+ NKT λεμφοκύτταρα στην μία περίπτωση, καθώς και προσδιορισμός των CD4+CD25+FoxP3+ T ρυθμιστικών κυττάρων στην άλλη περίπτωση(Εικόνα 15). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την επιλογή των κατάλληλων λεμφοκυτταρικών πληθυσμών για την περαιτέρω ανάλυση τους. Αρχικά, μέσω της πρόσθιας σκέδασης(FSC-Forward Scatter) και πλάγιας σκέδασης (SSC-Side Scatter) καθίσταται δυνατή η επιλογή των βιώσιμων κυττάρων (Lymphocyte gating) και η ανάλυση μόνο αυτού του συγκεκριμένου πληθυσμού κυττάρων μέσω μίας τεχνικής που ονομάζεται “gating”. Έτσι, μέσα στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων στην περίπτωση των T ρυθμιστικών κυττάρων η ύπαρξη θετικών σε CD4, CD25 και FoxP3 κυττάρων επέτρεψε τον προσδιορισμό ορισμένων ρυθμιστικών κυττάρων. Επίσης, στην περίπτωση των σκευασμάτων κουρκουμίνης η ύπαρξη των δεικτών CD4 και CD56 έδωσε την δυνατότητα της εύρεσης των CD4+ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, των CD56+ NK λεμφοκυττάρων και των CD4+CD56+ NKT λεμφοκυττάρων.



Αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 από την κουρκουμίνη σε μη διεγερμένα κύτταρα υγίων δότην

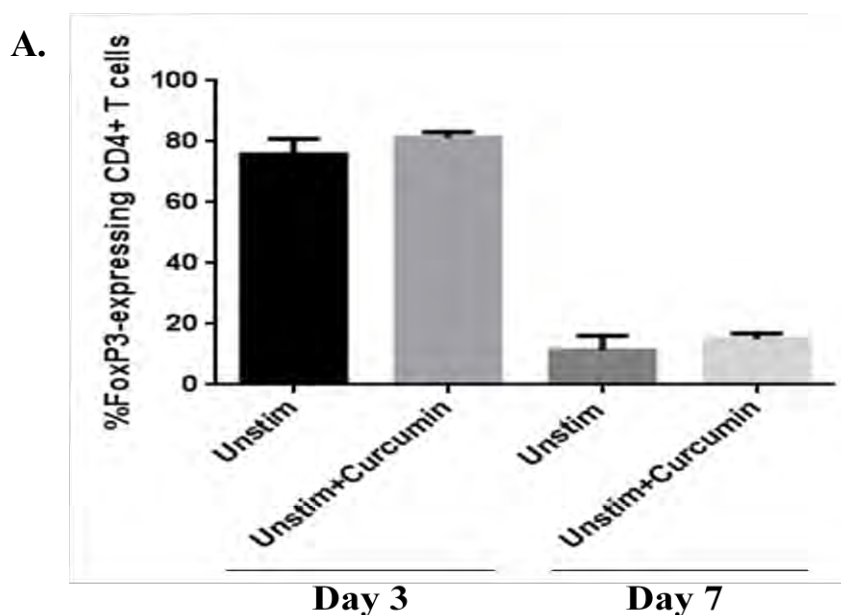


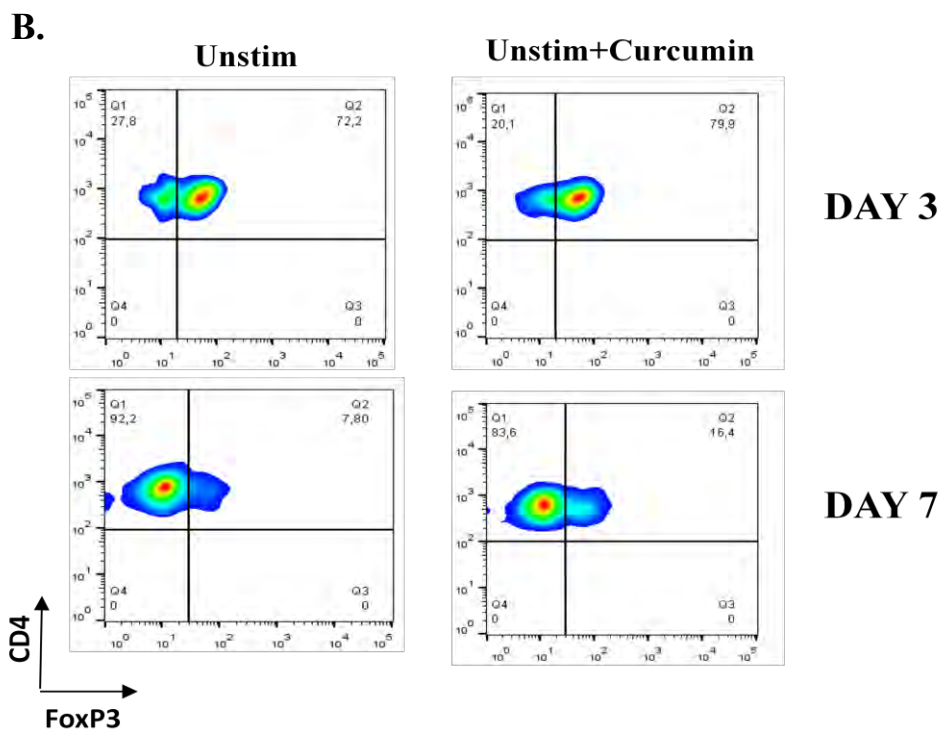
**Εικόνα 16:** Αύξηση έκφρασης FoxP3 σε μη διεγερμένα CD4+ T λεμφοκύτταρα υγιούς δότη μετά την χορήγηση κουρκουμίνης. **A.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα CD4+ T κυττάρων που εκφράζουν FoxP3 στις 3 και 7 μέρες παρουσία ή μη κουρκουμίνης (n=4). **B.** Χαρακτηριστική απεικόνιση κυτταρομετρίας ροής των FoxP3+ CD4+CD25high T κυττάρων στις 3 και 7 μέρες.

Η IL-2 είναι μια απαραίτητη κυτταροκίνη για τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Από μελέτες έχει δείχθει ότι για την επιβίωση των κυττάρων για άνω των μερικών ωρών είναι απαραίτητη η ουσία αυτή (173, 175, 176). Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της κουρκουμίνης στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, που όπως είναι γνωστό είναι δείκτης ρυθμιστικών κυττάρων, παρουσία μόνο IL-2. Πιο συγκεκριμένα αρχικός στόχος των

πειραμάτων ήταν η μελέτη της επίδρασης της κουρκουμίνης στην έκφραση του FoxP3 σε κύτταρα που δεν είχαν διεγερθεί. Τα δείγματα n=4 προέρχονταν από υγιείς δότες και η δράση της κουρκουμίνης μελετήθηκε στις 3 και 7 μέρες. Επίσης, η κουρκουμίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Cayman (Cayman chemicals, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) και από την βιβλιογραφία χρησιμοποιήθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση τα 2μg/ml. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 στο πάνελ Α, η προσθήκη της κουρκουμίνης βοήθησε στην έκφραση του FoxP3 καθώς αύξησε τα επίπεδα έκφρασης τόσο στις 3 μέρες όσο και στις 7 μέρες. Το Mean  $\pm$  SD των μη διεγερμένων κυττάρων στις 3 μέρες ήταν  $58.58 \pm 28.07$  όταν δεν προστέθηκε η κουρκουμίνη. Από την άλλη, το ποσοστό έπειτα από την κουρκουμίνη αυξήθηκε στο  $66.23 \pm 29.46$  για n=4 υγιών ατόμων. Επιπλέον, αύξηση παρατηρήθηκε και στις 7 μέρες καθώς χωρίς την κουρκουμίνη το Mean  $\pm$  SD για τα διεγερμένα κύτταρα ήταν  $42.43 \pm 20.20$  και έπειτα από την χρήση της κουρκουμίνης το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο 46.28 για n=4 υγιών ατόμων. Στο πάνελ Β φαίνονται δύο παραδείγματα της δράσης της κουρκουμίνης στις 3 και στις 7 μέρες, αντίστοιχα. Στην μέρα 3, απουσία κουρκουμίνης το ποσοστό των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων είναι 76.3% και παρουσία αυτής το ποσοστό αυξάνεται στο 82.4%. Ανάλογα και στην μέρα 7, το ποσοστό των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων είναι απουσία κουρκουμίνης στο 29.2% και έπειτα από την χρήση αυτής αυξάνεται στο 47.5%. Επομένως, παρατηρείται μια αύξηση της τάξης του 13% και 10% για τις 3 και 7 μέρες, αντίστοιχα.

Αύξηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 από την κουρκουμίνη σε μη διεγερμένα κύτταρα ασθενών με ψωρίαση



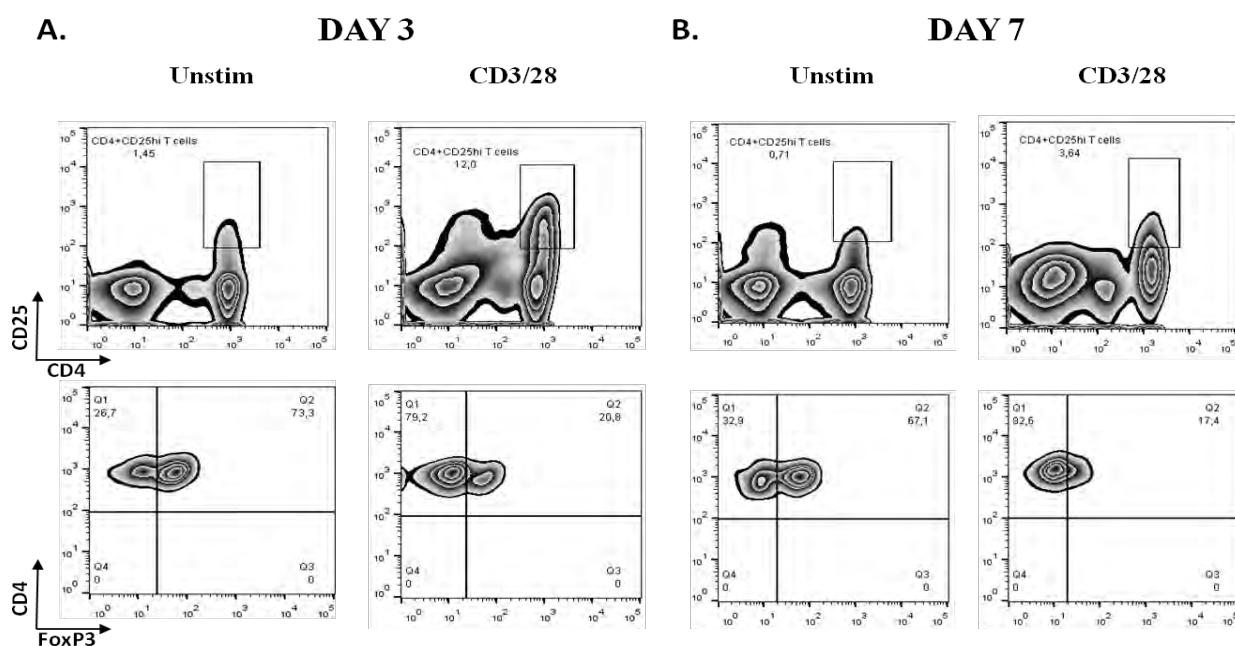


**Εικόνα 17:** Αύξηση έκφρασης FoxP3 σε μη διεγερμένα CD4+ T λεμφοκύτταρα ασθενούς με ψωρίαση έπειτα από χρήση κουρκουμίνης. Α. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα CD4+ T κυττάρων που εκφράζουν FoxP3 στις 3 και 7 μέρες παρουσία ή μη κουρκουμίνης (n=2). Β. Χαρακτηριστική απεικόνιση κυτταρομετρίας ροής των FoxP3+ CD4+CD25high T κυττάρων στις 3 και 7 μέρες.

Όπως αναφέρθηκε η κουρκουμίνη φαίνεται να προκαλεί αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, έναν δείκτη των T ρυθμιστικών κυττάρων, σε υγιείς άτομα. Το επόμενο βήμα για την έρευνα της κουρκουμίνης ήταν να ελεγχθεί αν η δράση της αυτή εμφανίζεται και σε ασθενείς. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της κουρκουμίνης σε μη διεγερμένα κύτταρα ασθενών με ψωρίαση (n=2) σε ίδιες συνθήκες όπως των υγιών. Στην Εικόνα 17 διακρίνεται ότι και σε ασθενείς με ψωρίαση η κουρκουμίνη μπορεί να διατηρεί τον ρόλο της στην αύξηση της έκφρασης του παράγοντα FoxP3. Συγκεκριμένα στις 3 μέρες, το Mean ± SD των μη διεγερμένων CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων είναι χωρίς την κουρκουμίνη  $75.8 \pm 5.1$ , ενώ όταν προστεθεί η κουρκουμίνη το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο  $81.3 \pm 1.8$ . Παρομοίως, αντίστοιχα αποτελέσματα διακρίνονται και στις 7 μέρες. Έτσι, το Mean ± SD των μη διεγερμένων CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων μετά από 7 μέρες ήταν  $11.3 \pm 4.9$ , ενώ όταν τα κύτταρα αυτές τις 7 μέρες είχαν επωαστεί με κουρκουμίνη τα επίπεδα του FoxP3 αυξάνονταν στο  $15.1 \pm 1.9$ . Στο πάνελ Β της Εικόνας 17 απεικονίζεται ένα παράδειγμα κυτταρομετρίας ροής ασθενούς με ψωρίαση παρουσία και μη κουρκουμίνης. Στο επάνω μέρος είναι τα κύτταρα στις 3 μέρες και στο κάτω μέρος στις 7 μέρες. Έτσι, στις 3 μέρες απουσία διεγέρτη καθώς και της ουσίας το ποσοστό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων κυμαίνεται στο 72.2% ενώ έπειτα από την επώαση με την ουσία αυξάνεται στο 79.9%. Στις 7 μέρες τα μη διεγερμένα κύτταρα

εκφράζουν σε ποσοστό 7.8% τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3, ενώ η προσθήκη της κουρκουμίνης θα προκαλέσει μια άνοδο του ποσοστού αυτού στο 16.4%. Κλείνοντας, όπως και σε υγιείς δότες έτσι και σε ασθενείς με ψωρίαση η κουρκουμίνη προκάλεσε αύξηση του ποσοστού των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων με την άνοδο αυτή να ανέρχεται στο 9% στις 3 μέρες και στο 25% στις 7 μέρες.

Συσχέτιση του δείκτη ενεργοποίησης των κυττάρων CD25 με την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3

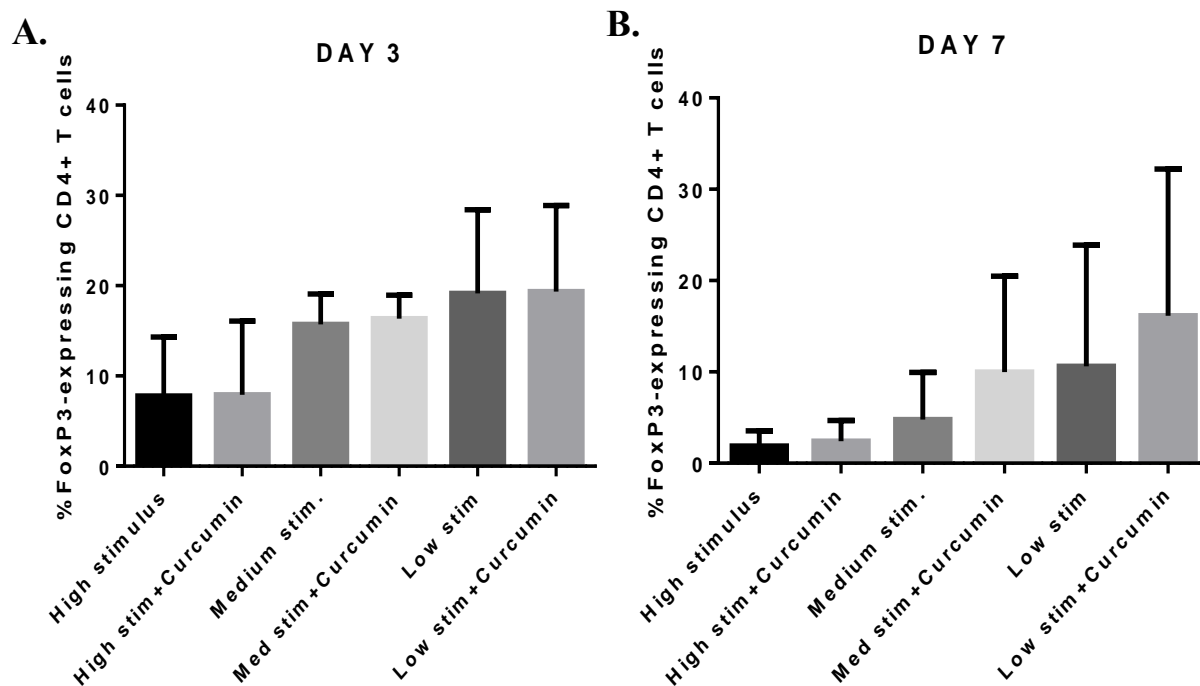


**Εικόνα 18:** Σύγκριση CD25 και FoxP3 παρουσία ή μη του διεγέρτη CD3/CD28 σε υγιή δότη στις 3 και 7 μέρες. **A.** Συσχέτιση του CD25 με το FoxP3 απουσία (αριστερό μέρος) και παρουσία (δεξιό μέρος) του διεγέρτη μετά από 3 μέρες επώασης. **B.** Συσχέτιση του CD25 με το FoxP3 απουσία (αριστερό μέρος) και παρουσία (δεξιό μέρος) του διεγέρτη μετά από 7 μέρες επώασης

Από τα προηγούμενα πειράματα δείχθηκε ότι σε συνθήκες που τα κύτταρα δεν είναι διεγερμένα η κουρκουμίνη μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση των κυττάρων που εκφράζουν FoxP3. Τα κύτταρα αυτά ήταν CD4+CD25hi T κύτταρα και η άνοδος του FoxP3 φάνηκε τόσο στις 3 μέρες επώασης με την κουρκουμίνη όσο και στις 7 μέρες. Ωστόσο, τα κύτταρα αυτά ήταν μη διεγερμένα και το ποσοστό των CD25hi, μέσα στον πληθυσμό στον οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάλυση, ήταν χαμηλό. Έτσι, κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί ένας διεγέρτης που θα προκαλέσει ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των κυττάρων. Ο διεγέρτης αυτός ήταν το CD3/CD28 που στην βιβλιογραφία χρησιμοποιείται κατά κόρον σε κατάλληλο περιβάλλον για την διέγερση και διαφοροποίηση των T κυττάρων σε T ρυθμιστικά κύτταρα (177, 178, 186).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα κυτταρομετρίας ροής φαίνεται στην Εικόνα 18 στα πάνελ Α και Β όπου διακρίνονται τα CD4+CD25hi T κύτταρα (επάνω μέρος) και τα CD4+CD25hiFoxP3+ T κύτταρα (κάτω μέρος) παρουσία ή μη διεγέρτη στις 3 και στις 7 μέρες επώασης. Στις 3 μέρες, απουσία του CD3/CD28 το ποσοστό των CD4+CD25hi T κυττάρων είναι μόλις στο 1.45% με το ποσοστό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων μέσα στον πληθυσμό αυτό να κυμαίνεται στο 73.3%. Όταν τα κύτταρα όμως διεγερθούν τότε ο πληθυσμός των CD4+CD25hi T κυττάρων αποτελεί το 12.0% με το ποσοστό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων μέσα στον πληθυσμό αυτόν να είναι 20.8%. Επομένως, μετά την χρήση του διεγέρτη παρατηρείται να υπάρχει μια πτώση των επιπέδων του FoxP3 όμως αυτό συνοδεύεται με μεγάλη αύξηση του δείκτη ενεργοποίησης των T κυττάρων, του CD25. Αντίστοιχα αποτελέσματα απεικονίζονται και στο πάνελ Β όπου φαίνεται ένα παράδειγμα μετά από 7 μέρες επώασης με τον διεγέρτη. Στην περίπτωση αυτή χωρίς τον διεγέρτη το ποσοστό των CD4+CD25hi T κυττάρων είναι αρχικά 0.71% με τον υποπληθυσμό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων να βρίσκεται στο 67.1%. Όταν τα κύτταρα επωαστούν με το CD3/CD28 τότε το ποσοστό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων είναι 3.64% με το ποσοστό των CD4+CD25hiFoxP3+ T κυττάρων να μειώνεται στο 17.1%. Επομένως, τόσο στις 3 όσο και στις 7 μέρες η χρήση του διεγέρτη μπορεί να μειώνει τα επίπεδα του FoxP3 αλλά παράλληλα καταφέρνει να προκαλέσει αύξηση των CD25high T κυττάρων, κύτταρα που από την βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί ότι μπορεί να διαφοροποιηθούν σε ρυθμιστικά T κύτταρα.

Αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 από την κουλτούρα στις 7 μέρες καλλιέργειας, αλλά όχι στις 3 μέρες σε διάφορες συγκεντρώσεις CD3/28 σε υγιείς δότες

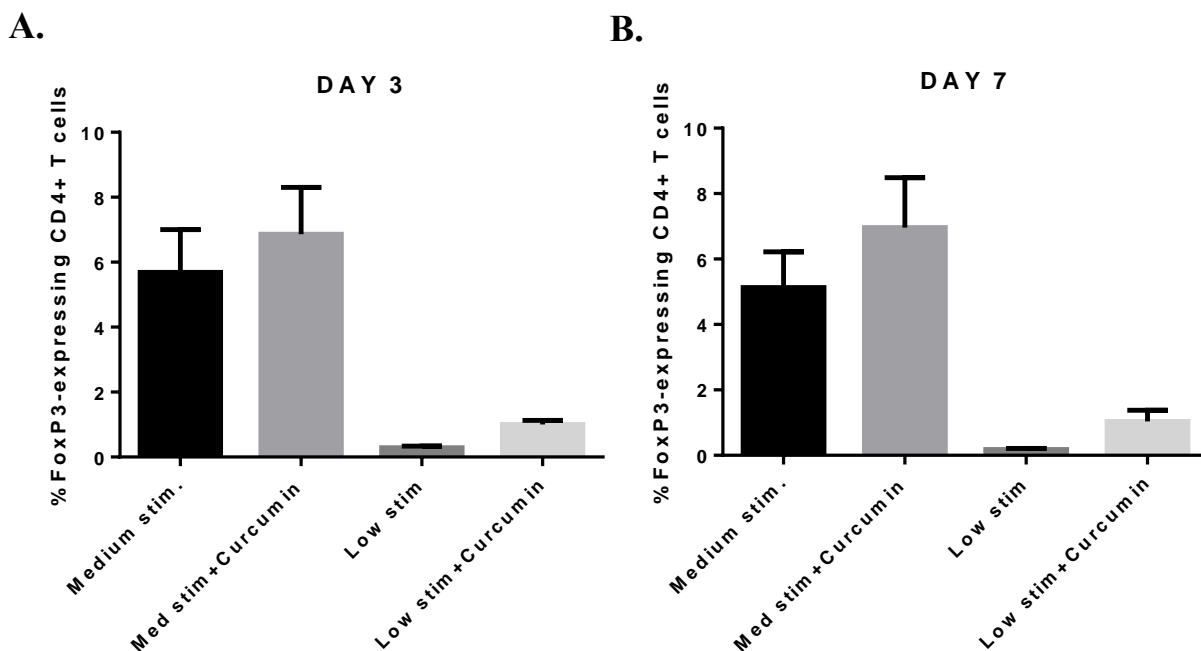


Εικόνα 19 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης του FoxP3 από CD4+ T κύτταρα παρουσία ή μη κουλτούρας στις 3 και 7 μέρες επώασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CD3/CD28 σε υγιείς δότες (n=2). Α. Αύξηση στην έκφραση του FoxP3 από την κουλτούρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διεγέρτη έπειτα από 3 μέρες επώασης. Β. Αύξηση στην έκφραση του FoxP3 από την κουλτούρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διεγέρτη έπειτα από 7 μέρες επώασης

Με βάση τα παραπάνω αποφασίστηκε η χρήση του CD3/CD28 για την διέγερση και διαφοροποίηση των T κυττάρων. Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν ήταν οι ίδιες όπως στα μη διεγερμένα κύτταρα και χρησιμοποιήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις του διεγέρτη. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν μια υψηλή (12.5μl/ml), μια ενδιάμεση (6.25μl/ml) και μία χαμηλή (2.5μl/ml) του διαλυτού διεγέρτη. Στην περίπτωση αυτήν αν και υπήρχε μεγάλη αύξηση των επιπέδων του CD25 (τα δεδομένα δεν δείχνονται) όπως διακρίνεται στην Εικόνα 19 στο πάνελ Α μόνο στις 7 μέρες υπάρχει αύξηση των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων. Στις 3 μέρες και για τις τρεις συγκεντρώσεις του διεγέρτη δεν υπάρχει αύξηση των επιπέδων του FoxP3. Συγκεκριμένα, στην υψηλή συγκέντρωση το Mean ± SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από διέγερση με CD3/CD28 είναι  $7.78 \pm 6.55$ , ενώ με την κουλτούρα είναι  $7.93 \pm 8.16$ . Στην ενδιάμεση συγκέντρωση το παραπάνω ποσοστό από  $15.7 \pm 3.4$  που ήταν χωρίς την κουλτούρα μετατρέπεται σε  $16.35 \pm 2.61$  έπειτα από την χορήγηση αυτής. Τέλος, στην χαμηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζονται ανάλογα αποτελέσματα όπου το Mean ± SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από την διέγερση κυμαίνεται στο  $19.15 \pm 9.26$ , ενώ όταν χορηγηθεί και η κουλτούρα το ποσοστό αυτό μετατρέπεται στο  $19.35 \pm 9.55$ .

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 19 όπου και εκεί απεικονίζεται η διατήρηση των επιπέδων του FoxP3 μετά την χορήγηση της κουρκουμίνης. Ωστόσο, στις 7 μέρες τα αποτελέσματα αλλάζουν και υπάρχει αύξηση των επιπέδων έκφρασης του FoxP3 και στις τρεις συγκεντρώσεις του διεγέρτη. Αρχικά, στην υψηλότερη συγκέντρωση το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων απουσία κουρκουμίνης είναι  $1.87 \pm 1.68$  ενώ μετά της χορήγηση της το ποσοστό των κυττάρων αυξάνεται στο  $2.42 \pm 2.25$ . Στην μεσαία συγκέντρωση το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από την διέγερση με CD3/CD28 είναι  $4.78 \pm 5.15$ , ενώ όταν στα κύτταρα προστεθεί η κουρκουμίνη το ποσοστό των κυττάρων αυξάνεται στο  $10.1 \pm 10.48$ . Τέλος, στην χαμηλή συγκέντρωση το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από την χρήση του διεγέρτη κυμαίνεται στο  $10.63 \pm 13.26$ , ενώ όταν προστεθεί και η κουρκουμίνη υπάρχει μια αύξηση στο  $16.14 \pm 16.07$ . Επομένως, στις 3 μέρες δεν υπάρχει αύξηση των επιπέδων του FoxP3 αλλά το ποσοστό των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων διατηρείται σταθερό μετά την χορήγηση της κουρκουμίνης. Όμως, στις 7 μέρες η κουρκουμίνη ασκεί σημαντική δράση καθώς προκαλεί ισχυρή άνοδο του ποσοστού των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων η οποία για την υψηλή συγκέντρωση φτάνει το 25%, για την ενδιάμεση το 52% και για την χαμηλότερη το 35%.

Αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 από την κουρκουμίνη στις 7 μέρες καλλιέργειας, αλλά όχι στις 3 μέρες σε διάφορες συγκεντρώσεις CD3/28 σε ασθενείς με ψωρίαση

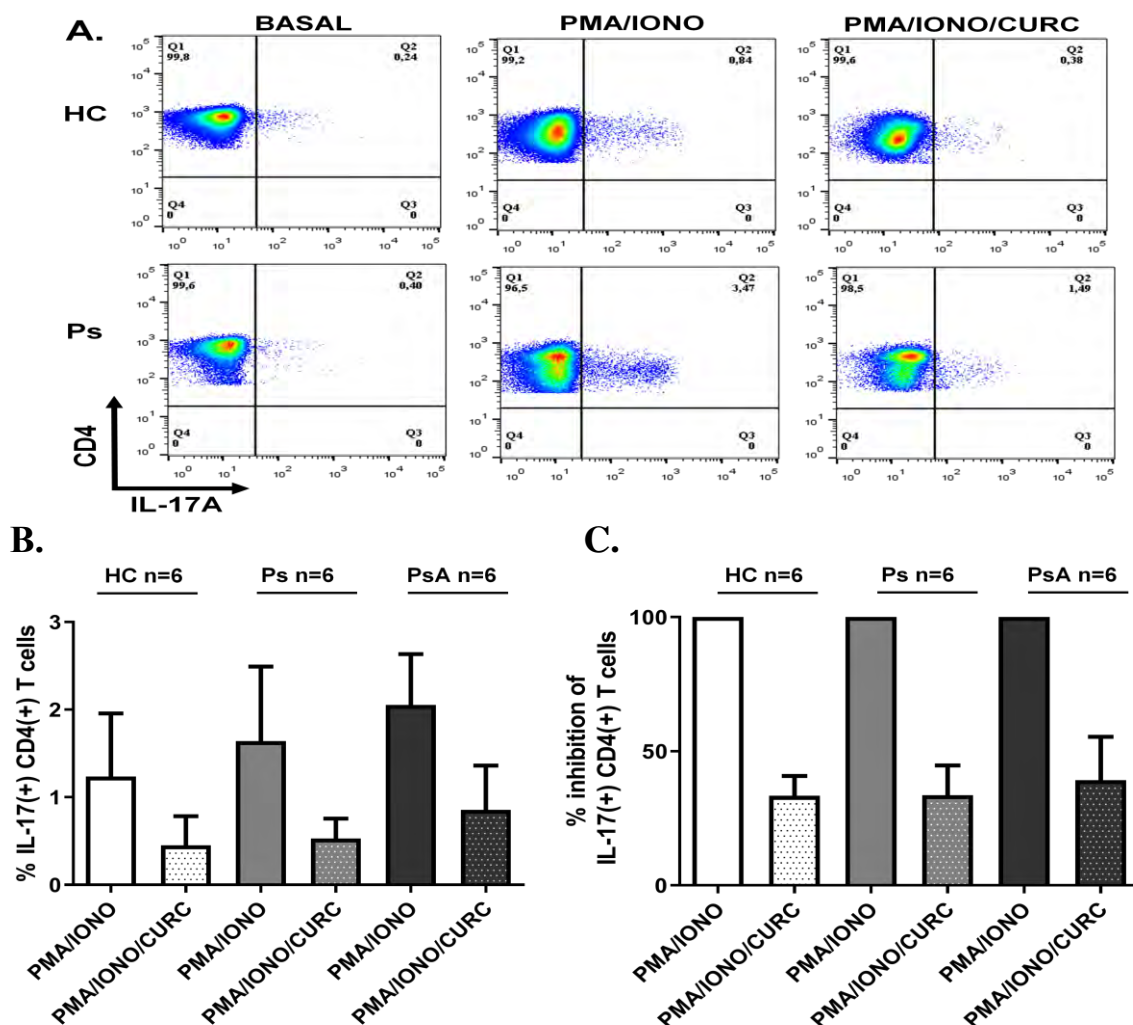


Εικόνα 20 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης του FoxP3 από CD4+ T κύτταρα παρουσία ή μη κουρκουμίνης στις 3 και 7 μέρες επώασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CD3/CD28 σε ασθενείς με ψωρίαση (n=2). Α. Επίδραση της κουρκουμίνης στην έκφραση του FoxP3 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διεγέρτη έπειτα από 3 μέρες επώασης. Β. Επίδραση της κουρκουμίνης στην έκφραση του FoxP3 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διεγέρτη έπειτα από 7 μέρες επώασης.

Σε υγιείς δότες η κουρκουμίνη παρατηρήθηκε άρα ότι προκαλεί αύξηση του ποσοστού των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων. Το επόμενο βήμα ήταν να πραγματοποιηθεί το ίδιο πείραμα και σε ασθενείς με ψωρίαση ώστε να ελεγχθεί αν η δράση της κουρκουμίνης στην αύξηση των ρυθμιστικών κυττάρων ισχύει και σε ασθενείς με ψωρίαση. Έτσι, διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε ότι όπως και στους υγιείς η κουρκουμίνη προκαλεί αύξηση των επιπέδων των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων. Η μόνη διαφορά με το προηγούμενο πείραμα ήταν ότι αφαιρέθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση του διεγέρτη CD3/CD28 καθώς η κουρκουμίνη φάνηκε να μην μπορεί να ασκήσει την αντιφλεγμονώδη δράση της στην συγκέντρωση αυτή. Από το πείραμα αυτό προέκυψε ότι τόσο στις 3 μέρες όσο και στις 7 μέρες η κουρκουμίνη καταφέρνει να επιτύχει τον σκοπό της. Στην Εικόνα 20 στο πάνελ Α φαίνεται η δράση της κουρκουμίνης όσον αναφορά τις 3 μέρες. Έτσι, το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων όταν χρησιμοποιήθηκε η ενδιάμεση συγκέντρωση του διεγέρτη ήταν  $5.69 \pm 1.31$ . Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε μετά την προσθήκη και της κουρκουμίνης φτάνοντας το  $6.85 \pm 1.45$ . Στην χαμηλότερη συγκέντρωση διεγέρτη παρατηρείται επίσης αύξηση καθώς το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από την διέγερση βρίσκεται στο  $0.28 \pm 0.05$ , ενώ η προσθήκη της κουρκουμίνης το μετατρέπει στο  $1.00 \pm 0.13$ . Αντιστοίχως, όπως διακρίνεται στο πάνελ Β και στις 7 μέρες η κουρκουμίνη ασκεί την δράση της καθώς υπάρχει αύξηση του FoxP3. Πιο συγκεκριμένα, το Mean  $\pm$  SD των CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων έπειτα από την διέγερση με την ενδιάμεση συγκέντρωση του CD3/CD28 είναι  $5.13 \pm 1.1$ . Όταν προστεθεί η κουρκουμίνη τότε το ποσοστό αυτό αυξάνεται και φτάνει το  $6.96 \pm 1.52$ . Επιπλέον, αύξηση υπάρχει και με την χρήση της χαμηλότερης συγκέντρωσης CD3/CD28. Υπό την συνθήκη αυτή, το Mean  $\pm$  SD των διεγερμένων CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων υπολογίζεται στο  $0.18 \pm 0.03$  πριν την χορήγηση της κουρκουμίνης. Όταν προστεθεί η ουσία αυτή παρατηρείται αύξηση του ποσοστού αυτού που φτάνει στο  $1.05 \pm 0.34$ . Επομένως, προκύπτει ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την δράση της κουρκουμίνης σε υγιή πληθυσμό επιβεβαιώνονται και σε ασθενείς. Η κουρκουμίνη κατάφερε τόσο στις 3 όσο και στις 7 μέρες να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων CD4+CD25hFoxP3+ T κυττάρων σε δύο συγκεντρώσεις του διεγέρτη CD3/CD28. Η αύξηση αυτήν ήταν σημαντική καθώς για τις 3 μέρες φτάνουν το 19% στην ενδιάμεση συγκέντρωση του διεγέρτη και το 72% στην χαμηλότερη συγκέντρωση. Παρόμοια σημαντική ήταν και στις 7 ημέρες όπου η αύξηση έφτασε το 27% στην ενδιάμεση συγκέντρωση του διεγέρτη και το 83% για την χαμηλότερη συγκέντρωση αυτού.



Η κουρκουμίνη προκαλεί μείωση των CD4+ κυττάρων που παράγουν IL-17 σε ασθενείς με Ψωρίαση και Ψωριασική αρθρίτιδα καθώς και σε υγιείς δότες

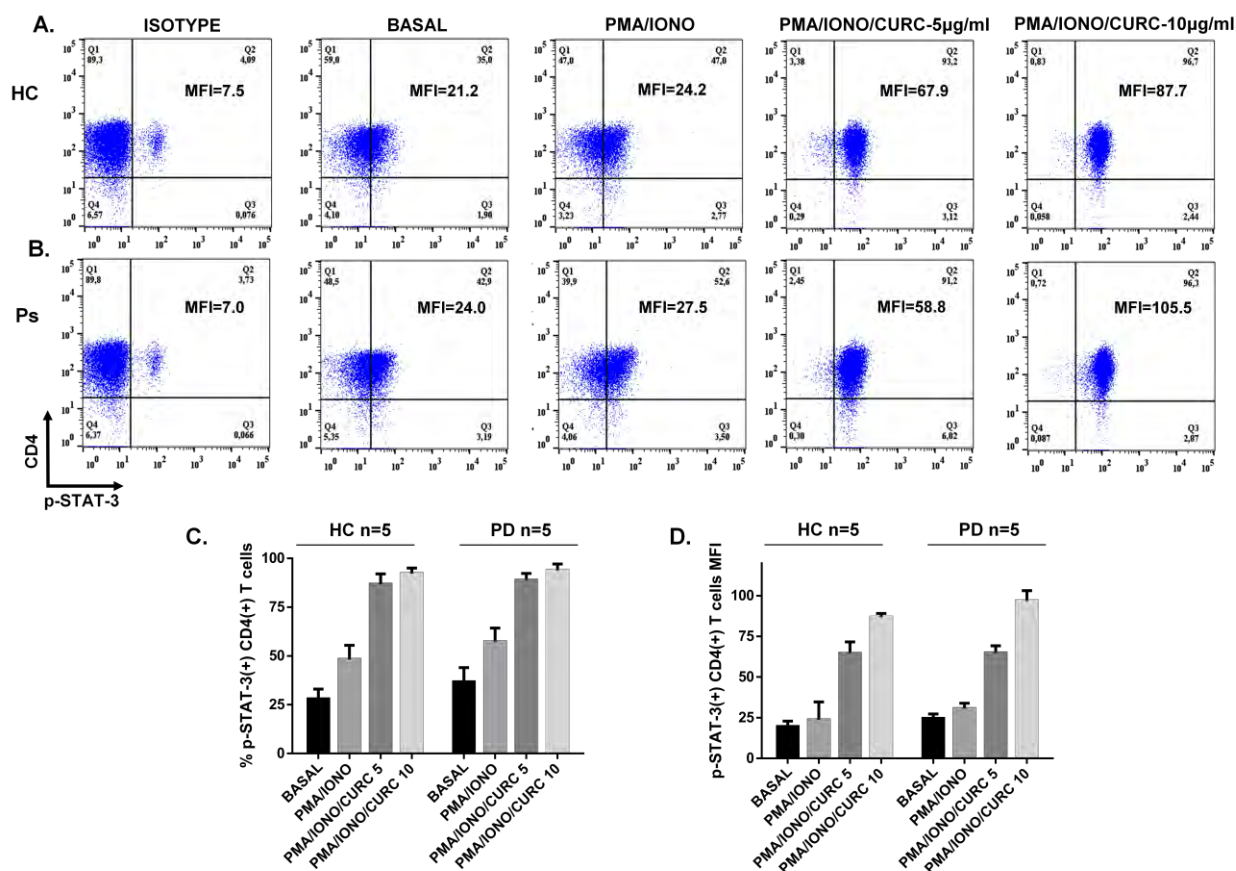


Εικόνα 21 Μείωση στην παραγωγή IL-17 από τα CD4+ T κύτταρα υγιών (n=6) και ασθενών με ψωρίαση (n=6) και ψωριασική αρθρίτιδα (n=6) από την δράση της κουρκουμίνης. Α. Κυτταρομετρική απεικόνιση της δράσης της κουρκουμίνης στα IL-17+CD4+ T κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin. Β. Συγκεντρωτικό διάγραμμα δράσης της κουρκουμίνης σε υγιείς και ασθενείς με Ps και PsA. C. Ποσοστό αναστολής της IFN-γ από τα CD4+ T κύτταρα έπειτα από την χρήση κουρκουμίνης

Καθότι από τα πειράματα μας προκύπτει ότι η κουρκουμίνη πιθανώς να έχει την ικανότητα να αυξάνει τα αντιφλεγμονώδη κύτταρα, θέλαμε να δούμε την επίδραση της στους προφλεγμονώδης κυτταρικούς πληθυσμούς. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της κουρκουμίνης στα CD4+ κύτταρα που παράγουν την προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-17. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, στα πάνελ Α και Β η κουρκουμίνη μπορεί να αναστέλλει σημαντικά το ποσοστό των CD4+ κυττάρων που παράγουν IL-17 τόσο σε υγιείς δότες (Healthy controls, HC) όσο και σε ψωριασικούς ασθενείς. Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε με βάση την βιβλιογραφία χρησιμοποιώντας υψηλότερη δόση κουρκουμίνης (10μg/ml) καθώς το χρονικό διάστημα στο οποίο μελετήθηκε η δράση της δεν ήταν όπως προηγουμένως 3 ή 7 μέρες αλλά

μόνο 7 ώρες. Στο πάνελ Β φαίνεται τόσο το ποσοστό των κυττάρων χωρίς και με κουρκουμίνη που είναι IL-17+CD4+ T κύτταρα από υγιείς και από ψωριασικούς ασθενείς όσο και το ποσοστό της αναστολής που προκαλεί η κουρκουμίνη. Έτσι, προκύπτει ότι το Mean  $\pm$  SD των κυττάρων αυτών έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin είναι για τους υγιείς δότες  $1.25 \pm 0.72$  και η τιμή αυτή φαίνεται έπειτα από την επίδραση με κουρκουμίνη να μειώνεται σε  $0.45 \pm 0.33$  σε ένα δείγμα 6 ατόμων. Επίσης, σε 6 άτομα με Ps και σε 6 με PsA, το Mean  $\pm$  SD των IL-17+CD4+ T κυττάρων έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin μειώθηκε από το αρχικό  $1.64 \pm 0.85$  και  $2.0 \pm 0.59$  στο τελικό  $0.52 \pm 0.22$  και  $0.85 \pm 0.50$  με την χρήση της κουρκουμίνης, αντίστοιχα για την κάθε ομάδα. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της αναστολής αυτής υπάρχει στο πάνελ Α όπου το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IL-17 χωρίς την διέγερση τους είναι 0.24%. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 0.84% έπειτα από διέγερση με PMA/Ionomycin και με την χρήση της κουρκουμίνης το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 0.38% δείχνοντας με τον τρόπο αυτόν την δράση της κουρκουμίνης. Αντίστοιχα, και σε ένα άτομο που έπασχε από Ps αρχικά το ποσοστό ήταν στο 0.45%, έπειτα αυξάνεται στο 3.47% ενώ η κουρκουμίνη προκαλεί πτώση στο 1.49%. Επομένως, όπως είναι διακριτό στο δεύτερο διάγραμμα του πάνελ Β η κουρκουμίνη προκαλεί στα IL-17+CD4+ T κύτταρα μία πτώση της τάξης του 66.7% στους υγιείς, 66.2% στους ασθενείς με Ps και 60.7% στους ασθενείς με PsA.

Η κουρκουμίνη προκαλεί αύξηση της έντασης του φθορισμού του STAT3 στην σερίνη 727 και των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων σε υγιείς και ασθενείς με Ps και PsA



**Εικόνα 22** Δοσο-εξαρτώμενη αύξηση του STAT3 έπειτα από την χορήγηση κουρκουμίνης. **A.** Κυτταρομετρική απεικόνιση της αύξησης των επιπέδων του STAT3 σε υγιή δότη έπειτα από χρήση δύο συγκεντρώσεων κουρκουμίνης. **B.** Κυτταρομετρική απεικόνιση της αύξησης των επιπέδων του STAT3 σε ασθενή με Ps έπειτα από χρήση δύο συγκεντρώσεων κουρκουμίνης. **C.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αύξησης των CD4+p-STAT3+ T κυττάρων μέσω της κουρκουμίνης. **D.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αύξησης του MFI των CD4+p-STAT3+ T κυττάρων μέσω της κουρκουμίνης

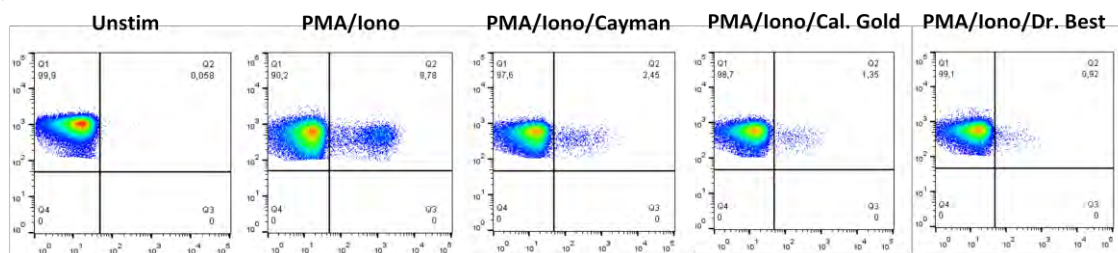
Από τα προηγούμενα ευρήματα προέκυψε ότι η κουρκουμίνη προκαλεί μείωση των IL-17+CD4+ T κυττάρων τόσο σε υγιείς όσο και ασθενείς με ψωριασική νόσο. Για να εξηγηθεί η δράση αυτή έγινε μελέτη της κουρκουμίνης σε μοριακό επίπεδο. *In vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι υπεύθυνο σε ένα βαθμό για την ανάπτυξη της IL-17 καθώς και για την αυτοανοσία που προκαλεί αυτή είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι του STAT3 (187). Το γεγονός αυτό αν συνδυαστεί με το ότι η κουρκουμίνη αναστέλλει την μεσολαβούμενη από IL-6 φωσφορυλίωση του STAT3 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (188) οδήγησε στο να μελετήσουμε την φωσφορυλίωση του STAT3 σε κύτταρα υγιών και ασθενών με Ps ή PsA. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως παρομοίως και σε αυτήν την πειραματική διαδικασία λόγω του σύντομου χρονικού διαστήματος που χρησιμοποιήθηκε η κουρκουμίνη επιλέχθηκαν δύο πιο υψηλές δόσεις της κουρκουμίνης, τα 5µg/ml και τα 10µg/ml. Από την μελέτη αυτή προέκυψε ότι η

κουρκουμίνη δοδο-εξαρτώμενα μπορεί να προκαλέσει μία αύξηση των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων καθώς και της φωσφορυλίωσης του STAT3(S727) όπως φαίνεται στα επίπεδα του MFI. Στα πάνελ Α και Β της Εικόνας 22 διακρίνεται ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα κυτταρομετρίας ροής των επιπέδων των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων και του MFI τους σε υγιείς και ασθενείς, αντίστοιχα. Στο παράδειγμα του υγιούς δότη (πάνελ Α) φαίνεται ότι το βασικό χωρίς διεγέρτη ποσοστό των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων είναι 35% με MFI:21.2. Το ποσοστό αυτό μετά την διέγερση με PMA/Ionomycin γίνεται 47% με MFI:24.2 ενώ η κουρκουμίνη στα 5μg/ml αυξάνει το ποσοστό στο 93.2% με MFI:67.9 και στα 10μg/ml στο 96.7% με MFI:87.8. Αντίστοιχα μεγάλη είναι και η αύξηση στον ασθενή που πάσχει με ψωρίαση (πάνελ Β). Το βασικό ποσοστό των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων είναι 42.9% με MFI:24, ενώ με PMA αυξάνεται στο 52.6% με MFI:27.5 και με κουρκουμίνη στα 5 και 10μg/ml μετατρέπεται σε 91.2% με MFI: 58.8 και 96.3% με MFI:105.5, αντίστοιχα. Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από 5 υγιείς δότες και 5 άτομα με ψωριασική νόσο ( 3 Ps και 2 PsA) απεικονίζονται στο πάνελ Γ. Στα διαγράμματα αυτά φαίνεται ότι το Mean ± SD των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων χωρίς τον διεγέρτη είναι 28 ± 5.0 με το αντίστοιχο MFI να είναι 19.6 ± 3.3 στους υγιείς και 36.8 ± 7.2 με MFI:24.6 ± 2.7 για τους ψωριασικούς ασθενείς. Έπειτα από την χορήγηση PMA/Ionomycin το Mean ± SD και το MFI των κυττάρων αυξήθηκε σε 48.3 ± 7.1 με MFI: 30.6 ± 3.3 για τους υγιείς και σε 57.3 ± 7.0 με MFI: 24.4 ± 5.3 για τους ψωριασικούς ασθενείς. Η χρήση της κουρκουμίνης προκάλεσε αύξηση του ποσοστού αυτού των p-STAT3+CD4+ T κυττάρων καθώς και του ανάλογου MFI. Στα 5μg/ml η κουρκουμίνη προκάλεσε άνοδο του Mean ± SD και του MFI σε 86.8 ± 5.2 με MFI: 64.6 ± 7.1 στους υγιείς και 88.8 ± 3.5 με MFI: 65.2 ± 4.3 στους ψωριασικούς ασθενείς. Τέλος, υψηλότερη δόση της κουρκουμίνης στα 10μg/ml έδειξε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του Mean ± SD και του MFI με το ποσοστό να είναι 92.3 ± 2.8 με MFI: 86.8 ± 2.4 για τους υγιείς και 93.8 ± 3.3 με MFI: 96.8 ± 6.4 για τους ψωριασικούς ασθενείς.

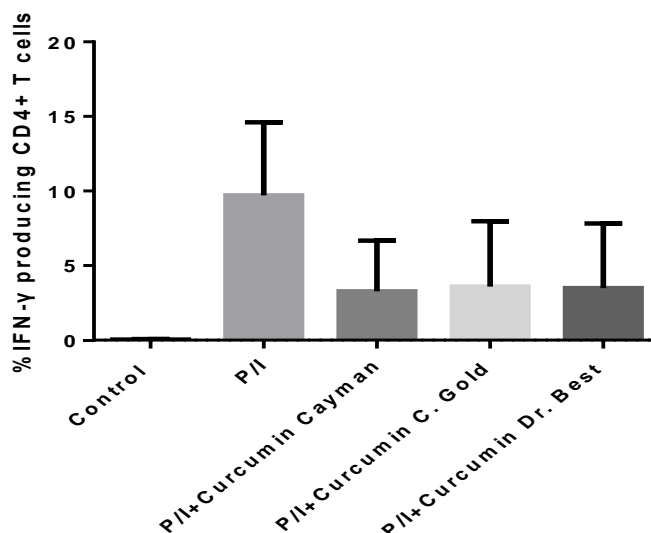
Εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα κουρκουμίνης προκαλούν μείωση στην παραγωγή IFN-γ από τα CD4+ T κύτταρα από υγιείς δότες

Παράλληλα με το κύριο μέρος της εργασίας που αφορούσε την ανοσοτροποποιητική δράση της κουρκουμίνης, πραγματοποιήθηκε και μελέτη σχετικά με ορισμένα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα της κουρκουμίνης. Αυτό το κομμάτι των πειραμάτων φαίνεται να μην έχει άμεση σχέση με την δράση της κουρκουμίνης σαν ανοσοτροποποιητικό στους ρυθμιστικούς πληθυσμούς όπως μελετήθηκε στα προηγούμενα πειράματα. Ωστόσο, προηγούμενη δημοσίευση της επιστημονικής μας ομάδας ανέδειξε τον ρόλο της κουρκουμίνης στην IFN-γ. Έτσι, αφορμώμενοι από την μελέτη αυτή κρίθηκε απαραίτητο να συγκριθεί η δράση της καθαρής κουρκουμίνης με τα προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο. Τα παραπάνω σκευάσματα ήταν το Curcumin C3 Complex with BioPiperine της California Gold Nutrition (iHerb, Moreno County, CA, U.S.A.) και το High Absorption Curcumin from turmeric root with C3 complex and BioPiperine της Dr. Best (Xiamen Kingdomway, Xiamen, Fujian, China). Αυτά τα δύο σκευάσματα διαθέτουν πιπερίνη για αύξηση της βιοαπορρόφησης καθώς και κουρκουμίνη σε ποσοστό 75-81%. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε, με βάση προηγούμενα πειράματα για την δόσο-εξαρτώμενη δράση της κουρκουμίνης, ήταν τα 10μg/ml. Η συγκέντρωση αυτήν χρησιμοποιήθηκε τόσο για τα δύο σκευάσματα της κουρκουμίνης όσο και για την καθαρή κουρκουμίνη της Cayman (Cayman chemicals, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) έτσι ώστε να συγκριθούν οι δράσεις τους.

A.



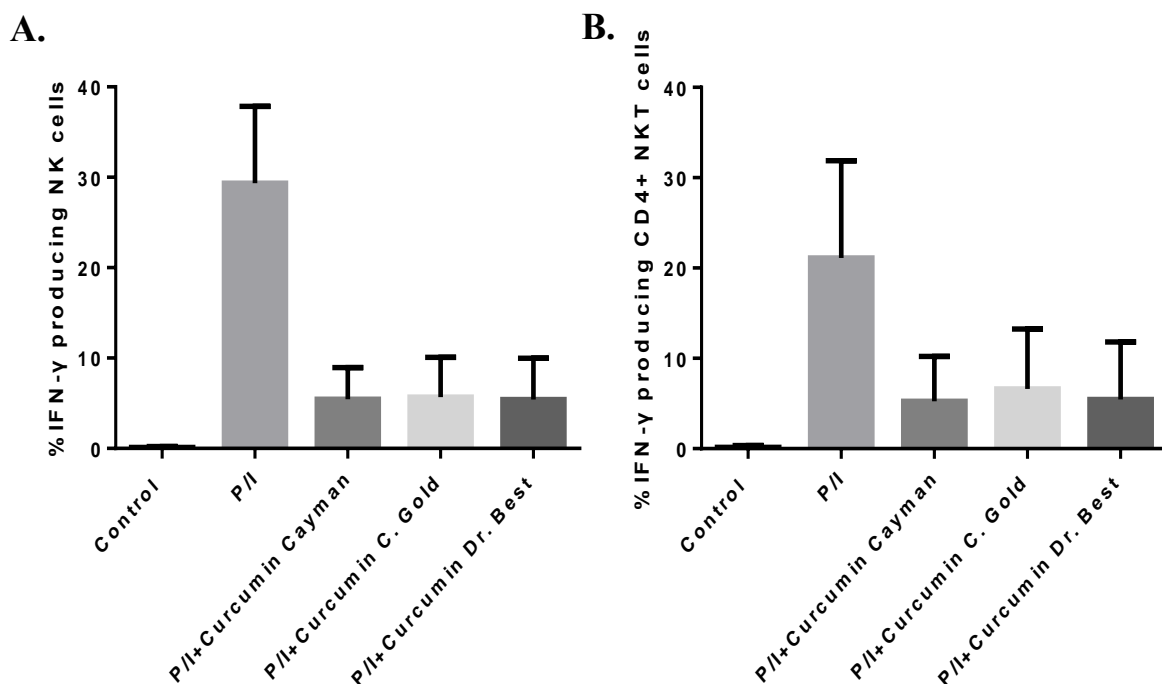
B.



Εικόνα 23 Μείωση των IFN- $\gamma$ +CD4+ T κυττάρων μετά από χορήγηση σκευασμάτων κουρκουμίνης σε υγιείς δότες (n=7). A. Κυτταρομετρική απεικόνιση της μείωσης των IFN- $\gamma$ +CD4+ T κυττάρων από διάφορα σκευάσματα κουρκουμίνης B. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μείωσης της παραγωγής IFN- $\gamma$  από τα CD4+ T κύτταρα από διάφορα σκευάσματα κουρκουμίνης

Αρχικά, για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω μελετήθηκε η επίδραση των σκευασμάτων της Cal. Gold και Dr. Best σε CD4+ T κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, η μείωση της IFN- $\gamma$  από την κουρκουμίνη της Cayman είναι αντίστοιχη με αυτήν που περιγράφεται στην δημοσίευση. Με το ποσοστό της πτώσης του Mean των IFN- $\gamma$ +CD4+ T κύτταρα να φτάνει το 68%. Ανάλογα αποτελέσματα ισχύουν και για τα δύο σκευάσματα όπου το ποσοστό αναστολής για την California Gold είναι 64% ενώ για την Dr. Best είναι 64%. Ένα παράδειγμα της αναστολής της κουρκουμίνης διακρίνεται στην Εικόνα 23 πάνελ A όπου φαίνεται η παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα διεγερμένα με PMA/Ionomycin κύτταρα καθώς και από αυτά που επώαστηκαν με κουρκουμίνη της Cayman, με το σκεύασμα της California Gold και με το σκεύασμα της Dr. Best. Τα ποσοστά που αναφέρθηκαν προκύπτουν σε δείγμα 7 υγιών ατόμων όπου τα IFN- $\gamma$ +CD4+ T κύτταρα που έχουν διεγερθεί με PMA/Ionomycin εμφανίζουν Mean  $\pm$  SD ίσο με  $9.71 \pm 4.89$ , ενώ για τα σκευάσματα της κουρκουμίνης είναι  $3.58 \pm 4.39$  και  $3.50 \pm 4.33$ , αντίστοιχα. Επομένως, από τα νούμερα αυτά προκύπτει ότι όσον αφορά τον πληθυσμό των CD4+ T κυττάρων η κουρκουμίνη και τα σκευάσματα αναστέλλουν το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  κατά 68% η κουρκουμίνη της Cayman και κατά 64% τα σκευάσματα.

Εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα κουρκουμίνης προκαλούν μείωση στην παραγωγή IFN-γ από τα NK κύτταρα και τα NKT κύτταρα από υγιείς δότες



**Εικόνα 24** Μείωση των IFN-γ+CD56+ NK κυττάρων και των IFN-γ+ CD4+ CD56+ NKT κυττάρων μετά από χορήγηση σκευασμάτων κουρκουμίνης σε υγιείς δότες (n=7). **A.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μείωσης της παραγωγής IFN-γ από τα NK κύτταρα από διάφορα σκευάσματα κουρκουμίνης. **B.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μείωσης της παραγωγής IFN-γ από τα CD4+ NKT κύτταρα από διάφορα σκευάσματα κουρκουμίνης

Πέρα των CD4+ T κυττάρων η επίδραση των σκευασμάτων της κουρκουμίνης μελετήθηκε και στα κύτταρα που εκφράζουν CD56 δηλαδή στα NK κύτταρα, καθώς και σε εκείνα που εκφράζουν CD4 και CD56 δηλαδή στα CD4+ NKT κύτταρα. Τόσο για τα NK κύτταρα όσο και για τα CD4+ NKT κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα 7 υγιών ατόμων. Τα IFN-γ+CD56+ NK κύτταρα που έχουν διεγερθεί με PMA/Ionomycin εμφανίζουν Mean  $\pm$  SD το οποίο ισούται με  $29.36 \pm 8.49$ , ενώ για τα σκευάσματα της κουρκουμίνης είναι: για της California Gold  $5.67 \pm 4.40$  και για της Dr. Best  $5.42 \pm 4.56$ . Επίσης, για την κουρκουμίνη της Cayman είναι  $5.45 \pm 3.48$  πράγμα που μεταφράζεται σε πτώση των NK κυττάρων που παράγουν IFN-γ της τάξης του 82% ποσοστό που είναι ελαφρώς υψηλότερο απ' ό τι περιγράφηκε στην προηγούμενη δημοσίευση μας. Αντίστοιχα, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 24 στο πάνελ A, η πτώση των NK κυττάρων που παράγουν IFN-γ είναι για την California Gold 81% και για την Dr. Best της τάξης του 82%.

Στην Εικόνα 24, εκτός των NK κυττάρων απεικονίζονται στο πάνελ B και τα CD4+ NKT κύτταρα στα οποία εντοπίζεται πτώση των κυττάρων που παράγουν IFN-γ όπως και στα NK κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, τα IFN-γ+CD4+CD56+ NKT κύτταρα που έχουν διεγερθεί με

PMA/Ionomycin παρουσιάζουν Mean  $\pm$  SD που είναι  $21.13 \pm 10.75$ , ενώ για τα διαφορετικά σκευάσματα της κουρκουμίνης είναι  $6.61 \pm 6.63$  για την California Gold και  $5.43 \pm 6.39$  για την Dr. Best. Επίσης, για την κουρκουμίνη της Cayman το Mean  $\pm$  SD ήταν  $5.26 \pm 4.96$ . Έτσι, όπως είναι διακριτό και στην Εικόνα 24 στο πάνελ B, υπάρχει μια πτώση του ποσοστού των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ . Το ποσοστό της αναστολής αυτής είναι συγκρίσιμο μεταξύ των τριών προϊόντων της κουρκουμίνης με την κουρκουμίνη της Cayman να έχει ποσοστό αναστολής 76%, της California Gold να είναι 69% και της Dr. Best να είναι 75%. Σχετικά με την κουρκουμίνη της Cayman σε αυτό τον λεμφοκυτταρικό πληθυσμό το ποσοστό της αναστολής των κυττάρων είναι κοντά με το αντίστοιχο που αναφέρεται στην προαναφερθείσα δημοσίευση.

## 5.Συζήτηση

Η μελέτη ανέδειξε ότι η κουρκουμίνη προκαλεί αύξηση στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 από τα CD4+CD25hi T κύτταρα ασθενών με ψωρίαση έπειτα από 7 μέρες καλλιέργειας. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε υγιείς δότες με την αύξηση των επιπέδων να παρατηρείται ήδη από τις 3 ημέρες. Επίσης, η κουρκουμίνη προκάλεσε πτώση των CD4+ T κυττάρων που παράγουν IL-17 (Th17) Αυτή η *in vitro* επίδραση της κουρκουμίνης παρατηρήθηκε τόσο σε ασθενείς με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα, όσο και σε υγιείς. Τέλος, η κουρκουμίνη αύξησε την ενεργοποίηση του STAT όπως φαίνεται από την αύξηση της φωσφορυλίωσης στην σερίνη 727 του STAT3 και στην αύξηση των p-STAT3+ CD4+ T κύτταρα από ασθενείς και σε υγιείς. Τέλος, όταν εξετάστηκε η επίδραση εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων κουρκουμίνης στα CD4+ και CD56+ κύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  από κύτταρα υγιών δοτών βρέθηκε μια μεγάλη πτώση της παραγωγής της IFN- $\gamma$ .

Από την μελέτη αυτή φαίνεται μία αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3, ένα παράγοντα που αποτελεί δείκτη των Tregs, τόσο παρουσία όσο και με απουσία διέγερσης. Τα αποτελέσματα αυτά διαφωνούν με εκείνα της μελέτης των Zhao et al (189) η οποία δείχνει μείωση του FoxP3 μετά από καλλιέργεια με κουρκουμίνη.. Ωστόσο, τα πειράματα των Zhao και συνεργατών διενεργήθηκαν σε σπληνοκύτταρα ποντικών και αναφέρεται σε περιορισμένη δράση της κουρκουμίνης μόνο στις πρώτες 24 ώρες επώασης με την ουσία αυτή (189). Αντίθετα, αποτελέσματα σύμφωνα με τα δικά μας έχουν προκύψει από την μελέτη των Kim et al (97) που έδειξαν την αύξηση του FoxP3 μετά από μεγάλο διάστημα επώασης με κουρκουμίνης, όπως και στην περίπτωση μας. Η ουσία αυτήν στις 3 ημέρες δεν κατάφερε να προκαλέσει αύξηση του FoxP3. Όμως, στις 7 ημέρες, μέσω και της αύξησης του TGF- $\beta$ , η κουρκουμίνη φαίνεται να προκαλεί σημαντική αύξηση του FoxP3. Παρά τα σημαντικά ευρήματα της μελέτης



των Kim et al, στην δημοσίευση τους οι ερευνητές δεν αναφέρονται καθόλου στην επίδραση της κουρκουμίνης σε κύτταρα ασθενών με ψωρίαση. Αντιθέτως, μελετάται η δράση της κουρκουμίνης σε πληθυσμό CD4+ κυττάρων και γίνεται μια γενική συνοπτική αναφορά στην επίδραση της κουρκουμίνης στα μονοκύτταρα (97). Άλλες δημοσιεύσεις έχουν επίσης τονίσει την επίδραση της κουρκουμίνης στα δενδριτικά και μονοκύτταρα και πως τα κύτταρα αυτά επάγουν την δημιουργία Tregs (95, 190). Έτσι, μελετώντας PBMCs καταφέραμε να παρατηρήσουμε την αύξηση του FoxP3 όπως αυτήν προκαλείται από την απευθείας δράση της κουρκουμίνης στα CD4 ή πιθανόν έμμεσα μέσω επίδρασης της σε κάποιον άλλο πληθυσμό, προφανώς στα μονοκύτταρα ή δενδριτικά.

Μία σημαντική διαφορά της μελέτης μας σε σχέση με άλλες ήταν ότι η δράση της κουρκουμίνης μελετήθηκε τόσο σε διεγερμένα όσο και μη διεγερμένα κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά αν και το ποσοστό των CD4+CD25hi κυττάρων είναι σημαντικά μικρότερο όταν δεν χρησιμοποιείται το CD3/CD28, μετά από την επώαση με την κουρκουμίνη παρουσιάζεται μία αύξηση των επιπέδων του FoxP3. Η αύξηση αυτήν εντοπίζεται στους ασθενείς μετά από 7 ημέρες καλλιέργειας, ενώ στους υγιείς παρατηρείται ήδη από τις 3 ημέρες. Ωστόσο, στα πειράματα με απουσία του CD3/CD28, τα ενεργοποιημένα κύτταρα (δηλαδή αυτά που εκφράζουν το CD25) βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Η χρήση του διεγέρτη προκαλεί μείωση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν FoxP3, ωστόσο υπάρχει υψηλότερο ποσοστό κυττάρων που δυνητικά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε Tregs. Για τον λόγο αυτό στα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκε ο διεγέρτης CD3/CD28, παρουσία του οποίου φαίνεται ότι η κουρκουμίνη μπορεί να προκαλέσει σημαντικότερη αύξηση των επιπέδων του FoxP3. Εκτός από τα πειράματα με ή χωρίς την χρήση διεγέρτη ελέγχθηκαν επίσης και δύο διαφορετικά medium για την καλλιέργεια και την διαφοροποίηση των κυττάρων (τα δεδομένα δεν δείχνονται). Από τα πειράματα αυτά βρέθηκε ότι το medium ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium είναι καταλληλότερο για την καλλιέργεια και διαφοροποίηση των κυττάρων σε μακροχρόνιες καλλιέργειες σε σχέση με το RPMI.

Δεδομένα που υποστηρίζουν την ανοσορυθμιστική δράση της κουρκουμίνης στηρίζονται επιπρόσθετα στην επίδραση της σε προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες. Ένα από τα ευρήματα της έρευνας αυτής ήταν ότι η κουρκουμίνη *in vitro* μειώνει τα κύτταρα που παράγουν IL-17 σε ποσοστό μέχρι και 66% τόσο σε ψωριασικούς ασθενείς όσο και σε υγιείς. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό μιας και διάφοροι βιολογικοί παράγοντες, που στοχεύουν την IL-17, χρησιμοποιούνται σήμερα για την αποτελεσματική θεραπεία των ψωριασικών παθήσεων. Η ανασταλτική επίδραση της κουρκουμίνης στην IL-17 έχει παρατηρηθεί και σε άλλες ασθένειες με παρόμοια αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η μείωση της IL-17 ως αποτέλεσμα της

αντιφλεγμονώδους δράσης της κουργουμίνης έχει φανεί σε μελέτες στηριγμένες στο μοντέλο της collagen induced arthritis (CIA), ένα από τα πιο διαδεδομένα μοντέλα της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (119, 191). Επίσης, η κουργουμίνη βρέθηκε να επιδρά ευεργετικά στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα μέσω αναστολής στην παραγωγή της IL-17 (192). Τέλος, η κουργουμίνη δρα ανασταλτικά σε ένα ζωικό μοντέλο που προσομοιάζει με την ψωρίαση (Imiquimod-induced psoriasis) καθώς και στην διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, σε κυτταρικές σειρές (98, 193).

Ακόμα ένας από τους κύριους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν και η διερεύνηση της επίδρασης της κουργουμίνης στον μεταγραφικό παράγοντα STAT3. Τόσο ο STAT3 όσο και το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB απαιτούνται για την έκφραση της IL-17 σε μοντέλο τρωκτικών που έπασχαν από αρθρίτιδα (194). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κουργουμίνη προκαλεί αναστολή στην φωσφορυλίωση του STAT3 στην τυροσίνη 705 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές επάγοντας αλλαγή προς Th1 προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις (195-197). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε την φωσφορυλίωση του STAT3 στην σερίνη 727 και βρήκαμε ότι είναι αυξημένη σε CD4+ T κύτταρα παρουσία κουργουμίνης.

Σε μία μελέτη όπου αξιολογήθηκε τόσο η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη όσο και στην σερίνη, ένα μικρό μόριο το FLL32 σχεδιασμένο από την κουργουμίνη ανέστειλε την φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 705 αλλά όχι στην σερίνη 727 (198). Η κουργουμίνη μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση των CD4+ T κυττάρων και πιθανώς βοηθά στην διαφοροποίησή τους σε Tregs (97, 199, 200). Το STAT3 έχει έναν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των κυττάρων σε CD4+CD25+FoxP3+ ρυθμιστικά κύτταρα (186, 201). Άλλες *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η κουργουμίνη αναστέλλει την διαφοροποίηση των κυττάρων σε Th1 και Th17 αποκρίσεις, ενώ παράλληλα επάγει αντι-φλεγμονώδεις φαινοτύπους σε δενδριτικά κύτταρα με αυξημένη έκφραση του STAT3 και μειωμένη έκφραση της IL-12b και της IL-23a (110).

Τέλος, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν και δύο εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα της κουργουμίνης. Θεωρήσαμε ότι αυτό ήταν αναγκαίο να γίνει γιατί μέχρι πριν είχαμε δεδομένα σε κουργουμίνη που χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς. Ορισμένες μελέτες έχουν τονίσει κάποια από τα προβλήματα της κουργουμίνης όσον αφορά την χορήγηση της. Το βασικότερο πρόβλημα της ουσίας αυτής είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της, ο υψηλός ρυθμός μεταβολισμού και αποβολής της (20-22). Για τον λόγο αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι φυσικοί και μη παράγοντες ώστε να ξεπεραστούν τα θέματα αυτά. Ένας φυσικός παράγοντας είναι η πιπερίνη μια ουσία του μαύρου πιπεριού η οποία όπως αναφέρεται σε μελέτες που

πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια αλλά και ανθρώπους προκαλεί μια ραγδαία αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της κουρκουμίνης (23-25). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα της κουρκουμίνης στα οποία περιέχεται πιπερίνη. Τα σκευάσματα αυτά βρέθηκε ότι μπορούν να δράσουν μειώνοντας τα επίπεδα της προ-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IFN- $\gamma$  σε CD4+ T κύτταρα και NK κύτταρα.

Παρά τα πρωτότυπα ευρήματα της, η μελέτη μας είχε και ορισμένους περιορισμούς. Καταρχάς, θα έπρεπε να ελεγχθεί μεγαλύτερος αριθμός υγιών και ασθενών, ώστε να προκύψουν πιο αξιόπιστα δεδομένα και επομένως συμπεράσματα. Δεύτερον, απαραίτητη είναι η περαιτέρω έρευνα σε μοριακό επίπεδο με σκοπό να διερευνηθεί πως δρα η κουρκουμίνη πέραν της ενεργοποίησης του STAT3. Επίσης, ο σχεδιασμός της μελέτης συμπεριέλαβε αυτήν *in vitro* πειράματα. Για να αποκτήσουν κλινική σημασία τα δεδομένα αυτά θα ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθούν *in vivo* μελέτες και οι ασθενείς που θα λάβουν κουρκουμίνη θα πρέπει να μελετηθούν πριν και μετά τη λήψη της. Μεγάλες κλινικές μελέτες θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν ώστε να αποτιμηθεί η δράση της κουρκουμίνης συμπληρωματικά με διάφορες θεραπείες στην ψωριασική νόσο καθώς και όσων αφορά την ανασταλτική της δράση στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών από διάφορους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Επίσης, οι μελέτες αυτές θα βοηθήσουν και στην εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης στην οποία η ουσία αυτήν ασκεί την ανοσορυθμιστική της δράση. Αν και οι μελέτες αυτές είναι χρήσιμες, οι δόσεις που χρησιμοποιούνται στην εργασία αυτήν περιλαμβάνονται στο εύρος των 0.5-2 gr κουρκουμίνης που είναι η συνιστώμενη δόση σε διάφορες φαρμακοκινητικές μελέτες (202). Τέλος, εξίσου σημαντικό θα ήταν και οι μελέτες σε ζωικά μοντέλα ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητή η επίδραση της στους ιστούς καθώς και του μοριακού μηχανισμού της.

Συμπερασματικά η μελέτη αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς ανέδειξε την δράση της κουρκουμίνης σε επίπεδο προ-φλεγμονωδών αλλά και αντι-φλεγμονωδών αποκρίσεων, τονίζοντας την ισχυρή ανοσορυθμιστική της δράση τόσο σε υγιείς όσο και ασθενείς που έπασχαν από ψωριασική νόσο. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν στο ότι η κουρκουμίνη και κυρίως τα διάφορα εμπορικά σκευάσματα της θα μπορούσαν να βοηθήσουν σαν ανοσορυθμιστικά δρώντας ενδεχομένως συμπληρωματικά της ενδεδειγμένης φαρμακευτικής θεραπείας της.

## 6.Βιβλιογραφία

1. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*. 2017;6(10).
2. Prasad S, Aggarwal BB. Turmeric, the Golden Spice: From Traditional Medicine to Modern Medicine. In: nd, Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Boca Raton (FL)2011.
3. Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(22):5308-32.
4. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014;19(12):20091-112.
5. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(3):283-99.
6. Farooqui T, Farooqui AA. Curcumin: Historical Background, Chemistry, Pharmacological Action, and Potential Therapeutic Value chapter 2. In: Farooqui T, Farooqui AA, editors. *Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders*2019. p. 23-44.
7. Srinivasan KR. A chromatographic study of the curcuminoids in *Curcuma longa*, L. *J Pharm Pharmacol*. 1953;5(7):448-57.
8. Schraufstatter E, Bernt H. Antibacterial action of curcumin and related compounds. *Nature*. 1949;164(4167):456.
9. Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett*. 1985;29(2):197-202.
10. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem*. 1995;270(42):24995-5000.
11. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.
12. Agrawal DK, Mishra PK. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. *Med Res Rev*. 2010;30(5):818-60.
13. Zhang J, Jinnai S, Ikeda R, Wada M, Hayashida S, Nakashima K. A simple HPLC-fluorescence method for quantitation of curcuminoids and its application to turmeric products. *Anal Sci*. 2009;25(3):385-8.
14. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(12):1867-76.
15. Barclay LR, Vinqvist MR, Mukai K, Goto H, Hashimoto Y, Tokunaga A, et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org Lett*. 2000;2(18):2841-3.
16. Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(4):338-78.
17. Zhang L, Zhu W, Yang C, Guo H, Yu A, Ji J, et al. A novel folate-modified self-microemulsifying drug delivery system of curcumin for colon targeting. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:151-62.
18. Tonnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1985;180(5):402-4.
19. Hoehle SI, Pfeiffer E, Solyom AM, Metzler M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J Agric Food Chem*. 2006;54(3):756-64.
20. Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(1):105-11.
21. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(6):1411-7.

22. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):2895-900.
23. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007;4(6):807-18.
24. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998;64(4):353-6.
25. Ryu EK, Choe YS, Lee KH, Choi Y, Kim BT. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J Med Chem.* 2006;49(20):6111-9.
26. Liu W, Zhai Y, Heng X, Che FY, Chen W, Sun D, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target.* 2016;24(8):694-702.
27. Ramalingam P, Ko YT. Enhanced oral delivery of curcumin from N-trimethyl chitosan surface-modified solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic and brain distribution evaluations. *Pharm Res.* 2015;32(2):389-402.
28. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3-4):223-30.
29. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm.* 2007;330(1-2):155-63.
30. Gupta NK, Dixit VK. Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline. *J Pharm Sci.* 2011;100(5):1987-95.
31. P SPI, P. R, S. S, S. U, T. S. Study on antioxidant and antimicrobial activities of turmeric clear liquid soap for wound treatment of HIV patients. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST).* 2005(27):569-78.
32. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int.* 2014;2014:186864.
33. De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1592-7.
34. Kundu P, De R, Pal I, Mukhopadhyay AK, Saha DR, Swarnakar S. Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3 and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. *PLoS One.* 2011;6(1):e16306.
35. Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M. Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(4):1065-72.
36. Kim HJ, Yoo HS, Kim JC, Park CS, Choi MS, Kim M, et al. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J Ethnopharmacol.* 2009;124(2):189-96.
37. Kim K, Kim KH, Kim HY, Cho HK, Sakamoto N, Cheong J. Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Lett.* 2010;584(4):707-12.
38. Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol Carcinog.* 2006;45(5):320-32.
39. Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer.* 2005;113(6):951-60.
40. Barthelemy S, Vergnes L, Moynier M, Guyot D, Labidalle S, Bahraoui E. Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Res Virol.* 1998;149(1):43-52.
41. Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, et al. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51163-71.

42. James JS. Curcumin: clinical trial finds no antiviral effect. *AIDS Treat News*. 1996(no 242):1-2.
43. McCarty MF. Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. *Integr Cancer Ther*. 2004;3(4):349-80.
44. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001;20(52):7597-609.
45. Vellampatti S, Chandrasekaran G, Mitta SB, Lakshmanan VK, Park SH. Metallo-Curcumin-Conjugated DNA Complexes Induces Preferential Prostate Cancer Cells Cytotoxicity and Pause Growth of Bacterial Cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):14929.
46. Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*. 2009;16(10):916-22.
47. Moghtaderi H, Sepehri H, Attari F. Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:582-94.
48. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(14):4491-9.
49. Epelbaum R, Schaffer M, Vizel B, Badmaev V, Bar-Sela G. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutr Cancer*. 2010;62(8):1137-41.
50. Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, Vareed S, Neuman M, Rodriguez L, et al. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(3):354-64.
51. He ZY, Shi CB, Wen H, Li FL, Wang BL, Wang J. Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer Invest*. 2011;29(3):208-13.
52. Sahebkar A, Serban M-C, Ursoniu S, Banach M. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of functional foods*. 2015:898-909.
53. Panahi Y, Alishiri GH, Parvin S, Sahebkar A. Mitigation of Systemic Oxidative Stress by Curcuminoids in Osteoarthritis: Results of a Randomized Controlled Trial. *J Diet Suppl*. 2016;13(2):209-20.
54. Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P. Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs. *Curr Med Chem*. 2014;21(2):204-22.
55. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:105-25.
56. Dai C, Tang S, Li D, Zhao K, Xiao X. Curcumin attenuates quinocetone-induced oxidative stress and genotoxicity in human hepatocyte L02 cells. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(4):340-6.
57. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, et al. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(5):475-84.
58. Bhandarkar SS, Arbiser JL. Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:185-95.
59. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74.
60. Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS*. 1999;107(1):80-5.
61. Li H, Soria C, Griscelli F, Opolon P, Soria J, Yeh P, et al. Amino-terminal fragment of urokinase inhibits tumor cell invasion in vitro and in vivo: respective contribution of the urokinase plasminogen activator receptor-dependent or -independent pathway. *Hum Gene Ther*. 2005;16(10):1157-67.
62. Santibanez JF, Quintanilla M, Martinez J. Genistein and curcumin block TGF-beta 1-induced u-PA expression and migratory and invasive phenotype in mouse epidermal keratinocytes. *Nutr Cancer*. 2000;37(1):49-54.
63. Parra M, Lluís F, Miralles F, Caelles C, Muñoz-Canoves P. The cJun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway mediates induction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) by the alkylating agent MNNG. *Blood*. 2000;96(4):1415-24.

64. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):363-98.
65. Chen WH, Chen Y, Cui GH. Effects of TNF-alpha and curcumin on the expression of VEGF in Raji and U937 cells and on angiogenesis in ECV304 cells. *Chin Med J (Engl).* 2005;118(24):2052-7.
66. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;34(1-2):109-15.
67. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med.* 1998;4(6):376-83.
68. Mohammadi Z, Sharif Zak M, Majdi H, Mostafavi E, Barati M, Lotfimehr H, et al. The effect of chrysin-curcumin-loaded nanofibres on the wound-healing process in male rats. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):1642-52.
69. Topman G, Lin FH, Gefen A. The natural medications for wound healing - Curcumin, Aloe-Vera and Ginger - do not induce a significant effect on the migration kinematics of cultured fibroblasts. *J Biomech.* 2013;46(1):170-4.
70. Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound Repair Regen.* 1999;7(5):362-74.
71. Mohanty C, Das M, Sahoo SK. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Mol Pharm.* 2012;9(10):2801-11.
72. Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem.* 2006;290(1-2):87-96.
73. Dai M, Zheng X, Xu X, Kong X, Li X, Guo G, et al. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:595126.
74. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and Health. *Molecules.* 2016;21(3):264.
75. Liu ZJ, Li ZH, Liu L, Tang WX, Wang Y, Dong MR, et al. Curcumin Attenuates Beta-Amyloid-Induced Neuroinflammation via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Function in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol.* 2016;7:261.
76. Wang YL, J.F., Wang, Y.T., Xu, C.Y., Hua, L.L. Yang, X.P., Geng, S., Wang, S.S., Wang, Z., Yin, H.L. Curcumin reduces hippocampal neuron apoptosis and JNK-3 phosphorylation in rats with A $\beta$ -induced Alzheimer's disease: protecting spatial learning and memory. *Journal of Neurorestoratology.* 2017;5:117-23.
77. Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:197-212.
78. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res.* 2004;75(6):742-50.
79. Sharma N, Nehru B. Curcumin affords neuroprotection and inhibits alpha-synuclein aggregation in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model. *Inflammopharmacology.* 2018;26(2):349-60.
80. Tripanichkul W, Jaroensuppaperch EO. Curcumin protects nigrostriatal dopaminergic neurons and reduces glial activation in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian mice model. *Int J Neurosci.* 2012;122(5):263-70.
81. Khatri DK, Juvekar AR. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016;150-151:39-47.
82. Meesarapee B, Thampithak A, Jaisin Y, Sanvarinda P, Suksamrarn A, Tuchinda P, et al. Curcumin mediates neuroprotective effect through attenuation of quinoprotein formation, p-p38 MAPK expression, and caspase-3 activation in 6-hydroxydopamine treated SH-SY5Y cells. *Phytother Res.* 2014;28(4):611-6.
83. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5698931.

84. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2):141-53.
85. Rahardjo B, Widjanto E, Sujuti H, Keman K. Different levels of IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  in monocyte cultures exposed by plasma preeclampsia and normotensive pregnancy. *Pregnancy Hypertens*. 2014;4(3):187-93.
86. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Simental-Mendia LE, Majeed M, et al. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. *Biomed Pharmacother*. 2016;82:578-82.
87. Reuter S, Gupta SC, Park B, Goel A, Aggarwal BB. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes Nutr*. 2011;6(2):93-108.
88. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*. 1999;39(1):41-7.
89. Guimaraes MR, Leite FR, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C, Jr. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. *Arch Oral Biol*. 2013;58(10):1309-17.
90. Yadav R, Jee B, Awasthi SK. Curcumin Suppresses the Production of Pro-inflammatory Cytokine Interleukin-18 in Lipopolysaccharide Stimulated Murine Macrophage-Like Cells. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):109-12.
91. Gao X, Kuo J, Jiang H, Deeb D, Liu Y, Divine G, et al. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(1):51-61.
92. Kang BY, Song YJ, Kim KM, Choe YK, Hwang SY, Kim TS. Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. *Br J Pharmacol*. 1999;128(2):380-4.
93. Campbell NK, Fitzgerald HK, Malara A, Hambly R, Sweeney CM, Kirby B, et al. Naturally derived Heme-Oxygenase 1 inducers attenuate inflammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment. *Sci Rep*. 2018;8(1):10287.
94. Zhao G, Liu Y, Yi X, Wang Y, Qiao S, Li Z, et al. Curcumin inhibiting Th17 cell differentiation by regulating the metabotropic glutamate receptor-4 expression on dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2017;46:80-6.
95. Rogers NM, Kireta S, Coates PT. Curcumin induces maturation-arrested dendritic cells that expand regulatory T cells in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(3):460-73.
96. Maier E, Kurz K, Jenny M, Schennach H, Ueberall F, Fuchs D. Food preservatives sodium benzoate and propionic acid and colorant curcumin suppress Th1-type immune response in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(7):1950-6.
97. Kim G, Jang MS, Son YM, Seo MJ, Ji SY, Han SH, et al. Curcumin inhibits CD4(+) T cell activation, but augments CD69 expression and TGF- $\beta$ 1-mediated generation of regulatory T cells at late phase. *PLoS One*. 2013;8(4):e62300.
98. Varma SR, Sivaprakasam TO, Mishra A, Prabhu S, M R, P R. Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin. *Eur J Pharmacol*. 2017;813:33-41.
99. Zhao Y, Sun J, Dou W, Hu JH. Curcumin inhibits proliferation of interleukin-22-treated HaCaT cells. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):9580-4.
100. Skyvalidas D, Mavropoulos A, Tsiogkas S, Dardiotis E, Liaskos C, Mamuris Z, et al. Curcumin mediates attenuation of pro-inflammatory interferon gamma and interleukin 17 cytokine responses in psoriatic disease, strengthening its role as a dietary immunosuppressant. *Nutr Res*. 2020;75:95-108.
101. Kang D, Li B, Luo L, Jiang W, Lu Q, Rong M, et al. Curcumin shows excellent therapeutic effect on psoriasis in mouse model. *Biochimie*. 2016;123:73-80.
102. Sun J, Zhao Y, Hu J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1 $\beta$  and IL-6 production in mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e67078.
103. Antiga E, Bonciolini V, Volpi W, Del Bianco E, Caproni M. Oral Curcumin (Meriva) Is Effective as an Adjuvant Treatment and Is Able to Reduce IL-22 Serum Levels in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Biomed Res Int*. 2015;2015:283634.



104. Carrion-Gutierrez M, Ramirez-Bosca A, Navarro-Lopez V, Martinez-Andres A, Asin-Llorca M, Bernd A, et al. Effects of Curcuma extract and visible light on adults with plaque psoriasis. *Eur J Dermatol.* 2015;25(3):240-6.
105. Kurd SK, Smith N, VanVoorhees A, Troxel AB, Badmaev V, Seykora JT, et al. Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: A prospective clinical trial. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(4):625-31.
106. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol.* 2002;168(12):6506-13.
107. Seyedzadeh MH, Safari Z, Zare A, Gholizadeh Navashenaq J, Razavi SA, Kardar GA, et al. Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function. *Int Immunopharmacol.* 2014;22(1):230-5.
108. Kanakasabai S, Casalini E, Walline CC, Mo C, Chearwae W, Bright JJ. Differential regulation of CD4(+) T helper cell responses by curcumin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Nutr Biochem.* 2012;23(11):1498-507.
109. Mohajeri M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Javan M. Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair. *Neuropharmacology.* 2015;99:156-67.
110. Bruck J, Holstein J, Glocova I, Seidel U, Geisel J, Kanno T, et al. Nutritional control of IL-23/Th17-mediated autoimmune disease through HO-1/STAT3 activation. *Sci Rep.* 2017;7:44482.
111. Dolati S, Ahmadi M, Aghebti-Maleki L, Nikmaram A, Marofi F, Rikhtegar R, et al. Nanocurcumin is a potential novel therapy for multiple sclerosis by influencing inflammatory mediators. *Pharmacol Rep.* 2018;70(6):1158-67.
112. Dolati S, Ahmadi M, Rikhtegar R, Babaloo Z, Ayromlou H, Aghebati-Maleki L, et al. Changes in Th17 cells function after nanocurcumin use to treat multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol.* 2018;61:74-81.
113. Dolati S, Babaloo Z, Ayromlou H, Ahmadi M, Rikhtegar R, Rostamzadeh D, et al. Nanocurcumin improves regulatory T-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2019;327:15-21.
114. Kloesch B, Becker T, Dietersdorfer E, Kiener H, Steiner G. Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes. *Int Immunopharmacol.* 2013;15(2):400-5.
115. Ahn JK, Kim S, Hwang J, Kim J, Lee YS, Koh EM, et al. Metabolomic Elucidation of the Effects of Curcumin on Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145539.
116. Okamoto YT, M., Fukui, T., Masuzawa, T. Inhibition of interleukin 17 production by curcumin in mice with collagen-induced arthritis. *Biomedical Research.* 2011;22(3).
117. Huang G, Xu Z, Huang Y, Duan X, Gong W, Zhang Y, et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production. *J Clin Immunol.* 2013;33(3):550-7.
118. Moon DO, Kim MO, Choi YH, Park YM, Kim GY. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1beta-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(5):605-10.
119. Funk JL, Oyarzo JN, Frye JB, Chen G, Lantz RC, Jolad SD, et al. Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. *J Nat Prod.* 2006;69(3):351-5.
120. Chen L, Liu T, Wang Q, Liu J. Anti-inflammatory effect of combined tetramethylpyrazine, resveratrol and curcumin in vivo. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):233.
121. Zheng Z, Sun Y, Liu Z, Zhang M, Li C, Cai H. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4931-42.
122. Chandran B, Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytother Res.* 2012;26(11):1719-25.
123. Amalraj A, Varma K, Jacob J, Divya C, Kunnumakkara AB, Stohs SJ, et al. A Novel Highly Bioavailable Curcumin Formulation Improves Symptoms and Diagnostic Indicators in Rheumatoid Arthritis Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Dose, Three-Arm, and Parallel-Group Study. *J Med Food.* 2017;20(10):1022-30.

124. Hemmati AA, Rajaei E, Houshmand G, A. FA, MalAmir4 DM-, S. H, et al. STUDY THE EFFECTS OF ANTI-INFLAMMATORY CURCUMEX CAPSULES CONTAINING THREE PLANTS (GINGER,CURCUMIN AND BLACK PEPPER) IN PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS. *IIOABJ*. 2016;7:389-92.
125. Jacob JA, A, Raj, K.K.J. ,Divya, C., Kunnumakkara, A.B,Gopi, S. A novel bioavailable hydrogenated curcuminoids formulation (CuroWhite™) improves symptoms and diagnostic indicators in rheumatoid arthritis patients - A randomized, double blind and placebo controlled study. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2018;9(4):246-352.
126. Javadi M, Khadem Haghighian H, Goodarzy S, Abbasi M, Nassiri-Asl M. Effect of curcumin nanomicelle on the clinical symptoms of patients with rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, controlled trial. *Int J Rheum Dis*. 2019;22(10):1857-62.
127. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*. 2011;12(3):332-47.
128. Shin HK, Kim J, Lee EJ, Kim SH. Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations. *Phytother Res*. 2010;24(4):577-82.
129. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *J Neurochem*. 2007;102(2):522-38.
130. Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep*. 2006;15(6):1557-62.
131. Liao S, Xia J, Chen Z, Zhang S, Ahmad A, Miele L, et al. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of Notch-1 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2011;112(4):1055-65.
132. Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*. 2006;106(11):2503-13.
133. Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene*. 2006;25(2):278-87.
134. Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Ralhan R. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Chem Biol Interact*. 2009;181(2):263-71.
135. Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, et al. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res*. 2002;62(19):5451-6.
136. Yan C, Jamaluddin MS, Aggarwal B, Myers J, Boyd DD. Gene expression profiling identifies activating transcription factor 3 as a novel contributor to the proapoptotic effect of curcumin. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(2):233-41.
137. Jung EM, Park JW, Choi KS, Park JW, Lee HI, Lee KS, et al. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through CHOP-independent DR5 upregulation. *Carcinogenesis*. 2006;27(10):2008-17.
138. Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM. Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:127-48.
139. Chen A, Xu J. Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(3):G447-56.
140. Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res*. 2009;1282:133-41.
141. Lev-Ari S, Starr A, Vexler A, Karaush V, Loew V, Greif J, et al. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity. *Anticancer Res*. 2006;26(6B):4423-30.
142. Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(3):511-45.

143. Sameermahmood Z, Balasubramanyam M, Saravanan T, Rema M. Curcumin modulates SDF-1alpha/CXCR4-induced migration of human retinal endothelial cells (HRECs). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3305-11.
144. Hasmeda M, Polya GM. Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry*. 1996;42(3):599-605.
145. Jurrmann N, Brigelius-Flohe R, Bol GF. Curcumin blocks interleukin-1 (IL-1) signaling by inhibiting the recruitment of the IL-1 receptor-associated kinase IRAK in murine thymoma EL-4 cells. *J Nutr*. 2005;135(8):1859-64.
146. Rajasingh J, Raikwar HP, Muthian G, Johnson C, Bright JJ. Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK-STAT pathway in T cell leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):359-68.
147. Rafiee P, Nelson VM, Manley S, Wellner M, Floer M, Binion DG, et al. Effect of curcumin on acidic pH-induced expression of IL-6 and IL-8 in human esophageal epithelial cells (HET-1A): role of PKC, MAPKs, and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G388-98.
148. Johnson SM, Gulhati P, Arrieta I, Wang X, Uchida T, Gao T, et al. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3185-90.
149. Reddy S, Aggarwal BB. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett*. 1994;341(1):19-22.
150. Gururajan M, Dasu T, Shahidain S, Jennings CD, Robertson DA, Rangnekar VM, et al. Spleen tyrosine kinase (Syk), a novel target of curcumin, is required for B lymphoma growth. *J Immunol*. 2007;178(1):111-21.
151. Cohen AN, Veena MS, Srivatsan ES, Wang MB. Suppression of interleukin 6 and 8 production in head and neck cancer cells with curcumin via inhibition of Ikappa beta kinase. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135(2):190-7.
152. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl4-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol*. 2008;73(2):399-409.
153. Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol*. 2007;576(1-3):34-42.
154. Grandjean-Laquerriere A, Antonicelli F, Gangloff SC, Guenounou M, Le Naour R. UVB-induced IL-18 production in human keratinocyte cell line NCTC 2544 through NF-kappaB activation. *Cytokine*. 2007;37(1):76-83.
155. Fahey AJ, Adrian Robins R, Constantinescu CS. Curcumin modulation of IFN-beta and IL-12 signalling and cytokine induction in human T cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):1129-37.
156. Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med*. 2007;19(3):469-74.
157. Wang X, Wang Q, Ives KL, Evers BM. Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5346-55.
158. Kobayashi T, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of Dermatophagoides farinea-induced interleukin-5 (IL-5) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) production by lymphocytes from bronchial asthmatics. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(7):819-24.
159. Parada E, Buendia I, Navarro E, Avendano C, Egea J, Lopez MG. Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(9):1690-700.
160. Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*. 2003;24(9):1515-24.
161. Dairaku I, Han Y, Yanaka N, Kato N. Inhibitory effect of curcumin on IMP dehydrogenase, the target for anticancer and antiviral chemotherapy agents. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(1):185-7.
162. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *J Mol Signal*. 2007;2:10.

163. Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R, Raveendran Nair PK, Fonseca H, Khatib Z, et al. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines. *Anticancer Res.* 2005;25(5):3293-302.
164. Moos PJ, Edes K, Mullally JE, Fitzpatrick FA. Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(9):1611-7.
165. Lee CW, Lin WN, Lin CC, Luo SF, Wang JS, Pouyssegur J, et al. Transcriptional regulation of VCAM-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in human tracheal smooth muscle cells: involvement of MAPKs, NF-kappaB, p300, and histone acetylation. *J Cell Physiol.* 2006;207(1):174-86.
166. Shen SQ, Zhang Y, Xiang JJ, Xiong CL. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol.* 2007;13(13):1953-61.
167. Kunnumakkara AB, Diagaradjane P, Anand P, Harikumar KB, Deorukhkar A, Gelovani J, et al. Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model. *Int J Cancer.* 2009;125(9):2187-97.
168. Saito K, Pignon P, Ayyoub M, Valmori D. Modulation of Cytokine Secretion Allows CD4 T Cells Secreting IL-10 and IL-17 to Simultaneously Participate in Maintaining Tolerance and Immunity. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145788.
169. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):3834-42.
170. Baran J, Kowalczyk D, Ozog M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(2):303-13.
171. Abrams SI, Bray RA, Brahmi Z. Mechanism of action of phorbol myristate acetate on human natural killer cell activity. *Cell Immunol.* 1983;80(2):230-40.
172. Lee HC. Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem.* 1993;268(1):293-9.
173. Ye C, Brand D, Zheng SG. Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3:2.
174. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):283-94.
175. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol.* 2015;36(12):763-77.
176. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* 2006;108(5):1571-9.
177. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med.* 2010;8:104.
178. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods.* 2003;275(1-2):251-5.
179. Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 2002;130(3):1102-8.
180. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
181. McCoy JP, Jr. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002;16(2):229-43.
182. Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:116.
183. Matheu MP, Cahalan MD. Isolation of CD4+ T cells from mouse lymph nodes using Miltenyi MACS purification. *J Vis Exp.* 2007(9):409.
184. Krutzik PO, Trejo A, Schulz KR, Nolan GP. Phospho flow cytometry methods for the analysis of kinase signaling in cell lines and primary human blood samples. *Methods Mol Biol.* 2011;699:179-202.
185. Wu S, Jin L, Vence L, Radvanyi LG. Development and application of 'phosphoflow' as a tool for immunomonitoring. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(6):631-43.

186. Pallandre JR, Brillard E, Crehange G, Radlovic A, Remy-Martin JP, Saas P, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol.* 2007;179(11):7593-604.
187. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol.* 2007;179(7):4313-7.
188. Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol.* 2003;171(7):3863-71.
189. Zhao GJ, Lu ZQ, Tang LM, Wu ZS, Wang DW, Zheng JY, et al. Curcumin inhibits suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in mice in vitro. *Int Immunopharmacol.* 2012;14(1):99-106.
190. Cong Y, Wang L, Konrad A, Schoeb T, Elson CO. Curcumin induces the tolerogenic dendritic cell that promotes differentiation of intestine-protective regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(11):3134-46.
191. Okamoto Y, Tanaka M, Fukui T, Masuzawa T. Brazilian propolis inhibits the differentiation of Th17 cells by inhibition of interleukin-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2012;34(5):803-9.
192. Xie L, Li XK, Funeshima-Fuji N, Kimura H, Matsumoto Y, Isaka Y, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(5):575-81.
193. Kang NW, Kim MH, Sohn SY, Kim KT, Park JH, Lee SY, et al. Curcumin-loaded lipid-hybridized cellulose nanofiber film ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. *Biomaterials.* 2018;182:245-58.
194. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB, et al. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol.* 2006;176(9):5652-61.
195. Liu Y, Wang X, Zeng S, Zhang X, Zhao J, Zhang X, et al. The natural polyphenol curcumin induces apoptosis by suppressing STAT3 signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):303.
196. Alexandrow MG, Song LJ, Altiock S, Gray J, Haura EB, Kumar NB. Curcumin: a novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2012;21(5):407-12.
197. Lee H, Pal SK, Reckamp K, Figlin RA, Yu H. STAT3: a target to enhance antitumor immune response. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;344:41-59.
198. Lin L, Deangelis S, Foust E, Fuchs J, Li C, Li PK, et al. A novel small molecule inhibits STAT3 phosphorylation and DNA binding activity and exhibits potent growth suppressive activity in human cancer cells. *Mol Cancer.* 2010;9:217.
199. Handono K, Pratama MZ, Endharti AT, Kalim H. Treatment of low doses curcumin could modulate Th17/Treg balance specifically on CD4+ T cell cultures of systemic lupus erythematosus patients. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(4):461-9.
200. Park MJ, Moon SJ, Lee SH, Yang EJ, Min JK, Cho SG, et al. Curcumin attenuates acute graft-versus-host disease severity via in vivo regulations on Th1, Th17 and regulatory T cells. *PLoS One.* 2013;8(6):e67171.
201. Boenisch O, Lopez M, Elyaman W, Magee CN, Ahmad U, Najafian N. Ex vivo expansion of human Tregs by rabbit ATG is dependent on intact STAT3-signaling in CD4(+) T cells and requires the presence of monocytes. *Am J Transplant.* 2012;12(4):856-66.
202. Ma Z, Wang N, He H, Tang X. Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application. *J Control Release.* 2019;316:359-80.